

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

Cytokinové interakce epiteliálních buněk

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

datum:.....

podpis:.....

Děkuji vedoucímu diplomové práce panu prof. MUDr. Ijovi Střížovi, CSc. za odborné rady.

OBSAH

Obsah	4
Zkratky	6
Úvod	8
Abstrakt	9
1. Imunita respiračního systému	10
1.1 Přirozená imunita.....	10
1.1.1 Buňky plicního parenchymu.....	10
1.1.2 Imunitní buňky.....	12
1.2 Adaptivní imunita.....	18
1.2.1 B lymfocyty.....	19
1.2.2 T lymfocyty.....	20
2. Epiteliální buňky respiračního traktu	22
2.1 Epitel a přirozená imunita.....	22
2.1.1 Protizánětlivý účinek epiteliálních buňek.....	23
2.1.2 Solubilní mediátory produkované epiteliálními buňkami.....	24
2.2 Interakce epiteliálních buněk s dendritickými buňkami.....	26
2.3 Interakce epiteliálních buněk s B lymfocyty.....	26
2.4 Interakce epiteliálních buněk s T lymfocyty.....	27
3. Cytokiny	27
3.1 Charakteristika cytokinů.....	27
3.2 Chemokiny.....	28
3.3 Cytokiny regulující krve tvorbu.....	29
3.4 Interferony – regulační a efektorové působení.....	30
3.5 Cytokiny regulující T a B lymfocytární systém.....	31
3.6 Pluripotentní prozánětlivé cytokiny.....	32
3.7 Rodina tumor nekrotizujících faktorů.....	32
3.8 Transformující růstové faktory.....	33
4. Cytokiny produkované epiteliálními buňkami plic	33
4.1 TNF- α (tumor nekrotizující faktor alfa).....	33
4.2 Rodina interleukinu 1.....	36

4.2.1 Interleukin 1 beta (IL-1 β).....	36
4.2.2 Interleukin 18.....	37
4.2.3 Interleukin 33.....	38
4.3 Interleukin 6.....	41
4.4 Interleukin 32.....	43
4.5 TGF- β (transformující růstový faktor beta).....	43
4.6 GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor).....	46
4.7 Interleukin 25.....	47
4.8 Chemokiny.....	48
4.8.1 Interleukin 8 / CXCL8.....	48
4.8.2 TSLP (thymic stromal lymphopoietin).....	50
4.8.3 RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted).....	53
4.8.4 Eotaxin.....	55
4.8.5 CCL2 / MCP-1.....	56
4.8.6 CCL20 / MIP-3 α	57
4.8.7 CCL3 / MIP-1 α	57
4.8.8 CCL13 / MCP-4.....	58
4.8.9 CCL28.....	58
4.8.10 CX3CL1 / fractalkine.....	58
Závěr.....	59
Přehled literatury.....	60

ZKRATKY

Ag	antigen
ALI	akutního zánětu plic
AM	alveolární makrofágy
APC	antigen prezentující buňky (antigen presenting cells)
ARDS	syndromu dechové tísně dospělých
CCL	chemokin
CCR6	receptor pro chemokiny
CD	diferenciační shluk (cluster of differentiation)
CTLA4	Cytotoxic T Lymphocytes Associated Protein – 4 (CD152)
CXCL	chemokin
CXCR	chemokinový receptor
DAMP	damage associate molecule patterns
DC	dendritické buňky (dendritic cells)
EAA	alergické alveolitidy ze zevních alergenů
ECM	extracelulární matrix
EGF	epiteliální růstový faktor
EMT	epiteliálně mezenchymální přechod
GM-CSF	granulocytární makrofágové kolonie stimulující faktor (Colony Stimulating Factor for Granulocytes Macrophages)
CHOPN	chronické obstrukční plicní onemocnění
ICAM	intracelulární adhezivní molekula (intracellular adhesion molecule)
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
INF	interferon
IPF	idiopatické plicní fibrózy
I-TAC	Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
LBP	Lipopolysaccharide Binding Protein
LL-37	katelicidin

LPS	lipopolysacharid
LTA4	leukotrien A4
LTB4	leukotrien B4
LTC4	leukotrien C4
MCP-1	monocytární chemotaktický protein (monocyte chmotactic protein)
mDC	myeloidní dendritické buňky
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MIP-1	makrofágový protein zánětu (macrophage inflammatory protein)
NFκB	Nuclear Factor κB
NOD	nukleotidové-spojené oligomerizované
PAF	destičky aktivující faktor (platelet activating factor)
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PAR	receptory aktivovatelné proteinázami (Proteinase-activated Recetor)
pDC	plazmacytoidní dendritické buňky
PDGF	destičkový růstový faktor (platelet derivated growth factor)
PPR	Patogen Pattern Receptors
RANTES	chemokin (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted)
RIG	retinoic inducible gene receptory
SCF	Stem Cell Factor
SLPI	sérový inhibitor leukocytárních proteáz
TCR	receptor T lymfocytů
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
Th	pomocné buňky T (helpers T cells)
TLR	toll-like receptor
TNF	faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)
Treg	T regulační lymfocyty
TSLP	chemokin
VCAM	vaskulární adhezivní molekula (vascular cell adhesion molecule)

Úvod

Epiteliální buňky plic nezajišťují pouze mechanickou bariéru proti inhalovaným škodlivým substancím, ale jedná se o metabolicky velmi aktivní buňky s bohatou sekretorickou aktivitou. Nyní se ukazuje, že epitheliální buňky plic jsou velmi dobře integrovány do imunitního systému plic a právě pomocí cytokinů regulují řadu imunitních reakcí. Cytokinové interakce epitheliálních buněk mají význam v patofyziologii řady plicních onemocnění, na která v některých případech neexistuje účinná léčba, a proto je tato oblast intenzivně studována.

Zadáním této práce je: zpracování literárních údajů o cytokinových interakcích epitheliálních buněk v dýchacím ústrojí a jejich význam v imunitních a imunopatologických reakcích v plicním parenchymu.

Abstrakt

Epiteliální buňky dýchacích cest jsou strategicky umístěny na rozhraní organismu s okolním prostředím, a tak hrají klíčovou roli v obranném systému. Epiteliální buňky nezajišťují pouze mechanickou bariéru proti vlivu potenciálně škodlivých inhalovaných substancí, ale jedná se o metabolicky velmi aktivní buňky s bohatou sekretorickou aktivitou. V reakci na různorodé stimuly např. lipopolysacharid produkují řadu působků: cytokiny, antimikrobiální peptidy. Epiteliální buňky jsou zejména významným zdrojem chemokinů (př. IL-8, TSLP, RANTES). Podle současných poznatků epitheliální buňky ovlivňují rovnováhu Th1/Th2/Th17 lymfocytů, pomocí prozánětlivých cytokinů amplifikují zánětlivé procesy a činnost efektorových buněk. Epiteliální buňky řídí přísun imunitních buněk do ložiska poškození a podílí se na reparačních procesech. Porucha těchto cytokinových regulací může vyústit v rozvoj různých plicních onemocnění jako je například astma a chronická plicní obstrukční nemoc. Z tohoto důvodu je tato oblast intenzivně studována, aby se hledaly nové cíle možných terapeutických zásahů.

Abstract

The airway epithelial cells is strategically positioned at the interface with environment, and thus plays a key role in host defence system. Epithelial cells do not provide only a mechanical barrier against the influence of potentially harmful substances, but these cells are metabolic very active with an extensive secretory activity. Epithelial cells generate a large number of cytokines, especially chemokines (eg. IL-8, TSLP, RANTES), antimicrobial peptides in response to variety of stimuli eg. lipopolysacharide. Epithelial cells are involved in the balance of Th1/Th2/Th17 cells. Another relevance of epithelial cell is, that they amplify inflammatory processes and activity of effector cells by inflammatory cytokines. Substantial new evidence indicates an importance of epithelial cells in their direction of recruitment immunity cells to the site of damage and they are involved in the reparation processes. Disorder of these cytokine regulations can be implicated in the development of diverse lung diseases such as eg. asthma or chronic obstructive pulmonary disease. Hence this field is intensively studying, so that could be find new targets of possible therapeutic interventions.

1. Imunita respiračního systému

Plíce jsou nejrozsáhlejším povrchem těla, který je v kontaktu s vnějším prostředím. Jejich odhadovaná plocha kolem 100m² přichází každý den do interakce s přibližně 10 000 litry inhalovaného vzduchu (Wang et al., 2008). Obrana lidského organismu proti mikrobům je zjednodušeně zajišťována na třech úrovních: 1) anatomické a fyziologické bariéry 2) přirozená imunita a 3) adaptivní imunita.

1.1 Přirozená imunita

Jednotná reakce imunitního systému lidského organismu bývá tradičně rozdělována do dvou větví. Na imunitu přirozenou (vrozenou, nespecifickou) a adaptivní (získanou, specifickou). Přirozená imunita poskytuje počáteční ochranu před mikroorganismy a zároveň stimuluje imunitu získanou. Přirozená imunita je zajišťována jak buňkami hematopoetického i nehematopoetického původu (například epiteliální buňky), tak humorální složkou. Hematopoetickými buňkami jsou fagocytující buňky, kterými jsou neutrofilové nebo makrofágy, dále bazofily, mastocyty, NK buňky, eozinofily a další. Epiteliální buňky tvoří sliznice respiračního, gastrointestinálního a urogenitálního traktu a neplní pouze pasivní funkci fyziologických membrán, ale aktivně interagují s oběma typy imunity. K posílení této buněčné obranyschopnosti má přirozená imunita k dispozici ještě řadu humorálních působků jakými jsou například složky komplementu, C-reaktivní protein, antimikrobiální peptidy jako jsou například kolektiny a defensiny (Krejsek a Kopecký, 2004).

1.1.1 Buňky plicního parenchymu

Epiteliální buňky

Bronchiální dýchací cesty jsou lemovány pseudostratifikovaným epitelem. Pseudostratifikovaný epitel je složen z bazálních, sekretorických a řasinkových buněk. Epiteliální buňky jsou přizpůsobeny k obraně respirační sliznice řadou mechanismů. Jedním z nich je mukociliární clearance. Intenzita a efektivita

mukociliární clearance je určena charakterem a množstvím hlenu a také strukturou a funkcí ciliárního aparátu respirační sliznice (Coraux et al., 2005). Respirační hlen je komplexem sekretů, přičemž v indukovaném sputu bylo identifikováno 191 různých proteinů. Hlavní složkou těchto sekretů jsou molekuly mucinu, které zesíťováním vytváří viskoelastický gel. Mimo jiné hlenová bariéra chrání epitelální povrch před dehydratací. (Swindle et al., 2009).

Epitelální buňky produkují protizánětlivé, antibakteriální a antioxidační molekuly. Druhá linie obrany je zajištěna mezibuněčnými spoji, které vytvářejí efektivní bariéru proti inhalovaným patogenům a dalším škodlivým činitelům. I přes tento efektivní obranný systém je epitel dýchacích cest často porušen neustálým kontaktem s vnějším prostředím, v němž jsou viry, mikroorganismy a různé polutanty. Poškození epitelální integrity se může lišit, od ztráty epitelální impermeability následkem otevření tight junctions, až po částečné nebo kompletní obnažení bazální membrány. Tyto změny ve struktuře a funkci epitelu se uplatňují v patogenezi mnoha respiračních onemocnění: chronická bronchitida, astma, chronická plicní obstrukční nemoc (CHOPN), cystická fibróza (Coraux et al., 2005).

Endoteliální buňky

Endoteliální buňky hrají důležitou roli v regulaci obranných reakcí proti noxám a modulují zánětlivé reakce. Mimo fyzikální bariéru aktivované endotelové buňky modulují povrchovou expresi adhezních molekul a působí agonisticky na faktor aktivující destičky (PAF). Endoteliální buňky také syntetizují a sekretují řadu mediátorů regulujících zánětlivé a imunitní reakce. Jedná se například o cytokiny (IL-1 β , IL-6, TGF- α , TGF- β) a chemokiny (IL-8, RANTES, MIP-1). Na povrchu endoteliálních buněk se nachází adhezní molekuly (P-selectin, E-selectin, ICAM-1,-2, VCAM, CD44, β 1 integriny) s vazbami pro rozdílné populace leukocytů, dále jsou zde růstové faktory a receptory pro růstové faktory a cytokiny. Endotelové buňky také aktivně reorganizují svůj cytoskelet a mění povrchovou expresi adhezních molekul, aby

reagovaly na transmigraci leukocytů a vaskulární permeabilitu během zánětlivých procesů (Chavakis et al., 2004, Kawkitinarong et al., 2004)

Fibroblasty

Vedle své strukturální funkce jsou fibroblasty aktivními účastníky obranných mechanismů (Kahler et al., 2001). Hlavní funkcí plicních fibroblastů je udržení tkáňové integrity. Plicní fibroblasty reagují na zánět a jiná poškození uvolněním extracelulárních matrixových proteinů (kolagen I, II, IV; fibronectin). Tím přispívají k remodelaci dýchacích cest, dále mají význam v místní regulaci imunitních dějů a zánětlivých reakcí například produkcí IL-1 α , - β ; TGF- α ; destičkového růstového faktoru (PDGF). PDGF vykazuje fibrogenní aktivitu a podobně jako TGF- β stimuluje procesy podílející se na opravě poškozené tkáně, chemotaxi a proliferaci fibroblastů, proliferaci buněk hladkého svalstva a syntézu kolagenu (Holgate, 2007; Sacco et al., 2004).

1.1.2 Imunitní buňky

Specifické populace leukocytů mající odlišné funkce v imunitě plic můžeme rozdělit na: makrofágy, dendritické buňky, lymfocyty, neutrofile, eozinofily a mastocyty.

Makrofágy

Makrofágy mají klíčový význam jak v přirozené, tak adaptivní imunitě a tvoří rozhodující mediátory zánětlivých procesů. Makrofágy se uvolňují z kostní dřeně jako nezralé monocyty, po cirkulaci v krevním řečišti migrují do plic, kde podstupují finální diferenciaci na alveolární makrofágy (AM). AM syntetizují cytokiny, chemokiny, růstové a angiogenní faktory za účelem podpory obranných mechanismů plic. AM zneškodňují patogeny produkcí reaktivních kyslíkových a dusíkatých radikálů a prezentují jejich antigeny cytotoxickým T-lymfocytům. AM mají pleiotropní fyziologický efekt, který je vyjádřen prezentací antigenu, cílenou buněčnou cytotoxicitou, remodelací tkáně, regulací zánětu, indukci imunity, trombózou a různými formami endocytózy (Siveen a Kuttan, 2009).

AM také iniciují zánět při malém množství kyslíku. Uvolněný chemokin MCP-1 z AM je zvýšen při hypoxii a způsobuje degranulaci mastocytů, tímto poskytuje důkaz, že MCP-1 je zánětlivý mediátor (Schiabale et al., 2010). Zřejmě nejdéle známou vlastností AM je fagocytóza inhalovaných částic a mikroorganismů. Fagocytóza umožňuje pohlcení inhalovaných partikulí, které jsou pak v makrofázích transportovány proximálním směrem a pomocí mukociliárního transportu odstraňovány z nižších etáží dýchacích cest. Tento složitý mechanismus je jedním z nejdůležitějších obranných pochodů a podílí se jak na očistě dýchacích cest od inhalovaných částic, tak i na zajišťování sterility plicních sklípků (Stříž, 2007).

U astmatu AM sekretují IL-1, IFN- γ , TNF- α , IL-6, CCL2, CCL3, CXCL8, což má za následek aktivaci a regulaci přísunu dalších zánětlivých buněk. IL-6 se účastní diferenciaci makrofágů. Schopnost AM sekretovat bioaktivní lipidy, reaktivní molekuly kyslíku, NO a nitráty ovlivňuje cévní tonus hladkých svalů, bronchiálních epiteliálních buněk a pravděpodobně tonus bronchiální hladké svaloviny. Na straně druhé AM působí imunoregulačně indukcí reverzibilního stavu T-lymfocytové anergie během lokální antigenní stimulace. AM mohou také inhibovat zánět produkcí prostaglandinu E2 a IL-10. Sekrece prostaglandinu E2 a IL-10 může být poškozena u astmatu (Bloemen et al., 2007).

Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC) jsou profesionální antigen prezentující buňky (APC) vytvářející most mezi vrozenou a získanou imunitou buď buněčnými interakcemi nebo sekrecí prozánětlivých a imunoregulačních cytokinů. DC jsou aktivované přímo patogeny via Toll-like receptory (TLR) nebo mediátory, které jsou produkovány například epiteliálními buňkami.

DC jsou speciálním subsetem leukocytů se schopností upozornit imunitní systém na přítomnost infekce a jsou zodpovědné za aktivaci a kontrolu adaptivní imunity. V případě adaptivní imunity jsou aktivované DC rozhodující

pro prezentaci peptidů a proteinů T a B lymfocytům. Na straně druhé specializované subsety DC pojmenované jako tolerogenní DC zprostředkovávají potlačení antigenně specifických reakcí indukci regulačních T lymfocytů (Treg) (Gregori, 2010).

