

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2021

Diana Novotná

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Matrix metaloproteináza-14 (MMP14)
u plicního zánětu**

Bakalářská práce

Diana Novotná

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

Olomouc 2021

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

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Diana NOVOTNÁ**
Osobní číslo: **R18654**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Matrix metaloproteináza-14 (MMP14) u plicního zánětu**
Téma práce anglicky: **Matrix metalloproteinase-14 (MMP14) in the lung inflammation**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

Zánět doprovází řadu plicních onemocnění. Syntéza matrix metaloproteinázy-14 (MMP14) a dalších cytokinů je zvýšena u plicních onemocnění jako sarkoidóza, chronická obstrukční plicní nemoc nebo astma. U pacientů s plicní sarkoidózou má diagnostický význam vyšetření bronchoalveolární (BA) tekutiny. Tento biologický materiál je také studován u CHOPN a astmatu. Tato bakalářská práce se zaměří na studium regulace a expresi MMP14 v BA buňkách. K tomuto stanovení bude normalizována metoda RT-PCR.

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

Seznam doporučené literatury:

Comparison of lymphocyte immune phenotypes in bronchoalveolar lavage of non-smoking patients with sarcoidosis and other interstitial lung diseases.
Novosadova E, Navratilova Z, Ordeltova M, Zurkova M, Zatloukal J, Kolek V, Petrek M.
J Thorac Dis. 2019 Jun;11(6):2287-2296. doi: 10.21037/jtd.2019.06.05.
The Serum Expression of Selected miRNAs in Pulmonary Sarcoidosis with/without Löfgren's Syndrome.
Novosadova E, Chabronova A, Kolek V, Petrek M, Navratilova Z.
Mediators Inflamm. 2016;2016:1246129. doi: 10.1155/2016/1246129. Epub 2016 Dec 5.
Expression Profile of Six RNA-Binding Proteins in Pulmonary Sarcoidosis.
Navratilova Z, Novosadova E, Hagemann-Jensen M, Kullberg S, Kolek V, Grunewald J, Petrek M.
PLoS One. 2016 Aug 30;11(8):e0161669.
The clinical and immunologic features of pulmonary fibrosis in sarcoidosis.
Patterson KC, Hogarth K, Husain AN, Sperling AI, Niewold TB.
Transl Res. 2012 Nov;160(5):321-31. doi: 10.1016/j.trsl.2012.03.005.

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

Datum zadání bakalářské práce: 12. května 2020
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2021

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 15. března 2021

Bibliografické údaje

| | |
|--------------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Diana Novotná |
| Název práce | Matrix metaloproteináza-14 (MMP14) u plicního zánětu |
| Typ práce | bakalářská |
| Pracoviště | Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci |
| Vedoucí práce | Mgr. Zdenka Navrátilová, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2021 |
| Klíčová slova | MMP14, CHOPN, astma bronchiale, RT-PCR |
| Počet stran | 31 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | čeština |

SOUHRN

Matrix metaloproteinázy (MMP) hrají roli v patogenezi chronických zánětlivých onemocněních plic jako je chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) a astma bronchiale (AB). Nicméně je velmi malé množství klinických studií, které se zabývají studiem exprese matrix metaloproteinázy 14 (MMP14). V této práci byla použita bronchoalveolární laváž (BAL) k určení exprese genu MMP14 u pacientů s CHOPN nebo AB. Cílem této práce bylo změřit expresi MMP14 u 22 pacientů s CHOPN, 14 pacientů s AB a u 25 kontrolních pacientů. Pomocí RT-PCR (polymerázové řetězové reakce v reálném čase) byla měřena relativní exprese genu MMP14. Výsledkem byla snížená exprese genu MMP14 obou skupin pacientů s CHOPN ($p = 0,0001$) nebo s AB ($p = 0,0001$) oproti kontrolní skupině. Mezi pacienty s CHOPN nebo AB nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v expresi genu MMP14. Snížená exprese genu MMP14 by měla být předmětem klinických studií s větším počtem pacientů.

Bibliographical identification

| | |
|--|---|
| Author's first name and surname | Diana Novotná |
| Title | Matrix metalloproteinase-14 (MMP14) in the lung inflammation |
| Type of thesis | bachelor |
| Department | Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc |
| Supervisor | Mgr. Zdenka Navrátilová, Ph.D. |
| The year of presentation | 2021 |
| Keywords | MMP14, COPD, asthma bronchiale, RT-PCR |
| Number of pages | 31 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

SUMMARY:

Matrix metalloproteinases (MMP) have been implicated in the pathogenesis of chronic lung diseases like the chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma bronchial (AB). However, there is little information on MMP14 in clinical studies. We, therefore, investigated the bronchoalveolar lavage (BAL) for the expression of MMP14 in COPD and AB patients. The aim of this work was measured MMP14 in BAL of 22 COPD patients, 14 AB patients and 25 control subjects. The real -time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to analyze the relative expression of this gene. We investigated that the relative expression of MMP14 was decreased in both groups of COPD ($p = 0.0001$) and AB ($p = 0.0001$) patients compared with control subjects. There was no significant difference between the COPD and the AB patients. The downregulation of MMP14 should be further investigated in clinical studies with a larger number of patients.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně na Univerzitě Palackého v Olomouci pod vedením Mgr. Zdenky Navrátilové*, Ph.D. a uvedla všechny použité zdroje informací. *Ústav Patologické Fyziologie a Ústav Molekulární a Translační Medicíny, Lékařská Fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

V Olomouci dne

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce Mgr. Zdence Navrátilové, Ph.D. za odborné vedení, rady a trpělivost při zpracování této práce.

Tato práce byla vytvořena za grantové podpory IGA UP: LF_2020_004, IGA UP: LF_2021_014 a CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868.

OBSAH

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | ÚVOD..... | 1 |
| 2 | CÍLE PRÁCE..... | 2 |
| 3 | LITERÁRNÍ PŘEHLED | 3 |
| 3.1 | Plicní onemocnění..... | 3 |
| 3.2 | Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) | 3 |
| 3.2.1 | Příčiny..... | 3 |
| 3.2.2 | Patofyziologie | 4 |
| 3.2.3 | Stanovení diagnózy..... | 6 |
| 3.2.4 | Klasifikace CHOPN..... | 8 |
| 3.2.5 | Léčba..... | 8 |
| 3.3 | Astma bronchiale | 9 |
| 3.3.1 | Patofyziologie | 9 |
| 3.3.2 | Stanovení diagnózy..... | 11 |
| 3.3.3 | Léčba..... | 12 |
| 3.4 | Astma-CHOPN překryv (ACO)..... | 12 |
| 3.5 | Matrix metaloproteinázy (MMP)..... | 13 |
| 3.5.1 | Matrix metaloproteináza 14 (MMP14)..... | 14 |
| 3.6 | Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-PCR)..... | 15 |
| 4 | MATERIÁL a METODY | 18 |
| 4.1 | Biologický materiál..... | 18 |
| 4.2 | Použité chemikálie, soupravy a roztoky..... | 19 |
| 4.3 | Seznam použitých přístrojů a zařízení | 19 |
| 4.4 | Použité experimentální a vyhodnocovací postupy..... | 20 |
| 4.4.1 | Izolace RNA | 20 |
| 4.4.2 | Reverzí transkripce | 21 |
| 4.4.3 | Kvantitativní PCR..... | 21 |

| | | |
|-------|-------------------------------|----|
| 4.4.4 | Statistické vyhodnocení | 22 |
| 5 | VÝSLEDKY | 23 |
| 6 | DISKUSE..... | 24 |
| 7 | ZÁVĚR | 25 |
| 8 | LITERATURA | 26 |

SEZNAM SYMBOLŮ a ZKRATEK

| | |
|------------------|--|
| AB | asthma bronchiale |
| ACO | astma-CHOPN překryv |
| BAL | bronchoalveolární tekutina |
| EMC | extracelulární matrix |
| FEV ₁ | usilovně vydechnutý objem vzduchu za 1 vteřinu |
| FVC | usilovná vitální kapacita plic |
| CT | počítačová tomografie |
| CHOPN | chronická obstrukční plicní nemoc |
| Ig | imunoglobulin |
| IL | interleukin |
| INF | interferon |
| MMP | matrix metaloproteináza |
| MT-MMP | transmembránové metaloproteinázy |
| qPCR | kvantitativní polymerázová řetězová reakce |
| RT-PCR | polymerázová řetězová reakce v reálném čase |
| SVC (VC) | pomalá vitální kapacita plic |
| Th | T helper = pomocný T lymfocyt |
| TIMP | tkáňový inhibitor matrix metaloproteináz |
| TNF- β | tumor nekrotizující faktor- β |

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Rozdíl mezi fenotypy CHOPN – chronickou bronchitidou a emfyzémem. Převzato z <https://www.symptomy.cz/nemoc/chronicka-obstrukcni-plicni-nemoc>.

Obrázek 2: Objem usilovně vydechovaného vzduchu (FEV) za určitý časový úsek (s) u teoretického pacienta s malou plicní obstrukcí (znázorněno modře). Převzato a upraveno podle Hoesterey et al., 2020.

Obrázek 3: Hypersensitivní reakce typu 1 – Th1 a Th2 imunitní odpověď. Převzato a upraveno podle Madore a Laprise, 2010.

Obrázek 4: Lokalizace genu MMP14 (zaznačeno červenou barvou) na dlouhém (q) raménku chromozomu 14. Převzato z GeneCards, 2021.

Obrázek 5: Srovnání exprese genu MMP14 mezi kontrolami a pacienty s astma bronchiale nebo pacienty s chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN)

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Charakteristika pacientů

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci

Tabulka 3: Teplotní profil reverzní transkripce

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro PCR

Tabulka 5: Teplotní profil PCR reakce

1 ÚVOD

Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) a astma bronchiale (AB) patří mezi chronická zánětlivá onemocnění plic. Tyto nemoci jsou spojeny s obstrukcí plic a mají proto podobné příznaky, kterými jsou dušnost, kašel, ztížené dýchání. Obstrukce v plicích u pacientů s CHOPN je nejčastěji způsobena cigaretovým kouřem a je ireversibilní. U pacientů s AB se obstrukce projevuje jako hypersenzitivní reakce imunitního systému na určitý podnět, který způsobí alergickou reakci.

