

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Laboratórium rastových regulátorov



IL-17A, IL-17F a IL-23 u chronickej bronchitídy a CHOCHP

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Adela Papiková
Študijný program:	Biológia
Študijný odbor:	Experimentálna biológia
Forma štúdia:	Prezenčná;
Vedúci práca:	Mgr. Zdenka Navrátilová, Ph.D.

Olomouc 2023

Bibliografické údaje:

Meno a priezvisko autora	Bc. Adela Papiková
Názov práce	IL-17A, IL-17F a IL-23 u chronickej bronchitídy a CHOCHP
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Laboratórium rastových regulátorov
Vedúca práce	Mgr. Zdenka Navrátilová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo zistiť, či expresia IL-23 a vybraných génov T_h-17 imunitnej odpovede sa líši medzi CHOCHP a chronickou bronchitídou. Rozličné štúdie preukázali, že T_h-17 imunitná odpoveď zohráva dôležitú úlohu pri patogenéze CHOCHP. O možných rozdieloch medzi pacientami s CHOCHP a chronickou bronchitídou toho nie je moc známe.

Na posúdenie relatívnej expresie IL-17A, IL17F a IL-23 bola použitá kvantitatívna PCR. Expresia sa stanovovala u 20 pacientov s chronickou bronchitídou a u 20 pacientov s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc.

Expresia IL-23 bola zvýšená u pacientov s CHOCHP ($p=0.0001$) v porovnaní s kontrolami, ktorými boli pacienti s chronickou bronchitídou. Nebol zistený rozdiel v expresii IL-17A a IL-17F medzi pacientami s CHOCHP a kontrolami ($p>0,05$).

Tato práca priniesla nový poznatok, keďže sa porovnávala relatívna expresia génov medzi pacientami s CHOPN a pacientami s chronickou bronchitídou. Ďalšie štúdie by mali potvrdiť naše závery u väčšieho počtu pacientov.

Kľúčové slová	chronická obštrukčná choroba pľúc, chronická bronchitída, IL-17A, IL-17F, IL-23
Počet strán	52
Počet príloh	0
Jazyk	slovenčina

Bibliographical identification:

Author s first name and surname	Bc. Adela Papiková
Title	IL-17A, IL-17F and IL-23 in chronic bronchitis and COPD
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of growth regulators
Supervisor	Mgr. Zdenka Navrátilová, Ph.D.
The year of presentation	2023

SUMMARY

The aim of this work was to determine whether the expression of IL-23 and selected Th-17 immune response genes differs between COPD and chronic bronchitis. Various studies have demonstrated that the Th-17 immune response plays an important role in the pathogenesis of COPD. Not much is known about the possible differences between patients with COPD and chronic bronchitis.

Quantitative PCR was used to assess the relative expression of IL-17A, IL17F and IL-23. The expression was determine in group of 20 patients with chronic bronchitis and in group of 20 patients with chronic obstructive pulmonary disease.

IL-23 expression was increased on patients with COPD ($p=0.0001$) compared to controls who were patients with chronic bronchitis. No difference was found in the expression of IL-17A and IL-17F between COPD patients and controls ($p>0.05$).

This work provided new insight as it compared the relative expression of genes between patients with COPD and patients with chronic bronchitis. Further studies should confirm our conclusions in a larger number of patients.

Keywords	chronic obstructive pulmonary disease, chronic bronchitis, IL 17A, IL-17F, IL-23
Number of pages	52
Number of appendices	0
Language	Slovak

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som túto diplomovú prácu vypracovala samostatne na Univerzite Palackého v Olomouci pod vedením Mgr. Zdenky Navrátilovej*, Ph.D.

*Ústav Patologickej Fyziológie a Ústav Molekulárnej a Translačnej medicíny, Lekárska Fakulta Univerzity Palackého v Olomouci.

Táto práca bola realizovaná za podpory grantu IGA UP: LF_2023_007 a CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868 (ENoch) grantovou podporou.

V Olomouci,.....

.....

Bc. Adela Papiková

POĎAKOVANIE

Chcela by som sa poďakovať mojej vedúcej práce Mgr. Zdenke Navrátilovej, Ph.D. za vedenie, ochotu a usmernenie pri písaní diplomovej práce.

Taktiež by som sa chcela poďakovať prof. MUDr. Martinovi Petřekovi, CSc. za umožnenie robiť výskum na Ústave patologickej fyziológie LF UP v Olomouci.

PodĎakovanie patrí aj mojej rodine a priateľovi za poskytnuté zázemie a podporu počas celého štúdia a taktiež pri písaní tejto diplomovej práce.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CIELE PRÁCE	2
3	LITERÁRNY PREHLAD	3
3.1	Chronická bronchitída	3
3.1.1	Epidemiológia a prevalencia	3
3.1.2	Patogenéza	4
3.1.3	Rizikové a vyvolávajúce faktory	5
3.1.4	Príznaky	5
3.1.5	Vyšetrenie	6
3.1.6	Liečba	6
3.2	Chronická obštrukčná choroba pľúc	7
3.2.1	Epidemiológia a prevalencia	8
3.2.2	Patogenéza	8
3.2.3	Rizikové a vyvolávajúce faktory	11
3.2.4	Príznaky	12
3.2.5	Vyšetrenie	13
3.2.6	Prevenencia	16
3.2.7	Liečba	16
3.3	Pomocné T _h lymfocyty	20
3.3.1	IL-23	21
3.3.2	IL-17A a IL-17F	22
3.4	Th-17 imunitná odpoveď pri CHOCHP	24
4	MATERIÁL A METÓDY	26
4.1	Biologický materiál	26
4.2	Použité chemikálie, kity a roztoky	28

4.3	Zoznam použitých prístrojov a zariadení.....	29
4.4	Metódy	30
4.4.1	RNA izolácia.....	30
4.4.2	Reverzná transkripcia	32
4.4.3	Kvantitatívna PCR.....	33
5	VÝSLEDKY	35
6	DISKUSIA.....	37
7	ZÁVER	42
8	POUŽITÁ LITERATÚRA	43

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

AAT	α 1-antitrypsin
BAL	bronchoalveolárna laváž
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBA	prietoková cytometria (angl. Cytometric Bead Array)
CCL	chemokínový (C-C motív) ligand (angl. chemokine (C-C motif) Ligand)
CXCL	chemokínový (C-X-C motív) ligand (angl. chemokine (C-X-C motif) Ligand)
CXCR	chemokínový receptor CXC (angl. CXC chemokine Receptors)
DEPC	diethylpyrokarbonát
DLCO	difúzna kapacita pľúc pre CO (angl. Diffusing Capacity Of The Lungs For Carbon Monoxide)
ELISA	enzýmovo značená imunoanalýza (angl. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
FEV	úsilne vydýchnutý objem (angl. Forced Expiratory Volume)
FVC	úsilná vitálna kapacita pľúc (angl. Forced Vital Capacity)
GOLD	Globálna iniciatíva pre chronickú obštrukčnú chorobu pľúc (angl. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease)
CHB	chronická bronchitída
CHOHP	chronická obštrukčná choroba pľúc
ICS	inhalačné kortikoidy (angl. Inhaled Corticosteroids)
IL	interleukín
JAK	Janus kináza
LABA	dlhodobo pôsobiaci beta-agonista (angl. Long-Acting Beta-Agonist)
LAMA	dlhodobo pôsobiaci muskarínový antagonist (angl. Long-Acting Muscarinic Antagonist)
MMP9	matrixová metaloproteináza – 9

NPPV	neinvazívna ventilácia pozitívnym tlakom (Noninvasive Positive-Pressure Ventilation)
PBS	fosfátový pufer (angl. Phosphate-Buffered Saline)
PCR	polymerázová reťazová reakcia (angl. Polymerase Chain Reaction)
RANK	receptorový aktivátor jadrového faktora kapp-β (angl. Receptor Activator of Nuclear factor Kappa- β)
RANKL	receptorový aktivátor ligandu jadrového faktoru kapp-β (angl. Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-β Ligand)
RT-qPCR	kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkripciou (angl. Reverse Transcription quantitative real-time PCR)
RV	reziduálny objem (angl. Residual Volume)
SABA	krátkodobo pôsobiaci beta-agonista(angl. Short-Acting Beta-Agonist)
STAT	prevodník signálu a aktivátor transkripčných proteínov (angl. Signal Transducer and Activator of Transcription proteins)
TCR	T-bunkový receptor (angl. T-Cell Receptor)
TGFβ	transformujúci rastový faktor β (angl. Transforming Growth Factor β)
TLC	celková kapacita pľúc (angl. Total Lung Capacity)
TNF	tumor nekrotizujúci faktor
TYK	tyrozín kináza

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Priedušky pri chronickej bronchitíde oproti zdravým prieduškám.....	4
Obrázok 2: Príčiny limitácie prietoku vzduchu v dýchacích cestách	7
Obrázok 3: 10 hlavných príčin celosvetových úmrtí	8
Obrázok 4: Patogenéza CHOCHP.	10
Obrázok 5: Štruktúra cytokínov IL-12 a IL-23 a receptorov.....	21
Obrázok 6: Molekulárny model heteroméneho 1:1:1 IL-17RA: IL-17RC: IL-17 (A, F alebo A/F) komplexu.	23
Obrázok 7: T _H 17 imunitná odpoveď pri stabilnej chronickej obštrukčnej chorobe pľúc.	25
Obrázok 8: Prehľad postupu mirVana™ miRNA Isolation Kit..	31
Obrázok 9: Relatívna expresia IL-23.....	35
Obrázok 10: Relatívna expresia IL-17A.....	36
Obrázok 11: Relatívna expresia IL-17F.....	36

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Klasifikácia CHOCHP podľa závažnosti (GOLD 2022)	14
Tabuľka 2: Podskupiny T _h pomocných lymfocytov.	20
Tabuľka 3: Klinická charakteristika pacientov s chronickou bronchitídou a chronickou obštrukčnou chorobou pľúc.	26
Tabuľka 4: Subcelulárny profil bronchoalveolárnej laváže.....	27
Tabuľka 5: Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu mRNA.	32
Tabuľka 6: Teplotné podmienky reverznej transkripcie.....	32
Tabuľka 7: Zloženie reakčnej zmesi pre PCR reakciu.	33
Tabuľka 8: Podmienky kvantitatívnej PCR.	33
Tabuľka 9 Porovnanie relatívnej expresie génov IL-23, IL-17A a IL-17F pri chronickej obštrukčnej chorobe pľúc.....	40

1 ÚVOD

Fajčenie tabaku je najčastejšou príčinou chronickej bronchitídy a chronickej obštrukčnej choroby pľúc (CHOCHP) v ČR. Typickým znakom u CHOCHP je obštrukcia dýchacích ciest, ktorá chýba u pacientov s chronickou bronchitídou. Chronická bronchitída je definovaná ako chronický produktívny kašeľ, ktorý trvá minimálne 3 mesiace v dvoch po sebe nasledujúcich rokoch. Pričom sú vylúčené iné možné príčiny kašľa.

Obe ochorenia sú spojené so zápalom. Chronická neobštrukčná bronchitída môže prejsť do obštrukčnej formy a vtedy dochádza k zmenám, ktoré vedú k zúženiu lumenu priedušiek a tým k obštrukčnej poruche prúdenia vzduchu.

V doposiaľ vykonaných štúdiách bola meraná expresia IL-17A, IL-17F a IL-23 pri CHOCHP, ktoré zistili zvýšené hladiny všetkých uvedených génov v porovnaní so zdravými ľuďmi. Žiadna zo štúdií sa nezamerala na stanovenie rozdielu expresie medzi pacientami s CHOCHP a CHB. Preto je praktická časť zameraná práve na stanovenie expresie medzi týmito dvomi skupinami pacientov. V teoretickej časti sú zhrnuté základné poznatky o CHB, CHOCHP a T_h-17 imunitnej odpovedi.

2 CIELE PRÁCE

1. Úloha T_h -17 imunitnej odpovede u CHOCHP, literárna rešerš zameraná na IL-23, IL-17A a IL-17F.
2. Stanovenie expresie dvoch kľúčových členov T_h -17 imunitnej rodiny a stimulačného faktoru IL-23, u pacientov s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc a chronickou bronchitídou.

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 Chronická bronchitída

Chronickú bronchitídu (CHB) charakterizoval už v roku 1814 Dr. Charles Badham, ako „Kašeľ ktorý pretrváva mnoho týždňov alebo mesiacov pacienti majú problém s dýchaním, pocit ťažoby alebo chvenia sputa je zvyčajne veľa, je viskózne a lepivé.“ [Badham 1814] .

Dnes je chronická bronchitída definovaná ako chronický produktívny kašeľ, ktorý trvá minimálne 3 mesiace v dvoch po sebe nasledujúcich rokoch. Pričom sú vylúčené iné možné príčiny kašľa. Táto definícia sa používa už desaťročia a stala sa zlatým štandardom.

Chronická bronchitída sa delí na dva typy:

- **Neobštrukčná chronická bronchitída** obvykle vymizne sama po odstránení príčinného faktoru (fajčenie, prach). Lekár v závislosti od príznakov navrhne terapiu (napr. odvykanie od cigariet, zmena zamestnania). Progresii ochorenia a ďalším komplikáciám je týmto spôsobom možné predísť.
- **Obštrukčná chronická bronchitída** je jednou zo zložiek chronickej obštrukčnej choroby pľúc. Pri chronickej obštrukčnej bronchitíde sú dýchacie cesty trvalo zúžené a ochorenie sa vyvíja veľa rokov. Po prejavení príznakov, nemožno terapiou vzniknuté poškodenie úplne zvrátiť. Možno však zabrániť ďalšej progresii ochorenia.

3.1.1 Epidemiológia a prevalencia

Prevalencia chronickej bronchitídy sa vo svete líši, avšak v bežnej populácii sa pohybuje približne v rozmedzí od 3,4% do 22% [Kim 2013]. Hoci sa CHB javí ako bežné ochorenie, presnú prevalenciu je ťažké určiť kvôli rôznym definíciám v lekárskej literatúre. Toto ochorenie sa častejšie vyskytuje u mužov, pričom tvoria 2/3 celkového počtu pacientov s CHB. Výskyt ochorenia u pacientov stúpa aj so zvyšujúcim sa vekom [Dotan 2019; Ferré 2012]. Najčastejšie sa chronická bronchitída vyskytuje u mužov vo

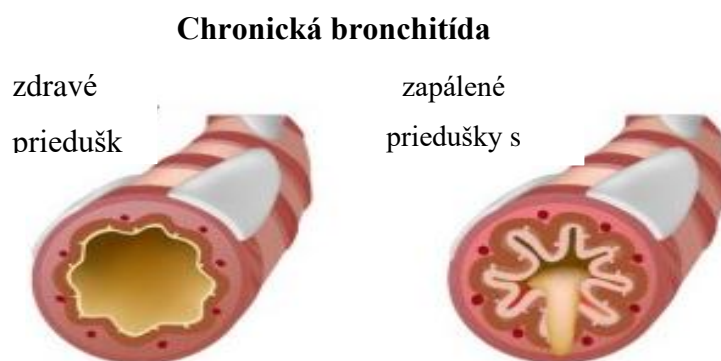
veku 50-59 rokov. U žien je to vo veku 40-49 rokov. Ochorenie sa vo vysokej miere vyskytuje u fajčiarov.

3.1.2 Patogenéza

Chronická bronchitída je charakterizovaná zápalom sliznice dýchacích ciest a zároveň sú v sliznici zmnožené a hypertrofované hlienové žliazky a teda dochádza k zvýšeniu sekrécie hlienu (Obrázok 1).

Poškodenie dýchacích ciest je komplexné a je spôsobené hlavne priamym účinkom cigaretového dymu. Narušenie je spôsobené aj mediátormi (napr. IL-8, prozápalové cytokíny) uvoľňovanými zo zápalových buniek a to všetko za podpory pôsobenia oxidačného stresu. U pacientov s CHB je v dýchacích cestách zvýšené množstvo neutrofilov. Akumulácia zápalových leukocytov v pľúcach je základným prvkom obrannej reakcie a charakteristickým znakom poškodenia pľúc [Nelson 2000]. Opakované expozície škodlivým látkam spôsobujú zápal dýchacích ciest, čo vedie k zvýšenej produkcii sputa až k patologickým zmenám v dýchacích cestách [Malesker 2020]. Sliznica dýchacích ciest produkuje väčšie množstvo sputa, ako ochranu pred pôsobením škodlivých látok. Chronická bronchitída sa teda prejavuje ako kašeľ, ktorým je toto nadmerné množstvo hlienu vylučované [Nelson 2000]. Taktiež sa zvyšuje viskozita bronchiálnych sekrétov, je narušený mukociliárny transport a aj čistiaca a ochranná funkcia pľúc, čo prispieva k chronickému zápalu sliznice.

