Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta

Disertační práce

Studium vybraných molekulárních aspektů u plicní sarkoidózy

Mgr. Eva Novosadová

Školitel: prof. MUDr. Martin Petřek, CSc.

Ústav patologické fyziologie

Obor: Lékařská biologie

Olomouc, 2021

Palacky University

Faculty of Medicine and Dentistry

Dissertation thesis

Study of selected molecular aspects in pulmonary sarcoidosis

Mgr. Eva Novosadová

Supervisor: prof. MUDr. Martin Petřek, CSc.

Department of Pathological Physiology

Field of study: Medical Biology

Olomouc, 2021

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat prof. MUDr. Martinu Petřkovi, CSc. za příležitost studovat molekulární biologii na Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Olomouci. Děkuji za vedení během studia, poskytnutý biologický materiál a laboratorní zázemí. Děkuji za ochotu, trpělivost a za odborné konzultace včetně spolupráce při publikování.

Děkuji Mgr. Zdence Navrátilové, Ph.D. za úzkou spolupráci po celou dobu mého studia. Děkuji za ochotu a trpělivost při vysvětlování, za pomoc při optimalizaci metod, za vedení při analýzách a statistickém zpracování dat. Dále chci Mgr. Zdence Navrátilové, Ph.D. poděkovat za stanovení proteinové exprese RNA-vazebných proteinů průtokovou cytometrií a za analýzu získaných dat během její stáže ve Švédsku (Stockholm, Karolinska Institutet, Lungforskningslab).

Poděkování patří i Klinice plicních nemocí a tuberkulózy ve FNOL, jmenovitě prof. MUDr. Vítězslavovi Kolkovi, DrSc., FCCP. Děkujeme za poskytnutý biologický materiál a data o diferenciálních buněčných počtech v bronchoalveolární laváži. Nápomocni byli kromě jiných zejména MUDr. Jaromír Zatloukal, Ph.D. a MUDr. Vladimíra Lošťáková, Ph.D. Děkuji RNDr. Martě Ordeltové (Ústav imunologie LF UP a FNOL) za data z průtokové cytometrie.

Poděkování patří i doc. RNDr. Vladimíru Divokému, Ph.D. jako garantovi oboru Lékařská biologie za konzultace a přípravu ke státním závěrečným zkouškám.

Dále děkuji kolegyním z laboratoře Ústavu patologické fyziologie LF UP, které se se mnou podílely na přípravě biologického materiálu a vlastním měření.

GRANTOVÁ PODPORA

Studium exprese RNA-vazebných proteinů bylo podpořeno grantovým projektem LO1304, CZ.1.07/2.3.00/30.0004 a IGA UP: LF_2016_009. Finanční podpora byla také získána od Švédské nadace pro srdce a plíce, Švédské výzkumné rady, Švédské asociace hrudních lékařů a od Karolínského Institutu (The Swedish Heart Lung Foundation, The Swedish Research Council, The Stockholm County Council, The Swedish Association for Chest Physicians, and Karolinska Institutet).

Studium exprese miRNA v séru pacientů s plicní sarkoidózou bylo podpořeno Grantovým projektem LO1304, CZ.1.07/2.3.00/30.0004, a IGA UP: LF_2015_020, IGA UP: LF_2016_009.

Analýza bronchoalveolárního buněčného profilu byla podpořena projekty CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868, LO1304 a IGA UP: LF_2019_009.

Finální zpracování disertační práce bylo podpořeno IGA UP: LF_2020_004.

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala samostatně pod vedením prof. MUDr. Martina Petřka, CSc. za použití citované literatury.“

„Jsem seznámena s tím, že tato disertační práce je majetkem Univerzity Palackého v Olomouci (autorský zákon č. 121/2000 Sb., § 60 odst. 1) a bez jejího souhlasu nesmí být obsah práce použit v jiné publikaci. Souhlasím se zpřístupněním této práce v Univerzitní knihovně Univerzity Palackého v Olomouci.“

V Olomouci …….

……

Mgr. Eva Novosadová

Souhrn

Sarkoidóza je systémové granulomatózní onemocnění postihující různé orgány. U obyvatel Evropy je nejčastější sarkoidóza plicní. Onemocnění může ve své počáteční fázi odeznít i bez léčby, avšak u jedné třetiny pacientů progreduje do chronické formy a vyžaduje farmakologickou terapii. Kvůli vedlejším účinkům se hledají další možnosti pro vývoj nových způsobů léčby.

U plicní sarkoidózy dochází k rozvoji Th1 imunitní odpovědi (T helper 1 immune response) se zvýšením $CD4^+$ T-lymfocytů v plicích a k jejich snížení v periferní krvi. Zkoumání relativních počtů $CD4^+$ T-lymfocytů u jednotlivých stádií plicní sarkoidózy a jejich porovnání s ostatními intersticiálními plicními nemocemi doplňuje poznatky o bronchoalveolárních $CD4^+$ T-lymfocytech. Prozatím nebyla uvedena publikace, která by porovnala buněčné profily jednotlivých stádií plicní sarkoidózy s ostatními intersticiálními plicními nemocemi. Pacienti v této studii byli všichni nekuřáci, protože kouření může ovlivňovat buněčné populace v plicích.

Stanovení relativních počtů bronchoalveolárních $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů a výpočtu poměru $CD4^+/CD8^+$ je v současné době využíváno v rámci vyšetření pro diagnostiku sarkoidózy. Někteří autoři se domnívají, že by $CD4^+$ T-lymfocyty mohly sloužit jako potenciální terapeutické cíle. Proto by bylo dobré podrobněji prozkoumat bronchoalveolární $CD4^+$ T-lymfocyty u přesněji stratifikovaných stádií plicní sarkoidózy. Zkoumání relativních počtů $CD4^+$ T-lymfocytů u různých skupin pacientů s plicní sarkoidózou by mohlo dopomoci k lepšímu popisu tohoto onemocnění, které může mít tak variabilní průběh a jehož mechanismy vzniku nejsou zatím objasněny.

Co se týče vývoje nových způsobů léčby, naděje jsou také vkládány do RNA-vazebných proteinů. RNA-vazebné proteiny jsou potenciálním terapeutickým cílem především u maligních plicních onemocnění. Znalosti o jejich expresi v bronchoalveolárních buňkách by také mohly přispět k rozvoji nových terapeutických strategií u sarkoidózy. V naší práci jsme stanovili relativní mRNA expresi vybraných RNA-vazebných proteinů u pacientů s plicní sarkoidózou a porovnali ji s relativní expresí u pacientů s obstrukčními plicními nemocemi, idiopatickými intersticiálními pneumoniemi a zdravými kontrolami.

Diagnóza sarkoidózy může být stanovena kombinací laboratorních vyšetření, zobrazovacích metod, funkčního vyšetření plic a invazivního bronchoskopického vyšetření, které může být spojeno s biopsií plicní tkáně. Průběh onemocnění může být variabilní a neurčitý. Proto přetrvává potřeba nalézt nové neinvazivní způsoby pro diagnostiku dalšího rozvoje nemoci. V tomto směru je naděje vkládána do studia miRNA, a to zejména těch obsažených v krvi. V tomto projektu jsme se zaměřili na prozkoumání a porovnání relativní exprese miRNA v séru pacientů s plicní sarkoidózou, a to u pacientů s akutním stádiem provázeným Löfgrenovým syndromem s pacienty v pokročilém stádiu onemocnění.

Klíčová slova: plicní sarkoidóza, bronchoalveolární $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocyty, RNA-vazebné proteiny, miRNA, real-time PCR

Summary

Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease affecting various organs. Pulmonary sarcoidosis is the most common in the European population. Sarcoidosis can resolve in its initial phase, nevertheless, it can deteriorate in one third of patients. These patients need a pharmacological therapy. However, current treatment could have side effects.

In pulmonary sarcoidosis, there is a development of T helper 1 (Th1) immune response with the increase of $CD4^+$ T-lymphocytes in bronchoalveolar space and their decrease in peripheral blood. The research in the field of bronchoalveolar $CD4^+$ T-lymphocytes in particular pulmonary sarcoidosis stages and its comparison with other interstitial pulmonary diseases could improve the knowledge about bronchoalveolar $CD4^+$ T-lymphocytes. So far, no publication about comparison of the bronchoalveolar $CD4^+$ and $CD8^+$ T-lymphocytes of individual pulmonary sarcoidosis stages with other interstitial lung diseases has been published. Patients in this study were all non-smokers, because smoking may affect cell populations in the lungs.

Relative counts of bronchoalveolar $CD4^+$ and $CD8^+$ T-lymphocytes and calculation of their ratio ($CD4^+/CD8^+$) is today still a part of the diagnostic process of sarcoidosis. $CD4^+$ T-lymphocytes are also interesting in terms of the development of new therapies. Therefore it could be useful to study relative bronchoalveolar T-lymphocytes in more detail in more precisely divided sarcoidosis stages. This could contribute to reveal the mechanism of sarcoidosis origin, which is not still clarified.

New ways of therapies for patients with sarcoidosis are still being sought. Molecules that are considered to be potential therapeutic targets are RNA-binding proteins. These molecules participate on regulation of transcription in the cells. As regards to the pulmonary diseases, RNA-binding proteins are currently potential therapeutic targets in malignant pulmonary disease. The knowledge about their expression in bronchoalveolar cells could contribute to the issue of new therapies in pulmonary sarcoidosis. In our work, we determined relative mRNA expression of RNA-binding proteins in patients with pulmonary sarcoidosis and we compared it with the relative mRNA expression determined in obstructive pulmonary diseases (asthma and chronic obstructive pulmonary disease), idiopathic interstitial pneumonias and healthy controls.

Diagnosis of sarcoidosis could be determined by combination of laboratory examination, medical imaging methods, functional examination of lungs and sometimes invasive bronchoscopic examination that could be associated with biopsy of pulmonary tissue. The course of the disease can be variable and difficult to predict. Therefore, there remains a need to find new non-invasive ways to diagnose the further development of the disease. In this regard, hope is placed in the study of miRNAs, especially those contained in the blood. In this miRNAs project, we focused on determination and comparison of the relative miRNA expression in the serum of patients with pulmonary sarcoidosis, notably in sarcoidosis patients with an acute stage with Löfgren's syndrome and patients in an advanced stage of the disease.

Keywords: pulmonary sarcoidosis, bronchoalveolar $CD4^+$ and $CD8^+$ T-lymphocytes, RNA-binding proteins, miRNA, real-time PCR.

Obsah

A. Úvod 13
A.1. Sarkoidóza 13
A.1.1. Granulom – specifická struktura sarkoidózy 14
A.1.2. Prevalence a incidence sarkoidózy 15
A.1.3. Löfgrenův syndrom 16
A.1.4. Klasifikace sarkoidózy podle nálezu na rentgenologickém snímku hrudníku 16
A.2. Další intersticiální plicní procesy 17
A.2.1. Idiopatická plicní fibróza 17
A.2.2. Hypersenzitivní pneumonie 18
A.3. Obstrukční plicní onemocnění 18
A.3.1. Chronická obstrukční plicní nemoc 18
A.3.2. Bronchiální astma 20
A.4. Bronchoalveolární laváž 20
A.5. RNA-vazebné proteiny 21
A.6. Inhibitory matrix metaloproteináz 23
A.7. MikroRNA 23
A.7.1. Cirkulující miRNA jako biomarkery 24
A.8. Reverzní transkripce a PCR v reálném čase 25
A.8.1. Reverzní transkripce mRNA a miRNA 25
A.8.2. Složení chemikálií a teplotní profil pro PCR v reálném čase 25
A.8.3. Relativní kvantifikace mRNA exprese 26
A.9. Průtoková cytometrie 27
A.9.1. Fluorescence v průtokové cytometrii 28
B. Materiál a metoda 29
B.1. Materiál a metoda pro porovnání relativních počtů bronchoalveolárních $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů u pacientů s plicní sarkoidózou a ostatních intersticiálních plicních nemocí 29
B.1.1. Soubor pacientů pro porovnání relativních počtů bronchoalveolárních $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů 29
B.1.2. Zpracování bronchoalveolární laváže a stanovení relativních počtů $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů průtokovou cytometrií 29
B.1.3. Statistické vyhodnocení dat relativních počtů u $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů 30
B.2. Materiál a metoda pro studium exprese šesti RNA-vazebných proteinů a dvou inhibitorů matrix metaloproteináz u pacientů s plicní sarkoidózou, chronickou obstrukční plicní nemocí, astmatem a idiopatickými intersticiálními pneumoniemi 32
B.2.1. Soubor pacientů pro studium relativní mRNA exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitorů matrix metaloproteináz v bronchoalveolárních buňkách 32

B.2.2. Izolace mRNA z bronchoalveolárních buněk a studium mRNA exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitorů matrix metaloproteináz pomocí PCR v reálném čase 34

B.2.3. Izolace mononukleárních buněk z krve a studium proteinové exprese dvou RNA-vazebných proteinů pomocí průtokové cytometrie v $CD4^+$ a $CD8^+$ buňkách periferní krve 36

B.2.4. Analýza a statistické zpracování výsledků relativní mRNA exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitorů matrix metaloproteináz 37

B.2.5. Analýza a statistické zpracování dat proteinové exprese RNA-vazebných proteinů AUF1 a HuR 37

B.3. Materiál a metoda pro studium relativní exprese miRNA v séru u pacientů s plicní sarkoidózou a u zdravých kontrol 37

B.3.1. Soubor pacientů s plicní sarkoidózou a zdravými kontrolami pro studium exprese miRNA v séru 37

B.3.2. Izolace extracelulárních miRNA ze séra a stanovení jejich exprese pomocí PCR v reálném čase 39

B.3.3. Analýza exprese miRNA v séru a statistické zpracování dat 42

B.3.4. Analýza signálních drah u deregulovaných miRNA v séru 43

C. Výsledky 44

C.1. Výsledky analýzy porovnání relativních počtů bronchoalveolárních $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů a jejich poměru u pacientů se sarkoidózou a ostatními intersticiálními plicními nemocemi 44

C.2. Výsledky studia exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitorů matrix metaloproteináz (MMP) u pacientů s plicní sarkoidózou 46

C.2.1. Výsledky porovnání bronchoalveolární mRNA exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitorů MMP u pacientů s plicní sarkoidózou v porovnání se zdravými kontrolami 46

C.2.2. Výsledky porovnání bronchoalveolární mRNA exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitorů MMP u pacientů s plicní sarkoidózou, CHOPN, astmatem a IIP 46

C.2.3. Výsledky porovnání bronchoalveolární mRNA exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitorů MMP u zdravých kontrol s pacienty s CHOPN, astmatem a IIP 47

C.2.4. Výsledky korelační analýzy bronchoalveolární mRNA exprese RNA-vazebných proteinů, inhibitorů matrix metaloproteináz a bronchoalveolárních buněčných populací 50

C.2.5. Vliv kouření a věku na bronchoalveolární mRNA expresi RNA-vazebných proteinů u pacientů s plicní sarkoidózou 50

C.2.6. Výsledky porovnání relativní proteinové exprese dvou RNA-vazebných proteinů v mononukleárních buňkách periferní krve u pacientů s plicní sarkoidózou a zdravých kontrol 51

C.3. Výsledky stanovení relativní exprese miRNA v séru u pacientů s plicní sarkoidózou a zdravými kontrolami 53

C.3.1. Výsledky Mann-Whitney testu při porovnání exprese miRNA v séru 53

C.3.2. Výsledky analýzy signálních drah miRNA deregulovaných v séru pacientů s plicní sarkoidózou 56

C.3.3. Výsledky multivariační analýzy exprese deregulovaných miRNA v séru pacientů se sarkoidózou 56

D. Diskuse 58
D.1. Diskuse: Porovnání relativních počtů bronchoalveolárních $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů u plicní sarkoidózy a ostatních intersticiálních plicních onemocnění 58
D.2. Diskuze: Exprese RNA-vazebných proteinů v bronchoalveolárních buňkách u plicní sarkoidózy 60
D.3. Diskuze: Exprese miRNA v séru u pacientů s plicní sarkoidózou 61
E. Závěr 64
F. Seznam ostatních publikací a konferenčních příspěvků 66
G. Seznam zkratek 67
H. Přílohy 70
H.1. Příloha: Výsledky subanalýzy porovnání BAL buněčného profilu u pacientů kuřáků a nekuřáků v různých stádiích sarkoidózy s intersticiálními plicními nemocemi 70
H.2. Příloha: Výsledky studia bronchoalveolární mRNA exprese RNA-vazebných proteinů: 75
I. Seznam literatury 76

A. Úvod

A.1. Sarkoidóza

Sarkoidóza patří mezi intersticiální plicní onemocnění, charakteristické kombinací zánětu a na něj navazující fibrózy plicního parenchymu. Tato onemocnění mohou být zapříčiněna vlivy vnějšího prostředí nebo se mohou rozvinout v důsledku autoimunitního onemocnění. Do skupiny intersticiálních plicních onemocnění patří také například hypersenzitivní pneumonie a idiopatická plicní fibróza. (Meyer, Raghu et al. 2012; Kalchiem-Dekel, Galvin et al. 2018).

V roce 1999 bylo přijato společné prohlášení Americké hrudní společnosti (ATS = American Thoracic Society), Evropské respirační společnosti (ERS = European Respiratory Society) a Světové asociace sarkoidózy a jiných granulomatózních onemocnění (WASOG = World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders), ve kterém je sarkoidóza definována jako onemocnění neznámé příčiny, postihující pacienty mladé nebo středního věku. Sarkoidóza se projevuje jako oboustranná hilová lymfadenopatie, plicní infiltráty, případně jako oční nebo kožní léze. Může postihovat játra, slezinu, slinné žlázy, srdce, nervový systém, kosti, svaly (Costabel a Hunninhake 1999). U 90 % všech diagnostikovaných pacientů bývá sarkoidózou postiženo dýchací ústrojí (Kolek, Žůrková et al. 2019).

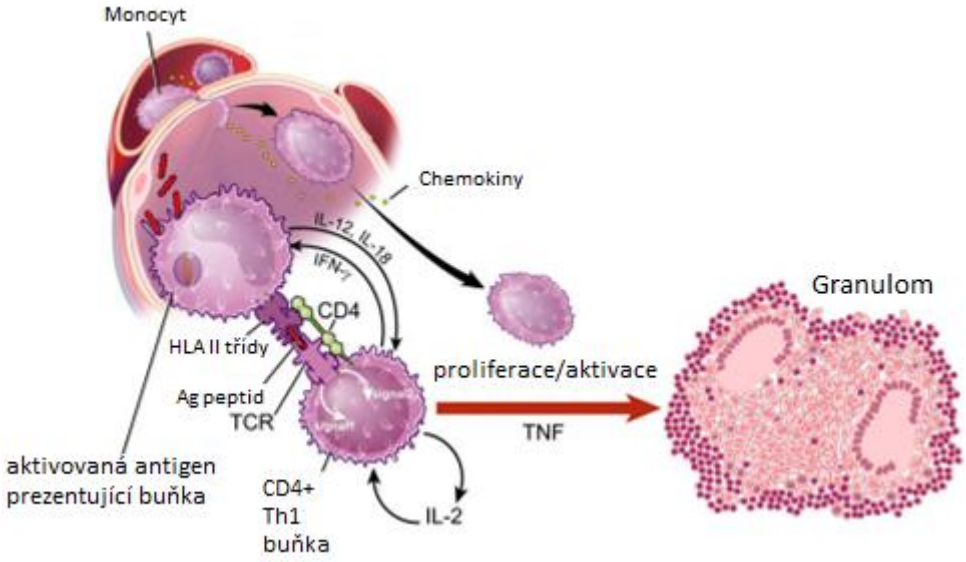
Diagnóza sarkoidózy je stanovena, pokud je klinicky a radiologicky prokázána přítomnost nekaseifikujícího epiteloidního granulomu. Granulomy vytvořené ze známých příčin by měly být vyloučeny. V místě postižení bývá charakteristická zvýšená imunitní odpověď pomocných Th1 (T helper 1) T-lymfocytů. Akutní nástup plicní sarkoidózy spolu s nodózním erytémem nebo asymptomatickou bilaterální hilovou lymfadenopatií mohou naznačovat, že dojde ke spontánnímu uzdravení pacienta. Postupný nástup nemoci s výraznějším množstvím mimoplicních lézí může předznamenávat rozvoj nevratné fibrózy plic a jiných orgánů (Costabel a Hunninhake 1999). Kolek et al. (2019) doplňují, že se změnily některé aspekty, které původní definici již nevyhovují. Onemocnění se posouvá do vyšších věkových kategorií, objevují se nové biomarkery a buňky imunitního systému podílející se na onemocnění, které jsou podrobněji charakterizovány (Kolek, Žůrková et al. 2019).

A.1.1. Granulom – specifická struktura sarkoidózy

Za specifickou strukturu sarkoidózy je označován granulom. Tato struktura vzniká následkem zánětlivé reakce u řady onemocnění. Sarkoidóza není zdaleka jediné onemocnění, u něhož vznikají granulomy z neznámých příčin. I při nálezu granulomu se diagnostika sarkoidózy opírá o další klinické a laboratorní informace (Kolek, Žůrková et al. 2019).

Předpokládaný rozvoj granulomu pravděpodobně začíná fagocytózou antigenu antigen prezentující buňkou, například makrofágem nebo dendritickou buňkou. Antigen prezentující buňka zpracuje antigen a předkládá jej pomocí lidského leukocytárního antigenu (HLA = Human Leukocyte Antigen) II. třídy. Antigen vystavený na povrchu buňky je předložen T buněčným receptorům na naivních T-lymfocytech nesoucích na svém povrchu $CD4^+$ znaky. Dochází k polarizaci T-lymfocytů na pomocné Th1 a atrakci dalších buněk do místa, kde se antigen nachází. Jádro granulomu je tvořeno epiteloidními histocyty odvozenými z makrofágů a velkými mnohojadernými buňkami, mezi kterými jsou rozptýleny $CD4^+$ T-lymfocyty (Baughman, Culver et al. 2011). Infiltrace aktivovanými $CD4^+$ T-lymfocyty v bronchoalveolární laváži je jedním ze znaků sarkoidózy (Drent, Mansour et al. 2007). Na povrchu granulomu se vyskytují $CD8^+$ T-lymfocyty, fibroblasty, regulační T lymfocyty a B-lymfocyty (Baughman, Culver et al. 2011). Epiteloidní a mnohojaderné buňky uvnitř granulomu produkují řadu cytokinů a jejich receptorů. Dochází k expresi interleukinů IL-1α, IL-1 β, IL-6, IL-12, IL-18, chemokinů CCL5, CXCR3, CXCR6 a jejich receptorů CCR a CCR2. Dále jsou produkovány další významné cytokiny, tumor nekrotizující faktor alfa (TNF-α), interferon gama (IFN-γ) a transformující růstový faktor beta (TGF-β). TNF-α je ústřední cytokin podílející se na tvorbě granulomu (viz **Obrázek 1**) (Kolek, Žůrková et al. 2019). K výše zmíněnému mechanismu rozvoje onemocnění musíme přidat i nesporné zapojení genetických faktorů, HLA genů, genů pro cytokiny a jejich receptory (Kishore a Petrek 2013).

Obrázek 1: Schéma rozvoje imunitní odpovědi u plicní sarkoidózy s postupným formováním granulomu (Baughman, Culver et al. 2011).



Legenda k obrázku 1: Ag peptid = antigenní peptid, INF-γ = interferon-gama, HLA = (Human Leukocyte Antigen) lidský leukocytární antigen, TCR = (T cell Receptor) receptor T-lymfocytů, TNF = tumor nekrotizující faktor.

A.1.2. Prevalence a incidence sarkoidózy

Sarkoidóza je celosvětově rozšířená, postihuje muže i ženy různého věku. Rozšíření sarkoidózy se liší v souvislosti s etnickou příslušností, kdy je u Afroameričanů a u Evropanů na severu pozorován nejvyšší výskyt. V **Tabulce 1** jsou uvedeny příklady incidencí a prevalencí v některých státech, případně u určitého etnika (Gerke, Judston et al. 2017).

Tabulka 1: Příklady incidencí a prevalencí sarkoidózy (Gerke, Judston et al. 2017).

Název studie nebo země, ve které byl výzkum proveden	Incidence (na 100 000 obyvatel)	Prevalence (na 100 000 obyvatel)
U.S. Optum Database (Baughman, Field et al. 2016):		
Afro-Američané	17,8	141,4
Bílá rasa	8,1	49,8
Hispánci	4,3	21,7
Asiaté	3,2	18,9
Švédsko (Milman a Selroos 1990):	24	64
Finsko (Pietinalho, Hiraga et al. 1995):	11,4	28,2
Česká republika (Morava a Slezsko) (Kolek 1994):	3,3–4,4	41,3–63,1
Řecko (Karakatsani, Papakosta et al. 2009):	1,07	5,89
Japonsko, Hokkaido (Pietinalho, Hiraga et al. 1995):	1	3,7

A.1.3. Löfgrenův syndrom

Löfgrenův syndrom patří mezi akutní a specifické projevy sarkoidózy. Mezi příznaky patří oboustranně zvětšené mízní hrudní uzliny, plicní parenchym se zánětlivou infiltrací nebo bez infiltrace, horečka, erythema nodosum a artritida. Pacienti mají obvykle vyšší předpoklad k uzdravení (Grunewald a Eklund 2009). Pacienti s Löfgrenovým syndromem mají lepší prognózu v porovnání s ostatními formami. Löfgrenův syndrom bývá obvykle spojen s rentgenologickým stádiem I, mnohem méně často se stádiem II a výjimečně se stádiem 0 (Vasakova, Sterclova et al. 2009).

