

**Th1/Th2 genový polymorfismus cytokinů u pacientů s idiopatickou plicní fibrózou**

Martina Vašáková

Práce vznikla za podpory grantů IGA MZČR No. 7641-3, 7859-3 a 8276-3

Klinická část projektu byla realizována na na autorově domácí půdě, Pneumologické klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy ve Fakultní Thomayerově nemocnici s poliklinikou

Laboratorní část projektu- genotypizace- byla provedena na pracovišti školitele- Úseku laboratorních vyšetřovacích metod IKEM v Oddělení imunogenetiky

Poděkování za spolupráci patří všem mým níže uvedeným spolupracovníkům a speciální dík mému školiteli doc. MUDr. Iljovi Střížovi, CSc., který je zároveň přednostou Úseku laboratorních vyšetřovacích metod IKEM

Seznam spolupracovníků:

MUDr. Antonij Slavčev, CSc

Šárka Jandová

Mgr. Libor Kolesár

MUDr. Juraj Dutka

MUDr. Jan Šulc

V případě pana doktora Dutky jde bohužel již o poděkování in memoriam a velmi mě mrzí, že se nedočkal ani publikace našich společných výsledků.

Zvláštní dík patří Mgr. Jeleně Skibové a RNDr. Věře Lánské za statistické zpracování výsledků.

Díky také patří všem pacientům, kteří souhlasili se vstupem do projektu a s odběrem krve na genetické vyšetření a z nichž řada bohužel už také dnes nežije.

V Praze 1.1.2007

Úvod.....	8
Idiopatická plicní fibróza – kryptogenní fibrotizující alveolitida.....	8
Klasifikace idiopatických intersticiálních pneumonií- Konsensus ATS/ERS.....	9
Demografická data.....	9
Etiologie.....	9
Rizikové faktory.....	14
Klinické projevy.....	15
Radiologický nálezn.....	16
Funkční vyšetření plic.....	19
Bronchoalveolární laváž.....	20
Plicní biopsie.....	21
Patologicko-anatomický obraz.....	22
Kritéria pro diagnózu IPF.....	23
Léčba.....	24
Prognóza.....	26
Genetické studie u idiopatické plicní fibrózy (IPF).....	28
Strategie genetických studií.....	28
Míra průkaznosti genetické studie.....	29
Familiární idiopatická intersticiální pneumonitida.....	31
Idiopatická plicní fibróza.....	32
Cytokiny.....	34
Nomenklatura cytokinů.....	34
Dělení cytokinů dle převažujících funkcí.....	35
Cytokinové receptory.....	35
T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2/Th3 profilace cytokinového spektra.....	37

Charakteristika vyšetřovaných cytokinů.....	38
Cytokinové genové polymorfizmy .....	46
Polymorfizmus v rámci etnických skupin .....	50
Cytokinové polymorfizmy a jejich vztah k některým patologickým stavům.....	52
Cytokiny u idiopatické plicní fibrózy.....	55
Role genových polymorfizmů v etiologii a patogenezi IPF .....	58
Genové polymorfizmy cytokinů u pacientů s IPF- vlastní pozorování.....	62
Cíl práce .....	62
Soubor pacientů.....	62
Materiál a metody .....	63
DNA extrakce.....	66
Genotypizace cytokinů.....	66
Statistické zpracování .....	69
Výsledky.....	69
Diskuze.....	76
Literatura .....	81

Tabulka 1. Klasifikace idiopatických intersticiálních pneumonií.....	9
Tabulka 2. HRCT skórovací systém u IPF ( dle Gay et al).....	18
Tabulka 3 . Buněčný rozpočet v BAL u zdravých kontrol a pacientů s IPF (Drent M. et al., 1993).....	21
Tabulka 4. Kritéria ATS/ERS pro stanovení diagnózy idiopatické plicní fibrózy.....	24
Tabulka 5. Vhodné velikosti souborů geneticky sledované populace v „case-control“ studiích pro dané frekvence výskytu minoritních alel.....	30
Tabulka 6. Intenzita produkce TGF-beta v závislosti na polymorfizmech v kodónu 10 a kodónu 25.....	48
Tabulka 7. Intenzita produkce IL-10 v závislosti na polymorfizmech v promotorové oblasti (-1082), (-819), (-592). ....	49
Tabulka 8. Intenzita produkce TNF-alfa v závislosti na polymorfismech v promotorové oblasti (-308), (-238). ....	49
Tabulka 9. Odlišnosti jednotlivých populací v různých geografických oblastech v polymorfních úsecích cytokinů.....	51
Tabulka 10. Genové polymorfizmy vyšetřované v souvislosti s IPF.....	60
Tabulka 11. Demografická a klinická data (plicní funkce a BAL) u pacientů s IPF v době diagnózy .....	63
Tabulka 12. HRCT skóre u pacientů s IPF.....	65
Tabulka 13. Seznam vyšetřovaných genových polymorfizmů .....	68
Tabulka 14. IL-4 -590. Frekvence jednotlivých genotypů u pacientů s IPF a zdravých kontrol.....	70
Tabulka 15. IL-4 -33. Frekvence jednotlivých genotypů u pacientů s IPF a zdravých kontrol.....	71

Tabulka 16. Korelace vitální kapacity v době diagnózy a genových polymorfizmů IL-1alfa (-889) u IPF.....	72
Tabulka 17. Korelace CD3+HLADR+ T lymfocytů v BAL v době diagnózy a genových polymorfizmů IL-1alfa (-889) u IPF .....	72
Tabulka 18. Korelace CD3+CD4+ a CD3+CD8+ T lymfocytů v BAL v době diagnózy a genových polymorfizmů IL-4(-1098).....	73
Tabulka 19. Korelace HRCT alveolárního skóre v době diagnózy a genových polymorfizmů IL-4 RA (+1902) .....	74
Tabulka 20. Korelace HRCT intersticiálního skóre v době diagnózy a genových polymorfizmů IL-12 (-1188) .....	74
Tabulka 21. Korelace změn HRCT intersticiálního skóre v čase a genových polymorfizmů IL-1RA (mspa 111100).....	75
Tabulka 22. Korelace změn HRCT intersticiálního skóre v čase a genových polymorfizmů IL-4RA (+1902) .....	75
Tabulka 23. Korelace změn HRCT intersticiálního skóre v čase a genových polymorfizmů IL-4 (-33) .....	75

Přílohy:

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;67:229-232

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* 2006; přijato k tisku 20. října 2006

Vasakova M., Striz I., Slavcev A., Jandova S., Dutka J., Terl M., Kolesar L., Sulc J.: Correlation of IL-1 alpha and IL-4 gene polymorphisms and clinical parameters in idiopathic pulmonary fibrosis. *Scandinavian Journal of Immunology* 2006; přijato k tisku 6.12.2006

## Úvod

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je závažným onemocněním s nepříznivou prognózou, se středním přežitím pacientů navzdory léčbě 3-5 let. (Grutters, 2005)

Etiologie a patogeneze onemocnění není zatím plně objasněna. V poslední době je zamítána hypotéza o zánětlivém původu onemocnění a data svědčí spíše pro nekontrolovanou fibroprodukcí, která posléze zcela zničí fyziologickou plicní architekturu. Předpokládá se, že příčinou fibroprodukce, jako odpovědi na neznámý insult, může být nerovnováha imunitní odpovědi, ve smyslu převahy Th2 typu. Sklon reagovat spíše typem Th2 imunitní odpovědi, může být zakotven v genetickém kódu, a to v oblasti genů pro cytokiny. (Marshall, 1997)

### **Idiopatická plicní fibróza – kryptogenní fibrotizující alveolitida**

Idiopatická plicní fibróza (IPF), také známá jako kryptogenní fibrotizující alveolitida, patří do rodiny idiopatických intersticiálních pneumonií, a vzhledem ke své prognóze je nejzávažnějším podtypem tohoto onemocnění. (Tabulka 1) Jedná se primárně o difúzní nezáánětlivé onemocnění, charakterizované fibroprodukcí, jež vzniká jako odpověď na neznámé agens. Poprvé byl klinický průběh plicní fibrózy popsán Hammanem a Richem (Albert, 2004) u 5 pacientů s progredující dušností, difúzními infiltráty a subakutním cor pulmonale. Onemocnění skončilo smrtí do 6 měsíců u všech pacientů. Dnes se ale soudí, že popsanou nemocí nebyla IPF, ale akutní intersticiální pneumonitida (AIP).



*Tabulka 1. Klasifikace idiopatických intersticiálních pneumonií*

Klasifikace idiopatických intersticiálních pneumonií- Konsensus ATS/ERS

- Kryptogenní fibrotizující alveolitida / Idiopatická plicní fibrosa- CFA / IPF-UIP
- Deskvamativní intersticiální pneumonitida / makrofágová pneumonie– DIP / AMP
- Nespecifická intersticiální pneumonitida / fibrosa - NSIP- formy- fibrotická celulární smíšená
- Akutní intersticiální pneumonitida / Difusní alveolární poškození – AIP / DAD
- Kryptogenní organizující pneumonie / Obliterující bronchiolitida – COP / BOOP
- Lymfoidní intersticiální pneumonie- LIP

Demografická data

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je závažným onemocněním s nepříznivou prognózou, se středním přežitím pacientů navzdory léčbě 3-5 let. Prevalence je celosvětově odhadována na 13-20/100.000 a incidence 7-11/100.000 , může však být i vyšší, protože předpokládáme poddiagnostikovanost této choroby. (Coultas 1994, Scott 1990) IPF se vyskytuje s malou pravděpodobností o něco více u mužů než u žen. Incidence onemocnění stoupá s věkem. IPF pacienti jsou nejčastěji ve středním věku, v rozmezí od 40 do 70 let. Přibližně dvě třetiny pacientů jsou starší 60ti let.

IPF nemá dle provedených výzkumů žádnou jistou geografickou distribuci. Vyskytuje se celosvětově se stejnou prevalencí, bez rozdílu ve městech i na vesnicích a bez jakékoliv asociace s rasou nebo etnicitou. Nicméně mortalita korelující s věkem se zdá být větší u kavkazoidní populace než u populací v Africe a Americe (Mannino, 1996).

Etiologie

Etiopatogeneze IPF není zatím zcela úplně jasná, zdá se však, že se jedná o uniformní patologickou odpověď plicní tkáně na různá infekční i neinfekční agens.

Dříve se předpokládalo, že IPF vzniká jako reakce na zánětlivý proces, jenž přešel do chronického stadia (Müller, 1997). Chronické zánětlivé dráždění plicí tkáně mělo posléze vést k fibrotickému procesu. Existovala zde důležitá domněnka, a to, že pokud bude chronický zánět přerušen v době před vlastním irreverzibilním poškozením plicní tkáně, bude možné vyhnout se další progresi a zamezit tak vzniku fibrotického procesu. Toto byl také jeden z důvodů, proč byly a stále ještě jsou k léčbě předepisovány protizánětlivé léky jako kortikosteroidy a imunosupresiva, avšak bez úspěchu (Thomas J, 2001).

Dnes se však více přijímá jiná z teorií. Předpokládá neznámý stimulus, jenž způsobuje opakované poškození výstelky plicních sklípků, vyúsťující v nekontrolovatelné a progredující jizvení. Zánětlivá reakce se někdy může vyskytnout až sekundárně. Léčba vycházející z této teorie by se tak více měla soustředit primárně na terapeutické zabránění zvýšené produkci vaziva. Této teorii odpovídá i zjištění, že zánětlivá odpověď plicní tkáně u IPF odpovídá převážně typu  $T_H2$  reakce (Majumdar, 1999), což by zároveň mohlo poukazovat na možný geneticky podmíněný vliv cytokinů, či přítomnost stimulu spouštějícího právě zvýšenou tvorbu  $T_H2$  cytokinů. (Obr.1)

Alveolární makrofágy u IPF jsou prostřednictvím  $Th2$  cytokinů pravděpodobně tzv. alternativně aktivovány a zvyšují pak produkci fibronektinu a tím indukují fibrogenezi ve fibroblastech. Během této alternativní aktivace makrofágy produkují zvýšené množství chemokinů CCL18. (Prasse, 2006)

Pravděpodobné však je, že patogeneze IPF může být daleko komplexnější než jsou výše popsané hypotézy. Na základě studií genové exprese ve vzorcích plicní tkáně pacientů s IPF, byla zjištěna zvýšená exprese čtyř skupin genů. První skupinou se zvýšenou expresí je skupina genů pro kontraktilní proteiny- aktin, myosin a tropomyosin. Další zvýšeně exprimovanou skupinou genů je skupina genů pro signální proteiny (kináza beta) a pro tvorbu extracelulární matrix ( kolagen I a III, fibronektin a filamin) a pro degradaci extracelulární matrix ( matrixmetaloproteináza (MMP)-1, MMP-2, MMP-

7, MMP-9). Třetí skupinou vysoce exprimovaných genů jsou geny pro prozánětlivé cytokiny, chemokiny a antioxidanty a čtvrtou skupinou geny kódující anuloide a imunoglobuliny. Expresí třetí a čtvrté skupiny genů podporuje opět dříve zavrženou hypotézu o chronickém zánětu jako důležitém faktoru u IPF. (Zuo, 2002)

Není možné nezmínit také roli oxidativního stresu v patogenezi IPF, který se pravděpodobně uplatňuje hlavně při vzniku iniciálních mikroskopických lézí alveolárního epitelu a nemožnosti úspěšného zhojení těchto lézí bez významné fibroprodukce. Pravděpodobnou roli hraje nerovnováha mezi redukčními a oxidačními systémy v plicích, které zahrnují celou škálu mechanismů ke kontrole tvorby a odbourávání reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). S oxidačně redukčními systémy v plicích je spjat nevyhnutelně i systém proteáz a antiproteáz, jejichž nerovnováha může být jednou z příčin udržování bludného kruhu nekontrolovatelné fibroprodukce. Hlavními reprezentanty proteázového/antiproteázového systému jsou matrix-metaloproteinázy (MMP) a tkáňové inhibitory matrixmetaloproteináz (TIMP). Navíc se zdá, že oxidačně redukční systémy v plicích přímo ovlivňují fibroprodukcí cestou transformujícího růstového faktoru beta (TGF-beta), kupříkladu myofibroblasty diferencované pod vlivem TGF-beta jsou samy zdrojem ROS. (Kinnula, 2005)

Přirozený průběh nemoci je u jednotlivých pacientů obtížně klinicky mapovatelný, neboť není možné klinické a radiologické nálezy v čase doložit opakovanými histologickými nálezy. Nicméně dle typického vzhledu radiologického obrazu a obzvláště vysoce výpočetní tomografie (HRCT) hrudníku je patrné, že IPF je časově značně heterogenní proces s okrsky normální plicní tkáně, okrsky s aktivní fibrotizací a okrsky konečného stádia fibrózy s obrazem voštinovité plíce. (Strieter, 2005)

Tradiční pohled na IPF je založen na představě o pomalém poklesu plicních funkcí vedoucím k respiračnímu selhání a smrti. Pravděpodobněji však vypadá teorie o

mnohočetných inzultech způsobujících tzv. akutní exacerbace nemoci s rychlejším poklesem plicních funkcí.

IPF ovlivňuje nejen plicní parenchym, ale i vaskulaturu. Za normálních podmínek jsou v plicích angiogenní a angiostatické stimuly v rovnováze, v případě IPF dochází k posunu této rovnováhy a aberantní angiogenezi, což bylo prokázáno již v roce 1960. (Turner- Warwick, 1963) Hlavními faktory ovlivňujícími angiogenezi ve smyslu pozitivním jsou bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a angiogenní CXC chemokiny obsahující motiv ELR (kyselina glutamová, leucin, arginin); ve smyslu negativním je angiogeneze ovlivněna angiostatinem a angiostatickými interferon (IFN)- inducibilními CXC chemokiny. Sekrece angiogenních CXC chemokinů je pozitivně stimulována lipopolysacharidy, tumor nekrotizujícím faktorem alfa (TNF- alfa) a interleukinem- 1 beta (IL-1 beta); IFN- gamma angiogenezi inhibuje. Tato hypotéza vytváří teoretickou podporu pro léčebné podání IFN-gamma pacientům s IPF. Expres CXC chemokinů v plicní tkáni, angiogenního interleukinu-8 (IL-8) oproti angiostatickému IFN- gama inducibilnímu proteinu IP-10, byla výrazně zvýšena v plicní tkáni nemocných s IPF ve prospěch angiogenního IL-8 oproti zdravým kontrolám a lokalizace exprese IL-8 korelovala s nakupením fibroblastů a extracelulární matrix (Keane, 1997).

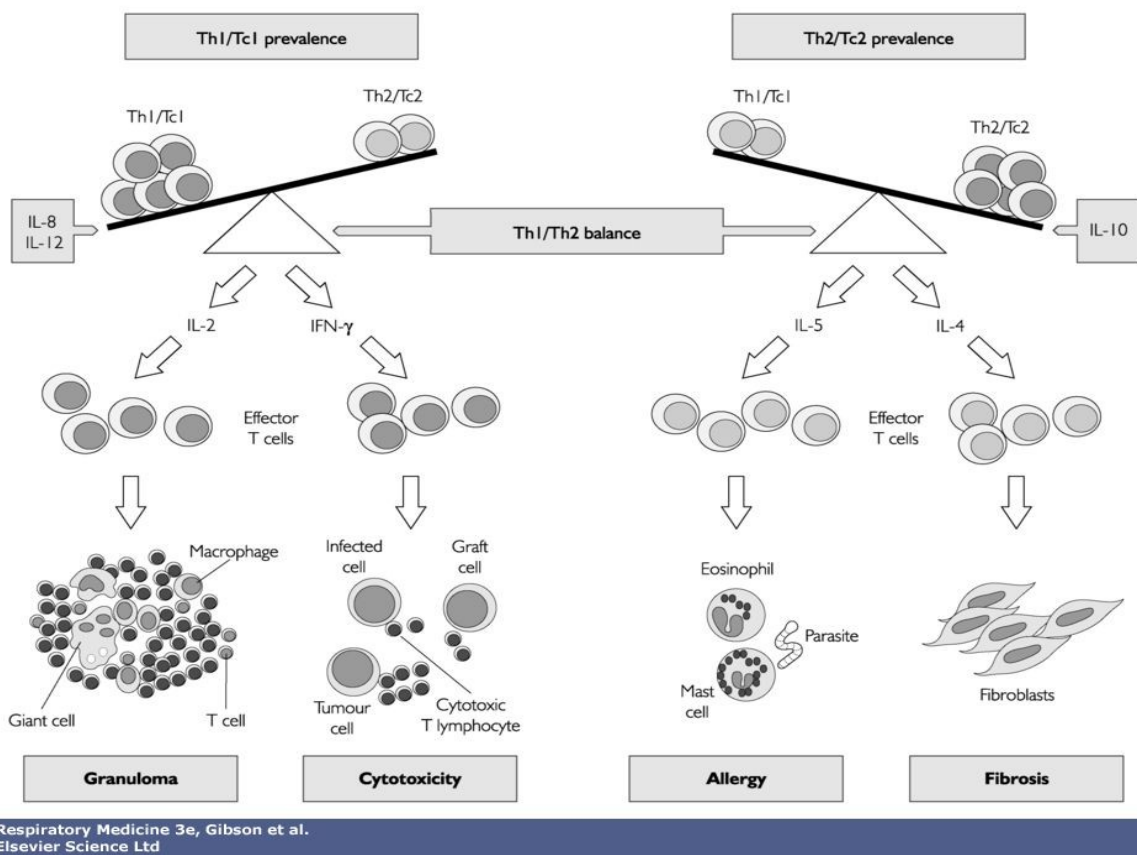
Existuje několik teorií o původu fibroblastů a myofibroblastů v plicní tkáni u pacientů s IPF. Jedna z nich předpokládá, že jde o rezidentní buňky, které se aktivují a prolifерují v odpověď na poranění. Současná teorie podporuje spíše myšlenku mimoplicního původu fibroblastů, které jsou původem z kostní dřeně, chovají se jako mezenchymální kmenové buňky a jsou atrahovány do míst tkáňového poranění, kde přispívají k fibrotizaci plicní tkáně. (Philips, 2004)

Další ze zkoumaných cest patogeneze plicní fibrózy je vliv hepatocytového růstového faktoru- hepatocyte growth factor (HGF) na fibroblasty. Produkce HGF z prekursoru

pro-HGF je regulována aktivátorem- serinovou proteázou- (HGFA) a inhibována specifickými inhibitory (HAI-1, HAI-2). Předpokládá se, že HGF má protektivní vliv proti vzniku plicní fibrózy a jeho protektivní vliv je znemožněn tím, že fibroblasty u jedinců s IPF mají sníženou schopnost exprese HGFA, tudíž je významně snížena hladina aktivního HGF v pokusech in vitro. (Marchand- Adam, 2006)

Je pravděpodobné, že fibroblasty u jedinců s IPF mají i sníženou schopnost apoptózy a že jsou chráněny proti apoptóze mediované Fas inhibitory apoptózy (IAP). Například ILP- X chromosome-linked IAP (ILP), které zvýšeně exprimují plicní fibroblasty nemocných s IPF, přímo inhibují caspázu- 3. Tyto fibroblasty také zvýšeně exprimují FLICE-like inhibitor protein (FLIP L/S), který byl nejprve popsán jako virový produkt inhibující Fas a TNF mediovanou apoptózu, a jenž má schopnost kompetitivně inhibovat vazbu caspázy-8 na komplex Fas receptoru a blokovat tak Fas signalizační dráhu. (Tanaka, 2002)

Idiopatická plicní fibróza se obvykle vyskytuje sporadicky, familiární případy jsou vzácné. Z toho důvodu je i relativně málo prací zkoumajících familiární plicní fibrózu. U tohoto onemocnění je pravděpodobný autosomálně dominantní přenos zatím nejasného genetického znaku- alely, manifestace bývá ale u jednotlivců značně rozmanitá a najdeme často v jedné rodině několik subtypů idiopatických intersticiálních pneumonií, což by podporovalo domněnku o vlivu prostředí na fenotyp (Steele, 2005)



Obr.1 Th1/Th2 rovnováha v imunologické reakci. Převzato z Gibson et al. Respiratory Medicine.