Při obou zánětlivých onemocněních se v těle zvyšuje produkce cytokinů a matrix metaloproteináz (MMP). Matrix metaloproteináza 14 (MMP14) patří k transmembránovým metaloproteinázám (MT-MMP), proto také bývá označována jako MT1-MMP. Vyskytuje se v buňce většinou v neaktivním stavu a po její aktivaci se přesune do cytoplazmatické membrány, kde se účastní kaskádových reakcí a aktivuje další metaloproteinázy (např. MMP2). Společně štěpí extracelulární matrix (EMC) a rozvíjí zánětlivou odpověď. To naznačuje, že MMP14 by mohla hrát důležitou roli v patofyziologii CHOPN a AB. Tato bakalářská práce se proto zaměřuje na studium exprese MMP14 v bronchoalveolární laváži (BAL).

2 CÍLE PRÁCE

1. Stanovení exprese matrix metaloproteinázy 14 (MMP14) u pacientů s chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN) v bronchoalveolární laváži (BAL) a porovnání získaných výsledků se současnými znalostmi
2. Stanovení exprese matrix metaloproteinázy 14 (MMP14) u pacientů s asthma bronchiale (AB) v bronchoalveolární laváži (BAL) a porovnání získaných výsledků se současnými znalostmi.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Plicní onemocnění

Plicní choroby jsou celosvětově jedním z nejčastějších onemocnění. Například CHOPN je nyní 3. nejčastější příčinou smrti na světě hned po srdečních chorobách a cerebrovaskulárním onemocnění (GOLD, 2021). Jednou z hlavních příčin plicních onemocnění je kouření cigaret a fakt, že je kouření běžnější než dříve. Až 7 000 toxických a 70 karcinogenních látek do sebe vdechne člověk během kouření. Kuřáci si tedy mnohdy zkracují kouřením cigaret své životy, a i přes tento známý fakt, bylo v roce 2015 v České republice více než 17 600 dětí (10–14 let) a přes 1 671 000 dospělých (ve věku 15+), kteří kouří cigarety každý den (The Tobacco Atlas, 2018). Cigaretový kouř může zapříčinit nejen onemocnění plic, ale může se dokonce podílet i na vzniku např. kardiovaskulárního onemocnění (Kondo *et al.*, 2019), chronické nemoci ledvin (Yacoub *et al.*, 2010) a mnoha dalších chorob. Rakovina plic patří k nejčastějším plicním onemocněním a je hlavní příčinou úmrtí na rakovinu ve světě. Mezi plicní onemocnění také patří již zmíněná chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN), astma bronchiale, sarkoidóza a další (GOLD, 2021).

3.2 Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN)

Chronická obstrukční plicní nemoc neboli CHOPN, je chronické progresivní zánětlivé plicní onemocnění, které je nevratné. Příčinou je přítomnost škodlivých látek ve vzduchu (hlavně při kouření), které stimulují zánětlivou odpověď v plicích a vedou k obstrukci dýchacích cest. Nejčastějšími příznaky CHOPN jsou kašel a ztížené dýchání (Ning *et al.*, 2004; Vandenbroucke *et al.*, 2011; GOLD, 2021). Riziko rozvoje nemoci mají také lidé trpící astmatem 12,5x vyšší než ti, kteří astma nemají (Silva *et al.*, 2004). U CHOPN jsou typické 2 fenotypové projevy. Těmi jsou emfyzém a chronická bronchitida. (GOLD, 2021).

3.2.1 Příčiny

Příčinou je vdechování škodlivých látek, nejčastěji se jedná o tabákový kouř (asi 80–90 % pacientů s CHOPN jsou kuřáci), proto se této nemoci říká někdy také „nemoc kuřáků“. Tabákový kouř není ovšem jediná příčina nemoci. Tou může být i vdechování částic ze

znečištěného ovzduší – z dopravy nebo také pracovního prostředí (Vladykova a Dimov, 2012). Vysoké riziko pro rozvinutí této choroby je v zemích Třetího světa – jedná se zejména o oblasti Afriky, také Asie nebo Jižní Ameriky, ve kterých žijí obyvatelé v extrémní chudobě a nemají zajištěny ani základní potřeby pro přežití. K nadměrnému vdechování škodlivých částic z ovzduší dochází např. při vaření na otevřeném ohni v obydli, které není dostatečně ventilované (Gordon *et al.*, 2014). Pokud nedojde k včasné léčbě, může být finálním stádiem nemoci smrt. V roce 2017 zemřelo dle statistiky (Regionální zpravodajství NZIS, 2017) na CHOPN v České republice téměř 3 500 lidí. Za posledních 20 let se úmrtnost téměř ztrojnásobila a stále roste, protože se neustále zvyšuje počet pacientů. Touto nemocí trpělo v roce 2017 téměř 230 000 lidí, nyní se odhaduje, že pacientů s CHOPN může být až 300 000. Většinou se nemoc projevuje u lidí ve věku 40 let a více.

3.2.2 Patofyziologie

Jak již bylo zmíněno, existují 2 fenotypy CHOPN, jimiž jsou chronická bronchitida a emfyzém.

- **Chronická bronchitida**

Dušnost, kašel a vykašlávání hlenu je způsobeno reakcí nespecifické (vrozené) imunity na vdechování toxických částic a plynů z okolí či konkrétně cigaretového kouře. Jedná se o zánětlivé onemocnění epitelálních buněk dýchacích cest a žláz produkujících hlen (viz **obrázek 1**). Tento hlen pak způsobuje ztíženou výměnu vzduchu v plicích (MacNee, 2005; Kim a Criner, 2013). Chronická bronchitida se definuje jako produkce hlenu po dobu nejméně 3 měsíců během dvou let nepřetržitě (GOLD, 2021).

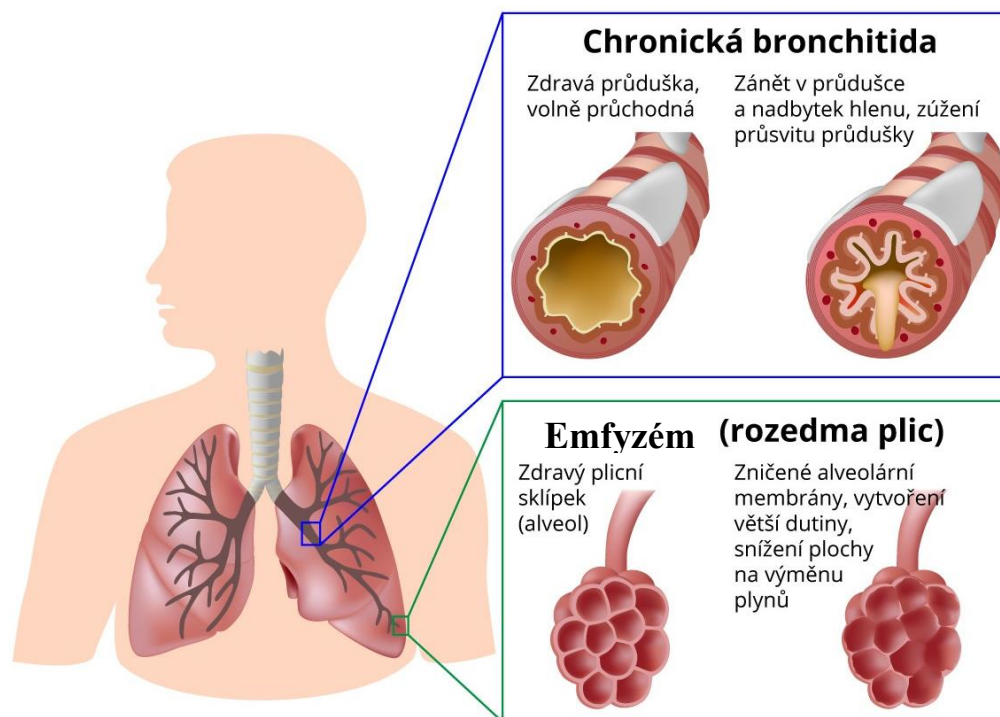
Nadměrná tvorba hlenu je způsobena metaplazií sliznice, tj. změna jednoho typu buňky na jiný, která nejčastěji postihuje dlaždicový epitel a konvertuje jej na žlázový. Při chronických onemocněních dochází právě ke konverzi buněk na žlázový epitel, následně k hypersekreci a nadprodukcí hlenu (Kim a Criner, 2013; Franssen *et al.*, 2019). U kuřáků, kteří mají zdravou plicní tkáň se nejví nadprodukce hlenu jako předpověď pro rozvinutí CHOPN v budoucnu. Může to být ale problém v pozdějších stádiích nemoci, při kterých dochází ke zrychlené ztrátě FEV₁ (MacNee, 2005). FEV₁ je objem vzduchu, který je vydechnut za první vteřinu usilovného a co nejrychlejšího výdechu po

maximálním nádechu. U zdravého člověka je $FEV_1 >80 \%$ (Vestbo a Lange, 2016; GOLD, 2021).

Podle Franssen *et al.*, 2019 způsobuje dlouhodobá inhalace toxických částic také apoptózu (buněčnou smrt), oxidativní stres a zánětlivou signalizaci, tím dojde ke zvýšené cirkulaci neutrofilů a monocytů v plicích. Aktivace buněk imunitního systému způsobí produkci proteolytických enzymů, jako je např. elastáza, která dokáže degradovat extracelulární matrix (EMC). Později se zvyšuje hladina T lymfocytů ($CD8^+$ – cytotoxické i $CD4^+$ – pomocné), B lymfocytů a protilátek proti vlastním antigenům, které jsou produkovány poškozenou plicní tkání. Jedná se o tzv. Th1 imunitní odpověď (Madore a Laprise, 2010).

