

D-4771



Univerzita Karlova v Praze  
1. lékařská fakulta

autoreferát dizertační práce

**Chemokiny a jejich receptory v patogenezi  
fibrotizujících plicních procesů**

Martina Šterclová

2009

## Doktorské studijní programy v biomedicíně

*Univerzita Karlova v Praze  
a Akademie věd České Republiky*

Obor: Imunologie

Předseda oborové rady: doc. RNDr. V. Holář, CSc.

Školící pracoviště: Pracoviště klinické a transplantační imunologie IKEM

Autor: MUDr. Martina Šterclová

Školitel: Doc. MUDr. I. Stříž, CSc.

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne:                    v hod.

Kde:

S dizertací je možno se seznámit na děkanátě

1: lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Obsah	3
Souhrn v češtině	4
Souhrn v angličtině	5
1. Úvod	6
Sarkoidóza	6
Exogenní alergická alveolitida	6
Idiopatická plicní fibróza	7
CXC chemokiny v patogenezi sarkoidózy, EAA a IPF	8
2. Hypotézy a cíle práce	9
3. Materiál a metodika	10
4. Výsledky	13
5. Diskuze	15
6. Závěry	20
7. Použitá literatura	21
Seznam publikací doktoranda	22
-1. publikace, které jsou podkladem disertace	22
-2. publikace bez vztahu k tématu dizertace	22

## Souborn

**Úvod:** Cílem naší práce bylo porovnat, zda v tekutině získané bronchoalveolární laváží (BALT) provedené u osob s IPF, chronickou EAA a sarkoidózou prokážeme stejné či odlišné chemokinové prostředí, a zda koncentrace chemokinů či exprese jejich receptorů koreluje s radiologickým obrazem choroby.

**Metodika:** Vyšetřeno bylo 22 nemocných se sarkoidózou, 16 pacientů s EAA a 8 s IPF. U všech bylo provedeno funkční vyšetření a bronchoskopie s bronchoalveolární laváží. Získaná tekutina byla vyšetřena cytologicky a průtokovou cytometrií se stanovením exprese CXCR3, CXCR2 a CCR3 na CD4+T lymfocytech. V supernatantu byly multiplexní analýzou stanoveny koncentrace IL-8, ENA-78, IP-10, I-TAC a VEGF. Pacientům bylo provedeno vyšetření krve na genové polymorfismy IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-1R, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- alfa, IFN gamma, TGF beta, IL-4R alfa. Sledovali jsme korelace mezi parametry BALT, genovými polymorfismy cytokinů, ventilačními parametry a intersticiálním a alveolárním skóre stanoveným počítačovou tomografií s vysokou rozlišovací schopností (HRCT).

**Výsledky:** U nemocných s EAA byla prokázána pozitivní korelace mezi procentuálním zastoupením CD4+T lymfocytů v BALT, CXCR3 expesí na CD4+T lymfocytech a HRCT alveolárním skóre. Statisticky významná byla pozitivní korelace mezi expesí CCR3 na CD4+T lymfocytech v BALT a intersticiálním HRCT skóre ( $p < 0,05$ ). V této skupině byla prokázána také negativní korelace mezi hodnotou plicní difuze (Tlco) a expesí CCR3 na CD4+T ( $p < 0,05$ ). Koncentrace VEGF v BALT pozitivně korelovaly s hodnotami vitální kapacity a plicní difuze v celé skupině pacientů s intersticiálními plicními procesy a ve skupině nemocných se sarkoidózou ( $p < 0,05$ ). Prokázali jsme negativní korelaci koncentrace VEGF v BALT a HRCT intersticiálního skóre u nemocných s IPF ( $p < 0,05$ ). Koncentrace IL-8 v BALT ve skupině všech nemocných s intersticiálními plicními procesy a v podskupině nemocných se sarkoidózou negativně korelovaly s vitální kapacitou i s hodnotami Tlco ( $p < 0,05$ ). Dále byla prokázána pozitivní korelace IL-8/ENA-78 s procentuálním zastoupením neutrofilů v BALT u nemocných s IPF ( $p < 0,05$ ). HRCT intersticiální skóre u nemocných s EAA pozitivně korelovalo s procentuálním zastoupením neutrofilů v BALT a s koncentrací IL-8 v BALT ( $p < 0,01$ ). U nemocných s IPF HRCT alveolární skóre korelovalo s koncentracemi IL-8 v BALT, kdežto intersticiální skóre pozitivně korelovalo s procentuálním zastoupením neutrofilů v BALT ( $p < 0,01$ ). U nemocných se sarkoidózou korelovaly alely IL-4Ralfa (+1902)AA a IL-10 (-1082)G s vyššími koncentracemi ENA-78 v BALT ( $p < 0,05$ ). U nemocných s EAA jsme zaznamenali, že alely IL-6 (-174)CG a IL-6(nt565)AG také korelovaly s vyšší koncentrací ENA-78 v BALT ( $p < 0,05$ ).