### Rizikové faktory

Byla objevena řada faktorů majících pravděpodobný vliv na vznik a vývoj IPF. V kontrolních studiích bylo prokázáno, že kouření je potenciálním rizikovým faktorem.

OR (odds ratio) z odlišných oblastí světa je v rozmezích 1,6 – 2,9 pro možný nástup onemocnění u těžkých kuřáků. Pravděpodobnost vzniku onemocnění stoupá s narůstajícím počtem let kouření (Hubbard, 1996). Mezi rizikové pro vznik IPF patří i expozice prachům, a to bez závislosti na tom, zda pacient je kuřákem či nikoliv. Riziko vzniku IPF pozitivně koreluje s dobou expozice. Prach obsahující ocel, mosaz, olovo a

částice z borovicového dřeva je nejvíce zatěžujícím faktorem. Dalším rizikovým faktorem je expozice rozpouštědlům (Scott, 1990; Hubbard, 1960; Baumgartner, 2000).

Na patogenezi IPF má vliv také řada virových patogenů. U pacientů s IPF byla zjištěna vyšší incidence EBV, chřipkového viru, cytomegaloviru (CMV) a viru hepatitidy C. Další viry, které by se mohly účastnit na patogenezi IPF, jsou virus parainfluenzy, human imunodeficiency virus A (HIV-1), virus spalniček, herpesvirus 6 a mycoplasma (Thomas, 2001).

### Klinické projevy

IPF je definována jako specifická forma chronické fibrotizující intersticiální pneumonie. Klinicky se projevuje progredující námahovou a posléze klidovou dušností, snadnou unavitelností, kašlem a v pozdějších fázích při nastupující hypoxémii i cyanózou. U  $\frac{3}{4}$  pacientů se také vyskytují fenotypové projevy, jako jsou paličkovité prsty s nehty tvaru hodinového sklíčka a poslechový fenomen krepitu slyšitelný nad plicními bazemi.(Obr.2)



*Obr.2 Paličkovité prsty s nehty tvaru hodinových sklíček*

I když je pro IPF typický pozvolný a plíživý nástup dušnosti s pomalu progredujícím zhoršováním dušnosti, u některých pacientů se vyskytnou epizody tzv. akutní exacerbace IPF, kdy dojde k náhlému klinickému zhoršení s poklesem plicních funkcí a radiologickým obrazem tzv. mléčného skla svědčícím pro alveolitidu. (Ambrosini, 2003) Předpokládalo se, že tato exacerbace je způsobena akutní idiopatickou pneumonitidou AIP, tj. obrazem difusního alveolárního poškození- DAD, nasedlého na IPF. Dle některých prací, popisujících bioptické nálezy u těchto nemocných byly však popsány akcentované fibrotické změny, nebo obraz tzv. nespecifické pneumonitidy- NSIP. To asi vysvětluje i kontroverze kolem efektu vyšších dávek kortikosteroidů a pacientů s exacerbací IPF. (Parambil, 2005)

#### Radiologický nález

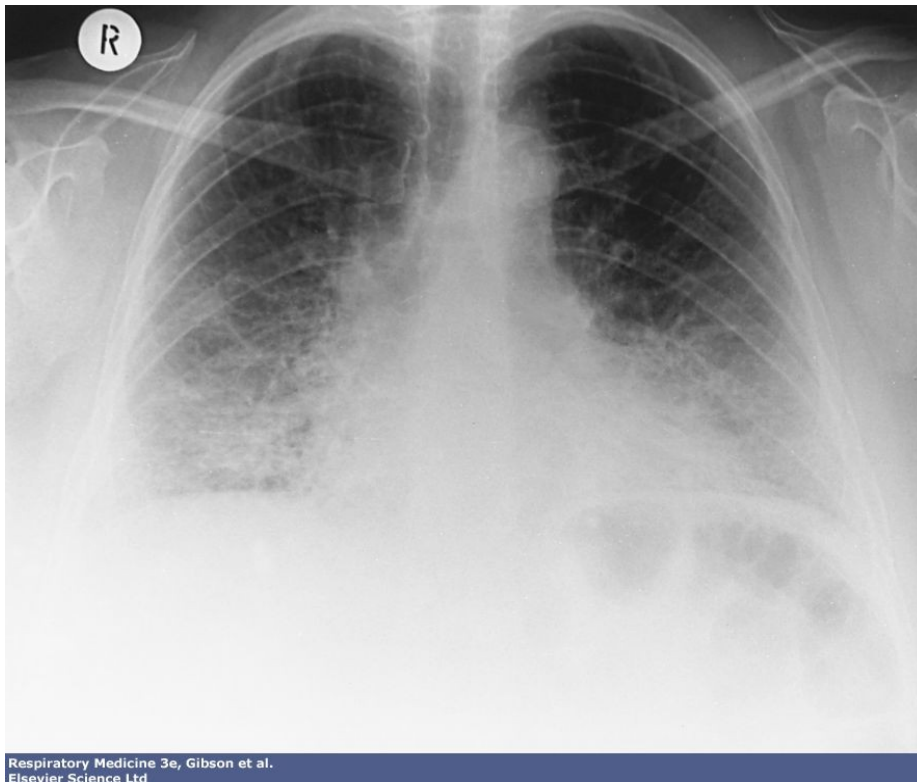
Typický radiologický nález popisuje zmnoženou plicní kresbu až retikulonodulaci na prostém zadopředním skiagramu hrudníku a obraz plicní fibrózy až s obrazem voštinovité plíce v bazích plicních s minimálními okrsky tzv. aktivních změn při vyšetření vysoce rozlišující výpočetní tomografií hrudníku (HRCT).(Obr.3, Obr.4) HRCT hrudníku je stěžejní vyšetřovací metodou v případě IPF. Napomáhá nejen v diagnostice a diferenciální diagnostice IPF, ale dá se jím sledovat poměr intersticiálních a alveolárních změn, rozsah fibrózních změn a dynamika onemocnění. Zvláště určení rozsahu fibrózních změn v době diagnózy ukazuje na prognózu onemocnění, tj. čím větší rozsah fibrózy, tím kratší doba přežití.(Gay, 1997) Terminálním postižením plicního parenchymu je tzv. voštinovitá plíce, která zobrazuje okrsky tkáně se zaniklými alveoly a kondenzovanou fibrózní tkání obklopující cystické prostory.

Pro lepší porovnatelnost a interpretovatelnost jednotlivých vyšetření v čase u jednoho pacienta nebo srovnání vyšetření mezi jednotlivými pacienty byly navrženy skórovací systémy, které hodnotí rozsah alveolárních a intersticiálních změn v % postižení plicního



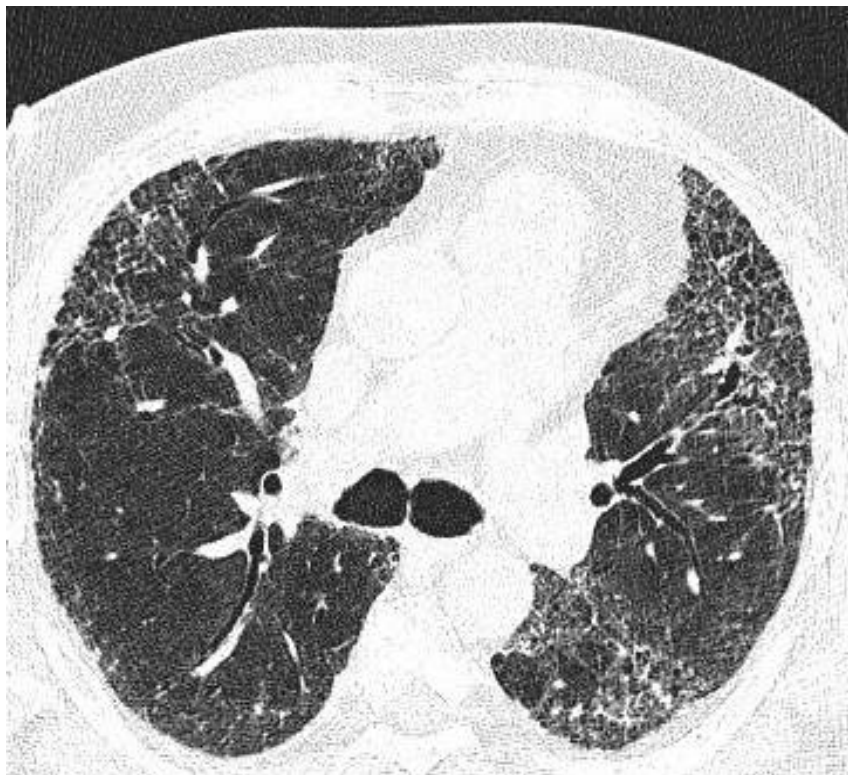
parenchymu.(Wells, 1993; Gay, 1997; Kazerooni, 1997; Hansel 1999; Nagao 2002)

(Tabulka 2 ) (Obr. 5, 6)



Respiratory Medicine 3e, Gibson et al.  
Elsevier Science Ltd

*Obr.3 RTG hrudníku u pacienta s IPF (Gibson et al.: Respiratory Medicine)*

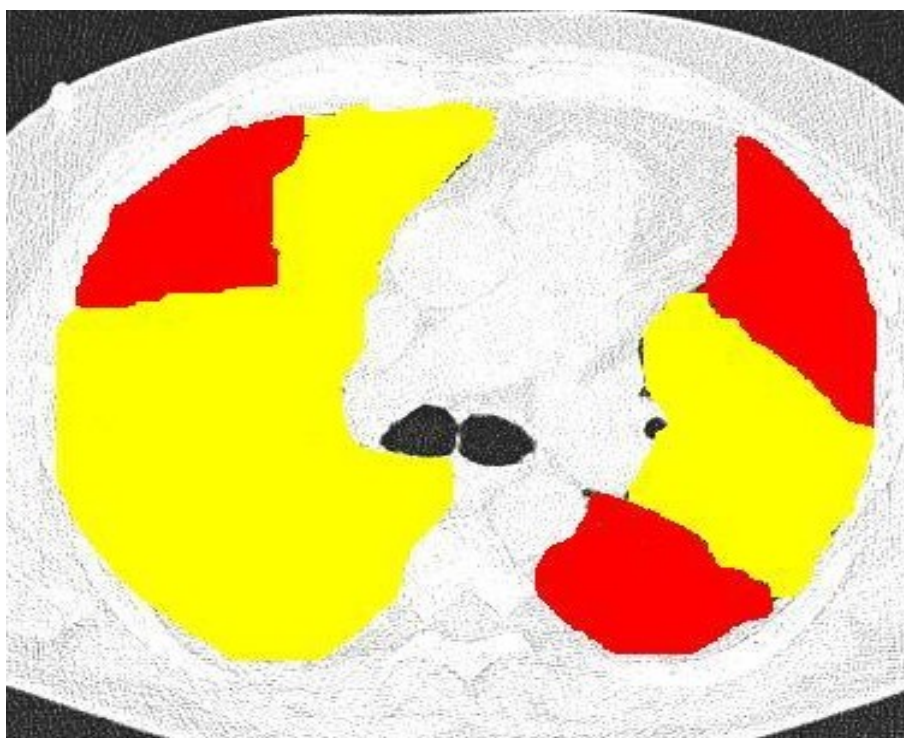


*Obr.4 HRCT hrudníku u pacienta s IPF (archiv autora)*

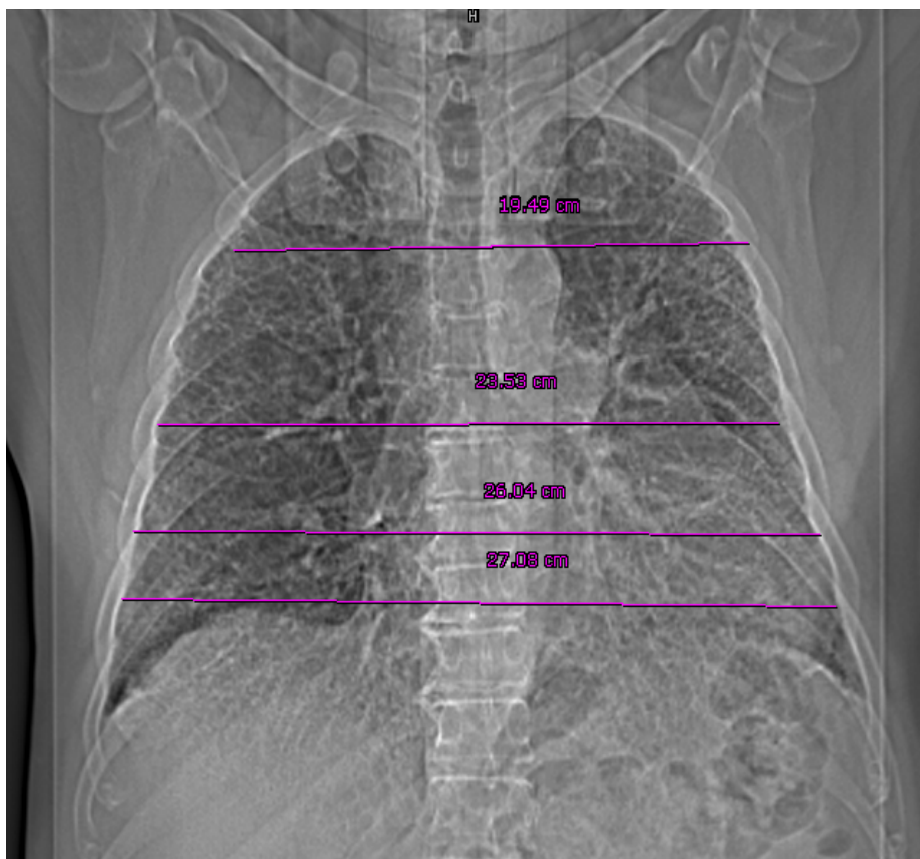
**Tabulka 2. HRCT skórovací systém u IPF (dle Gay et al)**

STUPĚŇ POSTIŽENÍ	ALVEOLÁRNÍ SKÓRE	INTERSTICIÁLNÍ SKÓRE
0	0	0, není voština
1	1-4%	1-4%, není voština
2	4-24%	5-24%
3	25-49%	25-49%
4	50-74%	50-74%
5	75%-100%	75-100%

*% udávají rozsah postižené plicní tkáně*



*Obr.5 Zobrazení okrsků intersticiálních a alveolárních změn metodou „manual tracking“*



Obr.6 Zobrazení úrovní hodnocení HRCT skóre u pacienta s IPF

### Funkční vyšetření plic

Funkční vyšetření patří nedílně ke škále základního vyšetření u IPF. Základní vyšetřovací metodou je spirometrie, která nám ukáže u pacientů s IPF převážně redukci vitální kapacity (VC) a body pletysmografie dále obvykle potvrdí restriktivní typ ventilační poruchy charakterizovaný typickým tvarem křivky a snížením totální kapacity (TLC) a residuálního objemu (RV). Citlivým ukazatelem je u IPF plicní difuze ( $DL_{CO}$ ), která je vyšetřována buď metodou single breathe nebo steady state s použitím inhalace kyslíčniku uhelnatého (CO). Hodnota  $DL_{CO}$  je obvykle snížena daleko dříve než hodnota vitální kapacity a je tak citlivým vyšetřením v úvodních fázích onemocnění. Ještě citlivějším vyšetřením je vyšetření plicní poddajnosti (compliance), která je časně snížena i při minimálním postižení plicního parenchymu. Vzácně se u pacientů s IPF setkáme i

s obstrukční ventilační poruchou, a to u podskupiny nemocných s kombinací plicní rozedmy a plicní fibrózy. (Cottin, 2005) Nedílnou součástí je i vyšetření krevních plynů, kdy je u pacientů s IPF v úvodu onemocnění pokles saturace krve kyslíkem ( $SaO_2$ ) a parciálního tlaku kyslíku ( $paO_2$ ) v tepenné krvi pouze při zátěži a s progresí onemocnění dochází i ke klidové hypoxémii. Na základě hodnot krevních plynů je pak zvažováno u pacientů s IPF přidělení suplementární léčby kyslíkem, a to buď cestou koncentrátoru kyslíku nebo kapalným kyslíkem. Dobrou informaci o funkčním stavu pacienta nám dá šestiminutový test chůze (6-MWT), který je také nedílnou součástí vyšetření pro případnou indikaci přidělení právě kapalného kyslíku.

Co se týče prognózy pacientů ve vztahu k funkčním parametrům, soudí se, že hodnota VC a věk v době diagnózy koreluje s prognózou onemocnění a délkou životního výhledu nemocných (Erbes, 1997) Ukazuje se, že i zátěžové funkční testy, jako je šestiminutový test chůze, jmenovitě saturace arteriální krve kyslíkem na konci zátěže, má vztah k délce přežití pacientů s IPF (Hallstrand, 2005)

#### Bronchoalveolární laváž

Dalším vyšetřením v algoritmu vyšetřovacích metod u pacientů s IPF je bronchoalveolární laváž (BAL). Je to vyšetření, kdy jsme schopni získat endoskopickou metodou buňky z oblasti plicních alveolů, tudíž místa, kde již probíhá vlastní patogenetický proces u IPF.

Vyšetření se provádí fibrobronchoskopem, který je po předchozím místním umrtvení sliznic horních cest dýchacích a trachey zaveden obvykle do některého ze subsegmentárních bronchů (většinou v oblasti středního laloku), kde je zaklíněn a po zaklínění je instilováno pracovním kanálem fibroskopu do přilehlého okrsku plicní tkáně 100-500 ml vlažného fyziologického roztoku ve 3 až 5 frakcích a následně je tekutina zpětně aspirována fibroskopem a určena k dalšímu vyšetření cytologickému, cytometrickému, event. biochemickému či genetickému.

V rámci základního klinického vyšetření tekutiny získané BAL se provádí po centrifugaci tekutiny nátěr na sklíčko a vzorek je pak cytologicky mikroskopicky morfologicky a kvantitativně vyšetřen. Normální hodnoty buněčného rozpočtu v BAL a hodnoty obvyklé u IPF jsou uvedeny v tabulce.(Tabulka 3) (Drent, 1993) Pro IPF je typické zmnožení granulocytů obvykle s malou příměsí eosinofilů, lymfocyty bývají zvýšeny minimálně.

V rámci cytometrického vyšetření BAL vyšetřujeme převážně T lymfocytární markery- CD3, CD4, CD8, B lymfocytární CD19, markery NK buněk CD16/56, a aktivační marker HLA DR na T lymfocytech. Z těchto povrchových molekul má klinický význam hlavně stanovení zastoupení CD4 a CD8 pozitivních T lymfocytů, které je důležité pro diferenciální diagnostiku IPF versus sarkoidóza a eventuálně exogenní alergická alveolitida. (Papiros, 2005)

Nebuněčné součásti BAL nejsou rutinně vyšetřovány a jejich klinický přínos je předmětem dalšího výzkumu.

**Tabulka 3 . Buněčný rozpočet v BAL u zdravých kontrol a pacientů s IPF (Drent M. et al., 1993)**

SKUPINA	AM	PMN	LYM	EOS
Zdraví nekuřáci	87,0+-5,2%	1,6+-1,4%	11,0+-5,2%	0,34+-0,52%
Zdraví kuřáci	91,6+-8,8%	1,2+-1,6%	6,8+-8,6%	0,41+-0,45%
IPF nekuřáci	67,8+-19,4%	11,7+-10,1%	13,8+-15,7%	6,4+-9,3%
IPF kuřáci	76,0+-25,5%	11,5+-21,5%	5,1+-4,8%	7,1+-12,2%

*AM= alveolární makrofágy; PMN= polymorfonukleáry; LYM= lymfocyty; EOS= eosinofily*

### Plicní biopsie

Otázka, do jaké míry je plicní biopsie a její histopatologická interpretace nutná pro definitivní stanovení diagnózy IPF je neustále diskutována. Spektrum názorů je od zcela jasného pro, kdy biopsie je pokládána za zlatý standard diagnostiky IPF až po názor, že

IPF má natolik charakteristické klinické a radiologické znaky, že v podstatě již histologické ověření není potřeba. Jasným a logickým vyústěním konfrontace těchto postojů jsou právě klinická a patologická kritéria diagnostiky IPF (Tabulka 4). Nicméně většina kliniků i patologů zabývajících se touto problematikou soudí, pokud je možné biopsii provést (tj. je pro pacienta únosná po interní stránce), je biopsie indikována, zvláště v případech, kdy klinické a radiologické známky onemocnění nejsou zcela typické (Fishbein, 2005).

Transbronchiální biopsie, která je méně invazivní endoskopickou alternativou biopsie vhodnou při ověřování jiných difusních procesů (granulomatózy, alveolární proteinóza, eosinofilní pneumonie), se jeví v případě idiopatických intersticiálních pneumonií jako nepřínosná. Proto je nutné při indikaci biopsie volit chirurgický přístup, a to většinou videothorakoskopickou cestou, méně často cestou minithorakotomie dle Klassea (Leslie KO, 2005).

