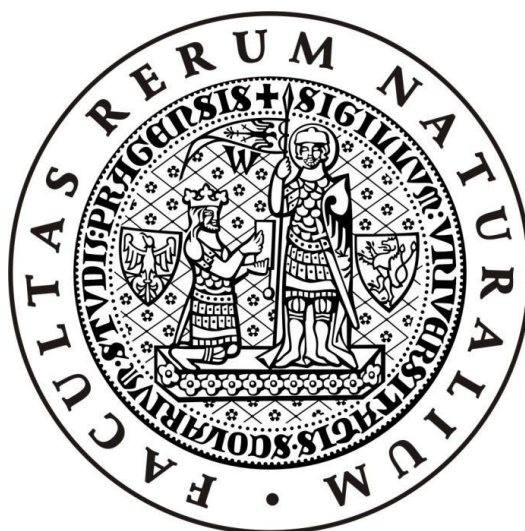


# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

## Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



DOMINIKA VOLFOVÁ

**Chemokiny epitelálních buněk u bronchiálního astmatu**

**Chemokines of epithelial cells in bronchial asthma**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: prof. MUDr. Ilja Stříž, CSc.

Praha, 2012

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Iljovi Střížovi, CSc. za odborné rady a vstřícnost během psaní mé bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat své rodině a svému příteli za jejich podporu, které si vážím.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 27. 8. 2012

Podpis

## OBSAH

|   |    |
|---|----|
| ABSTRAKT .....  | 5  |
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....  | 7  |
| <b>1. ÚVOD</b> .....  | 8  |
| <b>2. ASTHMA BRONCHIALE - CHARAKTERISTIKA</b> .....                       | 9  |
| 2.1. Faktory vzniku astmatu .....   | 9  |
| 2.2. Imunologické mechanismy astmatu.....                                 | 10 |
| 2.3. Alergická kaskáda.....   | 10 |
| <b>3. IMUNITNÍ BUŇKY PODÍLEJÍCÍ SE NA PATOGENEZI ASTMATU</b> .....        | 12 |
| 3.1. T-lymfocyty .....  | 12 |
| 3.2. Eosinofily .....   | 12 |
| 3.3. Makrofágy .....  | 13 |
| 3.4. Neutrofilny .....  | 13 |
| 3.5. Mastocyty .....  | 13 |
| <b>4. BRONCHIÁLNÍ EPITEL V PATOGENEZI ASTMATU</b> .....                   | 14 |
| 4.1. Bronchiální epitel charakteristika .....                             | 14 |
| 4.2. Role bronchiálních epiteliálních buněk u astmatu .....               | 14 |
| <b>5. CYTOKINY - CHARAKTERISTIKA</b> .....                                | 16 |
| <b>5.1. CHEMOKINY</b> .....   | 16 |
| 5.1.1. Charakteristika chemokinů .....                                    | 16 |
| 5.1.2. Klasifikace chemokinů.....   | 17 |
| 5.1.3. Chemokinové receptory .....  | 17 |
| <b>6. CHEMOKINY PRODUKOVANÉ BRONCHIÁLNÍMI EPITELIÁLNÍMI BUŇKAMI</b> ..... | 19 |
| <b>6.1. CC chemokiny</b> .....  | 19 |
| 6.1.1. RANTES/CCL5 .....  | 19 |
| 6.1.2. MCPs .....   | 20 |
| 6.1.3. MIPs.....  | 21 |
| 6.1.4. Eotaxin.....   | 21 |
| <b>6.2. CXC chemokiny</b> .....   | 22 |
| 6.2.1. IL-8/ CXCL8.....   | 22 |
| 6.2.2. IP-10/CXCL10.....  | 23 |
| <b>6.3. CXC chemokiny</b> .....   | 24 |
| 6.3.1. Fractalkine/ CX3CL1.....   | 24 |
| <b>7. TERAPEUTICKÉ CÍLE V PATOGENEZI ASTMATU</b> .....                    | 24 |
| <b>8. ZÁVĚR</b> .....   | 26 |
| SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....   | 27 |

## **ABSTRAKT**

Astma je alergické onemocnění vyvolané nežádoucími reakcemi na neškodné antigeny (alergeny) a je charakterizované přísunem eozinofilů, Th2-lymfocytů, mastocytů a neutrofilů do místa zánětu tkáně, tedy do plic. Tato akumulace leukocytů je zprostředkována generací chemotaktických cytokinů - chemokinů. Chemokiny jsou nízkomolekulární proteiny, plnící své funkce pomocí vazby na specifické receptory na buněčném povrchu. Vazba chemokinů s jejich receptory je velmi promiskuitní a následná aktivace efektorových buněk je velmi různorodá, což může často komplikovat výzkum v této oblasti. Nicméně chemokiny a jejich receptory jsou důležitými potenciálními terapeutickými cíly v alergických onemocněních včetně astmatu, především kvůli své ústřední roli v buněčné aktivaci a zánětu. Chemokiny jsou sekretovány jak buňkami imunitního systému, tak i buňkami různých tkání organismu. V poslední době se obrací pozornost na roli epitelálních buněk v patogenezi astmatu. Bronchiální epitelální buňky stimulované antigeny produkují obranné molekuly a cytokiny, pomocí nichž amplifikují zánětlivé procesy a regulují činnost efektorových buněk. Porucha těchto cytokinových regulací může vést k rozvoji různých plicních onemocnění včetně astmatu. V této práci jsou shrnuty dosavadní poznatky o jednotlivých chemokinech produkovaných epitelálními buňkami plic a účastnících se alergické reakce u astmatu.

**Klíčová slova:** chemokiny, bronchiální epitel, bronchiální astma, zánět

## **ABSTRAKT**

Asthma is an allergic disease caused by adverse reactions to harmless antigens (allergens) and is characterized by the recruitment of eosinophils, Th2 lymphocytes, mast cells and neutrophils into the tissue site of inflammation, to the lungs. This accumulation of leukocytes is mediated by the generation of chemotactic cytokines (chemokines). Chemokines are low molecular weight proteins, functioning by binding to specific receptors on the cell surface. Binding of chemokines and their receptors is highly promiscuous and subsequent activation of effector cells is very heterogeneous, which can often complicate research in this area. However, chemokines and their receptors are important potential therapeutic targets in allergic diseases including asthma, mainly because of their central role in cell activation and inflammation. Chemokines are secreted by cells of the immune system and cells of various tissues of the body. Recently, attention turns to the role of epithelial cells in the pathogenesis of asthma. Bronchial epithelial cells stimulated by antigens produce cytokines and defense molecules used for the amplification of inflammatory processes and regulate the activity of effector cells. Impaired cytokine regulation may lead to the development of various lung diseases including asthma. This work summarizes the current knowledge about different chemokines produced by lung epithelial cells and involved in allergic reactions in asthma.

**Keywords:** chemokines, bronchial epithelium, bronchial asthma, inflammation

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|        |  |
|--------|--|
| APC    | antigen presenting cell                                      |
| BAL    | bronchoalveolární laváž                                      |
| CCL    | beta chemokinový ligand                                      |
| CCR    | beta chemokinový receptor                                    |
| CX3CL  | delta chemokinový ligand                                     |
| CX3CR  | delta chemokinový receptor                                   |
| CXCL   | alfa chemokinový ligand                                      |
| CXCR   | alfa chemokinový receptor                                    |
| DC     | dendritic cell   |
| GINA   | global initiative for asthma                                 |
| CHOPN  | chronická obstrukční plicní nemoc                            |
| IFN    | interferon   |
| IgE    | immunoglobulin E   |
| IL     | interleukin  |
| LPS    | lipopolysacharid   |
| MCP    | macrophage chemoattractant protein                           |
| MIP    | macrophage inflammatory protein                              |
| mRNA   | messenger ribonucleic acid                                   |
| NK     | natural killer cell  |
| NO     | nitric oxide   |
| PDGF   | platelet-derived growth factor                               |
| RANTES | regulated on activation normal T-cell expressed and secreted |
| RV     | rhinovirus   |
| TGF    | transforming growth factor                                   |
| Th     | T-helper cell  |
| TNF    | tumor necrosis factor  |
| VLA-4  | integrin, very late antigen-4                                |

## 1. ÚVOD

Průduškové astma je v celosvětovém měřítku závažným zdravotnickým i sociálním problémem. Toto onemocnění dýchacích cest postihuje lidi různého věku a je jednou z nejčastějších chronických chorob na světě. Jeho prevalence se v jednotlivých zemích liší, přičemž v západním světě vykazuje dramatický vzestup. Zvýšení výskytu astmatu v západních zemích je spojeno především s urbanizací společnosti. Podle Globální iniciativy pro astma (GINA) trpí astmatem více než 300 milionů lidí na celém světě a očekává se, že do roku 2025 tento počet vzroste až na 400 milionů (GINA 2011). Odhaduje se, že každý rok zemře na následky astmatu až 250 000 lidí (Masoli, 2004). Prevalence astmatu stoupá na celém světě a je větší v průmyslových oblastech. Největším rizikem pro vznik onemocnění je atopie a životní prostředí. Zvýšené riziko astmatu je v rodinách, kde se vyskytuje samotná nemoc nebo alergická rýma či atopický ekzém.

Astma lze sice dnes účinně dostat pod kontrolu pomocí léků, ale nelze jej zcela vyléčit. Současná léčba využívá především inhalačních kortikosteroidů, antihistaminik a dlouhodobě působících beta-adrenergik, kombinace těchto léků jsou účinná až u 90 % astmatiků (Stríž, 2011). Existuje však malá skupina pacientů (asi 10%) trpících obtížně léčitelným astmatem (OLA), u kterých tato terapie selhává. Tyto osoby představují skupinu s nejvyšší mortalitou a uvádí se, že v Evropě spotřebují až 50% finančních prostředků vynaložených na zdravotní péči všech astmatiků (Holgate et al., 2008).

