

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra farmakologie a toxikologie

**Hodnocení účinků bronchoprotektivních látek**  
(diplomová práce)

*Vedoucí diplomové práce:* PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Hradec Králové, 2009

Barbora SCHMIDTOVÁ

Touto cestou bych ráda moc poděkovala PharmDr. Marii Vopršalové, CSc. za odborné vedení, ochotu a pomoc při sestavování této diplomové práce, za čas, který mi věnovala při konzultacích, za věcné připomínky k formální a obsahové stránce jednotlivých částí práce.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci „Hodnocení účinků bronchoprotektivních látek“  
vypracovala samostatně s použitím literatury uvedené v seznamu.

.....  
podpis diplomanta

# OBSAH

I.	ÚVOD.....	8
II.	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
	1. Anatomie respiračního traktu potkana.....	11
	2. Patologie respiračního traktu – zánět.....	16
	3. Zánětlivá onemocnění dýchacích cest.....	23
	3.1 Rhinitis.....	23
	3.2 Laryngitis.....	23
	3.3 Bronchitis.....	24
	3.4 Chronická obstrukční plicní nemoc.....	24
	3.5 Asthma bronchiale.....	26
	4. Látky terapeuticky ovlivňující respirační systém.....	28
	4.1 Bronchodilatancia.....	28
	4.2 Látky snižující zánět.....	31
	4.3 Ostatní látky.....	32
	4.4 Antitusika.....	33
	4.5 Expektorancia.....	34
	4.6 Surfactanty.....	35
	4.7 Dechová stimulancia.....	35
	4.8 Terapeutické plyny.....	35
	5. In vivo metodiky k hodnocení bronchoprotektivních účinků látek.....	37
	5.1 Metodika modelu alergického astmatu.....	37
	6. In vitro metodiky k hodnocení bronchoprotektivních účinků látek.....	38
	6.1 Metodika izolované průdušnice.....	38

III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	47
1. Metodika.....	48
1.1 Zvířata a použitý materiál.....	48
1.2 Metodika izolované průdušnice.....	49
2. Výsledky.....	52
IV. DISKUZE.....	59
V. ZÁVĚR.....	62
VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	64

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

a.	arterie
BAL	bronchoalveolární laváž
CaCl <sub>2</sub>	chlorid vápenatý
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CD znaky	cluster of differentiation – označení lymfocytárních antigenů
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
CNS	centrální nervový systém
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
Fc	receptory pro Fc fragmenty imunoglobulinů
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
HLA	human leukocyte antigen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
5-HT	5-hydroxytryptamine
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
ICAM-1	adhezivní glykoprotein endoteliálních buněk (intercellular adhesion molekule)
IFN	interferon
Ig	imunoglobuliny
IL	interleukiny
LT	leukotrieny
MMP-9	proteáza neutrofilů
MPO	myeloperoxidáza
NO	oxid dusnatý

O <sub>2</sub>	kyslík
OH <sup>-</sup>	hydroxidový anion
PAF	destičky aktivující faktor (platelet activating factor)
RANTES	Regulated on Activation, T-lymphocyte Expressed and Secreted
TGF	transformující růstový faktor
Th	pomocné T-lymfocyty
TNF	tumor nekrotizující faktor
TX	tromboxany
VCAM-1	adhezivní glykoprotein endoteliálních buněk (vascular cell adhesion molekule)
WHO	světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

# I. ÚVOD



Dýchání je primární životní funkce, se kterou se nám do dýchacích cest dostává nejen životně důležitý kyslík, ale i řada škodlivých látek, pocházejících z ovzduší, rizikového pracovního prostředí, ale tyto látky si také sami dobrovolně vpravujeme do těla svým nevhodným životním stylem, zvláště vdechováním cigaretového kouře (jak aktivním tak pasivním), což představuje jeden z hlavních rizikových faktorů chorob dýchacích cest. Škodlivé látky se hromadí v dýchacích cestách a přispívají ke zvýšené náchylnosti k infekcím dýchacích cest a jsou spouštěcími faktory astmatického záchvatu nebo karcinomu plic. Bez kyslíku vydrží organismus jen několik málo minut. Nemoci dýchacích cest jsou častým a obtěžujícím onemocněním.

Podle staré čínské medicíny jsou nemoci dýchacích cest signálem, že něco v okruhu plic je v nepořádku. Bývá to příznak oslabení dýchacího orgánu. Organismus nám dává znamení, abychom začali něco dělat a bedlivě střežili svůj zdravotní stav.

Respirační choroby (astma, CHOPN) se již řadu let drží v popředí zájmu lékařů i laiků. Astma je závažným problémem veřejného zdraví, a v celosvětovém měřítku představuje i vážný problém politický. Astma postihuje osoby všech věkových kategorií, nelze je vyléčit a ani mu nelze účinně předcházet. Astma, které není pod kontrolou (neovládané, neřízené, nekontrolované astma), má za následek závažné omezení každodenního života, a někdy i smrt. Celosvětová prevalence astmatu za posledních 20 let dramaticky vzrůstá, v jednotlivých regionech se prevalence pohybuje v rozmezí 1–18 %. Nyní se odhaduje, že astmatem trpí 300 milionů osob, z nichž 250 000 ročně na astma zemře. [33]

Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) patří se svou celosvětovou prevalencí 600 milionů nemocných mezi nejčastější příčiny morbidity i mortality. CHOPN postihuje více než 5 % dospělé populace a asi 4,7 milionu osob ročně na ni zemřou. Zatímco v současné době je CHOPN čtvrtou nejčastější příčinou smrti a zaujímá dvanácté místo mezi příčinami invalidity, v roce 2020 bude tato nemoc podle odhadu dokonce třetí celosvětově nejčastější příčinou smrti a pátou nejčastější příčinou invalidity. Odhaduje se, že v České republice trpí touto nemocí asi 800 tisíc lidí, mortalita se u nás pohybuje kolem 3 tisíc za rok. [34]

Cílem předkládané diplomové práce bylo podílet se jednak na zavedení metody izolované průdušnice, která se používá k zjišťování relaxačního potenciálu nových bronchodilatancií, a dále na tomto modelu stanovit relaxační aktivitu standardního léčiva teofylinu.

## **II. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1. ANATOMIE RESPIRAČNÍHO TRAKTU POTKANA

U obratlovců je dýchací ústrojí většinou spojeno s ústrojím hlasovým. Zvuk vzniká prouděním vzduchu z plic hlasovým orgánem, který je uložen v hrtanu. K dýchací soustavě patří dutina nosní, hltan, hrtan, průdušnice s průdušinkami a plíce. [1]

## DUTINA NOSNÍ (cavum nasi)

Vystýlá ji sliznice obsahující četné žilní pleteně a řasinkový epitel s pohárkovými buňkami a hlenovými žlázkami. Jimi vyloučený hlen zvlhčuje sliznici a umožňuje zachytit vdechnuté nečistoty. Současně se vdechnutý vzduch sytí vodními párami a na prokrvené sliznici se předehtívá. Dutinu nosní tvoří tři části: *regio vestibularis*, *regio respiratoria*, *regio olfactoria*. [1]

Dutina nosní je ohraničena obličejovými kostmi. Chrupavčitá přepážka ji dělí na dvě poloviny. Začíná naspodu zevního nosu nosními dírkami a ústí nozdrami do nosohlтанu. *Zevní nos* je vstupní bránou nosní dutiny. Jeho kostěným podkladem jsou kosti nosní a obě horní čelisti. Ostatek je tvořen chrupavkami (hřbet, křídla). Tento oddíl (*regio vestibularis*) je vystlán plochým epitelem. S dutinou ústní ho spojuje v zadní části se otvírající *řezákový otvor* (*canalis incisivus*), který má ve své výstelce typické chuťové pohárky. Vlastní dutina nosní je tvořena vesměs kostěnými stěnami. Svislá přepážka je vpředu chrupavčitá; vzadu ji ohraničuje svislá ploténka kosti čichové a kost radličná. Z boční stěny, tj. z horní čelisti a čichové kosti, odstupují dvě skořepy. Horní z nich je prodloužená *vnitřní skořepa čichová*, která je u hlodavců zvlášť vyvinutá. *Spodní skořepa* je samostatná kost spojená s horní čelistí. Skořepy dělí nosní dutinu na *tři průduchy nosní* (*meatus nasi*): horní, střední a dolní. Horní vede k ústrojí čichovému, střední a spodní k východům nosním. Horní úsek dutiny nosní vystýlá nažloutlá sliznice (*locus luteus*) charakteristická pro čichovou oblast (*regio*

*olfactoria*). Větší část dutiny nosní (*regio respiratoria*) i skořepy jsou vystlány sliznicí s hojnými cévami, krytou víceřadým řasinkovým epitelem. Jsou v ní uloženy četné nosní žlázy. [1]

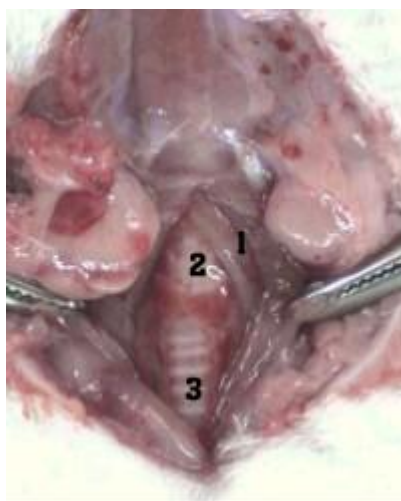
*Orgán Jacobsonův (organon vomeronasale)* vzniká jako ventrální vychlípenina dutiny nosní a leží po obou stranách nosní chrupavky na dně nosní dutiny. Je vyztužen zevně chrupavčitou trubicí (*cartilago vomeronasalis*), která souvisí s polokostěným žlábkem kosti radličné. Vystýlá ho sliznice, která má po stranách nízký a uprostřed vysoký smyslový epitel. Vzadu je tento orgán zakončen slepě, vpředu ústí do kanálu *nosopatrového*, který vede z dutiny nosní do dutiny ústní. Jacobsonův orgán je vystlán hlavně dýchacím epitelem a v malém množství epitelem čichovým. [1]

#### HRTAN (larynx)

Z nosní dutiny jde vzduch do dutiny hltanové, kde se dechové cesty kříží. Hltan spojuje dutinu nosní s cestou zažívací a dále s hrtanem. Vdechovaný vzduch následně vstupuje do hrtanu, který tvoří začátek dechové cesty krční. Hrtan se skládá z chrupavky štítné (*cartilago thyroidea*), prstencové (*cartilago cricoidea*) a z chrupavek hlasivkových (*cartilago arytaenoidea*), od nichž se táhnou směrem ke štítné chrupavce hlasové vazy. Chrupavka hrtanu je vesměs hyalinní, pouze na některých místech je chrupavka elastická. Svalovina je složena z příčně pruhovaných vláken. Sliznice vystýlající hrtan je kryta řasinkovým epitelem. Hrtan odděluje od vchodu jícnu chrupavčitá příklopka (*epiglottis*), která brání vniknutí potravy do dýchacích cest. [1]

#### PRŮDUŠNICE (trachea)

Je to tenkostěnná pružná trubice ležící před jícnem. Stěna trubice je tvořena sliznicí, vazivem, chrupavkou, svalovinou a vrstvou obalovou. Sliznice krytá dvojrstvým řasinkovým epitelem obsahuje četné žlázy a lymfatické uzlíky. Skládá se z asi třiceti dorzoventrálně zploštělých, vzadu neuzavřených a prstenčitých, hyalinních chrupavek, které jsou navzájem vazivově spojeny. Často též vápenatí. Dorzálně jsou chrupavky spojeny hladkým svalstvem, které se na ně upíná zvenčí. Průsvit průdušnice se postupně zmenšuje. [1]



**Obr. č. 1** Vypreparovaná trachea: (1)-rozstřižený *m. digastricus*, (2)-štítná chrupavka, (3)-trachea

Převzato z

<http://old.lf3.cuni.cz/physio/Physiology/education/materialy/praktika/tracheakan.htm>

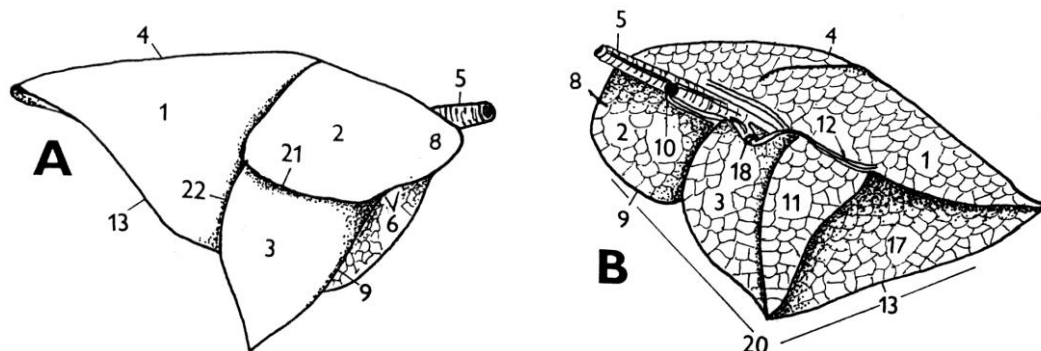
## PLÍCE (pulmo)

Plíce vyplňují skoro celou kónickou dutinu hrudní. Je to párový orgán. Na povrchu jsou kryty *poplicnicí (pleura pulmonalis)*, jež je podložena vazivovou vrstvou. Z povrchu vstupují do nitra plic přepážky z řídkého vaziva, které rozdělují plíci v lalůčky. Každá plíce je rozdělena hlubokými zářezy na *laloky*. Pravá plíce se člení ve čtyři laloky (horní hrotitý, střední srdeční, největší dolní brániční a malý lalok přídatný), levá má pouze jeden lalok. *Pravý hrotitý lalok (lobus apicalis)* obklopuje srdce a svým hrotem směřuje vlevo. Pak následuje malý plochý poloměsíčitý *srdeční lalok (lobus cardiacus)*, který kryje dorzálně spodní úsek hrotitého laloku a kraniální část *bráničního laloku (lobus diaphragmaticus)*. Je spojen s dolní dutou žilou. Posledním lalokem pravé strany plic je *přídatný lalok (lobus accesorius)*, jenž ční vlevo vpřed a obklopuje srdce svým kraniálním, vpravo směřujícím hrotem. [1]

Trachea se dělí na dvě *průdušky (bronchy)* v místě zvaném *bifurcatio tracheae*. Průdušky se zanořují do plic. První větev odstupuje z levé průdušky za a. pulmonalis, první větev z pravé průdušky odstupuje před a. pulmonalis. V plicích se průdušky postupně větví až na *průdušinky (bronchioli)*, které dále pokračují jako tenkostěnné alveolární chodbičky otevřené do *plicních sklípků (alveoli)*. [1]