Plicní biopsie může být hodnocena nejen patologicko-anatomicky, ale v poslední době je plicní tkáň v rámci výzkumných projektů vyšetřována geneticky a bylo zjištěno, že genová exprese jednotlivých genů pro zánět a tkáňovou remodelaci se významně liší mezi jednotlivými intersticiálními plicními procesy, což by mohlo mít značný diferenciálně diagnostický význam v případech, kdy patologický obraz není jednoznačný, a i význam prognostický. (Dave, 2005; Selman, 2006)

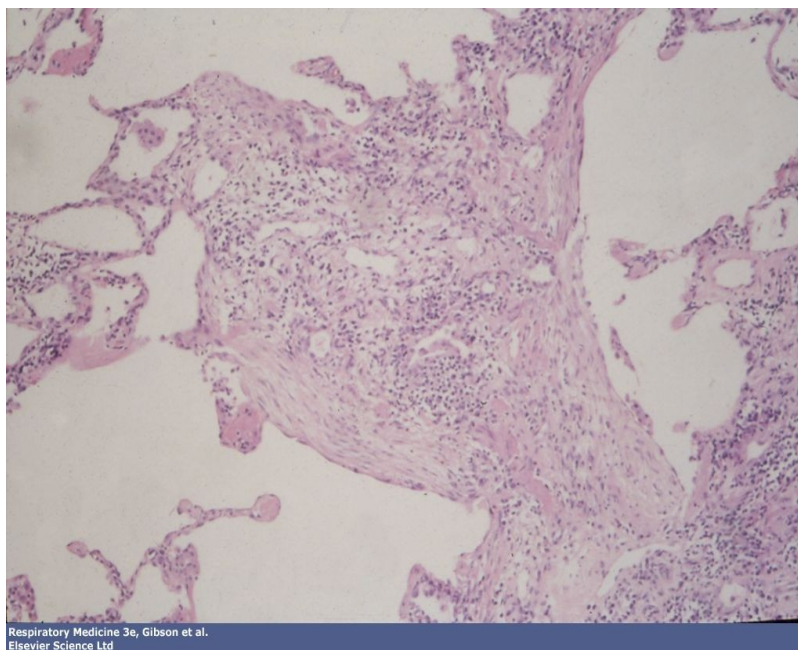
#### Patologicko-anatomický obraz

Patologicko-anatomický obraz u IPF je různorodý dle lokalizace odběru plicní tkáně, většina odebraných vzorků však zachycuje obraz tzv. obvyklé intersticiální pneumonitidy s převahou jizvení a destrukcí plicní architektiky. V případě vícečetného odběru vzorků plicní tkáně může být zachyceno několik různých obrazů, například změny typické pro deskvamativní pneumonitidu nebo obliterující bronchiolitidu, pokud by však jen jediný ze vzorků obsahoval změny typické pro idiopatickou pneumonitidu typu



obvyklého je nutné histopatologicky interpretovat nález jako idiopatickou plicní fibrózu. (Leslie KO, 2005) (Obr. 6)

Je důležité vědet, že finální diagnostika IPF je skutečně syntézou klinického, radiologického a histopatologického nálezu, která je dílem lékaře- klinika. Histopatologická diagnóza je hlavní oporou v těch případech, kdy manifestace onemocnění není typická. (Flaherty, 2004)



*Obr.6: Histopatologický obraz idiopatické plicní fibrózy typu obvyklého. Převzato z Respiratory Medicine, Gibson et al.*

### Kritéria pro diagnózu IPF

Diagnostika IPF se řídí posledními pravidly Americké hrudní společnosti a Evropské respirační společnosti ATS/ERS (Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and treatment, 2000, T.E.King Jr, 2005). (Tabulka 4)

*Tabulka 4. Kritéria ATS/ERS pro stanovení diagnózy idiopatické plicní fibrózy*

**V případě chirurgické plicní biopsie s nálezem obvyklé intersticiální pneumonitidy**

- Vyloučení jiných příčin difusního 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 intersticiální pneumonitidy**

**Hlavní kritéria- musí být splněna všechna**

- Vyloučení jiných příčin difusního plicního onemocnění
- Restriktivní ventilační porucha, zvýšený poměr FEV1/FVC a/nebo izolovaná porucha výměny krevních plynů
- Bibazilární retikulární změny s voštinovitou plící a málo nebo žádné změny typu ground glass na CT
- Transbronchiální biopsie nepotvrzuje jinou diagnózu nebo granulocytární bronchoalveolární laváž

**Malá kritéria- musí být splněna ze ¾**

- Věk vyšší než 50 let
- Pozvolný nárůst dušnosti
- Trvání obtíží více než 3-6 měsíců
- Bilaterální basální chrůpky

**Léčba**

Náhled na léčbu IPF standardně zavedenými režimy léčby je nyní více než rozpačitý. Ukazuje se, že u IPF nejsou prakticky vůbec účinné protizánětlivě působící léky, jako



jsou kortikosteroidy nebo imunosupresiva a cytostatika. Vyplývá to z hlubšího poznání patogeneze této nemoci, kde hlavním patofysiologickým podkladem není zánět, ale patologická fibroprodukce. Nicméně stále ještě obvyklou léčbou IPF je kombinace kortikoidů (prednison 0,5 mg/kg) + azathioprinu 100-200 mg denně, nebo cyklofosfamidu 100- 200 mg denně. Alternativou je pulsní terapie cyklofosfamidem v dávce 1000 mg 1x měsíčně, která pravděpodobně snižuje toxicitu preparátu z dlouhodobého hlediska, ale nemá též významný vliv na délku přežití pacientů s IPF.

Racionálním by se tedy zdálo použití antifibrotických léků, např. kolchicinu nebo D-penicilaminu, randomizované studie však neprokázaly pozitivní efekt této léčby oproti placebo. Z nových antifibroticky působících léků je t.č. zkoušen pirfenidon ve klinické fázi II . Dalším lékem, který je nyní zkoumán v klinické studii III- INSPIRE, je imunomodulační cytokin IFN- gama, který by logickým způsobem měl ovlivňovat nerovnováhu cytokinů a upřednostnit v tomto případě výhodnější Th1 typ imunitní odpovědi. Otázka, zda tato léčba bude mít vliv na přežití pacientů, zůstává však zatím otevřena.(Ziesche, 1999) Zdá se, že antifibrotické účinky by mohl mít i IFN- beta, který v pokusu zabraňoval vývoji fibrózy u myši po aplikaci bleomycinu. IFN- beta v tomto případě oslaboval propylhydroxylázovou aktivitu a navíc snižoval hladinu TGF-beta 1 v epiteliálních buňkách a extracelulární matrix. Tato pozorování podporují hypotézu o antifibrotickém efektu IFN- beta cestou inhibice TGF- beta a jeho aktivace snížením hladiny thrombospondinu-1/2 v plicní tkáni a změny lokalizace thrombospondinu z destiček do pěnících buněk (Azuma, 2003)

Ve studii Bonniauda et al byla úspěšně testována blokáda TGF beta 1 indukované plicní fibrózy inhibitorem ALK5 kinázy (aktivinová receptor-like kináza), kterou je přenášen biologický efekt TGF- beta na buňku. (Bonniaud, 2004) Možnosti klinického užití tohoto experimentálního léčebného postupu však čekají na podporu dalšími klinickými zkouškami.

Zatím jediným z nově zkoušených léčebných postupů, který se již vřadil do léčebného schématu v širším klinickém užití je antioxidačně působící N-acetylcystein, který při dlouhodobém podávání v dávce 1800 mg denně v kombinaci se střední dávkou kortikoidů a 150 mg azathioprinu statisticky významně zpomaluje pokles plicních funkcí, i když se zatím nezdá, že by měl vliv na dlouhodobé přežití. (Demedts, 2005)

Další klinické pokusy vycházejí ze znalosti, že v plicích u IPF je značně zvýšena exprese endotelinu-1 (ET-1), což naznačuje, že může být souvislost mezi produkcí ET-1 a probíhajícími fibrogenními procesy v plicích. Logicky pak tato úvaha vede k pokusu o ovlivnění tohoto procesu podáváním antagonistů endotelinového receptoru. Nyní probíhá klinická studie fáze II/III s neselektivním antagonistou endotelinového receptoru-bosentanem u pacientů s IPF (BUILD-1).

Mezi další zkoumané léky patří: solubilní receptor tumor nekrotizujícího faktoru (TNF-R)- etanercept; imatinib mesylát fungující cestou blokády receptoru pro destičkový růstový faktor (PDGF-R); sirolimus, což je makrolidové antibiotikum s imunosupresivními účinky a antagonisté leukotrienů (zileuton). (Bouros, 2005)

Z výše uvedeného přehledu vyplývá, že není jasné, jak a čím v současné době IPF účinně léčit. V praxi je asi nejčastěji používanou kombinací střední dávka kortikoidů s azathioprinem a acetylcysteinem.

Poslední studie však napovídají, že léčba IPF v budoucnosti bude pravděpodobně tzv. biologická, směřující ke specifické blokáde patogenetických mechanismů IPF, jejichž nedílnou součástí jsou právě cytokiny. A právě nerovnováha cytokinů, jejímž genetickým podkladem může být polymorfismus genů pro cytokiny, může významně ovlivňovat vznik i průběh onemocnění. (King, 2005)

### Prognóza

Prognóza je obecně špatná, navzdory léčbě má IPF v porovnání s ostatními typy idiopatických plicních pnemonií téměř vždy progredující zhoubný průběh. Nemocní jsou

|

vzhledem k doživotnímu užívání terapeutik ohroženi vedlejšími účinky, jako je zvýšené riziko osteoporózy, sekundární diabetes či oportunní infekce. U těchto pacientů je také ve zvýšené míře pozorován bronchogenní karcinom.(Hojo, 1998) Většina pacientů obvykle umírá do dvou let od zjištění diagnózy.

## **Genetické studie u idiopatické plicní fibrózy (IPF)**

Fibrotizující plicní nemoci jsou považovány za tzv. komplexní nemoci, což znamená, že v etiopatogeneze choroby jsou zahrnuty četné genové lokusy, každý s nějakou dílčí nemoc modifikující nebo spouštěcí/blokující funkcí. (Grutters, 2005)

Hypotéza o rozvoji fibrotizujícího plicního procesu u náchylných jedinců po expozici nějakému spouštěcímu faktoru zevního prostředí je podpořena sledováním rodinného výskytu difúzních plicních nemocí včetně idiopatické plicní fibrosy, sarkoidózy, exogenní alergické alveolitidy, plicní granulomatózy s Lagerhansových buněk a deskvamativní intersticiální pneumonie a HLA asociačními studiemi. (Burch, 2005; Steele, 2006; Marshall 1997)

### Strategie genetických studií

Je několik strategií k určení role genetických faktorů u IPF. Jednou z možností jsou rodinné studie, které vyžadují analýzu velkého počtu DNA znaků s cílem identifikovat oblast chromosomu, jejíž změny se objevují u jedinců s výskytem IPF nebo s obrazem určitého fenotypu mezi jedinci s IPF. Jakmile je kandidátní úsek dostatečně malý, můžeme určit gen asociovaný s nemocí pozičním klonováním. Nevýhodou tohoto postupu je nutnost vyšetření 3 generací v daných rodinách, což je většinou nemožné u chorob s pozdní manifestací fenotypu, jako je IPF.

Druhá strategie je založena na studiích nemocných s danou chorobou srovnávaných se zdravou populací („case- control“ studie). Tyto studie, které srovnávají četnost alel kandidátních genů nebo genových haplotypů mezi nemocnou a zdravou populací, jsou v problematice genetiky IPF podstatně častější.

Třetí možnou strategií je sledování sourozeneckých párů, které srovnává frekvenci alel u postižených a nepostižených sourozenců a je v podstatě modifikací „case- control“

studie, kde kontrolní skupinou jsou nepostižení sourozenci. Odpadá zde tak problém se stratifikací vyšetřované a kontrolní populace. (Kauffmann, 2004)

S rostoucími znalostmi o variacích lidského genomu postupně roste zájem o provádění genetických asociačních studií u komplexních nemocí, tudíž i u IPF. Studie s dobrým designem v této oblasti mohou poskytnout relevantní údaje o etiologii a patofyziologii sledované nemoci. Tyto studie jsou obvykle dobře realizovatelné, pokud má dotyčný výzkumník přístup k nemocné populaci, jejich validita je však významně ovlivněna počtem jedinců studované populace a populace kontrolní (obvykle je nejlepší poměr studovaná populace : kontrolní populaci 1:2).

#### Míra průkaznosti genetické studie

Na začátku genetické studie by měla být určena míra průkaznosti studie pro určení hledané odchylky. Většina genetických faktorů přispívajících ke vzniku komplexních nemocí, nemá relativní riziko větší než 2. Vhodná velikost studované populace k určení této míry rizika závisí na frekvenci polymorfismů sledovaných alel. Pro většinu genů je optimální velikost studovaného souboru několik set jedinců k získání relevantních výsledků. To je poměrně snadné dosáhnout u častých plicních nemocí, jako je asthma či chronická obstrukční plicní nemoc. Ve studiích určujících vztah genu a prostředí a vztah mezi jednotlivými geny je potřeba studovaných jedinců více a tudíž je obvykle nutná spolupráce mezi jednotlivými výzkumnými centry. Obtížné je dosáhnout velkých počtů jedinců ve sledované populaci u nemocí, které se vyskytují v populaci s nízkou četností a které vyžadují komplexní vyšetřovací program včetně invazivních vyšetření k určení diagnózy s vysokým stupněm věrohodnosti. K takovým nemocem jistě patří i idiopatická plicní fibróza. V těchto případech lze přijmout i výsledky studií na menším počtu jedinců s cílem blíže určit suspektní alely, které budou dále sledovány. (Tabulka 5)

**Tabulka 5. Vhodné velikosti souborů geneticky sledované populace v „case-control“ studiích pro dané frekvence výskytu minoritních alel.**

*Předpokládaná velikost kontrolního souboru je stejná jako souboru vyšetřovaného. GRR- relativní riziko daného genotypu.*

*(Hall IP, Blakey JD. Genetic association studies in Thorax. Thorax 2005;60:357-359)*

Frekvence minoritní alely	GRR	VYŽADOVANÝ POČET VYŠETŘENÝCH	
		Dominantní alela	Recesivní alela
0,01	1,5	5 500	> 1 000 000
	2	1 900	> 300 000
0,05	1,5	1 300	50 000
	2	400	15 000
0,2	1,5	600	5 000
	2	220	1 500
0,4	1,5	750	900
	2	300	350

Množství polymorfizmů (SNP- single nucleotide polymorphisms) jednotlivých genů je značné. V dostupných databázích je shromážděno cca 6 miliónů SNP, ale je pravděpodobné, že množství SNP s frekvencí alel vyšší než 1% je více než 10 miliónů. Počet alel, které se podílejí na patogenezi a modulaci průběhu onemocnění je proto významně převáženo množstvím alel, které jsou asociované s nemocí zcela náhodně. Takovéto falešně pozitivní výsledky se vyskytují hlavně u náhodně zvolených SNP. K výběru vhodných SNP napomáhá obvykle znalost funkčního významu daného SNP, která je ale odhalena pouze u velmi malého počtu SNP.

K zvýšení relevance výsledků je obvykle vhodné podpoření našich výsledků jejich testováním na jiném vzorku populace. V případě srovnávání více genetických znaků či klinických parametrů je nutné při statistickém zpracování použít metody mnohočetného srovnávání.

Další metodou je sledování kombinací SNP v oblasti daného genu- haplotypů- s touto nevýhodou, že počet sledovaných jedinců by měl být ještě vyšší k dosažení relevantních výsledků. Při testování haplotypů je nutné myslet na variace polymorfizmů sledovaného lokusu a „linkage disequilibrium“ v okolí dané oblasti.

Co se týče kontrolní populace, měla by být po stránce rasy, pohlaví a věku podobného složení jako populace vyšetřovaná. Nevhodnou kontrolní populací obvykle bývají mladí zdraví dárči krve, nebo jedinci sledovaní pro jinou chorobu než je choroba námi sledovaná.(Hall, 2005)

#### Familiární idiopatická intersticiální pneumonitida

Familiární výskyt plicní fibrózy (familiární IIP) je prokázán, pokud se v dané rodině vyskytují 2 a více postižených členů. Někdy v rámci téže rodiny může být exprimováno několik fenotypů fibrotizujících plicních procesů. Nejčastěji pozorovaným fenotypem u rodinného výskytu IIP je fenotyp IPF/UIP ( idiopatická plicní fibróza tzv. obvyklého typu). Familiární IIP tvoří 0,5- 2,2% všech pacientů s IPF s prevalencí 1,34/1 000 000 ve Velké Británii (Marshall, 2000) a 5,9/1 000 000 ve Finsku (Hodgson, 2000).

Nyní probíhá ve Spojených státech velká rodinná studie koordinovaná dr. Schwartzem zahrnující 75 rodin s 2 nebo 3 postiženými jedinci a probíhá linkage analýza za cílem najít dostatečně malou oblast vhodnou pro poziční klonování (Grutters, 2005). Familiární forma IIP se dědí pravděpodobně autosomálně dominantně s redukovanou penetrací.

Nejvýznamnějším počinem v hledání kandidátních genů u pacientů s familiární IIP byl objev Nogueeho, který popsal mutaci genu pro surfaktantový protein C (SFTP-C) u dítěte s NSIP, jehož matka měla DIP (Nogee, 2001). Substituce G>A na pozici +1 intronu 4

způsobila přeskočení exonu 4 s delecí 37 aminokyselin, čímž došlo ke ztrátě cysteinového residua, které je nutné pro skládání proteinů na základě disulfidických můstků. Oba postižení byli heterozygoti, což podporuje hypotézu autosomálně dominantního efektu genu. Thomas uveřejnil výsledky svého pozorování rodin s familiálním výskytem IIP, kdy popsal T>A substituci v exonu 5 na pozici +128 genu pro SFTP-C u všech postižených v této rodině. Zajímavé bylo, že pozoroval také rozdílné fenotypy u jednotlivých postižených, UIP u starších nemocných a NSIP u mladších (Thomas AQ, 2002). V pozorování Tredana a spol. bylo pozorována mutace g.2125G>A(p.R167Q) v oblasti genu pro SFTPC, která se klinicky u dvou pacientů manifestovala plicní alveolární proteinózou a nikoliv plicní fibrózou, což potvrzuje domněnku, že mutace genů pro surfaktantový protein C může mít variabilní genotyp (Tredano, 2004). Tato mutace se pravděpodobně projevuje ztrátou funkce SP-C jako protizánětlivého působku, který zároveň brání akumulaci kolagenu. (Lawson, 2005)

Defekt nebo chybění surfaktantu, které může vést k fatálním pneumopatiím novorozencům, ale také k vývoji intersticiálního plicního procesu, může být způsobeno i mutací genu pro ATP- vázící kazetový protein (ABCA 3). Tento gen kóduje protein, který se vyskytuje v membráně ohraničující lamelární tělíska v pneumocytech II. typu a má pravděpodobně úlohu v transportu lipidů a tudíž i důležitou roli v metabolismu surfaktantu. Missense mutace byla prokázána u 3 pacientů s DIP na jedné z alel genu ABCA na pozici 875 v prvním kodonu exonu 9 (A>T). Tato mutace vede v záměně valinu za glutamovou kyselinu (E292V) a tím tvoří nové místo rozpoznávané restričními endonukleázami BsrG1. (Bullard, 2005)

### Idiopatická plicní fibróza

Většina pacientů s IPF má ale rodinnou anamnesu stran fibrotizujících plicních procesů němou. Je pravděpodobné, že se jedná o onemocnění odlišné od familiální formy



IIP a že jde o nemoc podmíněnou mnohočetnými genetickými faktory ve spolupráci s faktory zevního prostředí. (duBois, 2003)

T.č. nejsou dostupné linkage analýzy celého genomu u pacientů s IPF a tudíž není možné ani poziční klonování k odhalení suspektních genů. Z toho důvodu je jedinou možnou cestou genetického výzkumu cesta „case- control“ studií. Vzhledem k tradičním představám o patogenezi IPF jsou zkoumány geny cytokinů, které se s vysokou pravděpodobností účastní patogenetických mechanismů IPF, tj. gen pro nádor nekrotizující faktor alfa (TNF-alfa) a skupina genů pro cytokiny skupiny interleukinu- 1 (IL-1).

Nyní ale tradiční představa o prvotní zánětlivé lézi plicního parenchymu, která posléze přechází ve fibrózu ustupuje do pozadí a předpokládá se, že primární jsou mikroskopické léze alveolárního epitelu, které se abnormálně hojí vystupňovanou, nekontrolovanou fibroprodukcí. Tudíž i kandidátní geny je třeba hledat v oblasti genů pro surfaktant, oxidačních/antioxidačních mechanismů a genů pro regulační působky ovlivňující fibroblasty a systém koagulace. Lze se domnívat, že i zde se mohou uplatňovat geny pro cytokiny, a to pro cytokiny tzv. protizánětlivé a regulační (skupina IL-4, IL-10, IL-12, IFN gamma), jejichž mutace může způsobit abnormální hojení epitelálních lézí u IPF. A právě tato představa se stala výchozí tezí našeho výzkumu genových polymorfismů cytokinů u pacientů s IPF.

## **Cytokiny**

Cytokiny jsou základní regulátory imunitního systému, které jsou sekretovány leukocyty a jinými buňkami. Působí prostřednictvím specifických receptorů na různé buňky imunitního systému i mimo něj. Existují ve formě solubilní a membránově vázané, které jsou zakotveny v buněčné membráně hydrofobní sekvencí přibližně 20 aminokyselin (transmembránové proteiny). Většina cytokinů je ve svých účincích pleiotropní (působí na několik různých druhů buněk) a navíc účinek jednoho cytokinu může být nahrazen jiným (redundantní funkce). Cytokiny se ve svém působení často ovlivňují, ať už synergicky nebo antagonisticky. Působí většinou v kaskádě, t.j. jeden cytokin indukuje tvorbu druhého. Působení cytokinů je buď autokrinní, parakrinní, nebo endokrinní. (Hořejší, 2005)

### Nomenklatura cytokinů

Cytokiny se dělí do skupin podle názvů, přestože názvy odrážejí spíše historický vývoj nežli strukturu a funkční vztahy. Původně se předpokládalo, že jsou produkovány lymfocyty a jejich historicky první název nesl jméno lymfokiny. Později bylo zjištěno, že jejich tvorba není striktně omezena na jeden buněčný typ, a byl zaveden širší termín: cytokiny.

Objevené lymfokiny byly číslovány podle pořadí, v jakém byla poznána jejich struktura. Toto však nebylo důsledně aplikováno a některé z molekul, které by dle stávajícího systému mezi lymfokiny měly být řazeny, byly stále nazývány jejich původními názvy (TNF). Tyto důvody tak vedly k zavedení obecnějšího pojmu cytokiny.

V současné době je známa primární struktura asi 120 cytokinů.

Při dělení cytokinů se uplatňuje řada hledisek: dělení dle struktury, převažujících funkcí, příslušenství k cytokinové rodině apod.