- **Emfyzém neboli rozedma plic**

Při emfyzému dochází k destrukci plicních sklípků (viz **obrázek 1**), které jsou velmi náchylné ke zranění či zničení, a tím ke snižování povrchu pro výměnu dýchacích plynů (GOLD, 2021). Asi 20 % kuřáků má právě fenotypový projev emfyzému. Emfyzém se pozvolna projevuje až po 20–30 letech nepřetržitého kouření jako stav přetrvávajícího zánětu nízkého stupně (Gharib *et al.*, 2019). Jednou z příčin vzniku emfyzému je právě cigaretový kouř, který způsobuje apoptózu alveolárních buněk. Buněčná smrt plicních buněk způsobená cigaretovým kouřem může souviset také se ztrátou růstových faktorů, poškození oxidačním stresem nebo také intracelulárním stresem vyvolaným škodlivými látkami. Výsledný účinek se může lišit podle typu buněk. Alveolární makrofágové budou signifikantně odolnější než malé endoteliální či epiteliální buňky (Tuder a Petrache, 2012). Dostupná data poukazují na to, že další možnou příčinou projevu emfyzému může být degradace EMC v alveolách, a to zejména elastinu. Degradaci alveolární EMC může způsobit přítomnost matrix metaloproteináz – MMP (Gharib *et al.*, 2018).



Obrázek 1: Rozdíl mezi fenotypy CHOPN – chronickou bronchitidou a emfyzémem. Převzato z <https://www.symptomy.cz/nemoc/chronicka-obstrukcni-plicni-nemoc>.

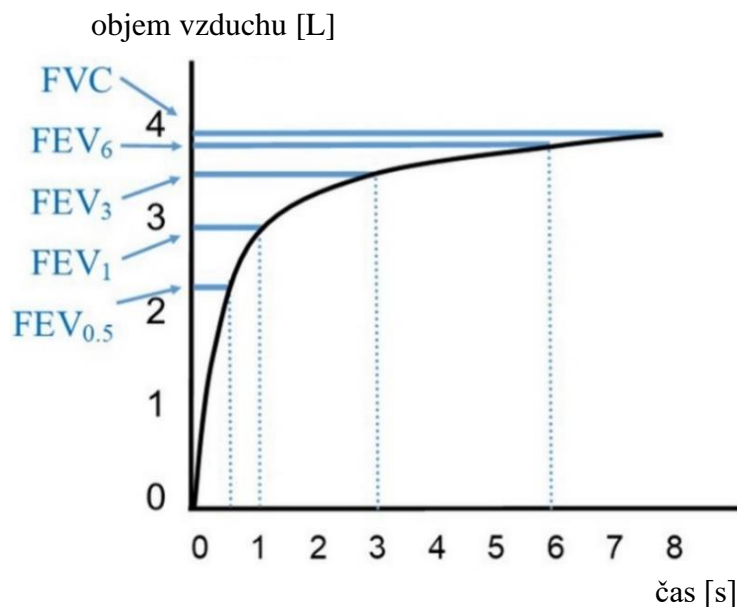
3.2.3 Stanovení diagnózy

Hlavním symptomem CHOPN je dušnost. Pacienty je popisována jako pocit těžkosti na hrudi a tím ztížené dýchání, lapání po dechu a nedostatek vzduchu k dýchání. Chronický kašel je obvykle prvním symptomem CHOPN, nejčastěji když je pacient vystaven expozici cigaretového kouře nebo kouře environmentálního původu. Zpočátku může být kašel nepravidelný, ale každým dnem se může jeho frekvence navyšovat, či se zhoršovat jeho průběh. Dalším symptomem je vykašlávání hlenu (viz chronická bronchitida). Měření množství produkce hlenu je obtížné, protože pacienti raději hlen polknou, než aby jej vyplivli. Záleží také na konzistenci a zabarvení hlenu. Například když je hlen hnisavý, znamená to zvýšenou produkci zánětlivých mediátorů na popud vdechnutí bakterií a rozvoj infekce (Liou a Kanner, 2009; GOLD, 2021).

Vyšetření by měli být všichni pacienti trpící právě dušností, chronickým kašlem nebo vykašlávají nadměrné množství hlenu (až u 30 % pacientů), ti, co byli vystaveni rizikovým faktorům. Typickým vyšetřením ke stanovení diagnózy je spirometrie. Jedná se o dostupné, neinvazivní a nenáročné vyšetření opakovatelné dle potřeby. Spirometrie měří usilovnou vitální kapacitu (FVC) – objem vzduchu usilovně vydechnutý za 1 minutu

po maximálním nádechu a usilovný výdech za první vteřinu po usilovném nádechu (FEV_1) a je třeba z těchto dvou hodnot (FEV_1/FVC) zjistit podíl. Někdy se místo tohoto poměru určuje podíl (FEV_1/VC) mezi FEV_1 a pomalou vitální kapacitou plic (SVC nebo VC). Výsledkem měření je graf (viz **obrázek 2**). Spirometrii se určuje na základě porovnání se skupinou pacientů stejného věku, pohlaví, výšky a národnosti (Liou a Kanner, 2009; Hoesterey *et al.*, 2020; GOLD, 2021).

Obrázek 2: Objem usilovně vydechovaného vzduchu (FEV) za určitý časový úsek (s) u teoretického pacienta s malou plicní obstrukcí (znázorněno modře). Převzato a upraveno podle Hoesterey *et al.*, 2020.



Legenda:

FVC – usilovná vitální kapacita, $FEV_{0,5, 1, 3, 6}$ – usilovný výdech za 0,5, 1, 3 a 6 sekund

K finálnímu určení diagnózy je třeba i dalších testů, protože i přes vysokou citlivost je tato metoda málo specifická. Je nutné si ale uvědomit, že i lidé s výsledkem spirometrie v normě ($FEV_1/FVC > 0,70$ nebo $FEV_1 > 80\%$), mohou trpět syndromy chronické nemoci a na druhou stranu je signifikantní počet kuřáků, u kterých je potvrzen emfyzém, mají zúžené dýchací cesty a dochází u nich k zachycování vzduchu v plicích, ale nedochází u nich k projevu žádné dýchací limitace (GOLD, 2021).

3.2.4 Klasifikace CHOPN

Podle GOLD, 2021 jsou pacienti s CHOPN rozřazeni do 4 skupin: GOLD 1–4, pokud je podíl $FEV_1/FVC \leq 0,70$.

Skupina GOLD 1 je mírné stádium, kdy $FEV_1 \geq 80\%$ predikované hodnoty. Průměrné stádium je označeno jako GOLD 2, kdy $50\% \leq FEV_1 \leq 80\%$ predikované hodnoty. GOLD 3 je označení pro těžké stádium kdy $30\% \leq FEV_1 \leq 50\%$ predikované hodnoty. a velmi těžké stádium je označeno GOLD 4, kdy $FEV_1 \leq 30\%$ predikované hodnoty.

3.2.5 Léčba

Hlavním doporučením pro pacienty s CHOPN je omezení styku s iritanty a zlepšení zdravotního stavu. Neexistují žádná známá léčiva, která by dokázala navrátit zpět zničenou plicní tkáň a obnovit ztracenou funkci plic. Léčba pomocí medikamentů musí být přizpůsobena konkrétnímu pacientovi na míru, aby nedošlo k nežádoucím účinkům. K nejčastějším medikamentům patří bronchodilatační léčiva, které zvyšují hodnotu FEV_1 . Důsledkem je tonus (změna napětí) hladkého svalstva, který způsobí rozšíření dýchacích cest (Decramer *et al.*, 2012; GOLD, 2021).

Mezi bronchodilatační léčiva patří např. beta₂-antagonisté, které se vážou na beta₂-adrenergní receptor, dojde ke zvýšení cyklického AMP, který produkuje funkčního antagonistu zabraňujícího bronchokonstrikci (zúžení průdušek), a to způsobuje relaxaci hladké svaloviny v plicích. Jsou 2 skupiny beta₂-antagonistů – krátce účinkující (SABA), které působí 4–6 hodin a dlouho účinkující (LABA) působící 12 a více hodin. Mezi SABA patří například fenoterol, terbutalin aj. a k LABA například patří formoterol, olodaterol, indacaterol atd. (Rutten *et al.*, 2010; Decramer *et al.*, 2012; GOLD, 2021).

Antimuskarinní léčiva blokují bronchokonstrikci způsobenou vazbou acetylcholinu na M₃ muskarinový receptor, který je produkován v hladké svalovině plic. Opět jsou 2 druhy tohoto typu léčiv – krátce účinkující (SAMA) a dlouho účinkující (LAMA) (Melani, 2015). Existuje ještě řada dalších možností léčby, například inhalování kortikosteroidů nebo se mohou léčby kombinovat mezi sebou (GOLD, 2021).

3.3 Astma bronchiale

Astma bronchiale (AB) je chronické alergické zánětlivé onemocnění. Na světě je přes 339 milionů lidí, kteří trpí astmatem. Při tomto onemocnění dochází k alergické reakci, což způsobí otok sliznice, stažení průdušek a následnou nadměrnou produkci hlenu. Alergická reakce je způsobena podrážděním dýchacích cest alergenem. Alergen je látka způsobující hypersensitivitu imunitního systému na podnět, který za normálních okolností u lidí netrpících astmatem, není příčinou vyvolání imunitní odpovědi (Mims, 2015; GINA, 2020).

