

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

**Optimalizace modelu alergického astmatu
u potkana**

(Rigorózní práce)

Vedoucí rigorózní práce: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Hradec Králové, 2007

Mgr. Hana RADOVÁ

Dovoluji si poděkovat PharmDr. Janě Pourové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a pomoc při vypracování této rigorózní 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. Patogeneze asthma bronchiale.....	10
	1.1 Buňky podílející se na patogenezi asthma bronchiale.....	10
	1.2 Proteiny, enzymy a další mediátory podílející se na patogenezi asthma bronchiale.....	26
	2. Možnosti sledování aktivity chronického eozinofilního zánětu u asthma bronchiale.....	33
	3. Laboratorní zvířata.....	45
	3.1 Etické zásady práce s laboratorními zvířaty.....	45
	3.2 Laboratorní potkan (<i>Rattus norvegicus</i>).....	47
III.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	55
	1. Použitý materiál.....	56
	2. Metodika.....	58
IV.	VÝSLEDKY.....	64
	1. Sledování hmotnosti zvířat.....	65
	2. Sledování buněk v bronchoalveolární laváži.....	65
	2.1 Porovnání dvou časových intervalů.....	65
	2.2 Srovnání dvou kmenů potkanů, Wistar a Brown Norway, v časovém intervalu za 24 hodin.....	73
	3. Stanovení EPO a proteinů.....	79
V.	DISKUZE.....	83
VI.	ZÁVĚR.....	88
VII.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	91

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAT	α_1 -antitrypsin
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
BAL	bronchoalveolární laváž
CD znaky	cluster of differentiation – označení lymfocytárních antigenů
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CSF	faktor stimulující kolonie
CXC	chemokiny obsahující skupinu CXC
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
ECM	extracelulární matrix
ECP	eozinofilní kationický protein
EDN	eozinofily produkovaný neurotoxin
EG	monoklonální protilátky pro ECP
EPO	eozinofilní peroxidáza
EPX	eozinofilní protein X
Fc	receptory pro Fc fragmenty imunoglobulinů
FEV ₁	jednosekundová vitální kapacita plic
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
15-HETE	15-hydroxytetraenoická kyselina
ICAM	intercelulární AM
IFN γ	interferon γ
Ig	imunoglobuliny
IL	interleukiny
IUPS	International Union of Physiological Sciences
LFA	antigen asociovaný s funkcí lymfocytů (lymphocyte function-associated antigen)
LT	leukotrieny
MAF	faktor aktivující makrofágy
MBP	hlavní bazický protein
MCP	monocytární chemotaktické proteiny patřící mezi CC chemokiny

M-CSF	faktor stimulující kolonie makrofágů
MIF	faktor inhibující migraci makrofágů
MIP	macrophage inflammatory protein
MMP-9	proteáza neutrofilů
MPO	myeloperoxidáza
mRNA	informační ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
NK	přirození zabíječi (natural killers)
NS	nesenzibilizovaná zvířata
OA	ovalbumin
OPD	o-fenylendiamin
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
ROI	toxické kyslíkové radikály
S	senzibilizovaná zvířata
SCF	růstový faktor kmenových buněk (stem cell factor)
TGF	transformující růstový faktor
Th	pomocné T-lymfocyty
TNF	tumor nekrotizující faktor
TX	tromboxany
VC	celková plicní kapacita
VLA	very late (activation) antigen

I. ÚVOD

Asthma bronchiale patří mezi onemocnění postihující významnou část celosvětové populace. Je nejčastější chronickou nemocí dětského věku a představuje nezanedbatelnou medicínskou, sociální i ekonomickou zátěž pro nemocného, jeho rodinu, ale i pro celou společnost. (25)

Na světě je dnes asi 300 milionů astmatiků. Toto onemocnění se vyskytuje ve všech oblastech světa, častější je v zemích ekonomicky více rozvinutých. V Evropě a Spojených státech je prevalence astmatu 5–10 %, u dětí 10–15 %. Celková prevalence astmatu v ČR se pohybuje kolem 8 %, u dětí je vyšší, 12–15 %. Diagnóza astmatu je však i v ČR v praxi lékaři stále podhodnocována. Odhaduje se, že je u nás nedidiagnostikováno cca 250 000–350 000 astmatiků. (25)

Dvě třetiny všech diagnostikovaných případů astmatu spadají do dětského věku a do puberty. V dětství převažuje výskyt astmatu u chlapců (téměř 2:1 k dívkám), ústup příznaků po pubertě se pak pozoruje rovněž častěji u chlapců, zejména při negativní anamnéze atopie. V pubertě se poměr pohlaví vyrovnává a ve věku nad 40 let významně převažují ženy. Vliv ženských pohlavních hormonů naznačuje často pozorovaná exacerbace obtíží před menstruací nebo v jejím průběhu (premenstruální astma). U žen se také udává vyšší mortalita zvláště v souvislosti s vyšší incidencí astmatu s rychlým a nepředvídatelným nástupem zhoršení. (25)

Prevalence astmatu se v různých částech světa podstatně liší, vyšší je na severní a západní polokouli, ovšem s výjimkou Austrálie (11,9 % v Melbourne), Nového Zélandu a Brazílie, kde výskyt odpovídá Severní Americe. Tradičně se uvádí nízký výskyt mezi Eskymáky v kontrastu s Karolínami či Maledivami, kde je postižena polovina celkové populace. Výskyt se výrazně liší i v rámci jedné oblasti, prevalence na ostrovech Papua – Nová Guinea, které jsou v blízkosti Karolín, je také prakticky nulová. (25)

Astma postihuje příslušníky všech ras a o výskytu rozhodují mnohem více faktory prostředí než faktory genetické. Výskyt astmatu je spojován s řadou rizikových faktorů, mezi které patří např. kouření tabáku, expozice alergenům, znečištěné ovduší, anamnéza alergie či astmatu v rodině atd. (25)

Vzhledem k tomu, že asthma bronchiale je poměrně časté onemocnění, jak v dospělé, tak v dětské populaci, je potřeba stále vyvíjet novou léčbu. Pokrok ve farmacii a v medicíně je však 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. Zvlášť 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 dnes užívá mnoho živočišných druhů, zejména však myši, potkanů, morčat, králíků, opic, psů, ovcí atd. (21) 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. (29)

Tato rigorózní práce navazuje na moji práci diplomovou a v mnoha bodech z ní také vychází. Jejím cílem byla další optimalizace modelu alergického astmatu u potkana.

Cíl práce:

1. Pomocí stanovení počtu buněk v bronchoalveolární laváži zjistit u potkanů Wistar, který časový interval (1 hodina nebo 24 hodin) je vhodnější pro hodnocení zvoleného modelu astmatu.
2. Ve zjištěném vhodnějším časovém intervalu provést srovnání potkanů Wistar a potkanů Brown Norway.
3. U potkanů Brown Norway zjistit další parametry – hodnoty EPO a proteinů v bronchoalveolární laváži.
4. Ověřit navození zkoumaného modelu u každého kmene srovnáním s kontrolní skupinou nealergických zvířat.

II. TEORETICKÁ ČÁST

1. Patogeneze asthma bronchiale

Asthma bronchiale je definováno jako chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, ve kterém hraje důležitou úlohu řada buněk a jejich mediátorů. Chronický zánět způsobuje s astmatem spojenou bronchiální hyperreaktivitu a opakované epizody pískotů, dušnosti, kašle, tíhy na hrudi, zvláště v nočních nebo časných ranních hodinách. Tyto epizody jsou obvykle spojeny s povšechným, ale variabilním zúžením dýchacích cest, které je reverzibilní spontánně nebo při léčbě. (25)

1.1 Buňky podílející se na patogenezi asthma bronchiale

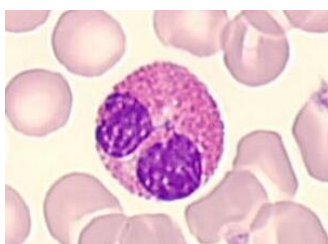
Na rozvoji patologické zánětlivé reakce u asthma bronchiale se podílí řada buněk. Nejdůležitějšími z nich jsou:

1. Eozinofily
2. Neutrofilny
3. Žírné buňky (mastocyty)
4. T-lymfocyty
5. B-lymfocyty
6. Bazofily
7. Monocyty/makrofágy

1. EOZINOFILY

Eozinofily mají jednoznačnou úlohu v patogenezi chronického alergického zánětu. Uvolněné eozinofilní proteiny – např. hlavní bazický protein, eozinofilní kationický protein a produkty oxidačního metabolismu jsou zodpovědné za rozvoj zánětu a poškozují epitel dýchacích cest. (26)

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 %. (26)



Obr. č. 1 Eozinofilní granulocyt. Převzato z www.med.univ-angers.fr

Evoluce a fylogeneze eozinofilů

Je pravděpodobné, že evoluce eozinofilů byla zahájena před 100 miliony let, přesto však výzkumné práce na těchto krevních buňkách byly zahájeny až v roce 1988. (26)

Nejsou žádné zprávy o přítomnosti krevních buněk typu eozinofilů u fosilních organismů, ale eozinofily byly prokázány u mladších forem časných obratlovců vyjma slizovek. U některých primátů, mezi které patří i člověk, byly prokázány dva geny pro tvorbu proteinů eozinofilních granul EDN a ECP, k jejichž duplikaci pravděpodobně došlo před 25–40 miliony let. (26)

V roce 1956 Undritz, který pracoval v belgickém Kongu, první zjistil, že eozinofily některých zvířecích druhů – koček, hyen, okapi a nosorožců – neobsahují EPO. Nepřítomnost krystaloidního jádra v eozinofilech je dokonce společným znakem výše uvedených zvířat. (26)

Životní cyklus eozinofilů

Většina z celkového počtu eozinofilů v organismu se nachází v tkáních, a to i tehdy, když jejich počet v periferní krvi není vysoký. Lze proto předpokládat, že tkáňové eozinofily přežívají déle. Není však známo, jak dlouho v tkáních přežívají, ačkoliv se dá předpokládat, že zde mohou setrvávat několik dnů až týdnů. (26)

V kostní dřeni zdravého dospělého člověka je 3,0–3,5 % eozinofilů. Vyplavovací čas eozinofilů (tzn. čas od konce posledního buněčného dělení do jejich objevení se v periferním řečišti) je u zdravých jedinců 2,5 dne. Průměrný obrat eozinofilů je $0,22 \times 10^9$ buněk za den a průměrná doba zrání eozinofilů v kostní dřeni a jejich skladování je 103 hodin. (26)

Poločas života eozinofilů v periferním řečišti u zdravých lidí je $18 \pm 2,1$ hodiny (u eozinofilie je výrazně prodloužen) a průměrná doba oběhu je 26 ± 3 hodiny, ta je stejná jako u neutrofilů. (26)

Bezpatogenní zvířata nemají žádné eozinofily v periferním řečišti a je velmi obtížné je prokázat v tkáních. Nejčastějším místem, kde se nacházejí lidské eozinofily jsou cylindrické povrchové epitely, které jsou vystaveny negativním vlivům životního prostředí. (26)

Mechanismus vzniku eozinofilie

Eozinofilii a akumulaci eozinofilů v tkáních vyvolávají závažné choroby – alergické nemoci, parazitární infekce a nádorová onemocnění. Definujeme ji jako zvýšení absolutního počtu eozinofilů a podle toho ji také rozlišujeme na:

- lehkou
- střední
- závažnou

Je důležité si uvědomit, že eozinofilie:

- ✓ je pod kontrolou T-lymfocytů
- ✓ znamená izolované zvýšení počtu eozinofilů nezávislé na vzestupu počtu jiných leukocytů
- ✓ byla prokázána jen u omezeného počtu chorob, což signalizuje, že imunitní systém je schopný odlišit jednotlivé antigeny od změn celku, které nevyvolávají eozinofilii.

Vývoj eozinofilů v kostní dřeni z pluripotentních kmenových buněk a jejich následnou diferenciaci regulují GM-CSF, IL-3 a IL-5. Migrace eozinofilů z krevního řečiště je zahájena vzájemnou interakcí mezi eozinofily a endoteliálními buňkami. Přestup eozinofilů do tkání je iniciován lokálními molekulami chemoatraktantů, jednak fyziologicky do lamina propria GIT a jednak v rámci rozvoje zánětlivé odpovědi do tkání. Mezi chemotaktické látky eozinofilů patří deriváty arachidonové kyseliny, PAF, bakteriální produkty, interleukiny – např. IL-16 a chemokiny. Relativně specifické pro eozinofily jsou eotaxin-1 a 2. (26)

Po expozici alergenem se během několika dnů rozvíjí pozdní alergická odpověď spojená s vcestováním zánětlivých buněk, které vyvolávají až rozvoj chronického alergického zánětu. (26)

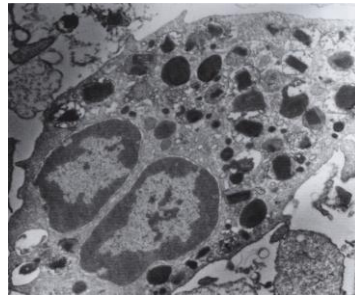
Normodenzní a hypodenzní eozinofily

Z granulocytů v periferní krvi mají eozinofily zdravých jedinců největší denzitu. V závislosti na hustotě obsahu buňky je rozdělujeme do 2 základních skupin – normodenzní a hypodenzní. (26)

1. Normodenzní eozinofily

Normodenzní eozinofily vykazují v elektronovém mikroskopu charakteristickou ultrastrukturu. Pozorujeme v nich zpravidla dvousegmentové jádro s nahromaděním

denzního heterochromatinu v periferní části pod jaderným obalem a s nukleoly v centrální části. V cytoplazmě jsou typická eozinofilní granula se světlejší homogenní nebo jemně zrnitou matrix a s denzním krystaloidem uprostřed. Kromě těchto typických granul nacházíme v těchto buňkách ojedinele větší granula s homogenní, značně denzní matrix – obr. č. 2.



Obr. č. 2 Normodenzní eozinofilní leukocyt; elektronový mikroskop, zvětšení 22 000×. Převzato z Kopriva, 2003.

V některých řezech zachytíme typický Golgiho komplex, tvořený převážně menšími cisternami a drobnými váčky. Obdobné drobné vezikuly se vyskytují v menším množství rozptýleny v celé cytoplazmě. Vaky granulárního endoplazmatického retikula jsou poměrně malé, spíše ojedinelé. Rovněž ribozomy, ve formě polyribosomů nebo izolované, nejsou příliš četné. Dále se v cytoplazmě vyskytují drobné mitochondrie, sférického nebo oválného tvaru s příčně uspořádanými kristami. (26)

2. Hypodenzní eozinofily

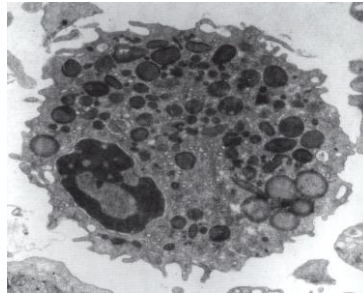
Aktivitou mediátorů a cytokinů se mění klidový normodenzní eozinofil v aktivovaný hypodenzní eozinofil, který je charakterizován takto: (26)

- nižší denzitou, než má normodenzní eozinofil
- polymorfii granul, vakuolizací cytoplazmy
- přítomností větší exprese Fc receptorů pro Ig, pro komplement i pro estrogeny
- zvýšenou cytotoxicitou, vyšší indukovanou sekrecí leukotrienů (LTC₄) po stimulaci
- vyšší afinitou receptorů pro IL-2, CD25
- zvýšenou expresí CD44, ale ne CD69, Mac-1, VLA-4 a LFA-1, Fcγ RII (CD32), CD11a, CD45
- převahou exprese proteinů Bcl-x-1
- větší tvorbou kyslíkových radikálů a PAF

- přítomností v tkáních i v BAL kde je většina hypodenzních eozinofilů, což je v soulase s nálezem i v periferní krvi
- vyšší tvorbou IL-17 hypodenzními eozinofily, která byla prokázána v periferní krvi, indukovaném sputu i v BAL

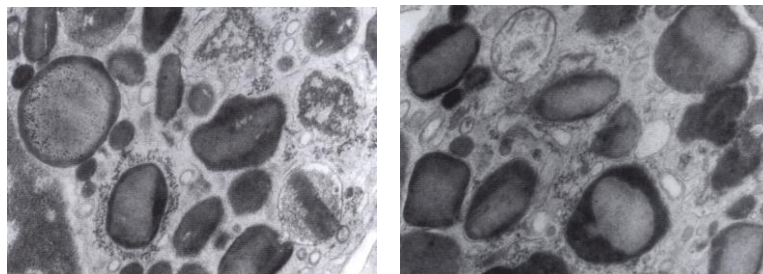
Hypodenzní eozinofily se odlišují od normodenzních především ultrastrukturním vzhledem specifických granul. V cytoplazmě nacházíme několik (nejméně pět rozdílných typů granul): (26)

1. Především jsou to granula, která mají tmavší základní matrix a naopak značně světlý krystaloid, takže se jeví jako negativní obraz normálních eozinofilních granul – obr. č. 3.



Obr. č. 3 Hypodenzní eozinofilní leukocyt; elektronový mikroskop, zvětšení 22 000×. Převzato z Kopřiva, 2003.

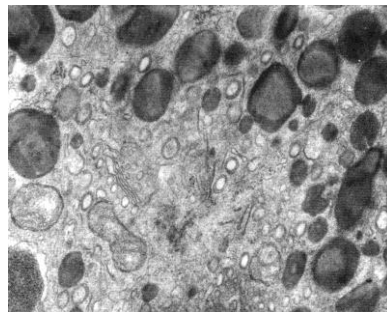
2. Dále jsou to granula, jejichž homogenní matrix je světlá v celém rozsahu a neobsahují krystaloid – obr. č. 4.
3. V některých oblastech cytoplazmy se vyskytují (zpravidla ve shlucích) velká sférická granula se světlým obsahem a tmavším okrajovým lemem – obr. č. 5.



Obr. č. 4 a 5 Atypická eozinofilní granula v cytoplazmě hypodenzního eozinofilu; elektronový mikroskop, zvětšení 55 000×. Převzato z Kopřiva, 2003.

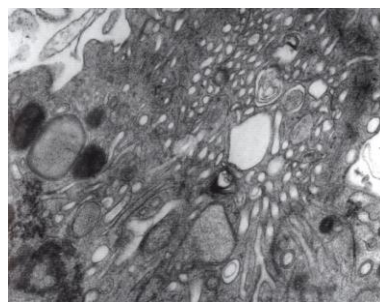
4. Dalším typem jsou větší oválná granula, vyplněná v celém rozsahu značně denzní matrix bez zřetelného krystaloidu, která se vyskytovala v menším množství i v normodenzních eozinofilech.
5. Typická eozinofilní granula se světlou základní matrix a denzním krystaloidem nacházíme v hypodenzních eozinofilech zcela ojediněle. Kromě uvedených pěti typů granul se mohou vyskytovat ještě jejich přechodné formy – obr. č. 3.

Dalším odlišným znakem v hypodenzních eozinofilech je zvýšená vakuolizace cytoplazmy – obr. č. 6.



Obr. č. 6 Velká vakuolizace v oblasti Golgiho komplexu v hypodenzním eozinofilu; elektronový mikroskop, zvětšení 53 000×. Převzato z Kopřiva, 2003.

Drobné cytoplazmatické vezikuly nebo tubuly, které pocházejí pravděpodobně z Golgiho komplexu, nacházíme ve větším množství rozptýleny v celé cytoplazmě. Místa dokonce tvoří shluky vyplňující celé oblasti cytoplazmy, zvláště na periferii buňky – obr. č. 7.



Obr. č. 7 Zmnožení cytoplazmatických vezikul a tubulů v hypodenzním eozinofilu; elektronový mikroskop, zvětšení 53 000×. Převzato z Kopřiva, 2003.