#### Dělení cytokinů dle převažujících funkcí

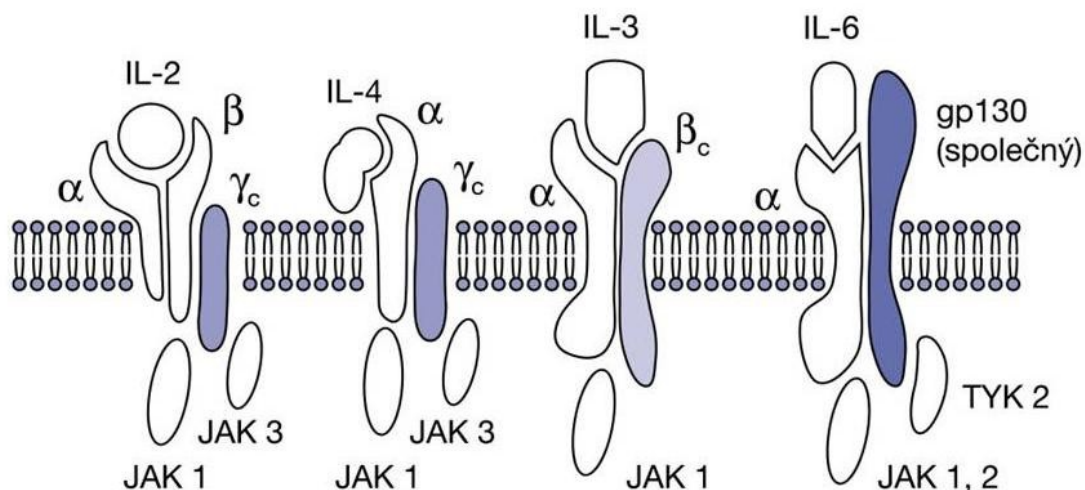
1. cytokiny podporující zánětlivou reakci – tzv. prozánětlivé cytokiny: IL-1alfa, IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IL-19, IL-22, TNF
2. cytokiny inhibující zánětlivou reakci – protizánětlivé cytokiny: IL-1Ra, IL-4, IL-6, IL-10, IL-25, IL-32, TGF-beta.
3. cytokiny s aktivitou růstových faktorů hematopoetických buněk: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-14, IL-15, IL-21, LT-beta, C-CSF, M-CSF, GM-CSF, SCF, LIF, EPO, CD70, CD30L, APRIL.
4. cytokiny uplatňující se v protilátkové imunitě ( $T_H2$ ): IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-21, CD40L, 4-1BB, APRIL, BlyS, TGF- beta.
5. cytokiny uplatňující se v buněčně zprostředované imunitě ( $T_H1$ ): IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-16, IL-23, IL-27, IL-31, CD70, IFN-gama, GM-CSF, TNF, LT, LT-beta.
6. cytokiny s antivirovým účinkem (interferony): IL-28, IL-29, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gama. (Hořejší, 2005)

#### Cytokinové receptory

Cytokiny reagují s buňkami skrze různé druhy specifických receptorů, jejichž densita na buněčném povrchu kolísá mezi 10 – 10 000 na jednu buňku.

Cytokinové receptory se nejčastěji skládají ze dvou či ze tří podjednotek. Jedna část podjednotky je zodpovědná za vazbu cytokinu a druhá, popřípadě třetí, zajišťuje spojení s intracelulárními signalizačními molekulami. Transmembránová část receptoru prochází nejčastěji jedenkrát membránou, pouze některé z cytokinových receptorů, jako je např. IL-8R, obsahují sedm transmembránových částí. Signalizační podjednotka bývá často

sdílěna několika různými cytokinovými receptory. Na základě toho lze receptory pro cytokiny sdružit do několika skupin.



Obr. č.7 – Podjednotkové složení cytokinových receptorů. (Hořejší, Bartůňková: *Základy imunologie*, 2005)

Jednu z rodin tvoří receptory pro IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 a IL-21, které všechny sdílejí podjednotku zvanou gama-c (CD 132).

Receptory pro IL-3, GM-CSF a IL-5 sdílejí společnou podjednotku beta (KH97;CDw131).

Receptory pro IL-6, leukemický inhibiční faktor (LIF), onkostatin M a ciliární neurotrofní faktor (CNTF) používají shodnou signální podjednotku gp 130(CD130)

Strukturně jsou si podobné receptory pro interferony a pro IL-10.

Další rodina zahrnuje receptory pro chemokiny. Pro tuto rodinu je typické, že jejich intracelulární polypeptidový řetězec prochází 7x membránou a je asociován s trimerními G-proteiny.

Velkou rodinu představují cytokinové receptory vážící cytokiny podobné TNF (TNF, lymfotoxin-LT, nervový růstový faktor-NGF); tyto receptory jsou tvořeny obvykle

trimery jedné podjednotky, která je spojena v intracelulární části se signalizačními molekulami. Do této rodiny patří dále receptory CD27, CD30, CD40, OX-40 (CD134) a 4-1BB(CDw137), Fas(CD95), DR4, DR5, RANK, TAC, BCMA, TWEAKR, které váží membránové cytokiny CD27L (CD70), CD30L, CD40L (CD154), OX-40L, 4-1BB-L, FasL, TRAIL, RANKL, APRIL, BlyS, TWEAK. (Hořejší, 2005)

### T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 rovnováha cytokinů

T lymfocyty představují jedny z nejdůležitějších producentů cytokinů. Vznikají z pluripotentních kmenových buněk, pro něž je mimo jiné typická přítomnost molekuly CD34, v kostní dřeni. V průběhu maturace se diferencují ve dvě základní subpopulace, T<sub>C</sub> (CD8+) a T<sub>H</sub> (CD4+). (Grakoui, 1999)

Jejich další diferenciaci v T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>2 lymfocyty byla poprvé popsána v roce 1986 u myši (Mosmann, 1986). Tyto dvě subpopulace se liší zejména tvorbou cytokinového spektra. T<sub>H</sub>1 lymfocyty jsou převážně producenty IL-2, TNF- beta a IFN-gama; subpopulace T<sub>H</sub>2 je charakterizovaná produkcí IL-4, IL-13, IL-5 (IL-6, IL-10). O diferenciaci do zmíněných subtypů rozhodují zejména IL-12 a IL-4.

IL-12, produkovaný makrofágy, spolu s IFN-gama směřují prekursor k diferenciaci do T<sub>H</sub>1, naopak IL-4 generuje buňky T<sub>H</sub>2. (Orris, 1999) Také T<sub>H</sub>1 lymfocyty produkují dále zejména IFN-gama, který tak silně podporuje vývoj T<sub>H</sub>1 a zároveň inhibuje vývoj T<sub>H</sub>2.

IL-4 je hlavním cytokinem sekretovaným bazofily a některými dendritickými buňkami. Jeho produkce indukuje vývoj T<sub>H</sub>2 populace lymfocytů a společně s cytokiny produkovanými těmito lymfocyty (IL-5, IL-6, IL-13) inhibuje produkci T<sub>H</sub>1 cytokinů.

V poslední době je ještě uvažován třetí typ T<sub>H</sub> lymfocytů, a to T<sub>H</sub>3 lymfocyty (CD4+ T lymfocyty, které produkují hlavně TGF- beta) a tlumí obecně imunologickou reakci T<sub>H</sub>1 i T<sub>H</sub>2 typu. Krom T<sub>H</sub>3 lymfocytů je ještě funkce regulace imunitní odpovědi a self-

|

tolerance připisována tzv. Tr1 lymfocytům, neboli T regulačním lymfocytům s povrchovými znaky CD4+CD25+ a transkripčním faktorem Foxp3, produkujícím značné množství IL-10.(Foussat, 2003)

Pro rovnováhu imunitního systému je nezbytná rovnováha produkce všech typů cytokinů. Poruchy regulačních mechanismů a patologické převážení spektra na stranu T<sub>H</sub>1 nebo T<sub>H</sub>2 mohou disponovat jedince ke vzniku řady onemocnění, v neposlední řadě i IPF.

### Charakteristika vyšetřovaných cytokinů

#### Interleukin-1 alfa, beta

K hlavním producentům těchto cytokinů patří monocyty, makrofágy a dendritické buňky, ale produkuje je i řada dalších buněk v organismu.

IL-1alfa a IL-1beta tvoří rodinu IL-1. Současná data ukazují, že IL-1alfa je převážně vázán na buňkách, zatímco IL-1beta je produkován jako sekretovaný.

Biologické aktivity těchto cytokinů jsou vesměs shodné a oba cytokiny reagují skrze stejné buněčné receptory. Funkčně IL-1beta a IL-1alfa můžeme zařadit mezi prozánětlivé cytokiny. Jsou důležitými mediátory zánětlivé odpovědi a hrají roli při vzniku chronického zánětu, který doprovází řadu onemocnění. Jsou také zaměřeny na aktivaci lymfocytů a indukci mediátorů jako jsou IFN-gama a IL-2. IL-1 se významně účastní stresových reakcí, a proto je pokládán i za neurotransmitter. Je produkován jednak na periférii a krevní cestou působí centrálně, ale také je syntetizován přímo v CNS. Je-li IL-1 produkován nadměrně, účastní se patogeneze šoku, artritidy, osteoporózy, diabetu 1. typu, aterosklerózy a dalších imunopatologických procesů.

Existují dva typy IL-1 receptorů: typ I (IL-1RI) je exprimován na T lymfocytech, fibroblastech, B lymfocytech, makrofázích a neutrofilech. Představuje hlavní receptor, převádějící signál do nitra buňky. Typ II (IL-1RII) je exprimován na B lymfocytech a

makrofázích a existuje ve formě membránově vázané a solubilní. Funkcí IL-1R (a to zejména IL-1RI) je vazba IL-1alfa, IL-1beta a IL-1Ra.

### IL-1RA

IL-1RA patří do rodiny IL-1 společně s IL-1alfa a IL-1beta. Buňky, které produkují IL-1alfa a IL-1beta, mají také schopnost vytvářet sekretovaný IL-1Ra. Jeho tvorba je proto indukovatelná ve většině buněk, vyjma astrocytů. Naproti tomu intracelulární IL-1Ra je exprimován konstitutivně pouze v keratinocytech a intestinálních epiteliálních buňkách.

Funkce intracelulární formy není zatím zcela známá, funkce sekretovaného IL-1RA spočívá v kompetitivní vazbě na IL-1 receptor, která zamezuje vznik signálu a tak způsobuje inhibici účinku IL-1alfa a IL-1beta.

Klidové a cytokiny stimulované epiteliální buňky v plicích uvolňují intracelulární IL-1RA do extracelulárního prostoru, kde IL-1RA může antagonizovat IL-1R. Intracelulární IL-1RA tak může představovat epiteliální buněčnou zásobu IL-1RA zodpovědnou za okamžité uvolnění v případě potřeby na povrch buňky (Levine, 1997).

### Interleukin- 2

IL-2 byl první cytokin, který byl identifikován na molekulární úrovni. Poprvé byl poznán při studiu mitogenní aktivity T lymfocytů jako růstový faktor TCGF (T cell growth factor) již v 70. letech (Morgan 1976).

IL-2 je produkován výhradně T lymfocyty a jeho genová exprese je řízena skrze T buněčný receptor (TCR). Po přenosu signálu přes TCR je však exprese pouze přechodná.

IL-2R byl prvním cytokinovým receptorem, který byl objeven a charakterizován. Jsou známy tři základní typy IL-2R dle afinity k IL-2. Řetězec IL-2 gama je nezbytný pro signální převod a rekonstrukci vysoce afinitního receptoru. Protože tento řetězec je

společný pro receptory dalších cytokinů, například pro IL-4, IL-7, IL-15, je tím možné vysvětlit širokospektré působení IL-2 .

Sekrece IL-2 je především autokrinní; po vyplavení samotný IL-2 zpětně indukuje vytváření kompletního receptoru (IL-2R).

IL-2 *in vivo* je zodpovědný za klonální expanzi antigenem stimulovaných CD4+ a CD8+ lymfocytů a následnou diferenciaci v jednotlivé buněčné podtypy a působí stimulačně na jejich další vývoj. T buněčná paměť je také závislá na IL-2 a tedy přežívání paměťových T lymfocytů do jisté míry záleží právě na přítomnosti IL-2.

IL-2 zvyšuje protinádorovou účinnost cytotoxických buněk a expresi některých strukturních bílkovin, například cytoskeletového proteinu alfa-tubulinu. (Sosman 1991)

#### Interleukin -4

IL-4 byl původně objeven v roce 1982 jako produkt T lymfocytů odlišný od IL-2, který dokázal stimulovat proliferaci B lymfocytů. Byl také nezávisle charakterizován jako faktor T lymfocytů zodpovědný za diferenciaci B lymfocytů v plazmatické buňky. (Paul, 1991).

Exprese IL-4 je indukována T lymfocyty a je vysoce tkáňově specifická. Nejvyšší exprese je patrna u diferencovaných T<sub>H</sub>2 lymfocytů jako odpověď na specifickou buněčnou stimulaci skrze T buněčný receptor. Tvorba IL-4 probíhá také v mastocytech a basofílech. IL-4 se váže na dva buněčné typy receptorů na buněčném povrchu, typ I a typ II. Oba představují funkční celek v podobě heterodimeru. Typ I se skládá z IL-4R alfa a IL-4R gama-c, zatímco typ II je tvořený IL-4R alfa a IL-13R alfa. Typ I je výsadním receptorem vázajícím IL-4, naproti tomu typ II díky své struktuře je schopen vázat IL-4 i IL-13. Oba typy receptorů jsou exprimovány na velké řadě různých buněčných typů.

IL-4 patří svojí funkcí mezi významné cytokiny, a to zejména svojí schopností regulovat diferenciaci naivních CD4+ T lymfocytů do fenotypové skupiny T<sub>H</sub>2. Tímto



podněcuje protilátkovou odpověď a spíše hojí, nežli exacerbuje autoimunitní procesy. IL-4 je účinným inhibítozem aktivace  $T_H1$  subpopulace a tvorby IFN-gama a inhibuje proliferaci T lymfocytů závislou na IL-2. Inhibuje sekreci zánětových cytokinů jako IL-1, TNF-alfa a IL-6.

Dále je IL-4 schopen iniciovat izotypový přesmyk ze třídy IgG<sub>1</sub> na třídu IgE. Má protektivní funkci při spontánní či indukované apoptóze a uplatňuje se také při chloridovém a iontovém transportu skrze intestinální buňky. Působení IL-4 je možné ovlivnit mutantními proteiny podobnými IL-4, které kompetují s nativním IL-4 a jemu blízkým cytokinem IL-13.

V případě patogeneze bronchiálního astmatu se předpokládá vliv IL-4 na expresi ICAM-1 epiteliálními buňkami a na adhezi monocytů a makrofágů k epiteliálním buňkám a v neposlední řadě i vzájemná potenciace sekrece IL-4 a TNF-alfa (Stříž, 1999, Am J Physiol) Také byl v experimentu prokázán vliv IL-4 na zvýšení sekrece IL-6 a IL-8 bronchiálními epiteliemi po na stimulaci TNF-alfa. (Stříž, 1999, Immunol Lett; Stříž, 1999, Inflammation)

### Interleukin-6

IL-6 byl popsán na počátku 80. let, a to jako produkt T lymfocytů stimulující růst B buněk - BSF-2. (Hirano, 1985)

IL-6 je faktor produkovaný fibroblasty, makrofágy, endoteliálními buňkami, keratinocyty a téměř všemi buňkami mezenchymální tkáně. Jeho zdroji jsou také T a B lymfocyty, osteoblasty, keratinocyty, gliové buňky, endoteliální buňky a další.

IL-6 interaguje s buňkou skrze jeden typ buněčného receptoru, skládajícího se ze 2 podjednotek, alfa řetězce (IL-6R alfa) a beta řetězce (gp 130). Gp 130 zprostředkovává přenos signálu nejenom od IL-6 navázaného na IL-6R alfa, ale také od dalších cytokinů jako je LIF (leukemia-inhibitory factor), OSM (oncostatin M), CT-1 (cardiotropin 1) či CNTF (ciliary neutropic transforming factor).

Bylo identifikováno nejméně 5 odlišných molekulárních forem IL-6 s molekulovou hmotností od 21 do 28 kDa. Tyto odlišnosti jsou dány odlišným stupněm glykosylace a fosforylace.

IL-6 má pleiotropní působení, zejména díky receptoru složenému ze dvou receptorových řetězců. Působí převážně na sekreci imunoglobulinů B lymfocyty. Působí však také na růst a vývoj B linií, podporuje růst kolonií hemopoetických kmenových buněk a vyvolává v jaterních buňkách tvorbu proteinů akutní fáze. Je diferenciacním a aktivačním faktorem T buněk a makrofágů, ovlivňuje také vývoj nervových buněk. Hraje významnou roli v neuroendokrinních regulacích. Pro tuto významnou regulační funkci se jeho nedostatek nebo nadměrná produkce uplatňuje u řady onemocnění. Podání IL-6 obdobně jako IL-1 vede k patogenezi horečky (Myers, 1994).

#### Interleukin- 10

IL-10 byl objeven koncem 80. let při studiu biologické aktivity myších  $T_H2$  buněčných linií a jejich vlivu na efektorové funkce  $T_H1$  buněk (Fiorentino, 1989).

IL-10 homodimer interaguje na povrchu buněk se dvěma heterodimerními receptorovými komplexy skládajícími se z IL-10R alfa a IL-10R beta podjednotek. Receptory vlastní kinázovou aktivitu a přes fosforylaci kinázy JAK1 a TYK2 přenáší signál dále do nitra buňky.

IL-10 je exprimovaný naivními a paměťovými T lymfocyty,  $T_H1$ ,  $T_H2$  či  $T_r$  subpopulace, dále NK buňkami, B lymfocyty, monocyty, keratinocyty, mikrogliovými buňkami a dalšími.

IL-10 je ve svých účincích pleiotropní. Jedna z jeho nejdůležitějších rolí je stimulace tvorby  $T_H2$  subpopulace T lymfocytů a inhibice tvorby cytokinů produkovaných subpopulací  $T_H1$ . IL-10 má tak supresivní efekt na tvorbu zánětlivého typu cytokinů. Jako významný produkt  $T_H2$  buněk pomáhá B lymfocytům v humorální imunitě a také při tvorbě autoprotilátek. *In vivo* se IL-10 účastní patogeneze zánětu a systémových

autoimunitních onemocnění, na endotelových buňkách zvyšuje expresi MHCII a adhezivních molekul (Saito, 1999). Jeho role však není omezená pouze na imunitní systém, ale skrze svoji schopnost modulace tvorby růstových faktorů a cytokinů může hrát roli během angiogeneze, tumorigeneze a infekce.

Uvažuje se o použití IL-10 na ovlivnění autoimunitních onemocnění a chronických zánětů, kde se uplatňuje subpopulace  $T_{H1}$ .

### IL- 12

Lidský IL-12 byl identifikován díky své schopnosti synergického efektu s IL-2. (Gately, 1986)

Zdrojem IL-12 jsou cirkulující monocyty, tkáňové makrofágy a dendritické buňky. Dendritické buňky po předchozí stimulaci CD-40L či IL-12 patří vůbec mezi nejsilnější producenty. Obecně je však produktem různých typů buněk prezentujících antigen (APC), které takto reagují na různé exogenní antigeny. IL-12 se účinně uplatňuje v obraně organismu proti intracelulárním mikrobiálním patogenům.

Po stimulaci toxiny se exprimují na buněčném povrchu receptory IL-12R $\beta$ 1 a IL-12R $\beta$ 2, jejich exprese koreluje s expresí IFN-gama, a předpokládá se proto, že mají centrální úlohu v imunitní odpovědi  $T_{H1}$  typu. Receptorový signál po vazbě IL-12 je přenášen kinázami Janusové rodiny (JAK2 a TYK2) a dále po fosforylaci transkripčními faktory STAT3 a STAT4, které po translokaci do jádra regulují transkripci genů.

IL-12 se významně uplatňuje u buněčně zprostředkované imunitní reakce umožňující maturaci  $T_{H1}$  typu CD4<sup>+</sup> leukocytů. Indukuje tak vývoj imunitní odpovědi  $T_{H1}$  typu a působí pozitivně na prezentaci antigenů makrofágy. Zvyšuje lytickou aktivitu lymfocytů, tvoření NK-LAK buněk, zvyšuje také specifickou CTLA (T8<sup>+</sup>) odpověď a produkci IFN-gama. Při indukci IL-12 aktivovaných NK-LAK působí synergicky s IL-2.

Působení IL-12 potlačuje vývoj a odpověď  $T_{H2}$  buněk a jimi produkovaných cytokinů a posléze také humorální imunitu manifestovanou zejména skrze IgG1 a IgE odpověď.

Bylo zjištěno, že podání rekombinantního IL-12 má terapeutický účinek u některých infekčních onemocnění a tumorů (Tahara, 1995). Výrazně se uplatňuje v obraně organismu proti intracelulárním patogenům. Působením na  $T_H1$  se IL-12 účastní vývoje některých imunopatologických procesů, jako jsou například autoimunitní endokrinopatie.

Funkce IL-12 je názorným příkladem vzájemného antagonismu  $T_H1$  a  $T_H2$  subpopulací při regulaci imunitní odpovědi.

### IFN-gama

IFN-gama byl v 60. letech objeven dvěma nezávislými skupinami (Wheelock, 1965; Gresser, 1964).

IFN-gama je produkovaný NK buňkami a aktivovanými T lymfocyty ( $CD4+$  a  $CD8+$ ). Z  $CD4+$  jej tvoří zejména subpopulace  $T_H1$ . Uplatňuje se v rámci mechanismu rozhodujícím o diferenciaci do  $T_H1$  či  $T_H2$  subpopulace  $CD4+$  lymfocytů.

IFN-gama receptorový komplex lidských mononukleárních lymfocytů se skládá nejméně ze tří odlišných proteinů. Interakce dvou z těchto proteinů je dostačující k indukci signálu pro expresi MHC II molekuly na povrchu buňky, ne však k expresi antivirového stavu. K té je potřeba interakce všech tří proteinů.