Alergeny mohou vyvolávat tzv. astmatický záchvat, kdy dojde k napuchnutí dýchacích cest a nadprodukcí hlenu, což ještě ztěžuje dýchání. K nejčastějším alergenům patří roztoči, zejména jejich trus, kteří se běžně v domácnostech vyskytují na prachových částicích. Dále mohou být přítomni v matracích, polštářích, kde se živí odumřelými buňkami lidské pokožky nebo i v kobercích a plyšových hračkách. Dalšími alergeny jsou pyly. Většinou se astma sezónně zhoršuje, například na jaro, kdy začínají rostliny kvést. Typickými pylovými spouštěči alergií jsou trávy, kvetoucí rostliny (pampeliška, sedmikráska) nebo stromy (bříza, líska). Častými alergeny jsou také zvířecí chlupy, zejména psí, kočičí a hlodavčí, nebo plísně, kvasinky či hmyz. Alergická reakce může být indukována i tabákovým kouřem, cvičením nebo stresem, dokonce i užitím drog apod. (Bousquet *et al.*, 2008).

Objevují se symptomy jako jsou pocit těžkosti na hrudníku a ztížené dýchání, sípání, také kašel, který se dostavuje nepravidelně a pokaždé s jinou intenzitou. Obvykle se astma projeví již během dětství, ale může rozvinout i během dospělosti. Tato nemoc postihuje všechny věkové kategorie i sociální skupiny (slavné atlety, celebrity i obyčejné lidi). Astma bývá často ovlivněno také genetickými predipozicemi. To znamená, že pokud trpí astmatem rodiče, jejich potomek má vyšší pravděpodobnost projevu nemoci (GINA, 2020; WHO, 2020).

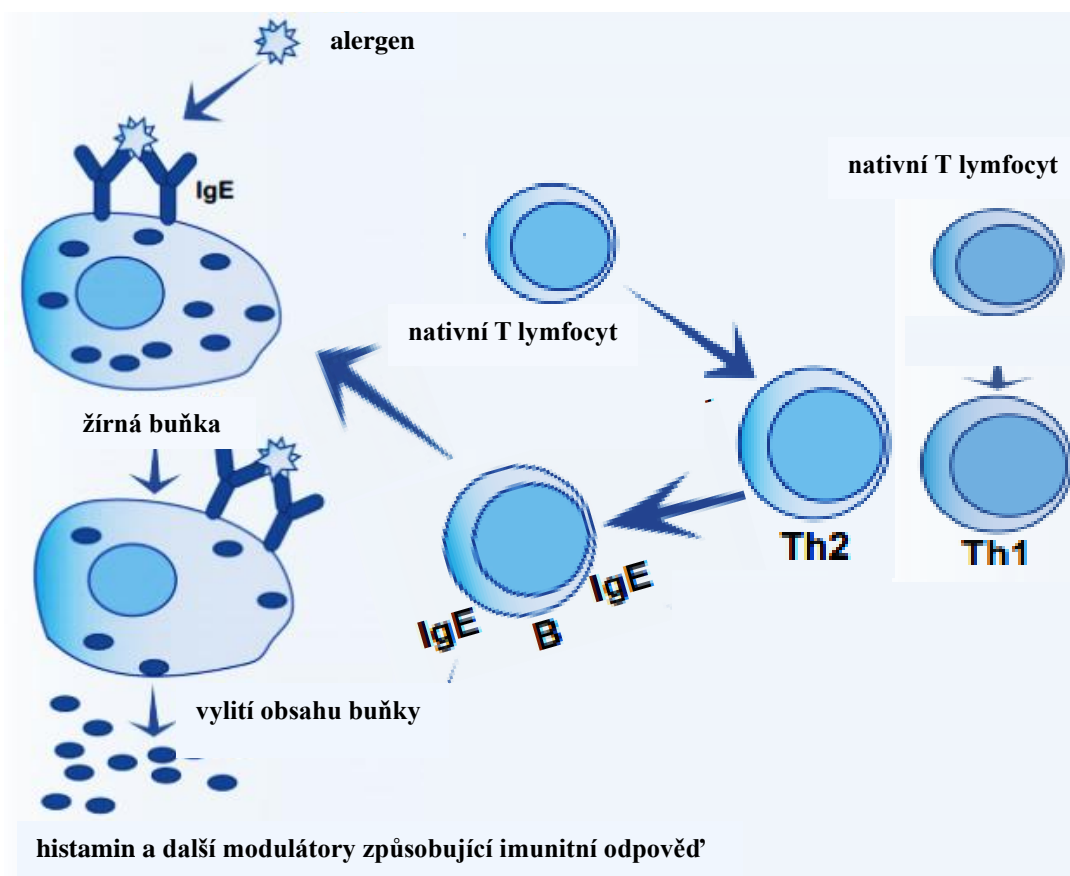
3.3.1 Patofyziologie

Nejčastějším typem astmatu je alergické astma, které je spojováno s hypersenzitivní reakcí 1. typu. Alergen indikuje tvorbu imunoglobulinu (Ig) E. Zdrojem těchto protilátek jsou B lymfocyty. B lymfocytům pomáhají hlavně Th2 lymfocyty, a proto se jedná o Th2 typ imunitní odpovědi. IgE protilátky se vážou na receptory přítomné na basofilech

(žirných buňkách) a dochází k tzv. přemostění, protože IgE je velká molekula a naváže se na více receptorů najednou. Po vzniklých vazbách mezi žirnou buňkou a IgE dojde k vylití obsahu buňky, ve kterém se nachází histamin (viz **obrázek 3**). Ten působí vazodilatačně; rozšiřuje cévy a zvyšuje jejich permeabilitu. Díky tomu se do tkáně dostanou eozinofily a další buňky. Současně histamin působí bronchokonstrikčně a přispívá tak k obstrukci dýchacích cest. Histamin má proto klíčovou roli v patofyziologii alergického astmatu.

Později se zapojují i další buňky. Příkladem mohou být Th1 buňky, které produkují interleukin 2 (IL-2), lymfotoxin- α , interferon- γ (INF- γ) a tumor nekrotizující faktor- β (TNF- β). Ty jsou charakteristické svou fagocytickou aktivitou (buněčná imunita). v tomto případě však nedochází k interakci s protilátkou (Tournoy a Pauwels, 2002; Madore a Laprise, 2010; Corren, 2013; Fajt a Wenzel, 2015).

Obrázek 3: Hypersensitivní reakce typu 1 – Th1 a Th2 imunitní odpověď. Převzato a upraveno podle Madore a Laprise, 2010.



Druhým typem astmatu je nealergické astma, které je způsobeno hypersenzitivitou typu 2. Imunitní odpověď není v tomto případě vyvolána alergenem, ale například stresem, zvýšenou fyzickou námahou, akutní infekcí, chladným či velmi suchým vzduchem nebo cigaretovým kouřem. Po kontaktu s antigenem dochází k produkci IgG a IgM jako reakce na povrchové antigeny navázané na buněčných membránách. Ke zničení antigenem označených buněk dochází např. pomocí klasické cytolyzy. Dalším způsobem je zprostředkovaná cytotoxicita, která je závislá na protilátkách, kdy dojde k lýzi pomocí NK buněk (z angl. natural killer – „přirozený zabiják“). Poslední možností je rozpoznání fragmentů IgG a IgM fagocytickými buňkami a jejich následná opsonizace – označení a degradace (Madore a Laprise, 2010).

3.3.2 Stanovení diagnózy

Astma má mnoho fenotypových projevů. Jsou 2 základní kritéria pro stanovení diagnózy astmatu. Prvním je historie různých dýchacích obtíží, kdy jsou typickými symptomy například tíživý pocit na hrudi, sípání, zkrácené dýchání, kašel. Lidé s astmatem obvykle mívají více symptomů najednou, kdy se jejich projevy zhoršují při fyzické námaze či v noci. K iritaci dochází při sportování, kontaktu s alergenem nebo chladným vzduchem nebo při virové infekci. Druhým kritériem je evidence různých limitací v dýchání pomocí spirometrie (viz vyšetření u CHOPN), zejména při výdechu, a to alespoň při jednom vyšetření (když je nízká hodnota FEV₁). Je třeba, aby bylo testování provedeno několikrát a za odlišných podmínek a při různých symptomech – jednou brzy ráno, jindy po užití bronchodilatačních léčiv atd. Čím větší je variabilita výsledků, tím je pravděpodobnější diagnóza astmatu.

Na rozvoj astmatu má vliv více faktorů jako je např. pracovní prostředí. Proto je třeba se pacienta ptát, zda se jeho stav horší v práci nebo alespoň nedochází ke změně. S vyšším věkem je větší pravděpodobnost rozvinutí nemoci, velký vliv má na astma fakt, zda je pacient kuřák či ex-kuřák. Může totiž dojít k překryvu mezi astmatem a CHOPN, kterému se říká „astma-CHOPN překryv“. Většinou k této variantě dochází právě u kuřáků nebo bývalých kuřáků. Tito pacienti jsou léčeni individuálně (GINA, 2020).

3.3.3 Léčba

Nejdříve je nutné potlačení vzniklého zánětu průdušek. Astma nelze vyléčit, mohou se pouze tlumit jeho příznaky pomocí správných medikamentů. K těm nejčastěji patří inhalátor, kdy do sebe člověk přímo vdechne kortikosteroidy. Lidé, u kterých přetrvávají nežádoucí příznaky dlouhodobě, užívají navíc každý den léky (bronchodilatační léčiva), která napomáhají rozšíření dýchacích cest a tím způsobí úlevu při dýchání. Bronchodilatační léčiva lze užívat i při krátkodobém zhoršení astmatu (exacerbace), např. v jarním období, kdy jsou ve vzduchu rozšířeny pyly a další iritanty. V lékárně jsou tyto léky běžně dostupné bez nutnosti předepsání receptu lékařem (antihistaminika). Díky medikamentům mohou lidé s astmatem žít plnohodnotné životy. Je také důležité, aby se lidé trpící astmatem vyhýbali spouštěčům jejich alergické reakce (WHO, 2020; GINA, 2020).