Ve výskytu a ultrastrukturním vzhledu ostatních organel, tj. mitochondrií, granulárního endoplazmatického retikula a ribozomů, nebyly pozorovány podstatné rozdíly proti normodenzním eozinofilům. (26)

Zvýšené procentuální zastoupení hypodenzních eozinofilů prokázal u pacientů s asthma bronchiale Fukuda v roce 1985, s alergickou rýmou Frick v roce 1988 a s hypereozinofilním syndromem Winqvist v roce 1982. (26)

Eozinofilní mediátory

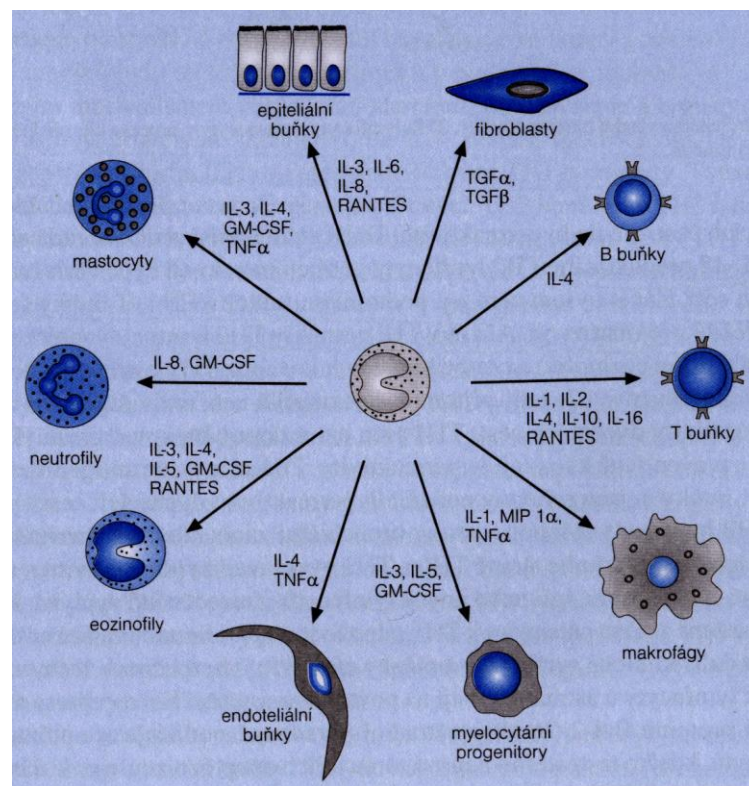
Eozinofily jsou potentní efektorové buňky zánětu uvolňující mediátory a cytotoxické granulární proteiny. Přehled základních eozinofilních mediátorů uvádí tab. č. 1. (26)

MEDIÁTORY TVOŘENÉ GRANULY EOZINOFILŮ	bazické proteiny	hlavní bazický protein
		eozinofilní kationický protein
		eozinofilní peroxidáza
		eozinem produkováný neurotoxin
	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 Z BUNĚČNÉ STĚNY	LTC ₄	
	PAF	
	15-HETE	
	PGE ₁	
	PGF ₂	
	TXB ₂	

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

Krystaloidní jádro granul obsahuje hlavní bazický protein a v matrix se nacházejí ribonukleázy – ECP a EPO a EPX/EDN, které se uvolňují degranulací. (26)

LTC₄ je dále metabolizován na LTD₄ a LTE₄. Tyto lipidové mediátory zvyšují cévní permeabilitu, sekreci hlenu a vyvolávají značnou kontrakci hladkého svalstva. Eozinofilní kationický protein (ECP) vyvolává elektrickou necitlivost, narušuje celistvost buněčné membrány a umožňuje nitrobuněčný průnik dalších toxických látek. Hlavní bazický protein (MBP) zvyšuje reaktivitu hladkého svalstva, degranulaci mastocytů a bazofilů. Eozinofily posilují zánětlivou kaskádu tvorbou vlastních chemoatraktantů (RANTES, eotaxinu a PAF), které urychlují vstup eozinofilů do místa zánětu. Toxické poškození vyvolávají produkované kyslíkové radikály a ionty halogenů. (26)



Obr. č. 8 Aktivita eozinofilních cytokinů v procesu zánětlivé odpovědi u asthma bronchiale.

Převzato z Kopřiva, 2003.

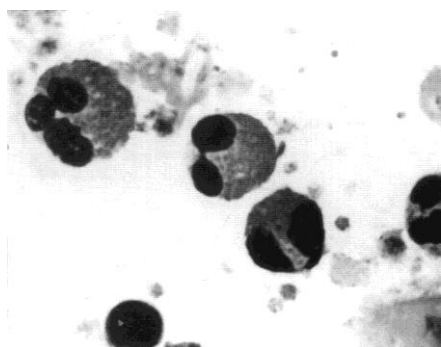
Metody zobrazení

Barevné desky ve světelném mikroskopu nabarvených krevních eozinofilů byly poprvé publikovány Shapirem v roce 1919, avšak ultrastruktura krevních eozinofilů byla definována Millerem až o 47 let později, v roce 1966. *In vitro* nebo v tkáních se eozinofily zobrazují jako tenké cytoplazmatické prsty průměru kolem 20 μ m. (26)

Většina metod používaných k průkazu a definování v tkáních je založena na přítomnosti velkého množství kationických proteinů v jejich granulech. (26)

Pro barvení eozinofilů se používá celá řada barviv, nejvíce používaným je eozin (není specifickým barvivem pro eozinofily), dále se využívá např. chromotrop 2R rozpuštěný ve fenolu, Biebrichovo šarlatové barvivo či Adamsovo barvivo. (26)

Nejrozšířenější barvicí metodou používanou k průkazu eozinofilů v krvi a ve vzorcích kostní dřeně je Romanovského barvicí technika. Hanselnovo barvivo je používáno při stanovení eozinofilů v moči u pacientů s intersticiální nefritidou a eozinofilní cystitidou. (26)



Obr. č. 9 Normodenzní eozinofilní leukocyty; světelný mikroskop, zvětšení 950×. Převzato z Kopřiva, 2003.



Obr. č. 10 Hypodenzní eozinofilní leukocyty; světelný mikroskop, zvětšení 950×. Převzato z Kopřiva, 2003.

2. NEUTROFILY

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. (26)

Vznikají z pluripotentní kmenové buňky v kostní dřeni. Jejich proliferaci a diferenciaci stimulují G-CSF, GM-CSF a IL-3. (26)

Jádro neutrofilu bývá členěno na 2-5 segmentů a v jejich cytoplazmě se nacházejí drobná granula, která se zbarvují růžově. (26)

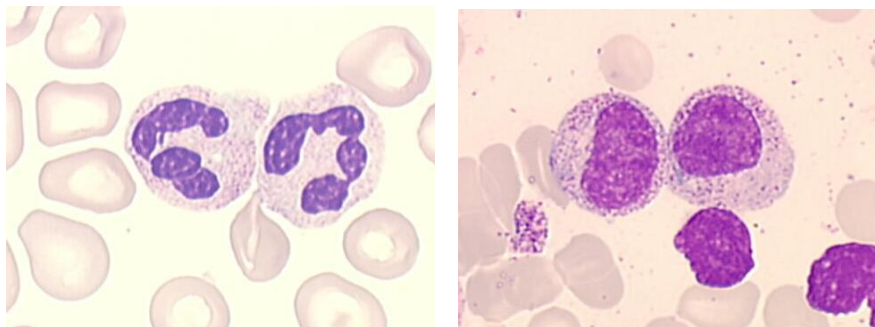
Na epiteliálních površích zdravých tkání, jež jsou v kontaktu s vnějším prostředím, jsou přítomny minimálně a jejich počet se zvyšuje po zahájení zánětlivého procesu. Mezi buněčné zdroje neutrofilních chemotaktických faktorů patří bakterie, makrofágy, lymfocyty, trombocyty a žírné buňky. (26)

Při úmrtí neutrofilu nebo vylití obsahu cytoplazmatického granula do extracelulárního prostoru, se může obsah cytoplazmatických 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 neutrofilny uplatňovat negativně v průběhu zánětu – poškozením vlastní tkáně. (26)

Neutrofilny 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. (26)

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. (26)

Neutrofilny tvoří velké množství mediátorů – metabolity kyseliny arachidonové (LTB_4 , PAF, TXA_2 a LTA_4), cytokiny (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , TGF β), proteázy (elastázu, kolagenázu, MMP-9), mikrobicidní látky (laktoferin, MPO, lyzozym) a kyslíkové radikály (superoxid, H_2O_2 , OH $^-$ a NO). (26)



Obr. č. 11 a 12 Neutrofilní granulocyty. Převzato z www.med.univ-angers.fr

3. ŽÍRNÉ BUŇKY (MASTOCYTY)

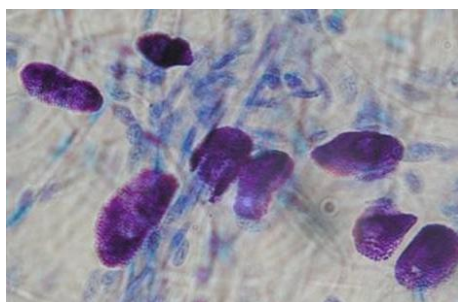
Žírné buňky – mastocyty – jsou tkáňové buňky nacházející se na rozhraní těla a vnějšího prostředí, s význačnou rolí v zánětu zprostředkovaném imunoglobulinem E. Jde o heterogenní populaci buněk lišících se navzájem svým tvarem a velikostí (průměr 10–30 μ m) a obsahujících v cytoplazmě elektronově denzní granula. (26)

Žírné buňky pocházejí z kmenových buněk kostní dřeně a jejich hlavním růstovým a diferenciačním faktorem je faktor kmenových buněk (SCF = stem cell factor). (26)

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, LTC₄, PGD₂) a svou tvorbou PAF, cytokinů (IL-3 až IL-6, IL-13, TNF α , enzymů atd.) se podílejí i na rozvoji chronického alergického zánětu. (26)

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). (26)

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 (neutrofilů, eozinofilů). 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. (26)



Obr. č. 13 Mastocyty. Převzato z www.histologia.cm-uj.krakow.pl

4. 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. (26)

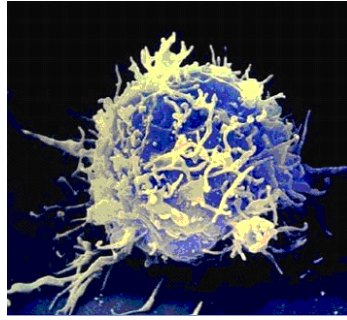
Pro vznik Th1 lymfocytů je nezbytný styk s infikovanými nebo jinak aktivovanými makrofágy a dendritickými buňkami, které tvoří také IL-12, jenž je významným diferenciačním faktorem pro Th1 lymfocyty. Th1 lymfocyty tvoří IFN γ a TNF β , které aktivují makrofágy a podílejí se na rozvoji pozdního typu přecitlivělosti. Th1 lymfocyty neaktivují však pouze makrofágy, ale vyvolávají též tvorbu protilátek opsonizačních, komplement – fixačních a protilátek podílejících se na protilátkově závislé buněčné cytotoxicitě. (26)

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. (26)

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. (26)

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. (26)

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). (26)

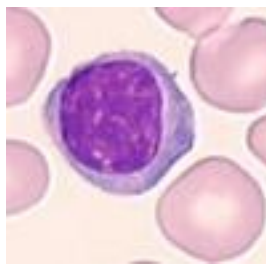


Obr. č. 14 T-lymfocyt. Převzato z <http://alife.tuke.sk/>

5. B-LYMFOCYTY

B-lymfocyty se po rozeznání antigenu přeměňují vlivem IL-2 z Th lymfocytů a dalších cytokinů v plazmatické buňky, které tvoří protilátky všech tříd. Dochází k vazbě mezi povrchovým kostimulačním receptorem CD40 na B-lymfocytech a jeho ligandem, membránovým glykoproteinem z povrchu Th lymfocytů CD40L (ligand CD40, gp39), nebo k vazbě CD2 na povrchu T-lymfocytů s CD40, popř. CD58 na povrchu B-lymfocytů. Th1 lymfocyty indukují tvorbu protilátek podtřídy IgG1 proti bakteriálním patogenům. Th2 lymfocyty indukují prostřednictvím uvolněných interleukinů (IL-4, IL-13) u B-lymfocytů izotopový přesmyk protilátek, i tvorbu specifických IgE protilátek. (26)

Tvorbu IgE dále ovlivňují svou aktivitou i IL-6, IL-5, IL-10, TNF α , MPP1 α , RANTES. Naopak ji potlačují IFN γ , IL-12, TGF β a IL-8. (26)



Obr. č. 15 B-lymfocyt. Převzato z www3.sympatico.ca

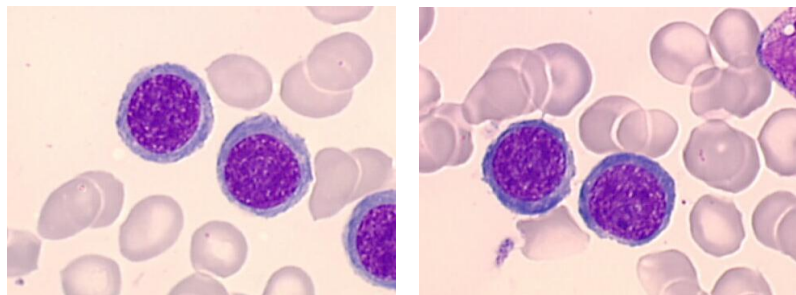
6. BAZOFILY

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-1 α , IL-8). (26)

Bazofily jsou cirkulující granulocyty s mnohými funkčními vlastnostmi tkáňových žírných buněk, v tkáních se však běžně nevyskytují. Jejich cytoplazmatická 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-1 α a IL-8 a dále působí na makrofágy, u kterých též zvyšuje expresi CD23 na povrchu, schopnost prezentovat antigen a schopnost zabíjet nádorové buňky. (26)

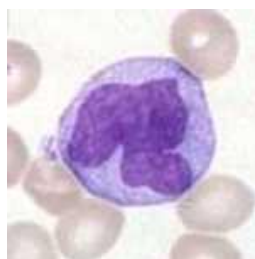


Obr. č. 16 a 17 Bazofilní granulocyty. Převzato z www.med.univ-angers.fr

7. MONOCYTY/MAKROFÁGY

Makrofágy byly popsány na začátku 20. století Mečnikovem. V imunitním systému mají výsadní postavení a společně s neutrofily hrají ústřední roli v obraně proti infekcím. (26)

Zralý makrofág má velikost 15–20 μm , má velkou cytoplazmu, bohatě členěnou plazmatickou membránu, malé jádro, velmi dobře vyvinutý Golgiho komplex a mitochondriální systém. Je vlastně konečným stadiem diferenciaci monocytárních fagocytujících buněk. (26)



Obr. č. 18 Monocyt. Převzato z <http://upload.wikimedia.org>

Mononukleární fagocytární systém zahrnuje promonocyty a jejich prekurzorové buňky v kostní dřeni, monocyty v krevním oběhu a makrofágy v tkáních. Monocyty a makrofágy vznikají ze společné progenitorové buňky a postupně se diferencují vlivem lokálně tvořených specifických kolony stimulačních faktorů – CSF – na monoblast, ten přechází v promonocyt, který je po určité době vyplaven do krevního oběhu jako monocyt. Poločas pobytu lidských monocytů v krevním oběhu je kolem 1-3 dnů. Do různých tkání migrují monocyty zřejmě náhodně, tam se usídlí jako konečné buňky, které mají vzhled a vlastnosti podle místa své lokalizace a funkční specializace. (26)

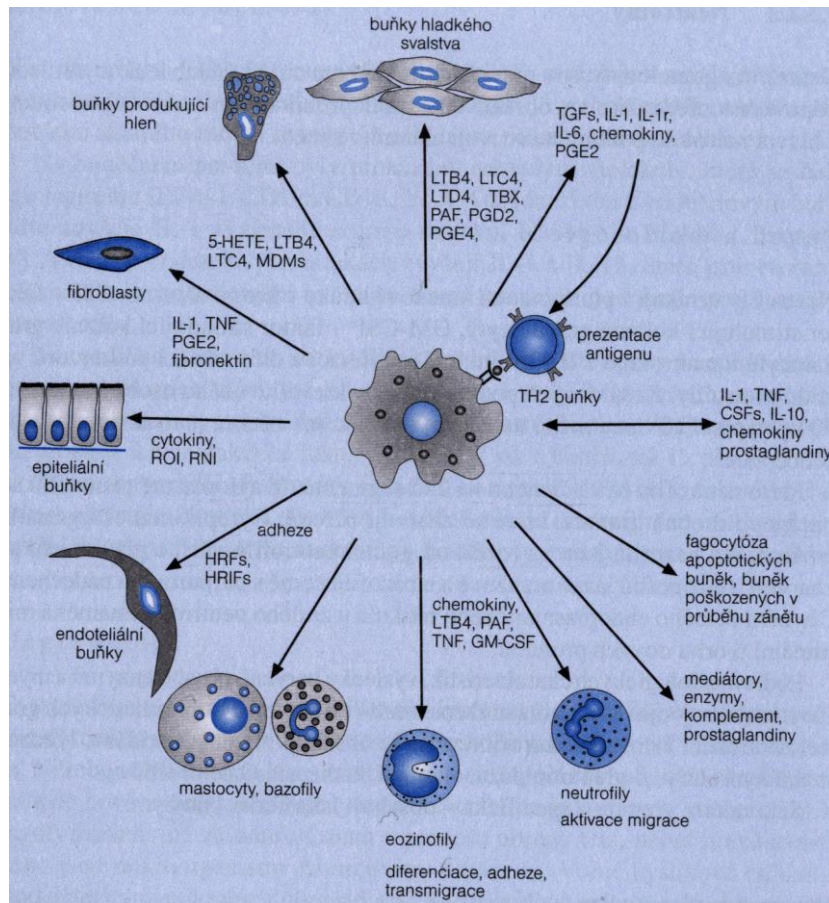
Makrofágy jsou přítomny v kostech (osteoklasty), v nervovém systému (buňky mikroglie), v pojivové tkáni, v játrech (Kupfferovy buňky), v plicích (alveolární makrofágy), v kostní dřeni, v lymfatických uzlinách (volné a vázané) a v serózních dutinách (pleurální a peritoneální makrofágy). (26)

Charakteristickou vlastností makrofágů je schopnost adherovat ke sklu. Na povrchu mají makrofágy přes 30 receptorů – pro vazbu imunoglobulinů G a E, pro složky komplementu, pro chemokiny, lektinové receptory, peptidy atd. (26)

Aktivovaný makrofág se liší v morfologických, metabolických a funkčních vlastnostech od klidového makrofágu – má zvýšenou schopnost usmrcovat fakultativně nitrobuněčné parazity nebo zabíjet nádorové buňky. Aktivace makrofágů je imunologicky specifická, neboť je spouštěna cytokiny (GM-CSF, $IFN\gamma$, faktor aktivující makrofágy – MAF a faktor inhibující migraci makrofágů – MIF) tvořenými T-lymfocyty. Pohlcování částic makrofágy je provázeno respiračním vzplanutím, jak je tomu i u neutrofilů a eozinofilů. (26)

Makrofágy jsou mimořádně aktivní sekreční a regulační buňky, které tvoří asi 100 různých látek ovlivňujících zánětlivou odpověď. Některé z nich jsou uvolňovány konstitutivně – obsah lyzozomů, lipoproteinová lipáza, zatímco ostatní až po interakci receptoru s ligandem. Sekreční produkty makrofágů jsou (viz obr. č. 19): (26)

- mikrobicidní a cytotoxické látky (superoxid, chlornany, oxid dusnatý, proteázy, lysozym atd.)
- endogenní pyrogeny (IL-1, IL-6, TNF α , MIP-1)
- regulátory zánětu (prostaglandiny, tromboxany, mediátory, složky komplementu, hemokoagulační faktory atd.)
- cytokiny (IL-1, IL-6, IL-8, M-CSF, GM-CSF, PDGF atd.)
- neutrální proteázy (elastáza, kolagenáza, angiotenzinová konvertáza)
- proteázové inhibitory (α 2 makroglobulin, α 1 proteinázový inhibitor, plazminový inhibitor)
- stresové proteiny
- hydrolytické proteiny



Obr. č. 19 Mediátory makrofágů a jejich úloha v patogenezi zánětu u asthma bronchiale. Převzato z Kopriva, 2003.

Na rozvoji chronického alergického zánětu se podílejí i další buňky, např. NK buňky, trombocyty či endoteliální buňky, jejich role však není rozhodující.

