

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2022

Janka Klačková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Expresia regulačných faktorov zápalu

Bakalárska práca

Janka Klačková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Janka KLAČKOVÁ
Osobní číslo: R19834
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Expresia regulačných faktorov zápalu
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Táto bakalárska práca sa zameria na zápalové ochorenia pľúc. Na základe súčasných znalostí budú vybrané regulačné faktory zápalu a ich expresia bude stanovená na úrovni mRNA. K detekcii expresie v bronchoalveolárných bunkách bude použitá metóda RT-PCR.

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

Seznam doporučené literatury:

Novosadova, E., Chabronova, A., Kolek, V., Petrek, M., Navratilova, Z. (2016). The serum expression of selected miRNAs in pulmonary sarcoidosis with/without Löfgren's syndrome. *Mediators of inflammation*, 2016.
Navratilova, Z., Novosadova, E., Hagemann-Jensen, M., Kullberg, S., Kolek, V., Grunewald, J., Petrek, M. (2016). Expression profile of six RNA-binding proteins in pulmonary sarcoidosis. *PLoS one*, 11(8), e0161669.
Kriegova, E., Arakelyan, A., Fillerova, R., Zatloukal, J., Mrazek, F., Navratilova, Z., Petrek, M. (2008). PSMB2 and RPL32 are suitable denominators to normalize gene expression profiles in bronchoalveolar cells. *BMC Molecular Biology*, 9(1), 69.

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

Datum zadání bakalářské práce: 10. února 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

L.S.

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

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

12-01-2122

V Olomouci dne 11. února 2022

Bibliografické údaje

Meno a priezvisko autora: Janka Klačková

Názov práce: Expresia regulačných faktorov zápalu

Typ práce: bakalárska

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

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

Rok obhajoby práce: 2022

Kľúčové slová: TNF α , chronická obštrukčná choroba pľúc, asthma bronchiale,
RT-PCR

Počet strán: xiv + 34

Počet príloh: 0

Jazyk: slovenský

SÚHRN

Tumor nekrotizujúci faktor α (TNF α) zohráva v tele radu významných a zároveň protichodných úloh. Prostredníctvom rôznych signálnych dráh je schopný vyvolať apoptózu, bunkovú diferenciáciu, či proliferáciu. Uplatňuje sa najmä pri zápalových procesoch a je tvorený rozličnými typmi buniek. Táto práca bola zameraná na stanovenie relatívnej expresie TNF α u pacientov so zápalovými ochoreniami pľúc, a to chronická obštrukčná choroba pľúc (CHOCHP) a astma bronchiale (AB). Pomocou kvantitatívnej PCR metódy bola zmeraná relatívna expresia génu TNF α vo vzorkách bronchoalveolárnej laváže (BAL) od 22 pacientov s CHOCHP, 14 pacientov s AB a 26 kontrolných pacientov. Výsledky meraní preukázali zvýšenú expresiu TNF α u pacientov s CHOCHP a u pacientov s AB v porovnaní s kontrolnou skupinou. Medzi skupinou pacientov s CHOCHP a AB nebol zaznamenaný signifikantný rozdiel v expresii TNF α . Pozorovania z tejto práce boli na záver porovnané s podobne zameranými klinickými štúdiami.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Janka Klačková

Title: Expression of regulatory factors in the inflammation

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: Mgr. Zdenka Navrátilová, Ph.D.

The year of presentation: 2022

Keywords: TNF α , chronic obstructive pulmonary disease, asthma bronchiale,
RT-PCR

Number of pages: xiv + 34

Number of appendices: 0

Language: Slovak

SUMMARY

Tumor necrosis factor α (TNF α) plays a number of important and conflicting roles in the body. It is able to induce apoptosis, cell differentiation and proliferation through various signaling pathways. TNF α plays a role especially in inflammatory processes and it is made up of different types of cells. The main objective of this work was to determine the relative expression of TNF α in patients with inflammatory lung diseases, namely chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and bronchial asthma (AB). The relative expression of the TNF α gene was measured by a quantitative PCR method in bronchoalveolar lavage (BAL) samples from 22 patients with COPD, 14 patients with AB and 26 control patients. The results showed increased TNF α expression in patients with COPD and in patients with AB compared to the control group. There was no significant difference in between the group of patients with COPD and AB in TNF α expression. The observations obtained from this work were compared with other similarly focused clinical studies.

Prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracovala samostatne na Univerzite Palackého v Olomouci pod vedením Mgr. Zdenky Navrátilovej*, Ph.D., za použitia citovanej literatúry. *Ústav patologické fyziologie a Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci.

Táto práca bola vytvorená z grantovej podpory IGA UP: LF_2021_014, IGA UP: LF_2022_005, CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868, ENOCH

V Olomouci dňa 6. 5. 2022

.....

Chcela by som sa úprimne poďakovať vedúcej mojej bakalárskej práce, Mgr. Zdenke Navrátilovej, Ph.D. za profesionálny prístup, trpezlivosť a čas strávený pri spracovaní tejto bakalárskej práce.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CIELE PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNY PREHLAD.....	3
3.1	Úvod do TNF α	3
3.1.1	Štruktúra	4
3.1.2	Expresia	5
3.1.3	Funkcia	5
3.1.4	Signalizácia	6
3.1.5	TNF α superrodina	8
3.2	Chronická obštrukčná choroba pľúc.....	10
3.2.1	Príčiny a epidemiológia.....	10
3.2.2	Patofyziológia.....	11
3.2.3	Diagnostika.....	12
3.2.4	Klasifikácia CHOCHP	14
3.2.5	Exacerbácie a komorbidity	14
3.3	Asthma bronchiale	15
3.3.1	Príčiny	15
3.3.2	Patofyziológia.....	15
3.3.3	Diagnostika.....	16
4	MATERIÁL A METÓDY	17
4.1	Biologický materiál	17
4.2	Použité chemikálie a roztoky.....	18
4.3	Zoznam prístrojov a zariadení	18
4.4	Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy	19
4.4.1	Izolácia mRNA.....	19

4.4.2	Reverzná transkripcia	20
4.4.3	Kvantitatívna PCR.....	21
4.5	Štatistické vyhodnotenie	22
5	VÝSLEDKY	23
6	DISKUSIA	24
7	ZÁVER.....	27
8	LITERATÚRA.....	28

ZOZNAM SYMBOLOV A SKRATIEK

AB	Astma bronchiale
ACO	Asthma bronchiale – Chronic obstructive pulmonary disease Overlap
APRIL	ligand indukujúci proliferáciu
BAFF	faktor aktivujúci B-bunky
BAL	bronchoalveolárna laváž
BB	bronchoepiteliárne bunky
CAT™	COPD Assessment Test
CCQ®	COPD Control Questionnaire
CHOCHP	Chronická obštrukčná choroba pľúc
ČK	červené krvinky
EDA-A1	ektodysplazmín A1
EDA-A2	ektodysplazmín A2
FADD	Fas-asociovaný proteín s doménou smrti
FEV ₁	objem vzduchu, ktorý je usilovne vydýchnutý za 1 sekundu po maximálnom nádychu
FVC	maximálny objem vzduchu, ktorý je možný vydýchnuť počas 1 minúty po maximálnom nádychu
GINA	Global Initiative for Asthma
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HL-60	bunková línia HL-60
HVEM	Herpesvirus entry mediator
IL-1 β	interleukín 1 β
KS	kontrolná skupina
LT α	lymfotoxín α
LT β	lymfotoxín β

MAPK	mapkinázy
MHC	hlavný histokompatibilný komplex
mMRC	Modified British Medical Research Council Questionnaire
NF- κ B	nukleárny faktor kapa B
NK	natural killer bunky
OA	occupational asthma – profesijná astma
PGE2	prostaglandín E2
RPMI 1788	bunková línia RPMI 1788
TNF	tumor nekrotizujúci faktor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TNFRSF	tumor necrosis factor family
TNF α	tumor nekrotizujúci faktor α
TNF β	tumor nekrotizujúci faktor β
TRADD	doména smrti asociovaná s receptorom tumor nekrotizujúceho faktoru
TRAIL	ligand indukujúci apoptózu súvisiaci s tumor nekrotizujúcim faktorom
TTP	tristetraprolínu
TWEAK	slabý induktor apoptózy súvisiaci s tumor nekrotizujúcim faktorom
VEGI	inhibítor rastu vaskulárnych endotelových buniek

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Štruktúra TNF α génu.	4
Obrázok 2: Základné signalizačné dráhy TNF α , ktoré vedú k apoptóze, aktivovaniu transkripčného faktoru AP-1 a k aktivovaniu NF- κ B faktoru.	8
Obrázok 3: Jednotlivé ligandy TNF superrodiny a ich rozdelenie podľa uplatnenia v organizme pri procesoch apoptózy, proliferácií a morfogénzii.	10
Obrázok 4: Výstup zo spirometrického vyšetrenia (spirogram), ktorý porovnáva merania u pacienta s výskytom obštrukcie dýchacích ciest a u zdravého pacienta bez prítomnosti obštrukcie.	13
Obrázok 5: Porovnanie relatívnej expresie TNF α medzi pacientami s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc, s astmou bronchiale a kontrolnou skupinou.....	23

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Základná charakteristika pacientov.	17
Tabuľka 2: Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu.	20
Tabuľka 3: Teplotný a časový profil reverznej transkripcie.	20
Tabuľka 4: Zloženie reakčnej zmesi pre PCR reakciu.	21
Tabuľka 5: Teplotný a časový profil PCR reakcie.	21
Tabuľka 6: Stručný prehľad štúdií zameraných na expresiu TNF α u pacientov s CHOCHP a AB.	25

1 ÚVOD

Medzi chronické zápalové ochorenia pľúc patria chronická obštrukčná choroba pľúc (CHOCHP) a asthma bronchiale (AB). Hlavný rozdiel medzi týmito dvomi ochoreniami predstavuje typ prítomnej obštrukcie. V prípade CHOCHP sa vyskytuje ireverzibilný typ, zatiaľ čo v prípade AB je typ obštrukcie reverzibilný. Charakteristický spoločný znak predstavujú príznaky pacientov. Ide predovšetkým o kašeľ a sťažené dýchanie. U pacientov s AB je imunitná reakcia vyvolaná alergickou reakciou, ktorú spôsobuje podráždenie dýchacích ciest alergénom. CHOCHP aj AB patria medzi pomerne rozšírené ochorenia v populácii ľudstva po celom svete.