Dochádza tiež k porušeniu produkcie lyzozýmu a iných látok s antibakteriálnym účinkom [Widysanto 2023].



Obrázok 1: Priedušky pri chronickej bronchitíde oproti zdravým prieduškám. Pri chronickej bronchitíde je prítomný zápal a zvýšená sekréciou hlienu [Prevzané a upravené z: https://www.physio-pedia.com/Chronic_Bronchitis (navštívené 27.3.2023)].

Chronická neobštrukčná bronchitída môže prejsť do obštrukčnej formy a vtedy dochádza k zmenám, ktoré vedú k zúženiu lumenu priedušiek a tým k obštrukčnej poruche prúdenia vzduchu.

3.1.3 Rizikové a vyvolávajúce faktory

Medzi hlavný rizikový faktor spôsobujúci rozvoj chronickej bronchitídy môžeme zaradiť fajčenie. Podľa McConnell a kol. majú aj elektronické cigarety vplyv na zvýšený výskyt bronchitických symptómov. Výpary z elektrických cigariet vyvolávajú oxidačný stres, zápal a znižujú životaschopnosť buniek [McConnell 2017].

Častými pacientami s chronickou bronchitídou sú ľudia, ktorí pracujú ako baníci, ktorí ťažia uhlie a rudu či iné nerasty, a taktiež aj výrobcovia betónu. Títo ľudia sú denne vystavený prachu a látkam znečisťujúcim prostredie. Ďalší faktor spôsobujúci rozvoj chronickej bronchitídy je chov dobytky. Chovatelia a farmári sú viac vystavený zvýšeným hladinám alergénov, pesticídov či zvieracím plynom [Mamane 2015].

Znečistené ovzdušie, používanie tuhého paliva na kúrenie a varenie má tiež súvislosť s výskytom CHB [Kurmi 2010].

Bakteriálne (napr. *Staphylococcus*, *Streptococcus*) a vírusové (vírus chrípky typu A,B) infekcie spôsobujú zvyčajne akútnu bronchitídu, ale opakované vystavenie týmto infekciám môže vyvolať chronickú bronchitídu. Na rozvoji CHB má podiel aj výskyt pridružených ochorení akými sú astma alebo cystická fibróza [Widysanto 2023].

3.1.4 Príznaky

Medzi hlavné príznaky chronickej bronchitídy patrí kašeľ, vykašliavanie hlienu alebo problém s dýchaním. Chronický kašeľ spôsobený CHB spôsobuje výrazné zhoršenie kvality života [Malesker 2020]. Kašeľ sa objavuje často ráno po spánku a je sprevádzaný výskytom slizovitého sputa. Môže k nemu dochádzať aj večer, v horších prípadoch aj počas celého dňa. Kašeľ slúži ako ochranný mechanizmus, vďaka ktorému sa odstraňuje prebytok bronchiálneho sekrétu. Intenzívny kašeľ u pacientov môže spôsobovať po určitom čase malátnosť, bolesť hrudníka alebo brucha. CHB prebieha vo vlnách zhoršení a zlepšení [Mejza 2017].

Prítomnosť chronickej obštrukčnej bronchitídy spôsobuje zhoršenie prúdenia vzduchu a zhoršenie funkcie pľúc. Chronická hypersekrécia hlienu je spojená s poklesom

FEV₁ [Mejza 2017]. Množstvo sputa sa zvyšuje a kašeľ sa stáva intenzívnejší. Začína sa objavovať aj dýchavičnosť, najskôr po fyzickej námahe a neskôr aj v kľude.

3.1.5 Vyšetrenie

Základom je určenie anamnézy a doplnenie fyzikálneho vyšetrenia.

V anamnéze sa zisťuje, či je daný pacient fajčiar, alebo je vystavený iným iritujúcim faktorom. Taktiež je potrebné zistiť, či sa u neho vyskytuje produktívny kašeľ a následne množstvo a farba sputa.

Dodatočne sa môže vykonať testovanie funkcie pľúc, röntgen hrudníka alebo vyšetrenie sputa či krvi. Pri testovaní funkcie pľúc získame informácie o vitálnej kapacite pľúc, dychovom objeme aj celkovej kapacite pľúc. Tieto poznatky umožnia posúdenie funkcie pľúc. Pomocou röntgenu je možné potvrdiť výskyt chronickej bronchitídy a vylúčiť pritom iné ochorenie dýchacích ciest [Widysanto 2023]. Kultiváciou sputa je možné vylúčiť v prípade podozrenia výskyt bakteriálnej infekcie.

3.1.6 Liečba

Hlavným cieľom liečby chronickej bronchitídy je zmierniť symptómy, zabrániť komplikáciám a spomaliť progresiu ochorenia. Primárne sa terapia zameriava na zníženie nadprodukcie hlienu, kontrolu zápalu a zníženie kašľa. Toho možno dosiahnuť buď farmakologickou alebo nefarmakologickou liečbou [Dotan 2019].

Za nefarmakologickú liečbu sa považuje odvyknutie od fajčenia, prípadne zmena zamestnania či prostredia, v ktorom sa nachádzajú iritujúce látky. Následne dôjde k zlepšeniu mukocilárnej funkcie a zníži sa hyperplázia pohárikových buniek.

Pri farmakologickej liečbe môžu byť podávané bronchodilatátory, ktoré podporujú odstraňovanie hlienu zvýšením lumenového priemeru dýchacích ciest. Patria tu parasymptolytika alebo β_2 -mimetiká [Dotan 2019]. Glukokortikoidy sa používajú na znižovanie zápalu a tvorby sputa. Podávajú sa však krátkodobo, pretože pri dlhodobej terapii by mohli vyvolať osteoporózu či hypertenziu. Známe sú aj inhibítory fosfodiesterázy 4, ktoré znižujú zápal a podporujú relaxáciu hladkého svalstva dýchacích ciest. Pôsobia tak, že bránia hydrolyze cyklického adenosínmonofosfátu, ktorý by sa následne degradoval a došlo by k uvoľneniu zápalových mediátorov [Widysanto 2023].

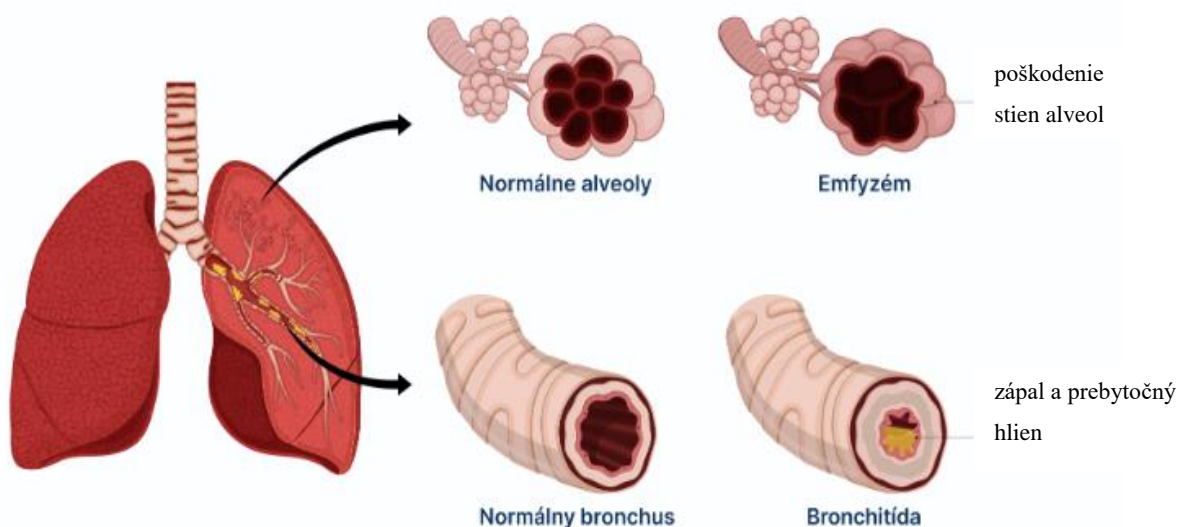
3.2 Chronická obštrukčná choroba pľúc

Chronická obštrukčná choroba pľúc (CHOCHP) predstavuje epidemiologicky závažnú chorobnú jednotku, ktorá je charakterizovaná poruchou priechodnosti vzduchu v prieduškách a bronchiolách, tzv. bronchiálnou obštrukciou [Spurzem 2005]. Toto ochorenie predstavuje významnú ekonomickú záťaž z hľadiska priamych nákladov na zdravotnú starostlivosť a nepriamych nákladov, ako je strata produktivity a predčasná smrť [Roche 2013; Nakamura 2017].

CHOCHP má väčšinou progresívny charakter a ide o abnormálnu chronickú odpoveď dolných dýchacích ciest a pľúc na škodlivé častice, alebo plyny inhalované z okolitého prostredia. Rýchlosť progresie a typ poškodenia môžu byť u každého pacienta variabilné. Príčiny limitácie prietoku v dýchacích cestách sú kombináciou emfyzému a chronickej obštrukčnej bronchitídy (Obrázok 2) [Koblížek 2017; Rozborilová 2005].

Emfyzém je charakterizovaný ako trvalé, abnormálne rozšírenie dýchacích ciest, periférne od bronchiol. Je spojený s poškodením pľúcneho tkaniva a s nahromadením vzduchu v pľúcach. Dochádza k poškodeniu pľúcnych mechúrikov, ktoré sa spájajú, a tak sa znižuje plocha, ktorá je potrebná k výmene plynov. Výsledkom toho je znížená ventilácia, ako dôsledok ubudnutia zdravého pľúcneho tkaniva [Rozborilová 2005].

Chronická bronchitída je definovaná ako zápalové ochorenie dýchacích ciest, kde je prítomný produktívny kašeľ minimálne 3 mesiace dva po sebe nasledujúce roky.



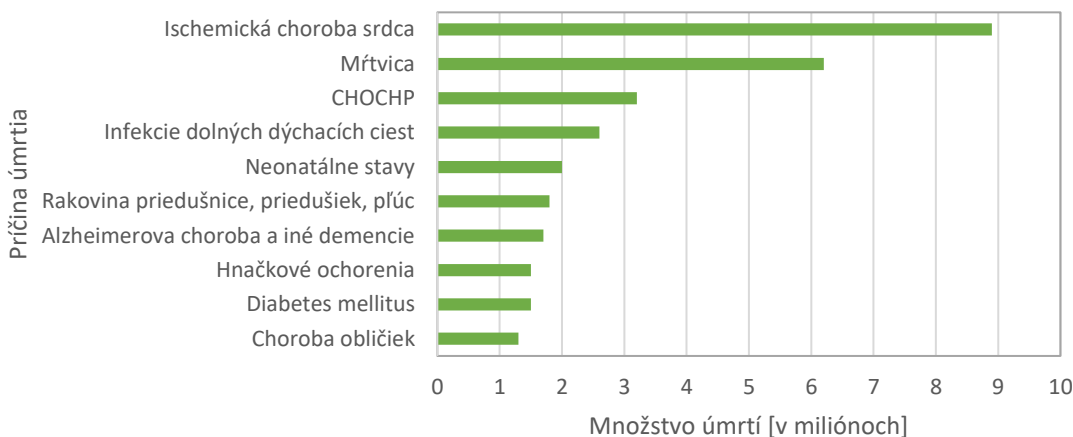
Obrázok 2: Príčiny limitácie prietoku vzduchu v dýchacích cestách [Prevzaté a upravené z: <https://lekarodporuca.sk/pneumologia/chronicka-obstrukcna-choroba-pluc-prevencia-diagnostika-a-liecba> (navštívené 14.3.2023)].

3.2.1 Epidemiológia a prevalencia

Bolo zistené, že v roku 2019 malo CHOCHP na celom svete približne 392 miliónov ľudí, vo vekovom rozmedzí od 30 do 79 rokov. Z tohto množstva, bolo v Európe 36 miliónov ľudí s CHOCHP a najvyššie zastúpenie bolo zistené u ľudí vo veku 60 až 75 rokov [Adeloye 2022]. CHOCHP je podľa Svetovej zdravotníckej organizácie, radená na tretie miesto, čo sa týka príčin úmrtia na svete, ako je vidieť na Obrázku 3.

Celosvetová prevalencia stále stúpa a ešte nedosiahla svojho vrcholu, keďže najvýznamnejší faktor determinujúci zvýšený výskyt CHOCHP, ktorým je fajčenie, má stále stúpajúci trend.

CHOCHP je takmer výhradne ochorenie dospelých a prevalencia sa s vekom zvyšuje. Taktiež k tomu dopomáha absencia symptómov, hlavne na začiatku ochorenia.



Obrázok 3: 10 hlavných príčin celosvetových úmrtí (Prebrané a upravené z <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>) [navštívené 28. januára 2023].

Kým v minulosti sa toto ochorenie týkalo najmä mužov, momentálne sa výskyt u mužov a žien vyrovnáva. Vplyv na to môže mať jednak stúpajúci počet žien-fajčiarok, ako aj to, že dýchacie cesty u žien sú na škodlivé účinky dymu citlivejšie [Kášák 2006].

3.2.2 Patogenéza

Na patogenéze CHOCHP sa podieľa v prvej rade pretrvávajúci zápal s oxidačným stresom a s poškodením rovnováhy proteázového a antiproteázového systému (Obrázok 4). Dochádza k zmenám pľúcneho parenchýmu a priedušiek. Taktiež vzniká

porucha mukociliárneho transportu. Konečným výsledkom je vznik respiračnej insuficiencie.

Zápal vzniká ako reakcia na vystavenie toxickým látkam, ktoré sú inhalované (napr. tabakový dym). Ak dôjde k poškodeniu obranných a reparačných mechanizmov, nasleduje aj poškodenie tkaniva a porucha jeho funkcie. Zápal u CHOCHP pretrváva a mení sa jeho intenzita. Keďže u CHOCHP sa jedná o ochorenie, ktoré dlhšiu dobu prebieha bez príznakov, býva často neskoro diagnostikované. Intenzita zápalu a ostatných patogenetických zmien je rozvinutá natoľko, že ani po eliminácii škodlivín zápal neustúpi, ako je tomu pri iných chronických zápalových ochoreniach.

Hlavné zápalové elementy sú neutrofilny, makrofágy a riadiacimi bunkami imunitného systému sú T-lymfocyty (subpopulácia CD4⁺). Mediátori uvoľnené z aktivovaných buniek ako leukotriény, interleukíny či TNF sú zodpovedné za poškodenie pľúcnych štruktúr. Koncentrácia aktivovaných neutrofilov sa zvyšuje a tie secernujú neutrofilnú elastázu a proteinázu-3. Ich pôsobením dochádza k deštrukcii pľúcneho parenchymu a ovplyvňujú mukóznú sekréciu. Ako chemoatraktanty pre neutrofilny pôsobia IL-8 a leukotrien (B4) [Rozborilová 2005; Kašák 2006]. Ďalším interleukínom je IL-23, ktorý je dôležitý pre diferenciáciu T_h17 buniek a predlžuje expresiu cytokínov týchto buniek, medzi ktoré patria aj IL-17A či IL-17F.

Po aktivácii T_h17 buniek, produkovaný IL-17A podporuje progresiu zápalových procesov tým, že indukuje expresiu veľkého množstva zápalových faktorov. To môže viesť k stavom ako znížená flexibilita či fibróza tkaniva [Liu 2021].

