

**UNIVERZITA PALACKÉHO
V OLOMOUCI
Lékařská fakulta**

**INVAZIVNÍ ENDOSKOPICKÉ
TECHNIKY V DIAGNOSTICE ZÁNĚTŮ
DÝCHACÍCH CEST**

Doktorská dizertační práce

MUDr. Jaromír Zatloukal

Olomouc 2011

Doktorand: MUDr. Jaromír Zatloukal

Doktorský studijní program: Vnitřní lékařství

Školící pracoviště: Klinika nemocí plicních a tuberkulózy
Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty
Univerzity Palackého Olomouc

Školitel: Prof. MUDr. Vítězslav Kolek, DrSc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vykonal samostatně a uvedl jsem veškerou použitou literaturu. Práce byla realizována na pracovištích Kliniky nemocí plicních a tuberkulózy FN a LF UP v Olomouci pod vedením přednosta kliniky Prof. MUDr. Vítězslava Kolka, DrSc. a v úzké spolupráci s kolegy z Laboratoře imunogenomiky a proteomiky FN a LF UP v Olomouci.

Poděkování

Chtěl bych na tomto místě vyjádřit své upřímné poděkování všem, kteří se podíleli na tomto projektu. Především bych chtěl poděkovat svému přednostovi a školiteli Prof. MUDr. Vítězslavu Kolkovi, DrSc., který byl a je mým učitelem pneumologie, který ve mně probudil lásku k tomuto oboru, ukázal mi netušené obzory, které tato vědní disciplína má, a bez jehož podpory by tato práce nemohla vzniknout.

Mé díky dále patří kolegům z Laboratoře imunogenomiky a proteomiky FN a LF UP v Olomouci, kteří pracovali na laboratorním zpracování odebraného materiálu, především Mgr. Zdence Navrátilové, PhD, Ing. Evě Kriegové, PhD a vedoucímu pracoviště Prof. MUDr. Martinu Petřkovi, DrSc.

OBSAH

1. ÚVOD	7
1.1. Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN)	8
1.1.1. Dějiny poznávání CHOPN	8
1.1.2. Epidemiologie CHOPN	9
1.1.3. Rizikové faktory, diagnóza a klinický průběh CHOPN	10
1.2. Asthma bronchiale (bronchiální astma).....	14
1.2.1. Dějiny poznávání bronchiálního astmatu	14
1.2.2. Epidemiologie bronchiálního astmatu	16
1.2.3. Rizikové faktory, diagnóza a klinický průběh bronchiálního astmatu	16
1.3. Bronchoskopie a bronchoskopická vyšetření v diagnostice bronchiálních zánětů.....	18
1.3.1. Historický přehled.....	18
1.3.2. Endoskopický obraz u CHOPN a bronchiálního astmatu	18
1.3.3. Bronchoalveolární laváž (BAL)	19
1.3.4. Bronchiální klíčkovatá biopsie a kartáčková biopsie.....	21
1.3.5. Komplikace bronchoskopie a bronchoskopických odběrů u pacientů s CHOPN a bronchiálním astmatem	21
1.3.5.1. Všeobecná doporučení týkající se bezpečného provedení bronchoskopie a BAL	21
1.3.5.2. Komplikace BAL	22
1.3.5.3. Krvácení	23
1.3.5.4. Pneumotorax.....	23
1.4. Zánět u CHOPN a bronchiálního astmatu	24
1.4.1. Přehled zánětlivých buněk u CHOPN a bronchiálního astmatu .	24
1.4.2. Přehled zánětlivých mediátorů u CHOPN.....	26
1.4.2.1. Chemokiny	26
1.4.2.2. Cytokiny	27
1.4.2.3. Růstové faktory	28
1.4.3. Přehled zánětlivých mediátorů u bronchiálního astmatu	29
1.4.3.1. Lymfokiny	29
1.4.3.2. Prozánětlivé cytokiny.....	30
1.4.3.3. Protizánětlivé cytokiny	31
1.4.3.4. Chemokiny	31
1.4.3.5. Růstové faktory	32
1.5. Matrix-metaloproteinázy – přehled o současném stavu problematiky	33
1.5.1. Matrix-metaloproteinázy a jejich inhibitory – obecný přehled...	33
1.5.2. Matrix-metaloproteinázy a jejich inhibitory v patogenezi CHOPN	36
1.5.3. Matrix-metaloproteinázy a jejich inhibitory v patogenezi bronchiálního astmatu	38
2. CÍL PRÁCE	40
3. METODIKA	41

4.	VÝSLEDKY	43
4.1.	Klinické charakteristiky souboru	43
4.2.	Komplikace bronchoskopie	47
4.3.	Cytologické vyšetření bronchoalveolární tekutiny	47
4.4.	Expres mRNA MMP-2, MMP-9 a TIMP-1 v bronchoalveolárních buňkách.....	51
4.5.	Stanovení koncentrací MMP-2, MMP-9, MMP-8, TIMP-1 a TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině metodou LUMINEX	58
5.	SOUHRNNÉ VÝSLEDKY A DISKUZE	68
6.	ZÁVĚR.....	76
7.	ABSTRAKT	77
8.	SUMMARY	80
9.	PŘEHLED ZKRATEK	83
10.	LITERATURA	86
11.	VLASTNÍ PUBLIKACE A PŘEDNÁŠKY	103

1. ÚVOD

Existuje řada zánětlivých onemocnění dýchacích cest. Patří mezi ně onemocnění akutní i chronická, některá jsou infekční, jiná neinfekční etiologie. Zvláštní místo mezi nimi zaujímají onemocnění spojená s bronchiální obstrukcí: chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) a bronchiální astma. Obě nemoci patří mezi nejrozšířenější jak v celosvětovém, tak v národním měřítku, jsou spojeny se značným sociálně-ekonomickým dopadem a v případě CHOPN také s vysokou mortalitou. Oběma nemocem je proto v poslední době věnována zvýšená pozornost [1, 2]. Zájem o tyto nemoci se projevuje také snahou o důkladnější poznání jejich patogenetických mechanismů a zaměřuje se na studium bronchiálního zánětu, který je jejich podstatou.

Vyšetření zánětu dolních dýchacích cest lze provést různými způsoby. Neinvazivní metody, např. vyšetření indukovaného sputa, analýza vydechovaného vzduchu anebo vyšetření kondenzátu vydechovaného vzduchu, jsou pro pacienta minimálně zatěžující, avšak umožňují pouze nepřímé vyšetření bronchiálního zánětu. Naproti tomu endoskopické vyšetření, tedy bronchoskopie s příslušnými odběry, je invazivní technikou, která je sice pro pacienta do určité míry zatěžující, avšak umožňuje přímé, bezprostřední vyšetření zánětlivých změn v dolních dýchacích cestách.

Přestože podstatou CHOPN i bronchiálního astmatu je především zánět dýchacích cest, je diagnostika těchto onemocnění v současné době založena na klinickém obrazu a spirometrickém funkčním nálezu. Bronchoskopie se v současné době v rutinní diagnostice CHOPN obvykle nevyužívá, přestože jde o vyšetření, které jako jediné umožní přímé vyšetření zánětu v dolních dýchacích cestách. Její použití je zpravidla vyhrazeno pro výzkumné účely. Provedení bronchoskopie umožňuje bezprostřední pozorování dolních dýchacích cest a provedení odběrů, umožňujících morfologické vyšetření tkáně, kvantifikaci zánětlivých buněk a mediátorů, případně provedení genetických a proteomických vyšetření.

Tato práce se zabývá vyšetřením zánětu dolních dýchacích cest pomocí bronchoskopie a bronchoalveolární laváže na poměrně velkém souboru 94 jedinců, kteří tvořili tři skupiny. Skupina pacientů s CHOPN čítala 35 osob, skupina s bronchiálním astmatem měla 26 osob a 33 osoby byly kontrolní jedinci. Přitom bylo provedeno vyšetření buněčných parametrů zánětu v bronchoalveolární tekutině, stanovení exprese mRNA některých matrix-metaloproteináz a jejich inhibitorů v bronchoalveolárních buňkách a konečně vyšetření koncentrace některých matrix-metaloproteináz a jejich inhibitorů v bronchoalveolární tekutině.

1.1. Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN)

1.1.1. Dějiny poznávání CHOPN

Nemoci spojené s bronchiální obstrukcí byly známy již ve starověku. Astma a jeho léčba pomocí inhalace par ze zahřáté bylinné mixtury je popisována již ve staroegyptském *Ebersově papyru*, který byl napsán kolem r. 1550 před naším letopočtem, ale který je pravděpodobně sám kopií rukopisu psaného již kolem r. 3400 před naším letopočtem [3, 4, 5]. Avšak teprve z r. 1691 pochází první ilustrace rozšířených dýchacích cest na povrchu plic, které zachytil na svých rytinách holandský anatom Frederick Ruysch při popisu kazuistiky 40-leté ženy [6]. O sto let později pak skotský patolog Matthew Baillie v r. 1793 poprvé popsal plicní emfyzém, který považoval za velmi vzácný [7]. O čtvrtstoletí později došlo k pokusu o vysvětlení vzniku plicního emfyzému – francouzský lékař a objevitel stetoskopu René Théophile Hyacinthe Laennec v r. 1819 zjistil, že místem, kde vzniká obstrukce vedoucí ke vzniku emfyzému, jsou právě periferní dýchací cesty. Přitom se domníval, že ztráta elasticity periferních dýchacích cest způsobuje snížený průtok vzduchu z rozšířených alveolů a tím přispívá ke vzniku emfyzému [8, 9]. K dalšímu výraznějšímu pokroku v poznání emfyzému plic došlo až po dalších téměř 130 letech. Gough a Wentworth v r. 1949 použili novou techniku fixace a ultratenkých řezů plicní tkáně, díky níž popsali a rozlišili centriacinální a panacinární emfyzém [10, 11]. Následovalo období explozivního nárůstu znalostí o patologii, epidemiologii a patofyziologii plicního emfyzému. Po r. 1960 docházelo ke snaze o pochopení patogeneze emfyzému a bronchitidy, v r. 1963 Carl-Bertil Laurell objevil α_1 -antitrypsin a zjistil, že jeho deficit vede ke vzniku plicního emfyzému [12], v dalších desetiletích byla zkoumána role zánětlivých buněk a jejich vliv na mechanismy vedoucí k poškození plicní tkáně. Na konci 20. století pak byla studována celá řada mediátorů podílejících se na zánětu dýchacích cest a byly zkoumány destruktivní a reparativní mechanismy probíhající při zánětu dýchacích cest.

Získané znalosti umožnily nový pohled na chronickou obstrukční plicní nemoc, která přestávala být chápána izolovaně jako chronická bronchitida anebo plicní emfyzém. Kolem r. 1960 probíhaly diskuze o klasifikaci obstrukční plicní nemoci a pokusy o její definici [13, 14]. V r. 1964 pak vznikla první definice CHOPN [15]. Znamenala velký pokrok ve vnímání nemoci, neboť do značné míry vyčlenila jiné příčiny obstrukce dýchacích cest, avšak z dnešního pohledu ještě měla významné nedostatky. Popisovala totiž CHOPN pouze jako „*chronickou obstrukci dýchacích cest nejasného původu*“. V tehdejší pojetí se tedy jednalo o diagnózu *per exclusionem*, kterou bylo možno přijmout po vyloučení známé příčiny intratorakální bronchiální obstrukce. Tím byly z definice CHOPN vyloučeny například lokalizované bronchiální obstrukce (u tumorů či jizevnatých změn při tuberkulóze nebo sarkoidóze), anebo specifické příčiny difuzní bronchiální obstrukce (bronchiektázie, cystická fibróza, bronchiolitis obliterans způsobená známým agens), ale také deficit α_1 -antitrypsinu, který v současné době chápeme jako jeden ze subtypů CHOPN. Na druhé straně nebylo podle tehdejší definice CHOPN zcela jasné, zda pod ni nelze zahrnout také bronchiální astma.

Upřesnění do značné míry přinesly novější definice Americké hrudní společnosti (ATS) z r. 1987 [16] a Evropské respirační společnosti (ERS) z r. 1995 [17], které poměrně rozsáhlým popisem definují CHOPN jako „*nemoc charakterizovanou redukcí maximálního průtoku vzduchu při expiriu a zpomaleným vyprazdňováním vzduchu z plic, přičemž omezení průtoku vzduchu je obvykle ireverzibilní a postupně progreduje a podílí se na něm jak bronchiální komponenta, charakterizovaná ztlustěním bronchiální stěny a bronchiální hypersekrecí, tak emfyzém plicní, definovaný anatomicky jako permanentní destruktivní rozšíření dýchacích cest distálně od terminálního bronchiolu bez zřetelné fibrózy*“. Součástí definice CHOPN z r. 1995 je také definice chronické bronchitidy, charakterizované „*bronchiální hypersekrecí vedoucí k produktivnímu kašli, přítomnému po většinu dnů nejméně 3 měsíce v roce a to v nejméně dvou po sobě následujících letech, a nezpůsobenou jinou plicní nebo kardiální příčinou*“.

Zatím poslední definice CHOPN z r. 2004, aktualizovaná v r. 2009, charakteristiku nemoci zpřehledňuje a přitom nově zdůrazňuje kurabilitu a preventabilitu nemoci a její mimoplicní účinky. Podle této definice „*CHOPN je léčitelné onemocnění, kterému lze předcházet a které má také významné mimoplicní účinky, které mohou přispívat k jeho závažnosti. Jeho plicní složka je charakterizována omezeným průtokem vzduchu v průduškách (bronchiální obstrukcí), který není plně reverzibilní. Bronchiální obstrukce obvykle progreduje a je spojena s abnormální zánětlivou odpovědí na škodlivé částice a plyny*“ [1].

Reakcí na vzrůstající význam a důsledky CHOPN byl v r. 1997 vznik mezinárodní organizace „The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease“ (GOLD), jejímž cílem je prohlubování znalostí o CHOPN, snižování morbidit a mortality způsobené CHOPN, zlepšení její prevence a léčby a podpora výzkumných aktivit v oblasti CHOPN. Mimoto vydává standardy strategie prevence, diagnostiky a léčby CHOPN. Následně bylo v r. 2000 v České republice ustaveno „České občanské sdružení proti chronické obstrukční plicní nemoci“ (ČOPN).

1.1.2. Epidemiologie CHOPN

Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) je v současné době jednou z nejčastějších příčin mortality a chronické morbidit. Zvyšování celosvětové spotřeby tabáku povede i v budoucnu k dalšímu nárůstu mortality, morbidit a ekonomických důsledků CHOPN [1]. Podle údajů Světové zdravotnické organizace (WHO) na CHOPN v r. 2008 zemřelo na celém světě 3,35 miliónů lidí, to znamená celkem 5,7% ze všech úmrtí, což zařadilo CHOPN na čtvrté místo v pořadí nejčastějších příčin úmrtí [18]. Podle odhadů WHO bude v r. 2030 CHOPN příčinou úmrtí u 5,80 miliónů osob, což bude činit 8,6% všech úmrtí, a bude v celosvětovém měřítku již třetí nejčastější příčinou úmrtí za ischemickou chorobou srdeční a cerebrovaskulárními nemocemi [19].

Odhady prevalence CHOPN se liší podle použité metodiky a pohybují se mezi 5 až 10% populace [1]. Podle odhadů WHO má CHOPN v současné době asi 210 miliónů lidí na celém světě, přitom přes 80 miliónů osob trpí středně těžkým a těžkým

stádiem, které jsou spojeny s klinicky významnými symptomy [20]. V České republice CHOPN postihovala v r. 1990 asi 750-800 tisíc osob [21].

CHOPN ekonomicky zatěžuje společnost jak přímými náklady (prevence, diagnostika, léčba), tak i nepřímými náklady (nemocenské dávky, invalidita, ztráta zaměstnání, předčasná úmrtí). V Evropské unii činí přímé náklady na CHOPN asi 38,6 miliard EUR, tedy asi 3,5% z celkového rozpočtu na zdravotní péči. Ve Spojených státech amerických činily v r. 2002 celkové náklady na CHOPN asi 32 miliard USD, z nichž asi 18 miliard USD byly přímé náklady [1]. Náklady přitom významně stoupají v závislosti na tíži onemocnění, další významné navýšení nákladů pak způsobují exacerbace a hospitalizace pacientů s CHOPN [22]. Podle různých studií hospitalizace vyčerpají 40-57% přímých nákladů na léčbu CHOPN [23]. Těžká exacerbace CHOPN, spojená s nutností korekce terapie, zvyšuje cenu léčení z 58 USD na 477 USD [24]. Podle odhadů Světové banky a WHO bude v r. 2020 patřit CHOPN společně s kardiovaskulárními nemocemi, těžkými depresemi a dopravními nehodami k největším příčinám zdravotně-ekonomických ztrát v celosvětovém měřítku [1].

1.1.3. Rizikové faktory, diagnóza a klinický průběh CHOPN

Bronchiální zánět a následná patogenetická kaskáda vedoucí k rozvoji CHOPN vzniká kombinací vlivu inhalace škodlivých látek a genetických faktorů. Mimoto se na patogenezi CHOPN mohou podílet také infekce dýchacích cest a v menší míře také další faktory, jakými jsou porodní váha a velikost plic při narození a v průběhu dětství.

Z inhalovaných škodlivin vedoucích ke vzniku CHOPN je na prvním místě inhalace tabákového kouře. Kuřáci cigaret mají vyšší výskyt respiračních příznaků a abnormalit plicních funkcí, větší roční pokles FEV₁ a vyšší mortalitu na CHOPN než nekuřáci [1]. Přibližně 40% kuřáků po 25 letech kouření onemocní CHOPN, z nich nejméně 25% bude mít CHOPN s klinicky závažnými projevy [25]. Riziko vzniku CHOPN a závažnost jejích projevů roste s celkovou expozicí tabákovému kouři. Ta se v současné době obvykle kvantifikuje pojmem „balíčko-rok“ („pack-year“), který je definován počtem krabiček (po 20 cigaretách) vykouřených za den a vynásobeným počtem let kouření. Např. hodnota 10 balíčko-roků (odpovídající kouření krabičky cigaret denně po dobu 10 let) znamená expozici vykouřených 73.000 cigaret. Nižší věk zahájení kouření zvyšuje riziko vzniku CHOPN a mortalitu. Vedle aktivního kuřáctví je rizikem pro vznik CHOPN také pasivní kouření. Kouření matky v těhotenství negativně ovlivňuje růst plic plodu a jeho imunitní systém a tím vede ke zvýšenému riziku vzniku CHOPN v dospělosti. Kuřáci dýmek a doutníků mají vyšší morbiditu a mortalitu na CHOPN než nekuřáci, ale nižší než kuřáci cigaret. Kouření marihuany vede ke vzniku zánětlivých změn v dýchacích cestách [26, 27], avšak nebylo prokázáno, že by vedlo k bronchiální obstrukci [28]; vliv kouření marihuany na vznik CHOPN je zatím nejasný [29]. Kromě kuřáctví je významným rizikovým faktorem vzniku CHOPN také vdechování průmyslových škodlivin, například organických či anorganických prachů, chemických škodlivin, plynů a par. V části zemí světa, zejména v řadě zemí Asie a Afriky, je důležitým rizikovým faktorem pro vznik CHOPN znečištění vzduchu v domácnostech při vaření a topení

biomasou ve špatně větraných domech – celosvětově se toto riziko týká až 3 miliard lidí. Vliv znečištění vzduchu ve městech na vznik CHOPN zatím není jednoznačně určen [1].

Diagnóza CHOPN je založena na anamnéze a klinickém vyšetření, doplněném o spirometrické funkční vyšetření plic, umožňující průkaz bronchiální obstrukce po inhalační aplikaci bronchodilatačního léku, které je nezbytné pro stanovení diagnózy a zároveň pro stanovení tíže nemoci podle klasifikace GOLD [1], podle které se řídí také ATS a ERS. Předpokladem správné diagnózy CHOPN je zhodnocení příznaků. Těmi jsou jednak dušnost, která je perzistující, každodenní, zpočátku pouze námahová, v průběhu času postupně progredující, a dále kašel, který může být intermitentní a neproduktivní, obvykle ale bývá produktivní a spojený s chronickou tvorbou sputa. Příznaky CHOPN mohou být přítomny izolovaně, naopak v těžších stádiích se k nim přidávají symptomy mimoplicních projevů CHOPN a v kterémkoliv stádiu mohou být doplněny projevy exacerbací. Diagnóza CHOPN je pak potvrzena spirometricky, pokud je po inhalační aplikaci krátkodobě působícího bronchodilatacia (např. 400 µg salbutamolu) prokázána bronchiální obstrukce, pro niž svědčí hodnota poměru $FEV_1/FVC < 70\%$. Hodnota FEV_1 pak určuje stádium CHOPN, které odráží tíži nemoci (tabulka 1) [1].

Tabulka 1: Spirometrická klasifikace tíže CHOPN na základě postbronchodilatační hodnoty FEV_1 podle GOLD/ATS/ERS [1]

Stádium I:	Lehké	$FEV_1/FVC < 70\%$ a $FEV_1 \geq 80\%$ náležitých hodnot
Stádium II:	Středně těžké	$FEV_1/FVC < 70\%$ a $50\% \leq FEV_1 < 80\%$ náležitých hodnot
Stádium III:	Těžké	$FEV_1/FVC < 70\%$ a $30\% \leq FEV_1 < 50\%$ náležitých hodnot
Stádium IV:	Velmi těžké	$FEV_1/FVC < 70\%$ a $FEV_1 < 30\%$ náležitých hodnot anebo $FEV_1 < 50\%$ náležitých hodnot s chronickým respiračním selháním

Řada dalších pomocných vyšetření se pak používá zejména k diferenciální diagnostice a u těžších stádií CHOPN, například radiologická vyšetření, vyšetření krevních plynů, kardiologická vyšetření, zátěžové testy, testy chůze, klasifikace dušnosti, vyšetření kvality života, vyšetření α_1 -antitrypsinu. Vyšetření bronchiálního zánětu při CHOPN, ať již nepřímou formou vyšetření indukovaného sputa, anebo přímým vyšetřením zánětu v dýchacích cestách, se v rutinní praxi obvykle neprovádí.

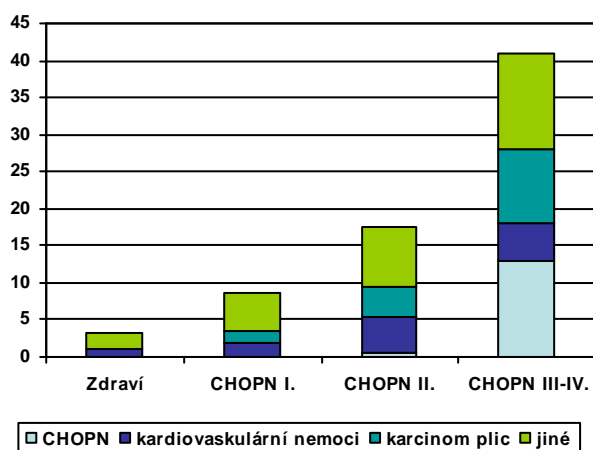
Průběh CHOPN má v podstatě dvě fáze. Jednou je stabilizované onemocnění s pomalou progresí a s pomalým zhoršováním plicních funkcí. Mimoto se v průběhu onemocnění vyskytují exacerbace, při nichž dochází k náhlému zhoršení celkového stavu nemocného s projevy akutního zánětu a významné deteriorace plicních funkcí s možnými vážnými komplikacemi.

Deklinace FEV_1 v průběhu času je jednou ze základních vlastností CHOPN, její rychlost je však u různých pacientů odlišná. Se zhoršováním plicních funkcí a s tím

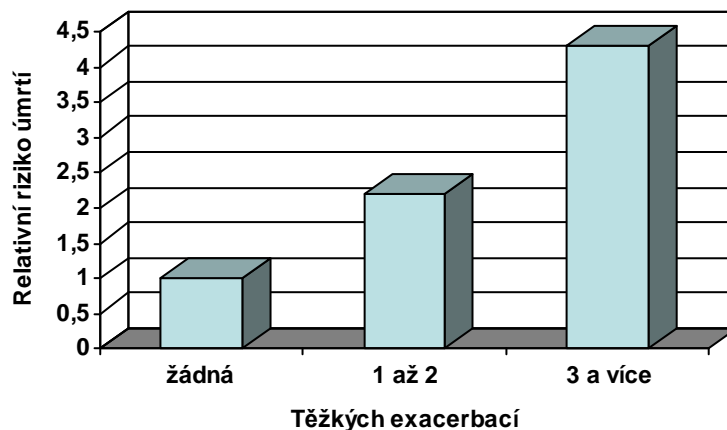
spojeným přechodem do těžšího stádia CHOPN dochází k významnému zvýšení mortality – pacienti ve druhém stádiu CHOPN mají mortalitu přibližně dvakrát vyšší a pacienti ve třetím a čtvrtém stádiu asi 5x vyšší než pacienti v prvním stádiu CHOPN (obrázek 1) [30]. Na druhé straně snížená hodnota FEV₁ u některých pacientů s CHOPN nemusí zcela přesně korelovat s jejich fyzickou výkonností, tolerancí námahy, subjektivním pocitem dušnosti ani kvalitou života.

Exacerbace CHOPN je definována jako náhle vzniklá příhoda v průběhu nemoci, charakterizovaná změnou obvyklé dušnosti, kašle anebo vykašlávání v míře větší, než je obvyklé každodenní kolísání těchto potíží. Příčinou vzniku exacerbace je nejčastěji bakteriální nebo virová infekce dýchacích cest, dalšími příčinami jsou znečištění ovzduší, expozice těkavým dráždivým látkám, chladné a deštivé počasí, přerušení léčby CHOPN, ale v řadě případů nelze příčinu exacerbace určit. Četnost exacerbací negativně ovlivňuje mortalitu – pacienti s CHOPN, kteří prodělají za rok 3 a více exacerbací, mají relativní riziko úmrtí 2–4 krát vyšší než pacienti se dvěma či méně exacerbacemi za rok (obrázek 2) [31].

Obrázek 1: Mortalita CHOPN rozdělená podle stádií (osob/1000 za rok) [30]



Obrázek 2: Relativní riziko úmrtí na CHOPN podle počtu exacerbací za rok [31]



Ačkoliv je zřejmé, že rychlost deklinace plicních funkcí v průběhu času anebo frekvence exacerbací mají vliv na průběh a mortalitu CHOPN, je v současné době zatím stále obtížné přesněji predikovat průběh onemocnění u jednotlivého pacienta. Některé recentní studie však naznačují, že CHOPN je heterogenní chorobou, v níž je možno vyčlenit různé fenotypy, které mají odlišné vlastnosti a mohou mít do určité míry také odlišný průběh nemoci [32]. Bližší poznání těchto fenotypů by mohlo vést k vyšší předvídatelnosti průběhu CHOPN u konkrétního pacienta.

1.2. Asthma bronchiale (bronchiální astma)

1.2.1. Dějiny poznávání bronchiálního astmatu

Historie bronchiálního astmatu sahá do starověku. Odkazy na toto onemocnění nacházíme v recepturách léků s bronchodilatačním účinkem, jedním z prvních je staroegyptský Ebersův papyrus [3, 4]. Ze starověku také pochází první zmínky o alergii. Staroegyptský faraón Menses zemřel po bodnutí vosím žihadlem někdy v době mezi léty 3640 a 3300 před naším letopočtem. Britannicus, syn římského císaře Claudia, měl alergii na koně a při kontaktu s nimi mu vznikala kožní exantém a otok očních víček [33].

Výraz *asthma* použil Homér ve své Iliadě při popisu stavu s krátkým dechem. Samotný termín *asthma* pochází z řeckého slova *aazein*, které znamená „vydechovat s otevřenými ústy“ anebo „těžce vzdychat“. Hippokrates z ostrova Kós (460–370 před naším letopočtem) popisoval astma, rozeznal jeho paroxysmální spastickou podstatu a věřil, že je způsobeno vlhkostí nebo klimatem a že se podobá epilepsii. Jeho popis astmatu u krejčích, rybářů a metalurgů je jedním z prvních popisů profesionálního astmatu [34].

Aretaeus z Kappadokie v 1. století našeho letopočtu již popisuje pískoty, suchý produktivní kašel a těžký spánek jako charakteristické příznaky astmatu [35], ve druhém století našeho letopočtu Hippokratovy a Aretaeovy úvahy rozvíjí Galenos z Pergamonu (129–199 n.l.), který se mimo jiné domníval, že astma je způsobeno silně viskózním sekretem, který omezuje vzdušný prostor v plicích [36]. Moses Maimonides, židovský lékař ze Španělska a osobní lékař sultána Saladina, jehož syn trpěl „astmatem a melancholií“, v r. 1190 napsal první knihu speciálně věnovanou astmatu. Poprvé zaznamenal souvislost mezi astmatem a depresí. Podle Maimonida je astma charakterizováno náhle vzniklými záchvaty dušnosti a v léčbě doporučoval velké množství kuřecí polévky, slazené kaše z ječmene, sexuální abstinenci a inhalaci par z *aloe vera* [37]. Jean Baptiste van Helmont a John Floyer v 17. století chápou astma jako akutní zúžení průdušek. Více než sto let po objevení Ameriky roste popularita používání tabáku, který je mnohdy chápán jako všelék. Zatímco van Helmont astmatikům doporučuje tabákový sirup, Floyer již v této době u astmatiků radikálně odmítá kouření tabáku, ale také jantaru a arzeniku, v té době oblíbených látek [38, 39]. Bernardino Ramazzini na konci 17. století popisuje námahou indukované astma [40]. V 18. století William Cullen chápe bronchospasmus jako příčinu astmatu a v 19. století Henry Hyde Salter charakterizuje astma jako epizodický bronchospasmus při zvýšené citlivosti průdušek. Chápe astma jako kombinaci vnitřních faktorů (bronchiální přecitlivělost) a zevních, „extrinsic“ spouštěčů, které popisuje a přesně klasifikuje – jako příklady uvádí cvičení, chladný vzduch, kašel, smích, kýčání, zvířecí chlupy, peří či rostlinné partikule [41]. V r. 1892 pak William Osler popisuje asthma jako chorobu, jejíž podstatou je zvláštní druh zánětu v malých bronších, zároveň označil astma za psychoneurózu [42]. Díky Oslerově autoritě pak bylo astma chápáno jako neuróza prakticky až do roku 1968, kdy Luparello provádí studii, v níž astmatici inhalovali fyziologický roztok označený jako silný bronchokonstriktor a byl vyhodnocován vliv inhalace na jejich plicní funkce. Touto studií byla upřesněna role psychogenních faktorů u

astmatu [43]. Navzdory Oslerovu vlivu byl již od konce 19. století vnímán význam zevních faktorů na patogenezi astmatu. Anglický praktický lékař Charles Brackley v r. 1873 dokázal, že pyl je příčinou senné rýmy a „senného astmatu“ [44]. V r. 1906 vídeňský pediatr Clemens von Pirquet poznal, že protilátky mají nejen obrannou funkci při imunitní odpovědi, ale mohou být také příčinou reakce přecitlivělosti, a poprvé v historii použil výraz „alergie“ [45]. Rusko-americký lékař Samuel James Meltzer v r. 1910 uvažoval nad tím, že astma u lidí a anafylaxe u morčat jsou obdobné jevy [46]. V průběhu první světové války se těžiště výzkumu astmatu přesunulo do Ameriky. Isaac Chandler Walker při experimentech s kožními testy v letech 1916-1918 zaznamenal souvislost astmatu a senzibilizace zvířecími, potravinovými a bakteriálními proteiny [47]. V téže době zjistil Francis Rackemann, že ne všechny případy astmatu jsou alergického původu a rozdělil astma na „extrinsic“, tedy protein-senzitivní, alergické, s nestabilním průběhem, obvykle postihující mladší jedince, a „intrinsic“, tedy nealergické, s těžším průběhem, obvykle postihující starší jedince [48]. V r. 1946 Curry popsal bronchiální hyperreaktivitu při inhalační aplikaci zvyšujících se dávek histaminu [49]. Po druhé světové válce došlo k rozvoji, zpřesnění a rozšíření spirometrie a v šedesátých letech 20. století k používání peak-flow metru.

Zánětlivé změny v dýchacích cestách u astmatiků byly již v době Williama Oslera prokazovány mikroskopickým vyšetřením sputa [42] a po většinu 20. století pak pomocí sekčních nekropsií [50, 51]. Třebaže bronchoskopie byla u astmatiků prováděna již v r. 1907 [52], první charakteristické histologické nálezy z biopsií bronchiální sliznice byly popsány až v r. 1977 Molinou [53] a v r. 1985 Laitienem [54]. Další pokrok v poznání astmatu přinesl v r. 1983 švédský nositel Nobelovy ceny Bengt Samuelsson objevem role prostaglandinů a leukotrienů v patogenezi zánětu [55], po němž následoval bouřlivý výzkum zánětlivých buněk a mediátorů u bronchiálního astmatu, přetrvávající dosud a v současné době doplněný o výzkumy v oblasti genomiky a proteomiky.

Změny pohledu na astma se odrážely také ve vývoji definice nemoci. Definice ATS z r. 1975, kdy již byla rutinně používána spirometrie, vychází z funkční podstaty astmatu a definuje je jako *„nemoc charakterizovanou zvýšenou citlivostí dýchacích cest vůči různým podnětům, která se projevuje zpomalením usilovného výdechu a jejíž závažnost se mění spontánně nebo léčbou“* [56]

Nejnovější definice podle GINA z r. 2006 již definuje astma jako chronickou nemoc, vystihuje její zánětlivou podstatu, zmiňuje charakteristické příznaky i funkční projevy: *„Asthma bronchiale je chronický zánět dýchacích cest s účastí mnoha buněk a jejich produktů, který vede k hyperreaktivitě průdušek. Příznaky bronchiální hyperreaktivity jsou opakované sípání, dušnost, kašel a sevření na hrudníku převážně v noci nebo časně ráno. Obstrukce dýchacích cest je generalizovaná a reverzibilní spontánně nebo léčbou“* [2].

V roce 1993 byla založena Globální iniciativa pro astma (Global Initiative for Asthma, GINA), která vznikla ve spolupráci Světové zdravotnické organizace (WHO) a Národního institutu pro srdce, plíce a krev (NHLBI). Jejím cílem bylo zlepšení péče o pacienty s astmatem. V roce 1995 vyhlásila GINA pod záštitou Světové zdravotnické organizace (WHO) dokument „Globální strategie péče o astma a jeho prevenci“. Společně s překladem tohoto dokumentu do češtiny byla v r. 1996 v České republice založena Česká iniciativa pro astma o.p.s. (ČIPA).

1.2.2. Epidemiologie bronchiálního astmatu

Podle odhadů WHO trpí astmatem asi 300 miliónů lidí a v r. 2008 na ně zemřelo 305.000 lidí, tj. 0,5% všech úmrtí. Podle odhadů WHO bude v r. 2030 mortalita na astma 428.000 osob, to bude znamenat 0,6% všech úmrtí [57]. V České republice zemřelo na astma v r. 2005 celkem 99 osob a nízká úmrtnost kolem 1/100.000 obyvatel přetrvává také v posledních letech. Prevalence astmatu v České republice se odhaduje asi na 700-800 tisíc osob, v péči plicních ambulancí bylo v r. 2005 ale pouze 139 tisíc osob [58].

Přímé a nepřímé náklady na léčení astmatu ve Velké Británii se odhadují na 2,5 miliardy liber ročně a každý rok dojde kvůli astmatu v této zemi ke ztrátě 20 miliónů pracovních dnů. V r. 1994 činily přímé a nepřímé náklady na léčení astmatu ve Spojených státech amerických 12 miliard amerických dolarů [59].

1.2.3. Rizikové faktory, diagnóza a klinický průběh bronchiálního astmatu

Rizikové faktory pro vznik bronchiálního astmatu jsou vnitřní faktory hostitele (predispozice) a vnější faktory prostředí, které se dělí na faktory ovlivňující vnímavost a na spouštěče, které mohou vyvolat exacerbaci.

Vnitřní faktory reprezentuje genetická dispozice, atopie a bronchiální hyperreaktivita. Asi polovina astmatiků má atopickou anamnézu a naopak riziko vzniku astmatu u atopika je asi 10–20 krát vyšší než u neatopika. Alergická rinitida a atopická dermatitida jsou považovány za preastmatické stavy. Určitým rizikovým faktorem je pohlaví, u chlapců je vyšší riziko vzniku bronchiálního astmatu. Z perinatálních faktorů je rizikovým faktorem pro vznik bronchiálního astmatu nízká porodní hmotnost a kuřáctví matky.

Mezi vnější rizikové faktory vzniku bronchiálního astmatu patří domácí i venkovní alergeny, kouření, virové infekce dýchacích cest, znečištění venkovního ovzduší, některé potraviny a léky. Exacerbace astmatu může být vyvolána některým ze spouštěčů astmatu, kterými jsou zejména alergeny, respirační infekce, ale také vzdušné polutanty, změny počasí, některé potraviny a léky, či hyperventilace.

Diagnóza bronchiálního astmatu je založena na anamnéze, fyzikálním nálezu a funkčním vyšetření plic. Pro diagnózu bronchiálního astmatu svědčí patognomické příznaky, kterými jsou pískoty při dýchání, dušnost nebo kašel, které se objevují v záchvatech, mezi nimiž jsou různě dlouhá období relativního klidu. Záchvaty jsou opakované, často jsou vázané na určité prostředí, fyzickou námahu, expozici alergenu nebo jinou situaci a často se objevují nebo zhoršují v noci nebo k ránu. V příznakovém období jsou při fyzikálním vyšetření přítomny variabilní expirační pískoty a vzruty, exspirium může být prodlouženo.

Spirometrické funkční vyšetření plic může prokázat obstrukci dýchacích cest a její reverzibilitu. Vzhledem k variabilitě bronchiální obstrukce u astmatu však normální spirometrie nevylučuje diagnózu bronchiálního astmatu.

V případě, že je přítomna bronchiální obstrukce svědčí pro diagnózu astmatu pozitivní bronchodilatační test, který je definován zlepšením FEV₁ o více než 12% původní hodnoty a zároveň o více než 200 ml. U bezpříznakových osob s normální spirometrií podporuje diagnózu bronchiálního astmatu průkaz bronchiální hyperreaktivity, která je definována snížením FEV₁ o více než 20% proti původní hodnotě po provokaci bronchokonstrikčním podnětem, například po inhalaci histaminu, acetylcholinu nebo metacholinu anebo po fyzické zátěži.

Průběh astmatu v sobě zahrnuje exacerbace projevující se astmatickými záchvaty, mezi nimiž je období, kdy je pacient bez příznaků. Průběh astmatu charakterizují stávající klasifikace astmatu.

Tradiční klasifikace astmatu podle tíže, která astma dělí na intermitentní, lehké perzistující, středně těžké perzistující a těžké perzistující astma, zohledňuje četnost denních a nočních příznaků a exacerbací, plicní funkce a jejich denní variabilitu. Tíži astmatu pak odpovídá příslušný stupeň ze čtyřstupňové strategie léčby.

Novější klasifikace astmatu hodnotí úroveň kontroly. Cílem péče o astma v současné době je pomocí správné terapie dosáhnout a udržet klinické projevy astmatu pod trvalou nebo alespoň dlouhodobou kontrolou, tedy ve stavu, kdy se neobjevují příznaky nemoci ani její exacerbace, kdy nedochází k žádnému omezení aktivity ani plicních funkcí a kdy není žádná potřeba použití záchranné medikace.

Přestože se v současné době daří správnou moderní terapií udržet většinu pacientů s astmatem pod plnou léčebnou kontrolou, existuje asi 5% pacientů s astmatem, u nichž není možné dosažení kontroly nad projevy nemoci ani za použití maximální léčby. Tito pacienti mají častější exacerbace a jsou ohroženi i možnostmi úmrtí na astma [2, 56].

1.3. Bronchoskopie a bronchoskopická vyšetření v diagnostice bronchiálních zánětů

Třebaže je podstatou CHOPN i bronchiálního astmatu především zánět dýchacích cest, je diagnostika těchto onemocnění v současné době založena na klinickém obrazu a spirometrickém funkčním nálezu. Bronchoskopie se do dnešního dne v rutinní diagnostice CHOPN obvykle nevyužívá, přestože jde o vyšetření, které jako jediné umožní přímé vyšetření zánětu v dolních dýchacích cestách. Provedení bronchoskopie umožňuje bezprostřední pozorování dolních dýchacích cest a provedení odběrů, jakými jsou aspirace bronchiálního sekretu s mikrobiologickým vyšetřením, dále bronchoalveolární laváž umožňující mikrobiologické a cytologické vyšetření a vyšetření zánětlivých markerů, kartáčková biopsie a konečně biopsie bronchiální sliznice, umožňující morfologické vyšetření tkáně, kvantifikaci zánětlivých buněk a působků v ní obsažených a genetická a proteomická vyšetření.

1.3.1. Historický přehled

Již deset let po Gustavu Killianovi, který v r. 1897 uskutečnil první bronchoskopii [60], provedl krakovský otorinolaryngolog Franz Nowotny v r. 1907 bronchoskopii s terapeutickým záměrem u tří astmatiků, u nichž se mu podařilo odstranění bronchiálního sekretu [52]. Podobné vyšetření pak v r. 1914 uskutečnil Keiper [61]. Po dlouhá desetiletí pak bylo využití bronchoskopie u astmatu a CHOPN omezeno na pouhé pozorování dolních dýchacích cest a jejich toaletu [62]. Teprve na konci 70. let 20. století došlo k posunu od makroskopického pozorování bronchiálního zánětu k jeho mikromorfologickému hodnocení. V r. 1977 byly popsány první charakteristické histologické nálezy z biopsií bronchiální sliznice Molinou [52] a v r. 1985 Laitienem a dalšími [53, 63]. V r. 1974 byla Reynoldsem a Newballem vypracována standardní metoda bronchoalveolární laváže [64, 65], která byla zanedlouho využita i k vyšetření pacientů s bronchiálními záněty [66].