**Závěr:** Zvýšená exprese chemokinového receptoru CCR3 v BALT může být u nemocných s EAA prognosticky nepříznivou známkou dalšího průběhu. Vyšší exprese VEGF v BALT naopak mohou pomoci identifikovat pacienty s IPF s lepší prognózou choroby. IL-8 i ENA-78 se pravděpodobně podílejí v patogenezi IPF a EAA, nicméně nemusí mít stejný vliv na průběh a rozvoj onemocnění. Zatímco IL-8 může pomoci odlišit nemocné s IPF v časném stádiu choroby, u pacientů s EAA naopak může svědčit pro pokračující expozici inhalačnímu antigenu.

## Summary

**Objectives:** The aim of our study was to investigate chemokine milieu in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of sarcoidosis, chronic extrinsic allergic alveolitis (EAA) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients and to find possible correlations between the chemokine milieu and radiologic pattern of the diseases.

**Methods:** We investigated 22 patients with pulmonary sarcoidosis, 16 patients with EAA and 8 patients with IPF. The diagnostic program included investigation of lung functions and bronchoscopy with bronchoalveolar lavage (BAL). Acquired BALF underwent cytological, flow cytometry and multiplex analysis investigation. Expression of CXCR3, CXCR2 and CCR3 on CD4+T cells as well as BALF IL-8, ENA-78, IP-10, I-TAC and VEGF concentrations were assessed. All subjects were tested for cytokine polymorphisms of IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-1R, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- alfa, IFN gamma, TGF beta, IL-4R alfa genes. Correlations of BALF results with gene polymorphisms and high resolution computer tomography (HRCT) results were investigated.

**Results:** Percentage of BALT CD4+T cells and CXCR3+CD4+T cells positively correlated with HRCT alveolar score in EAA group. CCR3+CD4+T cells positively correlated with HRCT interstitial score in EAA patients ( $p < 0,05$ ). We observed negative correlation between pulmonary difusing capacity and CCR3+CD4+T cells in EAA group. ( $p < 0,05$ ). VEGF BALF concentrations positively correlated with pulmonary difusing capacity of the whole group and in the sarcoidosis subgroup ( $p < 0,05$ ). We found negative correlation between BALF VEGF concentration and HRCT interstitial score in IPF group ( $p < 0,05$ ). IL-8 BALF concentrations negatively correlated with vital capacity and lung difusing capacity in the whole group as well as sarcoidosis subgroup ( $p < 0,05$ ). Further, positive correlation between IL-8/ENA-78 ratio and BALF neutrophil percentage in IPF was observed ( $p < 0,05$ ). Positive correlation between HRCT interstitial score, BALF neutrophil count and IL-8 BALF concentration were documented in the EAA group ( $p < 0,01$ ). Positive correlation between HRCT alveolar score and IL-8 BALF concentration as well as positive correlation between HRCT interstitial score and neutrophil BALF percentage were found in IPF ( $p < 0,01$ ). Patients with sarcoidosis III. stage had highest IL-8 BALF concentrations ( $p < 0,05$ ). IL-4Ralfa (+1902)AA and IL-10 (-1082)G and alely IL-6 (-174)CG a IL-6(nt565)AG correlated with higher BALF ENA-78 concentrations ( $p < 0,05$ ) in EAA group. **Conclusions:** We assume that higher CCR3 CD4+T cells expression might serve as a negative prognostic marker in chronic EAA patients. Higher VEGF BALF concentrations could help us to identify IPF patients with more favourable disease course. Our results support the idea, that both IL-8 and ENA-78 are involved in the pathogenesis of chronic EAA. While IL-8 could help us to find early stages of IPF, the same chemokine might show ongoing exposition of inhalation agents in EAA patients.

## 1. Úvod

Intersticiální plicní procesy patří do širší skupiny difuzních chorob plicního parenchymu. Jsou charakterizovány podobnými klinickými příznaky, fyzikálním nálezem, radiologickým a patologickým obrazem. Vzhledem k incidenci jednotlivých chorob jsme se zaměřili na pacienty trpící sarkoidózou, exogenní alergickou alveolitidou (EAA) a idiopatickou plicní fibrózou (IPF).

### **Sarkoidóza**

Sarkoidóza je chronické multiorgánové onemocnění neznámé etiologie. V imunopatogenezi onemocnění dominuje T buněčná odpověď. Hlavním mikromorfologickým znakem onemocnění je granulom. Zatímco v časných stádiích sarkoidózy dominuje Th1 cytokinové prostředí, s přibývajícím plicní fibrózou v pozdějších stádiích (III., IV. stádium) převládá Th2 cytokinové prostředí. Počítačová tomografie s vysokou rozlišovací schopností (HRCT) zobrazuje zesílení interlobulárních sept, noduly asociované s bronchovaskulárními svazky či subpleurálně lokalizované, porušení plicní architektiky, intersticiální infiltráty, hilovou a mediastinální lymfadenopatii. V tekutině získané bronchoalveolární laváží (BALT) nacházíme především lymfocyty, dominují CD4+T lymfocyty.