Jedním z nejdůležitějších zjištění je, že DC nejsou stejnorodým typem buněk, ale vytváří heterogenní populace, které vznikají ze vzdálených hematopoetických linií kostní dřeně a jsou charakterizovány specializovanými funkcemi v imunitním systému. V lidském organismu se nachází dvě hlavní a svojí podstatou odlišné subpopulace DC: myeloidní dendritické buňky (mDC) a plazmacytoidní dendritické buňky (pDC). Subpopulace mDC a pDC se od sebe liší cytokinovými aktivátory, znaky a funkcí. mDC zachycují antigen (Ag) v periférii a posunují ho z oblasti T lymfocytů do míst přirozené imunity. Tento proces vyžaduje několik dějů včetně up regulace hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) třídy II a exprese kostimulačních molekul, stejně jako sekreci cytokinů. Na regulaci daných dějů se podílí rozpoznání patogenů TLR. pDC tvoří složku přirozené imunity (v kontrastu s mDC) a jsou uzpůsobeny k produkci interferonu α (INF α) (Gregori, 2010).

Neutrofilly

Neutrofilly vznikají v kostní dřeni a jsou dominantními granulocyty v cirkulaci. Jsou nepostradatelnými buňkami přirozené imunity fagocytózou patogenů a uvolňováním antimikrobiálních molekul. Mohou syntetizovat řadu produktů: lipidy (LTA4, LTB4, PAF, tromboxan), cytokiny (IL-1 β , IL-6, TNF- α , TNF- β , CXCL 8), proteázy (elastáza, kolagenáza, matrixová metalloproteináza), antimikrobiální produkty (laktoferin, myeloperoxidáza, lyzozym) a reaktivní kyslíkové meziprodukty (Bloemen et al., 2007).

Migrace neutrofilů do dýchacích cest je významnou funkcí přirozené imunity. Neutrofilly se běžně nacházejí v dýchacích cestách zdravých jedinců. Nicméně zvýšená infiltrace dýchacích cest neutrofilly se objevuje u respiračních onemocnění jako je astma, kde neutrofilly významně přispívají k zánětu produkcí prozánětlivých mediátorů včetně cytokinů, chemokinů, proteáz (Baines

et al., 2009). Neutrofilů mají výrazný podíl na aktivaci a regulaci přisunu makrofágů do místa zánětu. Jakmile dojde k aktivaci neutrofilů generují různé chemotaktické faktory atrahující monocyty/ makrofágy a DC. Aktivované neutrofilů uvolňují rozličné chemokiny (IL-8), které odvádí monocyty/ makrofágy do místa zánětu. Naproti tomu makrofágy uvolněním TNF- α , IL-13 a granulocytárního makrofágového kolonie stimulujícího faktoru (GM-CSF) v místě zánětu nebo infekce zvyšují přežití neutrofilů. Uvedená data značí, že neutrofilů a makrofágy si v místě infekce navzájem pomáhají a kooperují (Kumar a Sharma, 2010).

Dokonce i při absenci plicního zánětu, se neutrofilů koncentrují v plicních kapilárách v porovnání s krví v systému. Zánětlivé stimuly jako jsou bakterie v plicích nebo v krvi zvyšují počet neutrofilů v plicních kapilárách. Následkem akumulace neutrofilů v plicních kapilárách dochází k jejich zachycení, adhezi k endoteliálním buňkám a k prolongaci zadržení neutrofilů. V případě, že jsou v alveolárním prostoru mikroby, neutrofilů se vystěhovávají z plicních kapilár do intersticia směrem k ložisku zánětu (Mizgerd, 2002).

Permanentní neutrofilie je implikována v patologii chronických plicních onemocnění jako je CHOPN a cystická fibróza. Současná terapie u těchto chronických onemocnění je neuspokojivá a jedním z možných terapeutických cílů by mohlo být řízené odvádění neutrofilů z místa zánětu (Snelgrove et al., 2011). Klasickým chemoatraktantem pro neutrofilů je motiv glutamové kyseliny, leucinu a argininu, který obsahují chemokiny (Rot a von Andrian, 2004).

Mastocyty

Mastocyty (žírné buňky) jsou lokalizovány po celém těle v těsné blízkosti epiteliálních povrchů, krevních cév, nervů, žláz, ale nevyskytují se v krevním oběhu. Mastocyty se tvoří z pluripotentní kmenové buňky a dozrávají ve tkáních. Mastocyty jsou důležitými elementy v přirozené imunitě pro schopnost detekovat změny ve svém prostředí a komunikovat s okolními buňkami. Mastocyty mají na svém povrchu řadu receptorů, k vysokoafinitním patří Fc ϵ RI; receptor pro IgE, dále TLR (TLR-1, TLR-2, TLR-6 a TLR-4), v kombinaci

s dalšími receptory umožňují mastocytům rozeznat potenciální patogeny a generovat specifické odpovědi. Mastocyty jsou aktivovány množstvím stimulů: imunoglobulinem E (IgE) s nebo bez antigenu, IgG, složkami komplementu, neuropeptidy, cytokiny, mikrobiálními produkty a fyzikálními vlivy (teplo, chlad, tlak) (Ryan a Fernando, 2009).

Mastocyty mají význam u alergických onemocnění a uvolňují produkty schopné atrahovat eozinofily například IL-5, IL-13, CCL-3 a metabolity kyseliny arachidonové (Ryan a Fernando, 2009). Mastocyty jsou dlouho spojovány s astmatem, časná alergická reakce následující po inhalaci alergenu je závislá právě mastocytech. Dnes víme, že mastocyty jsou přítomny nejen v epitelu dýchacích cest a pod sliznicemi, ale i v hlubších etážích dýchacích cest důležitých pro vznik astmatu (Holgate, 2008).

Bazofily

Bazofily se tvoří z progenitorů kostní dřeně a přestupují do krevního řečiště jako zralé buňky. Z krevního oběhu bazofily pronikají v průběhu zánětlivé odpovědi do periferních tkání a podílejí se na rozvoji pozdní fáze akutní alergické reakce. Bazofily stejně jako mastocyty exprimují na povrchu specifický receptor FcεR1 a jsou aktivovány přemostěním protilátek IgE navázaných na receptory antigenem. Nové údaje potvrzují, že bazofily mají na adaptivní Th2 odpověď mnohem větší vliv, než se předpokládalo. Například po sekundární expozici antigenu zvyšují bazofily aktivované cestou FcεR1 tvorbu protilátek interakcí s B lymfocyty a uvolněním IL-4 a IL-6. Z daného faktu vyplývá, že bazofily hrají roli v protilátkové imunitní odpovědi podmíněné imunologickou pamětí (Colgan a Hankel, 2010).

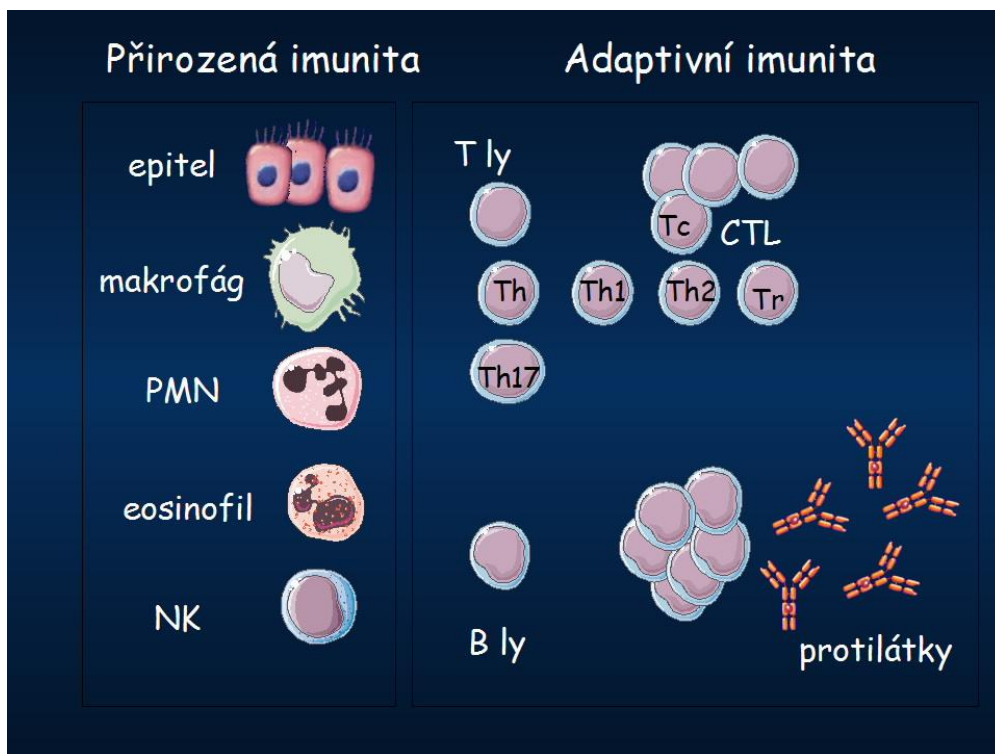
Bazofily jsou cirkulující zánětlivé buňky a při určitých imunitních reakcích se akumuluje v tkáních. Objevení bazofilního specifického znaku bazogranulinu umožnilo jejich identifikaci v dýchacích cestách astmatiků. Jejich přesný význam u astmatu není znám, ale pravděpodobně při infiltraci doprovází eozinofily (Holgate, 2008).

Eozinofily

Eozinofily, další buňky vznikající v kostní dřeni, jsou vnímány jako efektorové buňky alergických reakcí a také fungují v eliminaci parazitů. IL-3, GM-CSF a eotaxin 1-3 jsou rozhodující pro časný vznik eozinofilů z CD34⁺ prekurzorových buněk kostní dřene a spolu s IL-5 jsou zodpovědné za jejich dozrávání a migraci do dýchacích cest. Eozinofily jsou bohatým zdrojem granulových bazických proteinů (hlavní bazický protein, eozinofilová peroxidáza, eozinofilní kationický protein) a mají také schopnost vytvářet eikosanoidy (prostacyklin, cysteinylové leukotrieny). Přispění eozinofilů k tkáňové remodelaci je zvýrazněno jejich schopností syntézy TGF- β a podporovat tak proliferaci fibroblastů, syntézu kolagenu a zrání myofibroblastů (Holgate, 2008).

Eozinofily jsou hlavním zdrojem cysteinylových leukotrienů, především LTC₄, který působí jako mocný prozánětlivý mediátor, bronchokonstriktor a induktor glandulární sekrece. Eozinofily uvolňují několik cytokinů, včetně cytokinů stimulujících jejich proliferaci a zvyšujících jejich adhezi k endotelu: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, CXCL8, IL-10, IL-11, IL-12, CCL3 a CCL5, TNF α , TGF β , TGF α . Dané cytokiny mohou podporovat přísun a aktivaci eozinofilů pomocí autokrinního mechanismu (Bloemen et al., 2007).

Existuje důkaz, že zvýšená sekrece GM-CSF epiteliálními buňkami, fibroblasty, hladkou svalovinou a zánětlivými buňkami v astmatických dýchacích cestách je alternativní cestou pro přežití eozinofilů (Holgate, 2007).



Obr. 1 Přirozená a adaptivní imunita (Stříž, 2007)

1.2 Adaptivní (získaná, specifická) imunita

Adaptivní imunita je představována lymfocyty v krvi a lymfatickém systému, které mají schopnost zvyšovat antigenem navozenou specifickou imunitní odpověď spojenou s vývojem dlouhodobé paměti. Účinnost adaptivní imunity leží ve schopnosti vytvářet biliony různých antigenních receptorů z mnohočetných genových segmentů. Adaptivní a vrozená imunita jsou úzce spojeny, protože vrozená imunita definuje fenotyp následně antigeně specifické adaptivní imunity. Optimální imunitní funkce je výsledkem souhry imunoregulačních mechanismů obou typů imunity (Kato a Schleimer, 2007).

1.2.1 B lymfocyty

Humorální imunita plic je zprostředkována protilátkami, které tam převážně pronikají z krevního řečiště. Producenty protilátek jsou B lymfocyty. Zralý B lymfocyt je aktivován po setkání s epitopy Ag, které jsou rozeznány povrchovou protilátkou. Hlavní obranný mechanismus proti enkapsulovaným mikrobům je nezávislý na T lymfocytech, protože B lymfocyty jsou aktivovány přímo.

Protilátky reagující na většinu smíšených antigenů jsou závislé na pomoci T lymfocytů. Podmínkou je souhra mezi APC, B a T lymfocyty. Typická je aktivace fagocytózou antigenu obvykle makrofágem nebo DC. APC po zpracování antigenu provádí expresi jeho peptidových fragmentů na povrch APC ve spojení s molekulami hlavního histokompatibilního systému (MHC). Nyní může být komplex antigenu a molekuly MHC rozpoznán receptorem T lymfocytů (TCR) na povrchu lymfocytů. Th lymfocyty rozeznávají peptidové antigeny s molekulami MHC II. třídy (Moore et al., 2001).

Jakmile se TCR navázal ke komplexu MHC třídy II. s peptidem na APC, další vazba se uskuteční prostřednictvím CD4 molekuly na Th lymfocytech k molekule MHC třídy II. O tom se mluví jako o kostimulaci a je následkem dalších aktivačních signálů uvnitř Th lymfocytů. Nyní mají Th lymfocyty na povrchu novou molekulu, známou jako CD40 ligand (CD40L). CD40L se váže k CD40 molekule na B lymfocytech. Aktivační kaskáda uvnitř B lymfocytů, jejímž výsledkem je exprese cytokinových receptorů na B lymfocytech, je způsobena právě vazbou CD40 B lymfocytů s CD40L na Th lymfocytech. Aktivované Th lymfocyty sekretují cytokiny, které se mohou vázat na B lymfocyty a plně aktivovat produkci protilátek B lymfocytů. Cytokinová kaskáda, která je vytvořena mezi Th a B lymfocyty se liší v závislosti na podstatě antigenu. Tyto cytokinové signály indukují B lymfocyty k proliferaci a k terminální diferenciaci na plazmatické buňky tvořící protilátky (IgM, IgG, IgA, IgE) nebo se mohou stát buňkami paměťovými (Moore et al., 2001).

V posledních dekádách se zjistilo, že B lymfocyty nejsou jen producenty protilátek (do významu jejich důležitosti byla dávana hlavně tvorba IgE v patogenezi alergického onemocnění). B lymfocyty mají však mnoho na

protilátkách nezávislých funkcí: jednají jako APC, produkují cytokiny a uvolňují exozomy (Samitas a Lotvall, 2010).

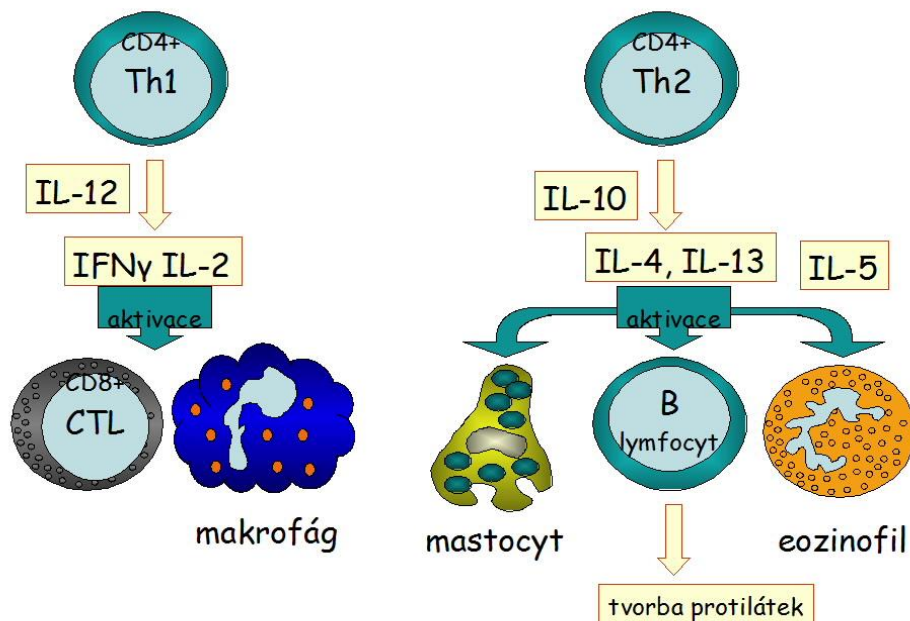
1.2.2 T lymfocyty

Lymfocyty jsou klíčovými činiteli v regulaci imunitního systému a zprostředkování specifické imunitní odpovědi. T lymfocyty jsou schopny rozeznat a zahájit imunitní odpověď vůči velkému počtu cizích antigenů, přičemž ignorují komponenty vlastního těla. Receptor T lymfocytů má schopnost rozpoznat antigen spojený s komplexem MHC proteinů na povrchu APC. Podle exprimovaných diferenciačních znaků na povrchu T lymfocytů lze funkčně odlišit subpopulace buněk např. $CD4^+$ pomocné T lymfocyty a $CD8^+$ cytotoxické T lymfocyty. Většina T lymfocytů v plicích má charakter paměťových buněk (Stříž, 2007).