1.2 Proteiny, enzymy a další mediátory podílející se na patogenezi asthma bronchiale

Nejvýznamnějšími proteiny a mediátory, které zasahují do patogeneze asthma bronchiale jsou:

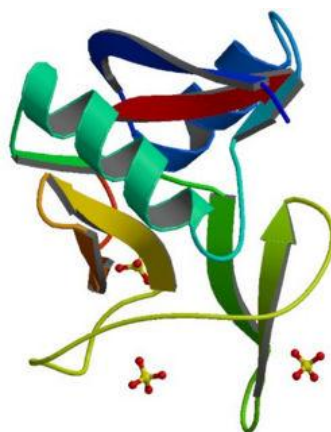
1. Hlavní bazický protein (MBP)
2. Eozinofilní kationický protein (ECP)
3. Eozinofilní peroxidáza (EPO)
4. Eozinofilní protein X (EPX)
5. Eozinofily produkovaný neurotoxin (EDN)
6. Myeloperoxidáza (MPO)
7. Elastáza neutrofilů
8. Histamin
9. IL-5
10. IL-8

1. HLAVNÍ BAZICKÝ PROTEIN (MBP)

V roce 1973 byl poprvé izolován hlavní bazický protein (MBP) z eozinofilů morčat a následně v roce 1976 i z lidských eozinofilů. Jak vyplývá již z názvu, jedná se o bazický protein, jehož izoelektrický bod $pI > 11$ a molekulová hmotnost se pohybuje kolem 14 kDa. Uvolňuje se z eozinofilů po jejich chemoatrakci do místa zánětu a jejich následné aktivaci. (12)

Hlavní bazický protein je velmi účinný enzym, který se nachází v jádře granul eozinofilů. Jeho enzymatická aktivita je zaměřena především proti parazitům a bakteriím, ale toxický je i pro savčí buňky a tkáně. Zvyšuje reaktivitu hladkého svalstva, mění permeabilitu buněčných membrán, způsobuje degranulaci mastocytů a bazofilů, aktivuje neutrofile a alveolární makrofágy, podílí se na destrukci epiteliálních buněk a přispívá k bronchospazmu, který provází některé alergické choroby, jako je např. asthma bronchiale. (12)

Struktura hlavního bazického proteinu je velmi podobná struktuře lektinů typu C, avšak na rozdíl od lektinů MBP postrádá vazebná místa pro sacharidy a vápenaté ionty. (12)



Obr. č. 20 Struktura hlavního bazického proteinu.
Převzato z www.answers.com/topic/major-basic-protein

2. EOZINOFILNÍ KATIONICKÝ PROTEIN (ECP)

Eozinofilní kationický protein byl poprvé izolován v roce 1971 a v té době se předpokládalo jeho původ v neutrofilních leukocytech. Teprve až v roce 1975 byl potvrzen původ z eozinofilů a protein byl přejmenován na eozinofilní kationický protein. Vlastní ECP tvoří asi 30 % obsahu proteinů v granulech. (26)

Vzhledem k homologii se savčími ribonukleázami se ECP také nazývá ribonukleáza 3 (RNáza 3). Vykazuje 70 % homologii s další ribonukleázou eozinofilů, EPX/EDN. Jedná se o heterogenní protein s molekulární hmotností 16-28 kDa. Společně s angiogeninem, lidskou pankreatickou ribonukleázou a RNázou 4 tvoří tyto proteiny pyrimidin-specifickou ribonukleázovou rodinu, mající charakteristické a identické aminokyseliny v aktivních místech, především lysin a histidin. Vlastní RNázová aktivita ECP je 100× menší než aktivita EPX. ECP obsahuje 20 histidinových zbytků, což má za následek vysoký izoelektrický bod (pI 10,8). Další vlastností zasluhující pozornost je individuální zastoupení aminokyselin, které je tak podkladem různých variant lišících se v biologických funkcích. (26)

Biologické funkce eozinofilního kationického proteinu jsou velmi různorodé a zahrnují:

- ✓ cytotoxicitu
- ✓ imunomodulaci
- ✓ regulaci aktivity fibroblastů
- ✓ indukci sekrece hlenu v dýchacích cestách
- ✓ interakci s koagulační a komplementovou kaskádou
- ✓ antivirové působení

Cytotoxická aktivita je zásadní funkcí ECP a je nezávislá na jeho vlastní RNázové aktivitě. Vlastní mechanismus tohoto účinku je pravděpodobně dán schopností ECP vytvářet póry v membráně buněk, což umožňuje prostup vody a malých molekul a vede ke zhroucení vnitřního prostředí buňky. RNázová aktivita není pro tkáňovou cytotoxicitu významná. Dále se jedná o imunomodulační aktivitu, která zahrnuje inhibici proliferujících T-lymfocytů v odpovědi na antigen a inhibici syntézy imunoglobulinů B-lymfocyty. Uvolnění histaminu a mediátorů bazofilních leukocytů značně zvyšuje hladinu ECP. (26)

ECP ovlivňuje tvorbu proteoglykanů fibroblasty a zvyšuje uvolňování kolagenu. Dále zvyšuje tvorbu hlenu epiteliálními buňkami dýchacích cest, což může být jednou z příčin hypersekrece hlenu u pacientů s astmatem. (26)

Významnou součástí funkce ECP je i propojení s koagulační kaskádou, kdy na jedné straně má fibrinolytické účinky, a na druhé stimuluje tvorbu fibrinu. Právě u hypereozinofilního syndromu je prokazována vysoká hladina ECP a tromboembolické komplikace. ECP také reaguje se složkami komplementu. (26)

K syntéze mRNA kódující ECP jsou zapotřebí cytokiny IL-3, GM-CSF a IL-5. U pacientů můžeme prokázat v cirkulaci mRNA pro ECP po maturaci eozinofilu. (26)

ECP je skladován a uvolňován jako necytotoxický a biologicky málo účinný protein, ale během patologické reakce, pravděpodobně účinkem cytokinů, se ECP transformuje na biologicky aktivní protein. (26)

In vitro bylo pozorováno zvýšené uvolňování granulárních proteinů v kultuře eozinofilů po přidání LTB₄ a PAF uvolňovaných z mastocytů. Při kultivaci lidských eozinofilů *in vitro* byla prokázána přímá protivirová aktivita ECP. (26)

ECP můžeme stanovovat v různých tělních kompartmentech. Monoklonální protilátka EG₂ deteguje intracelulární aktivní formu ECP a protilátka EG₁ prokazuje zásobní skladovaný protein. Extracelulárně můžeme prokázat ECP v séru, v lavážní tekutině získané při bronchoalveolární laváži (je popsána pozitivní korelace mezi plicními funkcemi a hladinou ECP v BAL), v indukovaném sputu a v moči. Nejčastěji využívaná a klinicky rozšířená je technika stanovení ECP v supernatantu z periferní krve po dvouhodinové inkubaci plné krve s aktivátory. (26)

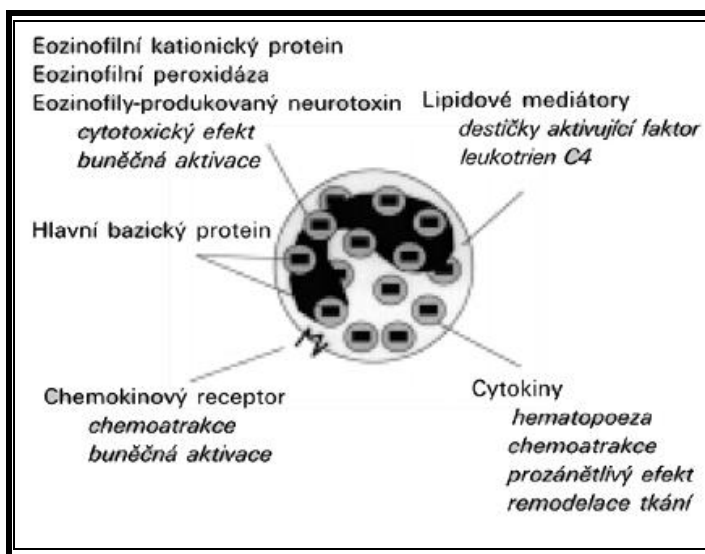
3. EOZINOFILNÍ PEROXIDÁZA (EPO)

Eozinofily syntetizují mnoho mediátorů, např. PAF, eikosanoidy (LTC₄, LTD₄, LTE₄), peptidy a cytokiny (IL-1, IL-3 ad.). Granula eozinofilů se dělí na dvě populace:

1. peroxidáza-pozitivní granula
2. granula charakterizovaná obsahem krystaloidů, tvořené jedním ze čtyř eozinofilních proteinů – eozinofilní kationický protein (ECP), eozinofilní peroxidáza (EPO), EPX/EDN a hlavní bazický protein (MBP).

Krystaloidní jádro granul obsahuje hlavní bazický protein a v matrix se nacházejí ribonukleázy – ECP, EPO a EPX/EDN, které se uvolňují degranulací.(26)

Eozinofilní peroxidáza je bazický protein, který se nachází v matrix granul eozinofilů. Tato ribonukleáza se z buněk uvolňuje při jejich degranulaci a významně přispívá k narušení integrity sliznic a vyvolává hypersenzitivní reakci. Je to proto jeden z markerů, pomocí kterých lze určit stupeň alergické reakce. (26)



Obr. č. 21 Eozinofilní granula obsahují hlavní bazický protein (MBP) v jádře, eozinofilní kationický protein (ECP), eozinofilní peroxidázu (EPO) a eozinofily produkovaný neurotoxin (EDN). Eozinofily produkují množství cytokinů, které jsou také uloženy v granulech, a lipidových mediátorů, jejichž tvorba je zahájena po aktivaci eozinofilů. Převzato z Koptřiva, 2003.

4. EOZINOFILNÍ PROTEIN X (EPX)

Eozinofilní protein X je vysoce toxický bazický protein obsažený v granulech eozinofilů, ze kterých se uvolňuje degranulací po aktivaci cytokiny. Je zodpovědný především za likvidaci buněčných parazitů, ale toxický je také pro mnoho tkání, včetně tkáně nervové a sliznice dýchacího traktu. Jeho hlavním účinkem je destrukce buněčné membrány, ve které vytváří póry, což následně vede k osmotické lýze buňky. (14)

Eozinofilní kationický protein a eozinofilní protein X mají ze 70 % homologní DNA a oba proteiny obsahují ve své struktuře značné množství aminokyseliny argininu. Z tohoto důvodu mají ECP i EPX vysoký izoelektrický bod, a proto se velmi dobře váží na záporně nabitě molekuly na povrchu buněčných membrán. (14)

5. EOZINOFILY PRODUKOVANÝ NEUROTOXIN (EDN)

Granula lidských eozinofilů obsahují velké množství kationických proteinů. Dalším z nich je eozinofily produkovaný neurotoxin, který je také velmi toxický pro řadu tkání. (7)

Z mnohých vědeckých studií je zřejmé, že EPX a EDN mají nejen stejnou molekulovou hmotnost, ale shodují se i ve svých neurotoxických a antiparazitárních účincích. Stejně tak oba proteiny vykázaly stejnou ribonukleázovou aktivitu. Usuzujeme proto, že vzhledem k tomu, že oba dva proteiny mají prakticky stejné vlastnosti, jedná se tedy pravděpodobně o stejný protein. (7)

6. MYELOPEROXIDÁZA (MPO)

Myeloperoxidáza je víceúčelový lyzozomální enzym patřící do skupiny peroxidáz. Tyto enzymy katalyzují oxidaci substrátu, přičemž oxidačním činidlem je peroxid vodíku – jeho kyslík se přenáší na oxidovaný substrát. Samotná myeloperoxidáza je silně kationaktivní glykosylovaný protein s molekulární hmotností 144 kD. Skládá se ze dvou identických dimerů propojených disulfidickým můstkem. Je přítomna zejména v azurofilních granulech neutrofilů (ty ovšem obsahují ještě jiné enzymy jako např. elastázy, proteinové syntázy, β -glukoronidázu, β -galaktosidázu, lyzozym a další) a její množství představuje asi 2–5 % hmotnosti buňky za sucha. Během degranulační fáze fagocytózy se vyplavuje z granul do fagozomu a při lýze buněk se může vyplavit

i do extracelulárního prostoru. Z tohoto důvodu může proto dojít v místech zánětu i k poškození vlastních tkání organismu, přestože primárně je aktivita myeloperoxidázy směřována proti zevním patogenním činitelům. Hladina myeloperoxidázy je jedním z ukazatelů míry infiltrace orgánů neutrofilů. (6)

Myeloperoxidáza je unikátní enzymatickou složkou vyskytující se zejména v granulech neutrofilů, ale je možné ji ve velmi malém množství detekovat i v monocytech. Nicméně monocyty ve srovnání s neutrofilů obsahují jen velmi malé množství tohoto enzymu. Též eozinofily disponují příbuzensky poměrně blízkou peroxidázou, která se vyznačuje ve srovnání s neutrofilní myeloperoxidázou 69,8 % homologií v sekvenční úrovni aminokyselin. (6)

7. ELASTÁZA NEUTROFILŮ

Elastáza neutrofilů je 29 kDa protein, tvořený prekurzory buněk myeloidní řady pod vlivem růstových faktorů bílé krevní řady, např. GM-CSF, a deponovaný v azurofilních granulech. Zánětový stimul vede k přesunutí elastázy z granulek na buněčný povrch a k následné degranulaci. Uvolněný enzym degraduje extracelulární strukturální proteiny a v nadbytku může mít pro tkáň destruktivní účinky. Další funkce elastázy jsou známy jenom částečně (stimulace sekrece bronchiálních žláz, uvolnění von Willebrandova faktoru z endoteliálních buněk). Aktivita elastázy je neutralizována jeho hlavním inhibitorem – AAT. U hereditárního deficitu AAT je nekontrolovaná aktivita elastázy hlavním patogenetickým faktorem rozvoje plicního emfyzému. (28)

Elastáza je vysoce senzitivní ukazatel aktivace polymorfonukleárních leukocytů. Plazmatické koncentrace elastázy stoupají z bazálních hodnot (90–180 mg/l) po zánětovém stimulu na 10- a vícenásobek. Nízká specifita ale brání širšímu diagnostickému uplatnění tohoto jevu. Zvýšené hladiny elastázy jsou popisovány u zánětů infekčních (novorozenecká seps, TBC), alergických (asthma bronchiale), autoimunitních (revmatoidní artritida), ale také např. u kuřáků. (28)

8. 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 . (26)

9. INTERLEUKIN 5

IL-5 je vysoce selektivní pro eozinofily, pro jejich proliferaci, diferenciaci, adhezi a efektorové funkce. Prodlužuje též přežívání eozinofilů, poněvadž potlačuje programovanou buněčnou smrt a tím významným způsobem ovlivňuje dynamiku i závažnost chronického eozinofilního zánětu. (26)

V myším modelu indukuje IL-5 specifickou a v buněčné linii restriktivní tvorbu eozinofilů v tekutých kulturách buněk kostní dřeně. Přidání IL-5 do média vyvolává tvorbu eozinofilů, jejíž vrchol je kolem 3 týdnů a pokračuje v rozmezí 6–8 týdnů. (26)

Naproti tomu kultury lidských buněk kostní dřeně v prostředí polotekutého agaru produkují v přítomnosti IL-5 větší množství eozinofilních kolonií.

IL-5 má vliv pouze na pozdní stadia vývoje eozinofilů. (26)

10. INTERLEUKIN 8

IL-8 se dnes řadí mezi CXC chemokiny. Je chemotaktický pro neutrofilů, T-lymfocyty a bazofily. Indukuje expresi dalších membránových struktur na povrchu neutrofilů zvyšujících jejich adhezivitu, čímž zvyšuje migraci neutrofilů do místa zánětu. Potlačuje uvolnění histaminu z mastocytů. (26)

2. Možnosti sledování aktivity chronického eozinofilního zánětu u asthma bronchiale

Asthma bronchiale je chronické zánětlivé onemocnění popisně definované a zahrnující abnormality na různých úrovních od klinických příznaků až po odchylky výsledků laboratorních vyšetření od normy. Aktivitu onemocnění můžeme hodnotit na základě: (26)

1. hodnocení symptomů (záchvatovité sevření hrudníku, wheezing)
2. vyšetření plicních funkcí (proměnná různá variabilní obstrukce dýchacích cest)
 - a) spirometrie
 - celková plicní kapacita (VC)
 - objem vzduchu vydechnutý za 1 sekundu (FEV₁)
 - vyšetření vrcholového výdechového proudu (PEF)
 - bronchodilatační test
 - bronchokonstrikční test
 - b) impulzní oscilometrie
3. vyšetření bronchiální hyperreaktivity (přímo a nepřímo vyvolávána bronchokonstriktořmi)
 - a) bronchoprovokační testy
 - b) bronchomotorické testy
4. vyšetření patologie dýchacích cest (akutní a chronický zánět bronchiální stěny)
 - a) bronchoskopie
 - b) indukované sputum
5. změny aktivity buněk (tvorba a uvolnění mediátorů, cytokiny)
 - a) eozinofilie
 - b) eozinofilní kationický protein (ECP)
6. ostatní (vyšetření moči, vyšetření vydechaného vzduchu)

V současnosti můžeme sledovat aktivitu jen části mechanismů tohoto mnohotvárného imunopatologického procesu vyvolávajícího asthma bronchiale. Základní a dnes již tradiční hodnocení klinického stavu pacientů s asthma bronchiale zahrnuje klinické symptomy a vyšetření plicních funkcí. Tento způsob hodnocení stavu se jeví jako nedostatečný a jen přímé hodnocení aktivity zánětu v dolních dýchacích

cestách má vypovídací hodnotu pro odpovídající zhodnocení průběhu onemocnění, aktuálního stavu i jeho prognózy do budoucnosti. (26)

Zásadním požadavkem současných konsenzů diagnózy a léčby asthma bronchiale je možnost objektivního sledování klinického obrazu onemocnění, měření parametrů plicních funkcí, sledování dynamiky chronického eozinofilního zánětu, na jejichž základě je vyhodnocen stupeň závažnosti nemoci. Rychle narůstající poznatky o patogenezi i patofyziologii nemoci vyvolávají rozvoj nových metod k hodnocení zánětu v dýchacích cestách, které poskytují rozhodující údaje o průběhu onemocnění, a umožňují tak zhodnotit i jeho prognózu. Přehled vybraných metod studia mechanismů zánětu a některé možnosti vyšetření biomarkerů uvádí tab. č. 2. (26)

Přímé metody	Buněčné biomarkery
<ul style="list-style-type: none"> • bronchiální biopsie • bronchiální oplach • bronchoalveolární laváž • transbronchiální biopsie • indukované sputum 	<ul style="list-style-type: none"> • eozinofilní granulocyty <ul style="list-style-type: none"> -MBP (hlavní bazický protein) -ECP (eozinofilní kationický protein) -EPO (eozinofilní peroxidáza) -EPX (eozinofilní protein X) -EDN (eozinem produkováný neurotoxin) • neutrofilní granulocyty <ul style="list-style-type: none"> -MPO (myeloperoxidáza) • žírné buňky <ul style="list-style-type: none"> -tryptáza, chymáza -histamin • lymfocyty <ul style="list-style-type: none"> -IL-8 (interleukin 8) -GM-CSF (kolonie stimulující faktor) • T-lymfocyty <ul style="list-style-type: none"> -IL-2, IL-5 • monocyty, makrofágy <ul style="list-style-type: none"> -IL-8, MCP-3 (monocytový chemotaktický protein) • buňky zánětu – obecně <ul style="list-style-type: none"> -histamin -leukotrieny (LTC₄) -prostaglandiny (PGD₂) -tromboxany (TXB₂) -PAF (destičky aktivující faktor)
Nepřímé metody	
<ul style="list-style-type: none"> • krevní <ul style="list-style-type: none"> -počet eozinofilů (%) -aktivované eozinofily CD44, -69, -95 -buněčné biomarkery -adhezivní molekuly • moč <ul style="list-style-type: none"> -LTE₄, TXB₂ -EPX, ECP • fyziologické <ul style="list-style-type: none"> -bronchoprovokační testy -PEF výdechoměrem • vydechovaný vzduch <ul style="list-style-type: none"> -H₂O₂ -NO -IL-5 -leukotrieny 	

Tabulka č. 2 Vybrané metody studia mechanismů zánětu a některé možnosti vyšetření biomarkerů. Převzato z Kopriva, 2003.

Získané údaje o aktivitě nemoci jsou základním kamenem vlastní efektivní léčby a podkladem self-managementu (sebekontroly) asthma bronchiale. Žádná ze současných

metod není dostatečná ani jednoznačná k monitorování aktivity asthma bronchiale – schopná předpovědět exacerbaci astmatu a zhodnotit protizánětlivé účinky léčby. Je nutné si uvědomit, že metody, které máme v současnosti k dispozici ke sledování aktivity zánětu v dýchacích cestách, postihují pouze část těchto procesů. (26)

1. HODNOCENÍ SYMPTOMŮ

Hodnocení skóre denních a nočních příznaků je individuálně ovlivněno subjektivním prožíváním pacienta. U dětí navíc podávají informace o průběhu onemocnění rodiče a informace o subjektivním prožívání obtíží dítětem jsou tudíž zprostředkované a jejich údaje jsou z těchto důvodů často nespolehlivé. (26)

2. VYŠETŘENÍ PLICNÍCH FUNKCÍ

a) Spirometrie

Spirometrie je základní metodou měření plicních funkcí a průkazu obstrukce dýchacích cest. Vyšetření plicních funkcí je však limitováno věkem danou spoluprací dítěte na hranici školní zralosti kolem 5. roku života. (26)

Vyšetření vrcholového výdechového proudu (PEF) je mnohem přístupnější k self-monitoringu plicních funkcí pacientem v domácím prostředí. Sledování funkce plic v každodenní péči vyžaduje pravidelné měření výdechoměrem alespoň 2× denně, ale též před i po užití úlevového léku či při zhoršení stavu. Takto prováděná měření jsou pro pacienta signálem k racionálnímu postupu léčebných úprav. Dnes je k dispozici celá škála výdechoměrů. Nejjednodušší jsou indikativní výdechoměry dětské, u nichž píšťalka signalizuje hodnotu výdechu nad trvale nastavenou referenční hladinu. Výdechoměry s lineární stupnicí nebo nověji logaritmické umožňují zapisovat již konkrétní hodnoty. Další kategorií jsou elektronické multifunkční výdechoměry, které díky své paměti měří parametry plicních funkcí, umožňují zápis údajů o pacientově aktuálním stavu a zobrazují měřený parametr i jeho trend na displeji. Výpovědní hodnota PEF je však nízká. (26)

Neprávem je opomíjena metoda hodnocení stupně bronchodilatace po hlubokém nádechu. Ztráta bronchodilatace je těsně spojená se závažností bronchiálního zánětu u pacientů s asthma bronchiale. (26)

b) Impulzní oscilometrie

Novou vyšetřovací metodou plicních funkcí je impulzní oscilometrie, což je neinvazivní, senzitivní a rychlá metoda měření rezistence, resp. impedance v dýchacích cestách. Vlivem rezistence či impedance těchto cest dochází k posunu a deformaci impulzů. Míra těchto změn je zpětně snímána z pneumotachografu, převáděna na elektrické impulzy a počítačově zpracována. Impulzní oscilometrie se používá u obstrukčních onemocnění dýchacích cest a v diferenciální diagnostice těchto stavů. Vzhledem ke své vysoké senzitivitě a rychlosti je vhodná i pro vyšetřování bronchiální hyperreaktivity. Pro minimální požadavky na spolupráci pacienta je využívána zejména pediatry, neboť umožňuje provést vyšetření plicních funkcí u dětí již od 2 let věku. (26)

3. VYŠETŘENÍ BRONCHIÁLNÍ HYPERREAKTIVITY

Bronchiální hyperreaktivita je jedním ze základních rysů asthma bronchiale, kdy průdušky reagují obstrukcí na podněty, na které průduška zdravého jedince nereaguje. V rozsáhlých studiích bylo prokázáno, že její tíže koreluje dobře se stupněm zánětu dýchacích cest. Alergický zánět zvyšuje hyperreaktivitu dýchacích cest na širokou škálu podnětů, které vedou k výraznému zúžení průdušek. Zhoršení kontroly astmatu, např. při virovém infektu dýchacích cest nebo po expozici alergenu, je doprovázeno zvýšením stupně bronchiální hyperreaktivity. Stupeň remodelingu prokázaný v bioptických vzorcích také koreluje se stupněm hyperreaktivity dýchacích cest. (26)

V současné době existují důkazy o tom, že monitorování pacientů pomocí stupně bronchiální hyperreaktivity je ve srovnání se standardním postupem mnohem účinnější a dokáže významně snížit výskyt exacerbací astmatu o přibližně 1/3. I když je rutinní měření bronchiální hyperreaktivity u všech pacientů prakticky nemožné pro její časovou náročnost, zdá se, že přinejmenším pro pacienty s těžším stupněm astmatu by mohlo být s výhodou používáno. (26)

a) Bronchoprovokační testy

Z hlediska působení bronchoprovokačních inhalovaných látek se rozeznává:

- *bronchiální senzitivita* – jež je vyvolána dávkou, která způsobí prahovou odpověď při funkčním vyšetření plic
- *bronchiální reaktivita* – což je stupeň změn v závislosti na dávce podnětu

Nealergická hyperreaktivita zahrnuje alergická i nealergická onemocnění dýchacího ústrojí.

