

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie

GENOVÉ POLYMORFISMY CYTOKINŮ
A JEJICH EXPRESE V BRONCHOALVEOLÁRNÍ
LAVÁŽI U PACIENTŮ S FIBROTIZUJÍCÍMI
PLICNÍMI PROCESY

Correlation of cytokine gene polymorphisms and bronchoalveolar
lavage fluid gene expression profiles in patients with interstitial
lung diseases

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Zpracovala: Eva Slimáčková

Pod vedením: Doc. MUDr. Martina Vašáková, Ph.D.

Akademický rok: 2008/2009

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla veškerou citovanou literaturu. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne 3.9.2009

Eva Slimáčková

Poděkování

Děkuji Doc. MUDr. Martině Vašákové, Ph.D. za odborné a profesionální vedení, zapůjčení studijní literatury a spoustu cenných rad a námětů k obsahu práce. Mé poděkování patří také Mgr. Liboru Kolesárovi za vše, co mě v daném oboru naučil, za jeho podněty a připomínky k dané práci a za veškerý čas, jež mi věnoval. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodičům, kteří mi umožnili studovat a celou dobu během mých studií mě podporovali.

Eva Slimáčková

Abstract:

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), extrinsic allergic alveolitis (EAA) and sarcoidosis are interstitial lung diseases (ILD) of distinct pathogenesis. While IPF represents primarily fibrosing lung disorder of unknown etiology with dominant Th2 cytokine milieu, sarcoidosis is a systemic disease presenting with noncaseating granulomas and Th1 cytokine pattern. EAA develops after repeated exposure to inhalation antigens, and can present either with a granulomatous formation or progressive pulmonary fibrosis according to the stage of the disease and relationship between antigen exposure and immune system status.

Th1/Th2 imbalance is dominant feature of these ILDs and we suppose that the susceptibility to them could be genetically encoded in cytokine gene polymorphisms. Cytokine gene polymorphisms could influence cytokine protein expression, which might lead to imbalance of Th1/Th2 immune reactions. Enhanced Th2 type cytokine production might induce the alternative activation of alveolar macrophages (AM), with consequent stimulation of collagen production by fibroblasts. The way from gene to protein leads through messenger RNA (mRNA) expression. Results of the pilot studies suggest that expression profiling could help to identify pathways relevant to pathogenesis of these disorders. The aim of our study was to elucidate possible pathogenic pathways of ILDs, from cytokine genes through mRNA to localized proteins expressions. We think that this kind of approach could help us to better understand ILDs pathogenesis.

Abstrakt:

Idiopatická plicní fibróza (IPF), exogenní alergická alveolitida (EAA) a sarkoidóza jsou intersticiální plicní procesy (IPP) s odlišnou patogenezi. Zatím co IPF představuje primární fibrotizující plicní onemocnění s neznámou etiologií s převažujícím Th2 cytokinovým prostředím, sarkoidóza je systémové onemocnění charakterizované přítomností nekaseifikujících granulomů a Th1 cytokinovou odpovědí. EAA se vyvíjí po opakované expozici inhalovaného antigenu, a může být prezentována buď vznikem granulomu nebo progresivní plicní fibrózou v závislosti na stádiu onemocnění a vztahu mezi expozicí antigenu a stavem imunitního systému.

Th1/Th2 nerovnováha je dominantním znakem těchto IPP a dle naší předpokladů, náchylnost k daným onemocněním by mohla být geneticky zakódována v genových polymorfismech cytokinů. Cytokinové genové polymorfismy mohou ovlivňovat expresi cytokinových proteinů, což může vést k nerovnováze Th1/Th2 imunitních reakcí. Zvýšená produkce cytokinů Th2 skupiny může indukovat alternativní aktivaci alveolárních makrofágů (AM) s následnou stimulací fibroblastů k produkci kolagenu. Cesta od genu k proteinu vede přes expresi mRNA. Výsledky pilotních studií naznačují, že expresní profil by mohl identifikovat cestu k patogenezi těchto onemocnění. Cílem naší studie bylo objasnit možné patogenetické cesty vedoucí k IPP, od cytokinových genů, přes mRNA k lokalizaci proteinové exprese. Domníváme se, že tímto způsobem budeme schopni lépe porozumět patogenezi IPP.

Obsah

1. Úvod do problematiky a hlavní cíle práce.....	8
2. Intersticiální fibrotizující plicní procesy	9
2.1 Idiopatická plicní fibróza (Kryptogenní fibrotizující alveolitida).....	12
2.1.1 Etiologie.....	12
2.1.2 Klinické projevy.....	12
2.1.3 Výskyt a diagnostika.....	13
2.1.4 Léčba.....	13
2.2 Sarkoidóza.....	15
2.2.1 Etiologie.....	15
2.2.2 Stádia onemocnění.....	15
2.2.3 Klinické projevy.....	15
2.2.4 Diagnostika	16
2.2.5 Výskyt.....	16
2.2.6 Léčba.....	16
2.3 Exogenní alergická alveolitida (EAA).....	17
2.3.1 Etiologie.....	17
2.3.2 Stádia onemocnění.....	17
2.3.3 Klinické projevy.....	17
2.3.4 Diagnostika.....	17
2.3.5 Léčba.....	18
3. Cytokiny plicních fibrotizujících procesů.....	19
3.1 Obecný úvod.....	19
3.2 Role cytokinů v plicních fibrotizujících procesech.....	21
3.2.1 Rodina interleukinu 1 (IL-1).....	22
3.2.2 Tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α).....	24
3.2.3 Transformující růstový faktor beta (TGF- β).....	25
3.2.4 Interleukin-2 (IL-2).....	26
3.2.5 Interleukin-4 (IL-4).....	27
3.2.6 Interleukin-6 (IL-6).....	28
3.2.7 Interleukin-10 (IL-10).....	29
3.2.8 Interleukin-12 (IL-12).....	30
3.2.9 Interferon gamma (IFN- γ).....	31
4. Genetika plicních fibrotizujících procesů.....	32
4.1 Obecný úvod.....	32
4.2 Genová exprese u plicních fibrotizujících procesů.....	33
4.3 Genové polymorfismy cytokinů u plicních fibrotizujících procesů.....	34
4.3.1 Rodina TNF- α	35
4.3.2 Rodina IL-1.....	35
4.3.3 Rodina IL-2.....	35
4.3.4 Rodina TGF- β	36
4.3.5 Rodina IFN- γ	36
4.3.6 Rodina IL-10.....	37
4.3.7 Rodina IL-6.....	37
4.3.8 Rodina IL-4.....	38
4.3.9 Rodina IL-12.....	38

5. Metodická část.....	39
5.1 Izolace RNA z BALT použitím EZ1 RNA Univerzal Tissue Kit (Qiagen).....	39
5.1.1 Odběr materiálu.....	39
5.1.2 Izolace celkové RNA z BALT použitím EZ1 RNA Univerzal Tissue Kit. .	40
5.2 Real-time PCR s použitím komerční soupravy Human Common Cytokines RT ² Profiler™ PCR Array.....	42
5.2.1 Reverzní transkripce RNA do cDNA.....	43
5.2.2 Real-time PCR.....	43
5.2.3 Hodnocení dat.....	44
5.3 Genotypizace cytokinů.....	45
5.3.1 Odběr materiálu.....	45
5.3.2 Izolace DNA z krve soupravou EZ1 DNA Blood 350 µl Kit.....	45
5.3.3 Analýza polymorfismů cytokinových genů.....	45
6. Výsledky.....	47
6.1 Genové polymorfismy cytokinů.....	47
6.1.1 Charakteristika vyšetřovaných skupin.....	47
6.1.2 Demografická data vyšetřovaných skupin a buněčný rozpočet v BALT....	48
6.1.3 Genové polymorfismy cytokinů – výsledky měření.....	49
6.1.3.1 Genové polymorfismy IL-4	50
6.1.3.2 Genové polymorfismy IL-10.....	52
6.1.3.3 Genové polymorfismy IL-6	53
6.2 Genová exprese cytokinů.....	54
6.2.1 Charakteristika vyšetřovaných skupin.....	54
6.2.2 Zastoupení jednotlivých buněčných populací v BALT.....	55
6.2.3 Exprese cytokinových genů v BALT -výsledky měření.....	56
7. Diskuze.....	58
8. Závěr.....	69
9. Seznam použitých zkratk.....	70
10. Příloha.....	73
11. Literatura.....	77

1. Úvod do problematiky a hlavní cíle práce

Intersticiální plicní procesy (IPP) jsou heterogenní skupinou postižení dýchacího ústrojí, která je charakterizována akutním i chronickým zánětem a obvykle irreverzibilním procesem fibrózy intersticia a alveolárních prostor (Schwarz et al, 2003).

Fibróza je patologický proces, který postihuje plicní tkáň. Dochází k poškození přirozené architektiky plic a nahrazení fibrotickou tkání. Vzniklé změny jsou nevratné a projeví se postupnou redukcí plicní tkáně, jež už není schopna výměny dýchacích plynů. Pacient tento stav pocítí jako narůstající zhoršení dýchacích funkcí, které může skončit až stavem, kdy je jediným řešením transplantace plic.

Vyvolávající stimul je u tohoto procesu neznámý. Nicméně je známa celá řada faktorů, jež se na tomto procesu podílí. Jsou to faktory, které vyvolávají tkáňovou remodelaci, proliferaci fibroblastů a ukládání extracelulární matrix. Jedná se o mechanismy zahrnující koagulační systém, oxidačně/antioxidační rovnováhu, reakce jednotlivých buněčných populací. Zcela nepochybně v tomto procesu hrají roli i cytokiny, na něž jsme se zaměřili v naší studii.

Vycházíme z hypotézy, že plicní fibrotické procesy mohou být charakterizovány různými genovými expresními znaky, které ve svém důsledku modifikují proces vedoucí k plicní fibróze a určují heterogenitu klinického obrazu fibrotizujících plicních procesů. Očekáváme, že tyto specifické znaky by mohly vést v ideálním případě k identifikaci nových biomarkerů s cílem lépe diagnostikovat a klasifikovat tato onemocnění. Často je totiž problém dle klinických projevů a histologického nálezu určit, o které onemocnění se skutečně jedná, jelikož mají velice obdobný obraz postižení.

Na rozdíl od většiny studií jsme se rozhodli sledovat genovou expresi v bronchoalveolární tekutině (BALT) odebrané během bronchoskopie. Předpokládáme, že budeme tak schopni lépe zhodnotit aktuální stav fibrotického procesu v plicích a určit prognózu onemocnění z tekutiny, získané přímo z pacientových plic. V BALT se nacházejí buňky, jež sekretují celou řadu látek, včetně cytokinů, a demonstrují průběh daného onemocnění. Změnou genové exprese cytokinů může být ovlivňován i jejich genový polymorfismus a následně jejich proteinová hladina či funkční aktivita. Změny v cytokinových hladinách by mohly ovlivňovat i hladiny chemokinů v cílových tkáních a orgánech a vést k aktivní fibroprodukcii jako odpovědi na sice neznámý, ale pravděpodobně společný stimul.

2. Intersticiální fibrotizující plicní procesy

Intersticiální plicní procesy (IPP) jsou heterogenní skupinou postižení dýchacího ústrojí, která je charakterizována akutním i chronickým zánětem a obvykle irreverzibilním procesem fibrózy intersticia a alveolárních prostor (Schwarz et al, 2003). Plicní intersticiium je prostor ohraničený endotelovými buňkami plicních kapilár a alveolárním epitelem, perilymfatické a perivaskulární interseptální prostory a centrálněji uložené peribronchiální prostory. Ve většině případů jsou však zároveň postižené i samotné alveoly.

Za normálních okolností plicní intersticiium obsahuje elementy plicní pojivové tkáně: kolagen, elastin a fibrily retikulinu, matrix složenou s glykosaminoglykanů, polysacharidů a nekolagenních proteinů fibronektinu a lamininu. Buněčná složka je minimální, malé množství makrofágů, mastocystů, plazmatických buněk, fibroblastů a myofibroblastů (Vašáková, Vnitřní lékařství IIIA, 2001).

Dojde-li k poškození plicních sklípků a plicního intersticia neznámým insultem, dochází v první fázi k akumulaci leukocytů a k množení regenerujících buněk, pneumocytů II. typu a fibroblastů, které indukují tvorbu extracelulární matrix. V druhé fázi se zvyšuje množství monocytů a makrofágů. Při zhojení ad integrum dochází k rychlému poklesu neutrofilů a v místě poškození zůstávají pouze makrofágy. Může ovšem dojít k imunopatologické reakci vedoucí k nekontrolovatelné fibroprodukcí a k destrukci plicní architektiky, jako u idiopatické plicní fibrózy. V tomto případě neutrofilů zůstávají déle a navíc se objevují další buňky imunitního systému, jako T a B lymfocyty a plazmatické buňky produkující celou řadu profibrotických faktorů, včetně cytokinů (Obr.1).

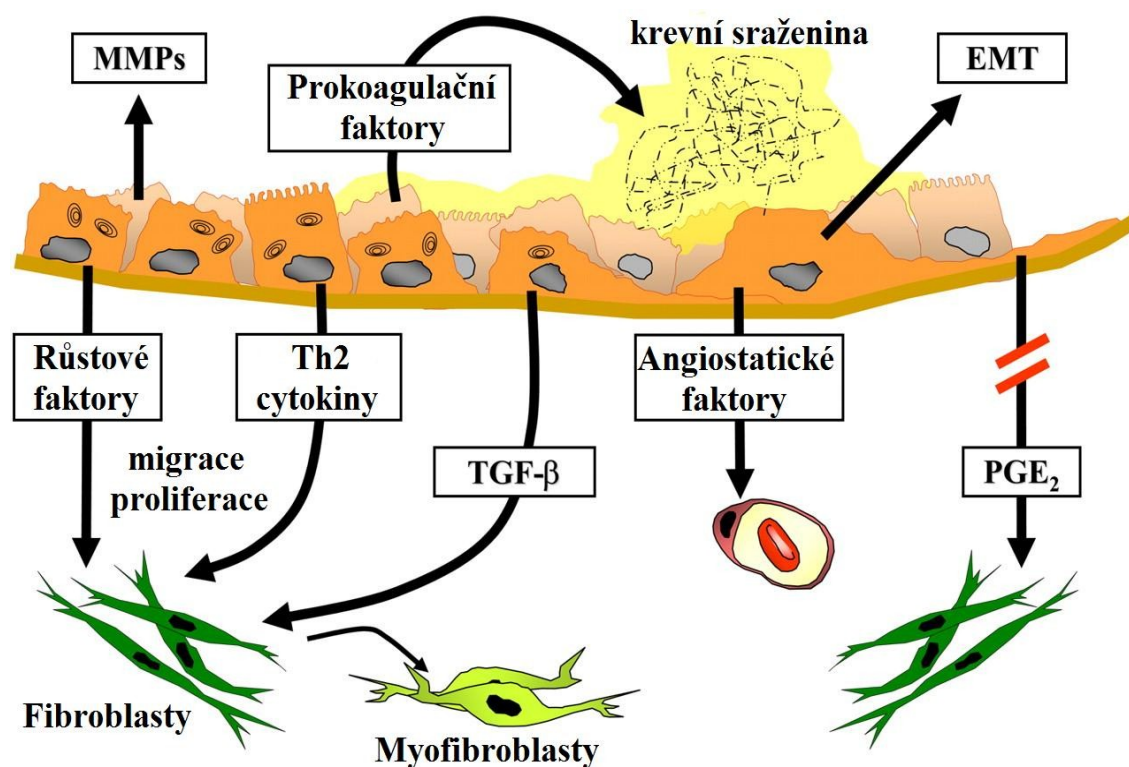
IPP mají nejednotnou etiologii, ale často sdílejí stejný vzorec postižení fyziologických funkcí. Jsou funkčně charakterizovány restriktivní ventilační poruchou s projevující se redukcí plicní poddajnosti, což je způsobeno ztrátou plicního objemu, redukovanou roztažitelností alveolů a změnami v elastických vlastnostech plíce či zvýšení povrchového napětí v alveolech.

Statické plicní objemy jsou u IPP v typických případech redukovány, ale v počátečních stádiích může být hodnota vitální kapacity (VC) v normě. Dynamické spirometrické hodnoty, měřící funkci dýchacích cest, jsou u IPP obvykle normální. Ovšem charakteristickým nálezem u většiny IPP je porucha výměny plynů projevující se klidovou hypoxemií a zvýšeným alveoloarteriálním kyslíkovým gradientem.

Při diagnostice IPP mají nezastupitelnou roli zobrazovací techniky. V první řadě je to radiologické zobrazení, a to zadopřední skiagram hrudníku, ale podstatně více informací o postižení intersticia nám dá výpočetní tomografie hrudníku s vysokou rozlišovací schopností (HRCT). Dalším důležitým vyšetřením je bronchoalveolární laváž a plicní biopsie-bronchoskopická (transbronchiální) nebo chirurgická.

Přepokládá se, že prevalence IPP je podstatně vyšší než je statisticky hlášeno, protože řada onemocnění není pravděpodobně vůbec rozpoznána. Celosvětově je prevalence odhadována na 13-20/100.000 obyvatel a incidence 7-11/100.000 obyvatel (Coultas et al., 1994).

Výskyt IPP může být asociován i s jiným onemocněním (Tab.1). V naší studii jsme se zaměřili převážně na 3 onemocnění, která se projevují v různých stádiích různým stupněm fibrotizace plicní tkáně. Následující kapitola bude stručně pojednávat o základních charakteristických znacích těchto tří chorob. Jedná se o idiopatickou plicní fibrózu, sarkoidózu a exogenní alergickou alveolitidu.



Obr. 1: Schema vývoje plicní fibrózy.

Aktivované epiteliální buňky sekretují řadu mediátorů, které vytváří silně profibrotické mikroprostředí. EMT=epithelialni-mesenchymalni přechod; MMPs=matrix metaloproteinázy, PGE₂=prostaglandin-2, TGF-β=transformující růstový faktor, Th2=T-helper lymfocyty, 2.typu.

Upraveno dle Selman a Pardo, 2006.:

<http://pats.atsjournals.org/cgi/content/full/3/4/364>

Tab.1: Klasifikace IPP dle klinických symptomů nebo podle histopatologických nálezů
(příklady z Schwarz MI, King TE, Intestinal Lung Disease):

Smíšená onemocnění pojiva spojená s IPP:
<ul style="list-style-type: none"> • Revmatoidní artritida • Systémový lupus erythematoses • Sklerodermie • Primární Sjögrenův syndrom • Smíšené onemocnění pojiva
Léky a léčebné modalities spojené s IPP:
<ul style="list-style-type: none"> • antibiotika (cefalosporin, monocyklin, sulfasalazin...) • protizánětlivé léky (penicilinamin, nesteroidní antihistaminika...) • chemoterapeutika, protinádorové léky • neurotropní, psychotropní léky (fluoxetin, dilantin, antidepresiva...) • radiace • kyslík
IPP spojené s expozicí antigenům profesionálního prostředí nebo životního prostředí:
<ul style="list-style-type: none"> • exogenní alergická alveolitida (EAA) • silikóza, azbestóza, berylióza • fibróza z tvrdých kovů • nemoc chovatelů ptáků, chovatelů kuřat, chovatelů holubů, farmářská plíce, plíce pěstitelů tabáku, plíce zpracovatelů ryb, plíce kožešníků, plíce pěstitelů žampionů, plíce mlynářská, plíce laboratorních pracovníků...
Autoimunitní choroby spojené s IPP:
<ul style="list-style-type: none"> • Autoimunitní hemolytická anemie • Idiopatické střevní záněty • Celiakie • Chronická aktivní hepatitida
IPP primární nebo spojené s jinými nemocemi:
<ul style="list-style-type: none"> • Sarkoidóza • Idiopatická plicní fibróza (IPF) • IPP spojené s Diabetes mellitus

2.1 Idiopatická plicní fibróza (Kryptogenní fibrotizující alveolitida)

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je závažným onemocněním s nepříznivou prognózou, se středním přežitím pacientů navzdory léčbě 3-5let (Grutters, 2005). Etiologie a patogeneze onemocnění není zatím plně objasněna, nicméně se předpokládá, že příčinou fibroprodukce, jako odpovědi na neznámý vyvolávající insult, může být nerovnováha imunitní odpovědi, ve smyslu Th2 typu. Sklon reagovat Th2 typem imunitní odpovědi může být zakotven v genetickém kódu, a to v oblasti genů pro cytokiny (Marshall, 1997).

2.1.1 Etiologie

Dříve se předpokládalo, že IPF vzniká jako reakce na zánětlivý proces, jenž přešel do chronického stádia a posléze vedl k fibrotickému poškození (Müller et al, 1997). Pokud by byl chronický zánět přerušen ještě před samotným irreverzibilním poškozením plicní tkáně, bylo by možné se vyhnout další progresi a zamezit vzniku fibrotického procesu. z tohoto důvodu byly a stále jsou předepisovány protizánětlivé léky, kortikosteroidy a imunosupresiva, ovšem bez většího úspěchu (Gross TJ a Hunninghake GW, 2001).

Dnes je ovšem přijímána nová teorie a to, že neznámý stimul způsobuje opakované poškození plicní výstelky vyúsťující v nekontrolovatelné a progredující jizvení. Zánět je až sekundární reakcí. Léčba dle této teorie by měla vycházet primárně ze zabránění zvýšené produkce vaziva.

Důležitou roli v tomto procesu hraje i imunitní systém jedince reagující převážně Th2 odpovědí. Alveolární makrofágy jsou prostřednictvím skupiny Th2 cytokinů alternativně aktivovány a zvyšují produkci fibronektinu a tím i fibrogenezi ve fibroblastech. Během této aktivace makrofágy produkují i zvýšené množství chemokinu CCL18 (Prase et al, 2006).

2.1.2 Klinické projevy

IPF se klinicky projevuje progredující námahovou a posléze klidovou dušností. U některých pacientů může dojít k tzv. akutní exacerbaci IPF, která se projevuje náhlým klinickým zhoršením s poklesem plicních funkcí a radiologickým nálezem tzv. mléčného skla svědčícím pro alveolitidu (Ambrosini et al, 2003).

Někteří pacienti mají i makroskopicky patrné změny fenotypové, jako prsty s nehty tvaru hodinového sklíčka (Obr.2) a poslechový fenomén krepitu slyšitelný nad plicními bázemi.

Radiologický nález je charakterizován pruhovitými opacitami až obrazem voštinovité plíce, typicky je patrné zmenšení plicních polí. Nález v BAL je charakterizován zvýšením granulocytů a minimálním zvýšením lymfocytů, příměs eosinofilů svědčí pro horší prognózu.

Pro potvrzení diagnózy při atypické manifestaci onemocnění, nejasných klinických projevech a radiologickém obrazu, se přistupuje k plicní biopsii ukazující patologicko-anatomický obraz postižení.

2.1.3 Výskyt a diagnostika

Diagnostika IPF se opírá o kritéria daná American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS) (International Consensus statement: Idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161;646-664) (Tab.2). Zakládá se na anamnéze, klinických symptomech, radiologickém nálezu, HRCT, bronchoskopii s odběrem BAL, histologickém obrazu z plicní biopsie a laboratorních testech. Přesto je toto onemocnění značně poddiagnostikováno. Prevalence IPF je celosvětově odhadována na 13-20/100 000, incidence 7-11/ 100 000 a stoupá s věkem. Nejčastější pacienti jsou v rozmezí 40-70 let, asi dvě třetiny jsou nad 60 let. Nepatrně vyšší je výskyt u mužů. Celosvětový výskyt nemá žádné geografické umístění, nesouvisí ani s rasou nebo etnikem.

2.1.4 Léčba

Ačkoliv z patogeneze onemocnění vyplývá, že zánět není hlavní patofyziologickým podkladem, obvyklou léčbou bývá kombinace kortikoidů (prednison) + azathioprinu + cyklofosfamidu. Racionálním by se tedy zdálo použití antifibrotických léků (kolchicinu, D-penicilaminu), nicméně nebyl prokázán jejich pozitivní efekt oproti placebo. Nyní se testují léčiva založená na imunomodulačním účinku IFN-1b (viz. Kapitola Cytokiny). V pokročilých stádiích onemocnění s respirační insuficiencí se pacientům poskytuje trvalá léčba kyslíkem. Při zhoršení stavu se uvažuje o transplantaci.

