

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2021      Karolína Vagaská**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Transformující růstový faktor beta  
(TGF- $\beta$ ) u plicního zánětu**

**Bakalářská práce**

**Karolína Vagaská**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2021**

**Vedoucí Práce: Mgr. Zdenka Navrátilová, Ph.D.**

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Karolína VAGASKÁ**  
Osobní číslo: **R18662**  
Studijní program: **B1501 Biologie**  
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **Transformující růstový faktor beta (TGF- $\beta$ ) u plicního zánětu**  
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

Zánět doprovází řadu plicních onemocnění. Produkce transformujícího růstového faktoru beta (TGF- $\beta$ ) a dalších cytokinů je zvýšena u plicních onemocnění jako sarkoidóza, chronická obstrukční plicní nemoc nebo astma. U pacientů s plicní sarkoidózou má diagnostický význam vyšetření bronchoalveolární (BA) tekutiny. Tento biologický materiál je také studován u CHOPN a astmatu. Tato bakalářská práce se zaměří na studium regulace a exprese TGF- $\beta$  v BA buňkách. K tomuto stanovení bude normalizována metoda RT-PCR.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**  
Jazyk zpracování: **Slovenština**

### Seznam doporučené literatury:

Comparison of lymphocyte immune phenotypes in bronchoalveolar lavage of non-smoking patients with sarcoidosis and other interstitial lung diseases. Novosadova E, Navratilova Z, Ordeltova M, Zurkova M, Zatloukal J, Kolek V, Petrek M. J Thorac Dis. 2019 Jun;11(6):2287-2296. doi: 10.21037/jtd.2019.06.05.

The Serum Expression of Selected miRNAs in Pulmonary Sarcoidosis with/without Löfgren's Syndrome. Novosadova E, Chabronova A, Kolek V, Petrek M, Navratilova Z. Mediators Inflamm. 2016;2016:1246129. doi: 10.1155/2016/1246129. Epub 2016 Dec 5.

Expression Profile of Six RNA-Binding Proteins in Pulmonary Sarcoidosis. Navratilova Z, Novosadova E, Hagemann-Jensen M, Kullberg S, Kolek V, Grunewald J, Petrek M. PLoS One. 2016 Aug 30;11(8):e0161669.

The clinical and immunologic features of pulmonary fibrosis in sarcoidosis. Patterson KC, Hogarth K, Husain AN, Sperling AI, Niewold TB. Transl Res. 2012 Nov;160(5):321-31. doi: 10.1016/j.trsl.2012.03.005.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Zdenka Navrátilová, Ph.D.**  
**Ústav patologické fyziologie**

Datum zadání bakalářské práce: 24. dubna 2020  
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

L.S.

  
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY  
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc – Holice  
tel.: +420 585 634 901  
-2-

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

## **Bibliografické údaje**

Meno a priezvisko autora: Karolína Vagaská

Názov práce: Transformujúci rastový faktor beta (TGF  $\beta$ ) u pľúcného zánětu

Typ práce: bakalárska

Pracovisko: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedúci práce: Mgr. Zdenka Navrátilová, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2021

Kľúčové slová: asthma bronchiale, chronická obštrukčná choroba pľúc, TGF $\beta$ 2

Počet strán: 46

Počet príloh: 0

Jazyk: slovenský

## **SÚHRN**

Úvod: Deregulácia rozličných členov rodiny TGF $\beta$  (transformujúci rastový faktor beta) je spojená s asthmou bronchiale (AB) a chronickou obštrukčnou chorobou pľúc (CHOCHP). Avšak jeden člen tejto rodiny býva vynechaný zo štúdií. Cieľom tejto štúdie bolo stanoviť expresiu TGF $\beta$ 2 v bronchoalveolárnej (BAL) laváži.

Metódy: Kvantitatívna PCR metóda bola použitá na posúdenie relatívnej expresie TGF $\beta$ 2 u 13 CHOCHP pacientov, 14 AB pacientov a 22 pacientov v kontrolnej skupine.

Výsledky: Expresia TGF $\beta$ 2 v BAL bola zvýšená u pacientov s CHOCHP ( $p = 0.01$ ) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Medzi pacientmi s AB a kontrolnou skupinou nebol zistený rozdiel ( $p > 0.5$ ). Taktiež nebol zistený rozdiel v expresii TGF $\beta$ 2 medzi pacientmi s CHOCHP a AB ( $p > 0.5$ ).

Záver: Táto štúdia rozširuje súčasné znalosti o TGF $\beta$  rodine. Naše pozorovania by však mali byť potvrdené na nezávislej skupine pacientov a taktiež by mali byť možné rozdiely v expresii TGF $\beta$ 2 u odlišných fenotypov CHOCHP preskúmané ďalšími štúdiami.

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: Karolína Vagaská

Title: Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) in the lung inflammation

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: Mgr. Zdenka Navrátilová, Ph.D.

Year of presentation: 2021

Keywords: asthma bronchiale, chronic obstructive pulmonary disease, TGF $\beta$ 2

Number of pages: 46

Number of appendices: 0

Language: Slovak

## **SUMMARY**

**Background and objective:** Dysregulation of various members of the TGF $\beta$  (transforming growth factor beta) family has been associated with asthma bronchiale (AB) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). However, one member of this family is omitted in clinical studies. The objective of this study was to investigate the expression of TGF $\beta$ 2 in bronchoalveolar (BAL) lavage.

**Methods:** Quantitative PCR method was used to assess the relative expression of TGF $\beta$ 2 in 13 COPD patients, 14 AB patients and 22 control patients.

**Results:** BAL expression of TGF $\beta$ 2 was increased in COPD patients ( $p = 0.01$ ) compared with control patients. There was no difference ( $p > 0.5$ ) between AB and control patients. Further relative expression of TGF $\beta$ 2 was similar between COPD and AB patients ( $p > 0.5$ ).

**Conclusion:** This study extends current knowledge of the TGF $\beta$  family. However, our main observations on TGF $\beta$ 2 should be confirmed in an independent cohort of patients and the possible differences among COPD phenotypes should also be investigated by other studies.

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne na Univerzite Palackého v Olomouci pod vedením Mgr. Zdenky Navrátilovej\*, Ph.D. \*Ústav Patologické Fyziologie a Ústav Molekulární a Translační medicíny, Lékařská Fakulta Univerzity Palackého v Olomouci.

Táto práca bola vytvorená zo grantovej podpory IGA UP: LF\_2020\_004, IGA UP: LF\_2021\_014 a CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000868.

Rada by som sa poďakovala vedúcej mojej práce, Mgr. Zdenke Navrátilovej, Ph.D. za odborné vedenie, trpezlivosť a pomoc pri výkone experimentálnej časti a následnom spracovaní výsledkov.



## OBSAH

1	ÚVOD .....	1
2	CIELE PRÁCE .....	2
3	LITERÁRNY PREHLAD .....	3
3.1	Asthma Bronchiale.....	3
3.1.1	Príčiny .....	3
3.1.2	Patofyiológia.....	4
3.1.3	Klasifikácia .....	5
3.1.4	Diagnostika .....	5
3.1.5	Liečba.....	6
3.2	Chronická obštrukčná choroba pľúc .....	7
3.2.1	Príčiny .....	7
3.2.2	Patofyziológia .....	8
3.2.3	Diagnostika .....	8
3.2.4	Liečba.....	10
3.2.5	Exacerbácie .....	10
3.2.6	Komorbidity.....	11
3.3	ACO syndróm .....	12
3.3.1	Príčiny .....	12
3.3.2	Patofyziológia .....	12
3.3.3	Diagnostika .....	13
3.3.4	Liečba.....	14
3.4	TGF $\beta$ .....	15
3.4.1	Expresia .....	15
3.4.2	Receptory .....	16
3.4.3	Regulácia .....	17

3.4.4	Funkcia.....	17
3.4.5	Porovnanie izoforiem TGF $\beta$ .....	18
4	MATERIÁL A METÓDY .....	20
4.1	Súbor pacientov.....	20
4.2	Metódy .....	21
4.2.1	Biologický materiál.....	21
4.2.2	Použité chemikálie a roztoky.....	21
4.2.3	Zoznam použitých prístrojov a zariadení.....	21
4.2.4	Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy .....	22
4.3	Štatistické vyhodnotenie .....	24
5	VÝSLEDKY .....	25
6	DISKUSIA.....	26
7	ZÁVER .....	28
8	LITERATÚRA .....	29
9	PRÍLOHY .....	33

## **ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK**

AB – asthma bronchiale

ACO – Asthma bronchiale – Chronic obstructive pulmonary disease Overlap

ACQ – Asthma Control Questionnaire

ACT – Asthma Control Test

BMPs – kostné morfo genetické proteiny

CAT<sup>TM</sup> – COPD Assessment Test

CCQ<sup>®</sup> – COPD Control Questionnaire

EGF – epidermálny rastový faktor

FEV<sub>1</sub> – usilovne vydýchnutý objem vzduchu za 1 sekundu výdychu po maximálnom nádychu

FVC – usilovná vitálna kapacita pľúc

GINA – Global Initiative for Asthma Bronchiale

GOLD – Global initiative for Obstructive Lung Disease

GPI – glykofosfoinositol

CHOCHP – chronická obštrukčná choroba pľúc

IKS – inhalačné kortikosteroidy

KS – kontrolná skupina

LABA – inhalačné  $\beta_2$ -agonisty s dlhodobým účinkom

LAMA – anticholinergiká s dlhodobým účinkom

LAPs – latency-associated peptides

LTRA – antileukotrieny

mMRC – Modified British Medical Research Council Questionnaire

MSCs – mesenchymálne kmeňové bunky

RABA – inhalačné  $\beta_2$ -agonisty s rýchlym nástupom účinku

SABA - inhalačné  $\beta_2$ -agonisty s krátkodobým účinkom

SAMA – inhalačné anticholinergiká s krátkodobým účinkom

SKS – systémové kortikosteoidy

SLC – small latent complex

TGF $\beta$  – transformujúci rastový faktor  $\beta$

TBRI – receptor pre TGF $\beta$  1. typu

TBRII – receptor pre TGF $\beta$  2. typu

## ZOZNAM OBRÁZKOV

**Obr. I:** Prierez dýchacích ciest pri bronchokonstrikcii

**Obr. II:** Spirogram u zdravého pacienta (sivá) a u pacienta s obštrukciou dýchacích ciest (červená).

**Obr. III:** Postup stanovenia diagnózy ACO.

**Obr. IV:** Hodnoty relatívnej expresie TGF $\beta$ 2 u jednotlivých skupín pacientov.

## **ZOZNAM TABULIEK**

**Tab. I:** Porovnanie AB a CHOCHP.

**Tab. II:** Charakteristika pacientov.

**Tab. III:** Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu mRNA.

**Tab. IV:** Teplotný profil reverznej transkripcie.

**Tab. V:** Zloženie reakčnej zmesi pre PCR reakciu.

**Tab. VI:** Teplotný profil PCR reakcie.

# 1 ÚVOD

Asthma bronchiale (AB) a chronická obštrukčná choroba pľúc (CHOCHP) sú obštrukčné ochorenia pľúc. Obštrukcia dýchacích ciest u AB je reverzibilná v porovnaní s CHOCHP, kde je obštrukcia reverzibilná slabo alebo ireverzibilná. V Európe je najčastejšou príčinou CHOCHP fajčenie tabaku. Toto ochorenie je taktiež jednou z hlavných príčin úmrtí vo svete. AB je heterogénne ochorenie väčšinou podmienené alergickou reakciou. Obe ochorenia sú spojené so zápalom, ktorého sa účastnia rôzne bunky imunitného systému. U CHOCHP sú to hlavne makrofágy a neutrofilie, ktoré produkujú zápal podporujúce cytokíniny, chemokíny a proteolytické enzýmy. Th2 imunitná odpoveď, mastocyty a eosinofily sú typické pre alergickú odpoveď u AB.