Bronchoprovokační testy dělíme do dvou skupin:

- *nespecifické* – jimi prokazujeme bronchiální hyperreaktivitu obecně. Inhalačně aplikujeme fyziologický roztok, histamin, methacholin, adenosin, leukotrieny a pacient inhaluje chladný vzduch. Jinými formami těchto testů jsou zátěžový test volným během, ergometrie a hyperventilační test
- *specifické* – k průkazu etiologie bronchiálního astmatu – profesionální bronchoprovokační podněty imunologické a neimunologické povahy, alergeny – např. pyly, prachy, plísně a bakteriální alergeny – viz tab. č. 3 (26)

Bronchoprovokační testy	Farmakologické	Nefarmakologické
Přímé	<ul style="list-style-type: none"> • cholinergní antagonisté -methacholin -karchol • bronchoaktivní aminy -histamin 	
Nepřímé	<ul style="list-style-type: none"> • β-adrenergní antagonisté -AMP -leukotrieny -peptidy 	<ul style="list-style-type: none"> • volný běh • chladný vzduch • SO₂ • hypertonický aerosol

Tabulka č. 3 Bronchoprovokační testy. Převzato z Kopřiva, 2003.

b) Bronchomotorické testy

Bronchomotorické testy můžeme rozdělit na:

- *provokační* – mající svůj význam v průběhu diagnostiky asthma bronchiale, k hodnocení aktivity onemocnění a v asymptomatickém období k zhodnocení účinnosti léčby či léčebné dávky
- *dilatační* – umožňující zhodnotit reverzibilitu bronchiální obstrukce či odlišit asthma bronchiale od jiných onemocnění. U nekomplikovaného asthma bronchiale se v dětství zvyšují hodnoty ventilačních ukazatelů většinou o 50 % a více oproti nálezů před podáním bronchodilatancia
- *protektivní* – jež využíváme ke zhodnocení účinku farmak proti navození bronchiální obstrukce (26)

Historicky rozlišujeme dvě základní metody inhalace látky:

- *metoda klidného dýchání* – aerosol se vyvíjí tryskovým nebulizátorem a kontinuálně skrz dvoucestný ventil se přivádí k ústům. Konstantní množství 1 ml každé koncentrace je inhalován 2 minuty klidným dýcháním
- *dozimetrická metoda* – elektronicky řízený ventil dávkuje kalibrované množství aerosolu v nádechu nebo v průběhu části nádechu, kdy je průtok v dýchacích cestách neefektivnější (26)

4. VYŠETŘENÍ PATOLOGIE DÝCHACÍCH CEST

a) Bronchoskopie

Při bronchoskopickém vyšetření můžeme provést:

- *bronchiální biopsii* – bronchiální biopsie by měla být brána za zlatý standard při hodnocení závažnosti zánětlivých změn u asthma bronchiale. U astmatických pacientů postihuje morfologii – ztlustění membrány a porušení epitelové výstelky, vyšší expresi ICAM-1 a E-selektinu a prokazuje buněčné zastoupení v bronchiální stěně – zvýšenou infiltraci CD4+ T-lymfocyty, žírnými buňkami a eozinofilními leukocyty. Nadto může být detekována zvýšená exprese aktivačních markerů např. na T-lymfocytech, zvýšená regulace a tvorba cytokinů, adhezivních molekul atd. I když jsou bioptické odběry malé, nacházíme téměř identické nálezy na různých místech bronchiálního stromu. Rozsah remodelingu koreluje se stupněm bronchiální hyperreaktivity dýchacích cest, ale nekoreluje s trváním a závažností asthma bronchiale (26)
- *bronchiální oplach (wash)* (26)
- *bronchoalveolární laváž (BAL)* – je rovněž často používána k hodnocení zánětlivých procesů u pacientů s astmatem. Tato metoda doznala v poslední době v plicní diagnostice značného rozšíření. Umožňuje odběr buněčného materiálu z plicní periferie, tedy až z terminálních bronchiolů a plicních sklípků, podrobné vyšetření stavu plicní tkáně a prokáže zastoupení různých typů buněk a mediátorů – vyšší hladiny IL-1 α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF, MIP α , TGF α , TGF β . Buňky takto získané z BAL je možno hodnotit jak z hlediska absolutního a diferenciálního odečtu, tak podrobně s využitím imunologických metod (imunofluorescence, průtoková cytometrie). Získanou bronchoalveolární tekutinu je možno použít i k diagnostice mikrobiologické a virologické. Pro praxi

je nejcennější diferenciální odečet buněk – u zdravého člověka jsou převažující buněčnou populací alveolární makrofágy, lymfocytů bývá do 10%, neutrofilů se vyskytují zcela ojediněle a eozinofily by prakticky neměly být přítomny vůbec. (13) U asthma bronchiale však počty eozinofilů v bronchoalveolární laváži podstatně stoupají a proto nám tato metoda podává srovnatelné údaje o jejich počtu. Hodnoty eozinofilie a ECP v BAL s hodnotami periferní eozinofilie korelují se závažností asthma bronchiale. (13, 26) Ve srovnání s bronchiálními biopsiemi BAL velmi dobře odráží zastoupení eozinofilních leukocytů, ale mnohem hůře počet T-lymfocytů. Obě vyšetření (bronchiální biopsie i bronchoalveolární laváž) však mají řadu nevýhod, pro pacienta jsou velmi nepříjemné a v neposlední řadě i časově náročné. Jejich opakování v časově krátkých intervalech je tudíž prakticky nemožné a neetické. (26)

➤ *transbronchiální biopsie* (26)

b) Indukované sputum

Vyšetření indukovaného sputa řadíme mezi neinvazivní metody k hodnocení zánětu dýchacích cest. Odráží specifické změny v dýchacích cestách více než vyšetření periferní krve nebo moči. Vykazuje dobrou reprodukovatelnost a buněčné zastoupení dobře koreluje s ventilačními parametry. Sputum indukované technikou inhalace hypertonického fyziologického roztoku je zdrojem buněk i cytokinů využitelných k monitorování asthma bronchiale. Procentuálním zastoupením jednotlivých buněčných elementů nejvíce připomíná bronchiální výplach a stejně jako v případě BAL podhodnocuje přítomnost T-lymfocytů. Určitým řešením těchto rozdílů by bylo hodnocení stavu aktivace jednotlivých zánětlivých buněk. (26)

Zastoupení eozinofilních leukocytů v indukovaném sputu se zdá být výhodným znakem stupně zánětu dýchacích cest. Jejich procento je zvýšeno u pacientů dosud neléčených inhalačními steroidy, dále stoupá po expozici alergenu nebo v průběhu akutní exacerbace astmatu. Zastoupení eozinofilů stoupá s několikátýdenním předstihem před zhoršením symptomů či plicních funkcí u nastupující exacerbace astmatu. V několika prospektivních randomizovaných studiích bylo prokázáno, že monitorování pacientů pomocí zastoupení eozinofilních leukocytů ve sputu vede ke zlepšení kontroly astmatu a významnému snížení výskytu exacerbací až o 2/3. Tato metoda monitorování je proto velmi vhodná pro sledování pacientů se středně těžkým až těžkým astmatem. (26)

5. ZMĚNY AKTIVITY BUNĚK

Vedle vyšetření plicních funkcí, impulzní oscilometrie, vyšetření indukovaného sputa, vyšetření moči, bronchoskopie, vyšetření vydechovaného vzduchu, hodnocení symptomů a vyšetření bronchiální hyperreaktivity pomocí bronchoprovokačních a bronchomotorických testů, došlo v 80. a 90. letech 20. století v diagnostice a terapii ke zvýšení zájmu o klinické využití monitorování různých buněk a stanovení koncentrací či přítomnosti proteinů produkovaných jednotlivými buněčnými populacemi. Jedním z klinicky využitelných proteinů se stal i eozinofilní kationický protein (ECP) – granulární protein, který je produktem eozinofilních leukocytů. V současnosti jsou nejdostupnějšími a nejpoužívanějšími parametry k nepřímému hodnocení aktivity eozinofilního zánětu:

- a) eozinofilie s převahou procentuálního zastoupení aktivovaných (hypodenzních) eozinofilů v periferní krvi se zvýšenou expresí CD44 na povrchu eozinofilů
- b) eozinofilní kationický protein (26)

a) Eozinofily v bronchoalveolární laváži u asthma bronchiale

Vysoké počty eozinofilů v BAL (2–11 %) jsou charakteristické pro asthma bronchiale. Počet eozinofilů v periferní krvi, v bronchoalveolární laváži a ECP koreluje se závažností asthma bronchiale. Byla též nalezena korelace mezi těmito parametry a nálezy při vyšetření bronchiální hyperreaktivity na methacholin. (26)

Eozinofilie v bronchoalveolární laváži koreluje s aktivovanými CD4+ T-lymfocyty exprimujícími IL-2 receptor s poklesem FEV₁ a bronchiální hyperreaktivitou na methacholin. (26)

Většina lymfocytů v bronchoalveolární laváži jsou T-lymfocyty a poměr CD4 k CD8 T-lymfocytům je od 1,5:1 do 2:1. Tyto nálezy odpovídají poměrům v periferní krvi. Není jednoznačně zodpovězena otázka, zda počty lymfocytů v bronchoalveolární laváži koreluje s počty v bronchiální stěně. Většina T-lymfocytů v periferní krvi exprimuje na povrchu znak CD45RA charakterizující naivní T-lymfocyty. V bronchoalveolární laváži většina T-lymfocytů exprimuje znak CD45RO spojený s paměťovými T-lymfocyty a pravděpodobně související s předchozí expozicí alergenem a transformací T-lymfocytů vlivem mikroprostředí dýchacích cest. (26)

V bronchoalveolární laváži u pacientů s atopickým asthma bronchiale byla prokázána převaha Th2 lymfocytů. IL-4 a IL-5 hrají klíčovou roli v rozvoji alergického zánětu. Makrofágy jsou slaběji antigen prezentujícími buňkami než lymfocyty a jejich

poměr k lymfocytům je 5:1 až 10:1 na povrchu dýchacích cest, mohou potlačovat lymfocytární odpověď. Makrofágy se podílejí na rozvoji zánětu v dýchacích cestách mnoha mechanismy na mnoha úrovních. Exprimují nízkoafinní receptory FcεRII pro imunoglobulin E a u astmatiků je jejich exprese zvýšená. Po vazbě antigenu na imunoglobuliny E uvolňují LTB₄, LTC₄, PGD₂, lyzozomální enzymy, superoxid, PAF atd. Tyto mediátory hrají významnou roli v rozvoji bronchokonstrikce a podílejí se na zánětlivých změnách zahrnujících přestup zánětlivých buněk do místa zánětu a alteraci vaskulární permeability. Produkují i prozánětlivé cytokiny – IL-1β, TNFα, IL-6 a GM-CSF, které se podílejí na aktivaci endoteliálních buněk, přestupu buněk a prodloužení životnosti eozinofilů. Zvýšená tvorba TNFα po expozici alergenu je součástí fyziologické pozdní odpovědi. (26)

b) Eozinofilní kationický protein (ECP)

Eozinofilní kationický protein je klinicky využíván v diagnostice alergických onemocnění, především bronchiálního astmatu. Množství ECP v periferní krvi je nepřímým ukazatelem aktivity eozinofilů a závažnosti chronického eozinofilního zánětu. Byly provedeny i studie u jiných onemocnění, kde se předpokládá destruktivní proces v tkáních a následná fibrotizace v rámci reparačních procesů, event. přímý podíl eozinofilních leukocytů. (26)

Komerčně uváděná normální hladina ECP je do 15 μg/l. ECP ovšem není vhodným samostatným faktorem pro potvrzení diagnózy atopie. Opakovaně byla také pozorována i sezónní variabilita ECP a také rozdílná horní hranice sérového ECP v jednotlivých zemích u zdravých jedinců. U atopiků došlo během pylové sezóny ke zvýšení hladiny tohoto proteinu v séru, posléze po sezóně byl pozorován pokles (totéž platilo i pro další eozinofilní granulární proteiny – EPX, EDN). (26)

Stanovení sérového ECP lze využít i k monitorování aktivity zánětu u bronchiálního astmatu. Opakovaně byla nalezena korelace mezi absolutním počtem eozinofilů a sérovým ECP. Při bronchoprovokačních testech došlo k vzestupu ECP společně se zvýšením cirkulujících eozinofilů a nejvyšší hladiny bylo dosaženo za 24 hodin po provokaci alergenem. (26)

U atopických senzibilizovaných dětí byla nalezena negativní korelace mezi intracelulárním a sérovým ECP, který byl vysoký. Naproti tomu u nesenzibilizovaných dětí bylo nalezeno vyšší množství intracelulárního ECP než u dětí senzibilizovaných a sérový ECP byl nízký, což odráželo připravenost k uvolnění obsahu granul. Tento

nález lze vysvětlit buď častým uvolňováním malých dávek granulárních proteinů u senzibilizovaných jedinců, což sníží jeho intracelulární obsah, nebo je nízká hladina intracelulárního ECP dána kontinuálním uvolňováním ECP v průběhu chronického eozinofilního zánětu v dýchacích cestách. (26)

Je nutné si uvědomit, že při hodnocení hladiny ECP musíme hodnotit klinický stav pacienta s bronchiálním astmatem i přítomnost jiných alergických onemocnění, ale i reexpozici alergenu, např. v pylové sezóně, a samozřejmě také jiná onemocnění, která mají fibrotické procesy ve své patofyziologii, včetně parazitárních onemocnění. (26)

Hladina ECP je používána pro hodnocení úspěšnosti terapie asthma bronchiale, především inhalačními steroidy, kde je u dospělých i u dětí popisován pokles sérové hladiny ECP po nasazení inhalačních kortikoidů. Sezónní vzestup ECP lze využít k diagnostice a monitorování alergie. U dospělých pacientů se využívá také metodika indukovaného sputa s podobnými nálezy jako u sérového ECP a ECP v bronchoalveolární laváži. (26)

6. OSTATNÍ

Mezi další nepřímé metody studia mechanismů zánětu u asthma bronchiale lze zahrnout vyšetření moči a vyšetření vydechovaného vzduchu. (26)

a) Vyšetření moči

Předností vyšetření moči je jednoduché získání vzorku při monitorování terapie. V posledních letech se čím dál více zdůrazňuje úloha metabolitů kyseliny arachidonové v patogenezi bronchiálního astmatu, proto se zde nabízí sledování leukotrienu E₄. Zvýšené množství LTE₄ v moči bylo prokázáno u aspirin senzitivních astmatiků, po bronchoprovokačním testu alergenem i u pacientů s akutní exacerbací bronchiálního astmatu. Žádné takové zvýšení však nebylo pozorováno u námahou navozeného bronchospazmu navzdory tomu, že jej antagonisté leukotrienových receptorů jsou schopny inhibovat. Měření LTE₄ v moči se zdá být velmi užitečné při podávání léků interferujících s tvorbou cysteinylových leukotrienů. Jeho vyšetřování v každodenní léčbě a monitorování pacientů s bronchiálním astmatem je však rovněž nepřínosné. (26)

U dětí s recidivujícími obstrukčními bronchitidami s wheezingem je možné použít ještě vyšetření eozinofilního proteinu X v moči. (26)

b) Vyšetření vydechaného vzduchu

Z možných markerů aktivity zánětlivého procesu dýchacích cest, které je možno měřit ve vydechaném vzduchu astmatiků, zaznamenal největší pozornost NO – oxid dusnatý (intercelulární mediátor). Jeho hlavním zdrojem jsou bronchiální epiteliální buňky (i když je známo, že je produkován rovněž epiteliemi sliznice nosu i paranazálních dutin). Množství NO ve vydechaném vzduchu stoupá po bronchoprovokačním testu alergenem i při akutní exacerbaci astmatu. Aplikace inhalačních i systémových steroidů vede naopak k jeho poklesu. Důležitým poznatkem je skutečnost, že jeho hladiny stoupají při zhoršení astmatu dříve, než dojde ke zhoršení skóre příznaků. Velkým nedostatkem je velikost a cena přístroje, který je schopen NO ve vydechaném vzduchu měřit. Navíc dosud nebyla publikována prospektivní studie, která by prokázala význam opakovaného měření NO pro zlepšení kontroly astmatu. (26)

Jednou z dalších látek, kterou lze prokazovat v kondenzátu vydechaného vzduchu může být i H_2O_2 jako obraz zvýšené tvorby kyslíkových radikálů v akutním stadiu astmatu. Dalšími potenciálními mediátory se zdají být leukotrieny nebo cytokiny. Tato vyšetření by mohla být ideálními neinvazivními markery zvláště u dětí, u nichž je obtížné získat indukované sputum. (26)

Tradičními laboratorními metodami jsou v medicíně historicky vyšetření periferní krve a moči, která nás však jen nepřímo informují o aktivitě eozinofilního zánětu. Existuje řada důkazů o korelaci absolutního počtu eozinofilních leukocytů s tíží astmatu. V nedávné době byla prokázána i podobná korelace pro jeden z hlavních produktů eozinofilních leukocytů – eozinofilní kationický protein. Hodnoty ECP v séru také částečně korelují se závažností aktivity eozinofilního zánětu, avšak jeho hladina je ovlivňována mnoha faktory, např. současně probíhajícím infekčním onemocněním. Nadějným vyšetřením se jeví monitorování IL-5. V současné době však není dostupný jediný spolehlivý marker odrážející stupeň zánětu dýchacích cest u pacientů s bronchiálním astmatem a stále se hledají alternativní markery k hodnocení zánětlivé aktivity v dolních dýchacích cestách. V současnosti, ale zřejmě i v blízké budoucnosti budeme muset kontrolu asthma bronchiale nadále posuzovat podle klinického stavu pacienta se zvláštním důrazem na frekvenci akutních exacerbací, častost aplikace krátkodobě působících inhalačních β_2 -mimetik, hodnoty ventilačních parametrů a jejich variabilitu. Existují však přinejmenším 2 metody (měření bronchiální hyperreakivity a měření počtu eozinofilů ve sputu), pomocí kterých bychom mohli a měli monitorovat

těžší a rizikové astmatiky. Nezastupitelné místo ve vyšetřovacích metodách má i flexibilní bronchoskopie s přímým odběrem vzorků. V posledním období vystupuje do popředí i zájem o vyšetřování složek vydechovaného vzduchu. (26)

3. Laboratorní zvířata

3.1 Etické zásady práce s laboratorními zvířaty

Při práci se zvířaty je nutno dodržovat etiku experimentální práce. Ke zvířeti musíme přistupovat jako k živému tvoru, který nám slouží jako pomocník při odstraňování potíží a bolestí člověka. Experiment musíme zvolit 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 etické principy, předpisy Ministerstva zemědělství ČR a zákon na ochranu zvířat proti týrání 246/1992 Sb. v platném znění. (21)

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. (19)

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. (19)

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. Orgány pro kultivaci se pochopitelně získávají z živého jedince, ale z některých orgánů je možné vytvořit více kultur a především je možno zužitkovat všechny orgány pokusného zvířete, které se uplatní pro různé experimenty, např. v rámci jednoho ústavu. V některých pokusech mohou být obratlovci nahrazeni nižšími organizmy – bezobratlými, mikroorganismy nebo rostlinami. Také vývoj nových 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. (19)

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 analgezií 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 analgezií při výkonech, které nejsou spojeny se záměrným vyvoláním bolesti. (19)

(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. (19)

3.2 Laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*)

Cílem mé rigorózní práce bylo testování metodiky na dvou kmenech laboratorních potkanů – Wistar a Brown Norway. Vzhledem k tomu, že se tato rigorózní práce úzce zabývá respiračním traktem, při bližším popisu laboratorních zvířat mu bude věnována větší pozornost.