3.4 Astma-CHOPN překryv (ACO)

Patogeneze astmatu i CHOPN je způsobena odlišnými iritanty. V případě CHOPN se jedná o toxické látky obsažené v cigaretovém kouři. U astmatu jsou to alergenů jako například pyl, roztoči, srst zvířat a další. Dochází ke kombinaci Th1 (typickou pro CHOPN) a Th2 (typickou pro astma) imunitní odpovědi. Tomuto projevu se říká astma-CHOPN překryv (ACO, z angl. asthma-COPD overlap). Pacienti trpící ACO mají většinou těžší průběh a větší obtíže než pacienti pouze s jednou z těchto nemocí. Ve většině případů se jedná o pacienty v nižší věkové kategorii než u CHOPN. Atopie (dědičný sklon k alergii), kouření cigaret a hyperreaktivita dýchacích cest jsou nejčastějšími faktory přispívající k rozvoji ACO. Hyperreaktivita je běžným projevem astmatu a rizikovým faktorem pro rozvoj CHOPN (Cosío *et al.*, 2018; Hikichi *et al.*, 2019).

Pro stanovení diagnózy se využívá nejen tradičních metod, jako je spirometrie, ale i dalších podrobnějších vyšetření plic, např. CT (počítačová tomografie) plic nebo měření počtu eosinofilů v krvi, včetně stanovení IgE. Léčba u ACO může být úzkého spektra – mířená jen na astma nebo na CHOPN nebo širokého spektra, která se zaměřuje na léčbu astmatu i CHOPN současně. Monoklonální protilátky jsou příkladem pro použití léčby úzkého spektra a příkladem léčby širokospektrální jsou kortikosteroidy nebo antibiotika účinná pro obě nemoci. Cílem léčby je zklidnit zánět dýchacích cest a také snížit produkci

hlenu. Pacientům je doporučeno nekouřit (Cosío *et al.*, 2018; Hikichi *et al.*, 2018; Yanagisiwa a Ichinose, 2018).

3.5 Matrix metaloproteinázy (MMP)

Matrix metaloproteinázy patří do skupiny na zinku dependentních endopeptidáz, které bývají také označovány jako matrixiny. Jsou zodpovědné za degradaci extracelulární matrix (ECM), remodelaci tkání, která je ovšem za fyziologických podmínek důležitá při vývoji, morfogenezi a při opravách tkání. Deregulovaná (příliš snížená či zvýšená) aktivita MMP může ale způsobit až destrukci tkáně, dále také štěpit a aktivovat cytokiny nebo defensiny. To pak vede k různým nemocím jako jsou fibróza, encefalitida, rakovina a další (Vandenbroucke *et al.*, 2011). Do této skupiny, včetně membránově vázaných matrix metaloproteináz (MT-MMP), patří také kolagenázy, stromelysiny, želatinázy a matrilysiny (Elkington a Friedland, 2006; Gharib *et al.*, 2018). Většina MMP je aktivována extracelulárně, výjimkou jsou transmembránové metaloproteinázy (MT-MMP), které jsou aktivovány intracelulárně např. pomocí furinu (Nagase *et al.*, 2006).

MMP se skládají z N-konce, po něm následuje katalytická doména, která je následně spojena s C-koncem enzymu. Jsou syntetizovány v podobě proenzymů (Fernandez-Catalan *et al.*, 1998).

Na struktuře plicních fibril se podílejí elastin, který umožňuje distenzibilitu (roztážitelnost svalů) a kolagen typu I, který poskytuje svalům odolnost a pevnost v tahu. Stěna plicních sklípků je tvořena kolagenem typu III, zatímco bazální membrána obsahuje kolagen typu IV. Elastinová a kolagenová vlákna jsou spojena menšími fibrilami tvořícími síť. Proto bude nejprve docházet ke štěpení zasítujících vláken k odhalení vazebných míst enzymů (Fernandez-Catalan *et al.*, 1998; Elkington a Friedland, 2006).

Většina MMP se ve ustáleném stavu buňky nachází v zanedbatelném množství. Jejich exprese je regulována a transkripčně kontrolována pomocí cytokinů, hormonů, růstových faktorů a také interakcemi mezi buňkami či buňkou a buněčnou matrix (Nagase *et al.*, 2006).

Endogenními tkáňovými inhibitory matrix metaloproteináz jsou TIMP (z angl. tissue inhibitor of metalloproteinases) a α_2 -makroglobulin. Makroglobulin je glykoprotein, který se skládá ze 4 identických podjednotek. Inhibuje proteinázy v tekutinách. Při

inhibici vzniká komplex, který je pak odbourán pomocí lipoproteinového receptoru (Nagase *et al.*, 2006).

TIMP je protein, který skládá se z 184 až 194 aminokyselin. C- i N-konec je stabilizován disulfidickými vazbami. Inhibující doména se váže na aktivní místo MMP, se kterou po navázání tvoří komplex (Murphy, 2011). Jsou známy 4 odlišné druhy TIMP 1–4, které se sekvencemi aminokyselin shodují asi v 41–52 %. TIMP2 je tvořen 194 aminokyselinami, není glykosylován a má záporně nabitý konec. Komplex MMP14-TIMP2 funguje jako receptor pro aktivaci proželatinázy A, která v aktivované formě hraje roli nejen v remodelačních procesech, ale také může způsobit chronická onemocnění či nádorové bujení a metastáze (Fernandez-Catalan *et al.*, 1998). Homopexinová doména nacházející se na C-konci obsahuje Ca^{2+} ionty a chloridy. Inhibitor TIMP-2 se váže právě na tuto doménu proMMP-2 jeho C-koncovou doménou. Výsledkem je, že se odštěpí N-koncová inhibiční doména TIMP-2 a ta může interagovat s dalším aktivním MMP (Nagase *et al.*, 2006).

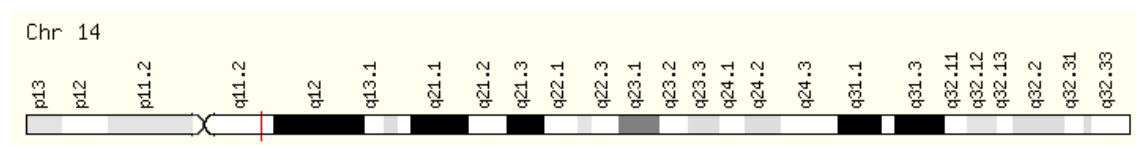
MMP tvoří kaskády a sítě, které se pak slučují a formují tzv. „proteázové pavučiny“. Proteázy totiž fungují pouze v kooperaci např. s dalšími proteázami. Nedochází k rovnováze, ale neustálými interakcemi proteinů, substrátů, receptorů, inhibitorů a produktů štěpení je síť v konstantním toku. Navíc i MMP jsou regulovány pomocí dalších proteinů, receptorů atd. (Morrison *et al.*, 2009).

3.5.1 Matrix metaloproteináza 14 (MMP14)

Matrix metaloproteináza 14 (MMP14) je kódována genem MMP14, který leží na dlouhém (q) raménku 14. chromozomu (viz **obrázek 4**). Patří mezi transmembránové proteiny typu I, proto bývá také značen jako MT1-MMP. Do skupiny transmembránových proteinů patří dále ještě MMP15, MMP16, MMP17, MMP24 a MMP25. Jak již bylo zmíněno, k aktivaci dochází intracelulárně. Enzym se také vyskytuje v neaktivní formě (jako zymogen). Po odštěpení propeptidové domény dochází k aktivaci a tyto aktivované enzymy se pak nachází exprimované v cytoplazmatické membráně buňky. Patří mezi hlavní proteázy degradující EMC. MMP14 štěpí kolageny typu I, II a III na dva specifické fragmenty – $\frac{1}{4}$ C-koncová a $\frac{3}{4}$ N-koncová část, protože má vůči nim kolagenolytickou aktivitu. Podílí se na přestavbě a modelaci skeletu pojivových tkání (Belvisi a Bottomley, 2003; Nagase *et al.*, 2006; GeneCards, 2021).

Ke štěpení dochází ve dvou krocích. Jako první dojde k rozpletení helikální struktury a poté k hydrolyze peptidových vazeb. Pro štěpení nativního fibrilárního kolagenu je zapotřebí hemopexinové domény. Naopak pro štěpení substrátu nekolagenní povahy je nutná přítomnost katalytické domény (Laronha a Caldeira, 2020). MMP14 je aktivátorem proteinu MMP2, který se může podílet na vzniku nádorových buněk a chronických onemocněních (GeneCards, 2021).

Obrázek 4: Lokalizace genu MMP14 (zaznačeno červenou barvou) na dlouhém (q) raménku chromozomu 14. Převzato z GeneCards, 2021.



- **Struktura enzymu MMP14**

Enzym se skládá ze 3 částí: propeptidové domény, která musí být k aktivaci enzymu odstraněna, katalytické metaloproteinázové domény a homopexinové domény na C-konci, která slouží k interakci s inhibítoem. Když dochází k vazbě mezi cysteinem nacházejícím se na propeptidu a Zn^{2+} iontem, který je lokalizován na katalytické doméně, nachází se MMP v neaktivní formě. Zn^{2+} ionty se v molekule vyskytují ve dvou kopiích. Jeden má katalytickou funkci a druhý strukturní. Molekula obsahuje i Ca^{2+} ionty, které slouží ke stabilizaci struktury. Zn^{2+} ion ve vazbě Cys- Zn^{2+} je katalytický a reaguje s SH-skupinou cysteinu. Pokud se tato vazba naruší, dojde k aktivaci enzymu (Bode *et al.*, 1993; Fernandez-Catalan *et al.*, 1998; Nagase *et al.*, 2006).

3.6 Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-PCR)

Klasickou polymerázovou řetězovou reakci (PCR) zavedl v roce 1983 Kary Mullis. Jedná se o relativně levnou a všeobecně dostupnou metodu, pomocí které lze replikovat i velmi malé množství nukleové kyseliny, aniž by musela být předtím klonována ve vektorech.