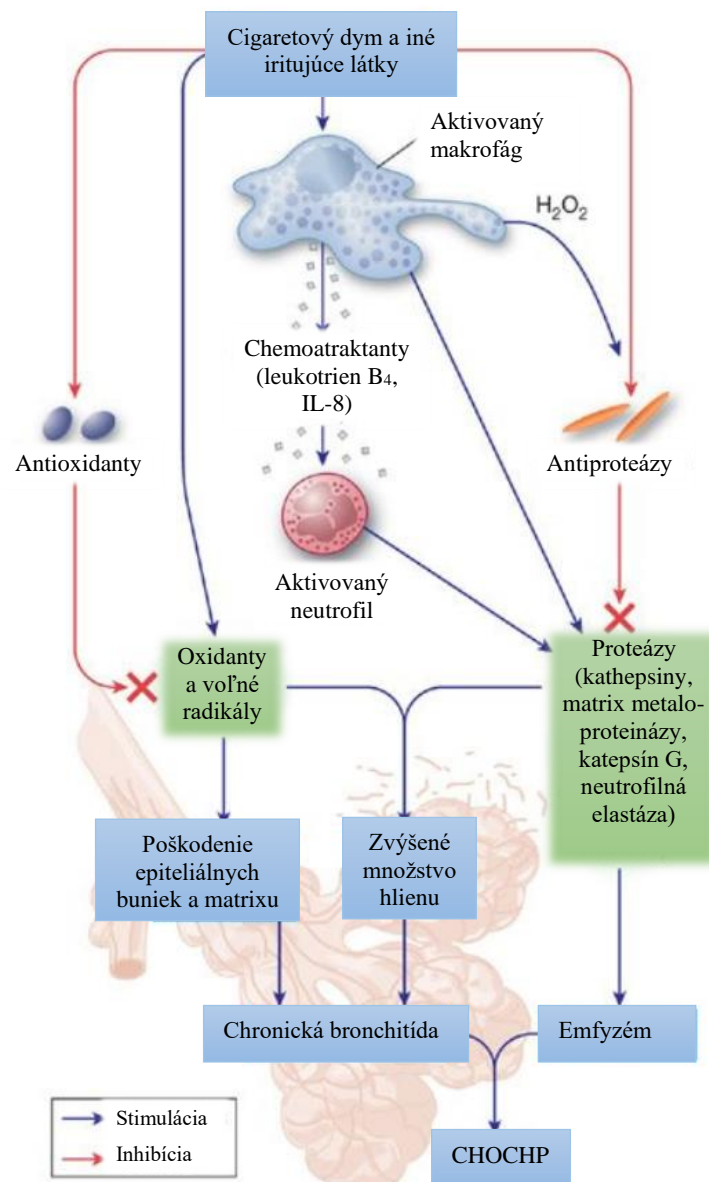
Dysbalancia medzi proteázovým a antiproteázovým systémom vedie k vzniku pľúcneho emfyzému. Táto dysbalancia môže byť vyvolaná ako na genetickom podklade, tak aj pôsobením zápalových buniek a ich mediátorov.

Ďalším dôležitým faktorom, ktorý zohráva úlohu pri patogenéze CHOCHP je oxidačný stres. V každom ťahu takákového dymu je 10¹⁷ molekúl voľných radikálov a oxidantov, ktoré vedú k aktivácii zápalových buniek [Kašák 2006].

Po vystavení inhalačným iritáciám dochádza k hypertrofii mukózných žliazok a zvýšeniu počtu pohárikových buniek. Cylindrický epitel má poškodené riasinky a dochádza k premene tohto typu tkaniva na dlaždicový epitel, čo zhoršuje mukociliárny transport [Kašák 2006; Rozborilová 2005]. Dochádza k nadprodukcii hlienu, ktorý sa hromadí v dýchacích cestách a to môže zvyšovať pravdepodobnosť opakovaných

respiračných infekcií. Zhorší sa slizničná imunita a dýchacie cesty môžu byť ľahšie kolonizované baktériami, čiže celkovo poklesne aj funkcia pľúc.

Vznik fibrotického tkaniva, oklúzia lumenu hlienovitými zátkami, hyperplázia pohárikových buniek a hypertrofia hladkých svalov sú zmeny, ku ktorým dochádza v dýchacích cestách. Tieto zmeny vedú k zhrubnutiu steny ciev a zúženiu prievitu a tým aj k zníženiu prietoku vzduchu. Remodelácia pľúcnych ciev (hyperplázia intimi, fibróza ciev) môže mať za následok vznik hypertenzie až *cor pulmonale*.



Obrázok 4: Patogenéza CHOCHP. Fajčenie stimuluje bunky, aby uvoľnili chemotaktické látky, ktoré dostávajú zápalové bunky do pľúc. K aktivácii zápalových buniek prispievajú oxidanty a radikály z dymu. V periférnych tkanivách dochádza k hromadeniu zápalových buniek a poškodeniu antiproteázového systému. Proteinázy a oxidanty poškodzujú extracelulárny matrix steny alveol a bronchiol a ovplyvňujú mukóznú sekréciu [Prevzaté a upravené od Senior a kol. 2015].

3.2.3 Rizikové a vyvolávajúce faktory

Príčiny vzniku CHOCHP sú multifaktoriálne a nie sú jednoznačne stanovené. Rizikové faktory môžeme rozdeliť do dvoch skupín, a to na exogénne a endogénne faktory. Tieto skupiny sa navzájom prelínajú.

Exogenné faktory

Za hlavný faktor vzniku, rozvoja a progresie ochorenia sa považuje fajčenie [Cook 2019]. Podľa Svetovej zdravotníckej organizácie vo svete fajčí približne 1,3 miliardy ľudí. Na ochorenia, ktoré súvisia s fajčením ročne umiera okolo 8 miliónov ľudí. Riziko CHOCHP u fajčiarov súvisí s počtom vyfajčených cigariet a zároveň s vekom, v ktorom osoba začala fajčiť. Okrem cigariet nepriaznivo pôsobia aj fajky či znečistené ovzdušie. Vo vnútornom prostredí môže byť ovzdušie znečistené kvôli využívaniu biomasy na kúrenie a pri varení, v slabo vetranej miestnosti. Ďalším faktorom, ktorý sa podieľa na vzniku CHOCHP je znečistené životné alebo pracovné prostredie. Spolupodieľať na vzniku ochorenia sa môžu anorganické častice, ako kremičitý a uhoľný prach, taktiež prach z rôznych kovov a cementu. Za nevhodné plynné zložky v ovzduší sa považuje smog, sírovodík, chlór a organické častice (plesne, baktérie). Častou príčinou vzniku ochorenia sú aj opakované a nedoliečené zápal dýchacích ciest [Rozborilová 2005]. Aj nízka pôrodná hmotnosť dieťaťa a zlý socio-ekonomický status rodiny, môže prispieť k vzniku ochorenia. Dokázaný je aj vzťah k nutričným faktorom. Nedostatok antioxidantných vitamínov (A, C a E) spolu s nedostatkom nenasýtených mastných kyselín a k tomu zvýšený obsah solí, môžu byť spojené s obštrukciou dýchacích ciest.

Endogenné faktory

Aj keď fajčenie predstavuje hlavný exogénny faktor, na vzniku a rozvoji CHOCHP sa môže podieľať aj genetická predispozícia. Jedinci s touto predispozíciou majú nízke hodnoty α 1-antitrypsinu (AAT) [Rozborilová, 2005]. AAT je glykoprotein syntetizovaný v pečeni, ktorý pôsobí ako cirkulujúci inhibítor sérových proteáz. AAT chráni pľúcny elastín tým, že blokuje pôsobenie neutrofilnej elastázy a zabraňuje poškodeniu, ktoré môže viesť k panlobulárnemu emfyzému. Elastín ako hlavná komponenta alveolárnych stien, je hlavným cieľom pre pôsobenie neutrofilnej elastázy. Ak dôjde k jeho deštrukcii a degradácii, už ho nie je možné reštaurovať. Fragmenty elastínu následne pôsobia ako chemoatraktanty pre neutrofilie a makrofágy. Neutrofilná elastáza a neutrofilná proteáza-3 ovplyvňujú hypersekréciu hlienu, čím dochádza k tvorbe hlienu a hypertrofii hlienových žliazok.

U pacientov, ktorých hladina AAT klesne pod 10% (0,78 – 2,0 g/l) normálnej hodnoty, dochádza k rozvoju emfyzému. Tento emfyzém je postupne zhoršovaný pôsobením cigaretového dymu. Podiel deficitu AAT na celkovom vzniku CHOCHP, je iba 1% [Drugdová 2011; Kašák 2006].

3.2.4 Príznaky

CHOCHP predstavuje klinický prejav zmien v štruktúre a funkcii alveolárneho tkaniva a malých dýchacích ciest. Podieľa sa na mnohých procesoch na úrovni tkanív a buniek, vrátane zápalu, apoptózy, zmeneného fenotypu pľúcnych buniek a prestavby extracelulárnej matrix [Senior 2015]. Na týchto procesoch sa podieľajú mnohé mediátory, najmä proteínázy, oxidanty a cytokíny. K hlavným príznakom CHOCHP patrí dýchavičnosť, kašeľ, tvorba sputa či sipot. Tieto symptómy majú značný vplyv na život pacientov, hlavne u pacientov s ťažkou formou CHOCHP [Kessler 2011; Roche 2013; Cook 2019]. Medzi nešpecifické príznaky sa radí únava, úbytok váhy, tusigenná synkopa či *cor pulmonale*. Subjektívne ťažkosti predchádzajú funkčným poruchám pľúc [Rozborilová 2005]. K nešpecifickým príznakom tohto ochorenia patria aj tlak na hrudníku či pískanie. Pacienti majú častejší výskyt zápalov dýchacích ciest, čo vo výsledku vedie k zhoršeniu ochorenia s následným obmedzením fyzickej aktivity, kvôli celkovej slabosti [Drugdová 2011].

Ako je uvedené v článku Kessler a kol., symptómy CHOCHP vnímané pacientami, sa menia ako počas dňa, tak aj v jednotlivých dňoch týždňa [Kessler 2011]. Tento fakt je spojený s rôznou intenzitou aktivity počas dňa, a taktiež aj počas týždňa. Ráno je považované za najhoršiu časť dňa, ako vyplýva z odpovedí pacientov v prieskumoch [Kessler 2011; Partridge 2009]. Za druhú kritickú časť je považovaná noc.

Najčastejším príznakom býva dýchavičnosť, ktorá je nasledovaná tvorbou sputa a kašľom. Dýchavičnosť je prvotný príznak, kvôli ktorému väčšina pacientov vyhľadá lekársku pomoc [Senior 2015]. Dýchavičnosť nepriaznivo ovplyvňuje pracovnú schopnosť, čím obmedzuje pacienta a môže sa spojovať s úzkosťou. Najskôr k nej dochádza pri väčšej fyzickej námahe, následne sa objavuje aj pri bežných denných aktivitách. V horších prípadoch sa vyskytuje aj v prípade, ak je pacient v kľude. Chronický kašeľ je prvým zo znakov rozvíjajúcej sa CHOCHP [Kašák 2006]. Kašeľ môže byť spočiatku len občasný a suchý alebo spojený s vykašliavaním hlienu. Pacienti

vykašliavajú hlien hlavne ráno [Roche 2013]. Môže dochádzať k jeho zintenzívneniu a vyskytuje sa u pacienta počas celého dňa a postupne prechádza aj do nočného kašľa.

Väčšina pacientov s CHOCHP si nie je vedomá svojho stavu, a to vedie k významnému oneskoreniu v diagnostike, ako aj v postupe v liečbe.

3.2.5 Vyšetrenie

Pre diagnostiku CHOCHP má najväčší význam podrobná anamnéza a spirometrické vyšetrenie pľúc.

V anamnéze je nutné zisťovať, či bol pacient vystavený rizikovým faktorom, akými sú napríklad fajčenie (dĺžka fajčenia, počet cigariet) či znečistené ovzdušie. Dôležitá je aj anamnéza týkajúca sa ranného veku, založená na informáciách o pôrodnej váhe, predčasnom narodení, astme, alergiách alebo aj o infekciách dýchacích ciest v detstve. Zisťuje sa aj rodinná anamnéza spojená s CHOCHP a výskyt komorbidít ako srdcová choroba a osteoporóza, ktoré môžu obmedziť aktivitu.

Fyzikálne vyšetrenie

Pri fyzikálnom vyšetrení vieme zistiť výskyt známk bronchiálnej obštrukcie ako piskot, predĺžený výdych, tachykardia či namáhavé zrýchlené dýchanie [Rozborilová 2005]. Neprítomnosť týchto príznakov, však nevylučuje prítomnosť ochorenia. Iba na samostatnom fyzikálnom vyšetrení nemôžeme zakladať stanovenie diagnózy. Výskyt obštrukcie je zjavný v prípade, keď už došlo k významnému poškodeniu pľúc. Toto vyšetrenie nie je dostatočne senzitívne a špecifické, preto v začiatkoch ochorenia nemá veľkú výpovednú hodnotu [Kašák 2006; GOLD 2022].

Funkčné vyšetrenie pľúc

Vyšetrenie funkcie pľúc umožňuje overiť diagnózu CHOCHP. Na základe výsledkov je možné určiť závažnosť a monitorovať CHOCHP, vrátane sledovania odpovede na liečbu. Funkciu pľúc môžeme vyšetřovať pomocou spirometrie, meraním objemu pľúc a určením difúznej kapacity pľúc pre oxid uhoľnatý [Lee 2017].

Spirometria je najdôležitejšie vyšetrenie na stanovenie diagnózy. Je zlatým štandardom, pretože je reprodukovateľná, štandardizovaná a je to objektívny spôsob pre meranie prietoku v prieduškách [GOLD 2022]. Pomocou spirometrie sa vyšetřuje úsilná vitálna kapacita pľúc (FVC) a úsilne vydýchnutý objem za prvú sekundu (FEV₁).

Pomerom týchto dvoch hodnôt FEV₁ a FVC sa vypočíta percentuálny podiel (FEV₁/FVC). Za zníženie FEV₁/FVC sa u ľudí do 50 rokov, považuje hodnota pod 75% a u ľudí nad 50 rokov je to 70% [Kašák 2006; Nakamura 2017]. Podľa GOLD klasifikácie CHOCHP (Tabuľka 1), sa za preukázanie obštrukcie považuje hodnota FEV₁/FVC menšia ako 70%.

Ďalším parametrom, ktorý je dôležitý pre určenie obštrukcie v dýchacích cestách a je rôzny pri jednotlivých štádiách CHOCHP je úsilne vydýchnutý objem za 1. sekundu (FEV₁). Ako je vidieť v Tabuľke 1, znížená hodnota FEV₁ súvisí so závažnejším štádiom CHOCHP. Znížená hodnota FEV₁, však indikuje až závažnejšiu obštrukciu dýchacích ciest, a tak pomocou tejto hodnoty nevieme zistiť vznik obštrukcie v počiatočnej fáze v periférnych oblastiach [Kašák 2006; Rozborilová 2005; GOLD 2022].

Tabuľka 1: Klasifikácia CHOCHP podľa závažnosti (GOLD 2022)

Štádium	Charakteristika
0: Pacienti v riziku CHOCHP	normálne výsledky pri spirometrii
I: Ľahká CHOCHP	FEV ₁ /FVC <70% FEV ₁ ≥ 80% z referenčnej hodnoty
II: Stredne ťažká CHOCHP	FEV ₁ /FVC <70% 50% > FEV ₁ < 80% z referenčnej hodnoty
III: Ťažká CHOCHP	FEV ₁ /FVC <70% 30% > FEV ₁ < 50% z referenčnej hodnoty
IV: Veľmi ťažká CHOCHP	FEV ₁ /FVC <70% FEV ₁ < 30% alebo chronické respiračné zlyhanie či zlyhanie srdca

Reverzibilita poruchy sa v rámci funkčného vyšetrenia pľúc dokazuje bronchodilatačnými testami. Medzi najčastejšie používané bronchodilatačné látky patria β₂-mimetiká alebo anticholinergiká. Ak stúpne FEV₁ o viac ako 15% alebo o 200ml oproti bazálnej hodnote, považujeme výsledok za pozitívny.

Okrem spirometrie je možné merať aj objem pľúc. Zisťuje sa celková kapacita pľúc (TLC) a reziduálny objem (RV) [Lee 2017]. Najpoužívanejšou metódou je celotelová pletysmografia, ktorou vieme odmerať zmenu TLC, ktorá vzniká pri CHOCHP. Jednou z patológií CHOCHP je emfyzém, pri ktorom dochádza k poruche pľúcneho tkaniva, čo vedie k strate elasticity. Strata elastického návratu vedie k natiahnutiu pľúc do abnormálne veľkého objemu s následným zvýšením TLC.

Pomocou tejto metódy sa dá zistiť aj nárast RV, ku ktorému dochádza už v skorom štádiu CHOCHP.

Tretou možnosťou vyšetrenia funkcie pľúc je určenie toho, ako ľahko sú molekuly oxidu uhoľnatého (CO) prenášané z alveolárneho plynu do hemoglobínu červených krviniek v pľúcnom obehú [Lee 2017]. Jedná sa o difúziu kapacitu pľúc pre CO (DLCO). Pri meraní sa pacient nadýchne malého množstva CO a zadrží dych po dobu 10 sekúnd. Následne sa zmena koncentrácie vydýchnutého CO vynásobí s TLC a vypočíta sa DLCO. Pokles DLCO je priamo úmerný poškodeniu alveol.