Tab.2 : Kritéria ATS/ERS pro stanovení diagnózy IPF

V případě chirurgické plicní biopsie s nálezem obvyklé intersiciální pneumonitidy
<ul style="list-style-type: none">• vyloučení jiných příčin difuzního plicního onemocnění• restriktivní ventilační porucha, zvýšený poměr FEV1/FVC a (nebo) izolované postižení výměny krevních plynů• typické abnormality na RTG a HRCT hrudníku
V případě chybění chirurgické plicní biopsie s nálezem obvyklé intersiciální pneumonitidy
Hlavní kritéria (musí být splněna všechna):
<ul style="list-style-type: none">• vyloučení jiných příčin difuzního plicního onemocnění• restriktivní ventilační porucha, zvýšený poměr FEV1/FVC a (nebo) izolované postižení výměny krevních plynů• bibasilární retikulární změny s voštinovitou plicí a málo nebo žádné změny typu ground glass na CT• transbronchiální biopsie nepotvrzuje jinou diagnózu nebo granulocytární bronchoalveolární laváž
Vedlejší kritéria (musí být splněna za $\frac{3}{4}$):
<ul style="list-style-type: none">• věk nad 50 let• pozvolný nárůst dušnosti• trvání obtíží déle než 3-6 měsíců• bilaterální bazální chrůpky



Obr. 2: Prsty s nehty tvaru hodinových skliček
Upraveno dle výukových materiálů 2.LF UK:
http://www.lf2.cuni.cz/projekty/interna/zof/vysetreni/srdce_i.htm

2.2 Sarkoidóza

Systémové onemocnění charakterizované přítomností nekaseifikujících epiteloidních granulomů, ale může se projevit nekróza fibrinoidní s následnou resorbí nebo vznikem centrální hyalinní fibrózy. Často se vyskytuje v kombinaci s postižením jiných orgánů (kůže, kloubů, oka, lymfatických uzlin, jater, sleziny, svalů, srdce, nervového systému atd.). Plíce bývají postiženy v 90% případů.

2.2.1 Etiologie

Příčina onemocnění je nejasná. Předpokládá se reakce organismu na antigeny, které se do plic dostávají inhalační cestou. Může se jednat o infekční agens (mykobakterie, mykoplazmata, viry), ale i některé rostlinné nebo anorganické látky.

V postižené tkáni dochází ke vzniku granulomu, jenž je tvořen zánětlivými buňkami, převážně transformovanými makrofágy na obrovské mnohojaderné epiteloidní buňky. V centru granulomu se pak akumulují CD4⁺ T lymfocyty, zatímco cytotoxické CD8⁺ T buňky jsou na okrajích spolu s fibroblasty. Vzniká oligoklonální buněčná odpověď ovlivněna cytokiny Th1 skupiny (reakci podporují IL-12, IL-18, INF- γ a TNF- α , naopak ji tlumí TGF- β).

2.2.2 Stádia onemocnění

Jednotlivá radiologická stádia onemocnění jsou charakterizována v závislosti na míře a typu postižení plicní tkáně (Tab.3):

Tab.3 : Charakteristika jednotlivých radiologických stádií sarkoidózy

I.stádium	hilová a mediastinální lymfadenopatie bez postižení plic
II.stádium	první znatelné změny ve smyslu plicního granulomatózního zánětu
III.stádium	začínají být patrné i různé stupně plicní fibrózy
IV.stádium	pouze fibrotické změny

2.2.3 Klinické projevy

Akutní fáze (Löfgrenův syndrom) je charakterizována horečkami, bolestmi kloubů (polyartritida), kožními projevy (erythema nodosum) a ztrátou reaktivity na tuberkulin. V chronické fázi se u většiny nemocných sarkoidóza projevuje celkovými příznaky jako únavou, nechutenstvím, zvýšenou teplotou. Častý je kašel a námahová dušnost.

2.2.4 Diagnostika

Diagnóza se opírá o kritéria daná American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and Granulomatous Disorders statement on sarcoidosis (WASOG). Opět je založena na anamnéze, klinických symptomech, radiologickém nálezu, HRCT, bronchoskopii s odběrem BAL, histologickým nálezem a laboratorních testech. V bronchoalveolární laváži nacházíme zpravidla převahu CD4⁺T lymfocytů. Důležité jsou histologicky doložené granulomatózní změny na postižených tkáních. Pacienti navíc podstupují transbronchiální biopsii, nebo transbronchiální punkci lymfatických uzlin, či videothorakoskopické vyšetření, jež potvrdí jejich diagnózu s velkou pravděpodobností.

Velmi typický nález pro sarkoidózu je porucha metabolismu vápníku, hyperkalcémie a hyperkalciurie. Zprvu převládala domněnka, že jde o zvýšenou citlivost k vitamínu D₃, až do chvíle kdy Adams et al., 1983 podali přesvědčivý důkaz o tom, že aktivované makrofágy jsou schopné metabolizovat v kultuře 25-hydroxycholekalCIFerol na 1,25-dihydroxykalciferol (kalcitriol), což je aktivní forma vitamínu D₃. Navázáním kalcitriolu na lymfocytární receptory dochází ke tvorbě produkce řady cytokinů, které ovlivňují průběh granulomatózního zánětu (Reichel et al, 1989).

U pacientů se sarkoidózou detekujeme také zvýšenou hladinu sérového ACE (angiotenzin konvertujícího enzymu). ACE se podílí na přeměně angiotenzinu I na angiotenzin II a tím pádem i nepřímo na zvýšení krevního tlaku.

2.2.5 Výskyt

Sarkoidóza častěji postihuje ženy než muže a mezi postiženými je převaha nekuřáků. Nejvyšší výskyt je ve věku 30-50 let, děti bývají postiženy vzácně. Nebyla prokázána žádná souvislost výskytu sarkoidózy s ohledem na rasu či kontinentální rozmístění.

2.2.6 Léčba

Vzhledem k tomu, že u některých nemocných dochází k spontánní remisi je vhodné u asymptomatických stádií I. a II. s léčbou vyčkat 6 a více měsíců. Indikací k neodkladnému zahájení léčby je uveitida (zánětlivé oční onemocnění uveyduhovky, cévnatky a řasnatého tělíška), neurologické postižení, sarkoidóza srdce, hyperkalcémie, symptomatické a progredující plicní stádium II. a III. Lékem první volby bývá prednison.

2.3 Exogenní alergická alveolitida (EAA)

Granulomatózní plicní postižení vyvolané pozdní přecitlivělostí na inhalované organické antigeny. Může se jednat o termofilní aktinomycety, plísňe, různé živočišné a rostlinné proteiny a chemikálie. Vzhledem k možné expozici antigenům v pracovním prostředí se může jednat i o profesionální onemocnění (farmářská plíce, plíce holubářů, plíce pěstitelů žampionů...atd.)

2.3.1 Etiologie

Důležitou roli zde hraje imunologická vnímavost postiženého vedoucí k imunopatologické reakci pozdní přecitlivělosti se sklonem ke granulomatóznímu zánětu. Spouštěcím mechanismem je tedy opakovaný kontakt a senzibilizace k antigenu.

2.3.2 Stádia onemocnění

Tab.4: Charakteristika jednotlivých typů EAA

akutní EAA	po masivním kontaktu s daným antigenem, po ukončení expozice spontánně ustupuje. Převažuje postižení imunokomplexy a látkami uvolněnými z aktivovaných neutrofilů.
subakutní EAA	po opakovaném setkání, zřídka ustupuje spontánně, ale lze ovlivnit léčbou. V této a následně chronické fázi hraje roli opožděný typ přecitlivělosti zprostředkovaný T lymfocyty.
chronická EAA	chronická expozice, irreverzibilní změny v plicním parenchymu

2.3.3 Klinické projevy

U akutní EAA dochází po 4-12 hod od expozice s antigenem ke kašli, horečkám, zimnici, dušnosti. U subakutní a chronické EAA je začátek pozvolný- kašel, únava, pozvolna narůstající námahová dušnost. Může nastat i váhový úbytek.

2.3.4 Diagnostika

Diagnóza se opírá o průkaz expozice antigenu v pracovním nebo domácím prostředí, o klinický obraz, radiologický nález a nález v BAL event. plicní biopsii.

Při akutní formě je výrazná leukocytóza s neutrofilii (u chronické mírná). V bronchoalveolární laváži nacházíme převahu CD8⁺ T lymfocytů.

Dochází k vzestupu imunoglobulinů (především IgG, ne IgE), detekujeme i přítomnost precipitujících protilátek v séru proti vyvolávajícímu antigenu (ne vždy a ne při léčbě kortikoidy). Rentgenový obraz plic je v akutní fázi normální, popřípadě se zde vyskytují jen drobná ložiska ev. migrující infiltráty. Je pravděpodobné, že pacienti s akutní formou EAA reagují na expozici inhalačního antigenu rozvojem Th1 imunitní odpovědi (Šterclová, Vašáková, 2008).

Chronicky probíhající formu EAA je někdy velmi těžké odlišit od idiopatické plicní fibrózy. Projevuje se snížením vitální kapacity plic, poruchou difuze, příznaky arteriální hypoxémie a nepřehlédnutelným radiologickým nálezem, který se může blížit obrazu IPF. Histologické nálezy u chronických forem EAA korelují s prognózou nemocných. Zohledňují rozsah fibrózy versus rozsah reverzibilních změn.

2.3.5 Léčba

V akutním stádiu obvykle stačí zabránit další expozici antigenu, při těžším průběhu se používají kortikosteroidy. V chronickém stádiu je léčba kortikosteroidy méně úspěšná a při nedostatečné odpovědi na steroidní léčbu se zahajuje kombinovaná léčba kortikosteroidy a imunosupresívy. Specifická hyposenzibilizační léčba není v tomto případě účinná.

3. Cytokiny plicních fibrotizujících procesů

3.1 Obecný úvod

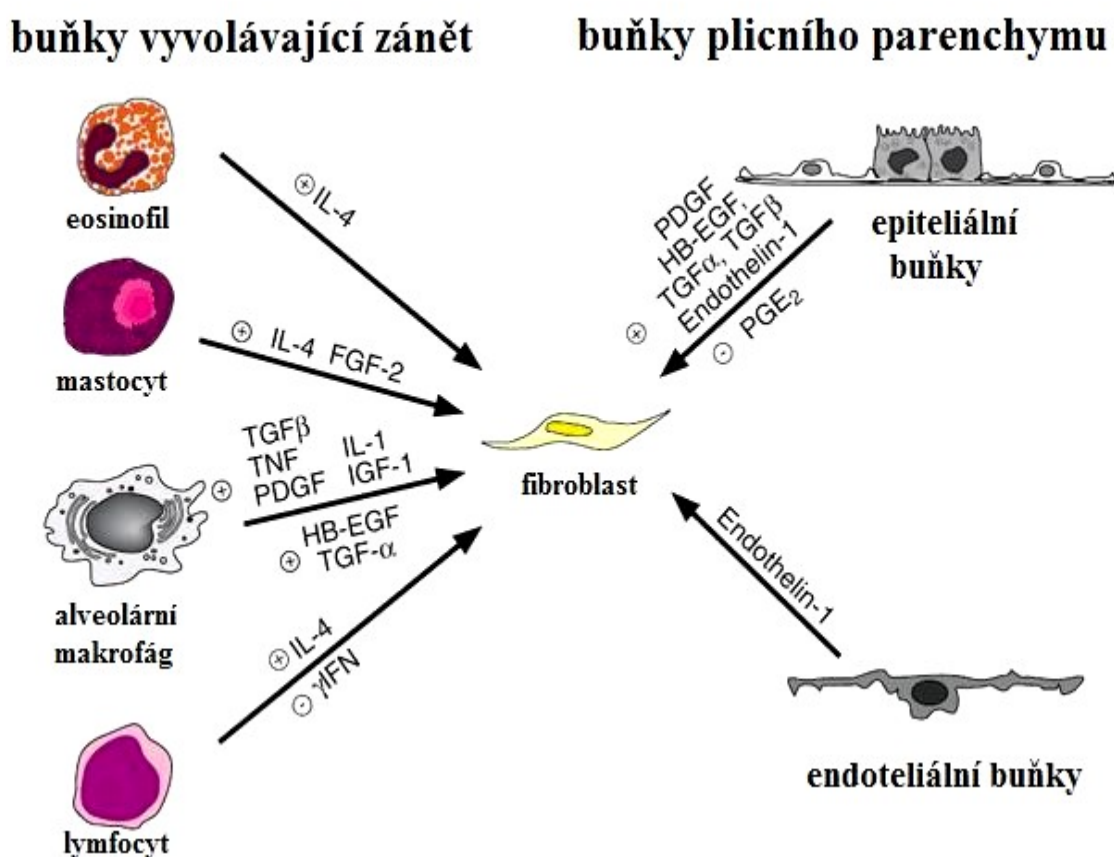
Cytokiny jsou základními regulátory imunitního systému. Jedná se o relativně malé proteiny, které jsou produkovány nejen leukocyty, ale i jinými buňkami. pro jejich působení je nezbytná vazba na příslušný receptor. Vyznačují se pleiotropním, synergickým a redundantním účinkem. Lze je klasifikovat dle různých kritérií: například dle struktury, dle funkce, dle buněk, které je produkují.

V naší studii jsme se blíže zaměřili na rozdělení Th1/Th2 skupiny cytokinů, a to z důvodu, že nerovnováha mezi těmito dvěma skupinami cytokinů je podkladem pro imunopatologický vývoj řady onemocnění včetně intersticiálních plicních procesů (IPP).

Základní dělení cytokinů dle lymfokinové aktivity a sekretovaných proteinů na Th1 (IFN- γ , IL-2) a Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) skupinu poprvé provedl Mosmann et al. V roce 1986 a záhy také popsal vliv nerovnováhy Th1/Th2 cytokinů na rozvoj a průběh imunopatologických stavů. Později se jednotlivé skupiny rozšířily o další cytokiny, dnes mezi Th1 cytokiny řadíme: IFN- γ , IL-2, TGF- β a mezi skupinu Th2: IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13. Také Th buňky získaly „nové“ členy: například Th3 lymfocyty produkující převážně TGF- β , Th17 lymfocyty, které svůj název získaly díky produkci IL-17. Už nyní je ale zřejmé, že toto rozdělení není zcela striktní a že jednotlivé cytokiny díky svému pleiotropnímu účinku mohou mít za různých podmínek různé funkce.

Th1 skupina cytokinů se podílí na obraně zejména proti intracelulárním parazitům, tím, že stimuluje makrofágy (především IFN- γ), a tak nepřímo podporuje fagocytózu a pomáhá při tvorbě zánětu. Th2 cytokiny se uplatňují v boji proti extracelulárním patogenům a proti mnohobuněčným parazitům. Účastní se reakcí, které vedou k silné produkci protilátek a aktivaci eosinofilů. Vzájemně tyto dvě skupiny cytokinů působí antagonisticky a inhibují produkci cytokinů druhé skupiny. Interferon- γ (IFN- γ), jakožto typický produkt Th1 buněk, dokáže potlačit účinek interleukinu 4 (IL-4) a tím pádem i diferenciaci v Th2 směru. Tento vztah působí i opačně, tzn. že IL-4 inhibuje Th1 cytokinovou diferenciaci. Opět zde záleží na mnoha vedlejších faktorech, jako hladiny ostatních cytokinů, zralost či přítomnost dalších buněk (např. makrofágů), jež poskytují T lymfocytům cytokiny potřebné k jejich diferenciaci a kostimulační signály nezbytné k jejich aktivaci.

Při nerovnováze Th1/Th2 hladiny cytokinů může dojít k rozvoji celé řady imunopatologických stavů. Převažuje-li Th1 cytokinová odpověď, může to vést k rozvoji autoimunitních onemocnění, jako je Crohnova choroba, ulcerózní kolitida atd., naopak nadprodukce Th2 se může projevit jako alergické onemocnění (astma, atopická dermatitida) nebo chronické fibroproliferativní stavy (IPF, systémová skleróza) (Romagnani, 1999).



Obr.3: Schema zobrazující patogenezi plicní fibrózy.

Buňky plicního parenchymu i buňky vyvolávající zánět produkují řadu faktorů stimuluji proliferaci fibroblastů: IL-4=interleukin-4, IL-1=interleukin-1, FGF-2=růstový faktor fibroblastů, TGF-β= transformující růstový faktor beta, TNF-α=tumor nekrotizující faktor alfa, PDGF=destičkový růstový faktor, IGF=inzulinový růstový faktor, HB-EGF= heparin vázající epidermální růstový faktor. Cytokiny s opačným antifibrotickým účinkem: IFN-γ=interferon gamma; PGE2=prostaglandin E2.

Upraveno dle Manson et al.(1999):

<http://www.nhlbi.nih.gov/meetings/workshops/ipf-sum.htm>

3.2 Role cytokinů v plicních fibrotizujících procesech

Cytokinová nerovnováha se projevuje v celé řadě intersticiálních plicních procesů, které mohou vyústit v progresivní fibrotizující proces s následnou devastací architektury plicní tkáně a postupnou ztrátou funkce plic.

Th1/Th2 paradigma platí i u sarkoidózy. Mění se cytokinové prostředí ovlivňuje formaci granulomů a rozvoj plicní fibrózy. Pokud na počátku převažuje Th1 odpověď, dochází ke kompartmentalizaci T lymfocytů, tvorbě granulomu a inhibici fibrogenese. Kromě stimulace tvorby granulomů vedou také Th1 cytokiny, IFN- γ a IL-2, k rozvoji alveolitidy. Pokud u nemocného dojde na počátku k převaze produkce Th2 cytokinů, rozvíjí se plicní fibróza. U nemocných se sarkoidózou byla prokázána vyšší exprese TNF ligandů a receptorů T lymfocyty a také vyšší exprese IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, IL-18, TNF- α a GM-CSF alveolárními makrofágy. Přechod k plicní fibróze zajišťují zejména fibrogenní cytokiny TGF- β , PDGF a IGF-I.

U exogenní alergické alveolitidy (EAA) vede počáteční produkce Th1 cytokinů k rozvoji hypersenzitivní reakce a antigen specifické imunitní odpovědi. Její chronická forma může být charakterizována rozsáhlou fibrózou, kdy granulomatózní formace charakterizující Th1 odpověď postupně mizí. (Schuyler et al., 2000; 2003).

U idiopatické plicní fibrózy (IPF) je předpokládán primární vliv Th2 odpovědi a na rozdíl od předešlých dvou onemocnění je zde fibróza jevem prvotním. U tohoto onemocnění jsou alveolární makrofágy alternativně aktivovány prostřednictvím Th2 cytokinů. Zvyšují produkci fibronektinu a tím podporují i fibrogenesi ve fibroblastech a dochází tak k rozvoji plicní fibrózy.

Zdá se tedy, že cytokinový profil uplatňující se při imunitní odpovědi určuje fenotyp choroby, který následně zodpovídá za uzdravení ad integrum nebo progresi do fibrózy. Následující kapitola bude pojednávat o jednotlivých skupinách cytokinů, které mohou ovlivňovat fibrotizaci v plicích a kterými jsme se zabývali i v naší studii. Jedná se o interleukiny IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, dále o TNF- α , TGF- β a IFN- γ . Nicméně nesmíme zapomenout, že na tomto procesu se podílí ještě celá řada dalších složek, jako chemokiny, angiogenní a růstové faktory (Obr. 3).

3.2.1 Rodina interleukinu 1 (IL-1)

Do této rodiny patří interleukin-1alfa (IL-1 α), interleukin-1beta (IL-1 β), receptorový antagonist IL-1 (IL-1RA), dále je zde řazen interleukin 18 (IL-18) a interleukin 33 (IL-33).

IL-1 byl poprvé popsán v roce 1972 jako faktor aktivující leukocyty (LAF). Nachází se ve dvou strukturních isoformách s převahou IL-1 β (až 95%), které jsou produkovány celou řadou buněk (monocyty, makrofágy, neutrofil, hepatocyty i tkáňovými makrofágy), váží se na IL-1 receptor I. typu (IL-1RI) a vyvolávají obdobné biologické reakce (kostimulace, zvýšení produkce IL-2, zesílení exprese povrchových molekul, pyrogen atd.).

IL-1R se vyskytuje ve dvou odlišných strukturních formách a to jako IL-1RI, který má dlouhou cytoplazmatickou doménu a je schopen aktivovat buňky a IL-1RII s krátkou intracelulární doménou a není biologicky aktivní. Nicméně IL-1RII může negativně regulovat buněčnou aktivaci tím, že váže ligandy na membráně, které by se jinak navázaly na IL-1RI.

IL-1RA má specifickou antagonistickou aktivitu. Po vazbě na IL-1RI zablokuje vazebné místo pro IL-1 a tím inhibuje jeho účinek. Vyskytuje se ve dvou strukturálních variantách: sIL-1RA je sekretovaná forma, produkováná monocyty, makrofágy a neutrofil, icIL-1RA je intracelulární, která zůstává v cytoplasmě monocytů, epiteliálních buněk a keratinocytů. IL-1RA je tvořen po stimulaci IgG, lipopolysacharidem a GM-CSF a IL-4 (Arend et al., 2008).

Obě formy IL-1 indukují expresi složek extracelulární matrix: prokolagenu typu I. A III. fibroblasty, kolagenu IV. typu epiteliemi, stimulují produkci glykosaminoglykanů a fibronektinu fibroblasty. IL-1 působí na fibroblasty jako mitogen a indukuje u nich produkci IL-2, IL-6, CC a CXC chemokinů. IL-1 dále ovlivňuje produkci substancí podílejících se na degradaci extracelulární matrix, jako jsou kolagenázy, gelatinázy, prostaglandin E2 (PGE2) a plasminogenní aktivátor. IL-1 β hraje roli zejména v iniciální fázi poškození plicního parenchymu, neboť zvyšuje produkci TGF- β . Tím zároveň nepřímo snižuje svou produkci, jelikož TGF- β se může také vázat na IL-1R a navíc indukuje antagonistický IL-1RA (Smith et al., 1995).

Jelikož IL-1RA ovlivňuje působení IL-1, může se tedy uplatňovat i při manifestaci plicního zánětu. U nemocných s IPF byla zjištěna zvýšená exprese IL-1RA v tkáňových homogenátech, stejně tak byla prokázána vyšší koncentrace IL-1RA v BALT

ve srovnání se zdravými kontrolami. Imunohistochemicky byl IL-1RA detekován v hyperplastických pneumocytech II. typu, alveolárních makrofázích a lokálních stromálních buňkách (Smith, 1995). Pacienti s IL-1RA polymorfismem (+2018) a TNF- α polymorfismem (-308) mají vyšší riziko plicní fibrózy a je u nich detekovatelná nerovnováha mezi IL-1 a IL-1RA aktivitou (Whyte et al, 2000).

U myšího experimentálního modelu bylo po expozici bleomycinu (Phan a Kunkel, 1992) nebo radioaktivnímu záření (Johnston et al, 1996) prokázáno, že hladina IL-1 exprese v plicích koreluje s vývojem plicní fibrózy. IL-1 β zde vyvolává akutní zánět následovaný tkáňovou destrukcí a produkcí fibrogenetických cytokinů (např. TGF- β), vedoucí k progresivní fibróze intersticia. Bleomycinem indukovaná plicní fibróza ukazuje na nezbytnou signalizaci přes IL-1RI (MyD88) za přítomnosti inflamatorové adaptorové molekuly ASC (Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain) (Gasse et al., 2007). Zároveň byl u myšího modelu celkově snížen IL-1RA v oblastech poškození plicní tkáně (Piquet et al., 1993).

Mezenchymálními kmenové buňky (MSCs) chrání plicní tkáň před poškozením bleomycinem u myšího modelu blokací TNF- α a IL-1. Jako potenciální mediátor tohoto efektu byl rozpoznán právě IL-1RA díky svému blokačnímu účinku. Byla identifikována subpopulace MSCs, jež sekretovala vyšší hladiny IL-1RA *in vitro* (Ortiz et al., 2007).

Nerovnováha mezi IL-1RA a IL-1 β , může tedy zodpovídat za rozvoj plicní fibrózy. IL-1 β se podílí v iniciální fázi na poškození plicní tkáně, zatímco IL-1RA, jež blokuje jeho efekt, může mít protektivní roli a lze uvažovat i o jeho možném terapeutickém využití.

3.2.2 Tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α)

Poprvé byl popsán v roce 1975 jako cytotoxický faktor produkováný makrofágy, jež je schopen zabít myší fibrosarkomovou buněčnou linii L-929 (Carswell et al, 1975). TNF- α je 17kDa produkt makrofágů a monocytů a váže se na receptor (TNF-R), který se vyskytuje ve dvou formách: TNF-RI (CD120a, funkční dimér p55/60) je exprimován na většině buněk a TNF-RII (CD120b, funkční dimér p75/80) se vyskytuje pouze na buňkách imunitního systému.

Jeho primární rolí je regulace imunitního systému. Je schopen indukovat apoptózu, zánět nebo inhibovat vznik nádorů a virovou replikaci. Je také považován za klíčový mediátor septického šoku (Beutler et al., *Science* 1985, *J Immunol.* 2008). Mezi jeho další důležité funkce v imunitním systému patří indukce exprese adhezivních molekul, zesiluje také proliferaci fibroblastů a expresi cytokinů IL-1, IL-6, CC a CXC chemokinů a GM-CSF. Dále stimuluje produkci kolagenáz, gelatináz a PGE2 a inhibuje tvorbu některých prokolagenů. Při inhibici TNF- α klesá i exprese TGF-beta a IL-5. TNF- α se podílí jak na přisunu imunokompetentních buněk do granulomů, tak i na vývoji granulomů.