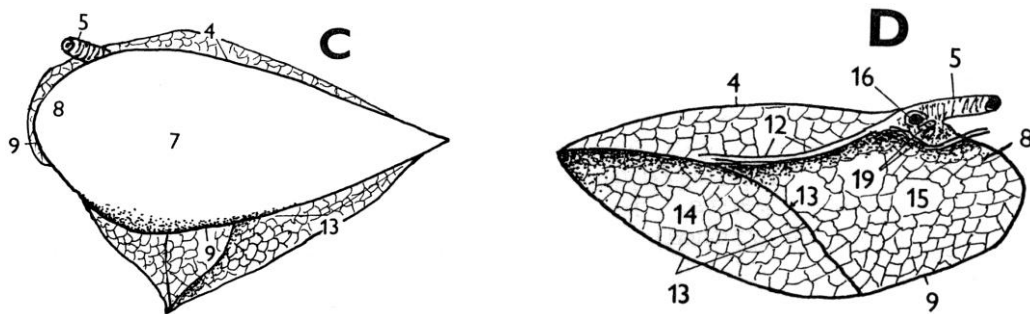
Velké bronchy jsou vystlány víceřadým řasinkovým epitelem s pohárkovými buňkami produkujícími hlen. Tento epitel se pokračujícím větvením bronchů snižuje a ztrácí řasinky. Větší bronchy ztrácejí hned po vstupu do plic chrupavčité prstence. V místě větvení bronchů jsou uloženy lymfatické uzliny. Průdušinky nemají ve své stěně chrupavku, ale zastupuje ji zde kolagenní vazivo. Jejich epitel nemá řasinky a přechází v alveolách v dýchací epitel, který vyplňuje celou respirační plochu plic. Plicní sklípky mají silnější stěny než u člověka. Tvoří je kromě hladkého svalstva převážně retikulární vlákna, jež podmiňují elasticitu stěny váčku. [1]

Krev přicházející do plic vstupuje do husté kapilární sítě, kde se zbavuje kyslíčnicku uhličitého a přijímá kyslík. Krev vyživující plíce přivádí a. bronchialis odstupující ze srdečnice. Podél bronchů probíhají nervová vlákna, která vytvářejí pleteň. Vstupují až do alveol. [1]



**Obr. č. 2 a 3** 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. 4 a 5** 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.*

## 2. PATOLOGIE RESPIRAČNÍHO TRAKTU – ZÁNĚT

Při zánětlivém onemocnění dýchacích cest hraje důležitou úlohu řada buněk a jejich mediátorů. Mezi hlavní buněčné typy, které se na zánětu podílejí, patří antigen prezentující buňky, lymfocyty T, lymfocyty B, eozinofily, mastocyty, neutrofilly, makrofágy, bazofily a epitelové buňky. [2]

### *Antigen prezentující buňky:*

hlavní roli zde hrají dendritické buňky, ale vlivem zánětlivých cytokinů (např. IFN- $\gamma$ ) může jakákoliv jaderná buňka exprimovat HLA II. třídy, a stát se tak zdrojem aberantní prezentace antigenů. [2]

### *T-Lymfocyty:*

se ve sliznici pacientů se zánětem dýchacích cest nacházejí ve zvýšeném množství. Bylo potvrzeno, že hlavní podíl tvoří lymfocyty T CD4<sup>+</sup>, podle spektra produkovaných cytokinů především buňky druhého typu – Th2, které jsou zřejmě do zánětlivých změn zapojeny v roli koordinátora. Samy se sice na výsledných změnách přímo nepodílejí, ale produkují celou řadu cytokinů, které se účastní řízení jak akutní, tak chronické reakce. Lymfocyty Th2 přebírají od dendritických buněk v komplexu s HLA II. třídy informaci o alergenech v kontaktu s bronchiální sliznicí. Aktivované lymfocyty produkují bohaté spektrum cytokinů, které se podílejí na řízení zánětlivé reakce. Jde např. o IL-4, jehož nejdůležitější funkcí je stimulace lymfocytů B k produkci protilátek typu IgE a který je sám induktorem diferenciaci lymfocytů typu Th0 na typ Th2. IL-4 má také schopnost indukovat expresi adhezivních molekul na buňkách endotelu (ICAM-1, VCAM-1), které mj. umožňují adhezi eozinofilů k endotelu cév. Dalším důležitým faktorem je IL-5, který stimuluje diferenciaci a aktivaci eozinofilů v kostní dřeni, má chemotaktickou aktivitu pro eozinofily a navíc pozitivně ovlivňuje zrání a prodlužuje přežívání těchto buněk tím, že negativně ovlivňuje jejich apoptózu. IL-13 indukuje tvorbu IgE. [3]



Posunutí nerovnováhy ve prospěch Th2 lymfocytů má pro rozvoj alergického zánětu zásadní význam. Tato dysbalanční teorie Th1/Th2 lymfocytů je však v poslední době nahrazována teorií o snížení tvorby regulačních T lymfocytů, které kontrolují výkonné lymfocyty, což vede k rozvoji alergického onemocnění. [2]



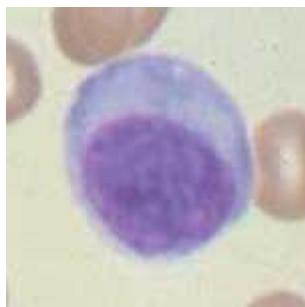
**Obr. č. 6 T-lymfocyt**

Převzato z <http://www.osel.cz/index.php?clanek=1900&akce=show2&dev=1>

### ***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. [4]

Tvorbu IgE dále ovlivňují svou aktivitou i IL-6, IL-5, IL-10, TNF $\alpha$ , MPP1 $\alpha$ , RANTES. Naopak ji potlačují IFN $\gamma$ , IL-12, TGF $\beta$  a IL-8. [4]



**Obr. č. 7 B-lymfocyt**

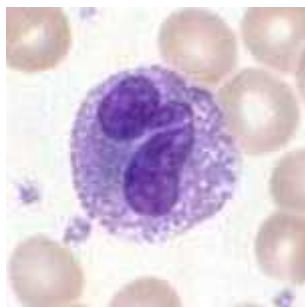
Převzato z <http://cs.wikipedia.org/wiki/B-lymfocyt>

### ***Eozinofily:***

mají jednoznačnou úlohu v patogenezi chronického alergického zánětu. Eozinofily patří mezi leukocyty obsahující červená hrubá granula a dvojlaločné jádro. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 12–17  $\mu\text{m}$  a v kostní dřeni jsou zastoupeny 3,0–3,5 %. [4]

Eozinofily se diferencují v kostní dřeni a jejich zralé formy cirkulují v krvi a mají tendenci se akumulovat ve sliznicích. Na jejich povrchu je exprimováno množství membránových molekul (např. adhezní molekuly, aktivační molekuly, receptory pro Fc fragment imunoglobulinů, receptory pro složky komplementu, pro chemokiny, cytokiny a různé mediátory), pomocí kterých přijímají aktivační podněty různého původu. [5]

Aktivované eozinofily uvolňují velké množství mediátorů, které ovlivňují bronchiální hyperreaktivitu, kontrakci hladkých svalů, vasodilataci a významně se podílejí na poškozování epitelu bronchů. Zdrojem těchto mediátorů jsou eozinofilní granula obsahující bazické polypeptidy (hlavní bazický protein, eozinofilní kationický protein, eozinofilní neurotoxin) a eozinofilní peroxidázu. Eozinofily jsou mj. schopny autochemoatrakce (samy produkují své eozinofilní chemoatraktanty – eotaxin, IL-5, IL-8, RANTES), a tím samovolně udržují perzistenci zánětu. Množství eozinofilů a jejich proteinů v indukovaném sputu, v biopsiích, v bronchoalveolární laváži i v periferní krvi dobře koreluje s aktivitou zánětu. [2]

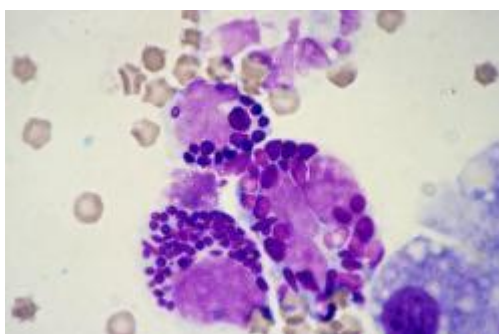


**Obr. č. 8 Eosinofilní granulocyt**

Převzato z [cs.wikipedia.org/wiki/B%C3%ADI%C3%A1\\_krvinka](https://cs.wikipedia.org/wiki/B%C3%ADI%C3%A1_krvinka)

***Mastocyty (žírné buňky):***

jsou hlavními buňkami časně fáze alergické reakce i anafylaxe. Na jejich povrchu je exprimován vysokoafinitní receptor pro IgE (FcεRI), na který se svou Fc částí váže IgE stimulovaný alergenem. Po vazbě alergenu na dvě sousední molekuly protilátky IgE přítomné na membráně žírné buňky dojde k její degranulaci a uvolnění řady mediátorů (histamin, prostaglandiny, leukotrieny aj.), které vyvolávají bronchospasmus a dále přispívají k rozvoji zánětlivé odpovědi. Zároveň dochází k novotvorbě mediátorů a cytokinů. Žírné buňky též odpovídají na stimulaci eozinofilními mediátory, a tím je podněcována jejich další exocytóza a novotvorba lipidových mediátorů. [2]



**Obr. č. 9 Mastocyty**

Převzato z [www.osel.cz/index.php?clanek=2053](http://www.osel.cz/index.php?clanek=2053)

***Neutrofilny:***

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. [4]

Vznikají z pluripotentní kmenové buňky v kostní dřeni. Jejich proliferaci a diferenciaci stimulují G-CSF, GM-CSF a IL-3. Jádro neutrofilu bývá členěno na 2-5 segmentů a v jejich cytoplazmě se nacházejí drobná granula, která se zbarvují růžově. [4]

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. [4]

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 neutrofilové uplatňovat negativně v průběhu zánětu – poškozením vlastní tkáně. [4]

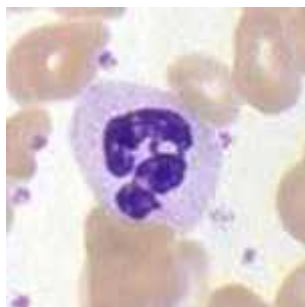
Neutrofilové jsou prvním typem buněk, které vcestovávají do plic po reakci s alergenem, ale tento influx je časově omezený jen na časovou odpověď. Na druhé straně i nealergické podněty vyvolávající asthma bronchiale, např. ozon a oxidy dusíku podněcují přestup neutrofilů do dýchacích cest. [4]

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. [4]

Neutrofilové tvoří velké množství mediátorů – metabolity kyseliny arachidonové (LTB<sub>4</sub>, PAF, TXA<sub>2</sub> a LTA<sub>4</sub>), cytokiny (IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα, TGFβ), proteázy (elastázu, kolagenázu, MMP-9), mikrobicidní látky (laktoferin, MPO, lyzozym) a kyslíkové radikály (superoxid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup> a NO). [4]

Jejich migrace do určité míry koreluje s migrací eozinofilů. Studie u některých forem těžkého astmatu zjistily zvýšený podíl neutrofilů v bronchoalveolární laváži a bylo vysloveno podezření, že u těchto forem nabývá neutrofilní infiltrace především v oblasti periferních dýchacích cest na významu a může korelovat se špatnou odpovědí na léčbu. [3]

V poslední době byla vytvořena nová nozologická jednotka, tzv. neozinofilní (non-eozinofilní) astma (NEA), kde mezi buňkami zánětu hrají neutrofilové dominantní roli. Vyskytuje se především u astmatiků kuřáků nebo u profesního astmatu. [2]

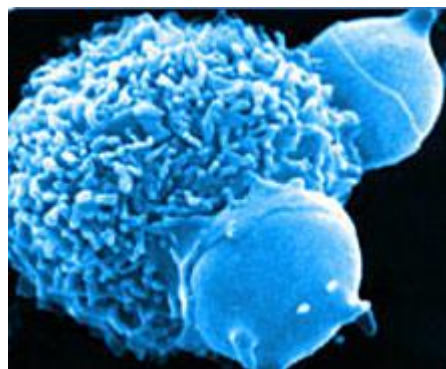
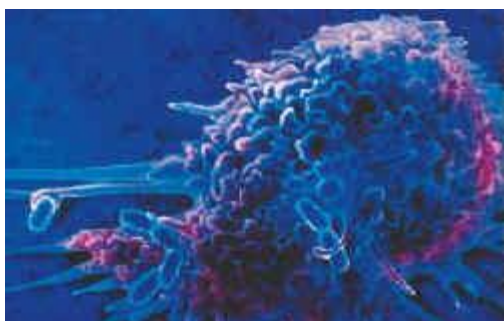


**Obr. č. 10 Neutrofilní granulocyt**

Převzato z [cs.wikipedia.org/wiki/B%C3%ADI%C3%A1\\_krvinka](https://cs.wikipedia.org/wiki/B%C3%ADI%C3%A1_krvinka)

### ***Makrofágy:***

pravděpodobně se podílejí na procesech poškozování a reparace s následkem přestavby dýchacích cest; degradují řadu makromolekul extracelulární matrix včetně elastinu a secernují růstové faktory, včetně základního růstového faktoru pro fibroblasty. [2]

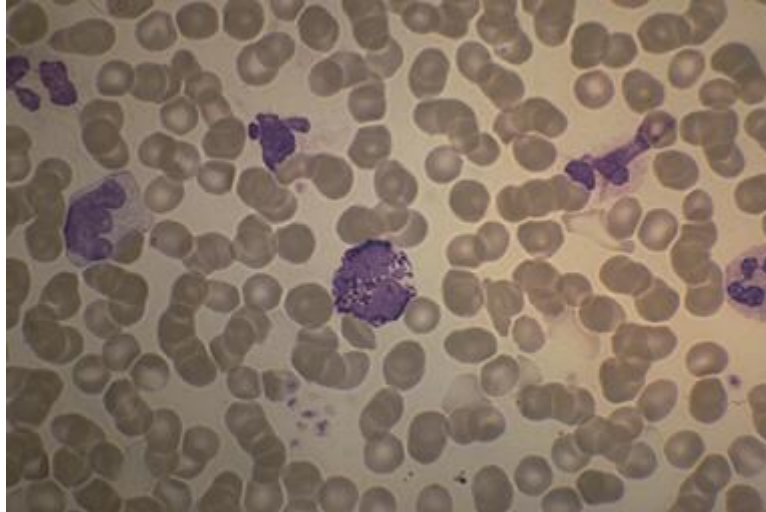


**Obr. č. 11 Makrofág**

Převzato z [kekule.science.upjs.sk/biologia/publikacie/se..](http://kekule.science.upjs.sk/biologia/publikacie/se..) a [www.kvarkadabra.net/article.php/imunski-sistem](http://www.kvarkadabra.net/article.php/imunski-sistem)

### ***Bazofily:***

mají svou základní funkci stejnou jako mastocyty, tj. produkci protizánětlivých mediátorů jako odpověď na přemostění molekul IgE navázaných na jejich povrchu. Bazofily však přispívají k pozdní fázi alergické reakce a samy secernují některé imunoregulační cytokiny, zejména IL-4 a IL-3. [2]



**Obr. č. 12 Bazofily**

Převzato z [webak.upce.cz/~kbbv/Student/Vyuka/Fyziologie/..](http://webak.upce.cz/~kbbv/Student/Vyuka/Fyziologie/)

### ***Epitelové buňky:***

jsou během alergického zánětu jednak poškozovány, jednak aktivovány. V buněčné patogenezi zánětu mohou být „hlavní obětí“ nebo „hlavním škůdcem“. Po jejich aktivaci dochází k indukci tvorby zánětlivých cytokinů, receptorů, antigenů HLA II. třídy a adhezivních molekul. Epitelové buňky za účasti NO-syntázy produkují oxid dusnatý (NO) působící vasodilataci a sekreci hlenu. [2]

Zdrojem buněčných působců jsou i ***fibroblasty***, buňky endotelu, hladkých svalů aj. Výsledkem těchto procesů je bezprostředně kontrakce hladkých svalů, dlouhodobě pak udržování chronického zánětu a přestavba (remodelace) dýchacích cest včetně novotvorby cév v bronchiální sliznici. [2]

### 3. ZÁNĚTLIVÁ ONEMOCNĚNÍ DÝCHACÍCH CEST

V této kapitole je nastíněna problematika vybraných zánětlivých onemocnění dýchacích cest, k nimž patří rhinitis, laryngitis, bronchitis, chronická obstrukční plicní nemoc, asthma bronchiale.