A.1.4. Klasifikace sarkoidózy podle nálezu na rentgenologickém snímku hrudníku

Stádium 0: Normální nález na snímku hrudníku. Onemocnění může být lokalizováno mimo plíce. Může se i jednat o asymptomatické stádium.

Stádium I: Symetrické bilaterární zvětšení hilových uzlin beze změn v plicním parenchymu. Zvětšení uzlin může být spojeno s erythema nodosum a Löfgrenovým syndromem, s plicními obtížemi nebo mimoplicní lokalizací sarkoidózy.

Stádium II: Jedná se o postižení plicního parenchymu s hilovou lymfadenopatií.

Stádium III: Je spojeno s postižením plicního parenchymu bez známek zvětšení nitrohrudních uzlin.

Stádium IV: Je spojeno s fibrotickými změnami v plicním parenchymu. Změny jsou ireverzibilní (Hunninghake, Costabel et al. 1999; Kolek, Žůrková et al. 2019).

A.2. Další intersticiální plicní procesy

Intersticiální plicní procesy jsou nesourodou skupinou onemocnění postihujících plicní intersticium, což je prostor mezi plicními kapilárami a stěnou plicních sklípků, který je vyplněn elastickým pojivem (Vašáková 2010). Mezi další intersticiální plicní procesy patří idiopatické intersticiální pneumonie (IIP). Mezi hlavní IIP patří idiopatická plicní fibróza (IPF), idiopatická nespecifická intersticiální pneumonie, respirační bronchiolitida, deskvamativní intersticiální pneumonie a kryptogenní organizující pneumonie. Dále jsou rozeznávány vzácné formy IIP, jako je například lymfoidní intersticiální pneumonie (Antoniou, Margaritopoulos et al. 2014). Některé případy intersticiálních plicních onemocnění zůstávají neklasifikovány i navzdory multidisciplinárním diagnostickým přístupům (Wallis a Spinks 2015; Skolnik a Ryerson 2016; Kalchiem-Dekel, Galvin et al. 2018).

A.2.1. Idiopatická plicní fibróza

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je nejběžnějším onemocněním ze skupiny intersticiálních plicních nemocí. Příčina vzniku je neznámá. Onemocnění má špatný dlouhodobý výhled pro uzdravení a nízkou terapeutickou odpověď (Kalchiem-Dekel, Galvin et al. 2018). IPF je jednou z nejagresivnějších forem idiopatických intersticiálních pneumonií. Je charakterizovaná progresivní fibrózou s neúprosným poklesem plicních funkcí, následným respiračním selháním a úmrtím (Barratt, Creamer et al. 2018). Mezi klinické projevy IPF patří v průběhu času se zhoršující námahová a klidová dušnost, dále únava a kašel. V pozdějším stádiu nastupuje hypoxemie i cyanóza. U některých pacientů může být fenotypovým projevem vznik paličkovitých prstů. V plicích je typické zmnožení neutrofilních granulocytů s menším množstvím eozinofilů. Lymfocyty jsou zvýšeny minimálně (Vašáková 2015).

Prevalence a incidence IPF je závislá na použitých diagnostických postupech a zkoumané populaci. Prevalence IPF v USA je odhadována mezi 14 až 27,4 případů na 100 000 obyvatel a v Evropě se prevalence IPF pohybuje mezi 1,25 až 23,4 případů nemocných na 100 000 obyvatel. Roční incidence IPF se v USA pohybuje mezi 6,8 až 8,8 postižených IPF na 100 000 a v Evropě mezi 0,22 a 7,4 případů na 100 000 obyvatel.

Incidence a prevalence se zvyšuje s věkem, je častější u mužů (Nalysnyk, Cid-Ruzafa et al. 2012). V České republice se incidence hlášené IPF pohybuje nad 1 případ na 100 000 obyvatel ročně, prevalence nad 10 případů na 100 000 obyvatel (Vašáková 2010).

A.2.2. Hypersenzitivní pneumonie

Hypersenzitivní pneumonie se může rozvinout po imunologicky indukovaném zánětu plicního parenchymu zasahujícího alveoly, terminální bronchy a intersticium. Nejběžnějšími agens způsobujícími hypersenzitivní pneumonii jsou antigeny mikrobiální a ptačí. Tyto antigeny s určitým nastavením genetického pozadí mohou přispět k rozvoji plicního zánětu. Akutní HP se vyznačuje zvýšením neutrofilů v plicích, u chronické HP dochází k aktivaci T-buněčné imunitní odpovědi a rozvoji tzv. T-lymfocytární alveolitidy (Spagnolo, Rossi et al. 2015). Současná literatura naznačuje, že poměr $CD4^+/CD8^+$ T-lymfocytů může být u pacientů s HP značně variabilní v závislosti na době od poslední expozice (Trentin, Marcer et al. 1988; Drent, van Velzen-Blad et al. 1993), povaze případně dávce antigenu (Ando, Konishi et al. 1991). Prevalence onemocnění se dosti mění. Je různá mezi zeměmi a je ovlivněná klimatickými faktory, různými pracovními podmínkami a kouřením (Bourke, Dalphin et al. 2001).

A.3. Obstrukční plicní onemocnění

Bronchiální astma a chronická obstrukční nemoc (CHOPN) jsou chronická obstrukční plicní onemocnění postihující dýchací systém chronickým zánětem. Obě onemocnění jsou charakterizována obstrukcí, zúžením dýchacích cest, které je reverzibilní u astmatu a u CHOPN je progresivní a ireverzibilní. U obou onemocnění dochází k rozvoji chronického zánětu, který je řízen zvýšenou expresí mnoha zánětlivých proteinů, zahrnujících cytokiny, chemokiny, zánětlivé enzymy a receptory. Onemocnění jsou provázena akutními zhoršeními, exacerbacemi, kdy intenzita zánětu stoupá (Barnes 2008).

A.3.1. Chronická obstrukční plicní nemoc

Chronická plicní obstrukční nemoc (CHOPN) je v současné době čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na světě a v roce 2020 by se mohla stát třetí nejčastější příčinou úmrtí. V roce 2012 zemřely na CHOPN více než tři miliony lidí, což tvoří 6 % z celkově globálně zemřelých. CHOPN představuje nemoc léčitelnou a preventivními přístupy jí lze v mnoha případech zabránit (Augusti, Beasley et al. 2020). Onemocnění nastupuje ve středním nebo vyšším věku

(Koblížek a Zatloukal 2019). Rozvoj onemocnění je pomalý. Je charakterizované obstrukcí dýchacích cest a může vést k respiračnímu selhání (Raherison a Girodet 2009). Jako nejčastější příčina CHOPN v západních zemích je vdechování cigaretového kouře a dlouhodobá expozice znečištěnému vzduchu (smog, látky z pracovního prostředí – chemické produkty, produkty hoření, drobné prachové částice) (Bourdin, Burgel et al. 2009; Koblížek a Zatloukal 2019). Běžnými symptomy jsou dušnost, kašel, produkce sputa. CHOPN může být provázena opakujícími se exacerbacemi (Augusti, Beasley et al. 2020).

Látky obsažené v cigaretovém kouři narušují funkci plicního epitelu a podporují procesy vedoucí k rozvoji zánětu a strukturálním změnám tkáně. Přetrvávající zánět podporuje zvýšení oxidativního stresu a nerovnováhu mezi proteázami a anti-proteázami a narušení plicní tkáně (Bourdin, Burgel et al. 2009). Oxidativní stres výrazně zesiluje rozvoj zánětu. Látky, které podporují oxidativní stres, jsou obsaženy v cigaretovém kouři, ale jsou produkovány i buňkami imunitního systému účastnícími se zánětu. Jsou to hlavně makrofágy a neutrofily (Augusti, Beasley et al. 2020). Zánět v plicích u CHOPN je provázen zvýšením $CD8^+$ T-lymfocytů (Spurzem a Rennard 2005).

Biopsie plicní tkáně u pacientů s CHOPN vykazují infiltraci T-lymfocyty a neutrofily, a to zejména v lumen dýchacích cest (Barnes 2008). Buňky imunitního systému společně s epiteliálními buňkami produkují zánětlivé mediátory. Chemotaktické faktory přitahují další buňky z periferie, prozánětlivé cytokiny amplifikují zánětlivé procesy a růstové faktory indukují strukturální změny ve tkáni (Augusti, Beasley et al. 2020). Epiteliální buňky a makrofágy uvolňují transformující růstový faktor-beta (TGF-β = Transforming growth factor-β), který stimuluje proliferaci fibroblastů a rozvoj fibrózy (Barnes 2008). Postupným hojením dochází k nahrazování původní funkční tkáně extracelulární matrix a k rozvoji fibrózy (Navratilova, Petrek et al. 2016). Fibróza se objevuje kolem malých dýchacích cest a předpokládá se, že je jedním z hlavních faktorů, které odpovídají za jejich ireverzibilní zužování (Barnes 2008).

Buňky zánětu produkují zvýšená množství proteáz, jež narušují pojivovou tkáň plic (Augusti, Beasley et al. 2020). Mezi tyto proteolytické enzymy patří například matrix metaloproteinázy (MMP) a neutrofilní elastázy (Barnes 2008; Navratilova, Petrek et al. 2016). Neutrofilní elastázy odpovídají za hypersekreci hlenu. Dochází k proteolýze elastinu.

Apoptóze podléhají pneumocyty I. řádu, které odpovídají za výměnu plynů, a endoteliální buňky. Tyto děje vedou k destrukci stěn alveolů nazývané emfyzém. (Barnes 2008).

A.3.2. Bronchiální astma

Bronchiální astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, které u vnímavého jedince způsobuje typické opakované stavy dušnosti provázené pískoty a sevřením na hrudi. I přesto je pro astma typická velká variabilita příznaků (Krčmová a Novosad 2010, Mims 2015). Někdy může mít pacient pouze určitý příznak, suchý dráždivý kašel nebo přetrvávající dušnost (Krčmová a Novosad 2010). Onemocnění je provázeno astmatickými epizodami, exacerbacemi, při nichž dochází k otoku a konstrikci průduškových svalů. Tyto astmatické epizody a zhoršování zánětu mohou být iniciovány různými spouštěči, respiračními virovými infekcemi, cigaretovým kouřem, částicemi znečišťujícími ovzduší, změnami teplot, stresem nebo přílišnou fyzickou námahou (Mims 2015).

Na rozdíl od CHOPN, u něhož dochází k rozvoji Th1 imunitní odpovědi, je pro astma charakteristická Th2 imunitní odpověď (Spurzem a Rennard 2005). Senzibilizace alergenem může proběhnout již v dětství (Krčmová a Novosad 2010; Kudo, Ishigatsubo et al. 2013). Alergeny jsou pohlcovány antigen prezentujícími buňkami, například dendritickými buňkami, které antigen zpracují a následně jej pak prezentují T-lymfocytům. Dochází k proliferaci Th2 buněk produkujících interleukin-4 a interleukin-13 a ty stimulují B-lymfocyty k produkci protilátek, imunoglobulinů třídy E (IgE) (Barnes 2008). Zánět průdušek vede ke zvýšené produkci hlenu, bronchokonstrikci, depozici kolagenu a zužování dýchacích cest (Mims 2015).

A.4. Bronchoalveolární laváž

Bronchoalveolární laváž (BAL) je užitečným diagnostickým nástrojem pro stanovení intersticiálních plicních onemocnění. Buněčný profil získaný BAL může, ve spojení s dalšími diagnostickými postupy a zobrazovacími metodami, dopomoci k přesnější diagnostice onemocnění (Meyer, Raghu et al. 2012; Costa e Silva a Rolo 2017). Cytologické vyšetření je užitečné pro stanovení diferenciálních buněčných počtů a identifikaci neobvyklých typů buněk v plicích (plasmatické buňky, mastocyty, apoptotické makrofágy) (Meyer a Raghu 2011).

Zvýšení lymfocytů v BAL bylo pozorováno u pacientů se sarkoidózou, hypersenzitivní pneumonií a ostatními intersticiálními plicními onemocněními jako jsou například kryptogenní organizující pneumonie, pneumokonióza nebo nespecifická intersticiální pneumonie. Mezi další významnou populaci buněk v BAL patří neutrofily a eozinofily. Jejich zvýšení je běžné u intersticiálních plicních onemocnění charakterizovaných fibrózou. Zvýšené množství neutrofilů je zaznamenáno u pacientů s idiopatickou plicní fibrózou, s diferenciálním buněčným počtem kolem 21 % (Costa e Silva a Rolo 2017).

Využití stanovení lymfocytárních subpopulací v bronchoalveolární laváži při diferenciální diagnóze intersticiálních plicních onemocnění zůstává kontroverzním tématem. Pro aktivní plicní sarkoidózu je typické zvýšení $CD4^+$ T-lymfocytů a poměru $CD4^+$ ku $CD8^+$ ($CD4^+/CD8^+$) subpopulací. U zdravých jedinců se poměr $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů pohybuje mezi hodnotami 1,5 až 2. Hodnota ≥ 3,5 je docela specifická pro sarkoidózu, nicméně má nízkou senzitivitu, protože mnoho pacientů se sarkoidózou má hodnotu poměru $CD4^+/CD8^+$ menší než 3,5 (Meyer 2007). Pacienti s odlišnými stádii plicní sarkoidózy, pacienti s Löfgrenovým syndromem (LS) a pokročilé třetí až čtvrté rentgenologické stádium mohou mít zcela odlišný BAL buněčný profil (Danila, Norkuniene et al. 2009).

S postupujícím onemocněním se počet $CD4^+$ T-lymfocytů snižuje a počet $CD8^+$ T-lymfocytů se zvyšuje, to vede ke snížení poměru $CD4^+/CD8^+$ (Danila, Jurgauskiene et al. 2008). Z BAL parametrů využívaných pro diagnostiku zůstává zvýšený poměr $CD4^+/CD8^+$ stále specifický pro akutní sarkoidózu. Práce zabývající se hlubším využitím bronchoalveolárních (BA) buněk k předpovědi následujícího vývoje onemocnění jsou sporadické. Nicméně se objevují publikace, které se snaží nalézt přínosy i dalších BA buněčných populací než pouze lymfocytů. Například Kinder et al. (2008) nalezli vztah mezi zvýšenými diferenciálními počty neutrofilů v BAL tekutině a následnou mortalitou u pacientů s idiopatickou plicní fibrózou (IPF) (Kinder, Brown et al. 2008).

A.5. RNA-vazebné proteiny

Regulace stability mediátorových RNA (mRNA = messenger RNA) v buňce je významným mechanismem pro kontrolu genové exprese. Změny v mRNA stabilitě se následně odráží na proteinové úrovni a jsou zásadní pro homeostázu buněk (Palanisamy, Jakymiw et al. 2012). Post-transkripční kontrolní mechanismy obvykle cílí na 3´ nepřekládanou oblast (UTR = untranslated region) v mRNA sekvenci (Anderson 2010).

V tomto úseku mRNA se nachází konzervativní vazebné domény pro RNA-vazebné proteiny s místy bohatými na adenin a uridin (ARE = Adenylate-Uridylate rich Elements). Transkripty genů, které jsou exprimovány brzy po zahájení imunitní odpovědi, mají více úseků bohatých na adenin a uridin, než ty, které jsou exprimovány později (Palanisamy, Jakymiw et al. 2012). Tímto způsobem dokáže imunitní systém na post-transkripční úrovni tlumit proteinovou expresi a regulovat zánět tak, aby nedošlo k poškození tkání (Anderson 2010; Ivanov a Anderson 2013). RNA-vazebné proteiny jsou schopné ovlivňovat expresi cytokinů, které jsou mediátory imunitní odpovědi. Jsou to například různé interleukiny (IL-3, IL-5, IL-8, IL-10), dále tumor nekrotizující faktor alfa (TNF-α), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF = Vascular Endothelial Grow Factor), faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF = Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) nebo cyklooxygenáza-2 (COX-2) (Palanisamy, Jakymiw et al. 2012).

AUF1 (AU-rich element RNA-binding protein 1) je protein, jehož primární funkcí je rychlá degradace mRNA, ale příležitostně působí i jako stabilizační faktor. AUF1 se podílí na degradaci cytokinových a proto-onkogenních mRNA, a to mechanismem destabilizace, který mRNA předurčí k rychlé degradaci (Moore, Chenette et al. 2014). Jedním z dalších RNA-vazebných proteinů je HuR (tj. ELAV1 = ELAV like RNA-binding protein 1), který stabilizuje například transkripty matrix metaloproteináz (Ezegbunam a Foronjy 2018). Matrix metaloproteinázy jsou skupinou enzymů významně se podílejících na patologických procesech probíhajících v plicích nemocných (Fireman, Kraiem et al. 2002; Henry, McMahon et al. 2002; Craig, Zhang et al. 2015). Protein HuR ochraňuje mRNA před degradací, a to tím způsobem, že kompetuje s mikroRNA, které navádí mRNA k proteinovému komplexu RISC (RNA Induced Silencing Complex) a ten je poté rozštěpí (Srikantan, Tominaga et al. 2012). Další RNA-vazebné proteiny KSRP (KH-type splicing regulatory protein) a TTP (Tristetraprolin) se podílejí na procesu odstranění poly-A konce ze sekvence mRNA, přičemž mRNA je následně urychleně degradována (Gherzi, Lee et al. 2004; Lai, Kennington et al. 2003).

RNA-vazebný protein TIA-1 (T-cell-restricted intracellular antigen 1) se účastní alternativního sestřihu pre-mRNA a je schopný inhibovat translaci vazbou na sekvence v mRNA genů TNF-α a COX-2, které jsou bohaté na adenosin a uridin (López de Silanes, Galbán et al. 2005). TIAR (TIA-1 related protein) může asociovat s transkripčním faktorem c-Myc, který reguluje proteiny spojené s translací v buňce. Mezi tyto proteiny patří například transkripční faktory eIF4E nebo eIF4A a další (Mazan-Mamczarz, Lal et al. 2006).

Dalším proteinem, který jsme zkoumali na mRNA úrovni, je nukleolin (NCL). NCL je multifunkční protein, vyskytuje se v jádře i v cytoplazmě, ale i na plazmatické membráně buněk. NCL se podílí na remodelaci chromatinu, transkripci ribozomálních RNA, transportu ribozomálních podjednotek z jádra do cytoplazmy a sestavení ribozomů v cytoplazmě (Abdelmohsen a Gorospe 2012).

A.6. Inhibitory matrix metaloproteináz

Matrix metaloproteinázy (MMP) jsou rodina proteolytických enzymů, které mají významnou úlohu v remodelaci extracelulární matrix, zajišťování buněčné migrace a dále například aktivaci cytokinů. Nicméně, nadbytečná aktivita MMP může vést k poškozování tkání (Elkington a Friedland 2006; Navratilova, Petrek et al. 2016). Mnoho enzymů z rodiny MMP je zvýšených v plicích pacientů během zánětlivých procesů (Greenlee, Werb et al. 2007).

Jednou z molekul, kterou jsme se zabývali v naší práci, v návaznosti na předchozí studii matrix metaloproteináz (Navratilova, Zatloukal et al. 2012) je protein RECK (reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs). Tato molekula se vyskytuje na povrchu buněk a působí jako inhibitor MMP-9 a MMP-2 (Takahashi, Sheng et al. 1998; Oh, Takahashi et al. 2001). Dalším inhibitorem, kterým jsme se v naší práci zabývali, je multifunkční protein PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten). PTEN také inhibuje funkci MMP-2 a MMP-9 (Park, Kim et al. 2002). Dále ovlivňuje mnoho buněčných funkcí, jako je růst, proliferace a buněčný metabolismus. PTEN odpovídá za regulaci buněčného cyklu, blokuje vstup buňky do S-fáze a působí tak jako nádorový supresor (Fata, Debnath et al. 2012).

A.7. MikroRNA

MikroRNA (miRNA) jsou jednovláknové nekódující RNA o délce 18–24 nukleotidů. MiRNA se vážou na sekvence messengerových RNA (mRNA) a mohou tak potlačit následnou mRNA translaci nebo mohou přímo podpořit destabilizaci mRNA a jejich štěpení, rozklad. Těmito mechanismy potlačují expresi protein kódujících genů na post-transkripční úrovni. (Sonkoly a Pivarcsi 2009). Exprese miRNA se výrazně liší mezi tkáněmi a jejich deregulace může přispívat k rozvoji onemocnění. Detekce deregulované exprese může odlišit zdravou a nemocnou tkáň. Kromě maligních plicních onemocnění byla zaznamenána deregulace exprese miRNA u zánětlivých plicních onemocnění jako je astma, chronická obstrukční plicní

nemoc, cystická fibróza a idiopatická plicní fibróza (Oglesby, McElvaney et al. 2010; Kishore, Borucka et al. 2014).

Tvorba miRNA začíná syntézou primárních miRNA (pri-miRNA), jejichž transkripty mají velikost od několika stovek nukleotidů po několik kilo-bází. Pri-miRNA jsou štěpeny na prekurzorové miRNA (pre-miRNA) nukleázou RNasa III, také nazývanou Drosha. Z jádra jsou pre-miRNA transportovány do cytoplazmy a zde jsou štěpeny cytoplazmatickou RNázou II (Dicer) (Denli, Tops et al. 2004; Han, Lee et al. 2004). Vznikají miRNA duplexy dlouhé přibližně 22 nukleotidů a ty se nazývají zralé miRNA (Han, Lee et al. 2004). Jeden z řetězců zralé miRNA poté vstupuje do miRISC (microRNA Induced Silencing Complex) a společně s proteinem Argonaut je tento komplex transportován k cílové mRNA. Protein Argonaut odpovídá za inkorporaci zralé dvouvláknové miRNA do miRISC. V sekvenci každé miRNA je úsek 2–8 nukleotidů, pomocí kterého se miRNA připojují k cílové mRNA. Sekvence pro vazbu miRNA se obvykle nachází na 3´ nepřekládané oblasti mRNA sekvence. Vazba miRNA na mRNA sekvenci inhibuje translaci, nebo může vést i k degradaci mRNA (Oglesby, McElvaney et al. 2010).

A.7.1. Cirkulující miRNA jako biomarkery

Identifikace určitých miRNA, jejichž exprese je deregulována kvůli nemoci ve tkáních nebo extracelulárních tekutinách, by mohla z takto vybraných miRNA vytvořit potenciální biomarker pro diagnostiku určitého onemocnění. Potenciál miRNA jako biomarkeru se skrývá v jejich základních vlastnostech. Lze je izolovat téměř ze všech buněk, ze všech tkání a tělních tekutin jako jsou sérum, plazma, moč, sliny, mateřské mléko, slzy, vydechovaný kondenzát z plic nebo také z bronchoalveolární laváže (Blondal, Jensby Nielsen et al. 2013).

Cirkulující miRNA nacházející se v krvi vykazují charakteristické znaky pro biomarkery. Jsou vysoce stabilní i mimo buněčné prostředí. Obvykle jsou vázány v komplexu s proteiny, a to je chrání před degradací RNázami. Nebo mohou být obaleny extracelulárními vezikulami, exozomy nebo mikrovezikulami. Dalším jejich charakteristickým znakem je, že jsou všudypřítomné (Blondal, Jensby Nielsen et al. 2013; Kishore, Borucka et al. 2014). Cirkulující miRNA jsou snadno dostupné, jelikož odběr krve není příliš invazivní zákrok. Co se týče stability při zpracovávání biologického materiálu, jsou miRNA stabilní i při zmrazování a rozmrazování vzorku. Exprese cirkulujících miRNA může být u určitých onemocnění

specifická. Cirkulující miRNA jsou snadno detekovatelné a kvantifikovatelné (Ortiz-Quintero 2016).

A.8. Reverzní transkripce a PCR v reálném čase

A.8.1. Reverzní transkripce mRNA a miRNA

Pro studium mRNA a miRNA exprese metodou PCR v reálném čase (real-time Polymerase Chain Reaction) je potřeba vyizolovanou mRNA a miRNA přepsat do sekvence cDNA. cDNA je poté použita jako vstupní materiál pro následnou PCR reakci.

Hlavními složkami reakce pro reverzní transkripci mRNA sekvencí jsou enzym reverzní transkriptáza, čtyři deoxynukleotidtrifosfáty a primer pro přepis mRNA, který ve své sekvenci obsahuje několik tymidinů (Anchored oligo $(dT)_{18}$ primer) a označuje tak počátek přepisu mRNA od 3´-poly(A) konce. Reverzní transkriptáza syntetizuje dlouhé cDNA (až 14 kb) při teplotě až +65 °C. Tohoto principu využívá kit pro reverzní transkripci mRNA Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (LifeScience, Roche).

U reverzní transkripce miRNA se ovšem používá jiných typů primerů. Primery pro reverzní transkripci určitých miRNA jsou sekvenčně specifické, každá miRNA potřebuje pro svůj přepis vlastní primer. Zralé miRNA mají délku pouze ~22 nukleotidů a nelze využít konvenčních primerů pro reverzní transkripci mRNA. Primer specifický pro miRNA má vlásenkovou strukturu (Stem Loop Structure). Tyto primery jsou dodávány například v kitu TaqMan microRNA Assay (Applied Biosystem, Thermofisher).