TNF- α , spolu s IL-1 β , hraje roli zřejmě spíše v počátečních fázích poškození plicního parenchymu než v pokročilém stádiu, což je podpořeno imunohistochemickým nálezem ze vzorků plicní tkáně, kde se prokázala jistá pozitivita TNF- α spolu s IL-1 β v alveolárních makrofázích a proliferujících pneumocytech II v akutní a fibroproliferativní fázi onemocnění oproti oblastem s pokročilým stádiem fibrózy (Pan et al, 1996).

U myších modelů plicního poškození je hladina TNF- α značně zvýšena a koreluje pozitivně s TGF- β a hladinou prokolagenu typu I. A III. (Zhang et al., 1997). Zvýšená exprese TNF- α v plicích indukuje zánět a sekreci TGF- β . TNF- α může v plicích vyvolávat zánět a fibrogenezi, stejně jako plicní emfyzém a hypertenzi (Fujita et al., 2001). Nicméně z klinického hlediska inhibice efektu TNF- α u pacientů s IPF se dosud setkala jen s malým úspěchem (Selman et al., 2004).

3.2.3 Transformující růstový faktor beta (TGF- β)

TGF- β se vyskytuje ve třech dimerických isofomách, TGF- β 1, 2 a 3, s podobnými biologickými účinky. Převažující formou je první izotyp, TGF- β 1. Existuje i několik různých izoforem receptoru pro TGF- β , které mohou být homo- nebo heterodimerické, spojené se serin/threoninovými kinázami.

TGF- β je produkován různými buňkami včetně trombocytů, neutrofilů, eosinofilů, makrofágů, fibroblastů, endotelií a také je to hlavní produkt Th3 a Treg lymfocytů. TGF- β 1 má významné imunoregulační schopnosti. Může inhibovat sekreci a aktivitu jiných cytokinů, včetně IFN- γ , TNF- α , IL-1 β . Může také snížit expresi cytokinových receptorů, kupříkladu receptoru pro IL-2, a tím také inhibovat IL-2 dependentní proliferaci aktivovaných T lymfocytů (Tiemessen et al., 2003). Isoforma TGF- β 1 a TGF- β 2 má obecně profibrotickou povahu, zatímco TGF- β 3 má odlišný charakter. Může buď stabilizovat nebo dokonce zeslabit progresi onemocnění (Shah et al., 1995). Expresní profil TGF- β 3 v plicích potvrdil, že nerovnováha mezi TGF- β 1 a TGF- β 3 hraje klíčovou roli ve vývoji fibrózy po tkáňovém poškození (Coker et al., 2001).

TGF- β je jedním z hlavních cytokinů, který se přímo podílí na fibrotizujícím procesu. Působí jako chemotaktický faktor pro fibroblasty a zároveň indukuje jejich proliferaci, tím že v endotelu reguluje produkci a aktivitu růstového faktoru fibroblastů (FGF-2) cestou MAPK dráhy (Khalil et al., 2005). FGF-2 má zároveň výrazný mitogenní vliv na pneumocyty II. typu. TGF- β pozitivně ovlivňuje tvorbu extracelulární matrix (zejména kolagenu) díky své indukci růstového faktoru pojivové tkáně (CTGF) (Duncan et al., 1999).

Aktivace TGF- β je tedy jedním z rozhodujících momentů v rozvoji plicní fibrózy. U nemocných s IPF byla prokázána zvýšená exprese TGF- β , která byla imunohistochemicky lokalizována v bronchiálních epiteliích a hyperplastických pneumocytech II typu (Khalil, 1996). U pacientů se sarkoidózou byl v některých pracech prokázán vliv genového polymorfismu TGF- β 3 na přechod a rozvoj fibrózy (Kruit et al., 2006).

3.2.4 Interleukin-2 (IL-2)

IL-2 byl jedním z prvních objevených cytokinů a byl definován jako růstový faktor T lymfocytů (T cell growth factor, TCGF). Je to molekula o velikosti 15kDa, která se nachází v glykosylovaném i neglykosylovaném-aktivním stavu.

Váže se na receptor IL-2R, který je složen ze tří podjednotek. Podjednotka α (CD25) je málo exprimovaná na klidových buňkách, zajišťuje vazbu, ale ne přenos signálu. o ten se stará podjednotka β (CD122), jež se na T buňkách vyskytuje konstitutivně. Třetí podjednotka γ zvyšuje afinitu pro IL-2 a podílí se na přenosu signálu do jádra. Je společná pro další cytokiny (IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21). Existuje i solubilní forma receptoru pro IL-2.

Je produkován především aktivovanými Th1 buňkami a stimuluje k růstu další T buňky, B buňky, makrofágy, monocyty. IL-2 jakožto prozánětlivý cytokin stimuluje T lymfocyty, které infiltrují plicní tkáň. Indukuje expresi MCP-1, který generuje produkci profibrotických cytokinů a extracelulární matrix. IL-2 koordinuje činnost Th1 lymfocytů, alveolárních makrofágů a fibroblastů.

U pacientů se sarkoidózou IL-2 spolu s IFN- γ indukují zvýšení počtu T lymfocytů, které se kompartmentalizují do granulomů, kde se podílejí na vzniku lokální zánětlivé reakce. to bylo potvrzeno ve studii Prasse et al., (2000), kde IL-2, IFN- γ a TNF- α byly označeny za hlavní vyvolavatele zánětu u sarkoidózy s možností jejich produkce CD4⁺ stejně jako i CD8⁺ lymfocyty. Při studiu sarkoidózy u HLA-DRB1*0301 pozitivních pacientů byla detekována signifikantně vyšší hladina IL-2 (spolu s IL-6, IL-12p70, IL-1 β a TNF- α) v BALT. Navíc tito pacienti měli snížené hladiny většiny cytokinů v BALT a redukovanou expresi Th1 lymfocytů, což by mohlo souviset s jejich lepší prognózou (Idali et al, 2006).

Hladiny IL-2, spolu s IL-8, IL-10 a IL-12, byly detekovány ve zvýšené formě v sérech pacientů s IPF na rozdíl od zdravých kontrol (Tsoutsou et al., 2006). To opět dokumentuje nerovnováhu Th1/Th2 cytokinů u pacientů s IPF.

3.2.5 Interleukin-4 (IL-4)

IL-4 je typický protizánětlivý cytokin s vlastností determinovat vývoj T lymfocytů ve směru Th2. Jemu podobný je IL-13, jež však není této determinace schopen. Tyto dva cytokiny mají obdobnou funkci a často působí společně. Receptor pro IL-4 (IL-4R) je složen ze tří podjednotek - α , β a γ . na podjednotku α (IL-4R α) se váže pouze IL-4 a IL-13, ale podjednotka γ (IL-4R γ) je společná pro IL-2, IL-7, IL-9, IL-15.

IL-4 je produktem především Th2 lymfocytů, NK buněk, mastocytů a basofilů. Je to základní faktor pro vývoj Th2 lymfocytů (inhibuje IFN- γ a vývoj do Th1 směru). Stimuluje k růstu B lymfocyty, umožňuje izotypový přesmyk ve směru IgE a IgG1 produkce a podílí se také na alergické reakci. IL-4 stimuluje produkci kolagenu fibroblasty *in vitro*.

U pacientů se sarkoidózou se v prvních fázích onemocnění, kdy dochází ke granulomatóznímu procesu s převahou Th1 cytokinové odpovědi, IL-4 neuplatňuje. Jeho hladiny jsou v tomto stádiu nižší v porovnání s IFN- γ nebo IL-2, které vyvolávají zánětlivý proces (Hill et al., 2008). Th1 cytokinová odpověď je zřejmá nejen z krve pacientů, ale i z jejich BALT a sputa (Tsiligianni et al., 2005).

IL-4 se podílí se na rozvoji plicní fibrózy u nemocných s IPF. Jeho produkce byla potvrzena imunohistochemicky v lézích plicní tkáně u pacientů s IPF .

IL-4 hraje důležitou roli v depozici kolagenu během fibroproliferativního procesu u bleomycinem indukované plicní fibrózy na experimentálním myším modelu a tento efekt se zdá být závislý na přítomnosti makrofágů (Huaux et al., 2003). Výsledky skupiny Jakubzick et al. (2003) ukázaly, že IL-4 a IL-13 deficientní myši s indukovanou plicní fibrózou měly snížený počet alveolárních makrofágů, což následně souviselo se signifikantně sníženou hladinou kolagenu. Tento nálezn by mohl naznačovat souvislost IL-4 a makrofágů s fibroproliferativními procesy. Tuto hypotézu podporuje i studie Whynes a Riches (2003), kteří potvrdili expresi molekuly IGF-I (Inzulin-like growth factor-I) na makrofázích a její závislost na IL-4 a IL-13. IGF-I stimuluje proliferaci a přežívání fibroblastů a myofibroblastů a podporuje syntézu kolagenní matrix.

3.2.6 Interleukin-6 (IL-6)

Do rodiny interleukinu-6 patří nejen IL-6, ale i leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatinM (OSM), ciliary neurotrophic factor (CNTF), cardiotrophin-1 (CT-1) a cardiotrophin-like cytokine (CLC). Tyto cytokiny spojuje strukturní homologie a využití gp-130 signální podjednotky receptorového komplexu.

IL-6 je cytokinem s pleiotropním účinkem, který je produkován mnoha buněčnými liniemi včetně makrofágů, endoteliálních buněk, fibroblastů a žírných buněk. Účastní se zánětlivé reakce, podněcuje produkci profibrotických faktorů jako IL-1 β , TNF- α , PDGF a TGF- β . Lze tedy předpokládat, že IL-6 bude hrát roli v řadě patologií, včetně intersticiálních plicních procesů. Nicméně záleží na podmínkách, za nichž IL-6 může buňky stimulovat, nebo inhibovat jejich proliferaci.

IL-6 za normálních podmínek u zdravého jedince inhibuje proliferaci fibroblastů. Naopak u IPF, kdy dochází k jistým fenotypovým změnám na fibroblastech, IL-6 podporuje jejich proliferaci a podílí se tak na fibrotizaci plicní tkáně (Moodley et al., 2003)

IL-6 spolu s TGF- β 1 hraje důležitou roli v proliferaci a stimulaci plicních fibroblastů in vitro. Po radioaktivním ozáření buňky stimulovaly produkci IL-6 přes PKC/NF κ -B signální dráhu (Tabata et al., 2006). Po přidání thalidomidu (Thal) byla produkce IL-6 inhibována stejně jako proliferace fibroblastů, což ukazuje na vzájemný vztah IL-6 a fibroblastů a současně na možný preventivní efekt Thal a jeho možné terapeutické využití (Tabata et al., 2007) .

Na experimentálním myším modelu bylo prokázáno, že IL-6 způsobuje především infiltraci lymfocytů a alveolitidu, avšak jen minimální fibrózu (Di Cosmo et al., 1994).

Možnou roli IL-6 v patogenezi IPP naznačují vyšší hladiny IL-6 v BALT pacientů se sarkoidózou, která je u nich signifikantně vyšší v porovnání se zdravými kontrolami (Takizawa et al., 1997). Jako zdroj IL-6 byly identifikovány alveolární makrofágy a fibroblasty (Shahar et al., 1996).

3.2.7 Interleukin-10 (IL-10)

IL-10 je považován za jeden z hlavních inhibičních cytokinů. Původně byl označen jako Faktor inhibující syntézu cytokinů (CSIF), a to především Th1 cytokinové skupiny. Nesnižuje produkci IL-2 a IFN- γ přímo, ale prostřednictvím antigen prezentujících buněk (APC), u nichž vyvolá snížení exprese povrchových kostimulačních molekul (CD80/86) a ty pak nemohou plně aktivovat Th1 lymfocyty. Je tedy produktem Th2 buněk, Treg buněk v gastrointersticiálním traktu a alveolárních makrofágů v plicích.

Největším zdrojem IL-10 v plicích jsou nejen alveolární makrofágy, ale i hyperplastické alveolární epiteliální buňky, které se podílí na regeneraci poškozené tkáně (Bergeron et al., 2003).

U pacientů s IPF byla zaznamenána zvýšená produkce mRNA IL-10 alveolárními makrofágy, nicméně proteinová forma IL-10 v BALT byla snížena ve srovnání se zdravými kontrolami (Martinez et al., 1997). Autoři vyslovili hypotézu, že zvýšená exprese IL-10 alveolárními makrofágy během reparačních procesů může působit jako negativní kontrola exprese prozánětlivého cytokinu TNF- α , jehož hladina se zvýšila až po stimulaci buněk LPS a za přítomnosti neutralizačních protilátek anti-IL-10.

IL-10 může inhibovat syntézu kolagenu *in vitro* za použití různých fibroblastických buněčných typů (Reitamo et al., 1994), nicméně efekt IL-10 se zdá být variabilní v závislosti na použitém experimentálním modelu.

U pacientů se sarkoidózou, kde je primární Th1 odpověď spojená se zánětem a vývojem granulomatózy, jsou hladiny IL-10 spolu s dalšími Th2 cytokiny, sníženy (Hill et al., 2008).

3.2.8 Interleukin-12 (IL-12)

Do rodiny interleukinu-12 patří krom IL-12 také relativně nedávno objevené cytokiny IL-23 a IL-27. Interleukin-12 je cytokin o velikosti 75kDa, heterodimer složený ze dvou podjednostek p35 a p45 spojených disulfidickým můstkem.

IL-12, jež je produkován především monocyty a makrofágy, indukuje diferenciaci ve směru Th1. Tím, že stimuluje produkci IFN- γ , ovlivňuje i činnost NK buněk. Dále působí i na angiogenezi - spouští antiangiogenní program prostřednictvím produkce IFN- γ , jehož tvorbou dochází k poklesu exprese vaskulárního a endoteliálního růstového faktoru (VEGF) (Del Vecchio et al., 2007). Bylo zjištěno, že při léčbě IL-12 dochází k inhibici základního růstového faktoru fibroblastů, který indukuje koronární neovaskularizaci u imunokompetentních i imunodeficientních myší (Voest et al., 1995).

Jelikož IL-12 indukuje především Th1 cytokinovou odpověď, inhibuje spolu s IFN- γ , produkci Th2 cytokinů (IL-4 a IL-13) a tím i diferenciaci fibrocytů (Shao et al., 2008). U experimentálního modelu bleomycinem indukované plicní fibrózy byl prokázán vliv IL-12 na hladinu IFN- γ v BALT a jeho protektivní role v tomto procesu (Keane et al., 2001).

U pacientů se sarkoidózou byla sledována hladina IL-12 v BALT, v séru i sputu pacientů. Zvýšené hladiny byly zaznamenány v BALT, zatímco v séru bylo signifikantní snížení ve vztahu ke kontrolní skupině. ve sputu nebyl zaznamenán žádný významný rozdíl. Toto zjištění ukazuje na lokální roli IL-12 v imunopatologické odpovědi u plicní sarkoidózy (Antoniou et al., 2006). Tyto nálezy potvrzuje i studie polské skupiny, kdy u pacientů se sarkoidózou pozorovali zvýšené hladiny IL-12, IL-18 v BALT a angiotenzin-konvertujícího enzymu (ACE) v plazmě (Mroz et al., 2008). Japonská studie označila IL-12 p40 přímo jako možný diagnostický marker sarkoidózy (Shigehara et al., 2003)

Také u pacientů s IPF byla detekována zvýšená hladina IL-12 (spolu s IL-2, IL-8, IL-10) (Tsoutsou et al., 2006).

3.2.9 Interferon gamma (IFN- γ)

IFN- γ je klíčový Th1 cytokin. Je tvořen především Th1 lymfocyty a zvyšuje cytotoxické schopnosti alveolárních makrofágů, lymfocytů a NK buněk. Jeho primární rolí je obrana proti virové infekci, nicméně má mnoho dalších pleiotropních účinků.

Zvyšuje expresi angiostatických chemokinů jako např. monokin indukovaný IFN- γ (monokine induced by IFN-gamma /MIG/CXCL9) či protein indukibilní IFN- γ (IFN-gama-inducible protein/ IP-10/CXCL10). Má především antifibrotické účinky, snižuje proliferaci endoteliálních buněk a syntézu kolagenu fibroblasty. Může také kooperovat s apoptotickou signální dráhou (Fas-APO-1) a podílet se tak na apoptóze u poškozených epiteliálních buněk. IFN- γ indukuje expresi cysteinové proteázy IL-1 β -konvertujícího enzymu, což je efektorová molekula apoptického procesu u plicních epiteliálních buněk A509 (Wen et al., 1997).

U pacientů se sarkoidózou je zvýšená hladina IFN- γ v BALT i krvi (Wahlström et al., 2001), což souvisí s primární Th1 odpovědí a následnými ději.

Existuje hypotéza, že dodáním IFN- γ pacientům s IPF, by mohlo dojít k vyrovnání Th1 cytokinové odpovědi a navíc k supresi fibroblastové aktivity (Bouros et al., 2006). V současné době se klinicky testuje imunomodulační účinek IFN- γ 1b. Pacientům se podává IFN- γ 1b, jež snižuje expresi TGF- β a tím, omezuje proliferaci fibroblastů a syntézu kolagenu. Zároveň IFN- γ 1b ovlivňuje i angiogenesi (Antoniou et al., 2008). Léčba s IFN- γ 1b je v některých studiích asociována s redukcí mortality (Bajwa et al., 2005), v jiných nebylo zaznamenáno žádné výrazné zlepšení plicních funkcí a navíc bylo vytykáno snížení kvality života pacientů (Prasse et al., 2003). Tato otázka zůstává stále otevřena, jelikož IFN- γ je jen jedním z mnoha faktorů, které hrají roli v patogenezi tohoto onemocnění.

4. Genetika plicních fibrotizujících procesů

4.1 Obecný úvod

Genetické faktory hrají důležitou roli v etiologii mnoha patologických procesů. Plicní fibrotická onemocnění jsou považována za tzv. komplexní choroby, v nichž hraje roli mnoho genových lokusů. Některé alely predisponují k danému onemocnění, další mohou mít protektivní účinek nebo naopak spouští patologický stav (Grutters a Bois, 2005).

Při studiu genetických faktorů u fibrotizujících plicních onemocnění lze využít tři hlavních strategií. První možností je „linkage“ analýza rodiny. V tomto případě používáme velké množství DNA markerů, které jsou rozloženy přes celý genom za účelem identifikovat chromozomální oblast, která nějak souvisí s výskytem onemocnění nebo specifický fenotyp v rodině s plicní fibrózou.

Druhou strategií je použití kontrolní skupiny, tzv. „case-control“ studie. Kontrolní skupinu srovnáváme se skupinou nemocných a hledáme důkaz významné asociace mezi alelami kandidátních genů nebo genových haplotypů. Kontrolní skupina musí odpovídat co do věku, pohlaví, populační stratifikace a dalších předem definovaných parametrů.

Poslední možností je studium sourozeneckých párů, u nichž sledujeme frekvenci alel u nemocných a zdravých subjektů, stejně jako u kontrolních skupin. Zdraví sourozenci zaujímají stejný význam jako kontrolní skupina.

V současné době u pacientů s IPP nejsou dostupné „linkage“ analýzy celého genomu a tudíž není možné ani poziční klonování k odhalení suspektních genů. z tohoto důvodu je jedinou možností „case-control“ studie, kterou jsme při našem studiu využili i my. s ohledem na neznámou etiologii sledovaných onemocnění vycházíme z dostupných hypotéz a hledáme kandidátní geny a polymorfismy v oblasti genů pro surfaktant, oxidačně/antioxidačních mechanismů a genů pro regulace fibroblastů a koagulační systém. Svou roli zde hrají i geny pro regulační a protizánětlivé cytokiny (skupiny IL-4, IL-10, IL-12, INF- γ), jejichž mutace může způsobit abnormální hojení epiteliálních lézí a rozvoj plicní fibrózy. Právě na genové polymorfismy cytokinů a jejich expresi v BALT je zaměřena tato práce.

4.2 Genová exprese u plicních fibrotizujících procesů

Další z možností vyšetření genetického pozadí IPP je vyhledávání kandidátních genů pomocí odlišné genové exprese oproti zdravé skupině, na rozdíl od přímého stanovování genotypu. Sledujeme, zda změny v expresi mRNA jsou smysluplné a jak ovlivní vznikající protein. Zajímá nás, v kterých buňkách a oblastech plic je protein exprimován a jestli následně došlo i ke změně funkce proteinu, ve smyslu profibrotickém. Hledáme genetickou odchylku asociovanou s onemocněním.

Sledováním genové exprese u IPP se zabývá celá řada studií. Většina z nich se zaměřuje na expresi genů ze vzorků odebraných z plicní tkáně při biopsii (např. Yang et al., 2007), hodnotí genovou expresi v různých částech plic postižených fibrotickým procesem (fibrotická ohniska, sousedící epiteliie, hyperplastická oblast pneumocytů typu II.) (Kelly et al., 2006). V naší studii jsme se rozhodli sledovat genovou expresi cytokinů přímo v bronchoalveolární tekutině (BALT) odebrané během bronchoalveolární laváže (BAL). Vycházíme z hypotézy, že genová exprese mRNA, kterou jsme získali přímo z BALT, nám dá obraz aktuálního stavu, jež se právě odehrává v pacientových plicích.

IPP jsou charakterizovány geny jež exprimují tkáňovou remodelaci, proliferaci fibroblastů, faktory ovlivňující ukládání extracelulární matrix. na tomto procesu, jak již bylo mnohokrát řečeno, se podílí celá řada faktorů a cytokiny, v něm hrají zcela nepochybně také svou roli. Změnou jejich genové exprese může být ovlivňován i jejich genový polymorfismus a následně proteinová hladina či funkční aktivita cytokinů. Změna v produkci daného cytokinu může vyvolat nerovnováhu v Th1/Th2 imunitní odpovědi, následované porušením homeostázy a rozvojem patologického stavu, v našem případě fibrotizujícím procesem.

4.3 Genové polymorfismy cytokinů u plicních fibrotizujících procesů

V naší studii jsme se zaměřili na skupinu 13 cytokinů, u nichž jsme sledovali následující polymorfismy (Tab.5). Jedná se o polymorfismy v nejen promotorové oblasti (IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α), ale i v překládané oblasti jako (TGF- β , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-4RA, IFN- γ).

Tab. 5: Sledované genové polymorfismy cytokinů

CYTOKIN	ALELICKÁ SPECIFITA	GENOTYP
IL-1 α	-889	C/C, C/T, T/T
IL-1 β	-511	C/C, C/T, T/T
	3962	C/C, C/T, T/T
IL-1R	pst 1970	C/C, C/T, T/T
IL-1RA	mspa 11100	C/C, C/T, T/T
IL-4RA	1902	A/A, A/G, G/G
IL-12	-1188	A/A, A/C, C/C
INF- γ	874	A/A, A/T, T/T
TGF- β	codon 10	C/C, C/T, T/T
	codon 25	C/C, C/G, G/G
TNF- α	-308	A/A, A/G, G/G
	-238	A/A, A/G, G/G
IL-2	-330	G/G, G/T, T/T
	166	G/G, G/T, T/T
IL-4	-1098	G/G, G/T, T/T
	-590	C/C, C/T, T/T
	-33	C/C, C/T, T/T
IL-6	-174	C/C, C/G, G/G
	nt 565	A/A, A/G, G/G
IL-10	-1089	A/A, A/G, G/G
	-819	C/C, C/T, T/T
	-592	A/A, A/C, C/C

Námi vybraná skupina cytokinů a jejich polymorfismů vychází z dostupné literatury a předchozích studií jejich možné role na patogenezi sledovaných onemocnění. Obecně se předpokládá, že náchylnost k danému onemocnění zahrnuje kombinaci několika polymorfismů, které souvisejí s epiteliálním poškozením a abnormálním hojícím procesem (Grutters a du Bois, 2005).

4.3.1 Rodina TNF- α

Polymorfismus TNF- α (-308) A/G byl jedním z prvních u nichž se uvažovalo o jeho možném vlivu na rozvoj patogenetického fibrotického onemocnění plic. U homozygotů AA a heterozygotů AG v promotorové oblasti (-308) byla prokázána (Whyte et al., 2000) a následně potvrzena ve dvou nezávislých studiích (Pantelidis et al., 2001 a Riha et al., 2004) souvislost s vývojem IPF.

U pacientů trpící akutní fází sarkoidózy (tzv. Löfgrenovým syndromem) byl prokázán vliv genetické predispozice v produkci TNF- α na patogenezi tohoto onemocnění (Seitzer et al., 1997). ve studii české populace (Mrázek et al., 2005) bylo poukázáno na vyšší výskyt homozygotů AA u Löfgrenova syndromu než u pacientů v chronickém stádiu sarkoidózy.