Astma je stále velkým problémem, protože všechny současné léčby směřují spíše k potlačení příznaků, než k předcházení primárního onemocnění. V této souvislosti se hledají nové mechanismy, které by pomohly objasnit problematiku astmatu a umožnily najít nové perspektivní cíle k terapeutickým zásahům. I přes veškeré dosud objevené poznatky, zůstávají mechanismy patogeneze astmatu nejasné. Aktuální pochopení buněčné a molekulární imunologie astmatu proto nese naději na specifickou terapii a možnosti snížení prevalence tohoto onemocnění.



## 2. ASTHMA BRONCHIALE - CHARAKTERISTIKA

Astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, při kterém dochází k dlouhodobému zánětu sliznic v dýchacím ústrojí, což postupem času vede ke ztíženému dýchání až k dechové nedostatečnosti a zhoršování funkce plic. Astma je výsledkem vzájemného působení řady genetických faktorů a vlivů vnějšího prostředí. V současné době existuje mnoho definic astmatu, ale nejvšeobecněji akceptovaná je definice dle GINA:

*„ Astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, v němž se účastní mnoho buněk a jejich mediátorů. Chronický zánět způsobuje průvodní zvýšení průduškové reaktivity, které vede k opakovaným epizodám pískotů při dýchání, dušnosti, tlaku na hrudi a kašle, převážně v noci a nad ránem. Tyto stavy jsou obvykle provázeny rozsáhlou, ale proměnlivou bronchiální obstrukcí, která je často reverzibilní, ať již spontánně či po léčbě.“ (GINA, 2011)*

Onemocnění postihuje celé dýchací cesty, intenzita obtíží je proměnlivá od příležitostných přechodných záchvatů s mírným průběhem, až po těžkou chronickou a život ohrožující bronchiální obstrukci. U pacientů s atopickou reaktivitou jsou astmatické záchvaty způsobeny imunologickou reakcí, která následuje po inhalaci alergenu. Opakované cykly akutního alergického zánětu vedou k poškozování průduškového epitelu, které ústí do strukturálních a funkčních změn známých pod pojmem přestavba dýchacích cest (Folli et al., 2008). Přestože, patologické změny v plicích člověka při pitvě odpovídají přesně popsaným chronickým zánětlivým procesům, zůstávají mechanismy patogeneze astmatu nejasné.

### 2.1. Faktory vzniku astmatu

I když astma může začít kdykoli v životě, nejčastěji se projevuje již v prvních letech života. Při vzniku astmatu se uplatňují rizikové faktory vnitřní (faktory hostitele) a faktory zevní (vnějšího prostředí). Nejvýznamnějším identifikovaným faktorem pro nastartování chronické zánětlivé reakce je atopie. Jedná se o genetickou predispozici k alergické reakci na běžné podněty, zprostředkované protilátkami třídy imunoglobulinu E (IgE). Atopie je přítomna u většiny osob trpících astmatem, ale nemusí být nutně u všech (Pearce et al., 1999). Na rozvoji onemocnění se podílejí i další faktory (např. životní prostředí, infekce

nebo tzv. západní styl života). Ve studiích Jackson et al. bylo dokázáno, že opakované rhinovirové (RV) infekce během prvních 3 let života zvyšují 10-ti násobně riziko vzniku astmatu ve věku do 6 let. U téměř 90% testovaných dětí, které trpěly do 3 let opakovanými RV infekcemi, se astma po šestém roce projevilo (Jackson et al., 2008). Kauzální vztah k nárůstu alergií v ekonomicky vyspělých zemích má také tzv. hygienická hypotéza (Wills-Karp et al., 2001). Základem této hypotézy je význam infekčních podnětů a styk s běžnými environmentálními mikroby (chov domácích zvířat, život na venkově), kterých ve vyspělých zemích ubývá. V důsledku nedostatečného infekčního tlaku a nízké stimulace zánětlivých Th1 reakcí, dochází k preferenční diferenciaci Th2 odpovědi a k alergické reakci. K tomu může také přispívat vymícení parazitárních infekcí, které fyziologicky tradičně stimulovaly odpovědi typu Th2 (Hořejší a Bartůňková, 2009).

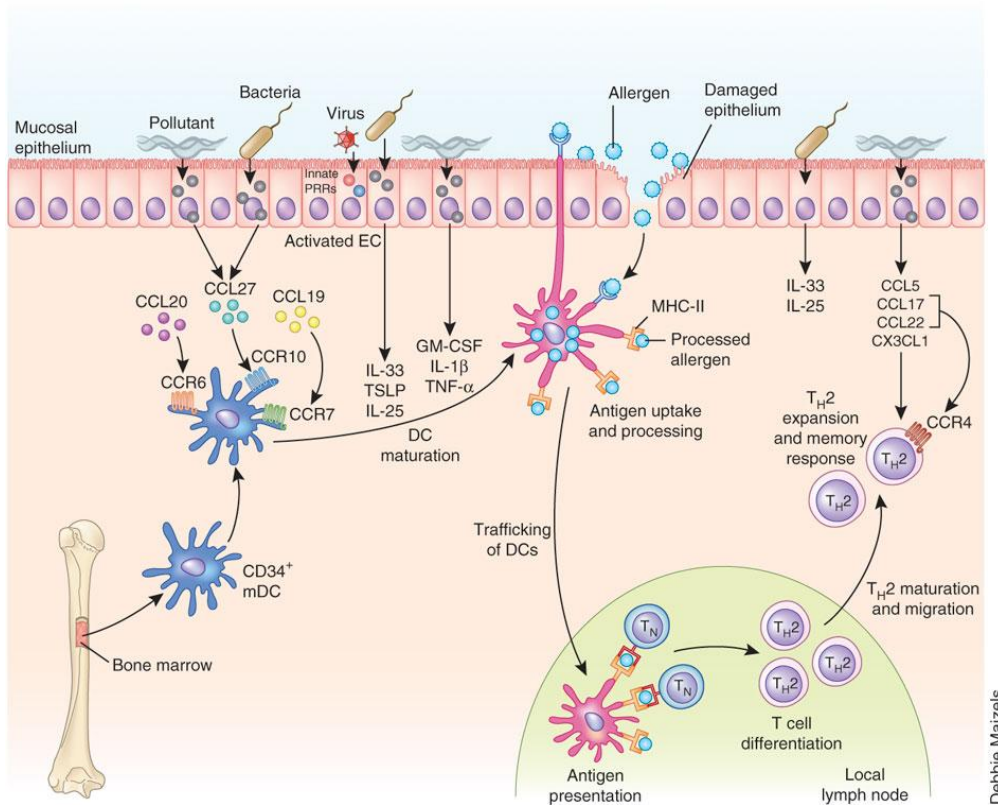
## **2.2. Imunologické mechanismy astmatu**

Astma je onemocnění spojené s chronickým zánětem sliznice dýchacích cest. Tento zánět je charakterizován zvýšeným počtem aktivovaných T-lymfocytů, makrofágů, eozinofilů a žírných buněk ve sliznici dýchacích cest a nadprodukcí zánětlivých mediátorů – cytokinů. Zánět je udržován pomocí aktivovaných T-lymfocytů s povrchovým znakem CD4+ a to především Th2 lymfocytů a cytokinů jimi produkovanými (IL-4, IL-5, IL-13). Efektorovou úlohu hrají zejména aktivované eozinofily a žírné buňky (mastocyty). U některých astmatiků mohou být v dýchacích cestách i neutrofilní leukocyty nebo aktivované makrofágy (Kim et al., 2003; Bousquet et al., 2000). Dnes se ukazuje, že důležitou úlohu hrají i buňky mimo tradiční rámec imunitního systému, buňky bronchiálního epitelu, fibroblasty a buňky hladké svaloviny.

## **2.3. Alergická kaskáda**

Klíčovou úlohu v rozvoji zánětu dýchacích cest u astmatu hraje alergická kaskáda. Inhalační alergeny, které pronikají skrz narušený epitel, jsou zpracovávány antigen prezentujícími buňkami (APC), které jsou distribuovány po celé sliznici dýchacího traktu. Aktivované APC migrují do lymfatických uzlin, kde zpracovaný alergen předkládají T a B-lymfocytům (Holt, 2000). Interakce mezi těmito buňkami vyvolávají reakce, které jsou charakterizovány a ovlivňovány cytokiny. Aktivace pomocných T buněk (Th) pomocí APC

vede k produkci cytokinů (IL-4 a IL-13), které regulují izotypový přesmyk B-lymfocytů k produkci imunoglobulinů třídy IgE (Bloemen et al., 2007 podle Corry a Kheradmand, 1999). Syntetizované protilátky IgE se váží na vysokoafinní receptor pro IgE (FcεRI) na žírných buňkách. Vazba komplexu alergenu s protilátkou na žírné buňky způsobí uvolnění mediátorů jako je histamin, prostaglandiny a leukotrieny a expresi cytokinů žírných buněk. Tyto mediátory způsobí tzv. časnou fázi astmatické reakce, která je charakterizována zúžením hladké svaloviny dýchacích cest, produkcí hlenu, zvýšenou hyperaktivitou a migrací dalších zánětlivých buněk do lumenu dýchacích cest (Bradding a Holgate, 1999). Tato raná fáze se projevuje ihned po senzibilizaci alergemem. Pozdní fáze reakce následuje o 4 až 6 hodin později a vyznačuje se nadměrným zánětem vedoucím k zúžení dýchacích cest a strukturálním změnám, které jsou vyvolané různými mediátory, odvozenými od zánětlivých buněk, jako jsou T-lymfocyty a eozinofily (Bousquet et al., 2000).