1.3.2. Endoskopický obraz u CHOPN a bronchiálního astmatu

Endoskopický obraz u CHOPN a bronchiálního astmatu je obvykle nepříliš charakteristický a může být zcela negativní, zejména u lehčích stádií CHOPN a ve stabilní fázi astmatu. Přesto se mohou vyskytovat některé nálezy, které pro bronchiální záněty mohou být příznačné, i když ne specifické.

U pacientů s CHOPN vidáme atrofickou bledou sliznici s výrazně patrnými tracheálními a bronchiálními chrupavkami a s prostorným bronchiálním průsvitem a dobrou přístupností bronchoskopu daleko do periferie. Jindy je naopak bronchiální sliznice hyperplastická, zarudlá, se setřelými konturami tracheálních a bronchiálních chrupavek, s tendencí ke zvýšené fragilitě bronchiální sliznice. V bronších je často

přítomen bronchiální sekret, obvykle vyšší viskozity a nezřídka v masivním množství. Při odsávání často dochází k uzavírání a kolapsu bronchů.

Řada pacientů s astmatem, zejména ve stabilní fázi, mívá zcela normální endobronchiální nález. Někteří pacienti s astmatem mívají zarudlou bronchiální sliznici, v nestabilní fázi onemocnění výrazně edematózní až zduřelou, způsobující zúžení bronchů. V dolních dýchacích cestách bývá přítomen velmi viskosní sekret, který adhezuje k bronchiální stěně a potencuje zúžení dýchacích cest a mnohdy je zcela uzavírá. Někdy je v průběhu bronchoskopie patrný bronchospasmus, který může být způsoben pouhým podrážděním bronchoskopem, manifestuje se zúžením bronchiálního ústí a obvykle vyžaduje ukončení vyšetření a farmakologickou intervenci [67].

1.3.3. Bronchoalveolární laváž (BAL)

Bronchoalveolární laváž (BAL) je v rámci bronchoskopie velmi málo invazivní metodou, informující o patologických procesech v bronších i v plicním intersticiu [64]. Její princip spočívá v aplikaci fyziologického roztoku do segmentárního bronchu a následném zpětném odsátí. Aplikovaný fyziologický roztok přitom dosáhne alveolárního prostoru a po zpětném odsátí je již označován jako bronchoalveolární tekutina (BALTe), jejíž obsah odráží patologické procesy v distálních bronších a v plicním parenchymu.

Bronchoalveolární laváž se v současné době obvykle provádí flexibilním bronchoskopem v lokální anestezii. Nejčastěji se používá standardní velikost bronchoskopu se sacím kanálem o průměru kolem 2 mm. V průběhu vyšetření by se mělo předcházet vzniku kašle, který může způsobit traumatizaci bronchu, vyšší ztrátu instilované tekutiny a její kontaminaci krví.

Flexibilní bronchoskop se při provádění bronchoalveolární laváže zavede co nejdál do příslušného bronchu, v němž má být provedena BAL, a je zde zaklíněn. Při zavádění bronchoskopu do místa zaklínění by nemělo být použito sání, aby se zabránilo kontaminaci pracovního kanálu bronchoskopu před samotnou BAL. U lokalizovaných plicních procesů, kam patří např. plicní infiltráty, tumory a jiné lokalizované plicní procesy, se BAL provádí v lokalizaci, v níž jsou patologické změny nejvíce vyjádřeny. U difuzních procesů, mezi něž patří také CHOPN a bronchiální astma, se BAL standardně provádí v pravém středním bronchu nebo v lingule, odkud je díky anatomickým poměrům nejlepší návrat a buněčnost bronchoalveolární tekutiny – ty jsou až o 20% vyšší než při BAL z dolních bronchů [69].

Byla také diskutována otázka, zda by u difuzních plicních postižení měla být prováděna BAL z obou plic a bronchoalveolární tekutina z pravé a levé plíce by měla být vyšetřována samostatně. Následné studie ukázaly vysokou korelaci mezi buněčnými profily v bronchoalveolární tekutině získané z pravé a levé plíce. V současné době je standardem provedení BAL z jedné lokalizace, která u většiny pacientů dává klinicky plně dostačující informaci a kterou lze považovat za reprezentativní pro obě plíce [68].

Po zaklínění bronchoskopu v příslušném segmentárním bronchu se kanálem bronchoskopu aplikuje standardní množství 100–300 ml apyrogenního

fyziologického roztoku. Fyziologický roztok se aplikuje frakcionovaně, obvykle injekční stříkačkou ve frakcích po 20–50 ml, a má být zahřát na tělesnou teplotu. Dodržení tělesné teploty aplikované tekutiny je důležité zejména u pacientů s astmatem anebo bronchiální hyperreaktivitou, příliš nízká teplota instilované tekutiny zvyšuje riziko bronchospasmu indukovaného chladem a snižuje návrat bronchoalveolární tekutiny [69].

Celkové množství fyziologického roztoku instilovaného při BAL bylo v minulosti podrobena diskuzím. Vyšší objemy aplikovaného fyziologického roztoku okolo 250–300 ml umožní získat bronchoalveolární tekutinu s větším počtem buněk a proteinů, které dobře odráží změny v plicním parenchymu. Zároveň ale vedou k častějším vedlejším účinkům BAL, zejména přechodnému snížení vitální kapacity a FEV₁, než při použití menších objemů instilované tekutiny [70]. Naproti tomu menší objemy fyziologického roztoku okolo 100 ml obsahují větší podíl bronchiální složky bronchoalveolární tekutiny, která obsahuje vyšší podíl neutrofilů a více odráží prostředí uvnitř bronchů než plicního parenchymu.

Další otázka týkající se celkového množství tekutiny instilované při BAL je spojena s kvantifikací nebuněčných komponent v bronchoalveolární tekutině. Protože koncentrace látky obecně je nepřímo úměrná objemu tekutiny, klesá koncentrace rozpustných bronchiálních a alveolárních substancí v bronchoalveolární tekutině v závislosti na zvyšujícím se objemu instilovaného fyziologického roztoku.

Po instilaci příslušné frakce fyziologického roztoku je vhodné před zpětnou aspirací počkat několik málo sekund, aby se pacient mohl jednou až dvakrát nadechnout, čímž dojde k lepšímu promíchání aplikovaného fyziologického roztoku a bronchoalveolárních buněk a nebuněčných komponent. Prodleva by naopak neměla být příliš dlouhá, protože by během ní došlo k absorpci lavážní tekutiny přes alveolo-kapilární membránu [71].

Zpět se aspiruje bronchoalveolární tekutina rovněž po frakcích. Příliš velký podtlak při zpětném sání může být příčinou kolapsu bronchů distálně od zaklíněného bronchoskopu, tím se zhorší návrat tekutiny a může dojít k poranění sliznice, které vede ke kontaminaci bronchoalveolární tekutiny krví. Jako optimální se doporučuje negativní tlak 25–100 mmHg. Pokud přetrvává tendence ke kolapsu bronchů a nízký zpětný návrat bronchoalveolární tekutiny, který je obvyklý u pacientů s destruktivním postižením plic a také s CHOPN, může pomoci několik hlubokých nádechů vyšetřovaného pacienta, které často zlepší návrat bronchoalveolární tekutiny [71]. Bohužel, i při zcela optimální technice provedení bronchoalveolární laváže bývá u nemocí spojených s bronchiální obstrukcí návrat bronchoalveolární tekutiny výrazně snížen, což se týká jak CHOPN [72, 73], tak bronchiálního astmatu [74].

Ze získané bronchoalveolární tekutiny se oddělí první porce, která odpovídá spíše bronchiální než alveolární frakci a zvláště u kuřáků obsahuje více polymorfonukleárů a méně makrofágů [75], zatímco u nekuřáků se příliš neliší od zbytku bronchoalveolární tekutiny [76]. Ostatní porce bronchoalveolární tekutiny se slijí do sterilní nádoby, například odměrného válce. Její stěny musí být silikonové, nikoliv skleněné, aby se zabránilo adhezi makrofágů a mononukleárů na stěnu nádoby a tím jejich ztrátě. Po změření objemu zpětně aspirované tekutiny a výpočtu poměru k objemu instilované tekutiny se bronchoalveolární tekutina zpracovává laboratorně s mikroskopickým, mikrobiologickým a cytologickým vyšetřením a v případě potřeby s dalšími speciálními vyšetřeními. Bronchoalveolární tekutina se dále centrifuguje a zjišťuje se celkový počet buněk a diferenciální buněčný rozpočet.

Protože zrychlení a doba centrifugace ovlivňuje výsledek buněčného rozpočtu, doporučuje se standardně centrifugace s 800 otáčkami za minutu, které odpovídají odstředivému zrychlení 90 g.

Návrat bronchoalveolární tekutiny, který je doporučen jako dostačující k jejímu správnému vyšetření, by měl odpovídat alespoň 40% instilované tekutiny [64]. Jako dostatečný celkový počet buněk v bronchoalveolární tekutině, který umožní její správné cytologické vyšetření, se uvádí nejméně $0,5 \times 10^5$ buněk [68]. Za normální hodnoty diferenciálního buněčného rozpočtu v bronchoalveolární tekutině se považují u nekuřáků hodnoty lymfocytů < 15%, neutrofilních leukocytů < 3% a eozinofilních leukocytů < 0,5%, u kuřáků pak bývají hodnoty lymfocytů nižší a jako normální se považují hodnoty < 7% [68].

1.3.4. Bronchiální klíšťková biopsie a kartáčková biopsie

Bronchiální klíšťková biopsie umožňuje získat vzorek obsahující bronchiální epitel, bazální membránu a submukózu. Bronchiální biopsie u pacientů s CHOPN a bronchiálním astmatem se provádějí okénkovými bioptickými klíšťkami, i když někteří autoři preferují také aligátorové klíšťky [77]. Bioptické vzorky se odebírají z bifurkačních segmentárních a subsegmentárních bronchů, někdy také z tracheální kariny. Mezinárodní doporučení z r. 1991 uvádí, že celkový počet odebraných vzorků má být nanejvýš šest [80], ale podle jiných autorů lze bezpečně provést i 10 slizničních biopsií [81]. Pokud se při vyšetření provádí také BAL, má se bronchiální biopsie provést až po BAL, aby lavážní tekutina nebyla kontaminována krví. Získané vzorky se ihned po odběru fixují ve fixačním médiu anebo zamrazují [77].

Kartáčková biopsie bronchiální sliznice je zcela šetrná metoda, která kromě příležitostného podráždění ke kašli nemá jiné komplikace. Pokud byla při vyšetření provedena BAL, provádí se kartáčková biopsie až po ní a může se provádět ze stejné lokalizace. Kartáčková biopsie se obvykle provádí z jednoho až dvou subsegmentárních bronchů, přitom v každém bronchu se provedou 2–4 táhlé stěry. Tímto způsobem lze získat asi 3 milióny buněk [77].

1.3.5. Komplikace bronchoskopie a bronchoskopických odběrů u pacientů s CHOPN a bronchiálním astmatem

1.3.5.1. Všeobecná doporučení týkající se bezpečného provedení bronchoskopie a BAL

Před diagnostickou bronchoskopií je obvykle dostatek času k poučení pacienta a získání jeho souhlasu s vyšetřením, k přípravě řádně vybaveného pracoviště a k sestavení erudovaného týmu, který je schopen provést vyšetření i zvládnout případné

komplikace. Při takto připraveném výkonu má bronchoskopie jen málo absolutních kontraindikací, mezi něž patří akutní infarkt myokardu, nestabilní ischemická choroba srdeční a závažné arytmie, metabolický rozvrat, projevy nekorigované koagulopatie, kóma a těžká respirační insuficience [78]. Bronchoalveolární laváž nemá žádné další kontraindikace nad rámec všeobecných kontraindikací bronchoskopie.

Přesto u pacientů s CHOPN, kteří mohou mít respirační insuficenci, a u pacientů s astmatem, kteří mají riziko vzniku bronchospasmu, je provedení bronchoskopie a BAL spojeno s určitými zvláštnostmi a riziky a zasluhuje zvláštní pozornosti.

U pacientů s CHOPN, zejména v jejích těžších stádiích, je nutná řádná příprava před bronchoskopií a BAL. Tato příprava v sobě zahrnuje důkladné klinické vyšetření před bronchoskopií, případně aplikaci bronchodilatancí v rámci premedikace a v průběhu bronchoskopie pak pečlivé monitorování EKG, saturace kyslíku v periferní krvi a vitálních funkcí, aplikaci kyslíku nosní kanylou [79, 80] a v případě nutnosti pak následnou možnost hospitalizace včetně možnosti observace na jednotce intenzivní péče. Není zcela jasná shoda v tom, jak velké snížení plicních funkcí u pacientů s CHOPN je limitující pro provedení bronchoskopie, ale mezinárodní doporučení dovolují provést bronchoskopii a BAL pacientům s $FEV_1 < 60\%$ náležitých hodnot [80] a dokonce jsou zkušenosti dokladující nekomplikovaný průběh bronchoskopie a BAL i u velmi těžkého postižení plicních funkcí s $FEV_1 0,64$ l, tj. 23% náležitých hodnot [79].

U pacientů s astmatem je doporučována v rámci přípravy před bronchoskopií a BAL premedikace inhalačními β_2 -agonisty, a v průběhu vyšetření pak aplikace kyslíku nosní kanylou, oxymetrie a monitorace EKG [68]. Při dodržení těchto opatření je možné pacientům s bronchiálním astmatem bezpečně a úspěšně provést bronchoskopii a BAL [82, 83, 84].

1.3.5.2. Komplikace BAL

BAL je bezpečná procedura s minimální závažností vedlejších projevů. V průběhu BAL se může objevit kašel, během několika hodin po provedení BAL může být zvýšená teplota, která spontánně ustupuje a obvykle nevyžaduje žádnou terapii anebo je možno podat jednorázově antipyretika. Během 24 hodin po provedení BAL může být na skiagramu patrná infiltrace v plicním segmentu, v němž byla BAL provedena, a v některých případech může dojít k přechodnému snížení plicní vitální kapacity, FEV_1 a k poklesu parciálního tlaku kyslíku v krvi, které nastávají přibližně za 30 minut po provedení BAL, zejména pokud bylo použito větší množství instilované tekutiny [70]. Naopak instilace 180 ml tekutiny při BAL se ukázala jako zcela bezpečná i u pacientů s velmi těžkou CHOPN [79]. Vedlejší projevy při provádění BAL bývají velmi mírné a málo významné, je však nutno počítat s tím, že u pacientů s těžším plicním postižením vznikají snáze a mohou být výraznější.

U pacientů se zvýšenou bronchiální hyperreaktivitou anebo bronchiálním astmatem může dojít ke vzniku pískotů při dýchání anebo ke vzniku bronchospasmu. Zahřátí instilovaného fyziologického roztoku na tělesnou teplotu chrání před vznikem bronchospasmu a zvyšuje návrat bronchoalveolární tekutiny. Při vzniku

bronchospasmu je nutné ukončení bronchoskopie a podání inhalačního β_2 -mimetika a intravenózní aplikace kortikoidů [67].

1.3.5.3. Krvácení

Krvácení je jednou z nejobávanějších komplikací při provádění bronchoskopie. Riziko krvácení při BAL je malé a obvykle je omezeno na hemoragické zbarvení bronchoalveolární tekutiny, čímž může být nepříznivě ovlivněna její kvalita a vhodnost k laboratorním vyšetřením. Ke krvácení při provádění BAL dochází nejčastěji u pacientů s hemoragickou diatézou, s antikoagulační léčbou či při zvýšené fragilitě bronchiální sliznice, ale může se objevit také u pacientů s těžšími projevy CHOPN a hyperplastickou a překrvenou bronchiální sliznicí. Snadněji vzniká při vyšším podtlaku při zpětné aspiraci. Obvykle spontánně ustupuje a nevyžaduje zvláštní terapii.

Podstatně závažnější endobronchiální krvácení může vzniknout při endobronchiálních biopsiích. Uvádí se, že endobronchiální krvácení vyžadující terapeutický zásah se vyskytuje u 0,8% flexibilních bronchoskopií bez biopsie a u 1,9–4,2% flexibilních bronchoskopií s biopsií. Letálně končí endobronchiální krvácení v 0,01–0,1% všech flexibilních bronchoskopií [85]. Při endobronchiálních biopsiích u bronchiálních zánětů, pokud nejsou přítomny jiné bronchiální patologické změny, dochází obvykle jen k lehkému nebo středně silnému krvácení. To lze dobře zvládnout kompresí anebo zaklíněním krvácejícího bronchu bronchoskopem a tamponádou, s následnou intrabronchiální aplikací studeného fyziologického roztoku anebo terlipresinu. V krajním případě, pokud nelze zvládnout krvácení flexibilním bronchoskopem, je nutno provést konverzi na rigidní bronchoskopii a tamponádu rigidními technikami [85].

1.3.5.4. Pneumotorax

Při bronchoskopii, BAL ani slizničních biopsiích obvykle nedochází ke vzniku pneumotoraxu. Zcela ojediněle může v průběhu bronchoskopie vzniknout pneumotorax u pacientů s CHOPN. Je popsán případ pacienta s těžkou CHOPN, rozsáhlým bulosním emfyzémem a těžkým snížením plicních funkcí s FEV_1 25% náležitých hodnot, u něhož v průběhu bronchoskopie došlo k záchvatům kašle a v jeho důsledku pak ke zvýšení intratorakálního tlaku, ruptury buly a vzniku pneumotoraxu [79].

1.4. Zánět u CHOPN a bronchiálního astmatu

Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) a bronchiální astma jsou chronická zánětlivá onemocnění, postihující především dýchací cesty. Záněty u těchto nemocí mají různé charakteristiky a jsou dominantně podmíněny různými buňkami a mediátory. Zatímco u stabilní CHOPN se při zánětu v dýchacích cestách uplatňují především alveolární makrofágy, neutrofilní leukocyty, CD8+ lymfocyty a některé mediátory (např. interleukin-8, interleukin-6, TNF- α), zánět u bronchiálního astmatu je spojen s eozinofilními leukocyty, CD4+ lymfocyty, B-lymfocyty, mastocyty a odlišnými mediátory, například eotaxinem, interleukinem-4 a interleukinem-5 [1]. Naopak některé charakteristiky zánětu jsou u obou nemocí podobné, například cytologické profily při exacerbacích, u těžkých forem onemocnění anebo u hraničních stavů, které v sobě spojují klinické a funkční projevy obou nemocí.

1.4.1. Přehled zánětlivých buněk u CHOPN a bronchiálního astmatu

CHOPN je charakterizována specifickým typem zánětu, který je spojen s přítomností neutrofilů, makrofágů a lymfocytů [86].

Neutrofil se vyskytují ve zvýšeném počtu u pacientů s CHOPN v BAL i ve sputu [87, 88], zatímco v plicním parenchymu a dýchacích cestách jsou zvýšeny jen mírně [89]. To může odpovídat jejich rychlé migraci přes plicní parenchym a stěnu dýchacích cest. Neutrofilové produkují jednak serinové proteázy, včetně neutrofilní elastázy, cathepsinu G, proteázy-3 a dále matrix-metaloproteinázy MMP-8 a MMP-9, které způsobují hypersekreci hlenu a vedou k alveolární destrukci. Migrace neutrofilů do respiračního traktu je řízena chemotaktickými faktory, kterými jsou interleukin IL-8 a leukotrien LTB₄. Délka přežití neutrofilů v respiračním traktu se zvyšuje působením cytokinů granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) a granulocyte colony stimulating factor [1, 86].

Makrofágy hrají klíčovou roli v patogenezi CHOPN a jsou zodpovědné za většinu rysů nemoci [90]. Vznikají transformací krevních monocytů, z nichž se diferencují v plicním parenchymu. Počet makrofágů je u pacientů s CHOPN výrazně, přibližně 5–10 krát, zvýšen v dýchacích cestách, v plicním parenchymu, v bronchoalveolární tekutině a ve sputu [1, 86]. U pacientů s emfyzémem se zvyšuje počet makrofágů v plicním parenchymu až 25× ve srovnání s normálními kuřáky [91]. Makrofágy jsou aktivovány cigaretovým kouřem. Produkují elastolytické enzymy, mezi nimi MMP-2, MMP-9, MMP-12, cathepsin K, L a S a neutrofilní elastázu. Rozhodujícím elastolytickým enzymem u pacientů s CHOPN je MMP-9 [86]. Alveolární makrofágy u pacientů s CHOPN vylučují více zánětlivých proteinů a mají větší elastolytickou aktivitu než makrofágy u zdravých kuřáků [92]. Makrofágy jsou fagocyty, přitom jejich fagocytární schopnosti mohou být u pacientů s CHOPN sníženy. To může být způsobeno zvýšenou bakteriální náloží v dýchacích cestách pacientů s CHOPN. Defektní fagocytóza dále může souviset s účinkem neutrofilní

elastázy, které štěpí fosfatidylserinový receptor makrofágů, jímž makrofágy rozeznávají apoptotické neutrofile. V důsledku toho se pak zvyšuje počet apoptotických neutrofilů v dýchacích cestách [93].

T-lymfocyty. U pacientů s CHOPN je zvýšený celkový počet T-lymfocytů v plicním parenchymu, v periferních i centrálních dýchacích cestách, přitom vyšší nárůst je u CD8+ než u CD4+ lymfocytů [1]. Je přítomna korelace mezi počtem T-lymfocytů a tíží bronchiální obstrukce i stupněm alveolární destrukce. Většina cytotoxických CD8+ lymfocytů u pacientů s CHOPN patří k subtypu Tc1, který produkuje interferon- γ . Zatím není zcela jasný mechanismus, díky němuž se T-lymfocyty akumuluji v dýchacích cestách pacientů s CHOPN. Může souviset se zvýšenou přítomností chemokinů aktivujících receptor CXCR3, jehož zvýšenou expresi vykazují T-lymfocyty v dýchacích cestách pacientů s CHOPN. U pacientů s CHOPN dochází ke zvýšení počtu T-lymfocytů v krevním oběhu, a to jak CD8+ lymfocytů, tak – zejména u těžších stádií CHOPN – i CD4+ lymfocytů [86].

Eozinofily. Role eozinofilů u CHOPN je nejasná. Eozinofily se vyskytují ve zvýšeném počtu v BAL a bronchiálních biopsiích během exacerbace CHOPN. Existují práce, které zaznamenaly zvýšený počet eozinofilů v BAL, bronchiálních biopsiích a indukovaném sputu i u stabilní CHOPN, jiné práce však toto zvýšení eozinofilů u stabilní CHOPN nepotvrdily. Přítomnost eozinofilů u pacientů se stabilní CHOPN může znamenat koexistující astma a predikuje lepší odpověď na terapii kortikosteroidy [1, 86].

Dendritické buňky hrají ústřední roli v iniciaci imunitní odpovědi. Tvoří bohatou síť v plicích a ve stěně dýchacích cest v blízkosti jejich lumen a mohou reagovat na inhalované škodlivé látky, především cigaretový kouř. Mohou aktivovat řadu dalších zánětlivých buněk, včetně makrofágů, neutrofilů, T a B lymfocytů. Bylo prokázáno zvýšení počtu dendritických buněk v plicích krys vystavených cigaretovému kouři a v dýchacích cestách kuřáků [94, 95].

Epiteliální buňky v dýchacích cestách a alveolech mohou být důležitým zdrojem zánětlivých mediátorů a proteáz u CHOPN. Epiteliální buňky aktivované cigaretovým kouřem produkují zánětlivé mediátory včetně TNF- α , IL-1 β , GM-CSF a IL-8. Epiteliální buňky v malých dýchacích cestách mohou být důležitým zdrojem TGF- β , který indukuje lokální fibrózu.

Bronchiální astma. Zánět u bronchiálního astmatu má jinou povahu než u CHOPN. Rozdíly jsou v zánětlivých buňkách, mediátorech, zánětlivé odpovědi, anatomické distribuci (u astmatu zánět nepostihuje plicní parenchym) a v odpovědi na protizánětlivou léčbu [96].

Eozinofily. Aktivované eozinofily se vyskytují ve zvýšeném počtu v bronchiálních biopsiích, nejčastěji v blízkosti bazální membrány. Jsou přítomny u pacientů s alergickým i nealergickým astmatem a jejich počet koreluje se závažností astmatu i s bronchiální hyperreaktivitou. Rozvoj eozinofilie u astmatu ovlivňuje řada mediátorů, nejvýznamněji IL-5. Eozinofily produkují cysteinylóvé leukotrieny (LTC₄, LTD₄, LTE₄), cytokiny TGF- α , TGF- β , IL-1, IL-3, IL-11, IL-17, GM-CSF, chemokiny RANTES a eotaxin.

Mastocyty se nacházejí v bronších u zdravých osob i u pacientů s astmatem, kde jsou častěji v degranulovaném stavu. Jsou aktivovány působením alergenů na jejich vysoce-afinní IgE-receptory a uvolňují řadu bronchokonstričních mediátorů včetně histaminu, cysteinylových leukotrienů a prostaglandinu PGD₂. Jsou významným zdrojem neutrálních proteáz, zejména tryptázy.

T-lymfocyty. U bronchiálního astmatu se uplatňují Th2 CD4⁺ lymfocyty, produkující IL-4 a IL-5.

Neutrofilů se objevují ve zvýšeném počtu u pacientů s chronickým těžkým astmatem, u astmatiků-kuřáků a během exacerbací způsobených infekcí respiračními viry nebo po expozici vzdušným polutantům.

Makrofágy jsou přítomny ve zvýšeném počtu v dýchacích cestách a ve sputu u astmatiků a mohou být aktivovány níže-afinními IgE-receptory s následným uvolněním zánětlivých mediátorů a cytokinů.

1.4.2. Přehled zánětlivých mediátorů u CHOPN

1.4.2.1. Chemokiny

Interleukin-8 (IL-8, CXCL8) je silným chemoatraktantem pro neutrofilů. Hodnoty IL-8 v indukovaném sputu jsou výrazně zvýšeny u pacientů s CHOPN a koreluje s počtem neutrofilů. Koncentrace IL-8 je ještě více zvýšena u emfyzému způsobeného deficitem α_1 -antitrypsinu. Koncentrace IL-8 je dále zvýšena při akutních exacerbacích CHOPN, což patrně odpovídá elevaci počtu neutrofilů a zvýšené purulenci sputa. Existuje korelace mezi koncentrací IL-8 a počtem bakteriálních kolonií ve sputu, tato skutečnost dokazuje, že bakteriální infekce indukuje neutrofilní zánět mimo jiné i cestou uvolnění IL-8 do dýchacích cest. Koncentrace IL-8 je signifikantně zvýšena u kuřáků s emfyzémem než u kuřáků bez ventilační poruchy. Koncentrace IL-8 je dále zvýšena u pacientů s CHOPN vyžadujících hospitalizaci a koreluje se svalovou únavou dechových svalů u pacientů s těžkou CHOPN.

IL-8 se tvoří především v epitelálních buňkách, makrofázích a neutrofilech. Epiteliální buňky respiračního traktu tvoří IL-8 jako odpověď na některé stimuly, mezi něž patří například TNF- α , IL-1 β , lipopolysacharidy, bakteriální produkty, některé viry, oxidativní stres a tabákový kouř. Epiteliální buňky a alveolární makrofágy u pacientů s CHOPN produkují více IL-8 než u zdravých kuřáků. MMP-9 zvyšuje aktivitu IL-8 až 10 \times [97, 98, 99, 100, 101, 102, 103].

Growth-Related Oncogene- α (GRO- α , CXCL1) je chemokin vylučovaný alveolárními makrofágy a epitelárními buňkami po stimulaci TNF- α a IL-17. GRO- α aktivuje neutrofilů, monocytů, bazofilů a T-lymfocyty pomocí receptoru CXCR2. Koncentrace GRO- α v bronchoalveolární tekutině a v indukovaném sputu je zřetelně zvýšena u pacientů s CHOPN ve srovnání se zdravými kuřáky i nekuřáky, přitom u

kuřáků je hodnota v bronchoalveolární tekutině vyšší než u nekuřáků. Je možné, že chemotaktická odpověď monocytů na GRO- α je jedním z mechanismů vedoucím ke zvýšení počtu makrofágů u pacientů s CHOPN a může být jedním z molekulárních mechanismů citlivosti na cigaretový kouř [104, 105, 106, 107].

Epithelial Cell-Derived Neutrophil-Activating Peptide-78 (ENA-78, CXCL5) aktivuje receptor CXCR2, avšak chemotaktická odpověď monocytů na něj není tak výrazná jako odpověď na GRO- α . ENA-78 je zvýšen v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN ve srovnání se zdravými osobami, dále u kuřáků ve srovnání s nekuřáky, avšak není rozdíl mezi pacienty s emfyzémem a zdravými kuřáky. ENA-78 je zvýšen při exacerbacích CHOPN [107].

Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1, CCL2) je dalším z chemokinů, jehož koncentrace je zvýšena ve sputu, bronchoalveolární tekutině a plicním parenchymu u pacientů s CHOPN. Aktivuje receptor CCR2 na monocytech a T-lymfocytech a má silný chemoatraktivní účinek na monocyty a tím vede ke zvýšení počtu makrofágů u CHOPN. Je exprimován makrofágy, T-lymfocyty, epiteliálními buňkami a také pneumocyty II. typu [106].

Macrophage Inflammatory Protein (MIP) je uvolňován makrofágy a má chemotaktický efekt na monocyty a neutrofile působením na receptor CCR1. Koncentrace MIP-1 α není výrazně zvýšena v bronchoalveolární tekutině u kuřáků s bronchitidou nebo bez ní, zatímco koncentrace MIP-1 β je zvýšena u pacientů s chronickou bronchitidou, ale ne u zdravých kuřáků [108].

Eozinofilní chemokiny. Počet eozinofilů je zvýšen u exacerbací chronické bronchitidy, stejně jako eozinofilní chemokiny RANTES (CCL5) a eotaxin (CCL11) [109, 110].

1.4.2.2. Cytokiny

Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) je přítomen ve vysoké koncentraci ve sputu pacientů s CHOPN. Je syntetizován z prekurzoru pro-TNF- α . Sérové koncentrace TNF- α jsou zvýšeny u kachektizujících nemocných s CHOPN. Studie s TNF receptorem ukazují, že TNF- α se podílí na vzniku 70% případů emfyzému indukovaného tabákovým kouřem u myší [111]. TNF- α aktivuje NF- κ B, který spouští transkripci zánětlivých genů v epiteliálních buňkách a makrofázích, včetně cytokinů, chemokinů a proteáz. TNF- α tedy vede k amplifikaci zánětu u CHOPN. Účinek TNF- α vede k aktivaci neutrofilů, makrofágů, epiteliálních buněk, hypersekreci hlenu a uvolnění proteáz s následnou destrukcí plicního parenchymu. Kromě toho TNF- α aktivuje NF- κ B a tím inhibuje expresi proteinů skeletárního svalstva, což vede ke zvýšené svalové slabosti [86].

Interleukin 1 β (IL-1 β) má podobné účinky jako TNF- α a je silným aktivátorem alveolárních makrofágů u pacientů s CHOPN. Role IL-1 β u CHOPN je studována.

Interleukin 6 (IL-6) má zvýšenou koncentraci v indukovaném sputu, v bronchoalveolární tekutině, v kondenzátu vydechaného vzduchu a v plasmě u

pacientů s CHOPN, zejména během exacerbací. Má prozánětlivé i protizánětlivé účinky a jeho role v CHOPN je nejasná [86].

Interleukin 9 (IL-9) je normálně vylučován Th2 lymfocyty a má amplifikující efekt na alergický zánět. Přesto má zřetelně vyšší expresi T-lymfocytech u pacientů s CHOPN [112].

Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) je v bronchoalveolární tekutině ve zvýšené koncentraci u stabilní CHOPN a je výrazně zvýšen během exacerbací. Je důležitý pro délku přežívání a zrání neutrofilů a hraje zásadní roli v neutrofilním zánětu. Zatímco sekrece GM-CSF z alveolárních makrofágů se u pacientů s CHOPN a zdravých kuřáků významně neliší, makrofágy pacientů s CHOPN vylučují výrazně více TNF- α , IL-8 a MMP-9 než makrofágy zdravých kuřáků. Sekrece GM-CSF je suprimována kortikoidy, na rozdíl od jiných cytokinů u CHOPN [113].

Interleukin 10 (IL-10) je silný protizánětlivý cytokin uvolňovaný monocyty a alveolárními makrofágy v odpovědi na zánětlivé stimuly. Sekrece IL-10 v makrofázích je výrazně snížena u pacientů s astmatem. Koncentrace IL-10 je snížena ve sputu pacientů s astmatem. Produkce IL-10 je zvýšena v makrofázích zdravých kuřáků. Není jasné, zda makrofágy u CHOPN vykazují sníženou produkci IL-10, podobně jako u astmatu, čímž by napomáhaly amplifikaci zánětu [86]. Bronchiální biopsie u pacientů s CHOPN prokázaly zvýšenou expresi IL-10 [112]. Protizánětlivý účinek IL-10, způsobený inhibicí NF- κ B a také supresí uvolňování MMP-9 z monocytů, by mohl být potenciálně využitelný v terapii CHOPN.

Interleukin 12 (IL-12) vykazuje zvýšenou expresi v bronchiálních biopsiích u pacientů s CHOPN [114].

Interleukin 13 (IL-13) je silné stimulans mukózní sekrece, které stimuluje diferenciaci pohárkových buněk aktivací EGFR. V bronchiálních biopsiích kuřáků s hypersekrecí hlenu je zvýšená exprese IL-13 ve srovnání s normálními kuřáky. Overexprese IL-13 a interferonu- γ v myších plicích vede ke zvýšené expresi matrix-metaloproteináz a katepsinů a ke vzniku emfyzému [115, 116].

Interleukin 17 (IL-17) není zvýšen ve sputu pacientů s CHOPN [117].

Interferon- γ (IFN- γ). Overexprese IFN- γ v myších plicích vede ke vzniku emfyzému [115, 116]. Byla prokázána zvýšená exprese IFN- γ u pacientů s CHOPN. Tc1-lymfocyty (CD8+ IFN- γ pozitivní buňky) jsou ve zvýšeném počtu přítomny ve sputu pacientů s CHOPN [112, 114].

1.4.2.3. Růstové faktory

Transforming Growth Factor - β 1 (TGF- β 1) vykazuje zvýšenou expresi v epiteliálních buňkách a alveolárních makrofázích u CHOPN a může hrát roli v procesu vzniku fibrózy v malých dýchacích cestách. Nebyla však prokázána zvýšená exprese TGF- β ve velkých dýchacích cestách. Zvýšená exprese TGF- β byla prokázána v monocytech v periferní krvi a v plicní tkáni pacientů s CHOPN. TGF- β

je ze svého inaktivního prekurzoru aktivován pomocí MMP-9. TGF- β vede k výraznému snížení počtu β_2 -adrenergických receptorů (down-regulation) a významně snižuje bronchodilatační účinek β_2 -agonistů. Polymorfismus genu TGF- β 1 spojený se zvýšenou produkcí TGF- β je asociován s těžkým astmatem [86].

Epidermal Growth Factor (EGF) a TGF- α aktivují EGFR, který hraje klíčovou roli v regulaci mukózní sekrece [118].

Vascular-Endothelial Growth Factor (VEGF) se podílí na remodelaci cév, vznikající při hypoxické plicní vasokonstrikci u těžké CHOPN. Zvýšenou expresi VEGF nacházíme v hladké svalovině plicních cév u pacientů s lehkou a středně těžkou CHOPN, ale u těžké CHOPN s emfyzémem je exprese VEGF paradoxně snižena. Koncentrace VEGF v indukovaném sputu je zvýšena u pacientů s astmatem a chronickou bronchitidou, ale je signifikantně snížena u pacientů s CHOPN s emfyzémem [119, 120].

Fibroblast Growth Factor (FGF) vykazuje zvýšenou expresi v hladké svalovině plicních cév a v epiteliálních buňkách u pacientů s CHOPN. Zvýšená exprese FGF částečně koreluje s vaskulární remodelací plicních cév [86].

1.4.3. Přehled zánětlivých mediátorů u bronchiálního astmatu

Cytokiny hrají zásadní roli při koordinaci a udržování zánětu dýchacích cest u bronchiálního astmatu [121]. Lze je rozdělit do několika skupin.

1.4.3.1. Lymfokiny

Interleukin-2. Elevace IL-2 v bronchoalveolární tekutině byla zjištěna u pacientů se symptomatickým astmatem [122, 123]. U astmatiků jsou přítomny také bronchoalveolární buňky exprimující mRNA IL-2 [124] a byl pozorován jejich nesignifikantní nárůst po expozici alergenu [125]. Obzvláště vysoké hodnoty IL-2 a IL-4 mRNA v bronchoalveolárních buňkách byly pozorovány u astmatiků rezistentních na steroidy ve srovnání s astmatiky citlivými na léčbu kortikosteroidy [126].

Interleukin-3 byl ve zvýšené míře exprimován v buňkách v bronchiálních biopsiích a v bronchoalveolární tekutině u pacientů s astmatem [124, 127]. Po expozici alergenu nebylo pozorováno zvýšení počtu buněk exprimujících IL-3 mRNA [125].

Interleukin-4 exprimují CD4+ a CD8+ T lymfocyty, eozinofily a mastocyty jak u atopického, tak u neatopického astmatu [128, 129]. Zvýšený počet lymfocytů exprimujících IL-4 mRNA v bronchoalveolární tekutině byl pozorován po expozici alergenu [127]. Inhalace IL-4 u astmatiků vede ke zvýšení počtu eozinofilů v indukovaném sputu a k přechodnému zvýšení bronchiální hyperreakivity [130]. Je možné, že IL-4 má svou úlohu při vzniku bronchiální hypersekrece [131].

Interleukin-5 je produkován CD4+ a CD8+ T lymfocyty, eozinofily [132, 133]. Expozice alergenu způsobuje zvýšenou expresi mRNA IL-5 v eozinofilech v bronchoalveolární tekutině [134], v níž pak narůstá koncentrace IL-5 až 300 násobně [135]. IL-5 hraje důležitou roli při zrání, chemoatrakci a aktivaci eozinofilů a může prodloužit jejich přežívání. IL-5 způsobuje uvolnění eozinofilů z kostní dřeni a společně s dalšími mediátory indukuje jejich migraci do dýchacích cest [136, 137]. Inhalace IL-5 u astmatiků vede k eozinofilii v dýchacích cestách a v indukovaném sputu a zvýšení bronchiální hyperreakivity, nezpůsobuje ale bronchiální obstrukci [138, 139]. Uvažuje se o tom, že eozinofilie indukovaná interleukinem-5 je přímou příčinou bronchiální hyperreakivity [140].

Interleukin-9 může mít význam v predispozici k astmatu, jeho exprese souvisí s eozinofilním zánětem dýchacích cest, hladinou IgE v séru a s bronchiální hyperreaktivitou [141].

Interleukin-13. Zvýšená exprese IL-13 mRNA byla pozorována v sliznici dýchacích cest u atopického i neatopického astmatu [142, 143]. Hladina IL-13 se u pacientů s astmatem zvyšuje po expozici alergenu společně s IL-2 a IL-4 [144].

Interleukin-15 má podobné vlastnosti jako IL-2, avšak zatím nejsou bližší údaje o úloze IL-15 u astmatu [145, 146].

Interleukin-16. Zvýšená koncentrace v bronchoalveolární tekutině byla prokázána u astmatických jedinců po expozici alergenu [145].

Interleukin-17 je secernován z CD4+ T-lymfocytů a stimuluje produkci NF- κ B, IL-6, IL-8, GM-CSF a PGE2 ve fibroblastech, epiteliálních a endoteliálních buňkách [147, 148, 149].

Interleukin-18 indukuje produkci interferonu- γ [150].

1.4.3.2. Prozánětlivé cytokiny

Interleukin-1. Hladiny IL-1 β v bronchoalveolární tekutině jsou vyšší u astmatiků ve srovnání se zdravými jedinci [151].

TNF- α hraje roli v amplifikaci astmatického zánětu [152, 153]. TNF- α je přítomen v bronchoalveolární tekutině u astmatiků, byla pozorována zvýšená exprese TNF- α mRNA v bronchiálních biopsiích astmatiků [122, 154].

Interleukin-6. Uvolňování IL-6 z alveolárních makrofágů je vyšší u astmatiků proti zdravým jedincům, a to jak po expozici alergenu, tak i bez předchozí expozice [155].

Interleukin-11 byl detekován v bronchoalveolární tekutině v průběhu respiračního infektu [156].

Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF). Byla prokázána zvýšená exprese GM-CSF v bronchiálních biopsiích u astmatiků. GM-CSF může být spojen s chronickou eozinofilií a remodelací dýchacích cest [157].

Stem Cell Factor (SCF). Je málo informací o expresi SCF v dýchacích cestách astmatiků [121].