Před PCR je nutno provedení reverzní transkripce, která umožní přepis z molekuly RNA do cDNA. Tento přepis umožňuje reverzní transkriptáza (RNáza H), která patří mezi RNA-dependentní DNA-polymerázy. Použité primery mohou být buď mRNA specifické,

které jsou specifické pro určité nukleotidové sekvence a snižují pozadí výsledku. Nebo univerzální oligo-dT primery, které maximalizují množství mRNA molekul z malého množství ze vzorku. (Bustin, 2000; Bustin *et al.*, 2005)

Při PCR dochází k enzymové syntéze určitých úseků na původním vlákně DNA, které slouží jako templát, ve směru 5' → 3' za pomoci DNA-polymerázy. Po denuraci původní DNA molekuly vzniknou 2 jednořetězcová (ss) vlákna, na každé nasedá komplementární primer. Ty jsou pak svými 3'-OH konci orientovány proti sobě a tím vymezují studované úseky nukleotidů. Přídavkem DNA-polymerázy společně s nukleotidy dochází k syntéze nových řetězců. V metodě PCR se využívá termostabilních DNA-polymeráz izolovaných z termofilních organismů, které odolávají teplotám, při nichž běžně dochází k denuraci DNA. Nejčastěji se využívá *Taq* polymeráza, která je izolována z bakterie *Thermus aquaticus*. Díky termostabilitě DNA-polymerázy může docházet k cyklickému opakování a tím k několikanásobnému zmnožení (amplifikace) specifického úseku DNA. Teoreticky lze díky postupnému opakování cyklů získat 2^n (kdy n = počet cyklů) kopií určitého úseku DNA. Běžně se provádí kolem 30 cyklů, protože s delším průběhem dochází ke vzniku nespecifických produktů PCR. Z toho vyplývá, že z původní dvouvláknové (ds) DNA může vzniknout až miliarda kopií fragmentů požadované sekvence, kterým se říká amplikony. Určení přítomnosti amplikonů ve směsi se stanovuje elektroforetickou separací v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu podle jejich velikosti nebo kvantitativním měřením v reálném čase (Šmarda *et al.*, 2005).

Jeden cyklus PCR se skládá ze 3 základních fází, které se cyklicky opakují. V úplně první fázi musí dojít k denuraci molekul dsDNA. Děje se tak při 95 °C. Následuje další fáze (při teplotě 55–65 °C) tzv. annealing, kdy nasedají primery na templátová vlákna. Poslední fází je tzv. elongace, při které se syntetizují nová vlákna DNA pomocí DNA-polymerázy. Tato fáze probíhá při 72 °C. Následně dochází k opětovné denuraci templátové DNA již nově nasyntetizovaných vláken při 95 °C, pokračuje annealing, elongace atd. V současné době se poslední 2 fáze často spojují do jedné.

Kvantitativní real-time (RT) qPCR se postupem neliší od běžné PCR, akorát je prováděna ve speciálním cycleru, který zaznamenává průběh reakce i množství DNA v reálném čase kontinuálně po skončení každého cyklu. Pro detekci jsou využívány fluorescenční substráty, které se vážou na molekulu DNA. Po vazbě s DNA dojde k vyzáření fluorescence, která je zaznamenávána pomocí detektoru. Intenzita záření koreluje

s množstvím DNA přítomné ve vzorku. Data získaná změřením intenzity fluorescence během amplifikace jsou použita pro kvantifikaci buď relativní, to znamená, že se porovnává intenzita fluorescence mezi testovaným a například referenčním vzorkem. Nebo je kvantifikace absolutní, kdy se vytvoří kalibrační křivka pomocí sériově nařaděného fragmentu DNA, u kterého známe koncentraci a od křivky je poté odečteno množství DNA námi změřené o dané koncentraci (Bustin, 2000; Bustin *et al.*, 2005; Šmarda *et al.*, 2005).

Existují 3 varianty fluorescenčního značení. Prvním je použití interkalačního barviva (SYBR Green I, ethidium bromid), dochází k interkalaci barviva do dvoušroubovice DNA a následnému vyzáření fluorescenčního signálu. Další možností je použití fluorescenčně označených primerů nebo fluorescenčně označených sond (TaqManTM), které se navážou na nasyntetizovaný fragment.

TaqManTM sondy jsou, které obsahují fluorescenční značku na 5'-konci a tzv. zhášeč na 3'-konci. Po navázání sondy na vnitřní část syntetizované sekvence za primer je díky 5' → 3' exonukleázové aktivitě *Taq* DNA-polymerázy odštěpena fluorescenční značka a dochází tak k emisi fluorescence, která je pak detekována pomocí detektoru a zaznamenávána postupně během každé fáze cyklu (Šmarda *et al.*, 2005).

4 MATERIÁL a METODY

4.1 Biologický materiál

Použitým biologickým materiálem byla bronchoalveolární laváž (BAL), která byla získána od pacientů s asthma bronchiale (AB) nebo od pacientů s chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN). Vzorky byly odebrány ve Fakultní nemocnici v Olomouci na Klinice plicních nemocí a tuberkulózy. Celkem byly vzorky odebrány od 61 pacientů. Z toho bylo 22 pacientů s CHOPN, kdy byla jejich diagnóza stanovena na základě mezinárodních doporučení (GOLD – The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease). Dále bylo 14 pacientů s AB, u kterých byla diagnóza také stanovena na základě mezinárodních kritérií (GINA – Global Initiative for Asthma). a ještě bylo odebráno 25 kontrolních vzorků (viz **tabulka 1**). V **tabulce 1** jsou uvedeny informace o procentuálním zastoupení buněčných populací lymfocytů nacházejících se v odebrané bronchoalveolární laváži pacientů.

Tabulka 1: Charakteristika pacientů

| charakteristika | CHOPN | AB | kontroly |
|-----------------------------|-------|------|----------|
| počet pacientů | 22 | 14 | 25 |
| kuřáci | 9 | 2 | 9 |
| bývalí kuřáci | 3 | 1 | 32 |
| nekuřáci | 6 | 10 | 13 |
| neuvedena data o kouření | 4 | 1 | 1 |
| ženy/muži | 9/13 | 9/5 | 12/13 |
| věkový průměr (min./max.) | 56 | 39 | 46 |
| průměr makrofágů [%] | 74,2 | 79,8 | 84,1 |
| průměr lymfocytů [%] | 13,6 | 4,8 | 8,3 |
| průměr neutrofilů [%] | 6,3 | 9,9 | 6,7 |
| průměr eosinofilů [%] | 5,9 | 0,8 | 1,2 |
| průměr CD4 ⁺ [%] | 32,9 | 35,6 | 43,6 |
| Průměr CD8 ⁺ [%] | 30,9 | 27,1 | 28,6 |

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie:

- 100% ethanol (PENTA, kat. č. 71250-11001)
- DEPC (Sigma-Aldrich, kat. č. 1609-47-8)
- destilovaná voda UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water, (ThermoFisher, kat. č. 10977015)
- RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, (ThermoFisher, kat. č. 10777019)

Použité soupravy:

- mirVana miRNA isolation kit (ThermoFisher, kat. č. AM1560)
- SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher, kat. č. 11754250)
- TaqMan® Gene Expression Assays (ThermoFisher, kat. č. 4351368)

Použité roztoky a jejich příprava:

- PBS (pH 7,4): 8 g NaCl + 200 mg KCl + 1,44 g Na₂HPO₄ + 245 mg KH₂PO₄ rozpustit za stálého míchání v 800 ml dH₂O, upravit na požadované pH, doplnit destilovanou vodou do 1 000 ml. Sterilizovat pomocí DEPC, následně autoklávkovat.
- V případě nového mirVana miRNA isolation kitu k wash solution 1 přidat 21 ml a k wash solution 2/3 přidat 40 ml 100% ethanolu. Roztoky dobře promíchat a pro další použití skladovat při 4 °C.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Centrifuga Spectrafuge 16M (Labnet)
- Thermoblock 603/3 (Nahita)
- Laminární flowbox BSB 4A (Gerlaire)
- Spectrafuge C1301 (Labnet)
- Termální cycler Rotor Gene 3000 (Corbett Research)
- NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific)
- Mastercycler pro (Eppendorf)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace RNA

1. Před každým použitím byly roztoky wash solution 1 a 2/3 a Acid-Phenol/Chloroform vytemperovány na pokojovou teplotu.
2. Ke vzorkům nacházejícím se v RNAlateru bylo přidáno cca 350 μ l PBS+DEPC a byly centrifugovány při 4 000 g a 4 °C po dobu 60 min.
3. Poté byl odsán supernatant, k peletu přidáno 600 μ l lysis/binding solution a vše důkladně zamícháno.
4. K lyzátu bylo přidáno 60 μ l miRNA Homogenate Additive. Vzorek byl opět důkladně promíchán a ponechán 10 min inkubovat na ledě.
5. Poté bylo přidáno 600 μ l dolní fáze Acid-Phenol/Chloroform.
6. Vzorek byl zamíchán pomocí vortexu po dobu 60 s a pak centrifugován po dobu 5 min při 10 000 g a pokojové teplotě.
7. Po skončení centrifugace bylo odebráno co nejvíce horní fáze do nové zkumavky.
8. K vodné fázi byl přidán 100% ethanol o objemu 1,25x větším, než byl objem, který byl přenesen do zkumavky.
9. Dále bylo maximálně po 700 μ l vzorku nanášeno na filtr, který byl umístěn do nové zkumavky. Poté byl vzorek centrifugován po dobu 15 s při 10 000 g.
10. Po centrifugaci byla odsána tekutina ze zkumavky. Tento proces byl opakován, dokud nedošlo k promytí celého obsahu vzorku.
11. Na kolonu bylo nanášeno 700 μ l wash solution, byla provedena centrifugace po dobu 10 s při 10 000 g a opět odsána tekutina ze zkumavky.
12. Na kolonu bylo poté nanášeno 500 μ l 2/3 wash solutin. Znovu byla provedena centrifugace po dobu 10 s při 10 000 g a následně odsána tekutina ze zkumavky. Tento krok byl zopakován ještě jednou.
13. Následně byla provedena další centrifugace po dobu 1 min při 10 000 g, aby byla odstraněna přebytečná tekutina z filtru.
14. Filtr byl přemístěn do nové zkumavky a na jeho střed bylo nanášeno 100 μ l přehřáté (na 95 °C) destilované vody. Byla provedena centrifugace po dobu 30 s při 14 000 g.
15. Ke 100 μ l vzorku byly přidány 2 μ l RNazinu.