Ďalšie vyšetrenia

- **pulzná oxymetria a meranie arteriálnych plynov**

Oxymetria sa používa u pacientov so stabilnou CHOCHP a predpokladaným $FEV_1 < 35\%$ alebo s príznakmi, ktoré naznačujú respiračné zlyhanie. Ide o rýchle a neinvazívne meranie hodnoty saturácie krvi kyslíkom a pulzovej frekvencie srdca [Drugdová 2011]. Ak je nameraná saturácia menej ako 92%, dochádza k nedostatočnému okysličeniu krvi. V počiatočnom štádiu CHOCHP, arteriálne plyny vykazujú miernu hypoxémiu bez hyperkapnie. So zhoršujúcim sa štádiom ochorenia, dochádza aj k zhoršeniu hypoxémie, čo môže byť sprevádzané hyperkapniou.

- **nedostatočnosť α 1-antitripsinu**

Ak je nameraná sérová koncentrácia α 1-antitripsinu pod 15-20% normálnej hodnoty, môže mať pacient homozygotný deficit α 1-antitripsinu [Lee 2017]. Jedná sa o jedinú genetickú abnormalitu, ktorá zvyšuje riziko vzniku CHOCHP.

- **záťažový test**

Využíva sa pri hodnotení účinnosti pľúcnjej rehabilitácie a identifikácii faktorov, ktoré obmedzujú cvičenie [Lee 2017]. Vykonáva sa kardiopulmonálny záťažový test pomocou bežeckého pásu alebo 6 minútová chôdza.

3.2.6 Prevencia

Prevenciu CHOCHP možno rozdeliť do troch fáz:

1. primárna prevencia – zabránenie vzniku ochorenia
2. sekundárna prevencia – diagnostika a liečba ochorenia v skorých štádiách
3. terciárna prevencia – vhodná liečba prebiehajúceho ochorenia

Primárna prevencia je založená na zabránení pôsobenia rizikových faktorov spojených s CHOCHP na zdravých ľudí. Radí sa tu prísny zákaz fajčenia u žien v priebehu celej gravidity [Drugdová 2011]. Predstavuje aj elimináciu všetkých rizikových faktorov prostredia akými sú tabakový dym, znečistenie vzduchu či už v miestnosti alebo vonku. Radí sa tu aj profesionálna expozícia škodlivým látkam a ostatné aspekty, ktoré súvisia s vekom, pohlavím či povoláním.

Cieľovou skupinou sekundárnej prevencie sú pacienti s CHOCHP. Zámerom sekundárnej prevencie je diagnostikovať CHOCHP v počiatočnom štádiu a zabrániť ďalšej progresii ochorenia [Lee 2017]. Toto ochorenie je značne poddiagnostikované, pretože väčšina pacientov si neuvedomuje svoj stav a na vyšetrenie sa dostanú až pri vážnejších príznakoch.

Terciárna prevencia je zameraná na pacientov, ktorí už majú ochorenie CHOCHP. Zahŕňa kontrolu poklesu funkcie pľúc, zisťovanie príčiny a následne úpravu liečby podľa aktuálnej potreby. U niektorých pacientov nedochádza takmer k žiadnemu poklesu funkcie pľúc a naopak u iných je pokles razantný [Lee 2017]. Je potrebné objaviť biomarkery, ktoré pomôžu včas identifikovať túto skupinu.

3.2.7 Liečba

Liečba ochorenia CHOCHP je zameriavaná na zmiernenie symptómov, na zvýšenie tolerancie fyzickej námahy či celkové zlepšenie kvality života. Taktiež dopomáha k zmierneniu množstva a závažnosti exacerbácií. Žiadne z liečiv nedokáže chorobu vyliečiť [GOLD 2022].

Liečba by sa mala upravovať a zintenzívňovať v súlade s narastaním závažnosti ochorenia. Odpoveď na liečbu je individuálna, takže pacienti musia byť starostlivo monitorovaní.

Prvým krokom v liečbe CHOCHP je navrhnutie pacientovi, aby zanechal fajčenie a podanie pomoci pri odvykaní od fajčenia. Ďalšími krokmi sú farmakologická alebo nefarmakologická liečba.

Farmakologická liečba

- **využitie bronchodilatačných liekov**

Farmakoterapia sa opiera o podanie bronchodilatačných liekov, ktoré zvyšujú hodnotu FEV₁ a ďalších ventilačných parametrov [Bártů 2017, Laššán 2017]. Pacientom s minimálnymi alebo občasne sa vyskytujúcimi príznakmi v štádiu I, stačí podávanie krátkodobo pôsobiacich bronchodilatačných látok. Ide o β 2-agonistov (SABA), ktorých hlavným účinkom je relaxácia hladkého svalstva dýchacích ciest, skrze stimuláciu β 2-adrenergných receptorov. Tým sa zvyšuje cyklická adenosínmonofosfatáza a dochádza k bronchodilatácii. Účinok týchto liekov vyprší zvyčajne do 4 až 6 hodín. Pravidelné užívanie SABA zlepšuje FEV₁ a symptómy. Taktiež sa v tomto prvom štádiu podávajú aj antimuskarinové lieky s krátkodobým účinkom (SAMA). Spôsobujú blokáciu bronchokonstrikčného účinku acetylcholínu na muskarinový receptor. Tieto receptory sú exprimované v hladkom svalstve dýchacích ciest. Medzi krátkodobo pôsobiace antimuskarinové lieky patrí ipratropium alebo oxitropium [GOLD 2022].

V horších štádiách sú podávané dlhodobejšie pôsobiace bronchodilatačné lieky zo skupiny β 2-agonistov (LABA) a dlhodobo pôsobiace antimuskarinové prípravky (LAMA) [Bártů 2017]. Doba pôsobenia LABA je 12 a viac hodín. Ich pôsobením dochádza k zlepšeniu FEV₁, zmierneniu dýchavičnosti a znižuje sa počet exacerbácií. Patrí tu formoterol, oladaterol alebo indacaterol [GOLD 2022]. LAMA majú väčší vplyv na obmedzenie exacerbácií, oproti LABA.

Používa sa aj kombinovaná bronchodilatačná liečba, ktorá na základe kombinácie bronchodilatancií zlepšuje dilatáciu bronchiálnej obštrukcie.

- **využitie protizápalových liekov**

Protizápalové lieky sa používajú u pacientov s III. a IV. štádiom CHOCHP. Jedná sa o inhibítory fosfodiesterázy 4, ktoré spôsobujú zníženie zápalu tým, že inhibujú rozpad vnútrobunecného cAMP [Bártů 2017]. Cieľom liečby je zníženie frekvencie exacerbácií a zlepšenie hodnôt pľúc. Môžeme tu zaradiť roflumilast. Roflumilast nemá priamy bronchodilatačný účinok, ale spôsobuje zlepšenie funkcie pľúc (FEV₁ sa zvýši o 50-80ml). Zlepšuje symptóm, ktorým je dýchavica a znižuje riziko exacerbácií [Laššán 2017].

- **využitie inhalačných kortikoidov**

Inhalačné kortikoidy (ICS) sa samostatne nevyužívajú na dlhodobú liečbu. Podávajú sa v kombinácii s LABA [Laššán 2017]. Táto kombinácia LABA/ICS je účinnejšia ako monokomponenty a zoskupenie v jednom inhalátory prináša prospech aj pre pacienta, v rámci lepšieho komfortu. Prospech sa prejavuje zvýšením kvality života a zlepšením funkcie pľúc.

Nefarmakologická liečba

- **zanechanie fajčenia**

Zanechanie fajčenia je podmienkou pre úspešnú liečbu CHOCHP.

- **pľúcna rehabilitácia**

Ak bola rehabilitácia zahájená počas hospitalizácie s CHOCHP, alebo do 4 týždňov od prepustenia, došlo u pacientov k zníženiu úmrtnosti v porovnaní s pacientami, ktorí rehabilitáciu nepodstúpili [Rysø 2018].

- **kyslíková liečba**

Dlhodobá domáca oxygenoterapia s aplikáciou kyslíka po dobu viac ako 15 hodín denne spoločne s obmedzením fajčenia, predlžuje život pacientov s CHOCHP [Celli 2008].

- **neinvazívna ventilácia pozitívnym tlakom (NPPV)**

CHOCHP je spojená s poklesom funkcie pľúc a poruchami dýchania v spánku a nočnou hypoventiláciou [Bhatt 2013]. To vedie k hypoxémii a hyperkapnií. NPPV upokojuje preťažené dýchacie svaly a obnovuje centrálny dychový pohon u pacientov

s hyperkapniou. Bhatt a kol. zistili, že použitím NPPV dôjde k zlepšeniu PaO₂ a taktiež sa zlepši kvalita života.

- **operácia na zníženie objemu pľúc**

Je určená pacientom s CHOCHP, ktorí majú rozvinutý ťažký nehomogénny emfyzém pľúc s výraznými symptómami (dyspnoe), napriek optimálnej liečbe. Ideálny kandidát je pacient s ťažkým stupňom obštrukčnej ventilačnej poruchy, zníženou difúznou kapacitou pľúc, výraznejšími emfyzémovými zmenami v horných lalokoch a bez významnejších komorbidít [Matula 2010].

Medzi ďalšie spôsoby nefarmakologickej liečby sa radí aj transplantácia pľúc a fyzická aktivita či nastavenie správnej výživy. Využíva sa aj fyzioterapia hrudníka, ktorá u pacientov s CHOCHP napomáha odhlieňovaniu a zlepšuje ventiláciu pľúc, čím zmierňuje príznaky ochorenia [Drugdová 2011].

3.3 Pomocné T_h lymfocyty

T lymfocyty sa vyvíjajú z pluripotentnej kmeňovej bunky kostnej drene. Vzniká multipotentná kmeňová bunka tzv. lymfoidný prekursor. Ďalšou diferenciáciou sa z neho stane unipotentná kmeňová bunka pre T lymfocyty. Nezrelé T lymfocyty putujú do thymu, kde počas imunopatologických procesov dozrievajú, v určité T lymfocytárne klony. Na povrchu týchto klonov sa nachádza funkčný receptor a niekoľko koreceptorov. Príkladom receptora je TCR (T-Cell Receptor) a medzi koreceptory radíme CD3, CD4/CD8 alebo CD28.

Podľa typu koreceptoru CD4 alebo CD8, sú T lymfocyty delené do dvoch subpopulácií. Prvou sú cytotoxické T_c lymfocyty, ktoré majú CD8 koreceptor. Druhú subpopuláciu tvoria pomocné T_h lymfocyty, u ktorých sa nachádza CD4 koreceptor. Nazývajú sa aj CD4⁺ lymfocyty.

Pomocné T_h lymfocyty možno podľa produkcie cytokínov rozdeliť na T_h1, T_h2 a T_h17 lymfocyty (Tabuľka 2).

Tabuľka 2: Podskupiny T_h pomocných lymfocytov.

	T_h1	T_h2	T_h17
Efektorové molekuly	IL-2, TNF, IFN γ	IL-5, IL-6, IL-4, IL-10	IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26, TNF
Proximálne regulátory	IL-12, IL-18	IL-4, IL-25, IL-33	TGF β , IL-23, IL-6, IL-21

T_h1 lymfocyty produkujú predovšetkým IL-2 a IFN- γ a základnou úlohou je aktivácia makrofágov pri zápalových procesoch [Miossec 2012].

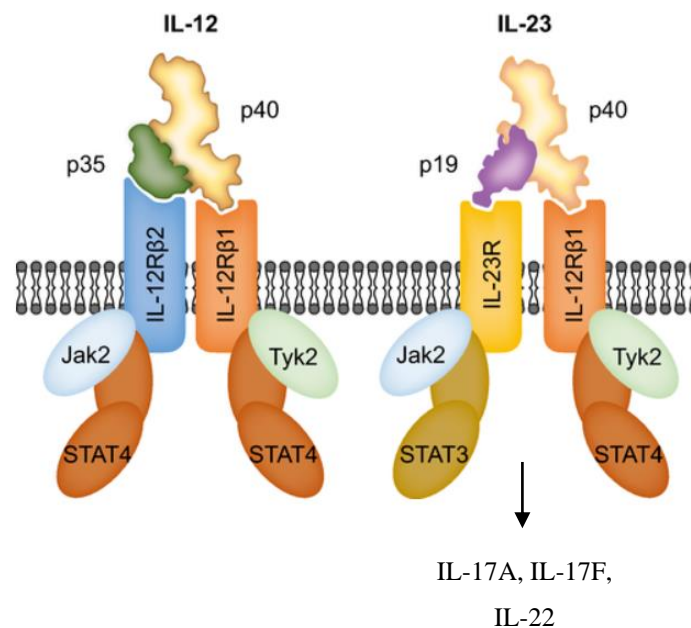
T_h2 lymfocyty uvoľňujú hlavne IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10 a ich uplatnenie je pri stimulácii B lymfocytov k produkcii protilátok na T lymfocytoch závislých.

T_h17 lymfocyty produkujú hlavne IL-17 a podieľajú sa na zápalových procesoch. Majú úlohu aj pri patologických autoimunitných ochoreniach a určitú rolu zohrávajú aj v patogenéze CHOCHP.

V nasledujúcich podkapitolách 3.3.1, 3.3.2 a 3.3.3 sa budem venovať interleukínom, ktoré súvisia s T_H17 lymfocytami. Pôjde o IL-23, ktorý ovplyvňuje T_H17 lymfocyty, ktoré následne produkujú ďalej zmienené IL-17A a IL-17F.

3.3.1 IL-23

Cytokín IL-23 patrí do rodiny IL-12, ktorá pozostáva zo 4 členov: IL-12, IL-23, IL-27 a IL-35. Tento interleukín bol pomenovaný v roku 2000, kedy sa prišlo na to, že kombináciou proteínových podjednotiek p40 a p19 vzniká nový, biologicky aktívny cytokín [Oppmann 2000]. IL-23 je teda heterodimér, ktorý je zložený z dvoch podjednotiek a to z jedinečnej podjednotky p19 a podjednotky p40, ktorá je súčasťou aj IL-12 (Obrázok 5). Obe tieto proteínové podjednotky sú spojené disulfidovou väzbou.



Obrázok 5: Štruktúra cytokínov IL-12 a IL-23 a receptorov. IL, interleukín; Jak, Janus kináza; R, receptor; STAT, prevodníky signálu a aktivátor transkripcie; Tyk, tyrozínkináza [Prevzaté a upravené z Ergen a kol.2018]

IL-23 sa viaže s vysokou afinitou na receptor IL-12Rβ1 skrze proteínovú podjednotku p40 a na receptor IL-23R je naviazaná p19 podjednotka. Po naviazaní dochádza k aktivácii TYK2, JAK2, STAT3 a STAT4, čím sú sprostredkované biologické účinky IL-23 na cieľové bunky [Sun 2015].

Stimulácia T_h buniek prostredníctvom IL-23 vedie k vzniku T_h17 subpopulácie a produkcii IL-17A, IL-17F či IL-22. V neprítomnosti IL-23 je vývoj T_h17 buniek neúplný. Ak chýba receptor (IL-23R) dochádza k narušeniu tvorby a dozrievania týchto buniek [McGeachy 2007]. Na IL-23 reagujú aj iné bunky ako napríklad $\gamma\delta T$ bunky, NK bunky alebo lymfoidné bunky čreva. To, že IL-23 interaguje aj s inými bunkami a stimuluje ich, je dôležité pri odolnosti voči infekciám, ako aj pri autoimunitnej patológii. Indukuje zápal, ktorý je väčšinou spojený s aktivitou IL-17 a IL-22.

IL-23 je ústredným prvkom patogenézy mnohých ochorení spojených so zápalom, medzi ktoré patrí psoriáza, skleróza multiplex, reumatoidná artritída alebo CHOCHP.

Tento interleukín, je jeden z najslubnejších cieľov na liečbu pacientov s chronickými zápalovými ochoreniami a niektorými typmi rakoviny, najmä kvôli jeho účasti na rozvoji T_h17 buniek [Floss 2015].