1.4.3.3. Protizánětlivé cytokiny

Interleukin-10. U astmatiků je snížený počet alveolárních makrofágů exprimujících IL-10 ve srovnání se zdravými jedinci [158, 159]. Na druhé straně některé studie prokazují zvýšený počet alveolárních makrofágů exprimujících mRNA IL-10 v bronchoalveolárních buňkách u astmatiků [160].

Interferon- γ . Redukuje počet eozinofilů u astmatiků. Produkce IFN- γ v T-lymfocytech je u astmatiků snížena. Po nebulizaci IFN- γ dochází k redukci počtu eozinofilů v bronchoalveolární tekutině. Uvažuje se o tom, že by IFN- γ mohl být využit v léčbě astmatu [161, 162].

Interleukin-12 hraje roli v inhibici nadměrné syntézy IgE a alergického zánětu vzniklého v důsledku expozici alergenu [121].

1.4.3.4. Chemokiny

CC-chemokiny (β -chemokiny) jsou chemokiny, v nichž dva cysteiny v blízkosti jejich N-terminální domény sousedí těsně vedle sebe. U bronchiálního astmatu se uplatňují MIP-1 α , MIP-1 β (Macrophage inflammatory protein 1 α a 1 β), MCP-1, MCP-2, MCP-3 (Monocyte chemoattractant protein 1, 2 a 3), RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted) a Eotaxin.

Byly zjištěny zvýšené hladiny MIP-1 α , MCP-1 a RANTES v bronchoalveolární tekutině u pacientů s astmatem [163] a po expozici alergenu [145]. Bylo zjištěno zvýšené uvolnění MIP-1 α z makrofágů u astmatiků, přestože exprese mRNA MIP-1 α v makrofázích se nelišila mezi astmatiky a zdravými jedinci [158]. U astmatiků byla pozorována zvýšená exprese mRNA RANTES a MCP-3 [164]. Zvýšená plazmatická koncentrace RANTES byla přítomna během exacerbace astmatu [165]. Exprese eotaxinu byla zvýšená v dýchacích cestách u astmatiků, nejvíce v epiteliálních buňkách, T-lymfocytech, makrofázích a eozinofilech [166, 167] a k jeho intenzivnímu uvolňování docházelo po expozici alergenu [168].

CXC-chemokiny (α -chemokiny) jsou chemokiny, v nichž je mezi dva cysteiny v blízkosti jejich N-terminální domény vložena jiná aminokyselina. Mezi jejich nejznámější zástupce patří interleukin-8 (IL-8, CXCL8), Growth-Regulated Oncogene- α , β , γ , GRO- α (CXCL1), GRO- β (CXCL2), GRO- γ (CXCL4), Epithelial cell derived neutrophil activating protein-78 (ENA-78, CXCL5), Granulocyte chemotactic protein-2 (GCP-2, CXCL6) a Macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2).

U bronchiálního astmatu se uplatňuje zejména interleukin IL-8, který byl prokázán u těžkého atopického astmatu, zatímco u lehkého astmatu se neobjevoval. Přitom byl

IL-8 spojen s chemotaxí neutrofilů. Zdá se tedy, že IL-8 by mohl být markerem těžkého astmatu. [121].

1.4.3.5. Růstové faktory

Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Destičkový růstový faktor. Byla studována role PDGF u bronchiálního astmatu, ale nebyly prokázány zvýšené hodnoty u pacientů s astmatem oproti zdravým jedincům [169].

Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Transformující růstový faktor beta. Byla zjištěna podobná exprese TGF- β v plicích astmatiků a zdravých jedinců [170].

Insulin-like Growth Factor (IGF), Inzulínu podobný růstový faktor je produkován epiteliálními buňkami dýchacích cest a je silným mitogenem podporujícím proliferaci hladkých svalů dýchacích cest. Léčba inhalačními kortikoidy vede ke snížení exprese IGF a zmírňuje ztlustění bazální membrány sliznice dýchacích cest [171].

1.5. Matrix-metaloproteinázy – přehled o současném stavu problematiky

1.5.1. Matrix-metaloproteinázy a jejich inhibitory – obecný přehled

Zánět dýchacích cest je spojen s akumulací zánětlivých buněk, které uvolňují proteázy, mezi jinými také metaloproteinázy. Předpokládá se, že dochází k dysbalanci mezi proteázami a jejich inhibitory, která vede k remodelaci tkání dýchacích cest. Ta může mít reparativní účinky, ale také může vést k postupnému rozvoji plicního emfyzému nebo plicní fibrózy. [172, 173, 174]. Představiteli proteáz jsou neutrofilní elastáza a matrix-metaloproteinázy, jejich inhibitory jsou α_1 -antitrypsin a tkáňové inhibitory metaloproteináz.

Matrix-metaloproteinázy objevili v r. 1962 Jerome Gross a Charles Lapiere, kteří zkoumali degradaci kolagenu při metamorfóze ocásku pulce skokana s druhovým označením *Rana catesbeiana* a přitom objevili enzym intersticiální kolagenáza (MMP-1) [175]. Matrix-metaloproteinázy (MMP) jsou velkou skupinou proteáz obsahujících ve svých molekulách ionty kovu Zn^{2+} a Ca^{2+} , nutné pro jejich proteolytickou činnost. V současné době je známo přes dvacet matrix-metaloproteináz (tabulka 2).

Inaktivní proenzymy matrix-metaloproteináz (pro-MMP) jsou uvolňovány alveolárními makrofágy, neutrofilny a jinými buňkami. Na povrchu buněk anebo v extracelulárním prostoru dochází proteolýzou jejich N-terminální domény k jejich aktivaci a vzniku aktivních MMP. Pro katalytickou funkci matrix-metaloproteináz mají zásadní význam ionty kovu v jejich molekulách. Proteolytická aktivita MMP je způsobena navázáním iontu Zn^{2+} nebo Ca^{2+} na aktivní místo proteinu a může být specificky inhibována některým z rodiny tkáňových inhibitorů metaloproteináz (TIMP) [176, 177].

Matrix-metaloproteinázy vedou *in vivo* k degradaci proteinů extracelulární matrix a jsou podstatné v procesu destrukce, remodelace a reparace tkání. Kromě toho mohou modulovat aktivitu dalších cytokinů a mediátorů. Jejich zvýšená exprese způsobuje řadu destruktivních procesů včetně nádorové invaze a angioneogeneze, arthritidy, aterosklerózy, arteriálních aneurysmat a plicního emfyzému [178].

Asi 40–50% aminokyselin je u všech MMP shodných a tyto aminokyseliny tvoří několik domén společných pro všechny MMP. Mezi tyto domény patří signální sekvence aminokyselin umožňující sekreci MMP z buňky, další doménou je N-terminální doména udržující proteázu v její latentní formě, další komponentou je aktivní doména koordinující vazbu katalytické molekuly zinku Zn^{2+} , a konečně C-terminální doména (hemopexin-like domain) umožňující rozeznání makromolekulárního substrátu a navázání na něj, tato doména je zároveň místem vazby inhibitoru TIMP. Optimální pro aktivitu MMP je pH 7,4. Matrix-metaloproteinázy MMP-2 a MMP-9 mají navíc fibronectinové domény zprostředkující jejich vysokou afinitu ke gelatinu a elastinu, MMP-9 má navíc ještě jednu doménu s vazbou na kolagen V [176, 177].

Matrix-metaloproteinázy lze rozdělit do několika skupin:

Gelatinázy, mezi něž patří gelatináza A (MMP-2) o molekulové hmotnosti 72 kDa a gelatináza B (MMP-9) o molekulové hmotnosti 92 kDa, rozkládají gelatin, tedy denaturovaný kolagen, a další matrixové proteiny, jakými je například kolagen IV. typu a elastin. Zdrojem MMP-9 jsou především neutrofilové, eozinofily, makrofágy a dendritické buňky, zdrojem MMP-2 jsou fibroblasty, endoteliální buňky, makrofágy a neutrofilové (tab. 2). Gelatinázy patří mezi nejpodrobněji zkoumané matrix-metaloproteinázy a MMP-9 je nejvíce sledovanou matrix-metaloproteinázou u CHOPN a bronchiálního astmatu. Zvýšená exprese MMP-9, často v asociaci s poklesem jejího inhibitoru TIMP-1, byla zjištěna v indukovaném sputu, v BAL a v plicní tkáni pacientů s CHOPN i bronchiálním astmatem [176, 177].

Mezi *kolagenázy* patří MMP-1, MMP-8 a MMP-13. Mají schopnost rozštěpit intersticiální kolagen tvořený trojitou šroubovnicí, avšak neštěpí elastin. MMP-1 má výrazně zvýšenou expresi v epitelálních buňkách pacientů s CHOPN a astmatem [179].

Makrofágová elastáza MMP-12 je proenzym s molekulovou hmotností 54 kDa, její aktivní forma má molekulovou hmotnost 22 kDa. Je schopna účinně štěpit elastin, který reprezentuje 2,5% hmotnosti plic [180], a díky tomu hraje významnou roli v patogenezi plicního postižení a obzvláště plicního emfyzému. Inaktivuje α_1 -antitrypsin účinněji než ostatní matrix-metaloproteinázy. MMP-12 je produktem především makrofágů a její zvýšená exprese v makrofázích byla zjištěna u pacientů s CHOPN a po expozici cigaretového kouře [181]. U astmatiků byla zjištěna MMP-12 v epitelálních buňkách a buňkách hladkých svalů dýchacích cest [182, 183].

Membránové metaloproteinázy (Membrane-type metalloproteinases, MT-MMP) jsou skupinou šesti matrix-metaloproteináz lokalizovaných na povrchu buněk. Nejméně jedna z nich, MT1-MMP aktivuje gelatinázu A (MMP-2) a je spojena s CHOPN. MT-MMP dokáže přímo štěpit proteiny extracelulární matrix, ale v současné době zatím chybí o jejich katalytických schopnostech dostatek přesných informací.

ADAM, *a disintegrin and metalloproteinase domain*, jsou skupinou proteáz příbuzných matrix-metaloproteináz, které jsou vázány na povrchu buněk. ADAM-33 byl zaznamenán u části osob s bronchiálním astmatem i u osob s CHOPN. Jeho význam je nejasný, zdá se, že nemá vlastní katalytickou aktivitu, je však možné, že je zapojen do patogeneze remodelace dýchacích cest a bronchiální hyperreaktivní [184].

Nejdůležitějšími fyziologickými inhibitory MMP jsou α_2 makroglobulin a skupina *tkáňových inhibitorů metaloproteináz* (TIMP). V současné době jsou známy čtyři TIMP (TIMP-1 až TIMP-4), všechny mají relativní molekulární hmotnost 22–30 kDa a jejich struktura je z 40–50% identická. TIMP-1 a TIMP-2 jsou vylučovány v rozpustné formě, zatímco TIMP-3 je spojena s extracelulární matrix. Tkáňové inhibitory TIMP se s vysokou afinitou váží na C-terminální doménu aktivní matrix-metaloproteinázy v molárním poměru 1:1, avšak není jasné, jakým způsobem tato vazba inhibuje proteolytickou aktivitu molekuly MMP. Mimoto TIMP-1 může tvořit specifické komplexy se všemi matrix-metaloproteinázami a s proenzymem pro-MMP-9. Tkáňový inhibitor TIMP-2 tvoří komplexy nejen s aktivní MMP-2, ale také s jejím proenzymem pro-MMP-2. Tkáňové inhibitory TIMP se tvoří v řadě buněk, například alveolární makrofágy vytváří vedle řady matrix-metaloproteináz také

TIMP-1 a TIMP-2. Naproti tomu TIMP-3 je tvořen převážně v epitelálních buňkách a váže se na extracelulární matrix, proto může být významný v prevenci vzniku emfyzému.

Matrix-metaloproteinázy a TIMP, jejichž exprese závisí na zánětlivém podnětu, tak tvoří systém proteáz/antiproteáz. Tento systém může být v rovnováze a svou koordinovanou regulací omezovat poškození tkáně v průběhu normální remodelace spojené se zánětem. Na druhé straně může být regulace nekoordinovaná, kdy se systém proteáz/antiproteáz dostane do nerovnováhy a může vést k poškození tkání. [176, 177].

Tabulka 2: Přehled matrix-metaloproteiáz a jejich inhibitorů [173, 176]

Podskupina	MMP	Název	Substrát	Zdroj
Kolagenázy	MMP-1	Intersticiální kolagenáza-1	Kolagen I, II, III, VII, VIII, gelatin, aggrecan, versican, proteoglycan link protein, inhibitor α -proteázy, α -makroglobulin, ovostatin, nidogen, pro-TNF α , L-selectin, MMP-2, 9	Fibroblasty, epitelální buňky, endotelální buňky, makrofágy, keratinocyty, osteoblasty, hepatocyty
	MMP-18	Intersticiální kolagenáza-4		
	MMP-8	Neutrofilní kolagenáza	Kolagen I, II, III, V, VII, VIII, X, gelatin, aggrecan, inhibitor α -proteázy, fibronectin	Fibroblasty, endotelální buňky, neutrofilny
	MMP-13	Kolagenáza-3		Fibroblasty
	MMP-15	<i>Xenopus</i> kolagenáza		
	MMP-21	Kolagenáza-4		
Gelatinázy	MMP-2	Gelatináza A (Kolagenáza A)	Kolagen I, IV, V, VII, X, XI, XIV, gelatin, elastin, fibronectin, aggrecan, perlecan, versican, inhibitor α -proteázy, β -amyloid, pro-TNF α , MMP-13, MMP-9	Fibroblasty, endotelální buňky, makrofágy, neutrofilny, T-lymfocyty
	MMP-9	Gelatináza B (Kolagenáza B)	Kolagen IV, V, VII, X, XIV, gelatin, elastin, fibronectin, aggrecan, nidogen, versican, inhibitor α -proteázy, pro-TNF α	Neutrofilny, makrofágy, T-lymfocyty, eozinofily, epitelální buňky, endotelální buňky, fibroblasty, keratinocyty, osteoblasty, trofoblasty
Elastázy	MMP-7	Matrylizin	Kolagen I, II, III, gelatin, elastin, fibronectin, aggrecan, laminin, entactin, kasein, inhibitor α -proteázy, pro-TNF α , MMP-1, 2, 9	Epitelální buňky, makrofágy, mezangiální buňky
	MMP-12	Makrofágová metalo-elastáza	Kolagen IV, gelatin, elastin, versican, aggrecan, , fibronectin, nidogen, inhibitor α -proteinasy, pro-TNF- α	makrofágy
	MMP-26	Matrylizin-2 (endometáza)		neutrofilny
Stromelyziny	MMP-3	Stromelyzin-1	Kolagen III, VII, IX, X, gelatin, aggrecan, versican, perlecan, fibronectin, laminin, elastin, kasein, fibrinogen, α -makroglobulin, ovostatin, pro-TNF α , MMP-1, 7, 8, 9, 13	Fibroblasty, epitelální buňky, endotelální buňky, makrofágy, keratinocyty, chondrocyty
	MMP-10	Stromelyzin-2	Kolagen III, IV, V, gelatin, aggrecan, fibronectin, elastin, kasein, inhibitor α -proteázy, MMP-1, 8	Fibroblasty, epitelální buňky, T-lymfocyty, keratinocyty,
	MMP-11	Stromelyzin-3		Fibroblasty, epitelální buňky, mezenchymální buňky
	MMP-19	Stromelyzin-4, RASI-1 (rheumatoid arthritis synovium inflamed-1)		Aktivované T-lymfocyty ve stěně synoviálních cév
	MMP-20	Enamelyzin	Zubní sklovina, amelogenin	Buňky zubní skloviny
cAMP MMP	MMP-23			
	MMP-28	Epilyzin	kasein	
Membránové MMP	MMP-14	MT1-MMP	Kolagen I, II, III, gelatin, elastin, fibronectin, aggrecan, laminin, kasein, pro-TNF α , MMP-2, 13	Fibroblasty, epitelální buňky, makrofágy, osteoblasty, vaskulární svalovina
	MMP-15	MT2-MMP		Fibroblasty, makrofágy
	MMP-16	MT3-MMP		Vaskulární svalovina, mozek, placenta
	MMP-17	MT4-MMP		Leukocyty, mozek
	MMP-24	MT5-MMP		
	MMP-25	MT6-MMP (leukolyzin)		mozek
Tkáňové inhibitory MMP	TIMP-1		Všechny MMP kromě MMP-14, 19	
	TIMP-2		Všechny MMP	
	TIMP-3		Všechny MMP	
	TIMP-4		MMP-1, 2, 3, 7, 9	

1.5.2. Matrix-metaloproteinázy a jejich inhibitory v patogenezi CHOPN

CHOPN je charakterizována chronickou obstrukcí dýchacích cest, často je spojena s chronickou bronchitidou (hypersekrecí hlenu při hyperplazii pohárkových buněk a submukosních žláz) a s emfyzémem (destrukcí parenchymu dýchacích cest). Působením chemických škodlivin z cigaretového kouře, vzdušných polutantů a/nebo recidivujících infekcí dýchacích cest dochází ke vzniku zánětu dýchacích cest, na němž se dominantně účastní neutrofilů a alveolární makrofágy. U některých pacientů s CHOPN byla zaznamenána výraznější přítomnost eozinofilů ve sputu, takoví pacienti mohou lépe reagovat na terapii inhalačními kortikosteroidy [185]. Neutrofilů uvolňují řadu mediátorů včetně oxidantů a proteáz jako neutrofilní elastázu a metaloproteinázy. Alveolární makrofágy produkují matrix-metaloproteinázy, zejména MMP-1, MMP-9 a MMP-12. Uvolněné proteázy narušují rovnováhu systému proteázy/antiproteázy a vedou k remodelaci a postupné destrukci tkání dýchacích cest. V patogenezi zánětu u CHOPN se uplatňují také CD8+ T-lymfocyty, jejich role dosud není zcela jasná, je však známo, že produkují granzymy a perforin, čímž přispívají k poškození dýchacích cest. [186]

Již od konce 70. let 20. století se zkoumal vliv kouření na funkční aktivitu proteáz a antiproteáz v bronchoalveolárním systému člověka [187, 188, 189]. V druhé polovině 90. let 20. století byly publikovány práce zjišťující koncentraci MMP v bronchoalveolární tekutině [190] a v r. 1997 byla s použitím bronchoalveolární laváže poprvé prokázána zvýšená exprese mRNA MMP v alveolárních makrofázích u pacientů s emfyzémem [191].

Kouření tabáku vede k zvýšení koncentrace MMP-1 a MMP-9 [192]. Inhalace kouře ze spalovaného dřeva vede ke zvýšené expresi MMP-9, MMP-12 a MMP-2 v bronchoalveolárních buňkách, podobně jako kouření tabáku [193]. Při krátkodobé expozici tabákovému kouři, reprezentované jednorázovým vykouřením 10 cigaret během 2 dnů, však nedošlo k ovlivnění koncentrací MMP-2, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině [194]. Bylo prokázáno zvýšení exprese MMP-2 u kuřáků s CHOPN všech stadií, zvýšení exprese MMP-2 přitom bylo v korelaci s rozsahem emfyzému a zároveň bylo v inverzním vztahu k hodnotě FEV₁/FVC [174].

Cigaretový kouř asi nejvýrazněji ovlivňuje expresi MMP-12, která pravděpodobně hraje významnou roli v patogenezi rozvoje emfyzému v důsledku kouření. Makrofágová elastáza MMP-12 je exprimována v makrofázích a má silnou schopnost degradace extracelulární matrix [195]. Společně s neutrofilní elastázou patří k nejsilnějším elastázám v plicní tkáni. MMP-12 po expozici tabákového kouře umožňuje uvolnění TNF- α , který působí chemotaxí na neutrofilů [111, 196]. MMP-12 přitom silněji než jiné matrix-metaloproteinázy inaktivuje α_1 -antitrypsin, který je inhibitory neutrofilní elastázy [195]. Tím MMP-12 nepřímo zvyšuje aktivitu neutrofilní elastázy uvolněné z neutrofilů chemotakticky migrujících do plic. Zvýšená exprese MMP-12 v makrofázích byla zjištěna po expozici cigaretového kouře, a to jak u člověka, tak u myši [181]. Také v *in vitro* studiích byly makrofágy získané od pacientů s CHOPN schopny rozštěpit více elastinu než makrofágy zdravých osob [92]. Výsledky studie na myších ukázaly, že MMP-12 má dostatečný potenciál k tomu, aby při chronické inhalaci cigaretového kouře byl umožněn rozvoj emfyzému [197]. Naopak podávání syntetického inhibitoru MMP u morčat, které

byly v expozici cigaretového kouře, redukovalo zánětlivou odpověď i rozvoj emfyzematických změn [192]. Degradací produkty elastinu, vzniklé působením MMP-12 v důsledku expozice cigaretového kouře, jsou chemotaktickým faktorem pro monocyty [198] a neutrofile produkující neutrofilní elastázu a ta společně s makrofágovou MMP-12 indukuje rozvoj plicního emfyzému [199].

U pacientů s CHOPN byla exprese MMP-12 v makrofázích získaných z BAL a z plicních biopsií vyšší než u zdravých jedinců, podobně u pacientů s CHOPN byla vyšší aktivita MMP-12 v bronchoalveolární tekutině [200].

Bylo prokázáno zvýšení exprese MMP-1, 2, 8, 9 v bronchoalveolárních buňkách u 10 pacientů s CHOPN [201]. Byly zjištěny několikanásobně vyšší koncentrace MMP-1, 2, 8, 9 a TIMP-1 v indukovaném sputu u pacientů s CHOPN ve srovnání s pacienty s astmatem a kontrolními subjekty, přitom koncentrace TIMP-1 u kuřáků byla ve sputu zvýšena podobně jako u pacientů s CHOPN [202].

Aktivita MMP-8 a MMP-9 v indukovaném sputu byla zvýšena u pacientů s lehkou a středně těžkou CHOPN [203]. Jiná studie prokázala rovněž vyšší expresi MMP-2 v plicní tkáni u pacientů CHOPN [174].

Při vyšetření chirurgicky získaných vzorků plicního parenchymu byla zvýšená exprese MMP-1 u pacientů s emfyzémem ve srovnání s kontrolními subjekty, zatímco exprese MMP-9 a TIMP-1 v plicní tkáni se mezi těmito dvěma skupinami nelišila a ani v jedné z obou skupin nebyla zjištěna exprese MMP-12 v plicním parenchymu [179].

MMP-2 i MMP-9 mají úzkou souvislost s tvorbou plicního emfyzému u CHOPN [191]. V chirurgicky získaných vzorcích pacientů s CHOPN byla exprese MMP-2 přímo úměrná tíži emfyzému a zhoršení plicních funkcí [174], naopak inhibice MMP-9 a MMP-1 u zvířecích modelů vedla k redukci destruktivních změn plicního parenchymu [192]. Podle výsledků zpracování histologických vzorků v těchto studiích se zdá, že MMP-9 se akumuluje více v dýchacích cestách, zatímco MMP-2 se vyskytuje převážně v plicní tkáni [174, 192].

Pacienti s emfyzémem, prokázaným dle HR CT plic, měli vyšší koncentraci MMP-9, vyšší poměr MMP-9/TIMP-1 a vyšší počet eozinofilů v indukovaném sputu ve srovnání se zdravými subjekty [204]. To odpovídá výsledkům studie s 30 astmatiky a 12 pacienty s CHOPN, v níž byla zjištěna asociace mezi poměrem MMP-9/TIMP-1 v indukovaném sputu a rozsahem strukturálních změn v dýchacích cestách, zjištěným pomocí výpočetní tomografie s vysokým rozlišením (HR CT) [205]. Přitom poměr MMP9/TIMP-1 pozitivně koreloval s hodnotami FEV₁, byl nižší u pacientů s astmatem a chronickou bronchitidou ve srovnání s kontrolními subjekty a u astmatiků poměr MMP-9/TIMP-1 pozitivně koreloval s počtem makrofágů a neutrofilů [206]. Na druhé straně byl prokázán vliv inhibitorů MMP na zlepšení plicních zánětlivých a strukturálních změn. Morčatům, u kterých byly po 6-měsíční expozici cigaretového kouře indukovány plicní zánětlivé změny a emfyzém plic, došlo po aplikaci syntetického kombinovaného inhibitoru MMP-9 a MMP-12 ke kompletní úpravě zánětlivých změn a ke zlepšení emfyzému asi o 70% [207].

Hodnoty aktivity tkáňových inhibitorů metaloproteináz jsou v různých studiích odlišné. V indukovaném sputu pacientů s CHOPN byla TIMP-1 signifikantně vyšší než u lehkého astmatu, zatímco u těžkých astmatiků se hodnoty TIMP-1 pohybovaly v širokém rozmezí a rozdílly nebyly signifikantní [208]. Naopak k opačnému závěru došla studie, v níž byly hodnoty TIMP-1 v BAL u pacientů s CHOPN signifikantně

nižší než u zdravých kuřáků a ještě výrazněji nižší ve srovnání se zdravými nekuřáky [209].

Význam rovnováhy a nerovnováhy systému proteáz-antiproteáz v patogenezi plicního zánětu, a to i při obdobném buněčném typu zánětu, ukazují výsledky další studie. Přestože v indukovaném sputu pacientů s CHOPN i pacientů s idiopatickou plicní fibrózou (IPF) byl nalezen shodně zvýšený počet neutrofilů ve srovnání s kontrolními subjekty, byla v indukovaném sputu pacientů s CHOPN vyšší koncentrace MMP-9 a vyšší hodnota poměru MMP-9/TIMP-1 než u pacientů s fibrózou a kontrolními subjekty. Koncentrace MMP-9 přitom korelovala s počtem neutrofilů [210].

Bakteriální kolonizace dolních dýchacích cest pacientů s CHOPN způsobuje zvýšení počtu neutrofilů, interleukinu-8, MMP-9 a endotoxinu v bronchoalveolární tekutině ve srovnání s pacienty s CHOPN bez kolonizace dýchacích cest [211].

Během exacerbace CHOPN dochází k zvýšení koncentrace MMP-9 a snížení koncentrace TIMP-1 v indukovaném sputu, současně se zvyšuje poměr MMP-9/TIMP-1 a počet neutrofilů, eozinofilů a lymfocytů ve sputu, zatímco počet makrofágů zůstává nezměněn [212].

Podobně jako u CHOPN, dochází ke zvýšení exprese MMP-8 a MMP-9 v bronchoalveolárních buňkách pacientů s bronchiectaziemi [213].

1.5.3. Matrix-metaloproteinázy a jejich inhibitory v patogenezi bronchiálního astmatu

U bronchiálního astmatu je dominující matrix-metaloproteinázou MMP-9 [173]. U pacientů ve stabilní fázi bronchiálního astmatu byla zjištěna elevace MMP-9 jak ve sputu [207], tak v bronchoalveolární laváži a v alveolárních makrofázích [214]. U pacientů s těžkým astmatem byly MMP-9 a TIMP-1 signifikantně zvýšeny ve srovnání s lehkým astmatem a zdravými kontrolami, zatímco hodnoty MMP-9 a TIMP-1 se mezi lehkým astmatem a zdravými kontrolami významně nelišily [206]. U pacientů s bronchiálním astmatem byla zjištěna signifikantně vyšší hladina TIMP-1 než u zdravých nekuřáků [215]. Některé studie zjistily také elevaci MMP-2 u astmatiků, avšak v mnohem menší míře než MMP-9 [216]. Další studie prokázaly zvýšení MMP-9 v BAL u CHOPN a v indukovaném sputu u astmatiků [191, 201, 206]. V jiné studii, v níž bylo vyšetřováno indukované sputum u 12 pacientů s CHOPN a 30 pacientů s astmatem, byla MMP-9 ve sputu zvýšena u CHOPN a u těžkého astmatu ve srovnání s lehkým astmatem, vzájemné rozdíly hodnot MMP-9 však v této studii nebyly signifikantní [208]. Kromě zvýšené exprese MMP-9 u astmatiků byla zjištěna také slabá, ale signifikantní korelace mezi expresí MMP-9 v submukóze a ztluštěním bazální membrány tvořené kolagenem (především kolagenem III a IV) u astmatiků [217], které může svědčit o vztahu mezi MMP-9 a remodelací dýchacích cest u astmatu.

Při exacerbaci dochází k dramatickému vzestupu hladin MMP-9 a TIMP-1 jak ve sputu [216, 218, 219], tak v BAL [220] a také v cirkulující krvi [221]. Po terapii glukokortikoidy a následném odeznění exacerbace dochází ke snížení koncentrace

MMP-9, zatímco hladina TIMP-1 zůstává i po terapii nadále zvýšená, což vede ke snížení molárního poměru MMP-9/TIMP-1 [219].

Po expozici alergenu byla zjištěna výrazná elevace MMP-9 v bronchoalveolární tekutině [222] a ve sputu [223]. Přitom byla zjištěna silná korelace mezi MMP-9 a počtem neutrofilů v bronchoalveolární tekutině, slabší korelace byla mezi MMP-9 a počtem makrofágů. Toto zjištění svědčí o tom, že v průběhu exacerbace je MMP-9 tvořena bronchoalveolárními zánětlivými buňkami, především neutrofilními leukocyty. Zvýšená tvorba MMP-9 je pak spojena se vznikem poškození bronchů, které může vést k remodelaci dýchacích cest u bronchiálního astmatu [222].

Terapie nepochybně ovlivňuje hodnoty metaloproteináz v dýchacích cestách astmatických pacientů. V prospektivní studii s 32 astmatiky, kteří užívali inhalační kortikoidy a poté absolvovali bronchoskopii s bronchiální biopsií, došlo k signifikantnímu zlepšení FEV₁, bronchiální reaktivity, redukci ztlustění bazální membrány a poklesu MMP-9 v submukóze ve srovnání s pacienty užívajícími placebo, zatímco hodnota TIMP-1 v bronchiálním epitelu léčených astmatiků zůstala nezměněna [224]. Tyto výsledky nasvědčují tomu, že zvýšená hladina MMP-9 u astmatiků v průběhu exacerbace je spojena s poškozením dýchacích cest, zatímco snížení hladiny MMP-9 po terapii může toto poškození omezit a reparovat.

Je otázka, jakou roli v tomto procesu hraje TIMP-1; zdá se, že má určitý protektivní účinek, ale jeho zvýšená hladina může teoreticky vést ke zvýšené remodelaci dýchacích cest [173]. Vyšší koncentrace TIMP-1 a s tím spojené nízké hodnoty poměru MMP-9/TIMP-1 u astmatiků vedou k proliferaci myofibroblastů a ke ztlustění bazální membrány. Přitom je zajímavé, že poměr MMP-9/TIMP-1 může predikovat odpověď na léčbu systémovými kortikosteroidy. Pacienti s bronchiálním astmatem, kteří neodpovídají na léčbu systémovými kortikosteroidy, mají nižší molární poměr MMP-9/TIMP-1 v séru ve srovnání s pacienty, kteří na léčbu systémovými kortikosteroidy reagují. To lze vysvětlit tím, že nižší poměr MMP-9/TIMP-1 u non-responderů odpovídá nižší intenzitě zánětu, nad kterým převažuje fibrogenese [225]. Na druhé straně však terapie inhalačními kortikosteroidy sama snižuje poměr MMP-9/TIMP-1 u astmatiků a vede k redukci ztlustění bazální membrány, takže se zdá, že pokles poměru MMP-9/TIMP-1 zlepšuje remodelaci dýchacích cest u astmatiků [224].

V souhrnu lze konstatovat, že u bronchiálního astmatu je dominující metaloproteinázou MMP-9. Její hladina v dýchacích cestách je zvýšena ve stabilní fázi nemoci, avšak dramaticky se zvyšuje při exacerbaci anebo provokaci alergenem. Elevace MMP-9 v akutní fázi astmatu je spojena se zvýšením zánětlivé celulizace v dýchacích cestách a může vést k poškození dýchacích cest. Po odeznění exacerbace, ať už spontánní anebo po terapii, dochází zpět ke snížení hladiny MMP-9, přitom ale zůstává zvýšená hladina TIMP-1 a klesá poměr MMP-9/TIMP-1.

Je možné, že molární poměr MMP-9/TIMP-1 může být určitým indikátorem odpovědi astmatických pacientů na terapii kortikosteroidy. Zdá se, že se MMP-9 podílí na bronchiálním zánětu a remodelaci dýchacích cest u bronchiálního astmatu. Role TIMP-1 v patogenezi bronchiálního astmatu zatím není zcela jasná a léčebné možnosti inhibitorů metaloproteináz u astmatu jsou zatím nejasné.

2. CÍL PRÁCE

Matrix-metaloproteinázy se vyskytují v dýchacích cestách a plicích a podle současných poznatků hrají roli v patogenezi CHOPN a bronchiálního astmatu. Jejich výzkum je prováděn různými postupy. Některé ze studií se zabývaly vyšetřením indukovaného sputa [187, 191, 201, 202, 203, 205, 206, 207, 208, 210, 212, 218, 219], jiné byly prováděny na zvířecích modelech [181, 192, 196, 198, 199] a jen část provedených studií se zaměřovala na přímou kvantifikaci těchto proteáz v dýchacích cestách, například pomocí BAL u pacientů s CHOPN [191, 193, 194, 200, 201, 209, 211] a s bronchiálním astmatem [214, 215, 220, 222, 224]. Pro bližší poznání průběhu zánětu je přitom důležité vyšetřovat a sledovat dynamiku těchto působků přímo v místě jejich působení v dýchacích cestách; k tomu je vhodné vyšetření bronchoalveolární tekutiny.

Cílem této práce bylo vyhodnotit u CHOPN a bronchiálního astmatu pomocí imunologického vyšetření bronchoalveolární tekutiny

- buněčné parametry zánětu periferních dýchacích cest a alveolů,
- expresi mRNA některých matrix-metaloproteináz a jejich inhibitorů v bronchoalveolárních buňkách,
- koncentraci některých matrix-metaloproteináz a jejich inhibitorů v bronchoalveolární tekutině a
- zjištěné parametry zánětu pak porovnat u CHOPN a bronchiálního astmatu a zhodnotit v závislosti na tíži a některých fenotypech CHOPN.

3. METODIKA

Soubor pacientů

Do studie byli zařazeni pacienti, u nichž byla nově diagnostikována CHOPN nebo asthma bronchiale. Každý pacient absolvoval spirometrii a bronchodilatační test a v případě, že to bylo nutné pro diagnózu bronchiálního astmatu, také bronchokonstrikční test. Diagnóza CHOPN a bronchiálního astmatu byla stanovena na základě klinického vyšetření a spirometrie.

Žádný z pacientů neměl před zařazením do studie inhalační léčbu ani jinou terapii CHOPN nebo astmatu. Po stanovení diagnózy a zařazení do studie byla zahájena terapie, v případě bronchiálního astmatu inhalační fixní kombinací inhalačního kortikosteroidu a dlouhodobě účinného betamimetika, v případě CHOPN terapie podle stádia onemocnění odpovídající doporučení GOLD [1].

U všech pacientů zařazených do studie byla zaznamenána kuřácká anamnéza včetně kuřácké expozice v balíčko-rocích, byla zaznamenána a vyhodnocována přítomnost produktivního kašle s expektorací sputa perzistující po dobu nejméně 3 měsíců během posledních dvou let.

První spirometrie a bronchodilatační test byly provedeny při zařazení do studie, další spirometrie byla provedena za 2 týdny po zahájení terapie, další pak za 6 měsíců, za 12 měsíců a za 24 měsíců po zahájení terapie. Podle změn jednovteřinového usilovného výdechu (FEV_1), zjištěného pomocí spirometrií během 24-měsíčního sledování, byli pacienti s CHOPN rozděleni do podskupin: s průměrným poklesem (zhoršením) FEV_1 o více než 12% za rok v průběhu kterýchkoliv 12 po sobě následujících měsíců v době trvání studie, dále do podskupiny s průměrnou změnou FEV_1 rovnou nebo menší než 12% za rok a do podskupiny s průměrným zvýšením (zlepšením) FEV_1 o více než 12% za rok, rovněž v průběhu kterýchkoliv 12 po sobě následujících měsíců v době trvání studie. Změna FEV_1 byla vztažena k postbronchodilatační hodnotě FEV_1 při spirometrii provedené za 2 týdny po zahájení terapie.

U každého pacienta byl sledován výskyt exacerbací v průběhu studie. Jako exacerbace bylo definováno zhoršení dušnosti a/nebo kašle a současně nutnost aplikace antibiotik a/nebo terapie systémovými kortikosteroidy. Pacienti s CHOPN pak byli rozděleni do podskupin: v jedné podskupině byli pacienti, kteří prodělali průměrně méně než 2 exacerbace za rok (tedy žádnou nebo jednu exacerbaci za rok), v druhé podskupině byli pacienti, kteří prodělali průměrně 2 a více exacerbací za rok.

Dále byli pacienti rozděleni do podskupin dle kuřáctví v době zařazení do studie. Jako nekuřáci byli definováni pacienti, kteří vykouřili za celý život méně než 100 cigaret a nekouřili ani v době zařazení do studie. Jako exkuřáci byli definováni bývalí kuřáci cigaret, kteří přestali kouřit před více než 6 měsíci před zařazením do studie. Jako kuřáci byli definováni pacienti, kteří aktivně kouřili v době zařazení do studie anebo v posledních 6 měsících před zařazením do studie.

Pacienti s CHOPN byli rozděleni do podskupin podle přítomnosti chronického produktivního kašle. Do podskupiny s perzistujícím produktivním kašlem byli zařazeni pacienti s přítomností produktivního kašle s expektorací sputa trvajícím po

většinu dnů po dobu nejméně 3 měsíců během posledních dvou let. Do skupiny bez perzistujícího produktivního kašle byli zařazeni pacienti, kteří toto kritérium nesplňovali.

Kontrolní skupinu tvořili jedinci, kteří absolvovali bronchoskopii a BAL, měli normální buněčný rozpočet v bronchoalveolární tekutině, normální hodnoty spirometrie a ani žádným jiným vyšetřením u nich nebylo prokázáno plicní onemocnění. Po provedení těchto vyšetření pak nebyli dále sledováni.

Bronchoskopie a BAL

Po zařazení do studie a ještě před zahájením terapie byla každému pacientovi a všem kontrolním jedincům provedena flexibilní bronchoskopie v lokální anestezii a bronchoalveolární laváž (BAL) z pravého středního laloku. Všechny bronchoskopie byly provedeny dopoledne. Všichni pacienti a kontrolní jedinci, pokud byli kuřáci, byli vyzváni, aby od předchozího večera nekouřili. Všichni pacienti s astmatem a pacienti se středně těžkým nebo těžkým stádiem CHOPN dostali před bronchoskopií nebulizaci se salbutamolem. Všem vyšetřovaným byla v průběhu bronchoskopie monitorována saturace kyslíku pulsním oxymetrem a v případě potřeby byl aplikován kyslík nosní kanylou. Lokální anestezie byla provedena nebulizací tetracainu a jeho instilací na hlasivky pomocí nepřímé laryngoskopie. Všechny bronchoskopie byly provedeny ústy. Bronchoalveolární laváž byla provedena z pravého středního laloku fyziologickým roztokem zahřátým na tělesnou teplotu frakcionovaně po 20 ml v celkovém množství 160 ml. Všichni vyšetřovaní byli po bronchoskopii sledováni po dobu 2 hodin, po propuštění měli k dispozici kontaktní telefonní číslo pro případ zdravotních komplikací. Všechny vedlejší účinky byly zaznamenány po skončení bronchoskopie a při následující klinické kontrole za 2 týdny po bronchoskopii.

Zpracování bronchoalveolární tekutiny

Tekutina z bronchoalveolární laváže (BALTe) byla rutinně zpracována a bylo provedeno její cytologické vyšetření, hodnocena návratnost a celkový počet buněk. Hodnocena byla jen BALTe u BAL s dostatečným návratem a buněčností (nejméně 40% aplikované tekutiny, $0,5 \times 10^5$ buněk v 1 ml).

Z bronchoalveolární tekutiny byly separovány bronchoalveolární buňky a z nich byla izolována celková RNA. Byla provedena kvantitativní reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce RT-PCR (Rotor-Gene 3000®), pomocí níž byla na úrovni mRNA stanovena relativní exprese genů matrix-metaloproteináz MMP-2, MMP-9 a tkáňového inhibitoru TIMP-1. Pro komparativní kvantifikaci byl použit referenční gen PSMB2 (proteasome, typ beta 2) [226, 227].

Pomocí spektrofotometrie využívající technologie mikrosfér (Luminex®) byly zjištěny koncentrace metaloproteináz MMP-2, MMP-9, MMP-8 a inhibitorů TIMP-1 a TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí Mann-Whitney U-testu.

4. VÝSLEDKY

4.1. Klinické charakteristiky souboru

Do studie bylo v době od 15.4.2006 do 20.2.2008 zařazeno celkem 94 subjektů, z nichž 35 mělo CHOPN, 26 subjektů mělo asthma bronchiale a 33 subjektů byli kontrolní jedinci, u nichž nebylo prokázáno plicní onemocnění. Demografické charakteristiky a kuřácká anamnéza zařazených subjektů jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Klinické charakteristiky souboru

	počet	mužů / žen	Věk (průměr ± SD)	nekuřáků	aktivních kuřáků	exkuřáků	množství vykouřených cigaret u kuřáků a exkuřáků (balíčko/roků, průměr ± SD)
CHOPN	35	25 / 10	64 ± 13	8	10	17	32 ± 19
Asthma bronchiale	26	11 / 15	44 ± 18	13	7	6	8 ± 10
Zdraví kontrolní jedinci	33	20 / 13	49 ± 15	23	3	7	16 ± 9

Z 35 pacientů s CHOPN bylo 5 pacientů v 1. stádiu CHOPN, 25 pacientů ve 2. stádiu a 5 pacientů ve 3. stádiu CHOPN. Jejich demografické charakteristiky a kuřácká anamnéza jsou uvedeny v tabulce 4. Všichni pacienti s CHOPN byli nově diagnostikováni a neléčeni a po zařazení do studie u nich byla zahájena terapie. Postbronchodilatační spirometrické hodnoty pacientů s CHOPN při zařazení do studie ukazuje tabulka 5.