Taxonomické zařazení: Nadříše: *Eukaryota*
Říše: *Animalia*
Podříše: *Metazoa*
Řada: *Deuterostomia*
Kmen: *Chordata*
Podkmen: *Vertebrata*
Nadtřída: *Gnathostomata*
Třída: *Mammalia*
Podtřída: *Theria*
Nadřád: *Eutheria*
Řád: *Rodentia*
Podřád: *Myomorpha*
Čeleď: *Muridae*
Rod: *Rattus*
Druh: *Rattus norvegicus*

Dnešní potkan má původ v oblasti Asie, v oblastech jižního Ruska a severní Číny, kde se hlodavci (*Rodentia*) objevili asi před 54 mil. let. Čeleď *Muridae* se poprvé objevila před 34 mil. let a asi před 3,5 mil. let se z ní vydělil rod *Rattus*, který v současné době zahrnuje 51 druhů. (9)

První potkan na evropské pevnině byl rozpoznán a popsán v roce 1728. Do Evropy se pravděpodobně dostal na lodích v období křižáckých výprav. Později se rozšířil i do Anglie a Spojených států. (9)

Laboratorní potkan byl získán z divokého potkana, neboť na rozdíl od křavy se lépe adaptuje na laboratorní podmínky. První záznam o experimentálním využití potkanů pochází z roku 1856, kdy Waller a Philipeaux sledovali vliv adrenalectomie. (29) V roce 1982 byl potkan jedno z nejvyužívanějších laboratorních zvířat (39 %).

V současné době je známo několik kmenů, z nichž pro laboratorní účely jsou nejpoužívanější kmen Wistar, kmen Brown Norway, kmen Long Evans a kmen Sprague Dawley. Mezi jednotlivými kmeny mohou být podstatné rozdíly a je třeba tento fakt zohlednit při výběru vhodného kmene pro daný typ pokusu. (8)



Obr. č. 22 Laboratorní potkan kmen Wistar.
Převzato z www.iar.or.jp



Obr. č. 23 Laboratorní potkan kmen Brown Norway.
Převzato z <http://currents.ucsc.edu>

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 štěrbinovité 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)

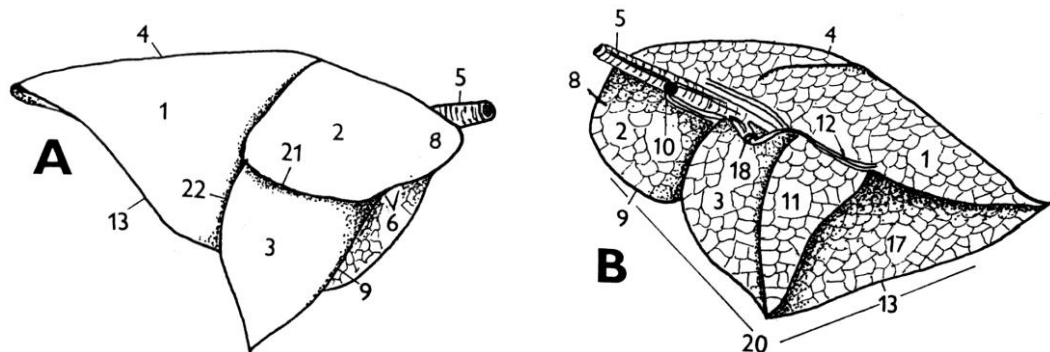
Respirační systém (*Apparatus respiratorius*) – anatomie

Cavum nasi začíná rostrálně štěrbinovitou nozdrou. Nosní i čichové skořepky 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 prstěnicitých 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

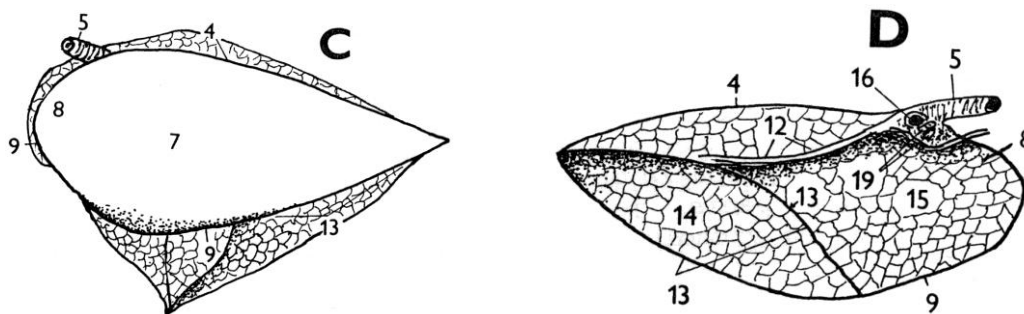
m. trachealis, upínající se na ně zvenčí. Intrapulmonálně nemají bronchy chrupavčitou výztuž. *Trachea* se v *bifurcatio tracheae* dělí na pravou a levou průdušku (*bronchus principalis dexter et sinister*). (1)

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 konstrikce je zajištěna vagovou inervací, není doplňována adrenergí 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. (29)



Obr. č. 24 a 25 Pravá plíce z laterální (A) a mediální (B) strany. Převzato z Červený, 1999.

1 – *lobus caudalis pulmonis dx.*, 2 – *lobus cranialis pulmonis dx.*, 3 – *lobus medius pulmonis dx.*, 4 – *margo dorsalis*, 5 – *trachea*, 6 – *incisura cardiaca pulmonis dx.*, 8 – *apex pulmonis*, 9 – *margo ventralis*, 10 – *bronchus principalis sin.*, 11 – *lobus accessorius pulmonis dx.*, 12 – *facies medialis, pars vertebralis et insertio mediastini*, 13 – *margo basalis*, 17 – *facies diaphragmatica pulmonis dx.*, 18 – *v. pulmonalis dx.*, 20 – *margo acutus*, 21 – *fissura interlobaris cranialis*, 22 – *fissura interlobaris caudalis*



Obr. č. 26 a 27 Levá plíce z laterální (C) a mediální (D) strany. Převzato z Červený, 1999.

4 – *margo dorsalis*, 5 – *trachea*, 7 – *pulmo sinister*, 8 – *apex pulmonis*, 9 – *margo ventralis*, 12 – *facies medialis, pars vertebralis et insertio mediastini*, 13 – *margo basalis*, 14 – *facies diaphragmatica pulmonis sin.*, 15 – *impresio cardiaca pulmonis sin.*, 16 – *bronchus principalis dx.*, 19 – *a. et v. pulmonalis sin.*

Respirační systém (*Apparatus respiratorius*) – histologie

Většinu epitelální výstelky nosní sliznice tvoří víceřadý respirační epitel s řasinkami, který sdílí mnohé charakteristiky a reakci na poškození s tracheálním a bronchiálním epitelem. V *lamina propria* respirační sliznice dutiny nosní jsou smíšené tuboalveolární žlázy produkující hlen, a drobné lymfatické uzlíky. Čichový epitel je charakteristický vysokou monooxygenázovou aktivitou závislou na cytochromu P-450 a je citlivý k řadě toxinů, které mohou poškozovat také bronchiolární epitel a některé složky alveolárních přepážek. (3)

V nasofaryngu ústí Eustachovy trubice. *Nasofarynx* je lemován víceřadým respiračním epitelem s řasinkami s oblastmi vícevrstevného dlaždicového epitelu. V submukóze jsou početné lymfatické uzlíky. (3)

Larynx je vyztužen chrupavkou, takže je odolný proti deformaci a obstrukci lumen. Ve vestibulu laryngu až k orálnímu okraji hlasivek je výstelka z vrstevnatého dlaždicového rohovějícího epitelu a respiračního epitelu s řasinkami. (3, 24)

Trachea a *bronchy* jsou vystlány víceřadým epitelem tvořeným buňkami s řasinkami, bez řasinek a hlenovými (pohárkovými) buňkami. Buňky bez řasinek jsou bazální, serózní a neuroendokrinní. V epitelu jsou také přítomny lymfocyty. Epitel průdušnice a bronchů je tvořen stabilními buňkami s kontinuální, pomalou obměnou. Po poškození epitelu dochází ke stereotypní reakci. Značně vulnerabilní buňky s řasinkovým lemem jako buňky vysoce diferencované bez schopnosti regenerace jsou

po poškození a deskvamaci nahrazovány alespoň v iniciální fázi hojení buňkami bez řasinek nebo hlenovými buňkami. Bazální buňky jsou důležité spíše pro uchycení cylindrických buněk k bazální membráně než pro regeneraci epitelu. Hlenové buňky a buňky bez řasinek mají schopnost vzájemné diferenciaci i diferenciaci v jiné epiteliální elementy. Kromě bariérové funkce, sekrece hlenu, mukociliárního transportu cizích částic, tracheobronchiální epitel syntetizuje a sekretuje řadu cytokinů a dalších velmi účinných působků (ikosanoidy atd.) (3)

Bronchioly na rozdíl od bronchů nemají u potkanů ve stěně chrupavčitou výztuž a jejich průchodnost je udržována pevným spojením jejich stěny s interalveolárními přepážkami. Vzhledem ke své anatomické stavbě jsou mnohem citlivější k poškození. Epitel v distálních částech je jednovrstevný cylindrický až kubický, většinou složen z buněk s řasinkami a bez řasinek, tzv. Clarovy buňky, které obsahují granula a fungují jako kmenové buňky při reparativních procesech alveolárního poškození, neboť mají schopnost diferenciaci na řasinkové a jiné buňky. Soustava větvících se bronchiolů končí terminálními bronchioly, ve kterých nejsou pohárkové buňky a epitel je kubický. Terminální bronchioly se dále rozvětvují na respirační bronchioly (u potkanů jsou přítomny za 10 dní po narození) nebo přímo přechází v alveolární dukty. (3) Podél intrapulmonálních bronchů a podél bronchiolů jsou u potkanů disseminovány lymfatické uzlíky, kde při zánětlivých procesech vznikají germinativní centra. Epitel nad lymfatickými uzlíky nemá řasinky. (24)

Alveolární parenchym vytváří strukturální a funkční jednotky – plicní aciny, které obsahují větve respiračních bronchiolů, alveolární chodbičky, alveolární váčky, alveoly a přívodnou cévu. (3)

Bariéru vzduch – krev u všech savců tvoří souvislý respirační alveolární epitel, endotel krevních kapilár a jejich bazální membrány. Mezi těmito vrstvami je různé množství retikulárních a elastických vláken v amorfní základní hmotě a fixní (fibroblasty, pericyty) a volné makrofágy. Všechny tyto složky tvoří strukturu označovanou jako interalveolární septum. (3)

Membranózní pneumocyt (typ I) je plochá epiteliální buňka pokrývající velkou většinu povrchu alveolu, s malou schopností adaptace. Poškozené buňky jsou rychle odloučeny od bazální membrány. (3)

Granulární pneumocyty (typ II, obrovská alveolární buňka) se poznají podle vakuolizované cytoplazmy. Jsou to kuboideální epiteliální buňky, ve kterých se nacházejí tzv. lamelární tělíska obsahující charakteristická fosfolipidová zrna. Tyto buňky

syntetizují surfaktant a jsou progenitorovými buňkami alveolárního epitelu při normální obměně a poškození. Buňky jsou schopny rychlé proliferace a repopulace denudované bazální membrány (epitelizace alveolů), diferenciaci na pneumocyt typu I a syntézy některých složek základní matrix a mají i další funkce. Plicní surfaktant pokrývá vnitřní povrch alveolů a plní v podstatě 3 funkce: udržuje alveolus bez vody s výjimkou její tenké vrstvičky, která pokrývá povrch epitelu, musí být tak strukturně stabilní, aby na konci expirace nenastal kolaps alveolu a přitom se povrchové napětí surfaktantu blížilo nule a zajišťuje vhodné podmínky pro funkci plicního obranného systému, zejména pro alveolární makrofágy. (3)

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. (29)

Alveolární fibroblasty jsou heterogenní skupinou buněk s různou syntetickou aktivitou (kolageny, elastin, atd.), kontraktilní funkcí a zprostředkovávání interakcí mezi buňkami a ECM. (3)

Makrofágová populace v plicích zahrnuje alveolární, intersticiální, intravaskulární makrofágy a dendritické buňky. Za fyziologických podmínek jsou alveolární makrofágy přítomné v plicní tkáni monocytárního původu. V průběhu zánětlivé reakce vznikají pak i jejich proliferací. Intravaskulární makrofágy jsou vysoce fagocytující buňky a zabraňují průniku bakterií do krevní cirkulace. Dendritické buňky jsou antigen – prezentující buňky. Endoteliální buňky mají především bariérové, transportní a metabolické funkce. (3)

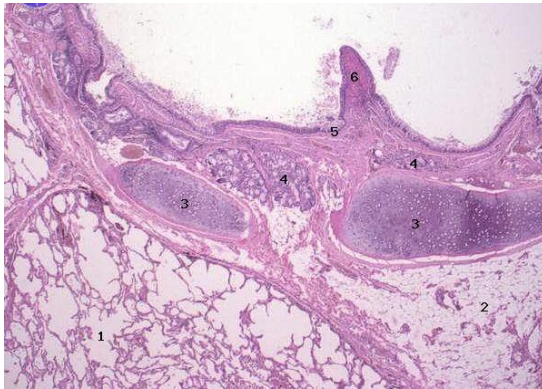
Řízení aktivity dýchacího ústrojí je zajištěno pomocí tkáňové výměny CO₂ v dýchacím centru v *medulla oblongata* a s účastí karotických tělísek. Karotická tělíška reagují na nízkou tenzi kyslíku v krvi. (29)

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. (29)

Podobně jako u člověka, prekapilární spoje v plicích se vyskytují jen v hilových oblastech plic. Plicní cévy se zužují při odpovědi na acetylcholin. (29)

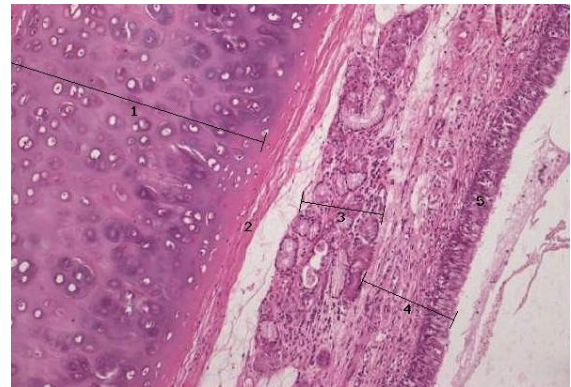
Potkani mají v plicích bohatou inervaci, vysokou aktivitu serotoninu a naopak nízkou aktivitu histaminu. (29)

Stenovy žlázy leží v maxilárních sinusech a jsou totožné se solnými žlázami mořských ptáků. Žlázy regulují viskozitu mucinu a vlhkost vdechovaného vzduchu. (29)



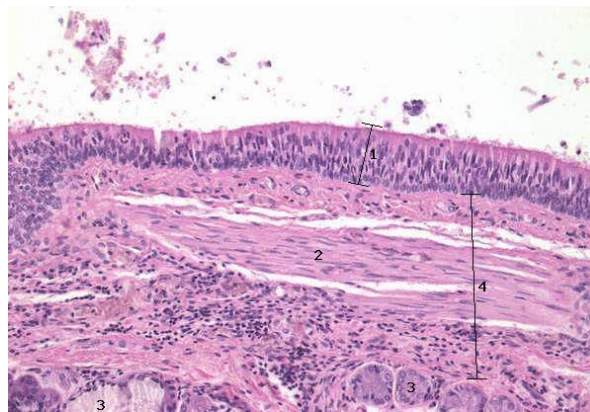
Obr. č. 28 *Bronchus intrapulmonalis*

1 – plicní alveoly, 2 – řídké vazivo, 3 – hyalinní chrupavka, 4 – seromucinózní žlázky, 5 – epitel a slizniční vazivo, 6 – slizniční řasa.
Převzato z <http://www.lf3.cuni.cz/histologie/Atlas0/>



Obr. č. 29 *Trachea*

1 – hyalinní chrupavka, 2 – *perichondrium*, 3 – seromucinózní žlázky, 4 – *tunica mucosa*, 5 – víceřadý cylindrický epitel s řasinkami.
Převzato z <http://www.lf3.cuni.cz/histologie/Atlas0/>



Obr. č. 30 Víceřadý epitel s řasinkami

1 – víceřadý cylindrický epitel s řasinkami, 2 – hladká svalovina v slizničním vazivu, 3 – seromucinózní žlázky, 4 – slizniční vazivo.
Převzato z <http://www.lf3.cuni.cz/histologie/Atlas0/>

Na závěr této kapitoly uvádím průměrné hodnoty nejčastěji sledovaných parametrů adultních zvířat: (1)

Hmotnost samce	900–1500 g
Hmotnost samice	700–1300 g
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) μm
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 *
Počet erytrocytů	5,5–10 mil . 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}

* 60–84 dní staří anestetizovaní potkani

III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. Použitý materiál

a) Chemikálie

Azur B, Fluka, 422989/1 30102
BCA Protein Assay Reagent Kit, Pierce, USA
Fyziologický roztok
Genciánová violet', LACHEMA, 50 270 0302
Hydroxid hlinitý, Sigma – Aldrich, 11033 LOT20320
Kyselina sírová 4 M, fa Kulich Hradec Králové
O-fenylendiamin 10 mM, Fluka
Ovalbumin, Sigma – Aldrich, A-5503, LOT71K7028
Pentobarbital, SPOFA, 41050590
Peroxid vodíku 1mM, Sigma – Aldrich, LOT S23803105
Propranolol, Sigma – Aldrich, P-0884, LOT 02K1489
Methanol p.a., fa Kulich Hradec Králové, 24090
Sukcinylocholin, Sigma – Aldrich, S-8251, LOT 21K1659
Tris HCl 0,05 M, Sigma – Aldrich, 114K546
Triton X-100 0,1 %, Sigma – Aldrich, 114K0182
Žlutý eozin, LACHEMA

b) Pomůcky

Bürkerova komůrka
Injekční stříkačky
Jehly
Krycí sklíčka
Laboratorní sklo
Mikrotitrační destička
Multikanálová pipeta
Nůžky: rovné, zahnuté, oční
Pinzety: rovné anatomické (bez zoubků na konci), chirurgické (tkáňové) se zoubky na konci, zahnuté bez zoubků na konci
Pipety
Podložní sklíčka
Zkumavky

c) Přístroje

Centrifuga, MPW-360, Polsko

Laboratorní váhy Kern

Mikroskop Olympus BX

Spektrofotometr EMS Reader MF (Biotech)

d) Zvířata

Laboratorní potkan, kmen Wistar, průměrná hmotnost 330 g, dodavatel Biotest
Konárovice, Česká republika

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

U zvířat byla porovnávána bronchiální reaktivita pomocí několika parametrů – celkového počtu buněk v 1 ml BAL, diferenciálního počtu buněk v BAL a dále byly měřeny proteiny a EPO v 1 μ l BAL. V experimentu byly použity 2 druhy zvířat – potkan Wistar a potkan Brown Norway; jejich rozdělení uvádí následující tabulka:

POTKANI WISTAR	Nesenzibilizovaní (NS) – kontrolní skupina zvířat, která nebyla senzibilizovaná ovalbuminem	BAL brán 1 hodinu po challenge; n = 4
		BAL brán 24 hodin po challenge; n = 6
	Senzibilizovaní (S) – skupina zvířat senzibilizovaných ovalbuminem	BAL brán 1 hodinu po challenge; n = 6
		BAL brán 24 hodin po challenge; n = 9
POTKANI BROWN NORWAY	Nesenzibilizovaní (NS) – kontrolní skupina zvířat, která nebyla senzibilizovaná ovalbuminem	BAL brán 24 hodin po challenge; n = 3
	Senzibilizovaní (S) – skupina zvířat senzibilizovaných ovalbuminem	BAL brán 24 hodin po challenge; n = 10

Tabulka č. 4 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) 1 hodinu nebo 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 na určitou dobu umístěna do komory vyplněné aerosolem a byla vystavena inhalaci až do úplného vyčerpání roztoku ovalbuminu.



Obr. č. 31 HSE nebulizátor. Převzato z www.harvardapparatus.com

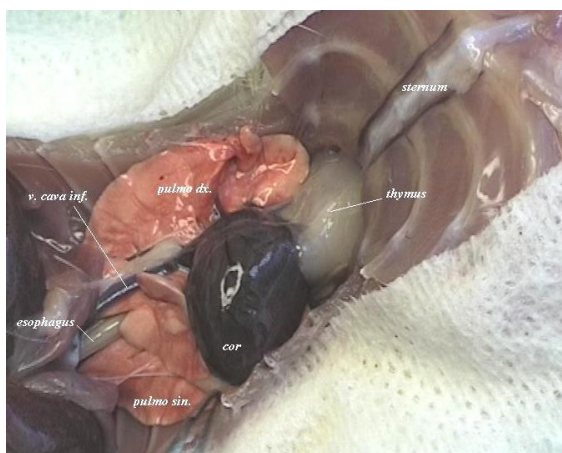
c) Anestezie a stanovení bronchiální reaktivity

Tato část pokusu tvořila základ mé diplomové práce.