#### 3.1 RHINITIS (rýma z nachlazení)

Zánět postihuje sliznici dutiny nosní a patří k nejčastějším virovým infekcím. [6, 7] Nejobvyklejším původcem je rhinovirus, coronavirus nebo influenza virus. Na virové postižení nosní sliznice a nosohltanu často navazuje bakteriální infekce. [6] Prolongované edematózní zduření sliznice se seriózní exsudací může být také podmíněno alergizací (atopická, senná rýma) nebo vazomotorickými poruchami (při záchvatovité vazomotorické rýmě nebo vedlejším účinkem antihypertenziv či kontraceptiv). [7]

#### 3.2 LARYNGITIS (zánět hrtanu)

Laryngitida patří mezi katarální záněty, nejčastěji s hlenohnisavým exsudátem. [6] Laryngitidy se v základních rysech podobají zánětům průdušnice, s nimiž často probíhají současně – laryngotracheitidy. [7]

Laryngotracheitis catarrhalis acuta se jeví jako typický katarální zánět s překrvením a zduřením sliznice, někdy s drobnými hemoragiemi a povrchnými erozemi. Zánět vzniká jako reakce na dráždění chemická, termická nebo bakteriální či virovou infekcí. Laryngotracheitis catarrhalis chronica často vzniká jako následek opakovaného akutního katarálního zánětu, který se nezhojí, příp. jako následek chronické iritace způsobené vdechováním prachu, dráždivých par, kouřením, přepínáním hlasu nebo při chronické venostáze. Sliznice je překrvená, zhrubělá, někdy až s drobnými polypózními výrůstky. [7]

### 3.3 BRONCHITIS (zánět průdušek)

Bronchitida je onemocnění, které u dospělých postihuje velké a střední bronchy. Klinicky probíhá pod obrazem obyčejného kašle. U dětí, zejména u kojenců a starších lidí, zánět často zachvacuje periferní dýchací cesty a pak se onemocnění označuje jako bronchiolitis. Tato forma je závažná, protože zánět snáze přechází na plicní parenchym, vzniká bronchopneumonie a exsudát ucpávající úzký průsvit bronchiolů může způsobit zadušení. [7]

Bronchitis catarrhalis acuta (akutní bronchitida) často navazuje na záněty horních cest dýchacích. [6] Akutní bronchitidu nejčastěji způsobují viry (90%) a mykoplazmata, vzácně bakterie. Může vznikat i v rámci jiného onemocnění, např. pertuse, spalničky, brucelóza, tyfus. [8] Recidivující bronchitida by měla být vždy důvodem k podrobnějšímu vyšetření plic. To napomůže časně detekci vrozených poruch obranných mechanismů dýchacího traktu (cystická fibróza, ciliární dysfunkce, imunodefekt), na které se v dětství nepřišlo nebo k detekci iniciálního stádia chronické obstrukční plicní nemoci. [9]

Bronchitis catarrhalis chronica (chronická bronchitida) se diagnostikuje tehdy, pokud u pacienta během dvou po sobě následujících let potvrdíme kašel s expektorací, trvající nejméně tři po sobě následující měsíce. [8] Je způsobena buď opakovanými atakami akutní bronchitidy nebo trvalým působením bakteriální infekce (např. při chronické sinusitidě), případně dráždivých látek (nejčastěji při kouření). [7] Chronická bronchitida je obvykle doprovázena plicním emfyzémem a jejich společný výskyt se v mnoha dřívějších definicích označoval jako chronická obstrukční plicní nemoc. [10, 11]

### 3.4 CRONICKÁ OBSTRUKČNÍ PLICNÍ NEMOC (CHOPN)

CHOPN je nemoc charakterizovaná omezením průtoku vzduchu v průduškách (bronchiální obstrukcí), které není úplně reverzibilní. Bronchiální obstrukce progreduje a je spojena s abnormální zánětlivou odpovědí plic na škodlivé částice a plyny. [11]

Prevalence ve světě je 10%, což je asi 600 miliónů obyvatel naší planety, v ČR se prevalence pohybuje kolem 8%. Počet nemocných přitom stále roste. Celosvětově je CHOPN mezi příčinami úmrtí na 5. místě a podle prognóz WHO se v roce 2010 dostane na 4. místo a v roce 2020 dokonce na místo 3. [12]



Základní příčinou je inhalace tabákového kouře, která vyvolává v plicích zánětlivý proces - především zánět malých bronchů (chronickou bronchiolitidu) a destrukci plicní tkáně s protrhávání interalveolárních sept - plicní emfyzém. Výskyt CHOPN stoupá s rozšiřováním kouření tabáku. U pacientů s CHOPN jsou kromě plic díky cirkulujícím zánětlivým cytokinům postupně zasahovány i další orgány, takže ve výsledku jde o systémové onemocnění. Vedoucím příznakem je dušnost a bronchiální hyperreaktivita. [12]

Další příčinou vzniku CHOPN mohou být také endogenní faktory (genetické faktory, primární ciliární dyskineze, hyperreaktivita dýchacích cest, růst plic). [11]

Kromě zánětu jsou pro patogenezi CHOPN důležité dva další procesy: nerovnováha mezi aktivitou proteáz a antiproteáz v plicích a oxidační stres. Laurell s Erikssonem si v roce 1963 všimli, že jedinci s vrozeným deficitem sérového proteinu alfa-1-antitrypsinu, který inhibuje proteázy, jako je např. neutrofilní elastáza, mají zvýšené riziko vývoje emfyzému. Elastin, cíl pro neutrofilní elastázu, je hlavní komponentou alveolárních stěn. Fragmenty elastinu mohou prodlužovat zánět tím, že působí jako silné chemotaktické látky pro makrofágy a neutrofilny. Pozorování vedla k hypotéze, že nerovnováha mezi proteázami a endogenními antiproteázami vede k destrukci plíce. Oxidační stres se podílí na vzniku CHOPN několika způsoby. Oxidanty mohou reagovat s mnoha biologickými molekulami, včetně proteinů, lipidů a nukleových kyselin, a tak je poškozovat. To může vést k poruše funkce buněk nebo k jejich smrti, stejně jako k poškození extracelulární matrix. Kromě přímého poškozování plic přispívá oxidační stres k nerovnováze mezi proteázami a antiproteázami jak inaktivací antiproteáz, jako je alfa-1-antitrypsin, tak aktivací proteáz. Oxidanty také podporují zánět například aktivací transkripčního faktoru NFkappa-B, který spouští expresi četných zánětlivých genů považovaných za důležité pro CHOPN, jako je interleukin 8 (IL-8). [13]

U této nemoci, možná více než u jiných, existuje fenomén „ledovce“, kdy jen u menšiny nemocných je včas stanovena diagnóza a zahájena léčba. Základními příznaky jsou kašel s vykašláváním a dušnost. Většina nemocných vyhledá lékaře pozdě. Je to způsobeno tím, že hlavní příznak, dušnost, vzniká postupně a nemocný si na ni zvyká. Když určitou činnost (ranní cestu na zastávku hromadné dopravy, práci na zahrádce apod.) zvládal dříve za několik minut a nyní mu to trvá déle, obvykle si řekne, že je to přibývajícím léty. Kromě toho chronický kašel s vykašláváním považují kuřáci za něco samozřejmého. Proto bychom se měli nemocných ptát, zda kouří, a u starších kuřáků indikovat spirometrické vyšetření. [13]

### 3.5 ASTHMA BRONCHIALE

Astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, kde hrají roli mnohé buňky (mastocyty, eozinofily, T-lymfocyty) a buněčné částice. Chronický zánět je spojen s průduškovou hyperreaktivitou a vede k opakujícím se epizodám pískotů, dušnosti, tíže na hrudi a kašle, zvláště v noci nebo časně ráno. Tyto epizody jsou obvykle spojeny s variabilní obstrukcí, která je často reverzibilní buď spontánně nebo vlivem léčby. [14]

A) Alergické (extrinsic) astma = astma zprostředkované imunologickými mechanismy. IgE zprostředkované astma – IgE protilátky spouští jak okamžitou tak pozdní reakci. T-lymfocyty pozdní a opožděné reakce.

B) Nealergické (intrinsic) astma = neimunologické typy astmatu.

Intermitentní x perzistující [14]

Celosvětová prevalence astmatu se pohybuje v rozmezí 1–18 % populace, odhaduje se, že astmatem trpí 300 milionů obyvatel naší planety. Astma je v mnoha zemích, především v ekonomicky vyspělých, jednou z nejčastějších chronických nemocí s prevalencí 10 až 15 %. Prevalence astmatu i prevalence senzibilizace vůči nejrůznějším alergenům zvláště v mladší dětské populaci ve věku 6–7 let stále vzrůstá. Astma je nejčastějším chronickým onemocněním dětského věku. [15]

Asthma bronchiale může vzniknout v jakémkoli věku a je pro něj charakteristická velká interindividuální i individuální variabilita. [9] Základním genetickým faktorem pro vznik astmatu je atopické onemocnění, které se vyskytuje familiárně v souvislosti s autozomálně dominantní dědičnou vlohou k nadprodukci IgE. [8] Počet atopiků se v naší populaci odhaduje přibližně na 1/3. [16]

Astmatické záchvaty jsou charakterizovány expirační dušností ze spazmu svaloviny bronchů, ze zvýšené produkce hlenu a ztluštěním bronchiální stěny. Podstata onemocnění spočívá ve vrozené dispoziční k přecitlivělosti I. typu, tj. zvýšení schopnosti reagovat anafylaktickým způsobem (vytváření IgE, degranulací žírných buněk, bronchiolokonstrikcí) na nejrůznější podněty (i psychické), které pro ostatní populaci alergeny nejsou. Mohou to být bílkoviny potravy, rostlinné pyly, zvířecí chlupy, roztoči, mikrobi či plísně. Vedle těchto atopických forem astmatu existuje astma neatopické, obtížněji zvladatelné, s prokazatelnou přecitlivělostí na léky (např. Aspirin) a viry při zvýšené bronchiální dráždivosti. [7]

Podle závažnosti a frekvence obtíží se astma klasifikuje jako intermitentní a perzistující lehké, střední a těžké. [9]

Nejčastější příznaky astmatu jsou:

- dýchavičnost – pocit těžkého dýchá
- záchvat kašle,
- pískoty.

Dýchacími cestami přichází do plic vzduch, aby mohl okysličit krev. Průdušky zdravého člověka nebo astmatika pod kontrolou jsou průchodné a vzduch jimi prochází bez překážek. Pokud není astma pod kontrolou, průdušky se zúží, opuchnou a tvoří se nadměrné množství hlenu. Příčinou těžkostí astmatika je to, že stažené průdušky brání proudění vzduchu při dýchání a tělo dostává méně kyslíku. Dýchání je těžké, s pískoty, nemocný snese menší tělesnou námahu. Na hrudi cítí těžkost. V horším případě přichází astmatický záchvat, který může v kritických situacích, pokud není poskytnuta lékařská pomoc, skončit až smrtí. [17]

Neustále se zhoršující životní prostředí je jistě jednou z příčin a „přítěžujících“ faktorů. Má vliv především na ty lidi, kteří žijí ve velkých městech a v oblastech se zhoršeným životním prostředím. Stav astmatika se může měnit také podle fyzické námahy, stresu, počasí nebo po kontaktu s určitými látkami. Faktory a látky, které přispívají k tomu, že se během života projeví vrozená dispozice k chorobě, se nazývají vyvolávače. Faktory a látky, které už přítomnou chorobu zhoršují, případně ji opětovně vyvolávají, ať už byla, nebo nebyla tlumena léčbou, se nazývají spouštěče. Příčinou těžkostí nebo jejich zvýraznění může být též prochlazení, infekce, tělesná námaha, stres, emocionální napětí, hormonální změny u žen (menstruace, klimakterium). Pacienti s alergickým astmatem pociťují zhoršení stavu při setkání s „jejich“ alergenem. Pacienti s nealergickým astmatem bývají citliví na změny počasí a nejhroším obdobím je pro ně doba na přelomu podzimu a zimy s častým sychravým inverzním počasím (mlha). Stav pacientů s takzvanou infekčně-alergickou chorobou se zhoršuje po každé prodělané infekci, často i po obyčejné rýmě. [17]

## 4. LÁTKY TERAPEUTICKY OVLIVŇUJÍCÍ RESPIRAČNÍ SYSTÉM

Mezi léčiva používaná k terapii nemocí respiračního systému patří kromě protiinfekčních látek (používaných ke zvládnutí nejrůznějších akutních infekcí respiračního traktu) mnoho farmak z různých terapeutických skupin. Patří sem **antitusika** (látky zmírňující kašel), **expektorancia** (látky usnadňující odstranění hlenu z dýchacích cest), **bronchodilatancia** (rozšiřují dýchací cesty, používají se především u průduškového astmatu), **glukokortikoidy** (látky snižující zánět), **imunoprolaktika** (látky vhodné u některých typů asthma bronchiale), **antihistaminika** (užívají se ke zvládnutí akutních alergických stavů), **dechová stimulancia** (látky stimulující dechové centrum), **surfaktanty** (látky snižující povrchové napětí v alveolech) a **terapeutické plyny** (plyny používané u některých typů hypoxií). [19]

Dýchací systém ovlivňují také léčiva působící v centrálním nervovém systému (CNS). Centrální analeptika mají stimulační účinek na respirační systém a např. opiáty, barbituráty a etanol působí tlumivě. [20]

### 4.1 BRONCHODILATANCIA

Bronchodilatancia vyvolávají různými mechanismy dilataci bronchů anebo zabraňují jejich konstrikcii. Používají se látky se třemi různými mechanismy účinku: beta<sub>2</sub>-sympatomimetika, parasympatolytika a deriváty metylxantinů. [19]

#### a) Sympatomimetika

Sympatomimetika se používají k léčbě asthma bronchiale. Dnes se používají výhradně sympatomimetika se selektivním účinkem na beta<sub>2</sub>-receptory. S výjimkou speciálních situací (např. těžké astma, kdy nemocný není schopen inhalovat) je třeba dát přednost inhalační formě podání. [9]

Inhalační beta<sub>2</sub>-sympatomimetika se podávají k „bronchodilataci“. [18] Kontraktilní stav hladké svaloviny závisí na intracelulárním poměru cAMP/cGMP. Čím je tento poměr větší, tím je svalovina bronchů relaxovanější. beta<sub>2</sub>-sympatomimetika (inhibitory adenylátcyklázy)

a methylxantiny (inhibitory fosfodiesterasy) tento poměr zvyšují. Svalovina bronchů obsahuje čtyři typy receptorů ( $\beta_2$ ,  $\alpha$ , histaminové a cholinergní). Pouze stimulace  $\beta_2$  receptorů však vede k bronchodilataci. [8]

Jde o látky působící na adrenergní  $\beta_2$  receptory na buněčných membránách buněk, které mají selektivní bronchodilatační účinky; tyto látky mají relativně malé účinky na funkci myokardu. Jako všechny beta adrenergní látky působící prostřednictvím cAMP mají také antialergické účinky. Dále snižují vaskulární permeabilitu a uvolňování zánětlivých mediátorů ze žírných buněk a bazofilů. [19]

Lékem volby při terapii astmatického záchvatu jsou právě krátkodobě účinná inhalačně podávaná  $\beta_2$ -sympatomimetika např. salbutamol, fenoterol a terbutalin. Jejich účinek nastoupí do několika minut po inhalaci a setrvá 4-6 hodin. [18] Jsou určeny ke krátkodobému zlepšení bronchokonstrikce a ventilační funkce.