V průběhu dvouletého trvání studie došlo u 5 pacientů ke zlepšení FEV₁ v průměru o více než 12% za rok (o 13% až 39%, průměrně o 21%) ve srovnání se stavem při zahájení terapie, ve všech případech se jednalo o pacienty ve 2. stádiu CHOPN. Byli mezi nimi dva exkuřáci a jeden kuřák, který měl produktivní kašel. Ostatní pacienti v této podskupině byli bez produktivního kašle. Dva pacienti z této podskupiny prodělali 2 nebo více exacerbací za rok.

U 11 pacientů došlo v průběhu studie ke snížení FEV₁ o více než 12% za rok (o 13% až 35%, průměrně o 16%) ve srovnání se stavem po zahájení terapie, z nich jeden měl 3. stádium a zbývajících 10 bylo ve 2. stádiu CHOPN. Bylo mezi nimi 5 kuřáků a 3 exkuřáci, 6 pacientů z této podskupiny mělo chronický produktivní kašel s expektorací a 4 pacienti prodělali průměrně 2 nebo více exacerbací za rok.

Zbývajících 19 pacientů mělo po zahájení terapie hodnoty FEV₁ poměrně stacionární s rozdílem rovným nebo nižším než 12% za rok. Mezi těmito pacienty byli 4 kuřáci a 12 exkuřáků, 7 pacientů s produktivním kašlem a žádný z těchto pacientů neprodělal 2 nebo více exacerbací za rok.

Celkem 6 pacientů s CHOPN prodělalo v průběhu studie průměrně 2 a více exacerbací za rok. U 4 z nich došlo k výraznému poklesu FEV₁ (u dvou pacientů o

20%, respektive 35% za rok a u dalších dvou pacientů o 25%, respektive 31% za 2 roky) ve srovnání se stavem krátce po zahájení terapie, naopak u dalších dvou pacientů došlo ke zlepšení FEV₁ ve srovnání se stavem krátce po zahájení terapie (o 13%, respektive 39%).

Z 35 pacientů s CHOPN mělo 14 pacientů dlouhodobě perzistující produktivní kašel s chronickou expektorací purulentního sputa, z nich 4 pacienti patřili do podskupiny, která prodělala průměrně dvě nebo více exacerbací za rok, 6 pacientů bylo v podskupině s poklesem FEV₁ o více než 12% rok a naopak u 1 pacienta s produktivním kašlem došlo ke zlepšení FEV₁ o více než 12% rok. Zbývajících 21 pacientů bylo bez produktivního kašle, z nich prodělali 2 pacienti dvě nebo více exacerbací za rok, u 5 pacientů došlo ke snížení FEV₁ o více než 12% rok a u 4 pacientů došlo ke zvýšení FEV₁ o více než 12% rok. (Tabulka 4, obrázek 3).

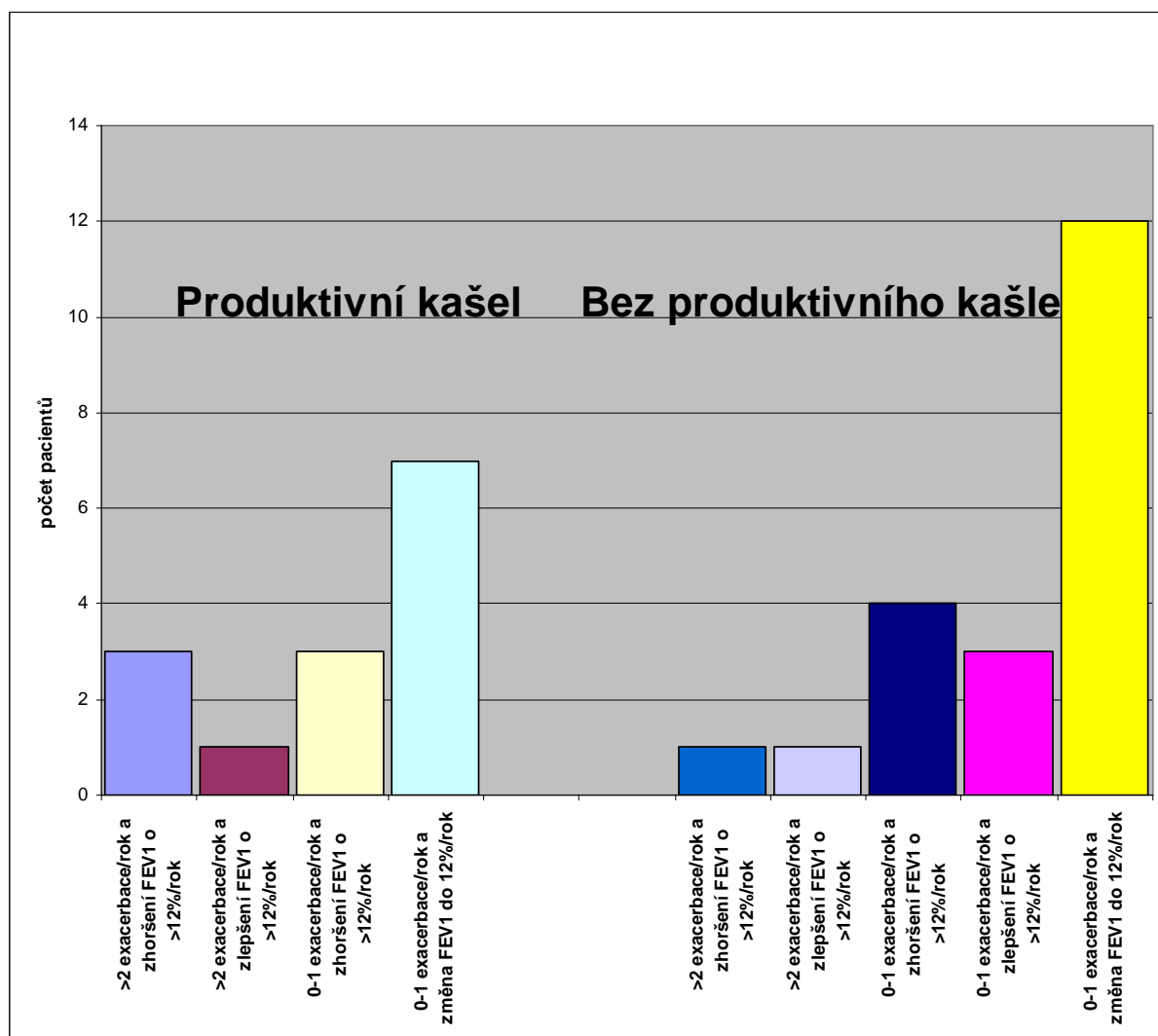
Tabulka 4: Klinické charakteristiky podskupiny pacientů s CHOPN

	počet	mužů/žen	Věk (průměr ± SD)	nekuřáků	aktivních kuřáků	exkuřáků	množství vykouřených cigaret u kuřáků a exkuřáků (balíčko/rok, průměr ± SD)
CHOPN I.st.	5	4 / 1	72 ± 9	2	0	3	15 ± 18
CHOPN II.st.	25	16 / 9	65 ± 10	5	8	12	38 ± 15
CHOPN III.st.	5	5 / 0	53 ± 18	1	2	2	30 ± 21
CHOPN se zlepšením FEV ₁ o >12% za rok	5	4 / 1	55 ± 18	2	1	2	28 ± 18
CHOPN se zhoršením FEV ₁ o >12% za rok	11	5 / 6	60 ± 13	3	5	3	34 ± 23
CHOPN se změnou FEV ₁ ≤ 12% za rok	19	16 / 3	70 ± 9	3	4	12	29 ± 16
CHOPN s 2 a více exacerbacemi za rok	6	3 / 3	57 ± 17	2	3	1	23 ± 17
CHOPN s 0-1 exacerbací za rok	29	22 / 7	65 ± 11	6	7	16	35 ± 19
CHOPN s perzistujícím produktivním kašlem	14	10 / 4	66 ± 12	2	5	7	33 ± 20
CHOPN bez perzistujícího produktivního kašle	21	15 / 6	62 ± 13	6	5	10	32 ± 19

Tabulka 5: Spirometrie pacientů s CHOPN při zařazení do studie (post-bronchodilatační hodnoty)

	VC	VC (%)	FEV ₁	FEV ₁ (%)
CHOPN celkem	3,54 ± 0,93	96,2 ± 15,8	1,86 ± 0,49	66,1 ± 13,5
CHOPN I.st.	3,62 ± 0,94	106,0 ± 11,0	2,25 ± 0,69	87,4 ± 10,8
CHOPN II.st.	3,36 ± 0,84	92,5 ± 13,8	1,80 ± 0,40	64,1 ± 6,4
CHOPN III.st.	4,16 ± 0,92	90,4 ± 8,9	1,67 ± 0,40	47,2 ± 5,3
CHOPN se zlepšením FEV₁ o >12% za rok	3,86 ± 1,25	87,0 ± 6,8	1,84 ± 0,49	54,8 ± 5,1
CHOPN se zhoršením FEV₁ o >12% za rok	3,45 ± 0,98	104,3 ± 16,8	1,79 ± 0,40	68,3 ± 11,6
CHOPN se změnou FEV₁ ≤ 12% za rok	3,57 ± 0,76	94,4 ± 14,8	2,08 ± 0,52	73,9 ± 14,6
CHOPN s 2 a více exacerbacemi za rok	3,49 ± 1,39	97,0 ± 12,1	1,74 ± 0,45	63,2 ± 9,2
CHOPN s 0-1 exacerbací za rok	3,55 ± 0,80	96,1 ± 16,5	1,89 ± 0,49	66,7 ± 14,2
CHOPN s perzistujícím produktivním kašlem	3,33 ± 0,70	96,1 ± 14,3	1,71 ± 0,37	64,9 ± 14,0
CHOPN bez perzistujícího produktivního kašle	3,68 ± 1,03	96,3 ± 16,7	1,96 ± 0,53	66,9 ± 13,1

Obrázek 3: Klinický průběh onemocnění u pacientů s CHOPN v podskupinách s produktivním kašlem a bez produktivního kašle



Všichni pacienti s bronchiálním astmatem měli jasné klinické projevy s paroxysmální dušností a expiračními pískoty. Po zahájení terapie inhalační fixní kombinací dlouhodobě účinného β_2 -mimetika a inhalačního kortikosteroidu došlo u všech pacientů k vymizení potíží a úpravě fyzikálního nálezu, 24 pacientů s astmatem pak bylo při terapii po celou dobu dalšího sledování pod úplnou léčebnou kontrolou, u dvou pacientů došlo k jedné exacerbaci za rok, mezitím byli rovněž bez potíží. U 8 pacientů s astmatem byl proveden bronchokonstrikční test (BKT), u všech s pozitivním výsledkem, u zbývajících 18 pacientů byla diagnóza bronchiálního astmatu klinicky natolik jednoznačná, že nebylo nutno BKT provádět. Všichni pacienti s bronchiálním astmatem měli spirometrické hodnoty v mezích normy po celou dobu sledování.

U všech zdravých kontrolních jedinců bylo vyloučeno plicní onemocnění a všichni měli normální hodnoty spirometrie. Po ukončení jejich pneumologického vyšetření pak již nebyli dále sledováni.

4.2. Komplikace bronchoskopie

U žádného z pacientů v průběhu bronchoskopie nedošlo ke krvácení, které by vyžadovalo léčebný zásah, u žádného z pacientů nedošlo ke vzniku pneumotoraxu, u žádného z pacientů nedošlo v průběhu bronchoskopie ani po ní ke komplikacím, které by vyžadovaly přijetí k hospitalizaci.

4.3. Cytologické vyšetření bronchoalveolární tekutiny

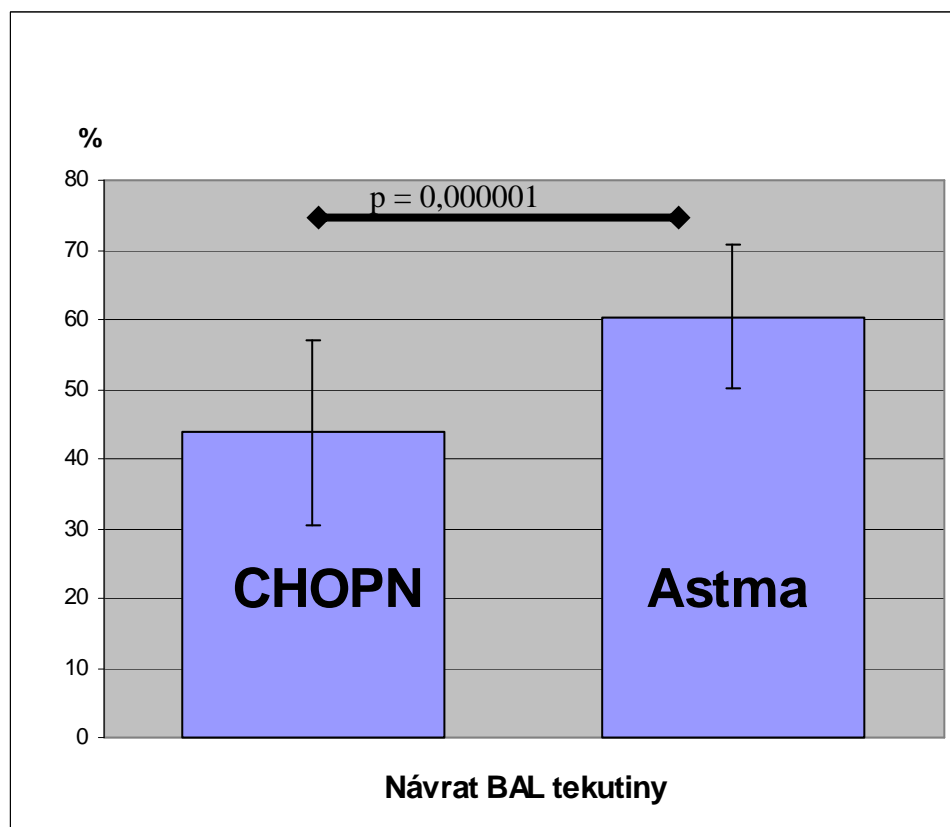
Výsledky cytologického vyšetření bronchoalveolární tekutiny jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 6: Cytologické vyšetření bronchoalveolární tekutiny (BALTe) u pacientů s astmatem a CHOPN

	Počet	Dosta- tečný návrát BAL tekutiny	Návrat BAL tekutiny (%)	Makrofágy (%)	Lymfocyty (%)	Neutrofily (%)	Eozinofily (%)
Asthma bronchiale celkem	26	26	60,4 ± 10,2	75,9 ± 14,2	8,9 ± 5,6	4,3 ± 5,0	10,9 ± 13,3
CHOPN celkem	35	29	43,7 ± 13,2	81,2 ± 18,5	4,5 ± 5,0	13,1 ± 18,4	1,2 ± 2,9
CHOPN I.st.	5	5	52,4 ± 14	81,8 ± 9,2	3,6 ± 3,4	13,4 ± 8,0	1,2 ± 1,3
CHOPN II.st.	25	21	42,3 ± 12,0	82,5 ± 20,6	4,8 ± 5,4	11,9 ± 20,4	0,9 ± 2,6
CHOPN III.st.	5	3	44,5 ± 16,1	74,0 ± 13,0	6,0 ± 3,0	15,0 ± 15,0	5,0 ± 5,0
CHOPN se zlepšením FEV ₁ o >12% za rok	5	4	50,2 ± 9,4	74,1 ± 14,7	9,4 ± 5,2	12,8 ± 10,5	3,7 ± 4,9
CHOPN se zhoršením FEV ₁ o >12% za rok	11	8	40,7 ± 11,3	85,8 ± 11,0	5,4 ± 5,8	7,4 ± 10,5	1,4 ± 3,3
CHOPN se změnou FEV ₁ ≤ 12% za rok	19	17	46,9 ± 14,4	79,1 ± 21,5	3,5 ± 3,2	16,8 ± 22,0	0,7 ± 0,9
CHOPN s 2 a více exacerbacemi za rok	6	5	42,8 ± 9,8	81,9 ± 13	6,5 ± 3,5	11,0 ± 10,8	0,5 ± 1,0
CHOPN s 0-1 exacerbací za rok	29	24	43,9 ± 13,8	81,0 ± 19,5	4,1 ± 5,1	13,5 ± 19,6	1,4 ± 3,1
CHOPN s perzistujícím produktivním kašlem	14	13	39,4 ± 10,7	77,7 ± 24	3,1 ± 3,0	18,1 ± 25,1	1,1 ± 2,8
CHOPN bez perzistujícího produktivního kašle	21	16	46,8 ± 13,9	83,7 ± 12,3	5,6 ± 5,8	9,3 ± 9,2	1,4 ± 2,9
CHOPN - aktivní kuřáci	10	9	45,1 ± 12,8	89,9 ± 8,2	4,8 ± 5,7	3,6 ± 4,8	1,7 ± 3,1
CHOPN - nekuřáci a exkuřáci	25	20	43,2 ± 13,3	77,0 ± 20,5	4,4 ± 4,6	17,6 ± 20,6	1,0 ± 2,7

Návrat bronchoalveolární tekutiny při BAL byl signifikantně nižší ve skupině s CHOPN ve srovnání se skupinou s astmatem, návrat u CHOPN činil $43,7 \pm 13,2\%$, u astmatu byl $60,4 \pm 10,2\%$, $p = 0,000001$. (Tabulka 6, obrázek 4).

Obrázek 4: Návrat bronchoalveolární tekutiny (BALTe)



Cytologické vyšetření bronchoalveolární tekutiny bylo provedeno u pacientů, u nichž byl návrat bronchoalveolární tekutiny roven nebo větší než 40% a celkový počet buněk v bronchoalveolární tekutině byl roven nebo vyšší než $0,5 \times 10^5$. Tuto podmínku splnili všichni pacienti s astmatem, všichni kontrolní jedinci a 29 pacientů s CHOPN. Počet pacientů v jednotlivých podskupinách CHOPN s dostatečným návratem bronchoalveolární tekutiny je uveden v tabulce 6.

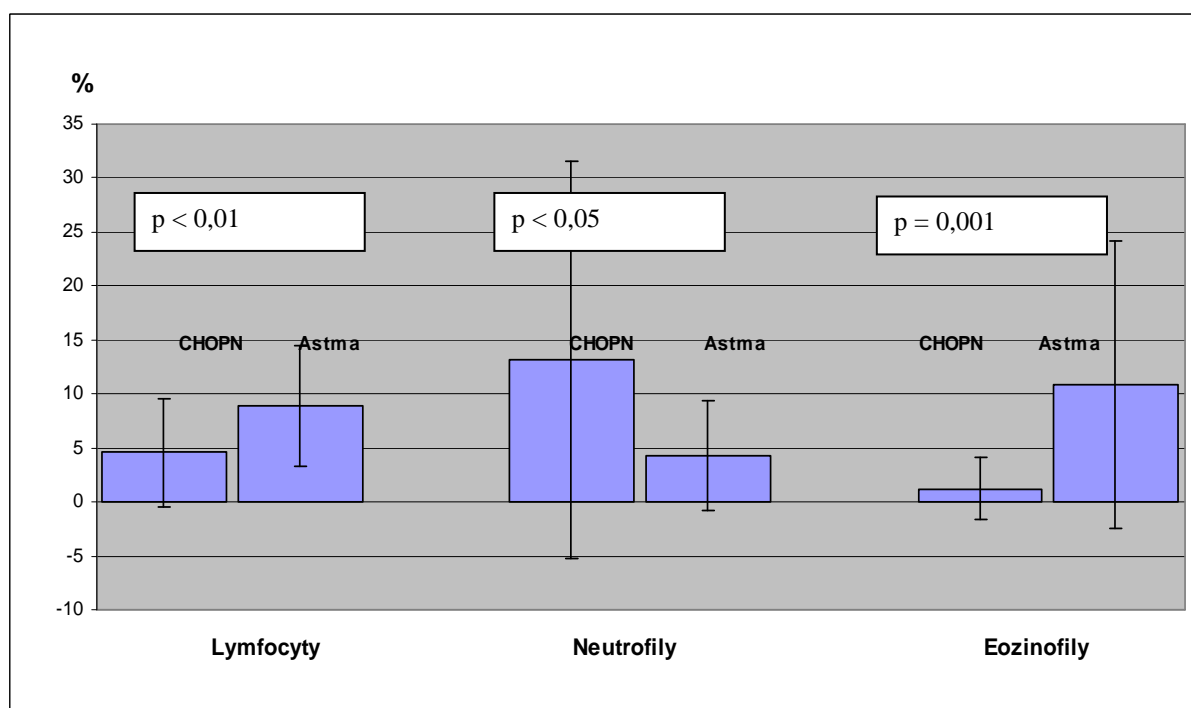
Mezi skupinou s CHOPN a astmatem byly signifikantní rozdíly v buněčném profilu bronchoalveolární tekutiny. Diferenciální počet lymfocytů v BALTe byl vyšší ve skupině s astmatem ($8,9 \pm 5,6$ vs. $4,5 \pm 5,0$, $p = 0,005$), stejně jako diferenciální počet eozinofilů ($10,9 \pm 13,3$ vs. $1,2 \pm 2,9$, $p = 0,001$). Naopak ve skupině s CHOPN byl vyšší diferenciální počet neutrofilů ($13,1 \pm 18,4$ vs. $4,3 \pm 5,0$, $p = 0,02$). (Tabulka 6, obrázek 5A, 5B).

Podskupina kuřáků s CHOPN měla v bronchoalveolární tekutině signifikantně vyšší relativní diferenciální počet makrofágů ($89,9 \pm 8,2$ vs. $77,0 \pm 20,5$, $p = 0,03$) ve srovnání s podskupinou nekuřáků a exkuřáků s CHOPN. Relativní diferenciální počet neutrofilů byl u kuřáků s CHOPN nižší než u nekuřáků a exkuřáků s CHOPN

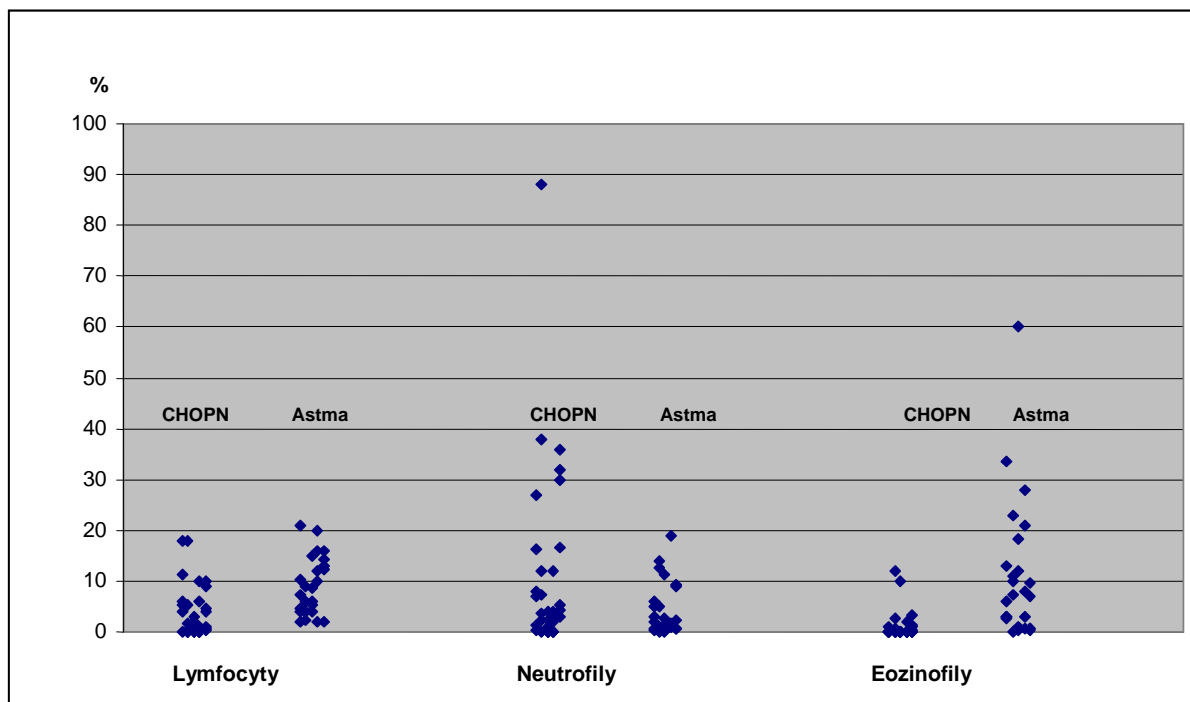
($3,6 \pm 4,8$ vs. $17,6 \pm 20,6$, $p = 0,013$) právě v důsledku vyššího počtu makrofágů u kuřáků. To je patrné z absolutních počtů buněk v BALTe, kde měli kuřáci s CHOPN vyšší absolutní počet makrofágů ($2,29 \pm 1,54 \times 10^5$ u kuřáků s CHOPN vs. $0,62 \pm 0,66 \times 10^5$ u nekuřáků/exkuřáků s CHOPN, $p = 0,02$), zatímco absolutní počty neutrofilů v BALTe se u obou těchto skupin nelišily ($0,084 \pm 0,132 \times 10^5$ u kuřáků s CHOPN vs. $0,086 \pm 0,075 \times 10^5$ u nekuřáků/exkuřáků s CHOPN). (Tabulka 6, obrázek 6).

Mezi jednotlivými stádii CHOPN ani mezi dalšími podskupinami pacientů s CHOPN nebyly významné rozdíly v počtech makrofágů, lymfocytů, neutrofilů, eozinofilů ani v návratu bronchoalveolární lavážní tekutiny.

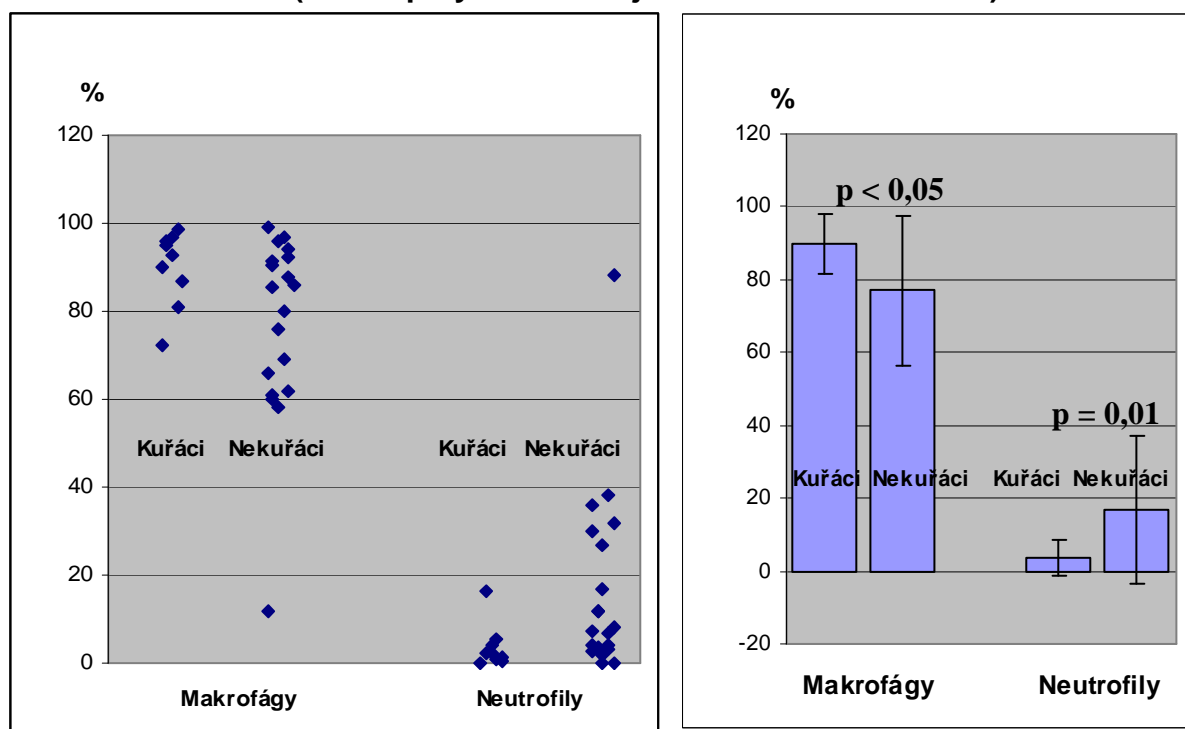
Obrázek 5A: Výsledky cytologického vyšetření bronchoalveolární tekutiny (BALTe)



Obrázek 5B: Výsledky cytologického vyšetření bronchoalveolární tekutiny (BALTe)



Obrázek 6: Rozdíly v cytologickém profilu bronchoalveolární tekutiny u kuřáků a nekuřáků (do skupiny nekuřáků jsou zařazeni i exkuřáci)



4.4. Exprese mRNA MMP-2, MMP-9 a TIMP-1 v bronchoalveolárních buňkách

Vyšetření exprese genů metaloproteináz MMP-2, MMP-9 a jejich inhibitoru TIMP-1 na úrovni mRNA v bronchoalveolárních buňkách bylo v rámci studie provedeno u 49 vzorků ze sledovaného souboru, které měly dostatečnou buněčnost umožňující vyšetření (21 vzorků pacientů s CHOPN, 12 vzorků pacientů s astmatem a 16 vzorků kontrolních subjektů). Výsledky vyšetření jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7: Relativní exprese mRNA MMP-2, MMP-9 a TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině pacientů s astmatem a CHOPN

	Počet	MMP-9 exprese mRNA	MMP-2 exprese mRNA	TIMP-1 exprese mRNA
CHOPN celkem	21	0,106 ± 0,140	0,066 ± 0,064	3,635 ± 4,385
Asthma bronchiale celkem	12	0,111 ± 0,110	0,113 ± 0,128	2,327 ± 1,752
Zdraví kontrolní jedinci	16	0,022 ± 0,018	0,026 ± 0,022	0,966 ± 0,656
CHOPN I.st.	3	0,085 ± 0,060	0,042 ± 0,016	1,848 ± 0,721
CHOPN II.st.	15	0,092 ± 0,120	0,078 ± 0,070	3,024 ± 3,242
CHOPN III.st.	3	0,192 ± 0,229	0,032 ± 0,035	8,474 ± 7,282
CHOPN se zlepšením FEV ₁ o >12% za rok	3	0,293 ± 0,216	0,092 ± 0,080	1,177 ± 0,831
CHOPN se zhoršením FEV ₁ o >12% za rok	6	0,021 ± 0,023	0,036 ± 0,029	2,214 ± 1,286
CHOPN se změnou FEV ₁ ≤ 12% za rok	12	0,123 ± 0,099	0,09 ± 0,066	4,088 ± 5,326
CHOPN s 2 a více exacerbacemi za rok	4	0,007 ± 0,008	0,022 ± 0,032	1,465 ± 1,028
CHOPN s 0-1 exacerbací za rok	17	0,129 ± 0,146	0,077 ± 0,065	4,145 ± 4,704
CHOPN s perzistujícím produktivním kašlem	9	0,044 ± 0,065	0,045 ± 0,063	5,567 ± 6,028
CHOPN bez perzistujícího produktivního kašle	12	0,152 ± 0,162	0,083 ± 0,059	2,185 ± 1,221
CHOPN - aktivní kuřáci	9	0,065 ± 0,110	0,05 ± 0,045	2,402 ± 1,208
CHOPN - nekuřáci a exkuřáci	12	0,136 ± 0,152	0,079 ± 0,072	4,559 ± 5,528

Výsledky relativní exprese mRNA u pacientů s CHOPN, astmatem a u kontrolních subjektů

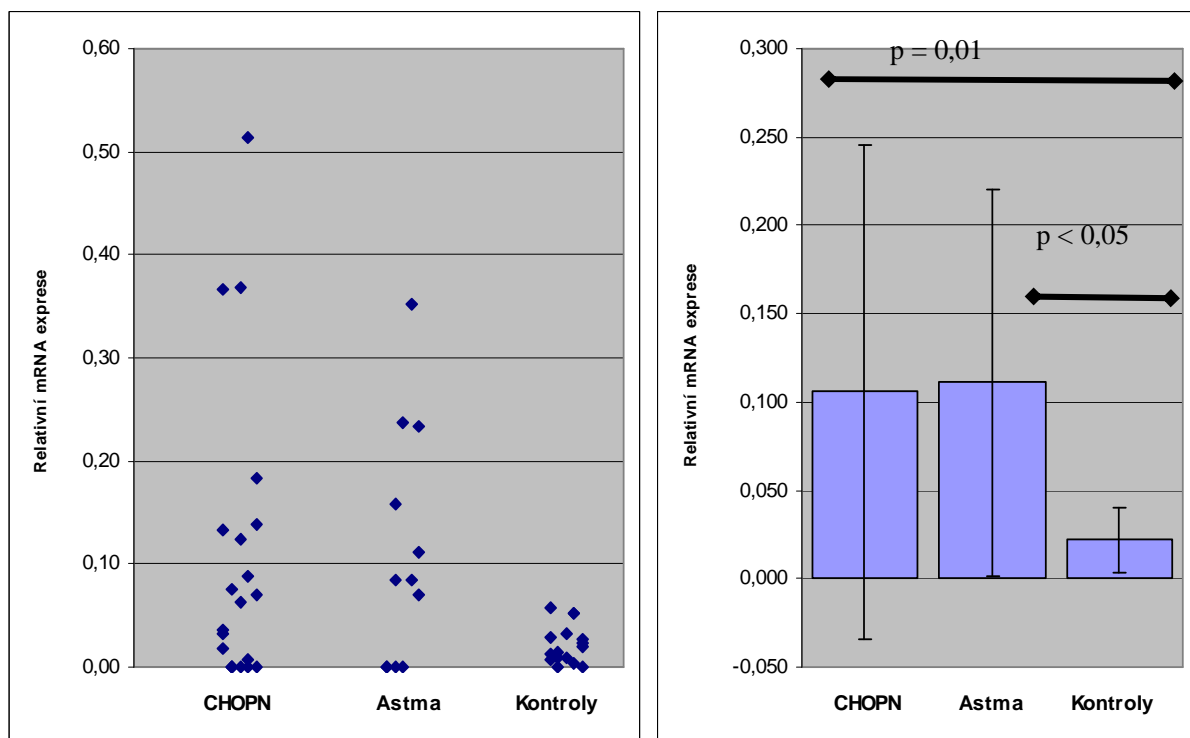
Relativní exprese mRNA MMP-9 v bronchoalveolárních buňkách byla signifikantně zvýšena u pacientů s CHOPN ve srovnání s kontrolní skupinou ($0,106 \pm 0,140$ vs. $0,022 \pm 0,018$, $p = 0,01$). Relativní exprese mRNA MMP-9 u pacientů s bronchiálním astmatem byla rovněž signifikantně zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou ($0,111 \pm 0,110$ vs. $0,022 \pm 0,018$, $p = 0,02$). Přitom se signifikantně nelišila relativní exprese mRNA MMP-9 mezi skupinou pacientů s CHOPN a skupinou pacientů s bronchiálním astmatem (tabulka 7, obrázek 7).

Relativní exprese mRNA MMP-2 v bronchoalveolárních buňkách byla rovněž signifikantně zvýšena u pacientů s CHOPN ve srovnání s kontrolní skupinou ($0,066 \pm 0,064$ vs. $0,026 \pm 0,022$, $p = 0,01$). Relativní exprese mRNA MMP-2 u pacientů s bronchiálním astmatem byla rovněž signifikantně zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou ($0,113 \pm 0,128$ vs. $0,026 \pm 0,022$, $p = 0,04$). Přitom se signifikantně nelišila relativní exprese mRNA MMP-2 mezi skupinou pacientů s CHOPN a skupinou pacientů s bronchiálním astmatem, přestože průměrná hodnota u CHOPN byla nižší ($p = 0,27$) (Viz tabulka 7, obrázek 8).

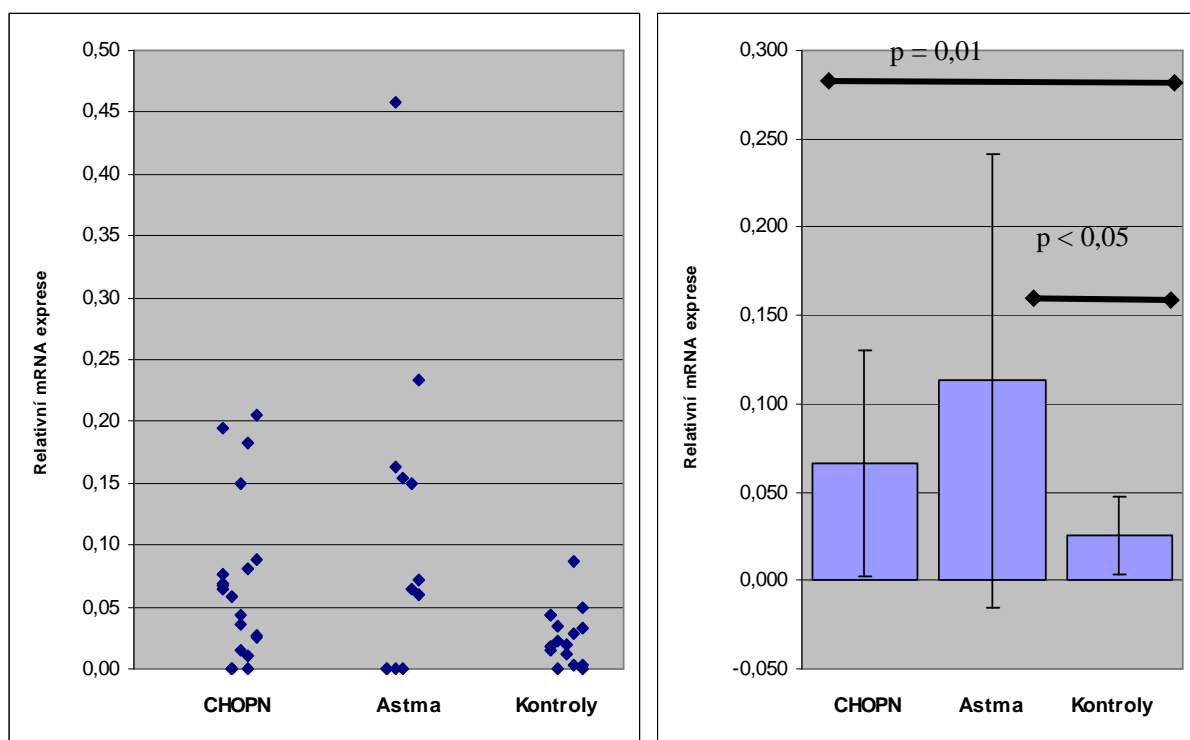
Relativní exprese mRNA TIMP-1 v bronchoalveolárních buňkách byla signifikantně zvýšena u pacientů s CHOPN ve srovnání s kontrolní skupinou ($3,635 \pm 4,385$ vs. $0,966 \pm 0,656$, $p = 0,01$). Relativní exprese mRNA TIMP-1 u pacientů s bronchiálním astmatem byla rovněž signifikantně zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou ($2,327 \pm 1,752$ vs. $0,966 \pm 0,656$, $p = 0,03$). Relativní exprese mRNA TIMP-1 ve skupině s CHOPN sice byla vyšší než ve skupině s astmatem, rozdíl však nebyl signifikantní ($p = 0,25$). (Viz tabulka 7, obrázek 9).

Výsledky relativní exprese mRNA MMP-9, MMP-2 a TIMP-1 v jednotlivých podskupinách CHOPN rozdělených podle stádií CHOPN se významně nelišily.