**Obrázek 1.** Vliv cytokinů a chemokinů produkovaných epitelem dýchacích cest jako jsou: IL-33, IL-25, TNF- $\alpha$ , CCL5 a CX3CL1 na aktivaci DC (APC) buněk a zrání Th2 lymfocytů. Převzato z (Holgate, 2012).

### **3. IMUNITNÍ BUŇKY PODÍLEJÍCÍ SE NA PATOGENEZI ASTMATU**

Znakem všech zánětlivých onemocnění včetně alergického astmatu je migrace zánětlivých buněk do poškozeného místa. Ta je zprostředkována přes řadu chemokinů a jejich receptorů. Tyto chemokiny kromě chemotaxe stimulují imunitní buňky ke zvýšené sekreci mediátorů a rozvoje imunitní odpovědi.

#### **3.1. T-lymfocyty**

T-lymfocyty hrají důležitou roli iniciátorů a buněk udržujících zánět v dýchacích cestách. Jak bylo uvedeno výše, u astmatu převažují Th2 lymfocyty, ačkoli se ukazuje, že i Th1 lymfocyty hrají určitou roli v různých fázích patogeneze astmatu (Hansen et al., 1999). Tyto subpopulace lymfocytů jsou zdrojem odlišného spektra sekretovaných cytokinů, a proto mají rozdílné efektorové vlastnosti. Th2 lymfocyty produkují spektrum cytokinů, jako: IL-4, IL-5, IL-13, IL-6 a IL-10. Interleukin-4 stimuluje B-lymfocyty k tvorbě protilátek třídy IgE a IL-5 indukuje produkci a aktivaci eozinofilů (Lloyd a Hessel, 2010). V mnoha studiích byly nalezeny zvýšené hladiny Th2 cytokinů v dýchacích cestách astmatiků, ve srovnání s kontrolními jedinci. Th1 lymfocyty jsou zdrojem INF- $\gamma$ , který je také prokazatelný v plicích astmatiků.

#### **3.2. Eozinofily**

Za hlavní efektorové buňky podílející se na vzniku a rozvoji zánětu dýchacích cest u astmatu jsou považovány eozinofily. Jedním ze základních rysů astmatu je právě nasměrování eozinofilů do plic a jejich nahromadění v dýchacím traktu. U chronického astmatu byl nalezen zvýšený počet aktivovaných eozinofilů jak ve sputu (Chlumsky et al., 2006), tak v bronchoalveolární laváži (BAL) astmatiků. Existuje i jasné spojení mezi aktivací eozinofilů, závažností astmatu a bronchiální hyperaktivitou (Bousquet et al., 1990). Eozinofily jsou stimulovány epiteliálními chemokiny: eotaxinem, RANTES, MCP-3 a MCP-4 pomocí specifického receptoru CCR3 na jejich povrchu. Aktivované eozinofily pak uvolňují obsah cytoplazmatických zrn a další látky (MBP, ECP, peroxidáza, leukotrieny), které jsou příčinou pro astma charakteristického poškození tkání a hyperreakivity bronchů (Pease, 2001).

### **3.3. Makrofágy**

Makrofágy jsou zdrojem několika cytokinů podporujících chronický zánět: IL-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 a chemokinů: CCL2, CCL3, CXCL8. Makrofágy infiltrují dýchací cesty zejména u neatopických pacientů, ale vyskytují se i u atopického astmatu po stimulaci alergenem. Makrofágy při hypoxii uvolňují chemokin MCP-1, který způsobuje degranulaci mastocytů, což poskytuje důkaz, že MCP-1 je zánětlivý mediátor (Chao et al., 2009). Makrofágy se také podílejí na poškození a přestavbě dýchacích cest u astmatu.

### **3.4. Neutrofilly**

Zvýšená infiltrace dýchacích cest neutrofilly se objevuje u pacientů s chronickým těžkým astmatem. Neutrofilly významně přispívají k zánětu uvolňováním široké škály enzymů včetně degradujících proteáz, reaktivních kyslíkových radikálů, cytokinů a chemokinů, např.: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 a IL-8 (Jatakanon et al., 1999). Aktivované neutrofilly poskytují signály pro aktivaci a zrání makrofágů a dendritických buněk, čímž se podílejí na jejich přísunu do místa zánětu. To značí, že neutrofilly a makrofágy si v místě infekce navzájem pomáhají a kooperují (Kumar a Sharma, 2010).

### **3.5. Mastocyty**

Žírné buňky (mastocyty) jsou již dlouho považovány za důležité efektorové buňky v alergických reakcích zprostředkovaných tvorbou IgE. Časná alergická reakce následující po inhalaci alergenu je závislá právě na mastocytech. Jedná se o tkáňové buňky, které se nacházejí v těsné blízkosti sliznice dýchacích cest (Holgate, 2008). U pacientů s astmatem jsou často v dýchacích cestách ve zmnoženém a degranulovaném (aktivovaném) stavu. Degranulací žírných buněk dochází k uvolnění histaminu, tryptázy a dalších vasoaktivních mediátorů, které napomáhají rozvoji zánětlivé reakce (Scott a Bradding, 2005). Právě tato degranulace a uvolnění zánětlivých mediátorů je jedním z charakteristických rysů bronchiálního astmatu. Žírné buňky jsou také zdrojem několika cytokinů, které mohou hrát roli při chronickém astmatickém procesu, včetně TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 a IL-6. Na svém povrchu též exprimují chemokinový receptor CCR3 pro eotaxin, RANTES a MCP chemokiny (Halova et al., 2012). Žírné buňky také mohou být z části zodpovědné za remodelaci dýchacích cest.

## **4. BRONCHIÁLNÍ EPITEL V PATOGENEZI ASTMATU**

Přesto, že je astma stále považováno za primárně alergické onemocnění zprostředkované Th2 lymfocyty, obrací se v poslední době pozornost i na činnost bronchiálního epitelu v patogenezi astmatu. Ukazuje se, že bronchiální epiteliální buňky nepředstavují pouze fyziologickou bariéru proti inhalovaným substancím, ale jedná se o metabolicky velmi aktivní buňky s bohatou sekretorickou aktivitou.

### **4.1. Bronchiální epitel - charakteristika**

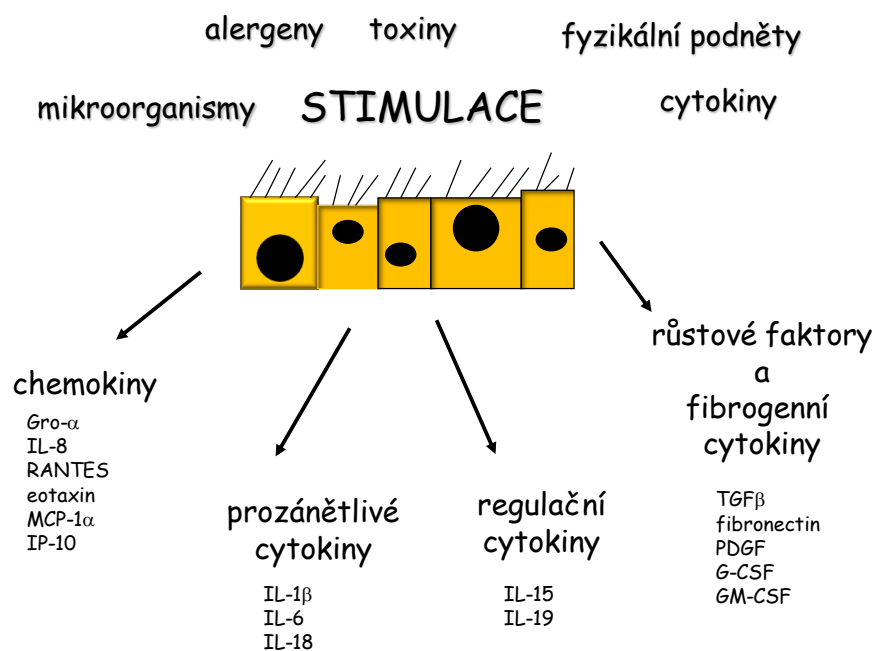
V dýchacích cestách se nachází pseudostratifikovaný epitel, tvořený řasinkovými, pohárkovými a bazálními buňkami. Epiteliální buňky dýchacích cest představují první místo interakce s vnějším prostředím a denně bývají v kontaktu s desetitisíci litry vdechovaného vzduchu, který obsahuje četné potenciálně škodlivé činitele (Stříž, 2008).

Bronchiální epiteliální buňky jsou přizpůsobeny k obraně respirační sliznice řadou mechanismů. Především vylučují četné protizánětlivé, antioxidační a antimikrobiální peptidy (defensiny, kolektiny a katelicidiny), které zajišťují první obrannou linii (Soruri et al., 2007; Kishore et al., 2006; Durr et al., 2006). Druhá linie obrany je zajištěna těsnými mezibuněčnými spoji (tight junctions). Ty za normálních okolností tvoří vysoce regulovanou a téměř nepropustnou bariéru, k jejímuž narušení dochází právě u astmatu (Holgate, 2007). Poškozením pevných spojů dochází k poruše epiteliální integrity, což může v důsledku vést k odchlípnutí epiteliálních buněk až k obnažení bazální membrány (Coraux et al., 2005). V modelu epitelové dysfunkce, indukuje odpověď na poškození (např. viry, polutanty, alergeny) vznik mikroprostředí usnadňujícího rozvoj Th2 odpovědi. Předpoklad epitelové dysfunkce jako primární abnormality u astmatu umožňuje také vysvětlení astmatu, které není vázáno na IgE, jako je nealergické astma nebo profesní astma, vznikající po expozici reaktivním chemikáliím (Holgate, 2007).