IFN-gama není bazálně sekretován ve vysokých koncentracích, sekrece však stoupá při patologických okolnostech, jako jsou různá traumata, infekce, nádorová onemocnění a autoimunitní poruchy. IFN-gama se uplatňuje jednak v iniciálních fázích zánětlivých reakcí indukci nespecifické imunitní odpovědi a stimulace antigen-prezentujících buněk, dále pak i ve fázích pokročilého zánětu cestou stimulace diferenciace a proliferace antigen reagujících klonů lymfocytů a nakonec i v závěrečných stádiích, kdy může v závislosti na dalších faktorech zánětlivou reakci inhibovat.

Defekty v produkci IFN-gama jsou asociované se zhoršenou schopností reakce proti infekčním onemocněním způsobeným určitými typy bakterií a virů, a to zejména těmi, které jsou za normálních okolností likvidovány aktivovanými makrofágy.

|

V oblasti plicního parenchymu byl experimentálně pozorován vliv IFN-gama na zvýšení exprese HLA II. třídy, ICAM-1 a na zvýšení sekrece IL-6, IL-8 a fibronektinu bronchiálními epitelii. Tento efekt byl inhibovatelný IFN- alfa s výjimkou exprese ICAM-1, která zůstala neovlivněna. (Stříž, 2000)

### TGF-beta

TGF-beta byl objeven v 80. letech v souvislosti se studiem růstu krysích fibroblastů za přítomnosti epidermálního růstového faktoru (EGF) (Roberts, 1984). Má 3 podtypy- TGF-beta 1,2 a 3, které vykazují obdobnou funkci, ale jsou kódované různými geny. Ve většině buněk a tkání je dominantně vytvářeným podtypem TGF-beta1. Nejhojnějším zdrojem TGF-beta1 jsou krevní destičky, kostní tkáň a slezina. TGF-beta 2 se vyskytuje ve velké míře mateřském mléce, amniové tekutině nebo v očním sklivci.

TGF-beta se váže na tři typy receptorových komplexů nazvaných T-betaR I , T-betaR II a T-betaR III. Signály ze všech tří forem TGF-beta jsou přenášeny skrze T-betaR cestou ALK-5 (activin receptor-like kinase).

TGF-beta se řadí do skupiny tzv. protizánětlivých cytokinů a uplatňuje se v patofyziologických stavech spojených s patologickou fibroprodukcí, dále při karcinogenezi, hojení ran, parazitárních onemocněních a řadě autoimunitních chorob. Cílové buňky bývají zejména buňky epitelální, endoteliální a hematopoetické. TGF-beta také reguluje diferenciaci buněk imunitního systému. Mezi jeho nejdůležitější funkce patří inhibice mitotické aktivity a izotypový přesmyk IgA.

### TNF-alfa

V roce 1962 byl popsán faktor vyskytující se v séru myši, který se zde objevil po vystavení myši bakteriálnímu endotoxinu a byl schopný indukovat nekrózu v tumorech. Byl tak nazván tumor necrosis serum (TNS) a později přejmenován na tumor necrosis factor - TNF-alfa.

TNF-alfa, také nazývaný kachektin, se vyskytuje v solubilní formě jako homotrimer. Je kódovaný jedním genem, který se nachází na šestém chromozómu v těsné blízkosti lokusu HLA-B.

Monocyty a makrofágy jsou největšími producenty TNF-alfa. Mimo to však TNF- alfa může být produkován i řadou jiných buněčných typů, jako T lymfocyty, makrofágy, dendritickými buňkami, endoteliálními buňkami, astrocyty, mastocyty, bazofily a dalšími.

TNF-alfa se váže na dva receptory, homologní ve svých extracelulárních doménách, ale odlišné v intracelulárních (Armitage, 1994). Vazba TNF-alfa může být kompetována vazbou lymfotoxinu (TNF-beta), což poukazuje na vzájemnou strukturální shodu. (Aggarwal, 1985)

TNF-alfa má v organismu velmi široké uplatnění. Hraje důležitou roli při ochraně proti bakteriálním, virovým, plísňovým a parazitárním infekcím. TNF-alfa moduluje buněčný růst, zabraňuje virové replikaci v buňce. V rámci patologických stavů se uplatňuje při vzniku septického šoku, autoimunitních chorob, revmatoidní artritidy, sarkoidózy a diabetu. TNF-alfa se také uplatňuje v kancerogenezi a metastázování nádorů. (Moore, 1999)

### Cytokinové genové polymorfizmy

K dnešnímu datu bylo identifikováno přes 200 různých cytokinů s nejrozmanitějšími funkcemi. U velké části z nich byla nalezena řada izoform, lišících se často pouhou jednou záměnou v genetickém kódu, z čehož můžeme usuzovat na vysoký stupeň polymorfizmů.

Existují tři hlavní typy cytokinových genových polymorfismů:

- SNP (single nucleotide polymorphisms) – bodové mutace
- Tandemové repeaty

- Mutace v mikrosatelitních oblastech

Většina polymorfizmů spadá do první kategorie (SNP) a je umístěna nejčastěji v promotorových oblastech, v intronových oblastech a ve 3' nepřekládaných oblastech cytokinových genů. Tyto jednonukleotidové záměny mohou být zodpovědné za změnu ve splicingu mRNA, stabilitě mRNA či intenzitě genové transkripce. Toto se může dít například napodobením struktury vazebných míst pro jednotlivé transkripční faktory v genových promotorech a finálně tak může docházet k ovlivnění míry produkce syntetizovaného produktu. Definovat změny vyplývající z polymorfizmů však bývá často obtížné a ne vždy jednoznačné ( Tabulka 6, 7, 8).

Díky změně v genetické informaci se může zvrátit poměr pro- a protizánětlivých cytokinů a přerušení této vzájemné rovnováhy může mít za následek řadu klinicky definovaných stavů nebo onemocnění.

Nejnovější studie prokazují, že cytokiny ovlivňují spíše patogenezí choroby než predispozici k ní. Většina onemocnění má totiž příčiny multifaktoriální (zahrnující vlivy genetické spolu s vlivy okolního prostředí) a vlivy genetické mohou být asociovány s řadou dalších vlivů.

Studia posledních let se nyní zaměřují na možné souvislosti rovnováhy  $T_H1$  a  $T_H2$  reakcí s polymorfismy cytokinů a cytokinových receptorů a na to, jakým způsobem jejich jednotlivé kombinace tuto rovnováhu mohou ovlivňovat.

Například vliv kombinace genotypu IL-1 alfa -889 a haplotypu IL-10 ATA na sekreci IL-10 byl popsán Kilipnenem (2002) u zdravé populace. Práce se opírala o předchozí poznatky, kdy bylo popsáno ovlivnění LPS indukované sekrece IL-10 endogenním IL-1 a zpětné negativní ovlivnění hladin IL-1 prostřednictvím IL-10. Zvýšená sekrece IL-10 byla spojena s haplotypem ATA a IL-1 alelou 2.

Řada vědeckých týmů, zabývajících se problematikou funkce genových polymorfismů cytokinů, však často publikuje protichůdné výsledky, což svědčí pro komplexnost celého problému (Wilson, 1995; Turner, 1995)

**Tabulka 6. Intenzita produkce TGF-beta v závislosti na polymorfizmech v kodónu 10 a kodónu 25.**

*Převzato od Cytokine genotyping kit worksheet, Pel-freez Clinical systems, LLC ©.*

TGF BETA1		PRODUKCE		
kodón 10	kodón 25	vysoká	intermediální	nízká
C	G		x	
C	C			x
T	G	x		
T	C		*	

*\*pravděpodobná intenzita produkce*



**Tabulka 7. Intenzita produkce IL-10 v závislosti na polymorfizmech v promotorové oblasti (-1082), (-819), (-592).**

*Převzato od Cytokine genotyping kit worksheet, Pel-freez Clinical systems, LLC ©.*

IL-10			PRODUKCE		
(-1082)	(-819)	(-592)	vysoká	intermediální	nízká
G	C	C	x		
A	C	A		x	
A	T	A			x
G	C	A	*		
G	T	A	*		
G	T	C	*		
A	C	A	*	*	*
A	T	C	*	*	*

*\*pravděpodobná intenzita produkce*

**Tabulka 8. Intenzita produkce TNF-alfa v závislosti na polymorfizmech v promotorové oblasti (-308), (-238).**

*Převzato od cytokine genotyping kit worksheet, Pel-freez Clinical systems, LLC ©.*

TNF ALPHA		PRODUKCE		
(-308)	(-238)	vysoká	intermediální	nízká
G	G			x
A	G	x		
G	A			x
A	A	x		

### Polymorfismus v rámci etnických skupin

Studie frekvencí SNP ukazují heterogenitu jak napříč mezi etnickými skupinami, tak mezi jednotlivými geografickými oblastmi.

V rámci geografických regionů vykazují starší populace v zásadě větší diference než populace ustanovené v nedávné době, což je vysvětlitelné zvětšující se migrací obyvatel.

Africké populace jsou historicky starší než Asijské či Evropské a ty jsou zase starší než populace na americkém kontinentě. Studie Y chromosomu, mitochondriální DNA (Jorde, 2000) nebo HLA studie (Sanchez-Masaz, 2001) ukazují haplotypy, které vznikly v Africe nebo Asii a odtud se rozšířily do celého světa díky populačním migracím.

Stejně tak i studia cytokinových polymorfizmů ukazují řady variant, jako je v případě TNF-alfa (-308), které vznikly v Africe a odtud migrovaly do Ameriky. SNP IL-6 (-174) ukazuje vysoký stupeň variability napříč celým světem. (Tabulka 9).

Tato pozorování pozitivně koreluje s rozdíly pozorovanými v distribuci HLA alel a s dosavadními výsledky, které poukazují na etnicky specifické polymorfizmy v TNF-alfa promotoru (Goldfeld, 2002). Tato zjištění by se měla brát v úvahu při studiu polymorfizmů.

**Tabulka 9. Odlišnosti jednotlivých populací v různých geografických oblastech v polymorfních úsecích cytokinů.**

*Jednotlivé p-hodnoty ukazují, nakolik se populace v odlišných geografických oblastech světa liší v rámci svých polymorfních úseků cytokinů. Převzato od Leslie et al, 2004; upraveno.*

CYTOKINY	POPULACE					
	Všechny	Afrika	Asie	Evropa	Amerika	Mediterra
IL-1 $\alpha$ (-889)	<0.0001	0.774	<0.0001	<0.0001	0.742	<0.0001
IL-1 $\beta$ (-511)	<0.0001	0.082	<0.0001	<0.0001	0.130	<0.0001
IL-1 $\beta$ (+3962)	<0.0001	0.697	<0.0001	0.001	0.105	0.028
IL-1R pstl1970	0.020	ND	0.010	0.780	0.026	0.737
IL-1RA mspa111100	<0.0001	ND	<0.0001	0.001	0.792	0.025
IL-4RA (+1902)	<0.0001	0.576	0.003	<0.0001	0.422	<0.0001
IL-12 (-1188)	<0.0001	ND	<0.0001	<0.0001	0.731	0.303
IFN $\gamma$ (+874)	<0.0001	ND	<0.0001	0.222	0.002	0.196
TGF- $\beta$ 1 cdn10	<0.0001	ND	0.255	<0.0001	0.005	0.066
TGF- $\beta$ 1 cdn25	0.001	ND	0.061	0.186	0.967	<0.0001
TNF- $\alpha$ (-308)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.012	<0.0001
TNF- $\alpha$ (-238)	0.001	0.256	0.045	0.003	0.149	0.007
IL-2 (-330)	<0.0001	ND	0.003	<0.0001	0.361	<0.0001
IL-2 (+160)	<0.0001	ND	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.003
IL-4 (-1098)	<0.0001	ND	0.001	<0.0001	0.321	0.005
IL-4 (-590)	<0.0001	0.284	<0.0001	0.080	0.006	0.023
IL-4 (-33)	<0.0001	ND	<0.0001	0.112	<0.0001	0.006
IL-6 (-174)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.005
IL-6 nt565	<0.0001	ND	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.010
IL-10 (-1082)	<0.0001	ND	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.905
IL-10 (-819)	<0.0001	ND	<0.0001	<0.0001	0.889	0.137
IL-10 (-590)	<0.0001	0.010	<0.0001	<0.0001	0.003	0.163

## Cytokinové polymorfismy a jejich vztah k některým patologickým stavům

Existuje řada onemocnění, u kterých je vliv cytokinů na etiologii a patogenezi více či méně prokázán.

U některých z nich ( IL-12, IL-2) byly polymorfni oblasti nalezeny poměrně nedávno (John, 1998). Naproti tomu TNF-alfa a IL-10 patří mezi cytokiny, u kterých je vliv SNP a dalších mikrosatelitních polymorfismů na vývoj některých onemocnění a jejich prognózu dobře prostudován.

U IL-10 je dobře známá asociace s lupus erytematodes. Analýzy primárních rodinných příslušníků a studie dvojčat naznačily, že ovlivnění míry produkce IL-10 je ze 75 % pod vlivem genetických faktorů. Bylo také zjištěno, že polymorfizmy situované do distální části promotorové oblasti oproti polymorfizmům v proximální části u IL-10 výrazně ovlivňují produkci tohoto cytokinu a zároveň zvyšují riziko vzniku lupus erytematodes (Gibson, 2001).

Předpokládá se, že polymorfismus genu pro IL-10 na pozici -1082 může ovlivnit produkci tohoto cytokinu (alela G na této pozici), tento polymorfismus byl sledován v korelaci s chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN) a syndromem dechové tísně dospělých (ARDS). V případě CHOPN se u pacientů s touto nemocí častěji vyskytuje alela G (Seifart, 2005) V případě ARDS , pacienti s genotypem GG na pozici -1082 IL-10 měli méně závažné projevy multiorgánového selhání v době diagnózy a nižší mortalitu. (Gong, 2006)

Mezi další nalezené asociace patří polymorfizmy IL-10 na pozici (-10), (-1082) a jejich vztah k výskytu maligního melanomu. Výsledky studií naznačují, že genotypy asociované s vysokým stupněm exprese IL-10 in vitro mají protektivní funkci při výskytu kožního maligního melanomu, zatímco genotypy indikující nízkou expresi jsou asociovány s horší prognózou a mohou zapříčinit vyšší náchylnost k tomuto onemocnění.

Příčiny protinádorového efektu IL-10 se hledají zejména ve schopnosti IL-10 inhibovat angiogenezi (Howell, 2001).

Byla také prokázána souvislost mezi schizofrenií a polymorfizmem TNF-alfa (-308), kdy TNF-alfa 2 (substituce A za G) zodpovídá za signifikantně větší vnímavost k této chorobě (Boin, 2001).

Souvislost je také suspektní u polymorfismu genu pro IL-1alfa a Alzheimerovy choroby. Záměna C za T v promotorové oblasti IL-1alfa (-889), označovaná jako IL-1alfa (-889) alela 2, je v silné souvislosti, zejména u homozygotické kombinace, s patogenezí Alzheimerovy choroby (Du, 2000).

Další studie prováděné v souvislosti s pozicí (-889) u IL-1 poukázaly na celkově zvýšenou expresi IL-1 za přítomnosti alely T v promotorové oblasti (-889). Toto bylo zjištěno u pacientů se systémovou sklerózou, sarkoidózou a již zmíněnou Alzheimerovou chorobou. (Hutyrová, 2002, 2004)

Jedny z následujících studií poukázaly na možný vliv IL-3 (-16) na patofyziologii revmatoidní artritidy. (Yamada, 2001)

Mutace v TNF-II receptoru je asociovaná s periodickým výskytem horeček. (Aksentijevich, 2001) Varianta v gamma receptoru IL-2 souvisí s akutní kombinovanou imunodeficiencí. (Gilmour, 2001)

V poslední době se ukazuje možná souvislost cytokinových polymorfizmů s mírou odhojování transplantovaných orgánů či při GvHD (graft versus host disease) u transplantace kmenových buněk. Vliv cytokinových polymorfizmů, zejména TNF-alfa a IL-10, byl zkoumán u transplantací srdce, jater, ledvin a u simultánní transplantace ledvin a pankreatu. Z výsledků vyplývá, že pacienti s vysokou produkcí TNF-alfa a zároveň nízkou produkcí IL-10 vykazují vyšší stupeň rejekce štěpu u transplantací srdce (Turner, 1997). Demonstrována byla asociace mezi úrovní produkce TNF-alfa a výskytem akutní rejekce u recipientů jater (Baghate, 2000). Při studii genových polymorfizmů TNF-alfa,

|

IFN-gamma, IL-10 a TGF-beta u recipientů ledvin a kombinace ledvina-pankreas, pouze vysoká produkce TNF-alfa pozitivně korelovala s rekurentní akutní rejekční epizodou (Pelletier, 2000). Tyto výsledky byly potvrzeny v další publikaci popisující zvyšující se incidenci akutní rejekční epizody u TNF-alfa vysokých producentů (Poli, 2000). Na druhou stranu však v další studii nebyly nalezeny žádné signifikantní asociace mezi TNF-alfa genovým polymorfismem a incidencí rejekce (Abdallah, 1999).

## Cytokiny u idiopatické plicní fibrózy

Idiopatická plicní fibróza je charakterizovaná zvýšenou depozicí kolagenu v plicním parenchymu. Jako první z cytokinů, které byly označeny za induktory ukládání kolagenu v plicích byly označeny TGF- beta, TNF- alfa a endotelin-1. Zároveň s tím bylo uvažováno o možném terapeutickém efektu IFN- gama, který je u IPF zřejmě relativně méně produkován. (Coker, 1998) V práci Kelly (2003) byla vyzdvižena role následujících cytokinů s profibrotickým efektem: IL-1 beta, který je výrazně prozánětlivý, způsobuje tkáňové poškození a následně v procesu hojení fibrózu, TNF-alfa a GM-CSF, které indukují zánět a mírnou fibrózu.

U idiopatické plicní fibrózy je předpokládána převaha cytokinů  $T_H2$  typu vedoucí k nekontrolované fibroprodukcí a destrukci plicního parenchymu. Stoupá množství důkazů o tom, že IL-4 a IL-13 u IPF podporuje růst fibroblastů a produkci kolagenu, zatímco IFN-gama potlačuje aktivitu fibroblastů. (Lukacs, 2001) IL-4 a IL-13 prokazatelně zvyšují produkci TGF- beta 2 lidskými bronchiálními epitelii, ale nikoli fibroblasty a tato funkce IL-4 a IL-13 je suprimovatelná podáním IFN- gama. (Wen, 2002) V práci Kim (2005) byla vyzdvižena role NKT buněk jako producentů IFN- gama, který tlumí vývoj bleomycinem indukované fibrózy u myši cestou regulace TGF-beta 1 produkce. (Gurueyjalakshmi, 1995)

Jedním z hlavních cytokinů, který se přímo podílí na progredujícím fibrotizujícím procesu u IPF je TGF- beta. TGF –beta je zánětlivý cytokin s pleiomorfním působením u IPF. V endotelu reguluje produkci a aktivitu růstového faktoru fibroblastů (FGF)-2, který má výrazný mitogenní vliv na pneumocyty II. typu. Tento fakt může být příčinou vzniku prefibrotických lézí u IPF tím, že brání fyziologické reepitalizaci drobných alveolárních lézí. Tvorba FGF-2 je indukovatelná kromě TGF- beta i FGF-1, naopak heparin snižuje TGF-beta a FGF-1 stimulovanou expresi FGF-2. (Li, 2001)

V rámci výzkumu cytokinů v tkáni získané plicní biopsií pacientů s IPF byla zjištěna zvýšená exprese mRNA TGF- beta a IL-10 a lokalizovaná exprese destičkového růstového faktoru (PDGF) a růstového faktoru keratinocytů (KGF). Hlavním zdrojem cytokinů byly hyperplastické alveolární epiteliální buňky, v menší míře byly cytokiny akumulovány i ve fibroblastech, buňkách hladkého svalu a extracelulární matrix. (Bergeron, 2003)

Někdy je role cytokinu nejednoznačná, jako v případě transgenního kmene myši produkujícího ve zvýšené míře TNF- alfa, u kterých se vyvíjí fenotyp plicního postižení s obrazem emfyzému spolu s fibrotickými změnami v plicním parenchymu. (Lennart, 2004). Je však pravděpodobné, že TNF- alfa spolu s IL- 1 hraje roli spíše v inciálních fázích poškození plicního parenchymu než v pokročilém onemocnění, což je podpořeno imunohistochemickým vyšetřením plicní tkáně, kde byla prokázána značná pozitivita TNF- alfa a IL-1 beta v alveolárních makrofázích a proliferujících pneumocytech II v akutních exudativní a fibroproliferativní fázi onemocnění na rozdíl od okrsků pokročilé fibrózy, kde byla pozitivita minimální. (Pan, 1996)

Dalším z cytokinů v poslední době zkoumaných v souvislosti s difusními plicními procesy ve smyslu fibrózy a emfyzému je IL-13. IL-13 stimuluje zánětlivou odpověď T<sub>H</sub>2 typu a spouští remodelaci plicní tkáně. Je mocným stimulatorem produkce TGF- beta 1. (Lee, 2001)

IL-13 indukuje tvorbu řady chemokinů: MCP, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, MIP-2, MIP-3 alfa, "thymus- and activation-regulated chemokin", "thymus expressed chemokin", eotaxin, eotaxin 2, makrofágy produkované chemokiny a C10. Tyto chemokiny působí převážně přes receptor CCR2. V případě CCR2(-/-) myši nebyla snížena basální nebo IL-13 stimulovaná exprese cílových matrix metaloproteináz nebo cathepsinů, ale byla zvýšena mRNA kódující alfa-1- antitrypsin, tkáňový inhibitor metaloproteináz-1, -2, -4 a inhibitor leukocytárních sekrečních proteináz. Navíc byla snížena v BAL hladina



aktivního i celkového TGF-beta. Výše uvedená data poukazují na roli IL-13 jako potentního stimulatoru MCP a jiných CC chemokinů a dokumentuje důležitost signalizace MCP-CCR v patogenezi IL-13 indukované plicní patologie. (Zhu, 2002)

Ve studii Jakubzickové et al bylo na fibroblastech pacientů s IPF nalezeno zvýšené zastoupení receptorových podjednotek vážících IL-4 a IL-13, a to zejména IL-4Ralfa a IL-13Ralfa2 (vysoce afinitní IL-13 receptorová podjednotka). Bylo zjištěno, že tyto receptory váží se zvýšenou afinitou IL-4 a IL-13 v porovnání s kontrolním souborem. Mohlo by se tak jednat o možnou iniciaci vzniku IPF kvůli zvýšené vnímavosti fibroblastů k tzv fibrogenním  $T_H2$  cytokinům (Jakubzick, 2004).