4.4.2 Reverzí transkripce

Všechny vzorky a chemikálie byly rozpuštěny na ledě a následně pomocí vortexu promíchány – kromě enzymu, protože by mohlo dojít k jeho poškození. Podle **tabulky 2** byla namíchána reakční směs. Více koncentrované vzorky RNA byly zředěny na stejnou koncentraci (2x – 7 µl vzorku a 7 µl destilované vody). K reakční směsi bylo přidáno 14 µl vzorku RNA. Celkový objem jedné reakce pro každého pacienta činil 20 µl. Vzorky byly vloženy do Mastercycler pro a následně provedena reverzní transkripce dle teplotního profilu (viz **tabulka 3**).

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci

| chemikálie | počet reakcí | |
|-----------------------------|--------------|--------------|
| | 1 | 61 |
| 5X VILO™ Reaction Mix | 4 | 244 |
| 10X SuperScript™ Enzyme Mix | 2 | 122 |
| vzorek RNA | 14 | 854 |
| celkem | 20 | 1 220 |

Tabulka 3: Teplotní profil reverzní transkripce

| teplota [°C] | čas [min] |
|--------------|-----------|
| 25 | 10 |
| 42 | 60 |
| 85 | 5 |

4.4.3 Kvantitativní PCR

Jako první byla pro metodu kvantitativní PCR připravena reakční směs, která obsahovala 20× TaqMan® Gene Expression Assay, 2× TaqMan® Gene Expression Master Mix a destilovanou vodu (viz **tabulka 4**). Výsledný objem mixu byl krátce promíchán a centrifugován a poté rozdělen do zkumavek určených k PCR. Dále byla k mixu přidána templátová cDNA. Výsledný objem jedné reakce na každého pacienta činil 20 µl. Následně byly všechny vzorky vloženy do přístroje Rotor Gene 3000, na kterém byl nastaven teplotní profil pro kvantitativní PCR (viz **tabulka 5**).

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro PCR

| chemikálie | počet reakcí | |
|---------------------------------------|------------------|--------------|
| | 1 | 61 |
| | objem [μ l] | |
| 20× TaqMan® Gene Expression Assay | 1 | 61 |
| 2× TaqMan® Gene Expression Master Mix | 10 | 610 |
| cDNA templát | 2 | 122 |
| destilovaná voda | 7 | 427 |
| celkem | 20 | 1 220 |

Tabulka 5: Teplotní profil PCR reakce

| | Teplota [$^{\circ}$ C] | čas |
|-------------------------|-------------------------|--------|
| aktivace DNA-polymerázy | 50 | 2 min |
| | 95 | 10 min |
| denaturace | 95 | 15 s |
| annealing + elongace | 60 | 60 s |

30 cyklů

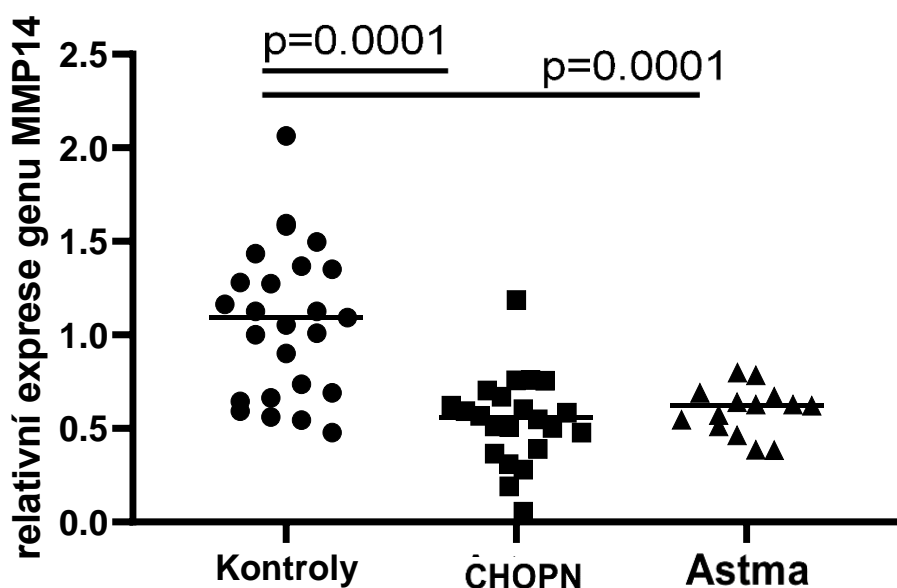
4.4.4 Statistické vyhodnocení

Relativní exprese genu MMP14 mezi pacienty a kontrolami byla porovnána pomocí Mann-Whitney testu v programu GraphPad Prism, 2018 a pouze hodnota $p < 0,5$ byla považována za statisticky významnou.

5 VÝSLEDKY

Byla určena relativní exprese genu MMP14 u jednotlivých pacientů s astma bronchiale nebo chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN) a u kontrolních vzorků. Bylo zjištěno, že exprese genu MMP14 je u pacientů s astmatem snížena v porovnání s kontrolní skupinou ($p = 0,0001$, **obrázek 5**). U pacientů s CHOPN byla pozorována také snížená exprese genu MMP14 v porovnání s kontrolními skupinami ($p = 0,0001$, **obrázek 5**). Relativní exprese genu MMP14 se významně nelišila mezi pacienty s astmatem a CHOPN.

Obrázek 5: Srovnání exprese genu MMP14 mezi kontrolami a pacienty s astma bronchiale nebo pacienty s chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN)



Legenda: Relativní exprese genu MMP14 u jednotlivých pacientů

- - s chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN)
- ▲ - s astma bronchiale (AB)
- - u kontrolních skupin

6 DISKUSE

U pacientů s plicním onemocněním byla ve srovnání s kontrolními skupinami snižená exprese matrix metaloproteinázy 14 (MMP14). Mezi pacienty s CHOPN nebo astmatem nebyl v expresi genu pozorován statisticky významný rozdíl.

Dřívější práce se zaměřily na studium exprese MMP14 u pacientů s emfyzémem (Ohnishi *et al.*, 1998; Otálora-Otálora *et al.*, 2019). Emfyzém je jedním z fenotypových projevů CHOPN, kde dominuje destrukce alveolárního septa (druhým fenotypem je chronická bronchitida). U pacientů s emfyzémem autoři pozorovali zvýšenou hladinu MMP14 ve srovnání s kontrolními skupinami pacientů. Narozdíl od původní studie tato bakalářská práce nerozlišuje mezi fenotypy. Různorodé zastoupení fenotypů by proto mohlo vysvětlit odlišné pozorování. Dalším vysvětlením odlišného pozorování by mohl být jiný typ biologického materiálu. Konkrétně v obou pracích (Ohnishi *et al.*; Otálora-Otálora *et al.*, 2019) byla použita plicní tkáň a MMP14 bylo stanoveno na proteinové a mRNA úrovni. Plicní tkáň použili také autoři celogenomové studie Zhu *et al.*, 2020, která se zaměřila na pacienty s CHOPN. Autoři pozorovali zvýšenou expresi MMP14. Dle našich současných znalostí tato práce poprvé stanovila MMP14 expresi v bronchoalveolární laváži (BAL) od pacientů s CHOPN.

Tato bakalářská práce dále pozorovala sníženou expresi MMP14 u pacientů s astmatem. Zvýšená hladina MMP14 jak v bronchoalveolární laváži, tak v indukovaném sputu byla publikována studií Maisi *et al.*, 2003. Tato původní studie měřila expresi aktivované metaloproteinázy na proteinové úrovni, zatímco exprese MMP14 v této práci byla stanovena na úrovni mRNA. Možným vysvětlením snížené exprese by mohla být negativní zpětná vazba a zvýšená aktivace MMP14 na posstranlační úrovni. Dalším možným vysvětlením by mohla být odlišná klinická charakteristika pacientů. Původní práce studovala neléčené pacienty s negativní historií kouření. V této práci byli studováni kuřáci i nekuřáci, kteří se také lišili jejich léčbou.

Snížená exprese MMP14 by měla být předmětem dalšího studia, které zahrne klinickou heterogenitu u pacientů s astma bronchiale a odlišné fenotypy CHOPN. Srovnáme-li naše výsledky s dalšími studii o plicním emfyzému, MMP14 by mohla sloužit jako fenotypový biomarker. Proto je důležité porovnat expresi MMP14 mezi pacienty s a bez plicního emfyzému.

7 ZÁVĚR

Teoretická část poskytuje úvod do problematiky chronické obstrukční plicní nemoci (CHOPN) a astma bronchiale (AB). Dále shrnuje základní poznatky o patofyziologii těchto plicních nemocí. Krátce zmiňuje jejich fenotypy a léčbu, protože mohou mít vliv na expresi matrix metaloproteináz (MMP) a experimentálních výsledků této práce.

V rámci experimentální části naší bakalářské práce byla měřena relativní exprese matrix metaloproteinázy 14 (MMP14) v bronchoalveolární laváži (BAL) pomocí metody kvantifikační PCR v reálném čase (RT-PCR). V obou případech byla u pacientů s CHOPN nebo s AB pozorována snížená exprese MMP14 v porovnání s kontrolní skupinou pacientů. Mezi pacienty s CHOPN nebo AB nebyl v expresi MMP14 pozorován signifikantní rozdíl. Protože expresní data nemusí korelovat s proteinovou hladinou, měly by další práce měřit MMP14 na proteinové úrovni, a především určit hladinu aktivní formy MMP14. Přímé stanovení enzymové aktivity by mohlo přispět k objasnění patofyziologické role MMP14 u CHOPN a AB. MMP14 by mohla také sloužit jako fenotypový biomarker. Tyto výsledky je ovšem potřeba potvrdit rozsáhlejší klinickou studií s více pacienty, která zahrne do analýzy odlišné fenotypové projevy CHOPN a AB.