Všechna inhalační  $\beta_2$ -mimetika mají podobné kontraindikace a vedlejší účinky. Kontraindikacemi je přecitlivělost na přípravky, opatrnost je nutná u hypertyreózy, těžkých oběhových onemocnění, akutního infarktu myokardu, hypertrofické subvalvulární stenózy, tachyarytmií a diabetu. Mají tokolytický účinek. Při použití vyšších dávek se objevují vedlejší účinky jako je třes rukou, neklid, tachykardie, závrať, pocení a cefalea. Závažnými vedlejšími účinky při těžkém předávkování jsou možnost komorové fibrilace a vývoj infarktu myokardu, vyjíměčně paradoxní bronchokonstrikce. [9]

$\beta_2$ -sympatomimetika s dlouhodobým účinkem (8 – 12 hodin) se užívají k profylaktické terapii. Nejsou vhodná k urgentní léčbě astmatického záchvatu (kromě formoterolu, který má zároveň rychlý nástup účinku). Zástupci jsou: formoterol, salmeterol, prokaterol, bambuterol, salbutamol v retardované formě. [8, 10]

Neselektivní sympatomimetika jsou dnes v této indikaci obsolentní a byla nahrazena selektivními  $\beta_2$ -adrenergními agonisty. Jen vyjíměčně se používá efedrin v kombinaci s xantiny. [10]

## b) Anticholinergika (parasymptolytika)

Parasymptolytika blokují M cholinergní receptory a brání tak účinku acetylcholinu. Ten se může při zvýšené aktivitě parasymptotiku podílet na bronchiálních spazmech. [19]

Pozdní zánětlivou fází u astmatu tato podskupina antiastmatik neovlivňuje. Dříve používaný atropin je spojen se širokým spektrem vedlejších anticholinergních účinků. Při

hledání vhodnější látky byl syntetizován jeho derivát – ipratropium bromid. Protože se jedná o sloučeninu s kvartérním dusíkem, prochází špatně přes bariéry (včetně gastrointestinální a hematoencefalické). Aplikuje se proto pouze inhalačně a ve srovnání s atropinem nemá vedlejší účinky na CNS. Navíc neinhibuje pohyb řasinkového epitelu v dýchacích cestách. Vzhledem k pomalému nástupu účinku je spíše vhodnější k preventivnímu podávání. Při terapii astmatu se osvědčila jeho kombinace s beta<sub>2</sub> sympatomimetiky (např. fenoterolem). [20]

Novodobým parasymptolíkem, které je odvozené od atropinu, je tiotropium. Má dlouhodobé účinky (přes 24 hod.), a je vhodné i k inhalační terapii. Jde o novou látku, která je nadějí pro léčbu chronické obstrukční plicní nemoci. [19]

### c) Methylxanthiny

V terapii astmatu se z metylxantinů využívá především theophyllin, popřípadě jeho rozpustnější ethylendiaminová sůl – aminophyllin. Mechanismus relaxačního účinku na hladkou svalovinu je spojován s inhibicí fosfodiesterázy a tím s následným zvýšením intracelulární koncentrace cAMP. Vedle toho se zřejmě uplatňují i protizánětlivé mechanismy těchto látek. Pro aplikaci theophyllinu připadá v úvahu cesta perorální, popřípadě intravenózní (nikoliv však inhalační). Relativně krátký biologický poločas theophyllinu vyprovokoval vývoj retardovaných lékových forem, které jsou schopny udržet terapeutickou plazmatickou hladinu kolem 12 hodin. [20]

Nežádoucí účinky, popřípadě intoxikace se vyskytují poměrně často, protože u theophyllinu existuje velmi malé rozmezí mezi klinicky efektivní hladinou a tou, která navozuje již efekty nežádoucí. U pacientů se objevují nauzea, zvracení, ze stimulace CNS tremor a nervozita (u dětí až křeče), při rychlé intravenózní aplikaci pak arytmie, hypotenze a srdeční zástava. Retardované formy mají zpravidla menší výskyt nežádoucích účinků. [20]

## 4.2 LÁTKY SNIŽUJÍCÍ ZÁNĚT

Protizánětlivá terapie spočívá v podávání glukokortikoidů a preventivních imunofarmak, přispívajících k normalizaci reaktivity dýchacích cest. [20]

### a) Glukokortikoidy

Příznivé účinky systémově podávaných glukokortikoidů u astmatu jsou známy již několik desítek let; jejich rozsáhlejšímu používání však brání velké nežádoucí účinky. Systémové vedlejší účinky zahrnují nadměrnou sekreci hlenu a kyseliny chlorovodíkové v žaludku, sníženou imunitu, hyperglykémii, rozvoj osteoporózy a život ohrožující útlum produkce endogenních kortikosteroidů spojený s akutní atrofií nadledvin. Systémová aplikace se používá hlavně u jinak nezvládnutelných astmatických stavů a u status asthmaticus. Velkým pokrokem bylo zavedení glukokortikoidů v inhalační formě, která je zbavila závažných nežádoucích účinků. Tato forma se nyní běžně označuje jako inhalační kortikosteroidy a představuje v současnosti léky první volby pro léčbu chronického průduškového astmatu. Podávají se dlouhodobě profylakticky (měsíce až léta); jejich krátkodobé podání u již rozvinutého akutního záchvatu nemá význam. [19, 20]

Glukokortikoidy potlačují zánětlivý proces v dýchacích cestách a po delším podávání (většinou po 2-4 týdnech) se následně snižuje i bronchiální reaktivita. Mechanismus jejich protizánětlivého účinku je vysvětlován potlačením syntézy protilátek typu IgE, inhibicí uvolňování spazmogenních mediátorů a mediátorů zánětu, snížením aktivity eosinofilních leukocytů. Plné rozvinutí těchto účinků však trvá i několik dnů. [20]

Mohou být tedy aplikovány buď perorálně (např. prednison, prednisolon) nebo parenterálně (metylprednisolon, hydrokortison) a inhalací (triamcinolon, beklometason, budesonid). Po inhalační terapii se může vyskytnout podráždění hrdla a kandidóza postihující dutinu ústní a hltan, proto se doporučuje výplach dutiny ústní vodou po každé aplikaci. [20]

### b) Imunoprofylaktika

Dlouhodobé podávání léčiv, řazených do této skupiny, snižuje u některých pacientů frekvenci astmatických záchvatů a umožňuje redukovat dávky bronchodilatancií a kortikosteroidů. Patří sem kromoglykan sodný, který potlačuje obě fáze (rychlou i pozdní) v patogenezi astmatu a snižuje hyperreaktivitu dýchacích cest. Aplikuje se tedy profylakticky,

k plnému rozvinutí účinku je zapotřebí dlouhodobější podávání (alespoň jeden měsíc). Nemírní již vzniklý bronchospasmus. Podává se pouze inhalačně ve formě prášku nebo aerosolu. Podobné účinky jako kromoglykan má ketotifen a navíc výrazně antagonizuje účinky histaminu na  $H_1$  receptorech. Může být aplikován perorálně. Novější látkou s podobným mechanismem účinku jako kromoglykan je nedokromil. Má celkově větší protizánětlivý efekt než kromoglykan a podává se inhalačně. [20]

## 4.3 OSTATNÍ LÁTKY

Při léčbě průduškového astmatu se používá celá řada dalších látek, které však nemají tak zásadní význam jako dosud uvedené látky. Mají většinou hlavně podpůrné účinky. [19]

### a) Antileukotrieny

Jako antileukotrieny označujeme látky, které antagonizují tvorbu nebo účinky leukotrienů. Leukotrieny se tvoří z kyseliny arachidonové působením lipoxygenázy a podílejí se na zánětlivých reakcích mnoha svými účinky. [19]

Mezi inhibitory tvorby leukotrienů patří zileuton, docebenon a piriiprost. Mezi antagonisty leukotrienových receptorů, které se u nás užívají, patří zafirlukast a montelukast; dále sem patří pranlukast a verlukast. Tenidap působí oběma uvedenými mechanismy a dokonce ještě blokuje tvorbu a účinky IL-1. [19]

Dosud bylo prokázáno, že lehčí formy průduškového astmatu lze příznivě ovlivnit výše uvedenými látkami. U těžších forem astmatu, které jsou léčeny protizánětlivými glukokortikoidy, lze současným použitím antileukotrienů snížit dávky podávaných látek. [19]

### b) Antihistaminika

Antihistaminika ovlivňující  $H_1$  receptory mají antialergické účinky. Používají se u různých alergických reakcí; bronchokonstrikci u průduškového astmatu však neovlivňují. Nepříjemným nežádoucím účinkem některých látek bývá jejich silný sedativní účinek (př. azatadin, bisulepin, klemastin, cyproheptadin, dimetinden, difenylhydramin, embramin, oxatomin, prometazin, difenylpyralin). V posledním desetiletí byly zavedeny látky, které mají jen malé sedativní účinky (akrivastin, astemizol, cetirizin, loratadin a terfenadin). Loratadin a



cetirizin se používají kromě různých alergických reakcí a u alergické rhinitidy také u atopického asthma bronchiale; bronchokonstrikci však neovlivňují. [19]

## 4.4 ANTITUSIKA

Antitusika jsou látky, které tlumí kašlací reflex. Podle toho, na jaké úrovni reflexního oblouku zasahují, se rozdělují na látky působící:

- centrálně
- periferně
- periferně i centrálně

Centrální antitusika tlumí kašlací reflex centrálním mechanismem – obvykle snižují dráždivost centra pro kašel. Patří sem hlavně antitusika morfiového typu: přirozené, popřípadě polysyntetické deriváty alkaloidů opia (kodein, etylmorfin, folkodin, oxykodon) a syntetické deriváty morfinu (dextrometorfan, levopropoxyfan). Většina látek z této skupiny vykazuje i slabý analgetický účinek. [20]

Periferní antitusika zabraňují vzniku kašlavého reflexu na periférii snížením citlivosti recepčních míst. Tímto mechanismem působí butamirát, benzonatát, dropropizin. Mezi antitusika působící obojím mechanismem, tedy centrálně i periferně, patří pentoxyverin a klobutinol. [20]

Podávání antitusik představuje pouze symptomatickou terapii, které by měla předcházet diagnóza onemocnění, jehož je kašel příznakem. Racionální použití těchto látek je omezeno pouze na suchý, dráždivý kašel, který pacienta vyčerpává, popřípadě ruší jeho spánek. Kodein je navíc součástí některých analgeticko-antipyretických směsí, v nichž potencuje analgetický účinek. [20]

Aplikace kodeinu a dalších morfiových derivátů může být spojena s útlumem dýchacího centra, se sníženou aktivitou bronchiálních žláz, se zvýšenou viskozitou hlenu, s výskytem zácpy a s rizikem vzniku závislosti. Výhodnější jsou z tohoto hlediska jednak folkodin, který se proto používá i v pediatrii, a jednak dextrometorfan a levopropoxyfen, které méně tlumí centrum dechu a nenavozují zácpu. Aplikace periferních antitusik vede většinou ke gastrointestinálním potížím (př. nechutenství, nauzea, zvracení). [20]

## 4.5 EXPEKTORANCIA

Expektorancia zlepšují vykašlávání, přičemž mechanismy působení jsou podkladem i pro farmakologické třídění:

- expektorancia, zkapalňující vazký sekret (mukolytika)
- expektorancia, stimuluje bronchiální sekreci řídkého hlenu (sekretolytika)
- expektorancia, usnadňující transport sekretu (sekretomotorika)

Mukolytika snižují viskozitu hlenu v dýchacích cestách zásahem do syntézy mukopolysacharidů v bronchiálním sekretu (bromhexin a jeho metabolit ambroxol podávané perorálně, intravenózně nebo inhalačně), štěpením disulfidických vazeb mukoproteinů hlenu (po inhalaci N-acetylcysteinu, mesny) nebo snížením povrchového napětí mezi sliznicí průdušek a sekretem (inhalace tyloxapolu). [20]

Sekretolytika zvyšují produkci řídkého bronchiálního sekretu buď přímo nebo reflektoricky. Přímě v bronších působí např. rostlinné silice (oleum eucalypti, oleum pini, oleum anisi), které jak po p.o. příjmu, tak po inhalaci dráždí bronchiální sliznici k sekreci. Kromě toho působí antisepticky a mírně bronchodilatačně. U salinických expektorancií (např. jodid draselný, bromoform, chlorid amonný) se předpokládá, že jsou po absorpci vylučovány žlázami v bronchiální sliznici a stimuluje je k větší produkci hlenu. Podobně působí i centrální myorelaxans guaifenezin. Emetin a saponiny aktivují bronchiální sekreci reflexně, tj. přes parasimpatikus drážděním žaludeční sliznice. Saponiny bývají obsaženy v některých rostlinách, např. flos primulae, herba thymi. Emetin je alkaloid kořene jihoamerické rostliny uragoga ipecacuanha (hlavěnka dávivá). Ve vyšších dávkách navozuje emetin nauzeu a zvracení. [20]

Mezi sekretomotorika patří např. oleum menthae piperitae a usnadňují evakuaci hlenu zvýšenou aktivitou řasinkového epitelu.