### **4.2. Role bronchiálních epiteliálních buněk u astmatu**

Bronchiální epiteliální buňky hrají aktivní roli v alergickém zánětu sekrecí prozánětlivých mediátorů. V reakci na různorodé stimuly např. lipopolysacharidy (LPS), alergeny nebo zánětlivé cytokiny, produkují řadu růstových faktorů (TGF- $\beta$ ), cytokinů (IL-6, IL-33, IL-1)

a chemokinů (IL-8, IP-10, MIP-1, eotaxin a RANTES), pomocí nichž amplifikují zánětlivé procesy a regulují činnost efektorových buněk. Porucha cytokinových regulací může vést k rozvoji různých plicních onemocnění, včetně astmatu (Bartemes a Kita, 2012). Epiteliální cytokiny podporují Th2 typ zánětu v dýchacích cestách a mohou také přispět k remodelaci dýchacích cest pozorovaných u astmatu. Bylo dokázáno, že TNF- $\alpha$  a IL-1, které jsou přítomny v epitelovém prostředí během prvních hodin infekce, jsou schopny vyvolat chemokinovou produkci epitelových buněk in vitro (Smit a Lukacs, 2006). Chemokiny RANTES, Eotaxin, MIP-1, IL-8 produkované bronchiálním epitelem, regulují migraci zánětlivých buněk do místa poškození tkáně. Vedle výroby chemokinů v reakci na zánět, mohou epitelové buňky také aktivovat některých cytokiny, které mohou přispět k remodelaci dýchacích cest. Epitelové buňky též produkují za přítomnosti NO-syntázy oxid dusnatý, který působí vasodilataci a sekreci hlenu. Proto již nelze epitel dýchacích cest považovat za pouhou strukturální bariéru, ale musí být považován za aktivního hráče v patogenezi astmatu a dalších alergických onemocněních (Holgate, 2009).



**Obrázek 2:** Epitelové buňky stimulované alergeny jsou zdrojem řady růstových faktorů a cytokinů (např. TGF- $\beta$ , IL-6), přispívající k amplifikaci vzniklé zánětlivé odpovědi a chemokinů (např. eotaxin, IL-8, RANTES), regulujících přísun zánětlivých buněk do místa poškození tkáně. Převzato ze zdroje (Stříž, 2008).

## 5. CYTOKINY - CHARAKTERISTIKA

Cytokiny jsou nízkomolekulární proteiny zajišťující komunikaci mezi buňkami imunitního systému a mezi ostatními tkáněmi organismu. Jsou to důležité regulátory fyziologických i patologických reakcí a mnohé z nich hrají důležité role i v patogenezi bronchiálního astmatu. Cytokinový profil pacientů s bronchiálním astmatem je charakterizován především cytokiny produkovanými Th2 lymfocyty (IL-4, IL-5, IL-13, IL-3), chemokiny (IL-8, RANTES, MCP-3, MIP-1 $\alpha$ , IL-16, eotaxin) a cytokiny akutní fáze zánětu (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), které jsou zodpovědné za charakteristické rysy alergické reakce (Stříž, 1999).

Cytokiny mohou mít zcela různé funkce v závislosti na zdroji nebo cíli a na konkrétní fázi imunitní odpovědi. Cytokiny jsou ve svých funkcích pleiotropní, redundantní a mohou se navzájem ovlivňovat synergicky a antagonisticky. Cílové buňky mohou v jejich funkci stimulovat i inhibovat (Kips, 2001). Četné cytokiny mají jak prozánětlivý tak i protizánětlivý potenciál.

### 5.1. CHEMOKINY

#### 5.1.1. Charakteristika chemokinů

Chemokiny představují velkou skupinu cytokinů s chemotaktickým účinkem. Chemokiny jsou nízkomolekulární (okolo 8-14 kDa), strukturně podobné peptidy, jejichž hlavní funkcí je regulace migrace buněk (Zlotnik a Yoshie, 2000; Ono et al., 2003). Chemokiny byly původně objeveny jako faktory směřující imunitní buňky do místa zánětu a poranění. Později se však ukázalo, že jejich funkce není omezena pouze na chemotaxi. Dnes víme, že chemokiny tvoří velmi komplexní síť se širokou škálou působnosti a hrají různé role v zánětlivých i homeostatických procesech (Ono et al., 2003; Rot a Von Andrian, 2004). Jsou sekretovány jak buňkami imunitního systému, tak i buňkami různých tkání organismu, včetně buněk epiteliálních. Chemokiny se účastní patogeneze mnoha autoimunitních zánětlivých onemocnění včetně bronchiálního astmatu a proto je tak důležité je studovat a pochopit jejich mechanismy účinku.



### **5.1.2. Klasifikace chemokinů**

Chemokiny představují jednu z nejpočetnějších cytokinových rodin. Jejich současná klasifikace je založena na rozdílném počtu a uspořádání cysteinových zbytků na N- konci polypeptidu. Ta dělí chemokiny do čtyř skupin: CXC (alfa chemokiny), CC (beta chemokiny), CX3C (delta chemokiny) a C (gama chemokiny) (Zlotnik a Yoshie, 2000). Rodina CXC chemokinů má mezi dvěma N-koncovými cysteiny vložený jeden proměnlivý aminokyselinový zbytek (tzv. CXC cysteinový motiv). CC chemokinová rodina má dva N-koncové cysteiny těsně vedle sebe (tzv. CC cysteinový motiv). C chemokiny mají jen jednu N-koncovou cysteinovou skupinu a CX3C chemokiny mají dvě N-koncové cysteinové skupiny oddělené třemi aminokyselinovými zbytky (Rollins, 1997).

Tyto čtyři skupiny chemokinů se odlišují nejen strukturně, ale i funkčně. Každá skupina má schopnost chemotaxe jiných typů leukocytů. CXC chemokiny jsou chemotaktické hlavně pro neutrofile a budou působit především v rané fázi zánětlivé reakce. CC chemokiny působí chemotakticky na monocyty, lymfocyty a eozinofily především v pozdní fázi zánětlivé reakce (Borish a Steinke, 2003; Rossi a Zlotnik, 2000). Dnes bylo identifikováno více než 50 chemokinů a 20 chemokinových receptorů.

### **5.1.3. Chemokinové receptory**

Chemokiny plní své biologické funkce prostřednictvím vazby na specifické receptory exprimované na povrchu leukocytů a epiteliálních buňkách. Jedná se o 7x-transmembránové receptory asociované s trimerními G-proteiny (Colobran et al, 2007). Navázání chemokinů na receptor způsobuje změny v přilnavosti a pohyblivosti leukocytů a jejich chemotaktické nasměrování do poškozených tkání. Většina receptorů rozpoznává několik různých chemokinů a stejně tak jeden chemokin se může vázat na několik receptorů. Systém je tedy velmi pružný a přizpůsobivý (Smit a Lukacs, 2006). Promiskuitní vazba chemokinů a jejich receptorů často komplikuje výzkum a vede k nejasnostem v chemokinové biologii.

**Tabulka 1.** Chemokiny a jejich receptory podílející se na alergické zánětlivé reakci. Převzato z (Garcia et al., 2005).

| Systematický název              | Chemokin-ligand                   | Chemokinový receptor |
|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| <b>CXC chemokiny/receptory</b>  |                                   |                      |
| CXCL 1, 2, 3                    | GRO $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ | CXCR 2               |
| CXCL 8                          | IL-8                              | CXCR 1, CXCR 2       |
| CXCL 9                          | Mig                               | CXCR 3               |
| CXCL 10                         | IP-10                             | CXCR 3               |
| CXCL 11                         | I-TAC                             | CXCR 3               |
| CXCL 12                         | SDF-1                             | CXCR 4               |
| <b>CX3C chemokiny/receptory</b> |                                   |                      |
| CX3CL 1                         | Fractalkine                       | CX3CR 1              |
| <b>CC Chemokiny/receptory</b>   |                                   |                      |
| CCL 1                           | I-309                             | CCR8                 |
| CCL 2                           | MCP-1                             | CCR 2                |
| CCL 3                           | MIP-1 $\alpha$                    | CCR 1, CCR 5         |
| CCL 4                           | MIP-1 $\beta$                     | CCR 5                |
| CCL 5                           | RANTES                            | CCR 1, CCR 3, CCR 5  |
| CCL 7                           | MCP-3                             | CCR 1, CCR 2, CCR 3  |
| CCL 8                           | MCP-2                             | CCR 3                |
| CCL 11                          | Eotaxin                           | CCR 3                |
| CCL 13                          | MCP-4                             | CCR 2, CCR 3         |
| CCL 17                          | TARC                              | CCR 4                |
| CCL 19                          | MIP-3 $\beta$ , ELC               | CCR 7                |
| CCL 20                          | MIP-3 $\alpha$ , LARC             | CCR 6                |
| CCL 21                          | SLC                               | CCR 7                |
| CCL 22                          | MDC                               | CCR 4                |
| CCL 24                          | Eotaxin 2                         | CCR 3                |
| CCL 26                          | Eotaxin 3                         | CCR 3                |

## 6. CHEMOKINY PRODUKOVANÉ BONCHIÁLNÍMI EPITELIÁLNÍMI BUŇKAMI

### 6.1. CC chemokiny

Mezi nejvýznamnější CC chemokiny u astmatu patří RANTES, MIPs, MCPs a eotaxin.

#### 6.1.1. RANTES/CCL5

Chemokin RANTES je produkován řadou buněk: lymfocyty, makrofágy, fibroblasty, krevními destičkami a epiteliálními i endoteliálními buňkami. Ve studiích provedených Wang et al. bylo prokázáno, že lidské bronchiální epiteliální buňky jsou schopné syntetizovat RANTES in vitro i in vivo (Wang et al., 1996), a proto mohou hrát důležitou roli v rozvoji zánětu alergických onemocnění dýchacích cest.