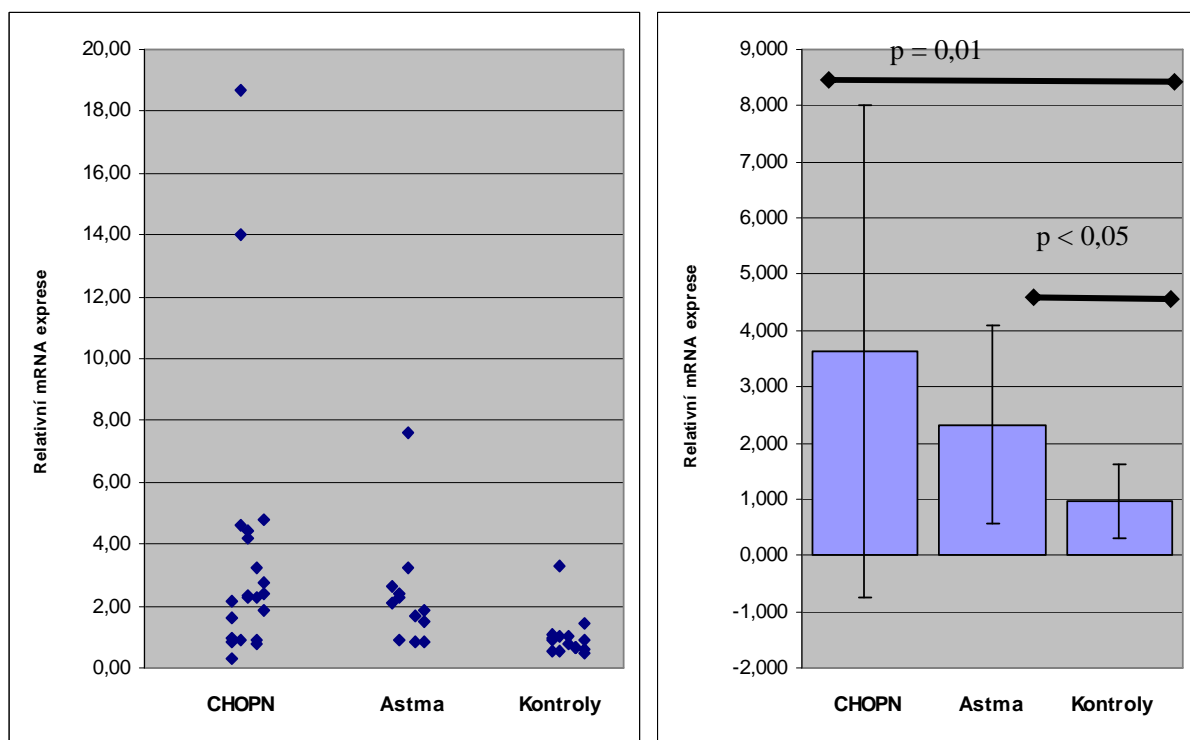
Obrázek 7: Relativní exprese mRNA MMP-9 v bronchoalveolární tekutině pacientů s CHOPN a astmatem



Obrázek 8: Relativní exprese mRNA MMP-2 v bronchoalveolární tekutině pacientů s CHOPN a astmatem



Obrázek 9: Relativní exprese mRNA TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině pacientů s CHOPN a astmatem



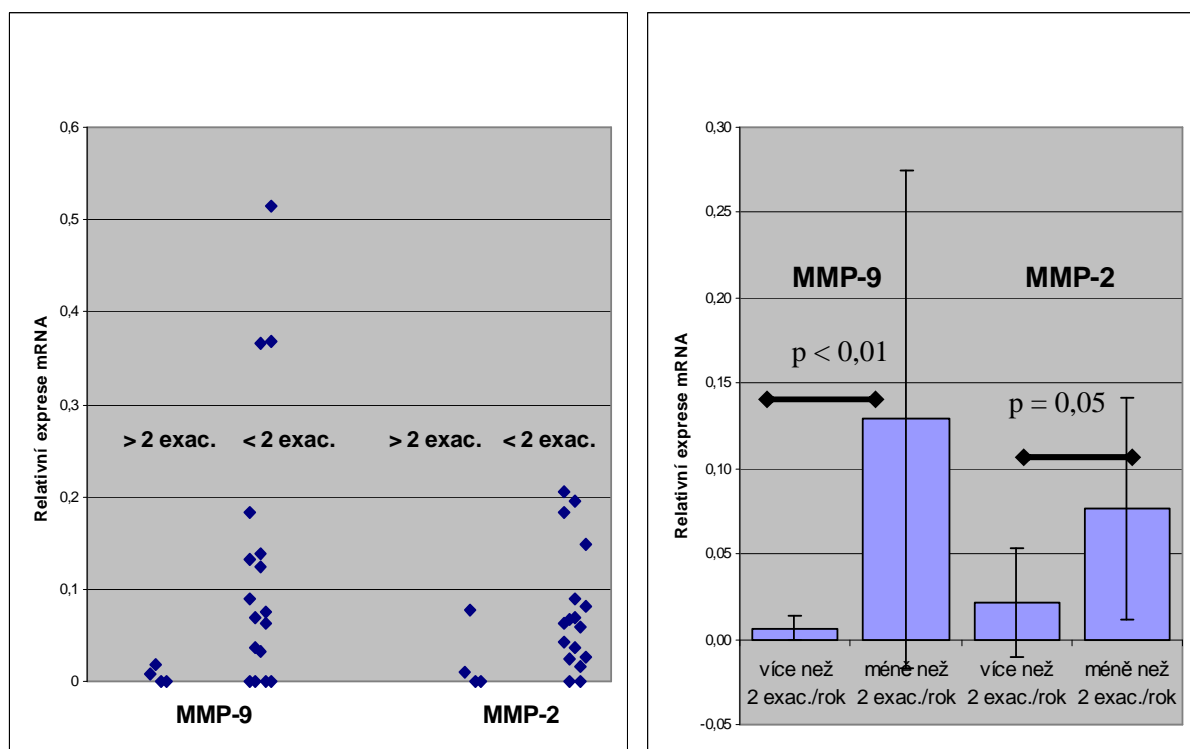
Výsledky relativní exprese mRNA v podskupinách pacientů s CHOPN rozdělených podle četnosti exacerbací

Pacienti s CHOPN, kteří ve dvou letech následujících po bronchoskopii s BAL prodělali průměrně 2 nebo více exacerbací za rok, měli MMP-9 významně nižší než pacienti, kteří neprodělali žádnou nebo prodělali 1 exacerbaci za rok ($0,01 \pm 0,01$ vs. $0,13 \pm 0,15$, $p = 0,004$).

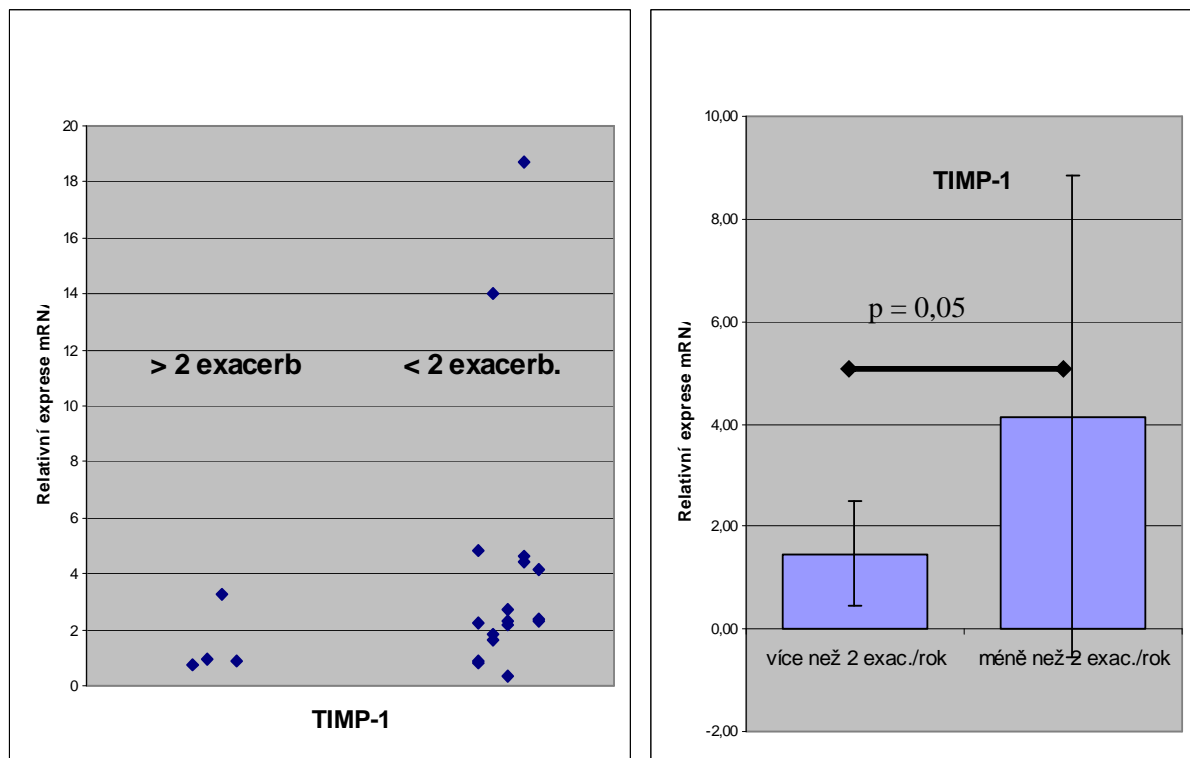
Pacienti s CHOPN, kteří ve dvou letech následujících po bronchoskopii s BAL prodělali průměrně 2 nebo více exacerbací za rok, měli také MMP-2 významně nižší než pacienti, kteří neprodělali žádnou nebo prodělali 1 exacerbaci za rok ($0,02 \pm 0,03$ vs. $0,08 \pm 0,06$, $p = 0,05$).

Pacienti s CHOPN, kteří prodělali průměrně 2 nebo více exacerbací za rok, měli rovněž TIMP-1 významně nižší než pacienti, kteří neprodělali žádnou nebo prodělali 1 exacerbaci za rok ($1,46 \pm 1,03$ vs. $4,15 \pm 4,70$, $p = 0,05$).

Obrázek 10: Relativní exprese mRNA MMP-9 a MMP-2 v bronchoalveolární tekutině pacientů s CHOPN s různou četností exacerbací



Obrázek 11: Relativní exprese mRNA TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině pacientů s CHOPN s různou četností exacerbací



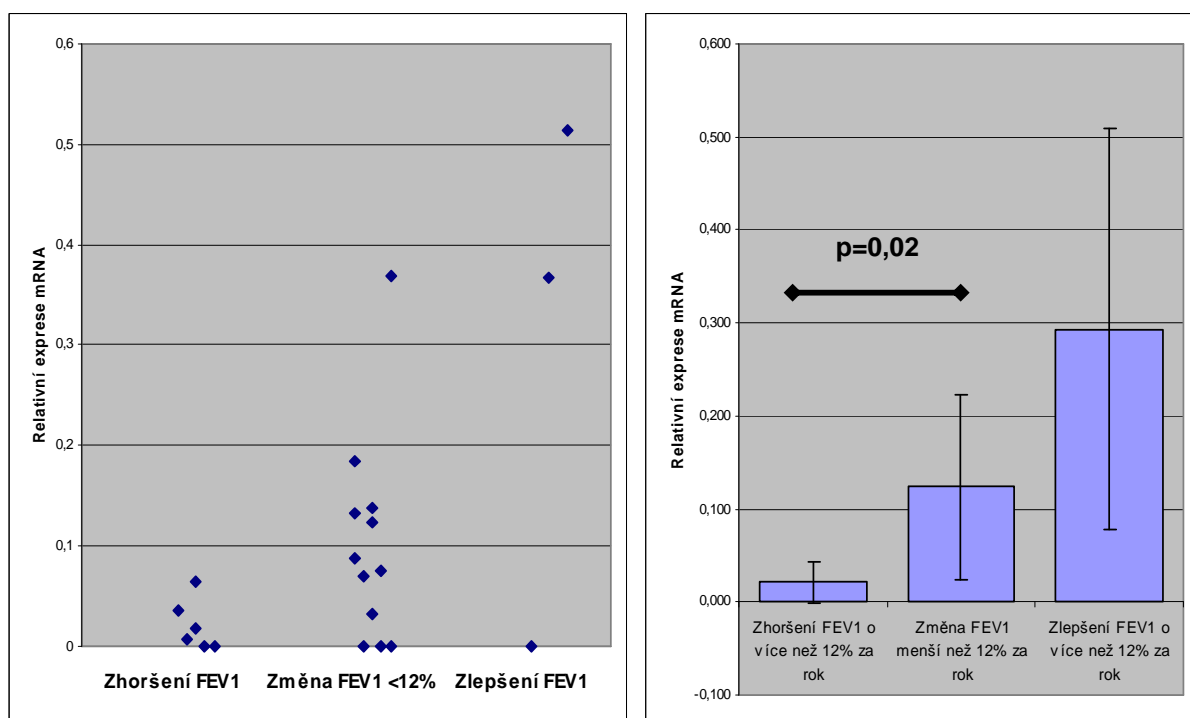
Výsledky relativní exprese mRNA v podskupinách pacientů s CHOPN rozdělených podle změny FEV₁ v průběhu času

Pacienti s CHOPN, u nichž během dvou let následujících po bronchoskopii s BAL došlo ke snížení FEV₁ o více než 12% za rok, měli signifikantně nižší expresi mRNA MMP-9 než pacienti, u nichž zůstala hodnota FEV₁ stejná anebo změněna do 12% za rok ($0,02 \pm 0,02$ vs. $0,12 \pm 0,10$, $p = 0,02$). Pacienti s CHOPN, u nichž došlo ke zlepšení FEV₁ o více než 12%, měli ještě vyšší expresi MMP-9 ($0,29 \pm 0,22$), rozdíl proti ostatním podskupinám však nebyl statisticky významný.

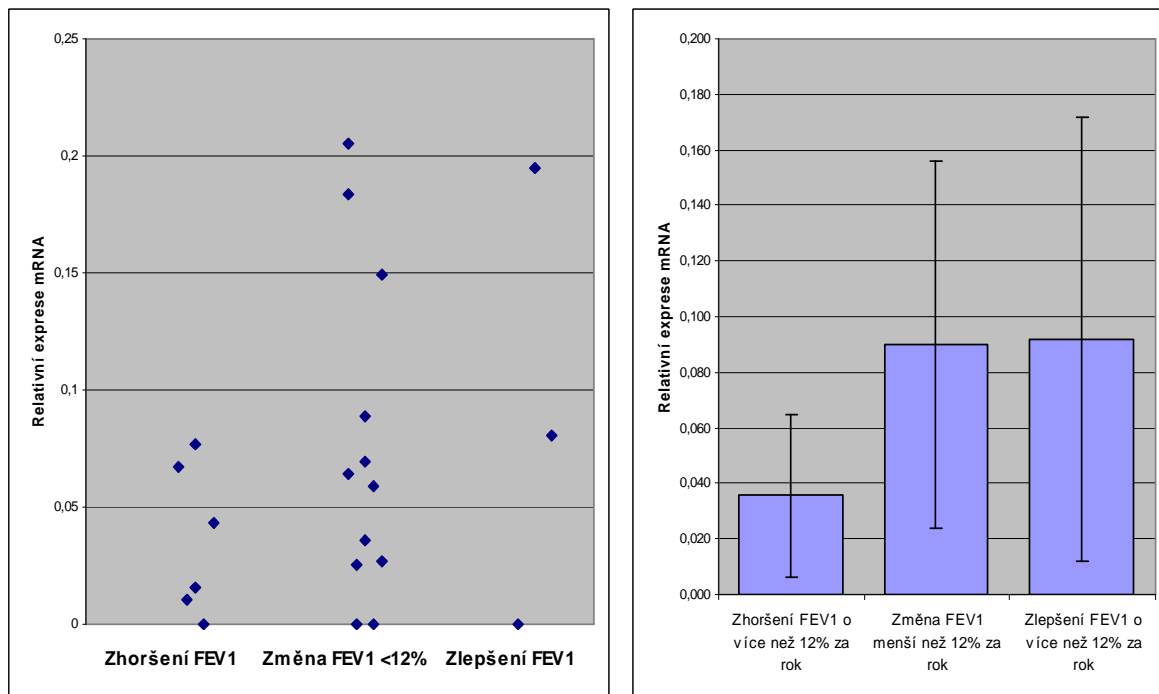
Pacienti s CHOPN, u nichž během dvou let následujících po bronchoskopii s BAL došlo ke snížení FEV₁ o více než 12% za rok, měli expresi mRNA MMP-2 v průměru nižší než pacienti, u nichž zůstala hodnota FEV₁ stejná anebo změněna do 12% za rok, rozdíl však nebyl statisticky významný ($0,04 \pm 0,03$ vs. $0,09 \pm 0,07$, $p = 0,11$).

Expresí mRNA TIMP-1 naopak byla významně nižší u pacientů s CHOPN se zlepšením FEV₁ o více než 12%, ve srovnání s pacienty se změnou FEV₁ rovnou nebo menší než 12% ($1,18 \pm 0,83$ vs. $4,09 \pm 5,33$, $p = 0,04$). Přitom se však exprese TIMP-1 významně nelišila mezi pacienty, u nichž došlo ke snížení FEV₁ o více než 12% za rok, a pacienty s rozdílem FEV₁ rovným nebo nižším než 12%, přestože průměrná hodnota exprese TIMP-1 byla u pacientů se snížením FEV₁ nižší.

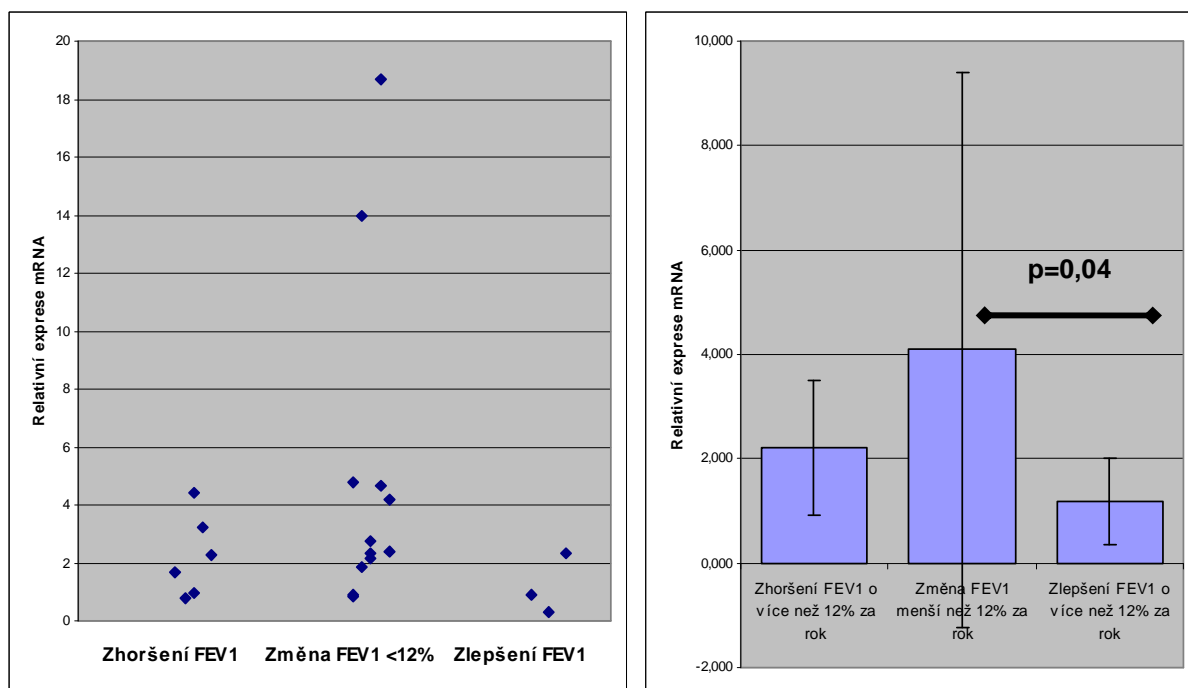
Obrázek 12: Relativní exprese mRNA MMP-9 v bronchoalveolární tekutině v podskupinách pacientů s CHOPN rozdělených podle změny FEV₁ v průběhu času



Obrázek 13: Relativní exprese mRNA MMP-2 v bronchoalveolární tekutině v podskupinách pacientů s CHOPN rozdělených podle změny FEV₁ v průběhu času



Obrázek 14: Relativní exprese mRNA TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině v podskupinách pacientů s CHOPN rozdělených podle změny FEV₁ v průběhu času



4.5. Stanovení koncentrací MMP-2, MMP-9, MMP-8, TIMP-1 a TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině metodou LUMINEX

Stanovení koncentrací metaloproteináz MMP-2, MMP-9 a jejich inhibitorů TIMP-1, TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině bylo provedeno u 87 vzorků ze sledovaného souboru (34 vzorků pacientů s CHOPN, 26 vzorků pacientů s astmatem a 27 vzorků kontrolních subjektů), koncentrace MMP-8 byla vyšetřena u 51 vzorků (16 vzorků pacientů s CHOPN, 17 vzorků pacientů s astmatem a 18 vzorků kontrolních subjektů). Výsledky vyšetření jsou shrnuty v tabulce 8. Všechny hodnoty koncentrací MMP a TIMP jsou uvedeny v pg/ml.

Tabulka 8: Koncentrace MMP-2, MMP-9, MMP-8, TIMP-1, TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině a hodnoty poměru koncentrací MMP-9 / TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN a astmatem

	Počet	MMP-9 v BALTe (pg/ml)	MMP-2 v BALTe (pg/ml)	MMP-8 v BALTe (pg/ml)	TIMP-1 v BALTe (pg/ml)	TIMP-2 v BALTe (pg/ml)	MMP-9/TIMP-1 v BALTe
CHOPN celkem	34	14808 ± 13529	220 ± 206	17559 ± 22389	4213 ± 3452	1626 ± 1394	5,407 ± 6,944
Asthma bronchiale	26	5939 ± 10676	247 ± 312	6744 ± 16547	8467 ± 4034	1469 ± 805	0,396 ± 0,661
Zdraví kontrolní jedinci	27	2580 ± 2956	128 ± 60	1058 ± 1857	4025 ± 4021	876 ± 347	1,374 ± 1,623
CHOPN I.st.	5	17665 ± 10342	429 ± 352	18203 ± 11427	2084 ± 701	1636 ± 586	8,282 ± 4,088
CHOPN II.st.	23	12098 ± 11423	178 ± 138	15283 ± 21684	4518 ± 3723	1576 ± 1627	3,874 ± 4,095
CHOPN III.st.	5	20489 ± 19647	186 ± 149	24501 ± 30158	3433 ± 1464	1667 ± 579	12,188±14,379
CHOPN se zlepšením FEV ₁ o >12% za rok	5	17037 ± 13918	255 ± 157	6356 ± 0	4111 ± 3728	1710 ± 391	9,957 ± 13,449
CHOPN se zhoršením FEV ₁ o >12% za rok	10	13443 ± 12188	119 ± 65	5102 ± 5857	4233 ± 3595	1183 ± 747	4,07 ± 4,861
CHOPN se změnou FEV ₁ ≤ 12% za rok	19	15806 ± 14002	320 ± 244	18655 ± 25684	3664 ± 3269	2054 ± 1780	6,385 ± 4,2
CHOPN s 2 a více exacerbacemi za rok	6	12266 ± 7627	103 ± 12	7292 ± 5224	2594 ± 1491	1201 ± 658	6,379 ± 5,514
CHOPN s 0-1 exacerbací za rok	28	15353 ± 14426	245 ± 219	22226 ± 25436	4573 ± 3655	1721 ± 1493	5,191 ± 7,205
CHOPN s chronickým produktivním kašlem	14	14007 ± 13850	224 ± 254	22969 ± 28282	4065 ± 3399	1692 ± 1939	4,705 ± 4,676
CHOPN bez chronického produktivního kašle	20	15369 ± 13271	217 ± 164	13351 ± 15117	4322 ± 3487	1578 ± 774	5,925 ± 8,185
CHOPN - aktivní kuřáci	10	9022 ± 11058	120 ± 74	11397 ± 16637	3652 ± 2039	1474 ± 924	4,116 ± 5,477
CHOPN - nekuřáci a exkuřáci	24	17219 ± 13732	261 ± 228	21257 ± 24484	4424 ± 3830	1684 ± 1530	5,892 ± 7,361

Koncentrace MMP-9 v bronchoalveolární tekutině byla signifikantně zvýšena u pacientů s CHOPN ve srovnání s kontrolní skupinou (14808 ± 13529 vs. 2580 ± 2956, p = 0,00001). Zároveň byla koncentrace MMP-9 v BALTe byla signifikantně zvýšena u pacientů s CHOPN ve srovnání s astmatem (14808 ± 13529 vs. 5939 ± 10676, p = 0,007). Průměr koncentrace MMP-9 ve skupině s astmatem byl sice vyšší než u kontrolní skupiny, rozdíl však nebyl statisticky významný. (Obrázek 15)

Koncentrace MMP-2 v bronchoalveolární tekutině byla signifikantně zvýšena u pacientů s CHOPN ve srovnání s kontrolní skupinou (220 ± 206 vs. 128 ± 60, p = 0,02). Koncentrace MMP-2 mezi skupinou s CHOPN a astmatem se nelišila. Ve

skupině s astmatem byl sice průměr MMP-2 vyšší než u kontrolní skupiny, rozdíl však nebyl statisticky významný. (Obrázek 16)

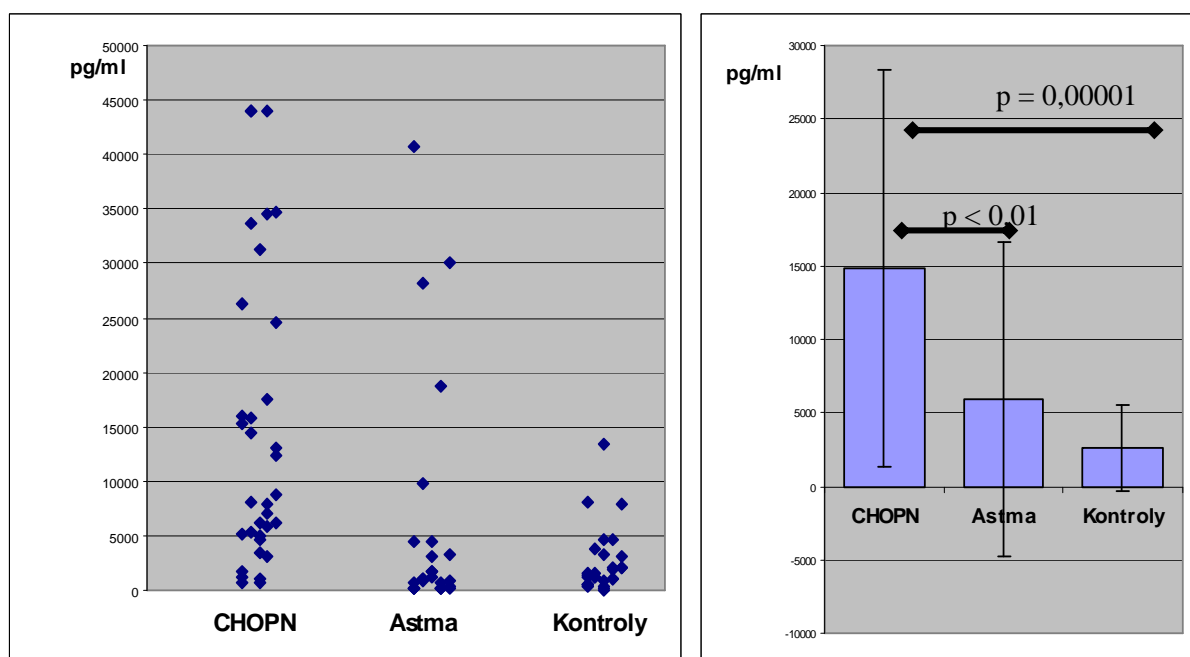
Koncentrace MMP-8 v bronchoalveolární tekutině byla signifikantně zvýšena u pacientů s CHOPN ve srovnání s kontrolní skupinou (17559 ± 22389 vs. 1058 ± 1857 , $p = 0,01$). Koncentrace MMP-8 ve skupině s astmatem byla 6744 ± 16547 , rozdíly proti skupině s CHOPN ani s kontrolními subjekty nebyly signifikantní. (Obrázek 17)

Koncentrace TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině byla signifikantně zvýšena u pacientů s astmatem ve srovnání s pacienty s CHOPN (8467 ± 4034 vs. 4213 ± 3452 , $p = 0,002$) a také ve srovnání s kontrolními subjekty (8467 ± 4034 vs. 4025 ± 4021 , $p = 0,002$). Přitom mezi skupinou s CHOPN a kontrolními subjekty se koncentrace TIMP-1 nelišily. (Obrázek 18)

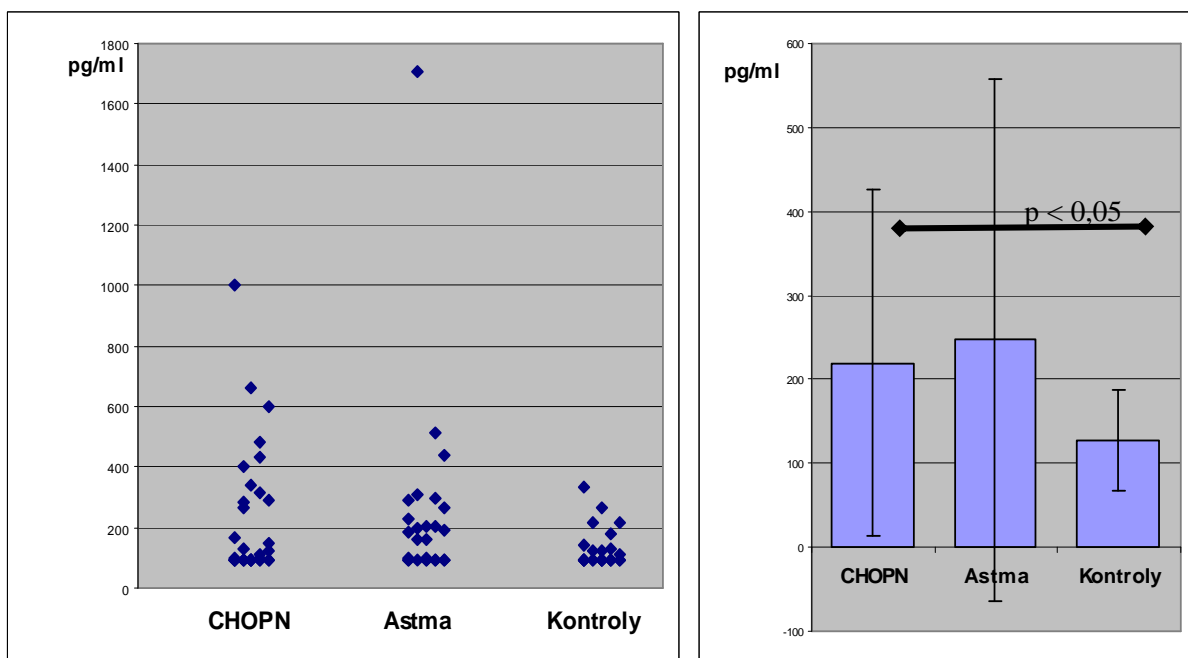
Koncentrace TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině byla signifikantně zvýšena u pacientů s CHOPN ve srovnání s kontrolními subjekty (1626 ± 1394 vs. 876 ± 347 , $p = 0,005$). Ve skupině s astmatem byla koncentrace TIMP-2 rovněž zvýšena ve srovnání s kontrolními subjekty (1469 ± 805 vs. 876 ± 347 , $p = 0,02$). Přitom mezi skupinou s CHOPN a astmatem se koncentrace TIMP-2 významně nelišily. (Obrázek 19)

Poměr koncentrace MMP-9 / TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině byl signifikantně zvýšen u pacientů s CHOPN ve srovnání s astmatem ($5,407 \pm 6,944$ vs. $0,396 \pm 0,661$, $p = 0,0003$) i kontrolní skupinou ($5,407 \pm 6,944$ vs. $1,374 \pm 1,623$, $p = 0,003$). Přitom rozdíl mezi skupinou s astmatem a kontrolními subjekty byl rovněž statisticky významný ($p = 0,01$). (Obrázek 20)

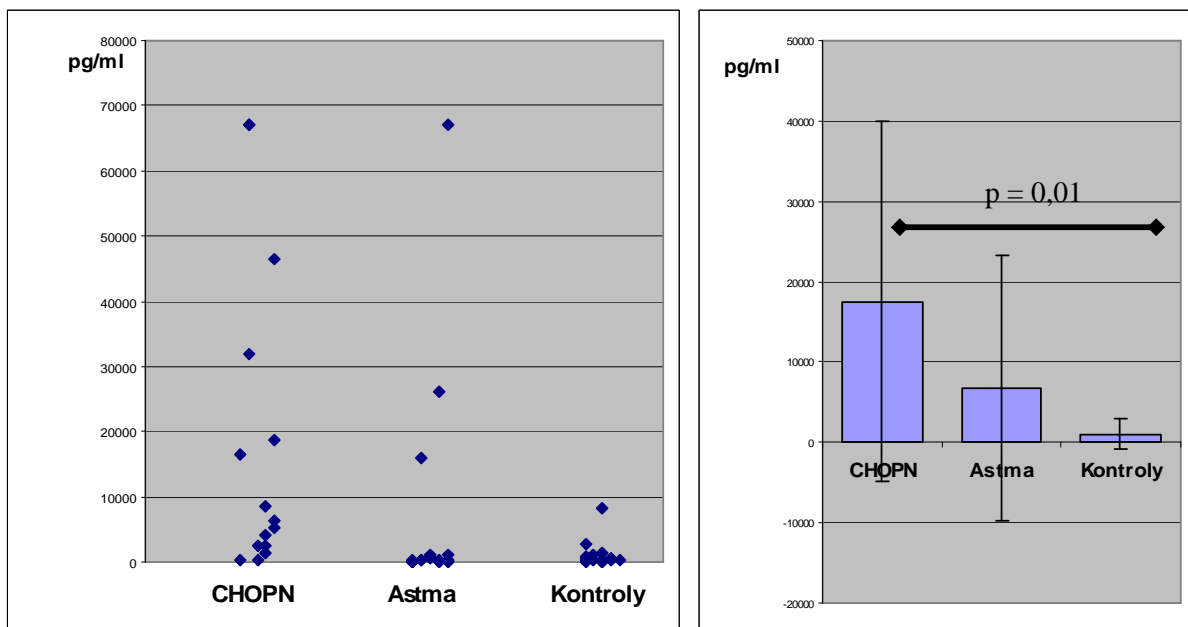
Obrázek 15: Koncentrace MMP-9 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN a bronchiálním astmatem



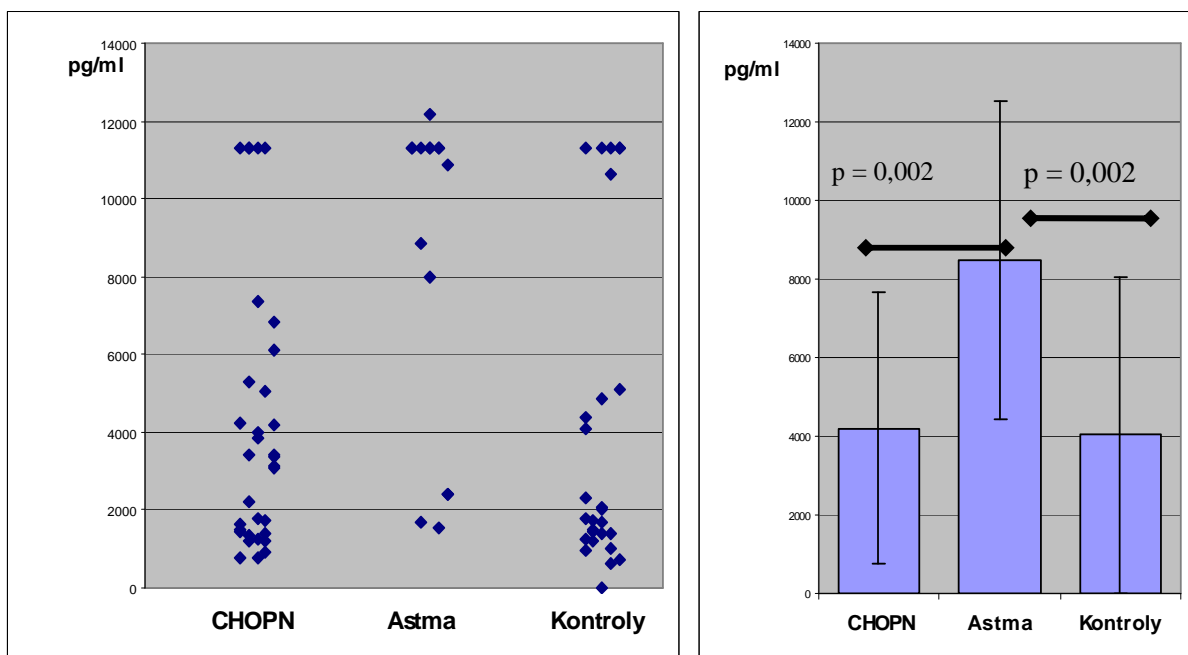
Obrázek 16: Koncentrace MMP-2 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN a bronchiálním astmatem



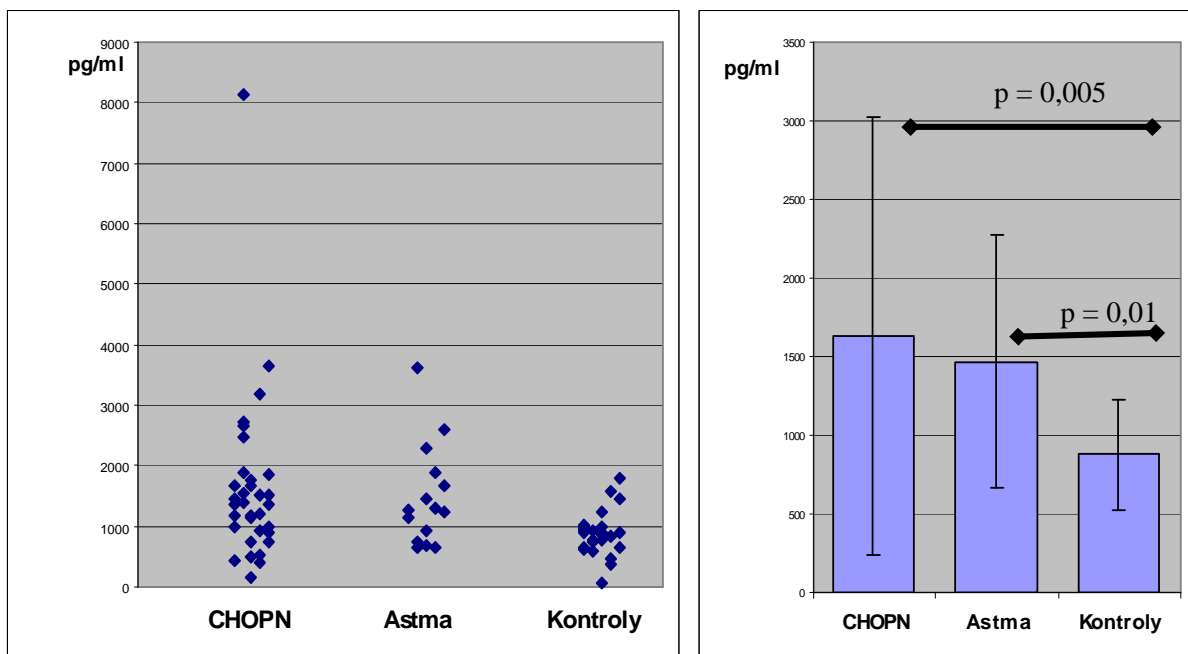
Obrázek 17: Koncentrace MMP-8 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN a bronchiálním astmatem



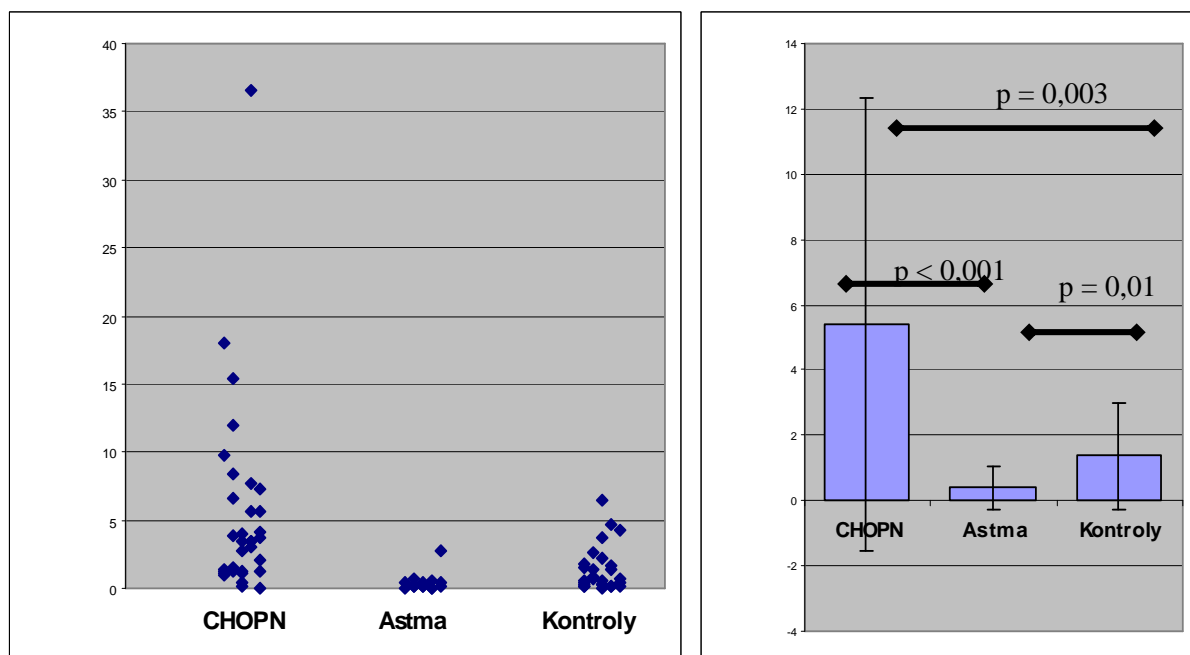
Obrázek 18: Koncentrace TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN a bronchiálním astmatem



Obrázek 19: Koncentrace TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN a bronchiálním astmatem



Obrázek 20: Poměr koncentrací MMP-9 / TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN a bronchiálním astmatem

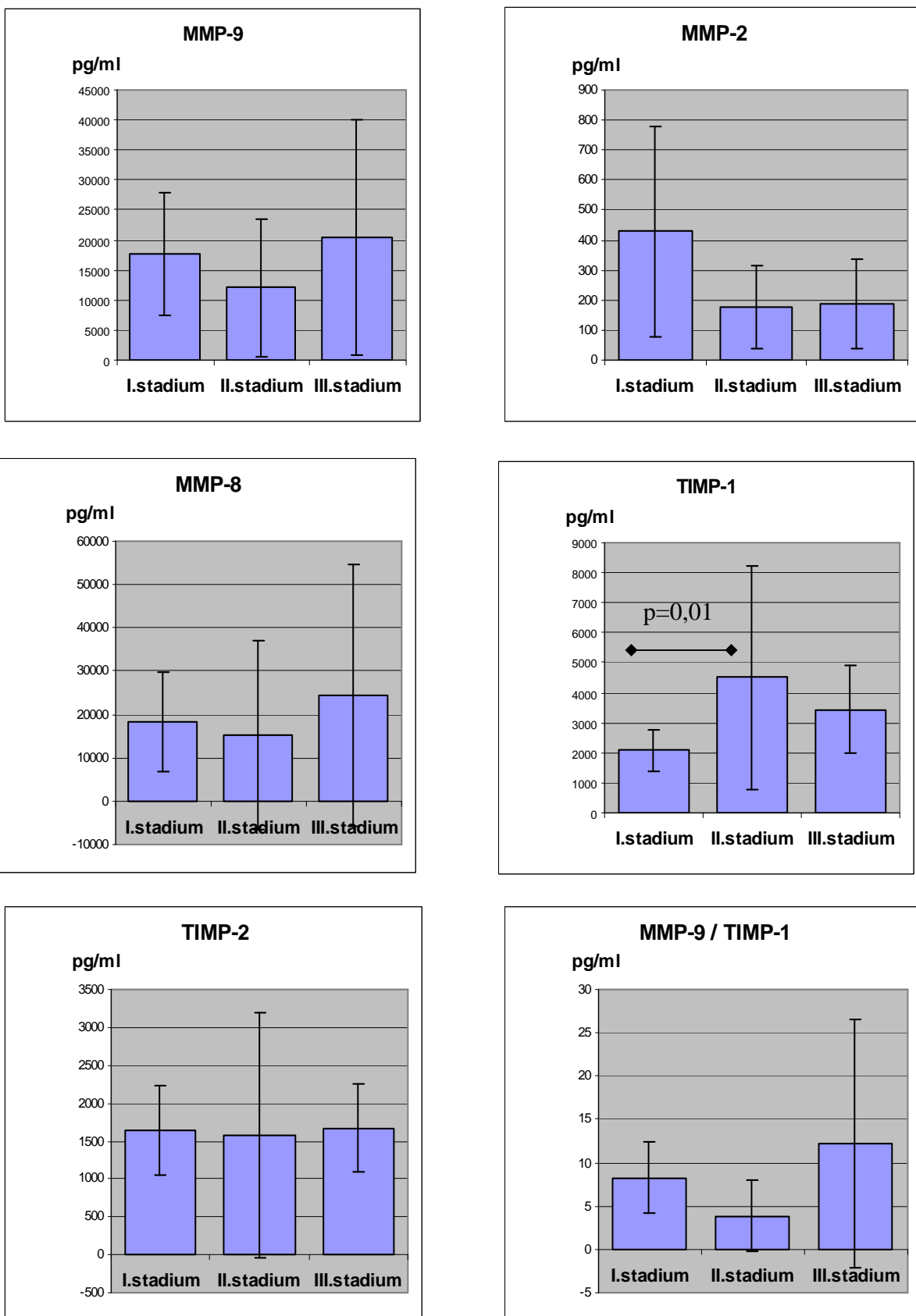


Koncentrace metaloproteináz a jejich inhibitorů v BALTe u pacientů s CHOPN v podskupinách rozdělených podle stádia CHOPN

Koncentrace MMP-2, MMP-9, MMP-8, TIMP-1, TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině a hodnoty poměru koncentrací MMP-9 / TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN v podskupinách rozdělených podle stádia CHOPN jsou uvedeny v tabulce 8 a na obrázku 21.