Pomocné Th lymfocyty jsou funkčně členěny podle schématu, které cytokiny produkují. Během stimulace obdržené prostřednictvím APC Th0 prekurzorové lymfocyty se mohou stát Th1, Th2 nebo Th17 lymfocyty v závislosti na prostředí přítomných cytokinů. Tyto subpopulace lymfocytů produkují odlišné spektrum sekretovaných cytokinů, a proto také mají rozdílné efektorové vlastnosti (Júnior et al., 2010).

Lymfocyty Th1 produkují velké množství IL-2, který indukuje proliferaci T lymfocytů (autokrinně), a také indukuje proliferaci a zvyšuje schopnost cytotoxicity $CD8^+$ T lymfocytů. Dalším cytokinem exprimovaným ve velkém objemu je INF- γ . Existuje zde pozitivní zpětná vazba, kdy INF- γ působí na Th0 lymfocyty a indukuje jejich polarizaci k Th1 diferenciaci a inhibuje dráhu Th2 (Júnior et al., 2010). Th1 lymfocyty se uplatňují jako efektorové buňky v obraně proti intracelulárním parazitům a stimulací tvorby protilátek IgG2 napomáhají antibakteriální imunitě. Tyto buňky jsou zodpovědné za reakce pozdní přecitlivělosti (Stříž, 2007).

Druhou subpopulací Th lymfocytů jsou Th2 lymfocyty produkující IL-4, IL-5, IL-13, IL-6 a IL-10. Odpovědi Th2 jsou spojeny s alergií a infekcemi. IL-4 indukuje změnu imunoglobulinové třídy B lymfocytů na IgE a IL-5 indukuje produkci a aktivaci eozinofilů. I v tomto případě je zde přítomna pozitivní zpětná vazba, kdy dráha Th2 inhibuje Th1 (Júnior et al., 2010). Th2 lymfocyty také aktivují mastocyty a naopak inhibují činnost makrofágů. Některé z Th2 cytokinů, např. IL-4 a IL-13 mohou mít i přímý prozánětlivý účinek např. indukce adhezivních molekul nebo chemokinů (Stříž, 2007).



Obr. 2 Funkce Th1 a Th2 lymfocytů (Stříž, 2007)

Existuje předpoklad, že ostrá polarizace mezi Th1 a Th2 je relativně vzácná a nachází se zde celá řada přechodů. V tomto případě jsou T lymfocyty schopny produkovat současně jak některé Th1, tak i Th2 cytokiny v závislosti na typu stimulace, stavu imunitního systému nebo na fázi imunitní reakce (Stříž, 2007).

V plicích můžeme dále prokázat lymfocyty Th17 představující relativně nový subtyp T lymfocytů významných pro ochranu před infekcí intracelulárními mikroorganismy. Th17 lymfocyty produkují IL-22, IL-26 a cytokiny rodiny IL-17. Interleukiny rodiny IL-17 jsou mocnými induktory zánětu a produkují další

prozánětlivé cytokiny (Júnior et al., 2010). IL-17 podporuje produkci IL-8 a tím chemotaxi neutrofilů (Aujla, 2011).

Regulační T lymfocyty (Treg), dříve nazývané supresorové T lymfocyty mají význam v imunologické toleranci a limitují imunitní reakce zprostředkované T lymfocyty. Treg lymfocyty regulují imunitní reakce produkcí protizánětlivých cytokinů IL-10 a TGF- β , expresí inhibičních molekul CTLA4, snížením regulace MHC II. třídy a kostimulačních molekul CD80 a CD86 na APC. Treg lymfocyty exprimují TLR a aktivace těchto TLR může zvýšit nebo snížit imunosupresorovou aktivitu, tímto způsobem poskytují spojení mezi vrozenou a adaptivní imunitou (Mullane, 2011).

2. Epiteliální buňky respiračního traktu

Epiteliální buňky tvoří komplexní fyzikální bariéru proti vlivu potenciálně škodlivých inhalovaných substancí a mikrobiálním patogenům. Hrají klíčovou roli v iniciování a zvyšování obranných mechanismů, produkují obranné molekuly a cytokiny v reakci na respirační viry, bakterie, houby a různé polutanty (Kato a Schleimer, 2007).

2.1 Epitel a přirozená imunita

Přirozená imunita je schopna pomocí membránových a solubilních receptorů identifikovat základní znaky povrchových a nitrobuněčných molekul patogenních mikroorganismů označovaných jako molekuly PAMP (pathogen associated molecular patterns). Receptory, kterými přirozená imunita identifikuje nebezpečné vzory mikroorganismů, se označují jako PPR (patogen pattern receptors). PPR receptory jsou exprimovány na řadě efektorových buněk přirozené imunity především na makrofázích a DC, ale i na B lymfocytech. Tyto tři typy buněk slouží jako profesionální APC. Signální receptory PPR indentifikují nebezpečné vzory PAMP a aktivují signální systém NF κ B, který indukuje expresi genů pro prozánětlivé cytokiny a geny pro některé kostimulační molekuly (Bérubé et al., 2008).

První údaje o existenci tohoto typu receptoru PPR byly získány genomickou analýzou modelového organismu *Drosophila melanogaster*. Systém označený u drosofilu jako systém Toll, kóduje transmembránové proteiny s velkou extracelulární doménou, obsahující sekvence bohaté na leucin. U savců byly tyto receptory označeny Toll-like receptory (TLR). Nitrobuněčný signální systém je společný pro různé receptory TLR, které identifikují odlišné složky mikrobiálních PAMP. Epiteliální buňky exprimují na povrchu PPR, mezi něž patří TLR, nukleotidové-spojené oligomerizované domény (NOD)-like receptory a receptory aktivovatelné proteinázami (PAR) (Kato a Schleimer, 2007). V současnosti je známo 12 TLR a více jak 20 (NOD)-like receptorů (Bérubé et al., 2008).

Epiteliální buňky dýchacích cest mají na povrchu hlavně TLR 2-6. TLR2 rozeznává bakteriální komponenty jako lipoprotein, peptidoglykan, lipoteichovou kyselinu, virový obal spalniček a lidského cytomegaloviru. TLR3 rozeznává virové dvojvlákno RNA. TLR4 rozpoznává lipopolysacharid (LPS) gramnegativních bakterií a protein z respiračního syncyciálního viru. TLR5 rozeznává flagellin, který je složkou bakteriálních flagel. Tyto partikulární TLR jsou strategicky rozmístěny na epiteliálních buňkách a rozpoznávají mikroorganismy, které se často vyskytují na mukózním povrchu a mohou ohrozit organismus člověka v počáteční expozici. Epiteliální buňky spouští reakci, která vede k eliminaci mikroorganismů obvykle bez potřeby účasti adaptivní imunitní odpovědi. (Turvey et al., 2010).

2.1.1 Protizánětlivý účinek epiteliálních buněk

Význam epiteliálních buněk v přirozené imunitě je znám od doby, kdy Alexander Flemming podal zprávu (r.1922), že lysozym a další mukózní substance zamezují růstu bakterií a dalších mikroorganismů (Schleimer et al., 2007).

Předními antimikrobiálními produkty, které jsou sekretované konstitutivně a/nebo indukovaně epiteliálními buňkami k ochraně před infekcemi jsou lysozym, laktoferin, defensiny, kolektiny, pentraxiny, LL-37, sérový inhibitor

leukocytárních proteáz (SLPI) a sérový amyloid A. Tyto molekuly mohou být rozděleny do enzymů, permeabilizujících peptidů, opsoninů, proteázových inhibitorů, toxických malých molekul a makromolekul, které spojují a neutralizují potencionální patogeny (Kato a Schleimer, 2007).

2.1.2 Solubilní mediátory produkované epitelálními buňkami

Elafin a SLPI jsou členy rodiny proteinů sekretovaných na sliznicích, hrají klíčovou roli v udržování homeostázy a při zánětlivých procesech. Mechanismem účinku je rozrušení mikrobiální buněčné membrány podobně jako u defensinů (Sallenave et al., 2000).

Lysozym se zdá být hlavním enzymem přímo zodpovědným za rozrušení peptidoglykanové stěny grampozitivních bakterií, zatímco jiné proteiny se účastní odstranění infekce grampozitivních bakterií odlišným způsobem (Palaniyar et al., 2002).

Antimikrobiální peptidy jsou na základě struktury klasifikovány do tří skupin: defensiny, kolektiny a katelicidiny.

Defensiny

Defensiny se dělí do tří skupin na α , β a θ . U člověka se nachází pouze α a β defensin. β defensiny jsou hlavně sekretovány epitelálními buňkami, z nichž některé mohou být indukovány jako odpověď na různé stimuly: bakteriální a virová infekce, IL-1, TNF a LPS (Sorensen et al., 2005).

Defensiny mimo antimikrobiální vlastnosti poskytují obranné mechanismy, jakými jsou vazba bakterií epitelálními buňkami, cytotoxicita, produkce cytokinů. Fungují jako chemoatraktanty pro monocyty a nevyzrálé DC pomocí jejich CCR6 receptorů a tak propojují přirozenou a adaptivní imunitu (Soruri et al., 2007). Defensiny mají za následek pokles zánětlivé odpovědi zvýšenou produkcí SLPI uvolněným z epitelálních buněk dýchacích cest a dále inhibicí komplementové kaskády (Aarbiou et al., 2004). Experimentálně bylo zjištěno,

že při expozici epitelálních buněk IL-4 a IL-13 dochází k výraznému poklesu antimikrobiální aktivity buněk a potlačení antimikrobiální aktivity lidského peptidu β defensinu2, ale na straně druhé nemají vliv na aktivitu β defensin1 a LL-37 (Kato a Schleimer, 2007).

Kolektiny

Jedním z důležitých obranných mechanismů zajišťovaných epitelálními buňkami je produkce surfaktantu pneumocyty II. typu. Plicní surfaktant je směs lipidů a proteinů tvořící pohyblivou kapalnou fázi pokrývající velký povrch alveolárního epitelia a udržující minimální povrchové napětí uvnitř plic, aby bylo zabráněno jejich kolapsu během respirace. Rozlišujeme 4 hlavní proteiny specifické pro surfaktant: proteiny A, B, C, D. Proteiny B a D snižují povrchovou tenzi, A a D patří do skupiny kolektinů přispívající k surfaktantové homeostáze a plicní imunitě. Kolektiny A a B mají řadu antivirových, antibakteriálních a antifungálních vlastností například zesilují fagocytózu makrofágy. Zvyšují rezistenci alergenních změn a plicní hypersenzitivity: inhibicí vazby IgE ke specifickým alergenům, supresí uvolnění histaminu z bazofilů a mastocytů (Kishore et al., 2006; Stříž, 2007). Surfaktantový protein D efektivně opsonizuje apoptotické buňky a napomáhá jejich odstranění alveolárními makrofágy (Litvak et al., 2010).

Katelicidiny

LL-37 jako jediný lidský katelicidin je peptid se širokým spektrem antimikrobiální aktivity působící synergisticky s lysozymem a laktoferinem (Tjabringa et al., 2003). LL-37 je uskladněn jako prekurzor ve specifických granulích a je také sekretován mastocyty a epitelálními buňkami. Jeho obranné aktivity zahrnují indukci cytokinové a chemokinové exprese epitelálními buňkami; přímou interakci DC na tvorbě Th1 lymfocytů; neutralizaci LPS; chemotaxi pro neutrofile, eozinofily, mastocyty T lymfocyty; degranulaci mastocytů (Durr et al., 2006).

Epiteliální buňky dýchacích cest mimo zprostředkování a aktivaci přirozené imunity také regulují specifickou imunitu interakcí s DC, T a B lymfocyty.

2.2 Interakce epiteliálních buněk s dendritickými buňkami

DC patří mezi nejsilnější APC a jsou v plicích lokalizovány pod epiteliální vrstvou dýchacích cest. Epiteliální buňky dýchacích cest a DC mají na svém povrchu PPR zahrnující TLR, (NOD)-like receptory a receptory RIG (retinoic inducible gene receptory) schopné rozeznat povrchovou charakteristiku patogenů a iniciovat přirozenou imunitu. Po zachycení antigenu DC se peptidy Ag dostávají do uzlin v mediastinu a jsou předloženy molekulám MHC II. třídy. Naivní nezměněné CD4⁺T lymfocyty se váží k proteinům MHC II. třídy a po kostimulaci podstupují proliferaci a diferenciaci na Th1, Th2, Th9, Th17 nebo T regulační (Treg) lymfocyty indukující fenotyp v závislosti na cytokinových signálech (Mullane, 2011).

2.3 Interakce epiteliálních buněk s B lymfocyty

Epiteliální buňky přispívají humorální imunitě aktivním transportem imunoglobulinů z lamina propria na lumenální povrch. Epiteliální buňky se podílejí na buněčné imunitě fyzickými interakcemi s cytokiny a chemokiny a samy cytokiny a chemokiny produkují. Homeostáza uvnitř dýchacích cest je udržována prostředky aktivní suprese vrozené a přirozené imunity uvolněním IL-10 a TGF- β regulačními T lymfocyty a DC.

Při porušení homeostázy například při expozici patogenů v dýchacích cestách vytváří humorální imunita další stupeň ochrany. Protilátky IgA, IgG a IgM, které jsou epiteliálními buňkami exportovány na lumenální povrch dýchacích cest, obalí invazivní patogeny, čímž je umožněno jejich následné odstranění mukociliárním transportem nebo jejich rozpoznání a usmrcení buňkami s Fc receptorem (Swindle et al., 2009).

Nedávné studie došly k závěru, že většina alergenně specifických protilátek IgE a izotypů IgA je produkována v dýchacích cestách a systémová senzitivace

je z velké části zprostředkována rozšířením imunoglobulinů z mukózního povrchu do cirkulace. Dříve se předpokládalo, že produkce IgE je pevně regulována, aby se zabránilo nebezpečí anafylaxe z důvodu vysoké koncentrace cirkulujících IgE. Dnes je zřejmé, že antigeně specifické B lymfocyty jsou aktivovány a podstupují izotopový přesmyk v dýchacích cestách. Současné práce naznačují, že epiteliální působky mohou aktivovat B lymfocyty k produkci IgG a IgM během imunitní odpovědi na patogeny (Schleimer et al., 2007).

2.4 Interakce epiteliálních buněk s T lymfocyty

Epiteliální buňky exprimují chemokinový receptor CXCR3, na který se váží chemokiny CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC) a indukují migraci Th1 lymfocytů do mukózy. Receptory CXCR3 jsou indukovány Th1 cytokinem INF- γ , interferony tříd (typů) I a III, dvouvláknovou RNA, respiračními viry, bakteriální infekcí.

Indukce Th2 lymfocytů epiteliálními buňkami se uskutečňuje prostřednictvím receptoru CCR8 a chemokinů CCL1(I-309), receptoru CCR4 a chemokinů CCL17 (TARC), CCL22 (MDC). CCL1 je jediný chemokin interagující s receptorem CCR8 exprimovaným na Th2 lymfocytech a Treg. Produkce CCL1 v epiteliálních buňkách je indukována Th2 cytokiny IL-4 a IL-13 a také INF- γ . Receptor CCR4 je mimo epiteliální buňky vyjádřený také na Th2 lymfocytech pro epiteliální produkty CCL17 a CCL22. Produkce CCL17 je indukována IL-4, IL-13 a TGF- β . TNF je schopen zesilovat oba typy zánětlivé odpovědi jak Th1 tak Th2. Epiteliální buňky interagují s T lymfocyty také expresí povrchových molekul a cytokinů (Kato a Schleimer, 2007).

3. Cytokiny

3.1 Charakteristika cytokinů

Cytokiny lze definovat jako humorální faktory, které zajišťují mezibuněčnou komunikaci v rámci imunitního systému a interakci mezi imunitním systémem a

dalšími soustavami v organismu. Cytokinová signální síť udržuje tělní homeostázu.

Většina cytokinů má molekulovou hmotnost v rozmezí 15-25 kDa. Cytokiny jsou produkovány aktivovanými buňkami a jsou funkční po navázání na specifické membránové receptory buněk, které mají být působením cytokinů ovlivněny. Účinek cytokinů je ve většině případů pleiotropní, tzn. že jeden cytokin vykazuje řadu fyziologických účinků. Rozdílné cytokiny mohou mít stejné nebo podobné působení. Cytokiny působí na buňku, která daný cytokin produkuje (autokrinní působení) nebo působí na krátké vzdálenosti od produkční buňky (parakrinní působení), mohou však vykazovat i aktivitu systémovou. Další vlastností cytokinů je synergie tj. různé cytokiny stimulují různé cílové buňky ke stejné reakci a antagonismus tj. různé cytokiny mohou mít na stejnou cílovou buňku účinky opačné.