A.8.2. Složení chemikálií a teplotní profil pro PCR v reálném čase

Metoda PCR v reálném čase (real-time PCR) se stala jednou z nejběžněji užívaných metod pro genovou kvantifikaci. Real-time PCR využívá fluorescence, jejíž intenzita koreluje s koncentrací PCR produktu (Wong a Medrano 2005). Pro detekci PCR produktu lze využívat různé typy sond, například fluorescenčně značené LNA (Locked Nucleic Acid) sondy (LNA, Universal ProbeLibrary; Roche Applied Science, Indianapolis, USA) (Kriegova, Arakelyan et al. 2008).

Začlenění uzamčených nukleových kyselin do sekvence sond, jako jsou například TaqMan sondy, zvyšuje stabilitu vzniku duplexu sondy a cílové cDNA sekvence. LNA jsou analogy nukleotidů, které mají větší vazebnou sílu v porovnání se standardními nukleotidy.

LNA zajišťují sondám určitou specifitu a teplotu tání, která je potřebná pro hybridizaci sondy na cílovou sekvenci (Bonetta 2005).

PCR reakční mix se skládá z cDNA, která pochází z vyizolované mRNA přepsané reverzní transkripcí do podoby cDNA. Dále jsou součástí reakce chlorid hořečnatý, směs deoxynukleotidtrifosfátů (dNTP), termostabilní polymeráza, PCR pufr, LNA sonda a primery ohraničující studovanou sekvenci. Obvyklý teplotní profil reakce začíná denaturací při 94 °C (jeden cyklus 15 min) a pokračuje 40 cyklů amplifikace (94 °C po dobu 45 s, 60 °C po dobu 30 s) (Kriegova, Arakelyan et al. 2008).

A.8.3. Relativní kvantifikace mRNA exprese

Během relativní kvantifikace jsou změny v genové expresi měřeny na základě externího standardu nebo referenčního vzorku, který je známý jako kalibrátor (Livak a Schmittgen 2001). Jako kalibrátor lze využít například cDNA syntetizované z univerzální referenční RNA (Stratagene QPCR Human Reference Total RNA, La Jolla, CA, USA). Relativní koncentrace každého vzorku je přirovnána ke kalibračnímu vzorku a je vypočítána na základě počátečního bodu (TakeOff) a reakční efektivity neboli účinnosti (Rotor-Gene® Q MDx User Manual, 2010, Hilden).

Relativní expresi mRNA je možné spočítat metodou druhé derivace. Metoda druhé derivace je kvantifikační metoda založená na výpočtu druhé derivace amplifikační křivky, která odpovídá nárůstu fluorescence v reakci. Počáteční bod (TakeOff) je definován jako cyklus, během kterého začíná konec fluorescenčního šumu a dochází k přechodu do exponenciální fáze reakce. TakeOff point je zde druhou derivací, která je na 20 % své maximální úrovně (RotorGene Software 6.1.71, Corbett Research, Sydney, Austrálie). Po výpočtu hodnot TakeOff kalibrátoru a vzorku je získána průměrná hodnota amplifikace a z ní relativní koncentrace. Relativní koncentrace pro každý vzorek je spočítána jako: $Relativní\ koncentrace = Amplifikace^{(\text{TakeOff Kalibrátoru} - \text{TakeOff Vzorku})}$

Pro PCR je důležité sledovat hodnotu účinnosti reakce neboli účinnosti amplifikace. V ideálním případě by se hodnota účinnosti amplifikace rovnala číslu 2, účinnost PCR pro každý vzorek by byla 100%. To by znamenalo, že během každého cyklu by se množství amplikonů zdvojnásobilo. Při metodě druhé derivace je účinnost amplifikace spočítána pro

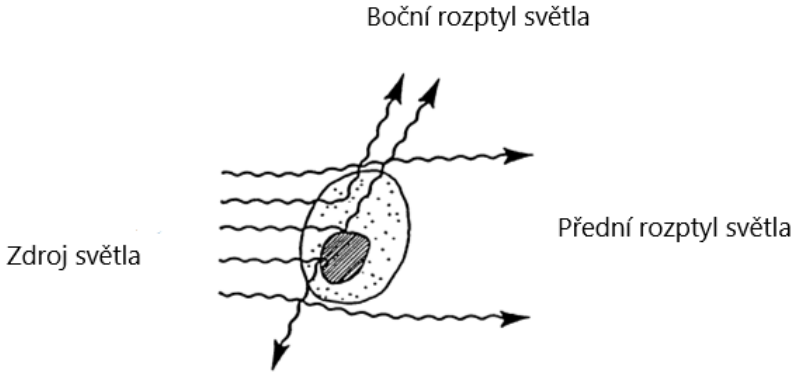
každý vzorek z části sklonu křivky mezi TakeOff bodem a jejím maximem (Kriegova, Arakelyan et al. 2008).

A.9. Průtoková cytometrie

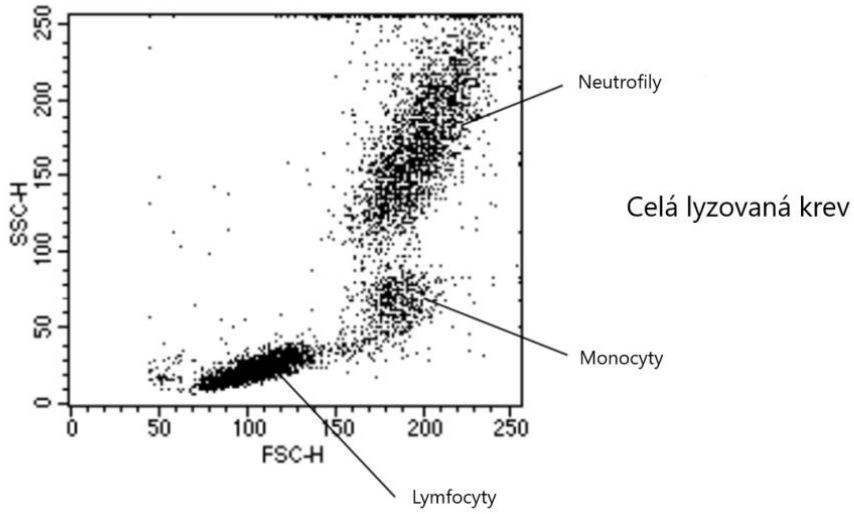
Průtokový cytometr je zařízení skládající se ze tří hlavních systémů: kapalinového, optického a elektronického. Kapalinový systém transportuje částice do paprsku laseru k analýze. Optický systém se skládá z laseru ozařujícího vzorek v proudu kapaliny a optických filtrů pro směřování světelných signálů k detektorům. Systém elektronicky převádí detekované světelné signály do elektronických, které jsou zpracovány počítačem (Introduction to flow cytometry: A Learning guide, © 2002 Becton, Dicinson Company).

Buňky procházejí skrze laserový paprsek a světlo rozptylují. Zároveň protilátky s fluorochromy navázanými na buňky vyzařují světlo (fluoreskují). Rozptýlené (scattered) a fluorescenční světlo je sbíráno čočkami. Kombinace rozbočovačů paprsků a filtrů řídí rozptýlené a fluorescenční světlo k příslušným detektorům. Rozptyl světla je závislý na fyzických vlastnostech částic, například na jejich velikosti a vnitřní komplexnosti. Faktory, které ovlivňují rozptyl světla, jsou buněčná membrána, jádro, granularita buněčné cytoplazmy či tvar buňky. Přední rozptýlené světlo (Forward-scattered light = FSC) je úměrné velikosti buněčného povrchu (**Obrázek 2**). FSC detekuje částice nezávisle na jejich fluorescenci. Boční rozptyl světla (Side-scattered light = SSC) je úměrný granularitě buňky. Boční rozptyl světla představuje světlo, které je sbíráno pod úhlem 90° a je kolmé k původní dráze laserového paprsku (Introduction to flow cytometry: A Learning guide, ©2002 Becton, Dicinson Company) (**Obrázek 2**). Korelace naměřeného FSC a SSC může dovolit diferenciaci různých buněčných populací. Hlavní populace leukocytů mohou být diferenciovány pomocí FSC a SSC (**Obrázek 3**).

Obrázek 2: Přední a boční rozptyl světla (Introduction to flow cytometry: A Learning guide, ©2002 Becton, Dicinson Company).



Obrázek 3: Buněčné populace lymfocytů v krvi zobrazené pomocí předního a bočního paprsku (Introduction to flow cytometry: A Learning guide, ©2002 Becton, Dicinson Company).



A.9.1. Fluorescence v průtokové cytometrii

Fluorescenční složka systému, fluorochrom, absorbuje světelnou energii v rozmezí vlnových délek charakteristických pro určitý fluorochrom. Absorpce světla způsobuje, že elektron fluorochromu se dostává na vyšší energetickou úroveň. Excitovaný elektron se rychle navrací do svého původního stavu a emituje energii v podobě fotonů. Množství detekovaného fluorescenčního signálu je úměrné počtu molekul fluorochromu na detekované částici. Fluorochrom konjugovaný k protilátce může identifikovat určitý buněčný typ v závislosti na antigenech buňky. Můžeme použít různé protilátky značené různými

fluorochromy k odlišení různých buněčných populací. V kombinaci s daty FSC a SSC můžeme zjistit, které buňky se ve vzorku nachází a spočítat jejich relativní procento (Introduction to flow cytometry: A Learning guide, ©2002 Becton, Dicinson Company).

B. Materiál a metody

B.1. Materiál a metody pro porovnání relativních počtů bronchoalveolárních $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů u pacientů s plicní sarkoidózou a ostatních intersticiálních plicních nemocí

B.1.1. Soubor pacientů pro porovnání relativních počtů bronchoalveolárních $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů

Provedli jsme analýzu buněčného profilu získaného bronchoalveolární laváží (BAL) u 297 pacientů s intersticiálními plicními nemocemi. Pacienti byli diagnostikováni na Klinice plicních nemocí a tuberkulózy ve Fakultní nemocnici Olomouc (FNOL) a vzorky byly odebrány v letech 1995–2013. Všechny osoby ve studii byly nekuřáci. Charakteristiky pacientů nekuřáků jsou uvedeny v **Tabulce 2**. Do studie byli zahrnuti pacienti se sarkoidózou s Löfgrenovým syndromem (LS) (n = 18) a bez LS (n = 64) s rentgenologickým (RTG) stádiem ≤ 1, dále pacienti s RTG stádiem 2 (n = 113) a pacienti s pokročilým RTG stádiem ≥ 3 (n = 26). Tyto skupiny pacientů s plicní sarkoidózou byly porovnávány s dalšími intersticiálními plicními nemocemi, jako jsou idiopatická plicní fibróza (n = 22), hypersenzitivní pneumonie (HP) (n = 15) a skupina ostatních intersticiálních idiopatických pneumonií (OIIP) (n = 39). Skupina OIIP byla složena z pacientů s nespecifickou intersticiální pneumonií (n = 10), kryptogenní organizující pneumonií (n = 6), idiopatickou lymfoidní intersticiální pneumonií (n = 1), deskvamativní intersticiální pneumonií (n = 1) a skupinou pacientů s IIP, které nelze přesně klasifikovat (n = 21). Pohlaví a věk pacientů v jednotlivých skupinách jsou uvedeny v **Tabulce 2.**

B.1.2. Zpracování bronchoalveolární laváže a stanovení relativních počtů $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů průtokovou cytometrií

Diferenciální buněčné počty byly stanoveny rutinně cytologickou laboratoří na Klinice plicních nemocí a tuberkulózy ve FNOL. Buňky fixované na sklo byly barveny pomocí May-Grünwald Giemsa barvení. Subpopulace BAL lymfocytů byly měřeny při rutinním zpracování pro diagnostické účely. Bronchoalveolární tekutina byla získána a zpracována podle doporučených postupů (Petrek a Kolek 1993; Petrek, Gibejova et al. 2002). V letech 1995–

2004 byl buněčný profil T-lymfocytů měřen průtokovým cytometrem Coulter Epics XL (Beckman Coulter). Od roku 2004 byl používán průtokový cytometr BD FACSCanto (Becton Dicinson, USA). Pro testování vzorků s cytometrem BD FACSCanto byly buňky značeny protilátkami Simultest CD4/CD8 Reagent (342407) (CD4-FITC/CD8-PE) od BD Biosciences. Charakteristiky bronchoalveolárních buněčných populací jsou uvedeny v **Tabulce 2.**

B.1.3. Statistické vyhodnocení dat relativních počtů u $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů

Rozdíly v buněčných subpopulacích T-lymfocytů a mezi skupinami pacientů byly vyhodnoceny pomocí Mann-Whitney testu v programu SPSS 23. Výsledné p hodnoty byly upraveny pomocí FDR (False Discovery Rate) korekce podle Benjamina a Hochberga pro odstranění falešně pozitivních výsledků (Benjamini a Hochberg 1995). Úroveň signifikance byla nastavena na $p < 0,05$.

Tabulka 2: Charakteristiky pacientů nekuřáků s intersticiálními plicními nemocemi. Data jsou uvedena jako průměr ± směrodatná odchylka průměru.

	S RTG ≤ 1 bez LS (n = 64)	S RTG = 2 (n = 113)	S RTG ≤ 1 s LS (n = 18)	S RTG ≥ 3 (n = 26)	IPF (n = 22)	OIIP (n = 39)	HP (n = 15)
Věk muži/ ženy	45,5 ± 11,9/ 53,8 ± 11,7	40,2 ± 8,0/ 52,0 ± 12,8	33,2 ± 4/ 33,2 ± 4	42,4 ± 10,5/ 57 ± 11,7	62,4 ± 10,0/ 58,2 ± 13,0	59,1 ± 12,8/ 57,3 ± 15,9	55 ± 5,3/ 53,0 ± 10,2
Pohlaví muži/ženy	23/41	45/68	6/12	9/17	9/13	14/25	5/10
RTG stádium 0/1	9/55	-	1/17	-	-	-	-
RTG stádium 3/3-4/4	-	-	-	22/2/2	-	-	-
BAL buněčný profil							
BAL návratnost [%]	62,1 ± 9,2	61,7 ± 10,2	64,1 ± 7,1	60,2 ± 11,4	66,8 ± 8,9	62,2 ± 11,0	64,9 ± 11,0
Celkový poč. buněk [x10^5l]	0,8 ± 0,6	0,9 ± 0,5	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,8	1,5 ± 0,9	1,3 ± 1,0	0,8 ± 0,4
Makrofágy relativní poč. [%]	75,8 ± 11,1	73,2 ± 12,9	78,3 ± 11,8	75,7 ± 17,6	76,7 ± 13,8	70,3 ± 19,2	61,1± 17,9
Makrofágy absolutní poč. [x10^5]	0,6 ± 0,4	0,7 ± 0,4	0,8 ± 0,3	0,75 ± 0,74	1,1 ± 0,7	0,9 ± 0,8	0,5 ± 0,3
Lymfocyty relativní poč. [%]	21,8 ± 11,1	21,8 ± 9,9	20,1 ± 12,0	18,3 ± 13,2	9,4 ± 9,4	15,3 ± 14,5	28,3 ± 17,7
Lymfocyty absolutní poč. [x10^5]	0,6 ± 0,4	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,2
Neutrofily relativní poč. [%]	2,0 ± 3,8	3,4 ± 4,9	1,23 ± 1,21	5,5 ± 14,0	11,1 ± 13,9	11,9 ± 13,8	7,3 ± 5,4
Neutrofily absolutní poč. [x10^5]	0,02 ± 0,04	0,4 ± 3,7	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
Eozinofily relativní poč. [%]	0,5 ± 0,9	0,8 ± 2,1	0,4 ± 0,5	0,6 ± 1,6	2,9 ± 3,2	2,5 ± 4,6	3,3 ± 4,4
Eozinofily absolutní poč. [x10^5]	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,002 ±0,01	0,1 ± 0,1	0,02 ± 0,04	0,03 ± 0,05
$CD3^+$ relativní poč. [%]	83,5 ± 15,4	80,9 ± 14,2	86,0 ± 11,5	76,6 ± 16,0	71,8 ± 11,9	73,5 ± 20,9	79,5 ± 12,5
$CD4^+$ relativní poč. [%]	65,4 ± 20,8	60,0 ± 19,7	71,5 ± 16,5	53,5 ± 16,0	42,9 ± 16,1	38,9 ± 18,7	39,5 ± 15,7
$CD8^+$ relativní poč.[%]	16,2 ± 11,1	19,2 ± 14,0	13,1 ± 7,5	20,4 ± 10,5	25,8 ± 14,0	32,8 ± 20,7	39,4± 19,0
$CD4^+/CD8^+$ poměr	7,5 ± 7,7	5,7 ± 5,4	9,4 ± 8,6	4,09 ± 4,06	2,9 ± 3,2	2,2 ± 2,7	1,5 ± 1,5

Legenda k Tabulce 2: S = sarkoidóza; RTG = rentgenologické stádium; LS = Löfgrenův syndrom; IPF = idiopatická plicní fibróza, OIIP = ostatní idiopatické intersticiální pneumonie, HP = hypersensitivní pneumonie, poč.= počet.

B.2. Materiál a metody pro studium exprese šesti RNA-vazebných proteinů a dvou inhibitorů matrix metaloproteináz u pacientů s plicní sarkoidózou, chronickou obstrukční plicní nemocí, astmatem a idiopatickými intersticiálními pneumoniemi

B.2.1. Soubor pacientů pro studium relativní mRNA exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitorů matrix metaloproteináz v bronchoalveolárních buňkách

Diagnóza plicní sarkoidózy byla provedena podle kritérií obsažených v dokumentu vydaném Americkou hrudní společností (ATS = American Thoracic Society), Evropskou respirační společností (ERS = European Respiratory Society) a Světovou asociací sarkoidózy a jiných granulomatózních onemocnění (WASOG = World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders) (Costabel a Hunninhake 1999). Vzorky bronchoalveolární laváže byly získány od českých pacientů s plicní sarkoidózou (n = 50). Tito pacienti neměli Löfgrenův syndrom a rentgenologické (RTG) vyšetření hrudníku zobrazilo, že se nacházejí v RTG stádiu 1 (n = 25) a RTG stádiu 2 (n = 25). Pro studium relativní mRNA exprese RNA-vazebných proteinů v bronchoalveolárních buňkách bylo do skupiny pacientů s plicní sarkoidózou zařazeno 25 mužů a 25 žen. Skupina měla průměrný věk 44 let v rozmezí 21–77 let. Dále bylo do studie zařazeno 17 zdravých mužů a 6 zdravých žen s průměrným věkem 43 let v rozmezí 19-78 let.

Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) a astma byly definovány podle kritérií společností zabývajících se CHOPN (GOLD = Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) (Rabe, Hurd et al. 2007) a astmatem (GINA = Global Initiative for Asthma) (GINA 2014). Pacienti s CHOPN měli mírnou či střední obstrukci dýchacích cest charakterizovanou poměrem parametrů FEV1/FVC (usilovně vydechnutý objem za 1 sekundu / usilovná vitální kapacita) s výslednou hodnotou poměru < 0,7 a parametrem FEV1 % s rozmezím hodnot 50–79 %. Skupina pacientů s CHOPN obsahovala 18 mužů a 12 žen s věkovým průměrem 64 let v rozmezí 40–84 let. Do skupiny pacientů s astmatem bylo zařazeno 5 mužů a 14 žen s průměrným věkem 45 let v rozmezí 20–83 let.

Dále jsme pro studii vybrali pacienty s idiopatickými intersticiálními pneumoniemi (IIP) podle jejich klinických a radiologických příznaků podpořených histologickým vyšetřením plicní tkáně (Katzenstein a Myers 2000; ATS a ERS 2002; Travis, King et al. 2002). Ve skupině pacientů s IIP bylo 6 mužů a 13 žen s věkovým průměrem 57 let v rozmezí 33-80 let. Bronchoalveolární buněčný profil jednotlivých skupin je uveden v **Tabulce 3**.

Tabulka 3: Buněčný profil bronchoalveolární laváže (BAL) u pacientů s intersticiálními plicními nemocemi, s CHOPN, s astmatem a zdravými kontrolami, u kterých byla v BAL na úrovni mRNA měřena exprese šesti RNA-vazebných proteinů a dvou inhibitorů matrix metaloproteináz.

	percentil	Celkový počet BAL buněk	Makrofágy	Lymfocyty	Neutrofily	Eozinofily	$CD3^+$	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+/CD8^+$	$CD19^+$
		$x10^9/1ml$	%	%	%	%	%	%	%	%	%
K (n = 23)	25.	0,6	90,1	2,5	0,7	0,4	68,4	32,3	26,3	1,0	0,0
	medián	0,8	94,2	5,3	1,3	0,5	81,5	41,5	32,0	1,3	1,0
	75.	1,1	95,8	7,0	3,0	0,5	89,0	48,8	39,8	2,0	1,0
S (n = 50)	25.	0,46	64,0	16,0	0,0	0,0	82,8	47,3	9,8	2,7	0,0
	medián	0,68	72,5	24,0	2,0	0,0	89,0	71,5	13,0	5,7	0,0
	75.	0,99	78,0	31,0	4,0	1,0	92,0	78,3	17,3	7,3	1,0
CHOPN (n = 30)	25.	0,5	72,0	0,5	1,2	0,0	42,0	18,0	10,0	0,9	0,0
	medián	0,9	85,4	2,5	3,8	0,3	74,0	34,0	17,0	1,5	0,0
	75.	1,9	93,0	11,7	5,7	1,3	79,0	45,0	38,0	4,2	0,0
Astma (n = 19)	25.	0,5	76,8	2,0	0,6	0,4	45,5	27,5	13,0	0,8	0,0
	medián	0,6	84,0	6,0	1,5	2,0	68,5	33,0	20,5	1,9	0,1
	75.	1,2	94,0	12,5	3,8	8,1	84,0	53,5	28,0	3,7	1,0
IIP (n = 19)	25.	1,1	74,6	6,9	1,8	0,1	66,0	17,5	20,0	0,6	0,0
	medián	1,5	82,3	8,5	2,5	0,8	74,0	34,0	24,0	1,3	0,0
	75.	2,4	89,6	14,6	5,8	4,5	90,0	55,5	41,5	3,0	1,0

Legenda k Tabulce 3: K = zdravé kontroly, S = pacienti s plicní sarkoidózou, CHOPN = chronická obstrukční plicní nemoc, IIP = idiopatická intersticiální pneumonie.

Vzorky bronchoalveolární laváže (krve) byly získány od pacientů se sarkoidózou/ zdravých kontrol/ CHOPN/ astma/ IIP pacientů kteří nikdy nekouřili (35(6)/13/8/9/9), byli ex-kuuřáci po dobu nejméně dvou let (11(3)/6/14/6/4) a ti co v době odběru vzorků kouřili (2(0)/4/8/3/4). Informace o kouření nebyla dostupná u 2/0/0/1/2 subjektů sarkoidózou/ zdravých kontrol/ CHOPN/ astma/IIP. V čase odběru BAL (krve), 33 (4) pacientů s plicní sarkoidózou, 15 pacientů s IIP mělo steroidní léčbu. 21 pacientů s CHOPN a 15 pacientů s astmatem bylo také léčeno steroidními přípravky. Žádný ze zdravých subjektů neměl chronické respirační příznaky a měli normální BAL buněčný profil.

B.2.2. Izolace mRNA z bronchoalveolárních buněk a studium mRNA exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitorů matrix metaloproteináz pomocí PCR v reálném čase

Bronchoalveolární buňky byly získány z tekutiny laváže centrifugací (Petrek, Gibejova et al. 2002). Z buněk byla izolována celková RNA pomocí High Pure miRNA kitu (Roche, Německo). Reverzní transkripce byla provedena pomocí chemikálií obsažených v Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kitu (Roche, Německo).

Pro studium relativní exprese mRNA v buňkách bronchoalveolární laváže byl jako referenční gen vybrán PSMB2 (Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2). Podmínky reakce a použitý referenční gen jsou popsány v práci Kriegová *et al.* (2008) (Kriegova, Arakelyan et al. 2008). Po fázi počáteční denaturace (94 °C, 15 min) byla provedena amplifikace cDNA, získané reverzní transkripcí, ve čtyřiceti cyklech (94 °C, 45 s a 60 °C, 30 s) pomocí přístroje RotorGene3000 (Corbett Research, Sydney, Austrálie). Relativní exprese byla vypočtena s použitím metody druhé derivace (RotorGene Software 6.1.71, Corbett Research, Sydney, Austrálie). Jako kalibrátor sloužila cDNA, která byla přepsána z lidské univerzální referenční RNA (Stratagene, La Jolla, CA, USA) při vstupní koncentraci 1,25 ng/5µl RNA. Celé názvy genů, odpovídající sekvence primerů a sonda, pro geny, u kterých byla měřena mRNA exprese, jsou uvedeny v **Tabulce 4**.

Tabulka 4: Sekvence primerů pro studium mRNA exprese RNA-vazebných proteinů, dvou inhibitorů proteolytické aktivity a referenčního genu.