Jedním z cytokinů, které patří též do  $T_H2$  spektra, je IL-10. Je to cytokin s významným protizánětlivým účinkem. Avšak zvýšená exprese tohoto cytokinu u myši s křemíkem indukovanou plicní fibrózou způsobuje exacerbaci fibrotických lézí měřenou množstvím hydroxyprolinu v BAL. Navíc IL-10 signifikantně u těchto zvířat zvyšoval zastoupení lymfocytů a IgG1 v BAL, což svědčilo pro reakci  $T_H2$  typu, a zároveň zvyšoval i expresi IL-4 a IL-13. (Barbarin, 2005)

IL-12 naopak je cytokinem působícím antifibroticky cestou indukce IFN- gamma. V pokusu na myších byl prokázán vliv IL-12 na zvýšení hladiny IFN gamma v BAL a v důsledku toho protektivní vliv IL-12 proti vzniku bleomycinem indukované plicní fibrózy. (Keane, 2001)

Nerovnováha spektra cytokinů ve prospěch  $T_H2$  hraje prokazatelně roli ve vývoji IPF. Práce zaměřené na srovnání hladin cytokinů u pacientů s IPF se zdravou populací prokázaly rozdíly v zastoupení cytokinů mezi těmito skupinami, jmenovitě byly u pacientů s IPF zvýšeny v séru hladiny IL-2, IL-8, IL-10 a IL-12(p40). (Tsoutsou, 2006)

## **Role genových polymorfizmů v etiologii a patogenezi IPF**

Cytokiny a jejich polymorfizmy hrají při patogenezi IPF nepochybně svoji roli. Převažující cytokinové spektrum u IPF tvoří  $T_H2$  cytokiny. Výzkum se v posledních letech soustřeďuje i na řadu jiných, jakou jsou interferony (alfa, beta, gamma), TGF-beta1, TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-8 aj. (Tabulka 10)

Polymorfismus TNF-alfa (-308) A/G byl jeden z prvních, o kterých se uvažovalo v souvislosti s výskytem IPF. Společně s IL-1 byla objevena jeho zvýšená exprese v lidských regenerujících pneumocytech, které jsou zodpovědné za zvýšení fibroblastické proliferace (Pan, 1996). Ve třech nezávislých publikacích byl signifikantně prokázán patogenní vliv TNF-alfa na vývoj IPF u homozygotů AA či u heterozygotů AG v promotorové oblasti (-308) (Whyte, 2000; Pantelidis, 2001; Riha, 2004), z čehož lze usuzovat na možný vliv při vzniku tohoto onemocnění. Whyte et al popsal ve své práci (2000) korelaci polymorfizmů TNF alfa na pozici -308 v promotorové oblasti a IL-1 RA na pozici +2018 s vývojem IPF v italské a anglické populaci. Souvislost alely TNF alfa(-308A) s rozvojem IPF byla potvrzena i v práci Riha et al (2004) v australské populaci.

V roce 1998 Awad et al popsali 5 polymorfizmů v TGF- beta 1 genu, na pozicích -800, -509, +72, +869 a +915, z nichž polymorfismus na pozici +915 v signální sekvenci, která mění kodon 25 (arginin-prolin) je spojena s interindividuálními variacemi na úrovni TGF- beta 1 produkce. Stimulované lymfocyty homozygotů (arginin/arginin) z kontrolní skupiny produkovaly výrazně více TGF beta in vitro ve srovnání s heterozygoty (arginin/prolin). U pacientů s IPF indikovaných k transplantaci plic byl výrazně zvýšený výskyt alely kodonu 25 TGF-beta 1 spojený s vysokou produkcí tohoto cytokinu (arginin) oproti jedincům indikovaným k transplantaci plíce z jiných důvodů (nefibrotické

plicní onemocnění). Navíc tito jedinci s nadprodukcí TGF beta 1 měli i vyšší riziko rozvoje plicní fibrózy v transplantátu plíce.

Souvislost polymorfizmu TGF-beta 1 v kodonech 10 a 25 s rozvojem IPF nepotvrdil ve svém sledování Xaubet et al (2003); pozoroval pouze vyšší vzestup alveoloarteriální difference u pacientů s IPF s prolinovou alelou v kodonu 10 v průběhu sledování.

Pantelidis et al (2001) soudí dle výsledků své studie na zvýšenou frekvenci výskytu alel IL-6 intron 4G a TNFR2 1690 C u skupiny pacientů s IPF oproti zdravým kontrolám. Navíc genotyp GG v oblasti intronu IL-6 byl v jeho práci spjat s výraznějším poklesem DL<sub>CO</sub> u těchto pacientů.

Whittington popsal ve své práci (2003) identifikaci nového polymorfizmu G/A na pozici +43 IL-10, která mění glycin na arginin na pozici 15 sekvence signálního peptidu, čímž se 48 hodin po transfekci COS-7 buněk in vitro snižuje v kultuře produkce IL-10 těmito buňkami. Autoři na základě těchto pozorování vyjádřili podezření na možnou roli snížené produkce IL-10 (dané sníženou efektivitou odštěpování signálního peptidu) alveolárními makrofágy v rozvoji IPF. Toto zjištění může přispět k vysvětlení převažujícího T<sub>H</sub>2 cytokinového spektra u IPF pacientů, způsobeného sníženou sekrecí cytokinu IL-10 nebo snížením schopnosti IL-10 suprimovat nadprodukcí IL-4 a IL-5 v plicní tkáni. (Majumdar, 1999) Zvýšené hodnoty IL-10 nalezené v plicních epitelilních buňkách a alveolárních makrofázích u IPF pacientů již byly zmíněny. (Bergeron, 2003).

**Tabulka 10. Genové polymorfizmy vyšetřované v souvislosti s IPF**

(převzato z Bidwell J et al. Cytokine gene polymorphisms in human disease: on-line databases. *Genes and Immunity* 1999, 2001, 2002. Upraveno)

SKUPINA GENŮ DLE FUNKCE	OZNAČENÍ GENU	POLYMORFISMUS	ASOCIACE S IPF
Pro/proti zánětlivé			
Skupina IL-1	IL-1A	-889C>T	Ne
	IL-1B	-511C>T	Ne
		+3953C>T	Ne
	IL-1RN	+2018C>T	+2018T[OR3,8]
		Intron 2 VNTR	Ne
Skupina TNF	TNF	-238G>A	Ne
		-308G>A	-308A[OR13,9]
		+488G>A	Ne
	TNFR1I	+676T>G	Ne
		+1663G>A	Ne
		+1668T>G	Ne
		+1690T>C	Ne
	LTA	+249A>G	Ne
		+365C>G	Ne
		+720C>A	Ne
		IL-6	-174G>C
	Intron4A>G	Ne	
	IL-10	+43G>A[G15R]	Ne
Skupina chemokinů	IL-8	-353A>T	Ne
		+293G>T	Ne
		+678T>C	Ne

	CXCR1	+2607G>C	Ne
	CXCR2	+785C>T	Ne
		+1208T>C	Ne
		+1440G>A	Ne
Th1/Th2 regulační geny	IL12B	3`UTR 1188A>C	Ne
	IFN G	3`UTR 5644A>G	Ne
Geny receptorů pro komplement	CR1	+3650A>G	Ne
		Intron 27 520T>C	Ne
		+5507C>G[P1827R]	+5507G[OR6,2]
Plicní surfaktant			
Geny pro surfaktantový protein	SFTPA-1	6A,6A <sup>2</sup> ,6A <sup>3</sup> ,6A <sup>4</sup>	6A <sup>4</sup> u nekuřáků[OR3,7]
	SFTPA-2	1A,1A <sup>0</sup> ,1A <sup>1</sup> ,1A <sup>2</sup> ,1A <sup>5</sup>	Ne
	SFTPB	1580T>C[I1131T]	1580C u kuřáků[OR7,6]
	SFTPC	438C>A[N138T]	Ne
		582G>A[N186S]	Ne
	SFTPD	ATG>ACG[M11T]	Ne
		ACA>GCA[T160A]	Ne
Koagulační kaskáda			
Geny PAI[inhibitor aktivátoru plasminogenu]	PAI1	Promotorová oblast 4G/5G	Ne
Cesta fibroblastů			
TGF-beta geny	TGFB1	+869T>C[L10P]	Ne
		+915G>C[R25P]	Ne
RAAS geny	ACE	I/D[inserce/delece]	D

## **Genové polymorfizmy cytokinů u pacientů s IPF- vlastní pozorování**

### Cíl práce

Cílem naší práce bylo určit vztah genových polymorfizmů širokého spektra cytokinů ke vzniku a vývoji IPF. U genových polymorfizmů, které pravděpodobně korelovaly s onemocněním IPF jsme ještě vyšetřovali vztah jednotlivých alel ke klinické manifestaci onemocnění reprezentované demografickými, funkčními a radiologickými parametry a v neposlední řadě i cytologickými a imunologickými parametry v BAL. Vycházeli jsme z hypotézy o nerovnováze spektra Th1 a Th2 cytokinů u IPF, která byla již zmíněna několika autory, ale doposud pro ni nebyl nalezen jednoznačný genetický podklad.

V části práce věnované korelaci genetických parametrů s parametry klinickými jsme se jako jedni z prvních opřeli v charakteristice fenotypu IPF o HRCT alveolární a intersticiální skóre, které jako jediné vystihuje závažnost onemocnění a je dobře měřitelné a porovnatelné v čase u jednoho pacienta i mezi jednotlivými pacienty navzájem.

### Soubor pacientů

Všichni pacienti byli běloši z České republiky. Celkový počet pacientů byl 30, 20 bylo žen a 10 mužů. Průměrný věk pacientů byl 65,4 roku (36- 85 let). (Tabulka 11)

IPF byla u pacientů diagnostikována na základě kritérií Americké hrudní (ATS) a Evropské respirační společnosti (ERS).(Tabulka 4) Všichni pacienti podepsali před genetickým vyšetřením informovaný souhlas schválený Etickou komisí Fakultní Thomayerovy nemocnice s poliklinikou a Institutu klinické a experimentální medicíny.

Kontrolní skupinu tvořilo 103 nepříbuzných jedinců kavkazské rasy z Čech (24 mužů a 79 žen) s negativní anamnézou stran plicních fibrotizujících onemocnění. Tito jedinci byli zdraví potenciální dárci kostní dřeně. Průměrný věk v kontrolním souboru byl 53 let (24-71 let). (Leslie GL, v tisku)

Design studie byl schválen Etickou komisí Fakultní Thomayerovy nemocnice s poliklinikou a Institutu klinické a experimentální medicíny.

*Tabulka 11. Demografická a klinická data (plicní funkce a BAL) u pacientů s IPF v době diagnózy*

	STŘ. HODNOTA	SD	MIN. HODNOTA	MAX. HODNOTA
Věk (roky)	65.4	12.8	36	87
Vitální kapacita (l)	67.4	19.4	21	108
Difuzní kapacita (%)	38.4	15.3	15	69
BAL lymfocyty (%)	16.1	17.9	2	53
BAL polymorfonukleáry (%)	14.2	14.5	2	51
BAL eosinofily (%)	1.2	2.7	0	8
BAL makrofágy (%)	68.3	22.5	24	95
BAL CD4+ T lymfocyty (%)	47.8	18.5	20	80
BAL CD8+ T lymfocyty (%)	35.7	17.8	8	63
CD4+/CD8+ poměr	2.2	2.5	0.32	10
BAL HLADR+ lymfocyty (%)	49.5	27.4	3	90

*SD=standardní odchylka*

#### Materiál a metody

U pacientů byla shromážděna demografická data- rasa, věk, pohlaví. V době diagnózy bylo provedeno funkční vyšetření plic- spirometrie s určením vitální kapacity plic (VC), difuzní kapacity plic (DL<sub>CO</sub>) a krevní plyny s určením parciálního tlaku kyslíku v arteriální

krvi. Spirometrie a bodypletysmografie byla provedena na přístroji Elite (MedGraphics, St. Paul, Minnesota, U.S.A) a  $DL_{CO}$  na přístroji ZAN 300 (ZAN Messgerate, GmbH, Oberthulba, SRN). Dále pacienti podstoupili BAL z oblasti středního laloku pravé plice čtyřmi porcemi vlažného fyziologického roztoku po 50 ml. První 3 frakce byly vyšetřeny cytologicky se stanovením diferenciálního počtu buněk v BAL a čtvrtá frakce byla vyšetřena imunologicky s imunocytochemickým barvením povrchových molekul CD3, CD4, CD8, CD19, HLADR. (Tabulka 11) V době diagnózy bylo provedeno vyšetření plic počítačovou tomografií s vysokou rozlišovací schopností (HRCT) hrudníku a toto vyšetření bylo pro stanovení dynamiky onemocnění opakováno každých 12 měsíců.

HRCT hrudníku bylo provedeno na přístroji SOMATOM Sensation 40 (Siemens, AG, Berlín a Mnichov, SRN). Výsledky vyšetření byly hodnoceny zkušeným radiologem na 4 úrovních: na úrovni aortálního oblouku, na úrovni hilů, pravé síně a v oblasti plicních bazí. Použili jsme hodnocení rozsahu alveolárních a intersticiálních změn podle systému Gay et al. (Tabulka 12) Hodnoty byly vyjádřeny v procentech a popisovaly rozsah změn. Co se týče změn v čase, nemoc jsme hodnotili jako stabilní pro hodnoty 0 a 1 (beze změn nebo regrese změn) a progresivní pro hodnotu 2 (progrese změn) (Tabulka 12)



**Tabulka 12. HRCT skóre u pacientů s IPF**

	IS I	IS II	IS III	IS IV	AS I	AS II	AS III	AS IV	DYNAM. IS	DYNAM.AS
13.	2	4			2	2			2	0
2.	3	3	4	4	4	3	1	2	2	1
23.	4		4		2		1		0	1
5.	3				4					
57.	3				3					
44.	4	3			3	1			2	2
60.	4	4			3	1			0	1
8.	4	4			1	2			0	2
18.	3			5	5	4		4	2	1
35.	3				2					
54.	3				3					
21.	4				3					
62.	5				3					
6.	5	5			3	3			0	0
32.	3				1					
2.	4	4	4	4	0	3	2	1	0	1
49.	4				0					
3.	3		4		2		3		2	2
31.	4	4			4	2			0	1
33.	4				1					
38.	4				2					
47.	3	3			1	1			0	0
11.	4	4	4,5	4	3	2	3	2	2	1
43.	3	4	4		1	1	1		2	0
37.	5				5					
55.	5				0					
20.	4	4	5		4	4	4		2	0

*IS= intersticiální skóre*

*AS= alveolární skóre*

*Dynamika: 0- beze změn, 1- regrese, 2- progrese*

*I- v době diagnózy*

*II- 1-11 měsíců od diagnózy*

*III- 12- 23 měsíců od diagnózy*

*IV- 24- 36 měsíců od diagnózy*

U pacientů byla v době diagnózy odebrána krev na genetické vyšetření po podepsání informovaného souhlasu s následným stanovením polymorfizmů cytokinů v promotorové oblasti IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-1R, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-alfa, IFN- gama a v překládaných oblastech TGF- beta, IL-1 beta, IL-2, IL-4 a IL-4RA. (Tabulka13)

#### DNA extrakce

Pro vyšetření bylo odebráno 10 ml periferní krve do EDTA zkumavek. K obsahu zkumavky byl přidán pufr pro lýzu červených krvinek (RCLB) a po 20 minutách byla zkumavka centrifugována 10 minut při 1300 g a byl následně odstraněn supernatant. Posléze byl přidán pufr pro lýzu bílých krvinek (WCLB) spolu s proteinázou a SDS. Směs pak byla inkubována na rotátoru 18 hodin při 37o C. Po inkubaci byl přidán ke směsi 6M NaCl a chloroform a 15 s promícháván před centrifugací (25 minut při 1300 g). Supernatant byl pak přidán do čisté zkumavky s 4 ml absolutního etanolu. Precipitovaná DNA pak vyjmuta a resuspendována ve sterilní vodě skladována při 4°C.

#### Genotypizace cytokinů

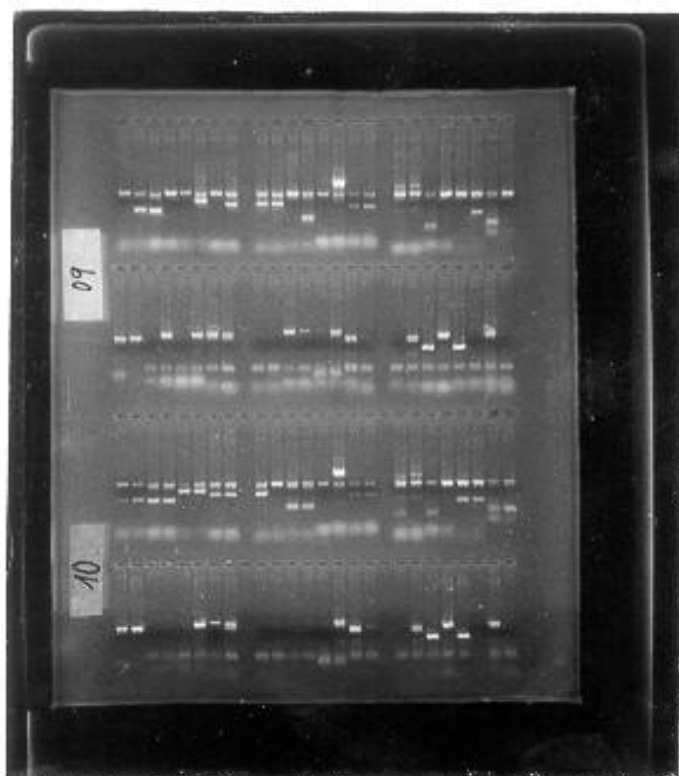
Byly hodnoceny polymorfizmy 13 různých cytokinových genů s pomocí CYTOKINE GENOTYPING KIT (Dynal Biotech, Norway). Test je dezignován jako PCR se sekvenčně specifickými primery (SSP).

Pracovní postup byl realizován podle návodu výrobce. PCR master mix vznikla smísením 140 µl PCR pufru, 75 µl genomické DNA (75-120 ng/µl), 4 µl Taq polamerázy (5U/µl) a 261 µl PCR H<sub>2</sub>O. Deset µl této směsi bylo posléze rozpipetováno do každé jamky. Každá ze 48 jamek obsahovala specifické páry primerů pro amplifikaci dané sekvence. Poté byla spuštěna termální cyklická PCR reakce na přístroji PTC 225 DNA ENGINE TETRAD (MJ Research, USA) s následujícími parametry: iniciální denaturace

94°C po dobu 120s, pak 10 cyklů při 94°C 15 s a 65°C 60s a poté 20 cyklů při 94°C 15 s, 61°C 50s a 72°C 30s.

Po ukončení cyklů byly PCR produkty přeneseny na 2% agarózový gel barvený ethidium bromidem a byla spuštěna elektroforéza 5V/cm.

Pozitivní a negativní výsledky byly dokumentovány a interpretovány v souladu s pracovním návodem. (Obr.7)



*Obr.7 Výsledek elektroforézy v agarovém gelu barveném ethidium bromidem*

*Tabulka13. Seznam vyšetřovaných genových polymorfizmů*

POLYMORFIZMUS	GENOTYP
IL-1alfa –889	C/C C/T T/T
IL-1beta –511	C/C C/T T/T
IL-1beta +3962	C/C C/T T/T
IL-1R pst 1970	C/C C/T T/T
IL-1 RA mspa 11100	C/C C/T T/T
IL-4 RA +1902	A/A A/G G/G
IL-12 –1188	A/A A/C C/C
INF-gama UTR 5644	A/A A/T T/T
TGF beta1 codon 10	C/C C/T T/T
TGF beta1 codon 25	C/C C/G G/G
TNF alfa –308	A/A A/G G/G
TNF alfa –238	A/A A/G G/G
IL-2 –330	G/G G/T T/T
IL-2 +166	G/G G/T T/T
IL-4 –1098	G/G G/T T/T
IL-4 –590	C/C C/T T/T
IL-4 –33	C/C C/T T/T
IL-6 –174	C/C C/G G/G
IL-6 +565	A/A A/G G/G
IL-10 –1082	A/A A/G G/G
IL-10 –819	C/C C/T T/T
IL-10 –592	A/A A/C C/C

## Statistické zpracování

Frekvence výskytu genotypů a nosičství alel u pacientů byly určovány přímým sčítáním a byly porovnávány s výsledky kontrolní populace chi-kvadrát testem v kontingenčních tabulkách. Hodnoty P byly korigovány na počet vyšetřovaných lokusů s pomocí Bonferroniho metody. Korigovaná hodnota P menší než 0,05 byla považována za signifikantní.

Pro kvantitativní proměnné (věk, funkční parametry, buněčný rozpočet v BAL) byly vypočteny průměry a směrodatné odchylky. Pro diskrétní proměnné (pohlaví, genotyp) bylo zastoupení jednotlivých hodnot vyjádřeno v procentech.

Analýza rozptylu (ANOVA) byla použita pro testování vztahu cytokinových polymorfizmů a kvantitativních proměnných (věk, difuzní kapacita, rozpočet buněk v BAL). Bonferroniho metoda mnohonásobného porovnávání byla opět použita pro korekci hladiny významnosti. Pro testování závislosti genotypů a diskrétních proměnných (pohlaví a HRCT vzorce) byl použit Fisherův přesný test.

Vícerozměrné kontingenční tabulky byly použity k vyhodnocení asociací mezi polymorfismy ve skupině pacientů.

Statistická analýza byla provedena s použitím statistického software MedCalc.