Zápal u pacientov s AB a CHOCHP je spojený s dereguláciou TGF $\beta$  rodiny. Členovia tejto rodiny stimulujú tvorbu kolagénu a ďalších zložiek extracelulárnej matrix. TGF $\beta$ 2 je málo študovaným členom tejto rodiny a preto sa praktická časť tejto bakalárskej práce zamerala na stanovenie TGF $\beta$ 2 *in vivo*. Teoretická časť tejto bakalárskej práce zhŕňa základné poznatky o AB, CHOCHP a TGF $\beta$  rodine.

## **2 CIELE PRÁCE**

- Stanoviť expresiu TGF $\beta$ 2 u pacientov s asthmou bronchiale a porovnať získané dáta so súčasnými znalosťami.
- Stanoviť expresiu TGF $\beta$ 2 u pacientov s chronickou obštrukčnou pľúcnou chorobou a porovnať získané dáta so súčasnými znalosťami.



## 3 LITERÁRNY PREHLAD

### 3.1 Asthma Bronchiale

Asthma bronchiale (AB) je heterogénne ochorenie dýchacích ciest, ktorého typickým znakom je chronický zápal. Typickým príznakom sú astmatické záchvaty. Ďalšími prejavmi sú opakované stavy kašľa, hvízdavého dýchania, dušnosti a tlaku na hrudi. (Neumannová *et al.*, 2018; GINA, 2020)

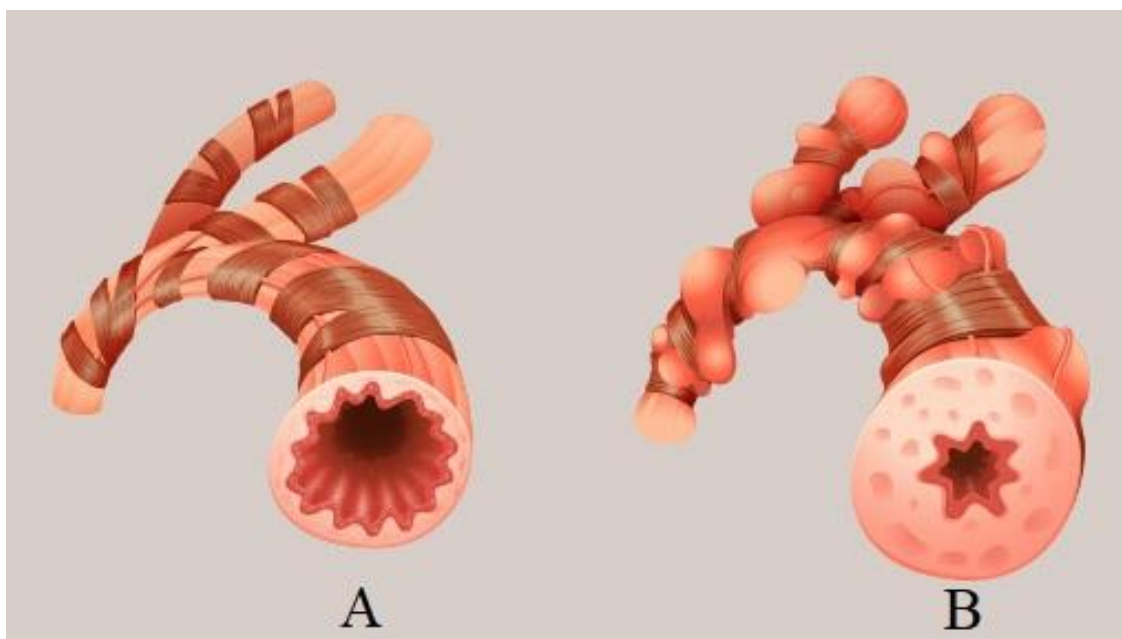
#### 3.1.1 Príčiny

Hlavnou príčinou AB sú akútne a chronický zápal dýchacích ciest, vyvolaný prítomnosťou alergénu. Alergénu sú antigény, ktoré stimulujú alergickú reakciu u hypersenzitívnych jedincov. Avšak u zdravých jedincov za bežných okolností alergickú reakciu nevyvolávajú. (Bousquet *et al.*, 2008)

Najčastejšie sú to inhalačné typy alergénov, ktorým sú ľudia vystavení v domácnostiach, práci alebo vo vonkajšom prostredí. Typickými domácimi alergénmi sú roztoče. Tie môžeme nájsť bežne v prachu alebo usadené v matracoch, vankúšoch, perinách alebo kobercoch. Z alergénov vonkajšieho prostredia sú to najmä peľ z tráv (najmä vysoké lúčne trávy), okrasných kvetov (púpava, sedmikráska, skorocel) alebo kvitnúcich stromov (breza, vŕba, jaseň). Ďalšími alergénmi schopnými zhoršiť astmatické stavy sú napríklad zvieracie chlpy (pes, mačka, škrečok), plesne, hmyz. (Bousquet *et al.*, 2008) Okrem alergénov patria medzi zvyčajné spúšťače AB vírusové infekcie horných a dolných dýchacích ciest, fajčenie, zmena počasia (ochladenie), stres alebo cvičenie. (Mims, 2015)

Vyššie spomínané spúšťače stimulujú zápal a bronchiálnu hyperreaktivitu, pri ktorej dochádza k bronchokonstrikcii (Obr. I). Pre zápal je typická Th2 imunitná odpoveď a stimulácia mastocytov a eozinofilných granulocytov. Tiež je pozorovaný zvýšený výskyt neutrofilných a bazofilných granulocytov. (Kašák *et al.*, 2001)

Rizikovými faktormi pre vznik takehoto zápalu sú genetická predispozícia, vplyvy vonkajšieho prostredia a zmeny v metabolizme pacienta. (Kašák *et al.*, 2001; Mims, 2015)



**Obr. I** : Prierez dýchacích ciest pri bronchokonstrikcii. A – dýchacie cesty v normálnom stave, B – bronchokonstrikcia dýchacích ciest pri zápale alebo astmatickom záchvate. Prevzaté z Allergy and Asthma Network (2020) .

### 3.1.2 Patofyziológia

Hlavným príznakom AB sú astmatické záchvaty. Tieto záchvaty vznikajú pomocou troch mechanizmov – sekréciou sputa, stiahnutím hladkej svaloviny dýchacích ciest (bronchokonstrikciiou) alebo vznikom edému, ktorý je podkladom pre štrukturálne a patofyziologické zmeny prieduškovvej steny, tkanivovú remodeláciu. K tejto zmene najčastejšie dochádza pri neskorom určení diagnózy a zahájení liečby AB. V tom prípade dochádza k zafixovaniu obštrukcie dýchacích ciest, ktorá by boli pri včasnej diagnóze reverzibilná. Pravdepodobnosť astmatického záchvatu u pacienta sa zvyšuje po prekonaní nedávneho záchvatu, alebo v noci a nadržanom. Záchvaty sa prejavujú sporadicky, s týždňovými, prípadne až mesačnými pauzami. (Kašák *et al.*, 2001; Vernerová, 2012; Mims, 2015; Neumannová *et al.*, 2018, GINA, 2020)

Ďalšími typickými príznakmi astmatického záchvatu sú dýchavičnosť, dráždivý kašeľ alebo hvízdavé dýchanie. Tieto symptómy pominú samé alebo po podaní liekov. V období medzi záchvatmi sú pacienti prevažne asymptomatickí, avšak môžu sa u nich symptómy prejavíť aj v období medzi záchvatmi. Príznaky majú tendenciu sa zhoršiť pri vírusovej infekcii, po telesnej námahe alebo pri silných prejavoch emócií. (Kašák *et al.*, 2001, GINA, 2020)

### 3.1.3 Klasifikácia

Vzhľadom k tomu, že AB je heterogénne ochorenie, nie je jednoduché definovať jej subtypy. Existuje niekoľko pohľadov, podľa ktorých je AB rozdelená do menších skupín.

Podľa Medzinárodnej organizácie pre AB (Global Initiative for Asthma Bronchiale – GINA) sú definované tieto fenotypy:

- alergická AB – u pacienta sa prejavujú aj ďalšie príznaky alergie, ako napr. ekzém, alergická rhinitída alebo potravinové a liekové alergie,
- nealergická AB – u pacienta sa neobjavujú iné alergické znaky, hlien vyprodukovaný v dýchacích cestách môže obsahovať iba malé množstvo zápalových buniek,
- AB v dospelosti – vyskytuje sa u pacientov v dospelosti, najmä u žien,
- AB s konštantou obštrukciou dýchacích ciest – u pacientov, u ktorých došlo k remodelácii dýchacích ciest,
- AB s obezitou – niektorí pacienti s AB a súčasne aj obezitou majú dlhotrvajúce respiračné problémy a taktiež mierny zápal dýchacích ciest.

Ďalším spôsobom, akým býva AB rozdelená, je stupeň kontroly. Kontrola AB obsahuje sledovanie príznakov, užívanie liečby, hodnotenie funkcie pľúc a počet záchvatov. Na hodnotenie klinickej kontroly AB sa používajú dotazníky Asthma Control Questionnaire (ACQ) alebo Asthma Control Test (ACT). Na základe výsledkov získaných vyplnením tohoto dotazníka sú pacienti s AB rozdelení do troch skupín:

- astma pod kontrolou,
- astma pod kontrolou čiastočne,
- astma pod kontrolou nedostatočne.