	Zkratka genu	Název genu anglicky	Obecná funkce (velmi zkráceně)	Přístupové číslo v GeneBank	Sekvence forward a reverse primerů	LNA sonda
RNA-vazebný protein	AUF1	Human AU-rich element RNA-binding protein AUF1 mRNA, complete cds	mRNA destabilizace při vazbě na ARE sekvenci	U02019.1	gcgaagattgacgccagta tcccagctaaggcctcctat	#88
	HuR	Human HuR RNA binding protein (HuR) mRNA	mRNA destabilizace při vazbě na ARE sekvence	U38175.1	ccaggcgcagagattcag ggttgtagatgaaaatgcaccag	#72
	NCL	Homo sapiens nucleolin	biosyntéza ribosomální RNA	NM_005381.2	ccacttgtccgcttcaca tcttggggtcaccttgattt	#70
	TIA	Human polyadenylate binding protein	Inhibice translace	M77142.1	agggagctggacctggag tggaaaggttaccgacgtataga	#46
	TIAR	GDB Homo sapiens nucleolysin TIAR mRNA		M96954.1	ggcaaccatggaatcaaca agcaccaaatccacccatc	#84
	PCBP2	Homo sapiens poly(rC) binding protein 2	mRNA splicing	NM_005016.5	agatctgcgtggtcatgttg tgctgtacctgtcctgacca	#14
Inhibitory proteolytické aktivity	RECK	Homo sapiens reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs	Inhibice sekrece MMP a indukce jejich inhibitorů	NM_021111.2	caagtgtccttcgctcttgg cacataatgggcaacaagca	#42
	PTEN	Homo sapiens phosphatase and tensin homolog	Inhibice sekrece MMP a indukce jejich inhibitorů	NM_000314.4	gcacaagaggccctagattc cgcctctgactgggaatagt	#60
Referenční gen pro PCR reakci	PSMB2	Homo sapiens proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 2	Housekeeping gen pro bronchoalveolární buňky	NM_002794.4	gtgagagggcagtggaactc gaaggttggcagattcagga	#50

B.2.3. Izolace mononukleárních buněk z krve a studium proteinové exprese dvou RNA-vazebných proteinů pomocí průtokové cytometrie v $CD4^+$ a $CD8^+$ buňkách periferní krve

RNA-vazebné proteiny byly stanoveny na proteinové úrovni v buňkách periferní krve u devíti švédských pacientů s plicní sarkoidózou bez/s Löfgrenovým syndromem (n = 2/7) s RTG stádiem 1 (n = 1), 2 (n = 3), 2-3 (n = 1), 3 (n = 2) a 4 (n = 2). Soubor obsahoval 5 mužů a 4 ženy s průměrným věkem 54 let v rozmezí 41–80 let. Jako kontrolní soubor sloužilo šest zdravých subjektů, 1 muž a 5 žen s průměrným věkem 45 let v rozmezí 35–59 let. Vzorky krve byly odebrány na Karolínském institutu ve Stockholmu ve Švédsku. Švédští pacienti poskytli informovaný souhlas s účastí na studii, která byla schválena etickou komisí na Karolínském institutu.

Pro izolaci mononukleárních buněk byla odebrána periferní krev do zkumavek s heparinem. Mononukleární buňky byly separovány na gradientu s médiem Ficoll (Ficoll Paque PLUS, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) a dvakrát promyty roztokem složeným z PBS, 0,5% BSA a 0,02% NaN_3. U každého vzorku, bylo odebráno 0,5 x 10^6 buněk a ty byly fixovány a permeabilizovány (Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent, eBioscience). Pomocí fluorescenčně značených protilátek byly označeny povrchové znaky buněk $CD3^+$ (CD3-Pacific Blue, BD Pharmigen), $CD4^+$ (anti-CD4-APC-H7, BD Pharmigen) a $CD8^+$ (CD8-AmCyan, BD Pharmingen). Pro intracelulární značení byly použity protilátky polyklonální králičí IgG proti proteinu AUF1 (anti-AUF1-APC, LifeSpan BioSciences) a protilátky monoklonální myší IgG1-kappa proti proteinu HuR (anti-HuR-APC, LifeSpan BioSciences). Dále byly použity izotypové kontroly, myší IgG1-kappa značená APC (BD Pharmigen) a králičí IgG izotopová kontrola značená APC (Santa Cruz Biotechnology) pro stanovení nespecifického značení vzorku protilátkami. Tyto izotypové kontroly byly protilátky se stejným izotypem jako protilátky proti RNA-vazebným proteinům. Izotypová kontrola byla použita u každého vzorku jak u nemocných, tak i u pacientů. Fluorescence izotypové kontroly byla odečtena od fluorescence protilátek proti RNA-vazebným proteinům. Výsledky jsou uvedeny jako průměrná intenzita fluorescence (mean fluorescence intensity = MFI) buněk, u kterých došlo k navázání protilátky v populaci. Vzorky byly měřeny pomocí průtokového cytometru FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, USA).

B.2.4. Analýza a statistické zpracování výsledků relativní mRNA exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitorů matrix metaloproteináz

Analýza dat naměřených PCR v reálném čase byla provedena programem RotorGene Software 6.1.71 (Corbett Research, Sydney, Austrálie). Relativní mRNA exprese byla normalizována k relativní expresi mRNA genu PSMB2.

Pomocí Mann-Whitney testu byl detekován možný vliv cigaretového kouře a stárnutí u jednotlivých skupin pacientů a zdravých kontrol. Tyto vlivy byly testovány pouze u plicní sarkoidózy, CHOPN a astma, protože pouze zde byly známy údaje týkající se kouření.

Kruskal-Wallisův test a Dunnův test mnohonásobného porovnávání byly využity pro analýzu exprese mRNA u všech pacientů ve studii a k následné subanalýze s ohledem na kouření u pacientů. Korelační analýzy byly hodnoceny pomocí Spearmanova koeficientu pořadové korelace (SPSS 12.0, SPSS, Chicago, IL, USA). Signifikantní hodnoty byly stanoveny parametrem ($p < 0,05$).

B.2.5. Analýza a statistické zpracování dat proteinové exprese RNA-vazebných proteinů AUF1 a HuR

Data byla analyzována pomocí programu Flowjo 10 (Treestar, Ashland, Oregon, USA). Výsledky jsou uvedeny jako průměrná intenzita fluorescence (mean fluorescence intensity = MFI) buněk u kterých došlo k navázání protilátky v populaci. Hodnoty MFI mezi skupinami byly porovnány pomocí Mann-Whitney testu (SPSS 12.0, SPSS, Chicago, IL, USA). Hodnota signifikance byla nastavena na $p < 0.05$.

B.3. Materiál a metody pro studium relativní exprese miRNA v séru u pacientů s plicní sarkoidózou a u zdravých kontrol

B.3.1. Soubor pacientů s plicní sarkoidózou a zdravými kontrolami pro studium exprese miRNA v séru

Pro studium extracelulárních miRNA bylo získáno sérum od 13 zdravých kontrol a 24 pacientů s plicní sarkoidózou podle standardního protokolu (Witwer, Buzás et al. 2013). Pacienti s plicní sarkoidózou byli diagnostikováni podle kritérií Americké hrudní společnosti (ATS), Evropské respirační společnosti (ERS) a Světové organizace pro sarkoidózu a další granulomatózní onemocnění (WASOG) (Costabel a Hunninhake 1999). Někteří pacienti měli příznaky Löfgrenova syndromu, který je charakterizovaný erythema nodosum, bilaterální hilovou lymfadenopatií, zvýšenou teplotou a bolestí kloubů. Všichni pacienti s Löfgrenovým

syndromem měli rentgenologické (RTG) stádium ≤ 1 (n = 12). Ostatní pacienti bez Löfgrenova syndromu měli RTG stádium ≥ 3 (n = 12). Klinické charakteristiky a bronchoalveolární buněčný profil jsou uvedeny v **Tabulce 5 a 6.**

Vzorky od pacientů pocházejí z Oddělení plicních nemocí a tuberkulózy ve Fakultní nemocnici Olomouc. Studie byla provedena se souhlasem Etické komise Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc. Informované souhlasy byly poskytnuty všemi subjekty ve studii.

Tabulka 5: Klinické charakteristiky subjektů, u kterých byla studována exprese miRNA v séru.

	Zdravé kontroly n = 13	S s Löfgrenovým syndromem RTG s. ≤ 1 (n = 12)	S bez Löfgrenova syndromu RTG s. ≥ 3 (n = 12)
Pohlaví: muži/ženy	2/11	8/4	6/6
Průměrný věk (min–max)	45,6 (23 – 62)	45,5 (32 – 62)	46,6 (26 – 72)
Historie kouření (nekuřáci/ex–kuřáci*/současní kuřáci/NH	13/0/0/0	9/1/1/1	9/2/1/0
RTG stádium 0/1	-	12	-
RTG stádium 3/4	-	-	10/2
FEV1 (min – max) (%)	-	106 (99 – 109)	90 (59 – 113)
FEV1/VC (min – max) (%)	-	81 (69 – 90)	76 (74 – 80)
Průměrná hodnota DLCO (min – max) (%)	-	101 (82 – 131)	78 (46 – 98)
Průměrná hodnota DLCO/VA (min – max) (%)	-	90 (84 – 94)	103 (95 – 115)

Legenda k Tabulce 5: S = sarkoidóza; RTG s. = rentgenologické stádium; DLCO (diffusing capacity of the lungs for carbon mono-oxide) = difúzní kapacita plic pro oxid uhelnatý; FEV1 (forced expiratory volume in 1 second) = usilovně vydechnutý objem za jednu sekundu, VA (alveolar volume) = alveolární objem; VC (vital capacity) = vitální kapacita; *ex–kuřáci, skupina pacientů, kteří nekouřili nejméně 2 roky před odběrem séra; NH = neznámá historie kouření.

Tabulka 6: Bronchoalveolární buněčný profil u pacientů s plicní sarkoidózou, u kterých byla měřena relativní exprese miRNA.

	S s Löfgrenovým syndromem (RTG s. ≤ 1) (n = 12)	S bez Löfgrenova syndromu (RTG s. ≥3) (n = 12)
Buněčný profil	Průměr (min–max)	Průměr (min–max)
Celkový počet buněk 10^6/1ml	0,85 (0,40–1,35)	0,72 (0,10–1,40)
Makrofágy absolutní počty (x10^5)	0,66 (0,28–1,02)	0,58 (0,09–1,40)
Makrofágy relativní počty (%)	77,31 (57,00–91,10)	76,67 (43,00–90,70)
Lymfocyty absolutní počty (x10^5)	0,18 (0,06–0,45)	0,14 (0,01–0,33)
Lymfocyty relativní počty (%)	20,58 (8,60–41,00)	20,08 (8,00–46,00)
Neutrofily absolutní počty (x10^5)	0,01 (0,00–0,04)	0,02 (0,00–0,05)
Neutrofily relativní počty (%)	1,68 (0,00–8,00)	2,27 (0,00–6,00)
Eozinofily absolutní počty (x10^5)	0,00 (0,00–0,01)	0,00 (0,00–0,02)
Eozinofily relativní počty (%)	0,43 (0,00–2,00)	0,99 (0,00–7,00)
$CD3^+$ relativní počty (%)	84,62 (58,00–94,00)	75,00 (36,00–96,00)
$CD4^+$ relativní počty (%)	71,69 (35,00–90,00)	55,58 (29,00–89,00)
$CD8^+$ relativní počty (%)	13,08 (3,00–31,00)	21,00 (4,00–53,00)
$CD4^+/CD8^+$	9,45 (1,13–30,00)	5,34 (0,55–22,25)

Legenda k tabulce 6: S = sarkoidóza; RTG s. = rentgenologické stádium.

B.3.2. Izolace extracelulárních miRNA ze séra a stanovení jejich exprese pomocí PCR v reálném čase

Vzorky séra byly zkontrolovány, zdali nejsou kontaminovány erytrocytárními miRNA po hemolýze. Hemolýza byla kontrolována spektrofotometricky (NanoDrop 1000, USA) při vlnové délce 414 nm, při níž absorbance o hodnotě vyšší než 0,2 znamená hemolýzu (Witwer, Buzás et al. 2013). Nevyhovující vzorky byly vyřazeny.

Extracelulární miRNA byly izolovány z 300 µl séra pomocí izolačního kitu miRCURY™ RNA (Exiqon, Dánsko). Podmínky pro reverzní transkripci, pre-amplifikaci a PCR reakci byly vytvořeny podle doporučení od Applied Biosystems s použitím kitů pro TaqMan® MicroRNA Assay.

Reverzní transkripce vybraných miRNA byla provedena v multiplexu. V jedné reakci u každého pacientského vzorku bylo současně přepsáno několik miRNA pomocí TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Thermofisher). Z primerů pro reverzní transkripci jednotlivých miRNA (TaqMan MicroRNa Assay; Applied Biosystems,

Thermofisher) byl vytvořen směsný mix (tzv. RT Primer Pool), 5X naředěný pomocí Tris-EDTA (TE) pufru. Po reverzní transkripci v multiplexu následovala pre-amplifikace několika studovaných miRNA současně v každém vzorku pacientů a kontrol. K tomu byl využit TaqMan PreAmp Master Mix s použitím směsného premixu primerů (tzv. PreAmp Primer Pool) z TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems, Thermofisher) připraveného ředěním 20X s 1X TE pufrem. Pre-amplifikace umožňuje zvýšit koncentraci specifických cDNA, před jejich detekcí pomocí PCR reakce, a snižuje potřebné množství původní vstupní cDNA z reverzní transkripce do PCR rekce. Po reverzní transkripci a pre-amplifikaci byla exprese miRNA měřena pomocí PCR v reálném čase. K pre-amplifikované cDNA byl pipetován speciální premix qPCRBIO Probe Mix No-ROX (PCR Biosystems, United Kingdom) a specifické miRNA sondy (20X TaqMan MicroRNA Assay; Applied Biosystems, Thermofisher). Po počáteční denaturaci (94 °C, 15 min) byla provedena amplifikace cDNA ve 40 cyklech (94 °C, 45 s a 60 °C, 30 s) pomocí přístroje RotorGene3000 (Corbett Research, Sydney, Austrálie). Relativní exprese byla vypočtena s použitím metody druhé derivace (RotorGene Software 6.1.71, Corbett Research, Sydney, Austrálie). Jako kalibrátor sloužila cDNA, která byla přepsána z lidské univerzální referenční RNA (Stratagene, La Jolla, CA, USA) při vstupní koncentraci 1,25 ng/5µl RNA. Seznam vybraných miRNA sekvencí je uveden v **Tabulce 7**.

Tabulka 7: Seznam studovaných miRNA v séru pacientů s plicní sarkoidózou s číslem TaqMan eseje (miRNA ID) a miRNA sekvencí.

Název miRNA	miRNA ID	miRNA sekvence
let-7a-5p	ID 000377	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
miR-1	ID 002222	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU
miR-16-5p	ID 000391	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
miR-17-5p	ID 002308	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
miR-19a-3p	ID 000395	UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA
miR-19b-3p	ID 000396	UGUGCAAAUCCAUGCAAAACUGA
miR-27a-5p	ID 002445	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA
miR-29b-3p	ID 000413	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
miR-30b-5p	ID 000602	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU
miR-31-5p•	ID 002279	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU
miR-33b-3p•	ID 241007	CAGUGCCUCGGCAGUGCAGCCC
miR-92b-5p•	ID 002343	AGGGACGGGACGCGGUGCAGUG
miR-93-5p	ID 001090	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG
miR-122a-5p	ID 002245	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
miR-125a-5p•	ID 002198	UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA
miR-142-5p•	ID 002248	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU
miR-142-3p	ID 000464	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA
miR-148a-3p	ID 000470	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
miR-155	ID 000479	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGG
miR-181b-1*-3p	ID 462578	CUCACUGAACAAUGAAUGCAA
miR-191-5p	ID 002299	CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUG
miR-193a-3p	ID 002250	AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU
miR-200b-5p	ID 002274	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA
miR-204-5p	ID 000508	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU
miR-206•	ID 000510	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG
miR-212-3p	ID 000515	UAACAGUCUCCAGUCACGGCC
miR-214 -3p	ID 002306	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU
miR-302c-3p	ID 000533	UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG
miR-335-5p	ID 000546	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU
miR-340-5p	ID 2258	UUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU
miR-362-3p•	ID 002117	AACACACCUAUUCAAGGAUUCA
miR-425-5p	ID 001516	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA

Legenda k tabulce 7: • Tyto miRNA nebyly analyzovány kvůli nízké účinnosti PCR.

Tabulka 7 (pokračování): Seznam studovaných miRNA v séru pacientů s plicní sarkoidózou s číslem TaqMan eseje (miRNA ID) a miRNA sekvencí.

miR-451a	ID 001141	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU
miR-487b-3p•	ID 1285	AAUCGUACAGGGUCAUCCACUU
miR-502-5p	ID 001109	AUCCUUGCUAUCUGGGUGCUA
miR-505*-5p	ID 002087	GGGAGCCAGGAAGUAUUGAUGU
miR-770-5p	ID 002002	UCCAGUACCACGUGUCAGGGCCA
miR-21-5p	ID 000397	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
miR-26a-5p	ID 000405	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
miR-146a-5p	ID 000468	UGAGAACUGAAUUCCAUGGGUU
miR-150-5p	ID 000473	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG

Legenda k tabulce 7 (pokračování): • Tyto miRNA nebyly analyzovány kvůli nízké účinnosti PCR.

B.3.3. Analýza exprese miRNA v séru a statistické zpracování dat

Data z PCR v reálném čase byla analyzována metodou druhé derivace, jak již bylo popsáno dříve v literatuře (Kriegova, Arakelyan et al. 2008). Byla stanovena hodnota Cq (prahová hodnota) a účinnost PCR v reálném čase. Pouze miRNA s účinností PCR 1,7 – 2,0 (27 miRNA) byly použity pro další analýzu (Forlenza, Kaiser et al. 2012). Celkově byla studována exprese 41 miRNA, z nichž 8 nebylo analyzováno kvůli nízké účinnosti PCR reakce (**Tabulka 7**). Pro stanovení nejvhodnějšího normalizačního faktoru pro analýzu relativní exprese miRNA v séru bylo využito algoritmů GeNorm a NormFinder (Vandesompele, De Preter et al. 2002; Andersen, Jensen et al. 2004). 23 miRNA bylo exprimovány ve všech subjektech a tyto miRNA měly nejnižší variabilitu exprese ve všech vzorcích. Geometrický průměr těchto miRNA byl použit jako normalizační faktor pro výpočet relativní exprese miRNA.

Exprese jednotlivých miRNA mezi skupinami pacientů byla analyzována pomocí Mann-Whitney testu. Při mnohonásobném porovnávání může docházet k falešně pozitivním výsledkům, proto byla provedena korekce p hodnoty pomocí FDR (False Discovery Rate) metody podle Benjamina a Hochberga (1995) (Benjamini a Hochberg 1995), kde byla požadovaná hladina významnosti 5 %. Pro naše výsledky jsme vybrali pouze miRNA, u nichž byly hodnoty signifikance $p \leq 0,03$.

Dále jsme provedli multivariační analýzu s využitím programu SIMCA P verze 13.5.0 (Unimetrics, AB, Umeå, Švédsko). Data jsme podrobili analýze hlavních komponent (PCA = Principal Component Analysis) a ortogonální projekce do latentních struktur (OPLS = Orthogonal Projection to Latent Structures) (Levänen, Bhakta et al. 2013).

Multivariační statistika pomáhá redukovat dimenzionalitu velkého množství dat a nalézt vztah mezi studovanými subjekty a naměřenými daty. Může sloužit k identifikaci biomarkerů pro rozlišení například mezi zdravými a nemocnými jedinci. Převedení mnoha proměnných do jednoho bodu (tzv. komponenty) pomáhá lépe propojit data získaná u různých proměnných (například proteinů či metabolitů). Pro počáteční analýzu dat se využívá analýza hlavních komponent (PCA), která identifikuje odlehlé hodnoty. Dále lze využít ortogonální projekce do latentních struktur (OPLS), což může být metoda vhodná pro výběr biomarkerů, například pro oddělení dvou skupin, zdraví a nemocní, od sebe (Wheelock a Wheelock 2013).

Výkonnost OPLS modelu (z angl. model performance) je zaznamenána jako kumulativní korelační koeficient R^2 a prediktivní výkonnost modelu je zaznamenána jako Q^2. Prediktivní výkonnost modelu Q^2 je založená na sedminásobném křížovém ověření (cross-validation) (Levänen, Bhakta et al. 2013). Q^2 znázorňuje korelaci založenou na průměru výsledků opakovaných křížových ověření a reprezentuje míru prediktivní síly modelu (Wheelock a Wheelock 2013). OPLS modely s R^2 větší než 0,9 a Q^2 větší než 0,5 mohou být hodnoceny jako dobré modely (Eriksson, Jaworska et al. 2003). Signifikantní rozdíly mezi skupinami jsou vyjádřeny jako p hodnota, která je vypočítána testem CV-ANOVA. Hodnota p menší než 0,05 je hodnocena jako signifikantní (Yang, Kohler et al. 2018).

B.3.4. Analýza signálních drah u deregulovaných miRNA v séru

Exprese miRNA, které byly deregulovány mezi pacienty a kontrolami, byly testovány v databázi miRSystem (verze 20150312). Tato databáze zobrazuje signální dráhy v organismu a v nich geny, na které mohou miRNA působit (Lu, Lee et al. 2012). Poměr hodnot expresí (pacienti/kontroly) byl zadán do databáze Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway. V databázi jsme z výběru analýz zvolili analyzovat dráhy s více než 25 geny a méně než 500 geny.

C. Výsledky

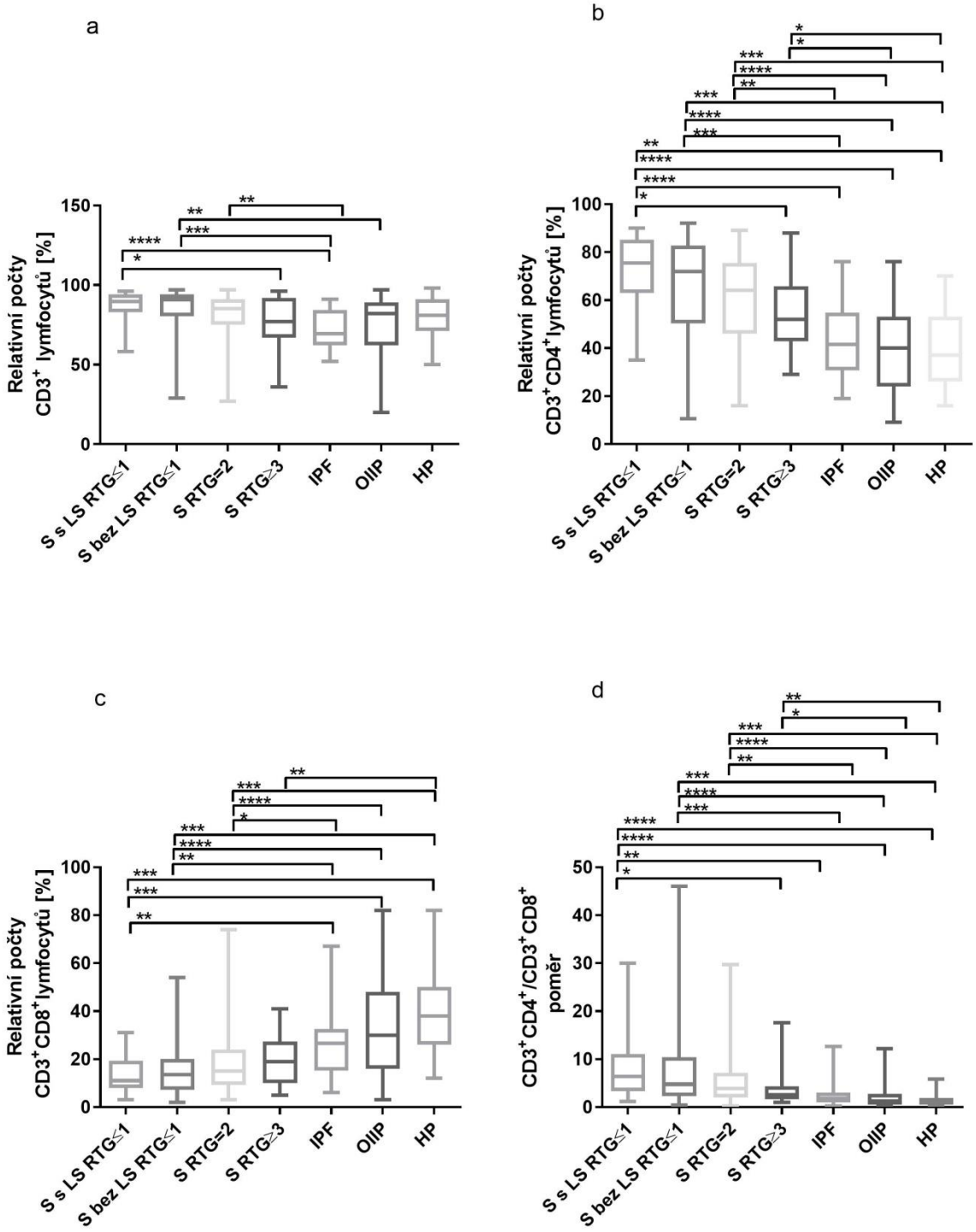
C.1. Výsledky analýzy porovnání relativních počtů bronchoalveolárních $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů a jejich poměru u pacientů se sarkoidózou a ostatními intersticiálními plicními nemocemi

Porovnávali jsme T-lymfocytární subpopulace $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ a poměr $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ v bronchoalveolární laváži u čtyř stádií pacientů s plicní sarkoidózou s ostatními intersticiálními plicními nemocemi u pacientů nekuřáků. Po FDR korekci p hodnot, jsme pozorovali rozdíly mezi pacienty s Löfgrenovým syndromem a pacienty v rentgenologickém (RTG) stádiu ≥ 3. Pacienti s Löfgrenovým syndromem měli zvýšené relativní počty $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ buněk, a vyšší poměr $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ než pacienti s RTG stádiem ≥ 3 (**Obrázek 4a, 4b, 4d**).