### **Exogenní alergická alveolitida**

EAA je skupina onemocnění rozvíjející se po opakované expozici inhalačním antigenům. V časných fázích onemocnění (několik hodin po expozici) dominuje poškození imunokomplexy a látkami

uvolněnými z aktivovaných neutrofilů. U subakutní a chronické EAA hraje hlavní roli opožděný typ přecitlivělosti zprostředkovaný T lymfocyty. Dosud nebyla vytvořena celosvětově platná kritéria, která by usnadnila stanovení diagnózy EAA. Radiologický obraz se mění podle formy onemocnění. V pozdějších stádiích onemocnění se na skiagramu hrudníku setkáme se zastřením charakteru mléčného skla (ground glass) a s retikulonodulacemi v různém poměru. V BALT obvykle dominují lymfocyty, někteří autoři uvádějí jako jedno z diagnostických kritérií více než 30 % lymfocytů v BALT. U pacientů s chronickou EAA procentuální zastoupení lymfocytů v BALT klesá. Obvykle dominují CD8+ T lymfocyty. Bylo zjištěno, že poměr CD4+/CD8+ T lymfocytů v BALT se mění podle stádia choroby (akutní, subakutní, chronická). Zatímco v subakutní fázi nacházíme především špatně ohraničené granulomy, může histopatologický obraz u nemocných s chronickými formami EAA imponovat jako idiopatická plicní fibróza typu obvyklého (UIP).

### **Idiopatická plicní fibróza**

IPF je onemocnění neznámé etiologie, které je charakterizováno akumulací neutrofilů v plicních alveolech a mononukleárních buněk v intersticiu s následným progresivním ukládáním kolagenu a destrukcí plicní tkáně. IPF pravděpodobně reprezentuje model abnormálního hojení v plíci, které je charakterizováno nepřítomností přiměřené reepitalizace a abnormalitami v chování myofibroblastů (Selman, 2001). HRCT má důležitější úlohu v diagnostických algoritmech než skiagram hrudníku. Pokud je HRCT obraz netypický, měla by v diagnostickém procesu následovat plicní

biopsie. Nemocní s IPF mívají v BALT vyšší procentuální zastoupení neutrofilů, které obvykle koreluje s rozsahem retikulací na HRCT hrudníku. Histologickým korelátem IPF je UIP.

### **CXC chemokiny v patogenezi sarkoidózy, EAA a IPF**

Plicní tkáň nemocných s IPF exprimuje více angiogenního interleukinu-8 (IL-8) a epiteliálního neutrofilu aktivujícího proteinu (epithelial neutrophil activating protein/ENA-78), které se váží především na receptor CXCR2. Angiogeneze je provázána i expresí vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (vascular endothelial growth factor/VEGF). VEGF stimuluje degradaci extracelulární matrix obklopující endotelie, migraci a organizaci tubulárních struktur. Expres angiostatických CXC chemokinů (tj. interferon gamma inducible protein (IP-10) a interferon iducible T cell alfa chemoattractant (I-TAC)) je u nemocných s IPF snížena. U nemocných se sarkoidózou zajišťují příliv aktivovaných T lymfocytů do plic chemokiny, jejichž tvorba je stimulována interferonem gamma (monokine induced by interferon gama/MIG, IP-10, I-TAC), a které působí prostřednictvím svého receptoru CXCR3. U pacientů s EAA je nejméně literárních dat zabývajících úlohou se CXC chemokinů a jejich receptorů. Nicméně bylo prokázáno, že CXCR3 a CXCR2 a jejich ligandy se účastní patogeneze EAA. Zatímco u sarkoidózy obvykle dominuje Th1 odpověď, jejímž dobrým markerem je právě exprese CXCR3, u osob s chronickou EAA a IPF převládá Th2 cytokinové prostředí, v kterém je zvýšena exprese CCR3.

### 2. Hypotézy a cíle práce

Cílem práce bylo porovnat chemokinové prostředí v BALT pacientů se sarkoidózou, EAA a IPF a vyšetřit vztah mezi koncentracemi chemokinů v BALT, radiologickým obrazem choroby a ventilačními parametry nemocných. Dále jsme se zaměřili na expresi receptorů pro tyto chemokiny na CD4+T lymfocytech získaných bronchoalveolární laváží (BAL) a zkoumali jsme vztah exprese receptorů, koncentrace chemokinů a radiologického obrazu. K porovnání radiologického obrazu jsme využili modifikovaného HRCT skórovacího systému dle Gaye (Gay, 1998). U nemocných jsme provedli vyšetření periferní krve ke stanovení polymorfismů genů pro vybrané cytokiny a u pacientů s prokázanými polymorfismy jsme porovnávali jejich vztah ke koncentracím chemokinů v BALT.

Naše počáteční hypotéza je založena na některých podobnostech mezi IPF a chronickou EAA – položili jsme si otázku, zda může mít chronická EAA podobné chemokinové prostředí zejména s ohledem na angiogenní a angiostatické faktory jako IPF.

Dle dostupných literárních údajů je naše práce první, která se zabývá korelací exprese chemokinových receptorů s radiologickým obrazem choroby. Zatímco byla publikována řada prací zabývajících se dynamikou produkce chemokinů u myšího modelu plicní fibrózy (bleomycinem indukovaná plicní fibróza) nebo EAA (hypersenzitivní reakce vyvolaná Saccharopolyspora sp.), obdobných prací zabývajících se touto problematikou u lidí je méně. V literatuře jsme se neseťkali s prací, která by se zabývala vlivem polymorfismů

genů pro cytokiny na chemokinové prostředí u pacientů s intersticiálními plicními procesy.