U oboch ochorení sa vyskytuje akútny zápal, počas ktorého je v tele zvýšená produkcia cytokínov. Sú to extracelulárne signálne proteíny zodpovedné za množstvo signálnych procesov prebiehajúcich v bunkách. Do tejto skupiny zaradíme aj $TNF\alpha$, ktorý bude predmetom štúdie tejto práce. Hladina expresie $TNF\alpha$ bude stanovovaná metódou kvantitatívnej PCR za využitia TaqMan próby.

2 CIELE PRÁCE

Táto bakalárska práca sa zameria na zápalové ochorenia pľúc. Na základe súčasných znalostí budú vybrané regulačné faktory zápalu a ich expresia bude stanovená na úrovni mRNA. K detekcii expresie v bronchoalveolárnych bunkách bude použitá metóda RT-PCR.

3 LITERÁRNY PREHLAD

3.1 Úvod do TNF α

TNF α faktor, tiež nazývaný ako tumor nekrotizujúci faktor či kachektin, je homotrimerický proteín zložený zo 157 aminokyselín s radou funkcií. Je produkovaný rôznymi typmi buniek, ako napríklad lymfocyty, neutrofilny, endoteliálne bunky, astrocyty, či makrofágy. V tele zohráva dôležitú úlohu v odolnosti voči infekčným činidlám, nádorom, pri regulácii spánku a v embryonálnom vývoji. Zaraďujeme ho medzi zápalové cytokíny, ktoré sú produkované počas akútneho zápalu a sú zodpovedné za množstvo signálnych procesov prebiehajúcich v bunkách, pričom najdôležitejšiu rolu hrajú v bunkovej proliferácii, diferenciácii a apoptóze. (Cammack *et al.*, 2006; Idriss *et Niasmith*, 2000; Murphy *et al.*, 2008)

Cytokíny sú definované ako extracelulárne signálne proteíny, zväčša o veľkosti 80 kDa, ktoré sú produkované rôznorodými druhmi buniek. Len zriedka sú produkované individuálne. Zväčša sú produkované spolu s inými cytokínmi, charakteristickými pre dané ochorenie. Keďže ovplyvňujú tesne susediace bunky, fungujú prevažne parakrinným spôsobom. Môžu však pôsobiť aj na diaľku (endokrinne) alebo priamo na pôvodnú bunku (autokrinne). (Chung, 2001)

V rodine cytokínov je možné pozorovať výskyt pleiotropie, ku ktorej dochádza v prípade, kedy jeden gén ovplyvňuje dva a viac spolu zdanlivo nesúvisiacich fenotypových znakov. Taktiež sa tu uplatňuje široká škála redundancie, kde každý z cytokínov má množstvo prekrývajúcich sa funkcií, pričom každá z nich je potencionálne sprostredkovaná viac ako jedným cytokínom. Synergické alebo antagonistické účinky sú dôsledkom vzájomného ovplyvňovania jednotlivých cytokínov. Pôsobenie týchto signálnych proteínov je sprostredkované ich väzbou na vysokoafinitné povrchové bunkové receptory, ktoré sú zvyčajne prítomné v malom množstve a ich expresia sa zväčšuje po aktivácii buniek. Receptory pre mnohé cytokíny boli zoskupené do superrodín na základe prítomnosti homológnych oblastí. (Chung, 2001)

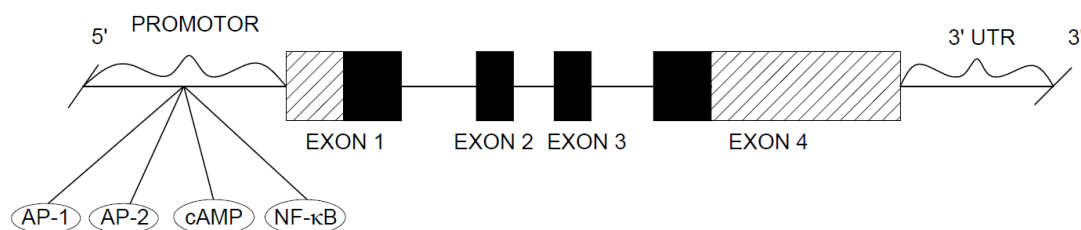
TNF α bol prvýkrát popísaný v roku 1975 ako cytokín, ktorý po stimulácii imunitného systému vykazoval významnú cytotoxickú aktivitu, a teda spôsobil nekrozu nádoru. Keď bol v roku 1984 klonovaný gén pre TNF α , bola taktiež objavená jeho štruktúra a funkčná homológia s lymfotokínom α (LT α) a TNF α bol zaradený

do veľkej skupiny cytokínov známych ako superrodina ligandov TNF. Členy tejto rodiny zaraďujeme medzi transmembránové proteíny II typu, ktoré existujú v dvoch formách, a to v sekretovanej forme alebo viazané na membránu. (Wajant *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2002; Zelová *et Hošek*, 2013)

3.1.1 Štruktúra

Ľudský gén pre TNF α je súčasťou hlavného histokompatibilného génového komplexu (MHC) umiestneného na krátkom ramene chromozómu 6. Gény MHC sú rozdelené do štyroch hlavných tried, pričom gény pre TNF α zaraďujeme do III. triedy MHC komplexu. TNF α pozostáva zo štyroch exónov prerušených tromi intrónmi, ktoré sú usporiadané na DNA vlákne dlhom približne 3 kb. (Spriggs *et al.*, 1992; Zelová *et Hošek*, 2013)

Viac ako 80 % sekvencie génu je kódovaných štvrtým exómom, zatiaľ čo prvý a druhý exón kódujú vedúcu sekvenciu vznikajúceho peptidu (**Obrázok 1**). Vedúci peptid je veľmi dôležitý pre translačnú úroveň regulácie TNF α . Pred touto sekvenciou sa nachádza promotorová oblasť, kde sa vyskytujú väzbové miesta pre regulačné faktory AP-1, AP-2, NF- κ B a cAMP. Táto promotorová oblasť spolu s vedúcou sekvenciou zohrávajú dôležitú úlohu pri regulácii TNF α . TNF α je vrátane vedúceho peptidu syntetizovaný ako 26 kDa prekurzor, ktorý môže byť proteolyticky štiepený transmembránovou matricovou metaloproteázou TNF α -konvertujúcim enzýmom na 17-kDa vylučovaný monomér, zatiaľ čo neštiepený TNF α je prítomný ako transmembránový proteín typu II. Expresia 17 kDa monoméru bola stanovovaná v experimentálnej časti tejto bakalárskej práce. (Gearing *et al.*, 1994; McGeehan *et al.*, 1994)



Obrázok 1: Štruktúra TNF α génu. Zľava sa nachádza promotor obsahujúci väzbové miesta pre AP-1, AP-2, cAMP, NF- κ B. Ďalej exon 1, exon 2, exon 3 a exon 4, ktorý tvorí veľkú väčšinu štruktúry génu.

3.1.2 Expresia

Gén pre TNF α je regulovaný dvojakým spôsobom, a to ako na transkripčnej, tak aj na translačnej úrovni. V 5' koncovej oblasti génu sa nachádza niekoľko regulačných miest so sekvenciami odpovedajúcimi regulačným faktorom AP-1, AP-2, NF- κ B a cAMP. Tieto oblasti sú známe z regulačných oblastí imunoglobulínov a cytokínov. (Zelová *et* Hošek, 2013)

5' koncová oblasť taktiež obsahuje MHC glykoproteíny III. triedy. Zdá sa, že všetky tieto sekvencie sa podieľajú na aktivácii transkripcie. Je známe, že k regulácii dochádza aj na post-transkripčnej úrovni, kde je stabilita TNF α mRNA regulovaná väzbou tristetraprolínu (TTP) na oblasť bohatú na AU 3'-UTR. Čo sa týka translácie génu, tá je regulovaná pomocou 3' konca ľudskej TNF α mRNA, ktorá je bohatá na UA oblasti. mRNA sa prekladá do ľudského proteínu zloženého zo 157 aminokyselín. (Deleault *et al.*, 2008; Idriss *et* Niasmith, 2000; Spriggs *et al.*, 1992)

3.1.3 Funkcia

Biologické funkcie TNF α sú rôzne. Na jednej strane dodáva odolnosť voči určitému typu infekcií prostredníctvom aktivácie neutrofilov a krvných doštičiek, zvýšenou schopnosťou makrofágov a NK buniek zabíjať a celkovou stimuláciou imunitného systému. Na druhej strane môže plniť funkciu patologickú pri mnohých autoimunitných ochoreniach, ako napríklad reumatoidná artritída, alebo pri rejekcii transplantovaného orgánu. Plní protichodné úlohy, ktoré súvisia s aktiváciou rôznych signálnych dráh. (Beutler *et* Bazzoni, 1998; Fiers, 1999; Idriss *et* Naismith, 2000)

Okrem toho, vykazuje cytotoxicitu voči maligným bunkám, najmä v kombinácií s niektorými interferónmi, napr. interleukínmi. Príliš vysoké koncentrácie TNF α sú pre hostiteľa toxické (maximálna tolerovaná hodnota hladiny je u ľudí 200 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$). Z tohto dôvodu je potrebné zvýšiť terapeutický index, a to buď znížením toxicity, prípadne zvýšením účinnosti. Toto je možné dosiahnuť prostredníctvom mutácií, ktoré znižujú systematickú cytotoxicitu a zvyšujú účinnosť TNF α pri selektívnej eliminácii nádorových buniek. (Idriss *et* Naismith, 2000)

TNF α je schopné vyvolať bunkovú smrť prostredníctvom nekrózy alebo apoptózy. (Beyaert *et* Fiers, 1994). Nekróza je sprevádzaná napučaním buniek, deštrukciou bunkových organel a lýzou buniek. (Steller, 1995). Apoptóza, tiež nazývaná ako programovaná bunková smrť, je proces, pri ktorom a bunku pôsobiace

faktory z vonkajšieho či vnútorného prostredia spôsobujú, že bunka postupne rozštiepi svoju DNA na fragmenty, rozloží vlastné proteíny a nakoniec sa rozpadne na niekoľko malých apoptotických teliesok. Tie sú v extracelulárnom prostredí pohltené okolitými bunkami. Týmto sa líši od nekrózy, kedy je bunka násilne zničená a jej obsah je vylúčený do okolia iných buniek, čím môže dôjsť k ich ohrozeniu. (Haanen *et al.*, 2000)