Cytokiny samy o sobě nejsou schopny vést k úplné aktivaci cílové buňky, pro buňku však představují dodatečné aktivační signály, které se spolupodílejí na buněčné aktivaci a regulaci buněčného cyklu. Účinkem cytokinů na buňky imunitního systému pak tyto buňky produkují další cytokiny. Tímto způsobem je modulována a zesilována signální aktivita v rámci imunitního systému. Další funkcí cytokinů je regulace exprese povrchových, kostimulačních a akcesorních molekul. Působí změny buněčného cytoskeletu, některé cytokiny indukují apoptózu buněk. Cytokiny významně regulují zánět, proliferaci a diferenciaci buněk imunitního systému, podílí se na cílené migraci rozličných buněčných populací imunitního systému (Krejsek a Kopecký, 2004)

Cytokiny mohou být na základě svých funkcí rozlišeny do následujících skupin:

3.2 Chemokiny

Chemokiny jsou malou skupinou chemotaktických cytokinů s molekulovou hmotností v rozmezí 8-10 kDa. Chemokiny jsou rozděleny do čtyř podrodin podle hlavní pozice buď jednoho nebo dvou cysteinových zbytků lokalizovaných

blízko N terminálního proteinu: CXC, CC, C a CXXC. Protože mnoho chemokinů má více než jedno jméno, byla v roce 1999 ustanovena nová nomenklatura. Chemokiny byly očíslovány podle pořadí, kdy byly objeveny a byl přidán L ligand (CXCL, CCL, CL a CXXCL). Mimoto, že chemokiny atrahují leukocyty, mají další funkce: stimulují myelopoézu, růst tumoru, angiogenezi a chovají se jako imunomodulátory (regulují T lymfocyty i antigen-prezentující funkce) (Teran, 2000).

Chemokiny zprostředkovávají svou činnost specifickými receptory. Jedná se o transmembránový receptor, který sedmkrát proniká cytoplazmatickou membránou buňky v cytoplazmě a je asociován s G proteinem. Receptory jsou rozděleny do podrodin podle třídy ligandu. Chemokiny jsou produkovány a jejich receptory jsou exprimovány na povrchu leukocytů, mastocytů, fibroblastů, epiteliálních a endoteliálních buněk. Různé typy buněk mají odlišné chemokinové receptory. Receptory se pojí ke specifickým ligandům a chemokinové ligandy se mohou vázat k mnoha receptorům. Chemokiny jsou implikovány u řady onemocnění např. astma pro svoji schopnost modulovat přísun a aktivaci celé škály odlišných buněčných typů (Murray et al., 2006).

Chemokiny mají významnou úlohu v koordinaci přirozené i adaptivní imunity. Regulují pohyb nezralých lymfoidních buněk, recirkulaci zralých naivních T a B lymfocytů. Chemokiny zajišťují i migraci APC zahrnující jak DC, tak i buňky z linií monocytů/mikrofágů. Chemokiny zvyšují afinitu a aviditu β_1 a β_2 integrinů na povrchu leukocytů k endoteliálním receptorům zahrnující intracelulární adhezivní molekulu 1 a 2 a vaskulární buněčnou adhezivní molekulu 1 (Kopecký J. a Kopecký O., 2010).

3.3 Cytokiny regulující krevtvorbu

Patří sem strukturně a funkčně heterogenní cytokiny působící na různých stupních vývoje krevních elementů. Cytokin SCF (stem cell factor) stimuluje proliferaci kmenových buněk krevtvorby a jejich uvolnění do krve. IL-3 je významný faktor podporující růst prekurzorů pro různorodé hematopoetické buňky: DC, erytrocyty, granulocyty (především bazofily), makrofágy, mastocyty

a lymfoidní buňky. Hlavním zdrojem IL-3 jsou T lymfocyty, ale u pacientů s alergickým zánětem má IL-3 také původ v eozinofilech a mastocytech (Krejsek a Kopecký, 2004).

GM-CSF podporuje maturaci DC, neutrofilů a makrofágů. GM-CSF spolu s dalšími koloniemi stimulujících faktorů podporuje produkci krevních destiček a erytrocytů. GM-CSF je aktivující faktor pro dozrávání granulocytů a mononukleárních fagocytů. V plicích má GM-CSF výhradní postavení pro maturaci AM včetně jejich exprese matrixových metaloproteináz a reaktivních kyslíkatých částic a zpracování surfaktantových proteinů. V případě imunity alergií GM-CSF sdílí vlastnosti s IL-3 a IL-5 tj. inhibuje apoptózu eozinofilů a tím prodlužuje přežití eozinofilů v místě alergického zánětu (Commnins et al., 2009).

3.4 Interferony – regulační a efektorové působení

Interferony mají svůj název odvozený ze své schopnosti interferovat s růstem virů. Interferony I. typu jsou $INF\alpha$, $INF\beta$ a $INF\omega$ jsou produkovány jadernými buňkami těla po předchozí stimulaci například virovou infekcí. Na protivirové obraně se účastní aktivací nitrobuněčných enzymatických systémů. Významný je také jejich antiproliferativní (cytostatický) a imunomodulační účinek. $INF\alpha$ zahrnuje přibližně 20 cytokinů produkováných především leukocyty. Působením $INF\beta$ jsou indukovány protizánětlivé cytokiny, které tlumí nežádoucí imunopatologickou reaktivitu zprostředkovanou subsetem Th1. $INF\gamma$ je produkován hlavně Th1 lymfocyty po antigenní stimulaci. $INF\gamma$ vykazuje imunomodulační, protinádorové účinky a hraje ústřední roli v obraně proti mikrobům (Krejsek a Kopecký, 2004).

Významným zdrojem $INF\alpha$ jsou mDC, které reflektují jejich aktivaci virovou RNA Toll-like receptory 3-4. Antivirová aktivita interferonů typu I. je zprostředkována jejich schopností inhibovat virovou replikaci uvnitř virem infikovaných buněk, chrání neinfikované buňky před infekcí a stimuluje antivirovou imunitu cytotoxickými (CD8) T lymfocyty a NK buňkami. $INF-\alpha$ má

další významné aktivity včetně up regulace třídy I. MHC a zprostředkování antitumorové aktivity.

INF γ je jediným členem tvořícím II. typ interferonů. INF γ je homodimer produkován zejména T lymfocyty, NK buňkami a menší mírou makrofágy. INF- γ vykazuje nevelkou antivirovou aktivitu a jeho původ z T lymfocytů napovídá, že je více interleukinem než interferonem. INF γ je nejvýznamnějším cytokinem zodpovědným za buněčně zprostředkovanou imunitu. INF γ představuje charakteristický cytokin, který je produkován Th1 buňkami, ale také cytotoxickými T lymfocyty a NK buňkami. INF γ zprostředkovává zvýšení exprese třídy I a II MHC a stimuluje prezentaci antigenů a produkci cytokinů APC. INF γ stimuluje funkce mononukleárních fagocytů a stejně jako ostatní interferony inhibuje replikaci virů (Commins et al., 2010).

3.5 Cytokiny regulující T a B lymfocytární systém

Jedná se o heterogenní skupinu cytokinů. Prototypem je IL-2 produkováný pomocnými T lymfocyty po jejich antigenní stimulaci a působící autokrinně na CD4⁺ T lymfocyty. IL-2 je významným aktivačním podnětem pro subpopulaci tlumivých cytotoxických T lymfocytů, NK buněk a představuje druhý signál pro aktivaci a diferenciaci B lymfocytů.

Pomocné T lymfocyty se člení na subsety na základě spektra produkováných cytokinů a funkčních odlišností. Subsety CD4⁺ T lymfocytů (Th1, Th2 a Th17) vyžívají ze společné prekurzorové buňky Th0 v závislosti na řadě faktorů. Významný je vliv konkrétního cytokinového mikroprostředí, ve kterém se aktivovaná Th0 buňka nachází. Lymfocyty Th 17 viz kapitola T lymfocyty. Vyžívání do subsetu Th1 stimuluje IL-12, který je produkován především monocyto-makrofágovými buňkami. Pro subset Th1 je typická produkce INF γ a TNF α . Th1 T lymfocyty jsou odpovědné za buňkami zprostředkovanou specifickou imunitu.

Vyvrávání do subsetu Th2 zajišťuje mikroprostředí obsahující IL-4 a IL-13. Pro Th2 je charakteristická produkce IL-4, IL-5 a IL-13. Udržování normálního poměru Th1/Th2 je jedním z nejdůležitějších imunoregulačních mechanismů. Pojetí T lymfocytů s odlišnou produkcí cytokinů můžeme nalézt i u subpopulace tlumivých cytotoxických CD8⁺ T lymfocytů. Navíc je vyčleněna skupina T lymfocytů značena jako subset Treg. Jedním z podtypů Treg jsou Th3 buňky, které po antigenní stimulaci produkují transformující růstový faktor β (TGF β) a IL-10. Působí především proti aktivitě subsetu Th1a produkují protizánětlivé cytokiny (Krejsek a Kopecký, 2004).

3.6 Pluripotentní prozánětlivé cytokiny

Do této skupiny patří mimo jiné IL-1 a IL-6. Proteiny, které jsou strukturně a vývojově příbuzné interleukinu 1 jsou řazeny do tzv. rodiny interleukinu 1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-18, IL-33 a další). IL-1 je produkován aktivovanými monocyto-makrofágovými buňkami i dalšími jadernými buňkami těla. IL-1 indukuje zvýšení teploty organismu a působí jako aktivační faktor pro T lymfocyty. IL-6 je produkován především T a B lymfocyty, monocyty i dalšími jadernými buňkami a reguluje diferenciaci a proliferaci B lymfocytů a syntézu protilátek. IL-6 způsobuje zvýšení koncentrace proteinů akutní fáze zánětu (Dinarello, 1997; Male et al., 1996).

3.7 Rodina tumor nekrotizujících faktorů

Důležitým podnětem pro jejich produkci je LPS vážící se na krevní bílkovinu LBP (Lipopolysaccharide Binding Protein). Vzniklý komplex reaguje díky membránové molekule CD14 s makrofágem a výsledkem je uvolnění prozánětlivých cytokinů včetně TNF α . TNF α má mnohé účinky například: indukuje expresi na adhezních molekulách endotelových buněk a leukocytů, indukuje zvýšenou teplotu, řídí ranné fáze zánětu, zvyšuje prokoagulační aktivitu endotelových buněk, stimuluje katabolické procesy v organismu. TNF α je produkován subsetem Th1 T lymfocytů. TNF β je produkován T a B lymfocyty.

TNF β má analogické účinky jako TNF α i strukturní podobnost (Krejsek a Kopecký, 2004).

3.8 Transformující růstové faktory

Transformující růstový faktor β (TGF β) působí na proliferaci a diferenciaci různých tělních buněk, expresí integrinových molekul reguluje adhezi buněk (Krejsek a Kopecký, 2004). TGF β představuje rodinu peptidů pravděpodobně s nejvýraznějším pleiotropním efektem, který vykazuje jak stimulační tak inhibiční účinky. TGF β je významný stimulant fibrózy, podporuje hojení a utváření jizev. TGF β inhibuje B lymfocyty a Th/cytotoxické lymfocyty. (Commings, 2009).

4. Cytokiny produkované epitelálními buňkami plic

4.1 TNF- α (tumor nekrotizující faktor alfa)

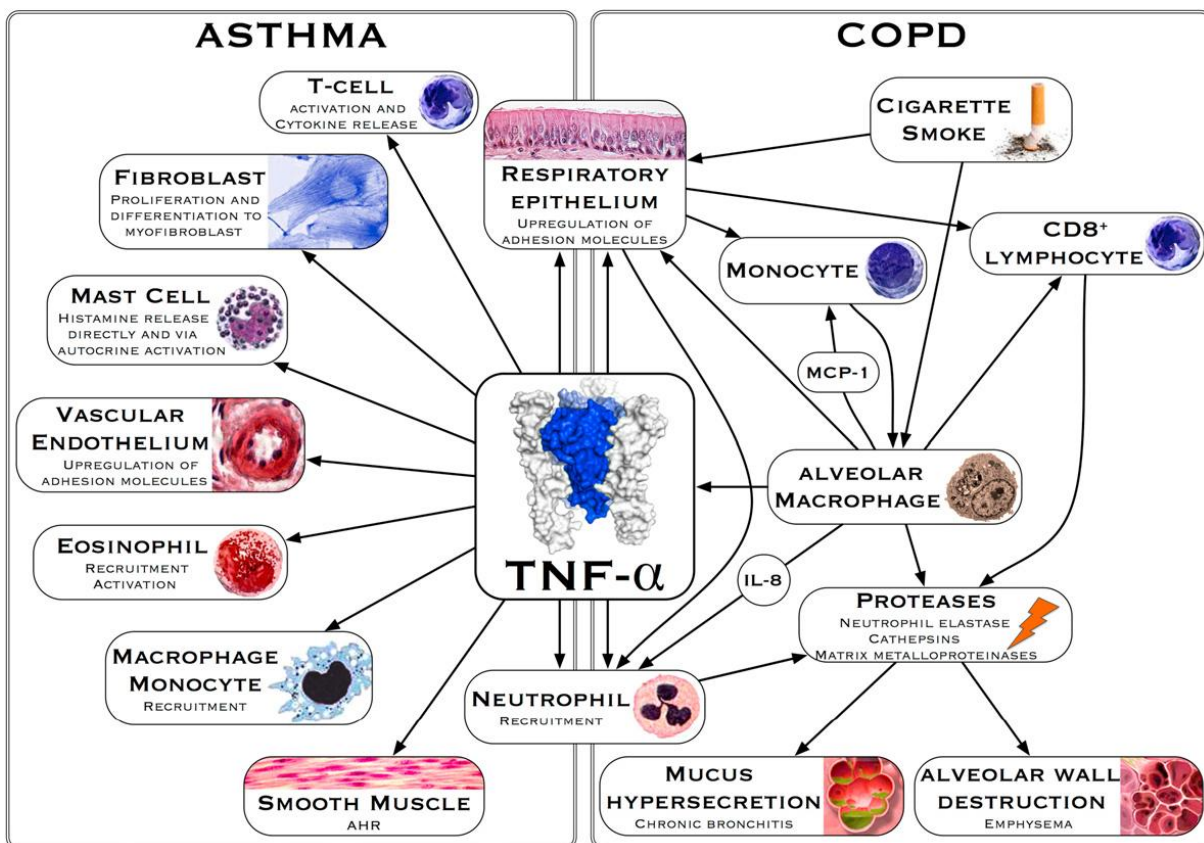
TNF představují dva homologní proteiny pocházející hlavně z mononukleárních fagocytů (TNF- α) a lymfocytů (TNF- β). TNF- α je produkován makrofágy, neutrofily, mastocyty, T a B lymfocyty, NK buňkami, endotelem a epitelálními buňkami. TNF- α se tvoří reakcí na bakterie, viry, cytokiny, imunitní komplexy, komplementovou složku C5a a reaktivní kyslíkové částice. TNF- α je mocný modulátor imunitních reakcí, indukuje adhezní molekuly, další cytokiny, aktivuje neutrofily a lymfocyty. TNF- α působí jako induktor antitumorové imunity přímým cytotoxickým efektem na rakovinové buňky; způsobuje septický šok (Male et al., 1996; Commings et al., 2006).

TNF- α hraje významnou roli v mnoha zánětlivých onemocněních plic: bronchiální asthma, chronická bronchitida, CHOPN, syndrom dechové tísně dospělých, akutní plicní selhání (Matera et al., 2009). TNF- α je základní mediátor zánětlivé kaskády u řady chorob, a proto slouží jako marker progresu nebo prognózy u určitých onemocnění např. pneumonie nebo cystická fibróza (Martínez-García, 2008).

TNF- α je prozánětlivý multifunkční Th1 cytokin, vykazující rozhodující úlohu v iniciaci, udržování a progresi astmatického zánětu dýchacích cest. TNF- α je uskladněn v granulích a uvolněn reakcí na alergický stimul z mastocytů a makrofágů via IgE-závislý mechanismus. Jiné buňky přispívající k patogenezi astmatu jsou také zdrojem TNF- α : eozinofily, epiteliální buňky a T lymfocyty. Studie prokázaly, že mRNA TNF- α je vyšší u astmatických subjektů než u kontrol, a také po expozici alergenu (Morjaria et al., 2006).