Expektorancia se používají zejména u těch nemocí dýchacích cest, které jsou spojeny s poruchami tvorby a evakuací sekretu. Nezanedbatelnou podmínkou expektorace je dostatečný přísun tekutin, zvláště bylinných čajů, ve kterých směs rostlinných drog může obsahovat i tzv. mucilaginoza, což jsou slizové látky vytvářející na sliznicích horních cest dýchacích ochrannou vrstvu a snižují tak jejich dráždění. [20]

V průběhu terapie bromhexinem, popřípadě jeho metabolitem ambroxolem se mohou vyskytovat gastrointestinální obtíže. Větší opatrnosti je třeba při podávání N-acetylcysteinu,

který může navodit až bronchokonstrikci. Bezpečnější je v tomto případě mesna, která tyto nežádoucí účinky nemá a je ještě asi pětikrát účinnější než N-acetylcystein. [20]

## 4.6 SURFAKTANTY

Jsou to látky, které ovlivňují povrchové napětí v alveolech. Jejich hlavní indikací je syndrom respirační tísně nebo syndrom hyalinních membrán u nedonošených novorozenců, kde není dostatečná funkce fosfolipidů a lipoproteidů, které by udržovaly přiměřené povrchové napětí. Používají se surfaktanty syntetické nebo izolované z telecích plic. Do této skupiny látek patří kolfoscerol, což je syntetický derivát lecitinu. Jeho hlavní indikací je syndrom respirační tísně. Dále fosfolipidy izolovány z telecích plic a používány k profylaxi a terapii syndromu respirační tísně. [19]

## 4.7 DECHOVÁ STIMULANCIA

Stimulancia dechového centra patří mezi látky dříve označované jako centrální analeptika. U závažných stavů (jako intoxikace hypnotiky) je používání této skupiny látek opuštěno pro pozdní nežádoucí účinky (vyčerpání životně důležitých center). V terapii zůstaly jen doxapramin a event. kofein. Používají se při terapii respirační insuficience u nemocných s chronickou obstrukční chorobou bronchopulmonální. U těžkých stavů je vždy nutná řízená ventilace. [19]

## 4.8 TERAPEUTICKÉ PLYNY

Terapeutické plyny představují důležité terapeutické prostředky, které využívají jak anesteziologové, tak ostatní odborníci ke zvládnutí různých stavů hypoxie. Kromě kyslíku se používají oxid uhličitý, helium a v poslední době i oxid dusnatý. [19]

Kyslík je prvek nepostradatelný pro život. Používá se při léčbě některých chorob dýchacího systému, které se vyznačují hypoxií. Při nadměrných koncentracích však vede k závažným intoxikacím. K udržení konstantní ventilace plic se ke kyslíku přidává kolem 10% oxidu uhličitého. Aby se zabránilo vdechování nadměrných koncentrací kyslíku, lze také použít tento plyn ve směsi s některým inertním plynem, jako je např. helium. Terapeuticky se směsi kyslíku aplikují maskami nebo nosním katetrem. Směsi kyslíku se používají k úpravě

hypoxie. Dále se kyslík používá jako nosič při podávání celkových anestetik. Dlouhodobé podávání koncentrovaného kyslíku může mít řadu nežádoucích účinků. Dochází k poškození plic. Při tlaku nad 200 kPa dochází i k poškození CNS, ke křečím a svalovým záškubům. [19]

Oxid uhličitý ( $\text{CO}_2$ ) stimuluje dýchání, jestliže je podán ve vdechované směsi do 10%. Nad tuto koncentraci má narkotické účinky a dýchání tlumí. Podáváme ho tam, kde chceme zvýšit ventilaci, ale není vhodný při hyperkapnii. [19]

Oxid dusnatý (NO) je znám jako difuzibilní buněčný messenger, který má vazodilatační účinky a funkci jako CNS neurotransmitter. Terapeutický význam tohoto plynu spočívá v jeho vazodilatačním působení a jeho velkou výhodou je nesmírně krátký biologický poločas. Ve velmi malých koncentracích je vdechován ke zvýšení plicní vazodilatace a k navození bronchodilatace. Lze ho použít u syndromu z respirační insuficience. [19]

## **5. IN VIVO metodiky k hodnocení účinků bronchoprotektivních látek**

### **5.1 METODIKA MODELU ALERGICKÉHO ASTMATU**

Jednou z často používaných metod k hodnocení účinku potenciálních antiastmatik je metoda navození modelu alergického astmatu.

Navození modelu alergického astmatu u zvířat se provádí metodou podle Elwooda, která vyvolává zvýšení protilátek proti IgE. [21] Tento model byl popsán u různých druhů zvířat (potkan, morče, myš) a používán k výzkumu např. bronchoprotektivních látek, antioxidantů, antiastmatik. Indukované změny plicních funkcí byly popsány v literatuře.

[22, 23, 24, 25]

Potkani se senzibilizují ovalbuminem, a to opakovaně, ve třech po sobě následujících dnech. Za 21 dní po senzibilizaci se provádí antigen challenge inhalací aerosolu antigenu. Bronchiální hyperreaktivita na 5-HT u potkanů s navozeným astmatem je sledována za 24 hodin po antigen challenge. [21]

Hodnocení účinku bronchoprotektivních látek, které se podávají opakovaně senzibilizovaným potkanům, probíhá na základě hodnocení parametrů plicních funkcí (plicní rezistence, compliance). [21]

## 6. IN VITRO metodiky k hodnocení účinků bronchoprotektivních látek

### 6.1 METODIKA IZOLOVANÉ PRŮDUŠNICE

Mezi in vitro metody, které se používají za účelem hodnocení účinků bronchoprotektivních látek, se řadí mimo jiné i často užívaná metoda izolované průdušnice.

Základem je klasická in vitro metodika podle Castillo a de Beera poprvé uvedená v roce 1947, která se ovšem s určitými modifikacemi používá dodnes. [26]

**Princip:** Trachea je složena z podkovovitých chrupavek, které jsou na dorsální straně spojeny svazkem hladkého svalstva. Svalstvo je uspořádané cirkulárně (obr. 13). Hladká svalovina průdušnice reaguje pomalými kontrakcemi na acetylcholin, histamin a 5-hydroxytryptamin. K pokusům se používá zpravidla trachea z morčete, která má zvýšenou citlivost vůči těmto látkám. [26]

#### Způsoby přípravy preparátů izolované průdušnice

- 1) *Řetězec prstenců průdušnice:* Příprava spočívá v tom, že průdušnice se rozdělí příčnými řezy mezi segmenty chrupavky na několik prstenců, které se tenkým vláknem navzájem spojí na způsob řetězu tak, aby svalová vrstva byla u jednotlivých segmentů střídavě vlevo a vpravo (obr. 13, 14). Ke zhotovení preparátu lze použít i pouze jeden tracheální prstenec, a to obvykle většího zvířete (ovce, prase).

- 2) *Spirálový preparát*: Připravuje se roztržením průdušnice spirálovitě ve směru chrupavčitých prstenců (obr. 15)
- 3) *„Cik-cak“ preparát*: Tento preparát se získá nastřížením „cik-cak“ mezi segmenty chrupavky tak, aby svalovina byla co nejbližší u sebe. (obr. 16)

Všechny tři preparáty získané výše uvedenými způsoby se zavěsí do nádoby se živným roztokem a registrují se izotonicky změny v jeho délce. (obr. 18)

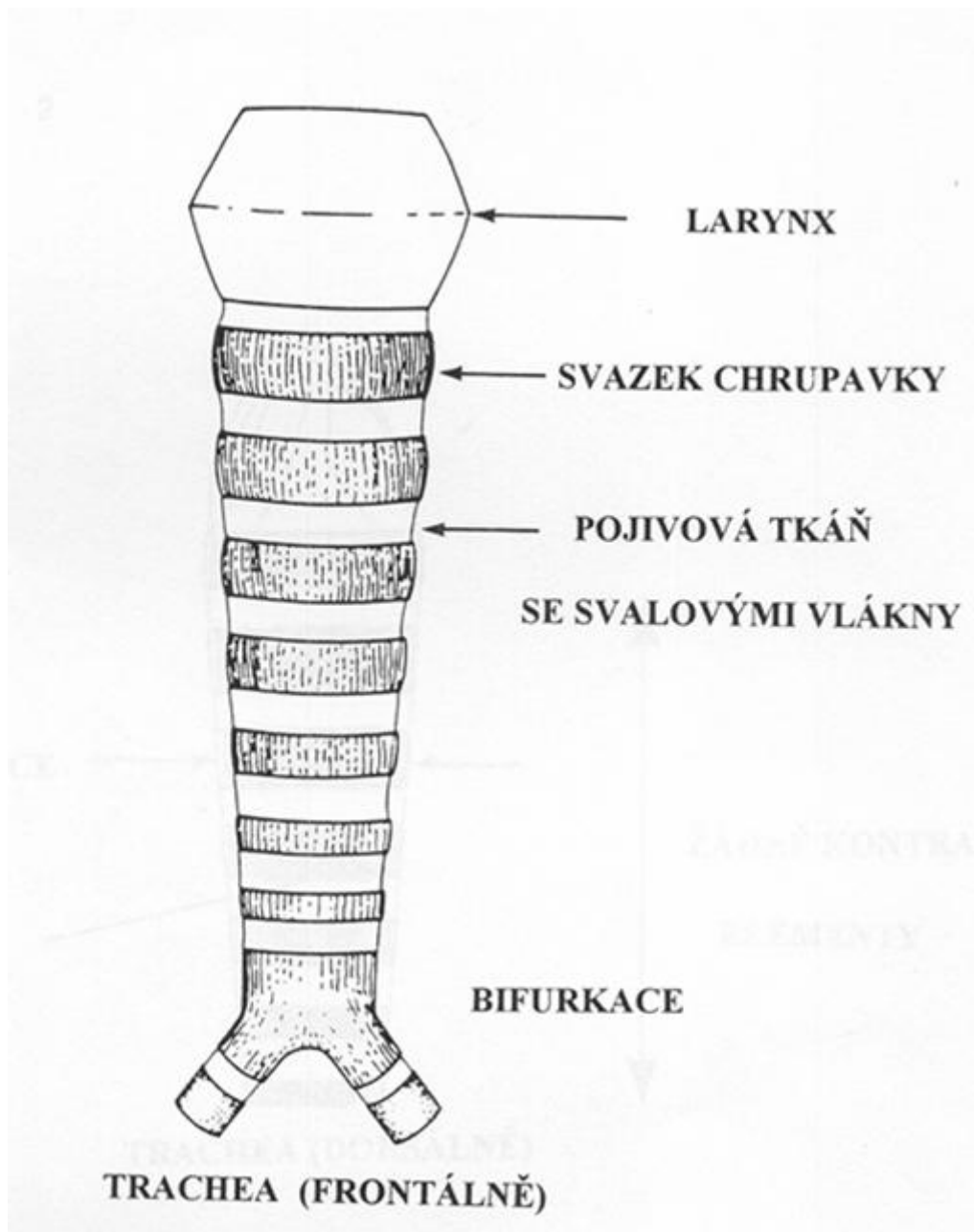
- 4) *Celá izolovaná trachea*: průdušnice je dolním a horním koncem pevně fixována na skleněné kanyly, spojené s reservoírem živného roztoku. Trachea je tímto živným roztokem naplněna a při její kontrakci se v uzavřeném systému zvýší tlak, jehož změny se elektronicky registrují. Kontrakce mohou být vyvolány elektrickými impulsy platinovou elektrodou umístěnou buď vně nebo uvnitř průdušnice. [27, 28, 29, 30, 31, 32]

#### **Příprava „cik-cak“ preparátu izolované průdušnice morčete**

Morče se uvede do celkové anestézie 20% roztokem uretanu. Po fixaci na operační stůl se odstříhne v krční oblasti řasa kůže a tupou preparací svalů se obnaží a uvolní trachea. Průdušnice se středem vertikálně rozstříhne a v délce 3 centimetrů se vyřízne. Poté se ihned přenesse do připravené Petriho misky se živným roztokem, kde se rozprostře do plochy a fixuje se jehlami k podložce tak, aby hladká svalovina byla ve středu. Po obou stranách se odstříhnou proužky přebytečné chrupavky. Průdušnice se nastříhá mezi jednotlivými segmenty chrupavky, a to střídavě z pravé nebo z levé strany, až na konec svaloviny. Na oba konce svaloviny se připevní ligatury.

**Použití:** Preparáty izolované průdušnice nacházejí uplatnění při experimentech sledujících toxický účinek chemických látek znečišťujících ovzduší, a to při jejich jednorázové nebo opakované expozici jak na izolovanou tracheu, tak na celé experimentální zvíře, jehož průdušnici lze požit ke sledování reaktivity na bronchokonstrikční účinek agonisty. Z testovaných látek můžeme použít např. acetylcholin v celkové koncentraci  $10^{-3}$ - $10^{-7}$ , histamin v celkové koncentraci 0,16 mmol/l, 5-hydroxytryptamin v celkové koncentraci 0,1 mmol/l.

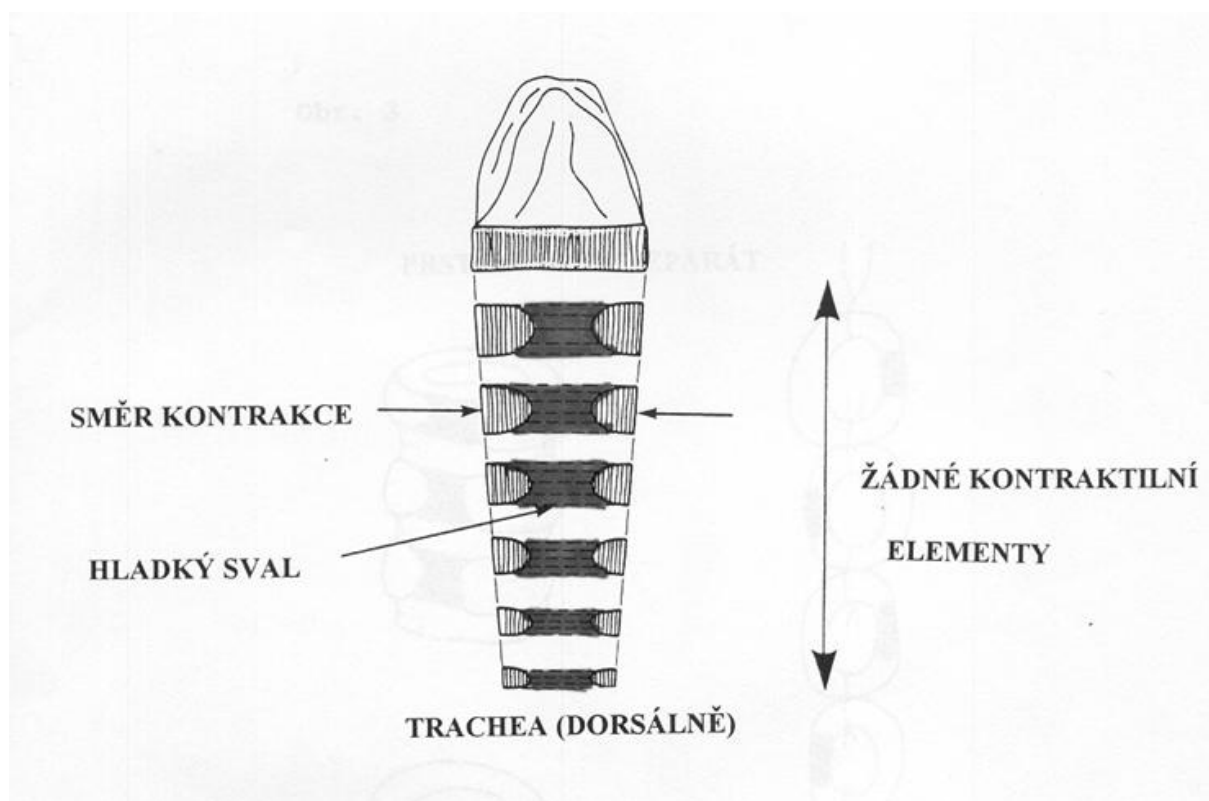
[27, 28, 29, 30, 31, 32]