Koncentrace TIMP-1 v BALTe byla signifikantně vyšší u pacientů ve 2. stádiu CHOPN ve srovnání s 1. stádiem (4518 ± 3723 vs. 2084 ± 701 , $p = 0,01$), ostatní rozdíly nebyly statisticky významné.

Obrázek 21: Koncentrace metaloproteináz a jejich inhibitorů v bronchoalveolární tekutině podle stádia CHOPN



Koncentrace metaloproteináz a jejich inhibitorů v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN v podskupinách rozdělených podle četnosti exacerbací

Koncentrace MMP-2, MMP-9, MMP-8, TIMP-1, TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině a hodnoty poměru koncentrací MMP-9 / TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN v podskupinách rozdělených podle četnosti exacerbací jsou uvedeny v tabulce 8 a na obrázku 22.

Koncentrace MMP-2 v bronchoalveolární tekutině byla signifikantně vyšší u pacientů, kteří ve dvou letech následujících po bronchoskopii s BAL neprodělali žádnou nebo prodělali 1 exacerbaci za rok ve srovnání s pacienty se 2 a více exacerbacemi za rok (245 ± 219 vs. 103 ± 12 , $p = 0,002$).

Koncentrace TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině byla signifikantně vyšší u pacientů, kteří ve dvou letech následujících po bronchoskopii s BAL neprodělali žádnou nebo prodělali 1 exacerbaci za rok ve srovnání s pacienty se 2 a více exacerbacemi za rok (4573 ± 3655 vs. 2594 ± 1491 , $p = 0,05$).

Rozdíly koncentrací MMP-9, MMP-8, TIMP-2 a poměru MMP-9/TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině v podskupinách CHOPN rozdělených podle četnosti exacerbací nebyly statisticky významné.

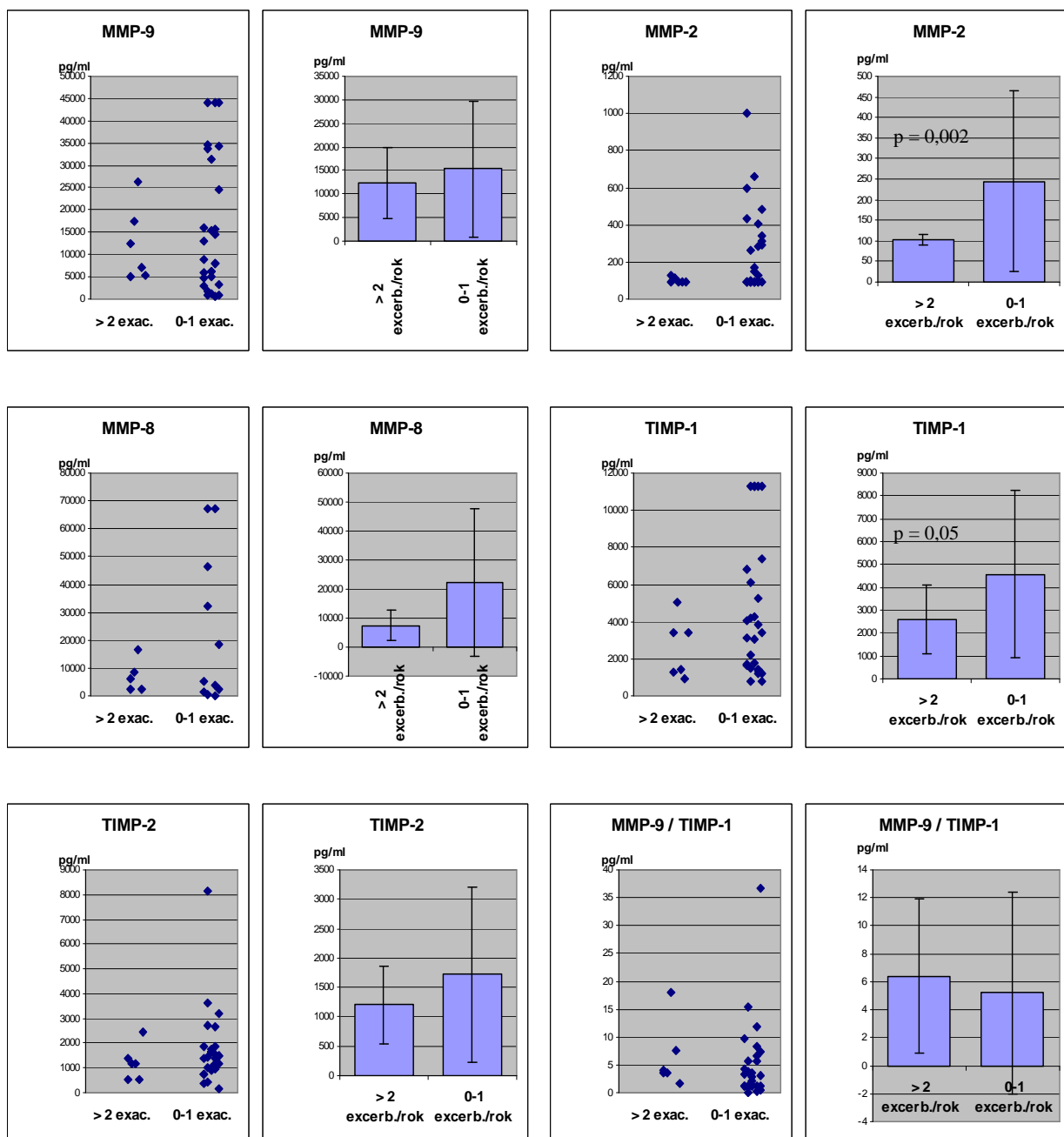
Koncentrace metaloproteináz a jejich inhibitorů v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN v podskupinách rozdělených podle změny FEV₁ v průběhu času

Koncentrace MMP-2, MMP-9, MMP-8, TIMP-1, TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině a hodnoty poměru koncentrací MMP-9 / TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN v podskupinách, rozdělených podle změny FEV₁ v průběhu dvou let následujících po bronchoskopii s BAL, jsou uvedeny v tabulce 8 a na obrázku 23.

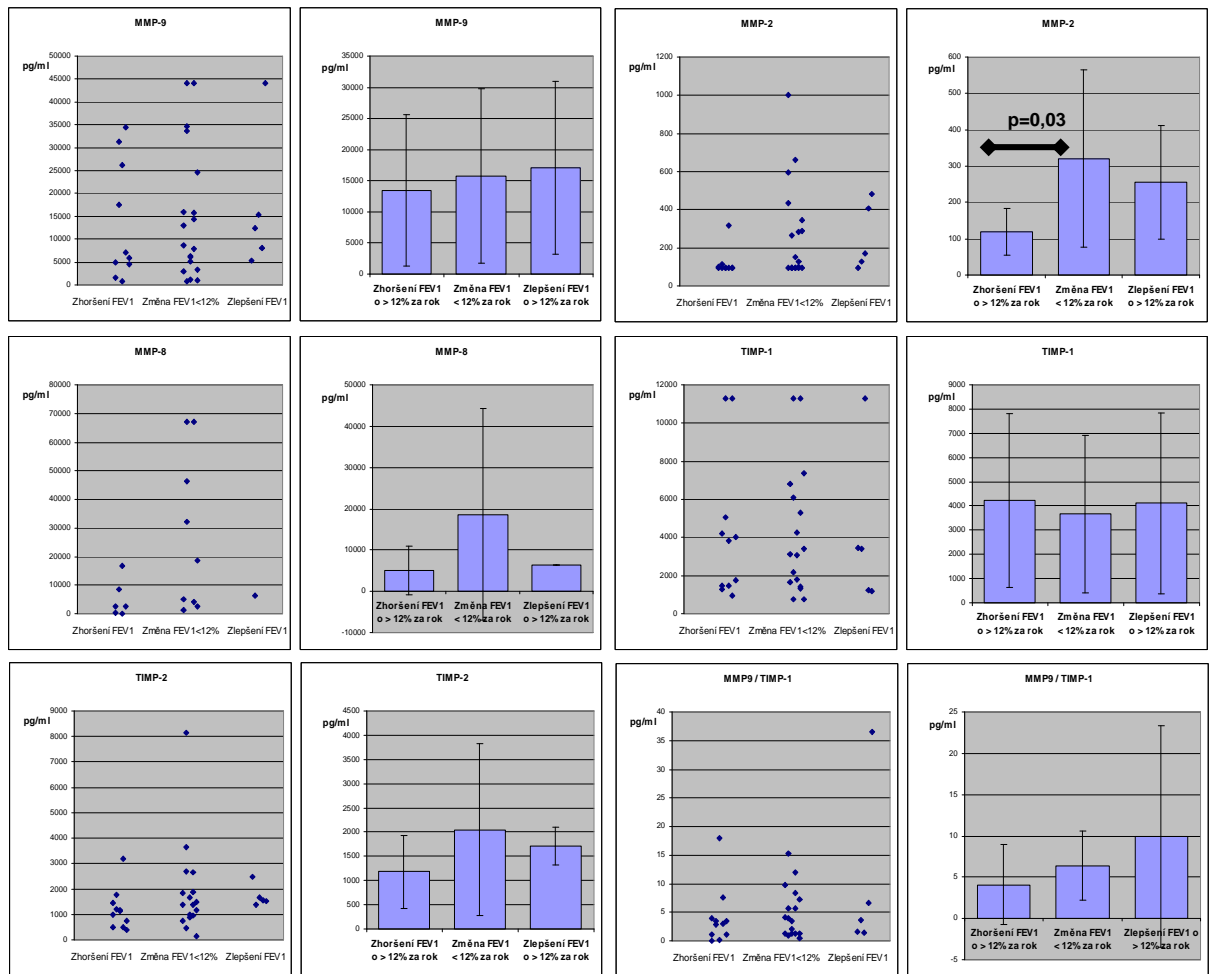
Koncentrace MMP-2 v BALTe byla signifikantně nižší u pacientů s poklesem FEV₁ o více než 12% za rok ve srovnání s pacienty, jejichž změna FEV₁ byla rovna nebo nižší než 12% (119 ± 65 vs. 320 ± 244 , $p = 0,03$).

Rozdíly v koncentraci MMP-2 mezi ostatními podskupinami a rozdíly koncentrace MMP-9, MMP-8, TIMP-1, TIMP-2 a poměru MMP-9/TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině v podskupinách CHOPN rozdělených podle změny plicních funkcí nebyly statisticky významné.

Obrázek 22: Koncentrace MMP-2, MMP-9, MMP-8, TIMP-1, TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině a hodnoty poměru koncentrací MMP-9 a TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN rozdělených podle četnosti exacerbací za rok



Obrázek 23: Koncentrace MMP-2, MMP-9, MMP-8, TIMP-1, TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině a hodnoty poměru koncentrací MMP-9 a TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN rozdělených podle změny FEV₁ v průběhu času



5. SOUHRNNÉ VÝSLEDKY A DISKUZE

Studie se zúčastnilo celkem 94 jedinců, kteří tvořili tři skupiny. Skupina pacientů s CHOPN čítala 35 osob, skupina s bronchiálním astmatem měla 26 osob a 33 osoby byly kontrolní jedinci. Skupinu pacientů s CHOPN bylo možno rozdělit do podskupin podle stádia nemoci, změny FEV₁ v průběhu času, četnosti exacerbací a kuřáctví. Většina pacientů s CHOPN byla ve druhém stádiu nemoci (25 osob), v prvním a třetím stádiu bylo shodně po 5 osobách.

Ve studiích, které se zabývaly vyšetřením MMP pomocí BAL u CHOPN, bývalo zařazeno obvykle 10–30 pacientů s CHOPN a 3–15 kontrolních subjektů [191, 193, 194, 200, 201, 209, 211]. Skupina 35 pacientů s CHOPN v našem souboru je poměrně velká a umožňuje srovnání se skupinou pacientů s astmatem a kontrolními subjekty zařazenými do našeho souboru. Také dovoluje rozdělení do podskupin podle stádií tíže CHOPN, ale také podle různých fenotypů CHOPN, například do podskupin s různou četností exacerbací, s různou rychlostí deklinace plicních funkcí nebo s přítomností či nepřítomností produktivního kašle. Po rozdělení do takových podskupin je však počet pacientů v některých podskupinách již natolik nízký, že neumožňuje přesné srovnání výsledků mezi všemi fenotypy, které se vyskytly v našem souboru.

V průběhu studie jsme sledovali změny FEV₁ u pacientů s CHOPN a podle této změny je zařadili do tří podskupin. Do podskupiny se zlepšením FEV₁ jsme zařadili pacienty s průměrným ročním zvýšením FEV₁ o > 12%, do podskupiny se zhoršením FEV₁ byli zařazeni pacienti s průměrným ročním snížením FEV₁ o > 12%, třetí podskupinu pak tvořili pacienti se průměrnou změnou FEV₁ ≤ 12% za rok. K zařazení do podskupiny se zlepšením nebo zhoršením FEV₁ bylo nutné, aby došlo k průměrné změně FEV₁ o > 12% v průběhu kterýchkoliv 12 po sobě následujících měsíců v době trvání studie. Hodnota změny FEV₁ na úrovni 12% byla pro účely této studie zvolena tak, aby odpovídala hodnotě používané pro hodnocení bronchiální reverzibility [1]. Toto kritérium použité v naší studii je u pacientů s CHOPN poměrně přísné, v jiných studiích se obvykle používají nižší hodnoty změny FEV₁, které odlišují jednotlivé fenotypy CHOPN [32, 228]. Takto přísně zvolené kritérium však umožňuje vyčlenění pacientů s CHOPN s výraznou změnou plicních funkcí, takže do podskupiny se zlepšením FEV₁ jsou začleněni pacienti s CHOPN s velmi dobrou reakcí na terapii a naopak do podskupiny se zhoršením FEV₁ jsou zařazeni pacienti s CHOPN, u kterých navzdory terapii dochází k rychlé deklinaci plicních funkcí.

U většiny pacientů s CHOPN (19 pacientů) byla roční změna FEV₁ rovna nebo nižší než 12%. Mezi těmito pacienty byli 4 kuřáci a 12 exkuřáků, 7 pacientů s produktivním kašlem a žádný z těchto pacientů neprodělal více než 2 exacerbace za rok. Celkem 11 pacientů s CHOPN mělo roční pokles FEV₁ vyšší než 12%, z nich 10 bylo ve druhém stádiu CHOPN a jeden ve 3. stádiu CHOPN, bylo mezi nimi 5 kuřáků a 3 exkuřáci, 6 pacientů z této podskupiny mělo chronický produktivní kašel s expektorací a 4 pacienti prodělali průměrně 2 či více exacerbací za rok. Podskupinu pacientů s CHOPN, u nichž došlo k ročnímu zlepšení FEV₁ o více než 12%, tvořilo pouze 5 jedinců. Všichni měli 2. stádium CHOPN, byli mezi nimi dva exkuřáci a

pouze jeden kuřák s produktivním kašlem, ostatní byli bez kašle a bez expektorace. Dva z pěti pacientů této podskupiny prodělali 2 či více exacerbací za rok.

Produktivní kašel, odpovídající definici chronické bronchitidy, se vyskytoval v podskupině s rychlejším poklesem plicních funkcí u 55% pacientů, zatímco v podskupině s menší změnou plicních funkcí jen u 37% pacientů. V podskupině se zlepšením plicních funkcí se produktivní kašel vyskytoval pouze u jednoho pacienta z pěti, zbývající čtyři pacienti se zlepšením plicních funkcí byli bez přítomnosti chronické bronchitidy. Tyto výsledky sice mohou podporovat závěr, že produktivní kašel může do jisté míry predisponovat rychlejší deklinaci plicních funkcí v průběhu času u pacientů s CHOPN, validita výsledků je však limitována malým počtem pacientů v podskupinách souboru. Vztahem chronického kašle a poklesu plicních funkcí v průběhu času se zabývá jen málo studií. Pelkonen se spolupracovníky při sledování 1711 pacientů s CHOPN ve Finsku v průběhu 30 let zjistil nižší hodnoty FVC a FEV₁ u pacientů s projevy chronické bronchitidy než bez nich, avšak nesledoval vývoj plicních funkcí v průběhu času [229]. Campbell se spolupracovníky sledoval plicní funkce u 66 pacientů s CHOPN během 4 až 6 let a zjistil souvislosti mezi jejich poklesem a řadou jiných faktorů, nezabýval se však produktivním kašlem a jeho vztahem na plicní funkce [230]. Sapey se spolupracovníky v práci publikované v roce 2010 zjistila, že polymorfismus TNF- α je spojen s vyšším výskytem chronické bronchitidy a rychlejším poklesem plicních funkcí v průběhu času [231]. Ve studii ECLIPSE, jejíž výsledky byly publikovány ve druhé polovině roku 2010 a která sledovala 2164 pacientů s CHOPN všech stádií, nebyl nalezen vztah mezi produktivním kašlem a hodnotami plicních funkcí, studie se však nezabývala hodnocením vztahu mezi produktivním kašlem a poklesem plicních funkcí [32].

Mezi 14 pacienty s CHOPN s chronickým produktivním kašlem byli 4 pacienti (28,6%) s fenotypem častějších exacerbací, tedy u nichž se vyskytly ≥ 2 exacerbace za rok. Pacientů s CHOPN bez chronického produktivního kašle bylo celkem 21, z nich dva (9,5%) prodělalo ≥ 2 exacerbace za rok. Výskyt fenotypu CHOPN s častějšími exacerbacemi se tedy v našem souboru vyskytoval 3x častěji mezi pacienty s chronickou bronchitidou než bez ní. Přestože se jedná o malý počet pacientů a výsledky jsou zatíženy statistickou chybou, mohou naše výsledky svědčit pro souvislost fenotypu CHOPN s častějšími exacerbacemi a fenotypu CHOPN s chronickou bronchitidou. K podobným závěrům došel Burgel, který sledoval pacienty s CHOPN, z nichž 321 mělo chronickou bronchitidu a 112 bylo bez chronické bronchitidy. Pacienti s chronickou bronchitidou měli průměrně 2,20 exacerbace za rok a u 55% z nich se vyskytly >2 exacerbace za rok, zatímco pacienti bez chronické bronchitidy prodělali průměrně 0,97 exacerbací za rok a pouze u 22% z nich se vyskytly >2 exacerbace za rok [232]. Naopak ve studii ECLIPSE četnost exacerbací sice vzrůstala s tíží CHOPN, avšak nijak se nelišila ve skupině pacientů s produktivním kašlem a bez něho [32].

Fenotyp s častějšími exacerbacemi, tedy 2 a více exacerbacemi za rok, se v našem souboru vyskytl u 6 pacientů s CHOPN. Dvě a více exacerbací za rok se v podskupině 11 pacientů s rychlejším poklesem plicních funkcí vyskytly u čtyř osob, tedy u 36% pacientů, zatímco mezi 19 pacienty s menší změnou plicních funkcí nebyl žádný pacient s ≥ 2 exacerbacemi za rok. To by mohlo svědčit pro vliv exacerbací na rychlost deklinace plicních funkcí u CHOPN. V souladu s tímto závěrem jsou výsledky dřívějších studií. Donaldson se spolupracovníky prokázal během čtyřletého sledování souboru 32 pacientů s CHOPN rychlejší pokles plicních

funkcí u pacientů s častějšími exacerbacemi. Pacienti, kteří prodělali v průměru více než 2,9 exacerbace za rok, měli roční pokles FEV₁ průměrně 40,1 ml za rok, zatímco pacienti s nižší četností exacerbací měli průměrný roční pokles FEV₁ 32,1 ml [233]. Kanner v průběhu 5 let trvající studie, do níž zařadil 5887 kuřáků s CHOPN, prokázal rychlejší pokles FEV₁ u kuřáků, kteří měli vyšší četnost exacerbací. U kuřáků, kteří přestali kouřit, ale žádnou souvislost mezi deklinací FEV₁ a četností exacerbací nezaznamenal [234]. Naproti tomu studie ECLIPSE sice prokázala vyšší četnost exacerbací u těžších stádií CHOPN a potvrdila existenci fenotypu s čtenějšími exacerbacemi, ale rychlejší deklinaci plicních funkcí v průběhu času u pacientů s tímto fenotypem neprokázala [235]. V rozporu s naším vlastním závěrem je skutečnost, že u dvou z pěti pacientů s výrazným zlepšením plicních funkcí se ≥ 2 exacerbace za rok objevily také. Vysvětlením je zřejmě malý počet pacientů v podskupině se zlepšením plicních funkcí, výsledky z této podskupiny jsou zatíženy náhodnou chybou a nedovolují přesnější srovnání s ostatními podskupinami pacientů s CHOPN.

Výsledky v našem souboru ukazují, že u pacientů s CHOPN je produktivní kašel častěji spojen s rychlejší deklinací plicních funkcí v průběhu času, dále že u fenotypu častějších exacerbací rovněž častěji dochází k rychlejšímu poklesu plicních funkcí v průběhu času. Přitom je v našem souboru produktivní kašel častěji spojen s fenotypem častějších exacerbací.

Z 35 pacientů s CHOPN v našem souboru bylo 11 pacientů (31,4%), u nichž došlo k průměrnému zhoršení FEV₁ o $> 12\%$ za rok. Zdá se, že rychlejší zhoršování plicních funkcí u CHOPN může mít genetický základ. Studie z r. 2009 prokázala, že polymorfismus genu kódujícího interleukin-6 (IL-6) ovlivňuje pokles plicních funkcí u CHOPN. Nejvýraznější efekt byl zjištěn při jednonukleotidovém polymorfismu na pozici 174 promotoru genu pro IL-6 v případě alely IL-6-174C, která byla spojena s rychlým poklesem plicních funkcí v průběhu 5-leté studie [236]. Mannino sledoval pokles plicních funkcí v průběhu 3 let v rozsáhlé populační studii, do níž bylo zapojeno 15 536 osob ve věku 44 až 66 let, z nichž 3 451 mělo CHOPN. Průměrný pokles FEV₁ v celém sledovaném souboru činil 62 ml ročně, což odpovídalo poklesu o 1,5% ročně. Kvartil souboru s nejrychlejším poklesem FEV₁ autoři označili jako „rapid decliners“, v této skupině byl pokles FEV₁ nejméně o 2,7% a průměrný roční pokles FEV₁ činil 171 ml, což odpovídalo poklesu o 4,7% proti vstupní hodnotě. Pacienti s CHOPN, které Mannino označil jako „rapid decliners“, měli v jeho souboru vyšší riziko úmrtí než ostatní pacienti, ve druhém stádiu CHOPN byla jejich mortalita 1,48 krát vyšší a ve 3.–4. stádiu 1,35 krát vyšší než u pacientů s CHOPN s pomalejším poklesem plicních funkcí. [228]. Při hodnocení Manninových závěrů však je nutno brát v potaz skutečnost, že kritérium pro zařazení do skupiny „rapid decliners“ v Manninově studii není příliš přísné, neboť do této skupiny dovoluje zařadit celý kvartil celkové populace. Proto Mannino zařadil mezi „rapid decliners“ také 20% zcela zdravých osob, 35% pacientů ve 2. stádiu CHOPN a 51% pacientů se 3.–4. stádiem CHOPN [228]. Naproti tomu kritérium zvolené v naší práci, odpovídající průměrnému zhoršení FEV₁ o $> 12\%$ za rok, je přísnější a dovoluje ostřeji vyčlenit skupinu pacientů s CHOPN, u níž došlo ke klinicky významné deklinaci plicních funkcí.

Při provedení bronchoskopie a bronchoalveolární laváže (BAL), kterou absolvovali všichni pacienti a všechny kontrolní osoby zařazené do našeho souboru, nedošlo ani v jednom případě k závažným komplikacím. V souladu s literárními zkušenostmi jsme potvrdili, že bronchoskopie a BAL jsou relativně šetrné metody, které lze použít k vyšetření pacientů s CHOPN a bronchiálním astmatem [64, 78, 79, 80, 85].

U pacientů s CHOPN se při provádění BAL setkáváme se sníženou návratností bronchoalveolární tekutiny, což může ovlivnit výsledky vyšetření. Literární zdroje uvádějí návrat bronchoalveolární tekutiny u CHOPN v rozmezí 10–40%, návratnost je přitom tím menší, čím výraznější je bronchiální obstrukce a čím rozsáhlejší je plicní emfyzém [68, 72, 73]. Také v naší studii jsme pozorovali tendenci ke kolapsu bronchů, které vedlo ke snížení návratu bronchoalveolární tekutiny a které bylo jen částečně ovlivnitelné technikou provedení zpětné aspirace bronchoalveolární tekutiny. Návrat bronchoalveolární tekutiny u pacientů s CHOPN byl signifikantně nižší ve srovnání s pacienty s bronchiálním astmatem.

Cytologické vyšetření bronchoalveolární tekutiny jsme provedli pouze u těch pacientů, u nichž se podařilo dosáhnout návratu bronchoalveolární tekutiny alespoň 40% objemu instilované tekutiny a dostatečné buněčnosti s celkovým počtem buněk $\geq 0,5 \times 10^5$, protože při nižším návratu a nižší buněčnosti bronchoalveolární tekutiny je její hodnocení nespolehlivé [64, 68]. Cytologické vyšetření bronchoalveolární tekutiny jsme tedy mohli provést u všech pacientů s astmatem, u všech pacientů s 1. stádiem CHOPN a u všech kontrolních subjektů. Pro nedostatečný návrat nebo buněčnost bronchoalveolární tekutiny nebylo cytologické vyšetření provedeno u 4 z 25 pacientů s 2. stádiem CHOPN a u dvou z pěti pacientů se 3. stádiem CHOPN.

Zjistili jsme vyšší diferenciální počet lymfocytů a výrazně vyšší počet eozinofilů v bronchoalveolární tekutině u pacientů s astmatem ve srovnání s pacienty s CHOPN. Naopak pacienti s CHOPN měli v bronchoalveolární tekutině výrazně vyšší diferenciální počet neutrofilů. Tyto výsledky jsou statisticky významné a odpovídají známým charakteristikám obou nemocí [1, 2].

Podskupina kuřáků s CHOPN v našem souboru měla v bronchoalveolární tekutině signifikantně nižší relativní diferenciální počet neutrofilů než skupina nekuřáků a exkuřáků s CHOPN. Tento poměrně neočekávaný výsledek může mít několik vysvětlení. Kuřáci s CHOPN měli v BALTe signifikantně vyšší relativní diferenciální počet makrofágů ve srovnání s nekuřáky a exkuřáky s CHOPN, což odpovídá známým zkušenostem [1]. Absolutní počet makrofágů v BALTe měli kuřáci výrazně vyšší než nekuřáci a exkuřáci, zatímco absolutní počty neutrofilů v BALTe se u obou těchto skupin nelišily. Relativní diferenciální počet neutrofilů v BALTe u kuřáků s CHOPN tedy mohl být nižší než u nekuřáků a exkuřáků s CHOPN právě v důsledku vyššího absolutního počtu makrofágů u kuřáků.

Jiné vysvětlení našich zjištění může souviset s dobou, kdy byla vykouřena poslední cigareta před bronchoskopií. Morrison ve své studii vyšetřoval bronchoalveolární tekutinu u 7 kuřáků, kteří kouřili naposled 1 hodinu před bronchoskopií s BAL a které označil jako „akutní kuřáky“, dále u 8 kuřáků, kteří kouřili naposled 12 hodin před bronchoskopií s BAL a u 7 nekuřáků. Podle očekávání zjistil, že kuřáci mají za hodinu po vykouření dvou cigaret relativní počet neutrofilů v bronchoalveolární tekutině vyšší než nekuřáci. Avšak kuřáci, kteří se po 12 hodin zdrželi kouření, měli relativní počet neutrofilů v bronchoalveolární tekutině nejenže signifikantně nižší než „akutní kuřáci“, ale dokonce nižší než nekuřáci, byť tento rozdíl nebyl signifikantní.

Absolutní počet neutrofilů v bronchoalveolární tekutině u kuřáků, kteří se po 12 hodin zdrželi kouření, byl sice vyšší než u nekuřáků, avšak rozdíl nebyl signifikantní, zatímco absolutní počet neutrofilů v bronchoalveolární tekutině u „akutních kuřáků“ byl signifikantně vyšší než u nekuřáků [237]. Pacienti – kuřáci v našem souboru se 12 hodin před bronchoskopií zdrželi kouření, to může být jedním z důvodů, proč jsme u kuřáků s CHOPN nezaznamenali zvýšení počtu neutrofilů v bronchoalveolární tekutině.

Pacienti s CHOPN s chronickým produktivním kašlem měli v našem souboru v průměru vyšší počet neutrofilů v bronchoalveolární tekutině než pacienti bez produktivního kašle, rozdíl však nebyl signifikantní. Pacienti ve 3. stádiu CHOPN měli v průměru vyšší relativní počet neutrofilů a eozinofilů v bronchoalveolární tekutině než pacienti ve 2. stádiu CHOPN, rozdíl však nebyl signifikantní a kromě toho byl zatížen statistickou chybou při malém počtu pacientů ve 3. stádiu CHOPN. Pacienti s CHOPN, u nichž došlo ke zlepšení FEV_1 o $> 12\%$ za rok, měli sice v průměru vyšší počet eozinofilů v bronchoalveolární tekutině než pacienti se zhoršením plicních funkcí nebo se změnou FEV_1 o $\leq 12\%$ za rok, což by mohlo souviset s výraznější odpovědí na léčbu, rozdíl však nebyl signifikantní a kromě toho byl zatížen statistickou chybou při malém počtu pacientů se zlepšením FEV_1 . Pacienti s CHOPN s rychlejším zhoršováním plicních funkcí a poklesem FEV_1 o $> 12\%$ za rok měli vyšší relativní počet makrofágů a nižší relativní počet neutrofilů, rozdíl proti ostatním podskupinám však nebyly statisticky významné. Mezi pacienty s čtenějšími exacerbacemi CHOPN a pacienty bez čtenějších exacerbací nebyly rozdíly v diferenciálním počtu buněk v bronchoalveolární tekutině.

Vyšetření exprese genů metaloproteináz MMP-2, MMP-9 a jejich inhibitoru TIMP-1 na úrovni mRNA v bronchoalveolárních buňkách bylo v rámci naší studie provedeno u 49 vzorků ze sledovaného souboru, které měly dostatečnou buněčnost umožňující vyšetření. Jednalo se o 21 vzorků pacientů s CHOPN, 12 vzorků pacientů s astmatem a 16 vzorků kontrolních subjektů.

Relativní exprese MMP-9 a MMP-2 byla u pacientů s CHOPN i astmatem signifikantně vyšší než u kontrolních subjektů. Přitom exprese MMP-9 se mezi skupinou s CHOPN a astmatem nelišila, zatímco exprese MMP-2 byla u CHOPN nižší než u astmatu, avšak rozdíl nedosahoval hladiny statistické významnosti. Podobně byla relativní exprese TIMP-1 u pacientů s CHOPN i astmatem signifikantně vyšší než u kontrolních subjektů, zároveň byla exprese TIMP-1 vyšší u CHOPN než u astmatu, rozdíl však nebyl signifikantní. Podobné výsledky v menším souboru jsme již dříve publikovali [238].

Naše výsledky jsou v souladu s literárními údaji, podle nichž je exprese MMP-2 a MMP-9 zvýšena u pacientů s CHOPN [174, 201, 203, 206] a astmatem [206, 214, 215]. Hodnoty aktivity TIMP jsou v různých studiích odlišné. V indukovaném sputu pacientů s CHOPN byla exprese TIMP-1 signifikantně vyšší než u lehkého astmatu, zatímco u těžkých astmatiků se hodnoty exprese TIMP-1 pohybovaly v širokém rozmezí a rozdíly nebyly signifikantní [208]. Naopak k opačnému závěru došla studie, v níž byly hodnoty TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN signifikantně nižší než u zdravých kuřáků a ještě výrazněji nižší ve srovnání se zdravými nekuřáky [209].

Pacienti s CHOPN, kteří po zařazení do naší studie prodělali 2 nebo více exacerbací za rok, měli významně nižší relativní expresi MMP-2, MMP-9 a také TIMP-1 než pacienti s CHOPN, kteří prodělali méně než 2 exacerbace za rok. Ve všech případech byly rozdíly statisticky významné, nejvýraznější rozdíl byl u MMP-9.

Pacienti s CHOPN a s rychlým poklesem plicních funkcí, u nichž došlo k poklesu FEV₁ o > 12% za rok, měli významně nižší relativní expresi MMP-9 a nesignifikantně nižší relativní expresi MMP-2 než pacienti s CHOPN se změnou rovnou nebo menší než 12% za rok. Naopak pacienti se zlepšením FEV₁ o > 12% za rok měli relativní expresi MMP-9 vyšší než pacienti s malou změnou plicních funkcí a výrazně vyšší ve srovnání s pacienty se zhoršením plicních funkcí. Expresie MMP-2 se nelišila mezi skupinou se zlepšením plicních funkcí a skupinou ze změnou FEV₁ rovnou nebo menší než 12%.

Nižší relativní exprese MMP-9 a MMP-2 v našem souboru predikovala vyšší četnost exacerbací a rychlejší deklinaci plicních funkcí v průběhu času. Naopak vyšší relativní exprese MMP-9 a MMP-2 predikovala nízkou četnost exacerbací a pomalejší pokles nebo dokonce zlepšení plicních funkcí v průběhu času. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami fenotypů CHOPN v našem souboru přitom byly výraznější u MMP-9 než u MMP-2.

Zjištěné výsledky implikují závěr, že nižší relativní exprese MMP-9 a MMP-2 může být predikcí horšího průběhu CHOPN s vyšší četností exacerbací a rychlejší deklinací plicních funkcí v průběhu času. Vysvětlení takového závěru není jednoznačné. Z dřívějších zkušeností popsanych v literatuře je známo, že v průběhu exacerbace dochází ke zvýšení koncentrace MMP-9 a poklesu TIMP-1 ve sputu [212, 239]. Je však jen málo prací, které by sledovaly matrix-metaloproteinázy v dýchacích cestách ve stabilní fázi CHOPN a jejich vliv na četnost exacerbací a vývoj plicních funkcí a celkově zhodnotily jejich schopnost predikovat průběh onemocnění.

Donaldson v r. 2005 poprvé sledoval vliv zánětu dýchacích cest na četnost exacerbací a na rychlost poklesu plicních funkcí u CHOPN. Zjistil, že rychlejší pokles FEV₁ v průběhu času je spojen s vyšší koncentrací IL-6 ve sputu a vyšším počtem neutrofilů a eozinofilů ve sputu, zatímco vyšší počet makrofágů a lymfocytů neovlivňuje deklinaci FEV₁ [240]. Omachi zjistil asociaci mezi vyšší hodnotou MMP-9 v plazmě a vyšší četností exacerbací a rychlejším zhoršením plicních funkcí u pacientů s defektem α_1 -antitrypsinu [241]. Podobně Higashimoto prokázal u dvanácti pacientů s CHOPN s rychlým poklesem FEV₁ zvýšené hodnoty C-reaktivního proteinu (CRP) a MMP-9 v séru, zatímco sérové hodnoty TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-8, neutrofilní elastázy a fibrinogenu s rychlostí poklesu FEV₁ nijak nekorelovaly [242].

V řadě prací byla popsána souvislost polymorfismu genů matrix-metaloproteináz a rychlostí zhoršování plicních funkcí. Van Diemen zjistil asociaci jednonukleotidového polymorfismu genů pro TIMP-1 a MMP-2 s rychlejším poklesem plicních funkcí u zdravé populace i u CHOPN. Podobná asociace nebyla zjištěna pro polymorfismus genů pro MMP-1, MMP-9 a MMP-12 [243]. Přitom byla zjištěna asociace jednonukleotidového polymorfismu genu MMP-12 a zlepšení FEV₁ u dětí s astmatem i u dospělých kuřáků. Tato alela genu pro MMP-12 by mohla snižovat riziko vzniku CHOPN u dospělých kuřáků [244]. V jiné práci byla zjištěna asociace jednonukleotidového polymorfismu genu pro ADAM-33 (*A disintegrin and metalloproteinase 33*) a rychlejšího zhoršování plicních funkcí u pacientů s CHOPN

a astmatem, ale také u zdravé populace. Jednonukleotidový polymorfismus genu pro ADAM-33 tak může být rizikovým faktorem pro vznik CHOPN [245].

Podskupina pacientů s CHOPN s rychlejším poklesem plicních funkcí, tedy horším průběhem nemoci, měla nejen signifikantně nižší expresi MMP-9 a nesignifikantně nižší expresi MMP-2 než podskupina se změnou $FEV_1 \leq 12\%$, ale také nižší průměrný poměr neutrofilů v bronchoalveolární tekutině ve srovnání s podskupinou se změnou $FEV_1 \leq 12\%$, i když rozdíl nebyl signifikantní. Naopak průměrný poměr makrofágů v bronchoalveolární tekutině byl v podskupině s rychlejším poklesem plicních funkcí vyšší než v podskupině se změnou $FEV_1 \leq 12\%$, rozdíl rovněž nebyl signifikantní. V podskupinách s četnějšími a méně častými exacerbacemi se buněčné parametry zánětu v bronchoalveolární tekutině podstatně nelišily.