Rozdíly v relativních počtech $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ T-lymfocytů a poměru $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ byly zaznamenány u tří skupin pacientů se sarkoidózou s/bez Löfgrenova syndromu s RTG stádiem ≤ 1 a pacienty se sarkoidózou s RTG stádiem 2 v porovnání se skupinami s idiopatickou plicní fibrózou (IPF), ostatními idiopatickými intersticiálními pneumoniemi (OIIP) a hypersenzitivní pneumonií (HP) (**Obrázek 4a-d**).

Porovnání pacientů s pokročilým stádiem sarkoidózy, RTG stádium ≥ 3 se skupinou s IPF neukázalo žádné rozdíly v relativních počtech $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ T-lymfocytů a poměru $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ T-lymfocytů. Pokročilé stádium sarkoidózy ukázalo nárůst relativních počtů $CD3^+CD4^+$ T-lymfocytů a zvýšený poměr $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ v porovnání s OIIP skupinou (**Obrázek 4b, 4d**). U skupiny sarkoidózy s pokročilým stádiem RTG ≥ 3 byly nalezeny zvýšené relativní počty $CD3^+CD4^+$ T-lymfocytů a poměr $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ T-lymfocytů v porovnání s pacienty s HP (**Obrázek 4b, 4d**). Dále pacienti s pokročilým stádiem plicní sarkoidózy měli snížené relativní počty $CD3^+CD8^+$ T-lymfocytů v porovnání ke skupině s HP (**Obrázek 4c**). Data jsou vyjádřena jako krabicový graf (boxplot), který vyznačuje 25. až 75. percentil. Medián je vyznačen jako vodorovná spojnice v grafu. Dále krabicový graf zobrazuje minimální a maximální hodnotu v souboru. Výsledky subanalýzy BA $CD3^+CD4^+$ a $CD3^+CD8^+$ T-lymfocytů a ostatních buněčných populací u pacientů kuřáků a nekuřáků jsou uvedeny v kapitole **H.1. Příloha v Tabulkách 1 a 2**. Nebyly nalezeny rozdíly v $CD3^+CD4^+$ a $CD3^+CD8^+$ T-lymfocytech a jejich poměru mezi kuřáky a nekuřáky.

Obrázek 4a-d: Porovnání relativních počtů subpopulací T-lymfocytů u intersticiálních plicních onemocnění.



Legenda k obrázku 4a-d: S = sarkoidóza; LS = Löfgrenův syndrom; RTG = rentgenologické stádium, IPF = Idiopatická Plicní Fibróza, OIIP = Ostatní Idiopatická Intersticiální Pneumonie; HP = Hypersenzitivní Pneumonie, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

C.2. Výsledky studia exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitorů matrix metaloproteináz (MMP) u pacientů s plicní sarkoidózou

C.2.1. Výsledky porovnání bronchoalveolární mRNA exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitorů MMP u pacientů s plicní sarkoidózou v porovnání se zdravými kontrolami

Po Kruskal-Wallisově testu byly čtyři skupiny pacientů a skupina zdravých kontrol porovnány Dunnovým testem mnohonásobného porovnání. Analýza zahrnovala subjekty bez ohledu na kouření a ukázala signifikantní pokles relativní exprese AUF1 ($p < 0,001$), HuR ($p < 0,001$), TIA ($p < 0,001$), TIAR ($p < 0,05$), NCL ($p < 0,001$) a inhibitoru MMP RECK ($p < 0,001$) v BAL buňkách u pacientů s plicní sarkoidózou v porovnání se zdravými kontrolami (**Obrázek 5, Tabulka 8**). Relativní mRNA exprese genu PTEN se nelišila mezi pacienty s plicní sarkoidózou a zdravými kontrolami. Nebyl nalezen žádný rozdíl v expresi RNA-vazebných proteinů a ani u inhibitorů MMP (RECK, PTEN) mezi pacienty s plicní sarkoidózou v rentgenologickém stádiu 1 a stádiu 2 ($p > 0,05$). Subanalýza u subjektů, které nikdy nekouřily, ukázala, že relativní mRNA exprese genů AUF1 ($p < 0,001$), TIA ($p < 0,001$), NCL ($p < 0,01$) a RECK ($p < 0,05$) byla snížená u pacientů se sarkoidózou v porovnání se zdravými kontrolami (**Obrázek 5**, **Tabulka 8**).

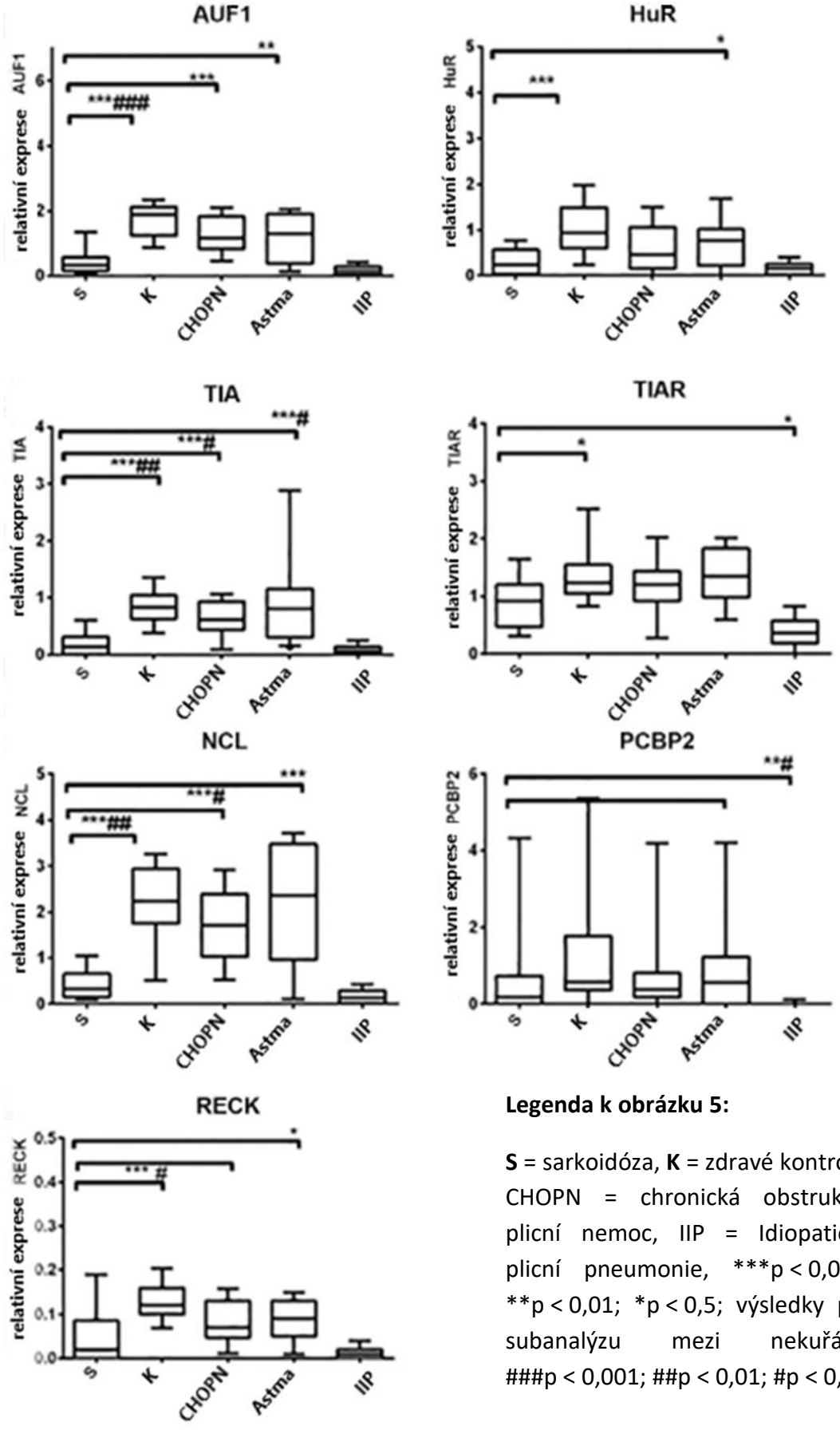
C.2.2. Výsledky porovnání bronchoalveolární mRNA exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitorů MMP u pacientů s plicní sarkoidózou, CHOPN, astmatem a IIP

Bez ohledu na kouření byla vyhodnocena snížená exprese AUF1 ($p_{CHOPN} < 0,001$; $p_{astma} < 0,01$), TIA ($p_{CHOPN} < 0,001$; $p_{astma} < 0,001$) a NCL ($p_{CHOPN} < 0,001$; $p_{astma} < 0,001$) v bronchoalveolárních buňkách u pacientů se sarkoidózou ve srovnání s obstrukčními nemocemi, CHOPN a astmatem (**Obrázek 5, Tabulka 8**). Subanalýza nekuřáků, pacientů, kteří nikdy nekouřili, ukázala pokles exprese TIA ($p_{CHOPN} < 0,05$; $p_{astma} < 0,05$) u pacientů se sarkoidózou v porovnání s oběma obstrukčními nemocemi (CHOPN, astma) a dále NCL ($p_{CHOPN} < 0,05$) ve srovnání s CHOPN (**Obrázek 5, Tabulka 8**). Data jsou vyjádřena jako krabicový graf (boxplot), který vyznačuje 25. a 75. percentil. Medián je vyznačen jako vodorovná spojnice v grafu. Dále krabicový graf zobrazuje minimální a maximální hodnotu v souboru.

C.2.3. Výsledky porovnání bronchoalveolární mRNA exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitorů MMP u zdravých kontrol s pacienty s CHOPN, astmatem a IIP

Porovnání mezi zdravými kontrolami a kontrolními skupinami nemocí (CHOPN, astma a IIP) jsou shrnuty v kapitole **H.2**. **Příloze Tabulka 1**. Bylo nalezeno snížení relativní exprese AUF1 ($p < 0,001$), TIA ($p < 0,001$), NCL ($p < 0,001$), PCBP2 ($p < 0,001$) a RECK ($p < 0,001$) ve skupině IIP v porovnání se zdravými kontrolami. Vliv kouření na BAL buněčný profil je uveden v kapitole **H.2. Příloha Tabulka 1**.

Obrázek 5: Dunnův test mnohonásobného porovnání relativní exprese mRNA u vybraných RNA-vazebných proteinů a inhibitoru MMP bez ohledu na kouření.



Legenda k obrázku 5:

S = sarkoidóza, **K** = zdravé kontroly, CHOPN = chronická obstrukční plicní nemoc, IIP = Idiopatické plicní pneumonie, ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,5; výsledky pro subanalýzu mezi nekuřáky: ###p < 0,001; ##p < 0,01; #p < 0,5.

Tabulka 8: Relativní mRNA exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitoru proteolytické aktivity MMP (RECK) u pacientů s plicními onemocněními a skupinou kontrol. V tabulce jsou uvedeny výsledky Dunnova testu mnohonásobného porovnání mezi skupinou se sarkoidózou a kontrolami. Dále jsou v tabulce uvedeny výsledky porovnání mezi skupinou se sarkoidózou a třemi skupinami plicních onemocnění (CHOPN, astma, IIP).

Onemocnění (n) Název genu	Plicní sarkoidóza (n = 50)	Zdravé kontroly (n =23)	CHOPN (n = 30)	Astma (n = 19)	IIP (n = 19)
AUF1	0,34 (0,15; 0,58)	1,89 (1,24; 2,13)***###	1,16 (0,83; 1,92)***	1,31 (0,38; 1,92)**	0,15 (0,04; 0,29) ns
HuR	0,24 (0,02; 0,57)	0,93 (0,6; 1,49)***	0,46 (0,15; 1,06) ns	0,76 (0,22; 1,01)*	0,15 (0,02; 0,25) ns
NCL	0,33 (0,16; 0,66)	2,24 (1,75; 2,94)***##	1,71 (1,03; 2,39)***#	2,36 (0,97; 3,47)***	0,14 (0,02; 0,29) ns
TIA	0,14 (0,01; 0,31)	0,83 (0,63; 1,04)***###	0,62 (0,44; 0,93)***#	0,81 (0,31; 1,16)***#	0,06 (0,03; 0,14) ns
TIAR	0,92 (0,47; 1,20)	1,24 (1,05; 1,54)*	1,2 (0,92; 1,44) ns	1,35 (0,98; 1,83) ns	0,36 (0,19; 0,57)*
PCBP2	0,19 (0,01; 0,74)	0,58 (0,36; 1,78) ns	0,38 (0,18; 0,82) ns	0,57 (0,01; 1,23) ns	0,01 (0,01; 0,02)**#
RECK	0,02 (0,01; 0,09)	0,12 (0,10; 0,16)***#	0,07 (0,05; 0,13) ns	0,09 (0,05; 0,13)*	0,01 (0,01; 0,02) ns

Legenda k Tabulce 8: Hodnota relativní exprese je uvedena jako medián. V závorkách je uveden 25. a 75. percentil relativní mRNA exprese; CHOPN = chronická obstrukční plicní nemoc; IIP = Idiopatické intersticiální pneumonie; n = počet subjektů ve skupině; ns = není signifikantní.

Dunnův test mnohonásobného porovnání:
Mnohonásobné porovnání bez ohledu na kouření ***$p < 0,001$; **$p < 0,01$; *$p < 0,05$
Mnohonásobné porovnání u nekuřáků ###$p < 0,001$; ##$p < 0,01$; #$p < 0,05$.

C.2.4. Výsledky korelační analýzy bronchoalveolární mRNA exprese RNA-vazebných proteinů, inhibitorů matrix metaloproteináz a bronchoalveolárních buněčných populací

Korelační analýza byla provedena za účelem nalezení vztahu mezi RNA-vazebnými proteiny a inhibitory matrix metaloproteináz, jejichž mRNA sekvence obsahují vazebná místa bohatá na adenosin (ARE = Adenosine-Rich Elements). Tyto mRNA se mohou stát cílem RNA-vazebných proteinů. U pacientů s plicní sarkoidózou byla mRNA exprese inhibitoru MMP RECK snížená současně se snižující se mRNA expresí genů AUF1 ($p = 0,002$), NCL ($p = 0,02$), HuR ($p = 0,002$), TIA ($p < 0,001$) a TIAR ($p = 0,007$). Nebyl nalezen žádný vztah mezi PTEN a RNA-vazebnými proteiny u pacientů s plicní sarkoidózou.

Korelace mRNA exprese RNA-vazebných proteinů s buněčným profilem bronchoalveolární laváže zjistila negativní korelaci mRNA exprese u genu PCBP2 s absolutními i relativními počty lymfocytů ($p = 0,003$ a $p = 0,003$) u pacientů s plicní sarkoidózou. Další informace o vztahu BAL buněčného profilu a mRNA exprese u dalších pacientských skupin jsou uvedeny online v naší publikaci o RNA-vazebných proteinech v doplňujícím dokumentu **S1 File** (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161669).

C.2.5. Vliv kouření a věku na bronchoalveolární mRNA expresi RNA-vazebných proteinů u pacientů s plicní sarkoidózou

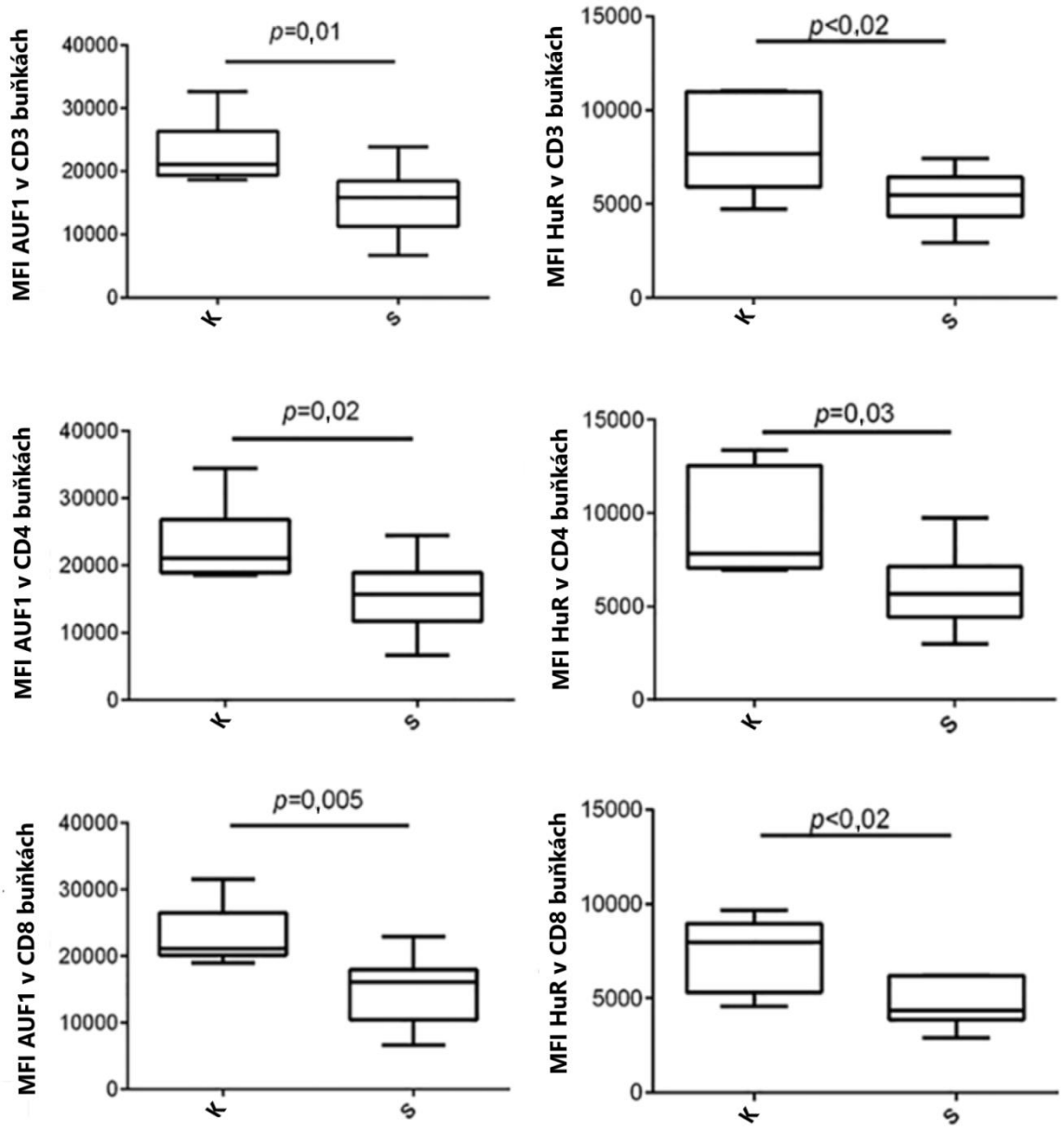
Zdali má kouření vliv na expresi RNA-vazebných proteinů bylo analyzováno porovnáním mezi kuřáky a nekuřáky, viz **H.2. Příloha Tabulka 1**. U pacientů s plicní sarkoidózou se relativní mRNA exprese RNA-vazebných proteinů a inhibitoru proteolytických enzymů RECK nelišila mezi nekuřáky a kuřáky. Skupina kuřáků zahrnovala ex-kuřáky (subjekty, které přestaly kouřit) se stále kouřícími pacienty ($p > 0,05$).

Analýza provedená s ohledem na věk pacientů nenašla rozdíl mezi mladými (≤ 45 let, $n = 25$) a staršími (> 45 let, $n = 25$) pacienty s plicní sarkoidózou ($p > 0,05$).

C.2.6. Výsledky porovnání relativní proteinové exprese dvou RNA-vazebných proteinů v mononukleárních buňkách periferní krve u pacientů s plicní sarkoidózou a zdravých kontrol

Na proteinové úrovni byly stanoveny dva z nejvíce studovaných RNA-vazebných proteinů, AUF1 a HuR. Jejich exprese byla stanovena na systémové úrovni v buňkách periferní krve. Nižší průměrná fluorescenční intenzita (MFI = Mean Fluorescence Intensity) u proteinu AUF1 ($p < 0,02$) a HuR ($p < 0,03$) byla stanovena v $CD3^+$, $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytech u pacientů se sarkoidózou v porovnání se zdravými kontrolami **(Obrázek 6).**

Obrázek 6: Porovnání průměrné fluorescenční intenzity (MFI = Mean fluorescence intensity) proteinů AUF1 a HuR v $CD3^+$, $CD4^+$ a $CD8^+$ pozitivních buněčných populacích v mononukleárních buňkách periferní krve.



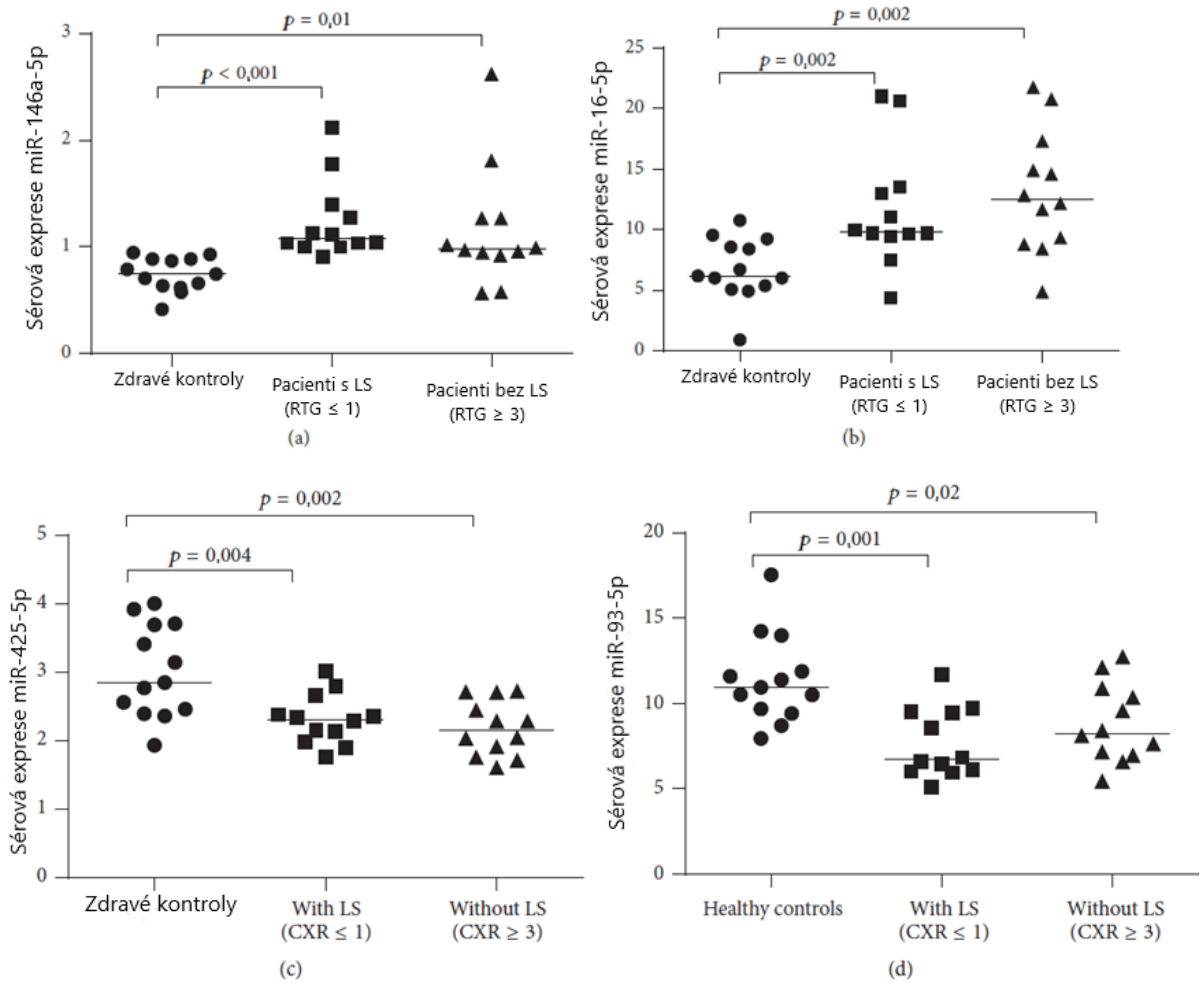
Legenda k obrázku 6: K = zdravé kontroly, S = pacienti s plicní sarkoidózou, MFI (Mean Fluorescence Intensity) = průměrná fluorescenční intenzita. Data jsou vyjádřena jako krabicový graf (boxplot), který vyznačuje 25. až 75. percentil. Medián je vyznačen jako vodorovná spojnice v grafu. CD3 = $CD3^+$ buňky; CD4 = $CD4^+$ buňky, CD8 = $CD8^+$ buňky