Prostredníctvom aktivácie NF- κ B, môže TNF α spôsobiť prežitie buniek. Doteraz bolo identifikovaných množstvo ligandov súvisiacich s TNF. Proteíny súvisiace s TNF, ako je RANKL, sú potrebné pre (osteoklastovú) bunkovú diferenciáciu, ktorá je nevyhnutná pre kostnú resorpciu. Niektoré receptory podobné TNF, napr. HVEM, slúžia ako vstupné body do buniek počas infekcie. (Idriss *et Naismith*, 2000). TNF α taktiež plní funkciu kritického prvku obrany hostiteľa proti bakteriálnej a vírusovej infekcii a je dôležitý pre tvorbu folikulov lymfatických uzlín a zárodočných centier. Tieto procesy sú kľúčové pre vytvorenie adaptívnej imunity. (Sellati *et Sahay*, 2014)

3.1.4 Signalizácia

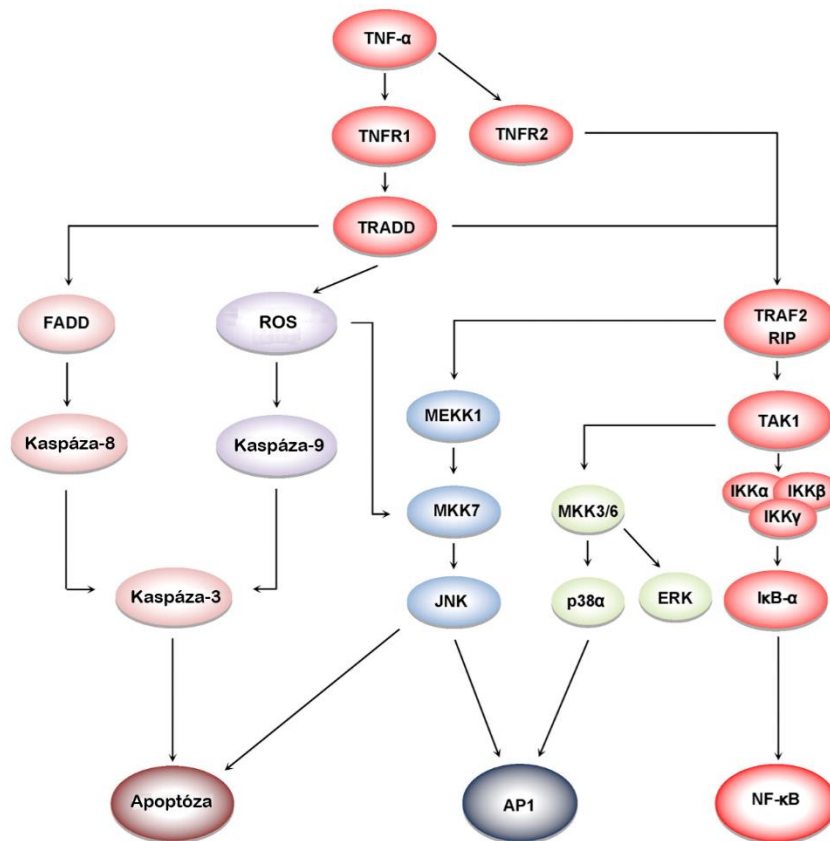
Všetky známe reakcie prejavuje väzbou ako trimér, buď na 55 kDa bunkový membránový receptor nazývaný TNFR-1 alebo 75 kDa bunkový membránový receptor nazývaný TNFR-2. Signálne kaskády vychádzajúce z týchto dvoch receptorov sú odlišné, a preto vedú k dvom rozdielnym výsledkom. Prozápalové a apoptotické funkcie sú spojené so signalizáciou sprostredkovanou TNFR1, zatiaľ čo signalizácia závislá od TNFR2 vedie k oprave tkaniva a angiogénze. Extracelulárne domény oboch receptorov obsahujú subdomény bohaté na cysteín, ktoré viažu TNF. Cytoplazmatické domény TNFR1 a TNFR2 nevykazujú žiadnu sekvenčnú homológiu a získavajú rôzne sady signálnych molekúl. (Aggarwal *et al.*, 2012; Idriss *et Naismith*, 2000; Sahay *et Sellati*, 2014; Wajant 2003)

Väzba TNF α na TNFR1 vedie k aktivácii dráh NF- κ B a MAPK. Po naviazaní získava TNF α doménu smrti asociovanú s TNFR (TRADD). TRADD ďalej získava proteín nazývaný Fas-asociovaný proteín s doménou smrti (FADD), ktorý následne sekvenčne aktivuje kaspázu-8 a kaspázu-3, a tým vyvolá apoptózu. Alternatívou vyvolania apoptózy je aktivácia mitochondrií, čo spôsobí postupné uvoľňovanie reaktívnych foriem kyslíku, ktoré vedie k aktivácii kaspázy-9 a kaspázy-3. TNFR1 je

teda schopný signalizovať bunkovú smrť dvomi spôsobmi (**Obrázok 2**). (Aggarwal *et al.*, 2012)

Zdá sa však, že *in vivo* apoptóza indukovaná TNF nie je taká kľúčová, ako celkový vplyv cytokínu pri regulácii zápalových procesov. Vysoká systémová toxicita TNF je v skutočnosti spôsobená bunkovými mediátormi ako napr. oxid dusný a nesúvisí priamo s jeho schopnosťou indukovať apoptózu. V miestach zápalu spúšťajú cytokíny, ako IL-1 β a TNF, sekréciu chemokínov, aby získali rôzne populácie leukocytov. Súčasne TNF indukovaná expresia cyklooxygenázy 2 spúšťa syntézu PGE₂, ktorá stimuluje vazodilatáciu a tým zvyšuje prietok krvi do miesta zápalu. (Idriss *et Naismith*, 2000; Sahay *et Sellati*, 2014; Wajant 2003)

Taktiež sa ukázalo, že TNF α je schopný aktivovať nukleárny faktor kapa B (NF- κ B), ktorý reguluje expresiu proteínov spojených s prežitím buniek a bunkovou proliferáciou. NF- κ B zahŕňa skupinu dimerických transkripčných faktorov, ktoré pozostávajú z rôznych členov. Tieto členy sa podieľajú na transkripčnej aktivácii veľkého množstva génov súvisiacich so zápalom. V posledných rokoch sa tiež ukázalo, že NF- κ B je schopný indukcie množstva antiapoptotických faktorov. Tento proces hrá kľúčovú úlohu v regulácii apoptotického mechanizmu bunky sprostredkovaného TNFR1. (Agarwall *et al.*, 2012; Wajant 2003)



Obrázok 2: Základné signalizačné dráhy TNF α , ktoré vedú k apoptóze, aktivovaniu transkripčného faktoru AP-1 a k aktivovaniu NF- κ B faktoru. Prevzaté a upravené podľa Aggarwal et al., 2012.

3.1.5 TNF α superrodina

Superrodina tumor nekrotizujúceho faktora (TNF) sa skladá z 19 ligandov a 29 receptorov. Všetky členy bez výnimky vykazujú prozápalovú aktivitu, čiastočne prostredníctvom aktivácie transkripčného faktoru NF- κ B. Niekoľko členov rodiny vykazuje proliferatívnu aktivitu na hematopoetické bunky, čiastočne prostredníctvom aktivácie rôznych mitogénom aktivovaných kináz, a iní členovia zohrávajú významnú úlohu pri apoptóze. Uvádza sa, že niektoré ligandy sú dôležité pri morfogenetických zmenách a diferenciácií buniek. (Aggarwal *et al.*, 2012)

Väčšina členov superrodiny TNF má priaznivé aj potenciálne škodlivé účinky. Napriek tomu, že TNF α je spájaný s fyziologickou proliferáciou a diferenciáciou B buniek za ustálených podmienok, spája sa aj so širokou škálou chorôb, vrátane rakoviny, kardiovaskulárnych, neurologických, pľúcnych, autoimunitných a metabolických porúch. (Aggarwal *et al.*, 2012)

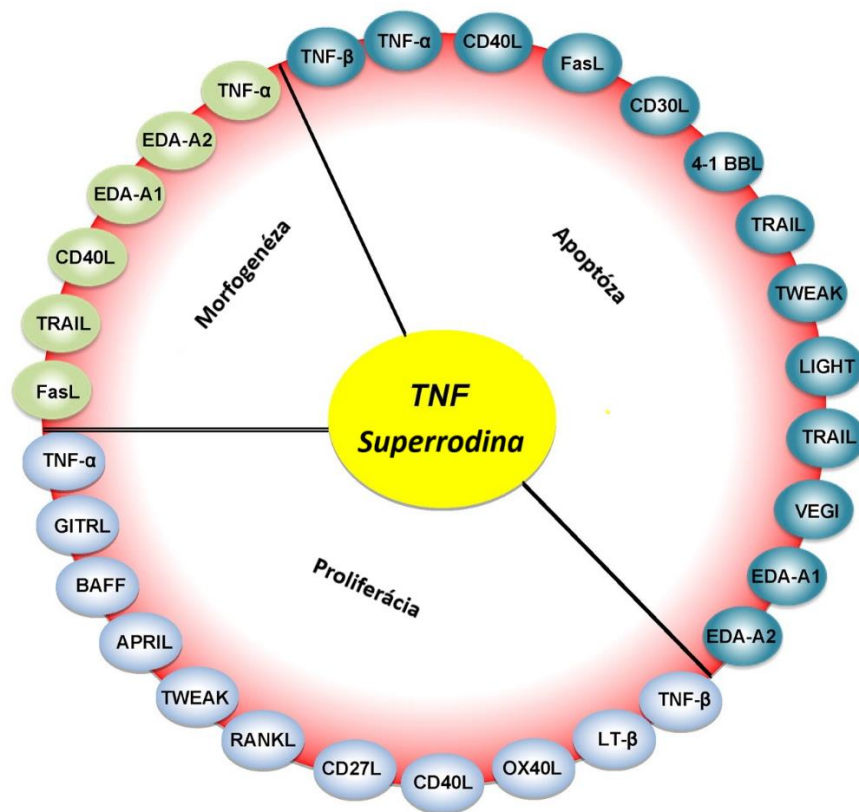
Pre identifikáciu jednotlivých členov celej tejto nadrodiny boli využité ich génové sekvencie. Ako prvé boli objavené členy TNF α a TNF β , ktoré sú zároveň jedinými, ktoré boli prvýkrát identifikované na úrovni proteínov ešte pred samotnou izoláciou ich cDNA. V rokoch 1984 a 1985 boli štrukturálne identifikované 2 rôzne TNF ligandy, ktorých gény boli naklonované. (Aggarwal *et al.*, 1985; Aggarwal *et al.*, 1984)