U astmatického onemocnění se TNF- α účastní zánětu, remodelace a pravděpodobně bronchiální hyperresponzivity (Bradley, 2008). TNF- α zesiluje astmatický zánět aktivací transkripčních faktorů NF κ B, AP-1 a dalších. Up regulace exprese TNF- α byla detekována u AM, mastocytů a bronchiálních epiteliálních buněk. TNF- α indukuje expresi mnoha genů v epiteliálních buňkách včetně cytokinů: IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF; chemokinů: eotaxin, CCL2, RANTES; adhezních molekul (ICAM-1), extracelulárních matrixových glykoproteinů (tenascin), neuropeptidů (endothelin-1), mucinů (Matera et al., 2009).

TNF- α způsobuje přechodnou bronchiální hyperresponzivitou, protože snižuje expresi M2 muskarinového receptoru a podporuje přísun eozinofilů obsahujících hlavní bazický protein, který je M2 antagonistou. Široce je akceptováno, že hyperreaktivita dýchacích cest může být způsobena dysfunkcí muskarinových M2 receptorů (Matera et al., 2009).



Obř. 3 Předpokládaná role TNF α v patogenezi astmatu a CHOPN (Matera et al., 2010).

Existuje předpoklad, že TNF- α hraje centřální roli v patogenezi CHOPN. TNF- α je produkován AM, neutrořily, T lymfocyty, mastocyty a epiteliálními buňkami po kontaktu s různými polutanty včetně cigaretového kouře. Na zvířecích modelech se ukázalo, že TNF- α indukuje patofyziologické změny spojené s CHOPN (buněčný zánětlivý infiltrát v plicích, plicní fibróza, emfyzém) a indukci exprese IL-8 zvyšuje chemotaxi a migraci neutrořilů. In vivo byly nalezeny zvýšené hladiny TNF- α v indukovaném sputu a v bronchoalveolární tekutině pacientů se stabilní CHOPN v porovnání s kontrolami (Matera et al., 2009).

TNF- α a IL-1 β byly identifikovány jako klíčové cytokiny v iniciaci zánětlivé kaskády během exacerbací perzistujícího astmatu a těžké CHOPN. Můžeme se domnívat, že TNF- α a/nebo jeho receptor mohou být terapeutickým cílem pro redukci zánětu u astmatu a CHOPN (Matera et al., 2009).

4.2 Rodina interleukinu 1

4.2.1 Interleukin 1 beta (IL-1 β)

IL-1 β je pleiotropní cytokin patřící do rodiny interleukinu 1. Členové rodiny interleukinu 1 mají hlavní význam v časně imunitní a zánětlivé reakci, která následuje po poškození tkáně nebo infekci. IL-1 má výrazné prozánětlivé působení, způsobuje horečku, akutní fázi zánětu, anorexii a somnolenci (Netea et al., 2010). Mezi buňky produkující IL-1 β patří mononukleární fagocyty, endoteliální a epiteliální buňky, keratinocyty, neutrofilové a další. IL-1 β stimuluje produkci cytokinů TNF- α , IL-6 a IL-8 a aktivuje T lymfocyty zvýšením produkce IL-2 a exprese receptoru pro IL-2 (Borish a Steinke, 2010). IL-1 β indukuje ovlivnění Th17 adaptivní imunity. (Netea et al., 2010).

Klasičtí členové rodiny interleukinu 1: IL-1 α , IL-1 β a IL-18 hrají významnou roli v imunitních regulacích a zánětlivých procesech indukci exprese mnoha efektorových proteinů jako jsou cytokiny/chemokiny a matrixové metaloproteinázy (Barksby et al., 2007). IL-1 účinkuje synergisticky s TNF- α a tím aktivuje prozánětlivé reakce u široké škály buněk. Dalšími funkcemi IL-1 β jsou zvýšení exprese adhezních molekul a podpora diapedézy (Netea et al., 2010).

IL-1 β byl nalezen ve zvýšeném množství v dýchacích cestách astmatiků. IL-1 β v epiteliálních buňkách dýchacích cest reguluje komplementaci tight junction. IL-1 β indukuje migraci endoteliálních buněk pravděpodobně vyvoláním změny složení matrixových receptorů. IL-1 β má účast v časně fázi zánětlivé reakce a mění rezpozivitu dýchacích cest astmatických pacientů (existuje stále více důkazů, že IL-1 přímo a samostatně moduluje konstriční a relaxační reakce v dýchacích cestách) (White et al., 2008).

Mechanismy, kterými IL-1 β mění strukturu a funkci dýchacích cest astmatiků jsou relativně dobře známy. IL-1 β indukuje uvolnění cytokinů např. RANTES, GM-CSF. IL-1 β zvyšuje chemotaxi eozinofilů, jejich přežití a aktivaci. Dále IL-1 β spouští uvolnění IL-9, který je růstovým faktorem T lymfocytů a mastocytů. IL-1 indukuje eozinofilii v dýchacích cestách, hyperreaktivitu

dýchacích cest a metaplazii pohárkových buněk. Navíc IL-1 β stimuluje uvolnění fibroblastových růstových faktorů např. PDGF, který zvyšuje proliferaci fibroblastů a syntézu kolagenu, čímž přispívá k remodelaci dýchacích cest (Yang et al., 2004). Mimo jiné IL-1 β a TNF- α jsou aktivátory transkripce IL-33 ve fibroblastech (Barksby et al., 2007).

4.2.2 Interleukin 18

IL-18 je prozánětlivý cytokin, člen rodiny IL-1, jehož produkce pochází hlavně z epiteliálních buněk (keratinocyty, epiteliální buňky dýchacích cest) a z APC (makrofágy, DC). IL-18 a IL-33 jsou dva interleukiny rodiny IL-1 vyvolávající produkci proalergenních cytokinů typu Th2, které indukují produkci IgE a vytvářejí tak charakteristickou reakci dýchacích cest u astmatu. Zájem o účinky IL-18 v alergii byl podpořen zjištěním, že mastocytový proteolytický enzym chymáza přeměňuje pro-IL-18 na menší formu IL-18 (Goetzl, 2008). IL-18 je významný regulátor jak Th1 tak Th2 cytokinové produkce. Zvýšená sekrece IL-18 byla zaznamenána u pacientů trpících alergií. IL-18 sám silně indukuje IgE a alergický zánět (El-Mezayen a Matsumoto, 2003).

K aktivátorům IL-18 patří LPS, exotoxiny z grampozitivních bakterií a různé mikrobiální produkty. IL-18 také indukuje nízké hladiny INF- γ , ale v přítomnosti kostimulantů se produkce zvýší např. použitím LPS. IL-18 stimuluje T lymfocyty k produkci IL-2, GM-CSF a TNF- α . Obecně lze říci, že schopnost IL-18 indukovat různé cytokiny závisí na buněčném cíli (Dinarello, 1999).

IL-18 sdílí biologické vlastnosti s IL-12 jako je stimulace produkce INF- γ , posílení cytotoxické aktivity NK buněk, stimulace Th1 buněčné diferenciace. IL-18 má významnou úlohu v Th1 zprostředkované imunitě ve spolupráci s IL-12. T lymfocyty a NK buňky produkují INF- γ následkem synergismu IL-18 a IL-12 (Akira, 2000).

Interleukin-1 β (IL-1 β) a IL-18 jsou důležitými prozánětlivými cytokiny na jedné straně aktivující monocyty, makrofágy, neutrofile a na straně druhé indukují Th1 a Th17 adaptivní imunitu. Jsou sekretovány jako neaktivní

prekurzory a jejich zpracování závisí na štěpení proteázami. IL-1 β , IL-18, TNF, INF γ aktivují neutrofile a makrofágy k fagocytóze patogenů a uvolňují toxické kyslíkaté a dusíkaté radikály (Netea et al., 2010).

U IL-18 byla poprvé rozpoznána jeho indukce T lymfocytové sekrece INF- γ a potlačení T lymfocytové generace IL-4 v přítomnosti IL-12. Informace předpokládá hlavní aktivitu IL-18 v normální hostitelské obraně proti různorodým mikrobiálním infekcím, která spočívá v indukci a amplifikaci reakce Th1 typu. V souladu s těmito nálezy je zjištěno, že supresorové CD8⁺ T lymfocyty interagují s DC, aby vyvolaly sekreci IL-18 a IL-12, která synergicky zvýší diferenciaci buněk typu Th1 a tímto způsobem inhibuje typ Th2.

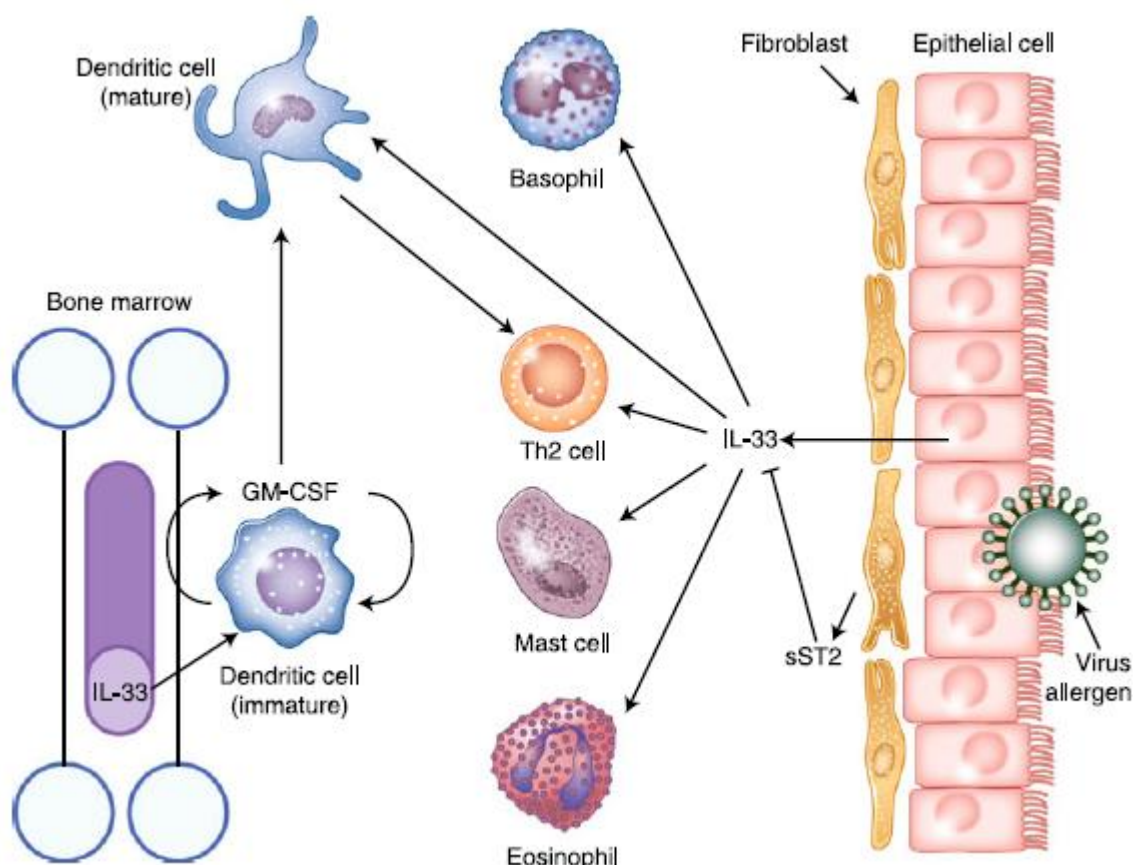
V kontrastu s tím, IL-18 projevuje duální efektorové role buňkami Th2 typu u alergických onemocnění a astmatu v součinnosti s dalšími cytokiny. Za prvé IL-18 s IL-12 podporují diferenciaci buněk Th2 typu a tvorbu cytokinů typu Th2 pomocí CD4⁺ T lymfocytů a NK buněk. Mastocyty a bazofily exprimují receptory pro IL-18, na které se IL-18 naváže a následně pak IL-18 společně s IL-3 produkuje vysoké hladiny cytokinů typu Th2. Za druhé IL-18 a IL-12 způsobují v dýchacích cestách reakce imitující astma. Podání IL-18 a IL-12 do dýchacích cest myši vyvolá CD4⁺ T lymfocytovou a na IL-13 závislou eozinofilní infiltraci dýchacích cest, hyperresponzivitu, hypersekreci hlenu a metaplazii pohárkových buněk (Goetzl, 2008).

4.2.3 Interleukin 33

Plicní epitel je náchylný k poškození patogeny, znečištěnému vzduchu, proteázové aktivitě alergenů. Všechny tyto vlivy podporují poškození epitelu a mají za následek produkci IL-33 (Lloyd, 2010). IL-33 byl identifikován databází prohledávající lidský genom, která použila profil odvozený z kompilace jiných členů rodiny IL-1. IL-33 je produkován mnoha typy buněk a tkání: srdce, mozek, žaludek, slezina, bronchiální epitel, buňky, fibroblasty, buňky hladkého svalu, keratinocyty, makrofágy a DC (Borish a Steinke, 2011). Exprese IL-33 v epitelálních buňkách je pozitivně regulována zánětlivými stimuly např. TNF nebo LPS (Smith, 2009).

Receptor pro IL-33 stejně jako u jiných s IL-1 příbuzných cytokinů je tvořen heterodimerní molekulou skládající se z ST2 a IL-1receptoru pomocného proteinu. Jsou tvořeny dva hlavní genové produkty ST2: transmembránová forma ST2 (ST2 nebo ST2L) a solubilní forma ST2 (sST2). ST2 je považována za funkční složku pro indukci bioaktivit IL-33 (Oboki et al., 2011).

Receptor IL-33 ST2 je exprimován na Th2 lymfocytech, eozinofilech, mastocytech a bazofilech. IL-33 přímo aktivuje eozinofily v dýchacích cestách. Degranulace mastocytů v reakci na IL-33 nastává až po primární aktivaci IgE, která zvyšuje expresi ST2 na mastocytech (Botturi et al., 2011). Mastocyty přímo reagují na stimulaci IL-33 produkcí cytokinů a chemokinů. Tento efekt je zvýšen, když IL-33 je v kombinaci s druhým stimulem např. TSLP (Smith, 2009).



Obr. 4: Poškození epiteliálních buněčných vrstev má za následek nekrózu a uvolnění IL-33. IL-33 může působit na mnohé typy buněk, přičemž výsledkem je maturace a migrace těchto buněk a uvolnění prozánětlivých faktorů v místě

zánětu. sST2 z fibroblastů může vázat IL-33, a tím ztlumí imunitní reakci a chrání před jejím propuknutím nebo může vést k zániku zánětu. Vlevo nekontrolovatelná kontinuální produkce IL-33 končí alergickým zánětem, který je charakteristický pro astma (Borish a Steinke, 2011)

IL-33 potencuje nejenom produkci cytokinů typu Th2, ale i Th1 - INF- γ . IL-33 chemoatrahuje Th2 lymfocyty, ale ne Th1. IL-33 má schopnost sám indukovat produkci cytokinů typu Th2 typu a chemokinů u bazofilů, mastocytů a Th2 lymfocytů. Dále IL-33 může přímo indukovat produkci IL-8 a superoxidu. U eozinofilů IL-33 zvyšuje produkci IL-3, IL-5 nebo GM-CSF zprostředkovanou IL-8 (Oboki et al., 2011). IL-33 má způsobilost ovlivnit vyžívání DC a jejich aktivitu (Borish a Steinke, 2011). IL-33 stimuluje DC k produkci IL-5, IL-6 a CD4⁺T lymfocyty k produkci IL-13 (Botturi et al., 2011). IL-33 (stejně jako TSLP) je nyní uznán za epiteliálně-mezenchymální cytokin manipulující zánětlivé a/nebo imunitní reakce (Oboki et al., 2011)

Některé linie důkazů předpokádají, že IL-33 se chová jako alarmin/DAMP. DAMP („damage associate molecule patterns“) jsou endogenní prozánětlivé faktory uvolněné nekrotickými buňkami v poškozených tkáních během traumatu a/nebo infekce. DAMP vyvolává lokální a/nebo systémový zánět zalarmováním buněk získané imunity, které pak představují endogenní nebezpečný signál (Oboki et al., 2011).

Když byla provedena endobronchiální biopsie a epiteliální buňky byly kultivovány in vivo, byla zjištěna zvýšená exprese IL-33 v epiteliálních buňkách lidí s bronchiálním astmatem v porovnání se zdravými jedinci. Tyto nálezy byly dále potvrzeny hodnotami hladin IL-33, které byly zvětšeny v bronchoalveolární tekutině astmatiků ve srovnání s kontrolami (Borish a Steinke, 2011). Narůstá počet genetických důkazů ve spojitosti mezi IL-33/ST2 a rozvojem astmatu. Genetická analýza našla propojení v polymorfismu IL-33 a ST2 geny s astmatem a alergenně příbuznými rysy. Celogenomová asociační studie s více než 10 000 astmatiky ukázala spojitosti s IL-33 (Lloyd, 2010).