(Krčmová *et* Novosad, 2010; Neumannová *et al.*, 2018; GINA, 2020)

### 3.1.4 Diagnostika

Na stanovenie diagnózy AB je potrebné vykonať niekoľko vyšetrení. Na začiatok musí byť stanovená dobrá anamnéza. Z anamnézy je možné predpokladať nie len diagnózu a stupeň AB, ale taktiež čo spôsobuje jej prejav u pacienta. (Teřl, 2007; Krčmová *et* Novosad, 2010)

Po stanovení anamnézy u pacienta nasleduje fyzikálne vyšetrenie, ktoré pozostáva zo sledovania prítomnosti pískotu a vŕzgania pri dýchaní. Pri podozrení výskytu obštrukcie dýchacích ciest je potrebné počúvať dýchacie cesty u pacienta pri manévri usilovného výdychu. Tento manéver sa skladá z maximálneho nádychu a následného usilovného výdychu, ktorý by mal byť prudký a pacient by sa mal pri ňom snažiť vydýchnuť čo možno najviac vzduchu z pľúc. (Teřl, 2007)

Hlavným vyšetrením stanovujúcim diagnózu AB je spirometrické vyšetrenie. Toto vyšetrenie potvrdzuje AB, ak je pomer FEV<sub>1</sub> (usilovne vydýchnutý objem vzduchu za 1 sekundu výdychu po maximálnom nádychu) a FVC (usilovná vitálna kapacita pľúc) nižší ako 75% náležitej hodnoty alebo ak je hodnota FEV<sub>1</sub> pod 80% náležitej hodnoty. Tieto výsledky sú potvrdené bronchodilatačným testom, ak je po podaní bronchodilatátorov hodnota FEV<sub>1</sub> väčšia aspoň o 15% oproti hodnote FEV<sub>1</sub> za normálneho stavu pacienta. (Cartier, 1994; Krčmová *et* Novosad, 2010)

Doplňujúce testy slúžia na potvrdenie diagnózy AB. Takými testami sú napríklad vyšetrenie oxidu dusného vo vydychovanom vzduchu. Hladina oxidu dusného je typicky zvýšená u pacientov, u ktorých sa prejavuje eozinofilný zápal. Ďalším doplňujúcim testom je alergický test. Najčastejšie je to základný kožný (prick) test, ktorým sa zisťuje prítomnosť alergie na štandardizované alergény. Tento test môže byť doplnený stanovením hladiny IgE protilátok v krvnom séru, avšak toto vyšetrenie samé nie je dostačujúce na určenie alergie u pacienta. (Krčmová *et* Novosad, 2010)

### 3.1.5 Liečba

Asthma bronchiale je primárne liečená farmakologicky. Preferovaný spôsob užívania liečiva je inhalačne. Používané liečivá sú rozdelené do dvoch skupín: úľavové a preventívne antiastmatiká. (Calverley, 1996; Neumannová *et al.*, 2007)

Úľavové antiastmatiká sa vyznačujú rýchlym bronchodilatačným účinom. Tieto liečivá sa užívajú v prípade, ak sa u pacienta vyskytne astmatický záchvat alebo sa mu výrazne zhoršia príznaky. Nie sú odporúčané ako každodenná forma liečby AB. Typickými úľavovými antiastmatikami sú napríklad:

- inhalačné  $\beta_2$ -agonisty s rýchlym nástupom účinku (RABA),
- inhalačné anticholinergiká s krátkodobým účinkom (SAMA), ktorých účinok oproti RABA nastupuje pomalšie,

- systémové kortikosteroidy (SKS) – užívajú sa najmä pri astmatickom záchvate a podávajú sa perorálne alebo intravenózne,
- intravenózne aplikované metylxantiny – kvôli intravenózne aplikácii sa musia užívať opatrne.

(Calverley, 1996; Teřl, 2007; Neumannová *et al.*, 2018)

Druhou skupinou bežne používaných liečiv sú preventívne (kontrolujúce) antiastmatiká. Ich hlavnou úlohou je minimalizovať chronický zápal dýchacích ciest. Na organizmus pôsobia protizápalovo. Medzi typické preventívne antiastmatiká patria:

- inhalačné kortikosteroidy (IKS),
- inhalačné  $\beta_2$ -agonisty s dlhodobým účinkom (LABA),
- antileukotrieny (LTRA) .

IKS sú základné preventívne antiastmatiká, avšak vo vysokých dávkach majú nežiadúce účinky. Aby sa predišlo výskytu týchto nežiadúcich účinkov sú vysoké dávky IKS nahradzované LABA spolu s nízkymi dávkami IKS. Vďaka prospešným účinkom užívania oboch liečiv naraz sa používajú tzv. fixné kombinácie IKS a LABA, kedy sú obe liečivá kombinované v jednom inhalátore a sú užívané naraz. LTRA sa používajú ako náhrada nízkych dávok IKS, pričom najčastejšie používaná látka montelukast pôsobí na užšie spektrum zápalových reakcií, a tým nie je účinný u každého pacienta. Odporúča sa jeho užívanie u astmatikov s ďalšími alergickými prejavmi (napríklad alergická nádcha alebo ekzém) alebo u alergikov s intoleranciou aspirínu a ďalších protizápalových liekov. (Calverley, 1996; Teřl, 2007; Neumannová *et al.*, 2018)

## **3.2 Chronická obštrukčná choroba pľúc**

Chronická obštrukčná choroba pľúc (CHOCHP) je ochorenie patriace medzi obštrukčné choroby dýchacích ciest. Jej typickými príznakmi sú konštatné respiračné problémy a obmedzenie prechodu vzduchu v dôsledku vzniku alveolárnych a dýchacích abnormalít. (Neumannová *et al.*, 2018; GOLD, 2021)

### **3.2.1 Príčiny**

CHOCHP je výsledkom nahromadenia komplexných faktorov, od dlhodobého pôsobenia škodlivých plynov a častíc až po genetickú predispozíciu alebo slabý vývoj pľúc

v detstve. Svetovo najrozšírenejším rizikovým faktorom pre CHOCHP je fajčenie tabaku, avšak fajčenie nie je podmienkou vzniku tejto choroby. Medzi rizikové faktory ďalej patria napríklad vek (s vyšším vekom rastie pravdepodobnosť výskytu príznakov), pohlavie (na CHOCHP sú náchylnejšie ženy), vnútorné a vonkajšie znečistenie vzduchu (zvyšuje koncentráciu inhalovaných škodlivých plynov a častíc) alebo socioekonomický status jedinca (v chudobnejších oblastiach je zvýšené riziko prejavu príznakov CHOCHP). (GOLD, 2021)

### 3.2.2 Patofyziológia

Najčastejšie príznaky sú dýchavičnosť, chronický kašeľ (často je prvým symptómom, ktorý sa u pacienta prejaví), hvízdavé dýchanie a tlak na hrudi alebo zvýšená produkcia hlienu. (GOLD, 2021)

Ďalším príznakom tohoto ochorenia je chronický zápal, ktorý stimuluje makrofágy a neutrofile k produkcii zápal podporujúcich faktorov a proteolytických enzýmov. Tento zápal sa nemusí prejavíť iba v oblasti dýchacích ciest, ale často tvorí tzv. systémový zápal. Často sa spája s ochoreniami kardiovaskulárnymi, psychickými (napr. úzkosť a depresia), s metabolickými a výživovými poruchami (častým prejavom je úbytok váhy). (Petty, 2003; Neumannová *et al.*, 2018, GOLD, 2021)

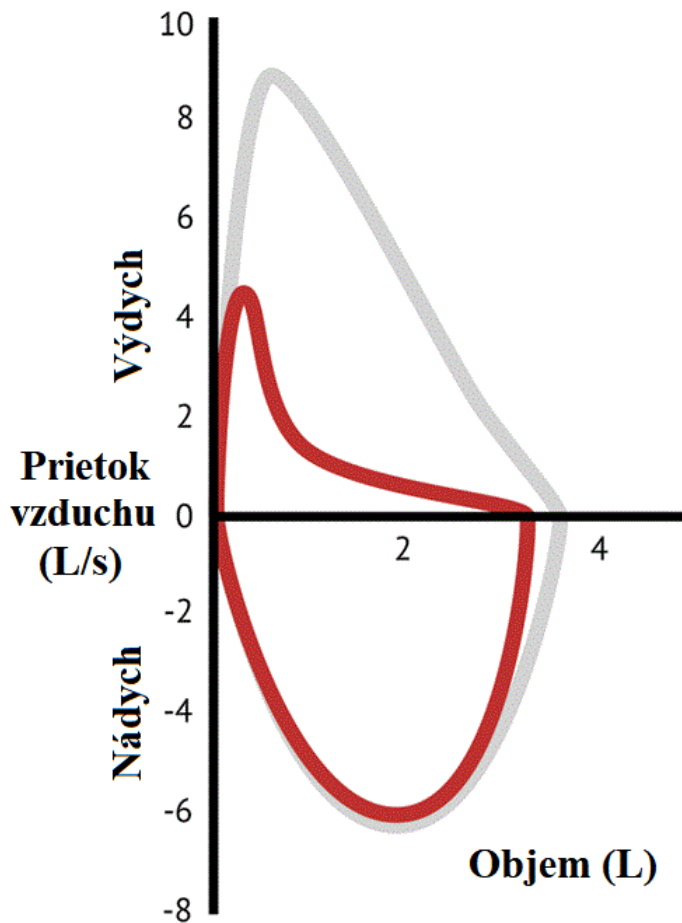
### 3.2.3 Diagnostika

Na určenie diagnózy CHOCHP je potrebné stanoviť stupeň obštrukcie dýchacích ciest a jeho vplyv na zdravotný stav pacienta, prípadne pravdepodobnosť výskytu nežiadúcich komplikácií v budúcnosti. Ošetrojúci lekár by mal zohľadniť tieto štyri faktory:

- prítomnosť a závažnosť spirometrického nálezu,
- aktuálny stav pacientových symptómov,
- história miernych a vážnych exacerbácií (zhoršení zdravotného stavu pacienta),
- prítomnosť komorbidít u pacienta. (GOLD, 2021)

Na potvrdenie diagnózy CHOCHP je nevyhnutné spirometrické vyšetrenie. Toto vyšetrenie sa vykonáva po podaní bronchodilatátorov (na maximálne možné uvoľnenie dýchacích ciest a na minimalizáciu variability), pričom sa sledujú dve hodnoty: FEV<sub>1</sub> a FVC. Hodnota pomeru FEV<sub>1</sub>/FVC (Tiffeneau index) menej ako 0,70 potvrdzuje prítomnosť konštantného obmedzenia dýchacích ciest a u pacientov s príslušnými

symptómami potvrdzuje diagnózu CHOCHP. Hlavným výstupom tohoto vyšetrenia je spirogram, na základe ktorého je možné dokázať obštrukciu dýchacích ciest u pacienta (**Obr. II**). (GOLD, 2021)



**Obr. II:** Spirogram u zdravého pacienta (sivá) a u pacienta s obštrukciou dýchacích ciest (červená). Prevzaté z Medschool (2021).