Proteín o veľkosti 25 kDa, ktorý sa pôvodne nazýval lymfotoxín- α (LT- α), bol purifikovaný z média zozbieraného z ľudskej lymfoblastovej bunkovej línie RPMI 1788. Neskôr sa jeho názov zmenil na TNF β . Izolácia druhého cytotoxického faktora bola vykonaná pomocou rovnakých testov bunkovej lýzie a protilátok proti lymfotoxínu, rozdiel bol však v bunkovej línii, z ktorej bol izolovaný. (Aggarwal *et al.*, 1985; Aggarwal *et al.*, 1984)

Pre druhý faktor bola použitá ľudská promyelomonocytická línia HL-60. Faktor bol nazvaný ako ľudský TNF α a mal dĺžku približne 17 kDa. Pri sekvenovaní aminokyselín TNF α a TNF β bola preukázaná až 50 % sekvenčná homológia. Imunologická odlišnosť týchto dvoch proteínov bola preukázaná generovaním protilátok proti každej molekule. Zatiaľ čo TNF α bol produkovaný makrofágmi, TNF β bol produkovaný lymfocytmi. (Aggarwal *et al.*, 1985; Aggarwal *et al.*, 1984)

Všetky ostatné ligandy tejto rodiny boli identifikované na základe sekvenčnej homológie s ľudskou cDNA. Celá superrodina je tvorená členmi: TNF α , TNF β , lymfotoxín- β (LT- β), CD40L, FasL, CD30L, 4-1BBL, CD27L, OX40L, ligand indukujúci apoptózu súvisiaci s TNF (TRAIL), LIGHT (TNFSF14), receptorový aktivátor ligandu NF- κ B (RANKL), slabý induktor apoptózy súvisiaci s TNF (TWEAK), ligand indukujúci proliferáciu (APRIL), faktor aktivujúci B-bunky (BAFF), inhibítor rastu vaskulárnych endotelových buniek (VEGI), ektodysplazín A EDA-A1, EDA-A2 a GITRL (TNFSF18). Stručný prehľad jednotlivých členov TNF α superrodiny je uvedený na **Obrázku 3**. (Aggarwal *et al.*, 2012)

Nomenklatúra ligandov superrodiny TNF bola štandardizovaná medzinárodnou komisiou ako superrodina TNF (TNFSF) a receptory ako TNFRSF. Ligandy aj receptory sú primárne exprimované rôznymi bunkami imunitného systému. (Aggarwal *et al.*, 2012)



Obrázok 3: Jednotlivé ligandy TNF superrodiny a ich rozdelenie podľa uplatnenia v organizme pri procesoch apoptózy, proliferácií a morfogenézi. Svetlomodro vyznačené ligandy vykazujú proliferatívnu aktivitu čiastočne prostredníctvom aktivácie rôznych mitogénom aktivovaných kináz. Modrozelenou sú vyznačené kontrolory apoptózy a zelenou kontrolory morfogenézy. Prevzaté a upravené podľa Aggarwal et al., 2012.

3.2 Chronická obštrukčná choroba pľúc

Chronická obštrukčná choroba pľúc (CHOCHP) je pľúcne ochorenie, ktoré je charakterizované dlhotrvajúcou reverzibilnou obštrukciou dýchacích ciest a perzistentnými respiračnými syndrómami. Patrí medzi progresívne a liečiteľné zápalové ochorenia. (GOLD, 2021)

3.2.1 Príčiny a epidemiológia

Najčastejšou príčinou CHOCHP je tabakový dym, čo preukazuje fakt, že väčšina ľudí trpiacich týmto ochorením sú fajčiari. Fajčenie však nie je podmienkou vzniku CHOCHP. Existuje rada ďalších faktorov, ktoré môžu CHOCHP spôsobiť,

prípadne zhoršiť. Medzi tieto faktory patrí neustála expozícia škodlivým vplyvom vnútorného a vonkajšieho životného prostredia. Zväčša sa jedná o prachové častice pri práci, rôzne chemikálie a škodlivé plyny. (GOLD, 2021)

Ďalšími rizikovými faktormi môžu byť pohlavie a vek. Ukázalo sa, že častejšie postihované býva ženské pohlavie z dôvodu vyššieho rizika pre rozvoj obštrukcie. Pravdepodobnosť výskytu ochorenia sa s pribúdajúcim vekom zvyšuje, najmä po 40. roku života. Do istej miery zohráva úlohu aj genetická predispozícia, ktorá môže mať za následok vytvorenie závislosti na nikotíne, či nedostatočný vývoj pľúc v detstve. Taktiež má veľký vplyv aj socioekonomický status jedinca. V chudobných krajinách sveta, kde sú základné podmienky pre prežitie jedinca veľmi limitované a kde nie je častokrát zabezpečená ani hygiena, je riziko pre rozvinutie CHOCHP veľmi vysoké. Ide najmä o zeme Tretieho sveta, teda regióny Afrického kontinentu, Južnej Ameriky či východného Stredomoria. (GOLD, 2021; Gordon *et al.*, 2014)

Jednou z hlavných príčin ťažkého odhadu globálnej prevalencie CHOCHP je nedostatočná diagnostika, najmä v krajinách s nízkym príjmom. Diagnostika je podceňovaná obzvlášť u mladších pacientov, nefajčiarov alebo u ľudí s nižším vzdelaním. V súčasnosti je toto ochorenie vo svete treťou najčastejšou príčinou smrti. V roku 2015 na túto chorobu zomrelo približne 3,2 milióna pacientov. (Rabe *et al.*, 2017)

3.2.2 Patofyziológia

Medzi najčastejšie prejavy CHOCHP patrí chronický produktívny kašeľ a dýchavičnosť. Kašeľ patrí medzi prvé symptómy, ktoré sa preukážu. Pacientami býva často popisovaný ako „fajčiarsky kašeľ“, ktorý je zvyčajne spojený so zvýšenou rannou tvorbou hlienu. Hlien spôsobuje sťaženú výmenu vzduchu v pľúcach. Prítomnosť produktívneho kašľa počas obdobia viac ako troch mesiacov v dvoch po sebe nasledujúcich rokoch, je definovaná ako chronická bronchitída. Je spojená so zrýchleným poklesom funkcie pľúc, väčším rizikom akútnych exacerbácií a aj vyššou mortalitou. CHOCHP sa môže prejaviť aj bez prítomnosti chronickej bronchitídy, avšak častejšie je pozorovaný ich spoločný výskyt. (Hattab *et al.*, 2016; GOLD, 2021; Kim *et Criner*, 2013)

Primárne mechanizmy zodpovedné za nadmerné množstvo hlienu pri CHOCHP sú spojené s metaplaziou a hyperplaziou epitelových buniek. Metaplazia

znamená premenu diferencovaného tkaniva na iný typ. V tomto prípade je to zmena dlaždicového epitelu na žľazový. Hyperplázia je stav, kedy dochádza k produkcií zvýšeného počtu buniek. Hypersekrécia hlienu sa vyvíja v dôsledku dlhodobého vystavenia sa škodlivým faktorom prostredia, alebo zápalovej bunkovej aktivácie transkripcie génu pre tvorbu mucínu prostredníctvom aktivácie receptora pre epidermálny rastový faktor. (Kim *et Criner*, 2013)

Autoimunitná signalizácia, vyvolaná výskytom zápalu, stimuluje tvorbu imunitných buniek, najmä makrofágov a neutrofilov. Makrofágy, neutrofil, eozinofily a dendritické bunky zhromaždené v mieste zápalu tvoria prirodzenú imunitnú odpoveď. Proteolytické enzýmy a reaktívne kyslíkové radikály prispievajú k poškodeniu tkaniva, najmä ak nie sú prítomné žiadne antiproteázy alebo antioxidantné faktory. Časom sa zvyšuje aj hladina B lymfocytov, T lymfocytov a protilátok, čo vyvoláva Th1 imunitnú odpoveď. (Madore *et Laprise*, 2010; Rabe *et al.*, 2017).

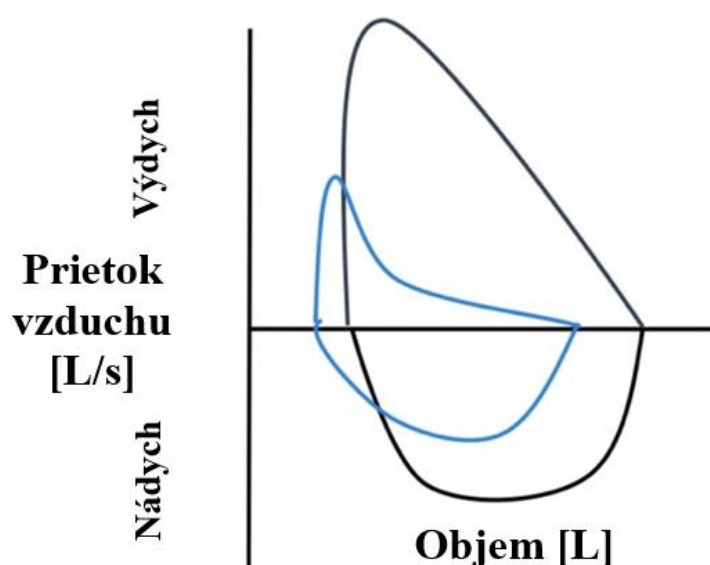
Chorobný proces zahŕňa remodeláciu pľúcneho tkaniva a stratu elasticity, ku ktorej dochádza emfyzematóznou deštrukciou pľúcnych alveol. Pľúcne alveoly sú veľmi náchylné ku akémukoľvek druhu poškodenia. Pri vzniku emfyzému dochádza k progresívnemu poklesu povrchu pre výmenu dýchacích plynov, čo má za následok zníženie hodnoty FEV1. FEV1 je definovaná ako objem vzduchu, ktorý je usilovne vydychnutý za 1 sekundu po maximálnom nádychu. U zdravých osôb by mala dosahovať 80 % a viac. (Vestbo *et Lange*, 2016; GOLD, 2021; Rabe *et al.*, 2017)

3.2.3 Diagnostika

Kľúčovým faktorom pri diagnostike CHOCHP je identifikácia stupňa obštrukcie dýchacích ciest. Zohľadňované sú však aj ďalšie činitele, ako prítomnosť spirometrického nálezu, stav aktuálne vyskytujúcich sa symptómov, výskyt komorbidít a exacerbácií. (GOLD, 2021)