IL-33 se zdá být atraktivním kandidátem pro terapeutickou intervenci, protože představuje molekulu schopnou regulovat imunologické aktivity u astmatu a alergických onemocnění. IL-33 patří mezi nejčastěji uvolněné signální molekuly a může zorganizovat přísun buněk zodpovědných za onemocnění. Neregulovaná aktivita IL-33 má za následek aktivaci Th2 lymfocytů, mastocytů, DC, eozinofilů a bazofilů, která nakonec vede ke zvýšení exprese mediátorů definujících onemocnění (Borish a Steinke, 2011).

4.3 Interleukin 6

IL-6 byl poprvé poznán jako signál pocházející z T lymfocytu, který indukoval zrání plazmatických buněk z B lymfocytů. Následně byl objeven jeho význam ve stresové reakci na infekci vedoucí k produkci proteinů akutní fáze, jako je C- reaktivní protein a sérový amyloidový protein-A. IL-6 je nejvýznamnějším induktorem proteinů akutní fáze a s IL-1 pojí IL-6 další schopnost - indukce horečky. Nejpodstatnějším zdrojem IL-6 jsou mononukleární fagocytující buňky, jiné buňky produkující IL-6: T a B lymfocyty, fibroblasty, endoteliální a epiteliální buňky, keratinocyty, hepatocyty, buňky kostní dřeně. IL-6 zprostředkovává aktivaci, růst a diferenciaci T lymfocytů. Pod vlivem IL-6 se B lymfocyty diferencují na zralé plazmatické buňky sekretující imunoglobuliny (Nelson a Martin, 2000; Commins et al., 2010).

IL-6 je pleiotropní cytokin, který je společně s IL-1 β a TNF- α považován za znak probíhajícího zánětu více než jako regulační cytokin s možností modulovat imunitní reakce. Existuje předpoklad, že IL-6 je významný pro určení typu adaptivní imunity zejména diferenciací efektorových CD4⁺ T lymfocytů. IL-6 podporuje Th2 diferenciaci CD4⁺ T lymfocytů, ale potlačuje diferenciaci Th1 nezávislou cestou. IL-6 inhibuje vývoj T reg. Význam IL-6 v diferenciaci Th17 je poněkud kontroverzní. Některé studie tvrdí, že IL-6 není důležitý pro vývoj Th17, zatímco jiné uvádějí synergii IL-6 s IL-1 β pro podporu diferenciaci Th17. IL-6 může být klíčovým faktorem pro stanovení rovnováhy jestli CD4⁺ T lymfocyty se stanou Treg nebo zánětlivými Th17 lymfocyty (Neveu et al., 2010).

V porovnání s cytokiny IL-1 β a TNF- α je IL-6 stále považován za užitečný nespecifický zánětlivý marker u řady onemocnění spojených s imunitou. Jednoduchou regresní analýzou u pacientů s intermitentním astmatem byla zjištěna přímá korelace hladiny IL-6 se statusem plicního onemocnění. Hladiny IL-6 v indukovaném sputu pacientů s intermitentním alergickým astmatem byly výrazně zvětšeny v porovnání s kontrolními subjekty a ani jedna hodnota z IL-1 β , TNF- α a MCP-1 nebyla zvýšena. Výsledky byly zjištěny při nepřítomnosti zjevné eozinofilie a neutrofilie. Zesílená produkce IL-6 detekována v mikroprostředí plic nebyla následkem zánětlivé reakce (Neveu et al., 2010).

TGF- β v bronchiálních epitelálních buňkách zvyšuje IL-6 a inhibuje IL-8 produkci v astmatických i neastmatických buňkách, přičemž TGF- β významně indukuje IL-6 u astmatiků (Ge et al., 2010). In vitro IL-17 stimuluje bronchiální epitelální buňky k uvolnění IL-6 (Lindén, 2001).

Vzestup produkce hlenu plicního epitelia u astmatu může působit obstrukci dýchacích cest ústící ve zvýšený odpor k proudícímu vzduchu. Plíce používají homeostatický mechanismus udržující rovnováhu produkce hlenu s jeho odstraněním z dýchacích cest. Jakékoliv porušení homeostázy může vést k plicní dysfunkci. Přítomnost IL-6 indukuje sekreci hlenu v astmatických dýchacích cestách, tento efekt může být následkem regulace exprese IL-13 interleukinem 6. IL-13 indukuje metaplazii hlenových buněk v plicích. V in vitro studiích se ukázalo, že IL-6 přímo indukuje genové hlenu Muc5AC a Muc 5B v lidských epitelálních buňkách, a proto nemůžeme vyloučit možnost přímého vlivu IL-6 na produkci hlenu epitelálními buňkami během alergického zánětu dýchacích cest (Neveu et al., 2009).

IL-6 je sekretován v počátku mnoha druhů zánětu různými typy buněk, a tak hraje roli téměř ve všech formách plicních onemocnění zahrnující infekci nebo zánět. Přestože je IL-6 často klasifikován jako prozánětlivý cytokin, studie představují i jeho protizánětlivé a protektivní vlastnosti. Mezi něž patří inhibice produkce TNF, IL-1 a MIP-2; pokles oddělování neutrofilů; zvýšení hladin IL-1 receptorového antagonisty (IL-1ra) a solubilního receptoru TNF (TNFsr); stimulace produkce metaloproteinázových inhibitorů; redukce produkce

intrabuněčných superoxidů; pokles degradace tkáňové matrix a inhibice buněčné apoptózy (Ward, 2006).

4.4 Interleukin 32

IL-32 je nedávno popsáný cytokin produkovaný T lymfocyty, NK buňkami, monocyty a epiteliálními buňkami. IL-32 má typické funkce prozánětlivého cytokinu. IL-32 stimuluje monocyty k produkci prozánětlivých cytokinů jako je IL-1 β , IL-6, TNF- α a chemokinů. Prozánětlivé cytokiny mají schopnost indukovat další prozánětlivé cytokiny a vedou tak k reciproční cytokinové indukci. Lokalizovaná reciproká indukce může způsobit chronický zánět a zvýšit tak závažnost onemocnění (Hong et al., 2009). V epiteliálních buňkách může být exprese IL-32 pozorována působením IL-1 β a IFN γ (Commins et al., 2010).

IL-32 může indukovat IL-8, TNF- α a IL-1 β . IL-32 má svou prozánětlivou funkcí roli v patogenezi CHOPN, infekci *Mycobacterium tuberculosis*. Mimoto byla zaznamenána up regulace IL-32 v plicích pacientů s CHOPN, která korelovala se závažností onemocnění (Ko et al., 2011). V současné době IL-32 postrádá sekvenční homologii k známým rodinám cytokinů. Existuje šest izoform IL-32 (α , β , γ , δ , ϵ a ξ). Všechny izoformy jsou biologicky aktivní, ale rekombinantní izoforma IL-32 γ má největší biologickou aktivitu, produkuje prozánětlivé cytokiny in vivo a in vitro. IL-32 byl indukován *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin stejně jako pomocí LPS nebo dalších mykobakterií. Navíc produkce IL-32 *M. tuberculosis* je závislá na endogenním INF- γ (Jeong et al., 2011).

4.5 TGF- β (transformující růstový faktor beta)

Transformující faktor beta (TGF- β) byl objeven pro svoji schopnost „transformovat“ krysí fibroblasty při vědecké studii růstového faktoru z destiček (PDGF) a epidermálních růstových faktorů (EGF, TGF- α) v roce 1983. TGF- β patří do skupiny cytokinů, která se kolektivně nazývá „TGF β superrodina“. Její členové regulují epiteliální buněčný růst, diferenciaci, motilitu, organizaci a tumorigenezi. Do superrodiny TGF také patří inhibitory a aktiviny, molekuly

mající význam v embryonálním vývoji, reparaci poškození, formování kosti. U savců jsou v současnosti identifikovány tři izoformy TGF- β . Všechny tři izoformy (TGF- β 1-3) vykazují velkou podobnost ve své aminokyselinové struktuře (Chin et al., 2003).

TGF- β je pleiotropní cytokin s celou škálou účinků. Účastní se modulace zánětu, opravy poškození, imunitní homeostázy a tolerance. Poprvé byl objeven jako růstový faktor fibroblastů, jeho první netrasmující rolí byla podpora reparace poškození zvýšením syntézy kolagenu a angiogenezí. V konečné fázi bylo zjištěno, že silně potlačuje proliferaci lymfocytů a aktivované lymfocyty TGF- β produkují. Dnes víme, že v podstatě každá buňka má potenciál produkovat TGF- β a má odpovídající odezvu na TGF- β . TGF- β může ovlivnit veškerý biologický systém testovaný in vivo a in vitro (Taylor, 2009).

V in vivo a v in vitro studiích bylo prokázáno, že TGF- β může mít jak funkci prozánětlivého cytokinu tak i protizánětlivého cytokinu na zánětlivé buňky. B a T lymfocyty po aktivaci LPS mohou uvolnit TGF- β . Autokrinní nebo parakrinní aktivace zánětlivých buněk TGF- β indukuje uvolnění prozánětlivých cytokinů TNF α a IL-1 makrofágy. Protizánětlivý efekt TGF- β se uplatní v inhibici proliferace T a B lymfocytů, indukci deaktivace makrofágů a inhibice přežití a diferenciace eozinofilů. Ohledně prozánětlivého efektu TGF- β indukuje chemotaxi eozinofilů, makrofágů, B lymfocytů, monocytů, neutrofilů, mastocytů. Mimoto TGF- β zvyšuje přežívání makrofágů, eosinofilů a T lymfocytů (Duvernelle et al., 2003).

TGF β reguluje homeostázu lymfocytů, inhibuje Th1 a Th2 imunitní reakce, dále inhibuje tvorbu IgE a podporuje produkci IgA. TGF- β ovlivňuje liniovou specifitu subsetu efektorových T lymfocytů. Podílí se na diferenciaci CD4⁺T lymfocytů buď na Th 17 nebo Treg lymfocyty v závislosti na přítomnosti IL-6, IL-12, kyseliny retinové, IL-23, IL-10. Zdá se, že TGF- β má potenciál reprogramovat diferencované Th lymfocyty do nového funkčního subsetu produkující IL-9. TGF- β pravděpodobně reguluje adhezivních vlastností epiteliálních buněk vedoucí k poškození epiteliální vrstvy (Lloyd a Hawrilowicz,

2009). TGF- β v epiteliálních buňkách zvětšuje hyperplazii pohárkových buněk a sekreci hlenu a snižuje adhezi k bazální membráně (Ge et al., 2010).

Za hlavní regulátor remodelace dýchacích cest u astmatiků je považována zvýšená tvorba TGF- β . Hojná exprese receptoru TGF- β a receptorově-ligandová signalizace podporuje syntézu extracelulární matrix (ECM) a přeměnu fibroblastů a hladké svaloviny dýchacích cest na myofibroblasty. Další z cest jak TGF- β podporuje remodelaci je indukce zánětlivých mediátorů strukturních buněk. TGF- β má přímý účinek na kontraktilitu hladkého svalstva dýchacích cest, čímž může změnit jejich vnímavost. Mimoto rozsáhlá exprese TGF- β v plicích způsobila vážné fibrózy s charakteristickými usazeninami přetvořené ECM (Murdoch a Lloyd, 2010). TGF- β může indukovat apoptický nebo antiapoptický efekt na epiteliální buňky, přičemž záleží na cestě aktivace (Halwani et al., 2010).

TGF- β stimuluje buňky mezenchymálního původu a silně inhibuje epiteliální proliferaci. Indukuje apoptózu, kontroluje morfogenezi prostřednictvím ukládání extracelulární matrix a remodelace. TGF- β stimuluje syntézu kolagenu, fibronektinu, proteoglykanu (Chin et al., 2003).

Patologická konverze epiteliálních buněk na fibroblasty (epiteliálně mezenchymální přechod - EMT) byla demonstrována in vivo v plicních alveolárních epiteliálních buňkách typu II. In vitro byl prokázán EMT u primárních bronchiálních epiteliálních buněk za použití stimulace TGF- β 1 a při přidání TNF- α došlo ke zvýšení efektu TGF- β 1. Epiteliálně mezenchymální přechod je transdiferenciace epiteliálních buněk na buňky mezenchymální. Během EMT procesu epiteliální buňky jsou odstraněny z buněčné polarity a jsou remodelovány adhezní kontakty epiteliální buňka-buňka stejně jako buňka-matrix. Následkem těchto změn jsou epiteliální buňky přeměněny na motilní fibroblasty dále až na myofibroblasty. Transdiferencované buňky jsou schopny migrovat bazální membránou do dalších oblastí v tkáni (Camara a Jarai, 2010).

TGF- β zaujímá významnou pozici v syntéze a akumulaci kolagenu i fibronektinu v plicích (Arribillaga et al., 2011). TGF- β má centrální účinek na

regulaci plicního zánětu a fibrózy. Bylo prokázáno, že TGF- β je indukován u idiopatické plicní fibrózy (IPF). Hlavní složkou ECM bazální membrány plic je kolagen IV a laminin, ale například u IPF plicní bazální membrána je narušena a dochází k vzestupu exprese kolagenu I, III a fibronektinu (Camara a Jarai, 2010). TGF- β se uplatňuje v patologickém hojení alveolárních lézí u IPF. Indukuje transkripci kolagenu typu I a fibronektinu ve fibroblastech. Příčinou fibroprodukce u IPF může být nerovnováha imunitní odpovědi ve smyslu převahy Th2 typu (Vašáková, 2009).

4.6 GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor)

GM-CSF (granulocytární makrofágový kolonie stimulující faktor) byl původně definován svojí schopností tvorby granulocytových a makrofágových kolonií z prekurzorových buněk jako výsledek proliferace a diferenciaci. GM-CSF můžeme považovat zejména za regulátora kontroly všech stádií maturace u granulocytové a makrofágové linie populací (Hamilton, 2002). GM-CSF je hlavní faktor pro přežití a aktivaci hematopoetických buněk, který instruuje všechny vyzrálé makrofágy, eozinofily a neutrofilie, je znám jako pleiotropní cytokin (Jeong et al., 2011).

GM-CSF je jedním z nejmocnějších aktivátorů DC, které jsou nejvýznamnějšími APC pro aktivaci a diferenciaci naivních T lymfocytů. Epiteliální buňky a alveolární makrofágy mohou produkovat značné množství GM-CSF v reakci na různé stimuly a tím vytváří vztah mezi přirozenou imunitou mukózního systému (makrofágy, dendritické buňky, epitheliální a mezenchymální buňky) a adaptivní imunitou, v níž mohou ovlivnit její iniciaci, vývoj a zachování (Ritz et al., 2002).

Expresi GM-CSF je zvýšena v bronchiálních epitheliálních buňkách astmatiků. Vzestup produkce GM-CSF je způsoben prozánětlivým cytokinem IL-1 β (Newton et al., 2001). U astmatiků byl popsán genový polymorfismus GM-CSF, což předpokládá alespoň jeden z genetických základů pro odlišnou expresi. U zánětlivých onemocnění dýchacích cest je vysoká exprese GM-CSF

charakteristická pro astma. GM-CSF nebyl detekován ve sputu pacientů s CHOPN (Ritz et al., 2002).

GM-CSF jako významný faktor pro přežití a funkci T lymfocytů a eozinofilů přispívá k samoudržení imunitně-zánětlivého prostředí u astmatu. Poškození epiteliálních buněk environmentálními inzulty vede k atypii reparačních procesů. Růstové faktory produkované epitelem způsobují proliferaci a diferenciaci mukózních mezenchymálních buněk, která vede ke ztluštění stěn dýchacích cest následkem zvětšené matrixové produkce a proliferace hladké svaloviny. Během tohoto chronického procesu se bronchiální epitel stává značně aktivním zdrojem růstových faktorů včetně GM-CSF. Podložní mezenchymální buňky se diferencují na myofibroblasty a hladká svalovina je také významným zdrojem GM-CSF (Ritz et al., 2002).

4.7 Interleukin 25

IL-25 patří do rodiny IL-17, je produkován bronchiálními epiteliálními buňkami, AM, eozinofily a mastocyty. Na rozdíl od jiných IL-17 cytokinů existuje ve dvou izoformách. Receptor pro IL-25 je na povrchu CD4⁺ Th2 paměťových buněk. Slouží jako koreceptor pro IL-17B a IL-25 s větší afinitou k IL-25. Jeho exprese je regulována DC v přítomnosti TSLP. IL-25 pro indukci Th2 cytokinů potřebuje obsadit dva receptory: IL-17RB a IL-17RA. IL-25 působí přímo na CD4⁺ T lymfocyty k zprostředkování Th2 imunitní odpovědi. IL-25 působí indukčně na alergickou hyperresponzivitou u myší. Dále indukuje produkci TSLP autokrinním způsobem (Botturi et al., 2011).