Doplňujúcimi testami na potvrdenie diagnózy CHOCHP sú napríklad:

- CAT™ test (COPD Assessment Test) – osembodový test popisujúci stupeň zhoršenia zdravotného stavu,
- CCQ® (COPD Control Questionnaire),
- mMRC (Modified British Medical Research Council Questionnaire) – meranie stupňa dýchavičnosti u pacienta.

Zatiaľ čo CAT™ a CCQ® popisujú stupeň vplyvu symptómov na pacientov zdravotný stav, mMRC popisuje konkrétne symptómy a umožňuje určiť zdravotný stav pacienta a predpokladať prípadnú pravdepodobnosť mortality pacienta. (GOLD, 2021)

### 3.2.4 Liečba

Po stanovení diagnózy je potrebné minimalizovať rizikové faktory u pacienta. Ošetrojúci lekár by mal pacientovi podať informácie o zdravom životnom štýle, o odporúčanej strave a množstve pohybovej aktivity, ktorá je prospešná v spomalení zhoršovania príznakov CHOCHP. Taktiež by mali byť pacientovi poskytnuté informácie ako zvládať dýchavičnosť, stresové situácie a ako šetriť energiou v rámci dňa. Od pacienta sa vyžaduje sledovanie svojho zdravotného stavu a pravidelné kontroly u ošetrojúceho lekára. (GOLD, 2021)

Farmakologická liečba slúži primárne na stlmenie príznakov a zníženie rizika vzniku exacerbácie, ale taktiež zlepšuje zdravotný stav pacienta. Výber liečiva závisí od dostupnosti a reakcie pacienta na dané liečivo, pričom sa uplatňuje postupné zvyšovanie dávok liečiva v závislosti od symptómov a stupňa obštrukcie dýchacích ciest (GOLD 1-4). Najčastejšie sú na liečbu CHOCHP používané bronchodilatátory (štádium I) a anticholinergiká (štádium III). (Neumannová *et al.*, 2018; GOLD, 2021)

Inhalačné bronchodilatátory sa používajú najmä na zväčšenie FEV<sub>1</sub>, pričom pôsobia na hladkú svalovinu dýchacích ciest a tým dočasne zväčšia prietok vzduchu do pľúc. Najpoužívanejšími liekmi spomedzi bronchodilatátorov sú  $\beta_2$ -agonisty:

- $\beta_2$ -agonisty s krátkodobým účinkom (SABA), ktoré pôsobia 4-6 hodín,
- $\beta_2$ -agonisty s dlhodobým účinkom (LABA), ktoré pôsobia 12 hodín a dlhšie.

(Neumannová *et al.*, 2018; GOLD, 2021)

Inhalačné anticholinergiká sú odporúčané od štádia II CHOCHP, pričom ich pacient užíva buď samostatne alebo v kombinácii s LABA a používajú sa na rovnaké účely ako bronchodilatátory. Taktiež sú rozdelené na:

- anticholinergiká s krátkodobým účinkom (SAMA), ktoré pôsobia 6-8 hodín,
- anticholinergiká s dlhodobým účinkom (LAMA), ktoré pôsobia 12-24 hodín.

(Neumannová *et al.*, 2018; GOLD, 2021)

### 3.2.5 Exacerbácie

Exacerbáciu pri CHOCHP je možné definovať ako akútne zhoršenie respiračných príznakov pacienta, ktoré vyžaduje dodatočnú liečbu. Často sú spojené so zápalom pľúc a zvýšenou tvorbou hlienu, ktoré zhoršujú dýchavičnosť pacienta. Ak nie sú zachytené dostatočne skoro, môžu vyvolať vážne zdravotné problémy a tým zhoršiť aj stav pacienta



s CHOCHP. Exacerbácie sa môžu vyskytovať samostatne, ale taktiež sa ich môže u pacienta vyskytnúť viaceroraz a ak už pacient jednu exacerbáciu prekoná, je vysoká pravdepodobnosť, že sa uňho vyskytne ďalšia. Typická exacerbácia trvá 7-10 dní, pričom pri pomalom zotavovaní pacienta je vysoká pravdepodobnosť zhoršenia stavu CHOCHP. (GOLD, 2021)

Spúšťačom exacerbácií sú najmä virálne a bakteriálne infekcie, ktoré sú často sprevádzané negatívnymi vplyvmi prostredia (napr. znečistené ovzdušie alebo výkyvy teplôt pri zmene počasia). (Neumannová *et al.*, 2018) Najčastejšou príčinou vzniku exacerbácie je ľudský rinovírus, ktorý bežne spôsobuje nádchu, pričom exacerbácie spôsobené vírusmi majú u pacientov s CHOCHP často ťažký priebeh, trvajú dlhšie a vyžadujú hospitalizáciu pacienta. (GOLD, 2021)

Liečba exacerbácie závisí od patogénu, ktorý zhoršenie stavu spôsobil. Najčastejšími liečivami sú bronchodilatátory, glukokortikoidy a antibiotiká. Bronchodilatátory sú používané na akútnu liečbu exacerbácie. Väčšinou sú inhalované beta<sub>2</sub>-agonisty s krátkym účinkom. Liečba glukokortikoidmi skracuje dobu zotavenia, zlepšuje funkciu pľúc, zlepšuje zásobenie buniek kyslíkom a skracuje dĺžku hospitalizácie. Najčastejšie sa používajú prednison a metylprednison, ktoré sa podávajú orálne. Použitie antibiotík na liečbu exacerbácií je odporúčané v prípade bakteriálnej infekcie, ktorá sa u pacienta prejavuje zvýšenou dýchavičnosťou, väčším objemom vyprodukovaného hlienu a podľa stupňa hnisavosti hlienu. Na výber správneho antibiotika je potrebné vykonať test rezistencie bakteriálnej kultúry voči rôznym antibiotikám. Liečba antibiotikami by nemala presahovať dĺžku 7 dní. (GOLD, 2021)

### **3.2.6 Komorbidity**

Komorbidity sú choroby ktoré sa prejavujú u pacienta spolu s CHOCHP a majú veľký vplyv na jej prognózu. Napriek tomu, že komorbidity môžu zhoršiť priebeh CHOCHP, CHOCHP je hlavná komorbidita pre pacientov trpiacich na iné choroby (pacienti trpiaci na iné choroby majú vyššiu mortalitu ak zároveň trpia aj na CHOCHP). (GOLD, 2021)

Približne polovica pacientov s CHOCHP majú diagnostikované aspoň 4 komorbidity, z ktorých väčšina nie je bežne asociovaná s CHOCHP. Existuje 5 skupín komorbidít: kardiovaskulárne, metabolické, psychologické, kachektické a komorbidity s menším vplyvom. (Jones *et al.*, 2016) Medzi bežne sa vyskytujúce komorbidity patria chronické

choroby ako napr. kardiovaskulárne choroby (ischemická choroba srdca, arytmia, hypertenzia), rakovina pľúc, osteoporóza, psychické poruchy (úzkosť a depresia) a cukrovka. (Jones *et al.*, 2016; GOLD, 2021)

### **3.3 ACO syndróm**

Asthma bronchiale a chronická obštrukčná choroba pľúc sa môžu prejavovať naraz u jedného pacienta. V tom prípade hovoríme o AB-CHOCHP prekryve, ktorý má oficiálny názov ACO syndróm (Asthma bronchiale – Chronic obstructive pulmonary disease Overlap). Tento syndróm je heterogénne ochorenie, v ktorom sú v rôznej miere zastúpené určité znaky každého ochorenia (AB aj CHOCHP). ACO syndróm sa svojimi príznakmi líši u každého pacienta, pričom má pacient väčšie zdravotné ťažkosti, ako keby sa uňho prejavilo iba jedno ochorenie. (Maselli *et Hanania*, 2019; Pauk, 2019)

#### **3.3.1 Príčiny**

Hlavným rizikovým faktorom ovplyvňujúcim prejav ACO u pacienta je fajčenie tabaku. Fajčenie urýchljuje degradáciu pľúcneho tkaniva a tým urýchljuje znižovanie funkcie pľúc. Pacienti, ktorí majú diagnostikovanú AB a súčasne aktívne fajčia, majú vyššiu pravdepodobnosť zhoršenia príznakov a taktiež majú oslabenú reakciu voči kortikosteroidom (liečbe AB). Taktiež majú vyššiu pravdepodobnosť remodelácie dýchacích ciest a tým vytvorenia trvalej obštrukcie dýchacích ciest, čo je hlavný príznak CHOCHP. (Desai *et al.*, 2017)

Ďalšími faktormi, ktoré môžu ovplyvňovať vznik ACO, u pacienta sú napríklad genetická predispozícia alebo dlhotrvajúca expozícia znečistenému ovzdušiu. Pravdepodobnosť vývoja ACO je taktiež vyššia u pacientov s diagnostikovanou AB, u ktorých sa vyskytujú príznaky častejšie a majú závažnejší charakter. (Liang *et al.*, 2017)

#### **3.3.2 Patofyziológia**

V rámci ACO je možné pozorovať u toho istého pacienta príznaky špecifické nielen pre AB, ale aj CHOCHP (**Tab. I**). Hlavnými príznakmi, ktoré sa u pacienta s ACO vyskytujú, sú napríklad kašeľ, zvýšená produkcia hlienu, hvízdavé dýchanie alebo dýchavičnosť. (Maselli *et Hanania*, 2019)

ACO sa oproti CHOCHP prejavuje zvyčajne u mladších pacientov, okolo 50-60 ročných, ktorí patria do skupiny bývalých alebo súčasných fajčiarov. Taktiež sa u nich zvyčajne prejavuje znak alergického ochorenia, ako napríklad alergická nádcha, ekzém alebo samotná AB. (Pauk, 2019)