Najčastejšie používaným nástrojom pre stanovenie diagnózy tohto ochorenia je spirometrické vyšetrenie. Ide o bežne dostupnú neinvazívnu metódu s jednoduchým prevedením. Výhodou je najmä možnosť opakovania meraní podľa potreby. Proces vyšetrenia je zahájený podaním látok, ktoré spôsobujú maximálnu relaxáciu dýchacích ciest a zároveň minimalizujú variabilitu, tzv. bronchodilatátory. (GOLD, 2021)

Spirometria sleduje dve základné hodnoty: FEV_1 (objem vzduchu, ktorý je usilovne vydýchnutý za 1 sekundu po maximálnom nádychu) a FVC (maximálny objem vzduchu, ktorý je možný vydýchnuť počas 1 minúty po maximálnom nádychu). Pre stanovenie výsledkov je potrebné určiť Tiffeneau index, čo je vlastne pomer hodnôt FEV_1/FVC . Hodnota pomeru nižšia ako 0,70 preukazuje prítomnosť obštrukcie dýchacích ciest a zároveň aj samotnú diagnózu CHOCHP. Výstupom spirometrického merania je graf nazývaný spirogram, ktorý je znázornený na **Obrázku 4**. (GOLD, 2021)



Obrázok 4: Výstup zo spirometrického vyšetrenia (spirogram), ktorý porovnáva merania u pacienta s výskytom obštrukcie dýchacích ciest (modrá krivka) a u zdravého pacienta bez prítomnosti obštrukcie (čierna krivka). Prevzaté a upravené z Ni, 2020.

Hoci je spirometrická diagnostika veľmi citlivá metóda, jej špecifickosť je nižšia. Z tohto dôvodu je potrebné pre konečné a presné určenie diagnózy použitie doplnujúcich testov. Sú známe testy ako, CATTM test (COPD Assessment Test), CCQ[®] (COPD Control Questionnaire) a mMRC (Modified British Medical Research Council Questionnaire). Spoločným znakom týchto testov je ich zameranie sa na symptómy ochorenia. Konkrétne CATTM popisuje stupeň zhoršenia zdravotného stavu pacienta vplyvom symptómov ochorenia, zatiaľ čo mMRC popisuje konkrétne symptómy (napríklad meranie stupňa dýchavičnosti). Tieto metódy umožňujú predpokladať ďalší vývoj ochorenia a predpovedať mieru pravdepodobnosti úmrtia. (GOLD, 2021)

Spirometrické vyšetrenie by sa malo zväžiť u každého pacienta, ktorý preukazuje prítomnosť niektorých z vyššie spomenutých príznakov ochorenia a obzvlášť u tých, ktorí sa neustále nachádzajú v rizikovom prostredí. Nie je však odporúčané vykonávať merania počas výskytu akútnej exacerbácie. (Hattab *et al.*, 2016)

3.2.4 Klasifikácia CHOCHP

Podľa GOLD, 2021 sú pacienti trpiaci CHOCHP zaraďovaní do 4 základných skupín na základe hodnoty FEV₁, ktorá je ovplyvnená stupňom obštrukcie dýchacích ciest:

- GOLD 1 – mierne štádium
- GOLD 2 – priemerné štádium
- GOLD 3 – ťažké štádium
- GOLD 4 – veľmi ťažké štádium

3.2.5 Exacerbácie a komorbidity

Akútna exacerbácia je definovaná ako akútne zhoršenie respiračných symptómov, ktoré si vyžadujú zmenu každodennej liečby. Výskyt exacerbácií môže byť samostatne alebo spoločne s ostatnými iného druhu. Hlavnou príčinou exacerbácií sú najmä virálne a bakteriálne nákazy, pričom u pacientov postihnutých CHOCHP môžu mať veľmi ťažký priebeh. Najčastejšie sú virálne nákazy spôsobené ľudským rinovírusom, ktorý zasahuje primárne horné dýchacie cesty a spôsobuje nádchu. Priemerná dĺžka trvania exacerbácie je 7 – 10 dní. (GOLD, 2021; Hattab *et al.*, 2016; Neumannová *et al.*, 2018)

Komorbidity je spoločné označenie pre choroby, ktorými bývajú pacienti s CHOCHP často postihnutí. Medzi bežne vyskytujúce sa komorbidity patria kardiovaskulárne choroby, osteoporóza, cukrovka, depresia a rakovina pľúc. Pacientom bývajú zväčša diagnostikované viac ako tri ochorenia.

V dôsledku prítomnosti komorbidít u pacientov môže dôjsť k zhoršeniu samotného priebehu CHOCHP. Jedným z hlavných rizikových faktorov výskytu komorbidít je fajčenie. (GOLD, 2021; Jones *et al.*, 2016; Rabe *et al.*, 2017)

3.3 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale je charakterizovaná ako chronické zápalové ochorenie dýchacích ciest, pri ktorom dochádza k alergickej reakcii. Táto reakcia je vyvolaná podráždením dýchacích ciest alergénom a spôsobuje opuch sliznice, zúženie priedušiek a nadmernú produkciu hlienu. (GINA, 2020; Mims, 2015)

3.3.1 Príčiny

Alergény sú látky stimulujúce hypersenzitivitu imunitného systému na podnet vonkajšieho prostredia, teda sú spúšťáčmi alergickej reakcie u pacientov trpiacich AB. Avšak za normálnych okolností u zdravých jedincov nie sú schopné vyvolať imunitnú odpoveď. Existujú rôzne typy alergénov, pričom pri astme sa najčastejšie stretávame s inhalačnými typmi, ktorým sú ľudia vystavovaní vo vonkajšom prostredí alebo domácom prostredí. Do tejto skupiny patria napríklad rôzne druhy peľov z tráv, okrasných kvetov (púpava, skorocel), či kvitnúcich stromov (breza, lieska). Zvýšený výskyt peľov v ovzduší, najmä na jar, je spojený so zhoršením prejavov astmy. (Bousquet *et al.*, 2008; Mims 2015)

Ďalšími často vyskytujúcimi sa alergénmi môžu byť zvieracie chlpy (mačka, pes, hlodavce), rôzne druhy plesní alebo hmyz. Z hmyzu sú typickými predstaviteľmi alergénov roztoče, najmä ich trus. V domácnostiach sú roztoče bežne prítomné v prachu, v matracoch, kde sa živia odumretými epidermálnymi bunkami, a taktiež aj v kobercoch. Okrem alergénov môžu byť spúšťáčmi alergickej reakcie aj tabakový dym, rôzne vírusové infekcie horných a dolných dýchacích ciest, cvičenie či stres. (Bousquet *et al.*, 2008)

3.3.2 Patofyziológia

Typickým prejavom AB sú astmatické záchvaty. Pri týchto záchvatoch dochádza k opuchu sliznice, ktorá je vyvolaná chronickým zápalom, čo následne spôsobuje bronchiálnu hyperreaktivitu a dochádza k bronchokonstrikcii. Opuch sliznice je podkladom pre štrukturálne a patofyziologické zmeny prieduškovvej steny a vyvoláva zvýšenú produkciu hlienu, čo pacientovi ešte väčšmi sťažuje dýchanie. (Neumannová *et al.*, 2018; GINA, 2020)

Popri astmatických záchvatoch sa objavujú aj ďalšie symptómy, ako napríklad pocit tlaku na hrudi, dýchavičnosť, nepravidelný kašeľ, ktorý môže mať zakaždým

rozdielnu intenzitu alebo hvízdavé dýchanie. Pacienti sú v období medzi záchvatmi asymptomatickí, avšak môžu sa u nich prejavíť príznaky aj v tomto období. (GINA, 2020)

Ďalším prejavom je zvýšený výskyt mastocytov, eozinofilných, bazofilných a neutrofilných granulocytov. Tie sa tvoria v dôsledku Th2 imunitnej odpovede, ktorá je vyvolaná prítomnosťou chronického zápalu. Vplyv vonkajšieho prostredia a zmeny metabolizmu pacienta predstavujú rizikové faktory. (Kašák *et al.*, 2001; Madore *et Laprise*, 2010)

Väčšinou sa astma prejaví už v detstve, môže sa však rozvinúť aj počas dospelosti. Na svete sa vyskytuje približne 339 miliónov ľudí, ktorí majú diagnostikované toto ochorenie. Astma býva tiež veľmi často ovplyvnená genetickými predispozíciami. (Kašák *et al.*, 2001; Mims, 2015)

3.3.3 Diagnostika

Stanovenie diagnózy ochorenia sa delí na dve základné časti. Prvá časť pozostáva z dôkladnej anamnézy dýchacích ťažkostí pacienta. Na základe anamnézy je možné určiť stupeň AB a taktiež príčinu prejavu symptómov u pacienta. Ďalším krokom po stanovení anamnézy je fyzikálne vyšetrenie, ktoré sleduje abnormality pri dýchaní, ako sú vrzganie alebo piskot. Týmto spôsobom sa sleduje možný výskyt obštrukcie dýchacích ciest. (Teřl, 2007)

Druhá časť stanovovania diagnózy je založená na spirometrickom vyšetrení. Podobne, ako u CHOCHP, sa pri meraní sledujú hodnoty FEV₁ a FVC. V prípade, že je pomer týchto dvoch hodnôt nižší ako 75 % alebo hodnota FEV₁ je nižšia ako 80 % náležitej hodnoty, je potvrdená diagnóza AB. Merania je však potrebné vykonať v niekoľkých opakovaniach za odlišných podmienok a pri výskyte rôznych symptómov. S rastúcou variabilitou výsledkov je určenie diagnózy astmy presnejšie. (GINA, 2020; Fajt *et Wenzel*, 2015)

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologický materiál

Pre laboratórnu diagnostiku relatívnej expresie zápalového faktoru TNF α boli použité vzorky bronchoalveolárnej laváže získané od 62 pacientov. Všetkým respondentom štúdie boli vzorky odobrané na základe informovaného súhlasu vo Fakultnej nemocnici v Olomouci na Oddelení pľúcnych chorôb a tuberkulózy. Z celkového počtu bolo 22 pacientov s diagnózou chronická obštrukčná choroba pľúc a 14 pacientov s diagnózou astma bronchiale. 26 pacienti boli zaradení do kontrolnej skupiny, u ktorej bola preukázaná chronická bronchitída (**Tabuľka 1**). Na základe medzinárodných odporúčaní pre AB (GINA – Global Initiative for Asthma) a pre CHOCHP (GOLD – Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease), bola determinovaná astma bronchiale a chronická obštrukčná choroba pľúc.