### 3. Materiál a metodika

Do prospektivní studie byli postupně zařazeni pacienti, u kterých byla na základě vyšetřovacího programu stanovena diagnóza sarkoidózy (22 pacientů), EAA (16 pacientů) a IPF (8 pacientů). Všichni pacienti podstoupili v rámci diagnostického procesu vyšetření ventilačních parametrů: základní spirometrické vyšetření a bodypletysmografie a vyšetření plicní difuze (Tlco) (Tabulka č. 1).

Tabulka č. 1 Demografická data ve studijní skupině

	Sarkoidóza	EAA	IPF
Počet pacientů	22	16	8
Věk	48,2±15,4	62,8±14,2	67,2±7,3
Pohlaví (muži/ženy)	10/12	3/13	6/2
Kuřáci/nekouřáci	7/15	2/14	1/7
FVC (L)	3,85±1,13	2,1±0,9	3,1±0,8
FVC (% n.h.)	92,3±25,4	72,2±18,9	86,3±19,7
FEV1 (L)	3,1±0,9	1,7±0,6	2,5±0,7
FEV1 (%n.h.)	90,5±23,2	72,7±17,5	88,6±20,9
Tlco (%n.h.)	74,8±23,5	47,1±13,4	44,8±22,8
Biopsie	22	2	4

FVC- usilovná vitální kapacita, FEV1 usilovně vydechnutý objem za 1 sekundu, Tlco transfer faktor, n.h.- náležité hodnoty, výsledky jsou vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka.

Dále bylo provedeno základní imunologické vyšetření, bronchoskopie s BAL (a následným cytologickým a cytometrickým zpracováním BALT), vyšetření exprese chemokinových receptorů na CD4+T lymfocytech v BALT průtokovou cytometrií a vyšetření supernatantu BALT multiplexní analýzou s využitím přístroje Luminex a

HRCT hrudníku. U nemocných jsme provedli i vyšetření genových polymorfismů z periferní krve.

### Bronchoalveolární laváž, cytologická a cytometrická analýza BALT (Tabulka č. 2)

BAL byla provedena flexibilním fibrobronchoskopem z oblasti středního laloku pravé plice běžným postupem. Získaný materiál 3. a 4. frakce byl vyšetřen mimo jiné cytologicky a průtokovou cytometrií s využitím monoklonálních protilátek včetně protilátek proti CD3, CD4, CD8, HLA-DR, CXCR3, CXCR2 a CCR3.

Tabulka č. 2 Cytologické a cytometrické vyšetření BALT

	Sarkoidóza	EAA	IPF
PMN (%)	12,4±19,6	19,0±29,3	13,8±23,0
Ly (%)	19,2±19,4	24,6±26,2	30,0±30,6
Eos (%)	0,4±1	4,8±8,1	5,1±9,8
CD4/CD8	7,7±7,4	2,1±2,2	2,3±1,2
CD4/CXCR3	1,5±3,7	0,6±0,6	1,5±1,7
CD4/CXCR2	0,8±1,1	1,3±2,2	0,7±0,5
CD4/CCR3	0,3±0,3	3,7±7,3	-----
Návratnost (ml)	28,2±8,0	23,5±8,5	24,4±7,8

### Chemokiny v BALT (Tabulka č. 3)

Koncentrace chemokinů I-TAC, IP-10, IL-8, ENA-78 a VEGF v supernatantu 4. frakce BALT byly stanoveny multiplexní analýzou s využitím přístroje Luminex.

Tabulka č. 3 Koncentrace chemokinů v BALT

	Sarkoidóza	EAA	IPF
IP-10	77,6±180,8	137,9±371,8	56,5±117,2
I-TAC	1,4±3,0	10,0±36,3	0,7±1,2
IL-8	31,8±34,9	96,7±122,8	44,6±41,1
ENA-78	39,7±40,6	54,0±47,7	74,6±76,5
VEGF	57,8±56,4	30,2±41,1	16,9±15,5

Výsledky jsou vyjádřeny v pg/mL jako průměr±směrodatná odchylka.

HRCT skórovací systém (Tabulka č.4, 5)

Rozsah alveolárních a intersticiálních změn na HRCT hrudníku byl hodnocen pomocí níže uvedeného skórovacího systému.

Tabulka č. 4 HRCT skórovací systém

Stupeň postižení	Alveolární skóre	Intersticiální skóre
0	0	0, není voštiny
1	1-4%	1-4%, není voštiny
2	5-24%	5-24%
3	25-49%	25-49%
4	50-74%	50-74%
5	75-100%	75-100%

Tabulka č. 5 HRCT skóre u jednotlivých diagnóz

	Sarkoidóza	EAA	IPF
HRCT alveolární skóre	1,0±1,2	2,5±1,6	1,0±1,1
HRCT intersticiální skóre	2,0±1,2	1,9±1,3	2,6±1,3

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka.

Cytokinové polymorfismy

Nemocným bylo po podpisu informovaného souhlasu odebráno 10 ml periferní krve. Ze získaného vzorku byla běžným způsobem extrahována DNA. Byly vyšetřeny polymorfismy v promotorové oblasti genů pro IL-1alfa, IL-1beta, receptor IL-1, receptorového antagonistu interleukinu 1 (IL-1RA), IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, tumor nekrotizující faktor alfa (TNF-alfa), interferon gamma a polymorfismů v překládaných oblastech genů pro transformujícího růstový faktor beta (TGF-beta), IL-1beta, IL-2, IL-4 a IL-4Ralfa.