**Tab. I:** Porovnanie AB a CHOCHP. Prevzaté z Pauk (2019) , upravené.

Parameter	AB	CHOCHP
Začiatok príznakov	Pred 20. rokom života	Po 40. roku života
Príznaky	Variabilita v priebehu minút, hodín, dní	Trvalé príznaky aj napriek terapii
	Zhoršenie v noci a zavčas nad ráno	Dobré a zlé dni, ale trvalé denné príznaky a ponáhľavá dýchavičnosť
	Spúšťáče – fyzická námaha, emócie, prach, alergén	Chronický kašeľ, produkcia hlienu nezávisle od spúšťáča
Funkcia pľúc	Variabilná priedušková obštrukcia	Trvalá obštrukcia
Funkcia pľúc v období medzi príznakmi	Normálne	Abnormálne
Anamnéza (vrátane rodinnej)	Výskyt AB v rodine	Výskyt CHOCHP, chronickej bronchitídy a emfyzému v rodine
	Rodinná anamnéza AB, atopie, ekzému, alergickej nádchy	Rizikové faktory – fajčenie cigariet, spaľovanie biomasy
Priebeh	Príznaky sa nezhoršujú v čase, iba sezónne	Príznaky sa časom horšia
	Zlepšenie spontánne alebo po liečbe	Bronchodilatátory spôsobia len čiastočnú úľavu

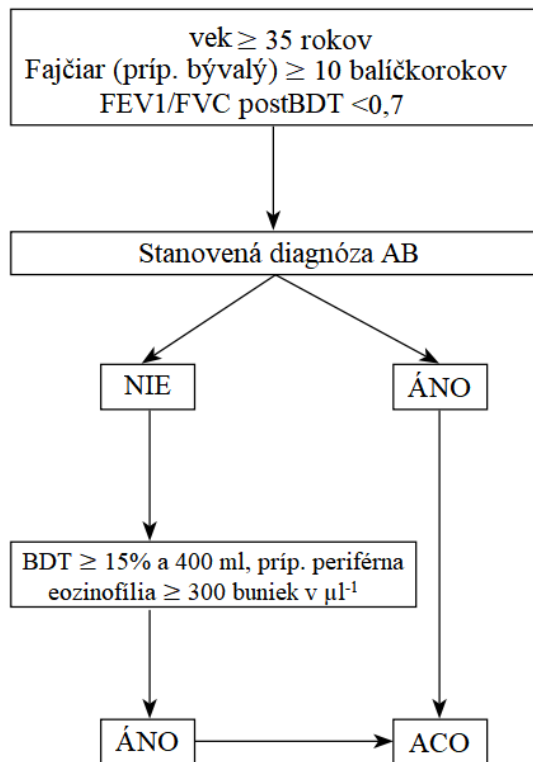
### 3.3.3 Diagnostika

Medzinárodné organizácie pre AB aj CHOCHP sa zhodujú v odporúčanom postupe pri stanovení diagnózy ACO. Tento postup má tri kroky:

- zhodnotiť prítomnosť chronického ochorenia dýchacích ciest,
- rozhodnúť, či príznaky prejavujúce sa u pacienta sú typické pre AB alebo CHOCHP,
- vykonať test funkcie pľúc zameraný na objem a difúziu kapacitu pľúc.

(Desai *et al.*, 2017; Maselli *et Hanania*, 2019)

Podľa španielskeho odporúčenia je vytvorený jednoduchý postup stanovenia diagnózy ACO (**Obr. III**). Toto odporúčenie taktiež popisuje určité klinické znaky, ktorými sa pacient s ACO odlišuje od pacientov s AB alebo CHOCHP. Sú to napríklad: rýchla strata funkcie pľúc, väčšia dýchavičnosť, častejšie exacerbácie alebo lepšia odpoveď na IKS (oproti CHOCHP). (Pauk, 2019)



**Obr. III:** Postup stanovenia diagnózy ACO. Prevzaté z Pauk (2019), upravené. .

Na základe pomeru príznakov špecifických pre AB a CHOCHP je ACO rozdelené do troch fenotypov, na základe ktorých je následne určený typ liečby:

- AB so znakmi CHOCHP (viac príznakov špecifických pre AB),
- CHOCHP so znakmi AB (viac príznakov špecifických pre CHOCHP),
- prekryv AB a CHOCHP (podiel príznakov je približne 1:1).

(Liang *et al.*, 2017)

### 3.3.4 Liečba

Hlavným princípom liečby ACO syndrómu je kontrola príznakov a sníženie exacerbácií s minimálnymi nežiaducimi účinkami liečby. Táto liečba musí obsahovať zložky účinné na príznaky AB aj CHOCHP. Správne zvolená liečba musí byť bezpečná, dostupná a musí byť zameraná na zníženie rizika a funkčného postihnutia pľúc u oboch ochorení.

Cieľom zvolenej liečby je snaha o elimináciu zápalu dýchacích ciest, ovplyvnenie hypertrofiie hladkých svalov a humorálnych procesov prispievajúcich k zápalu a bronchokonstrikcii. (Desai *et al.*, 2017; Pauk, 2019)

Podľa spektra účinku liečiva je rozdelená do dvoch skupín:

- liečba s úzkym spektrom účinku,
- širokospektrálna liečba.

Liečba s úzkym spektrom účinku je zameraná na úľavu od príznakov jedného alebo druhého ochorenia. Medzi takéto liečivá patria antileukotrieny alebo monoklonálne protilátky. Oproti nej širokospektrálna liečba účinkuje na príznaky oboch ochorení naraz. Medzi širokospektré liečivá patria bronchodilatátory, kortikosteroidy a antibiotiká, ktoré účinkujú pri AB aj CHOCHP. Vo väčšine prípadov je pacientovi ordinovaná práve širokospektrálna liečba, konkrétne kombinácia LABA a LAMA, ktorá je účinná pri oboch ochoreniach. (Postma *et Rabe*, 2015; Pauk, 2019)

### **3.4 TGFβ**

TGFβ, transformujúci rastový faktor, môžeme charakterizovať ako sekrečný proteín, ktorý je evolučne zachovalý a jeho expresia sa líši ako v embryotických bunkách, tak aj v dospelých bunkách. Tento proteín spolu s ďalšími proteínmi z jeho rodiny ovplyvňujú široké spektrum bunecných funkcií, pričom najdôležitejšia je ich rola v bunecnom prežití a smrti. Do jeho rodiny patria napríklad aktivíny, myostatín alebo kostné morfogenetické proteíny (BMPs). (Zhang *et al.*, 2017) Táto rodina je popísaná na základe objavu cytokinínu, ktorý po pridaní do bunecnej línie spolu s epidermálnym rastovým faktorom (EGF) inicioval rast buniek, bez potreby priľnutia k povrchu. V súčasnosti sú objavené tri izoformy TGFβ, pričom každá izoforma vplyva na bunky odlišne. Tieto tri izoformy sú považované za najúčinnnejšie inhibítory rastu bunky. Taktiež sú schopné zablokovať proliferáciu väčšiny typov buniek. (Morikawa *et al.*, 2016)

#### **3.4.1 Expresia**

TGFβ je, rovnako ako všetky ostatné proteíny z jeho rodiny, kódovaný veľkými polypeptidovými prekurzormi. Tieto prekurzory sú zložené z troch častí. Na amino-konci sa nachádza signálny peptid, ktorý je odstránený počas translokácie proteínu do lumenu endoplazmatického retikula. Na karboxy-konci sa nachádza polypeptid, ktorý je potrebný

pre aktiváciu a dozrievanie proteínu z TGF $\beta$  rodiny. Medzi koncovými peptidmi obsahuje prekursor tzv. prosegment, sekvenciu aminokyselín, ktorá sa líši dĺžkou u každého proteínu z tejto rodiny. U troch izoforiem TGF $\beta$  sú tieto sekvencie pomenované latency-associated peptides (LAPs). LAPs ostávajú po sekrecii zrelého TGF $\beta$  diméru naviazané nekovalentne a tým udržujú proteín v latentnom stave. LAP spolu s proteínom tvoria SLC (small latent complex). Aby bol TGF $\beta$  proteín schopný naviazať sa na svoj povrchový receptor, musia byť tieto LAPs odstránené. To sa deje naviazaním SLC na integríny, napr.  $\alpha_v\beta_6$  alebo  $\alpha_v\beta_8$  a s použitím kontraktilnej sily na ich následné rozdelenie. (Morikawa *et al.*, 2016)

### 3.4.2 Receptory

Proteíny z TGF $\beta$  rodiny spúšťajú signalizáciu naviazaním sa na špecifické kinázové receptory na povrchu cieľových buniek. Tieto kinázové receptory patria do skupiny serín/threonínových kinázových receptorov aj napriek tomu, že sú to receptory s duálnou špecificitou a svojou štruktúrou sa podobajú ako na serín/threonínové tak aj na tyrozínové kinázy. Naviazanie TGF $\beta$  proteínu na receptory spôsobí vytvorenie heterotetramérického komplexu dvoch receptorov typu I (T $\beta$ RI) a dvoch receptorov typu II (T $\beta$ RII). V ľudskom organizme existuje sedem druhov receptoru typu I a päť druhov receptoru typu II, pričom každý proteín z TGF $\beta$  rodiny sa viaže na špecifickú kombináciu receptorov typu I a II. Vytvorenie komplexu spustí fosforyláciu receptorov typu I a následnú aktiváciu receptorom aktivovaných (R-) Smad proteínov. Tie vytvoria spolu so Smad4 transkripčné komplexy, ktorú sú translokované do jadra, kde za spolupráce s koaktivátormi, korepresormi a ďalšími kofaktormi viažucimi DNA regulujú expresiu určitých génov. (Heldin *et Moustakas*, 2016; Zhang *et al.*, 2017;)

Naviazanie TGF $\beta$  proteínu na membránový receptor je ovplyvnené jeho interakciou s ostatnými transmembránovými proteínmi a proteínmi, ktoré sú v membráne ukotvené pomocou glykofoinositolu (GPI). Takéto koreceptory majú vplyv na dostupnosť signálnych kinázových receptorov alebo regulujú prezentáciu ligandu receptoru. Medzi koreceptory patria napr. betaglykán, endoglin alebo CD109. (Heldin *et Moustakas*, 2016)

Betaglykán, taktiež známy pod názvom T $\beta$ RIII, je transmembránový proteoglykán, ktorého extracelulárna doména obsahuje dve laločnaté subdomény oddelené spájacou doménou. Každá laločnatá subdoména sa zapája do procesu viazania ligandu, čo

z betaglykánu robí koreceptor s vysokou afinitou. Betaglykán je schopný naviazať všetky tri izoformy TGF $\beta$  a zároveň stabilizuje T $\beta$ RI a T $\beta$ RII komplex. Táto vlastnosť je veľmi dôležitá pre TGF $\beta$ 2, ktorý sa na T $\beta$ RII receptor viaže s nízkou afinitou. (Heldin *et Moustakas*, 2016)