## Výsledky

Ze souhrnu vyšetřovaných genových polymorfizmů u řady cytokinů nebyly shledány statisticky významné rozdíly ve výskytu mezi normální populací a pacienty s IPF. Genotypy IL-1beta na pozicích (-511) a (+3962), IL-1R pst 1970, IL-4RA (+1902), IL-1RA mspa 11100, IL-12 (-1188), IFN-gamma UTR 5644, TGF-beta 1 kodon 10 a

kodon 25, TNF alfa (-308) a (-238), IL-2 (-330) a (+166), IL-6 (-174) a (+565), IL-10 (-1082), (-592) a (-819) se významně v obou skupinách nelišily. (Vašáková, Tissue Antigens 2006)

V případě IL-1 alfa (-889), byl genotyp CT častěji zastoupen u pacientů s IPF oproti kontrolám ( $P=0,042$ ), avšak po Bonferroniho korekci rozdíl přestal být významný ( $P_{\text{corr}}=0,61$ ). Pokud jsme porovnávali oba genotypy s alelou T, t.j. CT i TT vůči CC homozygotitě, byl výskyt genotypů s alelou T významně vyšší ve skupině pacientů s IPF ( $P < 0,05$ ), ale po korekci rozdíl přestal být též významný ( $P_{\text{corr}} < 0,7$ ). Genotyp GT na pozici (-330) a TT na pozici (+166) v oblasti genu pro IL-2 byly častější u pacientů s IPF ( $P=0,015$ ), nicméně korigovaná hodnota P nedosáhla statistické signifikance ( $P_{\text{corr}}=0,28$ ). (Vašáková, Tissue Antigens 2006)

V případě promotorové oblasti genu pro IL-4 na pozici (-1098) bylo u pacientů s IPF častěji GT než u zdravých kontrol ( $P=0,012$ ) a 97% (29 z 30) pacientů s IPF mělo na této pozici genotyp GT nebo TT ve srovnání s kontrolami, nicméně po Bonferroniho korekci hodnota P nedosáhla statistické signifikance ( $P_{\text{corr}}=0,23$ ).

Na pozici (-590) IL-4 jsme zjistili častější výskyt CT genotypu u pacientů s IPF než u zdravých jedinců ( $P < 0,0001$ ) a rozdíl zůstal statisticky významný i po korekci ( $P_{\text{corr}} < 0,0022$ ). (Vašáková, Tissue Antigens 2006) (Tabulka 14)

**Tabulka 14. IL-4 -590. Frekvence jednotlivých genotypů u pacientů s IPF a zdravých kontrol**

IL-4 (-590)	IPF	ZDRAVÉ KONTROLY
CC	3 (10%)	77 (75%)
CT	26 (87%)	20 (20%)
TT	1 (3%)	5 (5%)

*( $p < 0,0001$ ,  $p_{\text{corr}} < 0,0022$ )*

V promotorové oblasti genu pro IL-4 na pozici (-33) u pacientů s IPF převažoval genotyp CT ve srovnání se zdravými kontrolami s převahou genotypu CC ( $p < 0,0001$ ) a hodnota P zůstala v mezích statistické významnosti i po Bonferroniho korekci ( $P_{\text{corr}} < 0,0022$ ). (Vašáková, Tissue Antigens 2006) ( Tabulka 15)

**Tabulka 15. IL-4 -33. Frekvence jednotlivých genotypů u pacientů s IPF a zdravých kontrol**

IL-4(-33)	IPF	ZDRAVÉ KONTROLY
CC	9 (30%)	77 (75%)
CT	20 (67%)	20 (20%)
TT	1 (3%)	5 (5%)

( $p < 0.0001$ ,  $p_{\text{corr}} < 0.0022$ )

V další fázi při porovnávání fenotypových znaků skupiny pacientů s IPF (klinických a paraklinických parametrů onemocnění) jsme již pracovali pouze s polymorfizmy těch cytokinů, které měly odlišné zastoupení genotypů u nemocných s IPF oproti zdravé populaci. Zvolili jsme proto geny pro skupinu cytokinů IL-4 a IL-1; v případě IL-1, kde byly v našem souboru rozdíly v zastoupení polymorfizmů statisticky méně přesvědčivé, jsme se opřeli i o předchozí práce (Whyte, Am J Resp Crit Care Med 2000) Také jsme vybrali pro porovnání s klinickými parametry jako  $T_H1$  regulační cytokin i IL- 12, i když v našem prvotním sledování rozdílu výskytů u pacientů s IPF a kontrolní populace nebyl statisticky významný rozdíl ve frekvenci polymorfizmů mezi těmito skupinami. Předpokládali jsme však, jak již v práci bylo uvedeno výše v teoretické části práce, že cytokinové polymorfizmy mohou mít vliv nikoli na vznik onemocnění, ale pouze na modifikaci jeho průběhu.

Pacienti s genotypem CT na pozici (-889) IL-1 alfa měli vyšší vitální kapacitu ve srovnání s těmi, kteří na této pozici nesli genotyp CC ( $p < 0,05$ ). (Vašáková, Scandinavian Journal of Immunology 2006) (Tabulka 16)

**Tabulka 16. Korelace vitální kapacity v době diagnózy a genových polymorfizmů IL-1alfa (-889) u IPF**

IL-1 ALFA (-889)	STŘEDNÍ HODNOTA VC v % PV
CC(12)	57.8(21-81);SD=18.7
CT(13)	77.4(44-108);SD=16.9
TT(5)	64.2(21-92);SD=18.1

( $p=0.0142$ )

SD=standardní odchylka

PV=predikovaná hodnota

Nositelé genotypu CC na této pozici měli vyšší zastoupení HLADR+ T lymfocytů v BAL než nositelé CT a TT genotypů ( $p < 0,05$ ) (Vašáková, Scandinavian Journal of Immunology 2006) (Tabulka 17)

**Tabulka 17. Korelace CD3+HLADR+ T lymfocytů v BAL v době diagnózy a genových polymorfizmů IL-1alfa (-889) u IPF**

IL-1 ALFA (-889)	STŘEDNÍ HODNOTA CD3+ HLADR+ T LY v %
CC(12)	69.3(11-90);SD=29.8
CT(13)	35.2(3-57);SD=18.6
TT(5)	42.8(6-64);SD=22.6

( $p=0.0284$ )

SD=standardní odchylka



Pacienti s GT na pozici (-1098) v promotorové oblasti genu pro IL-4 měli vyšší zastoupení CD4+ T lymfocytů v BAL, oproti těm s TT genotypem ( $p < 0,06$ ). Naopak TT homozygoti na této pozici měli významně vyšší zastoupení CD8+ T lymfocytů v BAL ( $p < 0,01$ ). Poměr zastoupení CD4+/CD8+ T lymfocytů v BAL byl vyšší u nosičů genotypu GT oproti TT na této pozici ( $p < 0,05$ ). (Vašáková, Scandinavian Journal of Immunology 2006) (Tabulka18)

**Tabulka18. Korelace CD3+CD4+ a CD3+CD8+ T lymfocytů v BAL v době diagnózy a genových polymorfizmů IL-4(-1098)**

IL-4(-1098)	GG (1)	GT(14)	TT(15)	p
Střední hodnota CD3+CD4+ T LY v %	77;SD=0	54.4;SD=20.3	37.6;SD= 9.2	p=0.0598
Střední hodnota CD3+CD8+ T LY v %	16;SD=0	25.9;SD=16.8	48;SD=10.3	p=0.0068
Střední hodnota poměru CD3+CD4+/CD3+CD8+	4.6;SD=0	3.35;SD=3.1	0.8;SD=0.2	p=0.0516

$p < 0,05$

SD= standardní odchylka

Co se týká porovnání HRCT změn s genotypem u pacientů s IPF, nejvyšší alveolární skóre (4+5) bylo spojeno s genotypem IL-4 RA (+1902) AG ve srovnání s homozygoty AA na této pozici. (Tabulka 19 ) Při porovnání se skupinou kontrol, se AA homozygosita na této pozici vyskytovala v obdobném zastoupení u zdravých kontrol a u pacientů s nižším stupněm alveolárního postižení (2+3) (63% vs. 55%) (Vašáková, Respir Med 2006)

**Tabulka 19. Korelace HRCT alveolárního skóre v době diagnózy a genových polymorfizmů IL-4 RA (+1902)**

	AS 0+1	AS 2+3	AS 4+5
AA	5 (31%)	10 (63%)	1(6%)
AG	3 (27%)	3 (27%)	5 (46%)

$P < 0,05$

HRCT intersticiální skóre bylo méně vyjádřeno u IL-12 (-1188) AA homozygotů. (Tabulka 20) Ve zdravé populaci je převažujícím genotypem na této pozici AA (55%), AC a CC genotyp byl přítomen u kontrol ve 41%, ve srovnání s 89% pacientů s IPF s intersticiálním skóre 4+5. (Vašáková et al, Respir Med 2006)

**Tabulka 20. Korelace HRCT intersticiálního skóre v době diagnózy a genových polymorfizmů IL-12 (-1188)**

	IS 2+3	IS 4+5
AA	10 (55,5%)	8 (44,5%)
AC, CC	1 (11%)	8 (89%)

$P < 0,05$

Co se týče progresu intersticiálních změn na HRCT, CC homozygosita na pozici IL-1RA(mspa 111100), AA homozygosita na pozici IL-RA (+1902) a CC homozygosita na IL-4 (-33) byly častěji zastoupeny u pacientů se stabilním onemocněním ve srovnání s těmi s progresivní nemocí. (Tabulka 21, 22, 23)

**Tabulka 21. Korelace změn HRCT intersticiálního skóre v čase a genových polymorfizmů IL-1RA (mspa 111100)**

	STABILNÍ ONEMOCNĚNÍ	PROGRESIVNÍ ONEMOCNĚNÍ
CC	6 (75%)	2 (25%)
CT	0	4 (100%)
TT	2 (67%)	1 (33%)

$P < 0,05$

**Tabulka 22. Korelace změn HRCT intersticiálního skóre v čase a genových polymorfizmů IL-4RA (+1902)**

	STABILNÍ ONEMOCNĚNÍ	PROGRESIVNÍ ONEMOCNĚNÍ
AA	8 (67%)	4 (33%)
AG	0	3 (100%)

$P < 0,08$

**Tabulka 23. Korelace změn HRCT intersticiálního skóre v čase a genových polymorfizmů IL-4 (-33)**

	STABILNÍ ONEMOCNĚNÍ	PROGRESIVNÍ ONEMOCNĚNÍ
CC	4 (100%)	0
CT	4 (36%)	7 (64%)

$P < 0,08$

Jsme si vědomi toho, že podskupiny pacientů v těchto skupinách jsou početně malé, ale srovnáme-li frekvenci zastoupení IL-4 (-33) CC genotypu u kontrolního souboru vs. u pacientů s IPF, můžeme vidět, že 75% zdravé populace jsou CC homozygoti, na rozdíl od skupiny pacientů s progresivním onemocněním, kde tento genotyp nenesl žádný z nemocných. V případě IL-1RA(mspa111100) a IL-4RA (+1902) polymorfizmů, srovnání s výsledky u zdravé populace nepřineslo žádné rozumné vysvětlení pro vztah nosičství některé z alel a progresse onemocnění. (Vašáková, Respir Med 2006)

## Diskuze

Cílem naší práce byla identifikace možných genových polymorfizmů širokého spektra cytokinů, které by se mohly podílet patogeneticky na rozvoji idiopatické plicní fibrózy. Náš výzkum jsme zprvu cílili na porovnání zdravé populace (103 dobrovolníků) a pacientů s IPF (30 pacientů).

Jsme si plně vědomi, že pro většinu genů je optimální velikost studovaného souboru několik set jedinců k získání relevantních výsledků, ale je obtížné dosáhnout velkých počtů jedinců ve sledované populaci u nemocí, které se vyskytují v populaci s nízkou četností a které vyžadují komplexní vyšetřovací program včetně invazivních vyšetření k určení diagnózy s vysokým stupněm věrohodnosti. V těchto případech lze přijmout i výsledky studií na menším počtu jedinců s cílem blíže určit suspektní alely, které budou dále sledovány. Dosavadní studie byly prováděny většinou na suboptimálních počtech pacientů a diagnóza a fenotyp nemoci u těchto pacientů nebyly vždy pregnantně dle závazných kritérií stanoveny.

Naše výsledky hodnotíme s vědomím určitého omezení bránícího všeobecné aplikaci vzhledem k suboptimálnímu počtu vyšetřených nemocných. Nicméně můžeme předpokládat, že i výsledky, které se po Bonferroniho korekci staly nesignifikantními, by mohly dosáhnout statistické významnosti pro více početnou skupinu pacientů. Do jisté míry mohly být výsledky ovlivněny i demografickými parametry (věk a pohlaví), které se v určitých aspektech lišily mezi pacienty a kontrolní populací. Navzdory těmto omezením, role některých polymorfizmů, a to hlavně v promotorové oblasti genu pro IL-4 (IL-4 –590, IL-4 –33), v etiologii a patogenezi IPF nemohou být vyloučeny.

V dalším sledování jsme se zaměřili na porovnání genových polymorfizmů v oblastech, které by mohly dle našeho předchozího pozorování s vývojem IPF souviset, tj. IL-1 a IL-4 cytokinů a jejich receptorových antagonistů a IL-12 jako potentního

induktoru cytokinu IFN- gama, který by měl působit protektivně proti vývoji plicní fibrózy, s klinickými a paraklinickými parametry u pacientů s IPF (funkčními parametry, diferenciálním rozpočtem buněk v BAL a HRCT hrudníku). Domníváme se, že genové polymorfizmy těchto cytokinů mohou hrát nikoliv roli přímo v etiologii onemocnění, ale posléze v patogenezi, jako tzv. nemoc modifikující faktory. Ve volbě cytokinových genových oblastí jsme byli podpořeni i předchozími, v následujícím odstavci krátce zmíněnými studiemi, které jsou podrobně rozebrány v teoretickém úvodu práce.

U IPF je předpokládána převaha cytokinů T<sub>H</sub>2 typu a stoupá množství důkazů o tom, že IL-4 a IL-13 u IPF podporuje růst fibroblastů a produkci kolagenu, zatímco IFN gama potlačuje aktivitu fibroblastů. (Lukacs, 2001, Wen, 2002, Lee, 2001, Zhu, 2002, Jakubzick, 2004) IL-12 naopak je cytokinem působícím antifibroticky cestou indukce IFN- gamma. (Keane, 2001). Whyte et al popsal ve své práci (2000) korelaci polymorfizmů TNF alfa na pozici -308 v promotorové oblasti a IL-1 RA na pozici +2018 s vývojem IPF v italské a anglické populaci.

Korelace vitální kapacity v době diagnózy s IL-1 alfa (-889) polymorfizmem byla jedinou korelací funkčních parametrů s cytokinovým genotypem. Nosiči genotypu CT na této pozici měli vyšší vitální kapacitu v době diagnózy. Tento výsledek je v rozporu s našimi předchozími pozorováními a je zřejmě způsoben malým počtem pacientů v klinických podskupinách a faktem, že alela T byla častěji přítomna jak v heterozygotní tak v homozygotní formě v celé skupině pacientů s IPF. Také je nepochybné, že vitální kapacita v době diagnózy je ovlivněna i řadou jiných faktorů včetně pacientova rozhodnutí, kdy navštívit poprvé pro obtíže lékaře (řada pacientů poprvé přijde ke specialistovi až ve velmi pokročilém stádiu onemocnění se vstupní nízkou hodnotou VC).

V případě hodnocení vztahu T lymfocytů v BAL s genotypem vyšetřovaných cytokinů, jsme našli korelaci mezi zastoupením CD4+ a CD8+ T lymfocytů v BAL a polymorfizmem na pozici (-1098) IL-4. Genotyp GT na této pozici byl spojen s vyšším

zastoupení CD4+T lymfocytů v BAL a naopak TT genotyp s vyšším zastoupením CD8+T lymfocytů v BAL. Tento výsledek svědčí o možné roli alely G na této pozici v ovlivnění CD4/CD8 T lymfocytárního profilu v BAL a může podporovat hypotézu o protektivní roli převahy CD3+CD4+ lymfocytů v BAL proti rozvoji progresivní fibrózy. Nicméně tato hypotéza je do jisté míry spekulativní a založena na našem předchozím pozorování vyšší prevalence alely T u pacientů s IPF ve srovnání s kontrolami. (Vašáková, Tissue Antigens 2006)

Co se týče zastoupení CD3+HLADR+ lymfocytů v BAL, přítomnost CC genotypu na pozici (-889) IL-1 alfa byla častěji pozorována u pacientů s vyšším zastoupením těchto aktivovaných T lymfocytů v BAL. Tento nález by mohl podporovat hypotézu o roli alely C na této pozici v aktivaci T lymfocytů u IPF, ale bude potřeba tuto hypotézu ověřit testováním na větším souboru pacientů.

Pro pozorování morfologických změn v plicním parenchymu ve vztahu k cytokinovému genotypu jsme zvolili, jak je uvedeno v kapitole Metody, HRCT alveolární a intersticiální skóre, které nejlépe obráží stupeň postižení plicního parenchymu, je dobře měřitelné a navzájem porovnatelné v čase u téhož pacienta i mezi jednotlivými pacienty navzájem. Pokud je nám známo, jsme první, kteří zvolili HRCT skóre jako obraz fenotypu IPF a využili výhody dobré kvantifikovatelnosti míry postižení a možnosti vzájemného porovnávání jednotlivých vyšetření u jednoho pacienta i mezi pacienty navzájem.

U pacientů s genotypem AG na pozici (+1902) IL4RA jsme našli vyšší rozsah alveolárního skóre (tj. aktivního procesu) v době diagnózy. Nižší intersticiální skóre (tj. menší rozsah fibrotických změn) byl nalezen u AA homozygotů na pozici (-1188) IL-12 v porovnání s AC heterozygoty na této pozici. Co se týče progresu onemocnění při porovnávání HRCT scanů v čase, CC homozygoti na pozici (mspa 111100) IL-1RA měli menší stupeň progresu intersticiálních (tj. fibrotických) změn než CT heterozygoti a TT

homozygoti. Obdobně IL-4RA (+1902) AA homozygoti měli patrnou menší progresi intersticiálního skóre v porovnání s AG heterozygoty a CC IL-4 (-33) homozygoti měli menší progresi fibrotických změn na HRCT než CT heterozygoti. (Vašáková, Respir Med 2006)

Nejslibnější se nám jeví ty výsledky z výše uvedených, kde nosičství některé alely bylo buď shodné, nebo se naopak lišilo oproti zdravé populaci. Například v případě IL-4RA (+1902), AA homozygosita byla v převaze jak u pacientů s vyšším alveolárním skóre na HRCT (čili s více vyjádřenými aktivními změnami bez výrazných změn fibrotických) tak i u zdravých kontrol.

Při pozorování vlivu polymorfizmu na pozici IL-12 (-1188) jsme sice neshledali statisticky významné odchylky v zastoupení genotypů mezi IPF a zdravou populací, nicméně nejčastější genotyp u zdravých dobrovolníků byl AA a tito homozygoti ve skupině IPF měli méně vyjádřené intersticiální (fibrotické) změny dle HRCT v době diagnózy, čili i lepší prognózu v porovnání s homozygotními nebo heterozygotními nosiči alely G na této pozici ve skupině pacientů s IPF, kteří měli stupeň intersticiálních změn 4+5.

Genotyp IL-4 (-33) CC byl nacházen v našem souboru u těch pacientů, kteří měli malý sklon k progresi fibrotických změn na HRCT v čase. Zároveň CC homozygosita byla nejčastějším genotypem ve skupině zdravých dobrovolníků (u 75% vyšetřených jedinců) a tento genotyp se nevyskytl u žádného s pacientů s rychlou progresí fibrotických změn na HRCT hrudníku.

Polymorfizmy IL-1 alfa -889 nekorelovaly ani s intersticiálními ani s alveolárními změnami na HRCT v době diagnózy a ani se změnami skóre v čase. Ze skupiny IL-1 genů pouze homozygosita CC na pozici IL-1RA mspa 111100 korelovala se stabilním onemocněním bez významné progresie intersticiálních změn v čase. V porovnání se

zdravou populací však vyplývá, že jde o nejméně často zastoupený genotyp na této pozici a tudíž význam této korelace je nejasný, ne-li zpochybnitelný.

Závěrem lze říci, že navzdory omezením daným počtem pacientů v našem souboru lze říci, že IL-4 genové polymorfismy, a to zvláště v promotorové oblasti na pozici (-33) a (-590) hrají pravděpodobně roli v etiologii a potogenezi IPF. Dále je pravděpodobné, že genové polymorfismy v oblasti skupin genů IL-1, IL-1RA, IL-4, IL-4RA a IL-12 mohou ovlivňovat klinickou manifestaci IPF ve smyslu ovlivnění buněčného rozpočtu v BAL a intersticiálních a alveolárních změn zobrazených na HRCT hrudníku a tudíž i ovlivňovat prognózu onemocnění.