Bylo popsáno, že polymorfismus TNF- α (-308A) koreluje s IL-1RA (+2018T). Pacienti mající oba tyto polymorfismy mají vyšší riziko vzniku alveolární fibrózy (Whyte et al., 2000).

4.3.2 Rodina IL-1

Geny kódující členy rodiny IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA) se nacházejí na chromozomu 2q13-21. na pozicích (-889) u IL-1 α a na pozici (-511) u IL-1 β , kterými jsme se zabývali i v naší studii, může dojít k jednonukleotidovému polymorfismu C/T. Protože vyšetřované polymorfismy leží v promotorové oblasti genu, mohou ovlivňovat hladinu exprese proteinu (Hulkkonen et al., 2000). Nicméně mechanismus změny genové exprese asociované s těmito polymorfismy zůstává stále nejasný.

U pacientů se sarkoidózou byl pozorován zvýšený výskyt homozygotů CC u IL-1 α (-889) ve srovnání se zdravými jedinci, ovšem u pacientů s IPF nebyl signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině (Hutyrová et al., 2002).

4.3.3 Rodina IL-2

Ve studii Minshall et al. (1997) byla prokázána zvýšená exprese IL-2, IL-10, IL-12 a IFN- γ u pacientů s aktivní sarkoidózou ve srovnání s neaktivní formou onemocnění. Autoři poukazují na vliv těchto cytokinů na aktivaci alveolárních makrofágů, jež se podílejí na tvorbě plicních granulomů.

4.3.4 Rodina TGF- β

TGF- β se vyskytuje ve třech izoformách a každá z těchto forem má několik možných polymorfních variací. U TGF- β 1 je popsáno hned několik jednonukleotidových polymorfismů, které jsou lokalizovány na chromozomu 10q13. Tři ze sedmi alelických variant jsou lokalizovány na 5' hraničící oblasti (na pozicích -988, -800, -509), další tři jsou lokalizovány v kódující oblasti (kodon 10 a 25 na exonu 1 a kodon 263 na exonu 5) a poslední nalezneme na 5' nepřekládané oblasti (pozice +72) (Cambien et al., 1996).

Bylo zaznamenáno, že produkce TGF- β 1 se mění mezi jedinci a částečně závisí na polymorfismech v kodonu 10 a 25 (Grangier et al., 1999). V těchto místech může dojít k substituci nukleotidů (kodon 10: T->C, kodon 25: G->C) a následně ke změnám v aminokyselinové kódující sekvenci (kodon 10: Leu->Pro, kodon 25 Arg->Pro), což v konečném důsledku může dosti významně ovlivnit produkci TGF- β 1 (Cambien et al., 1996).

Souvislost s polymorfismem TGF- β 1 v kodónech 10 a 25 ve vztahu k rozvoji IPF nepotvrdil ve své studii Xaubert et al. (2003), nicméně detekoval vyšší vzestup alveoloarteriální diference (zhoršení výměny dýchacích plynů) u pacientů s IPF mající prolinovou alelu v kodónu 10. Většina pacientů, kteří absolvovali transplantaci plic z důvodu pokročilého stádia IPF a u nichž se následně objevila rejekce orgánu, měli vyšší výskyt homozygotní alely GG kódující Arg v kodonu 25. Navíc u těchto pacientů se vyskytlo i vyšší riziko opětovného vzniku fibrózy v transplantátu vlivem nadprodukce TGF- β 1 (Awad et al., 1998).

U pacientů se sarkoidózou u nichž se vyvinula fibróza byl pozorován vliv genetického polymorfismu TGF- β 3, a to na alelách +4875A, +17369C. Tyto polymorfismy se vyskytovaly signifikantně častěji u pacientů s fibrózou ve srovnání s kontrolními skupinami sarkoidóz bez fibrotického procesu. Ovšem vliv polymorfismu TGF- β 1 nebyl u těchto pacientů v této studii prokázán (Kruit et al., 2006).

4.3.5 Rodina IFN- γ

Bylo zaznamenáno, produkce IFN- γ je ovlivňována geneticky a může ovlivňovat rozvoj fibrózy u pacientů po transplantaci plic (Awad et al., 1999). Nicméně ve studiích in vitro (Elias et al., 1990) a in vivo (Ziesche et al., 1999) byl demonstrován příznivý efekt IFN- γ na fibrózu a to, inhibicí proliferace plicních fibroblastů a snížením regulace transkripce genů kódujících TGF- β 1.

4.3.6 Rodina IL-10

V práci Kishore et al. (1999) bylo ukázáno, že u myších makrofágů IL-10 potlačuje expresi TNF- α cestou selektivní destabilizace mRNA. Tato destabilizace je způsobena tzv. ARE motivem v 3' nepřekládané oblasti (3' UTR) genu kódujícího TNF- α . ARE je motiv bohatý na opakující se sekvence AU a je znám jako oblast, kam nasedají RNA vazebné proteiny.

IL-10 potlačuje translaci TNF- α i u alveolárních makrofágů. Freeburn et al., (2001) vyslovili ve své studii hypotézu, že polymorfismus v 3' nepřekládané oblasti genu pro TNF- α u pacientů s IPF může být způsoben nedostatečnou supresí IL-10. Nicméně tato studie potvrzuje, že polymorfismus v této oblasti je vzácný a je nepravděpodobné, že by mohl být zahrnut do patogeneze IPF.

U pacientů s IPF byla zaznamenána zvýšená produkce IL-10 mRNA alveolárními makrofágy, nicméně proteinová forma IL-10 v BALT byla snížena ve srovnání se zdravými kontrolami (Martinez et al., 1997). Zvýšená exprese IL-10 alveolárními makrofágy během reparačních procesů by mohla působit jako negativní kontrola exprese prozánětlivého cytokinu TNF- α , jehož hladina se zvýšila až po stimulaci buněk LPS a za přítomnosti neutralizačních protilátek anti-IL-10.

Také ve vzorcích plicní biopsie od pacientů s IPF bylo zaznamenáno kvantitativní zvýšení IL-10 mRNA potvrzené proteinovou hladinou tohoto cytokinu imunohistochemicky (Bergeron a et al., 2003).

4.3.7 Rodina IL-6

Pantelidis et al. (2001) soudí dle výsledků své studie na zvýšenou frekvenci výskytu alel IL-6 intron 4G a TNFR2 1690C u skupiny pacientů s IPF oproti zdravým kontrolám. Navíc genotyp GG byl v jeho práci spjat s výraznějším poklesem DLCO (difúzní plicní kapacita oxidu uhličitého) u těchto pacientů.

Ve studii Grutters et al. (2003) byly vyšetřovány polymorfismy IL-6 ve vztahu k sarkoidóze. Konkrétně v této studii byl sledován polymorfismus G/C v oblasti (-174) a (A/G) na intronu 4 u nizozemské a britské populace. Dle jejich výsledků, vyšetřované polymorfismy pravděpodobně nezvyšují náchylnost k sarkoidóze, nicméně alela C na pozici (-174) může mít roli v přechodu do fibrotického stádia u těchto pacientů. Stejný polymorfismus byl sledován i u slovinské populace ve studii Mayer et al. (2007) a byl zde označen dokonce jako jeden z rizikových faktorů pro vývoj sarkoidózy.

4.3.8 Rodina IL-4

Gen kódující IL-4 je lokalizován na chromozomu 5q31, kde se nachází i geny pro IL-13, IL-5, IL-3 a IL-9. IL-4 má celou řadu genových polymorfismů. V naší studii jsme se zaměřili především na polymorfismy v promotorové oblasti (-33), (-590) a (-1089) a to z důvodu, že dle našich předchozích pozorování by právě tyto polymorfismy v těchto oblastech mohly souviset s patogenetickým vývojem IPF (Vašáková et al., 2007, 2006).

Naše hypotéza se opírá i o tvrzení dalších autorů, např. Buchard et al. (1999) poukázal ve své studii na asociaci polymorfismu (-590T) s těžkým astmatem u Kavkazské populace. Jeho závěry byly potvrzeny také u japonské a americké populace, jak u dospělých, tak u dětských astmatiků (Haukin et al, 2002). U astmatiků dochází ke stejné cytokinové profilaci jako u IPF, tedy směrem k Th2 cytokinové odpovědi, ve které IL-4 sehrává jednu z hlavních rolí.

4.3.9 Rodina IL-12

IL-12 je složen ze dvou podjednotek p35 a p40 a každá z těchto podjednotek je kódovaná odlišnými geny na chromozomech 3p12-3q13.2 a 5q31-33. Analýza genomové sekvence IL-12 p40 podjednotky odhalila několik intronových polymorfismů a jednonukleotidový polymorfismus v 3' nepřekládané oblasti IL-12p40 genu na pozici (-1188) (Huang et al., 2000 a Hall et al., 2000). U tohoto polymorfismu byla definována jeho asociace s mnoha chorobami, např. insulin dependentní diabetes mellitus (Morahan et al., 2001) či roztroušená skleróza (van Veen et al., 2001). Ovšem vztah tohoto polymorfismu k IPF ve studii Latsi et al., (2003) nebyl prokázán.

U pacientů se sarkoidózou byla zaznamenána zvýšená exprese receptorů pro IL-12 (Taha et al., 1999). Autoři v této studii sledovali pacienty nejen se sarkoidózou, ale i s plicní tuberkulózou a na základě svých pozorování vyslovili domněnku, že zvýšená exprese IL-12R u těchto granulomatózních onemocnění poukazuje na možnou proliferaci T-lymfocytů směrem k Th1 cytokinovému profilu *in vivo*.

5. Metodická část

5.1 Izolace RNA z BALT použitím EZ1 RNA Univerzal Tissue Kit (Qiagen)

5.1.1 Odběr materiálu

Bronchoalveolární laváž (BAL) se provádí pacientům pomocí flexibilního bronchoskopu (Olympus, Olympus Optical CO, Ltd., Japonsko) ze středního laloku pravé plíce. Bronchoskop se zaklíní obvykle do segmentárního či subsegmentárního bronchu pro střední lalok a pracovním kanálem bronchoskopu se provádí výplach vlažným fyziologickým roztokem s následným odsátím instilované tekutiny. na Pneumologické klinice 1. LF UK FTNsP se provádí výplach 4 frakcemi po 50 ml, pro účely naší studie jsme celkový počet frakcí zvýšili na 5 frakcí. Obvyklá návratnost je 20-40 ml z každé frakce.

Pro lepší výtěžek požadované RNA jsme všech 5 frakcí po odebrání slévali na jedné a z tohoto množství jsme odebírali požadované objemy na jednotlivá vyšetření: cytologie, cytometrie, bakteriologie. Zbytek bronchoalveolární tekutiny (BALT) jsme ponechali na izolaci mRNA.

BALT určená k izolaci RNA se ihned po odběru centrifugovala 5min/250g při laboratorní teplotě. Po odstranění supernatantu se buňky resuspendují v 500 μ l PBS (phosphate buffered saline) vychlazeném na 0°C a opět centrifugovány 5min/250g při laboratorní teplotě. K peletce buněk se přidá 750 μ l Qiazolu (Qiagen, Německo) a buněčný lyzát se několikrát dobře promíchá pipetou. Tímto krokem došlo k rozrušení plazmatické membrány buněk, denaturaci proteinů, mezi nimiž jsou i RNAasy, jež by mohly způsobit nechtěnou degradaci RNA. Odebraný a zlyzovaný materiál jsme skladovali při teplotě -80°C do doby izolace RNA.

5.1.2 Izolace celkové RNA z BALT použitím EZ1 RNA Univerzal Tissue Kit

Zlyzovanou BALT jsme zhomogenizovali před izolací RNA (ribonukleová kyselina) centrifugací 2 min. při 12 000 g při laboratorní teplotě přes komerčně dodávanou kolonku *QIAshredder* (Qiagen, Německo), čímž jsme docílili i odstranění občasných hrubých nečistot vzniklých při odběru.

Poté se přidá 150 μ l chloroformu, intenzivně vortexuje 15 s a nechá 2-3 min homogenizovat při laboratorní teplotě. Následně vzorek centrifugujeme 15min / 12000 x g / 4°C (nízká teplota je doporučována pro optimální fázovou separaci, odstranění genomické DNA a snížení aktivity enzymů).

Po extrakci chloroformem se vzorek rozdělí do tří fází: horní, bezbarvá, vodní fáze obsahující RNA, bílá interfáze a dolní, narůžovělá, organická fáze. Odebíráme 300-400 μ l horní vodní fáze do předem připravených zkumavek a provedeme purifikaci vyizolované RNA pomocí komerční soupravy a přístroje *Biorobot EZ1* (Qiagen, Německo).

Tento přístroj pracuje na principu magnetické separace (Obr.4). Nukleové kyseliny jsou přečištěny z lyzátu navázáním na povrch magnetických částic za přítomnosti chaotropních solí. Zbytky DNA jsou ze vzorku odstraněny přidávkem DNAasy a RNAasy jsou naopak inhibovány guanidin thiokyanatem, jež je součástí komerční soupravy. Magnetické částice jsou poté několikrát promývány pufrů a požadovaná RNA je nakonec eluována do elučního pufru. Během tohoto procesu dochází k zahřívání elučního roztoku, aby se RNA snadněji uvolňovala s magnetických kuliček a zároveň aby došlo k jejímu rychlejšímu rozpuštění v elučním roztoku.

Čistota a koncentrace RNA byla stanovena spektrofotometricky při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm. z poměrů A260/A280 a A260/A230 jsme stanovili čistotu RNA. pro stanovení genové exprese jsme použili takovou RNA, která splňovala $A_{260}/280 > 1,9$ a $A_{260}/230 > 1,7$. Získanou celkovou RNA jsme uchovali při -80°C .

EZ1 RNA Mini Procedure

Disrupted and homogenized cells or tissues



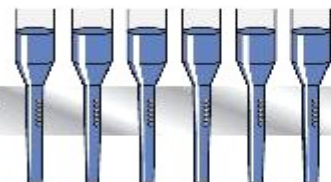
Magnetic particles added to lysates



Nucleic acids bind to magnetic particles



Magnet



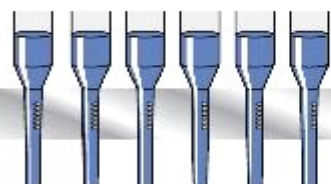
Magnetic separation

Digest DNA with DNase



Magnetic separation

Wash RNA



Magnetic separation

Elute RNA



Pure, high-quality RNA

Obr.4 : Schema purifikace RNA užitím Biorobotu EZ1

Upraveno dle EZ1 RNA Handbook (Qiagen)

5.2 Real-time PCR s použitím komerční soupravy Human Common Cytokines RT² Profiler™ PCR Array

Tato komerční souprava umožňuje stanovit expresní profil vybraných 84 důležitých cytokinových genů (viz. Příloha). Test pokrývá geny z rodiny interferonů, interleukinů, rovněž také členy TGF- β rodiny a další (viz níže). Detekce PCR (polymerázová řetězová reakce) produktu je založena na využití barvičky Sybr Green. Soupravou jsme stanovili relativní kvantifikaci genové exprese.

Interferony: IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA8, IFNB1, IFNG, IFNK.

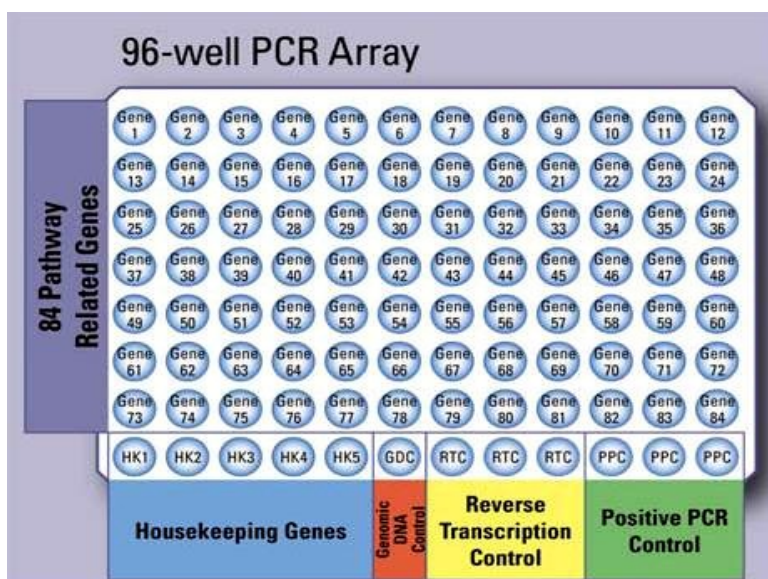
Interleukiny: IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17A, IL17B, IL17C, IL25 (IL17E), IL18, IL19, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL2, IL20, IL21, IL22, IL24, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9.

Bone Morphogenic Proteins (BMPs) a TGF- β rodina: BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8B, GDF10 (BMP3B), GDF11 (BMP11), GDF2 (BMP9), GDF3, GDF5, GDF8, GDF9, INHA, INHBA, NODAL, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3.

PDGF/VEGF rodina: FIGF (VEGFD), PDGFA.

TNF rodina: FASLG (TNFSF6), LTA, LTB, TNF, TNFRSF11B, TNFSF10, TNFSF11, TNFSF12, TNFSF13, TNFSF13B, TNFSF14, TNFSF4, CD70 (TNFSF7), TNFSF8.

Další růstové faktory a cytokiny: (MCSF), CSF2 (GMCSF), FAM3B, LEFTY2 (EBAF)



Obr.5: Schema rozmístění genů na 96 jamkové destičce

Upraveno dle manuálu RT² Profiler PCR Array System (SA Bioscience)

5.2.1 Reverzní transkripce RNA do cDNA

Pro reverzní transkripci jsme použili komerční soupravu, která je součástí testu pro stanovení genové exprese. K celkové RNA v množství 500 ng (doporučené množství se pohybuje v rozmezí 25ng/μl-5μg/μl) se přidají 2μl GE pufru (*Genomic DNA Elimination Mixture*) a směs se doplní na celkový objem 10μl *RNAse-free H₂O*. Promícháme a necháme inkubovat při 42°C 5 min. Poté se směs ochladí (1 min) a přidá se předem připravený mix k přepisu RNA do cDNA (*Reverse Transcription Cocktail*). na jeden vzorek si připravíme mix dle následujícího rozpisu:

<i>BC3 (5xRT Buffer3)</i>	4 μl
<i>P2 (Primer& External Control Mix)</i>	1 μl
<i>RE3 (RT Enzyme Mix3)</i>	2 μl
<i>RNAse-free H₂O</i>	3 μl
celkový objem	10 μl

Směs o celkovém objemu 20 μl se jemně ve špičce promíchá a vloží do termocyklu, kde se inkubuje 15 min při 42°C, poté 5 min při 95°C. Zahřátím na 95°C se reakce zastaví a ukončí se tak přepis RNA do cDNA. Vysledná cDNA se ještě naředí 91μl *RNAse-free H₂O*.

5.2.2 Real-time PCR

Pro stanovení genové exprese se používají předpipetované genově-specifické primery v 96-jamkové PCR destičce. Připravíme si následující roztok:

<i>2X SABiosciences RT²qPCR Master Mix (SYBR Green)</i>	1275 μl
<i>cDNA</i>	102 μl
<i>ddH₂O</i>	1173 μl
celkový objem	2550 μl

Vše dobře promícháme a poté do každé jamky napipetujeme 25 μl roztoku. Takto připravená destička se vloží do analyzátoru ABI 7900HT Fast System (Applied Biosystems, USA). V přístroji pak probíhá následující PCR program:

5.2.3 Hodnocení dat

Po skončení PCR reakce provedeme kontrolu celého PCR procesu. Hodnotíme přítomnost genomické DNA, zda proběhla reverzní transkripce a PCR reakce.

K vyhodnocení dat jsme použili aplikaci dostupnou na webových stránkách firmy SABiosciences (<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). Výpočet se provedl metodou $\Delta\Delta C_t$ (Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method*. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8.)

Hodnoty specifických genů byly srovnány s hodnotami 5 housekeeping genů (ACTB – Actin β , GAPDH - Glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, RPL13A - Ribozomální protein L13a, HPRT1 - Hypoxanthin fosforybozyltransferáza 1 a B2M – β -2-microglobulin).

Dále jsme se zabývali těmi geny, u nichž byla zvýšená/snížená exprese min 4krát oproti kontrolní skupině. Za signifikantní jsme považovali $p\text{-value} < 0,05$.

5.3 Genotypizace cytokinů

5.3.1 Odběr materiálu

Krev pacientů byla odebrána do antikoagulačních zkumavek s přidavkem EDTA (ethylen-diamino-tetraoctová kyselina).

5.3.2 Izolace DNA z krve soupravou EZ1 DNA Blood 350 µl Kit

DNA byla izolována z 350 µl plné krve komerční soupravou DNA Blood 350 µl Kit (Qiagen, Německo) s pomocí přístroje *Biorobot EZ1*. Princip metody spočívá v navázání nukleové kyseliny na magnetické částice v roztoku a jejich následné fixaci pomocí magnetického separátoru. Ostatní buněčné složky jsou pak odstraněny ze směsi promýváním speciálními pufrů. Získaná DNA je eluována do objemu 200 µl. Její čistotu a koncentraci jsme stanovovali spektrofotometricky při vlnové délce 260 a 280 nm. pro další testy byla použita DNA s poměrem $A_{260}/A_{280} = 1,7-1,9$.

5.3.3 Analýza polymorfismů cytokinových genů

K analýzy polymorfismů jsme použili komerční soupravu Cytokine Genotyping Kit (Invitrogen, USA). Princip metody je založen na PCR amplifikaci s použitím sekvenčně specifických primerů. Celkem jsme analyzovali polymorfismy 13 cytokinových genů (Tab.6).

Tab.6: Rozdělení vyšetřovaných genových polymorfismů

Promotorová oblast genu	IL-1 α (-819 C/T), IL-1 β (-511 C/T), IL-1R (pst 1970 C/T),IL-1RA (mspa 11100 C/T)
	IL-2 (-330G/T)
	IL-4 (-1098 G/T) (-590 C/T) (-33 C/T)
	IL-6 (-174 C/T)
	IL-10 (-1089 A/C) (-819 C/T) (-592 A/C)
	IL-12 (-1188 A/C)
Regulační oblast genu	TNF- α (-308 A/G) (-238 A/G)
	TGF- β (codon 10 C/T) (codon 25C/G)
	IL-1 β (3962 C/T)
	IL-2 (166 G/T)
	IL-6 (nt 565 A/G)
	IL-4RA(1902 A/G)
	IFN- γ (874 A/T)

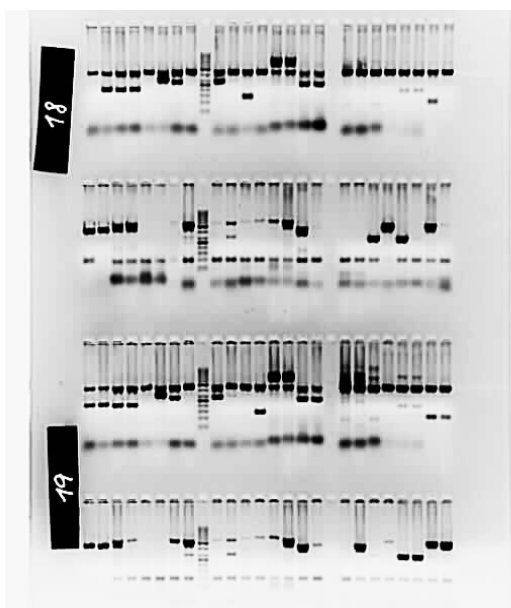
Na 96 jamkovou destičku, která obsahuje lyofilizované primery pro 2 vzorky, napipetujeme do každé jamky 10 μ l reakční směsi. Reakční směs obsahuje:

<i>Puf</i> s <i>dNTP</i>	140 μ l
<i>dd H₂O</i>	304 μ l
<i>TAQ polymeráza</i> (5U/ μ l)	3,3 μ l
<i>DNA</i> (100ng/ μ l)	75 μ l

Jamky destičky zavřeme víčky a vložíme do termocykleru vyhřátého na 85°C. Dále spustíme následující PCR program:

Počet cyklů	Cyklus	Teplota a čas
1	Denaturace	94°C 2 min.
10	Denaturace	94°C 15s
	Syntéza	65°C 60s
20	Denaturace	94°C 15s
	Nasedání primerů	61°C 50s
	Syntéza	72°C 30s

Po skončení reakce probíhala separace a detekce PCR produktů elektroforeticky v 2 % agarózovém gelu s přidavkem etidium bromidu, jež se vmezeřuje mezi sousední páry bazí v DNA a vytváří s ní komplex, který po osvětlení UV světlem září (Obr.6). Elektroforéza běží pod napětím 10V/cm. Velikost specifického PCR produktu jsme vztahovali ke standardnímu hmotnostnímu markeru (GeneRuler 50bp DNA Ladder, Fermentas, Německo).



Ob.6: Fotografie gelu z genotypizace cytokinů. Začátek je vlevo nahoře. Směr elektroforézy shora dolů. 9. dráha v každé řádce je standardní hmotnostní marker.