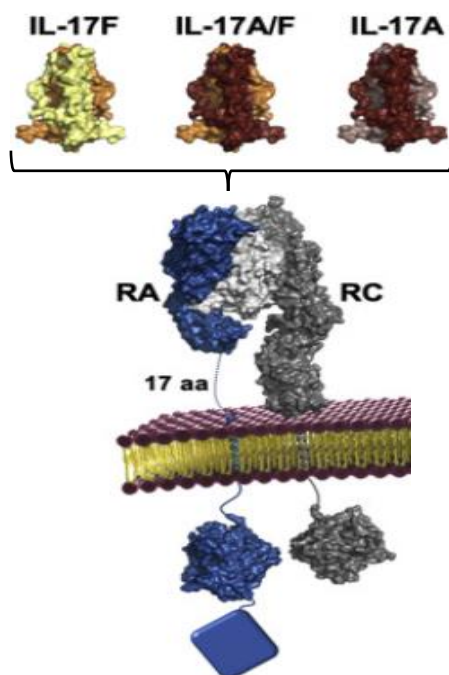
3.3.2 IL-17A a IL-17F

IL-17A aj IL-17F patria do rodiny, ktorá sa skladá zo 6 podtypov (IL-17A,B,C,D,E,F). Každý z podtypov sa viaže sa špecifický receptorový komplex z rodiny receptorov IL-17RA až IL-17RE [Ritzmann 2021; Pappu 2012].

IL-17A a IL-17F sú proteíny kódované génmi, ktoré sú lokalizované na 6. chromozóme blízko seba [Ishigame 2009]. Oba tieto interleukíny môžu byť sekretované vo forme homodimerov alebo vo forme heterodimerov (Obrázok 6). Homodimer je zložený buď z dvoch podjednotiek IL-17A alebo z dvoch podjednotiek IL-17F. Heterodimer obsahuje po jednej z oboch proteinových podjednotiek [Goepfert 2017]. IL-17F je vysoko homológny s interleukínom 17A.

Tieto dve molekuly sa viažu na rovnaké receptory, čo naznačuje, že dané cytokíny majú podobné biologické funkcie. Avšak väzbové afinity IL-17A a IL-17F k týmto receptorom sú rôzne, pretože IL-17A má vyššiu afinitu k receptoru IL-17RA a IL-17F má vyššiu afinitu k IL-17RC.

Jedná sa o prozápalové cytokíny, ktoré sú produkované aktivovanými T_h17 bunkami. IL-17A a IL-17F sú často exprimované spoločne. Oba tieto interleukíny sú produkované aj ďalšími vrodennými imunitnými bunkami ako napr. $\gamma\delta T$ bunkami, NK bunkami, panethovými bunkami či neutrofilmi [Cua 2010; Liu 2021].



Obrázok 6: Molekulárny model heteroméneho 1:1:1 IL-17RA: IL-17RC: IL-17 (A, F alebo A/F) komplexu. Cytokín naviazaný na receptor je znázornený svetlosivou, IL-17RA modrou a IL-17RC tmavosivou. Modrá čiara znázorňuje spojovaciu oblasť IL-17RA a intacelulárnu časť s doménou SERIF a CBAD (modrý štvorec) [Prevzaté a upravené od Goepfert a kol.2020].

Spomínané interleukíny majú dvojakú rolu. IL-17A a IL-17F chránia kožné a slizničné bariéry proti infekčným agens. Pôsobia na endotelové, epitelové bunky a fibroblasty. IL-17A môže rozšíriť úlohu imunitnej odpovede pri ochrane organizmu pred infekciami a podporovať opravu tkaniva. Interleukíny 17A a 17F zohrávajú úlohu pri aktivácii a migrácii neutrofilov. Ovplyvňujú sekréciu prozápalových cytokinov (IL-6, IL-1, TNF), chemokinov (CXCL1, IL-8, CCL2), matrixových metaloproteináz a antimikrobiálnych faktorov (defenzíny) [Yoshimoto 2014]. IL-17F je slabším induktorom expresie prozápalových cytokinov.

Na druhú stranu ich dysregulácia môže viesť k autoimunitným alebo alergickým reakciám. Nadmerná expresia IL-17F alebo IL-17A v pľúcach, vedie k zvýšenej expresii prozápalových cytokinov a chemokinov, čo vedie k zápalu spojenému s infiltráciou neutrofilov a taktiež k stavom, ako je znížená flexibilita tkaniva a tkanivová fibróza [Liu 2021]. IL-17A prispieva aj k patogenéze CHOCHP. Podporuje remodeláciu dýchacích ciest pri tomto ochorení, ktoré môže viesť k irreverzibilnej obštrukcii prietoku vzduchu. Remodeláciu môže tento interleukín podporovať buď inhibíciou bunkovej autofágie, ktorá súvisí so zápalom v pľúcnom tkanive alebo zvýšením TGF- β 1 [Liu 2021].

3.4 Th-17 imunitná odpoveď pri CHOCHP

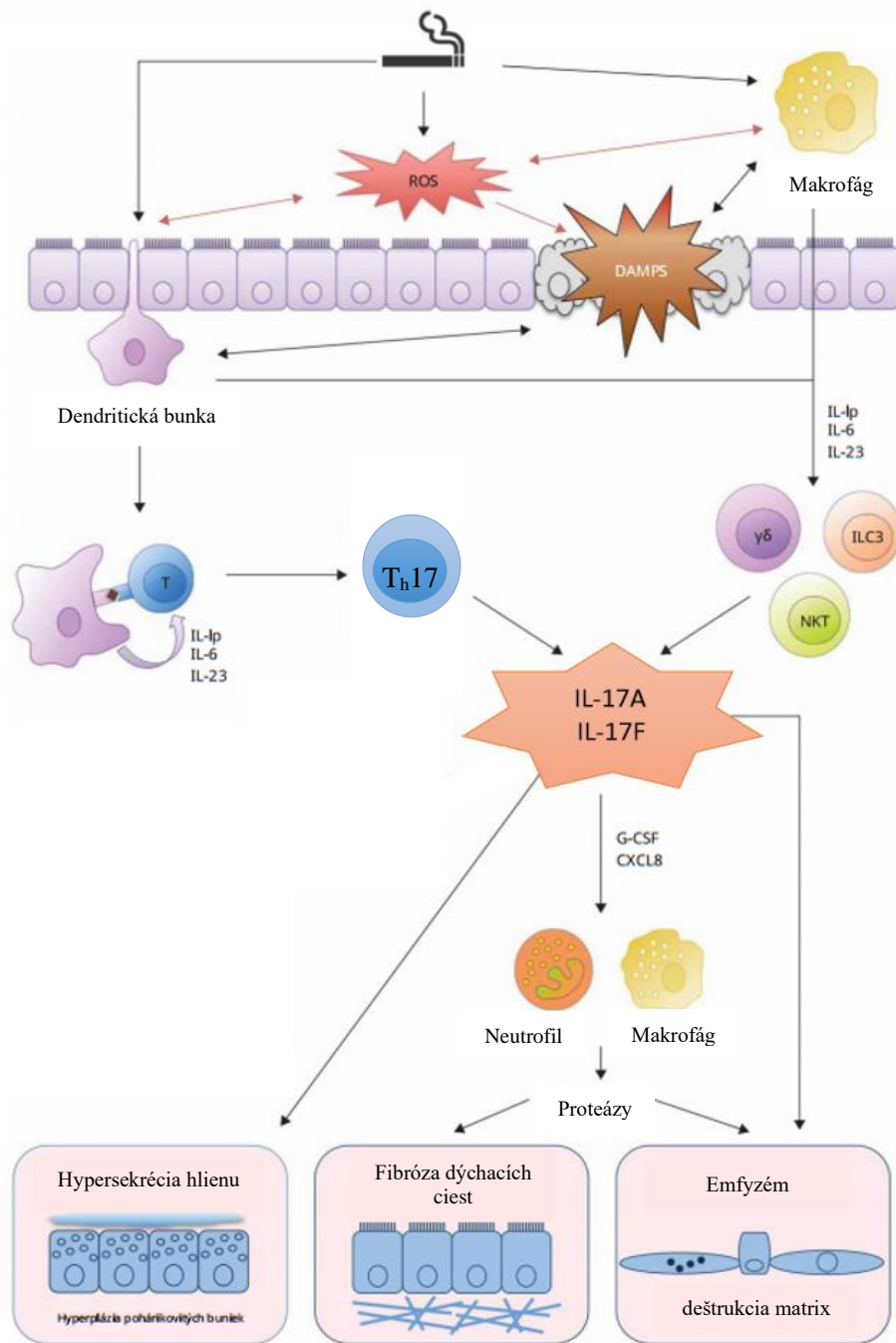
Po dlhodobom vystavení rizikovým faktorom, medzi ktoré patrí napríklad fajčenie, dochádza k aktivácii epitelových buniek a makrofágov, prostredníctvom voľných radikálov z dymu (Obrázok 7). Epitelové bunky a makrofágy uvoľnia chemotaktické látky, ktoré priťahujú zápalové bunky do pľúc.

Dochádza aj k aktivácii antigén prezentujúcich buniek, ktoré sa dostali do styku s antigénom a tie stimulujú T bunky. Stimulácia prebieha skrze IL-6, TGF- β , IL-21 a IL-23 [Le Rouzic 2017]. IL-23 sa viaže na vysoko afinitný receptor IL-23R, ktorý je exprimovaný na povrchu T_h buniek a tie následne stimuluje. Touto stimuláciou ovplyvňuje diferenciáciu T_h buniek na podskupinu T_h17 [Lee 2017]. Druhým potrebným interleukínom je IL-6, ktorý indukuje expresiu receptoru IL-23R na T_h bunkách [Yoshimoto 2014]. V neprítomnosti IL-23 alebo IL-23R, by bol vývoj T_h17 buniek neúplný a došlo by k narušeniu ich dozrievania [McGeachy 2007]. IL-23 je produkovaný aj aktivovanými makrofágmi a pôsobí aj na ďalšie bunky ako NK bunky, $\gamma\delta$ T bunky a vrodené lymfoidné bunky.

Po vzniku T_h17 buniek a ovplyvnení buniek vrodenej imunity, dochádza k sekrécii IL-17A, IL-17F či IL-22. Koncentrácie IL-17A v krvi pacientov s CHOCHP, bývajú vyššie v porovnaní so zdravými nefajčiarmi [Kubisheva 2020; Wang 2015; Gearhart 2017]. Sú to hlavné cytokíny, ktoré sa zapájajú do imunitnej odpovede.

IL-17 stimuluje signálnu kaskádu JAK/STAT3 a aj signálnu dráhu RANK/RANKL [Ma 2023]. Táto druhá dráha sa podieľa na zvýšení expresie matrixovej metaloproteinázy 9 (MMP9), čo vedie k zvýšeniu intenzity zápalu dýchacích ciest. MMP9 degraduje komponenty extracelulárnej matrix a to je jeden z dôvodov vzniku emfyzému.

Po aktivácii receptorov (IL-17RA), ktoré sa nachádzajú na bronchiálnych epitelových bunkách, sú sekretované neutrofilné chemotaktické faktory (IL-8, IL-6 a CXCL1) [Le Rouzic 2017]. Tieto faktory pôsobia na receptor CXCR2 a priťahujú neutrofile a monocyty. U pacientov bývajú hladiny IL-8 a CXCL1 v spute zvýšené. Zvýšené množstvo neutrofilov prispieva k patogenéze CHOCHP tým, že produkuje enzým neutrofilnú elastázu. Tá pôsobí proti extracelulárnej matrix a spôsobuje rozpad štruktúry pľúc a zväčšenie alveolárneho priestoru, čiže prispieva k vzniku emfyzému [Hong 2010]. Okrem toho môže spôsobiť aj hypersekréciu hlienu.



Obrázok 7: Th17 imunitná odpoveď pri stabilnej chronickej obštrukčnej chorobe pľúc. ROS: reaktívne formy kyslíka; DAMPS: molekulárne vzory spojené s poškodením; T: T-bunka; yδ :yδT-bunka; ILC3: vrodenná lymfoidná bunka typu 3; NKT: prirodzená zabíjачská T-bunka, G-CSF: faktor stimulujúci kolónie granulocytov; CXCL8: interleukín 8 [Prevzané a upravené od Le Rouzic 2017].

Epitelové bunky a makrofágy uvoľňujú po aktivácii transformujúci rastový faktor (TGFβ) a fibroblastové faktory. Tie spolu stimulujú proliferáciu fibroblastov, čo v konečnom dôsledku vedie k fibróze malých dýchacích ciest [Barnes 2009].

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologický materiál

Na hodnotenie relatívnej expresie IL-17A, IL-17F a IL-23 boli použité vzorky bronchoalveolárnej laváže (BAL) od 40 darcov. Darcovia pozostávali z pacientov s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc a chronickou bronchitídou. Pacienti s chronickou bronchitídou boli braný ako kontroly.

Všetky vzorky BAL boli získané od pacientov Kliniky respiračnej medicíny Fakultnej nemocnice v Olomouci, Česká republika. CHOCHP bola definovaná podľa kritérií Globálnej iniciatívy pre chronickú obštrukčnú chorobu pľúc [GOLD 2022].

Chronická bronchitída bola definovaná prítomnosťou kašľa a tvorby sputa počas najmenej 3 mesiacov v každom z dvoch po sebe nasledujúcich rokov podľa GOLD kritérií [GOLD 2022].

V Tabuľke 3 sú klinické charakteristiky pacientov a v Tabuľke 4 je subcelulárny profil bronchoalveolárnej laváže u pacientov s CHOCHP

Štúdia bola vykonaná so súhlasom Etických komisií LF UP a FN Olomouc. Od všetkých zaradených subjektov bol získaný informovaný súhlas s anonymným použitím vzoriek BAL na účely štúdie.

Tabuľka 3: Klinická charakteristika pacientov s chronickou bronchitídou a chronickou obštrukčnou chorobou pľúc.

	CHB	CHOCHP
N	20	20
Priemerný vek	40	55
Pohlavie (muži/ženy)	11/9	10/10
História fajčenia (ex fajčiari/ súčasní fajčiari)	10/10	10/10
Štádium (GOLD I/II/III/IV/NA)	NA	3/8/2/0/7

NA nie je dostupný

Tabuľka 4: Subcelulárny profil bronchoalveolárnej laváže.

	CHB	CHOCHP
Relatívny počet makrofágov (%)	80%	75%
Relatívny počet lymfocytov (%)	14%	14%
Relatívny počet neutrofilov (%)	5%	7%
Relatívny počet eozinofilov (%)	1%	4%

CHB,chronická bronchitída; CHOCHP,chronická obštrukčná choroba pľúc

4.2 Použité chemikálie, kity a roztoky

Použité chemikálie

- RNeasy Lysis Buffer™ stabilizačný roztok (Invitrogen™, katalógové číslo AM7020)
- Acid-Phenol: Chloroform, pH 4.5 (Invitrogen™, katalógové číslo AM9722)
- RNeasy Protect™ Rekombinantný Inhibitor Ribonukleázy (Invitrogen™, katalógové číslo 10777019)
- 100% Ethanol (Sigma-Aldrich, katalógové číslo E7023)
- RNeasy AWAY™ dekontaminačný prostriedok na povrchy (Thermo Scientific™, katalógové číslo 7000TS1)
- RNeasy-Free water (Qiagen, katalógové číslo 129112)
- TaqMan™ Fast advanced Master Mix (Applied Biosystems™, katalógové číslo 4444557)
- TaqMan™ Gene Expression Assay FAM (Applied Biosystems™, katalógové číslo 4351368)

Použité kity

- mirVana™ miRNA Isolation kit (Life technologies, katalógové číslo AM1561)
- SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, katalógové číslo 11754050)

Použité roztoky a ich príprava

- Pri príprave nového mirVana miRNA isolation kitu bolo k wash solution 1 pridaných 21ml 100% ethanolu. K wash solution 2/3 bolo pridaných 40 ml 100% ethanolu. Roztoky boli dôkladne premiešané a skladované pri 4°C
- PBS (pH 7,4) bol pripravený zmiešaním 8 g NaCl + 200 mg KCl + 1,44 g Na₂HPO₄ + 245 mg KH₂PO₄ . Následovalo rozpustenie v 800 ml destilovanej vody za stáleho miešania. Bola upravená hodnota pH a objem sa doplnil do 1000ml destilovanou vodou. Fľaša s PBS bola sterilizovaná pomocou DEPC a autoklávovaná.

4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

NanoDrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific
Chladená centrifuga Z300K	Hermle Labortechnik GmbH
Digitálna suchá kupeľ AccuBlock Mini	Labnet
Mini centrifuga c1301	Labnet
Spectrafuge 16M	Labnet
Termoblok 603/3	Auxilab
Termálny cyklér Rotor Gene 3000	Corbett Research
Mastercykler pro	Eppendorf
Laminárny box BSB 4A	Gelaire
Analyzátor REALIST DX	GeneTiCA
2D grafický a štatistický softvér GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc.