**Obr. č. 13**

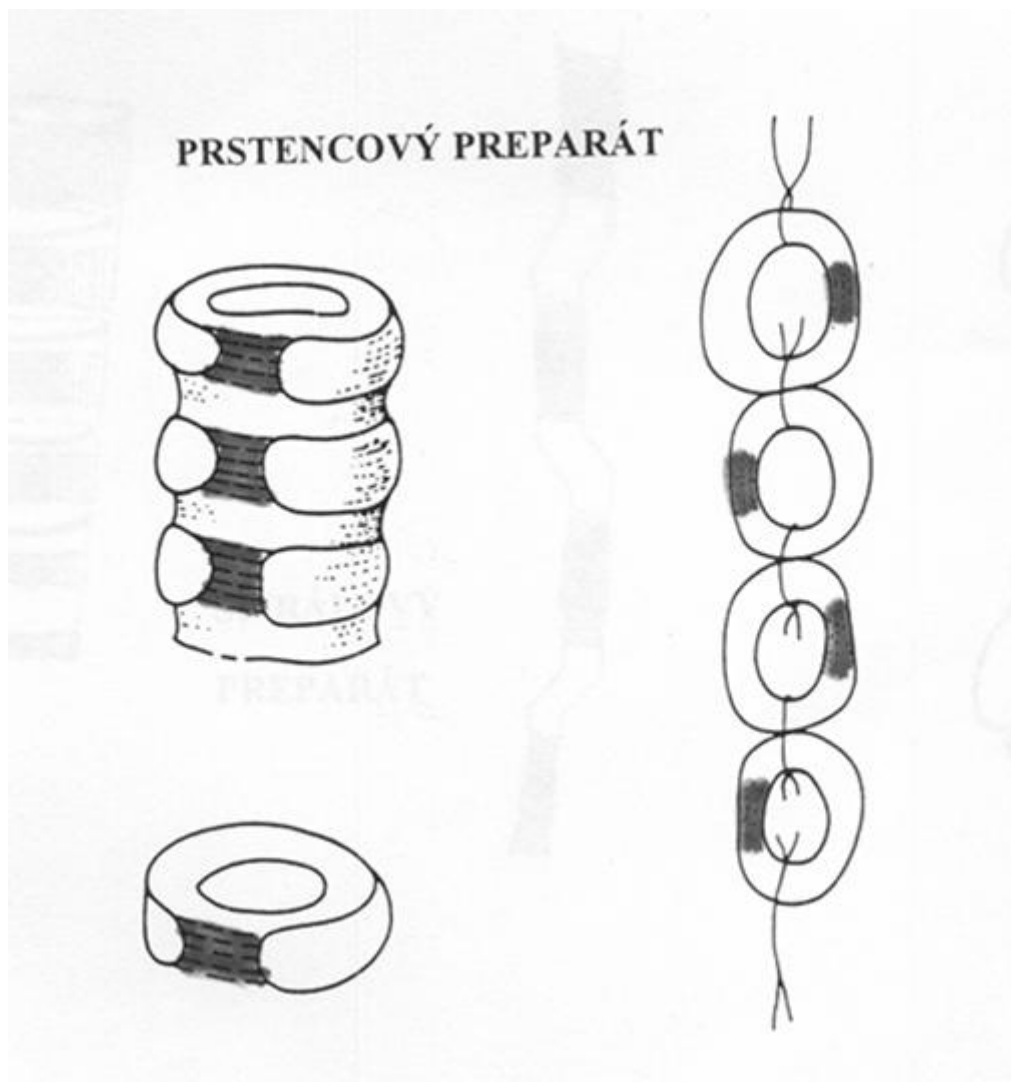
Převzato z: Závěrečná zpráva grantu FRVŠ, 1996 (Modernizace a ekonomizace výuky toxikologie 0322/7),  
Vopršalová M., Žáčková P.





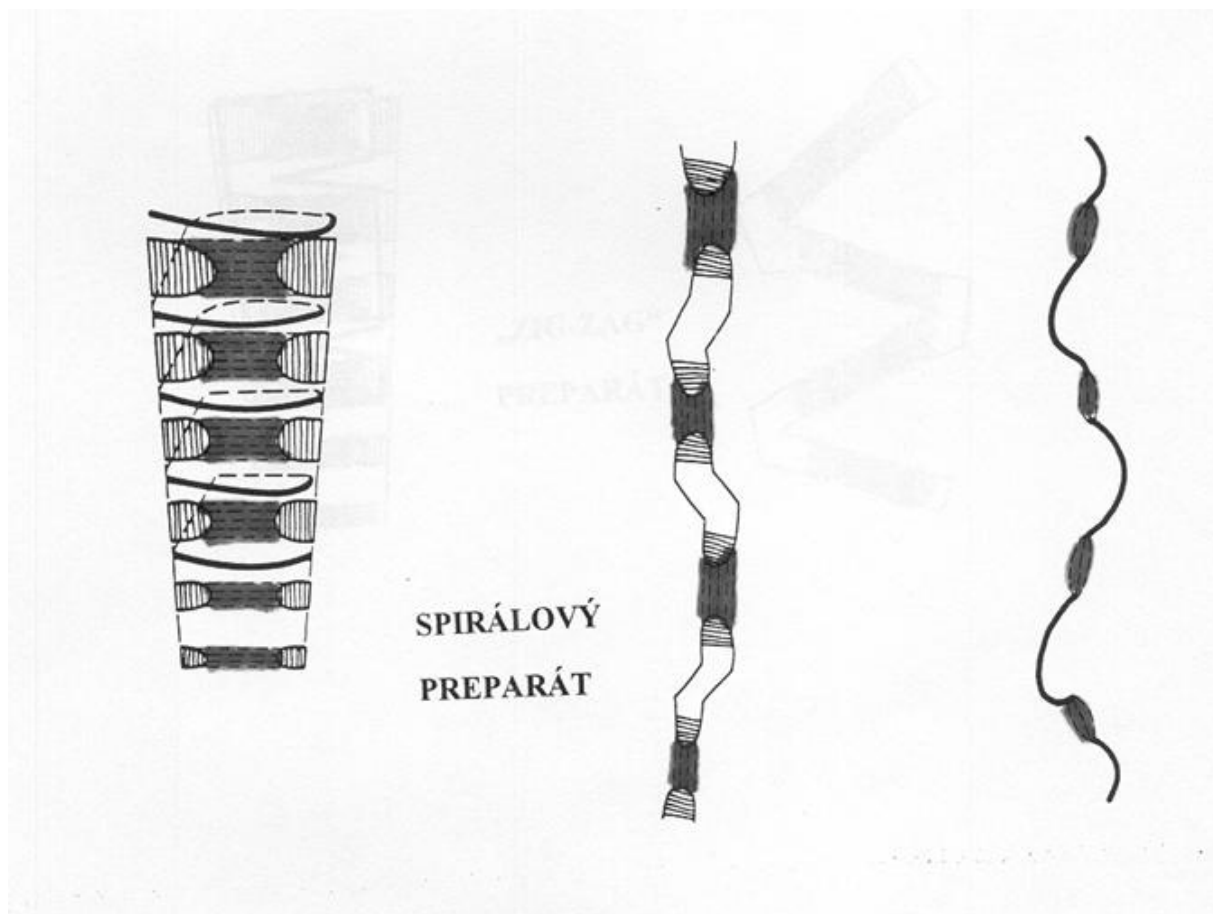
**Obr.č. 14**

Převzato z: Závěrečná zpráva grantu FRVŠ, 1996 (Modernizace a ekonomizace výuky toxikologie 0322/7),  
*Vopršalová M., Žáčková P.*



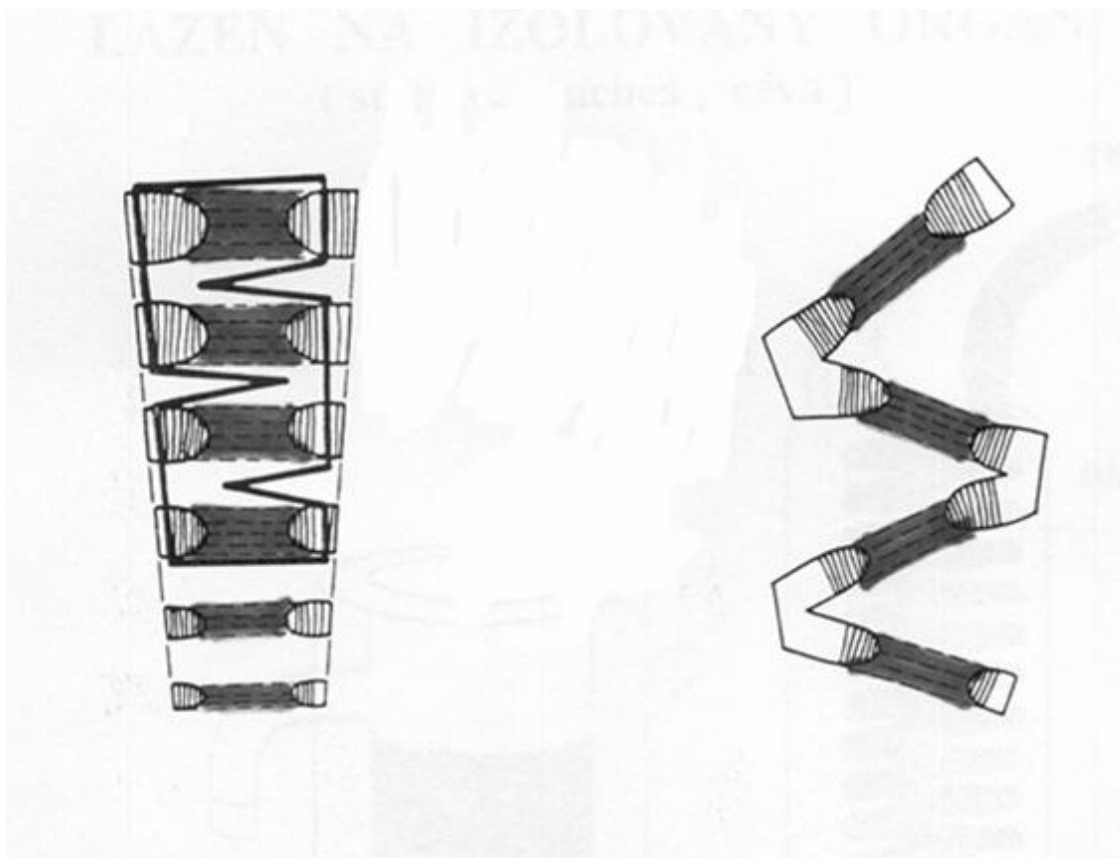
**Obr. č. 15**

Převzato z: Závěrečná zpráva grantu FRVŠ, 1996 (Modernizace a ekonomizace výuky toxikologie 0322/7),  
Vopršalová M., Žáčková P.



**Obr. č. 16**

Převzato z: Závěrečná zpráva grantu FRVŠ, 1996 (Modernizace a ekonomizace výuky toxikologie 0322/7),  
*Vopršalová M., Žáčková P.*



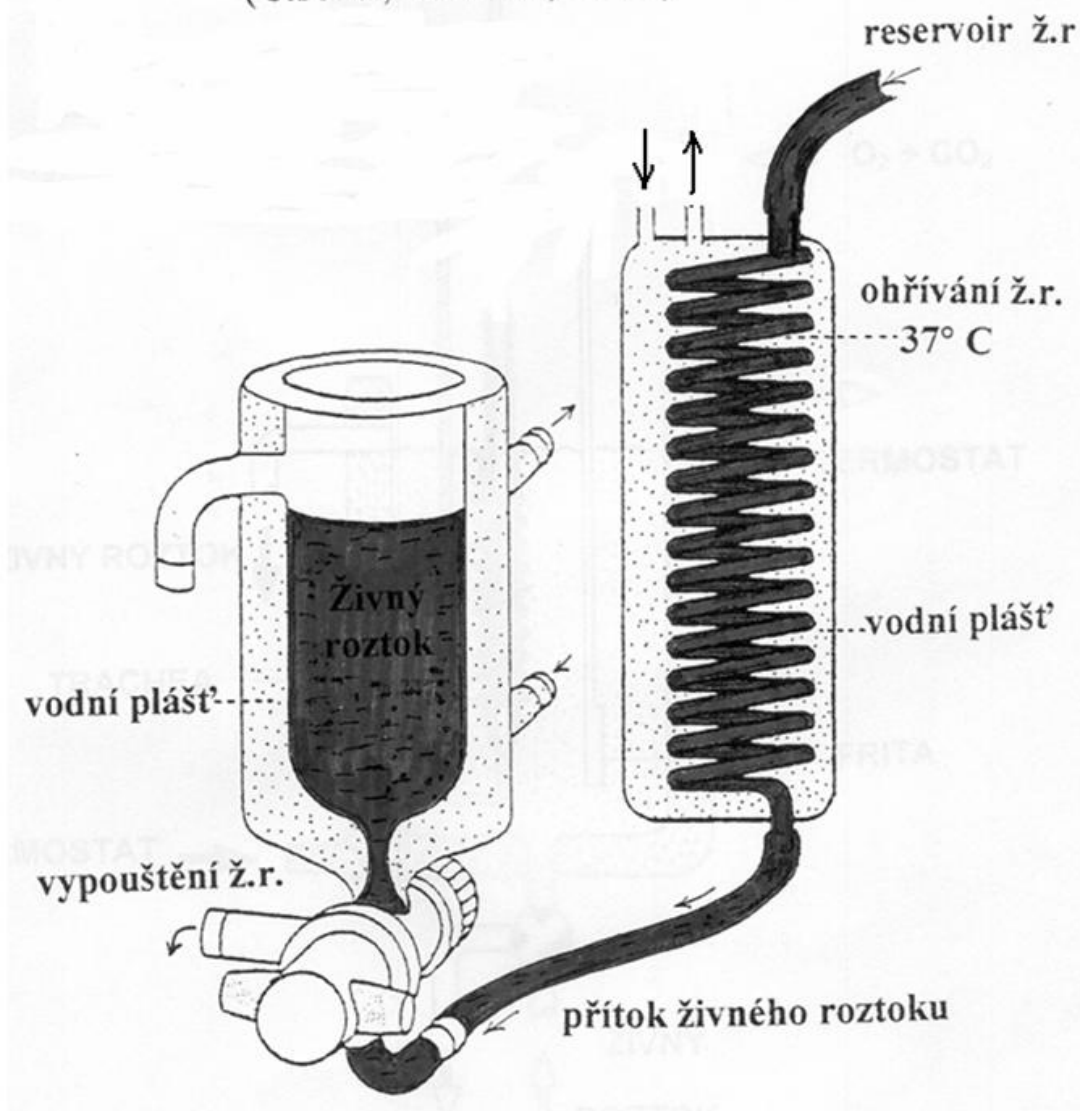
„CIK-CAK“ PREPARÁT

**Obr. č. 17**

Převzato z: Závěrečná zpráva grantu FRVŠ, 1996 (Modernizace a ekonomizace výuky toxikologie 0322/7),  
*Vopršalová M., Žáčková P.*

