

UNIVERZITA KARLOVA

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

PNEUMOLOGICKÁ KLINIKA 1. LF UK A FTN

# **Úloha vybraných chemokinů a cytokinů v patogenezi exogenních alergických alveolitid**

MUDr. Martina Šterclová, Ph.D.

Habilitační práce

2021

Obor habilitačního řízení: Vnitřní nemoci

Pracoviště: Pneumologická klinika 1. LF UK a Fakultní Thomayerovy nemocnice

Práce vznikla za podpory grantů IGA MZČR č. 8699-3; 9131-3; ERS-STRTF 103-2012; CHEST Foundation Grant 2015.

Klinická část projektu byla realizována na Pneumologické klinice 1. LF UK a Thomayerovy nemocnice.

Laboratorní část projektů byla provedena na pracovišti Klinické a transplantační imunologie IKEM, na Oddělení patologie a molekulárních metod Thomayerovy nemocnice a v Comprehensive Pneumology Center v Mnichově.

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno ve spolupráci s mgr. Jelenou Skibovou – Oddělení biostatistiky, IKEM.

Poděkování za spolupráci patří všem níže uvedeným spolupracovníkům a především prof. MUDr. Martině Vašákové, Ph.D., která při řešení projektů přispěla nejen odbornou radou, ale i osobní podporou.

Spolupracovníci: Prof. MUDr. Ilja Stříž, CSc.; MUDr. Jan Pavlíček; Ing. Monika Metlická; Mgr. Libor Kolesár; Mgr. Eliška Thornburn; Ing. Magdalena Brůžová; MUDr. Peter Paluch; Mgr. Pavel Sojka; Dr. Rt.nat. Katharina Heinzelmann, Ph.D.; prof. Oliver Eickelberg, MD.

Celá práce by nemohla vzniknout bez pochopení všech pacientů, kteří souhlasili se zařazením do projektů a bez podpory mé rodiny.

V Praze 23.7.2021

## Obsah

<b>1. Abstrakt</b> .....	2
<b>2. Abstract</b> .....	7
<b>3. Úvod do problematiky - exogenní alergická alveolitida</b> .....	12
3.1 Definice .....	12
3.2 Epidemiologie .....	12
3.3 Etiologie – inhalační antigeny .....	13
3.4 Nové inhalační antigeny – nové syndromy .....	15
3.5 Genetická predispozice .....	15
3.6 Další potenciální spouštěče onemocnění .....	16
3.7 Molekulární mechanismy .....	17
3.7.1 Interleukin 4 a receptor pro interleukin 4 .....	20
3.7.2 Proteázami aktivovaný receptor 2 (PAR-2) .....	21
3.7.3 Tumor nekrotizující faktor- $\alpha$ .....	22
3.7.4 Transformující růstový faktor- $\beta$ .....	23
3.7.5 Interleukin-8 .....	24
3.7.6 Epiteliální neutrofily aktivující protein-78 .....	25
3.7.7 CXCR2 .....	25
3.7.8 Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) .....	26
3.7.9 IP-10 (CXCL10), ITAC (CXCL11) .....	27
3.7.10 CXCR3 .....	28
3.7.11 Eotaxin a CCR3 .....	29
3.7.12 Wingless/integrase-1 (Wnt-1, Wnt-3) .....	30
3.7.13 Matrixová metaloproteináza-7 (MMP-7) .....	30
3.8 Klinický obraz .....	30
3.8.1 Anamnéza .....	34
3.8.2 Laboratorní vyšetření .....	35
3.8.3 HRCT hrudníku .....	35
3.8.4 Vyšetření plicních funkcí .....	39
3.8.5 Bronchoskopie s bronchoalveolární laváží .....	40
3.8.6 Histologie .....	40
3.8.7 Diagnostická kritéria EAA (tabulka 7) .....	44
3.9 Léčba EAA .....	45
3.10 Prognóza .....	47
<b>4. Jednotlivé cíle výzkumu: způsob řešení</b> .....	48

4.1	Vztah radiologického obrazu onemocnění s klinickými parametry.....	48
4.2	Porovnání chemokinového prostředí v BALTe pacientů s EAA a pacientů se sarkoidózou a IPF .....	48
4.3	Průkaz vlivu solubilních faktorů v BALTe na buňky podílející se na procesu fibrogenese.....	49
4.4	Buňky získané BAL u nemocných s EAA si mohou zachovávat vlastnosti odpovídající formě onemocnění.....	51
4.5	Úloha IL-4R $\alpha$ v patogenezi EAA .....	51
4.6	Může sérová koncentrace surfaktantového proteinu A (SP-A) napomoci k odlišení mezi chronickou EAA a IPF? .....	53
4.7	Možné zdroje expozice a manifestace EAA .....	54
4.8	Endogenní a exogenní faktory ovlivňující manifestaci EAA.....	56
<b>5.</b>	<b>Shrnutí výsledků provedeného výzkumu a diskuze.....</b>	<b>59</b>
<b>6.</b>	<b>Využití a možné využití získaných poznatků .....</b>	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>66</b>
<b>8.</b>	<b>Příloha.....</b>	<b>78</b>
8.1	Obr. 1 HRCT obraz nefibrotického postižení při EAA – bilaterálně difuzně patrný centrilobulární noduly.....	78
8.2	Obr. 2 HRCT obraz mlhovitých opacit a mozaikové perfúze u pacienta s nefibrotickou EAA .....	79
8.3	Obr. 3 HRCT obraz kombinovaného postižení s mlhovitými opacitami a zesílením interlobulárních sept u nemocné s fibrotickou EAA.....	80
8.4	Obr. 4 HRCT obraz obvyklé intersticiální pneumonie (UIP) u nemocného s fibrotickou EAA .....	81
8.5	Obr. 5 Konfluentní kultura buněčné linie lidských fibroblastů (zvětšení 10x100, nativně) .....	82
8.6	Obr. 6 Buňky získané bronchoalveolární laváží pacientů s EAA kultivované v různých médiích.....	83
<b>9.</b>	<b>Výsledky uvedené v kapitole 4.....</b>	<b>85</b>

## 1. Abstrakt

Předkládaná práce shrnuje poznatky, které jsou výsledkem výzkumné činnosti zabývající se patogenezí exogenní alergické alveolity (EAA).

Zpočátku jsme se věnovali problematice kvantifikace rozsahu a charakteru radiologického nálezu a vztahu radiologického obrazu onemocnění s klinickými parametry včetně procentuálního zastoupení jednotlivých typů buněk v tekutině získané bronchoalveolární laváží (BALTe) (1). Pilotní práce zaměřená na toto téma nám pomohla nahlédnout do spektra možných prezentací onemocnění, které zahrnují jak akutní manifestace s dominujícím zánětlivým obrazem na jedné straně, tak fibrotické plicní postižení na straně druhé. Zkoumaný poměr zastoupení CD4+ T lymfocytů a CD8+ T lymfocytů v BALTe nemocných ukazuje, že zatímco u pacientů s převážně zánětlivým postižením plicní tkáně pravděpodobně dominuje Th1 cytokinové spektrum, u pacientů s převažujícím fibrotickým postižením mohou dominovat Th2 cytokiny a mechanismy.

Protože Th1 cytokinové prostředí se uplatňuje i v patogenezi sarkoidózy, kdežto Th2 cytokinové spektrum bylo popsáno mimo jiné u nemocných s idiopatickou plicní fibrózou (IPF), v další fázi výzkumu jsme se zaměřili na porovnání chemokinového prostředí v BALTe nemocných s těmito procesy versus u pacientů s EAA. Fibrogenese bývá asociována nejen s Th2 cytokinovým laděním, ale i s angiogenezí – procesem, v kterém hrají důležitou úlohu angiogenní chemokiny (např. interleukin 8 (IL-8), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), od epiteliálních buněk odvozený faktor aktivující neutrofilů 78 (ENA-78)) a jejich receptor CXCR2. Protikladem jsou chemokiny angiostatické (např. interferonem gamma indukovaný protein 10 (IP-10), interferonem inducibilní chemoatraktant pro T lymfocyty (I-TAC)) a jejich receptor CXCR3. Výsledky provedených studií naznačují, že pacienti s chronickou EAA a pacienti s IPF se významně neliší v zastoupení chemokinů v BALTe, obdobná může být i radiologická manifestace obou procesů. Úloha chemokinů se ale může u obou onemocnění odlišovat - u EAA lze IL-8 považovat za pravděpodobný marker kontinuální expozice vyvolávajícím agens, ENA-78 může být považována za marker reverzibility plicního postižení a VEGF má spíše angiogenní než profibrotický efekt a hlavní roli pravděpodobně hraje v časných fázích EAA. Expresí CXCR3 na CD4+ T lymfocytech BALTe koreluje s rozsahem zánětlivých

změn dle počítačové tomografie s vysokou rozlišovací schopností (HRCT), což dále podporuje myšlenku, že v různých fázích onemocnění se na plicním postižení podílí různé mechanismy (2-5).

K objasnění těchto mechanismů jsme se rozhodli využít buněčných kultur – a to jak komerčně dostupných buněčných linií A549 (alveolární bazální epiteliální buňky pocházející z lidského adenokarcinomu) a hFL (buňky lidských fetálních plicních fibroblastů pocházející z plodů věku 16-18 týdnů), tak primárních lidských fibroblastů získaných z plicní tkáně nemocných s fibrotizujícími plicními procesy, a dále buněk primárních kultur buněk z BALTe pacientů s fibrotizujícími plicními procesy. Prokázali jsme, že proliferační kapacita buněk a produkce některých proteinů (Wingless 1, 3 (Wnt-1, Wnt-3) a matrixová metaloproteináza 7 (MMP-7)) exponovaných BALTe pacientů s intersticiálními plicními procesy včetně EAA závisí mimo jiné na tom, zda je plicní tkáň pacienta postižena spíše zánětem či spíše fibrózou. Pro některé pokusy jsme použili také buňky pacientů s EAA, které byly získány bronchoalveolární laváží a po odběru zamrazeny při  $-80^{\circ}\text{C}$ . Nejprve jsme optimalizovali kultivační médium pro další pěstování těchto buněk, v dalších pokusech jsme sledovali vliv expozice BALTe nemocných s EAA na pFL (produkce Wnt-1, Wnt-3 a MMP-7 buňkami) (6).

Zjištění, že cytokinové spektrum v BALTe se liší v závislosti na manifestaci onemocnění podpořily studie zaměřené na  $\alpha$  podjednotku receptoru pro interleukin 4 (IL-4R $\alpha$ ) v BALTe – prokázali jsme, že koncentrace tohoto cytokinového receptoru v BALTe nemocných s EAA pozitivně koreluje s rozsahem fibrotických změn dle HRCT hrudníku a dále že vysoké koncentrace IL-4R $\alpha$  u nemocných s EAA mohou pravděpodobně predikovat nepříznivý vývoj onemocnění navzdory léčbě systémovými kortikosteroidy. Jelikož jsme paralelně prokázali vyšší koncentrace IL-4R $\alpha$  v BALTe pacientů s fibrotizujícími idiopatickými intersticiálními pneumoniemi, stala se tato molekula předmětem dalšího výzkumu (7).

Výzkum porovnávající sérové koncentrace surfaktantového proteinu A u nemocných s fibrotizující chronické EAA a IPF, také neprokázal mezi oběma diagnózami signifikantní rozdíl, některé aspekty shodné obecně pro fibrotické a zánětlivé postižení nalézáme u nemocných s intersticiálními plicními procesy napříč všemi diagnózami (8).

Jak bude dále rozvedeno, EAA vzniká u osob (pravděpodobně s geneticky danou predispozicí) po opakované expozici organickým inhalačním antigenům. Přestože cytokinové spektrum v BALTe pravděpodobně na zdroji inhalační expozice nezávisí, zdá se, že EAA rozvíjející se po kontaktu s plísněmi se manifestuje mírnějším plicním postižením, než je tomu po kontaktu s jinými inhalačními antigeny. Často není ani po opakovaném podrobném odběru anamnézy od pacienta zřejmé, jakému antigenu vlastně je exponován. Určitou možnost přináší vyšetření specifických imunoglobulinů G v séru, vysoké koncentrace mohou na možný zdroj expozice poukázat. Čeští pacienti jsou pravděpodobně nejvíce senzitivizováni vůči hexametylen diisocyanátu a difenylmetan diisocyanátu, převažuje senzitivizace vůči více než jednomu inhalačnímu antigenu (8). Možností, jak specifikovat zdroj expozice u nemocných s EAA, je také stanovení specifických sérových IgG namířených přímo proti relevantním antigenům metodou ELISA (9).

Na manifestaci EAA se může podílet i expozice cigaretovému kouři – prokázali jsme, že expozice cigaretovému kouři ovlivňuje pravděpodobně koncentrace glutathion peroxidázy 3 (GPX3) v BALTe pacientů s EAA (10).

Kromě „vnějších“ expozic mají na manifestaci EAA patrně vliv i „vnitřní faktory“. Jedním z nich mohou být polymorfismy genů pro cytokiny – prokázali jsme konkrétně korelaci mezi polymorfismem genu pro interleukin 6 (IL-6) s koncentrací ENA-78 v BALTe. Dalším faktorem, který může ovlivňovat manifestaci EAA je věk – starší pacienti mívají vyšší zastoupení neutrofilů a eozinofilů v BALTe (11-14).

1. Sterclova M, Vasakova M, Dutka J, Kalanin J. Extrinsic allergic alveolitis: comparative study of the bronchoalveolar lavage profiles and radiological presentation. *Postgrad Med J* 2006;82(971):598-601.
2. Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc J, Striz I. Cytokine gene polymorphisms and BALF cytokine levels in interstitial lung diseases. *Respir Med* 2009;103(5):773-9.
3. Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc J, Skibova J, Striz I. Bronchoalveolar lavage fluid cellular characteristics, functional parameters and cytokine and chemokine levels in interstitial lung diseases. *Scand J Immunol.* 2009;69(3):268-74.

4. Sterclova M, Vasakova M, Pavlicek J, Metlicka M, Krasna E, Striz I. Chemokine receptors in a regulation of interstitial lung fibrosis and inflammation. *Exp Lung Res.* 2009;35(6):514-23.
5. Matěj R, Smětáková M, Vašáková M, Nováková J, Sterclová M, Kukul J, Olejár T. PAR-2, IL-4R, TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  in bronchoalveolar lavage distinguishes extrinsic allergic alveolitis from sarcoidosis. *Exp Ther Med.* 2014;8(2):533-538.
6. Sterclova M, Paluch P, Heinzelmann K, Fernandez I, Eickleberg O, Vasakova M. Role of Wnt-1, Wnt-3 and MMP-7 in fibrotic response in extrinsic allergic alveolitis and idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Society Annual Conference 2015*, poster PA3838.
7. Sterclova M, Matej R, Mandakova P, Skibova J, Vasakova M. Role of interleukin 4 and its receptor in clinical presentation of chronic extrinsic allergic alveolitis: a pilot study. *Multidiscip Respir Med* 2013;8(1):35.
8. Sterclova M, Vasakova M, Paluch P, Paulik M. Surfactant protein A in chronic extrinsic allergic alveolitis. *Eur Respir J* 2012;39(6):1543-4.
9. Sterclova M, Vasakova M, Metlicka M. Significance of specific IgG against sensitizing antigens in extrinsic allergic alveolitis: serological methods in EAA. *Rev Port Pneumol* 2011;17(6):253-9.
10. Sterclova M, Kremlackova V, Mottlova V, Bruzova M, Sojka P, Vasakova M. Quantitative assessment of specific serum IgGs may verify source of environmental exposure in extrinsic allergic alveolitis (EAA). *Cogent Medicine* 2021; 8 (1): 1894688.
11. Schamberger AC, Schiller HB, Fernandez IE, Sterclova M, Heinzelmann K, Hennen E, Hatz R, Behr J, Vašáková M, Mann M, Eickelberg O, Staab-Weijnitz CA. Glutathione peroxidase 3 localizes to the epithelial lining fluid and the extracellular matrix in interstitial lung disease. *Sci Rep* 2016;6:29952.
12. Sterclova M, Paluch P, Skibova J, Vasakova M. Influence of age on manifestation, VC and TLCO values, and bronchoalveolar lavage cell counts of sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Clin Respir J* 2015;9(1):39-44.
13. Sterclova M, Smetakova M, Stehlik L, Skibova J, Vasakova M. Bronchoalveolar lavage cell profiles and proteins concentrations can be used to phenotype extrinsic allergic alveolitis patients. *Multidiscip Respir Med* 2019;14:13.



14. Sterclova M, Petrek M, Kishore A, Skibova J, Vasakova M. Effect of genotype on disease course on hypersensitivity pneumonitis despite treatment. *European Respiratory Journal* 2018; 52 (Suppl 62): 3665.

## 2. Abstract

The presented work summarizes the findings that are the result of research activities dealing with the pathogenesis of exogenic allergic alveolitis (EAA).

Initially, we addressed the issue of quantification of the extent and nature of radiological findings and the correlation of radiologic phenotype of the disease with clinical parameters, including the cell percentages in the fluid obtained by bronchoalveolar lavage (BALF) (1). The pilot work on this topic helped us to look into the spectrum of possible presentations of the disease, which include both acute manifestations with a predominant inflammatory picture on one hand, and fibrotic lung disease on the other. The investigated ratio of CD4 + T cells to CD8 + T cells in BALF patients indicates that while predominant inflammatory lung tissue involvement is likely to be associated with the Th1 cytokine spectrum, in fibrotic involvement Th2 cytokines and mechanisms may dominate.

While Th1 cytokine environment is also involved in the pathogenesis of sarcoidosis, and Th2 cytokine spectrum has been described in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), the next phase of research focused on comparing the chemokine environment in BALF of patients with sarcoidosis and IPF and patients with EAA. Fibrogenesis is associated not only with Th2 cytokine tuning but also with angiogenesis - a process in which angiogenic chemokines (eg interleukin 8 (IL-8), vascular endothelial growth factor (VEGF), epithelial cell-derived neutrophil activating factor 78 (ENA-78)) and their receptor CXCR2 play role. Their counterparts represent angiostatic chemokines (e.g., interferon gamma-induced protein 10 (IP-10), interferon-inducible T cell chemoattractant (I-TAC)), and their CXCR3 receptor. We suggest that patients with chronic EAA and patients with IPF do not differ significantly in the representation of chemokines in BALF, moreover the radiological manifestation of both processes may be similar. However, the role of chemokines may differ in both diseases - in EAA, IL-8 can be considered a likely marker of continuous exposure to the inducing agent, ENA-78 can be considered a marker of reversibility of pulmonary disease, and VEGF has an angiogenic rather than profibrotic effect and probably plays a major role in early stages of EAA. The expression of CXCR3 on BALF CD4 + T cells correlates with the extent of inflammatory changes according to high-resolution computed

tomography (HRCT), which further supports the idea that different mechanisms are involved in pulmonary involvement at different stages of the disease (2-5).

To elucidate these mechanisms, we decided to use cell cultures - both commercially available cell lines A549 (alveolar basal epithelial cells derived from human adenocarcinoma) and hFL (human fetal lung fibroblast cells derived from fetuses aged 16-18 weeks) and primary human fibroblasts (pFL) obtained from the lung tissue of patients with fibrotic lung processes, as well as primary culture cells from BALF patients with fibrotic lung processes. We have shown that the cell proliferative capacity and production of some proteins (Wingless 1, 3 (Wnt-1, Wnt-3) and matrix metalloproteinase 7 (MMP-7)) of exposed BALF patients with interstitial lung processes, including EAA, depend, inter alia, on whether the patient's lung tissue is more affected by inflammation or more by fibrosis. For some experiments, we also used cells from patients with EAA, which were obtained by bronchoalveolar lavage and frozen at -80 ° C after collection. We first optimized the culture medium for further cultivation of these cells, in other experiments we observed the effect of BALF exposure of patients with EAA on pFL (production of Wnt-1, Wnt-3 and MMP-7 cells) (6).

The finding that the cytokine spectrum in BALF differs depending on the manifestation of the disease was supported by studies of the  $\alpha$  subunit of the interleukin 4 receptor (IL-4R $\alpha$ ) in BALF - we showed that concentrations of this cytokine receptor in BALF of patients with EAA positively correlate with fibrotic involvement on chest HRCT and that high levels of IL-4R $\alpha$  in patients with EAA are likely to predict adverse disease progression despite treatment with systemic corticosteroids. As we demonstrated in parallel higher concentrations of IL-4R $\alpha$  in BALF of patients with fibrotic idiopathic interstitial pneumonias, this molecule has been the subject of further research (7).

Study comparing serum surfactant protein A levels in patients with fibrotic chronic EAA and IPF also did not show a significant difference between the two diagnoses; some aspects similar to fibrotic and inflammatory disorders are found in patients with interstitial lung processes across all diagnoses (8).

As will be explained below, EAA develops in individuals (probably with a genetic predisposition) after repeated exposure to organic inhalation antigens. Although

the cytokine spectrum in BALF is unlikely to depend on the source of inhalation exposure, EAA that develops after contact with fungi appears to manifest as milder lung involvement than after contact with other inhalation antigens. It is often not clear even after detailed medical history has been taken from the patient to which antigen he is actually exposed. Examination of specific serum immunoglobulins G provides some possibility, high concentrations may indicate a possible source of exposure. Czech patients are probably most often sensitized to hexamethylene diisocyanate and diphenylmethane diisocyanate, with sensitization to more than one inhalation antigen predominating (8). One way to specify the source of exposure in patients with EAA is to determine specific serum IgG directed directly against the relevant antigens by ELISA (9).

Exposure to cigarette smoke may also contribute to the manifestation of EAA - we have shown that exposure to cigarette smoke is likely to affect glutathione peroxidase 3 (GPX3) levels in BALF patients with EAA (10).

In addition to "external" exposures, "internal factors" appear to influence EAA manifestations. One of them may be polymorphisms of cytokine genes - we have specifically shown a correlation between the polymorphism of the interleukin 6 (IL-6) gene with the concentration of ENA-78 in BALF. Another factor that may affect the manifestation of EAA is age - elderly patients tend to have a higher proportion of neutrophils and eosinophils in BALF (11-14).

1. Sterclova M, Vasakova M, Dutka J, Kalanin J. Extrinsic allergic alveolitis: comparative study of the bronchoalveolar lavage profiles and radiological presentation. *Postgrad Med J* 2006;82(971):598-601.
2. Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc J, Striz I. Cytokine gene polymorphisms and BALF cytokine levels in interstitial lung diseases. *Respir Med* 2009;103(5):773-9.
3. Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc J, Skibova J, Striz I. Bronchoalveolar lavage fluid cellular characteristics, functional parameters and cytokine and chemokine levels in interstitial lung diseases. *Scand J Immunol.* 2009;69(3):268-74.

4. Sterclova M, Vasakova M, Pavlicek J, Metlicka M, Krasna E, Striz I. Chemokine receptors in a regulation of interstitial lung fibrosis and inflammation. *Exp Lung Res.* 2009;35(6):514-23.
5. Matěj R, Smětáková M, Vašáková M, Nováková J, Sterclová M, Kukul J, Olejár T. PAR-2, IL-4R, TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  in bronchoalveolar lavage distinguishes extrinsic allergic alveolitis from sarcoidosis. *Exp Ther Med.* 2014;8(2):533-538.
6. Sterclova M, Paluch P, Heinzelmann K, Fernandez I, Eickleberg O, Vasakova M. Role of Wnt-1, Wnt-3 and MMP-7 in fibrotic response in extrinsic allergic alveolitis and idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Society Annual Conference 2015*, poster PA3838.
7. Sterclova M, Matej R, Mandakova P, Skibova J, Vasakova M. Role of interleukin 4 and its receptor in clinical presentation of chronic extrinsic allergic alveolitis: a pilot study. *Multidiscip Respir Med* 2013;8(1):35.
8. Sterclova M, Vasakova M, Paluch P, Paulik M. Surfactant protein A in chronic extrinsic allergic alveolitis. *Eur Respir J* 2012;39(6):1543-4.
9. Sterclova M, Vasakova M, Metlicka M. Significance of specific IgG against sensitizing antigens in extrinsic allergic alveolitis: serological methods in EAA. *Rev Port Pneumol* 2011;17(6):253-9.
10. Sterclova M, Kremlackova V, Mottlova V, Bruzova M, Sojka P, Vasakova M. Quantitative assessment of specific serum IgGs may verify source of environmental exposure in extrinsic allergic alveolitis (EAA). *Cogent Medicine* 2021; 8 (1): 1894688.
11. Schamberger AC, Schiller HB, Fernandez IE, Sterclova M, Heinzelmann K, Hennen E, Hatz R, Behr J, Vašáková M, Mann M, Eickelberg O, Staab-Weijnitz CA. Glutathione peroxidase 3 localizes to the epithelial lining fluid and the extracellular matrix in interstitial lung disease. *Sci Rep* 2016;6:29952.
12. Sterclova M, Paluch P, Skibova J, Vasakova M. Influence of age on manifestation, VC and TLCO values, and bronchoalveolar lavage cell counts of sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Clin Respir J* 2015;9(1):39-44.
13. Sterclova M, Smetakova M, Stehlik L, Skibova J, Vasakova M. Bronchoalveolar lavage cell profiles and proteins concentrations can be used to phenotype extrinsic allergic alveolitis patients. *Multidiscip Respir Med* 2019;14:13.

14. Sterclova M, Petrek M, Kishore A, Skibova J, Vasakova M. Effect of genotype on disease course on hypersensitivity pneumonitis despite treatment. *European Respiratory Journal* 2018; 52 (Suppl 62): 3665.

### 3. Úvod do problematiky - exogenní alergická alveolitida

#### 3.1 Definice

Exogenní alergické alveolitidy (EAA) představují skupinu intersticiálních plicních procesů rozvíjejících se v příčinné souvislosti s opakovanou expozicí inhalačním antigenům pravděpodobně u geneticky predisponovaných jedinců.