4.4 Metódy

4.4.1 RNA izolácia

Na izoláciu RNA z bronchoalveolárnej laváže, bola použitá *mirVana* miRNA izolačná súprava. Pred prácou s RNA, bol dôkladne vyčistený stôl a pomôcky pomocou prostriedku na povrchy RNase AWAY™, ktorý dekontaminoval RNázy. Samotná izolačná súprava sa nechala pre použitím ohriať pri izbovej teplote.

Príprava vzorky BAL

Ku vzorke, ktorá bola uchovaná v RNA later bolo pridaných 350µl PBS+DEPC. Následne sa vzorka s PBS+DEPC vortexovala 60 minút pri 4000g a 4°C.

Narušenie buniek

Po centrifugácií bol odstránený supernatant. K usadeným bunkám bolo pridaných 600µl lysis/binding solution a takto pripravená vzorka bola dôkladne zvortexovaná (Obrázok 8a).

Organická extrakcia

V tejto fáze bolo pridaných 60µl miRNA Homogenate additive. Po premiešaní sa nechala mikroskúmavka 10 minút na ľade. Následne bolo do mikroskúmavky pripipetovaných 600µl z dolnej fázy Acid- Phenol/Chloroformu (Obrázok 8b). Použil sa vortex a centrifúga. Mikroskúmavka bola centrifugovaná 5 minút pri 10 000g a izbovej teplote. Po centrifugácií bola vrchná vodná fáza odpipetovaná do novej mikroskúmavky.

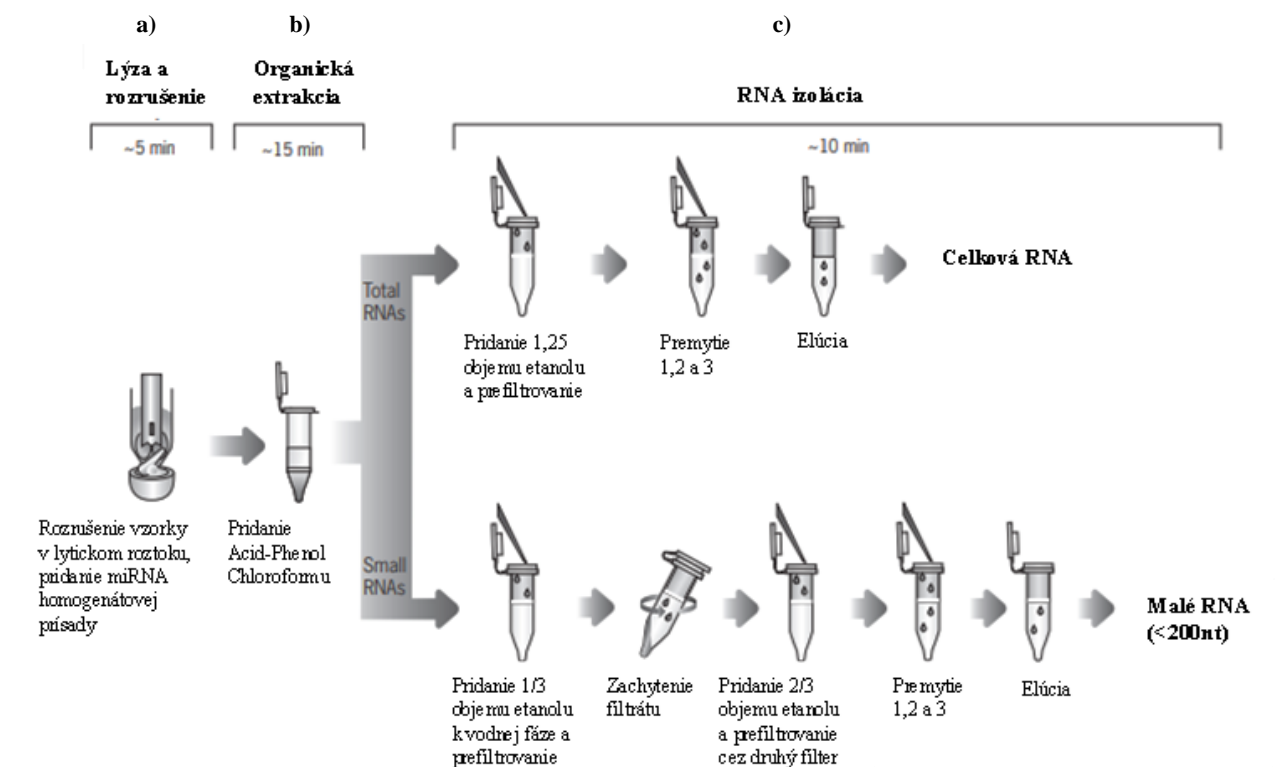
RNA izolácia

K vodnej fáze bolo pridaných 365µl 100% ethanolu (Obrázok 8c). Zmes lyzát/ethanol, ktorá mala 700µl, bola napipetovaná do mikroskúmavky s kolonkou. Mikroskúmavka bola centrifugovaná po dobu 15s pri 10 000g. Pretečená tekutina bola odpipetovaná a tento krok sa opakoval, kým cez kolonku neprešla celá vzorka. V ďalšom kroku sa na kolonku napipetovalo 700µl premývacieho roztoku 1 a kolonka bola centrifugovaná 10s pri 10 000g. Zo zbernej skúmavky bola odpipetovaná pretečená tekutina. Následne bolo na kolonku napipetovaných 500µl premývacieho roztoku 2/3 a spustila sa centrifugácia

na 10s pri 10 000g, tento krok sa opakoval 2 krát. Ďalej sa ešte centrifugovala kolonka bez roztoku po dobu 1 minúty, aby sa poriadne odstránila zvyšná tekutina.

Kolonka bola prenesená do novej mikroskúmavky. Na kolonku bolo napipetovaných 100µl RNaza free vody, ktorá bola ohriata na 95°C. Obsah sa centrifigoval pri 14 000g po dobu 30s.

Tým sa uvoľnila vyizolovaná RNA z kolónky do mikroskúmavky. Eluát bol zachytený a do 100µl RNA bolo pridaných 2µl RNasa OUT™ Rekombinant Ribonuclease Inhibitor. Vzorka bola uložená do -80°C, kde sa skladuje.



Obrázok 8: Prehľad postupu mirVana™ miRNA Isolation Kit. Na obrázku a) je znázornené narušenie buniek pomocou lysis/binding solution. V časti b) je zobrazený krok organickej extrakcie, za použitia Acid- Phenol/Chloroformu. Časť c) na obrázku znázorňuje samotnú RNA izoláciu [Prevzané a upravené z: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/fm_1560.pdf (dňa 27.3.2023)].

4.4.2 Reverzná transkripcia

Pri reverznej transkripcii bola použitá SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit. V prvom kroku sa nechali vzorky a zložky súpravy SuperScript VILO cDNA kitu rozpustiť a jemne sa premiešali. Do skúmavky, ktorá bola na ľade bol pripravený MasterMix bez RNA, podľa Tabuľky 5. Takto pripravený MasterMix sa premiešal.

Do nových skúmaviek uložených na ľade sa postupne napipetovalo po 6 μ l MasterMixu a pridalo sa 14 μ l RNA. Skúmavky boli jemne premiešané a nechali sa inkubovať v podmienkach, ktoré sú uvedené v Tabuľke 6.

Po ukončení inkubácie sa vzorky hneď uložili na ľad. Do nasledovného použitia boli vzorky skladované pri teplote -20°C.

Tabuľka 5: Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu mRNA.

Zložky	Množstvo na jednu reakciu
SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit	
5X VILO Reaction Mix	4 μ l
10X SuperScript Enzyme Mix	2 μ l
RNA templát	14 μ l
Celkom	20μl

Tabuľka 6: Teplotné podmienky reverznej transkripcie

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

4.4.3 Kvantitatívna PCR

Pred začatím kvantitatívnej PCR bola templatová cDNA nariadená u všetkých vzoriek na rovnakú koncentráciu a uchovávala sa pri -20°C.

Na ľade boli rozpustené jednotlivé nariadené vzorky cDNA a 20xTaqMan Gene Expression Assay a následne boli jemne zvortexované a krátko zcentrifugované. Podľa Tabuľky 7, bol pripravený PCR mix bez cDNA a na konci prípravy bol jemne premiešaný. Následne bolo rozpipetovaných po 18µl PCR mixu do skúmaviek a k nemu bolo pripipetovaných po 2µl cDNA. Takto pripravené vzorky boli vložené do analyzátora REALIST DX (GeneTiCA), kde prebehla PCR reakcia za podmienok, ktoré sú uvedené v Tabuľke 8.

Na posúdenie relatívnej expresie sa použil referenčný gén PSMB2 (Kriegova 2008).

Tabuľka 7: Zloženie reakčnej zmesi pre PCR reakciu.

Zložky	Množstvo na jednu reakciu
20xTaqMan	1 µl
TaqMan MasterMix	10 µl
RNase-free voda	7 µl
cDNA templát	2 µl
Celkom	20 µl

Tabuľka 8: Podmienky kvantitatívnej PCR.

Proces	Teplota	Čas	
Aktivácia polymerázy	50°C	2 min	40 cyklov
	95°C	10 min	
Denaturácia	95°C	15 sec	
Anelácia + predlžovanie	60°C	1 min	

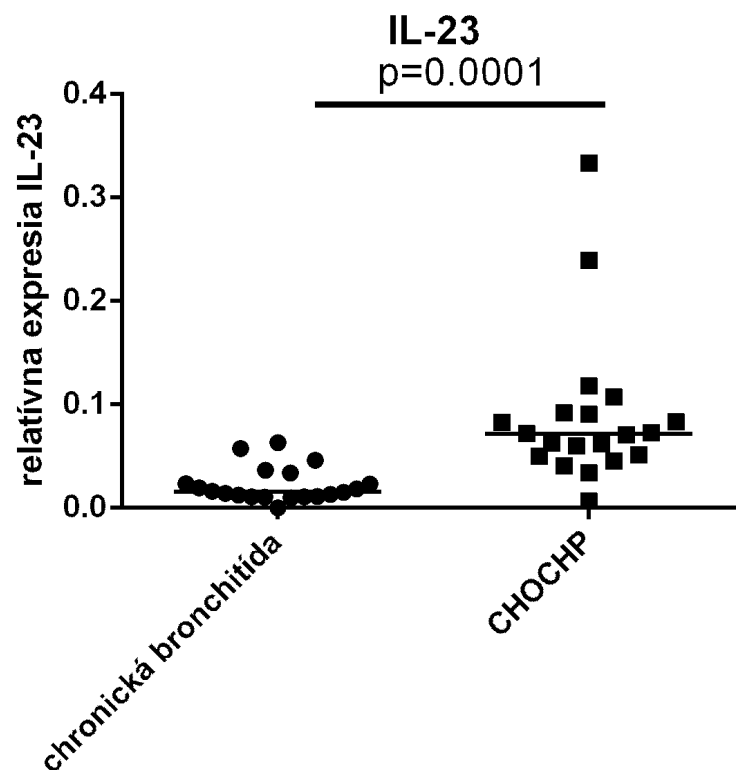
Štatistická analýza

Na štatistické vyhodnotenie výsledkov získaných laboratórnym stanovením relatívnej expresie IL-17A, IL-17F a IL-23 bol použitý neparametrický Man-Whitney test. Man-Whitney test sa používa na porovnávanie súborov štatistických dát, u ktorých nie je možné predpokladať normálne rozdelenie pravdepodobnosti sledovaného znaku. Hodnoty $p < 0.05$ boli považované za štatisticky významné. Na grafické zobrazenie výsledkov Man-Whitney testu bol použitý program GraphPad Prism.

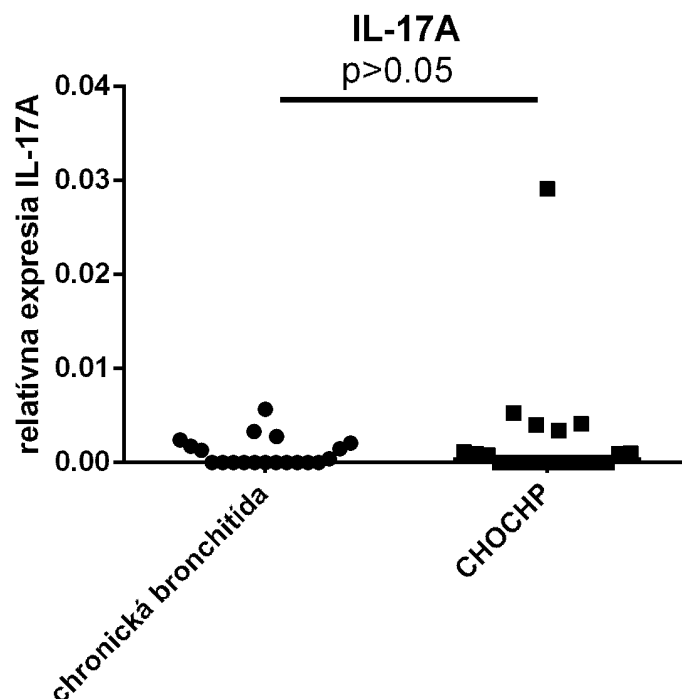
5 VÝSLEDKY

Na základe výsledkov získaných analýzou hodnôt expresie IL-23 (Obrázok 9) je možné skonštatovať, že hodnota expresie bola štatisticky významne zvýšená u pacientov s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc v porovnaní s pacientami s chronickou bronchitídou ($p = 0.0001$).

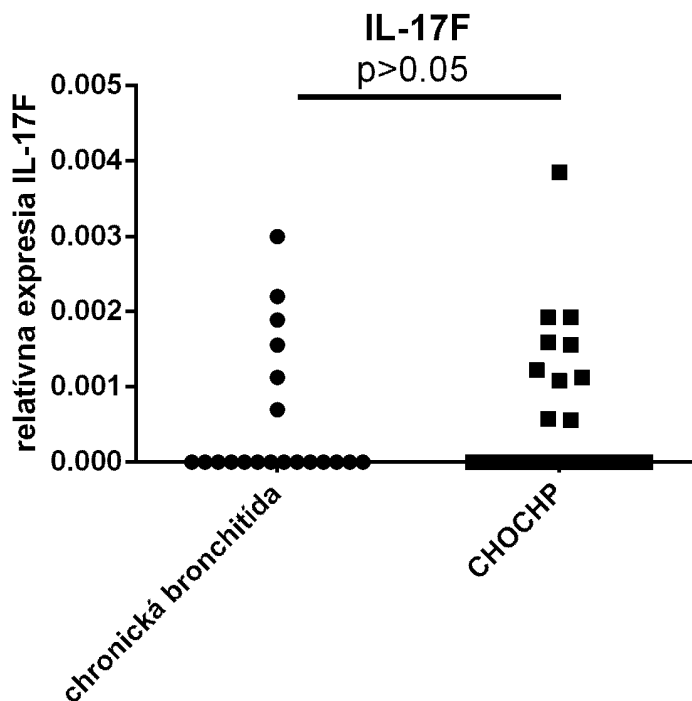
Analýzou výsledných hodnôt expresie IL-17A a IL-17F (Obrázok 10 a 11) sme zistili, že relatívna expresia nebola štatisticky významná pri porovnávaní pacientov s chronickou bronchitídou a CHOCHP ($p > 0.05$).



Obrázok 9: Relatívna expresia IL-23 u pacientov s chronickou bronchitídou [n=20] a CHOCHP – chronickou obštrukčnou chorobou pľúc [n=20].



Obrázok 10: Relatívna expresia IL-17A u pacientov s chronickou bronchitídou [n=20] a CHOCHP – chronickou obštrukčnou chorobou pľúc [n=20].



Obrázok 11: Relatívna expresia IL-17F u pacientov s chronickou bronchitídou [n=20] a CHOCHP – chronickou obštrukčnou chorobou pľúc [n=20].

6 DISKUSIA

Zistili sme, že expresia IL-23 v bronchoalveolárnej laváži, bola u pacientov s CHOCHP zvýšená. Ostatné nami stanovované gény T_h -17 imunitnej odpovede ako IL-17A a IL-17F u našich pacientov neboli deregulované. Výhodou našej práce je, že expresia IL-23, IL-17A a IL-17F bola porovnávaná s pacientami, ktorí mali chronickú bronchitídu. Išlo o symptomatické kontroly bez obštrukcie dýchacích ciest. U pacientov bola diagnostikovaná chronická bronchitída, ktorá je klinicky definovaná prítomnosťou produktívneho kašľa po dobu minimálne 3 mesiacov, počas 2 rokov nasledujúcich po sebe. Chronická bronchitída bez obštrukcie dýchacích ciest, bola podľa starých GOLD kritérií definovaná, ako najľahšie štádium CHOCHP. Súčasnú GOLD kritéria pre CHOCHP vyžadujú prítomnosť pľúcnej obštrukcie, ktorá je stanovená spirometricky ako pokles FEV_1 . Naš súbor pacientov toto kritérium spĺňa a porovnáva vybraných členov T_h -17 imunitnej odpovede s kontrolným súborom, ktorý má menej závažné postihnutie a normálnu funkciu pľúc. Doposiaľ publikované štúdie porovnávajú T_h -17 imunitnú odpoveď so zdravými kontrolami.