Endoglin je exprimovaný hlavne v bunkách endotelu, pričom slúži ako výpomoc pri viazaní TGF $\beta$  proteínu na TGF $\beta$  receptor. Jeho vplyv na signalizáciu TGF $\beta$  je rozdielny, negatívne reguluje aktiváciu Smad2 a Smad3, ale pozitívne reguluje aktiváciu Smad1, Smad5 a Smad8. (Heldin *et Mouskas*, 2016)

CD109 je proteín ukotvený pomocou GPI a viaže TGF $\beta$ 1 proteín s vyššou afinitou oproti ostatným TGF $\beta$  proteínom. Taktiež je schopný vytvoriť komplex s TGF $\beta$  receptorom a tým negatívne reguluje TGF $\beta$  signalizáciu. CD109 transportuje TGF $\beta$  receptory do kaveol a napomáha ich degradácii. (Heldin *et Moustakas*, 2016)

### 3.4.3 Regulácia

Pri regulácii proteínov TGF $\beta$  majú veľmi dôležitú úlohu typy receptorov, z ktorých sa skladá aktivovaný heterodimérický komplex. Na základe prítomnosti určitých receptorov dochádza po aktivácii k potlačeniu alebo podpore bunecnej proliferácie. Ďalším dôležitým faktorom ovplyvňujúcim účinky TGF $\beta$  proteínov sú koreceptory. Tento spôsob regulácie je bližšie popísaný v sekcii 3.4.2. (Heldin *et Moustakas*, 2016; Zhang *et al.*, 2017)

Tak ako môžu byť regulované samotné proteíny, môžu byť regulované aj receptory. Zaujímavý spôsob regulácie je napríklad regulácia pomocou endocytózy. Aktivované heterodimérické komplexy receptorov sú pomocou klathrínom obalených vezikul internalizované do endozómov. Ak dôjde k prerušeniu toho procesu, dochádza k supresii fosforylácie a následnej signalizácie R-Smad a tým je narušený účinok TGF $\beta$  proteínu. Po internalizácii je väčšina receptorov vrátená späť na bunecný povrch, pričom táto recyklácia receptoru prebieha nezávisle na prítomnosti naviazaného ligandu. (Heldin *et Moustakas*, 2016)

### 3.4.4 Funkcia

Účinky proteínov z TGF $\beta$  rodiny na bunky sú veľmi rozličné. TGF $\beta$  proteíny sú schopné inhibovať rast u niektorých typov buniek, zatiaľ čo u iných podporujú proliferáciu buniek

za špecifických podmienok. TGF $\beta$  môžu stimulovať proliferáciu určitých buniek, ako napr. chondrocytov, osteoblastov, mesenchymálnych kmeňových buniek (MSCs) alebo fibroblastov. Taktiež sú TGF $\beta$  proteíny schopné v tých istých bunkách ako vyvolávať, tak aj inhibovať rast, v závislosti od podmienok. Rovnako aj ligandy TGF $\beta$  sú spojené s diferenciáciou do rozličných línií, ako napr. imunitné bunky, krvné telieska alebo nervové bunky. (Morikawa *et al.*, 2016)

Proteíny z rodiny TGF $\beta$  majú vplyv aj na apoptózu buniek. Tento vplyv je odlišný u každej bunky, v závislosti na type bunky a na podmienkach prostredia. Apoptóza indukovaná TGF $\beta$  proteínmi je veľmi dôležitá pri vytváraní končatín počas vývoja organizmu. Taktiež sa TGF $\beta$  proteíny preukazujú ako veľmi schopné induktory apoptózy v hepatocytoch v prípade cirhózy pečene. (Zhang *et al.*, 2017)

TGF $\beta$  taktiež vykazuje schopnosť redukovať populácie buniek schopné vyvolať rakovinu v určitých druhoch tkanív, ako napr. rakovina prsníka, rakovina pankreasu alebo difúzny typ rakoviny žalúdka. (Morikawa *et al.*, 2016)

### **3.4.5 Porovnanie izoform TGF $\beta$**

Existujú tri hlavné izoformy TGF $\beta$  – TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 a TGF $\beta$ 3. V niektorých biologických funkciách sa všetri tri izoformy zhodujú, avšak každá izoforma vplýva na inú oblasť.

TGF $\beta$ 1 je proteín ovplyvňujúci rast a diferenciáciu buniek. Ovplyvňuje napríklad funkciu imunitných buniek, vaskulogenézu, hematopoézu a taktiež reakciu organizmu na neurodegradáciu. Taktiež hrá dôležitú úlohu v remodelácii kostí, kde reguluje premenu buniek na osteoblasty a spôsobuje chemotaxiu, proliferáciu a diferenciáciu zapojených osteoblastov, ako aj stimuluje tvorbu kolagénu. Jeho deficit spôsobuje defekty vo vývoji a funkcii imunitného systému. (Shull *et al.*, 1992; Memon *et al.*, 2008; Morikawa *et al.*, 2016; GeneCards, 2021)

TGF $\beta$ 2 je proteín ovplyvňujúci rozličné procesy, ako napríklad angiogenézu alebo správny vývoj srdca. Taktiež podporuje diferenciáciu buniek na chondrocyty. Jeho deficit v organizme spôsobuje defekty v kardiopulmonárnom vývoji, vo vývoji urogenitálnej sústavy alebo vo vývoji zmyslovej sústavy (napríklad zraku alebo sluchu). (Sanford *et al.*, 1997; Memon *et al.*, 2008; Morikawa *et al.*, 2016; GeneCards, 2021)



TGF $\beta$ 3 je proteín zapojený do regulácie embryogenézy a diferenciácie buniek. Je nevyhnutný na správny vývoj pľúc v ústnej dutine. Jeho deficit spôsobuje oneskorenie vývoja dýchacej sústavy. (Kaartinen *et al.*, 1995; Memon *et al.*, 2008; GeneCards, 2021)

## 4 MATERIÁL A METÓDY

### 4.1 Súbor pacientov

Táto štúdia merala relatívnu expresiu TGF $\beta$ 2 u 49 jedincov, ktorí boli diagnostikovaní na Oddelení pľúcnych chorôb a tuberkulózy vo Fakultnej nemocnici v Olomouci, z toho 13 pacientov bolo s diagnózou asthma bronchiale, 14 pacientov bolo s diagnózou chronická obštrukčná choroba pľúc a 22 pacientov patrilo do kontrolnej skupiny (**Tab. II**). Asthma bronchiale bola stanovená na základe medzinárodných odporúčení pre AB (GINA – Global Initiative for Asthma). Chronická obštrukčná choroba pľúc bola stanovená na základe medzinárodných odporúčení pre CHOCHP (GOLD – Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease). Do kontrolnej skupiny boli zaradení pacienti, u ktorých nebola preukázaná AB, CHOCHP ani iné akútne alebo chronické pľúcne choroby.

**Tab. II:** Charakteristika pacientov.

Charakteristika	AB	CHOCHP	KS
Počet pacientov	13	14	22
Aktívni fajčiari	2	8	8
Bývalí fajčiari	1	1	1
Nefajčiari	9	4	12
Chýbajú data o fajčení	1	1	1
Vekový priemer (min a max)	35 (20; 54)	50 (24; 79)	43 (20; 67)
Muži/ženy	4/9	6/8	10/12
Priemer makrofágov [%]	73.6	82.3	72.25
Priemer lymfocytov [%]	14	3.6	16
Priemer neutrofilov [%]	6	6	8.5
Priemer eosinofilov [%]	6.4	0.9	3.3
Priemer CD4+ [%]	34.8	40.3	6.3
Priemer CD8+ [%]	31.2	24.5	19.3
Priemerný pomer CD4+/CD8+ [%]	1.3	2.1	3.7

Na laboratórne stanovenie relatívnej expresie TGF $\beta$ 2 boli použité vzorky bronchoalveolárnej laváže.



#### **4.2.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy**

##### **A) Izolácia mRNA**

mRNA bola zo vzoriek bronchoalveolárnej laváže izolovaná pomocou mirVana miRNA isolation kit, ktorý bol pred použitím vytemperovaný na izbovú teplotu. Taktiež sa pracovalo v RNase free zóne, ktorá bola dosiahnutá pomocou Rnase AWAY Surface Decontaminant.

RNA later, v ktorom boli bunky uchované pri teplote  $-20^{\circ}\text{C}$ , bol odstránený pridaním  $350\ \mu\text{l}$  PBS a následnou centrifugáciou pri  $4000\text{g}$  po dobu 60 minút pri teplote  $4^{\circ}\text{C}$ . Po usadení buniek na dno mikroskúmavky bol supernatant odstránený. Následne bolo k sedimentovaným bunkám pridaných  $600\ \mu\text{l}$  lysis/binding solution. Po dôkladnom zvortexovaní bolo k lyzátu pridaných  $1/10$  objemu miRNA Homogenate Additive. Obsah mikroskúmavky bol premiešaný a nechán stáť na ľade 10 minút. Po uplynutí 10 minút bola pridaná dolná fáza Acid-Phenol/Chloroformu v rovnakom objeme aký mal pôvodný lyzáť (pred pridaním miRNA Homogenate Additive). Obsah mikroskúmavky bol krátko zvortexovaný a následne zcentrifugovaný pri  $10\ 000\text{g}$  po dobu 5 minút pri izbovej teplote. Touto centrifugáciou dojde k oddeleniu vodnej a organickej fázy, pričom vodná fáza bola opatrne odpipetovaná a prenesená do novej mikroskúmavky. K vodnej fázi bolo pridaných  $1,25\text{x}$  objemu 100% ethanolu. Na filter umiestnený v novej mikroskúmavke bolo prenesených  $700\ \mu\text{l}$  zmesi, ktorá bola následne centrifugovaná pri  $10\ 000\text{g}$  po dobu 15 sekúnd a tekutina, ktorá pretiekla do mikroskúmavky bola odstránená. Tento krok bol opakovaný, pokiaľ nebola spotrebovaná celá vzorka. Na filter bolo nanosených  $700\ \mu\text{l}$  wash solution 1 a filter bol centrifugovaný pri  $10\ 000\text{g}$  po dobu 10 sekúnd. Tekutina, ktorá pretiekla filtrom bola odstránená. Následne bolo na filter nanosené  $500\ \mu\text{l}$  wash solution 2/3 a filter bol centrifugovaný pri  $10\ 000\text{g}$  po dobu 10 sekúnd. Tento krok bol opakovaný dvakrát. Filter bol následne ešte raz centrifugovaný pri  $10\ 000\text{g}$  po dobu 1 minúta, aby z neho bola odstránená zvyšná tekutina. Následne bol filter prenesený do novej mikroskúmavky, kde naňho bolo nanosených  $100\ \mu\text{l}$  Rnase-free vody, ktorá bola predhriata na  $95^{\circ}\text{C}$ . Filter bol centrifugovaný pri  $14\ 000\text{g}$  po dobu 30 sekúnd, aby došlo k elúcii vyizolovanej mRNA z filtra do mikroskúmavky. Na záver bolo k  $100\ \mu\text{l}$  mRNA pridané  $2\ \mu\text{l}$  Rnazínu. Takto pripravená vzorka bola skladovaná v  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## B) Reverzná transkripcia

Vzorky vyizolovanej mRNA skladované v  $-80^{\circ}\text{C}$  boli pomaly rozpustené na ľade a zvortexované. RT mix bol pripravený podľa **Tab. III**. Jemne premiešaný RT mix bol rozpipetovaný k RNA v pomere 17,5:2,5 (celkový objem reakcie bol 20  $\mu\text{l}$ ). Následne bola uskotočnená reverzná transkripcia za podmienok uvedených v **Tab. IV**. Po ukončení reakcie boli vzorky ihneď dané do ľadu a cDNA bola uchovaná pri teplote  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Tab. III:** Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu mRNA.