#### 3.2 Epidemiologie

Přesná epidemiologická data, sledující incidenci a prevalenci EAA nejsou k dispozici. Onemocnění je podle některých autorů třetím nejčastějším intersticiálním plicním procesem (po idiopatické plicní fibróze a nespecifické fibrotizující pneumonii), data z různých států jsou ale různá. Např. v Dánsku je roční incidence EAA nižší než 1 případ na 100 000 obyvatel, podobná data jsou k dispozici z Velké Británie. Roční incidence EAA v Novém Mexiku je udávána jako 30 případů na 100 000 obyvatel. Zdá se, že záleží mimo jiné i na podnebí, ročním období nebo místních zvyklostech v daném regionu. Epidemiologická data může ovlivňovat i to, z jaké populace pocházejí, zejména lze-li ji považovat s ohledem na potenciální riziko EAA za rizikovou (1).

Onemocnění může mít v jednotlivých regionech i různou prevalenci: ve Spojených Státech je odhadnutá prevalence 420-3000 na 100 000 obyvatel, ve Francii 4370 na 100 000 obyvatel a ve Finsku 1400-1700 na 100 000 obyvatel (2). V poslední době se objevují studie, které uvádí, že řada pacientů původně diagnostikovaných jako IPF, může mít chronickou EAA (v literatuře 18-30 %) (3).

Aktuální údaje pro Českou republiku bohužel chybí. Dostupná jsou data týkající se nahlášených a uznaných případů EAA jako nemoci z povolání - v roce 2014 byla hlášena pětkrát izokyanátová plíce (souvislost s výrobou motorových vozidel), pětkrát farmářská plíce a jednou sladovnická plíce. Medián doby expozice do diagnózy EAA jako choroby z povolání byl 2,5 rok (0,04-13,0) (4).

Různé rizikové populace bývají postiženy rozdílnou měrou – zatímco roční incidence EAA mezi chovateli ptactva je 6-21 %, roční incidence EAA v populaci zemědělců dosahuje 0,4-7 % (5).

### 3.3 Etiologie – inhalační antigeny

Organických inhalačních antigenů, které byly popsány jako potenciální vyvolávatele EAA, je řada a v čase bývají definovány další. Jednak se mění spektrum činností a situací, při nichž může k expozici docházet a jednak stoupá snaha lékařů cíleně pátrat po možné vyvolávající příčině intersticiálních plicních procesů. Antigeny lze obecně rozdělit do skupiny plísně, zvířecí antigeny, chemické sloučeniny a bakterie (tabulka 1).

**Tabulka 1. Inhalační antigeny podílející se na rozvoji EAA**

Skupina antigenů	Antigen	Syndromy
Houby	<i>Termofilní aktinomycety</i>	Farmářská plíce, EAA z klimatizace, ze zvlhčovačů vzduchu, bagasóza, plíce pěstitelů hub, plíce bramborářů
	<i>Aspergillus clavatus</i>	Plíce sladovníků
	<i>Penicillium casei</i>	Plíce omývačů sýra
	<i>Cryptostroma corticale</i>	Plíce loupáčů javorové kůry, EAA z dřevního prachu
	<i>Penicillium frequentans</i>	Suberóza, EAA z dřevěných briket
	<i>Aerobasidium pullutans</i>	Sekvojóza
	<i>Mucor sp.</i>	Plíce kráječů papriky
	<i>Merulius lacrymans</i>	Plíce ze suché hniloby
	<i>Aspergillus versicolor</i>	Plíce pracovníků v psinci
	<i>Lycoperdon sp.</i>	Lykoperdonóza
	<i>Botrytis cinerea</i>	Vinařská plíce



	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichosporon cutaneum</i>	Letní EAA (summer-type hypersensitivity pneumonitis)
Zvířata	Ptačí proteiny, krev	Plíce chovatelů ptáků, EAA z draní peří
	Mouční červi	Nemoc z moučných červů
	Krysí proteiny	Plíce chovatelů krys
	Zvířecí srst	Plíce kožešníků
	Hovězí a vepřové proteiny	Plíce šňupačů hypofýz
Chemikálie	Toluen diisokyanát, definymetan diisokyanát	Izokyanátová plíce
	Pauliho činidlo	Plíce z Pauliho činidla
	Směs Bordeaux	Plíce ošetřovatelů vinic
	Kobalt, tvrdé kovy	Plíce obráběčů tvrdých kovů
	Silikon	EAA po expozici silikonu
Bakterie	<i>Bacillus subtilis</i>	Plíce z pracích prášků, EAA z detergentů, EAA z <i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Bacillus cereus</i>	EAA z <i>Bacillus cereus</i>
Různé	Prach z bavlny	Bysinóza
	Prach z kávových zrn	Plíce zpracovatelů kávy

### 3.4 Nové inhalační antigeny – nové syndromy

Zatímco s některými typy EAA se v současnosti prakticky neseťkáváme (plíce ošetřovatelů pacientů s neštovicemi), v čase byly popsány nové syndromy. V některých případech se jedná o kazuistická sdělení – je to např. plicní postižení u hráčů na saxofon a jiné dechové nástroje (*Fusarium*, *Penicillium*, *Candida*, *Cladosporium*, *Phoma*) (6), EAA u bankovní úřednice (tiskařská barva) (7), EAA u pěstitelů skleníkových růží (*Aspergillus*, *Penicillium*) (8), EAA ze zeleného čaje (katechiny) (9), EAA z prachu při výrobě uzenin (*Penicillium*, *Aspergillus*) (10), EAA při expozici fytáze (fytáza), plíce milovníků horkých koupelí (*Mycobacterium avium complex*), pneumonitida u obráběčů tvrdých kovů (*Mycobacterium immunogenum*), plíce ze saunování (*Exophiala jeanselmei*) (11), pneumonitida pěstitelů citrusů (*Aspergillus*, *Penicillium*), plicní postižení u osob, které jsou exponovány inhalačnímu antigenu sekundárně, např. prostřednictvím partnera (ptačí peří) (12), familiární EAA (*Trichosporon*), EAA po kontaktu s papouškem *Agapornis* nebo špačkem, EAA z odpuzovačů hmyzu, EAA z prachu z listů čekanky, poléková EAA (BCG, mesalamin, bevacizumab, lenalidomid, nesteroidní antirevmatika, venlafaxin, kolistin, temozolomid) (13).

### 3.5 Genetická predispozice

Kromě charakteristik vyvolávajícího antigenu (nebo směsi, které je inhalační antigen součástí) je pro rozvoj EAA důležitá nejspíše i genetická predispozice. Jedny z prvních výzkumů v této oblasti byly cíleny na pacienty s familiární EAA, která byla popsána jak v případech farmářské plíce, tak u plíce chovatelů ptáků. Přestože nebyla prokázána jednotná a jednoznačná genetická predispozice, práce některých autorů poukazují na asociaci polymorfismů genů pro lidské leukocytární antigeny (HLA) s výskytem EAA: konkrétně se jednalo o vyšší frekvenci výskytu HLA-Bw40, HLA-B8 a HLA-DR3 u chovatelů ptáků. U Mexičanů s tímto onemocněním se častěji vyskytuje haplotyp HLA-B35, DR4. U pacientů s farmářskou plící byla popsána vyšší frekvence HLA-B7 a HLA-DR2. U japonských pacientů s letním typem EAA byl zachycen častěji gen HLA-DQw3 (14).

Zkoumány byly i geny, jejichž produkty hrají roli v prezentaci a zpracování antigenu nebo v rozvoji následné imunitní odpovědi. Jedním z nich je gen kódující transportéry asociované se zpracováním antigenu (transporters associated with antigen processing,

TAP). TAP se podílí na přenosu peptidů membránou endoplazmatického retikula. S EAA byla prokazatelně sdružena alela Gly-637 (GGC) a genotypy Asp-637/Gly-637 a Pro-661/Pro-661. V porovnání s kontrolní skupinou byla u nemocných s EAA signifikantně méně často prokázána frekvence výskytu alely Pro-661 (CCA), genotypu Asp-637/Asp-637 a haplotypu (Val-333 (GTC), Val-458 (GTG), Gly-637 (GCG), Pro-661 (CCA)) (15). Na zpracování peptidů, aby mohly být prezentovány s MHC I. třídy, se podílí proteazom. Je tvořen podjednotkami, tzv. proteazomy o nízké molekulové hmotnosti (low-molecular-weight proteasomes, LMPs). U mexických pacientů s EAA byl popsán častější výskyt haplotypu PSMB9-RH/PSMB8KQ a zdá se, že predisponujícím faktorem zvyšujícím riziko rozvoje EAA by mohl být v této populaci genotyp PSMB8KQ (16).

Susceptibilitu k rozvoji EAA pravděpodobně zvyšují i polymorfismy genu pro tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), konkrétně v promotorové oblasti genu TNF-2-308 (A v pozici 308). U nositelů této alely byly prokázány vyšší koncentrace TNF- $\alpha$  v séru (17).

### 3.6 Další potenciální spouštěče onemocnění

Stejně jako u ostatních chronických plicních nemocí, i u EAA byl studován vliv infekce především respiračními viry na manifestaci a průběh onemocnění. Viry často interagují s intracelulárními signalizačními cestami buněk a spuštění potenciálně antivirově působících mechanismů (produkce interferonů nebo oxidu dusnatého) může vést k produkci řady cytokinů a chemokinů, které dále ovlivňují průběh preexistujícího onemocnění. Například infekce respiračním syncytiálním virem (RSV) vede k vyšší produkci TNF- $\alpha$ , IL-8, ENA-78, eotaxinu 1, 2 Th2 lymfocyty a také k vyšší expresi receptoru CCR3 na těchto buňkách (18). U nemocných s EAA bylo prokázáno, že viry mohou ovlivňovat průběh EAA ve více aspektech – proběhlá virová infekce akcentuje tvorbu granulomů po expozici inhalačnímu antigenu a také akcentuje neutrofilní alveolitidu rozvíjející se bezprostředně po kontaktu s inhalačním antigenem (19). U nemocných s akutní EAA byly v BALTe dokonce signifikantně častěji prokazovány metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) respirační viry, nejčastěji šlo o virus influenzy A (20, 21).

### 3.7 Molekulární mechanismy

Proti částicím pronikajícím do plicních sklípků se organismus snaží bránit a využívá k tomu složky nespecifické i specifické imunity. Jedny z prvních buněk, které se dostávají s antigenem do kontaktu, fagocytují jej a jsou mimo jiné zdrojem řady působků ovlivňujících další průběh onemocnění, jsou neutrofilů. Rozpoznávají molekulami na svém povrchu tzv. pathogen associated molecular patterns - PAMP, což jsou typické vzorce nezbytné pro život mikroba, které se fyziologicky v lidském těle neobjevují. Fagocytující buňky mají na svém povrchu i v cytoplazmě řadu receptorů, které jim umožní PAMP rozpoznat a reagovat na jejich přítomnost. V souvislosti s EAA jsou nejčastěji zmiňovány receptory TLR (toll-like receptory) a NOD (nucleotide-binding oligomerization domain), v důsledku jejichž aktivace stoupá exprese genů pro některé cytokiny (prozánětlivý interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8 a TNF- $\alpha$ ). TLR-2 rozpoznává peptidoglykany, kyselinu lipoteichoovou a bakteriální lipopolysacharidy a zdá se, že při rozvoji EAA hraje velmi důležitou úlohu. Signalizace probíhá v tomto případě přes adaptorovou molekulu MyD88, mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK) a transkripční faktor NF- $\kappa$ B. Po spuštění této kaskády jsou v důsledku produkce cytokinů atrahovány do místa kontaktu další neutrofilů, které jsou významným zdrojem TNF- $\alpha$  a IL-17. Složky domácího prachu (zejména antigeny roztočů, lipopolysacharid a heat shock proteiny) se váží na TLR-4. Rozpoznání antigenu receptorem TLR-4 vede prostřednictvím transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B k vyšší produkci cytokinů TSLP (thymický stromální lymfopoetin), GM-CSF (růstový faktor pro granulocyty a makrofágy), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-25 a IL-33. Práce některých autorů naznačují, že exprese chemokinů zodpovědných za atrakci makrofágů a lymfocytů do míst kontaktu s inhalačním antigenem je nezávislá na molekule MyD88 a části patogenů mohou být rozpoznávány nitrobuněčnými receptory NOD1, v případě expozice *Saccharopolyspora rectivirgula* jsou takto rozeznávány složky buněčné stěny. Po vcestování neutrofilů, aktivaci makrofágů a dendritických buněk putují do místa postižení i pomocné Th lymfocyty, jejichž úloha je zmíněna níže.

S antigenem přichází do kontaktu nejen hematopoetické buňky, ale i epitel. Buňky alveolárního epitelu mohou po kontaktu s antigeny produkovat IL-25 a TSLP. Tyto cytokiny působí mimo jiné i na bazofily, které produkují další IL-4 a ovlivňují tak průběh odpovědi adaptivní imunity.

Další buňky nespecifické imunity, které se podílejí při rozvoji EAA jsou NK-T lymfocyty. Velká část z nich exprimuje na svém povrchu CD16 a CD56 a zejména cytolytická aktivita těchto buněk včetně množství perforinu a granzymu B koreluje pozitivně s expresí CD56. CD8+CD56+ buňky jsou silnými induktory Th1 buněčné odpovědi- pokud jsou stimulovány IL-12, tvoří více interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) než CD8+ T lymfocyty (22).

Zvláštní skupinu NK (natural killers) buněk tvoří tzv. invariantní iNK-T lymfocyty, charakteristicky exprimující znaky CD8, CD56 a CD161. Tyto buňky na sobě nesou velké množství receptorů pro IL-12 a je-li produkován např. antigen prezentujícími buňkami (dendritickými buňkami), jsou iNK-T lymfocyty takto rychle aktivovány. Možná cesta aktivace tohoto buněčného subtypu zahrnuje i přímou cestu prostřednictvím TLR-4 (23).

Odpověď nespecifické a specifické imunity na inhalační antigen spojují i dendritické buňky, které exprimují řadu TLR. Vazba antigenu na TLR dendritických buněk a/nebo dalších ze skupiny antigen prezentujících buněk – alveolárních makrofágů- vede k ovlivnění exprese chemokinových receptorů a adhezivních molekul a k migraci dendritických buněk do lymfatických uzlin. Zde se vyvíjejí antigen specifické CD8+ T lymfocyty, Th-1 lymfocyty a mohou se tvořit i specifické IgG schopné vázat se na makrofágy. Antigeny parazitů a hub vážící se na TLR dendritických buněk indukují také tvorbu IL-4. Rozpoznání PAMP receptorem TLR9 vede k produkci cytokinů IL-23 a IL-17, které jsou následně důležité pro vznik granulomů. Podle některých prací se dokonce ukazuje, že tíže postižení koreluje spíše s aktivací Th17 buněčné odpovědi a hodnoty IL-17 odpovídají dobře jak neutrofilnímu zánětu, tak následně míře fibrotického postižení. Zdrojem IL-17 mohou být mimo jiné také  $\gamma\delta$  T lymfocyty (24).

Pokud vede kontakt s inhalačním antigenem převážně k tvorbě IL-12, následuje po pohlcení antigenu makrofágem rozvoj Th1 imunitní odpovědi – makrofág prezentuje na svém povrchu složky antigenu společně s MHC glykoproteiny II. třídy a v tomto kontextu je antigen rozpoznáván TCR receptorem Th prekurzorů. Pokud k tomuto kontaktu dochází v prostředí bohatém na IL-12, dojde k pomnožení klonu s příslušnou specifitou a k diferenciaci na efektorové Th1 buňky. Efektorové Th1 buňky produkují interferon (IFN)- $\gamma$ , který stimuluje přeměnu makrofágů v aktivovanou formu. Aktivované makrofágy produkují další cytokiny včetně IL-1 a TNF- $\alpha$ , které stimulují

lokální zánět a vznik pro některé formy typických nekaseifikujících vágně formovaných granuloma (25).

Pokud se ale prekurzorová Th buňka setká s komplexem MHC gp II – antigenní peptid na povrchu antigen prezentující buňky (obvykle dendritická buňka) za přítomnosti IL-4, diferencují se Th lymfocyty v tzv. Th2 (26). Th2 lymfocyty jsou jednak dalším zdrojem IL-4 a IL-5, IL-33 (ale i dalších cytokinů), jednak poskytují různými způsoby pomoc B lymfocytům. Tím důležitějším je specifická přímá pomoc B lymfocytů, které prostřednictvím BCR receptoru rozeznaly stejný antigen, který pohltily dendritické buňky a který vedl k vzniku klonu Th2 lymfocytů. Cytokinové prostředí ovlivňuje nejen to, jaký typ buněčné odpovědi bude následovat po kontaktu s antigenem, ale svým způsobem i další průběh specifické humorální odpovědi, konkrétně izotypový přesmyk. Ligandem výše zmíněného IL-33 je regulační molekula Suppression of tumorigenicity 2 (ST2L) konstitučně exprimovaná bazofily a eozinofily, po aktivaci se objevuje i na monocytech a Th2 lymfocytech. Pokud se IL-33 váže na ST2L na Th2 lymfocytech, prostřednictvím aktivace NF- $\kappa$ B a MAPK stoupá tvorba IL-4 a IL-13 těmito buňkami. Oba tyto cytokiny výrazně ovlivňují průběh reakcí adaptivní imunity.

Tvoří se řada specifických IgG a ty se taktéž podílejí na patogenezi onemocnění několika způsoby. Jednak představují volná vazebná místa pro antigen a po vazbě antigenu na protilátku dochází i k vazbě komplementu, zejména složky C5a. Stoupá produkce TNF- $\alpha$ , intercelulární adhezivní molekuly 1 (ICAM-1), IL-1 $\beta$  a E-selektinů, což zvyšuje adhezi neutrofilů ke stěně cév a zvyšuje jejich diapedezi do tkáně (27, 28). Další možnost představuje vazba specifických IgG na alveolární makrofágy, které jsou tímto způsobem aktivovány po kontaktu s antigenem a produkují řadu působků potenciálně se podílejících na systémové odpovědi – kyslíkové radikály, TNF- $\alpha$  a IL-12.

V patogenezi EAA se uplatňují dále Th17 lymfocyty, charakteristické produkcí IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNF- $\alpha$ , IL-6 a GM-CSF. Neprodukují ale ani IL-4 ani IFN- $\gamma$ . IL-17 je prozánětlivý cytokin, který aktivuje a atrahuje neutrofilů do místa poškození. IL-17A může aktivovat subepitelové myofibroblasty v plicích a může se podílet kromě zánětlivé odpovědi i na fibrogenezi. Další mechanismus, kterým může IL-17 přispívat k fibrogenezi, zahrnuje působení transformujícího růstového faktoru (TGF- $\beta$ ). Některé práce ukazují, že naivní Th lymfocyty se diferencují na Th17 subtyp

působením transkripčního faktoru ROR $\gamma$ t v přítomnosti IL-6 a TGF- $\beta$ . Minimálně pro opakovanou expozici *S. rectivirgula* platí, že TGF- $\beta$  může vest k diferenciaci CD4+ T lymfocytů na Th17 a k vystupňované fibrogenezi.

Část Th17 lymfocytů exprimuje také IL-22. IL-22 indukuje expresi antimikrobiálních peptidů keratinocyty a indukuje expresi prozánětlivých cytokinů. Oba cytokiny (IL-17 a IL-22) jsou důležité jak pro slizniční imunitu, tak mohou usnadňovat vznik fibrózy. Aktivují různé druhy buněk a usnadňují jejich přístup do plic po kontaktu s inhalačním antigenem.

Důležitou úlohu hrají T regulační lymfocyty- Treg, které udržují rovnováhu mezi tkáňovým poškozením a ochrannou úlohou imunitního systému. Treg jsou charakterizovány extracelulární expresí CD25,  $\alpha$  podjednotky vysoce afinitního receptoru pro IL-2 (IL-2R $\alpha$ ) a transkripčního faktoru FoxP3. Práce některých autorů poukazují na to, že u nemocných s EAA Treg nevykonávají své obvyklé imunosupresivní funkce. Pokud je organismus kontinuálně vystaven nízké dávce inhalačního antigenu, která vede k rozvoji mírné zánětlivé reakce, může dojít ke změně fenotypu antigen prezentujících dendritických buněk (29). Postupně může dojít k poklesu exprese MHC gp II a kostimulačních molekul, vznikají tolerogenní dendritické buňky produkující IL-10, TGF- $\beta$  a Treg. U pacientů s manifestní EAA může být funkce Treg poškozena- lymfocyty proliferují, hromadí se v plíci a udržují prozánětlivé prostředí. Imunosupresivní funkce Treg je snižována například působením TNF- $\alpha$ . Vyšší hladiny tohoto cytokinu byly detekovány i u nemocných s EAA. Expese TNF- $\alpha$  je ovlivňována IL-17, navíc v prozánětlivém prostředí může docházet k diferenciaci Treg v Th17 produkujících další IL-17.

V etiopatogenezi EAA se uplatňuje tedy řada cytokinů, chemokinů a jejich receptorů. Protože se jedná o působky relativně dobře stanovitelné v biologickém materiálu, zaměřili jsme se na jejich úlohu v rozvoji onemocnění a potenciální využití jako prognostických faktorů nebo terapeutických cílů.

### *3.7.1 Interleukin 4 a receptor pro interleukin 4*

Interleukin 4 (IL-4) je produkován aktivovanými T lymfocyty, žírnými buňkami, bazofily a eozinofily. Má obdobný funkční efekt i receptory s IL-13. Uplatňuje se především v regulaci apoptózy, proliferace, a exprese genů v různých buněčných

typech včetně lymfocytů, makrofágů, fibroblastů, epiteliálních buněk a buněk endotelu. Hraje též klíčovou úlohu při alternativní aktivaci makrofágů. Existuje několik typů receptoru pro IL-4: typ I vzniká dimerizací IL-4R $\alpha$  s IL-4R $\gamma$ c, typ II IL-4R $\alpha$  s IL-13R $\alpha$ 1. Ligandy mohou být vázány též solubilní formou receptoru- sIL-4R $\alpha$ . Vysokou afinitu k IL-4 mají zejména receptory exprimované na hematopoetických buňkách, jedná se o receptory I, které váží pouze IL-4. Receptor II je exprimován buňkami epitelu, hladké svaloviny, na monocytech, makrofázích a B lymfocytech a kromě IL-4 může vázat také IL-13 (30).

Interleukin 4 indukuje mimo jiné i expresi manózoového receptoru CD206 na makrofázích a indukuje vznik M2 makrofágů, zodpovídajících především za obranu proti parazitům. M2 makrofágy po expozici virům produkují další IL-4 a IL-13, CCL-18 (PARC, pulmonary and activation regulated chemokine), DC-CK1 (dendritic cell chemokine 1) a AMAC 1 (alternative macrophage activation-associated CC-chemokine 1). IL-4 může tedy zasahovat do patogeneze zánětu i fibrózy a to jak svým přímým působením tak prostřednictvím CCL-18, který má přímý profibrotický efekt (31). Důležitým poznatkem z hlediska patogeneze fibrotizujících intersticiálních plicních procesů je možnost indukce vzniku M2 makrofágů v souvislosti s infekčním onemocněním.

Informací o úloze IL-4 v patogenezi EAA je poskrovnu, navíc různí autoři v tomto ohledu dospěli k různým výsledkům (32-34). Protože při vývoji jiného závažného fibrotizujícího procesu- idiopatické plicní fibrózy- se tento cytokine uplatňuje tak významně, že jsou protilátky proti IL-4 testovány v rámci klinických studií, zaměřili jsme se na jeho podíl na vývoji chronické EAA. U nemocných s EAA jsme v porovnání s pacienty se sarkoidózou prokázali vyšší koncentrace IL-4R $\alpha$  v BALTe, tak i pozitivní korelaci mezi koncentrací receptoru a rozsahem intersticiálního plicního postižení dokumentované vyšším HRCT intersticiálním skóre (35).

### *3.7.2 Proteázami aktivovaný receptor 2 (PAR-2)*

PAR patří do rodiny receptorů sdružených s G proteiny. Nejsou ale aktivovány vazbou ligandu, nýbrž proteolytickým štěpením a až následnou vazbou vzniklého produktu na receptor. Proteázy aktivující tento typ receptoru zahrnují trombin, matrixové metaloproteinázy, faktor VII, faktor Xa, trypsin a tryptázu. Aktivace receptoru PAR-



2 je spojená s rozvojem akutního zánětu, ale i fibroproliferace, migrace a diferenciaci fibroblastů v myofibroblasty. PAR-2 ovlivňuje mimo jiné i aktivitu PAR-1 a prostřednictvím tohoto receptoru zasahuje do mechanismů fibrogenese. V případě bleomycinového modelu plicní fibrózy je uvolňován agonista PAR-1, který aktivuje PAR-1 na fibroblastech. Následně dochází k transaktivaci PAR-2 nebo k uvolňování PAR-2 agonistů. Tyto děje se mohou podílet na migraci a diferenciaci fibroblastů a následným ukládáním extracelulární matrix. PAR-1 agonisté pravděpodobně aktivují heterodiméry PAR-1/PAR-2 a indukují profibrotické procesy.

Práce zabývající se úlohou PAR-2 v patogenezi EAA donedávna chyběly. Imunohistochemicky byl PAR-2 v tkáni nemocných s EAA prokázán, jeho lokalizace je vázána především na membránu epitelálních buněk a fibroblastů, může být lokalizován i na makrofázích (zejména po stimulaci GM-CSF) (36). V rámci našich výzkumů byla prokázána přítomnost tohoto jinak na membránu vázaného receptoru i v BALTe a to zejména u nemocných s EAA (37). Je několik možných vysvětlení, proč je možné detekovat jinak membránově vázaný receptor v extracelulárním prostoru. Například v enterocytech byla prokázána existence intracelulárního poolu PAR-2, který se v případě poškození buňky může dostávat extracelulárně (38, 39). Další hypotetickou možností je existence solubilního PAR-2 nebo existence analogů receptoru s možností zkřížené reaktivity s protilátkou proti PAR-2. Příčina přítomnosti tohoto receptoru v solubilní formě v BALTe nebyla zatím objasněna.