# LÁZEŇ NA IZOLOVANÝ ORGÁN

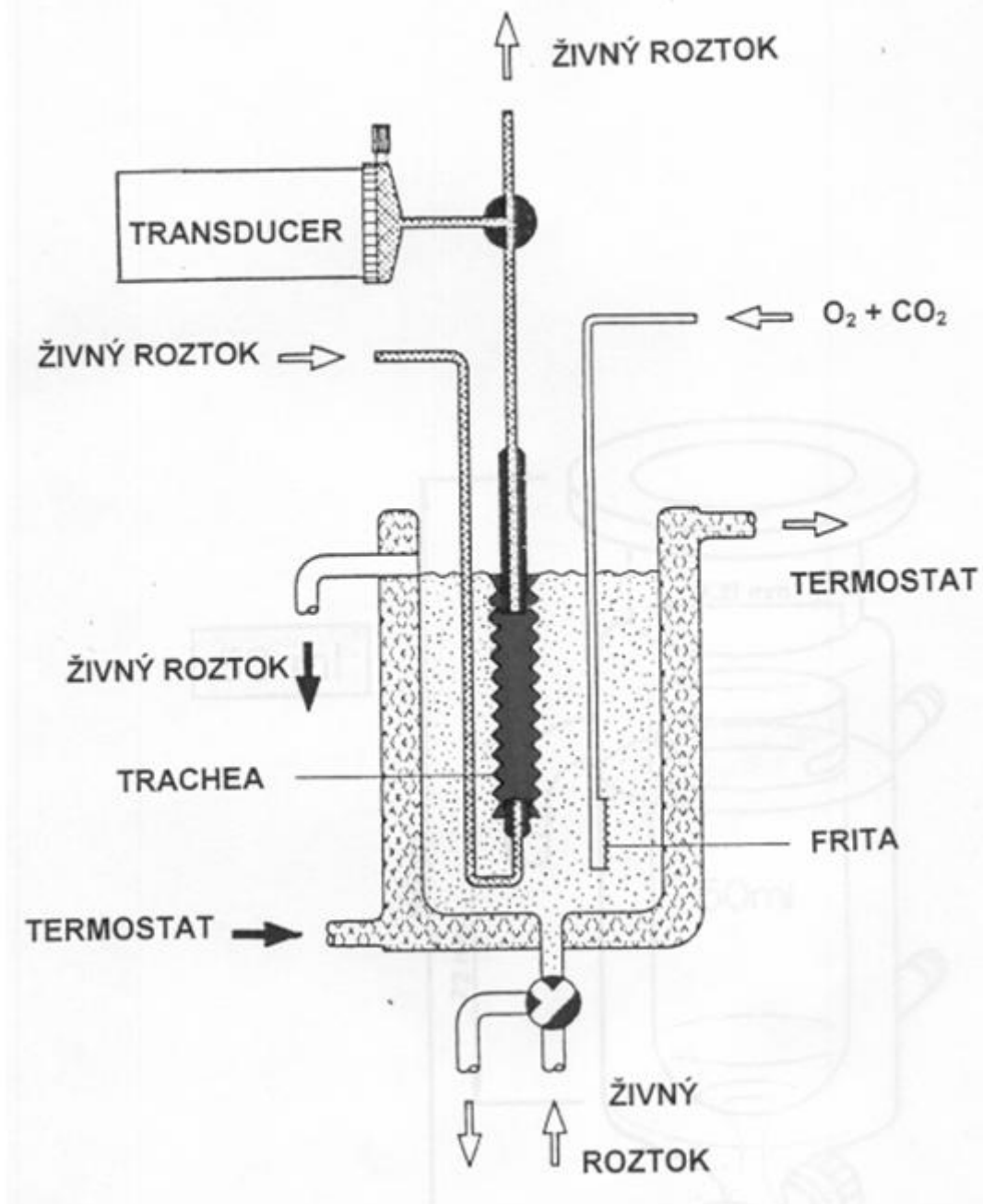
( střevo , trachea , céva )



Obr. č. 18

Převzato z: Závěrečná zpráva grantu FRVŠ, 1996 (Modernizace a ekonomizace výuky toxikologie 0322/7),  
Vopršalová M., Žáčková P.

## CELÁ IZOLOVANÁ TRACHEA



Obr. č. 19

Převzato z: Závěrečná zpráva grantu FRVŠ, 1996 (Modernizace a ekonomizace výuky toxikologie 0322/7),  
Vopršalová M., Žáčková P.

### **III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

# 1. METODIKA

## 1.1 ZVÍŘATA A POUŽITÝ MATERIÁL

### ❖ Zvířata

K experimentům byli použiti samci potkanů kmene Wistar (dodavatel BioTest s.r.o., Kolárovice, ČR) o průměrné hmotnosti 320g. Zvířata byla chována v prostorách vivária Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Zvířata byla umístěna v prostorách určených pro otevřený chov se zajištěním ventilace vzduchu a teplotou v rozmezí 21 °C, s volným přístupem ke standardní peletizované stravě a pitné vodě. K pokusům byla zvířata vždy použita až po uplynutí týdenní aklimatizace. Čtyřicet hodin před experimentem byla zvířata ponechána nalačno.

Pokus byl prováděn v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. O ochraně zvířat proti týrání a se souhlasem Etické komise Farmaceutické fakulty v Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

### ❖ Chemikálie

Byly použity následující chemikálie:

- **K přípravě živného roztoku (viz tab. č. 1.):** dihydrogenfosforečnan draselný p. a. (firma KULICH, Hradec Králové, Česká Republika), D-(+)-glukóza monohydrát p. a., heptahydrát síranu hořečnatého, chlorid draselný p. a., chlorid vápenatý p. a., bezvodý práškový (firma LACHEMA, Brno, Česká republika), hydrogenuhličitan sodný p. a. (firma PENTA, Chrudim, Česká republika)



- **K navození kontrakce průdušnice:** Carbamoylcholine chlorid 99% ( firma SIGMA-ALDRICH, Německo).
- **K navození relaxace průdušnice:** theophyllin ( firma SIGMA-ALDRICH, Německo).

#### ❖ Pomůcky

Jehla, laboratorní sklo (kádinky, Petriho misky ), ligatury, nůžky, pinzety, pipety, plynová bomba s pneumoxidem.

#### ❖ Přístroje

Aparatura na izolované orgány (Multi chamber tissue bath system, Experimetria Ltd., Budapešť, Maďarsko) s vyhodnocovacím softwarem (S.P.E.L. Advanced kymograph Software, Experimetria Ltd., Budapešť, Maďarsko)

Laboratorní váhy Kern

## 1.2 METODIKA IZOLOVANÉ PRŮDUŠNICE

Laboratorní zvíře jsme omráčili a usmrtili vykrvácením z *a. carotis*. Zafixovali jsme ho na operační stůl, v krční oblasti jsme odstříhli řasu kůže a tupou preparací jsme obnažili a uvolnili tracheu. Přenesli jsme ji do Petriho misky se živným roztokem (Krebs-Henseleitův, pH 7,8 – viz. tab. 1). Odstranili jsme přebytečnou tkáň a tracheu jsme středem podkovovitých chrupavek vertikálně rozstříhli a rozdělili na čtyři stejné části. Tracheu jsme rozprostřeli tak, aby hladká svalovina byla uprostřed, a na protilehlé konce jsme připevnili ligatury. Preparát jsme přenesli do nádobek na izolovaný orgán. Nádobky byly naplněny živným roztokem o objemu 5 ml vyhřívaným na 37°C a okysličovaným pneumoxidem (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>).

Preparát jsme fixovali ligaturou jedním koncem k fritě zásobující živný roztok pneumoxidem a druhý jsme zavěsili na háček aparatury.

Aparaturu jsme již dříve kalibrovali pomocí výše uvedeného software. Preparát jsme zatížili na 2g a nechali 30 min stabilizovat, přičemž každých 10 min jsme prováděli výměnu živného roztoku. Po uplynutí intervalu jsme snížili zatížení na 1g a počkali jsme, dokud se křivka záznamu nestabilizuje ve fázi plató. Poté byl preparát připraven k testování.

Do lázně naplněné živným roztokem (5 ml živného roztoku) jsme přidali karbachol o koncentraci  $10^{-5}$  M (10 $\mu$ l), čímž jsme navodili kontrakci trachey. Po dosažení maximální kontrakce jsme provedli výplach a ponechali tracheu 10 min relaxovat. Další dávkou karbacholu ( $10^{-5}$  M) jsme tracheu opět kontrahovali a pak jsme přidali kumulativní dávky vodného roztoku testované látky (teofylinu) ve vzrůstající koncentraci. Další dávku testované látky jsme přidali vždy po stabilizované odpovědi hladkého svalstva průdušnice na předcházející kontrakci. Relaxaci navozenou jednotlivými dávkami theofylinu jsme srovnávali s maximální relaxací navozenou teofylinem v koncentraci  $10^{-2}$  M podaným na konci experimentu. Použili jsme následující koncentrace teofylinu ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $7.5 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $7.5 \times 10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  M). Relaxační účinek každé jednotlivé koncentrace jsme vyjádřili jako procentuální změnu v poměru k maximální relaxaci.

Získané hodnoty jsme zpracovali v programu GraphPad Prism 5. Na osu X jsme nanesli log koncentrace testované látky, na osu Y procentuální relaxaci tkáně. Metodou nelineární regrese jsme získali DRC křivku a odečtenou hodnotu ED<sub>50</sub> (dávka vyvolávající polovinu maximální odpovědi). Z těchto údajů jsme vypočítali aritmetický průměr ED<sub>50</sub> a směrodatnou odchylku pro testovanou látku.

## Příprava Krebs-Henseleitova roztoku

Navážené substance (kromě  $\text{CaCl}_2$ ) jsme důkladně rozpustili v 1 l destilované vody. Chlorid vápenatý jsme rozpustili zvlášť v 500 ml destilované vody a pomalu jsme ho přiléváli tak, abychom zabránili vysrážení slabě rozpustných vápenatých solí.

<b>substance</b>	<b>1 l</b>	<b>1,5 l</b>
NaCl	6,8	10,2
KCl	0,35	0,52
NaHCO <sub>3</sub>	2,1	3,15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,14	0,21
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,29	0,43
Glukóza	2	3
CaCl <sub>2</sub>	0,28	0,42

Tabulka. č. 1: Složení Krebs-Henseleitova roztoku (g/l)

## **2. VÝSLEDKY**

trachea - preparát č. 4						trachea – preparát č. 4					
		(g)	1	3	4			(%)	1	3	4
		BASAL		0,99	1,06		1,09				
TEOFYLIN	CCh		2,39	2,36	1,72	TEOFYLIN					
	10-7M	0,0000001	2,39	2,36	1,72		10-7M	0,0000001	0,00	0,00	0,00
	10-6M	0,000001	2,38	2,36	1,71		10-6M	0,000001	0,72	0,00	1,30
	10-5M	0,00001	2,36	2,35	1,71		10-5M	0,00001	2,16	0,79	1,30
	10-4M	0,0001	2,35	2,35	1,71		10-4M	0,0001	2,88	0,79	1,30
	5*10-4M	0,0005	2,24	2,31	1,69		5*10-4M	0,0005	10,79	3,97	3,90
	7,5*10-4M	0,00075	2,18	2,28	1,66		7,5*10-4M	0,00075	15,11	6,35	7,79
	10-3M	0,001	2,13	2,24	1,64		10-3M	0,001	18,71	9,52	10,39
	5*10-3M	0,005	1,31	1,36	1,27		5*10-3M	0,005	77,70	79,37	58,44
	7,5*10-3M	0,0075	1,12	1,2	1,13		7,5*10-3M	0,0075	91,37	92,06	76,62
	10-2M	0,01	1	1,1	0,95		10-2M	0,01	100,00	100,00	100,00

Tabulka č. 2: Relaxace izolované průdušnice teofylinem, potkan č. 1

trachea – preparát č. 3							trachea – preparát č. 3						
TEOFYLIN		(g)	1	2	3	4	TEOFYLIN		(%)	1	2	3	4
		BASAL		1,00	1,00	1,12		1,04					
	CCh		1,64	2,01	2,49	2,42							
	10-7M	0,0000001	1,64	2	2,48	2,42		10-7M	0,0000001	0,00	0,90	0,58	0,00
	10-6M	0,0000001	1,64	2	2,46	2,41		10-6M	0,0000001	0,00	0,90	1,73	0,65
	10-5M	0,000001	1,64	2	2,46	2,41		10-5M	0,000001	0,00	0,90	1,73	0,65
	10-4M	0,00001	1,64	1,98	2,43	2,4		10-4M	0,00001	0,00	2,70	3,47	1,29
	5*10-4M	0,00005	1,63	1,94	2,33	2,32		5*10-4M	0,00005	1,32	6,31	9,25	6,45
	7,5*10-4M	0,000075	1,58	1,88	2,26	2,2		7,5*10-4M	0,000075	7,89	11,71	13,29	14,19
	10-3M	0,001	1,55	1,86	2,22	2,16		10-3M	0,001	11,84	13,51	15,61	16,77
	5*10-3M	0,005	1,08	1,22	1,13	1,3		5*10-3M	0,005	73,68	71,17	78,61	72,26
	7,5*10-3M	0,0075	0,96	1,05	0,94	1,09		7,5*10-3M	0,0075	89,47	86,49	89,60	85,81
	10-2M	0,01	0,88	0,9	0,76	0,87		10-2M	0,01	100,00	100,00	100,00	100,00

Tabulka č. 3: Relaxace izolované průdušnice teofylinem, potkan č. 2

trachea – preparát č. 2						trachea – preparát č. 2					
TEOFYLIN		(g)	2	3	4	TEOFYLIN		(%)	2	3	4
		BASAL		1,12	1,00		1,29				
	CCh		2,53	2,02	2,1						
	10-7M	0,0000001	2,53	2,02	2,1	10-7M	0,0000001	0,00	0,00	0,00	
	10-6M	0,000001	2,52	2,02	2,09	10-6M	0,000001	0,65	0,00	0,78	
	10-5M	0,00001	2,52	2,02	2,09	10-5M	0,00001	0,65	0,00	0,78	
	10-4M	0,0001	2,50	2,01	2,07	10-4M	0,0001	1,95	0,80	2,33	
	5*10-4M	0,0005	2,33	1,95	2,01	5*10-4M	0,0005	12,99	5,60	6,98	
	7,5*10-4M	0,00075	2,16	1,87	1,94	7,5*10-4M	0,00075	24,03	12,00	12,40	
	10-3M	0,001	1,46	1,32	1,45	10-3M	0,001	69,48	56,00	50,39	
	5*10-3M	0,005				5*10-3M	0,005				
	7,5*10-3M	0,0075				7,5*10-3M	0,0075				
	10-2M	0,01	0,99	0,77	0,81	10-2M	0,01	100,00	100,00	100,00	

Tabulka č. 4: Relaxace izolované průdušnice teofylinem, potkan č. 3

trachea – preparát č. 5						trachea – preparát č. 5					
TEOFYLIN		(g)	2	3	4	TEOFYLIN		(%)	2	3	4
		<b>BASAL</b>		0,54	1,1		1,02				
	<b>CCh</b>		1,42	2,03	2,08						
	<b>10-7M</b>	<b>0,0000001</b>	1,41	2,02	2,08		<b>10-7M</b>	<b>0,0000001</b>	1,30	1,00	0,00
	<b>10-6M</b>	<b>0,0000001</b>	1,41	2,02	2,08		<b>10-6M</b>	<b>0,0000001</b>	1,30	1,00	0,00
	<b>10-5M</b>	<b>0,000001</b>	1,4	2,02	2,08		<b>10-5M</b>	<b>0,000001</b>	2,60	1,00	0,00
	<b>10-4M</b>	<b>0,00001</b>	1,38	2,01	2,06		<b>10-4M</b>	<b>0,00001</b>	5,19	2,00	1,82
	<b>5*10-4M</b>	<b>0,00005</b>	1,35	1,96	1,98		<b>5*10-4M</b>	<b>0,00005</b>	9,09	7,00	9,09
	<b>7,5*10-4M</b>	<b>0,000075</b>	1,33	1,93	1,94		<b>7,5*10-4M</b>	<b>0,000075</b>	11,69	10,00	12,73
	<b>10-3M</b>	<b>0,0001</b>	1,31	1,92	1,91		<b>10-3M</b>	<b>0,0001</b>	14,29	11,00	15,45
	<b>5*10-3M</b>	<b>0,0005</b>	0,87	1,28	1,17		<b>5*10-3M</b>	<b>0,0005</b>	71,43	75,00	82,73
	<b>7,5*10-3M</b>	<b>0,00075</b>	0,75	1,1	1,04		<b>7,5*10-3M</b>	<b>0,00075</b>	87,01	93,00	94,55
	<b>10-2M</b>	<b>0,01</b>	0,65	1,03	0,98		<b>10-2M</b>	<b>0,01</b>	100,00	100,00	100,00