Zložka RT mixu	1 reakcia [ $\mu\text{l}$ ]
5X VILO™ Reaction Mix	4.0
10X SuperScript™ Enzyme Mix	2.0
RNase-free voda	11.5

**Tab. IV:** Teplotný profil reverznej transkripcie.

Teplota	Čas
25°C	10 min
42°C	60 min
85°C	5 min

## C) Kvantitatívna PCR

Jednotlivé vzorky templátovej cDNA boli pred začatím kvantitatívnej PCR nariedené na rovnakú koncentráciu.

Nariedené vzorky templátovej cDNA skladované pri teplote  $-20^{\circ}\text{C}$  boli pomaly rozpustené na ľade a zvortexované. PCR mix bol pripravený podľa **Tab. V**. Jemne premiešaný PCR mix bol rozpipetovaný k templátovej cDNA v pomere 16:4 (celkový objem reakcie bol 20  $\mu\text{l}$ ). Následne boli vzorky vložené do termálneho cykleru Rotor Gene 3000 a prebehla PCR reakcia za podmienok uvedených v **Tab. VI**.

**Tab. V:** Zloženie reakčnej zmesi pre PCR reakciu.

Zložka PCR mixu	1 reakcia [ $\mu$ l]
20X TaqMan® Gene Expression Assay	1
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	10
RNase-free voda	5

**Tab. VI:** Teplotný profil PCR reakcie.

Teplota	Čas
50°C	2 min
95°C	10 min
95°C	15 sec
60°C	1 min

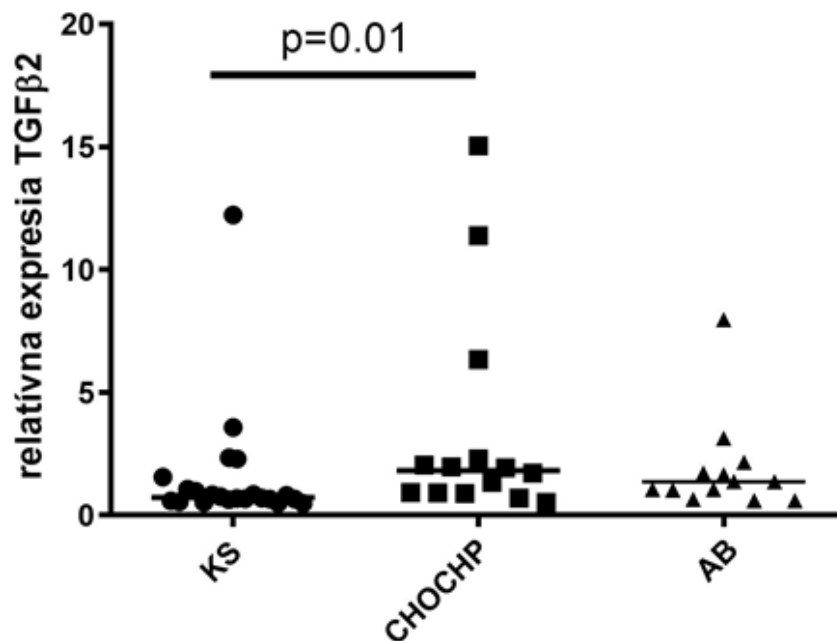
40 cyklov

### 4.3 Štatistické vyhodnotenie

Na štatistické vyhodnotenie výsledkov získaných laboratórnym stanovením relatívnej expresie TGF $\beta$ 2 bol použitý Man-Whitney test. Hodnoty  $p < 0.05$  boli považované za štatisticky významné. Na grafické zobrazenie výsledkov Man-Whitney testu bol použitý program GraphPad Prism.

## 5 VÝSLEDKY

Na základe výsledkov analýzy získaných hodnôt expresie TGF $\beta$ 2 (**Obr. IV**) je možné skonštatovať, že hodnota expresie bola štatisticky významne zvýšená u pacientov s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc v porovnaní s kontrolnou skupinou ( $p = 0.01$ ). Relatívna expresia TGF $\beta$ 2 sa nelíšila medzi pacientmi s astmou bronchiale a kontrolnou skupinou ( $p > 0.05$ ). Relatívna expresia TGF $\beta$ 2 sa nelíšila medzi pacientmi s astmou bronchiale a pacientmi s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc ( $p > 0.05$ ).



**Obr. IV:** Hodnoty relatívnej expresie TGF $\beta$ 2 u jednotlivých skupín pacientov. KS – kontrolná skupina ( $n = 22$ ), AB – pacienti s diagnózou astma bronchiale ( $n = 13$ ), CHOCHP – pacienti s diagnózou chronická obštrukčná choroba pľúc ( $n = 14$ ).

## 6 DISKUSIA

Výsledky tejto práce ukázali zvýšenú expresiu TGF $\beta$ 2 u pacientov s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc (CHOCHP). Hodnota expresie TGF $\beta$ 2 sa nelíšila medzi kontrolnou skupinou a pacientmi s astmou bronchiale (AB).

Výsledky pozorované v tejto práci môžeme porovnávať s prácou Batra *et al.* (2004), v ktorej sa autori zamerali na proteínovú hladinu TGF $\beta$ 2 po stimulácii alergénom. Vo svojej práci pozorovali zníženú expresiu TGF $\beta$ 2 u pacientov s AB. Medzi možné dôvody odlišnosti výsledkov môžeme zaradiť použitie odlišného metodického postupu alebo malý súbor pacientov (19 pacientov). Taktiež môžu byť výsledky odlišné z dôvodu pozorovania odlišného štádia AB u pacientov – autori v tejto práci pracovali s menej ťažkým štádiom astmy a naša práca skúmala vzorky od pacientov so stabilnou astmou.

Na rozdiel od Batra *et al.* (2004) došli Balzar *et al.* (2005) k opačnému záveru. V práci, ktorá tiež pozorovala súvislosť medzi hodnotou expresie TGF $\beta$ 2 a diagnózou AB, použili vzorky od 40 pacientov, čo sa veľkosťou súboru pacientov podobá našej štúdií. Na základe dvojitej imunofluorescencie pozorovali zvýšený počet TGF $\beta$ 2 pozitívnych buniek u pacientov s ťažkou astmou v porovnaní s pacientmi s miernou formou astmy a kontrolnou skupinou. To naznačuje možnosť, že expresia TGF $\beta$ 2 môže byť ovplyvnená závažnosťou AB.

V prípade CHOCHP pozorovali hodnoty expresie TGF $\beta$ 2 autori Di Stefano *et al.* (2018). Na základe svojich pozorovaní došli k záveru, že hodnoty expresie TGF $\beta$ 2 sa nelíšili medzi skupinou pacientov s CHOCHP a kontrolnou skupinou. Odlišnosť výsledkov môže byť spôsobená pozorovaním hodnoty expresie TGF $\beta$ 2 na menšom súbore pacientov (24 pacientov) alebo použitím odlišnej metódy (pozorovali bunky prieduškového tkaniva farbené imunohistochemicky).

Naopak Zhu *et al.* (2020) pozorovali hodnotu expresie TGF $\beta$ 2 zníženú oproti kontrolnej skupine. Vo svojej práci použili celogenómové sekvenovanie a analýzu RNA-sekvencií. Táto štúdia zahŕňala vzorky pľúcneho tkaniva od 91 pacientov s diagnostikovanou CHOCHP a 182 pacientov v kontrolnej skupine. Odlišnosť výsledkov môže byť spôsobená rozdielnou použitou metódou, pozorovania iného biologického materiálu od pacientov alebo taktiež odlišným počtom pacientov zapojených do štúdie (naša štúdia mala užší súbor pacientov). Výsledky tejto štúdie by mali byť potvrdené na ďalšej úrovni, inou metódou a na nezávislom súbore pacientov.



Súčasné znalosti o TGF $\beta$ 2 v klinických štúdiách sú limitované. Väčšina predchádzajúcich prác sa zamerala na TGF $\beta$ 1. Hodnoty expresie TGF $\beta$ 1 u pacientov s AB pozorovali Reddington *et al.* (1997), pričom vo svojej práci namerali mierne zvýšenú hodnotu expresie pred a výrazne zvýšenú hladinu expresie TGF $\beta$ 1 po stimulácii alergénom. Godinas *et al.* (2017) v štúdií pozorujúcej expresiu TGF $\beta$ 1 vo vzorkách sputa od pacientov s diagnostikovanou CHOCHP našli zvýšenú hodnotu expresie TGF $\beta$ 1. Taktiež Mahmood *et al.* (2016), ktorí pracovali so vzorkami biopsie dýchacích ciest od pacientov s CHOCHP, pozorovali zvýšenú expresiu TGF $\beta$ 1 aj napriek použitiu iného biologického materiálu a inej metódy. Výsledky všetkých troch štúdií (Reddington *et al.*, 1997; Godinas *et al.*, 2017 aj Mahmood *et al.*, 2016) naznačujú zvýšenú stimuláciu TGF $\beta$  rodiny. Tieto pozorovania sú v súlade s biologickými vlastnosťami TGF $\beta$ 1, ktorý aktivuje metaloproteinázy v organizme.