### *3.7.3 Tumor nekrotizující faktor- $\alpha$*

Tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) je produkován makrofágy, T a B lymfocyty, granulocyty, buňkami hladké svaloviny a eozinofily, fibroblasty a endoteliálními buňkami. Je uvolňován zejména po stimulaci IL-1, bakteriálními endotoxiny, TNF, růstovým faktorem odvozeným od destiček (PDGF) a viry. Je produkován nejprve jako transmembránový protein, který je odštěpen působením TNF- $\alpha$  konvertujícího enzymu (TACE). Vzniká rozpustný trimér s TNF- $\alpha$ , který při nízkých koncentracích rychle disociuje a ztrácí biologickou aktivitu.

Biologický efekt TNF- $\alpha$  je zajištěn vazbou na receptor I (TNF-R1) a II (TNF-R2), které lze nalézt prakticky na všech buňkách s výjimkou erytrocytů. Pokud se TNF- $\alpha$  naváže na RI, může dojít buď k aktivaci apoptózy (TNF receptor associated death

domain TRADD, Fas-associated death domain FADD) nebo cest zánětu (TNF receptor associated factor 2 TRAF-2, receptor-interacting protein, aktivace NF- $\kappa$ B). TNF-RII signalizuje pouze prozánětlivou cestou TRAF-2). TNF-RII je nacházen obvykle na imunitních buňkách a je aktivován membránově vázaným TNF, nikoliv solubilním trimérem.

TNF- $\alpha$  může spustit v buňkách řadu pochodů, které vedou k produkci kyslíkových radikálů, rozvoji oxidačního stresu, aktivací transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B a AP-1 a následně k produkci prozánětlivých molekul včetně VCAM-1 (vascular cell adhesive molecule-1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) nebo RAGE (receptor for advanced glycosylation endproducts) (40). Podílí se i v procesu angiogeneze-angiogenní působení IL-4/IL-13 a antiangiogenní účinky INF- $\gamma$  jsou zprostředkovány právě TNF- $\alpha$  a regulací autokrinní syntézy CXCR2 a CXCR3 chemokinů (41). TNF- $\alpha$  se podílí jak v regeneraci tkání, tak při jejich destrukci. Ovlivňuje také odpověď na intracelulární patogeny (43).

U pacientů s EAA byly prokázány genové polymorfismy TNF- $\alpha$  specifické ve zkoumaných populacích pro toto onemocnění (44, 17). Další práce ukázaly vyšší spontánní i stimulovanou produkci TNF- $\alpha$  alveolárními makrofágy (25) a vyšší expresi receptorů pro TNF- $\alpha$  na alveolárních makrofázích a lymfocytech získaných BAL (v porovnání s nemocnými s IPF). Možné vysvětlení přináší práce Hwanga et al (29), která ukazuje, že vyšší exprese TNFR I (asociován s aktivací proapoptotických drah) je detekovatelná u nemocných s EAA i na nehematopoetických buňkách získaných laváží. Apoptóza těchto buněk je spojena s následnou maturací dendritických buněk, s vyšší produkcí chemokinů MIP-1 (macrophage inflammatory protein 1) a MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) a s influxem imunitních buněk do plic. Naše práce ukazuje na rozdílnou úlohu TNF- $\alpha$  u různých intersticiálních plicních procesů, zejména sarkoidózy, u které jsme prokázali signifikantně nižší koncentrace TNF- $\alpha$  v BALTe v porovnání s EAA (37).

#### 3.7.4 Transformující růstový faktor- $\beta$

Transformující růstový faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) se vyskytuje v několika isoformách, z nichž u lidí se nejčastěji jedná o isoformu TGF- $\beta$ 1 produkovanou téměř všemi buňkami. V nejvyšší míře jej tvoří destičky, makrofágy, monocyty, lymfocyty, fibroblasty,

epiteliální buňky a dendritické buňky. Z těchto buněk je uvolňován ve formě inaktivního prekurzoru složeného z TGF- $\beta$ 1 a propeptidu LAP (Latency Associated Protein). V této podobě může být TGF “skladován” buď v granulích uvnitř buňky nebo na jejím povrchu. Prostřednictvím LAP je vázán na LTBP (latent TGF $\beta$  binding protein), který je mimo jiné součástí extracelulární matrix a jeho přítomnost je nezbytná pro syntézu TGF- $\beta$ . Trombospondin-1 může měnit konformaci LTBP, která vede k uvolnění vazby na LAP. Poločas aktivní formy je několik minut, proto bývá obtížné jej stanovovat jak v tkáni, tak v krvi nebo jiných biologických materiálech. TGF- $\beta$ 1 se váže na receptory TGF- $\beta$ 1RI-III. Působení TGF- $\beta$  tedy závisí na biologické dostupnosti protein, distribuci receptorů ve tkáni a typu cílové buňky. V kontextu s působením dalších molekul má TGF- $\beta$  v organismu různé úlohy – podílí se na embryogenezi, kontroluje růst a diferenciaci buněk, indukuje fibrózu a hojení tkání, má imunosupresivní účinky, účastní se procesů angiogeneze, může se podílet při nádorovém bujení a je důležitou molekulou zánětu. (44).

Navzdory tomu, že TGF- $\beta$  se podílí na produkci kolagenu v plicích nemocných s EAA (45), pravděpodobně není specifickým markerem fibrogeneze, úlohu hraje i při vzniku granulomatózních procesů (46). Přestože naše práce prokázaly pravděpodobný podíl TGF- $\beta$  v patogenezi EAA (37), jeho konkrétní úlohy a působení v rámci tohoto onemocnění nejsou známy.

### *3.7.5 Interleukin-8*

Protože interleukin-8 (IL-8) působí chemotakticky především na neutrofilů, je řazen do skupiny chemokinů, s ohledem na jeho složení konkrétně do skupiny ELR+ (obsahuje motiv Glu-Leu-Arg) CXC (podle aminokyselinových zbytků vložených mezi cysteiny) chemokinů. Je produkován monocyty, T-lymfocyty, neutrofilů, NK buňkami, ale také endoteliemi, fibroblasty a buňkami epitelu. Produkce IL-8 není konstitutivní, indukuje ji IL-1 a TNF- $\alpha$ , dále bakterie, viry, bakteriální lipopolysacharid a produkty virů, ale i hypoxie. Váže se na receptory CXCR1 a CXCR2, ale není jediným chemokinem, který prostřednictvím těchto receptorů spouští signalizační kaskádu. Receptor CXCR1 sdílí s CXCL6 a receptor CXCR2 s CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 a CXCL7.

Aktivity tohoto chemokinu jsou především prozánětlivé a angiogenní. IL-8 je hojně internalizován endoteliemi, transcytózou přenesen na lumenální stranu endotelie a je prezentován neutrofilům. V důsledku působení na neutrofilů se mění spektrum integrinů, selektinů a jiných adhezivních molekul na povrchu neutrofilu a neutrofilů adherují k proteinům extracelulární matrix. V rámci neutrofilů aktivuje IL-8 degranulaci a respirační vzplanutí. Indukuje dále schopnost bazofilů adherovat k endotelu a ovlivňuje T-lymfocyty. Společně s dalšími chemokiny stimuluje migraci endotelií, usnadňuje ztrátu adhezivitu fibroblastů a ovlivňuje jejich migraci (47).

Vyšší hladiny IL-8 v BALTe byly popsány jak u nemocných s IPF, tak u pacientů s EAA (48). Vyšší hladiny IL-8 mohou korelovat s pokračující expozicí u nemocných s EAA (49).

#### *3.7.6 Epiteliální neutrofilů aktivující protein-78*

Epiteliální neutrofilů aktivující protein 78 (ENA-78, CXCL-5) patří též do rodiny ELR+ CXC chemokinů. Stejně jako IL-8 působí především na neutrofilů, má i angiogenní vlastnosti. Zdrojem ENA-78 jsou alveolární epiteliální buňky, monocyty, endotelie, fibroblasty a mezotelie (50) a receptorem je CXCR2.

#### *3.7.7 CXCR2*

Chemokinový receptor CXCR2 má několik ligandů – CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7 a 8, CXCL8 je tím nejdůležitějším. Receptor exprimují leukocyty, nejvíce z nich neutrofilů, ale i buňky endotelu a epitel. Podílí se jednak na aktivaci, migraci a respiračním vzplanutí neutrofilů, ale také na angiogenezi nebo při rozvoji nádorového bujení. Po vazbě ligandu k receptoru CXCR2 dochází k disociaci receptoru na  $\alpha$  GTP (guanosintrifosfát) podjednotku a  $\beta\gamma$  GTP podjednotku.

Alfa podjednotka inhibuje především adenylyl cyklázu, což vede k poklesu intracelulární koncentrace cAMP (adenosinmonofosfátu) a poklesu aktivity cAMP dependetních kináz. Aktivuje ale i GTPázy a Ras, což vede dále k aktivaci fosfatidilinositol-3-kinázy (PI3K).  $\beta\gamma$  podjednotka aktivuje také PI3K a fosfolipázy PLC $\beta$ 2 a PLC $\beta$ 3, prostřednictvím kterých jsou aktivovány cytotoxické efektorové funkce neutrofilů. PI3K spouští signalizaci ovlivňující migraci neutrofilů a oxidační

vzplanutí. Mechanismem specifickým pro CXCR2 je napojení receptoru na dráhy PLC  $\beta$ 2 prostřednictvím scaffoldového proteinu (konkrétně Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor 1 NHERF1), což vede k ovlivnění chemotaxe a migrace neutrofilů.

Přestože je CXCR2 exprimován i lymfocyty, jeho exprese těmito buňkami nekoreluje s radiologickým obrazem ani rozsahem postižení u nemocných s EAA (51). Navzdory tomu může být tento receptor zajímavým v kontextu jednak s neutrofilní alveolitidou pozorovanou v počátcích onemocnění a to zejména u pacientů, kteří vyvinou obraz ARDS, tak ve fázi fibrotické s ohledem na možnost ovlivnění angiogeneze.

### 3.7.8 Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF)

Vaskulární endoteliální růstové faktory tvoří celou rodinu cytokinů – patří do ní VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a PlGF. VEGF-A se podílí především na angiogenezi. Vyskytuje se v řadě isoform s odlišnými biochemickými vlastnostmi a různým efektem na angiogenezi. Za fyziologických podmínek jsou různé isoformy VEGF různě rozmístěny v extracelulární matrix a působí na ně mimo vazeb na proteoglykany i řada inhibičních faktorů, například solubilní receptor pro VEGF (sVEGF-R). K uvolňování VEGF z těchto vazeb může docházet např. účinkem matrixových metaloproteináz, které mohou štěpit extracelulární matrix, samotný VEGF nebo jeho inhibitory a tak regulovat účinek cytokinu. Exprese VEGF se mezi jednotlivými tkáněmi liší a odráží potřebu angiogeneze v jednotlivých tkáních. Receptory VEGF (VEGFR-1, 2, 3) jsou exprimovány většinou buněk s výjimkou VEGFR-3, který se nachází především na endotelu lymfatických cév.

Exprese VEGF v plicní tkáni je v rámci lidského organismu jedna z nejvyšších. VEGF a jeho receptory byly identifikovány v alveolárních epiteliálních buňkách, buňkách epitelu dýchacích cest, buňkách mesenchymu, hladkých buňkách dýchacích cest a cév, v makrofázích a v neutrofilech. Koncentrace VEGF v alveolu jsou cca 500x vyšší než v plazmě (52).

Práce Navarra et al. (53) ukázala, že zatímco koncentrace VEGF v krvi nemocných s EAA je vyšší než u zdravých dobrovolníků, v BALTe je signifikantně nižší (54). V plicní tkáni nemocných s EAA je VEGF exprimován především epiteliálními buňkami, buňkami hladké svaloviny a intersticiálními makrofágy. Receptory pro

VEGF byly prokázány na endotelu středně velkých a malých cév. Naše výzkumy ukazují, že efekt VEGF může být skutečně spíše proangiogenní než profibrotický, a to navzdory tomu, že jeho koncentrace v BALTe nemocných s IPF se neliší významně od koncentrací u nemocných s EAA. Patrně by mohl tento cytokin hrát úlohu spíše v časných fázích intersticiálních plicních procesů (29).

To, že zkoumání úlohy VEGF v patogenezi intersticiálních plicních procesů včetně EAA je klinicky signifikantní ukazuje např. práce Mangoniho et al (55), podle které inhibice VEGF (a v současné době se inhibitory tohoto cytokinu podávají jak v léčbě bronchogenního karcinomu, tak prakticky i v léčbě IPF-nintedanib) kombinovaná se zevním ozářením významně zvyšuje riziko fibrotického plicního postižení.

### *3.7.9 IP-10 (CXCL10), ITAC (CXCL11)*

CXCL 10 a 11 patří do rodiny ELR- CXC chemokinů, jejichž exprese je stimulována různou mírou interferony. Jsou ligandy receptoru CXCR3 a mohou působit jak redundantně, synergicky, tak i antagonisticky. CXCL11 má k receptoru nejvyšší afinitu a již ve velmi nízkých koncentracích indukuje mobilizaci vápníku a chemotaxi. Váží se i na další chemokinové receptory a také na glykosaminoglykany na povrchu buněk nebo v extracelulární matrix, např. na proteoglykany. Ve vyšších koncentracích působí jako přirození antagonisté receptoru CCR3 a exprese receptoru CCR3 může tedy ovlivnit i funkční efekt těchto ligandů. Pokud jeden z ligandů CXCR3 chybí, nemůže být beze zbytku nahrazen ostatními ligandy.

Důležitou úlohu mají CXCL10 a 11 v rozvoji Th1 buněčné odpovědi a v angiogenezi, obojí mechanismy se mohou uplatnit i v patogenezi EAA. Aktivace přirozených imunitních mechanismů zahrnuje i aktivaci TLR a RNA helikáz a vede k produkci interferonů  $\alpha$  a  $\beta$ . Tyto interferony stimulují produkci CXCL10 endotelem a residenčními buňkami poškozené tkáně. CXCL10 atrahuje NK buňky a CD4+ T lymfocyty, které po stimulaci antigenem produkují interferon  $\gamma$ . Interferon  $\gamma$  působí na residenční dendritické buňky a tkáňové makrofágy, které produkují CXCL10 (a také CXCL9). Oba chemokiny působí chemotakticky na CD8+ cytotoxické lymfocyty. Ty produkují další interferon  $\gamma$ , stimulují residenční buňky k další sekreci CXCL 9 a 10 a amplifikují tak Th1 reakci.

Produkce CXCL11 je indukována v nejvyšší míře právě interferonem  $\gamma$  a interferonem  $\beta$ , slaběji interferonem  $\alpha$  a TNF- $\alpha$ . Po stimulaci interferonem se k promotoru genu pro CXCL11 váže heterodimer STAT1-STAT3, p56 a interferon regulační faktor I. Důležitá je mimo jiné synergie TNF- $\alpha$  a interferonu  $\gamma$  na indukci transkripce CXCL11.

Produkce CXCL10 je ovlivňována především interferonem  $\gamma$ , slaběji interferony  $\alpha$  a  $\beta$  a nejméně TNF- $\alpha$ . Tento chemokin má vliv na endotelie a fibroblasty, které neexprimují CXCR3 – děje se tak prostřednictvím vazby CXCL10 na glykosaminoglykany (56).

Dalo by se předpokládat, že produkce CXCL10 a CXCL11 bude odrážet Th1 imunitní odpověď, která je u nemocných s EAA spojena s tvorbou vágně formovaných granulomů a mlhovitých opacit v (sub) akutních fázích onemocnění (48). Rozsah tohoto typu postižení lze pak kvantifikovat prostřednictvím HRCT hrudníku (viz níže). Koncentrace chemokinů CXCL10 a CXCL11 v BALTe u nemocných s EAA ale s rozsahem a typem postižení detekovatelným prostřednictvím HRCT nekoreluje, pravděpodobně pro výše zmíněnou účast chemokinů v mnoha mechanismech plicního postižení (57). Bylo však prokázáno, že pacienti s plicí chovatelů ptáků a radiologickým obrazem obvyklé intersticiální pneumonie (UIP) mají v séru signifikantně nižší koncentrace CXCL10 a ve tkáni signifikantně nižší expresi receptoru CXCR3 než pacienti s radiologickým obrazem celulární nespecifické intersticiální pneumonie (NSIP)/ organizující se pneumonie (OP) (58).

### *3.7.10 CXCR3*

Prostřednictvím receptoru CXCR3 signalizuje řada chemokinů – jsou to především ITAC (CXCL11), IP-10 (CXCL10) a MIG (monokine induced by gamma interferon, CXCL9), dále i např. PF-4 (platelet factor-4, CXCL4). Patří mezi klasické transmembránové receptory spojené s G proteinem a po stimulaci je exprimován především na aktivovaných T lymfocytech- především CD4<sup>+</sup> T lymfocytech, efektorových CD8<sup>+</sup> T lymfocytech, ale i na NK buňkách. Na neaktivovaných T lymfocytech, B lymfocytech, monocytech a granulocytech je exprimován též, ale slabě. Receptor CXCR3 existuje v několika variantách, které jak se zdá, mají různý biologický efekt. CXCR3A je exprimován především na epiteliích a potencuje proliferaci buněk. CXCR3B bývá nacházen na fibroblastech, endoteliích a epitelu a

inhibuje migraci a apoptózu buněk. Varianta CXCR3-alt se vyskytuje v koexpresi s CXCR3A a po vazbě CXCL11 stimuluje migraci buněk. Ligand CXCL4 se může vázat jen na variantu CXCR3B (59). Lokalizace variant receptoru má mimo jiné vliv i na angiogenezi. Buňky hladké svaloviny cév exprimují převážně CXCR3A, zatímco endotel CXCR3B. Chemokiny CXCL10 a CXCL11 tedy mohou vést jak k proliferaci buněk hladké svaloviny cév, tak k potlačení proliferace endotelu.

Šedesát až devadesát procent paměťových T lymfocytů a 40 % paměťových CD4+ T lymfocytů exprimuje receptor CXCR3, stejně tak je nacházen na NK buňkách a NK T buňkách a patrně hraje důležitou úlohu v jejich přesunu do místa zánětu a poranění. Společným transkripčním faktorem Th1 buněk a cytotoxických T lymfocytů je T bet, který přímo transaktivuje i CXCR3, a amplifikuje Th1 odpověď.

Úlohu CXCR3 v patogenezi EAA prokázala např. práce Nance S. et al. – definuje CXCL10 a CXCL11 jako chemokiny atrahující CXCR3+ CD4+ T lymfocyty do plicní tkáně, kde se podílejí na tvorbě granulomů (60).

### *3.7.11 Eotaxin a CCR3*

Eotaxin je konstitučně produkován alveolárními makrofágy a bronchiálními epiteliemi. Inducibilní produkce byla zaznamenána u alveolárních makrofágů a alveolárních epiteliálních buněk I a II typu. Působí prostřednictvím receptoru CCR3 (společně s chemokiny MCP-2, 3, 4 a RANTES), který je exprimován eozinofily, bazofily, Th2 lymfocyty, alveolárními makrofágy, endotelem a neutrofilů stimulovanými interferonem  $\gamma$ . Eotaxin se tak podílí nejen na influxu eozinofilů, ale i neutrofilů. Působí i angiogenně. Na alveolární makrofágy má nejspíše nechemotaktický efekt, protože ani pokud exprimují CCR3, eotaxin na ně chemotakticky nepůsobí. Zdá se, že eotaxin má in vivo obdobné účinky jako IL-4 a IL-13 a opačný efekt než IL-8 (61). Hladiny eotaxinu stoupají s věkem. V BALTe nemocných s EAA jsou hladiny eotaxinu velmi nízké (54). Navzdory tomu exprese CCR3 na CD4+ T lymfocytech BALTe pozitivně koreluje u nemocných s EAA s rozsahem fibrotického poškození detekovaným prostřednictvím HRCT intersticiálního skóre (51).



### 3.7.12 *Wingless/integrase-1 (Wnt-1, Wnt-3)*

Signalizační kaskáda Wingless (Wnt) hraje důležitou úlohu v embryogenezi, ale také v regeneraci buněčného poškození. Dobře charakterizovány jsou tři signalizační dráhy: kanonická ( $\beta$ -katenin dependentní) a dvě nekanonické. Wnt-1 a Wnt-3 jsou členy rodiny Wnt ligandů, z níž každý hraje v průběhu vývoje a reparačních pochodů jinou úlohu (62). Bylo prokázáno, že Wnt-1 se podílí v patogenezi IPF indukcí exprese Wnt-1 inducibilního signalizačního proteinu (WISP-1), který je výrazně upregulován v plicích nemocných s IPF (63). Úlohu hraje hlavně v rámci fibrogenese, u nemocných s EAA nicméně studován v minulosti nikdy nebyl, stejně tak jako Wnt-3, který vykazuje významný stupeň homologie s Wnt-5, a podílí se též na regulaci fibrogenese (64).

### 3.7.13 *Matrixová metaloproteináza-7 (MMP-7)*

MMP patří do skupiny enzymů, které se podílejí na štěpení extracelulární matrix, ale i dalších substancí. MMP-7 je exprimována alveolárním epitelem, fibroblasty a mononukleárními fagocyty a jejím substrátem jsou proteoglykany, laminin, elastin a kolagen IV. typu (65). MMP-7 byla studována především u nemocných s IPF (66), mimo jiné jako prognostický marker, protože především sérové koncentrace MMP-7 u nemocných s IPF korelovaly pozitivně s nedobrou prognózou onemocnění (67). U pacientů s EAA práce zabývající se úlohou MMP-7 ve fibrogenese chybí.

## 3.8 Klinický obraz

EAA se může manifestovat různými způsoby, průběh onemocnění je velmi variabilní. Odpověď na otázku, proč se průběh onemocnění u jednotlivých pacientů může zásadně lišit, jednoznačně nebyla stanovena. Někteří autoři se domnívají, že klíč může ležet v charakteru expozice (masivní versus nízké dávky inhalačního antigenu), době trvání expozice, v charakteru antigenu a složení směsi inhalačních vyvolavatelů nebo v genetické predispozici. Možné průběhy EAA lépe než donedávna užívané označení akutní, subakutní a chronická charakterizuje pomyslná polopřímka, jejíž nejzazší hranici představuje radiologický a histopatologický obraz obvyklé intersticiální pneumonie (UIP). Na této polopřímce pak lze vytyčit některé pomyslné milníky.

Prvním z nich je nejspíše sensibilizace, charakterizovaná laboratorním průkazem specifických IgG nebo sérových precipitinů proti vyvolávajícímu antigenu u asymptomatických exponovaných osob.

Akutní EAA je pak nejčastěji popisována jako horečnaté onemocnění s chřipkovými příznaky, rozvíjející se 4-12 hod po expozici. Protože příznaky odeznívají za 24-48 hod, bývají obtíže často přičítány virovému respiračnímu infektu. Radiologicky bývá syndrom popisován jako prchavé infiltráty na skiagramu hrudníku, opacity mléčného skla (GGO, ground glass opacity) na HRCT hrudníku, pokud je provedeno, v BALTe dominují neutrofily. Onemocnění má sebelimitující průběh, je-li nemocný vyrazen z expozice, obtíže zcela mizí.

Zde se dostáváme k další nejasnosti v klinickém vývoji EAA, není totiž zřejmé, zda opakované ataky akutní EAA vedou k rozvoji subakutní či chronické EAA. Určitě to tak neplatí ani obráceně, nelze říci, že u všech nemocných s chronickou EAA lze v anamnéze vystopovat předchozí akutní ataky EAA.

Subakutní EAA bývá popisována méně alarmujícími příznaky, nemocní mohou být subfebrilní, mohou hubnout, kašlou, trápí je dušnost různého stupně. Definice této formy EAA je značně neostrá, a v posledních pracích je o existenci podjednotky subakutní EAA dokonce pochybováno (68). U nemocných s chronickou EAA mohou chybět systémové příznaky, zejména teploty nebo anamnestický údaj o zhoršení obtíží po expozici inhalačnímu antigenu, dominuje kašel a dušnost. Nemocní mohou mít krepitus a paličkové prsty, pokud je onemocnění pokročilé, mohou se rozvinout i známky cor pulmonale a pravostranného srdečního selhání.

Základem výše uvedené klasifikace byly klinické příznaky, se kterými nemocný přichází k lékaři. I když by podle doporučených postupů měla být v současné době opouštěna, práce vznikala v části v době, kdy byla výše uvedené diagnostická kritéria platná. Současná úroveň poznání vedla ke změně přístupu k hodnocení EAA – zohledněna by měla být především přítomnost známek fibrotizace plicní tkáně, protože představuje pro nemocného důležitý aspekt ve volbě terapie a paralelně je prognostickým ukazatelem (69, 70) (tabulka 2).

Z hlediska dalšího léčebného přístupu k nemocným je nezbytné specifikovat, zda onemocnění v čase progreduje (tabulka 3).

**Tabulka 2. Klasifikace exogenních alergických alveolitid**

	<b>Nefibrotická EAA</b>	<b>Fibrotická EAA</b>
Průběh onemocnění	Většinou reverzibilní  Možná úprava ad integrum  Příznaky se objevují v časové souvislosti s expozicí (často při expozici v zaměstnání)	Může být částečně reverzibilní  Riziko progresse
Radiologický obraz	Postižení horních a středních laloků  Dominují mlhovité opacity, centrilobulární noduly, mozaiková perfúze, air trapping, výjimečně konzolidace	Postižení horních a středních laloků, baze relativně ušetřeny  Dominuje fibróza, peribronchovaskulární fibróza, mozaiková perfúze, air trapping, mohou být centrilobulární noduly
Histopatologický obraz	Obraz zánětlivý/buněčný  Lymfoplasmocytární/mononukleární infiltráty  Peribronchiálně vázané lymfocytární infiltráty  Vágně formované granulomy  Mnohjaderné obrovské buňky  Nespecifická intersticiální pneumonie	Obraz fibrózy  Podobný obvyklé intersticiální pneumonii  Podobný nespecifické intersticiální pneumonii  Peribronchiální fibróza

		<p>Nespecifická a neklasifikovatelná fibróza</p> <p>Možná kombinace se zánětlivým postižením jako u akutní formy</p>
--	--	--

**Tabulka 3 Definice progredujícího fenotypu fibrotické EAA (70)**

<b>Hodnocené parametry</b>	<b>Fibrotická EAA</b>	
Relativní pokles FVC	O alespoň 10 % ve srovnání s předchozí hodnotou navzdory stávajícímu individualizovanému léčebnému postupu	O alespoň 5 % ve srovnání s předchozí hodnotou navzdory stávajícímu individualizovanému léčebnému postupu
Další nálezy	Nejsou potřeba	Současné zhoršování respiračních symptomů a/nebo zvětšování rozsahu fibrotického postižení plic
Interval hodnocení	Hodnoceno kdykoliv během posledních 24 měsíců před zahájením léčby antifibrotiky	Hodnoceno kdykoliv během posledních 24 měsíců před zahájením léčby antifibrotiky

Kromě anamnézy a fyzikálního vyšetření jsou u nemocných se suspektní EAA prováděny: imunologické vyšetření, HRCT hrudníku, vyšetření plicních funkcí, bronchoskopie s bronchoalveolární laváží, transbronchiální biopsie, kryobiopsie nebo chirurgická plicní biopsie s histologickým vyšetřením vzorku získané tkáně. Možné nálezy a jejich interpretace jsou popsány níže.