Anestezie byla všem zvířatům navozena intraperitoneálně. U potkanů kmene Wistar i Brown Norway byl použit pentobarbital v dávce 40–45 mg/kg. Následně byla u zvířat provedena kanylace *v. jugularis externa*. Dále byla provedena tracheální kanylace a přes tracheální kanylu bylo zvíře napojeno na dýchací přístroj. Vlastní respirace zvířete byla utlumena i.v. podáním sukcinylcholinu (2 mg/kg). Poté byl zvířeti aplikován i.v. serotonin v dávkách 5, 10, 20 a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a byla hodnocena bronchiální reaktivita pomocí měření plicní rezistence. Aby se zvýšila zaznamenávaná odpověď, byl 5 min před prvním podáním zkoumané bronchokonstrikční látky zvířeti podán i.v. propranolol (1 mg/kg). Po tomto pokusu bylo zvíře usmrceno předávkováním anestezie.

d) Výplach plic a příprava BAL

Po usmrcení zvířete předávkováním anestezie jsme provedli tupou preparaci plic zvířete, plíce jsme šetrně vyjmuli a opatrně omyli ve fyziologickém roztoku. Následně jsme provedli bronchoalveolární laváž 12 ml fyziologického roztoku rozděleného do dvou dávek po 6 ml. Poté byla provedena centrifugace tekutiny bronchoalveolární laváže (BAL) (1200 rpm, 20 min, 4°C) a supernatant byl uschován při -80°C pro pozdější stanovení peroxidázy eozinofilů (EPO).



Obr. č. 32 Uložení plic u potkana po otevření dutiny hrudní. Převzato z Živná, 2001

e) Stanovení počtu buněk v BAL

Stanovení počtu buněk bylo provedeno metodou počítání pod mikroskopem v Bürkerově komůrce. Bürkerova komůrka je 0,5 cm silné sklo, na němž se nacházejí 2 počítací prostory. Dna těchto prostorů jsou pokryta jemnými velmi přesnými vrypy. Počítací prostory jsou oproti okolí sníženy o 0,1 mm. Jednotlivými vrypy a tímto snížením je vytvořen prostor, v němž se buňky počítají. Počítací prostor Bürkerovy komůrky je rozdělen trojitými vrypy na 9 velkých čtvercových polí, každé z těchto polí je dále členěno dvojitými vrypy na 16 menších čtverců. Nejmenší čtverce (v každém z 9 velkých polí 9) jsou tvořeny průsečíky dvojitých vrypů. (20)



Obr. č. 33 Bürkerova komůrka. Převzato z www.lf3.cuni.cz (20)

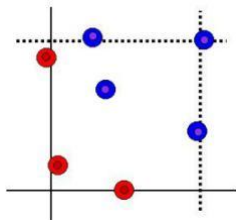
Principem této metody je sečtení všech buněk ve známém objemu. Toto číslo se pak vztáhne na objem referenční (1 litr nebo 1 mm^3).

Pelet jsme resuspendovali v 1 ml fyziologického roztoku a poté jsme smíchali 50 μl resuspendovaného peletu a 450 μl barvicího roztoku.

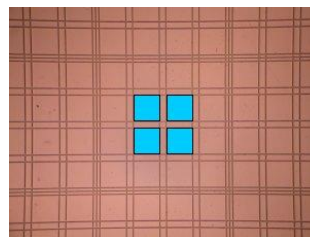
Příprava barvicího roztoku: Roztok na barvení leukocytů obsahuje 0,5 g krystalové violeti, 5 ml kyseliny octové a destilovanou vodu ad 250 ml.

Na počítací prostor jsme umístili krycí sklíčko. Do vzniklé komůrky jsme pipetou dali kapku směsi tak, aby byla komůrka plná. Po 3–5 minutách klesli všechny buňky na dno komůrky a bylo možné je počítat. Počet buněk jsme stanovili s ohledem na ředění vzorku.

Strana čtverce měří 0,2 mm, jeho obsah je tedy $0,04 \text{ mm}^2$ ($1/25 \text{ mm}^2$). V případě, kdy se buňka dotýká hrany čtverce, postupuje se podle následujícího pravidla: Před začátkem počítání si vybereme dvě sousední hrany čtverce. Všechny buňky, které se pak těchto hran dotýkají, do celkového počtu zahrneme. Ty které se dotýkají nezvolených hran naopak nepočítáme. (20) Buňky jsme počítali ve všech čtvercích z jednoho velkého čtverce, tj. v 25 malých čtvercích.



Obr. č. 34 Způsob počítání krvinek; vybrané hrany (horní a pravá) jsou označeny tečkovaně; krvinky uvnitř čtverce a ty, které se vybraných hran dotýkají (označeny modře), se počítají, krvinky dotýkající se zbylých hran (červené) ne. Převzato z www.lf3.cuni.cz (20)



Obr. č. 35 Čtverce pro počítání leukocytů; bílé krvinky se počítají v 50 větších čtvercích Bürkerovy komůrky; čtyři takové čtverce jsou na obrázku zvýrazněny. Převzato z www.lf3.cuni.cz (20)

f) Stanovení diferenciálního počtu buněk

Pelet jsme resuspendovali v 1 ml fyziologického roztoku a z toho 30 μ l jsme nanесли na podložní skličko pokryté želatinou (1,3 %). Preparát byl 10 min fixován v roztoku methanolu a postupně obarven (žlutý eozin, azur B). Pod mikroskopem jsme vždy napočítali celkem 100 buněk a určili jsme procentuální podíl neutrofilů, eozinofilů, makrofágů a leukocytů.

g) Stanovení eozinofilní peroxidázy (EPO)

Bronchoalveolární laváž uchovávanou při -80°C jsme na ledu pozvolna rozmrazili. 100 μ l BAL od každého vzorku a 100 μ l substrátu jsme odpipetovali pomocí multikanálové pipety do mikrotitrační destičky. Směs jsme nechali 30 min inkubovat. Poté jsme reakci zastavili přidáním 50 μ l 4 M H_2SO_4 a změřili jsme absorbanci roztoku při vlnové délce 490 nm; množství EPO je přímo úměrné hodnotám naměřené absorbance.

Příprava substrátu: Substrát obsahuje Tris HCl 0,05 M a 0,1 % Triton X-100. Důležité je, aby výsledné pH dosáhlo hodnoty 8. V opačném případě je třeba přidat hydroxid sodný. Těsně před pokusem jsme přidali peroxid vodíku (H_2O_2) a o-fenylendiamin (OPD) tak, aby výsledné koncentrace byly 1 mM a 10 mM.

h) Stanovení proteinů

Proteiny byly stanoveny pomocí kitu BCA Protein Assay Reagent Kit. Principem stanovení je redukce iontu Cu^{2+} na Cu^{1+} proteinem v alkalickém prostředí (biuretová reakce) a následně kolorimetrická detekce měďného kationtu Cu^{1+} pomocí BCA (bicinchoninic acid). Barevný produkt reakce vzniká chelatováním dvou molekul BCA jedním iontem Cu^{1+} . V rozmezí koncentrace proteinu od 20 do 2000 $\mu\text{g/ml}$ je absorbance (562 nm) tohoto komplexu přímo úměrná koncentraci a množství proteinu se proto může stanovit pomocí kalibrační křivky. Kalibrační křivku tvoří 8 známých koncentrací proteinu (25–2000 $\mu\text{g/ml}$) – potřebný standard (BSA) je součástí kitu.

i) Zpracování výsledků

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.

IV. VÝSLEDKY

Při hodnocení modelu alergického astmatu u potkana byly sledovány následující parametry:

1. Sledování hmotnosti zvířat

Během pokusu všechna zvířata prospívala a vykazovala odpovídající váhový přírůstek.

2. Sledování buněk v bronchoalveolární laváži

Bylo zjišťováno celkové množství buněk a dále diferenciální odečet.

2.1 POROVNÁNÍ DVOU ČASOVÝCH INTERVALŮ

Toto stanovení bylo provedeno u potkanů kmene Wistar.

Potkani, u kterých byl BAL odebrán 1 hod po challenge, byli rozděleni do dvou skupin – skupina nesenzibilizovaná (kontrolní skupina), ve které byla celkem 4 zvířata o průměrné hmotnosti $m = 324$ g a skupina senzibilizovaná, ve které bylo 6 zvířat o průměrné hmotnosti $m = 349$ g.

Potkani, u kterých byl BAL odebrán 24 hod po challenge, byli také rozděleni do dvou skupin – skupina nesenzibilizovaná (kontrolní skupina), ve které bylo celkem 6 zvířat o průměrné hmotnosti $m = 327$ g a skupina senzibilizovaná, ve které bylo 9 zvířat o průměrné hmotnosti $m = 332$ g.

1) Celkový počet buněk v 1 ml BAL, který byl odebrán 1 hodinu a 24 hodin po challenge

Celkový počet buněk nalezených v bronchoalveolární laváži u zvířat senzibilizovaných ovalbuminem a po challenge antigenem byl vždy vyšší než u zvířat z kontrolní skupiny, která senzibilizována nebyla. 24 hodin po challenge byl rozdíl mezi skupinou senzibilizovaných a nesenzibilizovaných zvířat mnohem výraznější než u zvířat, u kterých byl BAL odebrán už 1 hodinu po challenge .

Jednu hodinu po challenge byl průměrný celkový počet buněk v bronchoalveolární laváži u nesenzibilizovaných zvířat $0,31 \pm 0,02 \times 10^6$ ($n = 4$) a u senzibilizovaných zvířat $0,35 \pm 0,07 \times 10^6$ ($n = 6$).

Dvacet čtyři hodin po challenge byl průměrný celkový počet buněk v bronchoalveolární laváži u nesenzibilizovaných zvířat $0,27 \pm 0,03 \times 10^6$ (n = 6) a u senzibilizovaných zvířat $0,95 \pm 0,08 \times 10^6$ (n = 9) – tabulka č. 5 a graf č. 1.

	1 hod po challenge [$\times 10^6$]	24 hod po challenge [$\times 10^6$]
NS	0,31 \pm 0,02	0,27 \pm 0,03
S	0,35 \pm 0,07	0,95 \pm 0,08

Tabulka č. 5 Průměrné hodnoty celkového počtu buněk u potkanů Wistar v 1 ml BAL odebraném 1 hodinu a 24 hodin po challenge. NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat

a) Celkový počet buněk v 1 ml BAL, který byl odebrán 1 hodinu po challenge

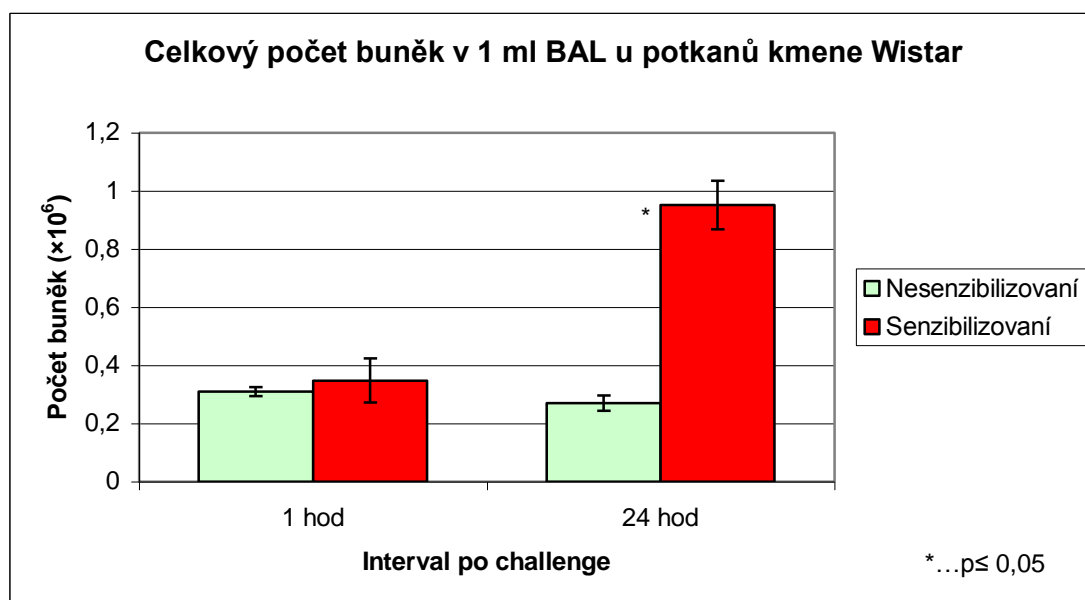
	Zvíře	1 hod po challenge [$\times 10^6$]
NS	W*1-1	0,35
	W*1-2	0,31
	W*1-3	0,31
	W*1-4	0,27
S	W*2-1	0,47
	W*2-2	0,23
	W*2-3	0,66
	W*2-4	0,30
	W*2-5	0,17
	W*2-6	0,26

Tabulka č. 6 Hodnoty celkového počtu buněk u jednotlivých potkanů Wistar v 1 ml BAL odebraném 1 hodinu po challenge. NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat

b) Celkový počet buněk v 1 ml BAL, který byl odebrán 24 hodin po challenge

	Zvíře	24 hod po challenge [$\times 10^6$]
NS	W1-1	0,35
	W1-2	0,31
	W1-3	0,31
	W1-4	0,25
	W1-5	0,20
	W1-6	0,20
S	W2-1	0,78
	W2-2	0,80
	W2-3	0,67
	W2-4	1,54
	W2-5	0,99
	W2-6	0,87
	W2-7	1,06
	W2-8	0,91
	W2-9	0,94

Tabulka č. 7 Hodnoty celkového počtu buněk u jednotlivých potkanů Wistar v 1 ml BAL odebraném 24 hodin po challenge. NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat



Graf č. 1 Celkový počet buněk v 1 ml BAL odebraném 1 hod a 24 hod po challenge u potkanů kmene Wistar

2) Diferenciální odečet buněk v 1 ml BAL, který byl odebrán 1 hodinu a 24 hodin po challenge

Počet všech typů buněk (neutrofilů, eozinofilů, makrofágů a lymfocytů) nalezených v bronchoalveolární laváži u zvířat senzibilizovaných ovalbuminem a po challenge antigenem byl vždy vyšší než u zvířat z kontrolní skupiny, která senzibilizována nebyla. 24 hodin po challenge byl rozdíl mezi skupinou senzibilizovaných a nesenzibilizovaných zvířat mnohem výraznější než u zvířat, u kterých byl BAL odebrán už 1 hodinu po challenge .

Jednu hodinu po challenge byl průměrný počet neutrofilů v bronchoalveolární laváži u nesenzibilizovaných zvířat $0,008 \pm 0,001 \times 10^6$, počet eozinofilů 0, počet makrofágů $0,303 \pm 0,016 \times 10^6$ a počet lymfocytů $0,001 \pm 0,001 \times 10^6$ (n = 4) a u senzibilizovaných zvířat byl průměrný počet neutrofilů $0,006 \pm 0,002 \times 10^6$, počet eozinofilů $0,001 \pm 0,001 \times 10^6$, počet makrofágů $0,340 \pm 0,073 \times 10^6$ a počet lymfocytů $0,001 \pm 0,001 \times 10^6$ (n = 6).

Dvacet čtyři hodin po challenge byl průměrný počet neutrofilů v bronchoalveolární laváži u nesenzibilizovaných zvířat $0,008 \pm 0,002 \times 10^6$, počet eozinofilů $0,004 \pm 0,002 \times 10^6$, počet makrofágů $0,250 \pm 0,032 \times 10^6$ a počet lymfocytů $0,001 \pm 0,001 \times 10^6$ (n = 6) a u senzibilizovaných zvířat byl průměrný počet neutrofilů $0,342 \pm 0,046 \times 10^6$, počet eozinofilů $0,133 \pm 0,028 \times 10^6$, počet makrofágů $0,474 \pm 0,047 \times 10^6$ a počet lymfocytů $0,003 \pm 0,002 \times 10^6$ (n = 9) – tabulka č. 8 a grafy č. 2, 3, 4.

A.

	Buňky	1 hod po challenge [$\times 10^6$]	24 hod po challenge [$\times 10^6$]
NS	neutrofily	$0,008 \pm 0,001$	$0,008 \pm 0,002$
	eozinofily	0	$0,004 \pm 0,002$
	makrofágy	$0,303 \pm 0,016$	$0,250 \pm 0,032$
	lymfocyty	$0,001 \pm 0,001$	$0,001 \pm 0,001$
S	neutrofily	$0,006 \pm 0,002$	$0,342 \pm 0,046$
	eozinofily	$0,001 \pm 0,001$	$0,133 \pm 0,028$
	makrofágy	$0,340 \pm 0,073$	$0,474 \pm 0,047$
	lymfocyty	$0,001 \pm 0,001$	$0,003 \pm 0,002$

B.

%	Buňky	1 hod po challenge	24 hod po challenge
NS	neutrofilý	2,50±0,29	3,20±0,86
	eozinofily	0	1,80±0,80
	makrofágy	97,25±0,48	94,60±1,63
	lymfocyty	0,25±0,25	0,40±0,24
S	neutrofilý	1,83±0,60	35,22±4,05
	eozinofily	0,17±0,17	13,33±2,09
	makrofágy	97,83±0,54	51,00±5,05
	lymfocyty	0,17±0,17	0,44±0,24

Tabulka č. 8 Průměrné hodnoty neutrofilů, eozinofilů, makrofágů a lymfocytů u potkanů Wistar v 1 ml BAL odebraném 1 hodinu a 24 hodin po challenge (A). Tytéž hodnoty vyjádřené v procentech (B). NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat

a) Diferenciální odečet buněk v 1 ml BAL, který byl odebrán 1 hodinu po challenge

A.

	Zvíře	Buňky 1 hod po challenge [$\times 10^6$]			
		neutrofilý	eozinofily	makrofágy	lymfocyty
NS	W*1-1	0,007	0	0,343	0
	W*1-2	0,009	0	0,299	0,003
	W*1-3	0,009	0	0,303	0
	W*1-4	0,005	0	0,265	0
S	W*2-1	0,014	0	0,457	0
	W*2-2	0,005	0	0,221	0
	W*2-3	0,007	0	0,646	0,007
	W*2-4	0,003	0,003	0,294	0
	W*2-5	0,007	0	0,163	0
	W*2-6	0	0	0,257	0

B.

%	Zvíře	Buňky 1 hod po challenge			
		neutrofilý	eozinofily	makrofágy	lymfocyty
NS	W*1-1	2	0	98	0
	W*1-2	3	0	96	1
	W*1-3	3	0	97	0
	W*1-4	2	0	98	0
S	W*2-1	3	0	97	0
	W*2-2	2	0	98	0
	W*2-3	1	0	98	1
	W*2-4	1	1	98	0
	W*2-5	4	0	96	0
	W*2-6	0	0	100	0

Tabulka č. 9 Hodnoty neutrofilů, eozinofilů, makrofágů a lymfocytů u jednotlivých potkanů Wistar v 1 ml BAL odebraném 1 hodinu po challenge (A). Tytéž hodnoty vyjádřené v procentech (B). NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat

b) Diferenciální odečet buněk v 1 ml BAL, který byl odebrán 24 hodin po challenge

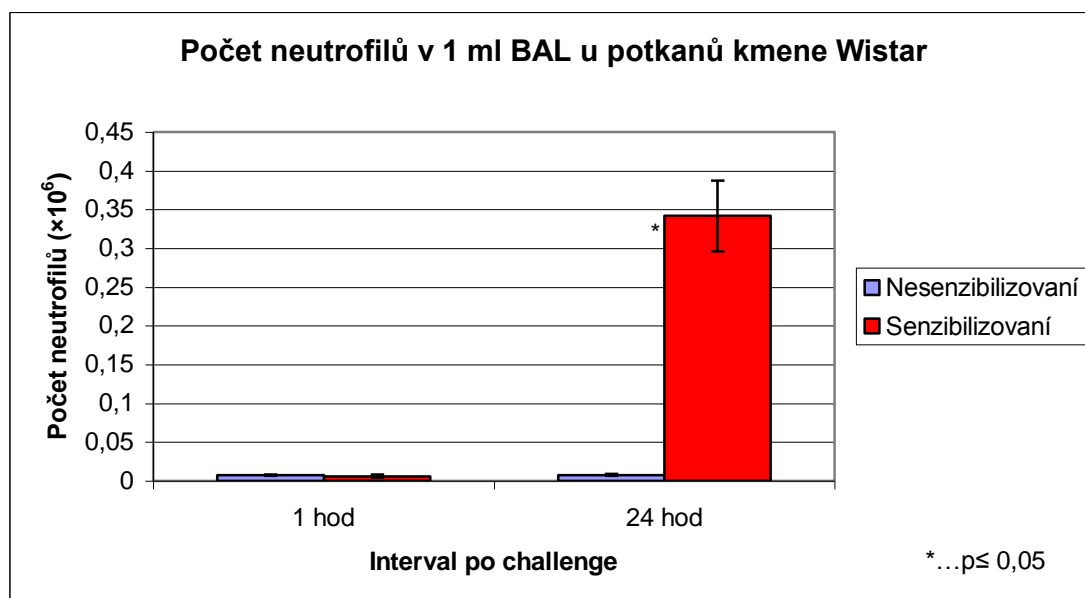
A.