RANTES byl nejprve popsán jako chemoatraktant lymfocytů, monocytů a později eozinofilů. Důkaz pro in vivo roli RANTES jako chemoatraktantu v alergickém zánětu pochází ze studie Gonzala et al., při níž neutralizace RANTES receptorovým antagonistou (Met-RANTES), významně inhibovala přísun jak lymfocytů tak eozinofilů do místa zánětu (Gonzalo et al. 1998). Aktivita RANTES spočívá ve vazbě ke specifickým receptorům (CCR1, CCR3, CCR4, CCR5) na povrchu leukocytů, především eosinofilů (Pease a Williams, 2006).

RANTES se účastní řady zánětlivých onemocnění dýchacích cest jako je astma, sarkoidóza nebo CHOPN. U astmatických pacientů byl RANTES nalezen ve zvýšené koncentraci v BAL tekutině po vystavení alergenu (Zietkowski et al., 2008). Studie Holgate et al. prokázaly, že již 4 hodiny po stimulaci alergenem došlo v BAL tekutině ke zvýšení hladiny RANTES a dalších chemokinů (MIP-1a, MCP-1), které se k původním hodnotám se vrátily až za 24 hodin (Holgate et al., 1997). To dokazuje, že bazální produkce RANTES je nízká a zvyšuje se až po expozici antigenu. Také cytokiny TNF- $\alpha$  a IL-1 zvyšují sekreci RANTES v epiteliálních buňkách a fibroblastech (Thomas et al., 2007). Naopak lokální podávání kortikosteroidů potlačuje místní expresi RANTES mRNA (Jahnsen et al., 1999).

### 6.1.2. MCPs

V posledních letech bylo popsáno hned několik MCP peptidů, které poutaly zájem s ohledem na alergický zánět: MCP-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13) a MCP-5 (CCL12).

MCP-1/CCL2 je prvním objeveným CC chemokinem, původně izolovaným z nádorových buněčných linií (Matsushima et al., 1989). Je velmi silným chemoatraktantem pro monocyty, na které se váže prostřednictvím CCR2 receptoru. MCP-1 je produkován různými typy buněk (včetně epiteliálních) konstitutivně nebo po indukci mediátory jako jsou PDGF, IL-1, IL-4, LPS a IFN- $\gamma$  (Yadav et al., 2010). MCP-1 atrahuje monocyty, T-lymfocyty a DC do poškozené tkáně. Zvýšené množství MCP-1 bylo zaznamenáno u alergického astmatu ( Holgate et al., 1997).

MCP3/ CCL7 může mít také význam v průběhu alergické reakce jako obzvláště silný chemoatraktant pro bazofily a eozinofily. MCP-3 je v chemotaxi eozinofilů asi 15krát silnější než MCP-2, ale o něco méně účinný než RANTES (Teran, 2000). Zvýšené množství MCP-3 bylo zaznamenáno v bronchiálních biopsiích atopických i neatopických astmatiků (Ying et al., 1999).

MCP-4/CCL13 působí chemotakticky na monocyty, T-lymfocyty, eozinofily a bazofily. Lamkhioued et al. potvrdili hypotézu, že MCP-4 hraje roli při migraci a aktivaci eozinofilů v dýchacích cestách astmatiků a tak přispívá k patogenezi tohoto onemocnění. MCP-4 je výrazně produkován epiteliálními buňkami dýchacích cest a byl nalezen v BAL tekutině pacientů s atopickým astmatem (Ying et al., 1999). Kromě toho bylo zjištěno, že úroveň MCP-4 proteinu v BAL koreluje s přílivem eozinofilů do místa zánětu. MCP-4 exprese v epiteliálních buňkách může být indukována TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$  (Lamkhioued et al., 2000).

Je zřejmé, že MCP proteiny hrají různě důležité role v patogenezi astmatu a proto by potenciální inhibice jejich funkce mohla mít příznivé účinky v terapii.

### 6.1.3. MIPs

MIP-1 $\alpha$ /CCL3 také známý jako makrofágů zánětlivý protein, je chemoatraktant lymfocytů, monocytů a eozinofilů. Produkce MIP-1 $\alpha$  epiteliálními buňkami je indukována virovou infekcí (Pazdrak et al., 1998). Zvýšené množství MIP-1 $\alpha$  bylo nalezeno v dýchacích cestách u pacientů s virově indukovaným astmatem (Proud a Leigh, 2011).

MIP-3 $\alpha$ /CCL20. Epiteliální buňky jsou též zdrojem chemokinu MIP-3 $\alpha$ , který je jediným ligandem receptoru CCR6, exprimovaným na nevyzrálých dendritických buňkách (DC) (Schutyser et al., 2003). Svou vazbou na receptor DC buněk MIP-3 $\alpha$  pravděpodobně indukuje migraci DC do dýchacích cest, čímž usnadňuje komunikaci mezi přirozenou a adaptivní imunitou (Reibman et al., 2003).

### 6.1.4. Eotaxin

Eotaxin se zásadním způsobem podílí na rozvoji alergických reakcí svojí schopností atrahovat eozinofily do místa zánětu. To je zprostředkováno prostřednictvím interakce eotaxinu s CCR3 receptorem, který je ve velkém množství exprimován na povrchu eozinofilů. Na rozdíl od jiných eozinofilních chemokinů (RANTES, MCP-4) se eotaxin váže pouze na tento jediný receptor CCR3 (Fujisawa et al., 2000).

Kromě eozinofilů ovlivňuje eotaxin i další buňky podílející se na alergickém zánětu. Receptor pro eotaxin (CCR3) mají na svém povrchu žírné buňky, basofily a Th2 lymfocyty (Das et al., 2006; Sallusto et al., 1997). Právě atrahování Th2 lymfocytů a eozinofilů do dýchacích cest eotaxinem je klíčovou fází rozvoje alergické reakce. Mimo chemotaxe eotaxin také indukuje degranulaci eosinofilů a IgE nezávislou degranulaci bazofilů, kteří po stimulaci eotaxinem migrují do oblasti zánětu a uvolňují zánětlivé mediátory (histamin a leukotrieny). To je charakteristické pro pozdní fázi alergické reakce (Menzies-Gow a Robinson, 2000).

Eotaxin je tvořen různými typy buněk, ale jeho hlavním zdrojem při alergických reakcích jsou epitelové buňky. Jeho exprese je indukována po expozici alergenu nebo prostřednictvím cytokinů TNF- $\alpha$  a IL-4. U astmatu je eotaxin tvořen ve vysokých koncentracích. Byl prokázán v BAL tekutině pacientů s atopickým i neatopickým astmatem (Ying et al., 1999). Hladina eotaxinu také přímo souvisí s přítomností eozinofilů v dýchacích

cestách a zdá se, že závažnost astmatu koreluje s počtem a stavem aktivace eozinofilů v bronchiální sliznici a s hyperaktivitou dýchacích cest.

Eotaxin působí synergicky s cytokinem IL-5, který přispívá k urychlené diferenciaci eozinofilních prekurzorů v kostní dřeni a prodlužuje přežívání eozinofilů v krvi, zatímco eotaxin odvádí eozinofily do tkáně (Zou et al, 2010). Tyto údaje ukazují, že specifické zaměření IL-5 nebo eotaxinu by mohlo pomoci snížit eozinofilii v plicích.

Existují dva funkční homology eotaxinu pojmenované jako eotaxin-2/CCL24 a eotaxin-3/CCL26, které jsou strukturně odlišné, ale funkčně velmi podobné. Oba jsou produkovány epiteliálními buňkami a mají též vliv na migraci a aktivaci eosinofilů, basofilů a lymfocytů. Eotaxin-2 a eotaxin-3 mají profibrogení účinky na lidské plicní fibroblasty a stimulují ukládání kolagenu, čímž mohou přispívat k remodelaci dýchacích cest u astmatu (Kohan, 2010). Oba homology se váží též na CCR3 receptor.

Eotaxin je dnes považován za klíčový regulátor alergických reakcí a vzhledem ke svým biologickým aktivitám i za perspektivní terč v terapii. Blokováním účinků eotaxinu obsazením buněčných receptorů CCR3 jinou molekulou (antagonistou) by se mohlo stát významnou inovací v léčbě astmatu. Specifický antagonist CCR3 receptoru byl vytvořen genetickou manipulací proteinu MIP-4. Tento antagonist byl nazván Met-Ck $\beta$ 7 a jeho účinnost je vysoká - stačí koncentrace Met-Ckb7 1 nmol/l. Inhibice interakce eotaxinu s CCR3 receptorem se na zvířecích modelech projevuje snížením alergické reakce v plicích, i když na její úplné potlačení zatím nestačí (Das et al., 2006; Nibbs et al., 2000).

## **6.2. CXC chemokiny**

Nejvýznamnějšími CXC chemokiny u astmatu jsou IL-8 a IP-10.

### **6.2.1. IL-8/ CXCL8**

IL-8, také známý jako chemotaktický faktor neutrofilů, je jedním z hlavních mediátorů zánětlivé reakce u astmatu. Je produkován monocyty, T buňkami, neutrofilů, fibroblasty, endoteliálními a epiteliálními buňkami. Jeho produkce není konstitutivní, ale může být vyvolána prozánětlivými cytokiny IL-1, TNF- $\alpha$ , bakteriemi, LPS a respiračními viry (Mukaida, 2003).