Tabuľka 1: Základná charakteristika pacientov.

Charakteristika	KS*	CHOCHP*	AB*
Počet pacientov	26	22	14
Vekový priemer (min, max)	45 (22, 67)	57 (24, 79)	38 (20, 69)
Muži	10	11	5
Ženy	16	11	9
Nefajčiari	15	4	10
Bývalí fajčiari	2	5	1
Aktívni fajčiari	8	10	2
Nedostupné data o fajčení	1	3	1
Štádium (gold 1/2/3/4)	-	3/7/5/3/5	-

* Legenda: KS – kontrolná skupina pacientov, CHOCHP – pacienti s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc, AB – pacienti s astmou bronchiale

4.2 Použité chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- 100% ethanol (Sigma-Aldrich, kat. č. E7023)
- RNase-Free voda (Qiagen, kat. č. 129112)
- PBS – RNase free (Thermo Fisher Scientific, kat. č. AM9625)
- Acid-Phenol/Chloroform (Invitrogen, kat. č. AM9722)
- Rnase AWAY Surface Decontaminant (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 7002PK)
- TaqMan® Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 4331182)
- TaqMan® Fast advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 4444556)
- RNAlater (Life technologies, kat. č. AM7021)

Použité súpravy

- *mirVana*TM miRNA Isolation kit (Life technologies, kat. č. AM1561)
- SuperScriptTM VILOTM cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, kat. č. 11754250)

Použité roztoky a ich príprava

- Pre prípravu PBS rozpustiť v 800 ml destilovanej H₂O za stáleho miešania nasledujúce chemikálie: 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na₂HPO₄; 2,4 g KH₂PO₄. Objem doplniť do 1 000 ml a pomocou HCl upraviť na požadované pH. Následne pomocou autoklávu sterilizovať.

4.3 Zoznam prístrojov a zariadení

- Chladená centrifuga Z300K (HERMLE labortechnik)
- Centrifuga spretrafuge 16M (Labnet)
- Spretrafuge C1301 (Labnet)
- NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Laminárny flowbox BSB 4A (Gelaire)
- Mastercycler pro (Eppendorf)
- Termálny cykler Rotor Gene 3000 (Corbett Research)
- Thermoblock 603/3 (Auxilab)

4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

Vzorky brochoalveolárnej laváže boli spracované prostredníctvom troch základných experimentálnych postupov. Izoláciou mRNA, reverznou transkripciou vyizolovanej mRNA do cDNA a kvantitatívnou PCR metódou.

4.4.1 Izolácia mRNA

Izolácia mRNA zo vzoriek bola vykonaná pomocou mirVana miRNA isolation kitu. Pre správne použitie kitu, bolo potrebné všetky jeho zložky pred každým použitím vytemperovať na izbovú teplotu. Všetky vzorky buniek získané od pacientov boli uchovávané pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v roztoku RNA later, ktorý slúžil ako stabilizátor bunkovej RNA. Pridaním $350\text{ }\mu\text{l}$ PBS a centrifugáciou po dobu 60 minút, pri 40000 g a teplote $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, bol RNA later odstránený. Po centrifugácii bol odobraný supernatant. K peletu v mikroskúmavke bolo pridaných $600\text{ }\mu\text{l}$ lysis/binding solution a všetky zložky boli dôkladne zvortexované. Následne bolo k lyzátu pridaných $1/10$ objemu miRNA Homogenate Additive. Vzorka bola dôkladne premiešaná a inkubovaná 10 minút na ľade. Po inkubácii bola pridaná spodná fáza Acid- Phenol/Chloroformu v rovnakom objeme, ako mal pôvodný lyzát. Takto pripravená vzorka bola pomocou vortexu krátko premiešaná a následne centrifugovaná po dobu 5 minút pri $10\text{ }000\text{ g}$ a izbovej teplote. V dôsledku centrifugácie došlo k oddeleniu vodnej (hornej) a organickej (spodnej) fázy. Bolo odpipetované čo najväčšie množstvo vodnej fázy a prenesené do čistej mikroskúmavky. K tejto fáze bol pridaný 100% ethanol o objeme $1,25 \times$ väčšom, ako objem prenesený do skúmavky. Do novej mikroskúmavky bol umiestnený filter, na ktorý bolo nanosených $700\text{ }\mu\text{l}$ vzorky. Zmes bola centrifugovaná po dobu 15 sekúnd pri $10\text{ }000\text{ g}$. Následne bola pretečená tekutina z mikroskúmavky odstránená. Tento proces bol opakovaný až do premytia celého obsahu vzorky. Ďalej bolo na kolónu s filtrom nanosených $700\text{ }\mu\text{l}$ wash solution 1 a kolóna bola centrifugovaná po dobu 10 sekúnd pri $10\text{ }000\text{ g}$ a pretečená tekutina bola opäť odsatá. Na filter bolo nanosených $500\text{ }\mu\text{l}$ wash solution 2/3 a bola prevedená centrifugácia po dobu 10 sekúnd pri $10\text{ }000\text{ g}$, po ktorej bola tekutina odstránená. Tento krok bol opakovaný ešte dvakrát. Pre dôkladné odstránenie prebytočnej tekutiny z filtra bola prevedená centrifugácia po dobu 1 minúty pri $10\text{ }000\text{ g}$. Filter bol prenesený do čistej mikroskúmavky a na stred bolo nanosených $100\text{ }\mu\text{l}$ dopredu predhriatej Rnase-free

vody na 95 °C. Z dôvodu elúcie vyizolovanej miRNA z filtra do mikroskúmavky, bola v ďalšom kroku prevedená centrifugácia po dobu 30 sekúnd pri 14 000g.

Boli odobrané 2 µl vzorky na meranie koncentrácie pomocou Nanodropu. Finálny krok pozostával z pridania 2 µl Rnázínu k 100 µl vzorky. Hotová vzorka bola uskladnená do -80 °C.

4.4.2 Reverzná transkripcia

Pre reverznú transkripciu vyizolovanej mRNA do cDNA bol použitý SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit. Jednotlivé vzorky boli vytiahnuté z chladiaceho boxu (-80 °C), postupne rozpustené na ľade a pomocou vortexu premiešané. Podľa **Tabuľky 2** bola pripravená reakčná zmes (RT mix), ktorá bola neustále chladená na ľade. RT mix bol následne jemne premiešaný a rozpipetovaný k 14 µl RNA. Celkový objem jednej reakcie činil 20 µl. Takto pripravené vzorky boli následne vložené do prístroja Mastercycler pro, v ktorom bola uskutočnená reverzná transkripcia podľa teplotného a časového profilu uvedeného v **Tabuľke 3**. Na záver, po ukončení reakcie, boli vzorky ihneď chladené na ľade a výsledná cDNA bola skladovaná pri teplote -20 °C pre ďalšiu manipuláciu.

Tabuľka 2: Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu.

Látka	Objem na 1 reakciu [µl]
5X VILO™ Reaction Mix	4
10X SuperScript™ Enzyme Mix	2
Celkom	6

Tabuľka 3: Teplotný a časový profil reverznej transkripcie.

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

4.4.3 Kvantitatívna PCR

Pre dosiahnutie náležitých výsledkov z kvantitatívnej PCR bolo potrebné nariadiť jednotlivé vzorky cDNA na rovnakú koncentráciu, ktoré boli následne uchovávané pri -20 °C. Pred začatím reakcie bola templátová cDNA postupne rozpustená na ľade a zvortexovaná. Pridaním jednotlivých zložiek podľa **Tabuľke 4** bol pripravený PCR mix. Do mixu bola pridaná ako posledná zo zložiek fluorescenčná sonda 20X TaqMan® Gene Expression Assay za tmavších svetelných podmienok, s cieľom obmedziť vysvietenie fluorescenčnej zložky sondy. Hotový PCR mix bol jemne zvortexovaný a rozpipetovaný spolu s templátovou cDNA do mikroskúmaviiek v pomere 18:2 (18 µl mixu, 2 µl cDNA). Teda celkový objem reakcie činil 20 µl. Takto pripravené vzorky boli následne vložené do prístroja Rotor Gene 3000, kde prebehla PCR reakcia podľa teplotného a časového profilu uvedeného v **Tabuľke 5**. Na stanovenie relatívnej expzie TNF α bol použitý housekeeping gén PSMB2.

Tabuľka 4: Zloženie reakčnej zmesi pre PCR reakciu.

Látka	Objem na 1 reakciu [µl]
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	10
RNase-free voda	7
20X TaqMan® Gene Expression Assay	1
cDNA templát	2
Celkom	20

Tabuľka 5: Teplotný a časový profil PCR reakcie.

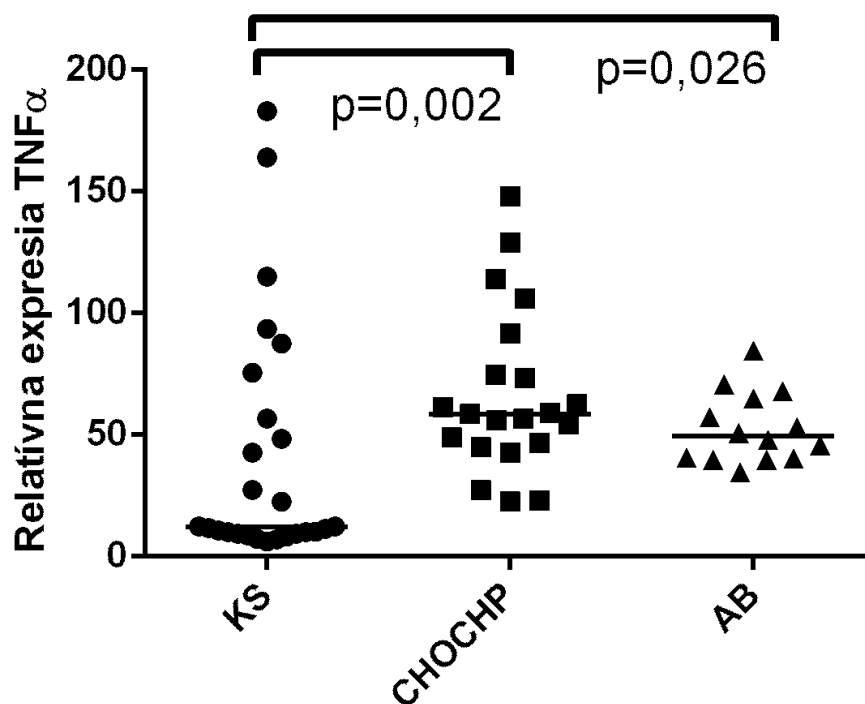
Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
50	2 min	1
95	10 min	1
95	15 sec	
60	1 min	40

4.5 Štatistické vyhodnotenie

Štatistické výsledky relatívnej expresie TNF α získané laboratórnymi postupmi boli vyhodnotené prostredníctvom Mann-Whitney testu. Pre grafické zobrazenie tohto hodnotenia bol použitý program GraphPad Prism. Za štatisticky signifikantné sa považovali hodnoty $p < 0,05$.