	Zvíře	Buňky 24 hod po challenge [$\times 10^6$]			
		neutrofilý	eozinofily	makrofágy	lymfocyty
NS	W1-1	0,007	0	0,343	0
	W1-2	0,009	0	0,299	0,003
	W1-3	---	---	---	---
	W1-4	0,003	0,005	0,243	0
	W1-5	0,012	0,008	0,178	0,002
	W1-6	0,008	0,006	0,186	0
S	W2-1	0,376	0,096	0,320	0,008
	W2-2	0,192	0,024	0,576	0,008
	W2-3	0,067	0,067	0,525	0,013
	W2-4	0,510	0,293	0,741	0
	W2-5	0,455	0,069	0,465	0
	W2-6	0,295	0,104	0,468	0
	W2-7	0,369	0,158	0,528	0
	W2-8	0,410	0,182	0,319	0
	W2-9	0,403	0,206	0,328	0

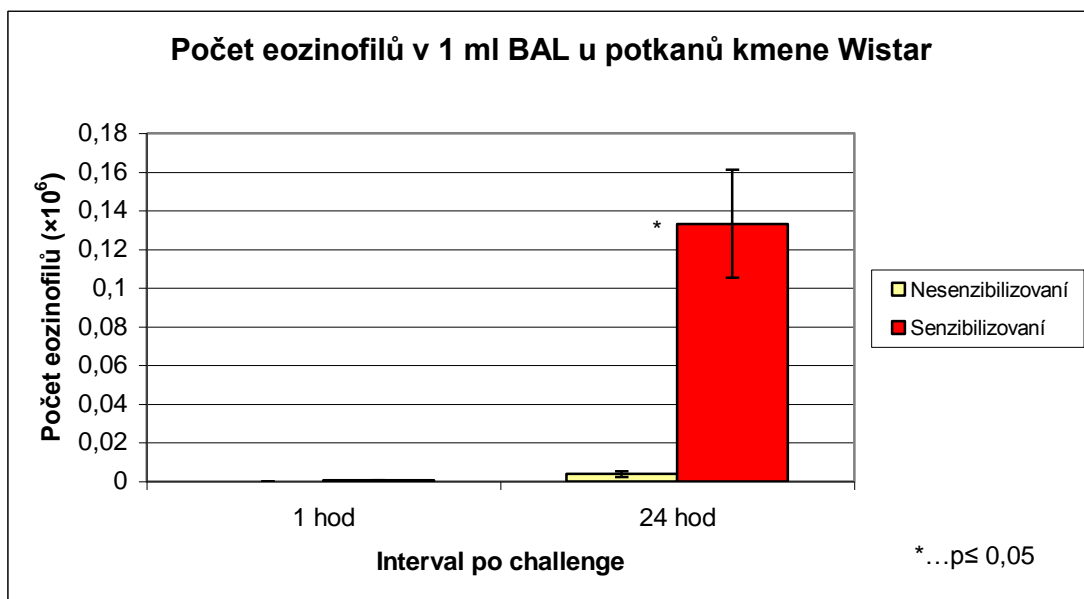
B.

%	Zvíře	Buňky 24 hod po challenge			
		neutrofilů	eozinofilů	makrofágy	lymfocyty
NS	W1-1	2	0	98	0
	W1-2	3	0	96	1
	W1-3	---	---	---	---
	W1-4	1	2	97	0
	W1-5	6	4	89	1
	W1-6	4	3	93	0
S	W2-1	47	12	40	1
	W2-2	24	3	72	1
	W2-3	10	10	78	2
	W2-4	33	19	48	0
	W2-5	46	7	47	0
	W2-6	34	12	54	0
	W2-7	35	15	50	0
	W2-8	45	20	35	0
	W2-9	43	22	35	0

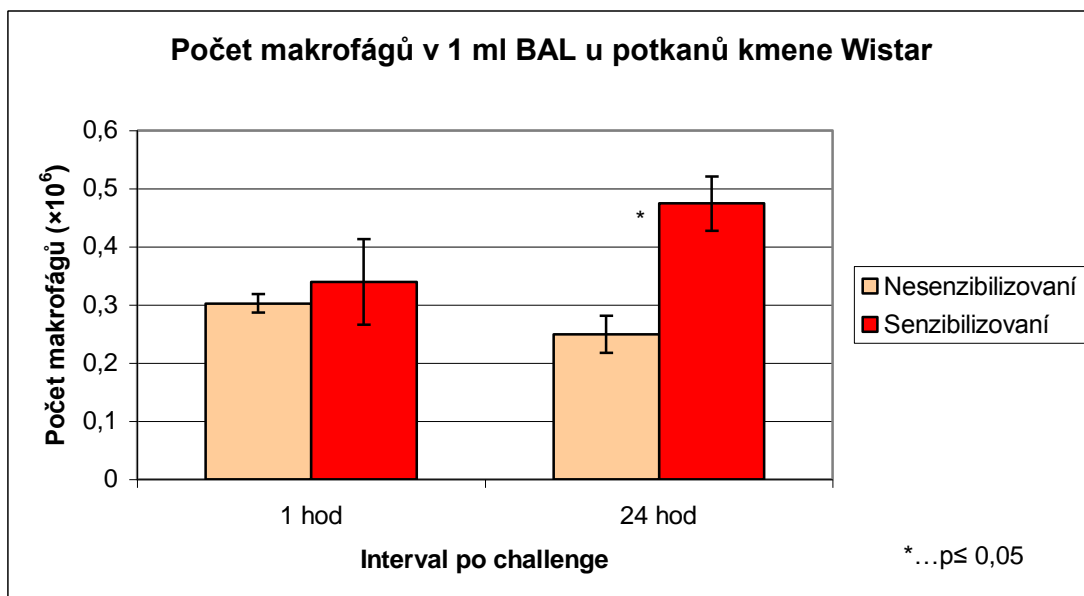
Tabulka č. 10 Hodnoty neutrofilů, eozinofilů, makrofágů a lymfocytů u jednotlivých potkanů Wistar v 1 ml BAL odebraném 24 hodin po challenge (A). Tytéž hodnoty vyjádřené v procentech (B). NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat



Graf č. 2 Počet neutrofilů v 1 ml BAL odebraném 1 hod a 24 hod po challenge u potkanů kmene Wistar



Graf č. 3 Počet eozinofilů v 1 ml BAL odebraném 1 hod a 24 hod po challenge u potkanů kmene Wistar



Graf č. 4 Počet makrofágů v 1 ml BAL odebraném 1 hod a 24 hod po challenge u potkanů kmene Wistar

2.2 SROVNÁNÍ DVOU KMENŮ POTKANŮ, WISTAR A BROWN NORWAY, V ČASOVÉM INTERVALU ZA 24 HODIN

Dalším cílem práce bylo srovnat dva kmeny potkanů. Vzhledem k tomu, že interval 24 hodin se v předchozím pokusu ukázal být jednoznačně výhodnější, porovnání obou kmenů zvířat bylo provedeno pouze 24 hodin po challenge. Tato zvířata byla rozdělena do dvou skupin – skupina nesenzibilizovaná (kontrolní skupina), ve které byla celkem 3 zvířata o průměrné hmotnosti $m = 205$ g a skupina senzibilizovaná, ve které bylo 10 zvířat o průměrné hmotnosti $m = 217$ g.

1) Celkový počet buněk v 1 ml BAL, který byl odebrán 24 hodin po challenge

Celkový počet buněk nalezených v bronchoalveolární laváži u zvířat senzibilizovaných ovalbuminem a po challenge antigenem byl vždy vyšší než u zvířat z kontrolní skupiny, která senzibilizována nebyla.

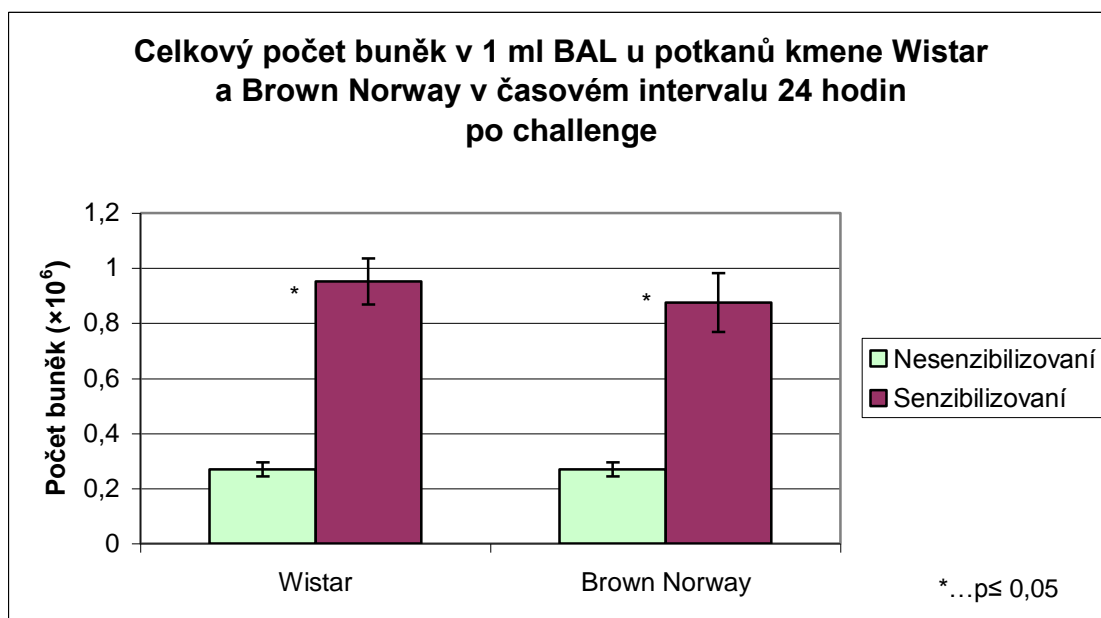
Dvacet čtyři hodin po challenge byl průměrný celkový počet buněk v bronchoalveolární laváži u nesenzibilizovaných potkanů Wistar $0,27 \pm 0,03 \times 10^6$ ($n = 6$), u senzibilizovaných potkanů Wistar $0,95 \pm 0,08 \times 10^6$ ($n = 9$), u nesenzibilizovaných potkanů Brown Norway $0,27 \pm 0,03 \times 10^6$ ($n = 3$) a u senzibilizovaných potkanů Brown Norway $0,88 \pm 0,11 \times 10^6$ ($n = 10$) – tabulky č. 5 a 11 a graf č. 5.

	24 hod po challenge [$\times 10^6$]
NS	$0,27 \pm 0,03$
S	$0,88 \pm 0,11$

Tabulka č. 11 Průměrné hodnoty celkového počtu buněk u potkanů Brown Norway v 1 ml BAL odebraném 24 hodin po challenge. Počet zvířat $n = 13$; NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat

	Zvíře	24 hod po challenge [$\times 10^6$]
NS	B1-1	0,24
	B1-2	0,25
	B1-3	0,32
S	B2-1	0,35
	B2-2	0,55
	B2-3	0,61
	B2-4	0,92
	B2-5	1,32
	B2-6	1,09
	B2-7	0,93
	B2-8	1,39
	B2-9	0,98
	B2-10	0,61

Tabulka č. 12 Hodnoty celkového počtu buněk u jednotlivých potkanů Brown Norway v 1 ml BAL odebraném 24 hodin po challenge. NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat



Graf č. 5 Celkový počet buněk v 1 ml BAL odebraném 24 hod po challenge u potkanů kmene Wistar a Brown Norway

2) Diferenciální odečet buněk v 1 ml BAL, který byl odebrán 24 hodin po challenge

Počet všech typů buněk (neutrofilů, eozinofilů, makrofágů a lymfocytů) nalezených v bronchoalveolární laváži u zvířat senzibilizovaných ovalbuminem a po challenge antigenem byl vždy vyšší než u zvířat z kontrolní skupiny, která senzibilizována nebyla.

Dvacet čtyři hodin po challenge byl průměrný počet neutrofilů v bronchoalveolární laváži u nesenzibilizovaných potkanů Wistar $0,008 \pm 0,002 \times 10^6$, počet eozinofilů $0,004 \pm 0,002 \times 10^6$, počet makrofágů $0,250 \pm 0,032 \times 10^6$ a počet lymfocytů $0,001 \pm 0,001 \times 10^6$ (n = 6), u senzibilizovaných potkanů Wistar byl průměrný počet neutrofilů $0,342 \pm 0,046 \times 10^6$, počet eozinofilů $0,133 \pm 0,028 \times 10^6$, počet makrofágů $0,474 \pm 0,047 \times 10^6$ a počet lymfocytů $0,003 \pm 0,002 \times 10^6$ (n = 9).

U nesenzibilizovaných potkanů Brown Norway byl 24 hodin po challenge průměrný počet neutrofilů 0, počet eozinofilů $0,003 \pm 0,002 \times 10^6$, počet makrofágů $0,266 \pm 0,027 \times 10^6$ a počet lymfocytů 0 (n = 3) a u senzibilizovaných potkanů Brown Norway byl průměrný počet neutrofilů $0,251 \pm 0,030 \times 10^6$, počet eozinofilů $0,154 \pm 0,050 \times 10^6$, počet makrofágů $0,457 \pm 0,060 \times 10^6$ a počet lymfocytů $0,002 \pm 0,001 \times 10^6$ (n = 10) – tabulky č. 8 a 13 a grafy č. 6, 7, 8.

A.

	Buňky	24 hod po challenge [$\times 10^6$]
NS	neutrofilly	0
	eozinofily	$0,003 \pm 0,002$
	makrofágy	$0,266 \pm 0,027$
	lymfocyty	0
S	neutrofilly	$0,251 \pm 0,030$
	eozinofily	$0,154 \pm 0,050$
	makrofágy	$0,457 \pm 0,060$
	lymfocyty	$0,002 \pm 0,001$

B.

%	Buňky	24 hod po challenge
NS	neutrofily	0
	eozinofily	1,33±0,88
	makrofágy	98,67±0,88
	lymfocyty	0
S	neutrofily	29,60±3,02
	eozinofily	15,60±3,80
	makrofágy	53,30±3,93
	lymfocyty	0,20±0,13

Tabulka č. 13 Průměrné hodnoty neutrofilů, eozinofilů, makrofágů a lymfocytů u potkanů Brown Norway v 1 ml BAL odebraném 24 hodin po challenge (A). Tytéž hodnoty vyjádřené v procentech (B). Počet zvířat n = 13; NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat

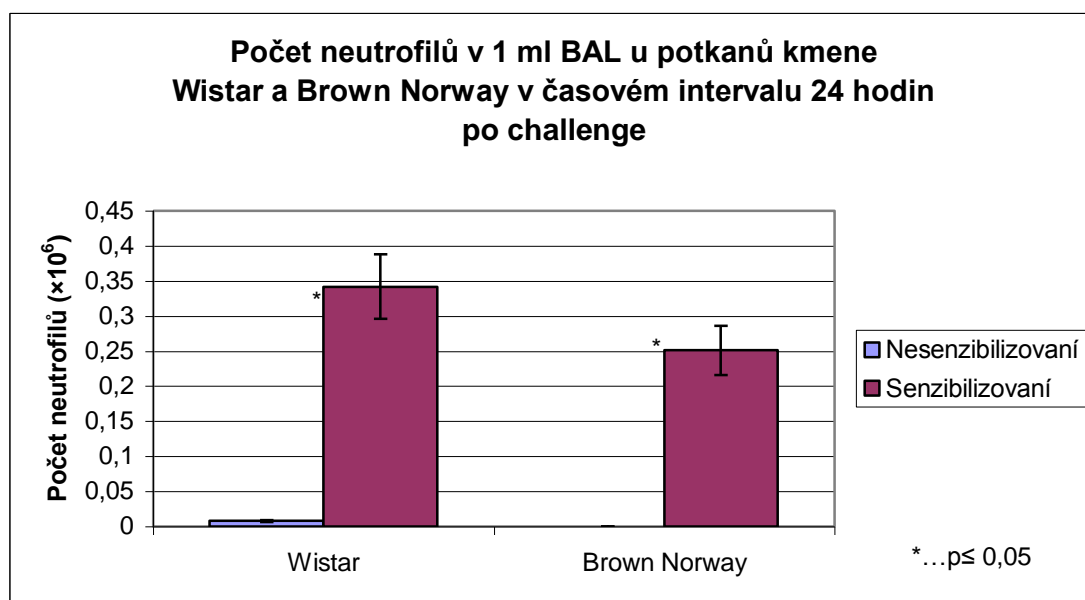
A.

	Zvíře	Buňky 24 hod po challenge [$\times 10^6$]			
		neutrofily	eozinofily	makrofágy	lymfocyty
NS	B1-1	0	0	0,238	0
	B1-2	0	0,007	0,240	0
	B1-3	0	0,003	0,320	0
S	B2-1	0,130	0,020	0,190	0
	B2-2	0,260	0,020	0,270	0,010
	B2-3	0,150	0,040	0,420	0
	B2-4	0,170	0,070	0,650	0
	B2-5	0,430	0,050	0,830	0
	B2-6	0,380	0,350	0,360	0
	B2-7	0,300	0,140	0,480	0,010
	B2-8	0,290	0,430	0,670	0
	B2-9	0,300	0,310	0,360	0
	B2-10	0,100	0,110	0,340	0

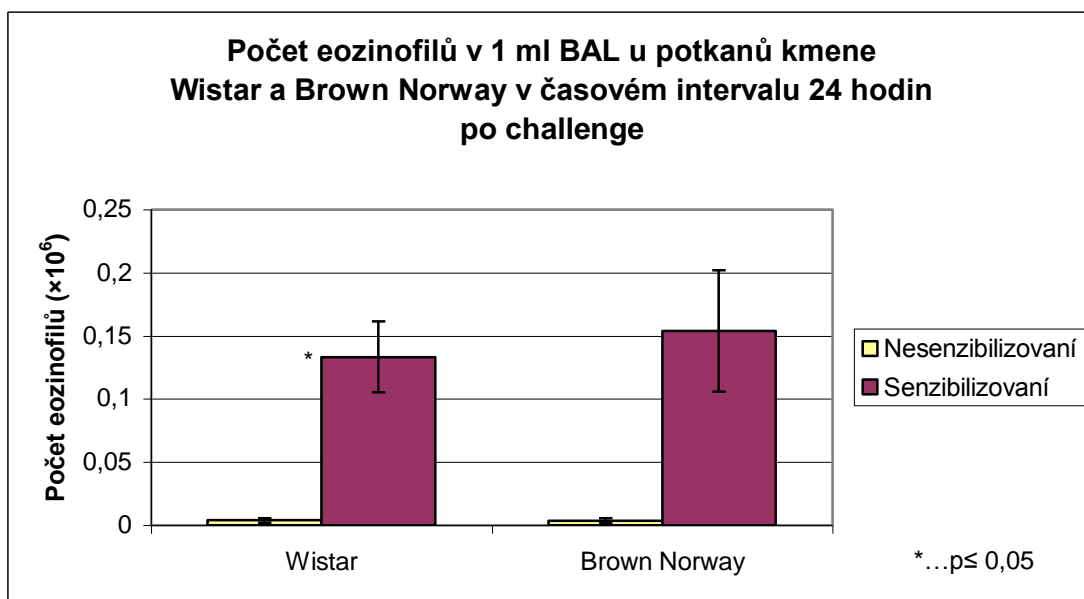
B.