Nižší exprese MMP-9 a MMP-2 v bronchoalveolárních buňkách u pacientů s CHOPN s častějšími exacerbacemi a u pacientů s rychlejším poklesem plicních funkcí, kteří navíc mají nižší průměrný poměr neutrofilů v bronchoalveolární tekutině, není jednoznačně vysvětlitelná. Snad může být zapříčiněna vlivem regulačních mechanismů, které u pacientů s nejtěžším průběhem CHOPN vedou k potlačení některých zánětlivých mediátorů.

Stanovení koncentrací matrix-metaloproteináz MMP-2, MMP-9 a jejich inhibitorů TIMP-1, TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině bylo provedeno u 87 vzorků ze sledovaného souboru. Jednalo se o 34 vzorků pacientů s CHOPN, 26 vzorků pacientů s astmatem a 27 vzorků kontrolních subjektů. Koncentrace MMP-8 byla vyšetřena u 51 vzorků, z toho u 16 vzorků pacientů s CHOPN, 17 vzorků pacientů s astmatem a 18 vzorků kontrolních subjektů.

Koncentrace všech vyšetřovaných matrix-metaloproteináz byla u pacientů s CHOPN signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny. Nejvýraznější rozdíly byly u MMP-9, jejíž koncentrace byla nejvyšší ve skupině s CHOPN, významně nižší ve skupině s astmatem a nejnižší v kontrolní skupině, rozdíl mezi astmatem a kontrolními subjekty však již nedosahoval statistické významnosti. Koncentrace MMP-2 a MMP-8 byla rovněž nejvyšší ve skupině s CHOPN, u astmatiků byla nižší a v kontrolní skupině nejnižší, statisticky významný však byl rozdíl v koncentraci těchto matrix-metaloproteináz pouze mezi skupinou s CHOPN a kontrolní skupinou.

Koncentrace TIMP-1 byla nejvyšší ve skupině s astmatem. Skupina s CHOPN a kontrolní skupina měly koncentraci TIMP-1 významně nižší a mezi sebou navzájem se nelišily. Naproti tomu koncentrace TIMP-2 byla vyšší u CHOPN i astmatu, mezi těmito skupinami se významně nelišila, avšak u obou těchto skupin byla signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny.

Poměr koncentrací MMP-9/TIMP-1 vyjadřuje v bronchoalveolární tekutině převahu metaloproteináz nad jejich inhibitory. Poměr koncentrací MMP-9/TIMP-1 v našem souboru byl nejvyšší ve skupině s CHOPN, významně nižší u kontrolních subjektů a nejnižší ve skupině s astmatem. Rozdíly mezi všemi skupinami dosahovaly vysokého stupně statistické významnosti. Tyto výsledky svědčí o tom, že zatímco u CHOPN jsou metaloproteinázy v převaze nad svými inhibitory, naopak u bronchiálního astmatu převažuje TIMP-1 nad MMP-1, a to ještě výrazněji než u zdravých jedinců.

Naše výsledky jsou v souladu se zkušenostmi publikovanými v literatuře [206, 219, 225] a svědčí pro to, že nerovnováha systému matrix-metaloproteináz a jejich inhibitorů hraje roli v patogenezi CHOPN i bronchiálního astmatu. Vyšší

koncentrace TIMP-1 a s tím spojené nízké hodnoty poměru MMP-9/TIMP-1 u astmatiků vedou k proliferaci myofibroblastů a ke ztluštění bazální membrány [246, 247] a jsou spojeny s horší odpovědí na terapii inhalačními kortikosteroidy [225], na druhé straně však terapie inhalačními kortikosteroidy sama snižuje poměr MMP-9/TIMP-1 u astmatiků a vede k redukci ztluštění bazální membrány, takže se zdá, že pokles poměru MMP-9/TIMP-1 zlepšuje remodelaci dýchacích cest u astmatiků [224].

Mezi jednotlivými stádii CHOPN se koncentrace matrix-metaloproteináz a jejich inhibitorů nelišily s výjimkou TIMP-1, jehož koncentrace v 1. stádiu CHOPN byla významně nižší než ve 2. stádiu CHOPN.

Pacienti s CHOPN, kteří prodělali dvě a více exacerbací za rok, měli nižší koncentrace všech vyšetřovaných matrix-metaloproteináz i jejich inhibitorů v bronchoalveolární tekutině ve srovnání s pacienty s 0–1 exacerbací za rok, avšak pouze v případě MMP-2 s TIMP-1 byly rozdíly mezi těmito podskupinami statisticky významné.

Pacienti s CHOPN, u nichž došlo ke zhoršení plicních funkcí se snížením FEV_1 o $> 12\%$ za rok, měli nižší koncentraci MMP-2 a MMP-8 v bronchoalveolární tekutině ve srovnání s pacienty, u nichž byla změna FEV_1 o $\leq 12\%$ za rok, avšak pouze u MMP-2 byl tento rozdíl statisticky významný. Jiné významné rozdíly mezi podskupinami rozdělenými podle změny FEV_1 v průběhu času v našem souboru nebyly zjištěny.

Nižší koncentrace MMP-2 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN s častějšími exacerbacemi a rychlejším poklesem plicních funkcí, stejně jako nižší koncentrace TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN s častějšími exacerbacemi nejsou jednoznačně vysvětlitelné, podobně jako nižší exprese MMP-9 a MMP-2 v bronchoalveolárních buňkách, která v našem souboru rovněž byla spojena s horším průběhem CHOPN. Možným vysvětlením mohou být regulační mechanismy složitého procesu patogeneze CHOPN, do něhož jsou matrix-metaloproteinázy a jejich inhibitory zapojeny. V takovém případě je otázkou, zda nemohou některé z regulačních mechanismů u pacientů s nejtěžším průběhem CHOPN vést k potlačení některých zánětlivých mediátorů.

6. ZÁVĚR

Byla vypracována metodika vyšetření zánětu dýchacích cest za použití bronchoskopie a bronchoalveolární laváže. V rámci tohoto projektu byla provedena studie, do níž bylo zařazeno 35 pacientů s CHOPN, 26 pacientů s bronchiálním astmatem a 33 kontrolních jedinců.

Zhodnocení našeho souboru ukazuje, že u pacientů s CHOPN je produktivní kašel častěji spojen s rychlejší deklinací plicních funkcí v průběhu času, dále že u fenotypu častějších exacerbací rovněž častěji dochází k rychlejšímu poklesu plicních funkcí v průběhu času. Přitom byl v našem souboru produktivní kašel častěji spojen s fenotypem častějších exacerbací.

Zjistili jsme vyšší diferenciální počet lymfocytů a výrazně vyšší počet eozinofilů v bronchoalveolární tekutině u pacientů s astmatem ve srovnání s pacienty s CHOPN. Naopak pacienti s CHOPN měli v bronchoalveolární tekutině výrazně vyšší diferenciální počet neutrofilů. Tyto výsledky byly statisticky významné a odpovídaly známým charakteristikám obou nemocí. U kuřáků s CHOPN jsme zjistili významně vyšší počet makrofágů a nižší relativní diferenciální počet neutrofilů.

Zjistili jsme zvýšenou expresi MMP-9, MMP-2 a TIMP-1 v bronchoalveolárních buňkách u CHOPN i astmatu ve srovnání s kontrolními jedinci. Zjistili jsme, že koncentrace MMP-9, MMP-2, MMP-8 a TIMP-2 byla v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN zvýšená signifikantně a u pacientů s astmatem nesignifikantně ve srovnání s kontrolními subjekty. U pacientů s astmatem byla významně zvýšená koncentrace TIMP-1 v bronchoalveolární tekutině ve srovnání s pacienty s CHOPN i s kontrolními subjekty. Poměr MMP-9/TIMP-1 byl u pacientů s astmatem významně nižší než u kontrolních jedinců, naopak u pacientů s CHOPN byl významně vyšší než u kontrolních jedinců.

Zjistili jsme, že pacienti s častějšími exacerbacemi CHOPN měli nižší expresi mRNA MMP-9, MMP-2 a TIMP-1 a nižší koncentraci MMP-2 a TIMP-1 než pacienti s méně častými exacerbacemi. Pacienti s CHOPN s rychlejším poklesem FEV1 měli nižší expresi mRNA MMP-9 a TIMP-1 a nižší koncentraci MMP-2 než pacienti se změnou FEV1 $\leq 12\%$ za rok. Zjištěné výsledky mohou znamenat, že nižší relativní exprese některých matrix-metaloproteináz může být predikcí horšího průběhu CHOPN s vyšší četností exacerbací a rychlejší deklinací plicních funkcí v průběhu času. Vysvětlení takového závěru není jednoznačné. Roli může hrát vliv regulačních mechanismů v procesu patogeneze CHOPN, do něhož jsou matrix-metaloproteinázy a jejich inhibitory zapojeny.

Zjištěné výsledky ukazují, že matrix-metaloproteinázy, jejich inhibitory a jejich vzájemná rovnováha hrají roli v patogenezi CHOPN a bronchiálního astmatu. Naše výsledky dále naznačují, že některé charakteristiky zánětu u některých fenotypů CHOPN se mohou odlišovat a MMP a jejich inhibitory mohou tyto rozdíly odrážet. Na provedenou studii bude navazovat další výzkum, který využije vypracovanou metodiku na větším souboru pacientů a umožní přesnější vyšetření charakteristik bronchiálního zánětu u různých fenotypů CHOPN.

7. ABSTRAKT

Invazivní endoskopické techniky v diagnostice zánětů dýchacích cest

Úvod: Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) a astma bronchiale jsou chronická zánětlivá onemocnění, postihující především dýchací cesty. Záněty u těchto nemocí mají různé charakteristiky a jsou dominantně podmíněny různými buňkami a mediátory. Matrix-metaloproteinázy (MMP) jsou velkou skupinou proteáz, které se uplatňují v patogenezi zánětu dýchacích cest u CHOPN a bronchiálního astmatu. Bronchoskopie a bronchoalveolární laváž (BAL) jsou invazivními technikami, které umožňují přímé vyšetření zánětu v dýchacích cestách.

Cíl: Cílem této práce bylo vyhodnotit u CHOPN a bronchiálního astmatu pomocí imunologického vyšetření bronchoalveolární tekutiny buněčné parametry zánětu periferních dýchacích cest a alveolů, expresi mRNA některých matrix-metaloproteináz a jejich inhibitorů v bronchoalveolárních buňkách, koncentraci některých matrix-metaloproteináz a jejich inhibitorů v bronchoalveolární tekutině a zjištěné parametry zánětu pak porovnat u CHOPN a bronchiálního astmatu a zhodnotit v závislosti na tíži a některých fenotypech CHOPN.

Metodika: Z 94 subjektů zařazených do studie bylo 35 pacientů s CHOPN, 26 pacientů s bronchiálním astmatem a 33 kontrolních jedinců. Žádný z pacientů neměl před zařazením do studie inhalační léčbu ani jinou terapii CHOPN nebo astmatu. Před zahájením terapie byla každému pacientovi i všem kontrolním jedincům provedena flexibilní bronchoskopie v lokální anestezii a bronchoalveolární laváž (BAL). Bylo provedeno cytologické vyšetření bronchoalveolární tekutiny, stanovení relativní exprese mRNA MMP-2, MMP-9 a TIMP-1 v bronchoalveolárních buňkách a zjištění koncentrace MMP-2, MMP-9, MMP-8, TIMP-1 a TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině. V průběhu následujících dvou let byly u všech pacientů s CHOPN sledovány změny plicních funkcí a četnost exacerbací. Pacienti s CHOPN pak byli rozděleni do podskupin se zlepšením FEV_1 o $> 12\%$ za rok, se změnou FEV_1 o $\leq 12\%$ za rok a se zhoršením FEV_1 o $> 12\%$ za rok, dále do podskupiny s častými exacerbacemi (≥ 2 za rok) a bez častých exacerbací (0–1 za rok) a dále do podskupiny s chronickou bronchitidou a bez ní.

Výsledky: Ve skupině s astmatem byl v bronchoalveolární tekutině (BALTe) vyšší diferenciální počet eozinofilů ($10,9 \pm 13,3$ vs. $1,2 \pm 2,9$, $p = 0,001$) a lymfocytů ($8,9 \pm 5,6$ vs. $4,5 \pm 5,0$, $p = 0,005$) proti skupině s CHOPN. Ve skupině s CHOPN byl vyšší diferenciální počet neutrofilů ($13,1 \pm 18,4$ vs. $4,3 \pm 5,0$, $p = 0,02$) ve srovnání s astmatem. Podskupina kuřáků s CHOPN měla v BALTe vyšší relativní diferenciální počet makrofágů ($89,9 \pm 8,2$ vs. $77,0 \pm 20,5$, $p = 0,03$) a nižší relativní diferenciální počet neutrofilů ($3,6 \pm 4,8$ vs. $17,6 \pm 20,6$, $p = 0,013$) ve srovnání s podskupinou nekuřáků a exkuřáků s CHOPN.

Expresí mRNA MMP-9 u pacientů s CHOPN byla zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou ($0,106 \pm 0,140$ vs. $0,022 \pm 0,018$, $p = 0,01$). Podobně byla exprese mRNA MMP-9 u pacientů s bronchiálním astmatem zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou ($0,111 \pm 0,110$ vs. $0,022 \pm 0,018$, $p = 0,02$). Přitom se signifikantně nelišila

expresie mRNA MMP-9 mezi skupinou pacientů s CHOPN a skupinou pacientů s bronchiálním astmatem. Expresie mRNA MMP-2 u pacientů s CHOPN byla zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou ($0,066 \pm 0,064$ vs. $0,026 \pm 0,022$, $p = 0,01$). Podobně byla expresie mRNA MMP-2 u pacientů s bronchiálním astmatem zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou ($0,113 \pm 0,128$ vs. $0,026 \pm 0,022$, $p = 0,04$). Přitom se signifikantně nelišila expresie mRNA MMP-2 mezi skupinou pacientů s CHOPN a skupinou pacientů s bronchiálním astmatem. Expresie mRNA TIMP-1 u pacientů s CHOPN byla zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou ($3,635 \pm 4,385$ vs. $0,966 \pm 0,656$, $p = 0,01$). Podobně byla expresie mRNA MMP-2 u pacientů s bronchiálním astmatem zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou ($2,327 \pm 1,752$ vs. $0,966 \pm 0,656$, $p = 0,03$). Expresie mRNA TIMP-1 ve skupině s CHOPN sice byla vyšší než ve skupině s astmatem, rozdíl však nebyl signifikantní. Pacienti s CHOPN s ≥ 2 exacerbacemi za rok měli nižší expresi mRNA MMP-9 ($0,01 \pm 0,01$ vs. $0,13 \pm 0,15$, $p = 0,004$), MMP-2 ($0,02 \pm 0,03$ vs. $0,08 \pm 0,06$, $p = 0,05$) a TIMP-1 ($1,46 \pm 1,03$ vs. $4,15 \pm 4,70$, $p = 0,05$) než pacienti s < 2 exacerbacemi CHOPN za rok. Pacienti s CHOPN se snížením FEV1 o $> 12\%$ za rok, měli nižší expresi mRNA MMP-9 ($0,02 \pm 0,02$ vs. $0,12 \pm 0,10$, $p = 0,02$) a TIMP-1 ($1,18 \pm 0,83$ vs. $4,09 \pm 5,33$, $p = 0,04$) než pacienti se změnou FEV1 $\leq 12\%$ za rok.

Koncentrace MMP-9 v BALTe byla zvýšena u pacientů s CHOPN ve srovnání s kontrolní skupinou (14808 ± 13529 vs. 2580 ± 2956 , $p = 0,00001$) i s astmatem (14808 ± 13529 vs. 5939 ± 10676 , $p = 0,007$). Průměr koncentrace MMP-9 ve skupině s astmatem byl sice vyšší než u kontrolní skupiny, rozdíl však nebyl statisticky významný. Koncentrace MMP-2 v BALTe byla zvýšena u pacientů s CHOPN ve srovnání s kontrolní skupinou (220 ± 206 vs. 128 ± 60 , $p = 0,02$). Koncentrace MMP-2 mezi skupinou s CHOPN a astmatem se nelišila. Koncentrace MMP-8 v BALTe byla zvýšena u pacientů s CHOPN ve srovnání s kontrolní skupinou (17559 ± 22389 vs. 1058 ± 1857 , $p = 0,01$). Koncentrace TIMP-1 v BALTe byla zvýšena u pacientů s astmatem ve srovnání s pacienty s CHOPN (8467 ± 4034 vs. 4213 ± 3452 , $p = 0,002$) a také ve srovnání s kontrolními subjekty (8467 ± 4034 vs. 4025 ± 4021 , $p = 0,002$). Přitom mezi skupinou s CHOPN a kontrolními subjekty se koncentrace TIMP-1 nelišily. Koncentrace TIMP-2 v BALTe byla zvýšena u pacientů s CHOPN ve srovnání s kontrolními subjekty (1626 ± 1394 vs. 876 ± 347 , $p = 0,005$). Ve skupině s astmatem byla koncentrace TIMP-2 rovněž zvýšena ve srovnání s kontrolními subjekty (1469 ± 805 vs. 876 ± 347 , $p = 0,02$). Přitom mezi skupinou s CHOPN a astmatem se koncentrace TIMP-2 významně nelišily. Poměr koncentrace MMP-9/TIMP-1 v BALTe byl zvýšen u pacientů s CHOPN ve srovnání s astmatem ($5,407 \pm 6,944$ vs. $0,396 \pm 0,661$, $p = 0,0003$) i kontrolní skupinou ($5,407 \pm 6,944$ vs. $1,374 \pm 1,623$, $p = 0,003$). Přitom rozdíl mezi skupinou s astmatem a kontrolními subjekty byl rovněž statisticky významný ($p = 0,01$). Koncentrace TIMP-1 v BALTe byla signifikantně vyšší u pacientů ve 2. stádiu CHOPN ve srovnání s 1. stádiem (4518 ± 3723 vs. 2084 ± 701 , $p = 0,01$). Pacienti s CHOPN s < 2 exacerbacemi za rok měli v BALTe vyšší koncentraci MMP-2 (245 ± 219 vs. 103 ± 12 , $p = 0,002$) a TIMP-1 (4573 ± 3655 vs. 2594 ± 1491 , $p = 0,05$) než pacienti s ≥ 2 exacerbacemi CHOPN za rok. Pacienti s CHOPN se snížením FEV1 o $> 12\%$ za rok, měli nižší koncentraci MMP-2 v BALTe (119 ± 65 vs. 320 ± 244 , $p = 0,03$) než pacienti se změnou FEV1 o $\leq 12\%$ za rok.

Závěry: Zjistili jsme zvýšenou expresi mRNA MMP-9, MMP-2 a TIMP-1 v bronchoalveolárních buňkách u pacientů s CHOPN a bronchiálním astmatem ve

srovnání se kontrolními jedinci, rozdíly mezi expresí u CHOPN a astmatu nebyly signifikantní.

Zjistili jsme zvýšenou koncentraci MMP-9, MMP-2, MMP-8 a TIMP-2 v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN ve srovnání se zdravými subjekty. Koncentrace MMP-9 byla ve skupině s CHOPN zvýšena také proti skupině s astmatem. Koncentrace TIMP-1 byla ve skupině s astmatem zvýšena proti skupině s CHOPN a také ve 2. stádiu CHOPN ve srovnání s 1. stádiem CHOPN. Poměr koncentrace MMP-9/TIMP-1 byl ve skupině s CHOPN významně vyšší než v kontrolní skupině a ve skupině s astmatem naopak významně nižší než v kontrolní skupině.

Pacienti s CHOPN s ≥ 2 exacerbacemi za rok měli nižší expresi mRNA MMP-9, MMP-2 a TIMP-1 a nižší koncentraci MMP-2 a TIMP-1 než pacienti s < 2 exacerbacemi CHOPN za rok. Pacienti s CHOPN se snížením FEV1 o $> 12\%$ za rok měli nižší expresi mRNA MMP-9 a TIMP-1 a nižší koncentraci MMP-2 než pacienti se změnou FEV1 $\leq 12\%$ za rok.

Zjištěné výsledky ukazují, že matrix-metaloproteinázy a jejich inhibitory hrají roli v patogenezi CHOPN a bronchiálního astmatu. Naše výsledky dále naznačují, že některé charakteristiky zánětu u některých fenotypů CHOPN se mohou odlišovat a MMP a jejich inhibitory mohou tyto rozdíly odrážet. Naše výsledky dále vybízejí k tomu, aby v budoucnu byl proveden rozsáhlejší výzkum, který využije vypracovanou metodiku na větším souboru pacientů a umožní přesnější vyšetření charakteristik bronchiálního zánětu u různých fenotypů CHOPN.

Klíčová slova: Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN), bronchiální astma, bronchoalveolární laváž (BAL), bronchoalveolární tekutina, matrix-metaloproteinázy

8. SUMMARY

Invasive endoscopic techniques for diagnosing airway inflammation

Introduction: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and bronchial asthma are chronic inflammatory diseases mainly affecting the airway. In these conditions, inflammation has various characteristics and is predominantly conditioned by various cells and mediators. Matrix metalloproteinases (MMP) are a large group of proteases involved in the pathogenesis of airway inflammation in COPD and bronchial asthma. Bronchoscopy and bronchoalveolar lavage (BAL) are invasive techniques used for direct assessment of inflammation in the airways.

Objective: The study aimed at assessing cellular parameters of peripheral airway and alveolar inflammation, expression of mRNA for certain MMPs and their inhibitors in bronchoalveolar cells, and concentration of certain MMPs and their inhibitors in the bronchoalveolar fluid in COPD and bronchial asthma using immunological assays, at comparing the inflammatory parameters in COPD and bronchial asthma, and assessing them depending on the severity and certain phenotypes of COPD.

Methods: A total of 94 subjects included in the study comprised 35 COPD patients, 26 patients with bronchial asthma and 33 controls. Prior to their inclusion in the study, none of the patients received inhalation or another therapy for COPD or asthma. Before the therapy was initiated, all patients and controls underwent flexible bronchoscopy under local anaesthesia and BAL. The analyses included cytological examination of the bronchoalveolar fluid, determination of relative expression of mRNA for MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 in bronchoalveolar cells and measurement of MMP-2, MMP-9, MMP-8, TIMP-1 and TIMP-2 concentration in the bronchoalveolar fluid. In the subsequent two years, all COPD patients were followed for changes in pulmonary function and frequency of exacerbations. Then the COPD patients were divided into the following subgroups: FEV₁ improved by > 12% per year, FEV₁ changed by ≤ 12% per year, and FEV₁ deteriorated by > 12% per year; with frequent exacerbations (≥ 2 per year) and without frequent exacerbations (0–1 per year); and with chronic bronchitis and without chronic bronchitis.

Results: The asthma patients had higher eosinophil (10.9 ± 13.3 vs. 1.2 ± 2.9 , $p = 0.001$) and white blood cell (8.9 ± 5.6 vs. 4.5 ± 5.0 , $p = 0.005$) differential count in the bronchoalveolar fluid (BALF) as compared with those with COPD. The COPD patients had higher neutrophil differential count than the asthma group (13.1 ± 18.4 vs. 4.3 ± 5.0 , $p = 0.02$). A subgroup of smokers with COPD had higher macrophage (89.9 ± 8.2 vs. 77.0 ± 20.5 , $p = 0.03$) and lower neutrophil (3.6 ± 4.8 vs. 17.6 ± 20.6 , $p = 0.013$) relative differential count as compared with COPD non-smokers and ex-smokers.

Expression of mRNA for MMP-9 was increased in the COPD patients as compared with the controls (0.106 ± 0.140 vs. 0.022 ± 0.018 , $p = 0.01$). Similarly, expression of mRNA for MMP-9 was increased in the patients with bronchial asthma as compared with the controls (0.111 ± 0.110 vs. 0.022 ± 0.018 , $p = 0.02$). There was no significant difference in MMP-9 mRNA expression between the patients with COPD and bronchial asthma. Expression of mRNA for MMP-2 was increased in the

COPD patients as compared with the controls (0.066 ± 0.064 vs. 0.026 ± 0.022 , $p = 0.01$). Similarly, expression of mRNA for MMP-2 was increased in the patients with bronchial asthma as compared with the controls (0.113 ± 0.128 vs. 0.026 ± 0.022 , $p = 0.04$). There was no significant difference in MMP-2 mRNA expression between the patients with COPD and bronchial asthma. Expression of mRNA for TIMP-1 was increased in the COPD patients as compared with the controls (3.635 ± 4.385 vs. 0.966 ± 0.656 , $p = 0.01$). Similarly, expression of mRNA for TIMP-1 was increased in the patients with bronchial asthma as compared with the controls (2.327 ± 1.752 vs. 0.966 ± 0.656 , $p = 0.03$). Although expression of mRNA for TIMP-1 was higher in the COPD group than in the asthma group, the difference was not statistically significant. The COPD patients with ≥ 2 exacerbations per year had lower expression of mRNA for MMP-9 (0.01 ± 0.01 vs. 0.13 ± 0.15 , $p = 0.004$), MMP-2 (0.02 ± 0.03 vs. 0.08 ± 0.06 , $p = 0.05$) and TIMP-1 (1.46 ± 1.03 vs. 4.15 ± 4.70 , $p = 0.05$) than patients with < 2 exacerbations per year. The COPD patients with FEV₁ decreased by $> 12\%$ per year had lower expression of mRNA for MMP-9 (0.02 ± 0.02 vs. 0.12 ± 0.10 , $p = 0.02$) and TIMP-1 (1.18 ± 0.83 vs. 4.09 ± 5.33 , $p = 0.04$) than those with FEV₁ changed by $\leq 12\%$ per year.

Concentration of MMP-9 in the BALF was increased in the COPD patients as compared with both the controls ($14,808 \pm 13,529$ vs. $2,580 \pm 2,956$, $p = 0.00001$) and asthma patients ($14,808 \pm 13,529$ vs. $5,939 \pm 10,676$, $p = 0.007$). Although the mean MMP-9 concentration was higher in the asthma group than in the controls, the difference was not statistically significant. Concentration of MMP-2 in the BALF was increased in the COPD patients as compared with the controls (220 ± 206 vs. 128 ± 60 , $p = 0.02$). There was no difference in MMP-2 concentration between the COPD and asthma groups. Concentration of MMP-8 in the BALF was increased in the COPD patients as compared with the controls ($17,559 \pm 22,389$ vs. $1,058 \pm 1,857$, $p = 0.01$). Concentration of TIMP-1 in the BALF was increased in the asthma patients as compared with the COPD patients ($8,467 \pm 4,034$ vs. $4,213 \pm 3,452$, $p = 0.002$) and the controls ($8,467 \pm 4,034$ vs. $4,025 \pm 4,021$, $p = 0.002$). There was no difference in TIMP-1 concentration between the COPD and control groups. Concentration of TIMP-2 in the BALF was increased in the COPD patients as compared with the controls ($1,626 \pm 1,394$ vs. 876 ± 347 , $p = 0.005$). In the group with asthma, TIMP-2 concentration was also increased as compared with the controls ($1,469 \pm 805$ vs. 876 ± 347 , $p = 0.02$). There was no significant difference in TIMP-2 concentration between the COPD and asthma groups. The MMP-9/TIMP-1 concentration in the BALF ratio was increased in the COPD patients as compared with both the asthma patients (5.407 ± 6.944 vs. 0.396 ± 0.661 , $p = 0.0003$) and controls (5.407 ± 6.944 vs. 1.374 ± 1.623 , $p = 0.003$). The difference between the asthma patients and controls was also statistically significant ($p = 0.01$).

Concentration of TIMP-1 in the BALF was significantly higher in patients with stage 2 COPD than in those with stage 1 disease ($4,518 \pm 3,723$ vs. $2,084 \pm 701$, $p = 0.01$). The COPD patients with < 2 exacerbations per year had higher BALF concentration of MMP-2 (245 ± 219 vs. 103 ± 12 , $p = 0.002$) and TIMP-1 ($4,573 \pm 3,655$ vs. $2,594 \pm 1,491$, $p = 0.05$) than patients with ≥ 2 exacerbations per year. The COPD patients with FEV₁ decreased by $> 12\%$ per year had lower BALF concentration of MMP-2 than those with FEV₁ changed by $\leq 12\%$ per year (119 ± 65 vs. 320 ± 244 , $p = 0.03$).

Conclusions: The patients with COPD and bronchial asthma were found to have increased expression of mRNA for MMP-9, MMP-2 and TIMP-1 in bronchoalveolar

cells as compared with the healthy individuals, with the difference in expression between COPD and asthma being non-significant.

The patients with COPD were found to have increased concentration of MMP-9, MMP-2, MMP-8 and TIMP-1 in the bronchoalveolar fluid as compared with the healthy subjects. Concentration of MMP-9 was higher in the COPD group than in the asthma group. Concentration of TIMP-1 was increased in the asthma group as compared with the COPD group and also in stage 2 COPD as compared with stage 1 of the disease. The MMP-9/TIMP-1 concentration ratio was significantly higher in the COPD group than in the controls but significantly lower in the asthma patients than in the controls.

The COPD patients with ≥ 2 exacerbations per year had lower expression of mRNA for MMP-9, MMP-2 and TIMP-1 as well as lower MMP-2 and TIMP-1 concentration than patients with < 2 exacerbations per year. The COPD patients with FEV₁ decreased by $> 12\%$ per year had lower expression of mRNA for MMP-9 and TIMP-1 as well as lower MMP-2 concentration than those with FEV₁ changed by $\leq 12\%$ per year.

The results show that matrix metalloproteinases and their inhibitors play a role in the pathogenesis of COPD and bronchial asthma. Moreover, the results suggest that there might be a difference in certain inflammatory characteristics in some COPD phenotypes, and that MMP and their inhibitors may reflect the difference. A larger study should be carried out in the future, using the above methods to study a larger group of patients to provide more precise assessment of the characteristics of bronchial inflammation in various COPD phenotypes.

Key words: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD), bronchial asthma, bronchoalveolar lavage (BAL), bronchoalveolar lavage fluid, matrix metalloproteinases

9. PŘEHLED ZKRATEK

ADAM	A disintegrin and metalloproteinase domain
ATS	American Thoracic Society (Americká hrudní společnost)
BAL	Bronchoalveolární laváž
BALTe	Bronchoalveolární tekutina
BKT	Bronchokonstrikční test
Ca ²⁺	Dvojmocný ion vápníku
CCL5	Chemokin CCL5, označovaný též jako RANTES
CCL11	Chemokin CCL11, označovaný též jako Eotaxin
CCR1	Receptor pro chemokin MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α)
CCR2	Receptor pro chemokin MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)
CD4+	CD4+ receptor pomáhajících (helper) T-lymfocytů
CD8+	CD8+ receptor cytotoxických T-lymfocytů
CRP	C reaktivní protein
CXCL1	Chemokin CXCL1 (GRO- α , Growth regulated oncogene- α)
CXCR2	Receptor pro chemokin Growth regulated oncogene- β (CXCL2)
CXCR3	Receptor pro chemokin Cytokine responsive gene-10 (CXCL9)
ČIPA	Česká iniciativa pro astma
ČOPN	České občanské sdružení proti chronické obstrukční plicní nemoci
ECLIPSE	Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (název studie)
EGF	Epidermal Growth Factor (epidermální růstový faktor)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (receptor pro epidermální růstový faktor)
ENA-78	Epithelial Cell-Derived Neutrophil-Activating Peptide-78 (CXCL5)
EKG	Elektrokardiografie, elektrokardiogram
ERS	European Respiratory Society (Evropská respirační společnost)
EUR	Euro (měna)
FEV ₁	Objem vzduchu vydechnutý za první sekundu usilovného výdechu
FGF	Fibroblast Growth Factor (růstový faktor fibroblastů)
FVC	Usilovná vitální kapacita plic, vitální kapacita při usilovném výdechu

FEV ₁ /FVC	Poměr FEV ₁ a FVC
g	Gravitační zrychlení (9,8 m.s ⁻²), jednotka odstředivého zrychlení při centrifugaci
GINA	Global Initiative for Asthma (Globální iniciativa pro astma)
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (faktor stimulující granulocyty-makrofágy)
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (Globální iniciativa pro CHOPN)
GRO- α ,	Growth-Regulated Oncogene- α (CXCL1)
CHOPN	Chronická obstrukční plicní nemoc
HR CT	Výpočetní tomografie s vysokým rozlišením (High Resolution Computed Tomography)
IFN- γ	Interferon- γ
IgE	Imunoglobulin E
IGF	Insulin-like Growth Factor, inzulínu podobný růstový faktor
IL-1 až IL-18	Interleukin-1 až interleukin-18
IL-6-174C	Alela při jednonukleotidovém polymorfismu na pozici 174 promotoru genu pro IL-6
IPF	Idiopatická plicní fibróza
kDa	kilodalton
LTB ₄	Leukotrien B ₄
LTC ₄	Leukotrien C ₄
LTD ₄	Leukotrien D ₄
LTE ₄	Leukotrien E ₄
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1 (CCL2)
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
μ g	mikrogram
ml	mililitr
mm	milimetr
mmHg	milimetr rtuťového sloupce, jednotka tlaku
mRNA	Messengerová ribonukleová kyselina
MMP-1 až 25	Matrix-metaloproteináza-1 až 25
MT-MMP	Membránové metaloproteinázy (Membrane-type metalloproteinases)
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (proteinový komplex kontrolující transkripci deoxyribonukleové kyseliny)
NHLBI	National Heart, Lung, and Blood Institute (Národní institut pro srdce, plíce a krev)

p	p-value, hladina významnosti
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor, destičkový růstový faktor
pg/ml	pikogram na mililitr
PGD5	Prostaglandin D5
pH	potential of hydrogen (vodíkový exponent, míra acidity či zásaditosti)
pro-MMP	Inaktivní proenzymy matrix-metaloproteináz
pro-TNF- α	Prekurzor pro Tumor necrosis factor- α
PSMB2	Proteasome, typ beta 2 (referenční gen používaný pro komparativní kvantifikaci)
RANTES	Chemokin CCL5 (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted)
RASI-1	Rheumatoid arthritis synovium inflammed-1, starší označení pro MMP-19
RT-PCR	Reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce
SCF	Stem Cell Factor
SD	Směrodatná odchylka (standard deviation)
Tc1	Subtyp cytotoxických CD8 ⁺ lymfocytů
TGF- α	Transforming Growth Factor- α (transformující růstový faktor- α)
TGF- β	Transforming Growth Factor- β (transformující růstový faktor- β)
Th2	Subtyp pomáhajících CD4 ⁺ lymfocytů (helper)
TIMP-1 až 4	Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 až 4 (tkáňový inhibitor metaloproteináz)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α (tumor nekrotizující faktor- α)
USD	Americký dolar (měna)
VEGF	Vascular-Endothelial Growth Factor (vaskulární růstový endotelový faktor)
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnické organizace)
Zn ²⁺	dvojmocný ion zinku

10. LITERATURA

1. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A: Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease, GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 176: 532–555
2. Global Initiative for Asthma: Global strategy for asthma management and prevention, 2006
3. Ebers GM, Stern L: Papyrus Ebers, das hermetische Buch über die Arzneimittel der alten Ägypter in hieratischer Schrift, Engelmann, 1875
4. Ebers GM, Stern L: Papyrus Ebers. Facsimile with a partial translation. 2 volumes. 1875
5. The papyrus Ebers. The greatest Egyptian Medical document. Translated by B. Ebbell. Copenhagen, Levin & Munksgaard, 1937
6. Ruysch F: *Observationum anatomico-chirurgicarum centuria*. Amsterdam: Apud Henricum & viduam Theodori Boom, 1691: 25-27
7. Baillie M: *The morbid anatomy of some of the most important parts of the human body*. Brattleborough: W. Fessenden, 1808: 52-53
8. Laennec RTH: *De l'Auscultation Médiante ou Traité du Diagnostic des Maladies des Poumons et du Coeur*. Paris: Brosson & Chaudé, 1819
9. Laennec RTH: *A treatise on the diseases of the chest and on mediate auscultation* [translated by Sir John Forbes], Philadelphia: Thomas & Co, 1835: 135-163
10. Gough J: Discussion on the diagnosis of pulmonary emphysema. *Proc R Soc Med*, 1952; 45:576–577
11. Gough J: The Patology of Emphysema. *Postgrad Med J*, 1965, 41: 392-400.
12. Laurell CB, Eriksson S: The electrophoretic alpha 1-globulin pattern of serum in alpha 1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest*, 1963, 15: 132–140
13. Ciba Foundation Guest Symposium: Terminology, definitions and classification of chronic pulmonary emphysema and related conditions. *Thorax*, 1959, 14: 286–299
14. American Thoracic Society: Definitions and classification of chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis*, 1962, 85: 762–768.
15. European Respiratory Monograph: Management of Chronic obstructive pulmonary disease, 1998, 3: 2-4

16. American Thoracic Society: Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis*, 1987, 136: 225–244
17. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB: Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Eur Respir J*, 1995, 8: 1398–1420
18. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/Dth6_2008_20090416.xls
19. http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/Dth6_2030.xls
20. <http://www.who.int/respiratory/copd/burden/en/index.html>
21. Vondra V., Reisová M.: *Časopis lékařů českých*, 1993, 132, 113–118
22. Hilleman DE, Dewan N, Malesker M: Pharmaco-economic evaluation of COPD. *Chest*, 2000, 118: 1278–1285
23. Chapman KR, Mannino DM, Soriano JB: Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 2006, 27: 188–207
24. Miravittles M, Murio C, Guerrero T: DAFNE Study Group: Pharmaco-economic evaluation of acute exacerbations of chronic bronchitis and COPD. *Chest*, 2002, 121: 1449–1455
25. Løkke A, Lange P, Scharling H: Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax*, 2006, 61: 935–939
26. Barsky SH, Roth MD, Kleerup EC: Histopathologic and molecular alterations in bronchial epithelium in habitual smokers of marijuana, cocaine and/or tobacco. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90: 1198–1205
27. Roth MD, Arora A, Barsky SH: Airway inflammation in young marijuana and tobacco smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157: 928–937
28. Hancox RJ, Poulton R, Ely M: Effects of cannabis on lung function: a population-based cohort study. *Eur Respir J*, 2010, 35: 42–47
29. Tashkin DP: Does cannabis use predispose to chronic airflow obstruction? *Eur Respir J*, 2010, 35: 3–5
30. Mannino DM, Doherty DE, Sonia BA: Global Initiative on Obstructive Lung Disease (GOLD) classification of lung disease and mortality: findings from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Respir Med*, 2006, 100: 115–122
31. Soler-Cataluña JJ, Martínez-García MA, Roman-Sánchez P, Salcedo E, Navarro M, Ochando R: Severe acute exacerbations and mortality in patients with COPD. *Thorax*, 2005, 60: 925–931
32. Agusti A, Calverley PMA, Celli B: Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respiratory Research* 2010, 11: 122
33. Ader R: *Psychoneuroimmunology*. Elsevier Academic Press, 2007: 801–802
34. Adams F: *The genuine works of Hippocrates*. Baltimore, Williams and Wilkins, 1939

35. Adams F: The extant works of Aretaeus the Cappadocian. London, Sydenham Society, 1856
36. Galen: On the Usefulness of the Parts of the Body. (Peri Chreias Morion.)(De Usa Partium.) Translated from the Greek with an introduction and commentary by Margaret Tallmadge May. Cornell University Press, Ithaca, N. Y., 1968
37. Maimonides, M.: Treatise on Asthma. Edited by Suessman Munther, M.D. Philadelphia and Montreal: J. B. Lippincott Company, 1963
38. van Helmont JB: Oriatrike or, Physick refined, London, 1662
39. Floyer J: A treatise of the asthma, London, Richard Wilkin, 1698: 207-226
40. Buchanan WW: Bernardino Ramazzini (1633–1714) Physician of Rradesmen, and possibly one of the “Fathers” of sports medicine. *Clinical Rheumatology*, 1991, 10: 136-137
41. Salter HH: Asthma: its pathology and treatment, 2nd ed. London, Churchill, 1868
42. Osler W: Diseases of the respiratory system: bronchial asthma. In: *The principles and practice of medicine*, 4th ed. New York: D. Appleton and Company, 1901: 628–632
43. Luparello T, Lyons HA, Bleeker E: Influences of suggestion on airway reactivity in asthmatic subjects. *Psychosom Med*, 1968, 30: 819–825
44. Blackey CH: Experimental researches on the causes and nature of catarrhus aestivus (hay fever or hay-asthma). London: Ballie` re, Tindall and Cox; 1873
45. von Pirquet C: Allergie. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 1906, 30: 1457–1458
46. Meltzer SJ: Bronchial asthma as a phenomenon of anaphylaxis. *JAMA*, 1910, 55: 1021–1024
47. Walker IC: A clinical study of 400 patients with bronchial asthma. *Boston Med Surg J*, 1918, 179: 288–293
48. Rackemann FM: A clinical study of one hundred fifty cases of bronchial asthma. *Arch Intern Med*, 1918, 22: 552
49. Curry JJ: The action of histamine on the respiratory tract in normal and asthmatic subjects. *J Clin Invest*, 1946, 25: 785–791
50. Huber HL, Koessler KK: The pathology of bronchial asthma. *Arch Intern Med*, 1922, 30: 689–760
51. Dunnill MS: The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial mucosa. *J Clin Pathol*, 1960, 13: 27–33
52. Nowotny F: Bronchoskopie und bronchoskopische Behandlung von Bronchialasthma. *Monatsschrift für Ohrenheilkunde*, 1907, 12
53. Molina C, Brun J, Coulet M: Immunopathology of the bronchial mucosa in late onset asthma. *Clin. Allergy*, 1977, 7: 137–145