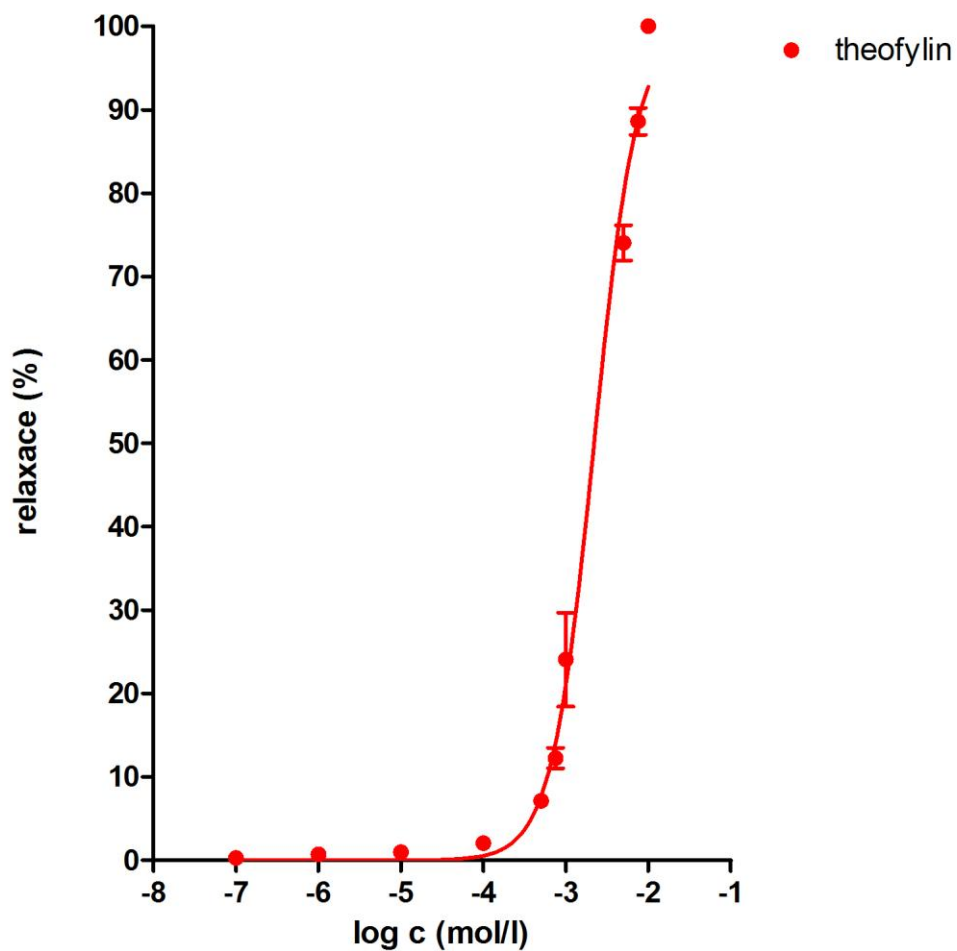
Tabulka č. 5: Relaxace izolované průdušnice teofylinem, potkan č. 4



		<b>PRŮMĚR</b>	<b>sem (ds.est/n)</b>	<b>n</b>
<b>TEOFYLIN</b>	<b>10-7M</b>	0,29	0,13	13
	<b>10-6M</b>	0,69	0,16	13
	<b>10-5M</b>	0,97	0,22	13
	<b>10-4M</b>	2,04	0,37	13
	<b>5*10-4M</b>	7,13	0,87	13
	<b>7,5*10-4M</b>	12,25	1,22	13
	<b>10-3M</b>	24,07	5,62	13
	<b>5*10-3M</b>	74,04	2,11	10
	<b>7,5*10-3M</b>	88,60	1,61	10
	<b>10-2M</b>	100,00	0,00	13

Tabulka č. 6: aritmetický průměr procentuální relaxace trachey všech vzorků se směrodatnou odchylkou

### Relaxace průdušnice po podání teofylinu



graf č. 1: relaxace průdušnice po podání teofylinu

Hodnotu  $ED_{50}$  lze odečíst a vypočítat přímo z grafu  $\rightarrow ED_{50} = 0,002480 = 2,5 \times 10^{-3} M$   
nebo ji lze vypočítat přesněji se směrodatnou odchylkou (program GraphPad Prism)  
 $\rightarrow ED_{50} = 2477 \mu mol \pm 66 \mu mol$ .

## **IV. DISKUZE**

Teofylin je bronchodilatační látka dlouhodobě používaná jako antiastmatikum. Poprvé byl extrahován z čajových lístků okolo roku 1888 německým biologem Albrechtem Kosselem a chemicky byl identifikován v roce 1896. První klinické použití teofylinu při léčbě astmatu bylo zaznamenáno v 50. letech 20. století. [35]

Teofyliny s prodlouženým účinkem a aminofylin mohou být použity jako preventivní antiastmatika. Klinické studie ukazují, že dlouhodobá léčba teofyliny s prodlouženým účinkem je účinná v kontrole příznaků astmatu a zlepšení plicní funkce. Jsou-li podány teofyliny s prodlouženým účinkem, dojde k odstranění nočních příznaků astmatu, které přetrvávaly i přes pravidelnou protizánětlivou léčbu. Teofyliny jsou též používány jako aditivní bronchodilatancia u pacientů s těžkým astmatem. Experimenty na zvířatech poukázaly na teratogenní rizika. Nemáme k dispozici žádné studie o teratogenitě u lidí, pouze studie u zvířat. Ty ukázaly, že teofylin v dávkách několikanásobně převyšujících terapeutické dávky může způsobit vrozené vady. I když u lidí dosud nejsou známy žádné teratogenní účinky, nesmí se teofylin podávat v prvním trimestru těhotenství. [37]

Teofylin se používá experimentálně v řadě studií jako standard pro porovnávání účinků potenciálních antiastmatik (např. obsahových látek z *Adhatoda vasica*). Rovněž byl zjišťován bronchodilatační účinek syntetických derivátů theofylinu - 1-methyl-3-propylxanthinu a 1-butyl-3-methylxanthinu. Studie byla provedena na izolované průdušnici morčat a jako porovnávací látka byl použit teofylin. Při této studii byl prokázán výrazně lepší dilatační účinek na hladkou svalovinu trachey syntetických derivátů než teofylinu. [36]

Místo teofylinu se někdy používá jako bronchodilatační standard aminofylin, což je směs theofylinu a ethylendiaminu.

Jako další standard v experimentech s izolovanou tracheou by mohl být použit salbutamol. Ten má jako agonista adrenergických  $\beta_2$  receptorů bronchodilatační účinky a používá se jako krátkodobě působící inhalační antiastmatikum a také v perorální formě jako profylaktikum pozátěžové bronchokonstrikce a ke zvládnutí nočních příznaků astmatu. Jeho nejčastější indikací je zvládnutí náhlých záchvatů dušnosti. Může být také přidán k inhalačním kortikosteroidům, jejichž standardní dávka není schopna plně eliminovat noční příznaky. Inhalační salbutamol je i v těhotenství bezpečný a pro dlouholetou zkušenost s užíváním je považován za lék první volby. V perorální formě je ale v těhotenství kontraindikován. [37]

Salbutamol a jeho účinek na izolovanou tracheu byl zkoumán ve studii, v níž byl srovnán účinek na tracheu čerstvě narozených morčat s hyperoxií a bez hyperoxie. Hyperoxie obecně zvyšuje kontraktilitu dýchacích cest. Salbutamol podle této studie relaxuje více hladkou

svalovinu trachey morčat s hyperoxií než bez hyperoxie a to ve srovnání s maximální relaxací teofylinu. [38]

Ve většině studií zaměřených na bronchodilatacia je používán teofylin jako základní látka vyvolávající maximální dilataci. Proto úkolem mé práce bylo právě měření jeho bronchodilatačního účinku v závislosti na koncentraci. Získaná hodnota  $ED_{50}$  bude využita k porovnání účinku nových potenciálních bronchodilatancií, jejichž vývoj je, vzhledem k neustálé se zvyšujícímu výskytu zánětlivých onemocnění dýchacích cest, nezbytný.

## **V. ZÁVĚR**

1. Na modelu izolované průdušnice jsme získali data pro vytvoření DRC křivky teofylinu.
2. Zjistili jsme hodnotu  $ED_{50}$  pro theophyllin (**2477  $\mu\text{mol} \pm 66 \mu\text{mol}$** ).
3. Získané údaje budou využity jako standard pro porovnání účinků nových, potenciálních antiastmatik (např. derivátů alkaloidů z rostliny *Adhatoda vasica*).

## **VI. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**



1. NEJEDLÝ, K.: Biologie a soustavná anatomie laboratorních zvířat. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1965, s. 71 – 73, 316 – 317
2. KAŠÁK, V.: Asthma bronchiale. Maxdorf, Praha, 2005, s. 14 – 17
3. ŠPIČÁK, V., PANZER, P., BARTUŇKOVÁ, J. et al.: Alergologie. Galén, Praha, 2004, s. 189 – 232
4. KOPŘIVA, F.: Chronický eozinofilní zánět a asthma bronchiale. Maxdorf, Praha, 2003, s. 10 – 54
5. KREJSEK, J., KOPECKÝ, O.: Klinická imunologie. Nukleus, Hradec Králové, 2004, s. 647 – 679
6. MAČÁK, J., MAČÁKOVÁ, J.: Patologie. GRADA, Avicenum, Praha, 2004, s. 182 - 186
7. MÍŘEJOVSKÝ, P., KOLEKTIV AUTORŮ: Speciální patologie. 3. vydání, Karolinum, Praha, 2004, s. 75 – 79
8. HEROLD, G.: Vnitřní lékařství: systematické vnitřní lékařství pro studenty a lékaře. 1. vydání, Praha, 2000, s. 253 – 27
9. MAREK, J. a kol.: Farmakoterapie vnitřních nemocí. 3. vydání, GRADA, Avicenum, Praha, 2005, s. 148 – 180
10. FENDRICH, Z. a kol.: Farmakologie pro farmaceuty I. 1. vydání, Karolinum, Praha, 2002, s. 125 – 126
11. SVĚTOVÁ INICIATIVA O CHRONICKÉ OBSTRUKČNÍ PLICNÍ NEMOCI: Zpráva pracovního zasedání NHLBI/WHO. 1. vydání, Vltavín, Praha, 2001
12. <http://www.edukafarm.cz/clanek.php?id=738> (červen 2009)

13. <http://www.edukafarm.cz/clanek.php?id=225> (červen 2009)
14. <http://patf.lf1.cuni.cz/stumat/bronch.pdf> (březen 2009)
15. <http://www.tribune.cz/clanek/10340> (červen 2009)
16. LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. a kol.: Základní a aplikovaná farmakologie. Galén, Praha, 2007, s. 367 - 370
17. <http://www.gsk.cz/vase-zdravi/astma.html> (červen 2009)
18. LÜLLMANN, H., MOHR, K., HEIN, L.: Barevný atlas farmakologie. 3. české vydání, GRADA, Avicenum, Praha, 2007, s. 342 – 343
19. HYNIE, S.: Speciální farmakologie, V. díl. 2. přepracované vydání, Karolinum, Praha, 2002, s. 1 – 51
20. KVĚTINA, J., HERINK, J., VOPRŠALOVÁ, M.: Základy farmakologie, 2.díl. 1. vydání, Ediční středisko VFU Brno, Brno, 1999, s. 117 – 123
21. ELWOOD, W., BARNES, P. J., CHUNG, K. F.: Airway hyperresponsiveness is associated with inflammatory cell infiltration in allergic Brown-Norway rats. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 99, 1992, p. 91 - 97
22. BLESA, S., CORTIJO, J., MATA, M. et al.: Oral N-acetylcysteine attenuates the rat pulmonary inflammatory response to antigen. *Eur. Respir. J.* 21, 2003, p. 349 - 400
23. NIE, X., LI, Q., CAI, G. et al.: The effect of N-acetylcysteine on Clara cells and Clara cell 16kDa protein in a murine model of allergen-induced airway inflammation. *Respirology.* 10, 2005, p. 157 - 163
24. BOSKABADY, M. H., ZIAEI, T.: Effect of ascorbic acid on airway responsiveness in ovalbumin sensitized guinea pigs. *Respirology.* 8, 2003, p. 473 - 478
25. SHEDOVA, A. A., KISIN, E. R., KAGAN, V. E. et al.: Increased lipid peroxidation and decreased antioxidants in lungs of guinea pigs following an allergic pulmonary response. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 132, 1995, p. 72 - 81

26. CASTILLO, J. C., DE BEER, E. J.: The tracheal Chain. A preparation for the study of Antisposmodics with particular Reference to Bronchodilator Drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 90, 1947, p. 104
27. BUCKNER, C. K., PATIL, P. N.: The rate of onset of beta adrenergic blockade by the optical isomers of alprenolol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 176, 1971, p. 634
28. COLEMAN, R. A.: Effects of some purine derivatives on the guinea-pig trachea and their interaction with drugs that block adenosine uptake. *Br. J. Pharmacol.* 57, 1976, p. 51
29. COLEMAN, R. A., LEVY, G. P.: A non-adrenergic inhibitory nervous pathway in guinea-pig trachea. *Br. J. Pharmacol.* 52, 1974, p. 167
30. HYASHI, S., TODA, N.: Age-related changes in the response of rabbit isolated aortae to vasoactive agents. *Br. J. Pharmacol.* 64, 1978, p. 229
31. PERSSON, H., JOHNSON, B.: Adrenergic receptors in the guinea-pig trachea and lung. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 28, 1970, p. 49
32. LULICH, K. M., MITCHELL, H. W., SPARROW, M. P.: The cat lung strip as an in vitro preparation of peripheral airways: a comparison of beta-adrenoceptor agonists, autacoids and anaphylactic challenge on the lung strip and trachea. *Br. J. Pharmacol.* 58, 1976, p. 71
33. <http://www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/1096> (srpen 2009)
34. <http://www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/9> (srpen 2009)
35. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Teofylin> (srpen 2009)
36. RUTTIKORN, A., TAKAGI, K., NADAI, M., KUZUYA, T., OGAWA, K., MIYAMOTO, K., HASEGAWA, T.: Studies on alkyl-xanthine derivatives. II. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a new bronchodilator, 1-methyl-3-propylxanthine (MPX). *Jpn J Pharmacol.*, 1988, 48: 341-7

37. <http://www.safebryo.cz/antiastmatika2.htm#antiastmatik> (srpen 2009)
38. FAYON, M. J., DENIS, D., MOLIMARD, M. et al.: Pharmacologically induced relaxation of tracheal smooth muscle is increased in hyperoxia-exposed 15-day-old rats. *Pediatr Pulmonol.*, 2002, 33: 124-9