C.3. Výsledky stanovení relativní exprese miRNA v séru u pacientů s plicní sarkoidózou a zdravými kontrolami

C.3.1. Výsledky Mann-Whitney testu při porovnání exprese miRNA v séru

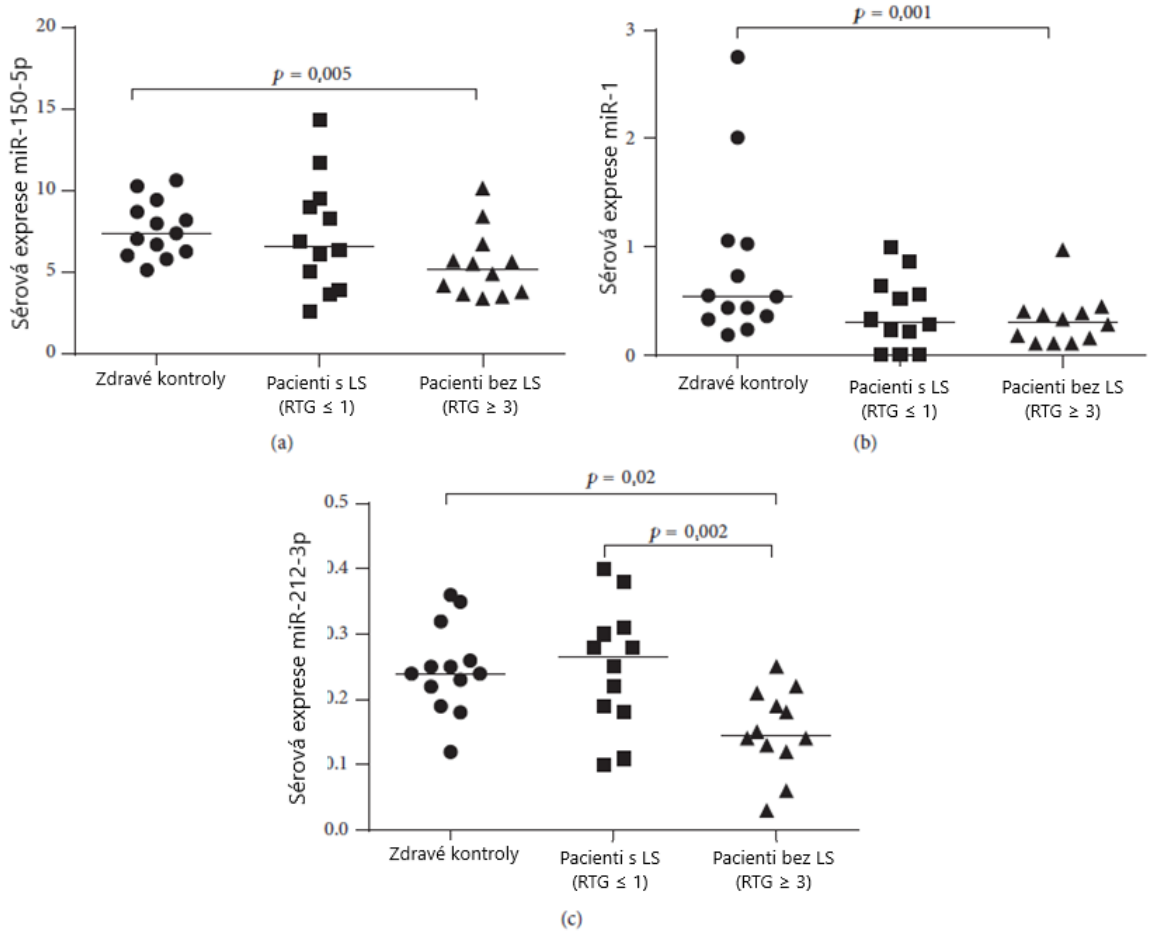
V porovnání se zdravými kontrolami byla pozorována zvýšená relativní sérová exprese miR-146a-5p a miR-16-5p a snížená exprese miR-425-5p a miR-93-5p v obou skupinách pacientů s plicní sarkoidózou s Löfgrenovým syndromem a bez Löfgrenova syndromu (**Obrázek 7a-d**). Exprese tří miRNA (miR-150-5p, miR-1 a miR-212-3p) byly sníženy u našich pacientů bez Löfgrenova syndromu v porovnání se zdravými kontrolami (**Obrázek 8a-c**). Exprese miR-21-5p byla zvýšená u našich pacientů s Löfgrenovým syndromem v porovnání se zdravými kontrolami (**Obrázek 9a**). Naopak miR-340-5p byla snížena u pacientů s Löfgrenovým syndromem v porovnání se zdravými kontrolami (**Obrázek 9b**). Pacienti bez Löfgrenova syndromu měli sníženou expresi miR-212-3p a miR-21-5p a zvýšenou expresi miR-340-5p v porovnání s pacienty s Löfgrenovým syndromem (**Obrázek 8c, 9a a 9b**).

Obrázek 7: Sérová relativní exprese miRNA deregulovaných v obou skupinách pacientů s plicní sarkoidózou s Löfgrenovým syndromem a bez Löfgrenova syndromu v porovnání se zdravými kontrolami.



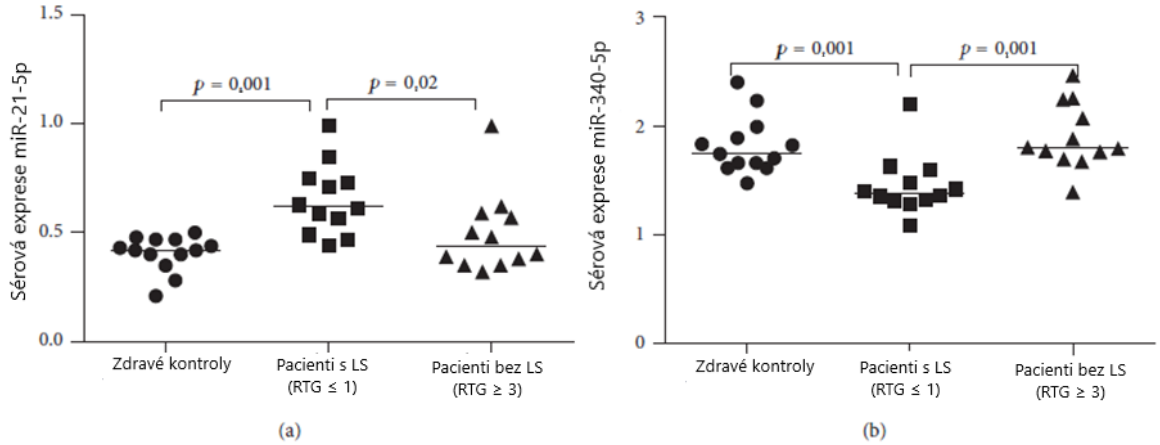
Legenda k obrázku 7: LS = Löfgrenův syndrom; RTG = rentgenologické stádium.

Obrázek 8: Sérová relativní exprese miRNA deregulovaných u pacientů s plicní sarkoidózou s Löfgrenovým syndromem a bez Löfgrenova syndromu v porovnání se zdravými kontrolami.



Legenda k obrázku 8: LS = Löfgrenův syndrom; RTG = rentgenologické stádium.

Obrázek 9: Sérová relativní exprese miRNA deregulovaných v obou skupinách pacientů s plicní sarkoidózou s Löfgrenovým syndromem a bez Löfgrenova syndromu v porovnání se zdravými kontrolami.



Legenda k obrázku 9: LS = Löfgrenův syndrom; RTG = rentgenologické stádium.

C.3.2. Výsledky analýzy signálních drah miRNA deregulovaných v séru pacientů s plicní sarkoidózou

Data o expresi deregulovaných miRNA jsme podrobili analýze v databázi miRSystem, která zobrazuje signální dráhy a v nich geny, které jsou miRNA schopny ovlivňovat. Analýzou jsme zjistili, na které geny, v určitých signálních drahách mohou naše deregulované miRNA působit.

Do databáze miRSystem jsou zadávány poměry průměrných expresí jednotlivých miRNA u porovnávaných skupin pacientů a zdravých kontrol. Expresní profily miRNA, které byly nalezeny deregulované u pacientů s LS a bez LS v porovnání s kontrolním souborem, ukázaly nejvyšší miRSystem skóre pro tzv. signální dráhu rakoviny (Pathway in Cancer) ($p = 5{,}0 \times 10^{-9}$ a $p = 9 \times 10^{-7}$). V této dráze všech 6 miRNA (miR-146a-5p, miR-16-5p, miR-425-5p, miR-93-5p, miR-21-5p a miR-340-5p), které byly deregulovány u pacientů s Löfgrenovým syndromem v porovnání s kontrolami, pravděpodobně ovlivňují expresi 103 genů. Interakce genů s určitou miRNA byla podle databáze miRSystem experimentálně ověřena.

Dále sedm miRNA (miR-146a-5p, miR-16-5p, miR-425-5p, miR-93-5p, miR-150-5p, miR-1 a miR-212-3p) deregulovaných u pacientů bez Löfgrenova syndromu pravděpodobně moduluje expresi 112 genů v tzv. signální dráze rakoviny (Pathway in Cancer), u kterých je jejich interakce s miRNA podle miRSystem experimentálně ověřena.

mRNA sekvence genů obsažených ve dráze transformujícího růstového faktoru (The Transforming Growth Factor (TGF)-beta signalling pathway) jsou cílem tří miRNA (miR-340-5p, miR-212-3p a miR-21-5p) deregulovaných mezi skupinami pacientů s LS a bez LS. Podle miRSystem skóre je TGF-beta signální dráha signifikantně ovlivněna těmito třemi miRNA ($p = 1{,}9 \times 10^{-10}$).

C.3.3. Výsledky multivariační analýzy exprese deregulovaných miRNA v séru pacientů se sarkoidózou

Jako doplňující analýzu jsme provedli multivariační modelování pro nalezení vztahu mezi exprimovanými miRNA vzhledem k nemoci, abychom zjistili, zdali by deregulované miRNA mohly sloužit k rozlišení nemocných a zdravých. Šest miRNA deregulovaných mezi pacienty s LS a zdravými kontrolami a mezi pacienty bez LS a zdravými kontrolami ukázalo, že OPLS modelování nalezlo statisticky významný rozdíl u těchto dvou porovnání s prediktivní hodnotou 72 % a 65 % ($R^2 = 0{,}737$, $Q^2 = 0{,}717$, $p = 9.2 \times 10^{-7}$; $R^2 = 0{,}692$, $Q^2 = 0{,}652$,

$p = 9.6 \times 10^{-6}$). Multivariační analýza pro tři miRNA deregulované mezi dvěma stádii plicní sarkoidózy (s Ls a bez Ls) ukázala signifikantní separaci obou souborů ale s velmi slabou prediktivní hodnotou pouze 44 % ($R^2 = 0,536$ a $Q^2 = 0,443$; $p = 2,2 \times 10^{-9}$).

D. Diskuse

Diagnostika a léčba intersticiálních plicních onemocnění je komplexní proces a snahy o jejich zlepšení jsou vkládány do studia molekul, jako jsou mikroRNA nebo RNA-vazebné proteiny. Někteří autoři zpětně studují již známé aspekty sarkoidózy, například $CD4^+$ T-lymfocyty, a snaží se nalézt jejich nový význam v návaznosti na možnou léčbu. Studium molekul jako jsou miRNA a RNA-vazebné proteiny, které jsou u sarkoidózy málo prozkoumány, by mohlo pomoci k rozvoji dalších diagnostických postupů, případně k rozvoji nové léčby. Avšak k tomu je potřeba prozkoumat plicní sarkoidózu u různých stádií.

D.1. Diskuse: Porovnání relativních počtů bronchoalveolárních $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů u plicní sarkoidózy a ostatních intersticiálních plicních onemocnění

Doposud je málo informací o porovnání bronchoalveolárních (BA) subpopulacích $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů a jejich poměru ($CD4^+/CD8^+$) u jednotlivých stádií plicní sarkoidózy s ostatními intersticiálními plicními nemocemi. Stanovení poměru $CD4^+/CD8^+$ v BA je stále jedním z testů u komplexního procesu diagnostiky intersticiálních plicních onemocnění, i-když je v současnosti pouze pomocným diagnostickým kritériem (Meyer, Raghu et al. 2012). Podrobnější charakterizace BA buněčného profilu u jednotlivých stádií plicní sarkoidózy by mohla přispět k lepšímu popisu jednotlivých fází nemoci a možné předpovědi dalšího vývoje onemocnění. Avšak takových studií, které by na větších souborech pacientů prozkoumaly BA buněčný profil, je prozatím málo. Studie zabývající se porovnáním BA subpopulací T-lymfocytů mezi sarkoidózou a ostatními intersticiálními nemocemi obvykle nerozdělují pacienty s plicní sarkoidózou do jednotlivých stádií, například podle rentgenologických stádií hrudníku (Jara-Palomares, Martín-Juan et al. 2009; Vasakova, Sterclova et al. 2009; Capelozzi, Faludi et al. 2013; Lee, Chung et al. 2015).

U našich pacientů s plicní sarkoidózou s a bez Löfgrenova syndromu (LS) s RTG stádiem ≤ 1 a RTG stádiem 2 jsme pozorovali rozdíly v BA $CD4^+$, $CD8^+$ T-lymfocytech a jejich poměru ($CD4^+/CD8^+$) v porovnání s ostatními skupinami intersticiálních plicních nemocí. Zvýšení $CD4^+$ buněk v BA laváži u pacientů se sarkoidózou s LS v porovnání s ostatními skupinami plicní sarkoidózy je v souladu s předchozími pozorováními (Danila, Jurgauskiene et al. 2008; Danila, Jurgauskiene et al. 2009; Danila, Norkuniene et al. 2009). Avšak doposud nebyla uvedena studie, která by porovnala jednotlivá stádia plicní sarkoidózy s ostatními

intersticiálními nemocemi, proto je složité porovnávat naše výsledky se současnou literaturou.

Naše analýza neukázala signifikantní rozdíly u T-lymfocytárních subpopulací mezi pokročilým stádiem plicní sarkoidózy a skupinou pacientů s idiopatickou plicní fibrózou (IPF). To může u pacientů s plicní sarkoidózou poukazovat na změnu imunologické odpovědi směrem k fibróze, která je prvkem IPF. V současné době je málo poznatků o porovnání relativních počtů BA $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů mezi pokročilým stádiem sarkoidózy a IPF. Jsou popsány histologické změny ukazující postup od granulomatózního zánětu směrem k fibrotizaci tkáně u pacientů s pokročilým stádiem sarkoidózy (Shigemitsu a Azuma 2011). Podle současných poznatků se domníváme, že dochází k posunu od zánětlivé Th1 imunitní odpovědi k Th2 imunitní odpovědi, která rozvíjí hojící fibrotické procesy. Přitom dochází ke změně složení buněčných populací a mediátorů, které procesy řídí, jak bylo popsáno u pacientů v různých stádiích sarkoidózy a IPF (Antoniou, Soufla et al. 2009; Vasakova, Sterclova et al. 2009). Dostatek nových poznatků o rozdílech v relativních počtech bronchoalveolárních $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytů u pokročilé sarkoidózy a IPF by mohl pomoci objasnit další podobnosti a rozdíly u obou nemocí.

$CD4^+$ T-lymfocyty jsou potenciálním cílem pro nové terapie. Například steroidní léky potlačují expresi zánětlivých mediátorů produkovaných $CD4^+$ T-lymfocyty. Mezi tyto mediátory patří například interleukin-2, tumor nekrotizující faktor-alfa a interferon-gama. Tato forma léčby je používána u různých stádií sarkoidózy, nicméně se ukázalo, že léčba steroidními přípravky má vedlejší účinky. Nesteroidní protizánětlivé léky na tom nejsou o mnoho lépe (Celada a Drake 2015). Oswald-Richter et al. (2013) předpokládají, že lokální a systémové $CD4^+$ T-lymfocyty u sarkoidózy vykazují defekt v buněčné funkci. Zjistili, že klinické zlepšení pacientů korelovalo s obnovením správné funkce $CD4^+$ T-lymfocytů, a to hlavně v expresi cytokinů a proliferaci (Oswald-Richter, Richmond et al. 2013). Proto jsou T-lymfocyty u sarkoidózy stále potenciálním terapeutickým cílem pro specificky cílenou léčbu (Patterson a Chen 2018). Zkoumání BAL buněčného profilu by proto mělo přinést další poznatky o T-lymfocytech u intersticiálních plicních onemocnění, zejména u různých stádií sarkoidózy.

D.2. Diskuze: Exprese RNA-vazebných proteinů v bronchoalveolárních buňkách u plicní sarkoidózy

Snahy o nalezení nových biomarkerů a způsobů léčby u sarkoidózy vedou k výzkumu doposud málo prozkoumaných molekul. Mezi ně patří například RNA-vazebné proteiny, které jsou prozatím prozkoumány hlavně u onkologických plicních onemocnění (Kechavarzi a Janga 2014; Hong 2017). Co se týče exprese RNA-vazebných proteinů u plicní sarkoidózy, existuje o ní málo informací, téměř žádné.

V naší studii jsme v bronchoalveolárních buňkách pacientů s plicní sarkoidózou stanovili sníženou relativní mRNA expresi vybraných RNA-vazebných proteinů v porovnání se skupinami obstrukčních plicních nemocí a skupinou idiopatických intersticiálních pneumonií. Dále jsme na proteinové úrovni stanovili sníženou relativní expresi dvou RNA-vazebných proteinů v $CD4^+$ a $CD8^+$ T-lymfocytech, a to na systémové úrovni v periferní krvi.

Obecně byl vyšší výskyt RNA-vazebných proteinů zaznamenán u nádorových plicních onemocnění (Kechavarzi a Janga 2014). To je však v rozporu s naším pozorováním, kdy jsme u našich pacientů s plicní sarkoidózou nalezli sníženou expresi AUF1, NCL a TIA na mRNA úrovni v bronchoalveolárních buňkách. Dále jsme nalezli sníženou proteinovou expresi AUF1 a HuR v T-lymfocytech z periferní krve. Ve zdravé plicní tkáni a leukocytech jsou RNA-vazebné proteiny vysoce exprimovány, více než miRNA a dokonce více než transkripční faktory. To ukazuje na významnou roli RNA-vazebných proteinů při regulaci zánětu v plicích (Kechavarzi a Janga 2014).

Můžeme se pouze domnívat, zdali snížená exprese RNA-vazebných proteinů u sarkoidózy podporuje rozvoj nedostatečného mechanismu pro degradaci mRNA kódujících cytokiny (např. IL-6), chemokiny (např. IL-8) a proteolytické enzymy (např. MMP-9), které se na zánětu podílí (Fireman, Kraiem et al. 2002; Henry, McMahon et al. 2002; Paschoud, Dogar et al. 2006; Liu, Rosenberg et al. 2006; Chowdhury, Dijkhuis et al. 2013). Terapie zaměřené na RNA-vazebné proteiny převládají prozatím u maligních onemocnění. U RNA-vazebného proteinu HuR, který je spíše u maligních onemocnění zvýšený, jsou nové terapeutické přístupy zaměřeny na snížení exprese HuR. Lipidové nanočástice obsahující krátké interferující RNA proti HuR mRNA, které účinně redukují invazi, migraci a viabilitu buněk karcinomu plic (Muralidharan, Babu et al. 2016; Muralidharan, Babu et al. 2017). Dále je možné v molekule proteinu HuR blokovat vazebné místo pro molekuly mRNA (Wu, Lan et al.

2015). U našich pacientů s plicní sarkoidózou jsme našli sníženou mRNA expresi RNA-vazebných proteinů v bronchoalveolárních buňkách. Nové způsoby terapií u sarkoidózy by mohly mít například základ v obnovení dostatečné koncentrace RNA-vazebných proteinů v buňce.

Inhibitor proteolytických enzymů RECK, který podléhá post-transkripční kontrole vedené RNA-vazebnými proteiny, měl nižší expresi v BA buňkách ve všech skupinách pacientů s plicním onemocněním v porovnání se zdravými kontrolami. Dále exprese několika RNA-vazebných proteinů korelovala s bronchoalveolární mRNA expresí proteinu RECK u různých plicních onemocnění. Ačkoliv tyto korelace poskytují pouze nepřímý důkaz o možné přímé interakci mezi RNA-vazebnými proteiny a proteinem RECK, jejich in vivo interakce jsou i tak pravděpodobné. Z tohoto drobného poznatku vyplývá, jak je regulace zánětu komplexní. Nízká mRNA exprese genu RECK u našich pacientů může být součástí procesu narušené proteolytické degradace pojivových tkání u zánětlivých plicních onemocnění (Raghavan, Ogilvie et al. 2002; Skjøt-Arkil, Clausen et al. 2012).

D.3. Diskuze: Exprese miRNA v séru u pacientů s plicní sarkoidózou

Optimální stanovení diagnózy sarkoidózy se opírá o klinicko-radiologický obraz a morfologický průkaz granulomu. Bronchoskopie a s ní spojený odběr BA tekutiny a tkáně s granulomem je považována za poměrně invazivní zákrok a je spojována s následnými zdravotními riziky (Kolek, Žůrková et al. 2019). V současné době se hledají nové diagnostické a prognostické markery v materiálu získaném od pacientů méně invazivními metodami, například z krve (Brown, Rahman et al. 2014). miRNA by se díky své stabilitě v séru mohly stát novými diagnostickými markery onemocnění, případně by mohly sloužit k prognóze dalšího vývoje. K tomu je ale potřeba prozkoumat miRNA komplexně u zdravých jedinců a následně u různých stádií sarkoidózy (Jazva, Kasper et al. 2015).

Naše studie poskytuje náhled na exprese miRNA, které jsou deregulovány u pacientů s plicní sarkoidózou. V současné době není dostatek informací o stabilních miRNA v séru u pacientů s plicní sarkoidózou, které by bylo možné využít k normalizaci dat z real-time PCR. Již dříve byl nalezen přístup, který využívá geometrického průměru expresí genů k normalizaci PCR dat (Vandesompele, De Preter et al. 2002). Testovali jsme několik způsobů, jak naše data normalizovat a geometrický průměr se ukázal být nejvhodnější, jelikož byl nejstabilnější. Exprese miRNA normalizovaná geometrickým průměrem (23 exprimovaných

miRNA) ukázala, že miR-146a-5p, miR-16-5p, miR-425-5p, a miR-93-5p jsou deregulovány u pacientů s plicní sarkoidózou bez ohledu na stádium (s LS /bez LS) v porovnání s kontrolami. Pacienti bez LS měli deregulovanou expresi miR-150-5p, miR-1, a miR-212-3p v porovnání se zdravými kontrolami. Pacienti s LS měli deregulovanou expresi miR-21-5p a miR-340-5p ve srovnání se zdravými kontrolami.

Jazva et al. (2015) také studovali expresi miRNA miR-16-5p, miR-146a-5p a miR-150-5p, ale použili jiný přístup pro normalizaci exprese miRNA u pacientů s plicní sarkoidózou. U žádné z těchto miRNA nenalezli deregulaci v expresi (Jazva, Kasper et al. 2015). Tyto výsledky jsou sice v rozporu s naší studií, avšak my jsme použili jiný normalizační přístup pro real-time PCR data. Jazva et al. (2015) mají také jiné složení souboru pacientů s plicní sarkoidózou (Jazva, Kasper et al. 2015).

Databáze miRSystem předpověděla, že nalezené deregulované miRNA jsou schopné ovlivňovat geny, které kódují molekuly patřící do tzv. signální dráhy rakoviny (z angl. Pathways in Cancer). Deregulace miRNA u pacientů se sarkoidózou může vést k rozvoji zánětlivých procesů, apoptóze a angiogenezi, které doprovází kancerogenezi (Landskron, De la Fuente et al. 2014; Khoury a Tran 2015; Kiess, Wang et al. 2015). To, že je tzv. dráha rakoviny (Pathways in Cancer) zapojena do patogeneze plicní sarkoidózy, zjistili i další autoři (Singla, Zhou et al. 2017). Dále je exprese některých miRNA spojena se signální dráhou TGF-β, jež je asociována spíše s průběhem onemocnění. Pro-fibrotické vlastnosti TGF-β mohou působit během procesů, jež probíhají v pozdějších fázích plicní sarkoidózy (Massague 2012; Loke, Herbert et al. 2013).

Naše multivariační analýza ukázala signifikantní rozdíl mezi pacienty s plicní sarkoidózou a kontrolami. Avšak tři miRNA (miR-21-5p, miR-340-5p a miR-213-3p), které byly nalezeny deregulované mezi pacienty se sarkoidózou s Löfgrenovým syndromem a bez Löfgrenova syndromu nejsou dostačujícími markery pro rozlišení pacientů. Prozkoumání exprese většího množství miRNA by mohlo dopomoci k odhalení miRNA profilů, dostatečně specifických a sensitivních pro určitá stádia sarkoidózy.