IL-8 je jedním z nejúčinnějších chemoatraktantů pro neutrofile v plicích. Mimo chemotaxe může aktivovat různé funkce neutrofilů, včetně degranulace a respiračního vzplanutí (MacDowell a Peters, 2007). Vedle neutrofilů aktivuje další zánětlivé buňky: T a B-lymfocyty, bazofily, IL-2 aktivované NK buňky a IL-3 stimulované eozinofily. IL-8 interaguje s receptory CXCR1 a CXCR2 na povrchu leukocytů (Hay a Sarau, 2001). Během zánětlivé odpovědi se IL-8 objevuje poměrně pozdě, ve srovnání s jinými chemokiny. IL-8 slouží nejen jako chemoatraktant, ale je také silným angiogenním faktorem (Borish a Steinke, 2003).

Koncentrace IL-8 v BAL astmatiků bývá zvýšena, přičemž zvýšené množství tohoto chemokinu v plicích je spojeno se zvýšeným počtem aktivovaných neutrofilů (Folkard et al., 1997). Bronchiální epiteliální buňky jsou mocným zdrojem IL-8 a tím přispívají k amplifikaci zánětlivé odpovědi u astmatu. Ve studii, kterou provedli Ge et al., došlo pomocí stimulace bronchiálních epiteliálních buněk TGF-1 $\beta$  k inhibici produkce IL-8 jak u astmatických, tak i u neastmatických buněk. Nicméně TGF-1 $\beta$  indukoval výrazně více jiného prozánětlivého cytokinu (IL-6) u astmatických buněk (Ge et al., 2010).

Je zajímavé, že plicní epiteliální buňky produkují vysoké hladiny IL-8 v přítomnosti diesellových výfukových částic, což může také přispívat k patogenezi astmatu (Takizawa et al., 1999). I když mechanismus IL-8 u astmatu zůstává nejasný, je zřejmé, že se podílí na vzniku astmatu v různých fázích, především aktivací a infiltrací neutrofilů do plic.

### **6.2.2. IP-10/CXCL10**

IP-10, neboli IFN- $\gamma$ -indukovaný protein, je produkován několika typy buněk (včetně buněk epiteliálních) a to po indukci IFN- $\gamma$ . IP-10 je především chemoatraktantem pro aktivované T-lymfocyty, se kterými interaguje prostřednictvím CXCR3 receptoru. Zvýšené množství IP-10 je pozorováno u mnoha Th1 typů zánětlivých onemocnění, kde hraje IP-10 důležitou roli hlavně při migraci T-lymfocytů do místa zánětu (Dufour et al., 2002). Přesto, že je astma považováno za primárně Th2 onemocnění, role Th1 typu mediátorů u astmatického zánětu zůstává kontroverzní. IP-10 je vysoce exprimován v dýchacích cestách astmatiků, ale jeho funkce u astmatu je nejasná. Myší modely, které exprimují IP-10 v plicích,

vykazují významně vyšší hyperaktivitu dýchacích cest a eozinofilii ve srovnání s kontrolními jedinci, zatímco myši s deficitem pro IP-10 prokázaly opačné výsledky (Medoff et al., 2002). Tyto výsledky ukazují, že IP-10 je exprimován u alergického zánětu plic, a že přispívá k hyperreaktivitě dýchacích cest a zánětu v modelu astmatu.

### **6.3. CX3C chemokiny**

#### **6.3.1. Fractalkine/ CX3CL1**

Fractalkine je jediným zástupcem rodiny CX3C chemokinů. Je exprimován jak v rozpustné tak v membránově vázané formě a to především na endotelových a epitelových buňkách. Fractalkine se váže na receptor CX3CR1 na povrchu leukocytů. V rozpustné formě působí CX3CL1 jako chemoatraktant pro monocyty, T buňky a žírné buňky. V membránové formě má funkci adhezivní molekuly (Rimaniol et al., 2003). U astmatických pacientů se epiteliální exprese CX3CL1 zvyšuje po stimulaci alergenem. Fractalkine je také produkován buňkami epitelu dýchacích cest po stimulaci TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IFN- $\gamma$  (Sukkar et al., 2004).

## **7. TERAPEUTICKÉ CÍLE V PATOGENEZI ASTMATU**

Chemokiny a jejich receptory se zdají být vhodným terapeutickým cílem pro léčbu různých zánětlivých onemocnění včetně bronchiálního astmatu, především proto, že hrají ústřední roli při infiltraci a aktivaci buněk v místě zánětu. Tato skutečnost je jedním z hlavních faktorů, proč jsou v současnosti tak studovány mechanismy působení chemokinů v alergických reakcích. Nové poznatky získané ze studia chemokinových interakcí se dnes využívají v cílené terapii, prostřednictvím tzv. biologické léčby. Tento typ léčby v současnosti využívá nejčastěji podávání monoklonálních protilátek, rekombinantních cytokinů nebo jejich receptorů a konstruovány jsou též nízkomolekulární inhibitory (antagonisté), které interferují s vazbou cytokinu či chemokinů na receptor (Stříž, 2011). Zdá se, že cíleným blokováním jednotlivých chemokinových funkcí pomocí specifických antagonistů, by bylo možné dosáhnout vysoce účinné léčby alergických onemocnění včetně astmatu.



K dnešnímu dni bylo vytvořeno již několik antagonistů chemokinových receptorů, z nichž některé jsou v současné době zařazeny i do klinických studií. Pravděpodobně nejvíce studovanou molekulou pro terapeutické zaměření u astmatu je chemokinový receptor CCR3, jehož ligandy (CCL5, CCL8, CCL11 a CCL13) jsou vysoce exprimovány v astmatickém prostředí plic, kde zprostředkovávají především akumulaci eozinofilů a T-lymfocytů (Elsner et al., 2004). Například antagonistické molekuly Met-Ck $\beta$ 7 a Met-RANTES ve studiích významně inhibovaly přísun jak lymfocytů tak eozinofilů do místa zánětu (Das et al., 2006; Gonzalo et al., 1998; Nibbs et al., 2000). Přísun zánětlivých buněk do ložiska zánětu lze tlumit také pomocí protilátek např. proti chemokinu CXCL8 (ABX-IL-8), nebo blokováním adhezivních molekul, např. VLA-4, monoklonální protilátkou (natalizumab). Dalšími slibnými cíly v léčbě astmatu mohou být i další chemokinové receptory CCR2, CXCR4 a CXCR2 (Pease, 2011).

V praxi je nejčastěji využíváno blokování cytokinů, zejména TNF- $\alpha$  pomocí protilátek (infliximab, adalimumab, certolizumab). Ve stadiu klinických studií jsou v současnosti monoklonální protilátky proti IL-4 (pascolizumab) a několik protilátek proti IL-13 (IMA-638, CAT-354, AMG 317). Monoklonální protilátka proti IL-9 (MEDI-528) prokázala svou bezpečnost v první fázi klinických studií a je nyní testována u pacientů se středně těžkým a těžkým astmatem (Stříž, 2011). Testovány jsou též protilátky proti IL-4 a IL-13 a podávána je též protilátka proti IL-5 (mepolizumab). Žádná z těchto látek však zatím nedosahuje účinnosti protilátky proti IgE (omalizumab).

Hlavními problémy chemokinové sítě jako terapeutického cíle jsou jednak velké množství různých chemokinů (asi 50) přítomných během zánětu, dále překrývání jejich funkcí a pleiotropií interakce s receptory. Navíc léčba astmatu zaměřená na základní imunologické mechanismy se ukázala být velmi obtížná, z důvodu multifaktoriální povahy tohoto onemocnění. Další překážkou ve vývoji léků je nedostatečná účinnost myších antagonistů u lidí (Pease a Williams, 2006). I přesto, že několik látek bylo vysoce účinných in vitro, ne všechny byly tak účinné v in vivo modelech alergického onemocnění. Určitým problémem je též heterogenita odpovědí u jednotlivých pacientů.

Cytokiny a chemokiny však představují pouze jeden z možných směrů ve vývoji léků. Současně jsou vyvíjena i nová dlouhodobě působící betaadrenergika, kortikosteroidy, nové

blokátory lipidových mediátorů a různé inhibitory kináz nebo transkripčních faktorů. Teprve čas a další poznatky o jednotlivých mechanismech alergických reakcí ukáží jejich potenciál v léčbě, ale i přesto je dnes jasné, že jsou velkou výzvou pro budoucnost.

## 8. ZÁVĚR

Bronchiální astma je komplexní onemocnění dýchacích cest, které je charakterizováno chronickým zánětem bronchiální sliznice, způsobeným buněčnou infiltrací. Tento zánět dýchacích cest pravděpodobně vede k bronchiální hyperreaktivitě a zvýšené sekreci hlenu a má za následek i obstrukci dýchacích cest. Není pochyb o tom, že chemokiny hrají důležitou roli při vzniku a přetrvávání tohoto zánětu v plicích. Několik studií prokázalo souvislost mezi počtem aktivovaných T-lymfocytů, mastocytů a eosinofilů v dýchacích cestách, zvýšeným výskytem chemokinů a klinickou závažností astmatu. Zvýšené hladiny chemokinů MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, MCP-3, MCP-4, eotaxin, IL-8 a IP-10 byly prokázány v bronchoalveolární laváži a bioptických vzorcích astmatických pacientů ve srovnání s kontrolními jedinci. Chemokiny přispívají nejen k regulaci migrace buněk do dýchacích cest, ale hrají roli i v aktivaci a diferenciaci zánětlivých buněk a mají regulační účinky na epitelální a endotelální buňky. Bronchiální epitelální buňky bychom proto neměli považovat jen za pouhou strukturální bariéru, ale vnímat je jako aktivní hráče v patogenezi astmatu a dalších alergických onemocněních.