IL-25 zvyšuje odpověď typu Th2 paměťovými T lymfocyty. Mimoto IL-25 působením na eozinofily zvyšuje uvolňování jejich prozánětlivých mediátorů (Corrigan et al., 2011). Provedené studie jak u lidí, tak na myších ukazují klíčovou roli IL-25 v patogenezi alergických onemocnění plic. V pokusech na myších nadprodukce IL-25 v plicním epitelu indukovala hyperplazii epiteliálních buněk, hypersekreci hlenu, infiltraci dýchacích cest eozinofily a makrofágy, regulaci směrem ke zvýšení chemokinů spojených s typem 2 imunitní reakce. Naproti tomu neutralizace IL-25 zeslabila alergický zánět, zredukovala

eozinofily a CD4⁺ T lymfocyty v plicích. IL-25 deficientní myši ukázaly signifikantní útlum alergického zánětu charakterizovaný redukcí Th2 a Th9 cytokinů (Reynolds et al., 2010).

4.8 Chemokiny

4.8.1 Interleukin 8 / CXCL8

IL-8 je členem CXC chemokinů. Tento chemokin je hlavním mediátorem zánětlivých reakcí a je sekretován několika typy buněk: monocyty, T lymfocyty, neutrofilů, NK buňkami, endoteliálními buňkami, fibroblasty a epiteliálními buňkami. Produkce IL-8 není konstitutivní, ale inducibilní prozánětlivými cytokiny jako je IL-1 a TNF- α . Navíc sekrece IL-8 může být indukována bakteriemi (př. *Pseudomonas aeruginosa*), bakteriálními produkty (př. LPS), viry, virovými produkty, faktory životního prostředí (Mukaida, 2003).

IL-8 byl prvním z popsaných prozánětlivých chemokinů, který atrahuje a aktivuje imunitní a zánětlivé buňky. IL-8 je přisuzováno mnoho odlišných biologických efektů včetně těch, které souvisí s neutrofilů: aktivace zánětlivých buněk a chemotaxe, zvýšení buněčné adheze k endoteliálním buňkám, podpora angiogeneze, modulace uvolnění histaminu. Vedle neutrofilů IL-8 aktivuje další zánětlivé buňky: T a B lymfocyty, bazofily, IL-2 aktivované NK buňky a GM-CSF a IL-3 stimulované eozinofily (Hay a Sarau, 2001).

IL-8 funguje nejenom jako chemoatraktant, ale i jako mocný angiogenní faktor. IL-8 si zachovává svou biologickou aktivitu dokonce v přítomnosti významných změn v pH a odolává mírné proteolytické degradaci v porovnání s jinými známými chemotaktickými faktory. Následkem může být prodloužená aktivita in vivo pro odvádění neutrofilů do místa akutního zánětu. IL-8 působí jako hlavní chemoatraktant pro neutrofilů v plicích (Murugan a Peck, 2009).

IL-8 hraje roli v patogenezi CHOPN, protože zvýšené hladiny IL-8 byly zaznamenány v indukovaném sputu u kuřáků cigaret s CHOPN. Zvýšené množství IL-8 je spojeno se zvýšeným počtem aktivovaných neutrofilů. Tento

fakt byl později potvrzen v jiné studii, ve které byli pacienti premedikováni anti-IL-8 neutralizující protilátkou získané ze sputa pacientů s CHOPN. Výsledkem studie v indukovaném sputu byla na koncentraci závislá inhibice neutrofilní chemotaxe (Murugan a Peck, 2009).

Eotaxin a IL-8 jsou vysoce exprimovány v plicích pacientů s perzistentním astmatem a v tomto pořadí mohou zesílit přežití eozinofilů a neutrofilů. U astmatiků bylo zaznamenáno zvýrazněné přežívání eozinofilů (Murray et al., 2006). Zvýšené hladiny IL-8 a IL-6 nacházíme v dýchacích cestách u pacientů s astmatem. Bronchiální epiteliální buňky jsou mocným zdrojem IL-6 a IL-8. Při stimulaci lidských bronchiálních epiteliálních buněk TGF β 1 byla zvýšena produkce IL-6, ale inhibována IL-8 jak u astmatických tak i u neastmatických buněk. Nicméně TGF indukoval výrazně více IL-6 u astmatických buněk (Ge et al., 2010).

IL-8 je zapojen v patogenezi syndromu dechové tísně dospělých (ARDS) a onemocnění akutního zánětu plic (ALI), u kterých je charakteristická masivní infiltrace neutrofilů v plicích. V bronchoalveolární laváži pacientů ARDS byla zaznamenána zvýšená hladina IL-8 a množství korelovalo s vývojem ARDS. Zánětlivé mediátory a buňky hrají klíčovou roli v patogenezi ARDS a ALI. ARDS a ALI jsou onemocnění charakterizovaná zvýšenou permeabilitou alveolárně-kapilární bariéry, influxem neutrofilů, vážným alveolárním poškozením. Atelektáza, plicní edém, porušená výměna plynů vede k alveolární a systémové hypoxii vyžadující použití mechanické ventilace s vysokou koncentrací kyslíku (Wendel et al., 2008). Jmenovitě sepse je jedním z hlavních rizikových faktorů a vyskytuje se přibližně u 40% případů ARDS/ALI. Zánětlivé mediátory a buňky hrají klíčovou roli v patogenezi ARDS/ALI (Wendel et al., 2008, Bao et al., 2009).

Plicní emfyzém je hlavní morfologickou změnou u CHOPN a je spojen s abnormální zánětlivou reakcí na stimuly. Za rozvoj emfyzému se v současné době udává vznik nerovnováhy mezi tkáňovým poškozením a reparací. Narůstá počet důkazů, že tkáňová schopnost opravy plicních fibroblastů, které jsou zodpovědné za regeneraci a údržbu ECM, je snížena u pacientů s CHOPN. Snížená proliferace fibroblastů byla pozorována u CHOPN v porovnání pacientů

s normální funkcí plic. LPS tvoří prozánětlivou komponentou buněčné stěny gramnegativních bakterií a je impulsem pro rozvoj rozličných plicních onemocnění včetně CHOPN. Chronický zánět má pravděpodobně hlavní význam v patogenezi emfyzému u CHOPN a LPS je všudypřítomný zánětlivý stimul. V in vitro studiích lidských plicních fibroblastů bylo zjištěno, že LPS může inhibovat proliferaci fibroblastů přinejmenším produkcí IL-6 a IL-8 (Zhang et al., 2011).

U IPF je významným dějem angiogeneze, která doprovází fibroplazii a ukládání ECM. Proces je regulován angiogenními a angiostatickými faktory. Chemokin IL-8 je angiogenním faktorem mající roli v angiogenezi u IPF i v rozvoji fibrózy u alergické alveolitidy ze zevních alergenů (EAA). Koncentrace IL-8 v bronchoalveolární tekutině koreluje s rozsahem fibrózy jak u IPF tak EAA (Sterclova et al., 2009).

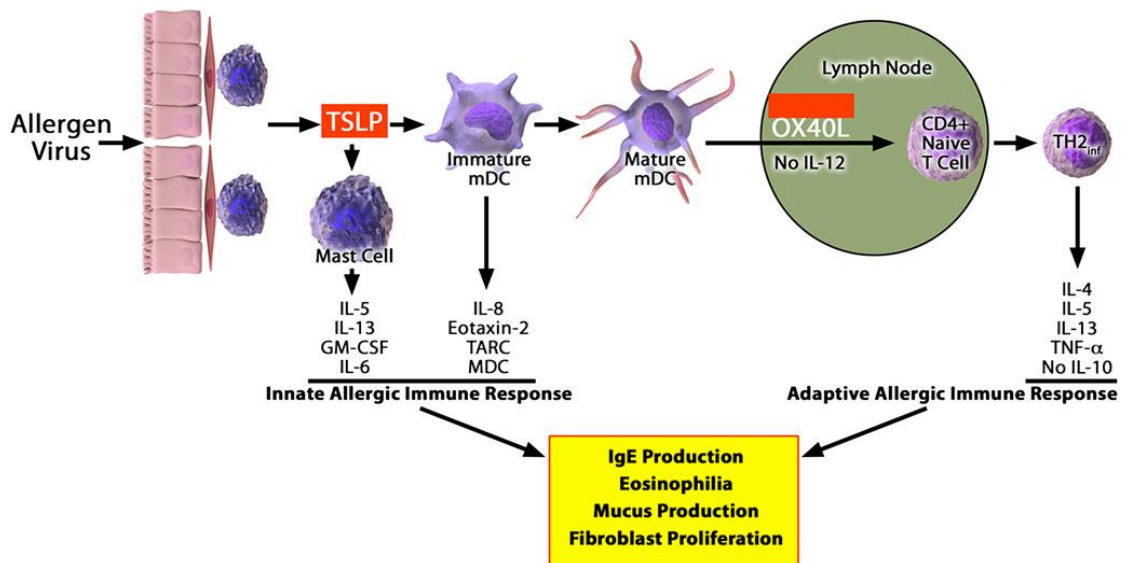
4.8.2 TSLP (thymic stromal lymphopoietin)

TSLP je produkován epiteliálními buňkami bronchů, mastocyty a bazofily. TSLP je mocný induktor a aktivátor DC typu 2, což poskytlo důkaz, že epiteliální buňky jsou klíčovým faktorem v maturaci DC. Těmito mechanismy epiteliální buňky mají potenciál kontrolovat typ a rozsah maturace DC, aktivaci T lymfocytů a diferenciaci B lymfocytů. TSLP zvyšuje u DC aktivaci, přežití a expresi Th2 lymfocytů. Mimoto DC ovlivněné TSLP mají schopnost instruovat naivní CD4⁺ T lymfocyty k produkci proalergenních cytokinů IL-4, IL-5, IL-13 a TNF α . Další schopností DC ovlivněných TSLP je aktivace a expanze naivních CD8⁺T lymfocytů a indukce jejich diferenciaci na buňky produkující IL-5- a IL-13 (Grunig et al., 2005).

IL-1 β a TNF α synergizují s IL-4 a IL-13 pro indukci TSLP epiteliálními buňkami. Dvouvláknová RNA produkovaná výrazně během replikace rinovirů je TLR3 ligandem a zvyšuje TSLP sekreci epiteliálními buňkami, které jsou aktivovány Th2 cytokiny. Ligandy TLR2, TLR4, TLR8 a TLR9 mohou také indukovat TSLP (Botturi et al., 2011).

Stimulace lidských mastocytů v in vitro studiích IL-1 β , TNF- α v přítomnosti TSLP silně zvýšila produkci prozánětlivých cytokinů IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13 stejně jako chemokinů účastnící se patogeneze alergických onemocnění. Získané informace naznačují, že aktivace mastocytů a DC způsobená Th2 diferenciací po stimulaci TSLP zesilují alergický zánět dýchacích cest. V souladu s tím blokáda endogenního TSLP, který je uvolněn aktivovanými epitelálními buňkami, inhibuje produkci IL-13 mastocyty. Uvedená data předpokládají, že TSLP může usnadnit komunikaci mezi mastocyty a epitelálními buňkami (Rochman a Leonard, 2008).

Zánětlivé cytokiny IL-12 a TNF- α jsou schopny indukovat rychlou produkci TSLP v bronchiálních epitelálních buňkách způsobem závislým na NF κ B (Lee et al., 2007). Zánětlivé cytokiny IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-13, IL-25, respirační viry, houbové proteázy jsou známé faktory v rozvoji astmatu nebo exacerbace již existujícího onemocnění a zároveň indukují expresi TSLP. V rozsáhlých genomových studiích lidských populací byly nalezeny genové polymorfismy TSLP spojené s astmatem. V řízení zánětu typu Th2 TSLP působí v součinnosti s cytokiny IL-25 a IL-33. Data ukazují, že TSLP má významnou úlohu v iniciaci alergických onemocnění. Nicméně jeho role v progresi onemocnění musí být dále vyjasněna stejně jako důležitost TSLP při normální imunitní homeostáze. Tento fakt bude významný pro stanovení, zda blokáda TSLP v terapii alergických onemocnění může být tolerována (Ziegler, 2010).



Obr. 5 Patofyziologie TSLP v alergickém zánětu. Alergenní nebo virové inzulty aktivují epiteliální buňky. TSLP zahájí iniciální fázi alergické reakce aktivací nevyzrálých DC, které produkují IL-8, eotaxin 2 a další chemokiny TARC a MDC. Kostimulační mastocyty produkují IL-5 a IL-13 stejně jako GM-CSF a IL-6. mDC aktivované TSLP se přeměňují na zralé DC a migrují do odvodných lymfatických uzlin, aby iniciovaly fázi adaptivní imunity při alergické reakci. DC aktivované TSLP exprimují OX40L. OX40L aktivuje diferenciaci alergenně specifických naivních CD4⁺ T lymfocytů na zánětlivé Th2 lymfocyty. Th2 lymfocyty produkují IL-4, IL-5 a IL-13. Zánětlivé Th2 lymfocyty migrují zpět do místa zánětu díky lokální produkci TARC a MDC. Th2 cytokiny IL-4, IL-5, IL-13 a TNF α , které jsou produkovány zánětlivými Th2 lymfocyty iniciují alergický zánět aktivací produkce IgE, eozinofilii a produkcí hlenu (Liu, 2007).

Hypotéza, že epiteliální bariéra se účastní zahájení alergické reakce byla podpořena důkazem TSLP, který reprezentuje klíčovou molekulu na rozhraní epiteliální buňka-DC pro iniciaci alergického zánětu. Prozánětlivé cytokiny IL-1 β a TNF- α spouští silnou produkci TSLP epiteliálními buňkami dýchacích cest (synergizují s IL-4 a IL-13). TSLP dává schopnost DC indukovat zánětlivé Th2 lymfocyty a expandovat, dále aktivovat alergenně specifické Th2 paměťové lymfocyty. TSLP nestimuluje mDC k produkci Th1 polarizovaného cytokinu IL-12 nebo prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β a IL-6. TSLP aktivuje mDC k produkci řady odlišných chemokinů včetně eotaxinu 2, IL-8. Uvedené nálezy

předpokládají, že jedním z nejvýznamnějších znaků TSLP je navození schopnosti mDC indukovat imunitní odpověď typu 2 při ztrátě schopnosti produkce Th1 polarizovaných cytokinů. Odpověď typu Th2 vede k alergii a atopii. Z pohledu molekulárního mechanismu, kterým DC aktivované TSLP indukují alergickou reakci je klíčovou molekulou OX40 ligand. OX40 ligand je molekula na DC indukovaná TSLP. Z tohoto důvodu TSLP a OX40L mohou reprezentovat významné cíle pro intervenci iniciace alergické zánětlivé reakce (Wang a Liu, 2009).

Epiteliální buňky astmatických pacientů mají zvýšenou expresi TSLP v porovnání se zdravými jedinci. TSLP stimuluje produkci Th2 cytokinů jako je IL-13. TSLP up reguluje expresi IL-13 jak v kontrolních buňkách, tak v buňkách astmatických pacientů (Simlali et al., 2010). IL-13 v patogenezi astmatu vykazuje zánětlivý profil, má schopnost podporovat tvorbu a formování hlenu a napomáhá remodelaci u modelů hlodavců (Holgate a Davies, 2009).

Stimulace pomocí TSLP indukovala v bronchiálních epiteliálních buňkách proliferaci a zvýšila reparační proces pomocí produkce IL-13. EGF je růstový faktor epiteliálních buněk a několik studií prokázalo vztah mezi IL-13 a receptorové signalizační dráhy EGF (EGFR), ve které je aktivace EGFR nezbytná pro epiteliální reparaci. U epiteliálních buněk astmatiků jsou tyto dráhy porušeny zejména přítomností aktivnější formy TGF- β ve srovnání se zdravými subjekty. TGF- β může vysvětlovat, že i přes vyšší produkci TSLP a IL-13 epiteliálními buňkami astmatických pacientů, nedochází u nich k takové proliferaci a reparaci jako u kontrolních buněk zdravých jedinců (Semlali et al., 2010).

4.8.3 RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted)

RANTES/CCL5 je klíčový prozánětlivý cytokin patřící do skupiny CC-chemokinů. RANTES u savců představuje malý protein čítající 68 aminokyselin o hmotnost přibližně 8kDa. Široká škála buněk RANTES produkuje: lymfocyty, makrofágy, fibroblasty, krevní destičky, buňky hladkého svalů, endoteliální a

epiteliální buňky. Vedle chemotaxe RANTES zprostředkovává stimulaci T lymfocytů. RANTES indukuje migraci leukocytů vazbou na specifické receptory (CCR1, CCR3, CCR4, CCR5) a podporuje infiltraci leukocyty v místě zánětu. (Arathy et al., 2011, Appay a Jones, 2001).