Metodou multiplexní PCR jsme prozkoumali expresi většího množství miRNA v séru pacientů s plicní sarkoidózou, než bylo doposud zkoumáno (Jazva, Kasper et al. 2015). Ale i přesto multiplexní PCR nedovoluje high-throughput screening, který by mohl odhalit více miRNA s deregulovou expresí, které by se mohly stát biomarkery pro prognózu onemocnění.

Srovnání mezi všemi pěti rentgenologickými stádii by mohlo objasnit některé z aspektů průběhu onemocnění, od abnormalit zahrnujících postižení lymfatických uzlin až po postižení plicního parenchymu a fibrózu plic patrnou v pokročilejších stadiích plicní sarkoidózy (Valeyre, Prasse et al. 2014). I přes mnoho nových informací o miRNA, zůstávají naděje, že se miRNA stanou klinicky využitelnými biomarkery u sarkoidózy, prozatím nenaplněny (Bonham 2018).

E. Závěr

Dílčí výsledky výzkumu ukazují, že plicní sarkoidóza je onemocnění, jehož patofyziologie se odehrává na mnoha úrovních. V současné době je známo mnoho oblastí, od kterých by se mohl odrazit výzkum nových terapií, případně diagnostiky. $CD4^+$ T-lymfocyty, RNA-vazebné proteiny i miRNA se zdají být nadějnými cíli s ohledem na poznatky ostatních vědců, ať již pocházejí z výzkumu jiných onemocnění, než je sarkoidóza.

Změna imunologické odpovědi provází různé fáze onemocnění. U akutního stádia s Löfgrenovým syndromem může docházet k výraznému zvýšení $CD4^+$ T-lymfocytů a naopak u pokročilého rentgenologického stádia ≥ 3 dochází k poklesu $CD4^+$ T-lymfocytů v porovnání k některým intersticiálním plicním nemocem. V některých studiích zabývajících se bronchoalveolárním buněčným profilem jsou porovnáváni pacienti s plicní sarkoidózou bez ohledu na stádium plicní sarkoidózy s ostatními intersticiálními plicními nemocemi. To může mít poté zkreslující vliv na získaná data týkající se celkového bronchoalveolárního buněčného profilu. Také kouření by mělo být bráno jako faktor ovlivňující buněčné populace v plicích. Avšak někdy je problematické získat pro studii přesně specifikovaný biologický materiál.

Mezi pacienty s pokročilým stádiem plicní sarkoidózy a idiopatickou plicní fibrózou jsme nenalezli rozdíly v $CD4^+$ T-lymfocytech a poměru $CD4^+/CD8^+$. U pokročilého stádia plicní sarkoidózy dochází k rozvoji fibrózních procesů, kvůli kterým plicní tkáň přestává plnit svoji funkci. S tím souvisí pokles bronchoalveolárních $CD4^+$ T-lymfocytů, které byly snížené u našich pacientů s rentgenologickým stádiem ≥ 3. Obnovení správné exprese genů u $CD4^+$ T-lymfocytů by mohlo vést ke zlepšení klinického stavu u pacientů.

Snížená exprese některých RNA-vazebných proteinů pravděpodobně vede u plicní sarkoidózy ke stabilizaci sekvencí mRNA, jejichž translací vznikají zánětlivé mediátory podporující zánět v plicích. V současné době je málo informací o expresi RNA-vazebných proteinů v BA buňkách a jejich využití při léčbě u plicní sarkoidózy. Přístupy využívající RNA-vazebné proteiny pro terapii byly prozatím zaznamenány u onkologických onemocnění.

U sérových miRNA je patrné, že působí na geny v různých signálních drahách organismu, které jsou i podle ostatních autorů zapojeny do patofyziologie onemocnění. Avšak prozatím sérové miRNA není možné využít jako neinvazivní marker, či jako marker následného vývoje onemocnění. To bude možné, až budou prozkoumány větší

soubory pacientů v různých stádiích a také v dlouhodobějších časových úsecích. V současné době cirkulující miRNA poskytují náhled na klíčové regulační cesty, které by mohly odlišit sarkoidózu od ostatních plicních onemocnění a připravují tak prostředí pro budoucí studie biomarkerů.

F. Seznam publikací a konferenčních příspěvků

Publikace v časopisech s impakt faktorem (IF) související s disertační prací:

Novosadova E, Chabronova A, Kolek V, Petrek M, Navratilova Z. The serum expression of selected miRNAs in pulmonary sarcoidosis with/without Löfgren's syndrome. *Mediators Inflamm.* **2016**;2016, Article ID 1246129, 12 pages. http://dx.doi.org/10.1155/2016/1246129

IF 2015: 3.418

Navratilova Z, **Novosadova E**, Hagemann-Jensen M, Kullberg S, Kolek V, Grunewald J, Petrek M. Expression Profile of six RNA-binding proteins in Pulmonary Sarcoidosis. *PLoS One* 2016; **11**(8): e0161669. doi: 10.1371/journal.pone.0161669

IF 2015: 3.057

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

IF 2018: 2.027

Další publikace:

Kishore A, Navratilova Z, Kolek V, **Novosadova E**, Čépe K, du Bois R M, Petrek M. Expression analysis of extracellular microRNA in bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary sarcoidosis. Respirology 2018; **23**: 1166-1172. doi: 10.1111/resp.13364

IF 2018: 4.756

Tokic S, Štefanic M, Glavaš-Obrovac L, Jaman S, **Novosadová E**, Petrkova J, Navratilova Z, Suver-Stevic M, Petrek M. The expression of T-cell FOXP3 and T-bet is upregulated in severe, but not euthyroid Hashimoto's thyroiditis. Mediators Inflamm. **2016**; 2016, Article ID 3687420, 9 pages. doi:10.1155/2016/3687420

IF 2015: 3.418

Konferenční příspěvky související s disertační prací:

Novosadova E, Navratilova Z, Hagemann-Jensen M, Wahlström J, Kullberg S, Kolek V, Grunewald J, Petrek M. Selected microRNAs and RNA-binding proteins in patients with pulmonary sarcoidosis. *Program and abstracts*, str. 56. (MPLC 2015 - Munich Pittsburgh Lung Conference, October 2-3, **2015**, Munich)- Sdělení s posterem

Postery se spoluautorstvím:

Navratilova Z, **Novosadova E**, Smitalova D, Kishore A, Kolek V, Petrek M. Serum and bronchoalveolar exosomal miRNAs in pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J.* **2015**; 46(Suppl.

59):PA3319. *Abstracts on USB Key*. DOI**:** 10.1183/13993003. congress-2015. PA3319, (ERS International Congress, September 26-30, 2015, Amsterdam)

Navrátilová Z, **Novosadová E**, Smitalová D, Kishore A, Kolek V, Petřek M. Exprese bronchoalveolárních a cirkulujících exozomálních miRNA u pacientů s plicní sarkoidózou. *Sborník abstrakt*, str. 60. (XIX. kongres České a Slovenské pneumologické a ftizeologické společnosti, 17.-19.6. **2015**, Brno)

Odborná sdělení:

Přednáškový večer spolku lékařů v Olomouci. Středa 1.11. 2017, Ústav Patologické fyziologie LF UP, Koordinátor: prof. MUDr. Martin Petřek, CSc. Název sdělení: RNA vazebné proteiny

Prezentace na soutěži o Cenu Alberta Schweitzera – soutěž Francouzské ambasády. 19.4. 2018, Praha 2. Lékařská fakulta FN Motol, Název sdělení: The Serum Expression of selected miRNAs in pulmonary sarcoidosis with/without Löfgren's syndrome.

G. Seznam zkratek

Ag	antigen
APC	Allophycocyanin
APC-H7	Allophycocyanine-Hilite®7-BD
BA	Bronchoalveolární
BAL	Bronchoalveolární laváž
BSA	Bovine serum albumine; hovězí sérový albumin
CCL	Chemokinový (C-C motiv) ligand; cytokin patřící do skupiny C-C chemokinů
cDNA	complementary DNA; komplementární DNA
CCR	CC chemokinový receptor
Ct value	threshold cycle value; číslo cyklu, ve kterém fluorescence překročí prahovou hodnotu
CXC	chemokin patřící do skupiny C-X-C chemokinů
CXCR	CXC chemokinový receptor
DNA	Deoxyribonucleic Acid; deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxynukleosid 5'-trifosfáty

FDR	False Discovery Rate; korekce podle Benjamina a Hochberga pro odstranění falešně pozitivních výsledků
FEV1/FVC	Forced Expiratory volume in one second/ Forced Vital capacity; usilovně vydechnutý objem za jednu sekundu/usilovná vitální kapacita
FEV1%	Forced Expiratory volume in one second %; jednovteřinová vitální kapacita vyjádřená jako podíl z vitální kapacity FEV1 % = (FEV1/VC) x 100 %
FITC	Fluorescein isothiocyanate; fluorescein isothiokyanát
FSC	Forward-Scattered Light; přední rozptýlené světlo
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating factor; faktor stimulující kolonie makrofágů a granulocytů
HLA	Human Leukocyte Antigen; lidský leukocytární antigen
HP	hypersenzitivní pneumonie
CHOPN	Chronická obstrukční plicní nemoc
IgG	imunoglobulin třídy G
IPF	Idiopatická plicní fibróza
IIP	Idiopatická intersticiální pneumonie
IL	interleukin
IFN-γ	interferon gamma
K	kontroly
LNA	Lock Nucleic Acid; uzamčená nukleová kyselina
LS	Löfgrenův syndrom
miRISC	microRNA Induced Silencing Complex; ribonukleoproteinový complex s miRNA určený k regulaci translace
miRNA	microRNA
MMP	matrix metaloproteináza
mRNA	mediátorová RNA (messengerová RNA)

NaN_3	azid sodný
OIIP	ostatní idiopatické intersticiální pneumonie
OPLS	Orthogonal Projection to Latent Structures; ortogonální projekce do latentních struktur
PCA	Principal Component Analysis; analýza hlavních komponent
PBS pufr	Phosphate buffered saline; fosfátový pufr
PCR	Polymerase chain reaction; polymerázová řetězová reakce
PE	Phycoerythrin; fykoerytrin
Q^2	prediktivní výkonnost modelu (u OPLS modelu)
R^2	kumulativní korelační koeficient (u OPLS modelu)
RBP	RNA-binding protein; RNA-vazebný protein
RISC	RNA Induced Silencing Complex; ribonukleoproteinový komplex s miRNA určený k regulaci translace
RNA	Ribonucleic acid; ribonukleová kyselina
RTG stádium	rentgenologické stádium
S	sarkoidóza
SSC light	Side-scattered light; boční rozptýlené světlo
TAE pufr	Tris-acetát-EDTA pufr
TCR	T-cell Receptor; T-buněčný receptor
TGF-β	Transforming Growth factor-β; transformující růstový faktor-β
Th1 response, Th2 response	T helper 1 response, T helper 2 response; T pomocná imunitní odpověď typu 1 nebo 2
TNF-α	tumor nekrotizující faktor-alfa
VC	Vital Capacity; vitální kapacita
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor; vaskulární endoteliální růstový faktor

H. Přílohy

H.1. Příloha: Výsledky subanalýzy porovnání BAL buněčného profilu u pacientů kuřáků a nekuřáků v různých stádiích sarkoidózy s intersticiálními plicními nemocemi

Zařadili jsme analýzu srovnávající BAL buněčný profil u kuřáků (pacienti, kteří v době studie kouřili a ti, co přestali kouřit (ex-kuřáky)) a nekuřáků. Avšak pro tuto analýzu je limitující nízký počet pacientů ve skupině kuřáků. Po FDR korekci většina těchto výsledků nedosáhla statistické významnosti.

U některých skupin kouřících pacientů s intersticiálními plicními nemocemi byl nalezen nárůst celkového počtu BAL buněk (x 10^5), relativních a absolutních počtů makrofágů v porovnání k nekuřákům. Relativní a absolutní počty lymfocytů byly sníženy u kuřáků v porovnání s nekuřáky. Analýza mezi kuřáky a nekuřáky neukázala rozdíly u $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$ T-lymfocyty a u poměru $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ **(H.1. Příloha Tabulka 1)**.

Analýza diferenciálních buněčných počtů nalezla méně rozdílů mezi ex-kuřáky a nekuřáky. Nicméně relativní počty $CD3^+CD4^+$ buněk byly sníženy u kuřáků a ex-kuřáků v porovnání s nekuřáky, a to u skupiny pacientů bez Löfgrenova syndromu s RTG stádiem ≤ 1 a u OIIP skupiny **(H.1. Příloha Tabulka 2).**

H.1. Příloha Tabulka 1a: Mann-Whitney test porovnávající BAL buněčný profil kuřáků a nekuřáků v jednotlivých skupinách intersticiálních plicních nemocí (IPN).

IPN	Počet kuřáků *vs.* nekuřáci	Návratnost laváže (%)	Celkový počet buněk ($\times 10^5$)	Makrofágy relativní počty (%)	Lymfocyty relativní počty (%)	Neutrofily relativní počty (%)	Eozinofily relativní počty (%)	Makrofágy absolutní počty ($\times 10^5$)	Lymfocyty absolutní počty ($\times 10^5$)	Neutrofily absolutní počty. ($\times 10^5$)	Eozinofily absolutní počty ($\times 10^5$)
S s LS (RTG ≤ 1)	10/18	0,737	0,178	0,332	0,279	0,940	0,139	0,157	***0,044***	0,681	0,133
S bez LS (RTG ≤ 1)	6/64	0,406	***0,0001***	***0,007***	***0,006***	0,741	0,129	***0,0001***	*0,054*	***0,022***	***0,047***
S RTG = 2	14/113	0,568	***0,017***	***0,047***	***0,037***	0,212	0,443	***0,020***	0,652	0,926	0,223
S RTG ≥ 3	1/26	0,274	0,898	0,441	0,563	0,847	0,456	0,898	0,700	0,898	0,459
IPF	4/22	0,726	0,056	0,252	***0,052***	0,799	0,947	***0,042***	0,161	0,105	1,000
OIIP	15/39	0,757	0,072	***0,002***	***0,004***	0,134	0,928	***0,021***	0,258	0,568	0,492
HP	3/15	0,097	0,405	***0,028***	***0,018***	0,441	0,432	0,110	0,173	0,553	0,314

Výsledky jsou uvedeny jako P hodnota. Úroveň signifikance je nastavena na hodnotu $P < 0,05$. P hodnoty < 0,05 jsou napsány kurzívou. IPN, intersticiální plicní nemoci; S, sarkoidóza; LS, Löfgrenův syndrom; RTG s., rentgenologické stádium; IPF, idiopatická plicní fibróza; OIIP, ostatní idiopatické intersticiální pneumonie; HP, hypersensitivní pneumonie.

H.1. Příloha Tabulka 1b: Mann-Whitney test porovnávající BAL buněčný profil kuřáků a nekuřáků v jednotlivých skupinách intersticiálních plicních nemocí (IPN).

IPN	Počet kuřáků *vs.* nekuřáci	$CD3^+$ relativní počty (%)	$CD4^+$ relativní počty (%)	$CD8^+$ relativní počty (%)	$CD19^+$ relativní počty (%)	CD4/CD8 poměr
S s LS (RTG ≤ 1)	10/18	0,970	0,941	0,525	0,492	0,766
S bez LS (RTG ≤ 1)	6/64	0,437	0,257	0,550	*0,030*	0,502
S RTG = 2	14/113	0,256	0,723	0,476	0,112	0,755
S RTG ≥ 3	1/26	0,898	0,653	0,652	0,424	1,000
IPF	4/22	0,823	0,702	0,849	0,452	0,611
OIIP	15/39	0,250	0,122	0,549	0,391	0,235
HP	3/15	0,477	0,767	0,906	0,106	0,953

Výsledky jsou uvedeny jako P hodnota. Úroveň signifikance je nastavena na hodnotu $P < 0,05$. P hodnoty < 0,05 jsou napsány kurzívou. IPN, intersticiální plicní nemoci; S, sarkoidóza; LS, Löfgrenův syndrom; RTG, rentgenologické stádium; IPF, idiopatická plicní fibróza; OIIP, ostatní idiopatické intersticiální pneumonie; HP, hypersensitivní pneumonie.

H.1. Příloha Tabulka 2a Mann-Whitney test porovnávající BAL buněčný profil u kuřáků plus ex-kuřáků a nekuřáků v jednotlivých IPN skupinách.

IPN	Počet kuřáků + ex-kuřáků *vs* nekuřáci	Návratnost laváže (%)	Celkový počet buněk ($\times 10^5$)	Makrofágy relativní počty (%)	Lymfocyty relativní počty (%)	Neutrofily relativní počty (%)	Eozinofily relativní počty (%)	Makrofágy absolutní počty ($\times 10^5$)	Lymfocyty absolutní počty ($\times 10^5$)	Neutrofily absolutní počty ($\times 10^5$)	Eozinofily absolutní počty ($\times 10^5$)
S s LS (RTG ≤ 1)	15/18	0,349	0,442	0,212	0,280	0,383	0,087	0,415	0,114	0,143	0,121
S bez LS (RTG ≤ 1)	16/64	0,749	0,248	0,174	0,224	0,971	0,266	0,243	0,605	0,430	0,216
S RTG = 2	48/113	0,706	0,101	0,147	0,306	0,349	0,263	0,097	0,965	0,642	0,139
S RTG ≥ 3	6/26	0,923	0,961	0,809	0,923	0,716	0,120	0,961	0,772	0,790	0,066
IPF	19/22	***0,011***	0,235	0,604	0,164	0,658	0,550	0,487	0,168	0,261	0,712
OIIPs	32/39	0,894	0,063	***0,014***	***0,014***	0,114	0,429	***0,024***	0,412	0,563	0,173
HP	14/15	0,275	0,484	0,067	***0,036***	0,444	0,164	0,138	0,138	0,777	0,265

Výsledky jsou uvedeny jako P hodnota. Úroveň signifikance je nastavena na hodnotu $P < 0,05$. P hodnoty < 0,05 jsou napsány kurzívou. IPN, intersticiální plicní nemoci; S, sarkoidóza; LS, Löfgrenův syndrom; RTG, rentgenologické stádium; IPF, idiopatická plicní fibróza; OIIP, ostatní idiopatické intersticiální pneumonie; HP, hypersensitivní pneumonie.

H.1. Příloha Tabulka 2b Mann-Whitney test porovnávající BAL buněčný profil u kuřáků plus ex-kuřáků a nekuřáků v jednotlivých IPN skupinách.

IPN	Počet kuřáků + ex-kuřáků *vs.* nekuřáci	$CD3^+$ relativní počty (%)	$CD4^+$ relativní počty (%)	$CD8^+$ relativní počty (%)	$CD19^+$ relativní počty (%)	Poměr $CD4^+ / CD8^+$
S s LS (RTG ≤ 1)	15/18	0,614	0,867	0,580	0,856	0,666
S bez LS (RTG ≤ 1)	16/64	0,123	*0,029*	0,455	0,204	0,188
S RTG = 2	48/113	***0,041***	0,077	0,769	0,255	0,365
S RTG ≥ 3	6/26	0,809	0,681	0,346	0,653	0,809
IPF	19/22	0,850	0,383	0,791	0,079	0,397
OIIPs	32/39	0,367	***0,034***	0,367	0,840	0,095
HP	14/15	0,445	0,793	0,132	0,414	0,315

Výsledky jsou uvedeny jako P hodnota. Úroveň signifikance je nastavena na hodnotu $P < 0,05$. P hodnoty < 0,05 jsou napsány kurzívou. IPN, intersticiální plicní nemoci; S, sarkoidóza; LS, Löfgrenův syndrom; RTG, rentgenologické stádium; IPF, idiopatická plicní fibróza; OIIP, ostatní idiopatické intersticiální pneumonie; HP, hypersensitivní pneumonie.

H.2. Příloha: Výsledky studia bronchoalveolární mRNA exprese RNA-vazebných proteinů:

H.2. Příloha Tabulka 1: Porovnání mRNA exprese u RNA-vazebných proteinů a jednoho inhibitoru proteolytické aktivity (RECK) mezi čtyřmi kontrolními skupinami zahrnujícími zdravé jedince a pacienty s chronickou plicní obstrukční nemocí (CHOPN), astmatem a idiopatickými intersticiálními pneumoniemi (IIP).

	CHOPN (n = 30) vs			Astma (n = 19) vs		IIP (n = 19) vs
	Zdravé kontroly (n = 23)	Astma (n = 19)	IIP (n = 19)	Zdravé kontroly (n = 23)	IIP (n = 19)	Zdravé kontroly (n = 23)
AUF1	↑++♦	ns	↓***##	↑+	↓***#	↑***###
HuR	↑+♦♦	ns	↓*	ns	↓**	↑***
NCL	↑+♦♦	ns	↓***###	ns	↓***##	↑***###
TIA	↑♦	ns	↓***##	ns	↓***#	↑***###
TIAR	ns	ns	↓***	ns	↓***#	↑***#
PCBP2	ns	ns	↓***#	ns	↓***#	↑***###
RECK	↑++♦	ns	↓***#	↑+	↓***#	↑***###

Legenda k H.2. Příloha Tabulka 1: ↑ zvýšená mRNA exprese; ↓ snížená mRNA exprese; CHOPN, chronická obstrukční plicní nemoc; IIP, idiopatická intersticiální pneumonie; ns, není signifikantní.

Výsledky Mann-Whitney U testu:

Analýza provedená bez ohledu na kouření ++p < 0,01; +p < 0,05

Současní kuřáci a ex-kuřáci ♦♦p < 0,01; ♦p < 0,05

Výsledky Dunnova testu mnohonásobného porovnání:

Mnohonásobné porovnání bez ohledu na kouření p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05

Mnohonásobné porovnání u nekuřáků: ###p < 0,001; ##p < 0,01; #p < 0,05

I. Seznam literatury

Abdelmohsen, K. a M. Gorospe. "RNA-binding protein nucleolin in disease." RNA biology 2012; **9**(6): 799-808.

Andersen, C. L., J. L. Jensen a T. F. Ørntoft. "Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets." Cancer Research 2004; **64**(15): 5245-5250.

Anderson, P. "Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation." Nature Reviews Immunology 2010; **10**(1): 24-35.

Ando, M., K. Konishi, R. Yoneda a M. Tamura. "Difference in the phenotypes of bronchoalveolar lavage lymphocytes in patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis, farmer's lung, ventilation pneumonitis, and bird fancier's lung: report of a nationwide epidemiologic study in Japan." The Journal of Allergy and Clinical immunology 1991; **87**(5): 1002-1009.

Antoniou, K. M., G. A. Margaritopoulos, S. Tomassetti, F. Bonella, U. Costabel a V. Poletti. "Interstitial lung disease." European Respiratory Review 2014; **23**(131): 40-54.

Antoniou, K. M., G. Soufla, A. Proklou, G. Margaritopoulos, C. Choulaki, R. Lymbouridou, K. D. Samara, D. A. Spandidos a N. M. Siafakas. "Different activity of the biological axis VEGF-Flt-1 (fms-like tyrosine kinase 1) and CXC chemokines between pulmonary sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis: a bronchoalveolar lavage study." Clinical & Developmental Immunology 2009: 1-8.

ATS a ERS (2002). "American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2002; **165**(2): 277-304.

Augusti, A., R. Beasley, B. R. Celli, R. Chen, G. Criner, P. Frith a D. Halpin. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. 2020; **:** 1-62.

Barnes, P. J. "Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease." Nature Reviews Immunology 2008; **8**, 183-192.

Barratt, S., A. Creamer, C. Hayton a N. Chaudhuri. "Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF): An Overview." Journal of Clinical Medicine 2018; **7**(8): 1-21.

Baughman, R. P., D. A. Culver a M. A. Judson. "A Concise Review of Pulmonary Sarcoidosis." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine: Concise Clinical Review 2011; **183**: 573–581.

Baughman, R. P., S. Field, U. Costabel, R. G. Crystal, D. A. Culver, M. Drent, M. A. Judson a G. Wolff. "Sarcoidosis in America. Analysis Based on Health Care Use." Annals of the American Thoracic Society 2016; **13**(8): 1244-1252.

Benjamini, Y. a Y. Hochberg. "Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) 1995; **57**(1): 289-300.

Blondal, T., S. Jensby Nielsen, A. Baker, D. Andreasen, P. Mouritzen, M. Wrang Teilum a I. K. Dahlsveen. "Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids." Methods 2013**; 59**(1): S1-6.

Bonetta, L. "Prime time for real-time PCR." Nature Methods 2005; **2**(4): 305-312.

Bonham, C. A. "Biomarkers in Sarcoidosis: Can microRNAs Fill the Gap?" American Lournal of Respiratory Cell and Molecular Biology 2018; **58**(1): 1-2.

Bourdin, A., P. R. Burgel, P. Chanez, G. Garcia, T. Perez a N. Roche. "Recent advances in COPD: pathophysiology, respiratory physiology and clinical aspects, including comorbidities." European Respiratory Review 2009; **18**: 198-212.

Bourke, S. J., J. C. Dalphin, G. Boyd, C. McSharry, C. I. Baldwin a J. E. Calvert. "Hypersensitivity pneumonitis: current concepts." The European Respiratory Journal. Supplement 2001; **18**(32): 81-92.

Brown, D., M. Rahman a S. P. Nana-Sinkam. "MicroRNAs in respiratory disease. A clinician's overview." Annals of the American Thoracic Society 2014; **11**(8): 1277-1285.