Stejně jako u ostatních alergických onemocnění došlo i u astmatu v posledních desetiletích k dramatickému nárůstu prevalence. V západních průmyslových zemích toto onemocnění dokonce dosáhlo epidemických rozměrů. V důsledku toho je nutné dále intenzivně zkoumat mechanismy alergických reakcí, jelikož pouze pochopením základních regulačních principů zapojených v patogenezi onemocnění můžeme začít poskytovat racionální základ pro vytváření nových léků a dosažení pokroku v cílené terapii. Budoucnost terapie astmatu by se mohla zaměřit právě na regulaci cytokinové sítě, spíše než na globální imunosupresi, jak je tomu dnes.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- BARTEMES, K. R. a H. KITA. Dynamic role of epithelium-derived cytokines in asthma. *Clinical Immunology*. 2012, roč. 143, č. 3, s. 222-235.
- BLOEMEN, K., S. VERSTRAELEN, R. VAN DEN HEUVEL, H. WITTERS, I. NELISSEN a G. SCHOETERS. The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunology Letters*. 2007, roč. 113, č. 1, s. 6-18.
- BORISH, L. a J. W. STEINKE. 2. Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003, roč. 111, č. 2, s. 460-475.
- BOUSQUET, J., P. CHANEZ, J. Y. LACOSTE, G. BARNÉON, N. GHAVANIAN, I. ENANDER, P. VENGE, S. AHLSTEDT, J. SIMONY-LAFONTAINE, P. GODARD a F.-B. MICHEL. Eosinophilic inflammation in asthma. *New England Journal of Medicine*. 1990, roč. 323, č. 15, s. 1033-1039.
- BOUSQUET, J., P. K. JEFFERY, W. W. BUSSE, M. JOHNSON a VIGNOLA. Asthma: From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2000, roč. 161, č. 5, s. 1720-1745.
- BRADDING, P. a S. T. HOLGATE. Immunopathology and human mast cell cytokines. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 1999, roč. 31, č. 2, s. 119-133.
- COLOBRAN, R., R. PUJOL-BORRELL, M. P. ARMENGOL a M. JUAN. The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity. *Clinical Exp. Immunology*. 2007, roč. 148, č. 2, s. 208-217.
- CORAUX, C., R. HAJJ, P. LESIMPLE a E. PUCHELLE. In vivo models of human airway epithelium repair and regeneration. *Eur. Respir. Rev*. 2005, roč. 14, č. 97, s. 131-136.
- CORRY, D. B. a F. KHERADMAND. Induction and regulation of the IgE response. *Nature*. 1999, č. 402, s. 18-23.
- DAS, A. M. Selective Inhibition of eosinophil influx into the lung by small molecule CC chemokine receptor 3 antagonists in mouse models of allergic inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2006, roč. 318, č. 1, s. 411-417.
- DUFOUR, J. H., M. DZIEJMAN, M. T. LIU, J. H. LEUNG, T. E. LANE a A. D. LUSTER. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *The Journal of Immunology*. 2002, roč. 168, č. 7, s. 3195-3204.
- DURR, U., U. SUDHEENDRA a A. RAMAMOORTHY. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2006, roč. 1758, č. 9, s. 1408-1425.
- ELSNER, J., S. E. ESCHER a U. FORSSMANN. Chemokine receptor antagonists: a novel therapeutic approach in allergic diseases. *Allergy*. 2004, roč. 59, č. 12, s. 1243-1258.

- FOLKARD, S. G., J. WESTWICK a A.B. MILLAR. Production of interleukin-8, RANTES and MCP-1 in intrinsic and extrinsic asthmatics. *European Respiratory Journal*. 1997, roč. 10, č. 9, s. 2097-2104.
- FOLLI, Ch., D. DESCALZI, F. SCORDAMAGLIA, A. M. RICCIO, C. GAMALERO a G. W. CANONICA. New insights into airway remodelling in asthma and its possible modulation. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2008, roč. 8, č. 5, s. 367-375.
- FUJISAWA, T., Y. KATO, H. NAGASE, J. ATSUTA, A. TERADA, K. IGUCHI, H. KAMIYA, Y. MORITA, M. KITaura, H. KAWASAKI, O. YOSHIE a K. HIRAI. Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000, roč. 106, č. 3, s. 507-513.
- GARCIA, G., V. GODOT a M. HUMBERT. New chemokine targets for asthma therapy. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2005, roč. 5, č. 2, s. 155-160.
- GE, Q., L. M. MOIR, J. L. BLACK, B. G. OLIVER a J. K. BURGESS. TGF $\beta$ -1 induces IL-6 and inhibits IL-8 release in human bronchial epithelial cells: The role of Smad2/3. *Journal of Cellular Physiology*. 2010, roč. 225, č. 3, s. 846-854.
- GINA. The Global Asthma Report 2011. *The International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*. 2011.
- GONZALO, J.-A., C. M. LLOYD, D. WEN, J. P. ALBAR, T. N.C. WELLS, A. PROUDFOOT, C. MARTINEZ-A, M. DORF, T. BJERKE, A. J. COYLE a J.-C. GUTIERREZ-RAMOS. The Coordinated Action of CC Chemokines in the Lung Orchestrates Allergic Inflammation and Airway Hyperresponsiveness. *Journal of Experimental Medicine*. 1998, roč. 188, č. 1, s. 157-167.
- HALOVA, I., L. DRABEROVA a P. DRABER. Mast Cell Chemotaxis - Chemoattractants and Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*. 2012, roč. 3, č. 119.
- HANSEN, G., G. BERRY, R. H. DEKRUYFF a D. T. UMETSU. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 1999, roč. 103, č. 2, s. 175-183.
- HAY, D. a H. M. SARAU. Interleukin-8 receptor antagonists in pulmonary diseases. *Current Opinion in Pharmacology*. 2001, roč. 1, č. 3, s. 242-247.
- HOLGATE, S. T. Pathogenesis of Asthma. *Clinical Experimental Allergy*. 2008, roč. 38, č. 6, s. 872-897
- HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature Medicine*. 2012, roč. 18, č. 5, s. 673-683.
- HOLGATE, S. T. Epithelium dysfunction in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007, roč. 120, č. 6, s. 1233-1244.
- HOLGATE, S. T., H. S. ARSHAD, G. C. ROBERTS, P. H. HOWARTH, P. THURNER a D. E. DAVIES. A new look at the pathogenesis of asthma. *Clinical Science*. 2009, roč. 118, č. 7, s. 439-450.
- HOLGATE, S. T., K. S. BODEY, A. JANEZIC, A. J. FREW, A. P. KAPLAN a L. M. TERAN. Release of RANTES, MIP-1 and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1997, roč. 156, č. 5, s. 1377-1383.

HOLGATE, S., H. BISGAARD, L. BJERMER, T. HAAHTELA, J. HAUGHNEY, R. HORNE, A. MCIVOR, S. PALKONEN, D. B. PRICE, M. THOMAS, E. VALOVIRTA a U. WAHN. The Brussels Declaration: the need for change in asthma management. *European Respiratory Journal*. 2008, roč. 32, č. 6, s. 1433-1442.

HOLT, P. G. Antigen presentation in the lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2000, č. 162, s. 151-6.

HOŘEJŠÍ, V. a J. BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: TRITON, 2009. ISBN 970-80-7387-280-9.

HUMBERT, M. a A.B. KAY. Chronic inflammation in asthma. *Eur Respir Mon*. 2003, roč. 23, s. 126–137.

CHAO, J., J. G. WOOD, V. G. BLANCO a N. C. GONZALEZ. The systemic inflammation of alveolar hypoxia is initiated by alveolar macrophage-borne mediator(s). *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2009, roč. 41, č. 5, s. 573-582.

CHLUMSKÝ, J., I. STRIZ, M. TERL a J. VONDRACEK. Strategy aimed at reduction of sputum eosinophils decreases exacerbation rate in patients with asthma. *The Journal of International Medical Research*. 2006, roč. 34, č. 2, 129-139.

JACKSON, D. J., R. E. GANGNON, M. D. EVANS, K. A. ROBERG, E. L. ANDERSON, T. E. PAPPAS, M. C. PRINTZ, W.-M. LEE, P. A. SHULT, E. REISDORF, K. T. CARLSON-DAKES, L. P. SALAZAR, D. F. DASILVA, C. J. TISLER, J. E. GERN a R. F. LEMANSKE. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2008, r. 178, č. 7, s. 667–672

JAHNSEN, F. L., R. HAYE, E. GRAN, P. BRANDTZAEG a F. E. JOHANSEN. Glucocorticosteroids Inhibit mRNA Expression for Eotaxin, Eotaxin-2, and Monocyte-Chemotactic Protein-4 in Human Airway Inflammation with Eosinophilia. *The Journal of Immunology*. 1999, roč. 163, č. 3, s. 1545-1551.

JATAKANON, A., C. UASUF, W. MAZIAK, K. F. CHUNG, P. J. BARNES a S. LIM. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1999, roč. 160, č. 5, s. 1532-1539.

KIM, C. K., S. W. KIM, C. S. PARK, B. KIM, H. KANG a Y. Y. KOH. Bronchoalveolar lavage cytokine profiles in acute asthma and acute bronchiolitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003, roč. 112, č. 1, s. 64-71.

KIPS, J. C. Cytokines in asthma. *European Respiratory Journal*. 2001, roč. 18, č. 1, s. 24-33.

KISHORE, U., T. J. GREENHOUGH, P. WATERS, A. K. SHRIVE, R. GHAI, M. F. KAMRAN, A. L. BERNAL, K. B. M. REID, T. MADAN a T. CHAKRABORTY. Surfactant proteins SP-A and SP-D: Structure, function and receptors. *Molecular Immunology*. 2006, roč. 43, č. 9, s. 1293-1315.

KOHAN, M., I. PUXEDDU, R. REICH, F. LEVI-SCHAFFER a N. BERKMAN. Eotaxin-2/CCL24 and eotaxin-3/CCL26 exert differential profibrogenic effects on human lung fibroblasts. *Annals of Allergy, Asthma*. 2010, roč. 104, č. 1, s. 66-72.