### *3.8.1 Anamnéza*

Anamnestické údaje je potřeba získat od nemocného podrobně a někdy i opakovaně. Údaj o výskytu EAA u ostatních rodinných příslušníků může svědčit jak o genetické predispozici, tak o stejném zdroji inhalačního antigenu, kterému jsou postižení jedinci exponováni. Ve starších pracích některých autorů bylo uváděno, že EAA se častěji vyskytuje u nekuřáků, novější práce zabývající se zejména farmářskou plící ukazují na obdobný výskyt EAA u nemocných s anamnézou nikotinismu i bez ní (71). Údaje o farmakologické léčbě pomohou spíše v diferenciální diagnostice, poléková EAA sice popsána v literatuře je, ale velice vzácně. Osobní anamnéza opět hraje roli spíše v diferenciální diagnostice. Nejdůležitějším střípkem v mozaice diagnostiky onemocnění je expozice inhalačnímu antigenu – při podezření na EAA je nutno vyptat se nemocného podrobně na pracovní anamnézu (kde pracuje, co v rámci svého zaměstnání přesně provádí, vhodné cíleně se ptát i na klimatizaci nebo zvlhčovače vzduchu na pracovišti), sociální anamnézu (kde bydlí, zda je dům suchý, zda se nevyskytla v bytě pacienta plíseň, jaké má lůžkoviny, zda nemá vířivku, saunu, klimatizaci, zvlhčovač vzduchu, co je v okolí bydliště – např. farma, obchod se zvířaty, chov ptactva, jaká zvířátka nemocný případně doma chová) a koničky pacienta (plavání, zahrada-skleníky, chov ptactva nebo jiných zvířat apod). O tom, že anamnéze pacienta je opravdu velice důležitá svědčí údaje řady autorů, kteří se zabývali revizí diagnózy u nemocných s anamnézou IPF – až u 20 % pacientů z této skupiny byla diagnóza revidována jako chronická EAA (3). Vhodné je i použití strukturovaných dotazníků, aby nebyly opominuty žádné potenciální zdroje expozice (68). Na druhé

straně až u 20 % nemocných, kde výsledky paraklinických vyšetření pro EAA svědčí, není ani po opakovaném odebrání anamnézy zdroj expozice zřejmý (72).

### 3.8.2 *Laboratorní vyšetření*

Laboratorní vyšetření, která se provádějí u nemocných s EAA, slouží k:

1. k vyloučení jiných příčin intersticiálního plicního postižení (systémové choroby pojiva, imunodeficity) v rámci diferenciální diagnostiky
2. ověření, že anamnesticky udávaná expozice je skutečně vyvolávajícím faktorem onemocnění
3. pomocné vyšetření, pokud zdroj expozice není znám

Bod jedna je základem vyšetření u všech nemocných s intersticiálním plicním postižením, bývá doporučeno screeningově vyšetřit autoprotilátky a alespoň základní parametry humorální imunity (hladiny sérových imunoglobulinů). Body dva a tři jsou specifické pro EAA, proto budou dále rozvedeny.

Ad 2: Do této skupiny testů lze zařadit expoziční testy (inhalační a kožní) a test blastické transformace lymfocytů po stimulaci suspektním vyvolávajícím antigenem. Expoziční testy nejsou v ČR používány, a to ani pokud se jedná u pacienta o podezření na nemoc z povolání. Kožní testy byly zkoušeny v zahraničí hlavně v letech 80. a 90., nyní lze sledovat příklon spíše k testům inhalačním (73, 74).

Ad 3: Původní metoda, která sloužila k detekci protilátkové odpovědi po opakované expozici inhalačnímu antigenu, byl průkaz tzv. precipitinů Ouchterlonyho metodou. Tato metoda je v několika modifikacích dále využívána i v současnosti – jedná se o radiální imunodifúzi. Často je používána ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), kterou lze detekovat protilátky ve třídě IgG, nověji využívají někteří autoři Western blot (75).

### 3.8.3 *HRCT hrudníku*

Počítačová tomografie hrudníku s vysokou rozlišovací schopností (HRCT) je jedním z pilířů vyšetření u nemocných s intersticiálními plicními procesy. Radiologickým obrazem u jednotlivých forem onemocnění bývá:

*Nefibrotické formy:* opacity mléčného skla, mosaiková perfúze, spíše v horních lalocích, centrilobulární a peribronchiální noduly do průměru 5 mm, organizující se pneumonie (OP). HRCT nález lze popsat jako typický pro EAA a kompatibilní s EAA (tabulka 4, obrázek 1, 2 - příloha).

**Tabulka 4 Počítačová tomografie s vysokou rozlišovací schopností u nemocných s nefibrotickou EAA**

HRCT obraz	Typický pro EAA	Kompatibilní s EAA
Popis	<ul style="list-style-type: none"> <li>-minimálně jedna HRCT abnormalita svědčící pro infiltraci parenchymu</li> <li>-minimálně jedna HRCT abnormalita svědčící pro postižení malých dýchacích cest</li> <li>-difuzní distribuce</li> </ul>	-nespecifické nálezy popsané u nemocných s EAA
Odpovídající radiologický obraz	<p><i>HRCT obraz infiltrace parenchymu:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-mlhovité opacity</li> <li>-mozaiková perfúze</li> </ul> <p><i>HRCT obraz postižení malých dýchacích cest:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-neostře ohraničené centrilobulární noduly</li> <li>-air trapping</li> </ul> <p><i>Distribuce změn:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-difuzní postižení</li> </ul>	<p><i>Postižení parenchymu:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-jemné mlhovité opacity</li> <li>-konzolidace</li> <li>-cysty</li> </ul> <p><i>Distribuce změn:</i></p>

		-difuzní, někdy s dominantním postižením dolních plicních polí nebo peribronchovaskulárně
--	--	---

*Fibrotické formy:* mohou perzistovat centrilobulární a peribronchiální noduly, ale není podmínkou. Retikulonodulace, voština, může být v kombinaci s air-trappingem a emfyzémem či s výše popsanými noduly. Voština a retikulonodulace mohou dominovat bazálně, obvykle ale bývají spíše v horních lalocích. HRCT nález lze popsat jako typický pro EAA, kompatibilní s EAA a nevylučující EAA (tabulka 5, obrázek 4, 5 -příloha).

**Tabulka 5 Počítačová tomografie s vysokou rozlišovací schopností u nemocných s fibrotickou EAA**

<b>HRCT obraz</b>	<b>Typický pro EAA</b>	<b>Kompatibilní s EAA</b>	<b>Nevylučující EAA</b>
Popis	-HRCT obraz plicní fibrózy s níže popsanou distribucí změn  -minimálně jeden nález svědčící pro postižení malých dýchacích cest	-lišší se buď charakter nebo distribuce změn od obrazu typického pro EAA  -přítomny změny svědčící pro postižení malých dýchacích cest	-jakýkoliv obraz, který není ani typický, ani kompatibilní s EAA
Odpovídající radiologický obraz	<i>HRCT obraz plicní fibrózy:</i>  -nepravidelné lineární opacity, distorze	<i>HRCT obraz:</i>  -UIP  -rozsáhlé mlhovité opacity a známky	<i>HRCT obraz:</i>  -UIP



	<p>architektoniky, trakční bronchiektázie, voština (není dominantní)</p> <p><i>Distribuce:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-náhodná</li> <li>-predominance ve středních polích</li> <li>-relativně ušetřeny bazální partie plic</li> </ul> <p><i>HRCT obraz při postižení malých dýchacích cest:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-neostře ohraničené centrilobulární noduly a/nebo mlhovité opacity</li> <li>-mozaiková perfúze, ostře ohraničené oblasti s mlhovitými opacitami, ostře ohraničené okrsky konzolidací a</li> </ul>	<p>mírného fibrotického postižení</p> <p><i>Distribuce:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-peribronchovaskulárně, subpleurálně</li> <li>-predominance v horních plicních polích</li> </ul> <p><i>HRCT obraz při postižení malých dýchacích cest:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-neostře ohraničené centrilobulární noduly</li> <li>-mozaiková perfúze, ostře ohraničené oblasti s mlhovitými opacitami, ostře ohraničené okrsky konzolidací a ostře ohraničené okrsky parenchymu obvyklého vzhledu a/nebo air trapping (lobulární distribuce)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pravděpodobná UIP</li> <li>-neurčený obraz pro UIP</li> <li>-fibrotická NSIP</li> <li>-organizující se pneumonie</li> <li>-neurčitá fibróza</li> </ul>
--	--	--	---

	ostře ohraničené okrsky parenchymu obvyklého vzhledu a/nebo air trapping (lobulární distribuce)		
--	--	--	--

UIP – obvyklá intersticiální pneumonie, NSIP – nespecifická intersticiální pneumonie

Výjimečnými u nemocných s EAA nejsou ani radiologické známky emfyzému. Bývá popisován především u nemocných s farmářskou plící a u pacientů s anamnézou nikotinismu, rozsah může být velmi variabilní.

Lze tedy říci, že u nemocných s EAA se můžeme setkat prakticky s jakýmkoliv radiologickým obrazem, kterým je popisován obraz intersticiálního plicního postižení na HRCT hrudníku – vidáme nespecifickou intersticiální pneumonii (NSIP), obvyklou intersticiální pneumonii (UIP), deskvamativní pneumonii (DIP), organizující se pneumonii (OP).

#### *3.8.4 Vyšetření plicních funkcí*

Funkční vyšetření slouží k posouzení míry postižení plicního parenchymu. V časných fázích onemocnění mohou být plicní funkce včetně transfer faktoru pro oxid uhelnatý (TLco) zcela v normě. Stejně tak u některých jedinců exponovaných organickým inhalačním antigenům může být patrná subklinická lymfocytární alveolitida, ale zcela normální plicní funkce. U nemocných s EAA se můžeme setkat s restrikcí, obstrukcí i kombinovanou ventilační poruchou. Obstrukční ventilační porucha odpovídá postižení nejen plicního parenchymu, ale i dýchacích cest – zejména periferních bronchiolů. Častější je i bronchiální hyperreaktivita prokazatelná bronchoprovokačními testy s metacholinem (u 22-60 % nemocných), zvláště u nemocných s farmářskou plící. Funkční vyšetření je důležité mimo jiné i pro

posuzování efektu léčby a k monitoraci vývoje onemocnění v čase. Je zajímavé, že zatímco u nemocných s farmářskou plící v čase dospěje k ireverzibilní obstrukční ventilační poruše a sníženému TLco, u nemocných s plící chovatelů ptáků vidáme spíše restriktivní ventilační poruchu (76, 77).

### *3.8.5 Bronchoskopie s bronchoalveolární laváží*

Úloha bronchoskopie a BAL u nemocných s EAA je spíše diferenciatně diagnostická. U akutních, nefibrotických forem bývá v BALTe dominantní procentuální zastoupení neutrofilů. Protože v této fázi ale BAL indikována nebývá, častějším nálezem u pacientů se subakutními formami může být vyšší procentuální zastoupení lymfocytů v BALTe (25-50 % dle některých autorů). Lymfocytózu vidáme častěji při současném HRCT obrazu centrilobulárních nodulů a mlhovitých opacit, u chronických forem EAA může lymfocytóza chybět a rozpočet buněk v BALTe se může blížit i normě (78). Další vliv na procentuální zastoupení buněk v BALTe má časový interval, který uběhl mezi expozicí a provedením BAL, věk nemocných a nikotinismus. Obdobné faktory patrně ovlivňují i zastoupení CD8+ T lymfocytů v BALTe - v literatuře se často setkáváme s názorem, že pro EAA je charakteristický poměr CD4+:CD8+ T lymfocytů < 1. Není tomu tak zdaleka ve všech případech, opět závisí na formě onemocnění, u fibrotických forem mohou hodnoty poměru někdy i stoupat. Zvýšené hodnoty jsou též udávány specificky pro některé antigeny, např. *M. avium* u nemocných s tzv. hot tub lung (79).

U nemocných s pokračující expozicí inhalačnímu antigenu je popisováno vyšší procentuální zastoupení žírných buněk a plasmatických buněk. Makrofágy mohou být pěnovité.

### *3.8.6 Histologie*

Zatímco u akutních nefibrotických forem onemocnění s ohledem na jejich sebelimitující průběh často nebývá biopsie s histologickým vyšetřením získané tkáně indikována, u fibrotických forem je zejména od chirurgické plicní biopsie upouštěno pro riziko akutní exacerbace procesu. V diferenciatně diagnostice hraje v těchto případech hlavní úlohu IPF, kde věk nad 65 let a postižení plicních funkcí, zejména nízká TLco, představuje pro nemocné nezanedbatelně rostoucí riziko mortality.

V poslední době je stále častěji využívána technika kryobiopsie, která umožňuje získat reprezentativní vzorek plicní tkáně i u nemocných s vysokým rizikem chirurgické plicní biopsie (80).

Stejně jako radiologický obraz je velmi variabilní, histologicky se u EAA můžeme setkat prakticky se všemi obrazy charakterizujícími intersticiální plicní procesy – NSIP, UIP, OP, DIP, DAD, v kombinaci s granulomy a emfyzémem (81, 82) (tabulka 6, 7).

**Tabulka 6 Histologický obraz u nemocných s nefibrotickou EAA**

<b>Typická EAA</b>	<b>Pravděpodobná EAA</b>	<b>Nevylučující EAA</b>
<p><i>Minimálně v jednom vzorku přítomny všechny tři typy změn:</i></p> <p>1. buněčná intersticiální pneumonie -bronchiolocentrická -vzorec buněčné NSIP -s převahou lymfocytů</p> <p>2. buněčná bronchiolitida -s převahou lymfocytů, fokální peribronchiální lymfoidní agregáty s germinálními centry -vzorec organizující se pneumonie s Massonovými tělísky -pěnovité makrofágy v alveolech</p> <p>3. neostře ohraničené nenekrotizující granulomy</p>	<p><i>Minimálně v jednom vzorku přítomny 2 typy změn:</i></p> <p>1. buněčná intersticiální pneumonie -bronchiolocentrická -vzorec buněčné NSIP -s převahou lymfocytů</p> <p>2. buněčná bronchiolitida -s převahou lymfocytů, fokální peribronchiální lymfoidní agregáty s germinálními centry -vzorec organizující se pneumonie s Massonovými tělísky -pěnovité makrofágy v alveolech</p>	<p><i>Minimálně v jednom vzorku přítomna jedna ze změn:</i></p> <p>1. buněčná intersticiální pneumonie nebo buněčná bronchiolitida</p> <p>2. buněčná NSIP</p> <p>3. organizující se pneumonie</p> <p>4. peribronchiolární metaplázie bez známek fibrotické EAA</p>

<p>- shluky epiteloidních a/nebo mnohояderných buněk</p> <p>- lokalizace v peribronchiolárním intersticiu, alveolech, současně může být organizující se pneumonie s Massonovými tělisky</p>		
<p><i>V bioptickém materiálu nejsou známky:</i></p> <p>- dominujících plazmatických buněk nad lymfocyty</p> <p>- rozsáhlá lymfoidní hyperplazie</p> <p>- rozsáhlé dobře formované sarkoidní granulomy a/nebo nekrotizující granulomy</p> <p>- cizí tělesa</p>	<p><i>V bioptickém materiálu nejsou známky:</i></p> <p>- dominujících plazmatických buněk nad lymfocyty</p> <p>- rozsáhlá lymfoidní hyperplazie</p> <p>- rozsáhlé dobře formované sarkoidní granulomy a/nebo nekrotizující granulomy</p> <p>- cizí tělesa</p>	<p><i>V bioptickém materiálu nejsou známky:</i></p> <p>- dominujících plazmatických buněk nad lymfocyty</p> <p>- rozsáhlá lymfoidní hyperplazie</p> <p>- rozsáhlé dobře formované sarkoidní granulomy a/nebo nekrotizující granulomy</p> <p>- cizí tělesa</p>

NSIP – nespecifická intersticiální pneumonie

Histologický obraz lze popsat jako typický pro EAA, pravděpodobná EAA a nevylučující EAA.

**Tabulka 7 Histologický obraz u nemocných s fibrotickou EAA**

<b>Typická EAA</b>	<b>Pravděpodobná EAA</b>	<b>Nevylučující EAA</b>
<p><i>V jednom vzorku</i> současně znak 1 nebo 2 a znak 3:</p> <p>1.chronická fibrotizující intersticiální pneumonie -distorze architektiky, fibroblastické fokusy ± subpleurální voština  -fibrotická NSIP</p> <p>2.broncho (bronchiolo) centrická fibróza ± peribronchiolární metaplázie  ±přemost'ující fibróza</p> <p>3.neostře ohraničené nenekrotizující granulomy ± buněčná intersticiální pneumonie  ± buněčná bronchiolitida  ± organizující se pneumonie</p>	<p><i>V jednom vzorku</i> současně znak 1 nebo 2:</p> <p>1.chronická fibrotizující intersticiální pneumonie -distorze architektiky, fibroblastické fokusy ± subpleurální voština  -fibrotická NSIP</p> <p>2.broncho (bronchiolo) centrická fibróza ± peribronchiolární metaplázie  ±přemost'ující fibróza  ± buněčná intersticiální pneumonie  ± organizující se pneumonie  ± buněčná bronchiolitida</p>	<p><i>Jakýkoliv</i> z následujících znaků v jednom vzorku:</p> <p>1.chronická fibrotizující intersticiální pneumonie -distorze architektiky, fibroblastické fokusy ± subpleurální voština  -fibrotická NSIP  ± buněčná intersticiální pneumonie  ± organizující se pneumonie  ± buněčná bronchiolitida</p>

<i>V bioptickém materiálu nejsou známky:</i>	<i>V bioptickém materiálu nejsou známky:</i>	<i>V bioptickém materiálu nejsou známky:</i>
-dominujících plazmatických buněk nad lymfocyty	-dominujících plazmatických buněk nad lymfocyty	-dominujících plazmatických buněk nad lymfocyty
-rozsáhlá lymfoidní hyperplazie	-rozsáhlá lymfoidní hyperplazie	-rozsáhlá lymfoidní hyperplazie
-rozsáhlé dobře formované sarkoidní granulomy a/nebo nekrotizující granulomy	-rozsáhlé dobře formované sarkoidní granulomy a/nebo nekrotizující granulomy	-rozsáhlé dobře formované sarkoidní granulomy a/nebo nekrotizující granulomy
-cizí tělesa	-cizí tělesa	-cizí tělesa

NSIP – nespecifická intersticiální pneumonie

### 3.8.7 Diagnostická kritéria EAA (tabulka 7)

**Tabulka 7 Diagnostická kritéria exogenní alergické alveolitidy**

	<b>Nefibrotická EAA</b>	<b>Fibrotická EAA</b>
Anamnéza expozice inhalačnímu antigenu	+/-	+/-
Krepitus	+/-	+
Transfer faktor	↓	↓
Vyšší procentuální zastoupení lymfocytů v BALTe (>20 % kuřáci, >30 % nekuřáci)	+	+/-
BALTe CD4/CD8	↓	↓/norma/↑

Radiologický obraz (HRCT)	Centrilobulární noduly, mlhovité opacity, mozaiková perfúze, kondenzace	Centrilobulární noduly, mlhovité opacity, mozaiková perfúze, kondenzace, zesílení intersticiálních sept, trakční bronchiektázie, voština, emfyzém
Histologický obraz	Granulomy, OP, NSIP	Granulomy, OP, NSIP, UIP, CPFE

BALTe - tekutina získaná bronchoalveolární laváží, HRCT- počítačová tomografie s vysokou rozlišovací schopností, OP -organizující pneumonie, NSIP - nespecifická intersticiální pneumonie, UIP - obvyklá intersticiální pneumonie, CPFE - syndrom kombinace fibrózy a emfyzému.

### 3.9 Léčba EAA

V první řadě je třeba nemocnému vysvětlit podstatu jeho onemocnění a motivovat jej ke spolupráci při léčbě. Pokud lze identifikovat vyvolávající inhalační antigen, měl by být odstraněn z životního prostředí pacienta. Nemocný by měl být poučen, že při dalším styku s vyvolávajícím antigenem dojde velmi pravděpodobně k relapsu onemocnění a ke zhoršení plicních funkcí. Někdy je nezbytné zamezit kontaktu s celou skupinou antigenů (holubářská plíce - pérové lůžkoviny apod.). U nemocných s akutním nebo subakutním onemocněním má obvykle zamezení další expozice poměrně promptní efekt, obecně lze říci, že čím bouřlivějšími příznaky je rozvoj onemocnění provázen, tím pravděpodobněji povede zamezení expozice k ústupu příznaků. U nemocných s pozvolným nástupem obtíží nevede obvykle zamezení expozice k jejich ústupu, zvláště jsou-li již rozvinuty fibrotické změny. Pokud zamezení expozice nelze docílit odstraněním zdroje inhalačního antigenu (farmářská



plíce), je dobré pacienta edukovat alespoň o možných způsobech redukce expozice (např. při zpracování cukrové třtiny došlo kvůli riziku bagasózy ke změně celého postupu – pytle s třtinou by měly být otevírány pod vodou, změnil se systém zpracování i ventilace).

Jedinou obecně doporučovanou farmakologickou léčbou je systémová kortikoterapie. U nemocných s akutní formou onemocnění nepřináší systémová kortikoterapie výraznější benefit, pokud jako kontrolní skupinu použijeme taktéž pacienty s akutní EAA, kteří zamezili další inhalační expozici vyvolávajícímu antigenu (83).

U pacientů s nefibrotickým onemocněním lze doporučit systémovou kortikoterapii v dávce 0,5 mg prednisonu na kg hmotnosti. Po stabilizaci stavu pacienta je vhodné dávku snižovat, nicméně v literatuře není dostupná žádná práce zabývající se rychlostí, jakou by měly být kortikosteroidy detrahovány a dobou, po kterou by měly být podávány. Některé práce doporučují systémovou kortikoterapii nepodávat déle než 4 týdny, protože se neprokázalo, že by déle podávaná léčba představovala pro nemocné jakýkoliv benefit. Systémová kortikoterapie urychluje ústup obtíží pacienta (u akutních a subakutních forem), mimo to práce Kokkarinena et al. naznačuje, že u pacientů léčených zpočátku kortikoterapií (pro akutní a subakutní EAA) byl v čase pozorován méně častý přechod do fibrotické fáze onemocnění (84).

U nemocných s progredujícím plicním postižením je nutno zvážit, zda byl skutečně identifikován vyvolávající antigen a odstraněn z životního prostředí nemocného. Pokud je samotná systémová kortikoterapie bez efektu, je možné zvážit kombinovanou imunosupresivní léčbu, je však nutno brát na zřetel, že klinická data o efektivitě tohoto postupu chybí. Stejně tak může být zvážena v individuálních případech léčba inhalačními bronchodilatancii nebo inhalačními kortikosteroidy, s cílem ovlivnění postižení v oblasti dýchacích cest.

U pacientů s fibrotickým plicním postižením na podkladě EAA je optimální léčebný postup otazný. Systémová kortikoterapie nemívá velký efekt, a i když onemocnění v čase pravděpodobně progreduje pomaleji než např. IPF, jedná se o prognosticky významný negativní ukazatel (85).

Pokud navzdory kortikoterapii onemocnění progreduje a dojde k rozvoji respirační insuficience, měla by být u pacienta zvážena dlouhodobá domácí oxygenoterapie.

Úloha fyzioterapie není u nemocných s EAA jasná. Vybraní pacienti s chronickým ireverzibilním plicním postižením mohou být kandidáty plicní transplantace.

### 3.10 Prognóza

Prognóza EAA je velmi variabilní. U části nemocných onemocnění proběhne v podobě jedné nebo více epizod a po identifikaci vyvolávajícího agens a zamezení další expozice dochází k úpravě ad integrum. Protipól představují nemocní, u kterých se onemocnění manifestuje plíživě, v době diagnózy jsou známky fibrotizace plicního parenchymu a onemocnění progreduje navzdory zamezení další expozice vyvolávajícímu agens. Za prognosticky nejzávažnější je považována přítomnost trakčních bronchiektazií, voštiny a retikulací dle HRCT hrudníku. První dva obrazy jsou i dobrými prediktory mortality nemocných s EAA. Z pohledu patologa jsou prognosticky nejzávažnějším nálezem histologické obrazy UIP, fibrotizující NSIP a bronchiolocentrické fibrózy (86, 87).

## 4. Jednotlivé cíle výzkumu: způsob řešení

### 4.1 Vztah radiologického obrazu onemocnění s klinickými parametry

Do studie bylo zařazeno 14 nemocných s EAA, u 7 se jednalo o subakutně probíhající onemocnění, u 7 o chronickou formu. Pacienti podstoupili v průběhu diagnostického programu BAL s následným cytologickým a cytometrickým vyšetřením BALTe a HRCT hrudníku. Charakter a rozsah postižení na HRCT byl kvantifikován pomocí HRCT skórování – rozsahu zánětlivých změn odpovídalo HRCT alveolární skóre, rozsahu fibrotických změn pak HRCT intersticiální skóre.