%	Zvíře	Buňky 24 hod po challenge			
		neutrofilů	eozinofilů	makrofágy	lymfocyty
NS	B1-1	0	0	100	0
	B1-2	0	3	97	0
	B1-3	0	1	99	0
S	B2-1	38	6	56	0
	B2-2	47	3	49	1
	B2-3	24	7	69	0
	B2-4	18	8	71	0
	B2-5	33	4	63	0
	B2-6	35	32	33	0
	B2-7	32	15	52	1
	B2-8	21	31	48	0
	B2-9	31	32	37	0
	B2-10	17	18	55	0

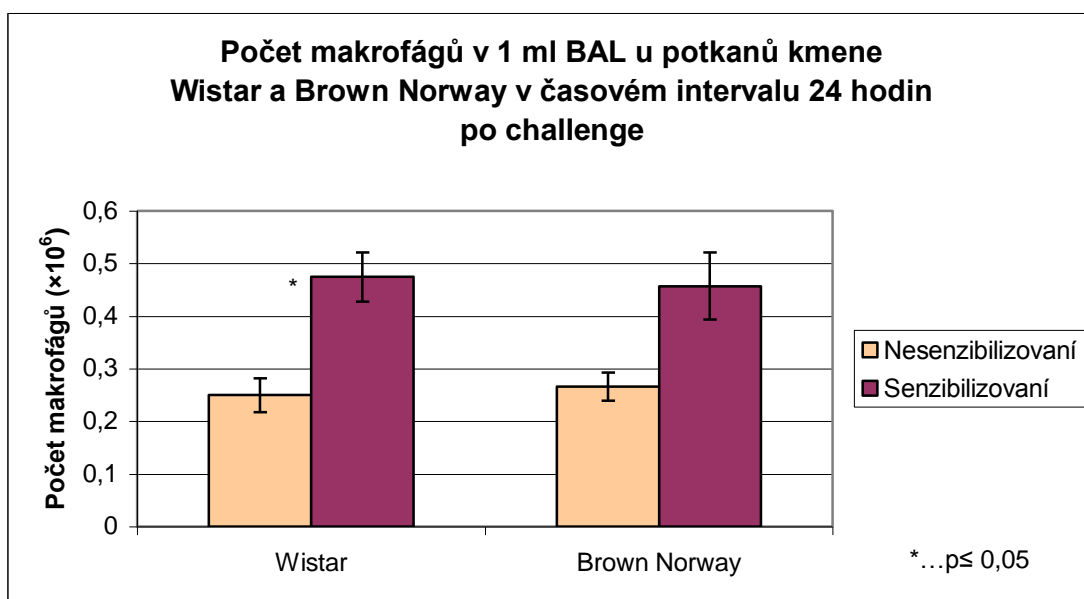
Tabulka č. 14 Hodnoty neutrofilů, eozinofilů, makrofágů a lymfocytů u jednotlivých potkanů Brown Norway v 1 ml BAL odebraném 24 hodin po challenge (A). Tytéž hodnoty vyjádřené v procentech (B). NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat



Graf č. 6 Počet neutrofilů v 1 ml BAL odebraném 24 hod po challenge u potkanů kmene Wistar a Brown Norway



Graf č. 7 Počet eozinofilů v 1 ml BAL odebraném 24 hod po challenge u potkanů kmene Wistar a Brown Norway



Graf č. 8 Počet makrofágů v 1 ml BAL odebraném 24 hod po challenge u potkanů kmene Wistar a Brown Norway

Jak u celkového počtu buněk tak u diferenciálního odečtu nebyly zjištěné rozdíly mezi potkany Wistar a Brown Norway velké a pohybovaly se v rámci statistické chyby.

3. Stanovení EPO a proteinů

I když při hodnocení buněk bronchoalveolární laváže nebyl zjištěn rozdíl mezi kmeny, stanovení eozinofilní peroxidázy a proteinů bylo provedeno jen u potkanů Brown Norway, kteří byli výhodnější při stanovení bronchiální reaktivity. U těchto zvířat byl BAL odebrán 24 hod po challenge a zvířata byla rozdělena do dvou skupin – skupina nesenzibilizovaná (kontrolní skupina), ve které byla celkem 3 zvířata o průměrné hmotnosti $m = 205$ g a skupina senzibilizovaná, ve které bylo 10 zvířat o průměrné hmotnosti $m = 217$ g.

1) EPO

Hodnoty EPO zjištěné v bronchoalveolární laváži u zvířat senzibilizovaných ovalbuminem a po challenge antigenem byly vždy vyšší než u zvířat z kontrolní skupiny, která senzibilizována nebyla.

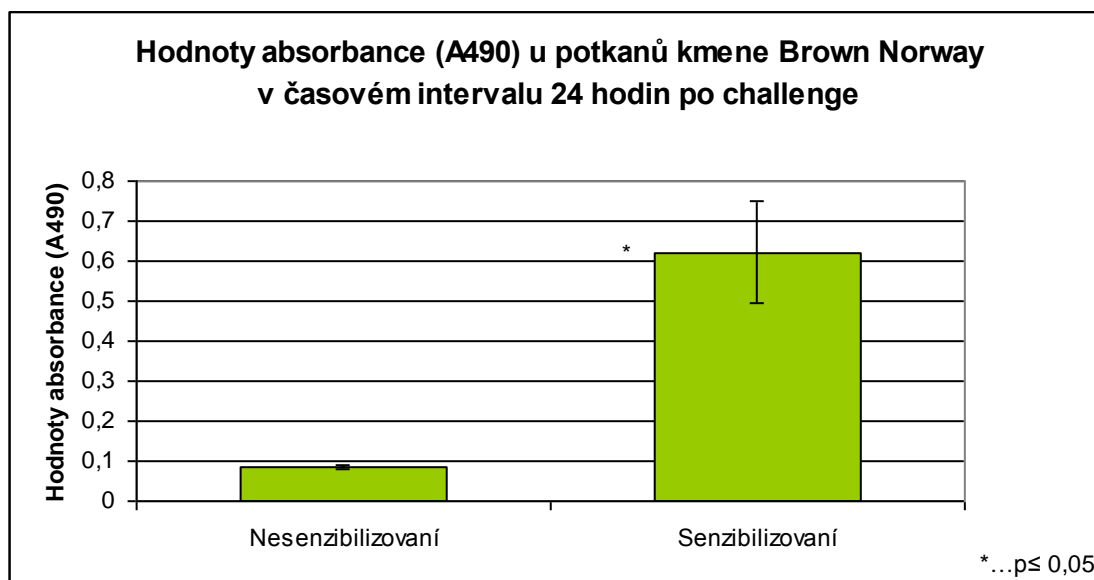
Dvacet čtyři hodin po challenge byly průměrné hodnoty absorbance u nesenzibilizovaných potkanů Brown Norway $0,085 \pm 0,005$ ($n = 3$) a u senzibilizovaných zvířat $0,622 \pm 0,128$ ($n = 10$) – tabulka č. 15 a graf č. 9.

	24 hod po challenge
NS	$0,085 \pm 0,005$
S	$0,622 \pm 0,128$

Tabulka č. 15 Průměrné hodnoty absorbance při 490 nm u potkanů Brown Norway v 1 ml BAL odebraném 24 hodin po challenge. Počet zvířat $n = 13$; NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat

	Zvíře	24 hod po challenge
NS	B1-1	0,082
	B1-2	0,094
	B1-3	0,078
S	B2-1	0,512
	B2-2	0,383
	B2-3	0,743
	B2-4	---
	B2-5	0,791
	B2-6	1,383
	B2-7	---
	B2-8	0,428
	B2-9	0,203
	B2-10	0,529

Tabulka č. 16 Hodnoty absorbance při 490 nm u jednotlivých potkanů Brown Norway v 1 ml BAL odebraném 24 hodin po challenge. NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat



Graf č. 9 Hodnoty absorbance (A490), které vychází z množství EPO v měřeném vzorku, 24 hod po challenge u potkanů kmene Brown Norway

2) Proteiny

Hodnoty proteinů zjištěné v bronchoalveolární laváži u zvířat senzibilizovaných ovalbuminem a po challenge antigenem byly vždy vyšší než u zvířat z kontrolní skupiny, která senzibilizována nebyla.

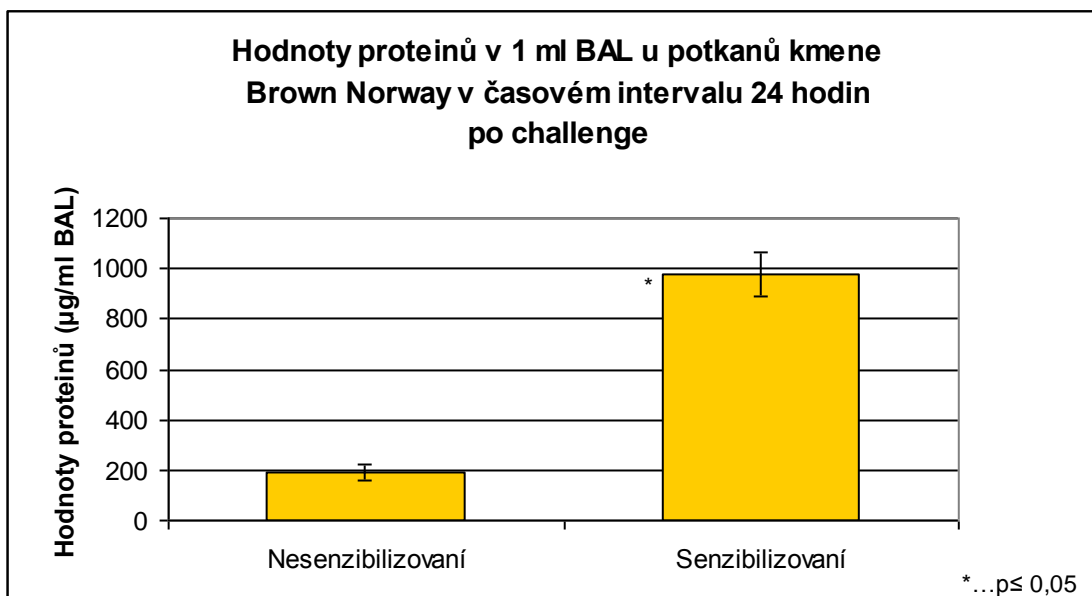
Dvacet čtyři hodin po challenge byly průměrné hodnoty proteinů v bronchoalveolární laváži u nesenzibilizovaných potkanů Brown Norway $191,06 \pm 29,44$ $\mu\text{g/ml}$ BAL ($n = 3$) a u senzibilizovaných zvířat $976,14 \pm 89,21$ $\mu\text{g/ml}$ BAL ($n = 10$) – tabulka č. 17 a graf č. 10.

	24 hod po challenge [$\mu\text{g/ml}$ BAL]
NS	$191,06 \pm 29,44$
S	$976,14 \pm 89,21$

Tabulka č. 17 Průměrné hodnoty proteinů u potkanů Brown Norway v 1 ml BAL odebraném 24 hodin po challenge. Počet zvířat $n = 13$; NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat

	Zvíře	24 hod po challenge [$\mu\text{g/ml}$ BAL]
NS	B1-1	134,33
	B1-2	205,78
	B1-3	233,07
S	B2-1	638,47
	B2-2	1181,32
	B2-3	1184,30
	B2-4	727,79
	B2-5	993,76
	B2-6	1430,92
	B2-7	1196,21
	B2-8	775,43
	B2-9	583,89
	B2-10	1049,33

Tabulka č. 18 Hodnoty proteinů u jednotlivých potkanů Brown Norway v 1 ml BAL odebraném 24 hodin po challenge. NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat



Graf č. 10 Hodnoty proteinů v 1 ml BAL odebraném 24 hod po challenge u potkanů kmene Brown Norway

V. DISKUZE

Poslední definice z r. 2002 definuje asthma bronchiale takto: „Astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, kde hrají roli mnohé buňky a buněčné působky. 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.“ (25)

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 podílejí 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. (27)

Tato rigorózní práce navazuje na moji práci diplomovou a v mnoha bodech z ní také vychází. Jejím cílem bylo optimalizovat model alergického astmatu u potkana a přispět tak k jeho zavedení na Farmaceutické fakultě. Použitý protokol přitom vycházel z modelů popsaných v odborné literatuře. Soustředili jsme se především na výběr nejvhodnějšího časového intervalu, ve kterém by se projevila dostatečná alergická reakce po challenge antigenem a dále pak na výběr vhodnějšího zvířecího druhu, který by nejlépe vyhovoval zvolenému modelu alergického astmatu. Kromě toho jsme vždy ověřili i účinnost zvoleného modelu porovnáním s kontrolní skupinou.

1. Porovnání dvou časových intervalů.

Pomocí stanovení počtu buněk v bronchoalveolární laváži jsme u potkanů Wistar zjišťovali, který časový interval (1 hodina nebo 24 hodin po challenge antigenem) je vhodnější pro hodnocení zvoleného modelu astmatu. Stanovovali jsme nejprve celkový počet buněk v 1 ml BAL, dále pak počet neutrofilů, eozinofilů, makrofágů a lymfocytů.

Z provedených pokusů vyplývá, že interval 24 hodin po challenge antigenem je pro zvolený model alergického astmatu jednoznačně výhodnější. Přestože lze již

po 1 hodině po challenge pozorovat určitý náznak rozdílu v počtu buněk mezi senzibilizovanými a nesenzibilizovanými zvířaty, získaný rozdíl je tak nepatrný, že z naměřených hodnot nelze učinit jednoznačný závěr. Doba 1 hodiny na vyvinutí potřebné alergické reakce nestačí.

Jednu hodinu po challenge bylo v bronchoalveolární laváži zjištěno minimum buněk, takže se setřel rozdíl mezi skupinou senzibilizovanou a nesenzibilizovanou. Výjimkou byly počty makrofágů. Zde byl rozdíl mezi senzibilizovanými a nesenzibilizovanými zvířaty také minimální, ale v porovnání s ostatními typy buněk byl jejich počet poměrně vysoký. Je to v souladu s tím, že i u zdravého jedince jsou převažující buněčnou populací alveolární makrofágy, lymfocytů bývá do 10%, neutrofilů se vyskytují zcela ojediněle a eozinofily by prakticky neměly být přítomny vůbec.

Dvacet čtyři hodin po challenge antigenem byl nalezen signifikantní nárůst v celkovém počtu buněk, v počtu neutrofilů, eozinofilů i makrofágů u senzibilizované skupiny oproti skupině kontrolní. Tento nárůst je v souladu s našimi úvodními předpoklady a svědčí o úspěšném navození zkoumaného modelu. V případě lymfocytů se nám signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami zvířat nepodařilo prokázat ani v intervalu 24 hodin po challenge a toto měření bylo zatíženo velkou statistickou chybou. Důvodem může být fakt, že počty lymfocytů v bronchoalveolární laváži jsou velmi nízké a značně variabilní.

2. Srovnání potkanů Wistar a Brown Norway v časovém intervalu za 24 hodin.

Z předchozího pokusu vyplynulo, že interval 24 hodin po challenge je pro zvolený model alergického astmatu výhodnější. Proto jsme ve zjištěném vhodnějším časovém intervalu srovnávali dva kmeny potkanů, potkany Wistar a potkany Brown Norway. Jejich volba nebyla náhodná. Oba dva kmeny 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.

V tomto pokusu jsme vycházeli z diplomové práce, kde jsme zjistili, že potkani Brown Norway jsou v použitém modelu alergického astmatu vnímavější, rozptyl získaných hodnot plicní rezistence byl mnohem menší a výsledky byly více homogenní. Je obecně známo, že potkani Brown Norway mají přirozeně zvýšené množství eozinofilů a výrazněji proto reagují na alergické podněty. Proto jsme předpokládali, že i pro tento model alergického astmatu budou tato zvířata výhodnější. Zde se však

ukázalo, že zvolíme-li pro hodnocení tohoto modelu astmatu počítání buněk v bronchoalveolární laváži, citlivost u obou kmenů potkanů bude srovnatelná a rozdíl mezi naměřenými hodnotami nebude velký. U potkanů Brown Norway byl 24 hodin po challenge mezi skupinami kontrolních a alergických zvířat signifikantní rozdíl v celkovém počtu buněk a v počtu neutrofilů, výsledky ale byly srovnatelné s výsledky získanými u potkanů Wistar. U potkanů Wistar byl navíc ještě prokázán signifikantní rozdíl v počtu eozinofilů a makrofágů, což se nám u potkanů Brown Norway prokázat nepodařilo.

Při výběru vhodného druhu zvířat je třeba vzít do úvahy také ekonomické hledisko. U potkanů Brown Norway je problémem 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. V našem případě jsme však dospěli k závěru, že pokud zvolíme hodnocení pouze pomocí počtu buněk v bronchoalveolární laváži, získané výsledky u obou kmenů potkanů budou srovnatelné, a proto by bylo výhodnější použít pro zvolený model alergického astmatu finančně méně náročné potkany Wistar. Na modelech in vivo na potkanech je však experimentálně navozené astma obvykle hodnoceno i pomocí stanovení bronchiální hyperreakivity. V těchto experimentech jsou však výsledky na potkanech Brown Norway jednoznačně lepší a proto je pro použití v praxi tento kmen nejvhodnější.

3. Stanovení EPO a proteinů.

Protože jsme v našich experimentech vycházeli z diplomové práce, ve které nám potkani Brown Norway vyšli pro zvolený model astmatu vhodnější, zjišťovali jsme u nich navíc ještě další parametry – hodnoty EPO a proteinů v bronchoalveolární laváži.

Získané hodnoty nám potvrdili výhody potkanů Brown Norway. Jak při stanovení eozinofilní peroxidázy, tak při stanovení proteinů v bronchoalveolární laváži byl nalezen signifikantní nárůst u skupiny senzibilizovaných zvířat oproti skupině zvířat kontrolních. Tento nárůst je v souladu s našimi úvodními předpoklady a svědčí o úspěšném navození zkoumaného modelu.

4. Ověření zvoleného modelu.

Navození zkoumaného modelu jsme u každého kmene ověřovali srovnáním s kontrolní skupinou nealergických zvířat.

Téměř ve všech případech byl v naměřených hodnotách patrný rozdíl mezi senzibilizovanými a nesenzibilizovanými zvířaty s tím, že alergická zvířata citlivěji reagovala na předchozí challenge antigenem a v jejich bronchoalveolární laváži jsme zjistili vyšší počty zánětlivých buněk než u zvířat kontrolních. Jedinou výjimkou byl počet neutrofilů v BAL u potkanů Wistar 1 hodinu po challenge. V tomto případě byl počet buněk v BAL u nesenzibilizovaných zvířat vyšší než u zvířat senzibilizovaných.

U potkanů Wistar byl 24 hodin po challenge mezi skupinami kontrolních a alergických zvířat signifikantní rozdíl v celkovém počtu buněk v bronchoalveolární laváži, dále pak v počtu neutrofilů, eozinofilů a makrofágů.

U potkanů Brown Norway byl 24 hodin po challenge prokázán signifikantní rozdíl mezi skupinou senzibilizovanou a kontrolní pouze v celkovém počtu buněk a v počtu neutrofilů. Došlo i k nárůstu počtu eozinofilů. Zjištěný rozdíl sice nebyl signifikantní, ale tendence byla očividná. Použití většího počtu zvířat by proto mohlo vést k získání významného rozdílu. U tohoto kmene byl navíc ještě prokázán signifikantní rozdíl mezi senzibilizovanými a nesenzibilizovanými zvířaty v hodnotách eozinofilní peroxidázy a v hodnotách proteinů zjišťovaných v 1 ml BAL.

VI. ZÁVĚR

Výběr nejvhodnějšího časového intervalu a nejvhodnějšího zvířecího druhu pro realizaci zvoleného modelu alergického astmatu záleží na řadě faktorů. Pro optimalizaci zkoumaného modelu jsme zjistili:

1. Pro hodnocení zvoleného modelu alergického astmatu je jednoznačně výhodnější časový interval 24 hodin po challenge antigenem. Přestože lze již po 1 hodině po challenge pozorovat určitý náznak rozdílu v počtu buněk mezi senzibilizovanými a nesenzibilizovanými zvířaty, získaný rozdíl je tak nepatrný, že z naměřených hodnot nelze učinit jednoznačný závěr. Doba 1 hodiny na vyvinutí potřebné alergické reakce nestačí, a proto pokud bychom si v budoucnu zvolili pro testování bronchoprotektivních látek tento model alergického astmatu, bylo by vhodnější pokus provádět v intervalu 24 hodin po challenge antigenem.
2. Při hodnocení počtu buněk jsme mezi oběma kmeny potkanů – Wistar a Brown Norway – nezaznamenali velký rozdíl. Získané výsledné hodnoty byly téměř srovnatelné. U potkanů Wistar byl 24 hodin po challenge mezi skupinami kontrolních a alergických zvířat signifikantní rozdíl v celkovém počtu buněk, v počtu neutrofilů, eozinofilů a makrofágů. Naproti tomu u potkanů Brown Norway byl signifikantní rozdíl mezi skupinou senzibilizovaných a nesenzibilizovaných zvířat v témže časovém intervalu pouze v celkovém počtu buněk a v počtu neutrofilů, a u počtu eozinofilů existovala zřetelná tendence k nárůstu u alergických zvířat. Dospěli jsme tedy k závěru, že pro tento model alergického astmatu a zvolený způsob hodnocení by bylo nejvhodnější použít potkany Wistar. Avšak po komplexním zhodnocení všech hledisek (ekonomické hledisko, etický aspekt, kvalita získaných výsledků) a především s přihlédnutím k tomu, že experimentálně navozené astma je obvykle hodnoceno i pomocí stanovení bronchiální hyperreaktivity, jsou pro použití v praxi přesto nejvhodnější potkani Brown Norway.
3. Pokud bychom se rozhodli v pokusu použít potkany kmene Brown Norway, bylo by výhodné získané výsledky ještě rozšířit o hodnoty eozinofilní peroxidázy a hodnoty proteinů v bronchoalveolární laváži. U obou parametrů byl signifikantní rozdíl mezi zvířaty senzibilizovanými a nesenzibilizovanými.
4. Použitý model alergického astmatu byl dobře zvolen – jak u potkanů Wistar, tak u potkanů Brown Norway vedl k senzibilizaci a po dostatečné challenge antigenem k odpovídající alergické reakci. Reaktivita dýchacích cest byla

u senzibilizovaných zvířat zvýšena oproti kontrole (jedinou výjimkou byl počet neutrofilů v bronchoalveolární laváži u potkanů Wistar 1 hodinu po challenge). Reakce respiračního systému se ve všech ostatních případech zvyšovala s délkou časového intervalu.

VII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