KUMAR, V. a A. SHARMA. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology*. 2010, roč. 10, č. 11, s. 1325-1334.

LAMKHILOUED, B., E. A. GARCIA-ZEPEDA, S. ABI-YOUNES., H. NAKAMURA, S. JEDRZKIEWICZ, L. WAGNER, P.M. RENZI, Z. ALLAKHVERDI, C. LILLY, Q. HAMID a A.D. LUSTER. Monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 expression in the airways of patients with asthma: Induction in epithelial cells and mononuclear cells by proinflammatory cytokines. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000, roč. 162, č. 2, s. 723-732.

LLOYD, C. M. a E. M. HESSEL. Functions of T cells in asthma: more than just TH2 cells. *Nature Reviews Immunology.* 2010, roč. 10, č. 12, s. 838-848.

MACDOWELL, A. L. a S. P. PETERS. Neutrophils in asthma. *Current Allergy and Asthma Reports.* 2007, roč. 7, č. 6, s. 464-468.

MASOLI, M., D. FABIAN, S. HOLT a R. BEASLEY. The global burden of asthma: executive summary of the GINA: Dissemination committee Report. *Allergy.* 2004, roč. 59, č. 5, s. 469-478.

MATSUNAGA, K., S. YANAGISAWA, T. ICHIKAWA, K. UESHIMA, K. AKAMATSU, T. HIRANO, M. NAKANISHI, T. YAMAGATA, Y. MINAKATA a M. ICHINOSE. Airway cytokine expression measured by means of protein array in exhaled breath condensate: Correlation with physiologic properties in asthmatic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2006, roč. 118, č. 1, s. 84-90

MATSUSHIMA, K., C. G. LARSEN, G. C. DUBOIS a J. J. OPPENHEIM. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *Journal of Experimental Medicine.* 1989, roč. 169, č. 4, s. 1485-1490.

MEDOFF, B. D., A. SAUTY, A. M. TAGER, J. A. MACLEAN, R. N. SMITH, A. MATHEW, J. H. DUFOUR a A. D. LUSTER. IFN-gamma-Inducible Protein 10 (CXCL10) contributes to airway hyperreactivity and airway inflammation in a mouse model of asthma. *The Journal of Immunology.* 2002, roč. 168, č. 10, s. 5278-5286.

MENZIES-GOW, A. a D. S. ROBINSON. Eosinophil chemokines and their receptors: an attractive target in asthma?. *The Lancet.* 2000, roč. 355, č. 9217, s. 1741-1743.

MUKAIDA, N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *AJP - Lung Physiol.* 2003, roč. 284, č. 4, s. 566-L577.

NIBBS, R. J. B., T. W. SALCEDO, J. D. M. CAMPBELL, X.-T. YAO, Y. LI, B. NARDELLI, H. S. OLSEN, T. S. MORRIS, A. E. I. PROUDFOOT, V. P. PATEL a G. J. GRAHAM. C-C chemokine receptor 3 antagonism by the Chemokine macrophage inflammatory protein 4, a property strongly enhanced by an amino-terminal alanine-methionine swap. *The Journal of Immunology.* 2000, roč. 164, č. 3, s. 1488-1497.

ONO, S. J., T. NAKAMURA, D. MIYAZAKI, M. OHBAYASHI, M. DAWSON a M. TODA. Chemokines: Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2003, roč. 111, č. 6, s. 1185-1199.

PAZDRAK, B. O., A. CASOLA, T. SAITO, R. ALAM, S. E. CROWE, F. MEI, P. L. OGRA a R. P. GAROFALO. Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1 by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 1998, roč. 72, č. 6, s. 4756-4764.

PEARCE, N., J. PEKKANEN a R. BEASLEY. How much asthma is really attributable to atopy?. *Thorax.* 1999, roč. 54, č. 3, s. 268-272.

- PEASE, J. E. Targeting chemokine receptors in allergic disease. *Biochemical Journal*. 2011, roč. 434, č. 1, s. 11-24.
- PEASE, J. E. a T. J. WILLIAMS. Chemokines and their receptors in allergic disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006, roč. 188, č. 2, s. 305-318.
- PROUD, D. a R. LEIGH. Epithelial cells and airway diseases. *Immunological Reviews*. 2011, roč. 242, č. 1, s. 186-204.
- REIBMAN, J., Y. HSU, L. CH. CHEN, B. BLECK a T. GORDON. Airway epithelial cells repase MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2003, roč. 28, č. 6, s. 648-654.
- RIMANIOL, A.-C., S. J. TILL, G. GARCIA, F. CAPEL, V. GODOT, K. BALABANIAN, I. DURAND-GASSELIN, E. M. VARGA, G. SIMONNEAU, D. EMILIE, S. R. DURHAM a M. HUMBERT. The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003, roč. 112, č. 6, s. 1139-1146.
- ROLLINS, B. J. Chemokines. *Blood*. 1997, roč. 90, č. 3, 909-28.
- ROSSI, D. a A. ZLOTNIK. The Biology of chemokines and their receptors. *Annual Review of Immunology*. 2000, roč. 18, č. 1, s. 217-242.
- ROT, A. a U. H. VON ANDRIAN. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annual Review of Immunology*. 2004, roč. 22, č. 1, s. 891-928.
- SALLUSTO, F., C. R. MACKAY a A. LANZAVECCHIA. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science*. 1997, roč. 277, č. 5334, s. 2005-2007.
- SCOTT, K. a P. BRADDING. Human mast cell chemokines receptors: implications for mast cell tissue localization in asthma. *Clinical Exp. Allergy*. 2005, roč. 35, č. 6, s. 693-697.
- SCHUTYSER, E., S. STRUYF a J. VAN DAMME. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Reviews*. 2003, roč. 14, č. 5, 409-426.
- SMIT, Joost J. a Nicholas W. LUKACS. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *European Journal of Pharmacology*. 2006, roč. 533, č. 1-3, s. 277-288.
- SORURI, A., J. GRIGAT, U. FORSSMANN, J. RIGGERT a J. ZWIRNER. Beta Defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. *European Journal of Immunology*. 2007, roč. 37, č. 9, s. 2474-2486.
- STRÍŽ, I. Novinky v léčbě astmatu - perspektivy biologické léčby. *Lékařské listy*. 2011, roč. 60, č. 2, s. 21-23.
- STRÍŽ, I. Respirační imunita. *Interní med. pro praxi*. 2008, roč. 10, č. 4.
- STRÍŽ, I. Úloha cytokinů v patogenezi bronchiálního astmatu. *Alergie*. 1999, roč. 397, č. 1.

- SUKKAR, M. B., R. ISSA, S. XIE, U. OLTMAN, R. NEWTON a K. F. CHUNG. Fractalkine/CX3CL1 production by human airway smooth muscle cells: induction by IFN-gamma and TNF-alpha and regulation by TGF-beta and corticosteroids. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004, roč. 287, č. 6, s. 1230-1240.
- TAKIZAWA, H., T. OHTOSHI, S. KAWASAKI, T. KOHYAMA, M. DESAKI, T. KASAMA, K. KOBAYASHI, K. NAKAHARA, K. YAMAMOTO, K. MATSUSHIMA a S. KUDOH. Diesel exhaust particles induce NF- $\kappa$ B activation in human bronchial epithelial cells in vitro: importance in cytokine transcription. *The Journal of Immunology*. 1999, roč. 162, č. 8, s. 4705-4711.
- TERAN, L. M. CCL chemokines and asthma. *Immunol Today*. 2000, roč. 21, č. 5, s. 234-242.
- THOMAS, L. H., M. I. Y. WICKREMASINGHE a J. S. FRIEDLAND. IL-1beta stimulates divergent upper and lower airway epithelial cell CCL5 secretion. *Clinical Immunology*. 2007, roč. 122, č. 2, 229–238.
- WANG, J. H., J. L. DEVALIA, C. XIA, R. J. SAPSFORD a R. J. DAVIES. Expression of RANTES by human bronchial epithelial cells in vitro and in vivo and the effect of corticosteroids. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 1996, roč. 14, č. 1, s. 23-35.
- WILLS-KARP, M., J. SANTELIZ a C. L. KARP. The germless theory of allergic disease: Revisiting the hygiene hypothesis. *Nature Reviews Immunology*. 2001, roč. 1, č. 1, s. 69-75.
- YADAV, A., V. SAINI a S. ARORA. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity. *Clinica Chimica Acta*. 2010, roč. 411, č. 21-22, s. 1570–1579.
- YING, S., Q. MENG, K. ZEIBECOGLOU, D. S. ROBINSON, A. MACFARLANE, M. HUMBERT a A. B. KAY. Eosinophil Chemotactic chemokines (Eotaxin, Eotaxin-2, RANTES, Monocyte Chemoattractant Protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C Chemokine Receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *The Journal of Immunology*. 1999, roč. 163, č. 11, s. 6321-6329.
- ZIETKOWSKI, Z., M. M. TOMASIAK, R. SKIEPKO a A. BODZENTA-LUKASZYK. RANTES in exhaled breath condensate of stable and unstable asthma patients. *Respiratory Medicine*. 2008, roč. 102, č. 8, s. 1198-1202.
- ZLOTNIK, A. a O. YOSHIE. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000, roč. 12, č. 2, s. 121-127.
- ZOU, Y., I. SONDEREGGER, G. LIPOWSKY, G. T. JENNINGS, N. SCHMITZ, M. LANDI, M. KOPF a M. F. BACHMANN. Combined vaccination against IL-5 and eotaxin blocks eosinophilia in mice. *Vaccine*. 2010, roč. 28, č. 18, s. 3192–3200.