6. Výsledky

6.1 Genové polymorfismy cytokinů

6.1.1 Charakteristika vyšetřovaných skupin

Sledovaná skupina obsahuje 104 pacientů rozdělených do tří skupin dle diagnóz. Jsou to lidé převážně středního věku, obou pohlaví (Tab.7). Všechna onemocnění byla diagnostikována na základě mezinárodně uznávaných kritérií.

Skupinu IPF tvoří 56 vyšetřovaných subjektů, což vzhledem k velmi nízkému výskytu v populaci může být považováno za poměrně široký soubor. Pacienti s IPF byli diagnostikováni dle kritérii ATS/ERS. U 16 pacientů s nejednoznačným klinickým a radiologickým obrazem byla navíc provedena videothorakoskopie s odběrem plicní biopsie. Následně histologický nález odhalil charakteristické změny definované jako běžná intersticiální pneumonie UIP/IPF (usual interstitial pneumonia). (Pozn. UIP = histologický obraz plicní fibrózy tzv. obvyklého typu se špatnou prognózou se středním přežitím 2-3 roky)

Pacientů se sarkoidózou je v naší studii zahrnuto celkem 31 a můžeme je dále rozdělit dle radiologického nálezu do tří stádií: 7 pacientů je v I.stádiu, 21 pacientů ve II.stádiu a 3 pacienti jsou v III.stadiu onemocnění. U všech pacientů byla také zjištěna zvýšená hladina sérového ACE, vápníku a kalciurie. Jejich diagnóza byla navíc potvrzena transbronchiální biopsií, nebo transbronchiální punkcí lymfatických uzlin, či pomocí videothorakoskopického vyšetření.

U skupiny EAA (17 pacientů) byla diagnóza zaměřena také na hledání a průkaz vyvolávajícího antigenu. Dle klinického stádia můžeme i tuto skupinu dále rozdělit na subakutní fázi onemocnění (6 pacientů) a na chronické stádium (11 pacientů).

Kontrolní skupinu tvoří 145 nepříbuzných jedinců (24mužů, 121žen). Všichni patří do kavkazské populace žijící v České republice. U žádného z nich se během zařazení do studie nevyskytoval fibrotizující plicní proces. Jsou to lidé ve věku od 19-80let, průměrný věk je 43,1 let (SD=16,17) .

6.1.2 Demografická data vyšetřovaných skupin a buněčný rozpočet v BALT

Tab.7: Demografická data a počet buněk v BALT dle skupin pacientů

	IPF (56 pacientů)	Sarkoidóza (31 pacientů)	EAA (17 pacientů)
Věk (roky)	67,29 (SD=11,85) (range 36-87)	47,52 (SD=13,49) (range 26-79)	57,47 (SD=16,02) (range 19-83)
Pohlaví (muži/ženy)	37/19	14/17	5/12
BALT lymfocyty (%)	17,86 (SD=18,93)	26,3 (SD=25,57)	17,00 (SD=22,88)
BALT neutrofilů (%)	15,84 (SD=17,58)	12,83 (SD=22,27)	17,20 (SD=26,67)
BALT eosinofily (%)	3,21 (SD=6,95)	0,80 (SD=1,99)	6,33 (SD=11,00)

Pozn. Cytometrické vyšetření BALT byla provedena na cytometru Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) užitím CXP softwaru (Beckman Coulter)

Tab.8: Počet buněk v BALT u zdravého jedince

90%	alveolární makrofágy
do 10%	lymfocyty
do 2%	neutrofilů
do 0,5%	eosinofily

Dle našich cytologických nálezů (Tab.7), lze již na tomto místě říci, že v BALT u sledovaných pacientů dochází k jistému posunu v počtu buněčných populací vlivem aktivního procesu v plicních alveolech. Oproti zdravým jedincům (Tab.8) se zvyšuje počet jak lymfocytů (IPF 17,87%, sarkoidóza 26,3%, EAA 17%) , tak neutrofilů (IPF 15,84%, sarkoidóza 12,83%, EAA 17,20%), což jasně ukazuje na migraci těchto buněk do plicního intersticia a jejich účast na právě probíhajícím hojícím, poškozujícím či fibrotickém procesu, tedy i na velmi pravděpodobnou sekreci cytokinů. U sarkoidózy pozorujeme nejvyšší zvýšení počtu lymfocytů, jež se pravděpodobně aktivně zapojují do tvorby granulomu. U EAA je navíc dosti patrné zvýšení eosinofilů (6,33%), což zřejmě souvisí s jejich reakcí vůči vyvolávajícímu antigenu (plísňe, houby, termofilní bakterie, nízkomolekulární chemické látky atd.).

6.1.3 Genové polymorfismy cytokinů – výsledky měření

V naší studii jsme se zaměřili na skupinu 13 cytokinů, u nichž jsme sledovali následující polymorfismy (Tab.9). Tyto polymorfismy se nacházejí jak v promotorové oblasti (IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ), tak v překládané oblasti jako (TGF- β , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-4RA). Navíc jsme určili haplotypy u TGF- β , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10.

Oproti zdravým kontrolám jsme u našich vyšetřovaných skupin (IPF, sarkoidóza, EAA) zaznamenali signifikantní rozdíly u IL-4 (IPF), IL-6 (IPF), IL-10 (sarkoidóza). Zbytek sledovaných polymorfismů nebyl statisticky významný v žádné vyšetřované skupině.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí Fisherova testu přesnosti a chi-kvadrát testu použitím MedCal statistického softwaru. Za signifikantní jsme považovali hodnoty p-value menší než 0,5. pro větší určení přesnosti jsme u daných polymorfismů provedli Bonferoniho korekci. Statistické hodnocení souboru provedla Mgr. Jelena Skibová.

Tab.9: Přehled sledovaných genových polymorfismů

CYTOKIN	ALELICKÁ SPECIFITA	GENOTYP
IL-1 α	-889	C/C, C/T, T/T
IL-1 β	-511	C/C, C/T, T/T
	3962	C/C, C/T, T/T
IL-1R	pst 1970	C/C, C/T, T/T
IL-1RA	mspa 11100	C/C, C/T, T/T
IL-4RA	1902	A/A, A/G, G/G
IL-12	-1188	A/A, A/C, C/C
INF- γ	874	A/A, A/T, T/T
TGF- β	codon 10	C/C, C/T, T/T
	codon 25	C/C, C/G, G/G
TNF- α	-308	A/A, A/G, G/G
	-238	A/A, A/G, G/G
IL-2	-330	G/G, G/T, T/T
	166	G/G, G/T, T/T
IL-4	-1089	G/G, G/T, T/T
	-590	C/C, C/T, T/T
	-33	C/C, C/T, T/T
IL-6	-174	C/C, C/G, G/G
	nt 565	A/A, A/G, G/G
IL-10	-1089	A/A, A/G, G/G
	-819	C/C, C/T, T/T
	-592	A/A, A/C, C/C

6.1.3.1 Genové polymorfismy IL-4

U IL-4 jsme hodnotili 3 polymorfismy v promotorové oblasti (-1098) G/T, (-590) C/T, (-33) C/T a následně frekvenci obou haplotypů. Signifikantní rozdíly jsme naměřili u skupiny IPF v porovnání se zdravými kontrolami. U sarkoidózy a EAA jsme statisticky významné rozdíly nezaznamenali.

Tab.10.1: Polymorfismus IL-4 v promotorové oblasti (-1098)

(- 1098) (p=0.0650)	genotyp	GG	GT	TT
	IPF	1 (1,8%)	18 (32,1%)	37 (66,1%)
kontrola	0 (0,0%)	22 (15,3%)	122 (84,7%)	

V promotorové oblasti, konkrétně na pozici (-1098) jsme u pacientů s IPF zaznamenali zvýšenou frekvenci alely T. Nejvyšší počet pacientů s IPF byli přímo homozygoti TT (66,1%), což odpovídá kontrolní skupině, kde nositelé TT alelické kombinace tvořili majoritní skupinu (84,7%). Nicméně u IPF se projevila v této pozici i alela G. V porovnání s kontrolní skupinou (15,3%) se alela G u IPF vyskytla v 33,9% (Tab.10.1.).

Tab.10.2 : Polymorfismus IL-4 v promotorové oblasti (-590)

(-590) (p=0.0000)	genotyp	CC	CT	TT
	IPF	24 (42,9%)	31 (55,4%)	1 (1,8%)
kontrola	112 (77,8%)	27 (18,8%)	5 (3,5%)	

U polymorfismu v oblasti (-590) je zcela markantní u pacientů s IPF výskyt CT heterozygotů (55,4%) v porovnání s kontrolní skupinou (18,8%). U kontrolní skupiny naopak převažuje výskyt CC homozygotů (77,8%) (Tab.10.2.).

Tab.10.3: Polymorfismus IL-4 v promotorové oblasti (-33)

(-33) (p=0.0006)	genotyp	CC	CT	TT
	IPF	29 (52,7%)	25 (45,5%)	1 (1,8%)
kontrola	112 (77,8%)	27 (18,8%)	5 (3,5%)	

U třetího polymorfismu v oblasti (-33) se nejčastěji vyskytují u obou sledovaných skupin homozygoti CC, IPF (52,7%) x kontrola (77,8%). Nicméně u IPF jsme zaznamenali nárůst heterozygotů CT (45,5%) oproti kontrolní skupině (18,8%) (Tab.10.3.).

Tab.10.4: Frekvence haplotypu 1 a 2 v promotorové oblasti IL-4 (-1098) (-590) (-33) mezi IPF a kontrolní skupinou

Tab.10.4.1: Frekvence haplotypu 1 IL-4 v promotorové oblasti (-1098) (-590) (-33)

	genotyp	GCC	TCC	TTC	TCT	TTT
Haplotyp 1	IPF	1 (1,8%)	23 (41,1%)	10 (17,9%)	1 (1,8%)	21 (37,5%)
	kontrola	0 (0,0%)	122 (77,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	32 (22,2%)
(p=0,0000)						

Tab.10.4.2: Frekvence haplotypu 2 IL-4 v promotorové oblasti (-1098) (-590) (-33)

	genotyp	GCC	GCT	GTT	TCC	TCT	TTT
Haplotyp 2	IPF	16 (28,6%)	2 (3,6%)	1 (1,8%)	35 (62,5%)	1 (1,8%)	1 (1,8%)
	kontrola	22 (15,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	177 (81,2%)	0 (0,0%)	5 (3,5%)
(p=0,0061)							

U pacientů s IPF jsme hodnotili frekvenci obou haplotypů IL-4 v promotorové oblasti na pozicích (-1098) (-590) (-33).

Nejčastější výskyt u haplotypu 1 je TCC alelická kombinace, jež se u IPF vyskytuje v 41,1% a u kontrolní skupiny dokonce v 77,8%. Zajímavé zde je relativně vysoký výskyt haplotypu TTC u IPF, který se v kontrolní skupině vůbec nevyskytoval. Svou roli u tohoto haplotypu ve vztahu k IPF může hrát zejména alela T na pozici (-590). Tuto domněnku by potvrzovalo i zvýšení výskytu haplotypu TTT u pacientů s IPF (37,5%) v porovnání s kontrolami (22,2%) (Tab.10.4.1.).

U haplotypu 2 jsme se setkali s rozdílným haplotypem GCC, jehož frekvence byla u pacientů s IPF vyšší (28,6%) v porovnání s kontrolami (15,3%). Nicméně i zde byla nejčastější haplotyp TCC, který u skupiny IPF byl detekován v 62,5% a u kontrolní skupiny dokonce v 81,2% (Tab.10.4.2).

6.1.3.2 Genové polymorfismy IL-10

U IL-10 jsme sledovali polymorfismus v promotorové oblasti, konkrétně na pozicích (-1082) A/G (-819) C/T (-592) A/C. V naší skupině pacientů se projevil nejvíce polymorfismus v oblasti (-819) a (-592) u pacientů se sarkoidózou. U IPF a EAA jsme nezaznamenali statisticky významné rozdíly.

Tab.11.1: Polymorfismus IL-10 v promotorové oblasti (-819)

(-819) (p=0,009)	genotyp	CC	CT	TT
	sarkoidóza	25 (80,6%)	6 (19,4%)	0 (0,0%)
kontrola	74 (51,0%)	64 (44,1%)	7 (4,8%)	

Na pozici (-819) se u pacientů se sarkoidózou vyskytoval častěji CC genotyp ve srovnání se zdravými kontrolami. Naopak u kontrolní skupiny byla v této pozici alela T skoro u poloviny vyšetřovaných osob (48,9%), ale jen u 19,4% pacientů se sarkoidózou (Tab.11.1.).

Tab.11.2: Polymorfismus IL-10 v promotorové oblasti (-592)

(-592) (p=0,022)	genotyp	AA	AC	CC
	sarkoidóza	0 (0,0%)	7 (22,6%)	24 (77,4%)
kontrola	7 (4,8%)	64 (44,1%)	74 (51,0%)	

Také na pozici (-592) se v naší skupině pacientů se sarkoidózou vyskytlo více CC homozygotů ve srovnání s kontrolami, u kterých jsme zaznamenali frekvenci alely a (Tab.11.2.).

Tab.11.3: Frekvence haplotypu IL-10 v promotorové oblasti (-1082) (-819) (-592) u pacientů se sarkoidózou a kontrolní skupinou

Haplotyp (p=0,037)	genotyp	ACA	ACC	ATA	GCC
	sarkoidóza	1 (3,2%)	19 (61,3%)	6 (19,4%)	5 (16,1%)
kontrola	0 (0,0%)	54 (37,2%)	71 (49,0%)	20 (13,8%)	

Ačkoliv polymorfismus v oblasti (-1082) se statisticky sám o sobě v naší studii neprojevil, zaznamenali jsme rozdílnou frekvenci alel haplotypu v promotorové oblasti IL-10 (-1082)(-819)(-592) ve srovnání se zdravou skupinou. Většina pacientů se sarkoidózou je nositelem haplotypu ACC, na rozdíl od kontrol, kde převažuje haplotyp ATA.

6.1.3.3 Genové polymorfismy IL-6

U IL-6 jsme hodnotili 2 polymorfismy a to v oblasti (-174) C/G a (nt 565) A/G. Signifikantní rozdíl jsme našli u haplotypu u pacientů s IPF. U ostatních vyšetřovaných skupin jsme neprokázali statisticky významné rozdíly.

Tab.12: Haplotyp IL-6 (-174) a (nt 565)

	genotyp	CA	CG	GA	GG
Haplotyp	IPF	4 (7,1%)	3 (5,4%)	1 (1,8%)	48 (85,7%)
(p=0,0438)	kontrola	25 (17,4%)	2 (1,4%)	0 (0,00%)	117 (81,2%)

U pacientů s IPF stejně jako u kontrolní skupiny je nejčastějším haplotypem GG. U IPF tvoří tento haplotyp 85,7%, u kontrolní skupiny 81,2%. Nicméně jsme u pacientů s IPF zaznamenali vyšší výskyt CG haplotypu (5,4%) oproti zdravé skupině (1,4%), naopak CA haplotyp u IPF byl nižší (7,1%) v porovnání s kontrolní skupinou (17,4%).

6.2 Genová exprese cytokinů

6.2.1 Charakteristika vyšetřovaných skupin

Do studie genové exprese cytokinů v BALT bylo zahrnuto celkem 16 studijních subjektů. Ty jsme rozdělili dle diagnóz na podskupinu IPF, sarkoidózy, EAA a kontroly (Tab.13). Jedná se o pacienty ve středním věku života, obou pohlaví. Všechna onemocnění byla diagnostikována dle požadovaných kritérií. Žádný z pacientů nepodstoupil během studie, ani nikdy předtím, léčbu steroidy.

Malý počet studijních subjektů je dán mnoha faktory. Ne všichni pacienti byli schopni odběru BALT, ne u všech odebraných jedinců se nakonec potvrdila diagnóza IPP. Zpočátku jsme se také potýkali s optimalizací metody izolace RNA, což zapříčinilo další redukci studijního materiálu. (viz. Diskuze).

Skupina IPF je zastoupena největším počtem pacientů (6). Pacienti s IPF byli diagnostikováni dle mezinárodně požadovaných kritérií. 2 Pacienti plně nesplňovali klinická kritéria, proto podstoupili plicní biopsii a jejich histologický nálezní potvrdil diagnózu IPF/UIP. Sarkoidóza byla diagnostikována dle kritérií ATS/ERS/WASOG. U všech sledovaných pacientů v této skupině se vyskytly nekaseifikující granulomy, potvrzené histologicky. 2 pacienti se sarkoidózou byli dle radiologického nálezu ve II. stádiu onemocnění a 1 pacient v I. stádiu. U pacientů s EAA byla potvrzena reakce po expozici antigenem a dle dalších požadovaných vyšetření byla určena jejich diagnóza (3 pacienti se nacházeli v subakutním stádiu onemocnění, 1 pacient v chronickém stádiu onemocnění). 2 pacienti z této skupiny navíc podstoupili plicní biopsii, pro potvrzení diagnózy. Kontrolní skupinu tvoří osoby, u nich pomocí HRCT bylo vyloučeno jakékoliv difuzní plicní onemocnění.

Tab.13: Demografická data dle skupin pacientů

	IPF (6 pacientů)	Sarkoidóza (3 pacienti)	EAA (4 pacienti)	Kontrola (3 pacienti)	Celkem (16 pacientů)
Věk (roky)	63,8 (SD=10,3) (range 54-82)	39,3 (SD=15,7) (range 27-57)	43,5 (SD=18,0) (range 28-66)	47,7 (SD=11,1) (range 36-58)	51,1 (SD=16,1) (range 27-82)
Pohlaví (♂/♀)	6/0	1/2	2/2	2/1	11/5

6.2.2 Zastoupení jednotlivých buněčných populací v BALT

Tab.14: Počet buněk v BALT

	IPF (6 pacientů)	Sarkoidóza (3 pacienti)	EAA (4 pacienti)	Kontrola (3 pacienti)	Celkem (16 pacientů)
BALT (ml)	32,4 (SD=3,0)	31,9 (SD=3,2)	30,8 (SD=1,9)	30,1 (SD=2,2)	31,4 (SD=2,6)
alveolární makrofágy (%)	65,0 (SD=29,4)	48,7 (SD=31,9)	38,7 (SD=38,6)	94,7 (SD=2,5)	62,4 (SD=32,5)
lymfocyty (%)	29,5 (SD=27,8)	33,7 (SD=19,6)	53,7 (SD=36,9)	3,7 (SD=2,1)	30,0 (SD=28,2)
neutrofilý (%)	2,3 (SD=1,4)	16,7 (SD=22,3)	2,7 (SD=1,2)	1,7 (SD=0,6)	5,1 (SD=10,4)
eosinofily (%)	2,0 (SD=4,9)	1,0 (SD=1,0)	5,0 (SD=1,0)	0 (SD=0,0)	2,0 (SD=3,4)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	4,7 (SD=2,5)	5,1 (SD=1,0)	0,9 (SD=1,3)	0,9 (SD=0,6)	3,1 (SD=2,6)

Pozn. Cytometrické vyšetření BALT byla provedena na cytometru Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) užitím CXP softwaru (Bekman Coulter)

Také u této studie, stejně jako u genových polymorfismů cytokinů (Tab.7), se projevily změny v počtu jednotlivých buněčných populací u daných skupin vzhledem ke kontrolám. U všech třech sledovaných skupin (IPF, sarkoidóza, EAA) byl zvýšen počet lymfocytů.

Nejmarkantněji je toto zvýšení znát u skupiny EAA, kdy počet lymfocytů dosáhl 53,7%, což může souviset i se zvýšením eosinofilů, které jsou aktivovány cytokiny produkovanými především Th2 lymfocyty. Samozřejmě, vyšší počet eosinofilů může také souviset s jejich reakcí vůči antigenu zevního prostředí, jak již bylo zmíněno u komentáře k Tab.7. U této skupiny navíc pozorujeme nejnižší počet alveolárních makrofágů, které mohou být inhibovány, právě cytokiny produkovanými Th2 lymfocyty.

U sarkoidózy jsme ještě zaznamenali zvýšení počtu neutrofilů oproti kontrolám i vůči ostatním sledovaným skupinám, což není typický nále. Může to souviset s prodělanou infekcí některého z pacientů v době odběru. Obecně lze říci, že u plicních fibrotizujících procesů přítomnost neutrofilů v BALT může být považována za špatný pro-

gnostický znak, jelikož tyto buňky svými proteolytickými a oxidativními enzymy ještě více poškozují plicní parenchym a mohou tak přispívat k rozvoji fibrózy (Stříž, 2007). U této skupiny byl také zvýšen počet lymfocytů a to zejména CD4⁺ T buněk, které se podílejí na vzniku granulomu.

6.2.3 Exprese cytokinových genů v BALT -výsledky měření

V naší studii jsme u každého pacienta sledovali expresní profil 84 cytokinových genů. Jednalo se o skupinu interleukinů, interferonů, rodinu TGF-β, rodinu TNF, bone morphogenetic proteins, růstové faktory a další cytokiny (viz. Příloha).

Naměřené hodnoty specifických genů byly srovnány s hodnotami 5 housekeeping genů (ACTB – Actin β, GAPDH - Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, RPL13A - Ribozomální protein L13a, HPRT1 - Hypoxanthin fosforybozyltransferáza 1 a B2M – β-2-microglobulin).

Změna genové exprese se nejvíce projevila u skupiny pacientů se sarkoidózou. Pacienti v této skupině měli zvýšenou expresi Faktoru stimulujícího granulocyty a makrofágy (GM-CSF), Fas ligandu (FASLG), Interferonu gamma (IFN-G), Interleukinu-7 (IL-7), Lymfotoxinu alfa (LTA), Transformujícího růstového faktoru beta 2 (TGF-B2). U skupiny EAA jsme zaznamenali vyšší expresi FASLG, IFN-G a Interleukin-6 (IL-6). Pacienti s IPF měli zvýšenou expresi pouze u Interferonu kappa (IFN-K).

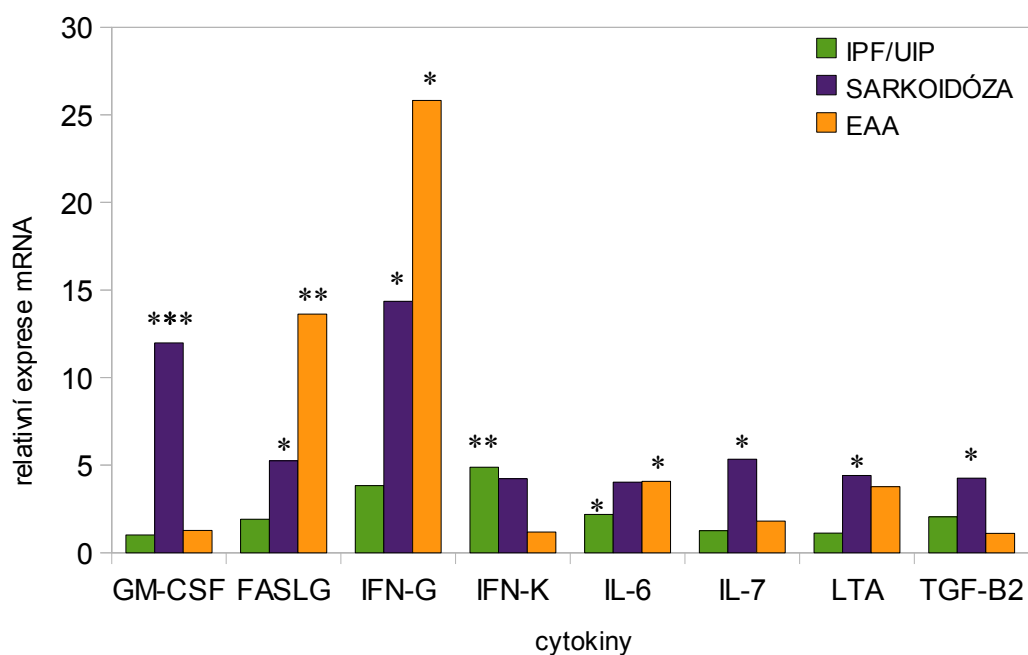
Tab.15: Relativní exprese mRNA u signifikantně zvýšeně exprimovaných cytokinových genů (za signifikantní jsme považovali p -value $\leq 0,05$ – zvýrazněné hodnoty)

	IPF/ kontrola	Sarkoidóza/ kontrola	EAA/ kontrola
GM-CSF	1,02	11,98	1,27
FASLG	1,91	5,25	13,62
IFN-G	3,83	14,35	25,81
IFN-K	4,88	4,23	1,19
IL-6	2,18	4,03	4,08
IL-7	1,26	5,35	1,81
LTA	1,13	4,40	3,77
TGF-B2	2,06	4,26	1,11

Tab.16: Hodnoty p-value mRNA exprese u studovaných skupin vzhledem ke kontrolní skupině (za signifikantní jsme považovali p-value $\leq 0,05$ – zvýrazněné hodnoty)

	IPF/ kontrola	Sarkoidóza/ kontrola	EAA/ kontrola
GM-CSF	1,00	0	0,71
FASLG	0,37	0,03	0,01
IFN-G	0,20	0,02	0,03
IFN-K	0,01	0,09	0,82
IL-6	0,05	0,08	0,02
IL-7	0,59	0,03	0,30
LTA	0,82	0,02	0,20
TGF-B2	0,19	0,02	0,82

Relativní exprese mRNA u signifikantně zvýšeně exprimovaných cytokinových genů



Graf 1: Relativní exprese mRNA u signifikantně zvýšeně exprimovaných cytokinových genů (hvězdičky označují statisticky významné zvýšení genové exprese)

7. Diskuze

Na problematiku plicních fibrotických procesů lze nahlížet z mnoha úhlů pohledu (klinický, diagnostický, histologický, imunologický, genetický atd.). V naší studii jsme se pokusili zaměřit především na etiologii daných onemocnění. Položili jsme si základní otázku, jakou roli může sehrát v tomto procesu reakce imunitního systému, konkrétně cytokiny, jejich polymorfismy a exprese v BALT. Čili zda zde hrají roli i genetické faktory, které by teoreticky mohly ovlivňovat produkci cytokinů a způsobit tak poruchu homeostázy u našich sledovaných pacientů?