54. Laitinen LA, Heino M, Laitinen A: Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am Rev Respir Dis*, 1985, 131: 599–606
55. Samuelsson B: Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammations. *Science*, 1983, 220: 568
56. Kašák V: Asthma bronchiale. *Farmakoterapie pro praxi*. Maxdorf, 2005: 10-11
57. <http://www.who.int/respiratory/asthma/en/index.html>
58. Česká Iniciativa pro astma: Diagnostika, léčba a prevence průduškového astmatu v České republice, uvedení globální strategie do praxe. *Jalna*, Praha, 2008
59. Global Initiative for Asthma: Global Burden of Asthma. Available on URL: <http://www.ginasthma.org/ReportItem.asp?l1=2&l2=2&intId=94>
60. Killian G: Über direkte Bronchoskopie. *Münch Med Wochenschrift*, 1898, 27: 844-47
61. Keiper GF: The bronchoscopic treatment of spasmodic asthma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1914, 23: 53–58
62. Clerf LH: Bronchoscopy as an aid in diagnosis and treatment of bronchial asthma. *J Am Med Assoc*, 1927, 89: 872-875
63. Djukanovic R, Britten K, Holgate S: Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial musoca of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry. *American Review of respiratory Disease*, 1990, 142: 863-871
64. Kolek V: Sarkoidóza – známé a neznámé. *Grada Publishing*, Praha 1998
65. Reynolds HY, Newball HH: Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J Lab Clin Med*, 1974, 84: 559
66. Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich G: Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. *American Review of respiratory Disease*, 1988, 137: 62-69
67. Dobbertin I, Dierkesmann R: *Lehrbuch und Atlas der Bronchoskopie*. Huber Verlag, 2004, Bern: 175-185, 257-268
68. Klech H, Pohl W: Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J*, 1989, 2: 561-585
69. Pingleton AK, Harrison GF, Stechschulte DJ: Effect of location, pH and temperature od instillate in bronchoalveolar lavage in normal volunteers. *Am Rev Respir Dis*, 1983, 128: 1035-1037
70. Dhillon DP, Haslam PL, Townsend PJ: Bronchoalveolar lavage in patients with interstitial lung diseases: side effects and factors affecting fluid recovery. *Eur J Respir Dis*, 1986, 68: 342-350
71. Reynolds HY, Fulmer JD, Kazmierowski JA: Analysis of cellular and protein content of bronchoalveolar lavage fluid from patients with idiopathic

- pulmonary fibrosis and chronic hypersensitivity pneumonitis. *J Clin Invest*, 1977, 59: 165-175
72. Martin TR, Raghu G, Maunder RJ: The effects of chronic bronchitis and chronic air flow obstruction on lung cell populations recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis*, 1985, 132: 254-260
 73. Löfdahl JM, Cederlund K, Nathell L: Bronchoalveolar lavage in COPD: fluid recovery correlates with the degree of emphysema. *Eur Respir J*, 2005, 25: 275–281
 74. Lam S, LeRiche JC, Kijek K: Effect of bronchial lavage volume on cellular and protein recovery. *Chest*, 1985, 88: 856-859
 75. Reynolds HY: Bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis*, 1987, 135: 250-263
 76. Davis GS, Giancola MS, Costanza MC: Analysis of sequential bronchoalveolar lavage samples from healthy human volunteers. *Am Rev Respir Dis*, 1982, 126: 611-616
 77. Jarjour NN, Peters SP, Djukanović R: Investigative Use of Bronchoscopy in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157: 692–697
 78. Kolek V: *Bronchologie pro zdravotní sestry*. IPVZ Brno, 2002
 79. Hattotuwa K, Gamble EA, O’Shaughnessy T: Safety of bronchoscopy, biopsy, and BAL in research patients with COPD. *Chest*, 2002, 122: 1909-1912
 80. Workshop summary and guidelines: investigative use of bronchoscopy, lavage, and bronchial biopsies in asthma and other airway diseases. *J. Allergy Clin. Immunol*, 1991, 88: 808–814
 81. Humbert M, Robinson DS, Assoufi B: Safety of fiberoptic bronchoscopy in asthmatic and control subjects and effect on asthma control over two weeks. *Thorax*, 1996, 51: 664–669
 82. Rankin JA, Snyder PE, Schachter EN: Bronchoalveolar lavage: its safety in subjects with mild asthma. *Chest*, 1984, 85: 723-728
 83. Wardlaw AJ, Collins JV, Kay AB: Mechanisms in asthma using the technique of bronchoalveolar lavage. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1987, 82: 518-525
 84. Summary and recommendation of a workshop on the investigative use of fiberoptic bronchoscopy and bronchoalveolar lavage in asthmatics. *Chest*, 1985, 88: 136-138
 85. Zatloukal J, Kolek V, Václavík A, Losse S, Jakubec P: Randomizovaná studie sledující lokální a systémové účinky intrabronchiálně podaného terlipresinu během bronchoskopie. *Stud Pneumol Phthiseol*, 2008, 68: 53-59
 86. Barnes PJ: Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev*, 2004, 56: 515-548

87. Lacoste JY, Bousquet J, Chanez P: Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma, chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*, 1993, 92: 537–548
88. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ: Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 153: 530–534
89. Finkelstein R, Fraser RS, Ghezzi H, Cosio MG: Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 152: 1666–1672
90. Barnes PJ: Macrophages as orchestrators of COPD. *J COPD*, 2004, 1: 59–70
91. Retamales I, Elliott WM, Meshi B, Coxson HO, Pare PD, Scirba FC, Rogers RM, Hayashi S, Hogg JC: Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164: 469–473
92. Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, Fitzgerald M, Barnes PJ: Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 283: 867–873
93. Vandivier RW, Fadok VA, Hoffmann PR, Bratton DL, Penvari C, Brown KK, Brain JD, Accurso FJ, Henson PM: Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *J Clin Invest*, 2002, 109: 661–670
94. Zeid NA, Muller HK: Tobacco smoke induced lung granulomas and tumors: association with pulmonary Langerhans cells. *Pathology*, 1995, 27: 247–254
95. Soler P, Moreau A, Basset F, Hance AJ: Cigarette smoking-induced changes in the number and differentiated state of pulmonary dendritic cells/Langerhans cells. *Am Rev Respir Dis* 1989, 139: 1112–1117
96. Barnes PJ: Mechanisms in COPD: differences from asthma. *Chest*, 2000, 117 (Suppl): 10S–14S
97. Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, Barnes PJ: Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 155: 542–548
98. Woolhouse IS, Bayley DL, Stockley RA: Sputum chemotactic activity in chronic obstructive pulmonary disease: effect of α_1 -antitrypsin deficiency and the role of leukotriene B₄ and interleukin 8. *Thorax*, 2002, 57: 709–714
99. Spruit MA, Gosselink R, Troosters T, Kasran A, Gayan-Ramirez G, Bogaerts P, Bouillon R, Decramer M: Muscle force during an acute exacerbation in hospitalised patients with COPD and its relationship with CXCL8 and IGF-I. *Thorax*, 2003, 58: 752–756
100. Nocker RE, Schoonbrood DF, Van de Graaf EA, Hack CE, Lutter R, Jansen HM, Out TA: Interleukin-8 in airway inflammation in patients with asthma

and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol*, 1996, 109: 183–191

101. Schulz C, Wolf K, Harth M, Kratzel K, Kunz-Schughart L, Pfeifer M: Expression and release of interleukin-8 by human bronchial epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease, smokers and never-smokers. *Respiration*, 2003, 70: 254–261
102. Culpitt SV, Nightingale JA, Barnes PJ: Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160: 1635–1639
103. Crooks SW, Bayley DL, Hill SL, Stockley RA: Bronchial inflammation in acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis: the role of leukotriene B₄. *Eur Respir J*, 2000, 15: 274–280
104. Geiser T, Dewald B, Ehrenguber MU, Clark-Lewis I, Baggiolini M: The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO α , GRO β and GRO γ activate human neutrophil and basophil leukocytes. *J Biol Chem*, 1993, 268: 15419–15424
105. Schulz C, Kratzel K, Wolf K, Schroll S, Kohler M, Pfeifer M: Activation of bronchial epithelial cells in smokers without airway obstruction and patients with COPD. *Chest*, 2004, 125: 1706–1713
106. Traves SL, Culpitt S, Russell REK, Barnes PJ, Donnelly LE: Elevated levels of the chemokines GRO- α and MCP-1 in sputum samples from COPD patients. *Torax*, 2002, 57: 590–595
107. Traves SL, Smith SJ, Barnes PJ, Donnelly LE: Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2. *J Leukoc Biol*, 2004, 76: 441–450
108. Capelli A, Di Stefano A, Gnemmi I, Balbo P, Cerutti CG, Balbi B, Lusuardi M, Donner CF: Increased MCP-1 and MIP-1₂ in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitis. *Eur Respir J*, 1999, 14: 160–165
109. Zhu J, Qiu YS, Majumdar S, Gamble E, Matin D, Turato G, Fabbri LM, Barnes N, Saetta M, Jeffery PK: Exacerbations of bronchitis: bronchial eosinophilia and gene expression for interleukin-4, interleukin-5 and eosinophil chemoattractants. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164: 109–116
110. Bocchino V, Bertorelli G, Bertrand CP, Ponath PD, Newman W, Franco C, Marruchella A, Merlini S, Del Donno M, Zhuo X: Eotaxin and CCR3 are up-regulated in exacerbations of chronic bronchitis. *Allergy*, 2002, 57: 17–22
111. Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Wright JL: Tumor necrosis factor- α drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 170: 492–498
112. Panzner P, Lafitte JJ, Tsiopoulos A, Hamid Q, Tulic MK: Marked up-regulation of T lymphocytes and expression of interleukin-9 in bronchial biopsy from patients with chronic bronchitis with obstruction. *Chest*, 2003, 124: 1909–1915

113. Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, de Matos C, Russell RE, Donnelly LE, Barnes PJ: Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167: 24–31
114. Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, Gnemmi I, Ricciardolo F, Oates T, Donner CF, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM: STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 2004, 24: 78–85
115. Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman Jr HA, Shapiro SD, Elias JA: Interferon γ induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med*, 2000, 192:1587–1600
116. Miotto D, Ruggieri MP, Boschetto P, Cavallesco G, Papi A, Bononi I, Piola C, Murer B, Fabbri LM, Mapp C: Interleukin-13 and -4 expression in the central airways of smokers with chronic bronchitis. *Eur Respir J*, 2003, 22: 602–608
117. Barczyk A, Pierzchala W, Sozanska E: Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med*, 2003, 97: 726–733
118. Nadel JA and Burgel PR: The role of epidermal growth factor in mucus production. *Curr Opin Pharmacol*, 2001, 1: 254–258
119. Santos S, Peinado VI, Ramirez J, Morales-Blanchir J, Bastos R, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Barbera JA: Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary arteries of smokers and patients with moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167: 1250–1256
120. Kanazawa H, Asai K, Hirata K, Yoshikawa J: Possible effects of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med*, 2003, 114: 354–358
121. Chung KF, Barnes PJ: Cytokines in asthma. *Thorax*, 1999, 54: 825-857
122. Broide DH, Lotz M, Cuomo AJ: Cytokines in symptomatic asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol*, 1992, 89: 958–67
123. Walker C, Bode E, Boer L: Allergic and non-allergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis*, 1992, 146: 109–15
124. Robinson DS, Hamid Q, Ying S: Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*, 1992, 326: 298–304
125. Bentley AM, Meng Q, Robinson DS: Increases in activated T lymphocytes, eosinophils and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993, 8: 35–42
126. Leung DY, Martin RJ, Szeffler SJ: Dysregulation of interleukin 4, interleukin 5, and interferon gamma gene expression in steroid-resistant asthma. *J Exp Med*, 1995, 181: 33–40

127. Robinson DS, Hamid Q, Bentley AM: Activation of CD4⁺ T cells and increased IL-4, IL-5 and GM-CSF mRNA positive cells in bronchoalveolar lavage fluid (BAL) 24 hours after allergen inhalation challenge of atopic asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*, 1993, 92: 313–24
128. Ying S, Humbert M, Barkans J: Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4⁺ and CD8⁺ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *J Immunol*, 1997, 158: 3539–44
129. Bradding P, Feather IH, Howarth PH: Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J Exp Med*, 1992, 176: 1381–1386
130. Shi HZ, Deng JM, Xu H: Effect of inhaled interleukin-4 on airway hyperreactivity in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157: 1818–21
131. Temann UA, Prasad B, Gallup MW: A novel role for murine IL-4 in vivo: induction of MUC5AC gene expression and mucin hypersecretion. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, 16: 471–8
132. Hamid Q, Azzawi M, Sun Ying: Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J Clin Invest*, 1991, 87: 1541–9
133. Till S, Li B, Durham S: Secretion of the eosinophil-active cytokines interleukin-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 by bronchoalveolar lavage CD4⁺ and CD8⁺ T cell lines in atopic asthmatics, and atopic and non-atopic controls. *Eur J Immunol*, 1995, 25: 2727–31
134. Broide D, Paine MM, Firestein GS: Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. *J Clin Invest*, 1992, 90: 1414–24
135. Sedgewick JB, Calhoun WJ, Gleich GJ: Immediate and late airway response of allergic rhinitis patients to segmental antigen challenge. Characterization of eosinophil and mast cell mediators. *Am Rev Respir Dis*, 1991, 144: 1274–81
136. Collins PD, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ: Cooperation between interleukin-5 and the chemokine, eotaxin, to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med*, 1995, 182: 1169–74
137. Rothenberg ME, MacLean JA, Pearlman E: Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. *J Exp Med*, 1997, 185: 785–90
138. Shi H, Qin S, Huang G: Infiltration of eosinophils into the asthmatic airways caused by interleukin 5. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, 16: 220–4
139. Shi HZ, Xiao CQ, Zhong D: Effect of inhaled interleukin-5 on airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157: 204–9
140. Mauser PJ, Pitman AM, Fernandez X: Effects of an antibody to interleukin-5 in a monkey model of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 152: 467–72

141. Temann UA, Geba GP, Rankin JA: Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J Exp Med*, 1998, 188: 1307–20
142. Naseer T, Minshall EM, Leung DY: Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 155: 845–51
143. Humbert M, Durham SR, Kimmitt P: Elevated expression of messenger ribonucleic acid encoding IL-13 in the bronchial mucosa of atopic and nonatopic subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1997, 99: 657–65
144. Kroegel C, Julius P, Matthys H: Endobronchial secretion of interleukin-13 following local allergen challenge in atopic asthma: relationship to interleukin-4 and eosinophil counts. *Eur Respir J*, 1996, 9: 899–904
145. Cruikshank WW, Long A, Tarpy RE, Kornfeld H, Carroll MP, Teran L, Holgate ST, Center DM: Early identification of interleukin-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP1 alpha) in bronchoalveolar lavage fluid of antigen-challenged asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995, 13: 738–47
146. Mashikian MV, Tarpy RE, Saukkonen JJ: Identification of IL-16 as the lymphocyte chemotactic activity in the bronchoalveolar lavage fluid of histamine-challenged asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*, 1998, 101: 786–92
147. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF: Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity*, 1995, 3: 811–21
148. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC: Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol*, 1995, 155: 5483–6
149. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P: T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines (see comments). *J Exp Med*, 1996, 183: 2593–603
150. Ushio S, Namba M, Okura T: Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol*, 1996, 156: 4274–9
151. Borish L, Mascali JJ, Dishuck J: Detection of alveolar macrophage-derived IL-1 in asthma: inhibition with corticosteroids. *J Immunol*, 1992, 149: 3078–82
152. Kips JC, Tavernier JH, Joos GF: The potential role of tumour necrosis factor alpha in asthma. *Clin Exp Allergy*, 1993, 23: 247–50
153. Shah A, Church MK, Holgate ST: Tumour necrosis factor alpha: a potential mediator of asthma. *Clin Exp Allergy*, 1995, 25: 1038–44
154. Ying S, Robinson DS, Varney V: TNF- α mRNA expression in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy*, 1991, 21: 745–50
155. Gosset P, Tsicopoulos A, Wallaert B: Increased secretion by tumor necrosis factor and interleukin 6 by alveolar macrophages consecutive to the

- development of the late asthmatic reaction. *J Allergy Clin Immunol*, 1991, 88: 561–71
156. Einarsson O, Geba GP, Zhu Z: Interleukin-11: stimulation in vivo and in vitro by respiratory viruses and induction of airways hyperresponsiveness. *J Clin Invest*, 1996, 97: 915–24
 157. Xing Z, Ohkawara Y, Jordana M: Transfer of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene to rat lung induces eosinophilia, monocytosis, and fibrotic reactions. *J Clin Invest*, 1996, 97: 1102–10
 158. John M, Lim S, Seybold J: Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1 α , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon- γ release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157: 256–62
 159. Borish L, Aarons A, Rumbyrt J: Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1996, 97: 1288–96
 160. Robinson DS, Tsicopoulos A, Meng Q: Increased interleukin-10 messenger RNA expression in atopic allergy and asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996, 14: 113–7
 161. Leonard C, Tormey V, Burke C: Allergen-induced cytokine production in atopic disease and its relationship to disease severity. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, 17: 368–75
 162. Koning H, Neijens HJ, Baert MR: T cell subsets and cytokines in allergic and non-allergic children. I. Analysis of IL-4, IFN- γ and IL-13 mRNA expression and protein production. *Cytokine*, 1997, 9: 416–26
 163. Alam R, York J, Boyars M: Increased MCP-1, RANTES and MIP-1 α in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 153: 1398–404
 164. Humbert M, Ying S, Corrigan C: Bronchial mucosal expression of the genes encoding chemokines RANTES and MCP-3 in symptomatic atopic and nonatopic asthmatics: relationship to the eosinophil-active cytokines interleukin (IL)-5, granulocyte macrophage-colony-stimulating factor and IL-3. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, 16: 1–8
 165. Chihara J, Yasuba H, Tsuda A: Elevation of the plasma level of RANTES during asthma attacks. *J Allergy Clin Immunol*, 1997, 100: S52–5
 166. Mattoli S, Stacey MA, Sun G: Eotaxin expression and eosinophilic inflammation in asthma. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 236: 299–301
 167. Lamkhioued B, Renzi PM, Abi Younes S: Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation. *J Immunol*, 1997, 159: 4593–4601
 168. Brown JR, Kleimberg J, Marini M: Kinetics of eotaxin expression and its relationship to eosinophil accumulation and activation in bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage (BAL) of asthmatic patients after allergen inhalation. *Clin Exp Immunol*, 1998, 114: 137–46

169. Chanez P, Vignola M, Stenger R: Platelet-derived growth factor in asthma. *Allergy*, 1995, 50: 878–83
170. Aubert J-D, Dalal BI, Bai TR: Transforming growth factor- β gene expression in human airways. *Thorax*, 1994, 45: 225–32
171. Hoshino M, Nakamura Y, Sim JJ: Inhaled corticosteroid reduced lamina reticularis of the basement membrane by modulation of insulin-like growth factor (IGF)-I expression in bronchial asthma. *Clin Exp Allergy*, 1998, 28: 568–77
172. Tetley TD: Macrophages and the Pathogenesis of COPD. *Chest*, 2002, 121: 156S-159S
173. Kelly E, Jarjour NN: Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr Opin Pulm Med*, 2003, 9: 28–33
174. Baraldo S, Bazzan E, Zanin ME: Matrix Metalloproteinase-2 Protein in Lung Periphery Is Related to COPD Progression. *Chest*, 2007, 132: 1733-1740
175. Gross J, Lapiere CM: Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1962, 48: 1014-1022
176. Lagente V, Manoury B, Nenan S: Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2005, 38: 1521-1530
177. Parks WC, Shapiro SD: Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res*, 2001, 2: 10-19
178. Shapiro SD: Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: Biological consequences. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10: 602-608
179. Imai K, Dalal SS, Chen ES: Human collagenase (matrix-metalloproteinase-1) expression in the lungs of patients with emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163: 786-791
180. Starcher BC: Elastin and the lung. *Thorax*, 1986, 41: 577-585
181. Woodruff PG, Koth LL, Yang YH: A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172: 1383-1392
182. Lavigne MC, Thakker P, Gunn J: Human bronchial epithelial cells express and secrete MMP-12. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 324: 534-546
183. Xie S, Issa R, Sukkar MB: Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 in human airway smooth muscle cells. *Respir Res*, 2005, 6: 148
184. Holgate ST, Yang Y, Haitchi HM: The genetics of asthma: ADAM33 as an example of a susceptibility gene. *Proc Am Thorac Soc*, 2006, 3: 440-443
185. Chanez P, Vignola AM, O'Shaughnessy T: Corticosteroid reversibility in COPD is related to features of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1997, 155: 1529 - 1534

186. Chung KF, Adcock IM: Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J*, 2008, 31: 1334–1356
187. Gadek JE, Fells GA, Crystal RG: Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans. *Science* 1979, 206: 1315–1316
188. Stone PJ, Calore JD, McGowan SE: Functional alpha 1-protease inhibitor in the lower respiratory tract of cigarette smokers is not decreased. *Science*, 1983, 221: 1187–1189
189. Abboud RT, Fera T, Richter A: Acute effect of smoking on the functional activity of alpha-1-protease inhibitor in bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis*, 1985, 131: 79–85
190. Torii K, Iida K, Miyazaki Z: Higher concentrations of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 155: 43–46
191. Finlay GA, O’Driscoll LR, Russell KJ: Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 156: 240–247
192. Selman M, Cisneros-Lira J, Gaxiola M: Matrix Metalloproteinases Inhibition Attenuates Tobacco Smoke-Induced Emphysema in Guinea Pigs. *Chest*, 2003, 123: 1633-1641
193. Montaña M, Becceril C, Ruiz V: Matrix Metalloproteinases Activity in COPD Associated With Wood Smoke. *Chest*, 2004, 125: 466–472
194. Glader P, Eldh B, Bozinovski S.: Impact of acute exposure to tobacco smoke on gelatinases in the bronchoalveolar space. *Eur Respir J*, 2008, 32: 644–650
195. Gronski TJ, Martin E, Kobayashi DK: Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J Biol Chem*, 1997, 272: 12189-94
196. Churg A, Wang RD, Tai H: Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor-alpha release. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167: 1083-1089
197. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM et al.: Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*, 1997, 277: 2002-2004
198. Senior RM, Griffin GL & Mecham RP: Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *Journal of Clinical Investigation*, 1980, 66: 859-862
199. Churg A, Zay K, Shay S: Acute cigarette smoke induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2002, 27: 368-374

200. Molet S, Belleguic C, Léna H: Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation Research*, 2004, 54: 31-36
201. Segura-Valdez L, Pardo A, Gaxiola M: Upregulation of Gelatinases A and B, Collagenases 1 and 2, and Increased Parenchymal Cell Death in COPD. *Chest*, 2000, 117: 684-694
202. Culpitt SV, Rogers DF, Traves SL: Sputum matrix metalloproteases: Comparison between chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Respiratory Medicine*, 2005, 99: 703-710
203. Vernooy JHJ, Lindeman JHN, Jacobs JA: Increased Activity of Matrix metalloproteinase-8 and Matrix Metalloproteinase-9 in Induced Sputum From Patients With COPD. *Chest*, 2004, 126: 1802-1810
204. Boschetto P, Quintavalle S, Zeni E: Association between markers of emphysema and more severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 2006, 61: 1037-1042
205. Vignola AM, Paganin F, Capiieu L: Airway remodelling assessed by sputum and high-resolution computed tomography in asthma and COPD. *Eur Respir J*, 2004, 24: 910-917
206. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A: Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158: 1945-1950
207. Churg A, Wang R, Wang X: Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs. *Thorax* 2007, 62: 706-713
208. Mattos W, Lim S, Russell R: Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Asthma: Effect of Asthma Severity, Allergen Challenge, and Inhaled Corticosteroids. *Chest*, 2002, 122: 1543-1552
209. Pons AR, Sauleda J, Noguera A: Decreased macrophage release of TGF- β and TIMP-1 in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 2005, 26: 60-66
210. Beeh KM, Beier J, Kornmann O: Sputum matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects. *Respiratory Medicine*, 2003 97: 634-639
211. Sethi S, Maloney J, Grove L: Airway Inflammation and Bronchial Bacterial Colonization in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173: 991-998
212. Mercer , Shute JK, Bhowmik A: MMP-9, TIMP-1 and inflammatory cells in sputum from COPD patients during exacerbation. *Respiratory Research*, 2005, 6:151
213. Zheng L, Lam WK, Tipoe GL: Overexpression of matrix metalloproteinase-8 and -9 in bronchiectatic airways in vivo. *Eur Respir J*, 2002; 20: 170-176

214. Mautino G, Oliver N, Chanez P: Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997, 17: 583–591
215. Mautino G, Henriquet C, Jaffuel D: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Levels in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Asthmatic Subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160: 324–330
216. Suzuki R, Kato T, Miyazaki Y: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in sputum from patients with bronchial asthma. *J Asthma*, 2001, 38: 477–484
217. Hoshino M, Nakamura Y, Sim JJ: Bronchial subepithelial fibrosis and expression of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 1998, 102: 783–788
218. Lee YC, Lee HB, Rhee YK: The involvement of matrix metalloproteinase-9 in airway inflammation of patients with acute asthma. *Clin Exp Allergy*, 2001, 31: 1623–1630
219. Tanaka H, Miyazaki N, Oashi K: Sputum matrix metalloproteinase-9: tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio in acute asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 105:900–905
220. Lemjabbar H, Gosset P, Lamblin C: Contribution of 92 kDa gelatinase type IV collagenase in bronchial inflammation during status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 159:1298–1307
221. Oshita Y, Koga T, Kamimura T: Increased circulating 92 kDa matrix metalloproteinase (MMP-9) activity in exacerbations of asthma. *Thorax*, 2003, 58: 757–760
222. Kelly EAB, Busse WW, Jarjour NN: Increased matrix metalloproteinase (MMP)-9 in the airway following allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162:1157–1161
223. Cataldo DD, Bettiol J, Noe A: Matrix Metalloproteinase-9, but Not Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1, Increases in the Sputum From Allergic Asthmatic Patients After Allergen Challenge. *Chest*, 2002; 122: 1553–1559
224. Hoshino M, Takahashi M, Takai Y: Inhaled corticosteroids decrease subepithelial collagen deposition by modulation of the balance between matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 1999, 104:356–363.
225. Bossé M, Chakir J, Rouabhia M: Serum matrix metalloproteinase-9:tissue inhibitor of metalloproteinases-1 ratio correlates with steroid responsiveness in moderate to severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 159:596–602
226. Kriegová E, Arakelyan A, Fillerova R, Zatloukal J, Mrazek F, Navratilova Z, Kolek V, du Bois RM, Petrek M: PSMB2 and RPL32 are suitable denominators to normalize gene expression profiles in bronchoalveolar cells. *BMC Mol Biol*, 2008, 9: 69
227. Kriegová E, Tsyurulnyk A, Arakelyan A, Mrázek F, Ordeltová M, Petzmann S, Zatloukal J, Kolek V, du Bois RM, Popper H, Petřek M: Expression of

- CCX CKR in pulmonary sarcoidosis. *Inflammation Research*, 2006, 55: 441-445
228. Mannino DM, Reichert MM, Davis KJ: Lung function decline and outcomes in an adult population. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, 173: 985-990
 229. Pelkonen M, Notkola IL, Nissinen A: Thirty-year cumulative incidence of chronic bronchitis and COPD in relation to 30-year pulmonary function and 40-year mortality. A follow-up in middle-aged rural men. *Chest* 2006, 130: 1129-1137
 230. Campbell AH, Barter CE, O'Connell JM: Factors affecting the decline of ventilatory function in chronic bronchitis. *Thorax* 1985, 40: 741-748
 231. Sapey E, Wood AM, Ahmad A: Tumor Necrosis Factor- α rs361525 polymorphism is associated with increased local production and downstream inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182: 192-199
 232. Burgel PR, Nesme-Meyer P, Chanez P, Caillaud D, Carre P, Perez T, Roche N: Cough and sputum production are associated with frequent exacerbations and hospitalizations in COPD subjects. *Chest* 2009, 135: 975-982
 233. Donaldson GC, Seemungal TAR, Bhowmik A, Wedzicha JA: Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002;57:847-52.
 234. Kanner RE, Anthonisen NR, Connett JE: Lower respiratory illnesses promote FEV1 decline in current smokers but not ex-smokers with mild chronic obstructive pulmonary disease: results from the Lung Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:358-64.
 235. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A: Susceptibility to Exacerbation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med* 2010;363:1128-38.
 236. He JQ, Foreman MG, Shumansky K, Zhang X, Akhbar L, Sin DD, Man SF, DeMeo DL, Litonjua AA, Silverman EK, et al: Associations of IL6 polymorphisms with lung function decline and COPD. *Thorax* 2009, 64:6 98-704
 237. Morrison D, Rahman I, Lannan S: Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 159: 473-479
 238. Zatloukal J., Navrátilová Z., Kolek V., Kriegová E., Petřek M.: Vyšetření matrix-metaloproteináz a jejich inhibitorů v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN a bronchiálním astmatem. *Stud. Pneumol. Phthiseol.* In press
 239. Celli BR, Barns PJ: Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*, 2007, 29: 1224-1238
 240. Donaldson GC, Seemungal TAR, Patel IS, Bhowmik A, Wilkinson TMA, Hurst JR, MacCallum PK, Wedzicha JA: Airway and systemic inflammation and decline in lung function in patients with COPD. *Chest*, 2005, 128: 1995-2004

241. Omachi TA, Eisner MD, Rames A, Markovtsova L, Blanc PD: Matrix metalloproteinase-9 predicts pulmonary status declines in α_1 -ntitrypsin deficiency. *Respiratory Research*, 2011, 12: 35-45
242. Higashimoto Y, Iwata T, Okada M, Satoh H, Fukuda K, Tohda Y: Serum biomarkers as predictors of lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2009, 103: 1231-8
243. van Diemen CC, Postma DS, Siedlinski M, Blokstra A, Smit HA, Boezen HM: Genetic variation in TIMP1 but not MMPs predict excess FEV1 decline in two general population-based cohorts. *Respiratory Research*, 2011, 12: 57-78
244. Hunninghake GM, Cho MH, Tesfaigzi Y, Soto-Quiros ME, Avila L, Lasky-Su J, Stidley C, Melén E, Söderhäll C, Hallberg J, Kull I, Kere J, Svartengren M, Pershagen G, Wickman M, Shapiro SD, Celedón JC: MMP12, Lung Function, and COPD in High-Risk Populations. *N Engl J Med* 2009; 361: 2599-2608
245. van Diemen CC, Postma DS, Vonk JM, Bruinenberg M, Schouten JP, Boezen MH: A Disintegrin and Metalloprotease 33 polymorphisms and lung function decline in the general population. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172: 329–333
246. Hayakawa T: Tissue inhibitors of metalloproteinase and their cell growth-promoting activity. *Cell Struct Funct* 1994, 19: 109–114
247. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST: Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989, 1: 520–524

11. VLASTNÍ PUBLIKACE A PŘEDNÁŠKY

Publikace v časopisech s impakt faktorem

Kriegova E., Arakelyan A., Fillerova R., Zatloukal J., Mrazek F., Navratilova Z., Kolek V., du Bois R.M., Petrek M.: PSMB2 and RPL32 are suitable denominators to normalize gene expression profiles in bronchoalveolar cells. BMC Molecular Biology 2008, 9:69

Citace v dizertační práci [226]

Kriegová E., Tsyurulnyk A., Arakelyan A., Mrázek F., Ordeltová M., Petzmann S., Zatloukal J., Kolek V., du Bois R.M., Popper H., Petřek M.: Expression of CCX CKR in pulmonary sarcoidosis. Inflammation Research, 2006, vol. 55, s. 441-445

Citace v dizertační práci [227]

Bouchal J., Džubák P., Hajdúch M., Dušek L., Grygárková I., Klein J., Zatloukal J., Škarda J., Kolář Z.: Squamous cell differentiation in NSCLC correlates with telomere length. Lung cancer, 32, 2001, S52

Publikace v časopisech bez impakt faktoru

Zatloukal J., Navrátilová Z., Kolek V., Kriegová E., Petřek M.: Vyšetření matrix-metaloproteináz a jejich inhibitorů v bronchoalveolární tekutině u pacientů s CHOPN a bronchiálním astmatem. Stud. Pneumol. Phthiseol. In press

Citace v dizertační práci [238]

Kolek V., Bartošová H., Zatloukal J., Václavík A., Losse S. Jakubec P., Marek O., Mrozek Z.: Bronchoskopická diagnostika a léčba benigních endobronchiálních nádorů. Stud. Pneumol. Phthiseol. 2009, roč. 69, 3

Zatloukal J., Kolek V., Václavík A., Losse S. Jakubec P.: Randomizovaná studie sledující lokální a systémové účinky intrabronchiálně podaného terlipresinu během bronchoskopie. Stud. Pneumol. Phthiseol. duben 2008, roč. 68, 2, s.53-59

Citace v dizertační práci [85]

Jakubec P., Kolek V., Václavík A., Zatloukal J., Losse S.: Cizí tělesa v dolních dýchacích cestách. Stud. Pneumol. Phthiseol. prosinec 2008, roč. 68, 6

Zatloukal J.: Exacerbace chronické obstrukční nemoci: srovnání dvou terapeutických přístupů - studie INSPIRE. Farmakoterapie, 2008, 1, s. 35-40

Zatloukal J.: Chronická obstrukční plicní nemoc. Zdravotnické noviny, Lékařské listy, 2007, 5, s.22-24

Zatloukal J.: Novinky v terapii CHOPN. Medicína pro praxi, 2007, 4, s.301-304

Jakubec P., Kolek V., Václavík A., Zatloukal J., Kučerová L.: Necílená biopsie pleury v diagnostice maligního postižení pleury. Stud. Pneumol. Phthiseol. červen 2006, roč. 66, s.119-123.

Kolek V., Zatloukal J., Václavík A., Tichý T., Dušková M.: Význam transbronchiální biopsie u difusních plicních procesů. Stud Pneumol Phthiseol, 63, 2003, 3, 91-94

Cwierotka K., Kolek V., Přidal I., Čecháček M., Václavík A., Zatloukal J., Macháček J.: Brachyterapie jako součást iniciální terapie bronchogenního karcinomu. Stud Pneumol Phthiseol, 63, 2003, 4, 149-155

Kolek V., Grygárková I., Zatloukal J., Roubec J.: Výsledky podávání gemcitabinu v druhé linii chemoterapie nemalobuněčného karcinomu plic. Stud Pneumol Phthiseol, 62, 2002, 1, 24-28

Kolek V., Grygárková I., Zatloukal J., Roubec J.: Výsledky podávání gemcitabinu v druhé linii chemoterapie nemalobuněčného karcinomu plic. Respirace 6, 2000, s.21

Šimek I., Zatloukal J., Ležatková H.: Das Auftreten und Äusserungen der Giardiasis in Olomoucer Region. Acta Univ Palacki, 135, 1993, 7-12

Přednáška s abstrakem v časopise s impakt faktorem

Zatloukal J., Kolek V., Jakubec P.: Electromagnetic navigation-guided diagnostic bronchoscopy for small peripheral lung lesions: A prospective study. European Respiratory Journal, Abstracts 20th ERS Annual Congress. Barcelona - Spain, September 2010, vol. 36, Suppl. 54.

Navratilova Z., Zatloukal J., Kriegova E., Mrazek F., Kolek V., Petrek M.: MMP2,8,9 and TIMP1-4 levels in bronchoalveolar fluid of patients with chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. European Respiratory Journal, Abstracts 20th ERS Annual Congress. Barcelona - Spain, September 2010, vol. 36, Suppl. 54.

Zatloukal J., Navratilova Z., Kriegova E., Fillerova R., Mrazek F., Kolek V., Petrek M.: The expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 mRNA in bronchoalveolar cells of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and bronchial asthma. European Respiratory Journal, Abstracts 19th ERS Annual Congress. Vienna - Austria, September 2009, vol. 34, Suppl. 53.

Zatloukal J., Kolek V., Václavík A.: Effects of intrabronchial terlipressin versus cold normal saline solution application in endobronchial bleeding. European Respiratory Journal, Abstracts 17th ERS Annual Congress. Stockholm - Sweden, September 2007, vol. 30, Suppl. 51, 538s.

Zatloukal J., Kolek V., Boriková A.: Haemoptysis as a major symptom of dissecting aortic aneurysm. Eur Respir J. September 2005, , 15th European Respiratory Society Annual Congress, Copenhagen - Denmark vol. 26 Suppl. 49, 523.

Bouchal J., Džubák P., Hajdúch M., Dušek L., Grygárková I., Klein J., Zatloukal J., Škarda J., Kolář Z.: Squamous cell differentiation in NSCLC correlates with telomere length. 7th Central European Lung Cancer Conference, Prague, June 3-6, 2001. Abstrakt v časopise Lung Cancer

Přednáška s abstrakem v časopise bez impakt faktoru

Zatloukal J.: Novinky v léčbě CHOPN. IV.konference ambulantních internistů, 2.4.2009, Olomouc, Interní medicína pro praxi, 2009, suppl.A, s.8.

Zatloukal J., Kolek V., Václavík A.: Stavění endobronchiálního krvácení intrabronchiální aplikací terlipresinu (Remestyp). X.Tománkovy dny bronchologie 30-31.3.2007. Respirace 2007, 13, Suppl.1, s.31.

Zatloukal J., Kolek V., Václavík A.: Transbronchiální biopsie u diseminovaných plicních procesů: do jaké míry může nahadit torakoskopii? X.Tománkovy dny bronchologie 30-31.3.2007. Respirace 2007, 13, Suppl.1, s.32.

Zatloukal J., Kolek V.: Aneurysma aorty jako příčina hemoptýzy. XIV.Moravskoslezské dny pneumologie 14.-15.10.2005. Respirace 2005, 11, suppl.2, s.35.

Zatloukal J.: Nové bronchologické vyšetřovací metody. Kongres praktických lékařů, Olomouc 21.-22.4.2005, Medicína pro praxi 2005

Zatloukal J., Kolek V., Václavík A., Tichý T., Dušková M., Zlámal J.: Význam transbronchiální biopsie u difusních plicních procesů. XI. Kongres České a Slovenské pneumologické a ftizeologické společnosti, Olomouc, 20.-23.6.2002. Stud Pneumol Phtiseol, 62, 2002, suppl.1, str.15, abstr.48

Valná E., Kolek V., Fialová J., Zatloukal J.: Postižení plic po intravenosní intoxikaci tetrachlorethylenem. XI. Kongres České a Slovenské pneumologické a ftizeologické společnosti, Olomouc, 20.-23.6.2002. Stud Pneumol Phtiseol, 62, 2002, suppl.1, str.18, abstr.75

Zatloukal J., Kolek V.: Chronický persistující kašel na ambulanci plicní kliniky. XI. Kongres České a Slovenské pneumologické a ftizeologické společnosti, Olomouc, 20.-23.6.2002. Stud Pneumol Phtiseol, 62, 2002, suppl.1, str.18, abstr.78

Přednáška bez abstraktu

Zatloukal J.: CHOPN - Srovnání výsledků studií z posledních let. Luhačovické dny, 26.3.2010

Zatloukal J., Kolek V., Navrátilová Z., Petřek M.: Imunologická vyšetření v BAL u nemocných s CHOPN. Konference České společnosti klinické biochemie ČLS JEP, Olomouc, 27.1.2010

Zatloukal J., Kolek V., Navrátilová Z., Kriegová E., Petřek M.: Imunologické nálezy v BAL u CHOPN a bronchiálního astmatu. Světový den CHOPN, Praha, 18.11.2009

Zatloukal J.: Časná intervence u CHOPN. XVIII. Moravskoslezské dny Olomouc, 17.10.2008

Zatloukal J.: Systémové projevy CHOPN, XV. Luhačovické dny, 28.-29.3.2008

Zatloukal J. Transbronchiální biopsie plic. Workshop intervenčních metod. X.Tománkovy dny bronchologie 30-31.3.2007.

Zatloukal J. Brachyterapie. Workshop intervenčních metod. X.Tománkovy dny bronchologie 30-31.3.2007.

Losse S., Zatloukal J., Kolek V., Viktorinová M.: Mycobacterium marinum: stoupající výskyt? Vědeckovzdělávací schůze ČPFS 30.9.2005, Praha

Zatloukal J. Léčba bronchiálního astmatu u dospělých a dětí, odborný seminář EDUKAFARM, Olomouc, 15.2.2005, Ostrava 9.3.2005, Brno 31.3.2005, Třešť 14.4.2005

Zatloukal, J.: Farmakologická a nefarmakologická léčba CHOPN. Konference praktických lékařů, Olomouc, 22.1.2005

Zatloukal J. Chronická obstrukční plicní nemoc. Kurs Sdružení praktických lékařů, Ostrava, 2.10.2004

Zatloukal J., Kolek V., Václavík A.: Je transbronchiální biopsie vhodná k diagnostice diseminovaných plicních procesů? IX.Tománkovy dny, Zlín, 11.-12.9.2003

Zatloukal J., Kolek V., Václavík A.: Význam transbronchiální biopsie u diseminovaných plicních procesů. X. den mladých pneumologů, Bratislava, 4.4.2003

Zatloukal J., Kolek V., Grygárková I.: Gemcitabin v druhé linii chemoterapie inoperabilního nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC). XX.dny mladých internistů, Olomouc,31.5.-1.6.2001

Kolek V., Grygárková I., Zatloukal J., Roubec J.: Gemcitabin v druhé linii chemoterapie inoperabilního nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC). X.Moravskoslezské dny, Olomouc, 8.-9.září 2000