Metaloproteinázy regulujú zápal v dýchacích cestách a zároveň regulujú uvoľňovanie profibrotických faktorov schopných vytvoriť lézie na dýchacích cestách. Taktiež sa podieľajú na patofyziológii u emfyzému. Podobne ako TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 tiež stimuluje tvorbu extracelulárnej matrix a tvorbu kolagénu, čím môže prispievať k remodelácii tkanív dýchacích ciest. Zvýšená hladina proteínov TGF $\beta$  rodiny (a teda aj TGF $\beta$ 2) môže mať prostredníctvom metaloproteináz vplyv na závažnosť ochorenia u pacienta. V prípade, že sa potvrdia tieto pozorovania, mohli by byť TGF $\beta$ 2 alebo iní členovia tejto rodiny použítí ako cieľ budúcej terapie zápalových ochorení dýchacích ciest. Práca Pallai *et al.* (2016) dokonca naznačila, že súčasná biologická liečba by mohla čiastočne pôsobiť cez inhibíciu členov TGF $\beta$  rodiny. (Boxall *et al.*, 2006; Churg *et al.*, 2012)

## 7 ZÁVER

V teoretickej časti tejto práce sme charakterizovali základné klinické poznatky o asthme bronchiale (AB) a chronickej obštrukčnej chorobe pľúc (CHOCHP). Obe ochorenia sú typické výskytom chronického zápalu dýchacích ciest. U AB je tento zápal doplnený prevažne imunitnou reakciou na alergické podnety. U CHOCHP je naopak doplnený degradáciou pľúcneho tkaniva z dôvodu fajčenia tabaku. Zároveň sú v teoretickej časti zhrnuté základné poznatky o TGF $\beta$  (transformujúci rastový faktor beta) rodine, spôsobe ich expresie a regulácie.

V praktickej časti tejto práce sme porovnávali hodnoty relatívnej expresie TGF $\beta$ 2 vo vzorkách bronchoalveolárnej laváže medzi pacientmi s CHOCHP, AB a kontrolnou skupinou. Hodnota expresie TGF $\beta$ 2 bola zvýšená u pacientov s CHOCHP v porovnaní s kontrolnou skupinou. Taktiež medzi hodnotami expresie TGF $\beta$ 2 u pacientov s AB a CHOCHP neboli pozorované rozdiely. Následne sú výsledky tejto práce diskutované v súvislosti s inými klinickými štúdiami. Priame porovnanie je však limitované veľkou variabilitou použitých metód, heterogenitou skupín pacientov a odlišným plánom štúdií.

Táto práca prináša nové poznatky o expresii TGF $\beta$ 2, ale zvýšené hodnoty expresie TGF $\beta$ 2 by mali byť potvrdené na proteínovej úrovni. Zväčšenie skupiny pacientov by umožnilo preskúmať možné rozdiely medzi odlišnými fenotypmi ochorení. TGF $\beta$ 2 je možné použiť ako cieľ budúcej terapie zápalových ochorení dýchacích ciest.

## 8 LITERATÚRA

- Allergy and Asthma Network. [online] [navštívené 5.4.2021] Dostupné z <https://allergyasthmanetwork.org/what-is-asthma/>
- Balzar S., Chu H. W., Silkoff P., Cundall M., Trudeau J., B., Strand M., Wenzel S. (2005). Increased TGF- $\beta$ 2 in severe asthma with eosinophilia. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115(1), 110-117. doi.org/10.1016/j.jaci.2004.09.034
- Batra V., Musani A. I., Hastie A. T., Khurana S., Carpenter K. A., Zangrilli J. G., Peters S. P. (2004). Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)-beta1, TGF-beta2, interleukin (IL)-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 34(3), 437-44. doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.01885.x
- Bousquet J., Khaltaev N., Cruz A. A., Denburg J., Fokkens W. J., Togias A., ... Williams D. (2008). Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008\*. *Allergy*, 63(s86), 8-160. doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01620.x
- Boxall C., Holgate S. T., Davies D. E. (2006). The contribution of transforming growth factor- $\beta$  and epidermal growth factor signalling to airway remodelling in chronic asthma. *European Respiratory Journal*, 27(1), 208-229. doi.org/10.1183/09031936.06.00130004
- Calverley P.M. (1996). Asthma. *Postgraduate Medical Journal*, 72, 12-18.
- Cartier A. (1994). Definition and diagnosis of occupational asthma. *European Respiratory Journal* 7, 153-160. doi.org/10.1183/09031936.94.07010153
- Churg A., Zhou S., Wright J. L. (2012). Matrix metalloproteinases in COPD. *European Respiratory Journal*, 39, 197-209. doi.org/10.1183/09031936.00121611
- Desai M., Oppenheimer J., Tashkin D. P. (2017). Asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap syndrome: What we know and what we need to find out. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 118, 241-245. doi.org/10.4046/trd.2017.80.1.11
- Di Stefano A., Sangiorgi C., Gnemmi I., Casolari P., Brun P., Ricciardolo F. L. M.,...Caramori G. (2018). TGF- $\beta$  signaling pathways in different compartments of the lower airways of patients with stable COPD. *Chest*, 153(4), 851-862. doi.org/10.1016/j.chest.2017.12.017

GeneCards human gene database. [online] [navštívené 5.4.2021] Dostupné z <https://www.genecards.org/>

GINA – Global Initiative for Asthma (2020). Global strategy for asthma management and prevention.

Godinas L., Corhay J. L., Henket M., Guiot J., Louis R., Moermans C. (2017). Increased production of TGF- $\beta$ 1 from sputum cells of COPD: Relationship with airway obstruction. *Cytokine*, 99, 1-8. doi.org/10.1016/j.cyto.2017.06.018

GOLD – Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (2021). Global strategy for diagnosis, management and prevention of chronic obstructive lung disease.

Heldin C. H., Moustakas A. (2016). Signaling receptors for TGF- $\beta$  family members. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8), a022053. doi.org/10.1101/cshperspect.a022053

Jones P. W., Watz H., Wouters E. F. M., Cazzola M., (2016). COPD: the patient perspective. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 11(Special Iss), 13-20. doi.org/10.2147/COPD.S85977

Kaartinen V., Voncken J. W., Shuler C., Warburton D., Bu D., Heisterkamp N., Groffen J. (1995). Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- $\beta$ 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nature Genetics*, 11, 415-421. doi.org/10.1038/ng1295-415

Kašák V., Špičák V., Pohunek P. (2001). Asthma Bronchiale. *Internal Medicine for Practice*, 3(10), 442-445.

Krčmová I., Novosad J. (2010). Bronchiální astma – praktické aspekty. *Internal Medicine for Practice*, 12(4), 196-199.

Liang J. B., Liu L. J., Fang Q. H. (2017). Clinical characteristics of patients with chronic obstructive pulmonary disease overlapped with bronchial asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 118, 564-569. doi.org/10.1016/j.anai.2017.02.019

Mahmood M. Q., Reid D., Ward C., Muller H. K., Knight D. A., Sohal S. S., Walters E. H. (2016). Transforming growth factor (TGF)  $\beta$ 1 and smad signaling pathways: A likely key to EMT-associated COPD pathogenesis. *Respirology*, 22(1), 122-140. doi.org/10.1111/resp.12882

- Maselli D. J., Hanania N. A. (2019). Management of asthma COPD overlap. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 123, 335-344. doi.org/10.1016/j.anai.2019.07.021
- Meschool. [online] [navštívené 5.4.2021] Dostupné z <https://medschool.co/images/detail/graph-obstructive.gif>
- Memon M. A., Anway M. D., Covert T. R., Uzumcu M., Skinner M. K. (2008). Transforming growth factor beta (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 and TGF $\beta$ 3) null-mutant phenotypes in embryonic gonadal development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 294(1-2), 70-80. doi.org/10.1016/j.mce.2008.08.017
- Mims J. W. (2015). Asthma: definitions and pathophysiology. *International Forum of Allergy & Rhinology*, 5, S2-S6. doi.org/10.1002/alr.21609
- Morikawa M., Derynck R., Miyazono K. (2016). TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  family: context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(5), a021873. doi.org/10.1101/cshperspect.a021873
- Neumannová K., Kolek V. a kolektiv (2018). *Asthma bronchiale a chronická obstrukční plicní nemoc: Možnosti komplexní léčby z pohledu fyzioterapeuta*. Praha: Mladá fronta.
- Pallai A., Kiss B., Vereb G., Armaka M., Kollias G., Szekanecz Z., Szondy Z. (2016). Transmembrane TNF- $\alpha$  reverse signaling inhibits lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine formation in macrophages by inducing TGF- $\beta$ : Therapeutic implications. *The Journal of Immunology*, 196(3), 1146-1157. doi.org/10.4049/jimmunol.1501573
- Pauk N. (2019). Diagnostika a terapie překryvu astmatu a CHOPN (ACO). *Internal Medicine for Practice*, 21(1), 8-13.
- Petty T. L. (2003). Definition, epidemiology, course, and prognosis of COPD. *Clinical Cornerstone*, 5(1), 1-10. doi.org/10.1016/s1098-3597(03)90003-2
- Postma D. S., Rabe K. F. (2015). The asthma-COPD overlap syndrome. *New England Journal of Medicine*, 373(13), 1241-1249. doi.org/10.1056/NEJMra1411863
- Reddington A. E., Madden J., Frew A. J., Djukanovic R., Roche W. R., Holgate S. T., Howarth P. H. (1997). Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 156(2 Pt 1), 642-647. doi.org/10.1164/ajrccm.156.2.9605065

- Sanford L. P., Ormsby I., Gittenberger-de Groot A. C., Sariola H., Friedman R., Boivin G. P., ... Doetschman T. (1997). TGF $\beta$ 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF $\beta$  knockout phenotypes. *Development*, 124(13), 2659-2670.
- Shull M. M., Ormsby I., Kier A. B., Pawlowski S., Diebold R. J., Yin M., ... Doetschman T. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$ 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 359(6397), 693-699. doi.org/10.1038/359693a0
- Teřl M. (2007). Astma bronchiale, novinky v diagnostice a léčbě. *Internal Medicine for Practice*, 9, 184-187.
- Vernerová E. (2012). Alergie a astma, současný stav poznání a léčby. *Internal Medicine for Practice*, 14(2), 55-58.
- Zhang Y., Alexander P. B., Wang X. F. (2017). TGF- $\beta$  family signaling in the control of cell proliferation and survival. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(4), a022145. doi.org/10.1101/cshperspect.a022145
- Zhu Y., Zhou A., Li Q. (2020). Whole transcriptome analysis of human lung tissue to identify COPD-associated genes. *Genomics*, 112(5), 3135-3141. doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.05.025

## 9 PRÍLOHY