5 VÝSLEDKY

Na základe štatistického spracovania nameraných hodnôt relatívnej expresie TNF α , ktorých výstup je uvedený na **Obrázku 5**, bolo zistené, že pri porovnaní pacientov s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc a kontrolnej skupiny s chronickou bronchitídou bola expresia zvýšená u pacientov s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc ($p = 0,02$). Taktiež u pacientov s astmou bronchiale je možné tvrdiť, že relatívna expresia TNF α bola vyššia než u kontrolnej skupiny ($p = 0,026$). Medzi pacientami s astmou bronchiale a s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc sa relatívna expresia TNF α nelíšila ($p > 0,05$).



Obrázok 5: Porovnanie relatívnej expresie TNF α medzi pacientami s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc, s astmou bronchiale a kontrolnou skupinou.

* Legenda: Jednotlivé skupiny pacientov

● - kontrolná skupina s chronickou bronchitídou (n = 26)

■ - skupina s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc (n = 22)

▲ - skupina s astmou bronchiale (n = 14)

6 DISKUSIA

V našej práci sme pozorovali zvýšenú expresiu TNF α u pacientov s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc a astmou bronchiale. Väčšina skorších štúdií, ako Goday *et al.* (1996), Francia *et al.* (1994), Serapinas *et al.* (2011), Pini *et al.* (2010), Calikoglu *et al.* (2004), Oncel *et al.* (2010), Mathanraj *et al.* (2017), bola zameraná na sledovanie hladiny TNF α v krvi. Yao *et al.* (2019) publikovali meta analýzu týchto štúdií a prišli k záveru, že hladina TNF α je zvýšená u pacientov s CHOCHP. Len veľmi málo štúdií bolo zameraných na lokálny zápal a stanovili expresiu TNF α v bronchoalveolárnej laváži alebo sputu. Boli to práce od tímov El-Shimy *et al.* (2014), Kleniewska *et al.* (2016), Foschino Barbaro *et al.* (2007). Tieto štúdie taktiež publikovali zvýšenú produkciu TNF α , ktorá bola meraná na proteínovej úrovni. Na rozdiel od tejto bakalárskej práce, vyššie zmieňované štúdie porovnávali pacientov so zdravými kontrolami.

Hlavným prínosom našej práce je porovnanie medzi pacientami s CHOCHP a kontrolnou skupinou pacientov, ktorí mali diagnostikovanú chronickú bronchitídu. Chronická bronchitída je definovaná ako chronický produktívny kašeľ trvajúci aspoň po dobu 3 mesiacov v dvoch po sebe idúcich rokoch. Pacienti s CHOCHP taktiež často trpia chronickým kašľom, avšak u nich je navyše diagnostikovaná obštrukcia dýchacích ciest. Naše výsledky preto potvrdzujú už v minulosti publikovanú súvislosť medzi TNF α a CHOCHP a súčasne rozširujú aktuálne znalosti o súvislosti medzi TNF α a pľúcnou obštrukciou. Podobne Hodge *et al.* (2007) odhalili negatívnu koreláciu medzi pľúcnou obštrukciou a množstvom bronchoalveolárnych buniek produkujúcich TNF α .

Ďalším prínosom tejto práce je stanovenie expresie TNF α v bronchoalveolárnych bunkách získaných od pacientov s bronchiálnou astmou. Podobne ako u CHOCHP, väčšina predchádzajúcich štúdií týkajúcich sa astmy bronchiale, sa zamerala na meranie vo vzorkách krvného séra (Jiang *et al.* (2018), Wang *et al.* (2015), Nasser *et Ezzat* (2018), Golikova *et al.* (2013)). Tieto práce zhodne popisali zvýšenú hladinu TNF α v krvi. Jednou z mála prác zameraných na lokálny pľúcny zápal je práca publikovaná tímom Ying *et al.* (1991). Autori v nej naznačili zvýšenú produkciu TNF α v BAL získanej od pacientov s astmou. Tieto výsledky sú v súlade s našim pozorovaním zvýšenej bronchoalveolárnej expresie

TNF α u astmy bronchiálne. Zatiaľ čo expresia bola zvýšená u oboch pľúcnych ochorení, nepozorovali sme rozdiel v TNF α medzi CHOCHP a AB. Toto pozorovanie naznačuje dôležitú úlohu TNF α v patofyziológii u oboch pľúcnych ochorení. Význam zvýšenej expresie TNF α sa pravdepodobne medzi týmito dvoma pľúcnymi ochoreniami líši. Na rozdiel od našej práce, Kubysheva *et al.* (2020) publikovali rozdiel v sérovej hladine TNF α medzi CHOCHP a AB. V **Tabuľke 6** je uvedený stručný prehľad vyššie spomínaných štúdií, ktorých výsledky boli porovnávané s výsledkami našej práce.

Tabuľka 6: Stručný prehľad štúdií zameraných na expresiu TNF α u pacientov s CHOCHP a AB.

Faktor	Ochorenie	Expresia	Biologický materiál	n	Metóda	Referencie
TNF α	CHOCHP	↑	krv	20	ELISA	Godoy <i>et al.</i> (1996)
	CHOCHP	↑	sérum	30	Imunoesej	Francia <i>et al.</i> (1994)
	CHOCHP, ACO, AB	↑	sérum	147	ELISA	Kubysheva <i>et al.</i> (2020)
	CHOCHP	↑	sérum	320	ELISA	Serapinas <i>et al.</i> (2011)
	CHOCHP	↑	krv	5	NEP	Pini <i>et al.</i> (2010)
	CHOCHP	↑	sérum, BAL	50	ELISA	El-Shimy <i>et al.</i> (2014)
	AB	↑	sérum	170	ELISA	Jiang <i>et al.</i> (2018)
	AB	↑	sérum	85	ELISA, Western blot	Wang <i>et al.</i> (2015)
	AB	↑	sérum	102	ELISA, PCR	Nasser <i>et al.</i> (2018)

Faktor	Ochorenie	Expresia	Biologický materiál	n	Metóda	Referencie
TNF α	AB	↑	krv	15	ELISA	Golikova <i>et al.</i> (2013)
	AB	↑	BAL	10	ISH	Ying <i>et al.</i> (1991)
	CHOCHP	↑	ČK, plazma	42	ELISA	Calikoglu <i>et al.</i> (2004)
	CHOCHP	↑	krv	40	ELISA	Oncel <i>et al.</i> (2010)
	CHOCHP, OA	↑	sérum, sputum	44	ELISA	Kleniewska <i>et al.</i> (2016)
	CHOCHP	↑	sputum, kondenzát	27	ELISA	Foschino Barbaro <i>et al.</i> (2007)
	CHOCHP	↑	sputum	47	ELISA	Guiot <i>et al.</i> (2017)
	CHOCHP	↑	krv	108	ELISA	Mathanraj <i>et al.</i> (2017)
	CHOCHP	↑	krv, BAL, BB	25	Prietoková cytometria	Hodge <i>et al.</i> (2007)

* Legenda: ↑ - zvýšená expresia, TNF α – tumor nekrotizujúci faktor, CHOCHP – chronická obštrukčná choroba pľúc, AB – astma bronchiale, ACO – prekryv chronickej obštrukčnej choroby a astmy bronchiale (ACO syndróm), OA – profesijná astma, BAL – bronchoalveolárna laváž, BB – bronchoepiteliálne bunky, ČK – červené krvinky, ELISA – enzýmová imunosorbentná analýza, PCR – polymerázová reťazová reakcia, ISH – *in situ* hybridizácia, NEP – metóda negatívneho výdychového tlaku.

7 ZÁVER

Teoretická časť tejto práce bola zameraná na bližšiu charakterizáciu génu TNF α a jeho receptorov. Ďalej zhrňuje klinické poznatky na úrovni patofyziológie, týkajúce sa pľúcnych zápalových ochorení, ako sú chornická obštrukčná choroba pľúc (CHOCHP) a asthma bronchiale (AB).

Experimentálna časť tejto bakalárskej práce sa zamerala na stanovenie relatívnej expresie TNF α vo vzorkách bronchoalveolárnej laváže získaných od pacientov diagnostikovaných s CHOCHP alebo AB za použitia metódy kvantitatívnej PCR. Zvýšená hodnota expresie TNF α bola pozorovaná u oboch skupín pacientov v porovnaní s kontrolnou skupinou. Naopak medzi týmito skupinami navzájom nebola pozorovaná významná odlišnosť v hodnotách expresie. Pre komplexnú presnosť je však potrebné získané výsledky overiť na proteínovej úrovni.

Pozorovania našej práce boli na záver porovnané a diskutované s analogicky zameranými štúdiami. Výsledky našej štúdie sa zhodovali s výsledkami ostatných štúdií. Avšak toto porovnanie je do istej miery limitované aplikáciou variabilných metód, odlišných typov vzoriek a taktiež rôznym počtom pacientov v sledovaných skupinách. Zistenia a výsledky tejto práce môžu byť ďalej aplikované v terapii zápalových ochorení dýchacích ciest.