4. Výsledky

Ve vyšetřovaných skupinách jsme neshledali statisticky významné rozdíly v diferenciálním rozpočtu buněk v BALT. Nemocní se sarkoidózou měli významně vyšší podíl CD4+/CD8+ T lymfocytů v BALT než pacienti s EAA či IPF (p<0,01). V první fázi výzkumu jsme se zaměřili na vliv exprese chemokininových receptorů a HRCT obraz nemoci u pacientů se sarkoidózou a chronickou formou EAA. V obou skupinách jsme nezaznamenali významné rozdíly v expresi chemokininových receptorů na CD4+T lymfocytech, nicméně u nemocných s EAA byla prokázána dominantní exprese CCR3 na CD4+T lymfocytech. Nemocní s EAA měli významně vyšší alveolární skóre (tj. zánětlivé postižení) než pacienti se sarkoidózou (p<0,01), HRCT intersticiální skóre (tj. stupeň plicní fibrózy) se mezi skupinami nelišila. U nemocných s chronickou EAA byla prokázána pozitivní korelace mezi procentuálním zastoupením CD4+T lymfocytů v BALT, CXCR3 expresí na CD4+T lymfocytech a HRCT alveolárním skóre.

V žádné z vyšetřovaných skupin nebyla prokázána korelace mezi expresí CXCR2 na CD4+T lymfocytech a intersticiálním HRCT skóre. Statisticky významná byla pozitivní korelace mezi expresí CCR3 na CD4+T lymfocytech v BALT a intersticiálním HRCT skóre (p<0,05). Dále byla prokázána negativní korelace mezi Tlco a expresí CCR3 na CD4+T lymfocytech ve skupině nemocných s chronickou EAA (p<0,05). Jiná korelace mezi výsledky průtokové cytometrie a ventilačními parametry nebyla prokázána. Přestože u nemocných s EAA bylo pozorováno vyšší procentuální zastoupení neutrofilů v BALT než u nemocných se sarkoidózou, nebyla nalezena žádná korelace mezi počtem neutrofilů v BALT a HRCT obrazem choroby. Nebyla prokázána korelace mezi procentuálním zastoupením lymfocytů v BALT a

HRCT obrazem choroby, ani korelace mezi procentuálním zastoupením HLA-DR+CD3 lymfocytů v BALT a intersticiálním či alveolárním skóre (Sterclova M., Experimental Lung Research 2009).

V další fázi jsme se u vybraných skupin nemocných zaměřili na porovnání koncentrací chemokinů v BALT a posouzení vztahů mezi jejich koncentrací, expresí chemokिनových receptorů, ventilačními parametry a HRCT obrazem choroby.

Koncentrace VEGF v BALT byly nejvyšší u nemocných se sarkoidózou, nejvyšších koncentrací IL-8 v BALT dosahovali nemocní s EAA. ENA-78 byla oproti skupině pacientů se sarkoidózou zvýšena v EAA i v IPF skupině. Rozdíly však nedosahovaly statistické významnosti. Koncentrace VEGF v BALT pozitivně korelovaly s hodnotami vitální kapacity a plicní difuze v celé skupině pacientů s intersticiálními plicními procesy a ve skupině nemocných se sarkoidózou ( $p < 0,05$ ). Prokázali jsme negativní korelaci koncentrace VEGF v BALT a HRCT intersticiálního skóre u nemocných s IPF ( $p < 0,05$ ). Koncentrace IL-8 v BALT ve skupině všech nemocných s intersticiálními plicními procesy a v podskupině nemocných se sarkoidózou negativně korelovaly s vitální kapacitou i s hodnotami Tlco ( $p < 0,05$ ). Dále byla prokázána pozitivní korelace IL-8/ENA-78 s procentuálním zastoupením neutrofilů v BALT u nemocných s IPF ( $p < 0,05$ ). (Vasakova, Sterclova, Scandinavian Journal of Immunology, 2009)

Po rozšíření skupiny pacientů s EAA o 10 nemocných (celkem 16 pacientů) a skupiny IPF na celkem 8 nemocných jsme znovu porovnali korelace mezi cytometrickým vyšetřením BALT a HRCT obrazem choroby. U nemocných s EAA byla prokázána negativní korelace mezi HRCT alveolárním skóre a poměrem CD4+/CD8+ T lymfocytů v BALT ( $p < 0,01$ ). HRCT intersticiální skóre u nemocných s EAA pozitivně korelovalo s procentuálním zastoupením neutrofilů v BALT a s koncentrací IL-8 v BALT ( $p < 0,01$ ). U nemocných s IPF HRCT alveolární skóre korelovalo s koncentracemi IL-8 v BALT, kdežto intersticiální skóre pozitivně korelovalo s procentuálním zastoupením neutrofilů v BALT ( $p < 0,01$ ). Neshledali jsme korelaci mezi expresí CXCR3 a CXCR2 na CD4+ T lymfocytech v BALT a koncentrací výše uvedených chemokinů v BALT.