Cytologické nálezy nám potvrdily, že v BALT u našich sledovaných pacientů dochází k jistému posunu v počtu buněčných populací vlivem aktivního procesu v plicních alveolech (Tab.7; Tab.14). Migrace buněk imunitního systému (neutrofilů, eosinofilů, lymfocytů) do plicního intersticia zřejmě souvisí s jejich účastí na právě probíhajícím hojícím, poškozujícím či fibrotickém procesu a lze tedy očekávat s velkou pravděpodobností i sekreci cytokinů těmito buňkami.

U studijní skupiny, u níž jsme sledovali polymorfismy cytokinů, jsme získali relativně velký počet pacientů (104) navzdory k nízkému výskytu daných onemocnění v populaci. Nicméně jsme si vědomi, že naše závěry nelze považovat za obecně platné pro celou kavkazskou populaci. Můžeme jen diskutovat s ostatními autory, porovnávat naše výsledky s dosud publikovanými daty a snažit se podpořit či vyvrátit dosud platné hypotézy.

Genový polymorfismus cytokinů se u našich studijních subjektů projevil u interleukinu-4 (IL-4 u IPF), u interleukinu-6 (IL-6 u IPF) a u interleukinu-10 (IL-10 u sarkoidózy). U EAA jsme neprokázali vliv genového polymorfismu u žádného ze stanovovaných cytokinů. Může to být zapříčiněno tím, že u tohoto onemocnění hraje primární roli především expozice antigenu zevního prostředí. Ačkoliv bylo prokázáno, že i u EAA imunitní odpověď na inhalované antigeny může být podmíněna genetickými faktory, např. polymorfismy u TNF rodiny (Chen et al, 2005).

U IL-4 jsme hodnotili 3 polymorfismy v promotorové oblasti tohoto genu, tedy v místě, kam nasedají transkripční faktory. Polymorfismus v této oblasti by tedy mohl mít vliv na transkripci a následně translaci celého proteinu. Rozdílný genotyp u IL-4 se projevil pouze u pacientů s IPF vzhledem ke skupině zdravých kontrol.

Na pozici (-1098) převažovala sice alela T (genotyp TT), nicméně u pacientů s IPF, jsme zaznamenali i zvýšený výskyt alely G (genotyp GT). Dle našich předchozích studií GT genotyp na pozici (-1098) u pacientů s IPF koreluje s vyšším výskytem CD4⁺ T lymfocytů, na rozdíl od TT genotypu, kde převažují CD8⁺ T lymfocyty v BALT (Vašáková et al., 2007). Polymorfismus v této oblasti byl sledován i v jiných studiích např. ve vztahu k chronické osteomyelitidě (zánětlivé onemocnění kostní dřeně) (Tsezou et al., 2008). Autoři v této studii dle svých výsledků soudí, že polymorfismus v této oblasti a v oblasti (-590), kterou jsme také sledovali, je spjat s vyšším rizikem vzniku osteomyelitidy u nosičů alely T. ve studii Trajkov et al. (2009) bylo poukázáno na makedonské populaci, že alela T v oblasti (-1098) u IL-4 genu má pozitivní asociaci s chronickým obstrukčním plicním onemocněním (CHOPN) a že nosiči této alely mají vyšší náchylnost k danému onemocnění. Naopak alela G v této genové oblasti, může mít u těchto pacientů protektivní charakter.

V oblasti (-590) na tomto genovém lokusu, jsme se u pacientů s IPF setkali s vyšším výskytem heterozygotů CT oproti zdravým kontrolám (převaha CC). Vyšší výskyt alely T na tomto místě je diskutován v mnoha studiích a je dáván do souvislosti např. s astmatem (Buchard et al., 1999, Haukin et al., 2002), plicní formou tuberkulózy (Vidyarani et al., 2006) či jinými autoimunitními chorobami jako atopie, alergická rýma, ekzém, Crohnova choroba, thyreoitida (Haukim et al, 2002).

Polymorfismus v oblasti (-33) u IL-4 se projevil u pacientů s IPF nárůstem frekvence výskytu alely T. Nejvyšší zastoupení v našem souboru měli sice homozygoti CC, nicméně u heterozygotů CT jsme zaznamenali vyšší výskyt pacientů s IPF vzhledem ke kontrolní skupině. CT genotyp je častěji zastoupen u pacientů s IPF s dynamickými změnami na HRCT skóre, tedy s progresivní formou onemocnění (Vašáková et al., 2007). Alela T v této oblasti opět asociuje s celou řadou dalších onemocnění, např. juvenilní artritidou (Haukim et al, 2002).

Pokud se tedy podíváme na celou námi sledovanou promotorovou oblast a dáme do souvislosti všechny vyšetřované polymorfismy IL-4, můžeme říci, že u pacientů s IPF v naší studii převažuje haplotyp TCC. Haplotyp TCC byl popsán ve studii Trajkov et al. (2009), spolu s haplotypem GCC, jako protektivní vůči chronickému obstrukční-

mu plicnímu onemocnění (CHOPN), na rozdíl od haplotypu TCT, jež by mohl zvyšovat náchylnost k danému onemocnění. ve studii Rezaei et al., (2009) byl dán haplotyp GCC do souvislosti s variabilním imunodeficitem (CVID). Autoři se domnívají, že u pacientů s tímto haplotypem můžeme očekávat na základě tohoto polymorfismu i vyšší produkci IL-4.

Polymorfismus IL-4 (genu) by tedy mohl ovlivňovat samotnou produkci IL-4 (proteinu). Pokud by došlo vlivem polymorfismu ke nadměrné produkci IL-4, následovalo by i zvýšení počtu Th2 buněk, neb IL-4 je považován za jeden z hlavních determinujících faktorů diferenciaci Th2 lymfocytů. Zároveň IL-4 potlačuje vznik Th1 lymfocytů a tím pádem vzniká nerovnováha ve smyslu převahy Th2 buněk. Zvýšená a trvalá produkce IL-4 byla prokázána v souvislosti s IPF mnoha studiích (Wallace et al., 1999; Ando et al., 1999; Huax et al., 2003). Cytokiny Th2 skupiny, tzn. I IL-4, aktivují tzv.alternativně alveolární makrofágy (AM), které se za normálních okolností podílí na regeneraci plicního epitelu produkcí fibronektinu a TGF- β . Nicméně nadměrná aktivace AM vede k poškozování alveolárního epitelu a fibrogenezi ve fibroblastech následované rozvojem fibrózy.

U pacientů s IPF se také projevil polymorfismus genu pro IL-6, respektive jsme zaznamenali u naší studijní skupiny změnu v haplotypu (-174) (nt565). V promotorové oblasti (-174) dochází k polymorfismu ve smyslu C/G a u intronové sekvence (nt565) A/G. Pacienti s IPF měli nejvyšší výskyt haplotypu GG (85,7%), mnohem menší počet studijních subjektů měl haplotyp CA a CG. Je tedy patrné, že na pozici (-174) u toho genu dochází k výrazné substituci G→C.

Asociace mezi polymorfismem v této oblasti (-174G) a IPF byla diskutována ve studiích Pantelidis et al., (2001) a Říha et al., (2004). V americké studii progresivní formy plicní fibrózy u horníků pracujících v uhelných dolech byla zaznamenána také zvýšená frekvence alely G (-174) u IL-6. Polymorfismus IL-6 byl zde dán do souvislosti s VEGF a ICAM-1, jelikož se u těchto pacientů projevil ve zvýšené formě polygenotypu: VEGF (+405C)/ ICAM-1 (+241A)/IL-6(-174G). Autoři dle svých výsledků soudí, že zmíněný genotyp asociuje se zvýšeným rizikem progresivní formy fibrózy (Yucesoy et al., 2008).

C alela v této oblasti (-174) je naopak dávána do souvislosti se sarkoidózou (Grutters et al., 2003; Mayer et al., 2007). Zmínění autoři naznačují, že alela C by mohla mít vliv u pacientů se sarkoidózou na přechod do fibrotického stádia onemocnění. Ovšem v naší studii jsme u pacientů se sarkoidózou tato tvrzení neprokázali. Stejně jako jsme neprokázali vztah tohoto polymorfismu k EAA. Nicméně v naší předešlé studii (Vašáková et al., 2008) jsme zaznamenali u pacientů s EAA korelaci mezi tímto polymorfismem a zvýšenou hladinou chemokinu ENA-78 v BALT.

Polymorfismus C/G v promotorové oblasti IL-6 je spojován i s dalšími onemocněními. Např. insulin dependentní diabetes mellitus, osteoporóza, systémový lupus erythematosus (SLE), Kaposiho sarkom, rejekce transplantátu ledvin aj. (Haukim et al., 2002).

IL-6 je považován za prozánětlivý cytokin s pleiotropním účinkem působení. Zmíněný genotyp tohoto cytokinu by mohl hrát roli u pacientů s IPF zejména v první fázi poškození plicních alveolů. Na experimentálním myším modelu bylo prokázáno, že IL-6 způsobuje především infiltraci lymfocyty a alveolitidu, avšak jen minimální fibrózu (Di Cosmo et al., 1994). V nedávné studii na myším modelu bylo uvedeno, že rozvoj plicní fibrózy indukované experimentálně bleomycinem může být inhibován antagonistou receptoru leukotrienu B4 (BLTR), a to způsobem zeslabení zánětlivé reakce a změnou v produkci cytokinů, mimo jiné i IL-6, jehož hladina v BALT se snížila (Izumo et al., 2009).

Posledním cytokinem, u něhož jsme zaznamenali změnu v genovém polymorfismu byl IL-10. V naší studijní skupině se nejvíce projevil polymorfismus tohoto cytokinu v promotorové oblasti (-819) C/T a (-592) A/C a v haplotypu 2 (-1082)A/G (-819)C/T (-592)A/C u pacientů se sarkoidózou. Polymorfismus IL-10 (-1082) ve vztahu k tomuto onemocnění hodnotil ve své studii Muraközy et al., (2001), nicméně nenašel signifikantní rozdíly mezi svými pacienty a zdravými kontrolami. ve své studii vycházel z předpokladu, že polymorfismus genu kódující tento cytokin může modifikovat jeho produkci a tím pádem i průběh daného onemocnění.

Sarkoidóza patří do skupiny granulomatózních chorob, stejně jako tuberkulóza či lepra. U těchto infekčních onemocnění byla také sledována role IL-10 a jeho polymorfismu. Vztahem IL-10 k tuberkulóze se zabývá ve své práci např. Thye et al., (2009). Tito autoři popsali ve své studii na Ghanské populaci vliv haplotypu IL-10 na produkci IL-10 při odpovědi na mycobakteriální antigeny. Jedinci s haplotypem (-2849)A (-1082)A (-819)C (-592)C produkovali nízké hladiny IL-10 v plazmě ve srovnání s jedinci s haplotypem (-2849)G (-1082)G (-819)C (-592)C, jež se vyskytoval s menší frekvencí v dané populaci u kontrolních jedinců s negativním kožním tuberkulinovým testem. U pacientů trpících leprou byla detekována nízká hladina IL-10 u nosičů alely T na pozici (-819), zejména v konečném stádiu onemocnění. Snížení produkce IL-10 by to mohlo vést k chronické a neefektivní odpovědi kulminující rozvojem lepry (Pereira et al., 2009).

Co se týče onemocnění neinfekčního charakteru, tak byl zaznamenán vliv genotypu a haplotypu IL-10 u Sjögrenova syndromu (Hulkkonen et al., 2001), SLE (Chung et al., 2007) či systémové sklerózy (Beretta et al., 2007). U všech tří zmiňovaných onemocnění se vyskytoval zvýšeně haplotyp GCC u IL-10 v promotorové oblasti na pozicích (-1082) (-819)(-592) a vždy výskyt tohoto haplotypu koreloval se zvýšenou hladinou IL-10.

Můžeme tedy říci, že genový polymorfismus u IL-10 souvisí s celou řadou onemocnění. U některých daný polymorfismus a haplotyp v genové oblasti zvyšuje produkci proteinu IL-10, u jiných naopak souvisí s poklesem IL-10. U pacientů se sarkoidózou, kde je primární Th1 odpověď spojená se zánětem a vývojem granulomatózy, jsou hladiny IL-10 spolu s dalšími Th2 cytokiny, sníženy (Hill et al., 2008). Tuto hypotézu by potvrdzovaly i studie dalších granulomatózních chorob (tuberkulóza, lepra), u nichž je navíc prokázán i vliv genového polymorfismu na sníženou produkci tohoto cytokinu.

Při studiu genové exprese cytokinů jsme vycházeli z hypotézy, že exprese mRNA je významným mezikrokem mezi geny kódujícími daný cytokin a výslednou produkcí proteinové formy daného cytokinu. Změny v expresi genů by nám proto mohly poskytnout nový pohled na tuto dosud příliš neprobádanou oblast.

Při studiu exprese cytokinových genů v BALT jsme se potýkali s několika problémy. Prvním z nich byl již samotný odběr materiálu (BALT). Při odběru BALT dochází k jistým ztrátám (Tab.6), neb část aplikovaného fyziologického roztoku zůstává vždy v malých prostorech dýchacích cest, takže ani nemůžeme očekávat 100% výtěžnost. Navíc odebraná BALT může být znečištěna přítomností krve či hlenu, což pak znesnadňuje další manipulaci. Samotná bronchoskopie bývá pro pacienty stresující záležitostí a u každého tento zákrok může vyvolat jinou reakci, proto je nutný profesionální a individuální přístup ke každému jedinci.

Dalším kritickým krokem byla stabilizace odebraného materiálu. Abychom zabránili degradaci RNA v BALT, používali jsme zpočátku ihned po odběru stabilizační roztok (*RNAlater RNA Stabilization Reagent* od firmy *Qiagen*), jež měl buňky zafixovat do doby izolace. Tento postup se nám nicméně neosvědčil, jelikož nebylo možné s vysokou účinností oddělit stabilizační činidlo od buněk centrifugací a tak docházelo k ztrátám před izolací RNA. Následně jsme tedy změnili protokol odběru tak, že buňky ihned po odběru se zlyzovaly roztokem *Qiazol* (od firmy *Qiagen*), což je denaturační činidlo, které zaručuje inhibici RNAas a zároveň ochranu molekul RNA. Takto zlyzované vzorky jsme uložili na -80°C do doby izolace RNA.

Při samotné izolaci a manipulaci s RNA je nutno si dát pozor na kontaminaci vzorku DNA a na degradaci RNAasami. z tohoto důvodu se během izolace přidává DNasa, která dokáže odstranit genomickou DNA. pro real-time PCR (RT-PCR) je potřeba získat nejen požadované množství RNA, ale i požadovanou čistotu. Dobrých zkušeností jsme dosáhli s použitím soupravy na izolaci RNA (*RNA Tissue Kit*, *Qiagen*, *Německo*), jejíž princip je založen na vychytání molekul RNA na magnetické mikročástice. Celý proces izolace probíhá v uzavřeném prostoru automatu na izolaci nukleových kyselin, čímž jsme snížili riziko kontaminace na minimum. V průběhu izolace byl navíc zařazen krok degradace kontaminující DNA roztokem DNAsy.

Původní metodu ke stanovení genové exprese, kterou jsme se rozhodli použít pro naši studii, byla analýza pomocí nylonových membránek s ukotvenými genově specifickými sondami (*Super Array, Frederick, MD, USA*), ke kterým hybridizovaly molekuly RNA přepsané do cDNA. I přes veškeré úsilí jsme v daných podmínkách bohužel nedosáhli kýžených výsledků a proto jsme zvolili jinou variantu, a to real-time PCR. Touto metodou jsme již byli schopni lépe a přesněji kvantifikovat genovou expresi. Vybrali jsme si systém od stejného výrobce jako nylonových membránek, neboť jsme byli spokojeni s návazností na další aplikace při analýze dat. Navíc metoda RT-PCR má v sobě dobře propracovaný systém kontroly kvality: 1) pozitivní kontrola, která indikuje přítomnost nečistot ve vzorku, 2) kontrola reverzní transkripce, která umožňuje sledovat účinnost reverzní transkripce a 3) kontrola genomické DNA, která umožňuje detekovat přítomnost kontaminující DNA. Při samotném měření jsme navíc zařadili další krok kontroly kvality využitím analýzy křivky tání PCR produktů, kterou si můžeme ověřit přítomnost pouze jednoho specifického PCR produktu. V případě přítomnosti dvou produktů by se jednalo o kontaminaci genomickou DNA a takovou reakci není možné analyzovat.

Je patrné, že množství pacientů v této studijní skupině je podstatně menší v porovnání se skupinou, u níž jsme sledovali genové polymorfismy cytokinů. Tuto studii je proto nutno chápat jako pilotní, s cílem vyladit danou metodiku a poskytnout tak zdroj základních informací pro další studijní záměry. Jsme si vědomi, že získané výsledky nelze aplikovat na celou populaci, a že nám poskytují jen nástin toho, co se v plicích pacientů během fibrotického procesu skutečně odehrává. Tato oblast je dosud neprobádaná a proto každý nový poznatek lze chápat, jako posun kupředu.

Nicméně jsme zaznamenali zvýšení genové exprese u následujících molekul: GM-CSF, FASLG, IFN-G, IFN-K, IL-7, IL-6, LTA, TGF-B2. Jedná se o růstové faktory (GM-CSF, IL-7), cytokiny spojené Th1 buněčnou odpovědí a zánětlivou reakcí (IFN-G, IL-6), molekuly asociované s apoptózou (FASLG, LTA). Zvýšená exprese značí i možnou vyšší produkci těchto molekul buňkami BALT.

GM-CSF je růstovým faktorem granulocytů a monocytů. Je produkován makrofágy, Th2 buňkami, mastocyty, endotelovými buňkami a také fibroblasty. Exprese tohoto cytokinů byla zvýšena u pacientů se sarkoidózou. Tito pacienti měli také nejvyšší počet neutrofilů v BALT, což by mohlo naznačovat přímý účinek tohoto růstového faktoru na granulocyty v BALT. Zvýšená exprese mRNA GM-CSF v BALT byla prokázána také u pacientů se sarkoidózou ve studii Ishioka et al. (1996). Ten naznačuje možný vliv GM-CSF při akumulaci makrofágů a tvorbě granulomu.

Jelikož je GM-CSF také produktem fibroblastů, lze předpokládat jeho roli i na fibrotickém procesu. Tuto domněnku potvrzuje studie Chung A.S. a Kao W.J. (2009), kde zmínění autoři popisují účinek GM-CSF na fibroblasty a monocyty v podmínkách *in vitro*. U pacientů, u nichž se vyvinula plicní fibróza po zasažení yperitemem, byla zaznamenána zvýšená hladina GM-CSF v BALT (Emad A. a Emad Y., 2007).

Pokud tedy dojde k poškození plicního epitelu, zahájí se reparační procesy, na nichž se zcela nepochybně podílí i GM-CSF. Ten stimuluje alveolární makrofágy a neutrofilly, které se mohou následně shlukovat do granulomů, jako v případě sarkoidózy. Zvýšená exprese GM-CSF v epiteliálních buňkách může být ovlivněna i řadou jiných cytokinů, např. TNF- α (Carakova et al., 2009).

Dalším růstovým faktorem, u něhož jsme zaznamenali zvýšenou expresi v BALT, byl interleukin 7 (IL-7). Ten stimuluje především lymfocyty. Jeho zvýšená exprese se projevila u pacientů se sarkoidózou. U těchto pacientů dochází k masivnímu přílivu Th1 lymfocytů, které exprimují vysoké hladiny receptoru pro IL-7. Polymorfismus v genech kódující tento receptor může mít vliv na rozvoj sarkoidózy a může být považován dokonce za rizikový faktor ve vývoji dalších granulomatózních chorob (Heron et al., 2009).

Ve studiích *in vitro* byl ukázán vliv IL-7 na lidské bronchiální intraepiteliální lymfocyty. Tyto buňky produkovaly nezanedbatelné množství IL-7 (a IL-15), které se ještě zvýšilo po stimulaci IFN- γ (Hirosako et al., 2009). IFN- γ polarizuje imunitní odpověď v Th1 směru, což u sarkoidózy je směrem k formaci granulomů, nežli k fibrotickému procesu. Navíc IL-7 inhibuje účinek TGF- β , potenciálního profibrotického faktoru tím, že up-reguluje Smad7, hlavní inhibitor signální dráhy TGF- β (Huang et al., 2002; Zhang et al., 2004).

IFN- γ je považován za typický cytokin Th1 skupiny. Jeho exprese byla zvýšena u pacientů se sarkoidózou i EAA. Účinek IFN- γ je především antifibrotický, snižuje proliferaci endotelových buněk i syntézu kolagenu ve fibroblastech. Hraje také roli v apoptóze (Wen et al., 1997), což by potvrzovaly i naše nálezy současného zvýšení exprese IFN- γ spolu s FasL a LTA u sarkoidózy i EAA. Naopak u pacientů s IPF byla zaznamenána snížená exprese IFN- γ v BALT (Park et al., 2009), což jsme v naší studii neprokázali.

Největší změnu genové exprese toho cytokinu jsme zaznamenali u EAA. IFN- γ je u tohoto onemocnění zcela zásadní během formace granulomu, s čímž souvisí migrací neutrofilů do alveolárních prostor. Tímto problémem se zabývá studie Nance et al., (2008), kde na myším modelu tohoto onemocnění sledují možné pattern recognition receptors (PRRs) jejichž aktivace příslušnými antigeny způsobuje produkci chemokinů a atrakci neutrofilů do místa poškození. Protektivní roli může mít naopak u tohoto onemocnění produkce IL-4 NKT buňkami, která potlačuje produkci IFN- γ neutrofilů (Hwang et al., 2006).

IFN- κ je členem interferonové rodiny. Je schopen zesílit produkci IL-10 a zároveň inhibovat IL-12 principem negativní zpětné vazby, což v konečném důsledku může souviset s potlačením aktivace T lymfocytů a NK buněk (Nardelli et al., 2002). Tento cytokin byl sledován u pacientů s psoriásou či atopickou dermatitidou v souvislosti s jeho expresí v keratinocytech (Scarponi et al., 2006). Nicméně jeho role v IPP není dosud objasněna. V naší studii, jsme zaznamenali jeho zvýšený expresní profil pouze u pacientů s IPF. Jeho hladina může být ovšem zvýšena vlivem léčby IFN- γ či prodělané virové infekce (Buontempo et al., 2006).

Lymfotoxin- α (LTA) patří do skupiny tumor nekrotizujících faktorů a hraje roli během apoptotické smrti buněk. My jsme zaznamenali zvýšení jeho genové exprese u pacientů se sarkoidózou, stejně jako se u této skupiny projevilo zvýšení FasL. Souvislost mezi LTA a kožní formou sarkoidózy byla sledována ve studii McDougal et al., (2009). Plicní formou sarkoidózy a polymorfismem LTA se zabývala česká studie Mrázek et al., (2005). Také u pacientů s IPF byla provedena genová analýza zahrnující i LTA (Pantelidis et al., 2001).

Fas ligand (FasL) je molekula spojená s procesem apoptózy. Vazbou FasL na Fas receptor dojde k vyvolání kaskádovité reakce, jejíž cílem je programovaná buněčná smrt. FasL je exprimován převážně na aktivovaných T-lymfocytech. Jeho exprese může být tedy zvýšena i u lymfocytů v BALT. to ukázal ve své studii Kuwano et al., (2008) na lymfocytech a granulocytech v BALT u pacientů s IPF. U těchto pacientů může docházet vlivem apoptózy k nadměrnému poškozování plicní výstelky (Barbas-Filho et al., 2001; Martin et al., 2005).