8 LITERATÚRA

- Aggarwal B. B., Gupta S. C., Kim J. H. (2012): Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 119: 651-665.
- Aggarwal B. B., Kohr W. J., Hass P. E., Moffat B., Spencer S. A., Henzel W. J., Bringman T. S., Nedwin G. E., Goeddel D. V., Harkins, R. N. (1985): Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *The Journal of biological chemistry* 260: 2345-2354.
- Aggarwal B. B., Moffat B., Harkins R. N. (1984): Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *The Journal of biological chemistry* 259: 686-691.
- Barbaro M. P. F., Carpagnano G. E., Spanevello A., Cagnazzo M. G., Barnes P. J. (2007): Inflammation, oxidative stress and systemic effects in mild chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 20: 753-763.
- Berry M., Brightling CH., Pavord I., Wardlaw A. (2007): TNF- α in asthma. *Current opinion in Pharmacology* 7: 279-282.
- Beutler B., Bazzoni F. (1998): TNF, apoptosis and autoimmunity: a common thread?. *Blood cells, molecules & diseases*, 24: 216-230.
- Beyaert R., Fiers W. (1994): Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. *FEBS letters* 340: 9-16.
- Bousquet J., Khaltaev N., Cruz A. A., Denburg J., Fokkens W. J., Togias A., Zuberbier T., Baena-Cagnani C. E., Canonica G. W., van Weel C., Agache I., Ait-Khaled N., Bachert C., Blaiss M. S., Bonini S., Boulet L. P., Bousquet P. J., Camargos P., Carlsen K. H., Chen Y., ... *AllerGen* (2008): Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008. *Allergy* 63: 8-160.
- Calikoglu M., Sahin G., Unlu A., Ozturk C., Tamer L., Ercan B., Kanik A., Atik U. (2004): Leptin and TNF-alpha levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease and their relationship to nutritional parameters. *Respiration; international review of thoracic diseases* 71: 45-50.

- Corren J. (2013): Asthma phenotypes and endotypes: an evolving paradigm for classification. *Discovery Medicine* 15: 243-249.
- de Godoy I., Donahoe M., Calhoun W. J., Mancino J., Rogers R. M. (1996): Elevated TNF-alpha production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 153: 633-637.
- Deleault K.M., Skinner S.J., Brooks S.A. (2008): Tristetraprolin regulates TNF TNF-alpha mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways. *Molecular Immunology* 45: 13-24.
- Di Francia M., Barbier D., Mege J. L., Orehek, J. (1994): Tumor necrosis factor-alpha levels and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 150: 1453-1455.
- El-Shimy W.S., El-Dib A.S., Nagy H.M., Sabry W. (2014): A study of IL-6, IL-8, and TNF- α as inflammatory markers in COPD patients. *Egyptian Journal of Bronchology* 8: 91-99.
- Fajt M. L., Wenzel S. E. (2015): Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: the next steps toward personalized care. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135: 299-311.
- Fiers W. (1991): Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS letters* 285: 199-212.
- Franssen F. M., Alter P., Bar N., Benedikter B. J., Iurato S., Maier D., Maxheim M., Roessler F. K., Spruit M. A., Vogelmeier C. F., Wouters E. F., Schmeck B. (2019): Personalized medicine for patients with COPD: where are we?. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 14: 1465-1484.
- Gearing A. J., Beckett P., Christodoulou M., Churchill M., Clements J., Davidson A. H., Drummond A. H., Galloway W. A., Gilbert R., Gordon, J. L. (1994): Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 370: 555-557.

- GeneCards human gene database. [online] [navštívené 22.4.2022] Dostupné z <https://www.genecards.org/>
- GINA – Global Initiative for Asthma (2020). Global strategy for asthma management and prevention. [online] [navštívené 22.4.2022] Dostupné z https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2020/04/GINA-2020-full-report_-final-_wms.pdf
- GOLD – Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (2021). Global strategy for diagnosis, management and prevention of chronic obstructive lung disease. [online] [navštívené 22.4.2022] Dostupné z https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2020/11/GOLD-REPORT-2021-v1.1-25Nov20_WMV.pdf
- Golikova E. A., Lopatnikova J. A., Kovalevskaya-Kucheryavenko T. V., Nepomnyashih V. M., Sennikov S. V. (2013): Levels of TNF, TNF autoantibodies and soluble TNF receptors in patients with bronchial asthma. *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma* 50: 705-711.
- Gordon S. B., Bruce N. G., Grigg J., Hibberd P. L., Kurmi, O. P., Lam K. B., Mortimer K., Asante K. P., Balakrishnan K., Balmes J., Bar-Zeev N., Bates M. N., Breyse P. N., Buist S., Chen Z., Havens D., Jack D., Jindal S., Kan H., Mehta S., Moschovis P., Naeher L., Patel A., Perez-Padilla R., Pope D., Rylance J., Semple S., Martin W. J. (2014): Respiratory risks from household air pollution in low and middle income countries. *The Lancet Respiratory medicine* 2: 823-860.
- Guiot J., Henket M., Corhay J. L., Moermans C., Louis R. (2017): Sputum biomarkers in IPF: Evidence for raised gene expression and protein level of IGFBP-2, IL-8 and MMP-7. *PLOS one* 12: 1-12.
- Hattab Y., Alhassan S., Balaan M., Lega M., Singh A. C. (2016): Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Critical Care Nursing Quarterly* 39: 124-130.
- Hoesterey D., Das N., Janssens W., Buhr R. G., Martinez F. J., Cooper C. B., Tashkin D. P., Barjaktarevic I. (2019): Spirometric indices of early airflow impairment in individuals at risk of developing COPD: Spirometry beyond FEV1/FVC. *Respiratory Medicine* 156: 58-68.

- Chung K. F. (2001): Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *The European respiratory journal. Supplement 34*: 50-59.
- Idriss H. T., Naismith J.H. (2000): TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy research and technique 50*: 184-95.
- Jiang X. G., Yang X. D., Lv Z., Zhuang P. H. (2018): Elevated serum levels of TNF- α , IL-8, and ECP can be involved in the development and progression of bronchial asthma. *The Journal of asthma: official journal of the Association for the Care of Asthma 55*: 111-118.
- Jones P. W., Watz H., Wouters E. F., Cazzola M. (2016): COPD: the patient perspective. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease 11*: 13-20.
- Kašák V., Špičák V., Pohunek P. (2001): Asthma Bronchiale. *Interní medicína pro praxi 3*: 442-445
- Kim V., Criner G. J. (2013): Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 187*: 228-237.
- Kleniewska A., Walusiak-Skorupa J., Piotrowski W., Nowakowska-Świrta E., Wiszniewska M. (2016): Comparison of biomarkers in serum and induced sputum of patients with occupational asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of occupational health 58*: 333-339.
- Kubysheva N., Boldina M., Eliseeva T., Soodaeva S., Klimanov I., Khaletskaya A., Bayrasheva V., Solovyev V., Villa-Vargas L. A., Ramírez-Salinas M. A., Salinas-Rosales M., Ovsyannikov D. Y., 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 2020*: 1-11.
- Liou T. G., Kanner R. E. (2009): Spirometry. *Clinical reviews in Allergy and Immunology 37*: 137-152.
- Madore A. M., Laprise C. (2010): Immunological and genetic aspects of asthma and allergy. *Journal of Asthma and Allergy 3*: 107-121.

- Mathanraj S., Kumar V., Yuvarajan S., Reddy V. (2017): Correlation of serum TNF alpha level with severity of chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Research in Medical Sciences* 5: 3309-3316.
- McGeehan G. M., Becherer J. D., Bast Jr. R. C., Boyer C. M., Champion B., Connolly K. M., Conway J. G., Furdon P., Karp S., Kidao S. (1994): Regulation of tumour necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature* 370: 558-561.
- Mims J. W. (2015): Asthma: definitions and pathophysiology. *International Forum of Allergy and Rhinology* 5: 2–6.
- Murphy K., Travers P., Walport M. (2008): *Janeway's Immunobiology*. 7. vyd. Garland Science, New York, United States.
- Nasser M. Z., Ezzat D. A. (2018): Association of -308G/A Polymorphism and Serum Level of TNF- α with Bronchial asthma in Children. *The Egyptian journal of immunology* 25: 117-124.
- Neumannová K., Kolek V. a kolektiv (2018): *Asthma bronchiale a chronická obstrukční plicní nemoc: Možnosti komplexní léčby z pohledu fyzioterapeuta*. Mladá fronta, Praha, Česká Republika.
- Ni A. (2020): An Approach to: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *McGill Journal of Medicine*, 18: 1-8.
- Oncel C., Baser S., Cam M., Akdağ B., Taspınar B., Evyapan F. (2010): Peripheral neuropathy in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 7: 11-16.
- Pini L., Valsecchi A., Boni E., Guerini M., Tantucci C. (2010): Acute Dynamic Hyperinflation And Systemic Inflammation In Stable COPD Patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181: A2907.
- Rabe K. F., Watz H. (2017): Chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* 389: 1931-1940.
- Sellati T.J., Sahay B. (2014): Cells of Innate Immunity: Mechanisms of Activation. In: McManus L., Mitchell R. (ed.): *Pathobiology of Human Disease*, Academic Press, pp. 258-274.

- Serapinas D., Narbekovas A., Juskevicius J., Sakalauskas R. (2011): Systemic inflammation in COPD in relation to smoking status. *Multidisciplinary Respiratory Medicine* 6: 214-219.
- Smith A. D., Datta S. P., Smith G. H., Campbell P. N., Bentley R., McKenzie H. A. (2006): *Oxford dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*, revised edition. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Spriggs D.R., Deutsch S., Kufe D.W. (1992): Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunology Series* 56: 3-34.
- Steller H. (1995): Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science (New York, N.Y.)*, 267: 1445-1449.
- Teřl M. (2007): Astma bronchiale, novinky v diagnostice a léčbě. *Interní medicína pro praxi* 4: 184-187.
- Tournoy K. G., Kips J. C., Pauwels R. A. (2002): Is Th1 the solution for Th2 in asthma?. *Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 32: 17-29.
- Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C. (2000): Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods* 243: 167-190.
- Vestbo J., Lange P. (2016): Natural history of COPD: Focusing on change in FEV1. *Respirology (Carlton, Vic.)* 21: 34-43.
- Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. (2003): Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10: 45-65.
- Wang L., Chen Q., Shi C., Lv H., Xu X., Yu L. (2015): Changes of serum TNF- α , IL-5 and IgE levels in the patients of mycoplasma pneumonia infection with or without bronchial asthma. *International journal of clinical and experimental medicine* 8: 3901-3906.
- Ying S., Robinson D. S., Varney V., Meng Q., Tsiopoulos A., Moqbel R., Hamid Q. (1991): TNFalpha mRNA expression in allergic inflammation. *Clinical and Experimental Allergy* 21: 745-750.
- Zelová H., Hošek J. (2013): TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation research* 62: 641-651.

Zhou T., Mountz J.D., Kimberly R.P. (2002): Immunobiology of tumor necrosis factor receptor superfamily. *Immunologic Research* 26: 323-36.