Jelikož nemocných se sarkoidózou bylo do skupiny zařazeno nejvíce, pokusili jsme se porovnat koncentrace chemokinů v BALT u jednotlivých radiologických stádií sarkoidózy. Porovnávali jsme čtyři nemocné se stádiem I, 7 pacientů ve stádiu II a 5 osob ve stádiu III. Hladiny chemokinů se mezi jednotlivými stádii sarkoidózy nelišily

vyjma koncentrace IL-8, která byla nejvyšší u nemocných ve III. klinickém stádiu ( $p < 0,05$ ). (Vasakova, Sterclova, Respiratory Medicine 2009).

Při vyšetření genových polymorfismů bylo prokázáno, že u nemocných se sarkoidózou korelovaly alely IL-4Ralfa (+1902)AA a IL-10 (-1082)G s vyššími koncentracemi ENA-78 v BALT ( $p < 0,05$ ). U nemocných s EAA jsme zaznamenali, že alely IL-6 (-174)CG a IL-6(565)AG také korelovaly s vyšší koncentrací ENA-78 v BALT ( $p < 0,05$ ). U pacientů s IPF nebyla prokázána korelace mezi žádným z vyšetřovaných genových polymorfismů a hladinou chemokinů v BALT. (Vasakova, Sterclova, Respiratory Medicine, 2009).

## 5. Diskuze

Na první pohled jsou IPF, sarkoidóza i EAA tři naprosto odlišné nosologické jednotky, nicméně všechny tři mohou vyústit v ireverzibilní plicní fibrózu, která zhoršuje kvalitu a zkracuje život pacientů. Idiopatickou plicní fibrózu provází fibrózní změny plicního intersticia od samého počátku, u nemocných s EAA se při přetrvávající expozici inhalačnímu antigenu mohou postupně vyvinout a zhoršovat. Jelikož i histologický obraz IPF a EAA může být obdobný (UIP), zajímalo nás, zda se při rozvoji plicní fibrózy u nemocných s IPF a EAA mohou uplatňovat obdobné mechanismy. Jsme si vědomi, že limitující je zejména množství vyšetřených nemocných a že vzhledem k omezenému počtu pacientů v jednotlivých skupinách musíme výsledky našeho výzkumu interpretovat s obezřetností.

CXCR3 hraje důležitou úlohu v patogenezi granulomatózních onemocnění, zatímco CCR3 může být využit jako marker Th2 imunitní odpovědi. U nemocných s EAA byla prokázána pozitivní korelace mezi expresí CXCR3 na CD4+T lymfocytech v BALT a HRCT alveolárním skóre ( $p < 0,01$ ), stejně jako korelace exprese



CCR3 na CD4+T lymfocytech a HRCT intersticiálního skóre ( $p < 0,05$ ). Domníváme se, že vyšší exprese CXCR3 na CD4+T lymfocytech může být známkou aktivní alveolity a dominujícího Th1 cytokinového prostředí. Naopak převládající exprese CCR3 může dokumentovat ireverzibilitu fibrotizujících procesů. Je otázkou, zda může být převládající exprese CCR3 na CD4+T lymfocytech v BALT nemocných s chronickými formami EAA prognosticky nepříznivou známkou dalšího průběhu choroby. Angiogeneze pozorovaná i ve fibrotické plicní tkáni nemocných s IPF je nezbytná pro růst a obnovu tkání po poranění, ale může se podílet i na poškození tkání při zánětlivých nebo fibrotizujících procesech. Na novotvorbě kapilár se podílí i VEGF. V námi vyšetřené skupině měli nemocní se sarkoidózou vyšší koncentrace VEGF v BALT než pacienti s EAA nebo IPF, i když rozdíl nedosahoval statistické significance. U pacientů s IPF koncentrace VEGF v BALT negativně korelovaly s HRCT intersticiálním skóre. Zdá se, že snížení exprese VEGF messengerové ribonukleové kyseliny (mRNA) může vést k remodelaci alveolárního epitelu u nemocných s IPF. VEGF může mít u těchto pacientů i jinou úlohu, než je indukce angiogeneze; pravděpodobně se podílí na ochraně a regeneraci defektů alveolární stěny. Prokázali jsme pozitivní korelaci mezi koncentrací VEGF v BALT a vitální kapacitou a hodnotami plicní difuze u nemocných se sarkoidózou. Literatura popisuje anti apoptotický vliv VEGF na alveolární epitelální buňky, což může vysvětlit výše zmíněné pozorování. Domníváme se, že VEGF by mohl být dalším

potenciálním biomarkerem, který by mohl pomoci identifikovat naopak prognosticky příznivější formy onemocnění IPF.

Na rozdíl od VEGF, ELR+ chemokiny se na angiogenezi u nemocných s fibrotizujícími plicními procesy pravděpodobně podílejí. Koncentrace IL-8 v BALT negativně korelovaly s výsledky funkčního vyšetření jak u celé skupiny pacientů tak u nemocných se sarkoidózou.