IL-23 bol pozorovaný v mnohých štúdiách [Moermans 2021; Gearhart 2017; Li 2021; Di Stefano 2009; Rong 2020; Wang 2015]. Zaznamenané bolo ako zvýšenie IL-23 [Di Stefano 2009; Rong 2020; Wang 2015; Gearhart 2017], tak aj to, že nedošlo k zmene expresie IL-23 [Moermans 2021; Gearhart 2017; Li 2021].

Štúdie použité v diskusii, ktorých prehľad je v Tabuľke 9, sa väčšinou zamerali na skúmanie vzoriek z periférnej krvi. Oproti tomu v tejto práci, je štúdium expresie génov detegované priamo v pľúcach, ktoré sú primárne postihnuté ochorením CHOCHP, čo môže byť považované za výhodu.

Iba niektoré práce sa zamerali na imunitnú odpoveď v pľúcach a poskytli kontroverzné výsledky. Dve práce [Moermans 2021; Li 2021], ktoré použili podobný princíp a skúmali sputum dospeli k rozdielnym výsledkom. Di Stefano a kol. študovali IL-23 vo vzorke bronchiálnej biopsie a ich výsledky sú v súlade s našimi [Di Stefano 2009].

Zvýšená hladina IL-23 bola nameraná u všetkých štúdií, ktoré detegovali hladinu cytokínov v sére na proteínovej úrovni [Rong 2020; Wang 2015; Antoniu 2017; Gearhart 2017; Ghosh 2020]. Aj nami lokálne meraná expresia cytokínu IL-23 v BAL bola zvýšená, čo naznačuje, že zápal pri CHOCHP má pôvod a pretrváva v pľúcach.

Biologická úloha IL-23 zahŕňa aktiváciu makrofágov, T lymfocytov a NK buniek. Tento interleukín sa považuje za regulátora T_H -17 imunitnej odpovede. V tejto práci boli stanovené expresie dvoch hlavných členov, ktoré sa účastnia na T_H -17 imunitnej odpovedi. Expresia IL-17A v bunkách bronchoalveolárnej laváže nebola u našich pacientov deregulovaná. Väčšina štúdií zaznamenala zvýšenie expresie IL-17A u pacientov s CHOCHP oproti zdravým kontrolám [Roos 2015; Imani 2016; Di Stefano 2009; Zhang 2013; Doe 2010; Li 2015; Kubisheva 2020; Wang 2015 a Gearhart 2017]. Naše výsledky sa môžu líšiť práve kvôli tomu, že iné štúdie pracovali so zdravými kontrolami a my sme mali ako kontrolu pacientov s CHB.

Našla sa aj štúdia, ktorej meranie je v súlade s našimi výsledkami. V tejto štúdií bola rovnako ako u nás použitá bronchoalveolárna laváž, ale hladina IL-17A sa stanovovala na proteínovej úrovni [Gaerhart 2017]. Zamerali sa v nej aj na stanovenie cytokínu IL-17A v sére a pri tomto type vzorky, bola nameraná zvýšená hladina. Použili však rozdielnu metódu a porovnávali hladinu IL-17A medzi pacientami s CHOCHP a zdravými kontrolami.

Viacere štúdie zistili zvýšenú hladinu cytokínu IL-17A analýzou sputa [Zhang 2013; Doe 2010; Li 2015]. Górska a kol. použili na analýzu taktiež sputum a rovnakú metódu, no nezistili zmenu v hladine daného cytokínu medzi pacientami s CHOCHP a zdravými kontrolami [Górska 2017].

Oproti tomu štúdie, ktoré sa zamerali na imunitnú odpoveď v pľúcach pri použití vzorky bronchiálnej biopsie alebo pľúcneho tkaniva mali totožný výsledok [Roos 2015; Imani 2016; Di Stefano 2009]. Aj keď použili rozdielne metódy detekcie, dospeli k záveru, že pri CHOCHP dochádza k zvýšeniu hladiny IL-17A u pacientov v porovnaní so zdravými kontrolami.

Pri použití bronchoalveolárnej laváže a vyhodnotením metódou RT-qPCR sme nedetegovali zvýšenie hladiny IL-17F. K rovnakému výsledku dospeli aj dve štúdie, ktoré sa taktiež zamerali na imunitnú odpoveď v pľúcach [Di Stefano 2009; Doe 2010]. K rozdielnemu výsledku dospeli Roos a kol. spolu s Wang a kol., ktorí detegovali zvýšenú hladinu IL-17F [Roos 2015; Wang 2015].

Na záver je možné povedať, že výsledky tejto práce sú v súlade s väčšinou doposiaľ vykonaných štúdií. Táto práca priniesla nové poznatky, pretože sa sústredila na rozdiely

medzi chronickou obštrukčnou chorobou pľúc a chronickou bronchitídou. Toto porovnanie poukazuje na úlohu IL-23 u obštrukcie pľúc. Hlavné členy T_h-17 imunitnej odpovede neboli u našich pacientov deregulované. Ďalšie štúdie by mali potvrdiť naše závery u väčšieho počtu pacientov.

Tabuľka 9: Porovnanie relatívnej expzie génov IL-23, IL-17A a IL-17F pri chronickej obštrukčnej chorobe pľúc.

Gén	Ochorenie	Expzia	Biologický materiál	n	Metódy	Autor
IL-23	CHOCHP	↑	Vzorka bronchiálnej biopsie	28	Imunohistochemia; RT-qPCR	Di Stefano <i>a kol.</i> 2009
		↑	Sputum	73	CBA	Li <i>a kol.</i> 2021
		—	Sputum	20	RT-qPCR	Moermans <i>a kol.</i> 2021
		—	BAL	31	Imunoanalýza	Gearhart <i>a kol.</i> 2017
		↑	Krv – sérum	92	ELISA	Rong <i>a kol.</i> 2020
		↑	Krv – sérum	65	ELISA	Wang <i>a kol.</i> 2015
		↑	Krv – sérum	16	ELISA	Antoniou <i>a kol.</i> 2017
		↑	Krv – sérum	31	Imunoanalýza	Gearhart <i>a kol.</i> 2017
		↑	Krv – sérum	62	Imunoanalýza	Ghosh <i>a kol.</i> 2020
IL-17F	CHOCHP	—	Vzorka bronchiálnej biopsie	28	Imunohistochemia	Di Stefano <i>a kol.</i> 2009
		↑	Vzorka pľúcneho tkaniva	30	Imunohistochemia	Roos <i>a kol.</i> 2015
		↑	Krv – sérum	36	ELISA	Wang <i>a kol.</i> 2021
		—	Sputum	27	ELISA	Doe <i>a kol.</i> 2010

Tabuľka 9: Pokračovanie

Gén	Ochorenie	Expresia	Biologický materiál	n	Metódy	Autor
IL-17A	CHOCHP	↑	Vzorka pľúcneho tkaniva	30	Imunohistochemia	Roos <i>a kol.</i> 2015
		↑	Vzorka bronchiálej biopsie	9	ELISA	Imani <i>a kol.</i> 2016
		↑	Vzorka bronchiálej biopsie	28	Imunohistochemia	Di Stefano <i>a kol.</i> 2009
		↑	Sputum	94	ELISA	Zhang <i>a kol.</i> 2013
		↑	Sputum	27	ELISA	Doe <i>a kol.</i> 2010
		↑	Sputum	21	ELISA	Li <i>a kol.</i> 2015
		—	Sputum	33	ELISA	Górska <i>a kol.</i> 2017
		↑	Krv – sérum	58	ELISA	Kubisheva <i>a kol.</i> 2020
		↑	Krv – sérum	65	ELISA	Wang <i>a kol.</i> 2015
		↑	Krv – sérum	31	Imunoanalýza	Gearhart <i>a kol.</i> 2017
—	BAL	31	Imunoanalýza	Gearhart <i>a kol.</i> 2017		

↑ zvýšená regulácia; – žiadny významný rozdiel; BAL bronchoalveolárna laváž; RT-qPCR kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkripciou; CBA prietoková cytometria; ELISA enzýmovo značená imunoanalýza

7 ZÁVER

Teoretická časť tejto diplomovej práce bola zameraná na charakterizáciu základných klinických poznatkov o chronickej bronchitíde a chronickej obštrukčnej chorobe pľúc. Chronická bronchitída je definovaná ako produktívny kašeľ, ktorý trvá minimálne 3 mesiace v dvoch po sebe nasledujúcich rokoch. Pričom sú vylúčené iné možné príčiny kašľa. Pri chronickej obštrukčnej chorobe pľúc je jedným z príznakov taktiež kašeľ, avšak v tomto prípade dochádza aj k obštrukcii dýchacích ciest a degradácii pľúcneho tkaniva. V teoretickej časti bola opísaná aj úloha T_H -17 imunitnej odpovede u CHOCHP a bola urobená literárna rešerš zameraná na základné poznatky o IL-23, IL-17A a IL-17F.

V praktickej časti diplomovej práce sme porovnávali hodnoty relatívnej expresie IL-17A, IL-17F a IL-23 u pacientov s CHOCHP a chronickou bronchitídou. Na stanovenie expresie sme použili vzorky bronchoalveolárnej laváže. Vzorky od pacientov s chronickou bronchitídou slúžili ako kontroly. Relatívna expresia IL-23 bola u pacientov s CHOCHP zvýšená oproti pacientom s chronickou bronchitídou. Hlavné členy T_H -17 imunitnej rodiny IL-17A a IL-17F neboli deregulované.

Táto práca rozširuje poznatky o expresii IL-23, IL-17A a IL-17F u pacientov s CHOCHP v porovnaní s pacientmi s chronickou bronchitídou. Tieto naše zistenia by mali byť potvrdené štúdiami s väčším počtom pacientov.

8 POUŽITÁ LITERATÚRA

Adeloye D., Song P., Zhu Y., Campbell H., Sheikh A. a Rudan I. (2022) Global, regional, and national prevalence of, and risk factors for, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in 2019: a systematic review and modelling analysis. *The Lancet. Respiratory Medicine* [online]. roč. 10, č. 5, s. 447–458. ISSN 2213-2619. Dostupné na: doi:10.1016/S2213-2600(21)00511-7

Antoniou S. A., Petrescu E., Stanescu R. a Boiculese L. (2017) Fatigue, Disease Burden and Autoimmune Systemic Inflammatory Biomarkers in Normoxemic COPD Patients: an Exploratory Analysis. *Medical Connections* [online]. roč. 41, č. 1/2017. ISSN 1843-9306. Dostupné na: doi:10.33311/medcon.2017.41.1.2

Badham Ch. a Henry D. (1814) An essay on bronchitis: with a supplement, containing remarks on simple pulmonary abscess & c. Dostupné na: <https://wellcomecollection.org/works/cncu67ha>

Barnes P. J. (2009) The Cytokine Network in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* [online]. roč. 41, č. 6, s. 631–638. ISSN 1044-1549, 1535-4989. Dostupné na: doi:10.1165/rcmb.2009-0220TR

Bártů V. (2017) Nové odporúčania GOLD pre chronickú obštrukčnú chorobu pľúc. *Farmakoterapia* [online]. roč. 7, č. 2, s. 134 –139. Dostupné na: https://www.farm-servis.cz/ext/files/article/5581/2_sk_ftp_01.pdf

Bhatt S. P., Peterson M. W., Wilson J. S. a Durairaj L. (2013) Noninvasive positive pressure ventilation in subjects with stable COPD: a randomized trial. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* [online]. s. 581. ISSN 1178-2005. Dostupné na: doi:10.2147/COPD.S53619

Celli B. R. (2008) Update on the Management of COPD. *Chest* [online]. roč. 133, č. 6, s. 1451–1462. ISSN 00123692. Dostupné na: doi:10.1378/chest.07-2061

Cook N. S., Kostikas K., Gruenberger J. B., Shah B., Pathak P., Kaur V. P., Mudumby A., Sharma R. a Gutzwiller F. S. (2019) Patients' perspectives on COPD: findings from a social media listening study. ERJ Open Research [online]. roč. 5, č. 1, s. 00128–02018. ISSN 2312-0541. Dostupné na: doi:10.1183/23120541.00128-2018

Cua J. D. a Tato C.M. (2010) Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. Nature Reviews Immunology [online]. roč. 10, č. 7, s. 479–489. ISSN 1474-1733, 1474-1741. Dostupné na: doi:10.1038/nri2800

Di Stefano A., Caramori G., Gnemmi I., Contoli M., Vicari C., Capelli A., Magno F., D'Anna S. E., Zanini A., Brun P., Casolari P., Chung K. F., Barnes P. J., Papi A., Adcock I. a Balbi B. (2009) T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. Clinical and Experimental Immunology [online]. roč. 157, č. 2, s. 316–324. ISSN 1365-2249, 0009-9104. Dostupné na: doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03965.x

Doe C., Bafadhel M., Siddiqui S., Desai D., Mistry V., Rugman P., McCormick M., Woods J., May R., Sleeman M., Snderson I. K. a Brightling Ch. E. (2010) Expression of the T Helper 17-Associated Cytokines IL-17A and IL-17F in Asthma and COPD. CHEST [online]. roč. 138, č. 5, s. 1140–1147. ISSN 0012-3692. Dostupné na: doi:[10.1378/chest.09-3058](https://doi.org/10.1378/chest.09-3058)

Dotan Y., So J.Y. a Kim V. (2019) Chronic Bronchitis: Where Are We Now? Chronic Obstructive Pulmonary Diseases: Journal of the COPD Foundation [online]. roč. 6, č. 2, s. 178–192. ISSN 2372952X. Dostupné na: doi:10.15326/jcopdf.6.2.2018.0151

Drugdová M., Krištúfek P., Majer I., Rozborilová E. a Tkáčová R. (2011) Chronická obštrukčná choroba pľúc. Národné smernice pre prevenciu a terapiu. Slovenská pneumologická a ftizeologická spoločnosť [online]. ISBN: 978-80-88866-98-5. Dostupné na: <https://www.copdplatform.com/res/file/national-documents/svk-guidelines.pdf>

Ergen E. N. a Yusuf N. (2018) Inhibition of interleukin-12 and/or interleukin-23 for the treatment of psoriasis: What is the evidence for an effect on malignancy? *Experimental Dermatology* [online]. roč. 27, č. 7, s. 737–747. ISSN 1600-0625. Dostupné na: doi:10.1111/exd.13676

Ferré A., Fuhrman C., Zureik M., Chouaid Ch., Vergnenégre A., Huchon G., Delmas M. CH. a Roche N. (2012) Chronic bronchitis in the general population: Influence of age, gender and socio-economic conditions. *Respiratory Medicine* [online]. roč. 106, č. 3, s. 467–471. ISSN 0954-6111. Dostupné na: doi:10.1016/j.rmed.2011.12.002

Floss D. M., Schröder J., Franke M. a Scheller J. (2015) Insights into IL-23 biology: From structure to function. *Cytokine & Growth Factor Reviews* [online]. roč. 26, č. 5, Special Issue: IL-6 and IL-12 Type Cytokines – A multifaceted Family, s. 569–578. ISSN 1359-6101. Dostupné na: doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.005

Gearhart A. M., Cavallazzi R., Peyrani P., Wiemken T. L., Furmanek S. P., Reyes-Vega A., Gauhar U., Rivas-Perez H., Roman J., Ramirez J. A. a Fernandez-Botran R. (2017) Lung Cytokines and Systemic Inflammation in Patients with COPD. *Journal of Respiratory Infections* [online]. roč. 1, č. 4. ISSN 24732869. Dostupné na: doi:10.18297/jri/vol1/iss4/4

Ghosh N., Choudhury P., Kaushik S. R., Arya R., Nanada R., Bhattacharyya P., Roychowdhury S., Banerjee R. a Chaudhury K. (2020) Metabolomic fingerprinting and systemic inflammatory profiling of asthma COPD overlap (ACO). *Respiratory Research* [online]. roč. 21, č. 1, s. 126. ISSN 1465-993X. Dostupné na: doi:10.1186/s12931-020-01390-4