8 LITERATURA

Belvisi MG, Bottomley KM. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? *Inflamm Res.* 2003 Mar;52(3):95-100.

Bode W, Gomis-Rüth FX, Stöckler W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* 1993 Sep 27;331(1-2):134-40.

Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, Zuberbier T, Baena-Cagnani CE, Canonica GW, van Weel C, Agache I, Aït-Khaled N, Bachert C, Blaiss MS, Bonini S, Boulet LP, Bousquet PJ, Camargos P, Carlsen KH, Chen Y, Custovic A, Dahl R, Demoly P, Douagui H, Durham SR, van Wijk RG, Kalayci O, Kaliner MA, Kim YY, Kowalski ML, Kuna P, Le LT, Lemiere C, Li J, Lockey RF, Mavale-Manuel S, Meltzer EO, Mohammad Y, Mullol J, Naclerio R, O'Hehir RE, Ohta K, Ouedraogo S, Palkonen S, Papadopoulos N, Passalacqua G, Pawankar R, Popov TA, Rabe KF, Rosado-Pinto J, Scadding GK, Simons FE, Toskala E, Valovirta E, van Cauwenberge P, Wang DY, Wickman M, Yawn BP, Yorgancioglu A, Yusuf OM, Zar H, Annesi-Maesano I, Bateman ED, Ben Kheder A, Boakye DA, Bouchard J, Burney P, Busse WW, Chan-Yeung M, Chavannes NH, Chuchalin A, Dolen WK, Emuzyte R, Grouse L, Humbert M, Jackson C, Johnston SL, Keith PK, Kemp JP, Klossek JM, Larenas-Linnemann D, Lipworth B, Malo JL, Marshall GD, Naspitz C, Nekam K, Niggemann B, Nizankowska-Mogilnicka E, Okamoto Y, Orru MP, Potter P, Price D, Stoloff SW, Vandenplas O, Viegi G, Williams D; World Health Organization; GA(2)LEN; AllerGen. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy.* 2008 Apr;63 Suppl 86:8-160.

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol.* 2005 Jun;34(3):597-601.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000 Oct;25(2):169-93.

Corren J. Asthma phenotypes and endotypes: an evolving paradigm for classification. *Discov Med*. 2013 Apr;15(83):243-9.

Cosío BG, Dacal D, Pérez de Llano L. Asthma-COPD overlap: identification and optimal treatment. *Ther Adv Respir Dis*. 2018 Jan-Dec;12:1753466618805662.

Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2012 Apr 7;379(9823):1341-51.

Drope J, Schluger N, Cahn Z, Drope J, Hamill S, Islami F, Liber A, Nargis N, Stoklosa M. 2018. *The Tobacco Atlas*. Atlanta: American Cancer Society and Vital Strategies. [online] [navštíveno 6.5.2021] dostupné z <https://tobaccoatlas.org>

Elkington PT, Friedland JS. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax*. 2006 Mar;61(3):259-66.

Fajt ML, Wenzel SE. Asthma phenotypes and the use of biologic medications in asthma and allergic disease: the next steps toward personalized care. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Feb;135(2):299-310; quiz 311.

Fernandez-Catalan C, Bode W, Huber R, Turk D, Calvete JJ, Lichte A, Tschesche H, Maskos K. Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase a receptor. *EMBO J*. 1998 Sep 1;17(17):5238-48.

Franssen FM, Alter P, Bar N, Benedikter BJ, Iurato S, Maier D, Maxheim M, Roessler FK, Spruit MA, Vogelmeier CF, Wouters EF, Schmeck B. Personalized medicine for patients with COPD: where are we? *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2019 Jul 9;14:1465-1484.

GeneCards. [online] [navštíveno 6.5.2021] dostupné z <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MMP14>

Gharib SA, Manicone AM, Parks WC. Matrix metalloproteinases in emphysema. *Matrix Biol.* 2018 Nov;73:34-51.

Global Initiative for Asthma. [online] [navštíveno 6.5.2021] dostupné z www.ginasthma.org

Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. [online] [navštíveno 6.5.2021] dostupné z www.goldcopd.org

Gordon SB, Bruce NG, Grigg J, Hibberd PL, Kurmi OP, Lam KB, Mortimer K, Asante KP, Balakrishnan K, Balmes J, Bar-Zeev N, Bates MN, Breyse PN, 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 WJ 2nd. Respiratory risks from household air pollution in low and middle income countries. *Lancet Respir Med.* 2014 Oct;2(10):823-60.

Hikichi M, Hashimoto S, Gon Y. Asthma and COPD overlap pathophysiology of ACO. *Allergol Int.* 2018 Apr;67(2):179-186.

Hikichi M, Mizumura K, Maruoka S, Gon Y. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by cigarette smoke. *J Thorac Dis.* 2019 Oct;11(Suppl 17):S2129-S2140.

Hoesterey D, Das N, Janssens W, Buhr RG, Martinez FJ, Cooper CB, Tashkin DP, Barjaktarevic I. Spirometric indices of early airflow impairment in individuals at risk of developing COPD: Spirometry beyond FEV₁/FVC. *Respir Med.* 2019 Sep;156:58-68.

Kim V, Criner GJ. Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Feb 1;187(3):228-37.

Kondo T, Nakano Y, Adachi S, Murohara T. Effects of Tobacco Smoking on Cardiovascular Disease. *Circ J*. 2019 Sep 25;83(10):1980-1985.

Kurmi OP, Lam KB, Ayres JG. Indoor air pollution and the lung in low- and medium-income countries. *Eur Respir J*. 2012 Jul;40(1):239-54.

Laronha H, Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells*. 2020 Apr 26;9(5):1076.

Liou, T.G., Kanner, R.E. Spirometry. *Clinic Rev Allerg Immunol* 37. 2009; 137–152.

MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(4):258-66; discussion 290-1.

Madore AM, Laprise C. Immunological and genetic aspects of asthma and allergy. *J Asthma Allergy*. 2010 Aug 20;3:107-21.

Melani AS. Long-acting muscarinic antagonists. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2015;8(4):479-501.

Mims JW. Asthma: definitions and pathophysiology. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015 Sep;5 Suppl 1:S2-6.

Morrison CJ, Butler GS, Rodríguez D, Overall CM. Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Oct;21(5):645-53.

Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol*. 2011 Nov 11;12(11):233.

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 2006 Feb 15;69(3):562-73.

Ning W, Li CJ, Kaminski N, Feghali-Bostwick CA, Alber SM, Di YP, Otterbein SL, Song R, Hayashi S, Zhou Z, Pinsky DJ, Watkins SC, Pilewski JM, Sciruba FC, Peters

DG, Hogg JC, Choi AM. Comprehensive gene expression profiles reveal pathways related to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 12;101(41):14895-900.

Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Kontinen YT. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest*. 1998 Sep;78(9):1077-87.

Otálora-Otálora BA, Florez M, López-Kleine L, Canas Arboleda A, Grajales Urrego DM, Rojas A. Joint Transcriptomic Analysis of Lung Cancer and Other Lung Diseases. *Front Genet*. 2019 Dec 6;10:1260.

Regionální zpravodajství NZIS. [online] [navštíveno 6.5.2021] Dostupné z <https://reporting.uzis.cz>

Rutten FH, Zuithoff NP, Hak E, Grobbee DE, Hoes AW. Beta-blockers may reduce mortality and risk of exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med*. 2010 May 24;170(10):880-7.

Silva GE, Sherrill DL, Guerra S, Barbee RA. Asthma as a risk factor for COPD in a longitudinal study. *Chest*. 2004 Jul;126(1):59-65.

Stockley RA, O'Brien C, Pye A, Hill SL. Relationship of sputum color to nature and outpatient management of acute exacerbations of COPD. *Chest*. 2000 Jun;117(6):1638-45.

Chronické plicní nemoci. [online] [navštíveno 6.5.2021] Dostupné z <https://www.symptomy.cz/nemoc/chronicka-obstrukcni-plicni-nemoc>

Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J. *Metody Molekulární biologie*. 2005. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita

Tournoy KG, Kips JC, Pauwels RA. Is Th1 the solution for Th2 in asthma? *Clin Exp Allergy*. 2002 Jan;32(1):17-29.

Tuder RM, Petrache I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*. 2012 Aug;122(8):2749-55.

Vandenbroucke RE, Dejonckheere E, Libert C. a therapeutic role for matrix metalloproteinase inhibitors in lung diseases? *Eur Respir J*. 2011 Nov;38(5):1200-14.

Vestbo J, Lange P. Natural history of COPD: Focusing on change in FEV1. *Respirology*. 2016 Jan;21(1):34-43.

Vlaykova T, Dimov D. Polymorphisms of Matrix Metalloproteinases (MMP) in COPD, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2012, 26:sup1, 111-119.

Yacoub R, Habib H, Lahdo A, Al Ali R, Varjabedian L, Atalla G, Kassis Akl N, Aldakheel S, Alahdab S, Albitar S. Association between smoking and chronic kidney disease: a case control study. *BMC Public Health*. 2010 Nov 25;10:731.

Yacoub R, Habib H, Lahdo A, Al Ali R, Varjabedian L, Atalla G, Kassis Akl N, Aldakheel S, Alahdab S, Albitar S. Association between smoking and chronic kidney disease: a case control study. *BMC Public Health*. 2010 Nov 25;10:731.

Yanagisawa S, Ichinose M. Definition and diagnosis of asthma-COPD overlap (ACO). *Allergol Int*. 2018 Apr;67(2):172-178.

Zhu Y, Zhou A, Li Q. Whole transcriptome analysis of human lung tissue to identify COPD-associated genes. *Genomics*. 2020 Sep;112(5):3135-3141.