Zatímco při vyšetřování malých počtů nemocných s EAA a IPF jsme neprokázali korelace mezi cytologickým a cytometrickým profilem BALT a HRCT obrazem onemocnění, po výrazném rozšíření zejména skupiny nemocných s EAA jsme zaznamenali negativní korelaci mezi CD4+/CD8+ T lymfocyty a HRCT alveolárním skóre u nemocných s chronickou EAA. Toto pozorování plně koresponduje s naším předchozím pozorováním (Šterclová, 2006) i s obecně akceptovaným zjištěním, že nemocní s chronickými formami EAA mají vyšší hodnoty CD4+/CD8+ T lymfocytů v BALT než pacienti s akutními a subakutními formami. HRCT intersticiální skóre v rozšířené skupině nemocných s EAA pozitivně korelovalo s procentuálním zastoupením neutrofilů v BALT a s koncentrací IL-8 v BALT ( $p < 0,01$ ). Neutrofilové se podílejí na patogenezi plicní fibrózy nejen prostřednictvím produkce kyslíkových radikálů a IL-8 je jedním z jejich chemotaktických faktorů. U pacientů s EAA bylo prokázáno, že tvorba IL-8 může být indukována expozicí inhalačním antigenům včetně endotoxinu. Nemocní s chronickou EAA bývají vystaveni trvale nízkým dávkám inhalačních antigenů, nelze tedy vyloučit, že produkce IL-8 je u nich kontinuální s výkyvy odpovídajícími vyšší expozici inhalačnímu

antigenu. IL-8 a potažmo neutrofilů se mohou podílet na progresi fibrózy, což je dokumentováno korelací s HRCT intersticiálním skóre.

U nemocných s IPF korelovalo s koncentracemi IL-8 v BALT naopak HRCT alveolární skóre ( $p < 0,01$ ). Bylo prokázáno, že u nemocných s IPF oblasti opacit charakteru mléčného skla na HRCT hrudníku obvykle korespondují s histologickým nálezem počínající jemné intersticiální fibrózy. V dostupné literatuře jsme nezaznamenali práci, která by se zabývala zkoumáním exprese IL-8 v BALT v čase. Je možné, že IL-8 u IPF je exprimován jen v počátečních fázích onemocnění a v pozdější fázi s rozvojem voštinovité plíce u nemocných s IPF se neuplatňuje. Na základě těchto pozorování nelze vyloučit, že úloha IL-8 v patogenezi IPF a EAA je odlišná.

Dalším ze skupiny angiogenních chemokinů je ENA-78. Nezaznamenali jsme korelaci koncentrace ENA-78 v BALT s radiologickým obrazem IPF ani EAA, přestože koncentrace ENA-78 s těchto skupinách byly vyšší než u nemocných se sarkoidózou. Bylo prokázáno, že ENA-78 má na rozdíl od IL-8 minimální úlohu v atrakci neutrofilů, podílí se především na angiogenezi. Je tedy možné, že ENA-78 je produkována hlavně v počátečních fázích fibrózy, podílí se na rozvoji angiogeneze, ale její exprese nemá sama o sobě vliv na radiologický obraz onemocnění.

Protipólem angiogenních chemokinů jsou interferonem indukované angiostatické ELR- chemokiny. Jak jsme v úvodu zmínili, patří mezi ně IP-10 a I-TAC, které sdílejí společný receptor CXCR3. Byla formulována hypotéza, dle které by jedním z důležitých momentů

v patogenezi IPF mohl být defekt na ose CXCR3 ligandy/CXCR3 (Sallusto, 1997). Dále bylo prokázáno, že I-TAC je pravděpodobně jediný chemokin angiostatické skupiny, který je skutečně stimulován interferonem gamma a tak zpomaluje fibrogenezi. Japonští autoři pozorovali desetkrát nižší koncentrace I-TAC v BALT než v séru pacientů se sarkoidózou. Prokázali, že I-TAC má stokrát vyšší afinitu k CXCR3 než ostatní ligandy tohoto receptoru, a že se patogeneze fibrotických procesů účastní i ve velmi nízké koncentraci. Toto pozorování odpovídá námi dokumentovaným nízkým koncentracím I-TAC v BALT.

Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl v koncentracích IP-10 v BALT mezi nemocnými s EAA a IPF. Podíl CXCR3 ligandů na ovlivnění angiogeneze není stejný. IP-10 nejspíše nemá přímý vliv na angiogenezi, zdá se, že především inhibuje chemotaktickou aktivitu plicních fibroblastů. Jeho efekt na fibroblasty však není zprostředkovaný receptorem CXCR3. Složitost působení chemokinů a provázanost chemokinové sítě dokresluje pozorování, že IP-10 inhibuje receptor CXCR2 a tím nepřímo zasahuje do angiogeneze. Neprokázali jsme korelaci mezi koncentrací IP-10 v BALT a HRCT obrazem choroby. Důvodem může být v čase se měnící exprese CXCR3 ligandů – bylo prokázáno, že exprese ligandů CXCR3 kolísá v čase, v závislosti na trvání choroby. Jelikož nemocní zařazení do naší práce měli různé stupně plicního postižení, mohla se exprese CXCR3 ligandů u jednotlivých pacientů lišit. Na základě výše uvedených pozorování nepovažujeme IL-8, ENA-78 ani IP-10 či I-TAC za potenciální biomarkery vhodné k výběru prognosticky nepříznivých skupin pacientů.