Goepfert A., Lehmann S., Blank J., Kolbinger F. a Rondeau J. M. (2020) Structural Analysis Reveals that the Cytokine IL-17F Forms a Homodimeric Complex with Receptor IL-17RC to Drive IL-17RA-Independent Signaling. *Immunity* [online]. roč. 52, č. 3, s. 499-512.e5. ISSN 1074-7613. Dostupné na: doi:10.1016/j.immuni.2020.02.004

Goepfert A., Lehmann S., Wirth E. a Rondeau J. M. (2017) The human IL-17A/F heterodimer: a two-faced cytokine with unique receptor recognition properties. *Scientific Reports* [online]. roč. 7, č. 1, s. 8906. ISSN 2045-2322. Dostupné na: doi:10.1038/s41598-017-08360-9

GOLD – Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (2022). Global strategy for diagnosis, management and prevention of chronic obstructive lung disease. Dostupné na: www.goldcopd.org

Górska K., Paplinska-Goryca M., Nejman-Gryz P., Goryca K. a Krenke R. (2017) Eosinophilic and Neutrophilic Airway Inflammation in the Phenotyping of Mild-to-Moderate Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* [online]. roč. 14, č. 2, s. 181–189. ISSN 1541-2555, 1541-2563. Dostupné na: doi:10.1080/15412555.2016.1260539

Hong S. Ch. a Lee S. H. (2010) Role of Th17 Cell and Autoimmunity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Immune Network* [online]. roč. 10, č. 4, s. 109. ISSN 1598-2629. Dostupné na: doi:[10.4110/in.2010.10.4.109](https://doi.org/10.4110/in.2010.10.4.109)

Imani S., Salimian J., Fu J., Ghanei M. a Panahi Y. (2016) Th17/Treg-related cytokine imbalance in sulfur mustard exposed and stable chronic obstructive pulmonary (COPD) patients: correlation with disease activity. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* [online]. roč. 38, č. 4, s. 270–280. ISSN 0892-3973. Dostupné na: doi:[10.1080/08923973.2016.1188402](https://doi.org/10.1080/08923973.2016.1188402)

Ishigame H., Kakuta S., Nagai T., Kadoki M., Nambu A., Komiyama Y., Fujikado N., Tanahashi Y., Akitsu A., Kotaki H., Sudo K., Nakae S., Sasakawa Ch. a Iwakura Y. (2009) Differential Roles of Interleukin-17A and -17F in Host Defense against Mucoepithelial Bacterial Infection and Allergic Responses. *Immunity* [online]. roč. 30, č. 1, s. 108–119. ISSN 1074-7613. Dostupné na: doi:10.1016/j.immuni.2008.11.009

Kašák V. (2006) Chronická obstrukční plicní nemoc: průvodce ošetřujícího lékaře. Praha: Maxdorf,. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 8073450828.

Kessler R., Partridge M. R., Miravitlles M., Cazzola M., Vogelmeier C., Leynaud D. a Ostinelli J. (2011) Symptom variability in patients with severe COPD: a pan-European cross-sectional study. *European Respiratory Journal* [online]. roč. 37, č. 2, s. 264–272. ISSN 0903-1936, 1399-3003. Dostupné na: doi:10.1183/09031936.00051110

Kim V. a Criner G. J. (2013) Chronic Bronchitis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. roč. 187, č. 3, s. 228–237. ISSN 1073-449X, 1535-4970. Dostupné na: doi:10.1164/rccm.201210-1843CI

Kobližek V. a Hejduk K. (2017) A targeted search for patients with chronic obstructive pulmonary disease: brief summary. *Vnitřní lékařství* [online]. roč. 63, č. 11, s. 750–756. ISSN 0042773X, 18017592. Dostupné na: doi:10.36290/vnl.2017.146

Kriegova E., Arakelyan A., Fillerova R., Zatloukal J., Mrazek F., Navratilova Z., Kolek V., M du Bois R. a Petrek M. (2008) PSMB2 and RPL32 are suitable denominators to normalize gene expression profiles in bronchoalveolar cells. *BMC Molecular Biology* [online]. roč. 9, č. 1, s. 69. ISSN 1471-2199. Dostupné na: doi:10.1186/1471-2199-9-69

Kubysheva N., Boldina M., Eliseeva T., Soodaeva S., Klimanov I., Khaletskaya A., Bayrasheva N., Solovyev V., Villa-Vargas L. A., Ramírez-Salinas M., A., Salinas Rosales M., Ovsyannikov D. Y. a Batyrshin I. (2020) Relationship of Serum Levels of IL-17, IL-18, TNF- α , and Lung Function Parameters in Patients with COPD, Asthma-COPD Overlap, and Bronchial Asthma. *Mediators of Inflammation* [online]. roč. 2020, s. 1–11. ISSN 0962-9351, 1466-1861. Dostupné na: doi:10.1155/2020/4652898

Kurmi O. P., Semple S., Simkhada P., Smith W. C. S. a Gayres J (2010) COPD and chronic bronchitis risk of indoor air pollution from solid fuel: a systematic review and meta-analysis. *Thorax* [online]. roč. 65, č. 3, s. 221–228. ISSN 0040-6376. Dostupné na: doi:10.1136/thx.2009.124644

Laššán Š., Hájková M. a Laššánová M. (2017) Protizápalová liečba stabilnej CHOCHP – aktuálne trendy a odporúčania pre klinickú prax. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. Roč. 31, č. 1, s. 22-30. Dostupné na: doi:10.36290/far.2017.006

Le Rouzic O., Pichavant M., Frealle E., Guillon A., Si-Tahar M. a Gosset P. (2017) Th17 cytokines: novel potential therapeutic targets for COPD pathogenesis and exacerbations. *European Respiratory Journal* [online]. 2017, roč. 50, č. 4, s. 1602434. ISSN 0903-1936, 1399-3003. Dostupné na: doi:10.1183/13993003.02434-2016

Lee S. D. a kol. (2017) *COPD: Heterogeneity and Personalized Treatment* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. ISBN 978-3-662-47177-7. Dostupné na: doi:10.1007/978-3-662-47178-4

Li H., Liu Q., Jiang Y., Zhang Yi., Xiao W. a Zhang Ya. (2015) Disruption of Th17/Treg Balance in the Sputum of Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The American Journal of the Medical Sciences* [online]. roč. 349, č. 5, s. 392–397. ISSN 0002-9629, 1538-2990. Dostupné na: doi:10.1097/MAJ.0000000000000447

Li W., Meng X., Hao Y., Chen M., Jia Y. a Gao P. (2021) Elevated sputum IL-36 levels are associated with neutrophil-related inflammation in COPD patients. *The Clinical Respiratory Journal* [online]. roč. 15, č. 6, s. 648–656. ISSN 1752-6981, 1752-699X. Dostupné na: doi:10.1111/crj.13338

Liu M., Wu K., Lin J., Xie Q., Liu Y., Huang Y., Zeng J., Yang Z., Wang Y., Dong S., Deng W., Yang M., Wu S., Jiang W. a Li X. (2021). Emerging Biological Functions of IL-17A: A New Target in Chronic Obstructive Pulmonary Disease? *Frontiers in Pharmacology* [online]. roč. 12, s. 695957. ISSN 1663-9812. Dostupné na: doi:10.3389/fphar.2021.695957

Ma R., Su H., Jiao K. a Liu J. (2023) Role of Th17 cells, Treg cells, and Th17/Treg imbalance in immune homeostasis disorders in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Immunity, Inflammation and Disease* [online]. roč. 11, č. 2. ISSN 2050-4527, 2050-4527. Dostupné na: doi:10.1002/iid3.784

Malesker M. A., Callahan-Lyon P., Madison M., Ireland B. a Irwin R. S., Adams T. M., Altman K.W., Azoulay E., Barker A. F., Birring S. S., Blackhall F. a kol. (2020) Chronic Cough Due to Stable Chronic Bronchitis. *Chest* [online]. roč. 158, č. 2, s. 705–718. ISSN 00123692. Dostupné na: doi:10.1016/j.chest.2020.02.015

Mamane A., Baldi I., Tessier J. F., Raheison Ch. a Bouvier G. (2015) Occupational exposure to pesticides and respiratory health. *European Respiratory Review* [online]. roč. 24, č. 136, s. 306–319. ISSN 0905-9180, 1600-0617. Dostupné na: doi:10.1183/16000617.00006014

Matula B. (2010) Liečba chronickej obštrukčnej choroby pľúc – najnovšie poznatky. *Via practica* [online]. roč. 7, č. 6, s. 257-261.

McConnell R., Barrington-Trimis J. L., Wang K., Urman R., Hong H., Unger J., Samet J., Leventhal A. a Berhane K. (2017) Electronic Cigarette Use and Respiratory Symptoms in Adolescents. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. roč. 195, č. 8, s. 1043–1049. ISSN 1073-449X, 1535-4970. Dostupné na: doi:10.1164/rccm.201604-0804OC

McGeachy M. J. a Cua D.J. (2007) The link between IL-23 and Th17 cell-mediated immune pathologies. *Seminars in Immunology* [online]. roč. 19, č. 6, s. 372–376. ISSN 10445323. Dostupné na: doi:10.1016/j.smim.2007.10.012

Mejza F., Gnatiuc L., Buist A. S., Vollmer W. M., Lamprecht B., Obaseki D. O., Nastalek P., Nizankowska-Mogilnicka E. a Burney G. J. (2017) Prevalence and burden of chronic bronchitis symptoms: results from the BOLD study. *European Respiratory Journal* [online]. roč. 50, č. 5, s. 1700621. ISSN 0903-1936, 1399-3003. Dostupné na: doi:10.1183/13993003.00621-2017

Miossec P. a Kolls J. K. (2012) Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. roč. 11, č. 10, s. 763–776. ISSN 1474-1776, 1474-1784. Dostupné na: doi:10.1038/nrd3794

Moermans C., Damas K., Guiot J. Njock M. S., Corhay J. L., Henket M., Schleich F. a Louis R. (2021) Sputum IL-25, IL-33 and TSLP, IL-23 and IL-36 in airway obstructive diseases. Reduced levels of IL-36 in eosinophilic phenotype. *Cytokine* [online]. roč. 140, s. 155421. ISSN 10434666. Dostupné na: doi:10.1016/j.cyto.2021.155421

Nakamura H. a Aoshiba K. a kol. (2017) *Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systemic Inflammatory Disease* [online]. Singapore: Springer Singapore. Respiratory Disease Series: Diagnostic Tools and Disease Managements. ISBN 978-981-10-0838-2. Dostupné na: doi:10.1007/978-981-10-0839-9

Nelson S. a Mason C. M. (2000) *The Inflammatory Response in Chronic Bronchitis*. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. roč. 21, č. 2, s. 0079–0086. ISSN 10693424, 10989048. Dostupné na: doi:10.1055/s-2000-9842

Oppmann B., Lesley R., Blom B., Timans J. C., Xu Y., Hunte B., Vega F., Yu N., Wang J., Singh K., Zonin F., Vaisberg E., Churakova T., Liu M., Gorman D., Wagner J., Zurawski S., Liu Y. J., Abrams J. S., Moore L. W., Rennick D., Waal-Malefyt R., Hannum Ch., Bazan J. F. a Kastelein R.A. (2000) Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12. *Immunity* [online]. roč. 13, č. 5, s. 715–725. ISSN 10747613. Dostupné na: doi:10.1016/S1074-7613(00)00070-4

Pappu R., Rutz S. a Ouyang W. (2012) Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines. *Trends in Immunology* [online]. roč. 33, č. 7, s. 343–349. ISSN 14714906. Dostupné na: doi:10.1016/j.it.2012.02.008

Patridge M. R., Karlsson N. a Small R. (2009) Patient insight into the impact of chronic obstructive pulmonary disease in the morning: an internet survey. *Current Medical Research and Opinion* [online]. roč. 25, č. 8, s. 2043–2048. ISSN 0300-7995, 1473-4877. Dostupné na: doi:10.1185/03007990903103006

Ritzmann F. a Beisswenger Ch. (2021) Preclinical studies and the function of IL-17 cytokines in COPD. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* [online]. roč. 237, s. 151729. ISSN 09409602. Dostupné na: doi:10.1016/j.aanat.2021.151729

Roche N., Chavannes N. H. a Miravittles M. (2013) COPD symptoms in the morning: impact, evaluation and management. *Respiratory Research* [online]. roč. 14, č. 1, s. 112. ISSN 1465-9921. Dostupné na: doi:10.1186/1465-9921-14-112

Rong B., Fu T., Rong C., Liu W., Li K. a Liu H. (2020) Association between serum CCL-18 and IL-23 concentrations and disease progression of chronic obstructive pulmonary disease. *Scientific Reports* [online]. roč. 10, č. 1, s. 17756. ISSN 2045-2322. Dostupné na: doi:[10.1038/s41598-020-73903-6](https://doi.org/10.1038/s41598-020-73903-6)

Roos A. B., Sandén M., Bjermer L., Stampfli M. R. a Erjefält J. S. (2015) IL-17A Is Elevated in End-Stage Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Contributes to Cigarette Smoke-induced Lymphoid Neogenesis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. roč. 191, č. 11, s. 1232–1241. ISSN 1073-449X. Dostupné na: doi:[10.1164/rccm.201410-1861OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201410-1861OC)

Rozborilová E. (2005) Chronická obštrukčná choroba pľúc. *Via practica* [online]. roč. 2, č. 2, s. 89-93. [citované 12.2.2023] Dostupné na: <https://www.solen.sk/storage/file/article/Rozborilova.pdf>

Ryrsø C. K., Godtfredsen N. S., Kofod L. M., Lavesen M., Mogensen L., Tobberup R., Farver-Vestergaard I., Callesen H. E., Tendal B., Lange P. a Iepsen U. W. (2018) Lower mortality after early supervised pulmonary rehabilitation following COPD-exacerbations: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pulmonary Medicine* [online]. roč. 18, č. 1, s. 154. ISSN 1471-2466. Dostupné na: doi:10.1186/s12890-018-0718-1

Senior R. M., Pierce R. A. a Atkinson J. J. (2015) Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Epidemiology, Pathophysiology, Pathogenesis, and α 1-Antitrypsin Deficiency. V: Grippi M. A., Elias J. A., Fishman J. A., Senior R. M. a Siegel M. D. vydal *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders* [online]. 5. vyd. New York, NY: McGraw-Hill Education. Dostupné na: accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1122358782

Spurzem J. R. a Rennard S. I. (2005) Pathogenesis of COPD. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. roč. 26, č. 2, s. 142–153. ISSN 1069-3424, 1098-9048. Dostupné na: doi:10.1055/s-2005-869535

Sun L., He Ch., Nair L., Yeung J. a Egwuagu Ch. E. (2015) Interleukin 12 (IL-12) Family Cytokines: Role in Immune Pathogenesis and Treatment of CNS Autoimmune Disease. Cytokine [online]. roč. 75, č. 2, s. 249–255. ISSN 1043-4666. Dostupné na: doi:10.1016/j.cyto.2015.01.030

Wang H., Ying H., Wang S., Gu X., Weng Y., Peng W., Xia D. a Yu W. (2015) Imbalance of peripheral blood Th17 and Treg responses in patients with chronic obstructive pulmonary disease: Th17 and Tregs in COPD. The Clinical Respiratory Journal [online]. roč. 9, č. 3, s. 330–341. ISSN 17526981. Dostupné na: doi:10.1111/crj.12147

Wang Ch., Wang H., Dai L., Zhang J., Fang L., Liu L., Fu W. a Tang D. (2021) T-Helper 17 Cell/Regulatory T-Cell Imbalance in COPD Combined with T2DM Patients. International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease [online]. roč. 16, s. 1425–1435. ISSN 1178-2005. Dostupné na: doi:[10.2147/COPD.S306406](https://doi.org/10.2147/COPD.S306406)

Widysanto A. a Mathew G. (2023) Chronic Bronchitis. V: StatPearls [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [cit. 17.3.2023]. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482437/>

Yoshimoto Ta. a Yoshimoto To. (2014) Cytokine Frontiers: Regulation of Immune Responses in Health and Disease [online]. ISBN 978-4-431-54441-8. Dostupné na: doi:10.1007/978-4-431-54442-5

Zhang L., Cheng Z., Liu W. a Wu K. (2013) Expression of Interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in Serum and Sputum of Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients. COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease [online]. roč. 10, č. 4, s. 459–465. ISSN 1541-2555, 1541-2563. Dostupné na: doi:10.3109/15412555.2013.770456