Prokázali jsme, že pacienti s normálním poměrem CD4+/CD8+ T lymfocytů v BALTe měli signifikantně vyšší HRCT intersticiální skóre, tedy výraznější fibrotické plicní postižení. Naopak u pacientů s vyšším procentuálním zastoupením lymfocytů v BALTe bylo prokázáno vyšší alveolární HRCT skóre svědčící pro vyšší podíl zánětu, a to hlavně u osob s pokračující expozicí vyvolávajícím inhalačním antigenům.

*Reference v příloze:*

- Sterclova M, Vasakova M, Dutka J, Kalanin J. Extrinsic allergic alveolitis: comparative study of the bronchoalveolar lavage profiles and radiological presentation. Postgrad Med J 2006; 82: 598-601.

### 4.2 Porovnání chemokinového prostředí v BALTe pacientů s EAA a pacientů se sarkoidózou a IPF

Pacienti s chronickou EAA se průběhem svého onemocnění liší od pacientů s akutními formami onemocnění. Zatímco akutní formy bývají spojovány s Th1 cytokinovým milieu, u pacientů s fibrotickým plicním postižením nalézáme spíše Th2 cytokinové prostředí. Fibrogenese bývá asociována také i s angiogenezí – procesem, v kterém hrají důležitou úlohu angiogenní chemokiny (např. IL-8, VEGF, ENA-78) a jejich receptor CXCR2. Protikladem jsou chemokiny angiostatické (např. IP-10, I-TAC) a jejich receptor CXCR3.

Do studií bylo zahrnuto 22 pacientů se sarkoidózou, 16 pacientů s EAA a 8 nemocných s IPF. Nemocní podstoupili v průběhu diagnostického programu bronchoalveolární laváž, vyšetření plicních funkcí a HRCT vyšetření hrudníku. Tekutina získaná BAL byla vyšetřena cytologicky, průtokovou cytometrií (se stanovením exprese CXCR3,

CXCR2 a CCR3 na CD4 +T lymfocytech v BALTe) a byly v ní stanoveny koncentrace vybraných chemokinů (IL-8, VEGF, ENA-78, IP-10, I-TAC). Výsledky uvedených vyšetření BALTe byly porovnávány s HRCT obrazem a klinickou manifestací onemocnění.

Prokázali jsme, že zastoupení chemokinů v BALTe u nemocných s chronickou EAA se významně neodlišuje od zastoupení chemokinů v BALTe nemocných s IPF. Úloha chemokinů se ale může u obou onemocnění odlišovat - u EAA lze IL-8 považovat za pravděpodobný marker kontinuální expozice vyvolávajícím agens, ENA-78 může být považována za marker reverzibility plicního postižení a VEGF má spíše angiogenní než profibrotický efekt a hlavní roli pravděpodobně hraje v časných fázích EAA.

Exprese CXCR3 na CD4+ T lymfocytech BALTe u nemocných s EAA koreluje s rozsahem zánětlivých změn dle HRCT hrudníku, což dále podporuje myšlenku, že v různých fázích onemocnění se na plicním postižení podílí různé mechanismy.

#### *Reference v příloze:*

- Sterclova M, Vasakova M, Metlicka M, Pavlicek J, Kolesar L, Striz I. Angiostatic versus angiogenic chemokines in IPF and EAA. *Respiratory Medicine* 2009; 103: 1651-1656.
- Sterclova M, Vasakova M, Pavlicek J, Metlicka M, Krasna E, Striz I. Chemokine receptors in a regulation of interstitial lung fibrosis and inflammation. *Exp Lung Res* 2009; 35:514-523.
- Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc J, Skibova J, Striz I. Bronchoalveolar lavage fluid cellular characteristics, functional parameters and cytokine and chemokine levels in interstitial lung diseases. *Scand J Immunol* 2009; 69: 268-274.

#### 4.3 Průkaz vlivu solubilních faktorů v BALTe na buňky podílející se na procesu fibrogenese

Do studie bylo zařazeno 11 pacientů s chronickou EAA a 7 s IPF. Pacienti v době stanovení diagnózy podstoupili BAL, ze získané tekutiny byly odstraněny buňky a pak

byla využita k dalším experimentům. Dále byl u zařazených nemocných kvantifikován rozsah postižení s pomocí HRCT skórování. Tekutina získaná BAL byla aplikována k buněčným kulturám lidských alveolárních epitelů II typu (A549), k buněčné kultuře lidských fibroblastů (hFL) (obr. 5) a ke kultuře primárních lidských plicních fibroblastů (pFL). Následně byla stanovena proliferace takto exponovaných buněk a hodnoty byly korelovány s klinickými daty nemocných. Proliferační index hFL exponovaných BALTe nemocných s EAA negativně koreloval s alveolárním HRCT skóre těchto nemocných. Proliferační index pFL pozitivně koreloval s HRCT intersticiálním skóre nemocných s EAA. Proliferační index A549 pozitivně koreloval s věkem nemocných s IPF.

Z buněčných kultur pFL exponovaných BALTe nemocných s EAA a IPF byl odebrán supernatant, a následně v něm byly stanoveny metodou ELISA koncentrace Wnt-1, Wnt-3 a MMP-7. Kontrolní skupina buněk byla exponována kultivačnímu médiu a kultivačnímu médiu obohacenému o TGF-beta.

Výsledky naznačují, že expozice primárních lidských fibroblastů BALTe pacientů s EAA a IPF signifikantně zvyšuje produkci MMP-7 těmito buňkami. Vliv na produkci MMP-7 má především věk a rozsah zánětu (dle HRCT hrudníku – alveolární skóre) u jednotlivých nemocných.

#### *Reference:*

- Sterclova M, Paluch P, Fernandez IE, Heinzelmann K, Eickelberg O, Vasakova M. Change of primary lung fibroblasts (pFL) characteristics upon stimulation with bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases. Poster, WASOG meeting 2014, Kusadasi, Turecko.
- Sterclova M, Paluch P, Heinzelmann K, Eickelberg O, Vasakova M. Change of A549 cells characteristics upon stimulation with bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases. Eur Respir J 2014; 44 (Suppl 58): P3745. Abstrakt.
- Sterclova M, Heinzelmann K, Fernandez IE, Paluch P, Skibova J, Eickelberg O, Vasakova M. Role of Wnt-1, Wnt-3 and MMP-7 in fibrotic response in extrinsic allergic alveolitis and idiopathic pulmonary fibrosis. Eur Respir J 2015; 46 (Suppl 59): PA3838. Abstrakt.

#### 4.4 Buňky získané BAL u nemocných s EAA si mohou zachovávat vlastnosti odpovídající formě onemocnění

Do studie bylo zahrnuto 6 nemocných s EAA a 10 s IPF. V době stanovení diagnózy pacienti podstoupili bronchoalveolární laváž - 10 ml získané tekutiny bylo centrifugováno, a po odsátí supernatantu a promytí byly buňky resuspendovány v 2 ml čerstvě připravené kryoprezervační směsi (RPMI 1640, 20 % FCS, 10 % DMSO) a ve speciální komůrce zamraženy při -80°C. Pacienti dále absolvovali v době stanovení diagnózy HRCT hrudníku a vyšetření plicních funkcí. Pro účel studie byly buňky rozmrazeny, viabilita buněk byla stanovena pomocí trypanové modři a buňky byly pěstovány v kultivačních mediích různého složení (obr.6). Proliferační schopnost buněk byla posuzována BrDU testem. Proliferační schopnost buněk byla korelována s klinickými daty nemocných (procentuální zastoupení buněk v BALTe, HRCT skóre, plicní funkce).

Byla prokázána negativní korelace mezi HRCT alveolárním skóre a proliferační kapacitou BALTe buněk u nemocných s EAA a pozitivní korelace mezi proliferační schopností buněk a procentuálním zastoupením eozinofilů v BALTe.

#### *Reference:*

- Sterclova M, Heinzlann K, Fernandez IE, Paluch P, Eickelberg O, Vasakova M. Bronchoalveolar lavage cells in modeling alveolar milieu. Poster, Munich Pittsburg Lung Conference, 2015, Munich, Německo.
- Sterclova M, Paluch P, Heinzlann K, Fernandez IE, Eickelberg O, Vasakova M. BAL cell cultures as a model for studying interstitial lung diseases pathogenesis. Poster, ATS kongres, 2014, Denver, USA.

#### 4.5 Úloha IL-4R $\alpha$ v patogenezi EAA

Jedna z prvních studií, která nás upozornila na možný význam IL-4R $\alpha$  byla práce zaměřená na markery fibroproliferativního hojení u nemocných s fibrotizujícími idiopatickými intersticiálními procesy. Do studie bylo zahrnuto 10 nemocných s IPF a fibrotizující NSIP a 9 osob s regredující pneumonií, u kterých byla fibrobronchoskopie indikována pro podezření na intersticiální plicní proces, který ale nebyl dalšími

vyšetřeními prokázán. Pacienti absolvovali v rámci diagnostického programu bronchoskopii s BAL, vyšetření plicních funkcí a HRCT hrudníku. V tekutině získané BAL byly stanoveny metodou ELISA koncentrace IL-4R $\alpha$  a dalších cytokinů. U pacientů s fibrotizujícími idiopatickými intersticiálními procesy byla prokázána signifikantně vyšší koncentrace IL-4R $\alpha$  v BALTe než v kontrolní populaci.

Zajímalo nás tedy, jakou úlohu hraje IL-4R $\alpha$  u nemocných, jejichž onemocnění může mít nejen složku fibrózní, ale i zánětlivou a zaměřili jsme se na porovnání koncentrací této molekuly u nemocných s EAA a u nemocných se sarkoidózou. Do studie bylo zařazeno 20 osob, šest z nich s prokázanou sarkoidózou, u 14 byla diagnostikována EAA. V době stanovení diagnózy byla u všech nemocných provedena bronchoalveolární laváž, v získané tekutině byly stanoveny koncentrace IL-4R $\alpha$ , PAR-2, TNF- $\alpha$  a TGF- $\beta$ . Signifikantně vyšší hladiny IL-4R $\alpha$  v BALTe byly nalezeny u nemocných s EAA.

Úloha IL-4R $\alpha$  v patogenezi EAA byla ověřena dále ve studii asociací mezi koncentracemi této molekuly a radiologickým nálezem u nemocných s EAA. Do studie bylo zařazeno 14 osob s chronickou EAA a 6 pacientů se sarkoidózou. Koncentrace IL-4R $\alpha$  v BALTe byly korelovány vůči intersticiálním a alveolárním změnám prokázaným pomocí HRCT hrudníku. Pozitivní korelace mezi koncentrací IL-4R $\alpha$  a rozsahem fibrózních změn na HRCT hrudníku (HRCT intersticiální skóre) ukazuje na možnou úlohu IL-4R $\alpha$  v patogenezi chronické EAA.

Koncentrace IL-4R $\alpha$  v BALTe nemocných s EAA mohou vypovídat nejen o probíhající fibrotizaci u neléčených osob, ale mohou mít i prognostický význam. Pozorování je založeno na studii zahrnující 24 nemocných s EAA, kteří na našem pracovišti podstoupili nejen vyšetřovací program (včetně bronchoskopie s BAL, HRCT hrudníku a vyšetření plicních funkcí), ale byli i nadále sledováni případně léčeni. Po šesti měsících byli pacienti rozděleni do 4 skupin ve vztahu k průběhu onemocnění a léčebnému postupu. Výsledkem byla skupina osob s poklesem plicních funkcí navzdory léčbě, neléčených pacientů s poklesem plicních funkcí, osob neléčených, u kterých došlo ke zlepšení plicních funkcí a osob léčených, u nich se též plicní funkce zlepšily. Výsledky studie ukázaly, že pacienti, u kterých plicní funkce (prakticky bez ohledu na léčbu) v čase klesají, mají vstupně vyšší koncentrace IL-4R $\alpha$  v BALTe než pacienti, u kterých dochází v čase ke zlepšení.

*Reference:*

- Vasakova M, Sterclova M, Stranska E, Mandakova P, Skibova J, Matej R. Biomarkers of fibroproliferative healing in fibrosing idiopathic interstitial pneumonias. *Open Resp Med J* 2012; 6: 160-164.
- Matej R, Smetakova M, Vasakova M, Novakova J, Sterclova M, Olejár T. PAR-2, IL-4R, TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  in bronchoalveolar lavage distinguishes extrinsic allergic alveolitis from sarcoidosis. *Exp and Ther Med* 2014; 8: 533-538.
- Sterclova M, Matej R, Mandakova P, Skibova J, Vasakova M. Role of interleukin 4 and its receptor in clinical presentation of chronic extrinsic allergic alveolitis: a pilot study. *Multidisciplinary respiratory Medicine* 2013; 8:35
- Sterclova M, Kolbekova M, Smetakova M, Vasakova M. Markers of treatment outcome in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 2016; 48 (Suppl 60): PA 3706. Abstrakt.
- Bruzova M, Pavlova M, Matej R, Sterclova M, Vasakova M. Interstitial Score and Concentrations of IL-4R $\alpha$ , PAR-2, and MMP-7 in Bronchoalveolar Lavage Fluid Could Be Useful Markers for Distinguishing Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Diagnostics (Basel)* 2021;11(4):693.

4.6 Může sérová koncentrace surfaktantového proteinu A (SP-A) napomoci k odlišení mezi chronickou EAA a IPF?

Diferenciální diagnostika mezi zejména chronickou EAA a IPF nemusí být vždy jednoduchá, řada pacientů s chronickou EAA nemá jednoznačný zdroj expozice, pokud expozice nepokračuje, mohou mít pacienti nízké procentuální zastoupení lymfocytů v BALTe a onemocnění může nabývat HRCT obrazu obvyklé intersticiální pneumonie, velmi podobné jako u IPF.

U 13 nemocných s chronickou EAA a 7 pacientů s IPF jsme vyšetřili koncentraci sérového SP-A v době stanovení diagnózy. Pacienti též v rámci diagnostického programu absolvovali bronchoskopii s BAL, vyšetření plicních funkcí a HRCT vyšetření hrudníku. Studie prokázala, že sérové koncentrace SP-A u nemocných



s chronickou EAA a u pacientů s IPF se významně neliší a tato molekula by tedy neměla být používána jako diagnostický marker.

*Reference:*

- Sterclova M, Vasakova M, Paluch P, Paulik M. Surfactant protein A in chronic extrinsic allergic alveolitis. Eur Respir J 2011, 6: 1543-1544.

#### 4.7 Možné zdroje expozice a manifestace EAA

Podílí se na manifestaci onemocnění i specifické vlastnosti zdroje inhalační expozice? U 54 osob byla v době vyšetření provedena bronchoskopie s BAL, vyšetření plicních funkcí, HRCT hrudníku a podrobný anamnestický rozbor. Abychom našli odpověď na tuto otázku, studovali jsme koncentrace IL-4R $\alpha$ , MMP-7, PAR-2 a TNF- $\alpha$  v BALTe u 34 nemocných s EAA. Pacienti v době diagnózy podstoupili podrobný anamnestický rozhovor s cílem objasnit zdroj expozice inhalačnímu antigenu. Na základě anamnestických údajů byli rozděleni do skupiny osob exponovaných plísním, ptačím antigenům a osob s neznámým zdrojem inhalačních antigenů. Koncentrace výše uvedených cytokinů v BALTe se u nemocných v závislosti na anamnestickém zdroji expozice významně neliší.

U stejné skupiny nemocných s EAA jsme zkoumali vliv zdroje expozice na prognózu jejich onemocnění. Podle zdroje expozice bylo 54 osob s EAA rozděleno do pěti skupin podle zdroje inhalačních antigenů – do skupiny exponované chemickým látkám, do skupiny exponované plísním, do skupiny exponované ptačímu peří, do skupiny exponované srsti savců a do skupiny osob s neznámým zdrojem expozice. U zařazených osob byly sledovány hodnoty plicních funkcí v době stanovení diagnózy a 12 měsíců po stanovení diagnózy EAA. Sledovali jsme, zda se skupiny nemocných v souvislosti se zdrojem expozice liší v manifestaci onemocnění (procentuální zastoupení buněk v BALTe, plicní funkce – usilovná vitální kapacita (FVC), usilovně vydechnutý objem za první vteřinu (FEV1), TLco) a zda se průběh nemoci liší v závislosti na zdroji expozice. Prokázali jsme, že skupina pacientů exponovaných plísním má v době stanovení diagnózy významně lepší plicní funkce a menší rozsah poškození dle HRCT hrudníku. Pacienti exponovaní ptačímu peří měli signifikantně lepší prognózu než ostatní skupiny nemocných.

Protože u cca 20 % nemocných s EAA se navzdory opakovaným dotazům nepodaří možný zdroj inhalačního antigenu odhalit, zkoumali jsme možnost detekce kontaktu s organickým inhalačním antigenem z krevního vzorku. U 72 nemocných s prokázanou EAA jsme vyšetřili koncentrace specifických imunoglobulinů G v séru a výsledky porovnali s anamnestickými údaji pacientů. Podle těchto údajů jsme nemocné rozdělili do 4 skupin podle zdroje expozice na osoby s anamnestickým údajem o expozici roztočům, plísním, savčí srsti a ptákům a skupiny osob, které anamnézu expozice danému inhalačnímu antigenu neměli. Nemocní byli rozděleni také do třech skupin podle manifestace onemocnění na pacienty se subakutní a chronickou EAA. U všech pacientů byl vyšetřen panel specifických IgG. Výsledky studie naznačují, že sérové koncentrace specifických IgG proti plísním a savčí srsti se neliší u osob s anamnézou expozice a u osob s anamnézou expozice a s manifestní EAA. Vyšší sérové koncentrace specifických IgG proti roztočům a ptačím antigenům byly zaznamenány především u pacientů s chronickou a subakutní manifestací EAA. Důležitým závěrem studie je zjištění, že stanovení koncentrací specifických IgG v séru osob bez jednoznačné anamnézy expozice nás může nasměrovat k potenciálnímu zdroji inhalačního antigenu, a to zejména u osob s vyššími sérovými koncentracemi specifických IgG vůči ptačím antigenům a roztočům.

Senzitizací vůči inhalačním antigenům jsme se zabývali i v další práci – u 254 pacientů s EAA byly vyšetřeny koncentrace specifických IgG v periferní krvi a byla shromážděna anamnestická data zaměřená na expozici inhalačním antigenům. U 85 osob nebyl ani na základě opakovaného odběru anamnézy zjištěn možný zdroj inhalační expozice, naopak u 63 pacientů byla prokázána senzitivace vůči více než jednomu inhalačnímu antigenu. Čeští pacienti byli nejčastěji senzitivováni vůči diisokyanátům.

řada pacientů není exponována jen jednomu zdroji inhalačních antigenů, zdroje expozice mohou být vícečetné. Navíc byt' panel komerčně nabízených specifických IgG je poměrně rozsáhlý, nezahrnuje pochopitelně všechny potenciální antigeny. Pokud je ale materiál z prostředí pacienta podkladem pro výrobu antigenního extraktu, může tento sloužit k posouzení celkové sérologické odpovědi, a tak stanovit, které prostředí je pro pacienta potenciálně nebezpečnější. Tuto hypotézu jsme testovali na deseti nemocných s EAA a buď vícečetným nebo neobjasněným zdrojem expozice. Navržená metoda má potenciál odhalit skryté zdroje expozice u nemocných s EAA.

*Reference:*

- Sterclova M, Kolbekova M, Smetakova M, Skibova J, Vasakova M. Effect of source of inhalation antigen on hypersensitivity pneumonitis manifestation and cytokine milieu. Chest 2016; 150 (4\_S):933A. Abstrakt.
- Sterclova M, Vasakova M, Paluch P. Effect of source of inhalation antigen on manifestation and prognosis of extrinsic allergic alveolitis. Eur Respir J 2012; 40 (Suppl 56): P684. Abstrakt.
- Sterclova M, Vasakova M, Metlicka M. Significance of specific IgG against sensitizing antigens in extrinsic allergic alveolitis: serological methods in EAA. Rev Port Pneumol 2011; 17: 253-259.
- Sterclova M, Paulik M, Skibova J, Vasakova M. Inhalation antigens sensitisation in czech hypersensitivity pneumonitis patients. Am J Respir Crit Care Med 2016; 193: A6273. Abstrakt.
- Sterclova M, Kremlackova V, Mottlova V, Bruzova M, Sojka P, Vasakova M. Quantitative assessment of specific serum IgGs may verify source of environmental exposure in extrinsic allergic alveolitis (EAA). Cogent Medicine 2021; 8 (1): 1894688.

#### 4.8 Endogenní a exogenní faktory ovlivňující manifestaci EAA

V rámci 3 studií jsme zkoumali vliv genových polymorfismů, věku a expozice cigaretovému kouři na manifestaci EAA.

Pilotní studie zaměřená na vliv polymorfismů genů pro vybrané cytokiny na koncentrace chemokinů v BALTe zahrnovala 8 pacientů. Pacienti podstoupili v rámci diagnostického programu kromě obligátní bronchoskopie s BAL, HRCT hrudníku a funkčního vyšetření také odběr krve. Zaměřili jsme se na jednonukleotidové polymorfismy (SNP, single nucleotid polymorphisms) v genech pro IL-1 $\alpha$ , IL-1R, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-4R $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ 1 a TNF- $\alpha$ . V BALTe byly

metodou ELISA stanoveny koncentrace MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, ENA-78, FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , TPO a VEGF. Prokázali jsme, že pacienti s polymorfismy genu pro IL-6 (konkrétně (-174)CG a (nt565)AG) mají v BALTe vyšší koncentrace ENA-78 a uvedený polymorfismus tedy může být pro pacienty významný z hlediska možné reverzibility plicního postižení.

Do studie zaměřené na posouzení vlivu věku nemocných na manifestaci onemocnění EAA bylo zahrnuto 121 pacientů. Nemocní byli rozděleni podle věku v době stanovení diagnózy do 3 skupin (pacienti mladší 30 let, 30-60 let a pacienti starší 60 let). Všichni nemocní v době stanovení diagnózy podstoupili HRCT hrudníku, vyšetření plicních funkcí a bronchoskopii s BAL. Zjišťovali jsme, zda se funkční parametry a procentuální zastoupení buněk získaných BAL signifikantně liší v závislosti na věku pacienta v době stanovení diagnózy. Zatímco plicními funkcemi se nemocní v rámci jednotlivých skupin signifikantně neodlišovali, pacienti starší 60 let měli v BALTe vyšší procentuální zastoupení neutrofilů, eozinofilů a vyšší poměr CD4+/CD8+ T lymfocytů. Je pravděpodobné, že reaktivita imunitního systému se mění s věkem, a tak i manifestace EAA může být na věku pacienta závislá.

Do studie zaměřené na studium antioxidačních mechanismů v patogenezi intersticiálních plicních procesů včetně EAA bylo zahrnuto celkem 15 nemocných s EAA. Pacienti v době stanovení diagnózy podstoupili HRCT hrudníku, vyšetření plicních funkcí, bronchoskopii s BAL a část nemocných také chirurgickou plicní biopsií (jednalo se o pacienty, u kterých navzdory výše uvedeným vyšetřením nebyla diagnóza EAA jednoznačná). V BALTe byly metodou ELISA stanoveny koncentrace glutathion peroxidázy 3 (GPX3) a exprese GPX3 v plicní tkáni pacientů byla stanovena metodou nepřímé imunofluorescence. Prokázali jsme, že celoživotní nekuřáci s EAA mají vyšší koncentrace GPX3 v BALTe než pacienti s anamnézou nikotinismu. GPX3 je u nemocných s EAA exprimován v bazální membráně bronchů a hlavním zdrojem GPX3 se zdají být bronchiální epitelie. Stejný obraz byl pozorován i v kontrolní skupině (tvořili ji nemocní podstupující hrudní operaci pro nádorové onemocnění, nemají známky IPP dle HRCT hrudníku a použita byla plicní tkáň nepostížená nádorovým bujením). Na rozdíl od kontrolní skupiny byl ale GPX3 exprimován u pacientů s EAA také v extracelulární matrix. Na základě výsledků výzkumu lze předpokládat, že antioxidační mechanismy u nemocných s EAA se

mohou lišit od zdravé populace a jedním z faktorů, který je mimo jiné může měnit, je pravděpodobně i expozice cigaretovému kouři.

*Reference:*

- Vasakova M, Sterclova M, Kolesa L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc J, Striz I. Cytokine gene polymorphisms and BALF cytokine levels in interstitial lung diseases. *Respiratory Medicine* 2009; 103: 773-779.
- Sterclova M, Paluch P, Skibova J, Vasakova M. Influence of age on manifestation, VC and TLco values, and bronchoalveolar lavage cell counts of sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Clin Resp J* 2015; 1:39-44.
- Schamberger AC, Schiller HB, Fernandez IE, Sterclova M, Heinzelmann K, Hennen E, Hatz R, Behr J, Vasakova M, Mann M, Eickelberg O, Staab-Weijnitz CA. Glutathione peroxidase 3 localizes to the epithelial lining fluid and the extracellular matrix in interstitial lung disease. *Sci Rep* 2016; 6: 29952.

## 5. Shrnutí výsledků provedeného výzkumu a diskuze

EAA tvoří heterogenní skupinu onemocnění s různými zdroji expozice, různou manifestací a prognózou. Dlouhodobým problémem v diagnostice onemocnění je zejména absence celosvětově přijímaných diagnostických kritérií, která by umožnila lépe charakterizovat celou skupinu a zlepšit výsledky léčby nemocných.