V naší studijní skupině jsme zaznamenali zvýšenou expresi FasL u pacientů se sarkoidózou a EAA. U těchto dvou skupin byla popsána i zvýšená koncentrace FasL v BALT (Shikuwa et al., 2002). Nicméně Laflamme et al., (2003) sledoval u pacientů s EAA nižší výskyt apoptózy lymfocytů v BALT vzhledem ke kontrolní skupině, ačkoliv exprese FasL byla u těchto pacientů srovnatelná s kontrolní skupinou.

Apoptotický proces vyvolaný FasL může mít i pozitivní účinek. Například při odstraňování poškozených buněk, inhalovaných částic a regeneraci tkáně (Nomoto et al., 1997). Je tedy patrné, že apoptóza hraje rozdílnou roli v závislosti na daném onemocnění.

TGF- β 2 je jedním ze tří možných izoform TGF- β , základního imunoregulačního cytokinu. Jeho role ve fibrotickém plicním procesu je nesporná. Působí jako chemotaktický faktor pro fibroblasty, ovlivňuje sekreci jejich růstového faktoru FGF-2 (Khalil et al., 2005), i faktoru podporující rozvoj pojivové tkáně (CTGF) (Duncan et al., 1999).

Jeho zvýšenou genovou expresi jsme zaznamenali u pacientů se sarkoidózou. U tohoto onemocnění byl prokázán vliv genového polymorfismu TGF- β 3 na rozvoj fibrotického stádia onemocnění, nicméně TGF- β 1 a TGF- β 2 se u těchto pacientů neprojevil (Kruit et al., 2006).

Produkce TGF- β 2 může být ovlivněna jinými cytokiny. Například IL-4 a IL-13 stimuluje jeho produkci v lidských bronchiálních epiteliálních buněk, naopak IFN- γ ji inhibuje (Wen et al., 2002). Tyto závěry ukazují nejen na vzájemnou orchestraci cytokinů, ale i na možnou roli TGF- β jak v reparačních procesech během poškození plicního epitelu, tak v patogenezi rozvoje fibrózy.

Posledním cytokinem, u něhož jsme zaznamenali změnu genové exprese, byl IL-6. Jeho exprese byla zvýšena u pacientů s EAA i IPF. Role tohoto cytokinu v patogenezi fibrotizujících plicních procesů byla již diskutována v hodnocení genových polymorfismů, jelikož jsme u IL-6 zaznamenali i statisticky významnou změnu v haplotypu u pacientů s IPF. Závěrem lze tedy říci, že IL-6 je cytokinem s pleiotropními účinky, jež se dozajista podílí na patogenezi daných onemocnění, nicméně mechanismus jeho působení u IPP není dosud zcela objasněn.

8. Závěr

Na počátku naší studie jsme vycházeli z hypotézy, že u intersticiálních plicních procesů hraje jednu z hlavních rolí i patologická reakce imunitního systému. Ta zahrnuje celou řadu mechanismů, které se společně s dalšími faktory mohou podílet na fibrotizaci plicní tkáně. V naší studii jsme se zaměřili na jednu složku imunitního systému, a to na cytokiny. Sledovali jsme jejich polymorfismy a expresi v BALT s cílem najít znaky odlišné a typické pro danou diagnózu a zároveň i znaky společné, kupříkladu patogenetické cesty a jejich modifikující faktory vedoucí k fibrotizaci plicní tkáně. Naším studijním záměrem byl nejen průkaz genetických faktorů, ale i vytvoření a zdokonalení metody na izolaci RNA z BALT pro další klinické použití či výzkumné záměry.

Jsme si vědomi, že soubor našich pacientů neodpovídá požadovanému množství, z něhož by bylo možno vyvozovat obecně platné závěry pro celou populaci. Nicméně naše výsledky potvrzují dosud platné teorie o možných genetických faktorech, jež ovlivňují produkci cytokinů u těchto onemocnění. Cytokiny pak následně mohou posunout rovnováhu ve směru Th2 buněčné odpovědi a vyvolat možný rozvoj plicní fibrózy. V opačném případě, převažuje-li Th1 odpověď, může dojít k zánětlivé a hypersenzitivní reakci jako u EAA, či k alveolidě a tvorbě granulomu jako v případě sarkoidózy.

Je nezbytné si uvědomit, že pracujeme s lidským organismem, ve kterém probíhá současně několik desítek či stovek dějů, jež se mohou lišit od reakcí *in vitro*, často situovaných do ideálních podmínek. Nelze obecně říci, že cytokiny způsobují či potlačují plicní fibrózu. Jejich role v tomto procesu je nepopíratelná, nicméně se na něm podílí i řada dalších faktorů, jako chemokiny, angiogenní a růstové faktory, jednotlivé buněčné populace. Také faktory zevního prostředí hrají u těchto onemocnění svou roli, expozice alergenu, inhalace toxických či karcinogenních látek, znečištěné pracovní prostředí (viz.EAA). Každý jedinec na tyto faktory reaguje jiným způsobem, každý si zároveň nese jinou genetickou výbavu. Je proto nelehké zobecnit dané poznatky a vytvořit obecně platné pravidlo pro danou skupinu onemocnění.

V naší studii jsme se snažili přispět k dosud známým poznatkům a naznačit další možné cesty výzkumu této problematiky.

9. Seznam použitých zkratek

1. LF UK	1.lékařská fakulta Univerzity Karlovy
3' UTR	3' nepřekládaná oblast (3' untraslation region)
A	adenin
ACE	angiotenzin-konvertující enzym
ACTB	Actin β
AM	alveolární makrofág
ASC	Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain
ATS	Americká hrudní společnost (American Thoracic Society)
B2M	β -2-microglobulin
BAL	Bronchoalveolární laváž
BALT	Bronchoalveolární tekutina
BLTR	receptor leukotrienu B4
C	cytozin
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CLC	cardiotrophin-like cytokine
CNFT	ciliární neutrofilní faktor (Ciliary neurotrophic factor)
CSIF	Faktor inhibující syntézu cytokinů
CT-1	cardiotrophin-1
CTGF	růstový faktor pojivové tkáně (Connective tissue growth factor)
CVID	variabilní imunodeficit
DLCO	difuzní plicní kapacita oxidu uhličitého (množství plynu, které přejde přes.alveolokapilární membránu v závislosti na velikosti molekuly, na parciálním tlaku před a za membránou, na kvalitě a čase. Snížení hodnoty DLCO značí fibrózu)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EAA	exogenní alergická alveolitida
ECM	extracelulární matrix
EDTA	ethylen-diamino-tetraoctová kyselina (ethylen-diamino-tetraacetic acid)
ERS	Evropská respirační společnost (European respirator society)
FGF-2	růstový faktor fibroblastů (Fibroblast growth factor)
FTNsP	Fakultní Thomayerova nemocnice s poliklinikou
G	guanin

GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
GM-CSF	Granulocyty and monocyty - colony stimulated factor
HB-EGF	heparin binding epidermal growth factor
HPRT1	Hypoxanthin fosforybozyltransferáza 1
HRCT	počítačová tomografie s vysokou rozlišovací schopností (high resolution computed tomography)
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
IFN- γ	interferon gamma
IGF-I	Insulin-like growth factor
IL-1R	receptor pro IL-1
IL-1	interleukin 1
IL-10	interleukin 10
IL-12	interleukin 12
IL-1RA	antagonista receptoru interleukinu 1
IL-2	interleukin 2
IL-2R	receptor pro IL-2
IL-4	interleukin 4
IL-6	interleukin 6
IPF	idiopatická plicní fibróza
IPP	intesticiální plicní procesy
LAF	faktor aktivující leukocyty (Leukocyte activated factor)
LIF	faktor inhibující leukemii (Leukemia inhibitory factor)
LPS	lipopolysacharid
MCP-1	membránový kofaktorový protein (Membrane cofactor protein, CD46)
MSCs	mezenchymální kmenové buňky
NK	„přirození zabíječi“ (natural killer cells)
OSM	oncostatin M
PBS	fyzilogický roztok s fosfátovým pufrem (phosphate buffer saline)
PCR	polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PDGE2	prostaglandin 2
PDGF	destičkový růstový faktor (Platelet derivated growth factor)
RNA	ribonukleová kyselina
RPL13A	ribosomální protein L13a
RT-PCR	real- time PCR
RTG	rentgen
SLE	systemový lupus erythematodes

Tc	cytotoxické T lymfocyty (cytotoxic T cells)
TCGF	růstový faktor T lymfocytů (T cell growth factor)
TGF- β	transformující růstový faktor (Transforming growth factor-beta)
TH	„pomocné“ T lymfocyty (helper T cells)
TNF-R	receptor pro TNF
TNF- α	Faktor nekrotizující nádory (Tumor necrosis factor-alpha)
U	uracyl
UIP	běžná intersticiální pneumonie (usual interstitial pneumonia)
VC	vitální kapacita plic
VEGF	vaskulární a endoteliální růstový faktor
WASOG	World Association of Sarcoidosis and Granulomatous Disorders statement on sarcoidosis

10. Příloha

Seznam sledovaných genů a jejich pozice na PCR destičce

Vyšetřované geny												
A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12	
B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12	
C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12	
D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12	
E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12	
F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12	
G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12	
H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12	
Housekeepingové geny					Kontrola genomické DNA	Kontrola reverzní transkripce			Kontrola pozitivní PCR			

Pozice	Symbol	Popis genu
A01	BMP1	Bone morfogenetický protein 1
A02	BMP2	Bone morfogenetický protein 2
A03	BMP3	Bone morfogenetický protein 3
A04	BMP4	Bone morfogenetický protein 4
A05	BMP5	Bone morfogenetický protein 5
A06	BMP6	Bone morfogenetický protein 6
A07	BMP7	Bone morfogenetický protein 7
A08	BMP8B	Bone morfogenetický protein 8b
A09	M-CSF	Macrophage-Colony stimulating factor 1
A10	GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
A11	FAM3B	Family with sequence similarity 3, member B
A12	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)

Pozice	Symbol	Popis genu
B01	FIGF	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)
B02	GDF10	Growth differentiation factor 10
B03	GDF11	Growth differentiation factor 11
B04	GDF2	Growth differentiation factor 2
B05	GDF3	Growth differentiation factor 3
B06	GDF5	Growth differentiation factor 5
B07	MSTN	Myostatin
B08	GDF9	Growth differentiation factor 9
B09	IFNA1	Interferon, alpha 1
B10	IFNA2	Interferon, alpha 2
B11	IFNA4	Interferon, alpha 4
B12	IFNA5	Interferon, alpha 5

Pozice	Symbol	Popis genu
C01	IFNA8	Interferon-alpha 8
C02	IFNB1	Interferon-beta 1, fibroblast
C03	IFNG	Interferon-gamma
C04	IFNK	Interferon, kappa
C05	IL-10	Interleukin-10
C06	IL-11	Interleukin-11
C07	IL-12A	Interleukin-12A (p35)
C08	IL-12B	Interleukin-12B (p40)
C09	IL-13	Interleukin-13
C10	TXLNA	Taxilin alpha
C11	IL-15	Interleukin-15
C12	IL-16	Interleukin-16

Pozice	Symbol	Popis genu
D01	IL-17A	Interleukin-17A
D02	IL-17B	Interleukin-17B
D03	IL-17C	Interleukin-17C
D04	IL-25	Interleukin-25
D05	IL-18	Interleukin-18
D06	IL-19	Interleukin-19
D07	IL-1B	Interleukin-1 alpha
D08	IL-1A	Interleukin-1 beta
D09	IL-1F10	Interleukin-1family, member 10 (theta)
D10	IL-1F5	Interleukin-1family, member 5 (delta)
D11	IL-1F6	Interleukin-1family, member 6 (epsilon)
D12	IL-1F7	Interleukin-1family, member 7 (zeta)

Pozice	Symbol	Popis genu
E01	IL-1F8	Interleukin-1family, member 8 (eta)
E02	IL-1F9	Interleukin-1family, member 9
E03	IL-2	Interleukin-2
E04	IL-20	Interleukin-20
E05	IL-21	Interleukin-21
E06	IL-22	Interleukin-22
E07	IL-24	Interleukin-24
E08	IL-3	Interleukin-3
E09	IL-4	Interleukin-4
E10	IL-5	Interleukin-5
E11	IL-6	Interleukin-6
E12	IL-7	Interleukin-7

Pozice	Symbol	Popis genu
F01	IL-8	Interleukin-8
F02	IL-9	Interleukin-9
F03	INHBA	Inhibin alpha
F04	INHBA	Inhibin betaA
F05	LEFTY	Left-right determination factor 2
F06	LTA	Lymfotoksin alpha
F07	LTB	Lymfotoksin beta
F08	NODAL	Nodal homolog (mouse)
F09	PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide
F10	TGFA	Transforming growth factor-alpha
F11	TGFB1	Transforming growth factor-beta1
F12	TGFB2	Transforming growth factor-beta2

Pozice	Symbol	Popis genu
G01	TGFB3	Transforming growth factor-beta3
G02	TNF	Tumor necrosis factor
G03	TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
G04	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
G05	TNFSF11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
G06	TNFSF12	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12
G07	TNFSF13	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13
G08	TNFSF13B	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
G09	TNFSF14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14
G10	TNFSF4	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
G11	CD70	CD70 molecule
G12	TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8

Pozice	Symbol	Popis genu
H01	B2M	Beta-2-microglobulin
H02	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H03	RPL13A	Ribosomal protein L13a
H04	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H05	ACTB	Actin-beta
H06	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	RTC	Reverse Transcription Control
H08	RTC	Reverse Transcription Control
H09	PPC	Positive PCR Control
H10	PPC	Positive PCR Control
H11	PPC	Positive PCR Control
H12	PPC	Positive PCR Control

11. Literatura

1. Adams JS, Sharma OP, Gacad MA, Singer FR. Metabolism of 25-hydroxyvitamin D3 by cultured pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis. *J Clin Invest.* 1983 Nov;72(5):1856-60. PubMed PMID: 6688814; PubMed Central PMCID: PMC370476.
2. Ambrosini V, Cancellieri A, Chilosi M, Zompatori M, Trisolini R, Saragoni L, Poletti V. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: report of a series. *Eur Respir J.* 2003 Nov;22(5):821-6. PubMed PMID: 14621091.
3. Ando M, Miyazaki E, Fukami T, Kumamoto T, Tsuda T. Interleukin-4-producing cells in idiopathic pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Respirology.* 1999 Dec;4(4):383-91. PubMed PMID: 10612573.
4. Antoniou KM, Tzanakis N, Tzortzaki EG, Malagari K, Koutsopoulos AV, Alexandrakis M, Wells AU, Siafakas NM. Different angiogenic CXC chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid after interferon gamma-1b therapy in idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008 Dec;21(6):840-4. Epub 2008 Jul 2. PubMed PMID: 18644457.
5. Antoniou KM, Tzouvelekis A, Alexandrakis MG, Tsiligianni I, Tzanakis N, Sfiridaki K, Rachiotis G, Bouros D, Siafakas NM. Upregulation of Th1 cytokine profile (IL-12, IL-18) in bronchoalveolar lavage fluid in patients with pulmonary sarcoidosis. *J Interferon Cytokine Res.* 2006 Jun;26(6):400-5. PubMed PMID: 16734560.
6. Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev.* 2008 Jun;223:20-38. Review. PubMed PMID: 18613828.
7. Awad M, Pravica V, Perrey C, El Gamel A, Yonan N, Sinnott PJ, Hutchinson IV. CA repeat allele polymorphism in the first intron of the human interferon-gamma gene is associated with lung allograft fibrosis. *Hum Immunol.* 1999 Apr;60(4):343-6. PubMed PMID: 10363726.
8. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation.* 1998 Oct 27;66(8):1014-20. PubMed PMID: 9808485.
9. Bajwa EK, Ayas NT, Schulzer M, Mak E, Ryu JH, Malhotra A. Interferon-gamma1b therapy in idiopathic pulmonary fibrosis: a metaanalysis. *Chest.* 2005 Jul;128(1):203-6. PubMed PMID: 16002936.
10. Barbas-Filho JV, Ferreira MA, Sesso A, Kairalla RA, Carvalho CR, Capelozzi VL. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/usual interstitial pneumonia (UIP). *J Clin Pathol.* 2001 Feb;54(2):132-8. PubMed PMID: 11215282; PubMed Central PMCID: PMC1731356.
11. Beretta L, Cappiello F, Barili M, Scorza R. Proximal interleukin-10 gene polymorphisms in Italian patients with systemic sclerosis. *Tissue Antigens.* 2007 Apr;69(4):305-12. PubMed PMID: 17389013.

12. Bergeron A, Soler P, Kambouchner M, Loiseau P, Milleron B, Valeyre D, Hance AJ, Tazi A. Cytokine profiles in idiopathic pulmonary fibrosis suggest an important role for TGF-beta and IL-10. *Eur Respir J*. 2003 Jul;22(1):69-76. PubMed PMID: 12882453.
13. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science*, 1985, 229(4716):869-871. Classical article. *J Immunol*. 2008 Jul 1;181(1):7-9. PubMed PMID: 18566363.
14. Bouros D, Antoniou KM, Tzouvelekis A, Siafakas NM. Interferon-gamma 1b for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Expert Opin Biol Ther*. 2006 Oct;6(10):1051-60. Review. PubMed PMID: 16989587.
15. Buontempo PJ, Jubin RG, Buontempo CA, Wagner NE, Reyes GR, Baroudy BM. Antiviral activity of transiently expressed IFN-kappa is cell-associated. *J Interferon Cytokine Res*. 2006 Jan;26(1):40-52. PubMed PMID: 16426147.
16. Burchard EG, Silverman EK, Rosenwasser LJ, Borish L, Yandava C, Pillari A, Weiss ST, Hasday J, Lilly CM, Ford JG, Drazen JM. Association between a sequence variant in the IL-4 gene promoter and FEV(1) in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(3):919-22.
17. Cakarova L, Marsh LM, Wilhelm J, Mayer K, Grimminger F, Seeger W, Lohmeyer J, Herold S. Macrophage TNF- α Induces Epithelial Expression of GM-CSF: Impact on Alveolar Epithelial Repair. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Jul 9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19590023.
18. Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Générénaz L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Poirier O. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. the Etude Cas-T  moins de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension*. 1996 Nov;28(5):881-7. PubMed PMID: 8901839.
19. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Sep;72(9):3666-70. PubMed PMID: 1103152; PubMed Central PMCID: PMC433057.
20. Coker RK, Laurent GJ, Jeffery PK, du Bois RM, Black CM, McAnulty RJ. Localisation of transforming growth factor beta1 and beta3 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung. *Thorax*. 2001 Jul;56(7):549-56. PubMed PMID: 11413354; PubMed Central PMCID: PMC1746092.
21. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, Sobonya RE. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Oct;150(4):967-72. PubMed PMID: 7921471
22. Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze MT, Wesa A, Parmiani G, Anichini A. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 15;13(16):4677-85. Review. PubMed PMID: 17699845.

23. DiCosmo BF, Geba GP, Picarella D, Elias JA, Rankin JA, Stripp BR, Whitsett JA, Flavell RA. Airway epithelial cell expression of interleukin-6 in transgenic mice. Uncoupling of airway inflammation and bronchial hyperreactivity. *J Clin Invest*. 1994 Nov;94(5):2028-35. PubMed PMID: 7962549; PubMed Central PMCID: PMC294635.
24. Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J*. 1999 Oct;13(13):1774-86. PubMed PMID: 10506580.
25. Elias JA, Freundlich B, Adams S, Rosenbloom J. Regulation of human lung fibroblast collagen production by recombinant interleukin-1, tumor necrosis factor, and interferon-gamma. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;580:233-44. PubMed PMID: 2110794.
26. Emad A, Emad Y. Increased granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) levels in BAL fluid from patients with sulfur mustard gas-induced pulmonary fibrosis. *J Aerosol Med*. 2007 Fall;20(3):352-60. PubMed PMID: 17894541.
27. Freeburn RW, Kendall H, Dobson L, Egan J, Simler NJ, Millar AB. The 3'untranslated region of tumor necrosis factor-alpha is highly conserved in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Eur Cytokine Netw*. 2001 Mar;12(1):33-8. PubMed PMID: 11282543.
28. Fujita M, Shannon JM, Irvin CG, Fagan KA, Cool C, Augustin A, Mason RJ. Overexpression of tumor necrosis factor-alpha produces an increase in lung volumes and pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Jan;280(1):L39-49. PubMed PMID: 11133493.
29. Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulin N, Charron S, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Akira S, Quesniaux VF, Lagente V, Ryffel B, Couillin I. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest*. 2007 Dec;117(12):3786-99. PubMed PMID: 17992263; PubMed Central PMCID: PMC2066195.
30. Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2001 Aug 16;345(7):517-25. Review. PubMed PMID: 11519507.
31. Grutters JC, du Bois RM. Genetics of fibrosing lung diseases. *Eur Respir J*. 2005 May;25(5):915-27. Review. PubMed PMID: 15863652.
32. Grutters JC, Sato H, Pantelidis P, Ruven HJ, McGrath DS, Wells AU, van den Bosch JM, Welsh KI, du Bois RM. Analysis of IL6 and IL1A gene polymorphisms in UK and Dutch patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2003 Mar;20(1):20-7. PubMed PMID: 12737276.
33. Hall MA, McGlinn E, Coakley G, Fisher SA, Boki K, Middleton D, Kaklamani E, Moutsopoulos H, Loughran TP Jr, Ollier WE, Panayi GS, Lanchbury JS. Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-mediated disease. *Genes Immun*. 2000 Feb;1(3):219-24. PubMed PMID: 11196715.

34. Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ, Keen LJ. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2. *Genes and Immunity*, 2002;3:313–330
35. Heron M, Grutters JC, van Moorsel CH, Ruven HJ, Huizinga TW, van der Helm-van Mil AH, Claessen AM, van den Bosch JM. Variation in IL7R predisposes to sarcoid inflammation. *Genes Immun*. 2009 Jul 23. [Epub ahead of print] PubMed PMID:19626041.
36. Hill TA, Lightman S, Pantelidis P, Abdallah A, Spagnolo P, du Bois RM. Intracellular cytokine profiles and T cell activation in pulmonary sarcoidosis. *Cytokine*. 2008 Jun;42(3):289-92. Epub 2008 May 15. PubMed PMID: 18485728.
37. Hirosako S, Goto E, Fujii K, Tsumori K, Hirata N, Tsumura S, Kamohara H, Kohroggi H. Human bronchial intraepithelial T cells produce interferon-gamma and stimulate epithelial cells. *Clin Exp Immunol*. 2009 Feb;155(2):266-74. Epub 2008 Nov 26. PubMed PMID: 19040600; PubMed Central PMCID: PMC2675258.
38. Huang D, Cancilla MR, Morahan G. Complete primary structure, chromosomal localisation, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit. *Genes Immun*. 2000 Dec;1(8):515-20. PubMed PMID:11197695.
39. Huang M, Sharma S, Zhu LX, Keane MP, Luo J, Zhang L, Burdick MD, Lin YQ, Dohadwala M, Gardner B, Batra RK, Strieter RM, Dubinett SM. IL-7 inhibits fibroblast TGF-beta production and signaling in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*. 2002 Apr;109(7):931-7. PubMed PMID: 11927620; PubMed Central PMCID: PMC150933.
40. Huaux F, Liu T, McGarry B, Ullenbruch M, Phan SH. Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis. *J Immunol*. 2003 Feb 15;170(4):2083-92. PubMed PMID: 12574379.
41. Hulkkonen J, Laippala P, Hurme M. A rare allele combination of the interleukin-1 gene complex is associated with high interleukin-1 beta plasma levels in healthy individuals. *Eur Cytokine Netw*. 2000 Jun;11(2):251-5. PubMed PMID: 10903804.
42. Hulkkonen J, Pertovaara M, Anttonen J, Lahdenpohja N, Pasternack A, Hurme M. Genetic association between interleukin-10 promoter region polymorphisms and primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2001 Jan;44(1):176-9. PubMed PMID: 11212157.
43. Huttyrová B, Pantelidis P, Drábek J, Zůrková M, Kolek V, Lenhart K, Welsh KI, Du Bois RM, Petrek M. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jan15;165(2):148-51. PubMed PMID: 11790645.
44. Hwang SJ, Kim S, Park WS, Chung DH. IL-4-secreting NKT cells prevent hypersensitivity pneumonitis by suppressing IFN-gamma-producing neutrophils. *J Immunol*. 2006 Oct 15;177(8):5258-68. PubMed PMID: 17015711.