## Literatura

Abdallah A. N., Cucchi-Mouillot P., Biteau N., Cassaigne A., Haras D., Iron A. Analysis of the polymorphism of the tumor necrosis factor [TNF] gene and promoter and of circulating TNF-alpha levels in heart transplantation patients suffering from severe rejection. *Eur J Immunogenet* 1999;26:249-255

Aggarwal BB., Eessalu TE, Hass PE. Characterization of receptor for human tumor necrosis factor and their regulation by  $\gamma$  interferon. *Nature* 1985;318:665-667

Aksentijevich I., Galon J., Soares M., Mansfield E., Hull K., Oh H. H., *et al.* The tumor-necrosis-factor receptor-associated periodic syndrome: new mutations in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype-phenotype studies and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers. *Am J Hum Genet* 2001;69:301-314

Albert R.K., Spiro S.K., Setz J.R. *Clinical Respiratory Medicine*, 2/e, Mosby 2004, Philadelphia, Pennsylvania. Ch 43, p.551

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;22:821-826

Armitage RJ. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* 1994;6:407-413

Awad M. R., El-Gamel A., Hasleton P. et al. Genotypic variations in the transforming growth factor-beta 1 gene: association with transforming growth factor-beta 1

production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 1998;66:1014-1020

Azuma A., Li YJ, Abe S, Usuki J, Matsuda K, Henmi S, Miyauchi Y, Ueda K, Izawa A, Sone S, Hashimoto S, Kudoh S. Interferon beta inhibits bleomycin-induced lung fibrosis by decreasing TGF beta and thrombospondin. *Am J Respir Cell Mol Biol.*2005 ;32(2):93-8

Baghate A. J., Pravica V., Perrey C., Therapondos G., Plevris J. N., Hayes P. C., Hutchinson I. V.: The effect of polymorphism in tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in acute hepatic allograft rejection. *Tranplantation* 2000;69:1514-1517

Barbarin V, Xing Z, Delos M, Lison D, Huaux F. Pulmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:841-848

Baumgartner KB., Coultas DB., Stidley DA., Hunt WC., Colby TV., Waldron JA., and the Collaborating centres. Occupational and enviromental risk factors for idiopatic pulmonary fibrosis: a multicentre case- control study. Collaborating Centres. *Am J Epidemiol* 2000;152(4):307-15

Bergeron A., Soler P., Kaboucher M., Loiseau P., Milleron B., Valyeyre D., Hance A. J., Tazi A. Cytokine profiles in idiopatic pulmonary fibrosis suggest an important role for TGF- $\beta$  and IL-10 *Eur Respir J* 2003;22:69-76

Boin F., Zanardini R., Pioli R., Altamura CA., Maes M., Genarelli M. Association between –G 308 A tumor necrosis factor alpha gene polymorphism and schizophrenia. *Mol psychiatry* 2001;6:79-82

Bonnaud P, Margetts PJ, Kolb M, Schroeder JA, Kapoun AM, Damm D, Murphy A, Chakravarty S, Dugar S, Higgins L, Protter AA, Gauldie J. Progressive TGF beta 1 induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* ;2005:889-898

Bouros D, Antoniou KM. Current and future therapeutic approaches in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2005;26:693-702

Bullard JE, Wert SE, Whitsett JA, Dean M, Noguee LM. ABCA 3 mutations associated with pediatric interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1026-1031, 2005

Burch LH, Schwartz DA. Finding fibrosis genes: the lung. *Methods Mol Med* 2005;117:293-313

Coker RK, Laurent GJ. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. *Eur Respir J* 1998;11:1218-1221

Cottin V, Nunes H, Brillet PY, Dělával P, Devouassoux, Tillie-Leblond I, Izrael-Biet D, Court-Fortune I, Valeyre D, Cordier J-F. Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. *Eur Respir J* 2005;26:586-593

Coultas D. B., Zumwalt R. E., Blak W. C., Sobonya R. E. The epidemiology of interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:967-972

Dave NB, Kaminski N. Analysis of microarray experiments for pulmonary fibrosis. *Methods Mol Med* 2005;117:333-358

Demedts M, Behr J, Buhl R, Costabel U, Dekhuijzen R, Jansen HM, MacNee W, Thormeer M, Wallaert B, Laurent F, Nicholson AG, Verbeken EK, Verschakelen J, Flower CDR, Capron F, Petruzzelli S, De Vuyst P, vane den Bosch JMM, Rodriguez-Becerra E, Corvasce G, Lankhorst I, Sardina M, Montanari M. High dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2005;353:2229-42

Drent M, Mulder PGH, Wagenaar SS, Hoogsteden HC, van Velzen-Blad H, van den Bosch JMM. Differences in BAL fluid variables in interstitial lung diseases evaluated by discriminant analysis. *Eur Respir J* 1993;6:803-810

Du Bois RM, Kangesan I, Veeraraghavan S. Genetics of pulmonary fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2003;24/2:205-212

Du Y., Dodel R. C., Eastwood B. J., Bales K. R., Gao F., Lohmuller F., *et al.*: Association of an interleukin 1 alpha polymorphism with Alzheimer's disease. *Neurology* 2000;55:480-483

Erbes R, Schaberg T, Loddenkemper R. Lung function tests in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Are they helpful for predicting outcome? *Chest* 1997;111/1: 51-57

Fishbein MC. Diagnosis: To biopsy or not to biopsy. Assessing the role of surgical lung biopsy in the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2005;128:520-525S

Flaherty KR, King TE, Raghu G, Lynch JP, Colby TV, Travis WD, Gross BH, Kazerooni EA, Toews GB, Long Q, Murray S, Lama VN, Gay S, Martinez J. Idiopathic interstitial pneumonia. What is the effect of a multidisciplinary approach to diagnosis? *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:904-910

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse helper T cell. IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081-2095

Foussat A., Cottrez F., Brun V., Fournier N., Breittmayer J-P., Groux H. A comparative study between T regulatory type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation. *J Immunol* 2003;171:5018-5026

Gately MK, Wilson DE, Wong HL. Synergy between recombinant interleukin 2 (rIL-2) and IL 2-depleted lymphokine-containing supernatants in facilitating allogeneic human cytolytic T lymphocyte responses *in vitro*. *J Immunol* 1986;136:1274-1282

Gay SE, Kazerooni EA, Tows GB, Lynch JP, Gross BH, Cascade PN, Spizarny DL, Flint A, Schork MA, Whyte RI, Popovich J, Hyzy R, Martinez FJ. Idiopathic pulmonary

fibrosis. Predicting response to therapy and survival. *Am J Respir Crit Care Med*;1998;157:1063-1072

Gibson A. W., Edberg J. C., Wu J., Westendorp R. G., Huizinga T. W., Kimberly R. P. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001;166:3915-3922

Gilmour K. C., Fujii H., Cranston T., Davies E. G., Kinnon C., Gaspar H. B. Defective expression of the interleukin-2/interleukin-15 receptor beta subunit leads to a natural killer cell-deficient form of severe combined immunodeficiency. *Blood* 2001;98:8778-79

Gong MN, Thompson BT, Williams PL, Zhou W, Wang MZ, Pothier L, Christiani DC. Interleukin-10 polymorphism in position -1082 and acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J* 2006;27:674-681

Grakoui A., Donermeyer D. L., Kanagawa O., Murphy K. M., Allen P. M. TCR-independent pathways mediated the effects of antigen dose and altered peptide ligands on Th cell polarization. *J Immunol* 1999;162:1923-1930

Gresser I, Nacify K. Recovery of an interferon-like substance from cerebrospinal fluid. *Proc Soc Exp Biol Med* 1964;117:285-289

Grutters JC, duBois RM. Genetics of fibrosing lung diseases. *Eur Respir J* 2005;25:915-927

Gurujeyalakshmi G., Giri S. N. Molecular mechanism of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: down-regulation of TGF $\beta$  and procollagen I and III gene expression. *Exp Lung Res* 1995;21:791-808

Hall IP, Blakey JD. Genetic association studies in Thorax. *Thorax* 2005;60: 357-359

Hallstrand TS, Boitano LJ, Johnson WC, Spada CA, Gates JG, Raghu G. The timed walk test as a measure of severity and survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2005;25:96-103

Hansell DM. High-resolution computed tomography in the evaluation of fibrosing alveolitis. *Clin Chest Med*;1999;20:739-760

Herblot S, Chastangner P, Samady L, Moreau JL, Demaison C, Froussard P, Liu X, Bonnet J, Theze J. IL-2 dependent expression of Genes Involved in Cytoskeleton organisation, oncogene regulation, and transcriptional control. *J Immunol* 1999;162:3280-3288

Hirano T, Taga T, Pyun KH, Kishimoto T. Purification to homogeneity and characterisation of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:5490-5494

Hodgson U, Laitinen T, Tukiainen P. Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax* 2000;57:338-342

Hojo S, Fujita J, Yamadori I, Kamei T, Yoshinouchi T, Ohtsuki Y, Okada H, Bandoh S, Yamaji Y, Takahara J, Fukui T, Kinoshita M. Heterogenous point mutation of the p53 gene in pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, 1998;12: 1404-1408

Hořejší V., Bartůňková J. Základy imunologie. 3. vydání. Triton, Praha 2005. s.95-105

Howell W. M., Turner S. J., Bateman A. C., Theaker J. M. IL-10 promoter polymorphisms influence tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immun* 2001;2:25-31

Hubbard R., Lewis S., Richards K., Johnston I., Britton J. Occupational exposure to meal or wood dust and aetiology of cryptogenetic fibrosins alveolitis. *Lancet* 1996;347:284-289).

Hutyrova B., Pantelidis P., Drabek J., Zurkova M. et al. Interleukin-1 gene cluster polymorphism in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis, *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:148-151

Hutyrova B., Lukac J., Bosak V., et al. Interleukin 1 alpha single-nucleotide polymorphism associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2004;31;81-84

Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment, *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:646-664

Jakubzick C., Kunkel S. L., Puri R. K. et al. Therapeutic Targeting of IL-4- and IL-13-responsive cells in pulmonary fibrosis. *Immun Res* 2004;30/3:339-349



John S., Turner D., Don R., et al. Two novel biallelic polymorphisms in the IL-12 gene. *Eur J Immunogenet* 1998;25:419-420

Kauffmann F. Post Genome Respiratory Epidemiology Group. Post-genome respiratory epidemiology: a multidisciplinary challenge. *Eur Respir J* 2004;24:239-244

Kazerooni E., Martinez F., Flint A., Jamadar D., Gross B., Spizarny D. Thin-section CT obtained at 10 mm increments versus three-level thin-section CT for idiopathic pulmonary fibrosis: correlation with pathologic scoring. *Am J Roentgenol* 1997;169:977-83

Keane MP, Arenberg DA, Luch JP III, et al. The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol* 1997;159:1437-1443

Keane MP, Belperio JA, Burdick MD, Strieter RM. IL-12 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281/1:192-197

Kelly M., Kolb M., Bonniaud P., Gaudie J. Re-evaluation of fibrogenic cytokines in lung fibrosis. *Curr Pharm Des.* 2003;9(1):39-49

Kilpinen S., Huhtala H., Hurme M. The combination of the interleukin-1-alpha (IL-1alpha-889) genotype and the interleukin-10 (IL-10 ATA) haplotype is associated with increased interleukin-10 (IL-10) plasma levels. *Eur Cytokine Netw* 2002;13:66-71

Kim JH, Kim HY, Kim S, Chung JH, Park WS, Chung DH. Natural killer T (NKT) cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis by producing interferon-gamma. *Am J Pathol* 2005;167(5):1231-1241

King, TE, Jr. Clinical advances in the diagnosis and therapy of the interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:268-279

Kinnula VL, Fattman CL, Tan RJ, Oury TD. Oxidative stress in pulmonary fibrosis. A possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:417-422

Lawson WE, Poloshukin VV, Stathopoulos GT, Zoia O, Han W, Lane KB, Li B, Donnelly EF, Holburn GE, Lewis KG, Collins RD, Hull WM, Glasser SW, Whitsett JA, Blackwell TS. Increased and prolonged pulmonary fibrosis in surfactant protein C-deficient mice following intratracheal bleomycin. *Am J Pathol* 2005;167/5:167-1277

Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliansky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior M, Elias JA. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta 1. *J Exp Med* 2001;194:809-821

Lennart KA, Thompson- Figueroa J, Leclair T, Sullivan MJ, Poynter ME, Irvin CG, Bates JHT. Tumor Necrosis factor alpha overexpression in lung disease. A single cause behind a complex phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1363-1370

Leslie GL, Silver E. W., Direskeneli G. S., et al. Worldwide variation in cytokine genes. HLA 2004” Immunobiology of the Human MHC. Processings of the 13<sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop and Congress. Hansen JA and Dupont B, eds, Volume I+III, IHWG Press, Seattle, WA, 2004. In press

Leslie KO. Historical perspective. A pathologic approach to the classification of idiopathic interstitial pneumonias. *Chest* 2005;128(5):513-519S

Levine SJ, Wu T, Shelhamer JH. Extracellular release of the type I intracellular IL-1 receptro antagonist from human airway epithelial cells: differential effect of IL-4, IL-13, IFN-gama, and corticosteroides. *J Immunol* 1997;158:5949-5957

Li CM, Khosla J, Hoyle P, Sannes PL. Transforming growth factor-beta(1) modifies fibroblasts growth factor-2 production in type II cells. *Chest* 2001;120/1:60S-61S

Lukacs NW, Hogaboam C, Chensue SW, Blease K, Kunkel SL. Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis. *Chest* 2001;120/1S:5S-8S

Majumdar S., Li D., Ansari T., et al. Tissue cytokine profiles of cryptogenetic fibrosis alveolitis (CFA) and fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis (FASSc) are distinct: a quantitative in situ study of open lung biopsies. *Eur Respir J* 1999;14:251-257

Mannino D. M., Etzl R. A., Parish R. G. Pulmonary fibrosis deaths in the United States, 1979-1991: an analysis of multiple cause mortality data. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1548-1552

Marshall RP, McAnulty, Laurent GJ. The pathogenesis of pulmonary fibrosis: is there a fibrosis gene? *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29/1: 107-120

Marshall RP, Puddicombe A, Cookson WO, Laurent GJ. Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the United Kingdom. *Thorax* 2000;55:143-146

Marchand-Adam S, Fabre A, Mailleux AA, Marchal J, Quesnel C, Kataoka H, Aubier M, Dehoux M, Soler P, Crestani B. Defect of pro-hepatocyte growth factor activation by fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:58-66

Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. (1976). Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 1976;193:1007-1008

Mosmann T. R., Cherwinski H., Bomd M. W., Giedlin M. A., Coffman R. L. Two types of murine helper T-cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348 -2357

Müller N.L., Colby T.V. Idiopathic interstitial pneumonias: high resolution CT and histologic findings. *Radiographics* 1997;17:1016-22

Myers RD., Lopez-Valpuesta FJ, Barwick VS, Wolpe SD. Fever and feeding in the rat: actions of intrahypothalamic interleukin-6 compared to macrophage inflammatory protein-1 beta (MIP-1 beta). *J Neurosci Res* 1994;39:31-37

Nagao T, Nagai S, Hiramoto Y, Hamada K, Shigematsu M, Hayashi M, Izumi T, Mishima M. Serial evaluation of high-resolution computed tomography findings in

patients with idiopathic pulmonary fibrosis in usual interstitial pneumonia.

*Respiration*;2002;69:413-419

Nogee LM, Dunbar AE III, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett JA. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl Med J* 2001;344:573-579

Oriss T. B., McCarthy S. A., Campana M. A. K., Morel P. A. Evidence of positive cross-regulation on Th1 by Th2 and antigen-presenting cells: effects on Th1 induced by IL-4 and IL-12. *J Immunol* 1999;162:1999-2007

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. *AmJ Respir Crit Care Med* 2001;163/6:1432-1436

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;46/2:91-99

Papiros SA, Kollintza A, Kitsanta P, Kapotsis G, Karatza M, Milic-Emili J, Roussos C, Daniil Z. Relationship of BAL and tissue CD4+ and CD8+ T lymphocytes, and their ratio in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2005;128/4:2971-2977

Philips RJ, Burdick MD, Hong K, et al. Circulating fibrocytes traffic to the lung in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* 2004;114:438-446

Parambil JG, Myers JL, Ryu JH. Histopathologic features and outcome of patients with acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis undergoing surgical lung biopsy. *Chest* 2005;128:3310-3315

Paul WE, IL-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 1991;77:1859-1870

Pelletier R., Pravica V., Perrey C., Xia D., Ferguson R. M., Hutchinson I. V., Orosz C. Evidence for a genetic predisposition towards acute rejection after kidney and simultaneous kidney-pancreas transplantation. *Tranplantation* 2000;70:674-680

Poli F., Boschiero L., Giannoni F., Tonini M., Scalamogna M., Ancona G., Sirchia G. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism: implication in kidney transplanatation. *Cytokine* 2000;12:1778-1783

Prasse A., Müller K. M., Kurc C., Hamm H., Virchow J. C. J. Does interferon- $\gamma$  improve pulmonary function in idiopatic pulmonary fibrosis? *Eur Respir J* 2003;906-911

Prasse A, Pechkovsky DV, Toews GB, Jungraithmayr W, Kollert F, Goldmann T, Vollmer E, Muller- Quernheim J, Zissel G. A vicious circle of alveolar macrophages and fibroblasts perpetuates pulmonary fibrosis via CCL 18. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 781-792

Riha RL., Yang IA, Rabnott GC, Tunnicliffe AM, Fong KM, Zimmerman PV. Cytokine gene polymorphism in idiopatic pulmonary fibrosis. *Inter Med Jour* 2004;34:126-129

Roberts AB, Sporn MB. Handbook of Experimental Pharmacology. Peptide Growth Factors and Their Receptors, (ed. M.B. Sporn, A.B. Roberts), The transforming growth factor- $\beta$ . *Springer-Verlag*, New York. 1990;419-472

Saito I, Haruta K, Shimuta M, Inoue H, Sakurai H, Yamada K, Ishimaru A, Hayashi Y, Tsubota K. Fas ligand-mediated exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in Mice Transgenic for IL-10. *J Immunol* 1999;162:2488-2494

Scott J., Johnston I., Britton J. What causes cryptogenetic fibrosis alveolitis? A case-control study of enviromental exposure to dust. *Br Med J* 1990;301:1015-1017

Seifart C., Dempfle A., Plagens A. et al. TNF-alpha, TNF-beta, IL-6, and IL-10 promoter polymorphisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Tissue Antigens* 2005;65:93-100

Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:188-198

Sosman J. A., Hank J. A., Moore K. H. Prolonged interleukin-2 (IL-2) treatment can augment immune activation with enhancing antitumor activity in renal cell carcinoma. *Cancer Invest* 1991;9:35-48

Steele MP, Speer MC, Loyd JE, Brown KK, Herron A, Slifer SH, Burch LH, Wahidi MM, Phiillips JA III, Sporn TA, McAdams P, Schwarz MI, Schwartz DA. Clinical and

pathological features of familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1146-1152

Stříž I, Mio T, Adachi Y, Heires P, Robbins RA, Spurzem JR, Illig MJ, Romberger DJ, Rennard SI. IL-4 induces ICAM-1 expression in human bronchial epithelial cells and potentiates TNF-alpha. *Am J Physiol* 1999;277:58-64

Stříž I, Mio T, Adachi Y, Romberger DJ, Rennard SI. Th2 type cytokines modulate IL-6 release by human bronchial epithelial cells. *Immunol Lett* 1999;70(2):83-8

Stříž I, Mio T, Adachi Y, Robbins RA, Romberger DJ, Rennard SI. IL-4 and IL-13 stimulate human bronchiale epithelial cells to release IL-8. *Inflammation* 1999;23(6):545-55

Stříž I, Mio T, Adachi Y, Carnevali S, Romberger DJ, Rennard SI. Effects of interferons alpha and gamma on cytokine production and phenotypic pattern of human bronchial epithelial cells. *Int J Immunopharmacol* 2000;22(8):573-85

Tahara H., Lotze MT. Antitumor effects of interleukin-12 (IL-12): applications for the immunotherapy and gene therapy of cancer. *Gene Ther* 1995;2:96-106

Tanaka T, Yoshimi M, Maeyama T, Hagimoto N, Kuwano K, Hara N. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human lung fibroblasts. *Eur Respir J* 2002;20:359-368

Thomas J., Gross M. D., Gary W., Hunninghake M. D. Idiopathic pulmonary fibrosis, *N Engl J Med* 2001;7:345



Thomas AQ, Lane K, Phillips J III et al. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1322-1328

Tredano M., Griese M., Brach F., Schumacher S., de Blic J., Marque S., Houdayer C., Elion J., Couderc R., Bahau M. Mutation of SFTPC in infantile pulmonary alveolar proteinosis with or without fibrosing lung disease. *Am J Med Gen* 2004;126A:18-26

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. *Respiratory Medicine* 2006;100:938-945

Turner DM., Grant SC., Lamb WR., et al. A genetic marker of high TNF-alpha production in heart transplant recipients. *Transplantation* 1995;60:1113-1117

Turner D., Grant SCD., Yonan N., Sheldon S., Dyer PA., Sinnott PJ., Hutchinson IV. Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. *Transplantation* 1997;64:776-779

Turner- Warwick M. Precapillary systemic-pulmonary anastomoses. *Thorax* 1963;18:225-237

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;67:229-232

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* 2006; přijato k tisku 20. října 2006

Vasakova M., Striz I., Slavcev A., Jandova S., Dutka J., Terl M., Kolesar L., Sulc J.: Correlation of IL-1 alpha and IL-4 gene polymorphisms and clinical parameters in idiopathic pulmonary fibrosis. *Scandinavian Journal of Immunology* 2006; přijato k tisku 6.12.2006

Wheelock EF. Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 1965;141:30–311

Whittington H. A., Freeburn R. W., Godinho S. I. H. et al. Analysis of an IL-10 polymorphism in idiopathic pulmonary fibrosis. *Gen Immun* 2003;258-264

Whyte M., Hubbard R., Meliconi R. et al. Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:755-758

Wilson A. G., Symons J. A., McDowell T. L., McDevitt H. O., Duff G. W. Effect of a polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195-3199

Wells A, Hansell D, Rubens M, Cullinan P, Black C, duBois R. The predictive value of appearances on thin/section computed tomography in fibrosing alveolitis. *Am Rev Respir Dis*;1993;148:1076-1082

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-beta 2 production in cultured human bronchial epithelial cells is attenuated by interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26/4:484-490

Xaubet A., Marin-Arguedas A., Lario S. Transforming growth factor-beta 1 gene polymorphisms are associated with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:431-435

Yamada R., Tanaka T., Unoki M., Nagai et al. Association between a single-nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients, and maximum-likelihood estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to the disease. *Am J Hum Genet.* 2001 68;3:674-85

Zhu Z, Ma B, Zheng T, Homer RJ, Lee CG, Charo IF, Noble P, Elias JA. IL-13-induced chemokine responses in the lung: role of CCR2 in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Immunol* 2002; 168/6:2953-2962

Ziesche R., Hofbauer E., Wittmann K., Petkov V., Block L. H. A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1999;341- 345

Zuo F, Kaminski N, Eugui E, et al. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:6292-6297

|