Jednoznačně definovaná klasifikace EAA neexistuje, nicméně většina autorů se ve svých pracích přiklání k rozdělení nemocných do skupiny s akutní/subakutní manifestací a do skupiny s chronickým průběhem nemoci (88). Výsledky naší práce ukazují, že skupiny lze odlišit nejen podle klinické prezentace, ale i dle radiologických nálezů (charakter změn dle HRCT hrudníku), procentuálního zastoupení lymfocytů v BALTe a poměrů CD4+ a CD8+ T lymfocytů v BALTe. Problematikou radiologické prezentace EAA u nemocných s akutní, subakutní a chronickou EAA se zabývala např. Silva CIS (89), jednotlivé formy onemocnění mají charakteristické radiologické nálezy. Radiologický obraz onemocnění není důležitý jen z pohledu klasifikace, ale i prognózy nemocných. Z tohoto hlediska se jako prognosticky nejzávažnějším faktorem jeví rozsah retikulárních opacit na HRCT hrudníku (90).

Naše práce dále ukazuje, že pacienti s chronickou formou EAA nemusí mít lymfocytární alveolitidu – lymfocytární alveolitida byla dlouhou dobu považována za podmínku diagnózy EAA. K podobným závěrům došel na základě vlastních pozorování později Espoladore et al. nebo Gaxiola et al. (91, 92). Spolehlivým diagnostickým markerem není ani dříve proklamovaný tzv. imunoregulační index, tedy poměr CD4+/CD8+ T lymfocytů v BALTe, který by u nemocných s EAA dle starších prací měl být nízký. Tento poměr však nabývá různých hodnot podle klinické manifestace EAA, u chronických forem může být zcela v normě (93).

Prognosticky nejzávažnější je nepochybně chronická forma EAA, zvláště pokud je provázena radiologickým a histopatologickým vzorcem odpovídajícím UIP nebo fibrotické NSIP (94). Odlišit tuto formu EAA od IPF není snadné, v praxi je k tomu možné využít expoziční test, který se však v ČR rutinně neprovádí (72). Dle námi provedených studií nebyl prokázán mezi oběma diagnózami signifikantní rozdíl ani v koncentracích angiogenních a angiostatických chemokinů v BALTe, ani v expresi jejich receptorů na CD4+ T lymfocytech v BALTe. Úloha chemokinů se ale může u obou onemocnění odlišovat - u EAA lze IL-8 považovat za pravděpodobný marker

kontinuální expozice vyvolávajícím agens, ENA-78 může být považována za marker reverzibility plicního postižení a VEGF má spíše angiogenní než profibrotický efekt a hlavní roli pravděpodobně hraje v časných fázích EAA. Exprese CXCR3 na CD4+ T lymfocytech BALTe koreluje s rozsahem zánětlivých změn dle HRCT hrudníku, což dále podporuje myšlenku, že v různých fázích onemocnění se na plicním postižení podílí různé mechanismy. Podobné pozorování publikovali Willems et al, koncentrace řady proteinů se v BALTe nemocných s chronickou EAA a IPF neliší. Jelikož jejich práce zahrnovala širší spektrum molekul, kromě schodných nálezů prokázala i odlišnosti, zejména v koncentracích chemokimu IL12p40 a TGF- $\beta$  (54). Paralelu mezi chronickou EAA a IPF, zejména z pohledu angiogenních a angiostatických působků, popsal dále např. Kishi et al. (58).

Pokud ale postižení při EAA nemá radiologický charakter UIP, může být situace jiná. Působky přítomné v BALTe nemocných s EAA totiž ovlivňují proliferačních schopnosti některých buněčných linií (včetně primárních) v závislosti na manifestaci onemocnění (konkrétně na rozsahu zánětlivých změn na HRCT hrudníku, kvantifikovaných HRCT alveolárním skóre, a na rozsahu fibrotických změn na HRCT hrudníku, kvantifikovaných HRCT intersticiálním skóre). Jelikož BALTe nemocných s vysokým alveolárním HRCT skóre (a tedy s výraznou zánětlivou složkou onemocnění) tlumila proliferační schopnosti primárních lidských fibroblastů, je otázkou, zda prozánětlivé prostředí nemůže mít protektivní vliv a „chránit“ pacienta s EAA před rozvojem fibrózy.

Asociacemi mezi zánětem a fibrózou se zabývá a zabývala řada autorů. Obecně přijímanou hypotézou je, že chronický zánět predisponuje u řady nemocí k následnému rozvoji fibrózy. Stejná hypotéza je přijímaná i u nemocných s chronickou EAA, která je považována za důsledek jizvení zánětem vyvolaného poškození plicní tkáně (95). Vztah k chronickému zánětu má pravděpodobně i nádorové bujení, i v tomto případě většina prací podporuje hypotézu, že chronický zánět predisponuje k rozvoji malignit (96, 97). Objevují se ale i studie, které toto paradigma zpochybňují a poukazují na skutečnost, že ne vždy je zánět na škodu – stimulace imunitní odpovědi může např. k aktivaci antigen prezentujících buněk (APC), nebo mohou být produkovány cytokiny, které stimulují protinádorovou imunitu (98, 99). Za prozánětlivé bývají považovány především Th1 cytokiny včetně INF- $\gamma$ , který negativně působí na tzv. Th2 lymfocyty a jejich tvorbu tlumí.

Th2 lymfocyty produkují řadu cytokinů včetně IL-4. Koncentrace  $\alpha$  podjednotky receptoru pro IL-4 v BALTe nemocných s EAA pozitivně koreluje s rozsahem fibrotických změn dle HRCT hrudníku. Vysoké koncentrace IL-4R $\alpha$  pravděpodobně predikují nepříznivý vývoj onemocnění navzdory léčbě systémovými kortikosteroidy. Jaká je tedy asociace mezi zánětem a fibrózou u nemocných s EAA není dle našeho názoru jednoznačné. Pokud hodnotíme jakékoliv biologické vzorky od pacientů s EAA, měli bychom při interpretaci výsledků vzít vždy v potaz manifestaci onemocnění včetně radiologického obrazu a BALTe buněčného profilu.

Možné vysvětlení různých klinických manifestací EAA přináší genetická predispozice. V rámci studií zabývajících se touto problematikou byly studovány polymorfismy genů pro TNF- $\alpha$ , PCD1 (programmed cell death protein 1), LMP-7 (jedna z podjednotek imunoproteazomu), TIMP-3 (metalloproteinase inhibitor 3), TAP-1 a genů pro prozánětlivé a protizánětlivé cytokiny (100, 101). Rozsáhlejší multicentrická studie zahrnující dostatečný počet pacientů s různými zdroji expozice však nikdy provedena nebyla. Interakce mezi jednotlivými složkami imunitní odpovědi jsou komplexní a funkční genový polymorfismus může ovlivňovat další kaskády dějů. V naší práci jsme pozorovali konkrétně vliv polymorfismu genu pro IL-6 na koncentraci ENA-78 v BALTe. Vztah mezi IL-6 a ENA-78 je mediován solubilním receptorem pro IL-6, který atrahuje neutrofilů do místa zánětu a zvyšuje expresi ENA-78. ENA-78 pak může regulovat další vlastnosti neutrofilů (102).

Potenciálně by manifestaci EAA mohlo ovlivňovat i inhalační agens, s kterým jsou nemocní opakovaně v kontaktu. Pacient navíc nebývá vystaven izolovanému antigenu, ale jejich směsi. Jelikož hnízda ptáků jsou největším zdrojem roztočů, lze si představit, že nemocný s holubářskou plící není exponován jen holubímu peří, trusu a séru, ale i částicím těchto roztočů. Antigeny roztočů mají často proteázovou aktivitu a mohou dále modifikovat imunitní odpověď organismu (103). Podobně tomu může být s antigeny plísní – plísně představují důležitý zdroj potravy pro některé roztoče, navíc mohou mít imunomodulační vlastnosti (104). V naší práci jsme neprokázali, že by se cytokinové spektrum v BALTe lišilo u nemocných s EAA v závislosti na anamnesticky uváděném zdroji expozice.



U zhruba 20 % nemocných zůstává zdroj expozice neznámý navzdory opakovanému dotazování a aktivnímu zapojení pacienta (70). Jistou pomoc u těchto nemocných může přinést vyšetření specifických IgG v séru. K interpretaci výsledků je nutno přistupovat obezřetně, protože např. v případě farmářské plíce pro ČR nebyly stanoveny relevantní inhalační antigeny. Naše práce prokázala, že koncentrace sérových protilátek proti komerčně dostupným antigenům *Saccharopolyspora rectivirgula* a *Thermoactinomyces vulgaris* jsou v české populaci s anamnézou expozice v zemědělství velmi nízké. V sousedním Německu byla u pacientů s farmářskou plící prokázána i expozice *Aspergillus fumigatus*, *Absidia (Lichtheimia) corymbifera*, *Erwinia herbicola* a *Streptomyces albus* (105). Na východě Francie dominují *Absidia sp.*, *Eurotium sp.*, *Wallemia sebi* a termofilní aktinomycety (106). Další úskalí přináší absence referenčního rozmezí pro českou populaci. Referenční rozmezí závisí mimo jiné i na použité metodice a nepochybně se bude pro jednotlivé inhalační antigeny lišit. Relativně častá se zdá být senzitivizace vůči více než jednomu inhalačnímu antigenu (24 % nemocných s EAA). Vysoké koncentrace specifických IgG v séru mohou u nemocných s EAA a neznámým zdrojem expozice na tento zdroj poukázat. Identifikace zdroje expozice (a následné zamezení další expozici) vede ke zlepšení prognózy nemocných s EAA (107).

Čeští pacienti s EAA jsou pravděpodobně nejvíce senzitivizováni vůči hexametylen diisocyanátu (MDI) a difenylmetan diisocyanátu (HDI) (až 28 % vyšetřených osob). Obě látky se používají k výrobě pěnového polyuretanu, přidávají se do epoxidových pryskyřic. Používají se ve stavebnictví jako rychle tuhnoucí montážní pěny a tmely, lepidla, tužidla pro polyuretanové laky a barvy. V automobilovém průmyslu se používají do laků pro karoserie, tvrdých a měkkých polyuretanových pěn pro sedadla a další vybavení interiéru. Uvolňují se mimo jiné při vznícení polyuretanů.

Kromě genetické predispozice se na manifestaci EAA mohou podílet i další expozice exogenním inhalačním antigenům, a to zejména expozice cigaretovému kouři. Starší práce uvádí, že EAA trpí častěji nekuřáci. Studie Furuyie et al. ukazuje, že klinická praxe je jiná, krátkodobá expozice cigaretovému kouři vede k potlačení zánětu (takže u kuřáků s EAA nemusí být v BALTe patrná lymfocytóza), dlouhodobá expozice pak k fibrotizaci plicní tkáně (108). Další práce také prokázaly negativní vliv kouření na prognózu nemocných s EAA (109). Zajímavá data přinesla studie, která se zabývala

mikrobiální kontaminací cigaret – prokázána byla přítomnost druhů rodu *Bacillus*, řada z nich bývá spojována s rozvojem EAA. Tímto zvláštním způsobem může docházet k propojení kuřáctví s onemocněním EAA (110). Podobné příznaky má EAA postihující pracovníky tabákového průmyslu – i u těchto osob bylo pozorováno, že pokud došlo k rozvoji EAA, kouření vede k její exacerbaci (111).

Expozice cigaretovému kouři zvyšuje produkci kyslíkových radikálů a zatěžuje buňky vyšší mírou oxidačního stresu. Důležitým enzymem, který může chránit buňky před tímto oxidačním stresem je GPX3, jedná se o extracelulární antioxidantní protein. Některé studie prokazují, že vlivem expozice tabákovému kouři může dojít díky epigenetickým modifikacím k „umlčení“ (silencing) genu pro GPX-3, což může dále stupňovat nežádoucí dopad oxidačního stresu u kuřáků (112). Touto cestou se na manifestaci EAA může podílet i expozice cigaretovému kouři – prokázali jsme, že expozice cigaretovému kouři ovlivňuje pravděpodobně koncentrace glutathion peroxidázy 3 (GPX3) v BALTe pacientů s EAA.

Dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje imunitní odpověď jedince, a tedy i odpověď na organické inhalační antigeny, je věk (113). Tento stav je popisován termínem imunosenescence, který zahrnuje především pokles funkce specifické imunity. Klesá zastoupení naivních lymfocytů, protože nejsou uvolňovány ani z thymu (T-lymfocyty) ani z kostní dřeně (B-lymfocyty). Dominují paměťové lymfocyty, které ale nejsou funkčně kompetentní (114). U starších osob bývají prokazovány vyšší koncentrace prozánětlivých cytokinů (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18 a TNF- $\alpha$ ) a pokles schopnosti neutrofilů fagocytovat. Dle výsledků naší práce se zdá, že věk může ovlivňovat i klinickou prezentaci EAA – starší pacienti mají v BALTe vyšší procentuální zastoupení neutrofilů a eozinofilů než pacienti mladší, což může být dáno mimo jiné posunem hematopoiezy směrem k myelopoéze (115).

## 6. Využití a možné využití získaných poznatků

Doporučené postupy diagnostiky a léčby EAA (85) – na základě zkušeností a poznatků získaných péčí o nemocné s touto chorobou vznikl doporučený postup diagnostiky a léčby tohoto onemocnění. Postup je akceptován Centry pro diagnostiku a léčbu intersticiálních plicních procesů a schválen ČPFS.

Slibnou molekulou, která by mohla najít využití v klinické praxi se dle výsledků našich výzkumů zdá být IL-4R $\alpha$ . Dosavadní data naznačují, že koncentrace IL-4R $\alpha$  v BALTe v době stanovení diagnózy koreluje s prognózou pacientů a zejména s odpovědí na systémovou kortikoterapii. Pokud se naše hypotéza potvrdí ve větším souboru pacientů, můžeme získat jednoduchý marker, který usnadní rozhodování o indikaci systémové kortikoterapie. U řady nemocných můžeme správně indikovanou – nebo spíše v tomto případě neindikovanou a nepodanou - léčbou předcházet rozvoji komplikací spojených s vedlejšími účinky systémové kortikoterapie. Zejména vzestup hmotnosti a rozvoj steroidní myopatie případně akcelerace arteriální hypertenze situaci nemocných s EAA dlouhodobě léčených systémovými kortikosteroidy nezlepšují.

Část pacientů s EAA neprofituje z léčby systémovými kortikosteroidy a navzdory zamezení expozice u nich dochází k progresi fibrotického plicního poškození v čase (78). U těchto nemocných je do léčby obvykle zaváděn azatioprin (eventuálně off label mykofenolát mofetilu), což v některých případech může vést ke stabilizaci onemocnění (116). Prospektivní klinická studie zaměřená na efektivitu těchto postupů ale provedena nikdy nebyla. Kazuisticky je zmiňováno užití rituximabu u nemocných s chronickou pregredující EAA (117), ale i zde chybí klinické studie přinášející důkazy o efektivitě tohoto postupu. Cesta interleukinu 4 a 13 hraje úlohu v patogenezi řady plicních nemocí včetně plicních fibróz. Nejvíce byly tyto cytokiny a jejich úloha v patogenezi studovány u nemocných s astma bronchiale a u pacientů s idiopatickou plicní fibrózou. Protože receptory pro oba interleukiny mají společné některé podjednotky (zejména IL-4R $\alpha$ ), byly navrženy bispecifické monoklonální protilátky proti oběma molekulám, tj. IL-4 a IL-13. Do klinické praxe vstoupila již pitrakinra (Aerovant<sup>TM</sup>, duální antagonist IL-4 a IL-13) – zatím pro pacienty s těžkým astmatem, u pacientů s idiopatickou plicní fibrózou je testována molekula SAR156597 (ukončeny studie fáze II). Výsledky našich výzkumů naznačují, že podobné

mechanismy se mohou uplatňovat i v patogenezi některých forem chronické EAA a část pacientů by mohla z podobných léčebných postupů profitovat.

Za zajímavé zjištění dále považujeme vliv BALTe nemocných s EAA na proliferační schopnosti primárních lidských fibroblastů. V BALTe nemocných s EAA byla prokázána přítomnost řady proteinů, cytokinů, chemokinů a růstových faktorů (118, 119, 120), které v lidském těle působí vždy paralelně. Je tedy otázkou, zda naše představy o úloze zánětu jako spouštěče fibrotizace plicní tkáně u nemocných s EAA nevycházejí z nevhodných modelů. Jako nejčastější experimentální model se používají myši C57BL/6, kterým je opakovaně intranazálně nebo intratracheálně podána *S. rectivirgula*. Výsledkem takovéto aplikace je rozvoj peribronchiálně vázaných mononukleárních infiltrátů, které charakterem a lokalizací připomínají situaci u nemocných se subakutní EAA (121). Podobně lze použít k instilaci *Mycobacterium immunogenum*, vzniklý stav je považován za model postižení vyvolaného expozicí kapalinám používaným při kovoobrábění (metal-working fluid) (122) nebo extrakt holubího trusu (pigeon dropping extract) (123). Jako model chronické EAA se používají myši C57BL/6, BALB/c a A/J exponované extraktu z holubího trusu vždy tři dny v týdnu po dobu 6-12 týdnů, využít lze ale i jiná schemata (124). Za “dospělou” je považována 4 měsíce stará myš (C57BL/6), za “geriatrickou”, alespoň z pohledu hematopoezy je považována myš ve věku 20-24 měsíců. Kromě věku se tato zvířata od lidské populace liší také charakterem expozice, komorbiditami, expozicí dalším inhalačním antigenům včetně tabákového kouře.

Námi provedené výzkumy prokázaly, že k výzkumu mechanismů, které vedou k rozvoji EAA je výhodnější použít komplexní lidský biologický material – tzn. BALTe nebo přímo buňky získané alveolární laváží u konkrétního pacienta s EAA. Při hodnocení výsledků je nezbytně nutné přihlédnout ke klinickému obrazu onemocnění.

## 7. Literatura

1. Singh S, Collins B, Sharma BB et al. Interstitial Lung Disease (ILD) in India: Results of a Prospective Registry. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 195: 801-81320.
2. Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin JC, Ando M, Morell F, Erkinjuntti-Pekkanen R, Muller N, Colby TV, Schuyler M, Cormier Y, HP Study Group. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:952–958.
3. Morell F, Reyes L, Domenech G, Gracia J, Majo J, Ferrer J. Diagnoses and diagnostic procedures in 500 consecutive patients with clinical suspicion of interstitial lung disease. *Arch bronconeumol* 2008; 44(4): 185-81.
4. [http://www.szu.cz/uploads/NZP/Hlaseni\\_odhlaseni\\_2014.pdf](http://www.szu.cz/uploads/NZP/Hlaseni_odhlaseni_2014.pdf), staženo 27.5.2017
5. Arya A, Roychoudhury K, Bredin CP. Farmer's lung is now in decline. *Ir Med J* 2006; 99(7):203-5.
6. Metzger F, Haccuria A, Reboux G, Nolard N, Dalphin JC, De Vuyst P. Hypersensitivity pneumonitis due to molds in a saxophone player. *Chest* 2010;138(3):724-6.
7. Kupeli E, Karnak D, Sak SD, Kayacan O. Hazards of the 'hard cash': hypersensitivity pneumonitis. *Can Respir J* 2010;17(5):e102-5.
8. Amano Y, Enomoto M, Bando M, Kawakami M, Sugiyama Y. Hypersensitivity pneumonitis in a greenhouse rose grower. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 2009;47(10):960-4.
9. Otera H, Tada K, Sakurai T, Hashimoto K, Ikeda A. Hypersensitivity pneumonitis associated with inhalation of catechin-rich green tea extracts. *Respiration* 2011;82(4):388-92.
10. Morell F, Cruz MJ, Gómez FP, Rodriguez-Jerez F, Xaubet A, Muñoz X. Chacinero's lung - hypersensitivity pneumonitis due to dry sausage dust. *Scand J Work Environ Health* 2011;37(4):349-56.
11. Lacasse Y, Girard M, Cormier Y. Recent advances in hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 2012;142(1):208-17.
12. Merget R, Sander I, Ewig S, Sennekamp J, Bruening T. Consort hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 2009;33(5):1223-5.

13. Taj A. Docetaxel-induced hypersensitivity pneumonitis mimicking lymphangitic carcinomatosis in a patient with metastatic adenocarcinoma of the lung. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2013;6(3-4):117-9.
14. Kline JN, Doekes G, Bønløkke J, Hoffman HJ, Essen SV, Zhai R. Working Group report 3: sensitivity to organic dusts--atopy and gene polymorphisms. *Am J Ind Med* 2004;46(4):416-8.
15. Aquino-Galvez A, Camarena A, Montaña M, Juárez A, Zamora AC, González-Avila G, Checa M, Sandoval-López G, Vargas-Alarcon G, Granados J, Pardo A, Zúñiga J, Selman M. Transporter associated with antigen processing (TAP) 1 gene polymorphisms in patients with hypersensitivity pneumonitis. *Exp Mol Pathol* 2008;84(2):173-7.
16. Camarena A, Aquino-Galvez A, Falfán-Valencia R, Sánchez G, Montaña M, Ramos C, Juárez A, García-de-Alba C, Granados J, Selman M. PSMB8 (LMP7) but not PSMB9 (LMP2) gene polymorphisms are associated to pigeon breeder's hypersensitivity pneumonitis. *Respir Med* 2010;104(6):889-94.
17. Falfán-Valencia R, Camarena A, Pineda CL, Montaña M, Juárez A, Buendía-Roldán I, Pérez-Rubio G, Reséndiz-Hernández JM, Páramo I, Vega A, Granados J, Zúñiga J, Selman M. Genetic susceptibility to multicase hypersensitivity pneumonitis is associated with the TNF-238 GG genotype of the promoter region and HLA-DRB1\*04 bearing HLA haplotypes. *Respir Med* 2014;108(1):211-7.
18. Vassallo R. Viral-induced inflammation in interstitial lung diseases. *Semin Respir Infect.* 2003;18(1):55-60.
19. Gudmundsson G, Monick MM, Hunninghake GW. Viral infection modulates expression of hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol* 1999;162(12):7397-401.
20. Bougiouklis PA. Avian circoviruses of the genus Circovirus: A potential trigger in Pigeon breeder's lung (PBL)/Bird fancier's lung (BFL). *Med Hypotheses* 2007;68(2):320-3.
21. Dakhama A, Hegele RG, Laflamme G, Israël-Assayag E, Cormier Y. Common respiratory viruses in lower airways of patients with acute hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(4 Pt 1):1316-22.
22. Rijavec M, Volarevic S, Osolnik K, Kosnik M, Korosec P. Natural killer T cells in pulmonary disorders. *Respir Med* 2011;105 Suppl 1:S20-5.

23. Kim JH, Kim HS, Kim HY, Oh SJ, Chung DH. Direct engagement of TLR4 in invariant NKT cells regulates immune diseases by differential IL-4 and IFN- $\gamma$  production in mice. *PLoS One* 2012;7(9):e45348.
24. Hasan SA, Eksteen B, Reid D, Paine HV, Alansary A, Johansson K, Gwozd C, Goring KA, Vo T, Proud D, Kelly MM. Role of IL-17A and neutrophils in fibrosis in experimental hypersensitivity pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131(6):1663-73.
25. Ye Q, Nakamura S, Sarria R, Costabel U, Guzman J. Interleukin 12, interleukin 18, and tumor necrosis factor alpha release by alveolar macrophages: acute and chronic hypersensitivity pneumonitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2009;102(2):149-54.
26. Sato A. Basic and clinical aspects of bronchus-associated lymphoid tissue. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 2000;38(1):3-11.
27. Sogkas G, Vögtle T, Rau E, Gewecke B, Stegner D, Schmidt RE, Nieswandt B, Gessner JE. Orai1 controls C5a-induced neutrophil recruitment in inflammation. *Eur J Immunol* 2015;45(7):2143-53.
28. Yoshizawa Y, Nomura A, Ohdama S, Tanaka M, Morinari H, Hasegawa S. The significance of complement activation in the pathogenesis of hypersensitivity pneumonitis: sequential changes of complement components and chemotactic activities in bronchoalveolar lavage fluids. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988;87(4):417-23.
29. Hwang SJ, Kim HS, Chung DH. Fas/Fas ligand-mediated apoptosis promotes hypersensitivity pneumonitis in mice by enhancing maturation of dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181(11):1250-61.
30. Ranasinghe C, Trivedi S, Wijesundara DK, Jackson RJ. IL-4 and IL-13 receptors: Roles in immunity and powerful vaccine adjuvants. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014;25(4):437-42.
31. Cai M, Bonella F, He X, Sixt SU, Sarria R, Guzman J, Costabel U. CCL18 in serum, BAL fluid and alveolar macrophage culture supernatant in interstitial lung diseases. *Respir Med* 2013;107(9):1444-52.
32. Butler NS, Monick MM, Yarovinsky TO, Powers LS, Hunninghake GW. Altered IL-4 mRNA stability correlates with Th1 and Th2 bias and susceptibility to hypersensitivity pneumonitis in two inbred strains of mice. *J Immunol* 2002;169(7):3700-9.

33. Hwang SJ, Kim S, Park WS, Chung DH. IL-4-secreting NKT cells prevent hypersensitivity pneumonitis by suppressing IFN-gamma-producing neutrophils. *J Immunol* 2006;177(8):5258-68.
34. Wallace WA, Howie SE. Immunoreactive interleukin 4 and interferon-gamma expression by type II alveolar epithelial cells in interstitial lung disease. *J Pathol* 1999;187(4):475-80.
35. Sterclova M, Matej R, Mandakova P, Skibova J, Vasakova M. Role of interleukin 4 and its receptor in clinical presentation of chronic extrinsic allergic alveolitis: a pilot study. *Multidiscip Respir Med* 2013;8(1):35.
36. Aoki M, Yamaguchi R, Yamamoto T, Ishimaru Y, Ono T, Sakamoto A, Narahara S, Sugiuchi H, Hirose E, Yamaguchi Y. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor primes interleukin-13 production by macrophages via protease-activated receptor-2. *Blood Cells Mol Dis* 2015;54(4):353-9.
37. Matěj R, Smětáková M, Vašáková M, Nováková J, Sterclová M, Kukul J, Olejár T. PAR-2, IL-4R, TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  in bronchoalveolar lavage distinguishes extrinsic allergic alveolitis from sarcoidosis. *Exp Ther Med* 2014;8(2):533-538.
38. Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 2004;84(2):579-621.
39. Cottrell GS, Coelho AM, Bunnett NW. Protease-activated receptors: the role of cell-surface proteolysis in signalling. *Essays Biochem* 2002;38:169-83.
40. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNF $\alpha$  in pulmonary pathophysiology. *Respir Res* 2006;7:125.
41. Orihara K, Matsuda A. Pathophysiological roles of microvascular alterations in pulmonary inflammatory diseases: possible implications of tumor necrosis factor-alpha and CXC chemokines. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2008;3(4):619-27.
42. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003;10(1):45-65.
43. Kondoh K, Usui Y, Ohtani Y, Inase N, Miyake S, Yoshizawa Y. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms in hypersensitivity pneumonitis. *J Med Dent Sci* 2006;53(1):75-83.



44. Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, Kos-Kudła B. Transforming growth factor  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) in physiology and pathology. *Endokrynol Pol* 2013;64(5):384-96.
45. Denis M, Ghadirian E. Transforming growth factor-beta is generated in the course of hypersensitivity pneumonitis: contribution to collagen synthesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;7(2):156-60.
46. Szlubowski A, Soja J, Grzanka P, Tomaszewska R, Papla B, Kuzdzał J, Cmiel A, Śladek K. TGF-beta1 in bronchoalveolar lavage fluid in diffuse parenchymal lung diseases and high-resolution computed tomography score. *Pol Arch Med Wewn* 2010;120(7-8):270-5.
47. Mukaida N. Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284(4):L566-77.
48. Cui A, Anhenn O, Theegarten D, Ohshimo S, Bonella F, Sixt SU, Peters J, Sarria R, Guzman J, Costabel U. Angiogenic and angiostatic chemokines in idiopathic pulmonary fibrosis and granulomatous lung disease. *Respiration* 2010;80(5):372-8.
49. Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc J, Skibova J, Striz I. Bronchoalveolar lavage fluid cellular characteristics, functional parameters and cytokine and chemokine levels in interstitial lung diseases. *Scand J Immunol* 2009;69(3):268-74.
50. Walz A, Schmutz P, Mueller C, Schnyder-Candrian S. Regulation and function of the CXC chemokine ENA-78 in monocytes and its role in disease. *J Leukoc Biol* 1997;62(5):604-11.
51. Sterclova M, Vasakova M, Pavlicek J, Metlicka M, Krasna E, Striz I. Chemokine receptors in a regulation of interstitial lung fibrosis and inflammation. *Exp Lung Res* 2009;35(6):514-23
52. Papaioannou AI, Kostikas K, Kollia P, Gourgoulis KI. Clinical implications for vascular endothelial growth factor in the lung: friend or foe? *Respir Res* 2006;7:128.
53. Navarro C, Ruiz V, Gaxiola M, Carrillo G, Selman M. Angiogenesis in hypersensitivity pneumonitis. *Arch Physiol Biochem* 2003;111(4):365-8.
54. Willems S, Verleden SE, Vanaudenaerde BM, Wynants M, Doms C, Yserbyt J, Somers J, Verbeken EK, Verleden GM, Wuyts WA. Multiplex protein

- profiling of bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis and hypersensitivity pneumonitis. *Ann Thorac Med* 2013;8(1):38-45.
55. Mangoni M, Vozenin MC, Biti G, Deutsch E. Normal tissues toxicities triggered by combined anti-angiogenic and radiation therapies: hurdles might be ahead. *Br J Cancer* 2012;107(2):308-14.
56. Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol* 2011;89(2):207-15.
57. Martina S, Martina V, Monika M, Jan P, Libor K, Ilja S. Angiostatic versus angiogenic chemokines in IPF and EAA. *Respir Med* 2009;103(11):1651-6.
58. Kishi M, Miyazaki Y, Jinta T, Furusawa H, Ohtani Y, Inase N, Yoshizawa Y. Pathogenesis of cBFL in common with IPF? Correlation of IP-10/TARC ratio with histological patterns. *Thorax* 2008;63(9):810-6.
59. Singh AK, Arya RK, Trivedi AK, Sanyal S, Baral R, Dormond O, Briscoe DM, Datta D. Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013;24(1):41-9.
60. Nance S, Cross R, Fitzpatrick E. Chemokine production during hypersensitivity pneumonitis. *Eur J Immunol* 2004;34(3):677-85.
61. Guo RF, Lentsch AB, Warner RL, Huber-Lang M, Sarma JV, Hlaing T, Shi MM, Lukacs NW, Ward PA. Regulatory effects of eotaxin on acute lung inflammatory injury. *J Immunol* 2001;166(8):5208-18.
62. Ota C, Baarsma HA, Wagner DE, Hilgendorff A, Königshoff M. Linking bronchopulmonary dysplasia to adult chronic lung diseases: role of WNT signaling. *Mol Cell Pediatr* 2016;3(1):34.
63. Königshoff M, Kramer M, Balsara N, Wilhelm J, Amarie OV, Jahn A, Rose F, Fink L, Seeger W, Schaefer L, Günther A, Eickelberg O. WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2009;119(4):772-87.
64. Rydell-Törmänen K, Zhou XH, Hallgren O, Einarsson J, Eriksson L, Andersson-Sjöland A, Westergren-Thorsson G. Aberrant nonfibrotic parenchyma in idiopathic pulmonary fibrosis is correlated with decreased  $\beta$ -catenin inhibition and increased Wnt5a/b interaction. *Physiol Rep* 2016;4(5). pii: e12727.

65. Craig VJ, Zhang L, Hagood JS, Owen CA. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015;53(5):585-600.
66. Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173(2):188-98.
67. Guiot J, Moermans C, Henket M, Corhay JL, Louis R. Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung* 2017. doi: 10.1007/s00408-017-9993-5.
68. Vasakova M, Morell F, Walsh S, Leslie K, Raghu G. Hypersensitivity Pneumonitis: Perspectives in Diagnosis and Management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Jun 9. doi: 10.1164/rccm.201611-2201PP.
69. Raghu G, Remy-Jardin M, Ryerson CJ, et al. Diagnosis of hypersensitivity pneumonitis in adults. An official ATS/JRS/ALAT Clinical practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* 2020; 3: e36-e69.
70. Flaherty KR, Wells AU, Cottin V, et al.; INBUILD Trial Investigators. Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *N Engl J Med* 2019;381:1718-1727.
71. Soumagne T, Pana-Katatali H, Degano B, Dalphin JC. Combined pulmonary fibrosis and emphysema in hypersensitivity pneumonitis. *BMJ Case Rep* 2015;2015. pii: bcr2015211560.
72. Hanak V, Golbin JM, Ryu JH. Causes and presenting features in 85 consecutive patients with hypersensitivity pneumonitis. *Mayo Clin Proc* 2007;82(7):812-6.
73. Morell F, Roger A, Cruz MJ. Usefulness of specific skin tests in the diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110(6):939.
74. Morell F, Villar A, Ojanguren I, Muñoz X, Cruz MJ. Hypersensitivity Pneumonitis: Challenges in Diagnosis and Management, Avoiding Surgical Lung Biopsy. *Semin Respir Crit Care Med* 2016;37(3):395-405.
75. Merget R, Sander I, van Kampen V, Raulf-Heimsoth M, Rabente T, Kolk A, Brüning T. Hypersensitivity pneumonitis due to metalworking fluids: how to find the antigens. *Adv Exp Med Biol* 2013;788:335-40.

76. Nowicka U, Wiatr E, Radzikowska E, Martusewicz-Boros M, Boros P, Fijolek J, Jakubowska L, Szamotulska K, Roszkowski-Śliż K. Pulmonary Function Abnormalities in Regard to Age at the Time of Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis. *Adv Exp Med Biol* 2015;861:75-84.
77. Chan AL, Juarez MM, Leslie KO, Ismail HA, Albertson TE. Bird fancier's lung: a state-of-the-art review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012;43(1-2):69-83.
78. Glazer CS. Chronic hypersensitivity pneumonitis: important considerations in the work-up of this fibrotic lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2015;21(2):171-7.
79. Spagnolo P, Rossi G, Cavazza A, Bonifazi M, Paladini I, Bonella F, Sverzellati N, Costabel U. Hypersensitivity Pneumonitis: A Comprehensive Review. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2015;25(4):237-50
80. Poletti V, Ravaglia C, Gurioli C, Piciocchi S, Dubini A, Cavazza A, Chilosi M, Rossi A, Tomassetti S. Invasive diagnostic techniques in idiopathic interstitial pneumonias. *Respirology* 2016;21(1):44-50.
81. Grunes D, Beasley MB. Hypersensitivity pneumonitis: a review and update of histologic findings. *J Clin Pathol* 2013;66(10):888-95.
82. Smith ML. Update on Pulmonary Fibrosis: Not All Fibrosis Is Created Equally. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140(3):221-9.
83. Romeo L, Dalle Molle K, Zanoni G, Peretti A, Marangi G, Conrado LG, Aragón A, Perbellini L. Respiratory health effects and immunological response to *Thermoactinomyces* among sugar cane workers in Nicaragua. *Int J Occup Environ Health* 2009;15(3):249-54.
84. Kokkarinen JI, Tukiainen HO, Terho EO. Effect of corticosteroid treatment on the recovery of pulmonary function in farmer's lung. *Am Rev Respir Dis* 1992;145(1):3-5.
85. Šterclová M. Doporučený postup diagnostiky a léčby EAA. Dostupné na [www.pneumologie.cz](http://www.pneumologie.cz)
86. Chung JH, Zhan X, Cao M, Koelsch TL, Gomez DC, Brown KK, Lynch DA, Russell G, Fernández Pérez ER. Presence of Air-Trapping and Mosaic Attenuation on Chest CT Predicts Survival in Chronic Hypersensitivity Pneumonitis. *Ann Am Thorac Soc* 2017 May 17. doi: 10.1513/AnnalsATS.201701-035OC.

87. Jacob J, Bartholmai BJ, Egashira R, Brun AL, Rajagopalan S, Karwoski R, Kokosi M, Hansell DM, Wells AU. Chronic hypersensitivity pneumonitis: identification of key prognostic determinants using automated CT analysis. *BMC Pulm Med* 2017;17(1):81.
88. Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin JC, Morell F, Erkinjuntti-Pekkanen R, Mueller NL, Colby TV, Schuyler M, Jomphe V, Cormier Y; HP Study Group.. Classification of hypersensitivity pneumonitis: a hypothesis. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149(2):161-6.
89. Silva CI, Churg A, Müller NL. Hypersensitivity pneumonitis: spectrum of high-resolution CT and pathologic findings. *AJR Am J Roentgenol* 2007;188(2):334-44.
90. Jacob J, Bartholmai BJ, Rajagopalan S, Karwoski R, Mak SM, Mok W, Della Casa G, Sugino K, Walsh SL, Wells AU, Hansell DM. Automated computer-based CT stratification as a predictor of outcome in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Radiol* 2017 Jan 27. doi: 10.1007/s00330-016-4697-4.
91. Espoladore LM, Gregório BB, Lima MS, de Pereira CA, Soares MR, Coletta EN. Cytological analysis of bronchoalveolar lavage in patients with interstitial lung diseases and the relation of cytological analysis to fibrosis in high-resolution computed tomography. *Anal Quant Cytopathol Histopathol* 2014;36(4):206-12.
92. Gaxiola M, Buendía-Roldán I, Mejía M, Carrillo G, Estrada A, Navarro MC, Rojas-Serrano J, Selman M. Morphologic diversity of chronic pigeon breeder's disease: clinical features and survival. *Respir Med* 2011;105(4):608-14.
93. Caillaud DM, Vergnon JM, Madroszyk A, Melloni BM, Murriss M, Dalphin JC; French Group of Environmental Immunoallergic Bronchopulmonary Diseases.. Bronchoalveolar lavage in hypersensitivity pneumonitis: a series of 139 patients. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2012;11(1):15-9.
94. Wang P, Jones KD, Urisman A, Elicker BM, Urbania T, Johansson KA, Assayag D, Lee J, Wolters PJ, Collard HR, Koth LL. Pathological Findings and Prognosis in a Large Prospective Cohort of Chronic Hypersensitivity Pneumonitis. *Chest*. 2017 Feb 18. pii: S0012-3692(17)30220-9. doi: 10.1016/j.chest.2017.02.011.

95. Gifford AH, Matsuoka M, Ghoda LY, Homer RJ, Enelow RI. Chronic inflammation and lung fibrosis: pleiotropic syndromes but limited distinct phenotypes. *Mucosal Immunol* 2012;5(5):480-4.
96. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006;441:431–436.
97. Waldner MJ, Neurath MF. Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. *Semin Immunopathol* 2009;31:249–256.
98. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, Lidereau R, Mariette C, Chaput N, Mira JP, Delaloue S, et al. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 2007a;220:47–59.
99. Zhang B, Bowerman NA, Salama JK, Schmidt H, Spiotto MT, Schietinger A, Yu P, Fu YX, Weichselbaum RR, Rowley DA, et al. Induced sensitization of tumor stroma leads to eradication of established cancer by T cells. *J Exp Med* 2007;204:49–55.
100. Zúñiga J, Torres-García D, Jimenez L, Ramírez-Martínez G, Juárez-Nicolás F, Mujica F, Romero LT, Acuña V, Cruz-Lagunas A, Ruíz-Saavedra D, Ramos C, Montaña M, Mendoza-Milla C, Vargas-Alarcón G, Pardo A, Selman M. PDCD1 gene polymorphisms in different Mexican ethnic groups and their role in the susceptibility to hypersensitivity pneumonitis. *Clin Biochem* 2010;43(10-11):929-31.
101. Hill MR, Briggs L, Montaña MM, Estrada A, Laurent GJ, Selman M, Pardo A. Promoter variants in tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) protect against susceptibility in pigeon breeders' disease. *Thorax* 2004;59(7):586-90.
102. McLoughlin RM, Hurst SM, Nowell MA, Harris DA, Horiuchi S, Morgan LW, Wilkinson TS, Yamamoto N, Topley N, Jones SA. Differential regulation of neutrophil-activating chemokines by IL-6 and its soluble receptor isoforms. *J Immunol* 2004;172(9):5676-83.
103. Morales M, Iraola V, Leonor JR, Carnés J. Enzymatic activity of allergenic house dust and storage mite extracts. *J Med Entomol* 2013;50(1):147-54.
104. Roy RM, Klein BS. Fungal glycan interactions with epithelial cells in allergic airway disease. *Curr Opin Microbiol* 2013;16(4):404-8.

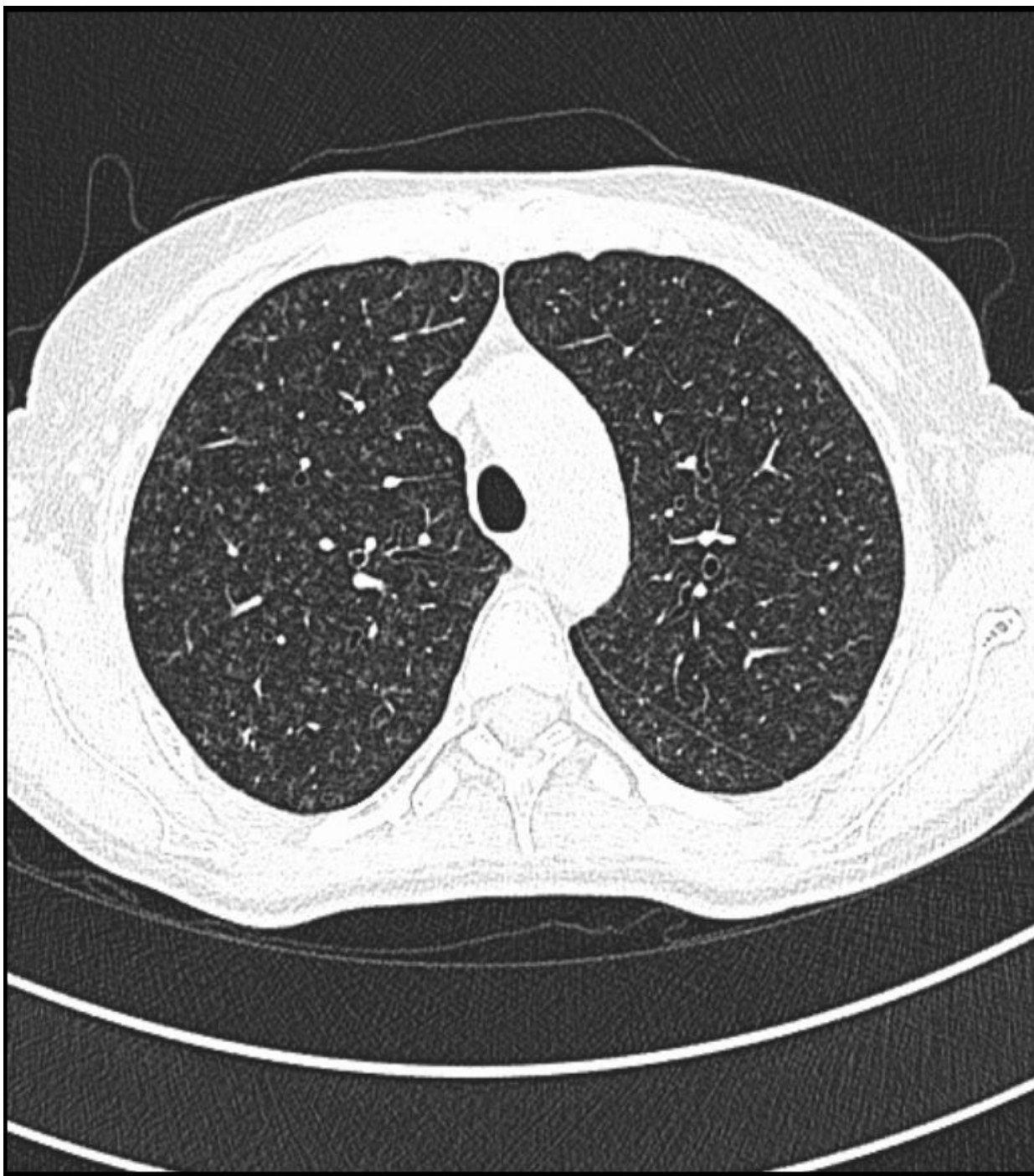
105. Sennekamp J, Joest M, Sander I, Engelhart S, Raulf-Heimsoth M. Farmer's lung antigens in Germany. *Pneumologie* 2012;66(5):297-301.
106. Gbaguidi-Haore H, Roussel S, Reboux G, Dalphin JC, Piarroux R. Multilevel analysis of the impact of environmental factors and agricultural practices on the concentration in hay of microorganisms responsible for farmer's lung disease. *Ann Agric Environ Med* 2009;16(2):219-25.
107. Fernández Pérez ER, Swigris JJ, Forssén AV, Tourin O, Solomon JJ, Huie TJ, Olson AL, Brown KK. Identifying an inciting antigen is associated with improved survival in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 2013;144(5):1644-51.
108. Furuiye M, Miyake S, Miyazaki Y, Ohtani Y, Inase N, Umino T, Yoshizawa Y. Effect of cigarette smoking on the development of murine chronic pigeon breeder's lung. The difference between a short-term and a long-term exposure. *J Med Dent Sci* 2007;54(1):87-95.
109. Ohtsuka Y, Munakata M, Tanimura K, Ukita H, Kusaka H, Masaki Y, Doi I, Ohe M, Amishima M, Homma Y, et al. Smoking promotes insidious and chronic farmer's lung disease, and deteriorates the clinical outcome. *Intern Med* 1995;34(10):966-71.
110. Rooney AP, Swezey JL, Wicklow DT, McAtee MJ. Bacterial species diversity in cigarettes linked to an investigation of severe pneumonitis in U.S. Military personnel deployed in operation iraqi freedom. *Curr Microbiol* 2005;51(1):46-52.
111. Huuskonen MS, Husman K, Järvisalo J, Korhonen O, Kotimaa M, Kuusela T, Nordman H, Zitting A, Mäntyjärvi R. Extrinsic allergic alveolitis in the tobacco industry. *Br J Ind Med* 1984;41(1):77-83.
112. Lee CH, Pan KL, Tang YC, Tsai MH, Cheng AJ, Shen MY, Cheng YM, Huang TT, Lin P. LDOC1 silenced by cigarette exposure and involved in oral neoplastic transformation. *Oncotarget* 2015;6(28):25188-201.
113. Castle SC. Clinical Relevance of Age-Related Immune Dysfunction. *Clin Infect Dis* 2000; 31 (2): 578-585.
114. Weng NP. Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? *Immunity* 2006;24(5):495-9.
115. Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc Biol Sci* 2015;282(1821):20143085.

116. Morisset J, Johannson KA, Vittinghoff E, Aravena C, Elicker BM, Jones KD, Fell CD, Manganas H, Dubé BP, Wolters PJ, Collard HR, Ryerson CJ, Ley B. Use of Mycophenolate Mofetil or Azathioprine for the Management of Chronic Hypersensitivity Pneumonitis. *Chest* 2017;151(3):619-625.
117. Lota HK, Keir GJ, Hansell DM, Nicholson AG, Maher TM, Wells AU, Renzoni EA. Novel use of rituximab in hypersensitivity pneumonitis refractory to conventional treatment. *Thorax* 2013;68(8):780-1.
118. Mroz RM, Korniluk M, Stasiak-Barmuta A, Chyczewska E Upregulation of Th1 cytokine profile in bronchoalveolar lavage fluid of patients with hypersensitivity pneumonitis. *J Physiol Pharmacol* 2008;59 Suppl 6:499-505.
119. Teirilä L, Karvala K, Ahonen N, Riska H, Pietinalho A, Tuominen P, Piirilä P, Puustinen A, Wolff H. Proteomic changes of alveolar lining fluid in illnesses associated with exposure to inhaled non-infectious microbial particles. *PLoS One* 2014;9(7):e102624.
120. Okamoto T, Miyazaki Y, Shirahama R, Tamaoka M, Inase N. Proteome analysis of bronchoalveolar lavage fluid in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Allergol Int* 2012;61(1):83-92.
121. Ishizuka M, Miyazaki Y, Masuo M, Suhara K, Tateishi T, Yasui M, Inase N. Interleukin-17A and Neutrophils in a Murine Model of Bird-Related Hypersensitivity Pneumonitis. *PLoS One* 2015;10(9):e0137978.
122. Johansson E, Boivin GP, Yadav JS. Early immunopathological events in acute model of mycobacterial hypersensitivity pneumonitis in mice. *J Immunotoxicol* 2017;14(1):77-88.
123. Mitaka K, Miyazaki Y, Yasui M, Furuie M, Miyake S, Inase N, Yoshizawa Y. Th2-biased immune responses are important in a murine model of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;154(3):264-74.
124. Andrews K, Ghosh MC, Schwingshackl A, Rapalo G, Luellen C, Waters CM, Fitzpatrick EA. Chronic hypersensitivity pneumonitis caused by *Saccharopolyspora rectivirgula* is not associated with a switch to a Th2 response. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016; 310(5):L393-402.