45. Chen B, Tong Z, Ye Q, Nakamura S, Costabel U, Guzman J. Expression of tumour necrosis factor receptors by bronchoalveolar cells in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J.* 2005 Jun;25(6):1039-43. PubMed PMID: 15929959.
46. Chung AS, Kao WJ.: Fibroblasts regulate monocyte response to ECM-derived matrix: the effects on monocyte adhesion and the production of inflammatory, matrix remodeling and growth factor proteins. *J Biomed Mater Res A.* 2009 Jun 15;89(4):841-53. PubMed PMID: 19437738
47. Chung EY, Liu J, Zhang Y, Ma X. Differential expression in lupus-associated IL-10 promoter single-nucleotide polymorphisms is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Genes Immun.* 2007 Oct;8(7):577-89. Epub 2007 Aug 16. PubMed PMID: 17703177.
48. Idali F, Wikén M, Wahlström J, Mellstedt H, Eklund A, Rabbani H, Grunewald J. Reduced Th1 response in the lungs of HLA-DRB1*0301 patients with pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J.* 2006 Mar;27(3):451-9. PubMed PMID: 16507843.
49. Ishioka S, Saito T, Hiyama K, Haruta Y, Maeda A, Hozawa S, Inamizu T, Yamakido M. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, platelet-derived growth factor-B and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA in cells of bronchoalveolar lavage fluids from patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 1996 Sep;13(2):139-45. PubMed PMID: 8893383.
50. Izumo T, Kondo M, Nagai A. Effects of a leukotriene B4 receptor antagonist on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2009 May 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19460787.
51. Jakubzick C, Choi ES, Joshi BH, Keane MP, Kunkel SL, Puri RK, Hogaboam CM. Therapeutic attenuation of pulmonary fibrosis via targeting of IL-4- and IL-13-responsive cells. *J Immunol.* 2003 Sep 1;171(5):2684-93. PubMed PMID: 12928422.
52. Johnston CJ, Piedboeuf B, Rubin P, Williams JP, Baggs R, Finkelstein JN. Early and persistent alterations in the expression of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha mRNA levels in fibrosis-resistant and sensitive mice after thoracic irradiation. *Radiat Res.* 1996 Jun;145(6):762-7. PubMed PMID: 8643837.
53. Keane MP, Belperio JA, Burdick MD, Strieter RM. IL-12 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001 Jul;281(1):L92-7. PubMed PMID: 11404251.
54. Kelly MM, Leigh R, Gilpin SE, Cheng E, Martin GE, Radford K, Cox G, Gauldie J. Cell-specific gene expression in patients with usual interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Sep 1;174(5):557-65. Epub 2006 May 25. PubMed PMID: 16728711.

55. Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, Unruh H.: TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996 Feb;14(2):131-8. PubMed: PMID: 8630262
56. Khalil N, Xu YD, O'Connor R, Duronio V. Proliferation of pulmonary interstitial fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta1-induced release of extracellular fibroblast growth factor-2 and phosphorylation of p38 MAPK and JNK. *J Biol Chem.* 2005 Dec 30;280(52):43000-9. Epub 2005 Oct 24. PubMed PMID: 16246848.
57. Kishore R, Tebo JM, Kolosov M, Hamilton TA. Cutting edge: clustered AU-rich elements are the target of IL-10-mediated mRNA destabilization in mouse macrophages. *J Immunol.* 1999 Mar 1;162(5):2457-61. PubMed PMID: 10072482.
58. Kruit A, Grutters JC, Ruven HJ, van Moorsel CH, Weiskirchen R, Mengsteab S, van den Bosch JM. Transforming growth factor-beta gene polymorphisms in sarcoidosis patients with and without fibrosis. *Chest.* 2006 Jun;129(6):1584-91. PubMed PMID: 16778279.
59. Kuwano K. Involvement of epithelial cell apoptosis in interstitial lung diseases. *Intern Med.* 2008;47(5):345-53. Epub 2008 Mar 3. Review. PubMed PMID: 18310962
60. Laflamme C, Israël-Assayag E, Cormier Y. Apoptosis of bronchoalveolar lavage lymphocytes in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J.* 2003 Feb;21(2):225-31. PubMed PMID: 12608434.
61. Latsi P, Pantelidis P, Vassilakis D, Sato H, Welsh KI, du Bois RM. Analysis of IL-12 p40 subunit gene and IFN-gamma G5644A polymorphisms in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Respir Res.* 2003;4:6. Epub 2003 Jun 27. PubMed PMID: 12914676; PubMed Central PMCID: PMC185252.
62. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8. PubMed PMID: 11846609
63. Marshall RP, McAnulty RJ, Laurent GJ. The pathogenesis of pulmonary fibrosis: is there a fibrosis gene? *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Jan;29(1):107-20. Review. PubMed PMID: 9076945.
64. Martin TR, Hagimoto N, Nakamura M, Matute-Bello G. Apoptosis and epithelial injury in the lungs. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(3):214-20. Review. PubMed PMID: 16222040; PubMed Central PMCID: PMC2713319.
65. Martinez JA, King TE Jr, Brown K, Jennings CA, Borish L, Mortenson RL, Khan TZ, Bost TW, Riches DW. Increased expression of the interleukin-10 gene by alveolar macrophages in interstitial lung disease. *Am J Physiol.* 1997 Sep;273(3 Pt 1):L676-83. PubMed PMID: 9316504.
66. Mayer A, Medica I, Salobir B, Sabovic M, Tercelj M, Peterlin B. Polymorphisms in genes coding for mediators in the interleukin cascade and their effect on susceptibility to sarcoidosis in the Slovenian population. *Int J Mol Med.* 2007;20(3):385-90.

67. McDougal KE, Fallin MD, Moller DR, Song Z, Cutler DJ, Steiner LL, Cutting GR; ACCESS Research Group. Variation in the lymphotoxin-alpha/tumor necrosis factor locus modifies risk of erythema nodosum in sarcoidosis. *J Invest Dermatol.* 2009 Aug;129(8):1921-6. Epub 2009 Feb 19. PubMed PMID: 19225544.
68. Minshall EM, Tscopoulos A, Yasruel Z, Wallaert B, Akoum H, Vorng H, Tonnel AB, Hamid Q. Cytokine mRNA gene expression in active and nonactive pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J.* 1997 Sep;10(9):2034-9. PubMed PMID: 9311498.
69. Moodley YP, Scaffidi AK, Misso NL, Keerthisingam C, McAnulty RJ, Laurent GJ, Mutsaers SE, Thompson PJ, Knight DA. Fibroblasts isolated from normal lungs and those with idiopathic pulmonary fibrosis differ in interleukin-6/gp130-mediated cell signaling and proliferation. *Am J Pathol.* 2003 Jul;163(1):345-54. PubMed PMID: 12819039; PubMed Central PMCID: PMC1868172.
70. Morahan G, Huang D, Ymer SI, Cancilla MR, Stephen K, Dabadghao P, Werther G, Tait BD, Harrison LC, Colman PG. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. *Nat Genet.* 2001 Feb;27(2):218-21. Erratum in: *Nat Genet* 2001 Mar;27(3):346. PubMed PMID: 11175794.
71. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol.* 2005 Jul 1;175(1):5-14. PubMed PMID: 15972624.
72. Mrazek F, Holla LI, Hutyrova B, Znojil V, Vasku A, Kolek V, Welsh KI, Vacha J, du Bois RM, Petrek M. Association of tumour necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha and HLA-DRB1 gene polymorphisms with Löfgren's syndrome in Czech patients with sarcoidosis. *Tissue Antigens.* 2005 Feb;65(2):163-71. PubMed PMID: 15713215.
73. Mroz RM, Korniluk M, Stasiak-Barmuta A, Chyczewska E. Increased levels of interleukin-12 and interleukin-18 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. *J Physiol Pharmacol.* 2008 Dec;59 Suppl 6:507-13. PubMed PMID: 19218675.
74. Müller NL, Coiby TV. Idiopathic interstitial pneumonias: high-resolution CT and histologic findings. *Radiographics.* 1997 Jul-Aug;17(4):1016-22. PubMed PMID: 9225401.
75. Muraközy G, Gaede KI, Zissel G, Schlaak M, Müller-Quernheim J. Analysis of gene polymorphisms in interleukin-10 and transforming growth factor-beta 1 in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2001 Jun;18(2):165-9. PubMed PMID: 11436536.
76. Nance SC, Yi AK, Re FC, Fitzpatrick EA. MyD88 is necessary for neutrophil recruitment in hypersensitivity pneumonitis. *J Leukoc Biol.* 2008 May;83(5):1207-17. Epub 2008 Feb 19. PubMed PMID: 18285403; PubMed Central PMCID: PMC2626771.

77. Nardelli B, Zaritskaya L, Semenuk M, Cho YH, LaFleur DW, Shah D, Ullrich S, Girolomoni G, Albanesi C, Moore PA. Regulatory effect of IFN-kappa, a novel type I IFN, on cytokine production by cells of the innate immune system. *J Immunol.* 2002 Nov 1;169(9):4822-30. PubMed PMID: 12391192.
78. Nomoto Y, Kuwano K, Hagimoto N, Kunitake R, Kawasaki M, Hara N. Apoptosis and Fas/Fas ligand mRNA expression in acute immune complex alveolitis in mice. *Eur Respir J.* 1997 Oct;10(10):2351-9. PubMed PMID: 9387964.
79. Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, Phinney DG. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jun 26;104(26):11002-7. Epub 2007 Jun 14. PubMed PMID: 17569781; PubMed Central PMCID: PMC1891813.
80. Pan LH, Ohtani H, Yamauchi K, Nagura H. Co-expression of TNF alpha and IL-1 beta in human acute pulmonary fibrotic diseases: an immunohistochemical analysis. *Pathol Int.* 1996 Feb;46(2):91-9. PubMed PMID: 10846556.
81. Pantelidis P, Fanning GC, Wells AU, Welsh KI, Du Bois RM. Analysis of tumor necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha, tumor necrosis factor receptor II, and interleukin-6 polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 May;163(6):1432-6. PubMed PMID: 11371414.
82. Park SW, Ahn MH, Jang HK, Jang AS, Kim DJ, Koh ES, Park JS, Uh ST, Kim YH, Park JS, Paik SH, Shin HK, Youm W, Park CS. Interleukin-13 and its receptors in idiopathic interstitial pneumonia: clinical implications for lung function. *J Korean Med Sci.* 2009 Aug;24(4):614-20. Epub 2009 Jul 29. PubMed PMID: 19654941; PubMed Central PMCID: PMC2719183.
83. Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IM, Parelli FP, Venturini J, Villani-Moreno FR, Pacheco AG, Moraes MO. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun.* 2009 Mar;10(2):174-80. Epub 2008 Dec 25. PubMed PMID: 19110537.
84. Phan SH, Kunkel SL. Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res.* 1992 Jan-Mar;18(1):29-43. PubMed PMID: 1374023.
85. Piguet PF, Vesin C, Grau GE, Thompson RC. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) prevents or cures pulmonary fibrosis elicited in mice by bleomycin or silica. *Cytokine.* 1993 Jan;5(1):57-61. PubMed PMID: 7683505.
86. Prasse A, Georges CG, Biller H, Hamm H, Matthys H, Luttmann W, Virchow JC Jr. Th1 cytokine pattern in sarcoidosis is expressed by bronchoalveolar CD4+ and CD8+ T cells. *Clin Exp Immunol.* 2000 Nov;122(2):241-8. PubMed PMID: 11091281; PubMed Central PMCID: PMC1905777.

87. Prasse A, Müller KM, Kurz C, Hamm H, Virchow JC Jr. Does interferon-gamma improve pulmonary function in idiopathic pulmonary fibrosis?. *Eur Respir J*. 2003 Dec;22(6):906-11. PubMed PMID: 14680077.
88. Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, Jungraithmayr W, Kollert F, Goldmann T, Vollmer E, Müller-Quernheim J, Zissel G. A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL18. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Apr 1;173(7):781-92. Epub 2006 Jan 13. PubMed PMID: 16415274.
89. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med*. 1989 Apr 13;320(15):980-91. Review. PubMed PMID: 2648151.
90. Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Uitto J. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloproteinase gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest*. 1994 Dec;94(6):2489-92. PubMed PMID: 7989607; PubMed Central PMCID: PMC330082.
91. Rezaei N, Aghamohammadi A, Mahmoudi M, Shakiba Y, Kardar GA, Mahmoudi M, Moradi B, Amirzargar AA. Association of IL-4 and IL-10 gene promoter polymorphisms with common variable immunodeficiency. *Immunobiology*. 2009 Feb 25. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19249119.
92. Riha RL, Yang IA, Rabnott GC, Tunnicliffe AM, Fong KM, Zimmerman PV. Cytokine gene polymorphisms in idiopathic pulmonary fibrosis. *Intern Med J*. 2004 Mar;34(3):126-9. PubMed PMID: 15030461.
93. Scarponi C, Nardelli B, Lafleur DW, Moore PA, Madonna S, De Pità O, Girolomoni G, Albanesi C. Analysis of IFN- κ expression in pathologic skin conditions: downregulation in psoriasis and atopic dermatitis. *J Interferon Cytokine Res*. 2006 Mar;26(3):133-40. PubMed PMID: 16542135.
94. Seitzer U, Swider C, StÄLber F, Suchnicki K, Lange A, Richter E, Zabel P, MÄLLer-Quernheim J, Flad HD, Gerdes J. Tumour necrosis factor alpha promoter gene polymorphism in sarcoidosis. *Cytokine*. 1997 Oct;9(10):787-90. PubMed PMID:9344512.
95. Selman M, Thannickal VJ, Pardo A, Zisman DA, Martinez FJ, Lynch JP 3rd. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs*. 2004;64(4):405-30. Review. PubMed PMID: 14969575.
96. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci*. 1995 Mar;108 (Pt 3):985-1002. PubMed PMID: 7542672.
97. Shahar I, Fireman E, Topilsky M, Grief J, Kivity S, Spirer Z, Ben Efraim S. Effect of IL-6 on alveolar fibroblast proliferation in interstitial lung diseases. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996 Jun;79(3):244-51. PubMed PMID: 8635282.

98. Shao DD, Suresh R, Vakil V, Gomer RH, Pilling D. Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. *J Leukoc Biol.* 2008 Jun;83(6):1323-33. Epub 2008 Mar 10. PubMed PMID: 18332234; PubMed Central PMCID: PMC2659591.
99. Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, Kamiguchi K, Takahashi R, Morita-Ichimura S, Ohchi T, Tatsuno T, Hiraga Y, Abe S, Sato N. Increased circulating interleukin-12 (IL-12) p40 in pulmonary sarcoidosis. *Clin Exp Immunol.* 2003 Apr;132(1):152-7. PubMed PMID: 12653850; PubMed Central PMCID: PMC1808667.
100. Shikuwa C, Kadota J, Mukae H, Iwashita T, Kaida H, Ishii H, Ishimatsu Y, Kohno S. High concentrations of soluble Fas ligand in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. *Respiration.* 2002;69(3):242-6. PubMed PMID: 12097768.
101. Schuyler M, Gott K, Cherne A. Experimental hypersensitivity pneumonitis: role of MCP-1. *J Lab Clin Med.* 2003 Sep;142(3):187-95. PubMed PMID: 14532907.
102. Schuyler M, Gott K, Cherne A. Mediators of hypersensitivity pneumonitis. *J Lab Clin Med.* 2000 Jul;136(1):29-38. PubMed PMID: 10882225.
103. Schwarz MI, King TE: *Interstitial Lung Diseases.* BC Decker Inc, Hamilton, Ontario, 2003, s.1
104. Smith DR, Kunkel SL, Standiford TJ, Rolfe MW, Lynch JP 3rd, Arenberg DA, Wilke CA, Burdick MD, Martinez FJ, Hampton JN, et al. Increased interleukin-1 receptor antagonist in idiopathic pulmonary fibrosis. A compartmental analysis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Jun;151(6):1965-73. PubMed PMID: 7767546.
105. Stříž: *Imunita respiračního ústrojí.* *Alergie Supplementum 2/2007,* s.28-32
106. Šterclová M., Vašáková M.: *Současný pohled na exogenní alergickou alveolitidu.* *Alergie 4/2008,* s.293-296
107. Tabata C, Kubo H, Tabata R, Wada M, Sakuma K, Ichikawa M, Fujita S, Mio T, Mishima M. All-trans retinoic acid modulates radiation-induced proliferation of lung fibroblasts via IL-6/IL-6R system. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Mar;290(3):L597-606. Epub 2005 Oct 28. PubMed PMID: 16257998.
108. Tabata C, Tabata R, Kadokawa Y, Hisamori S, Takahashi M, Mishima M, Nakano T, Kubo H. Thalidomide prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Immunol.* 2007 Jul 1;179(1):708-14. PubMed PMID: 17579094.
109. Taha RA, Minshall EM, Olivenstein R, Ihaku D, Wallaert B, Tsicopoulos A, Tonnel AB, Damia R, Menzies D, Hamid QA. Increased expression of IL-12 receptor mRNA in active pulmonary tuberculosis and sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Oct;160(4):1119-23. PubMed PMID: 10508796.

110. Takizawa H, Satoh M, Okazaki H, Matsuzaki G, Suzuki N, Ishii A, Suko M, Okudaira H, Morita Y, Ito K. Increased IL-6 and IL-8 in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) from patients with sarcoidosis: correlation with the clinical parameters. *Clin Exp Immunol.* 1997 Jan;107(1):175-81. PubMed PMID: 9010273; PubMed Central PMCID: PMC1904552.
111. Thye T, Browne EN, Chinbuah MA, Gyapong J, Osei I, Owusu-Dabo E, Brattig NW, Niemann S, Rüsç-Gerdes S, Horstmann RD, Meyer CG. IL10 haplotype associated with tuberculin skin test response but not with pulmonary TB. *PLoS One.* 2009;4(5):e5420. Epub 2009 May 1. PubMed PMID: 19412539; PubMed Central PMCID: PMC2671601.
112. Tiemessen MM, Kunzmann S, Schmidt-Weber CB, Garssen J, Bruijnzeel-Koomen CA, Knol EF, van Hoffen E. Transforming growth factor-beta inhibits human antigen-specific CD4+ T cell proliferation without modulating the cytokine response. *Int Immunol.* 2003 Dec;15(12):1495-504. PubMed PMID: 14645158.
113. Trajkov D, Mirkovska-Stojkovikj J, Petlichkovski A, Strezova A, Efinska-Mladenovska O, Sandevska E, Sibinovska O, Hristomanova S, Djulejic E, Petrov J, Gogusev J, Spiroski M. Association of cytokine gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease in Macedonians. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2009 Mar;8(1):31-42. PubMed PMID: 19279357.
114. Tsezou A, Poultsides L, Kostopoulou F, Zintzaras E, Satra M, Kitsiou-Tzeli S, Malizos KN. Influence of interleukin 1alpha (IL-1alpha), IL-4, and IL-6 polymorphisms on genetic susceptibility to chronic osteomyelitis. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 Dec;15(12):1888-90. Epub 2008 Oct 29. PubMed PMID: 18971305; PubMed Central PMCID: PMC2593176.
115. Tsiligianni I, Antoniou KM, Kyriakou D, Tzanakis N, Chrysofakis G, Siafakas NM, Bouros D. Th1/Th2 cytokine pattern in bronchoalveolar lavage fluid and induced sputum in pulmonary sarcoidosis. *BMC Pulm Med.* 2005 Jun 24;5:8. PubMed PMID: 15978129; PubMed Central PMCID: PMC1175094.
116. Tsoutsou PG, Gourgoulialis KI, Petinaki E, Germenis A, Tsoutsou AG, Mpaka M, Efremidou S, Molyvdas PA. Cytokine levels in the sera of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* 2006 May;100(5):938-45. Epub 2005 Oct 19. PubMed PMID: 16236490.
117. van Veen T, Crusius JB, Schrijver HM, Bouma G, Killestein J, van Winsen L, Salvador Penaa A, Polman CH, Uitdehaag BM. Interleukin-12p40 genotype plays a role in the susceptibility to multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001 Aug;50(2):275. PubMed PMID: 11506417.
118. 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. *Respir Med.* 2009 May;103(5):773-9. Epub 2008 Dec 30. PubMed PMID: 19117745.
119. Vasakova M, Striz I, Dutka J, Slavcev A, Jandova S, Kolesar L, Sulc J. Cytokine gene polymorphisms and high-resolution-computed tomography score in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* 2007 May;101(5):944-50. Epub 2006 Oct 23. PubMed PMID: 17056243.

120. Vasakova M, Striz I, Slavcev A, Jandova S, Dutka J, Terl M, Kolesar L, Sulc J. Correlation of IL-1alpha and IL-4 gene polymorphisms and clinical parameters in idiopathic pulmonary fibrosis. *Scand J Immunol.* 2007 Mar;65(3):265-70. PubMed PMID: 17309781.
121. Vasakova M, Striz I, Slavcev A, Jandova S, Kolesar L, Sulc J. Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Tissue Antigens.* 2006 Mar;67(3):229-32. PubMed PMID: 16573560.
122. Vašáková M.: Intersticiální plicní onemocnění. In *Vnitřní lékařství IIIa, Pneumologie*, Praha: Galén, 2001, s. 145-169
123. Vidyarani M, Selvaraj P, Prabhu Anand S, Jawahar MS, Adhilakshmi AR, Narayanan PR.: Interferon gamma (IFN gamma) & interleukin-4 (IL-4) gene variants & cytokine levels in pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2006 Oct;124(4):403-10. PubMed: PMID: 17159260
124. Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, Truitt G, D'Amato RJ, Folkman J. Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Apr 19;87(8):581-6. PubMed PMID: 7538593.
125. Wahlström J, Katchar K, Wigzell H, Olerup O, Eklund A, Grunewald J. Analysis of intracellular cytokines in CD4+ and CD8+ lung and blood T cells in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Jan;163(1):115-21. PubMed PMID:11208635.
126. Wallace WA, Howie SE. Immunoreactive interleukin 4 and interferon-gamma expression by type II alveolar epithelial cells in interstitial lung disease. *J Pathol.* 1999 Mar;187(4):475-80. PubMed PMID: 10398109.
127. Wen FQ, Kohyama T, Liu X, Zhu YK, Wang H, Kim HJ, Kobayashi T, Abe S, Spurzem JR, Rennard SI. Interleukin-4- and interleukin-13-enhanced transforming growth factor-beta2 production in cultured human bronchial epithelial cells is attenuated by interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 Apr;26(4):484-90. PubMed PMID: 11919085
128. Wen LP, Madani K, Fahrni JA, Duncan SR, Rosen GD. Dexamethasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by IFN-gamma and Fas. *Am J Physiol.* 1997 Nov;273(5 Pt 1):L921-9. PubMed PMID: 9374718.
129. Whyte M, Hubbard R, Meliconi R, Whidborne M, Eaton V, Bingle C, Timms J, Duff G, Facchini A, Pacilli A, Fabbri M, Hall I, Britton J, Johnston I, Di Giovine F. Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Aug;162(2 Pt 1):755-8. PubMed PMID: 10934117.
130. Wynes MW, Riches DW. Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol.* 2003 Oct 1;171(7):3550-9. PubMed PMID: 14500651.

131. Xaubet A, Marin-Arguedas A, Lario S, Ancochea J, Morell F, Ruiz-Manzano J, Rodriguez-Becerra E, Rodriguez-Arias JM, Inigo P, Sanz S, Campistol JM, Mullol J, Picado C. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Aug 15;168(4):431-5. Epub 2003 May 13. PubMed PMID: 12746254.
132. Yang IV, Burch LH, Steele MP, Savov JD, Hollingsworth JW, McElvania-Tekippe E, Berman KG, Speer MC, Sporn TA, Brown KK, Schwarz MI, Schwartz DA. Gene expression profiling of familial and sporadic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Jan 1;175(1):45-54. Epub 2006 Sep 22. PubMed PMID: 16998095; PubMed Central PMCID: PMC1899261.
133. Yucesoy B, Johnson VJ, Kissling GE, Fluharty K, Kashon ML, Slaven J, Germolec D, Vallyathan V, Luster MI. Genetic susceptibility to progressive massive fibrosis in coal miners. *Eur Respir J*. 2008 Jun;31(6):1177-82. Epub 2008 Feb 6. PubMed PMID: 18256065.
134. Zhang K, Gharaee-Kermani M, McGarry B, Remick D, Phan SH. TNF-alpha-mediated lung cytokine networking and eosinophil recruitment in pulmonary fibrosis. *J Immunol*. 1997 Jan 15;158(2):954-9. PubMed PMID: 8993016.
135. Zhang L, Keane MP, Zhu LX, Sharma S, Rozengurt E, Strieter RM, Dubinett SM, Huang M. Interleukin-7 and transforming growth factor-beta play counter-regulatory roles in protein kinase C-delta-dependent control of fibroblast collagen synthesis in pulmonary fibrosis. *J Biol Chem*. 2004 Jul 2;279(27):28315-9. Epub 2004 May 7. PubMed PMID: 15133032.
136. Ziesche R, Hofbauer E, Wittmann K, Petkov V, Block LH. A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 1999 Oct 21;341(17):1264-9. Erratum in: *N Engl J Med* 2000 Feb 17;342(7):524. PubMed PMID: 10528036.