Statisticky významnou se ukázala být ve skupině nemocných se sarkoidózou korelace mezi koncentrací ENA-78 v BALT a polymorfismem genu pro IL-4Ralfa a IL-10. Nositelé alely IL-4Ralfa (+1902)AA a IL-10(-1082)G měli vyšší koncentrace ENA-78 v BALT. Nelze vyloučit, že geneticky podmíněná vyšší produkce IL-10 nevede k vyšší tvorbě chemokinů ENA-78 a nezhoršuje průběh onemocnění u pacientů se sarkoidózou. Tuto hypotézu bohužel nepotvrzuje porovnání koncentrací ENA-78 u nemocných s různými radiologickými stádii sarkoidózy, nicméně longitudinální studie chybí a vliv vyšších koncentrací ENA-78 na horší prognózu nemocných se sarkoidózou nelze zcela vyloučit.

Dále jsme pozorovali korelaci polymorfismu genu pro IL-6 (IL-6 – 174CG a IL-6 nt565 AG) s vyššími koncentracemi ENA-78 v BALT u nemocných s EAA, což může prokazovat vliv polymorfismu genu pro IL-6 na prognózu nemocných s EAA.

## 6. Závěry

Na základě výsledků naší práce se domníváme, že zvýšená exprese chemokinového receptoru CCR3 v BALT může být u nemocných s EAA prognosticky nepříznivou známkou dalšího průběhu. Vyšší exprese VEGF v BALT naopak mohou pomoci identifikovat pacienty s IPF s lepší prognózou choroby. V našem souboru jsme prokázali, že IL-8 i ENA-78 se podílejí v patogenezi IPF a EAA, nicméně nemusí mít stejný vliv na průběh a rozvoj onemocnění. Zatímco IL-8 může pomoci odlišit nemocné s IPF v časném stádiu choroby, u pacientů s EAA naopak může svědčit pro pokračující expozici inhalačnímu antigenu. Multiplexní analýza zřejmě není

dostatečně senzitivní metodou k detekci chemokinů I-TAC v BALT. Koncentrace IP-10 samy o sobě nemají vliv na radiologický obraz intersticiálních plicních procesů.

## 7. Použitá literatura

Gay SE, Kazerooni EA, Toews GB. Idiopathic pulmonary fibrosis, predicting response to therapy and survival. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1063-1072.

Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science*. 1997; 277: 2005-2007.

Selman M, King TE Jr, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypothesis about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001; 134:136-51.

### Seznam publikací doktoranda:

#### 1. publikace, které jsou podkladem dizertace:

Sterclova M, Vasakova M, Pavlicek J, Metlicka M, Krasna E, Striz I. Chemokine receptors in a regulation of interstitial lung fibrosis and inflammation. *Experimental Lung Reserch* – přijato k tisku. IF 1,506

Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc J, Skibova J, Striz I. Bronchoalveolar lavage fluid cellular characteristics, functional parameters and Cytokine and chemokine levels in interstitial lung diseases. *Scandinavian Journal of Immunology* - přijato k tisku. IF 1,928

Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc J, Striz I. Cytokine gene polymorphisms and BALF cytokine levels in interstitial lung diseases. *Respiratory Medicine*- přijato k tisku. IF 2,235

#### 2. publikace, které nejsou podkladem dizertace:

Sterclova M, Vasakova M, Dutka J, Kalanin J. Extrinsic allergic alveolitis: comparative study of the bronchoalveolar lavage profiles and radiological presentation. *Postgrad Med J.* 2006;82:598-601 IF 1,218

Šafránková M., Hytych V., Dorazilová V. Plicní forma tularémie imitující bronchogenní karcinom. *Kazuistiky v Pneumologii* 1, č. 2: 14-18, 2004

Šafránková M., Horažďovský P., Vedralová J. Inflamatorní myofibroblatický pseudotumor- neobvyklý nález. *Studia pneumologica et phtiseologica* 65, č. 4: 189-193, 2005.

Šterclová M. „Phantom bone disease“ – neobvyklá příčina chylothoraxu *Kazuistiky v pneumologii* 3, č.1: 22, 2006.

Šterclová M., Matěj R. Difuzní plicní amyloidóza jako příčina recidivujícího fluidothoraxu *Kazuistiky v pneumologii* 3, č.1: 4-8, 2006.

Šterclová M., Hricíková I., Hytych V. Nitrohruční manifestace germinálních tumorů. *Studia pneumologica et phtiseologica* 67, č. 3: 124-126, 2007.

Šterclová M. Dědičná vnímavost k mykobakteriálním infekcím. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL* 4, č.1: 48, 2007.

Šterclová M. Chemokiny a jejich receptory v patogenezi idiopatické plicní fibrózy. *Alergie* 9, č.1: 39-44, 2007.

Šterclová M., Vašáková M. Exogenní alergická alveolitida. *Praktický lékař* 87, č. 8: 470-473, 2007.

Šterclová M., Vašáková M., Dorazilová V. Lymfocytární plicní infiltráty u nemocné s revmatoidní artritidou. Kasuistiky v alergologii, pneumologii a ORL 2008, 4: 17-18.

Šterclová M., Vašáková M. Současný pohled na exogenní alergickou alveolitidu. Alergie 2008, 4:293-296.

Šterclová M., Vašáková M. Význam sérologického vyšetření v diagnostice exogenních alergických alveolitid. Studia pneumophthiseologica- přijato k tisku.