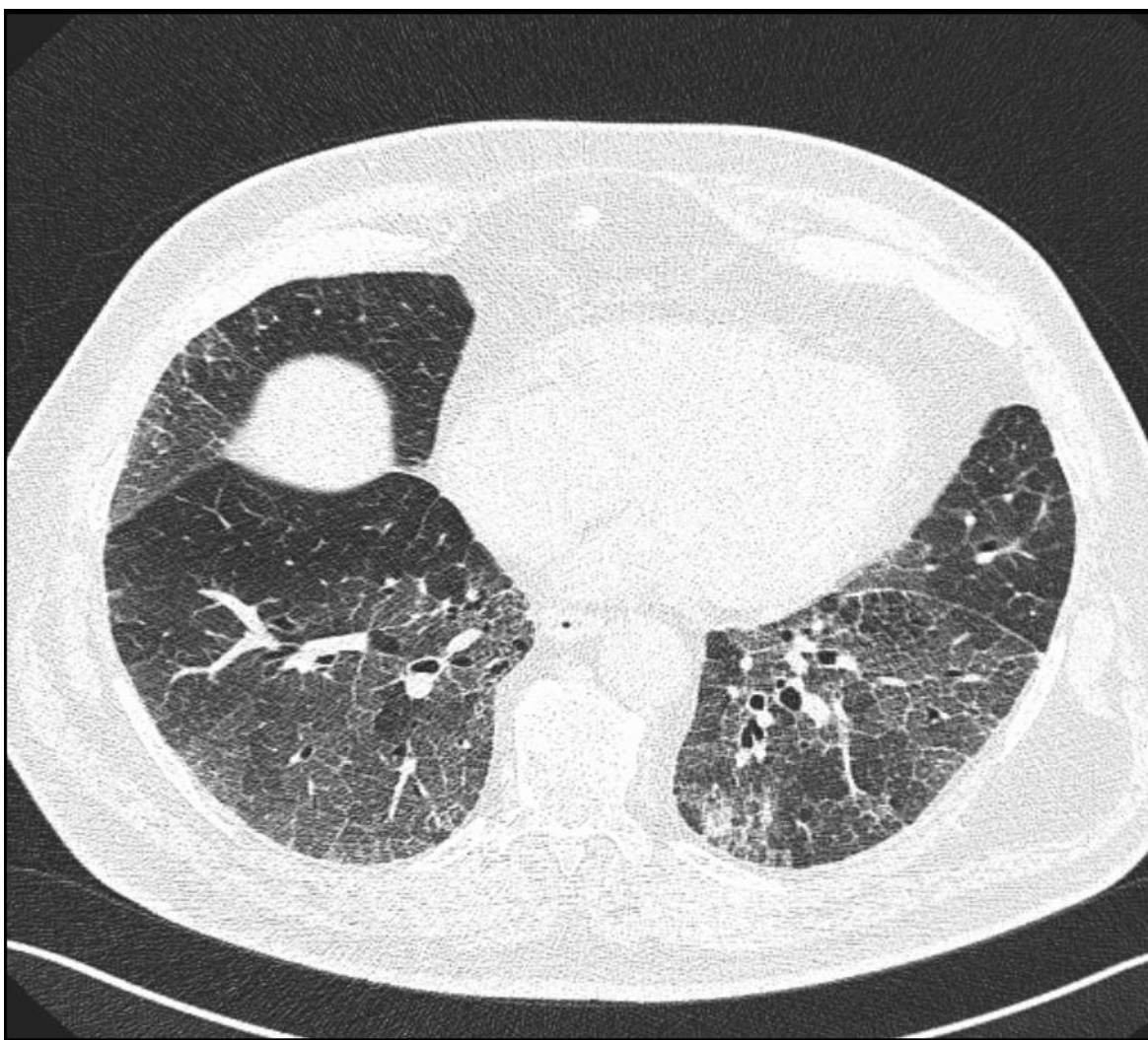


## 8. Příloha

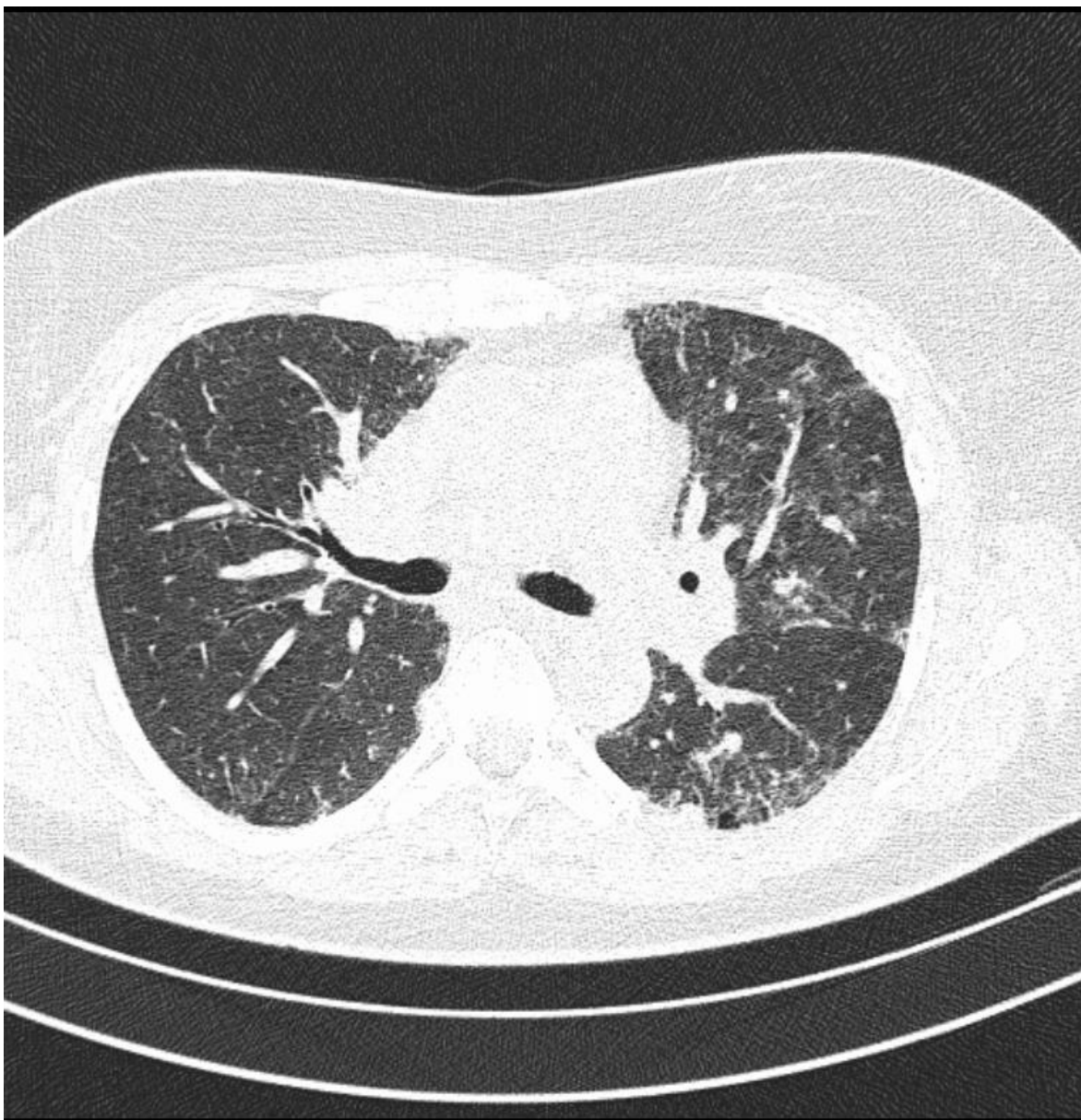
8.1 Obr. 1 HRCT obraz nefibrotického postižení při EAA – bilaterálně difuzně patrný centrilobulární noduly



8.2 Obr. 2 HRCT obraz mlhovitých opacit a mozaikové perfúze u pacienta s nefibrotickou EAA



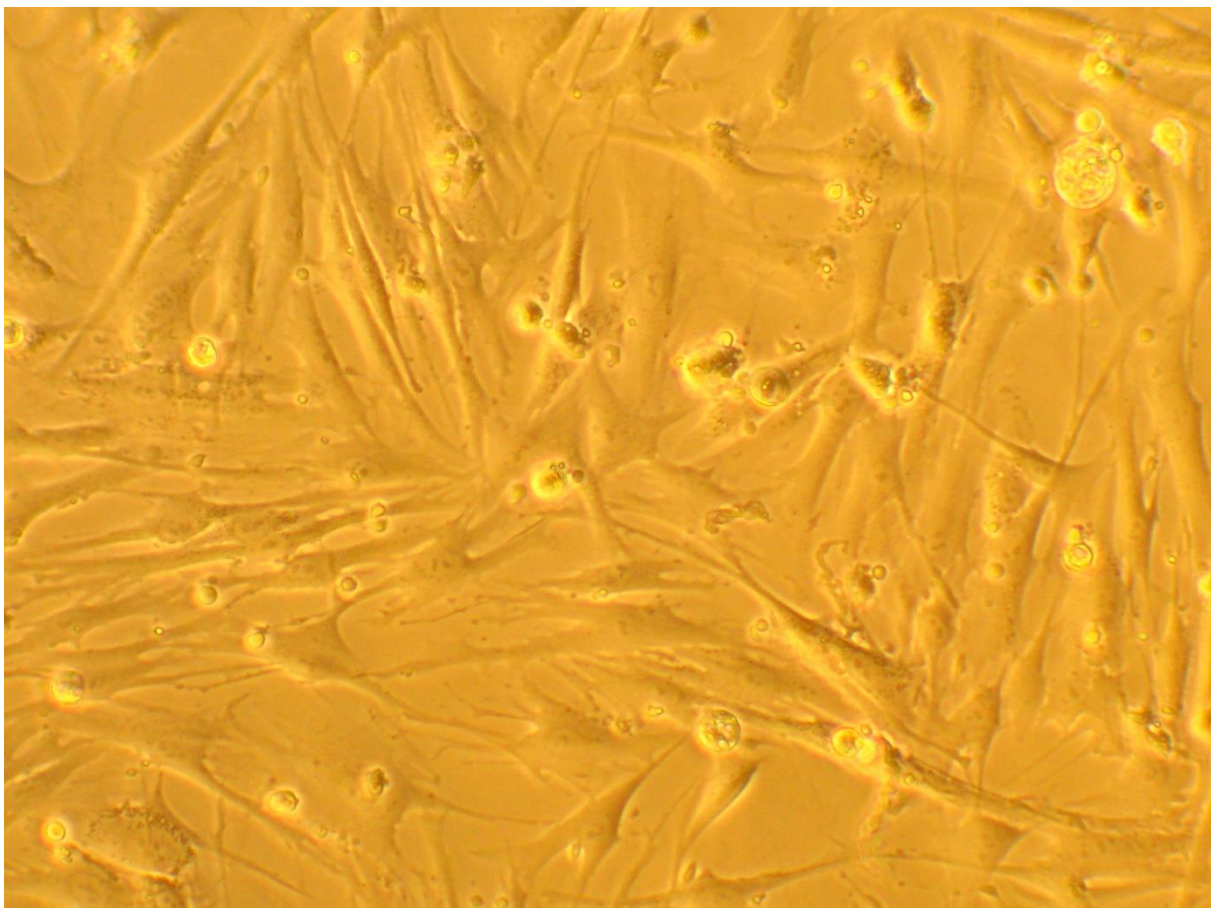
8.3 Obr. 3 HRCT obraz kombinovaného postihu s mlhovitými opacitami a zesílením interlobulárných sept u nemocné s fibrotickou EAA



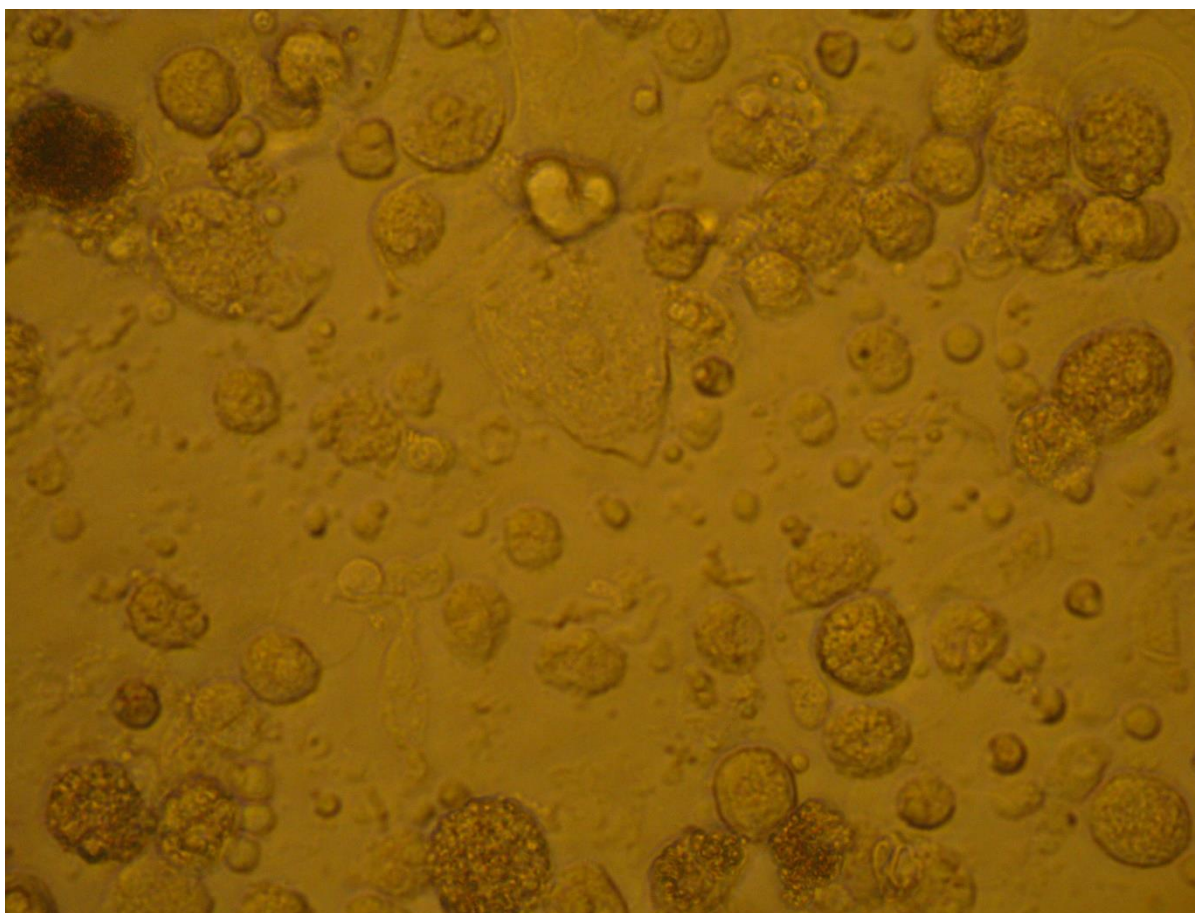
8.4 Obr. 4 HRCT obraz obvyklé intersticiální pneumonie (UIP) u nemocného s fibrotickou EAA



8.5 Obr. 5 Konfluentní kultura buněčné linie lidských fibroblastů (zvětšení 10x100, nativně)

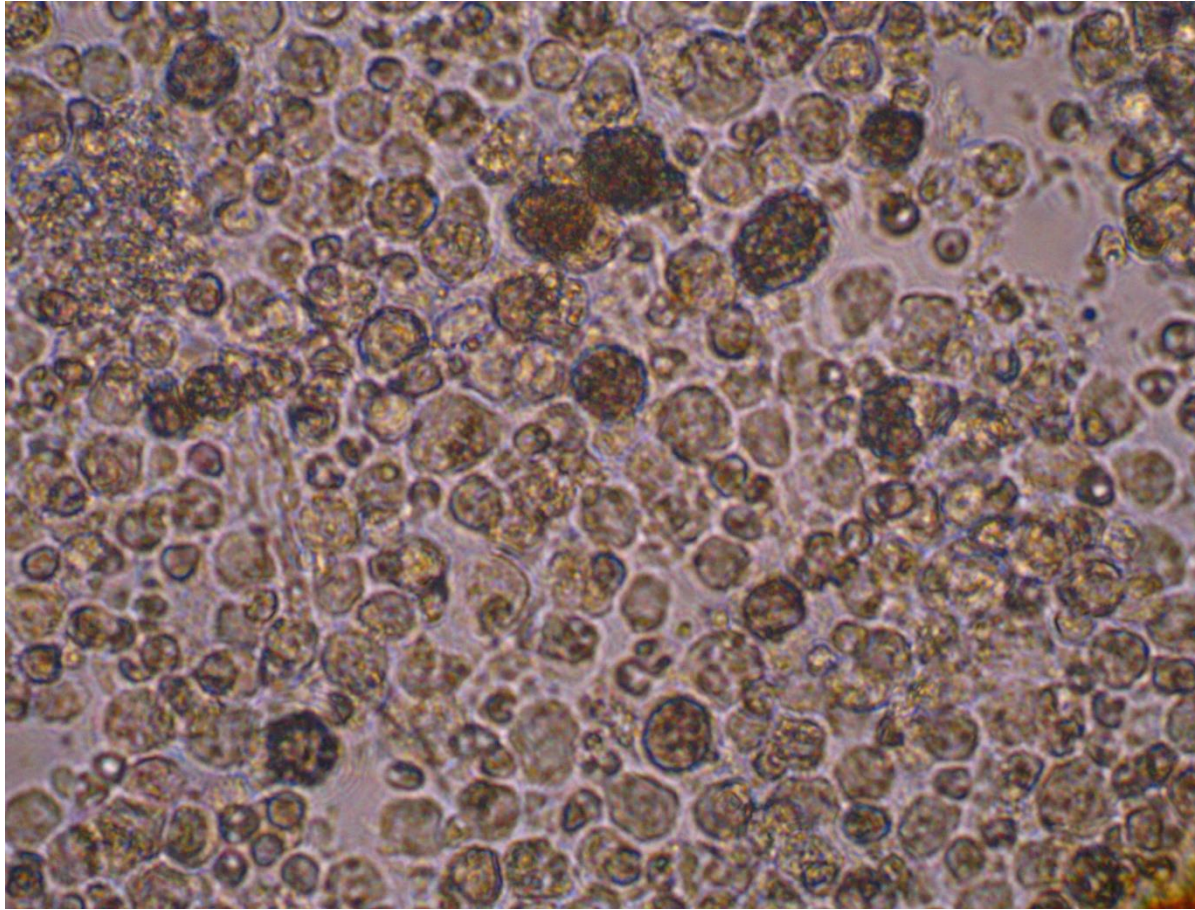


8.6 Obr. 6 Buňky získané bronchoalveolární laváží pacientů s EAA kultivované v různých médiích



a)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium, po týdnu kultivace (zvětšení 10x100, nativně)



b)

RPMI 1640 médium, týden kultivace (zvětšení 10x100, nativně)

## 9. Výsledky uvedené v kapitole 4

### 4.1 Vztah radiologického obrazu onemocnění s klinickými parametry

a. Sterclova M, Vasakova M, Dutka J, Kalanin J. Extrinsic allergic alveolitis: comparative study of the bronchoalveolar lavage profiles and radiological presentation. Postgrad Med J 2006; 82: 598-601.

[Extrinsic allergic alveolitis: comparative study of the bronchoalveolar lavage profiles and radiological presentation \(nih.gov\)](#)

### 4.2 Porovnání chemokinového prostředí v BALTe pacientů s EAA a pacientů se sarkoidózou a IPF

a. Sterclova M, Vasakova M, Metlicka M, Pavlicek J, Kolesar L, Striz I. Angiostatic versus angiogenic chemokines in IPF and EAA. Respiratory Medicine 2009; 103: 1651-1656.

[Angiostatic versus angiogenic chemokines in IPF and EAA - Respiratory Medicine \(resmedjournal.com\)](#)

b. Sterclova M, Vasakova M, Pavlicek J, Metlicka M, Krasna E, Striz I. Chemokine receptors in a regulation of interstitial lung fibrosis and inflammation. Exp Lung Res 2009; 35:514-523.

[Chemokine receptors in a regulation of interstitial lung fibrosis and inflammation - PubMed \(nih.gov\)](#)

c. Vasakova M, Sterclova M, Kolesar L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc J, Skibova J, Striz I. Bronchoalveolar lavage fluid cellular characteristics, functional parameters and cytokine and chemokine levels in interstitial lung diseases. Scand J Immunol 2009; 69: 268-274.

[Bronchoalveolar Lavage Fluid Cellular Characteristics, Functional Parameters and Cytokine and Chemokine Levels in Interstitial Lung Diseases - Vasakova - 2009 - Scandinavian Journal of Immunology - Wiley Online Library](#)



#### 4.3 Průkaz vlivu solubilních faktorů v BALTe na buňky podílející se na procesu fibrogeneze

- a. Sterclova M, Paluch P, Fernandez IE, Heinzelmann K, Eicklberg O, Vasakova M. Change of primary lung fibroblasts (pFL) characteristics upon stimulation with bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases. Poster. WASOG meeting 2014, Kusadasi, Turecko.
- b. Sterclova M, Paluch P, Heinzelmann K, Eickelberg O, Vasakova M. Change of A549 cells characteristics upon stimulation with bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung diseases. ERJ 2014; 44 (Suppl 58): P3745.  
[Change of A549 cells characteristics upon stimulation with BALF of patients with interstitial lung diseases | European Respiratory Society \(ersjournals.com\)](#)
- c. Sterclova M, Heinzelmann K, Fernandez IE, Paluch P, Skibova J, Eickelber O, Vasakova M. Role of Wnt-1, Wnt-3 and MMP-7 in fibrotic response in extrinsic allergic alveolitis and idiopathic pulmonary fibrosis. ERJ 2015; 46 (Suppl 59): PA3838.  
[Role of Wnt-1, Wnt-3 and MMP-7 in fibrotic response in extrinsic allergic alveolitis and idiopathic pulmonary fibrosis | European Respiratory Society \(ersjournals.com\)](#)

#### 4.4. Buňky získané BAL u nemocných s EAA si mohou zachovávat vlastnosti odpovídající formě onemocnění

- a. Sterclova M, Heinzelmann K, Fernandez IE, Paluch P, Eickelberg O, Vasakova M. Bronchoalveolar lavage cells in modeling alveolar milieu. Poster Munich -MPLC 2015.
- b. Sterclova M, Paluch P, Heinzelmann K, Fernandez IE, Eickelberg O, Vasakova M. BAL cell cultures as a model for studying interstitial lung diseases pathogenesis. Poster ATS 2014.  
[Primary Bronchoalveolar Lavage Fluid Cells May Represent Possible Model For Studying Interstitial Lung Diseases Pathogenesis | D21.](#)  
[IMMUNOPATHOGENESIS OF SARCOIDOSIS AND OTHER INTERSTITIAL LUNG DISEASES \(atsjournals.org\)](#)

#### 4.5 Úloha IL-4R $\alpha$ v patogenezi EAA

- a. Vasakova M, Sterclova M, Stranska E, Mandakova P, Skibova J, Matej R. Biomarkers of fibroproliferative healing in fibrosing idiopathic interstitial pneumonias. *Open Resp Med J* 2012; 6: 160-164.  
[Biomarkers of Fibroproliferative Healing in Fibrosing Idiopathic Interstitial Pneumonias \(nih.gov\)](#)
- b. Matej R, Smetakova M, Vasakova M, Novakova J, Sterclova M, Olejár T. PAR-2, IL-4R, TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  in bronchoalveolar lavage distinguishes extrinsic allergic alveolitis from sarcoidosis. *Exp and Ther Med* 2014; 8: 533-538.  
[PAR-2, IL-4R, TGF- \$\beta\$  and TNF- \$\alpha\$  in bronchoalveolar lavage distinguishes extrinsic allergic alveolitis from sarcoidosis \(nih.gov\)](#)
- c. Sterclova M, Matej R, Mandakova P, Skibova J, Vasakova M. Role of interleukin 4 and its receptor in clinical presentation of chronic extrinsic allergic alveolitis: a pilot study. *Multidisciplinary respiratory Medicine* 2013; 8:35  
[Bronchoalveolar lavage cell profiles and proteins concentrations can be used to phenotype extrinsic allergic alveolitis patients \(nih.gov\)](#)
- d. Sterclova M, Kolbekova M, Smetakova M, Vasakova M. Markers of treatment outcome in hypersensitivity pneumonitis. *ERJ* 2016; 48 (Suppl 60): PA 3706.  
[Markers of treatment outcome in hypersensitivity pneumonitis patients | European Respiratory Society \(ersjournals.com\)](#)
- e. Bruzova M, Pavlova M, Matej R, Sterclova M, Vasakova M. Interstitial Score and Concentrations of IL-4R $\alpha$ , PAR-2, and MMP-7 in Bronchoalveolar Lavage Fluid Could Be Useful Markers for Distinguishing Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Diagnostics (Basel)* 2021;11(4):693.  
[Interstitial Score and Concentrations of IL-4R \$\alpha\$ , PAR-2, and MMP-7 in Bronchoalveolar Lavage Fluid Could Be Useful Markers for Distinguishing Idiopathic Interstitial Pneumonias \(nih.gov\)](#)

4.6 Může sérová koncentrace surfaktantového proteinu A (SP-A) napomoci k odlišení mezi chronickou EAA a IPF?

a. Sterclova M, Vasakova M, Paluch P, Paulik M. Surfactant protein A in chronic extrinsic allergic alveolitis. Eur Respir J 2011, 6: 1543-1544.

[Surfactant protein A in chronic extrinsic allergic alveolitis | European Respiratory Society \(ersjournals.com\)](https://www.ersjournals.com)

4.7 Možné zdroje expozice a manifestace EAA

a. Sterclova M, Kolbekova M, Smetakova M, Skibova J, Vasakova M. Effect of source of inhalation antigen on hypersensitivity pneumonitis manifestation and cytokine milieu. Chest 2016; 150 (4\_S): 933A.

[Effect of Source of Inhalation Antigen on Hypersensitivity Pneumonitis Manifestation and Cytokine Milieu \(chestnet.org\)](https://www.chestnet.org)

b. Sterclova M, Vasakova M, Paluch P. Effect of source of inhalation antigen on manifestation and prognosis of extrinsic allergic alveolitis. ERJ 2012; 40 (Suppl 56): P684.

[Effect of source of inhalation antigen on manifestation and prognosis of EAA patients | European Respiratory Society \(ersjournals.com\)](https://www.ersjournals.com)

c. Sterclova M, Vasakova M, Metlicka M. Significance of specific IgG against sensitizing antigens in extrinsic allergic alveolitis: serological methods in EAA. Rev Port Pneumol 2011; 17: 253-259.

[Significance of specific IgG against sensitizing antigens in extrinsic allergic alveolitis: Serological methods in EAA - ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

d. Sterclova M, Paulik M, Skibova J, Vasakova M. Inhalation antigens sensitisation in czech hypersensitivity pneumonitis patients. AJRCCM 2016; 193: A6273.

[Inhalation Antigens Sensitisation in Czech Hypersensitivity Pneumonitis Patients | C104. RARE INTERSTITIAL LUNG DISEASE: LAM, CYSTIC LUNG DISEASE, AND MORE \(atsjournals.org\)](https://www.atsjournals.org)

e. Sterclova M, Kremlackova V, Mottlova V, Bruzova M, Sojka P, Vasakova M. Quantitative assessment of specific serum IgGs may verify source of environmental exposure in extrinsic allergic alveolitis (EAA). Cogent Medicine 2021; 8 (1): 1894688.

[Full article: Quantitative assessment of specific serum IgGs may verify source of environmental exposure in extrinsic allergic alveolitis \(EAA\) \(tandfonline.com\)](#)

#### 4.8 Endogenní a exogenní faktory ovlivňující manifestaci EAA

a. Vasakova M, Sterclova M, Kolesa L, Slavcev A, Pohunek P, Sulc J, Striz I. Cytokine gene polymorphisms and BALF cytokine levels in interstitial lung diseases. *Respiratory Medicine* 2009; 103: 773-779.

[Cytokine gene polymorphisms and BALF cytokine levels in interstitial lung diseases - Respiratory Medicine \(resmedjournal.com\)](#)

b. Sterclova M, Paluch P, Skibova J, Vasakova M. Influence of age on manifestation, VC and TLco values, and bronchoalveolar lavage cell counts of sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Clin Res J* 2015; 1:39-44.

[Influence of age on manifestation, VC and TLCO values, and bronchoalveolar lavage cell counts of sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis - Sterclova - 2015 - The Clinical Respiratory Journal - Wiley Online Library](#)

c. Schamberger AC, Schiller HB, Fernandez IE, Sterclova M, Heinzelmann K, Hennen E, Hatz R, Behr J, Vasakova M, Mann M, Eickelberg O, Staab-Weijnitz CA. Glutathione peroxidase 3 localizes to the epithelial lining fluid and the extracellular matrix in interstitial lung disease. *Sci Rep* 2016; 6: 29952.

[Glutathione peroxidase 3 localizes to the epithelial lining fluid and the extracellular matrix in interstitial lung disease \(nih.gov\)](#)