Capelozzi, V. L., E. P. Faludi, A. B. Balthazar, S. d. M. Fernezlian, J. V. B. Filho a E. R. Parra "Bronchoalveolar lavage improves diagnostic accuracy in patients with diffuse lung disease." Diagnostic Cytopathology 2013; **41**, 1-8.

Celada, L. J. a W. P. Drake. "Targeting $CD4^+$ T cells for the treatment of sarcoidosis: a promising strategy?" Immunotherapy 2015; **7**(1): 57-66.

Costa e Silva, M. a R. Rolo. "The role of Bronchoalveolar lavage in Interstitial Lung Diseases." Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition) 2017; **23**, 360-362.

Costabel, U. a G. W. Hunninhake. "ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. Sarcoidosis Statement Committee. American Thoracic Society. European Respiratory Society. World Association for Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders." European Respiratory Journal 1999; **14**: 735-737.

Craig, V. J., L. Zhang, J. S. Hagood a C. A. Owen. "Matrix Metalloproteinases as Therapeutic Targets for Idiopathic Pulmonary Fibrosis." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 2015; **53**(5): 585-600.

Danila, E., L. Jurgauskiene a R. Malickaite. "BAL fluid cells and pulmonary function in different radiographic stages of newly diagnosed sarcoidosis." Advances in Medical Sciences 2008**; 53**(2): 228-233.

Danila, E., L. Jurgauskiene, J. Norkuniene a R. Malickaite. "BAL fluid cells in newly diagnosed pulmonary sarcoidosis with different clinical activity." Upsala Journal of Medical Sciences 2009; **114**(1): 26-31.

Danila, E., J. Norkuniene, L. Jurgauskiene a R. Malickaite. "Diagnostic role of BAL fluid CD4/CD8 ratio in different radiographic and clinical forms of pulmonary sarcoidosis." The Clinical Respiratory Journal 2009; **3**(4): 214-221.

Denli, A. M., B. B. J. Tops, R. H. A. Plasterk, R. F. Ketting a G. J. Hannon. "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." Nature 2004; **432**(7014): 231-235.

Drent, M., K. Mansour a C. Linssen. "Bronchoalveolar Lavage in Sarcoidosis." Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine (2007) **28**, 486-495.

Drent, M., H. van Velzen-Blad, M. Diamant, S. S. Wagenaar, H. C. Hoogsteden a J. M. van den Bosch. "Bronchoalveolar lavage in extrinsic allergic alveolitis: effect of time elapsed since antigen exposure." The European Respiratory Journal 1993; **6**(9): 1276-1281.

Elkington, P. T. G. a J. S. Friedland. "Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology." Thorax 2006; **61**(3): 259-266.

Eriksson, L., J. Jaworska, A. P. Worth, M. T. D. Cronin, R. M. McDowell a P. Gramatica. "Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability evaluations of classification- and regression-based QSARs." Environmental Health Perspectives 2003; **111**(10): 1361-1375.

Ezegbunam, W. a R. Foronjy. "Posttranscriptional control of airway inflammation." Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA 2018; **9**(1): 1-17.

Fata, J. E., S. Debnath, E. C. Jenkins, Jr. a M. V. Fournier. "Nongenomic Mechanisms of PTEN Regulation." International Journal of Cell Biology **2012**: 1-11.

Fireman, E., Z. Kraiem, O. Sade, J. Greif a Z. Fireman. "Induced sputum-retrieved matrix metalloproteinase 9 and tissue metalloproteinase inhibitor 1 in granulomatous diseases." Clinical and Experimental Immunology 2002; **130**: 331-337.

Forlenza, M., T. Kaiser, H. F. J. Savelkoul a G. F. Wiegertjes. "The use of real-time quantitative PCR for the analysis of cytokine mRNA levels." Methods in Molecular Biology 2012; **820**: 7-23.

Gerke, A. K., M. A. Judston, Y. C. Cozier, D. A. Culver a L. L. Koth . "Disease Burden and Variability in Sarcoidosis." Annals of the American Thoracic Society 2017; **14**(6): 421-428.

Gherzi, R., K.-Y. Lee, P. Briata, D. Wegmüller, C. Moroni, M. Karin a C. Y. Chen. "A KH Domain RNA Binding Protein, KSRP, Promotes ARE-Directed mRNA Turnover by Recruiting the Degradation Machinery." Molecular Cell 2004; **14**(5): 571-583.

GINA. "Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention.: WHO/NHLBI workshop report." Global Initiative for Asthma 2014: 1-113.

Greenlee, K. J., Z. Werb a F. Kheradmand. "Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted." Physiological Reviews 2007; **87**(1): 69-98.

Grunewald, J. a A. Eklund. "Löfgren's Syndrome Human Leukocyte Antigen Strongly Influences the Disease Course." Ammerican Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2009; **179**: 307-312.

Han, J., Y. Lee, K. H. Yeom, Y. K. Kim, H. Jin a V. N. Kim. "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." Genes & Development 2004; **18**(24): 3016-3027.

Henry, M. T., K. McMahon, A. J. Mackarel, K. Prikk, T. Sorsa, P. Maisi, R. Sepper, M. X. FitzGerald a C. M. Connor. "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in sarcoidosis and IPF." European Respiratory Journal 2002; **20**(5): 1220.

Hong, S. "RNA Binding Protein as an Emerging Therapeutic Target for Cancer Prevention and Treatment." Journal of Cancer Prevention 2017; **22**(4): 203-210.

Hunninghake, G. W., U. Costabel, M. Ando, R. P. Baughman, J. F. Cordier, R. M. Du Bois, A. Eklund, M. Kitaichi, J. Lynch, R. G., C. Rose, O. Selroos a G. Semenzato. "Statement on sarcoidosis. Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS), the European Respiratory Society (ERS) and the World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (WASOG) adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee, February 1999." American journal of respiratory and critical care medicine 1999; **160**(2): 736-755.

Chowdhury, S., A. Dijkhuis, S. Steiert, R. Lutter a P. Holvoet (2013) "IL-17 Attenuates Degradation of ARE-mRNAs by Changing the Cooperation between AU-Binding Proteins and microRNA16." PLoS Genetics 2013; **9**: 1-11.

Ivanov, P. a P. Anderson. "Post-transcriptional regulatory networks in immunity." Immunological Reviews 2013; **253**: 253-272.

Jara-Palomares, L., J. Martín-Juan, L. Gómez-Izquierdo, A. Cayuela-Domínguez, E. Rodríguez-Becerra a F. Rodríguez-Panadero. "Bronchoalveolar lavage findings in patients with diffuse interstitial lung disease: prospective study of a cohort of 562 patients." Archivos de bronconeumologia 2009; **45**(3): 111-117.

Jazva, A., L. Kasper, M. Bak, M. Sobczak, K. Szade, A. Jozkowicz, K. Sladek a J. Dulak "Differential inflammatory microRNA and cytokine expression in pulmonary sarcoidosis." Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 2015; **63**: 139–146.

Kalchiem-Dekel, O., J. R. Galvin, A. P. Burke, S. P. Atamas a N. W. Todd "Interstitial Lung Disease and Pulmonary Fibrosis: A Practical Approach for General Medicine Physicians with Focus on the Medical History: A Practical Approach for General Medicine Physicians with Focus on the Medical History." Journal of Clinical Medicine 2018; **7**(12): 1-27.

Karakatsani, A., D. Papakosta, A. Rapti, K. M. Antoniou, M. Dimadi, A. Markopoulou, P. Latsi, V. Polychronopoulos, G. Birba, L. Ch a D. Bouros "Epidemiology of interstitial lung diseases in Greece." Respiratory Medicine 2009; **103**(8): 1122-1129.

Katzenstein, A. L. a J. L. Myers "Nonspecific interstitial pneumonia and the other idiopathic interstitial pneumonias: classification and diagnostic criteria." The American Journal of Surgical Pathology 2000; **24**(1): 1-3.

Kechavarzi, B. a S. C. Janga "Dissecting the expression landscape of RNA-binding proteins in human cancers." Genome Biology 2014; **15**: 1-16.

Khoury, S. a N. Tran "Circulating microRNAs." Biomarkers in Medicine 2015; **9**: 131-151.

Kiess, A. P., H. Wang, W. D. Travis a J. Yahalom "Sarcoid in cancer patients: clinical characteristics and associated disease status." Sarcoidosis, Vasculitis and Diffuse lung Diseases 2015; **14**: 200-207.

Kinder, B. W., K. K. Brown, M. I. Schwarz, J. H. Ix, A. Kervitsky a T. E. King "Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis." Chest 2008; **133**(1): 226-232.

Kishore, A., J. Borucka, J. Petrkova and M. Petrek "Novel insights into miRNA in lung and heart inflammatory diseases." Mediators of Inflammation **2014**: 259131.

Kishore, A. a M. Petrek "Immunogenetics of sarcoidosis." International Trends in Immunity 2013; **1**(4): 43-53.

Koblížek, V. a J. Zatloukal Chronická obstrukční plicní nemoc. 2019; Praha 2, Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP.

Kolek, V. "Epidemiological study on sarcoidosis in Moravia and Silesia." Sarcoidosis 1994; **11**(2): 110-112.

Kolek, V., M. Žůrková, R. Aiglová, J. Anton, B. Bábková, K. Balihar, R. Bittenglová, M. Doubková, M. Heřman, P. Horák, J. Hrdý, L. Hubáčková, A. Kishore, P. Koranda, E. Kriegová, K. Lenhart, V. Lošťáková a J. Müller-Quernheim Sarkoidóza: nemoc mnoha tváří. 2019; Praha 4, Maxdorf.

Krčmová, I. a J. Novosad "Bronchiální astma – praktické aspekty." Interní medicína pro praxi 2010; **12**(4): 196–199.

Kriegova, E., A. Arakelyan, R. Fillerova, J. Zatloukal, F. Mrazek, Z. Navrastilova, V. Kolek, R. du Bois a M. Petrek "PSMB2 and RPL32 are suitable denominators to normalize gene expression profiles in bronchoalveolar cells." BMC Molecular Biology 2008; **9**(69): 1-14.

Kudo, M., Y. Ishigatsubo a I. Aoki "Pathology of asthma." Frontiers in Microbiology 2013; **4**: 1-16.

Lai, W. S., E. A. Kennington a P. J. Blackshear "Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease." Molecular and Cellular Biology 2003; **23**(11): 3798-3812.

Landskron, G., M. De la Fuente, P. Thuwajit, C. Thuwajit a M. A. Hermoso "Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment." Journal of Immunology Research **2014**; 1-19.

Lee, W., W. S. Chung, K.-S. Hong a J. Huh (2015). "Clinical usefulness of bronchoalveolar lavage cellular analysis and lymphocyte subsets in diffuse interstitial lung diseases." Annals of Laboratory Medicine 2015; **35**(2): 220-225.

Levänen, B., N. R. Bhakta, P. Torregrosa Paredes, R. Barbeau, S. Hiltbrunner, J. L. Pollack, C. M. Sköld, M. Svartergren, J. Grunewald, S. Gabrielsson, A. Eklund, B. M. Larsson, P. G. Woodruff, D. J. Erle a Å. M. Wheelock "Altered microRNA profiles in bronchoalveolar lavage fluid exosomes in asthmatic patients." The Journal of Allergy and Clinnical Immunology 2013; **131**(3): 894-903.

Liu, W., G. A. Rosenberg a K. J. Liu 2006 "AUF-1 mediates inhibition by nitric oxide of lipopolysaccharide-induced matrix metalloproteinase-9 expression in cultured astrocytes." Journal of Neuroscience Research 2006; **84**: 360-369.

Livak, K. J. a T. D. Schmittgen "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods 2001; **25**(4): 402-408.

Loke, W. S. J., C. Herbert a P. S. Thomas (2013). "Sarcoidosis: Immunopathogenesis and Immunological Markers." International Journal of Chronic Diseases **2013**: 1-13.

López de Silanes, I., S. Galbán, J. L. Martindale, X. Yang, K. Mazan-Mamczarz, F. E. Indig, G. Falco, M. Zhan a M. Gorospe "Identification and functional outcome of mRNAs associated with RNA-binding protein TIA-1." Molecular and Cellular Biology 2005; **25**(21): 9520-9531.

Lu, T. P., C. Y. Lee, M. H. Tsai, Y. C. Chiu, C. K. Hsiao, L. C. Hsiao a E. Y. Chuang "miRSystem: an integrated system for characterizing enriched functions and pathways of microRNA targets." PLoS One 2012; **7**, 1-10.

Massague, J. "TGFβ signalling in context." Nature Reviews. Molecular Cell Biology 2012: **13**(10): 616-630.

Mazan-Mamczarz, K., A. Lal, J. L. Martindale, T. Kawai and M. Gorospe "Translational repression by RNA-binding protein TIAR." Molecular and Cellular Biology 2006; **26**(7): 2716-2727.

Meyer, K. "Bronchoalveolar Lavage as a Diagnostic Tool." Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine 2007; **28**(5): 546-560.

Meyer, K. C. and G. Raghu "Bronchoalveolar lavage for the evaluation of interstitial lung disease: is it clinically useful?" European Respiratory Journal 2011; **38**(4): 761-769.

Meyer, K. C., G. Raghu, R. P. Baughman, K. K. Brown, U. Costabel, R. M. du Bois, M. Drent, P. L. Haslam, D. S. Kim, S. Nagai, P. Rottoli, C. Saltini, M. Selman, C. Strange and B. Wood "An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2012; **185**(9): 1004-1014.

Milman, N. a O. Selroos "Pulmonary sarcoidosis in the Nordic countries 1950-1982. Epidemiology and clinical picture." Sarcoidosis 1990; **7**(1): 50-57.

Mims, J. W. "Asthma: definitions and pathophysiology." International Forum of Allergy & Rhinology 2015; **5**: 1-5.

Moore, A. E., D. M. Chenette, L. C. Larkin a R. J. Schneider "Physiological networks and disease functions of RNA-binding protein AUF1." Wiley interdisciplinary reviews. RNA 2014; **5**(4): 549-564.

Muralidharan, R., A. Babu, N. Amreddy, K. Basalingappa, M. Mehta, A. Chen, Y. D. Zhao, U. B. Kompella, A. Munshi a R. Ramesh "Folate receptor-targeted nanoparticle delivery of HuR-RNAi suppresses lung cancer cell proliferation and migration." Journal of Nanobiotechnology 2016; **14**(47): 1-17.

Muralidharan, R., A. Babu, N. Amreddy, A. Srivastava, A. Chen, Y. D. Zhao, U. B. Kompella, A. Munshi and R. Ramesh "Tumor-targeted Nanoparticle Delivery of HuR siRNA Inhibits Lung Tumor Growth In Vitro and In Vivo By Disrupting the Oncogenic Activity of the RNA-binding Protein HuR." Molecular Cancer Therapeutics 2017; **16**(8): 1470-1486.

Nalysnyk, L., J. Cid-Ruzafa, P. Rotella and D. Esser "Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature." European Respiratory Review 2012; **21**(126): 355-361.

Navratilova, Z., M. Petrek a V. Kolek "Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 2016; **64**: 177–193.

Navratilova, Z., J. Zatloukal, E. Kriegova, V. Kolek and M. Petrek "Simultaneous up-regulation of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, 7, 8, 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1, 4 in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease." Respirology 2012; **17**(6): 1006-1012.

Oglesby, I. K., N. G. McElvaney a C. M. Greene "MicroRNAs in inflammatory lung disease - master regulators or target practice?" Respiratory Research 2010; **11**(1): 1-13.

Oh, J., R. Takahashi, S. Kondo, A. Mizoguchi, E. Adachi, R. M. Sasahara, S. Nishimura, Y. Imamura, H. Kitayama, D. B. Alexander, C. Ide, T. P. Horan, T. Arakawa, H. Yoshida, S.-I. Nishikawa, Y. Itoh, M. Seiki, S. Itohara, C. Takahashi a M. Noda "The Membrane-Anchored MMP Inhibitor RECK Is a Key Regulator of Extracellular Matrix Integrity and Angiogenesis." Cell 2001; **107**(6): 789-800.

Ortiz-Quintero, B. "Cell-free microRNAs in blood and other body fluids, as cancer biomarkers." Cell proliferation 2016: **49**(3): 281-303.

Oswald-Richter, K. A., B. W. Richmond, N. A. Braun, J. Isom, S. Abraham, T. R. Taylor, J. M. Drake, D. A. Culver, D. S. Wilkes and W. P. Drake "Reversal of global CD4+ subset dysfunction is associated with spontaneous clinical resolution of pulmonary sarcoidosis." Journal of Immunology 2013; **190**(11): 5446-5453.

Palanisamy, V., A. Jakymiw, E. A. Van Tubergen, N. J. D'Silva and K. L. Kirkwood (2012). "Control of Cytokine mRNA Expression by RNA-binding Proteins and microRNAs." Journal of Dental Research **91**(7): 651-658.

Park, M. J., M. S. Kim, I. C. Park, H. S. Kang, H. Yoo, S. H. Park, C. H. Rhee, S. I. Hong and S. H. Lee "PTEN suppresses hyaluronic acid-induced matrix metalloproteinase-9 expression in U87MG glioblastoma cells through focal adhesion kinase dephosphorylation." Cancer Research 2002; **62**(21): 6318-6322.

Paschoud, S., A. M. Dogar, C. Kuntz, B. Grisoni-Neupert, L. Richman a L. C. Kuhn "Destabilization of Interleukin-6 mRNA Requires a Putative RNA Stem-Loop Structure, an AU-Rich Element, and the RNA-Binding Protein AUF1." Molecular and Cellular Biology 2006; **26**: 8228-8241.

Patterson, K. C. a E. S. Chen "The Pathogenesis of Pulmonary Sarcoidosis and Implications for Treatment." Chest 2018; **153**(6): 1432-1442.

Petrek, M., A. Gibejova, J. Drabek, F. Mrazek, V. Kolek, E. Weigl a R. M. du Bois "CC chemokine receptor 5 (CCR5) mRNA expression in pulmonary sarcoidosis." Immunology Letters 2002; **80**(3): 189-193.

Petrek, M. a V. Kolek "T-lymfocytární subpopulace v bronchoalveolární laváži u plicní sarkoidózy a ostatních onemocnění plicního intersticia." Časopis lékařství českého 1993; **132**(3): 365-368.

Pietinalho, A., Y. Hiraga, Y. Hosoda, A. B. Löfroos, M. Yamaguchi and O. Selroos (1995). "The frequency of sarcoidosis in Finland and Hokkaido, Japan. A comparative epidemiological study." Sarcoidosis **12**(1): 61-67.

Rabe, K., S. Hurd, A. Anzueto, P. Barnes, S. Buist and C. P "Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: GOLD Executive Summary." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2007; **176**(6): 532-555.

Raghavan, A., R. L. Ogilvie, C. Reilly, M. L. Abelson, S. Raghavan, J. Vasdewani, M. Krathwohl and P. R. Bohjanen "Genome-wide analysis of mRNA decay in resting and activated primary human T lymphocytes." Nucleic Acids Research 2020; **30**(24): 5529-5538.

Raherison, C. and P. O. Girodet "Epidemiology of COPD." European Respiratory Review 2009; **18**(114): 213-221.

Shigemitsu, H. and A. Azuma "Sarcoidosis and interstitial pulmonary fibrosis; two distinct disorders or two ends of the same spectrum." Current Opinion in Pulmonary Medicine 2011; **17**(5): 303-307.

Skjøt-Arkil, H., R. E. Clausen, Q. H. T. Nguyen, Y. Wang, Q. Zheng, F. J. Martinez, C. M. Hogaboam, M. Han, L. B. Klickstein, M. R. Larsen, A. Nawrocki, D. J. Leeming a M. A. Karsdal "Measurement of MMP-9 and -12 degraded elastin (ELM) provides unique information on lung tissue degradation." BMC Pulmonary Medicine 2012; **12**(1): 34.

Skolnik, K. a C. J. Ryerson "Unclassifiable interstitial lung disease: A review." Respirology 2016; **21**(1): 51-56.

Sonkoly, E. a A. Pivarcsi "microRNAs in Inflammation." International Reviews of Immunology 2009; **28**(6): 535-561.

Spagnolo, P., G. Rossi, A. Cavazza, M. Bonifazi, I. Paladini, F. Bonella, N. Sverzellati a U. Costabel "Hypersensitivity Pneumonitis: A Comprehensive Review." Journal of investigational allergology & clinical immunology 2015; **25**(4): 237-250.

Spurzem, J. R. a S. I. Rennard "Pathogenesis of COPD." Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine 2005; **26**(2): 142-153.

Srikantan, S., K. Tominaga a M. Gorospe "Functional interplay between RNA-binding protein HuR and microRNAs." Current Protein & Peptide Science 2012; **13**(4): 372-379.

Takahashi, C., Z. Sheng, T. P. Horan, H. Kitayama, M. Maki, K. Hitomi, Y. Kitaura, S. Takai, R. M. Sasahara, A. Horimoto, Y. Ikawa, B. J. Ratzkin, T. Arakawa a M. Noda "Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1998; **95**(22): 13221-13226.

Travis, W. D., T. E. King, E. D. Bateman, D. A. Lynch, F. Capron, D. Center, T. V. Colby, J.-F. Cordier, R. M. duBois, J. Galvin, P. Grenier, D. M. Hansell, G. W. Hunninghake, M. Kitaichi, N. L. Müller, J. L. Myers, S. Nagai, A. Nicholson, G. Raghu a B. Wallaert "American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2002; **165**, 277-304.

Trentin, L., G. Marcer, M. Chilosi, R. Zambello, C. Agostini, M. Masciarelli, R. Bizzotto, C. Gemignani, A. Cipriani, G. Di Vittorio et al. "Longitudinal study of alveolitis in hypersensitivity pneumonitis patients: an immunologic evaluation." J Allergy Clin Immunol 1998; **82**(4): 577-585.

Valeyre, D., A. Prasse, H. Nunes, Y. Uzunhan, P. Y. Brillet a J. Muller-Quernheim "Sarcoidosis." Lancet 2014; **383**(9923): 1155-1167.

Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe a F. Speleman "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biology 2002; **3**(7): 1-12.

Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe a F. Speleman "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." Genome Biology 2002; **3**, 1-12.

Vasakova, M., M. Sterclova, L. Kolesar, A. Slavcev, P. Pohunek, J. Sulc, J. Skibova aI. Striz "Bronchoalveolar Lavage Fluid Cellular Characteristics, Functional Parameters and Cytokine a Chemokine Levels in Interstitial Lung Diseases." Scandinavian Journal of Immunology 2009; **69**, 268-274.

Vašáková, M. Plicní fibróza: Jak léčit plicní fibrózu? 2010; Olomouc, SOLEN, s.r.o.

Vašáková, M. "Léčba idiopatické plicní fibrózy v České republice v roce 2015." Interní medicína pro praxi 2015; **17**(3): 128-132.

Wallis, A. a K. Spinks "The diagnosis and management of interstitial lung diseases." BMJ 2015; **350**(17): h2072-h2072.

Wheelock, Å. M. a C. E. Wheelock "Trials and tribulations of ‘omics data analysis: assessing quality of SIMCA-based multivariate models using examples from pulmonary medicine." Molecular BioSystems 2013; **9**(11): 2589-2596.

Witwer, K. W., E. I. Buzás, L. T. Bemis, A. Bora, C. Lässer, J. Lötvall, E. N. Nolte-´t Hoen, M. G. Piper, S. Sivaraman, J. Skog, C. Théry, M. H. Wauben and F. Hochberg "Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research." Journal of Extracellular Vesicles 2013; (2): 1-25.

Wong, M. L. and J. F. Medrano "Real-time PCR for mRNA quantitation." BioTechniques 2005; **39**(1): 75-85.

Wu, X., L. Lan, D. M. Wilson, R. T. Marquez, W. C. Tsao, P. Gao, A. Roy, B. A. Turner, P. McDonald, J. A. Tunge, S. A. Rogers, D. A. Dixon, J. Aubé and L. Xu "Identification and validation of novel small molecule disruptors of HuR-mRNA interaction." ACS Chemical Biology 2015; **10**(6): 1476-1484.

Yang, M., M. Kohler, T. Heyder, H. Forsslund, H. K. Garberg, R. Karimi, J. Grunewald, F. S. Berven, S. Nyrén, M. S. C. and Å. M. Wheelock "Proteomic profiling of lung immune cells reveals dysregulation of phagocytotic pathways in female-dominated molecular COPD phenotype." Respiratory Research 2018; **19**(1): 1-11.

Internetové odkazy k laboratorním návodům a databázím:

Databáze miRSystem dostupná z: http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/

Introduction to flow cytometry: A Learning guide, © 2002 Becton, Dicinson Company dostupné z: https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf

Rotor-Gene® Q MDx User Manual, 2010, Hilden dostupné z: https://www.qiagen.com/kr/resources/download.aspx?id=3a8376b5-a48d-4f29-8c0a-d116cd06f10d&lang=en

Universal Probe Library; Roche Applied Science, Indianapolis, USA dostupné z: https://lifescience.roche.com/en_cz/brands/universal-probe-library.html

TaqMan microRNA Assay, Applied Biosystem, Thermofisher dostupné z: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4465407_CustomRT-preamp_UG.pdf

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, LifeScience, Roche dostupné z: https://lifescience.roche.com/en_cz/products/transcriptor-first-strand-cdna-synthesis-kit.html