RANTES byl první chememokin identifikován jako silný eozinofilní atraktant. Nejprve byly popsány atrahující vlastnosti pro lymfocyty a monocyty. Důkaz, že RANTES působí jako chemoatraktant v alergickém zánětu in vivo ukázala studie, při níž neutralizace RANTES receptorovým antagonistou (Met-RANTES) významně inhibovala přísun lymfocytů a eozinofilů (Teran, 2000).

Bazální produkce RANTES nebo eotaxinu je minimální, ale zvětšuje se expozicí stimulu, jakými jsou respirační viry, TNF- α nebo INF- γ . TNF- α indukuje na koncentraci závislým způsobem produkci RANTES v bronchiálních epiteliálních buňkách. TNF- α a IL-1 zvyšují sekreci RANTES v epiteliálních buňkách a fibroblastech. INF- γ indukuje RANTES synergicky s TNF v epiteliálních a endoteliálních buňkách. Genová exprese RANTES se zdá být odlišně regulována v závislosti na typu buněk a použitém stimulu (Casola et al., 2002).

Studie prokázaly, že RANTES má úlohu v několika onemocnění dýchacích cest. U bronchiolitidy hladiny RANTES korelují s vážností onemocnění. RANTES se úzce pojí se získáváním buněk pro formulaci granulomů u tuberkulózy. RANTES společně s CCL3 je významný v patogenezi granulomatózního zánětu a alveolitidy u sarkoidózy, zde exprese RANTES koreluje s průběhem onemocnění. Zvýšené hladiny RANTES nacházíme v plicích pacientů s astmatem (Thomas et al., 2006).

Podle teorie je právě zánět u CHOPN hlavním mechanismem limitujícím proudění vzduchu a mnoho zánětlivých mediátorů bylo prokázáno ve sputu pacientů trpících CHOPN. Pacienti s astmatem a CHOPN často trpí exacerbacemi. Během exacerbace jsou hladiny chemokinu RANTES značně zvýšeny v epiteliálních buňkách dýchacích cest a jsou doprovázeny vzrůstající eozinofilii (Bérubé et al., 2008).

4.8.4 Eotaxin

Eotaxin je CC chemokin atrahující eozinofily aktivací CCR3 chemokinového receptoru. Eotaxin u astmatu aktivuje leukocytové chemokinové receptory, které tvoří součást leukocytové extravazace regulované prostřednictvím selektinů, integrinů a sekrecí chemokinů. Epiteliální buňky produkují eotaxin po stimulaci cytokiny a jeho exprese v dýchacích cestách u senzitivních jedinců je indukována po expozici alergenu. Po alergenní expozici je eotaxin produkován epiteliálními buňkami v místě akumulace eozinofilů. Hladiny eotaxinu v dýchacích cestách přímo souvisí s jejich senzitivitou ke kontraktálním stimulům a s přítomností eozinofilů u pacientů s mírným astmatem (Lilly et al., 1999). Exprese eotaxinu v dýchacích cestách jde ruku v ruce s přítomností eozinofilního infiltrátu (Yadav et al., 2010). Eotaxin stimuluje uvolnění reaktivních kyslíkových částic stejně jako indukci integrinů na eozinofilech (Rankin et al., 2000).

Zvýšená exprese eotaxinu byla zjištěna u atopického i neatopického astmatu. Bylo prokázáno, že zvýšené hladiny eotaxinu korelují s diagnózou astmatu. Eotaxin 1 je produkován mimo epiteliální buňky také plicními fibroblasty, buňkami hladkého svalu, endoteliálními buňkami, alveolárními makrofágy, eozinofily, lymfocyty. Na straně druhé eotaxin atrahuje eozinofily, Th2 lymfocyty, bazofily, thymocyty.

TNF- α a IL-4 stimulují transkripci genu pro eotaxin v epiteliálních buňkách dýchacích cest a plicních fibroblastech. Promotor genu pro eotaxin obsahuje překrývající shodné části pro transkripční faktory nukleárního faktoru (NF) κ B a pro signální transduktor a aktivátor transkripce (STAT)-6 pravděpodobně zprostředkující odpovědi na TNF- α a IL-4. IL-13 hraje významnou roli v etiologii bronchiální hyperreakivity a zřejmě také podporuje produkci eotaxinu (Pease a Williams, 2001).

Receptorem pro eotaxin-1(CCL11), eotaxin-2(CCL24) a eotaxin-3(CCL26) je pouze CCR3 (CC chemokinový receptor 3). CCR3 je na povrchu buněk účastnících se alergického zánětu tj. eozinofily, bazofily a Th2 lymfocyty (Pease a Williams, 2001). Chemokinový receptor CCR-3 by mohl být terapeutickým cílem, protože má schopnost přitahovat eozinofily a je exprimován Th2 buňkami a jeho ovlivněním by snad bylo možné zabránit vzniku astmatu (Folli et al., 2008).

Eotaxin kooperuje s IL-5 při indukci přísunu eozinofilů. IL-5 podporuje mobilizaci eozinofilů z kostní dřeně zatímco eotaxin odvádí eozinofily do tkáně. Kinetika uvolňování eotaxinu v bronchoalveolární tekutině astmatiků po expozici alergenu je podobná jako u RANTES, MIP- α a MCP-1. Eotaxin 2 a eotaxin jsou funkčně podobné, ale strukturně odlišné. Vykazují 39% identitu na úrovni aminokyselin a kompletně se liší v N koncové oblasti. In vitro eotaxin působí chemotaxi eozinofilů. Eotaxin 2 působí také chemotakticky pro bazofily a indukuje uvolnění histaminu a leukotrienu (LTC₄) u IL-3 aktivovaných bazofilů. Zvýšená mRNA exprese eotaxinu 2 byla zaznamenána v bronchiální biopsii od atopických a neatopických astmatiků. Eotaxin 3 vykazuje 36% a 32% shodu s eotaxinem a eotaxinem 2 v tomto pořadí. Také eotaxin 3 atrahuje bazofily. Navíc IL-4 a IL-3 indukují expresi eotaxinu 3 v endoteliálních buňkách. Nicméně eotaxin 3 je 10x méně silný v aktivaci eozinofilů a bazofilů než dva dříve zmíněné eotaxiny (Teran, 2000).

Eotaxin-1 vykazuje profibrogenní aktivitu na fibroblasty v plicích. Eotaxin-2 podporuje proliferaci fibroblastů a syntézu kolagenu. Naproti tomu eotaxin-3 stimuloval migraci fibroblastů (Kohan et al., 2010).

4.8.5 CCL2 / MCP-1

MCP-1 (monocytový chemoatraktantový protein) je silný atraktant pro monocyty patřící mezi CC chemokiny. Byl to první objevený CC chemokin. Gen pro CCL2 je lokalizován na chromozomu 17 a jeho exprese může být indukována různými mediátory: PDGF, IL-1, IL-4, vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF), LPS a IFN- γ .

CCL2 je produkován různými typy buněk konstitutivně nebo po indukci cytokinů, růstových faktorů či oxidativního stresu. CCL2 exprimují epiteliální a endotelové buňky, fibroblasty, astrocyty, mikroglie a buňky hladkého svalu. CCL2 odvádí monocyty, paměťové T lymfocyty a DC do místa infekce nebo poškozené tkáně (Yadav et al., 2010).

CCL2 interaguje s receptorem spojeným s G proteinem na povrchu leukocytů. MCP-1 se váže k receptoru CCR₂ a CCR₁₁. Vazba k receptoru CCR₁₁ nezpůsobuje zvýšenou intracelulární mobilizaci kalcia, která je důležitá pro chemotaxi. MCP-1 má nízkou afinitu k receptoru CCR₁₁. CCL2 odvádí leukocyty na místo zánětu nebo infekce, vedle toho zeslabuje zánět inhibicí produkce prozánětlivých cytokinů. Zvýšené množství CCL2 bylo zaznamenáno u alergického astmatu (Yadav et al., 2010). CCL2 může zeslabovat zánět na základě své schopnosti inhibovat produkci prozánětlivých cytokinů (van Zoelen, 2011).

4.8.6 CCL20 / MIP-3 α

Epiteliální buňky produkují významné množství CCL20 v reakci na stimuly včetně zánětlivých cytokinů a okolních částic. CCL20 je jediný chemokin, který interaguje s receptorem CCR6, který je exprimován na nevyzrálých DC. Mohl by odvádět DC do dýchacích cest, čímž by propojoval přirozenou a adaptivní imunitu. CCL20 má antimikrobiální aktivitu podobnou β -defensinům (Schutyser et al., 2003; Proud a Leigh, 2011).

4.8.7 CCL3 / MIP-1 α

CCL3 je chemotaktický pro lymfocyty, monocyty a eozinofily. Epiteliální exprese CCL3 následuje po indukci virovou infekcí. Vzestup hladiny CCL3 je přítomen v sekretech dýchacích cest u subjektů s virově indukovanými exacerbacemi astmatu (Proud a Leigh, 2011). CCL3 spolu s CCL2 byl identifikován jako profibrotický mediátor (Isozaki et al, 2011).

4.8.8 CCL13 / MCP-4

CCL13 působí chemotakticky na monocyty, paměťové T lymfocyty, eozinofily a bazofily. Zvýšená epiteliální exprese byla zaznamenána u astmatu (Proud a Leigh, 2011).

4.8.9 CCL28

CCL28 je nový CC chemokin exprimovaný v mukózních tkáních. CCL28 vykazuje chemotaktickou aktivitu pro eozinofily a CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocyty prostřednictvím CCR3 a CCR1 receptorů. Asociace CCL28 s eotaxinovým receptorem CCR3 předurčuje jeho roli v eozinofilní infiltraci. IL-1 β a TNF- α indukují na NF κ B závislou expresi CCL28 ve vysoké míře. Údaje informují o potenciální úloze CCL28 v určení povahy zánětu dýchacích cest po mikrobiálním insultu (O’Gorman et al., 2006). Ačkoli konstituční exprese CCL28 je nízká, v in vitro podmínkách je indukována prozánětlivými cytokiny (Proud a Leigh, 2011).

4.8.10 CX3CL1 / fractalkine

Chemokin CX3CL1 interaguje s receptorem CX3CR1 nacházejícím se na T lymfocytech, monocitech, NK buňkách a mastocytech. INF- γ zvyšuje epiteliální expresi CX3CL1. Nicméně adheze mononukleárních buněk k INF- γ stimulovaných epiteliálních buněk je částečně inhibována protilátkami k CX3CL1. Epiteliální exprese CX3CL1 se zvětšuje po působení alergenu u astmatických subjektů. Hladiny CX3CL1 v bronchoalveolární tekutině subjektů se zánětlivým onemocněním dýchacích cest korelovaly s počtem mononukleárních buněk v bronchoalveolární laváži (Proud a Leigh, 2011).

CX3CL1 syntetizují především endoteliální buňky. CX3CL1 indukuje adhezi a migraci leukocytů. Rozpustná forma CX3CL1 údajně využívá svůj chemotaktický efekt pro monocyty, NK buňky a T lymfocyty. Existuje předpoklad, že plicní fibroblasty jsou významným buněčným zdrojem CX3CL1, který může hrát roli v plicním zánětu a fibróze (Isozaki et al., 2011).

Závěr

Podle současných poznatků epiteliální buňky regulují činnost řady imunitních buněk. Epiteliální buňky ovlivňují rovnováhu Th1/Th2/Th17, pomocí prozánětlivých cytokinů (např. IL-1 β , TNF- α) amplifikují zánětlivé procesy a činnost efektorových buněk, řídí přísun imunitních buněk do ložiska poškození. Epiteliální buňky dýchacích cest jsou zejména významným zdrojem chemokinů (př. IL-8, RANTES) regulujících přísun zánětlivých buněk do místa poškození. Dále se epiteliální buňky podílejí na reparačních procesech. Z řady zjištěných biologických funkcí cytokinů lze například uvést, že stimulace bronchiálních epitelálních buněk pomocí TSLP zvyšuje reparační proces, ale na straně druhé byly reparační dráhy buněk astmatiků porušeny přítomností aktivnější formy TGF- β . IL-33 je signální molekulou, která je schopna zorganizovat přísun buněk zodpovědných za onemocnění, konkrétně u astmatu a alergických onemocnění, tudíž další výzkum IL-33 je nutný pro ověření, zda-li by se IL-33 mohl stát interleukinen vhodným pro terapeutickou intervenci. Porucha cytokinových regulací může vyústit v rozvoj různých plicních onemocnění, a proto je tato oblast intenzívně studována, aby se hledaly nové cíle možných terapeutických zásahů.

Přehled literatury:

AARBIOU, J., VERHOOSSEL, R.M., VAN WETERING, S. et al.: Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004, roč. 30, s. 193-201.

AKIRA, S.: The role of IL-18 in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000, roč. 12, s. 59-63.

APPAY, V., ROWLAND-JONES, S.L.: RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 2001, roč. 22, s. 83-87.

ARATHY, D.S., NAIR, S., SOMAN, S.S. et al.: Functional characterization of the CC chemokine RANTES from Pekin duck (*Anas platyrhynchos*). *Dev Comp Immunol.* 2011, roč. 35, s. 142-150.

ARRIBILLAGA, L., DOTOR, J., BASAGOITI, M. et al.: Therapeutic effect of a peptide inhibitor of TGF- β on pulmonary fibrosis. *Cytokine.* 2011, roč. 53, s. 327-333.

AUJLA, S.J., ALCORN, J.F.: T(H)17 cells in asthma and inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2011.

BAINES, K.J., SIMPSON, J.L., WOOD, L.G. et al.: Transcriptional phenotypes of asthma defined by gene expression profiling of induced sputum samples. *J Allergy Clin Immunol.* roč. 127, s. 153-60.

BAO, Z., YE, Q., GONG, W. et al.: Humanized monoclonal antibody against the chemokine CXCL-8 (IL-8) effectively prevents acute lung injury. *Int Immunopharmacol.* 2010, roč. 10, s. 259-263.

BARKSBY, H.E., LEA, S.R., PRESHAW, P.M., TAYLOR, J.J.: The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin Exp Immunol.* 2007, roč. 149, s. 217-225.

BÉRUBÉ J., BOURDON, C., YAO, Y., ROUSSEAU, S.: Distinct intracellular signaling pathways control the synthesis of IL-8 and RANTES in TLR1/TLR2, TLR3 or NOD1 activated human airway epithelial cells. *Cell Signal.* 2009, roč. 21, s. 448-456.

BLOEMEN, K., VERSTRAELEN, S., VAN DEN HEUVEL, R. et al.: The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunol Lett.* 2007, roč. 113, s. 6-18.

BORISH, L., STEINKE J.W.: Interleukin-33 in asthma: How big of a role does it play? *Curr Allergy Asthma Rep.* 2011, roč. 10, s. 7-11.

BOTTURI, K., LANGELOT, M., LAIR, D. et al.: Preventing asthma exacerbation: What are the targets? *Pharmacol Ther.* 2011, roč. 131, s. 114-120.

BRADLEY, J.R.: TNF-mediated inflammatory disease. *J Patol.* 2008, roč. 214, s. 149-160.

CAMARA, J., JARAI, G.: Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF-alpha. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2010, roč.3, s. 2-11.

CASOLA, A., HENDERSON, A., LIU, T. et al.: Regulation of RANTES promoter activation in alveolar epithelial cells after cytokine stimulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002, roč. 283, s. 1280-1290.

COLGAN, J.D., HANKEL, I.L.: Signaling pathways critical for allergic airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2010, roč. 10, s. 42-7.

COMMINS, S., BORISH, L., STEINKE, J.W.: Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2010, roč. 125, s. 53-72.

CORAUX, R., HAJJ, R., LESIMPLE, P., PUCHELLE, E.: In vivo models of human airway epithelium repair and regeneration. *Eur Respir Rev.* 2005, roč. 14, s. 131-136.

CORRIGAN, C.J., WANG, W., MENG, Q. et al.: Allergen-induced expression of IL-25 and IL-25 receptor in atopic asthmatic airways and late-phase cutaneous responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2011, roč. 128. S. 116-124.

DINARELLO, C.A.: IL-18 A T H1 –inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol.* 1999, roč. 103, s. 11-13

DURR, U.H., SUDHEENDRA, U.S., RAMAMOORTHY, A.: LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2006, roč. 1758, s. 1408-1425.

DUVERNELLE, C., FREUND, V., TROSSARD, N.: Transforming growth factor-beta and its role in asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2003, roč.16, s. 181-196.

EL-MEZAYEN, R.E.H., MATSUMOTO, T.: In vitro responsiveness to IL-18 in combination with IL-12 or IL-2 by PBMC from patients with bronchial asthma and atopic dermatitis. *Clin Immunol.* 2004, roč. 111, s. 61-68.

FOLLI, C., DESCALZI, D., SCORDAMAGLIA, E. et al.: New insights into airway remodelling in asthma and its possible modulation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008, roč.8, s. 367-75.

GE, Q., MOIR, L.M., BLACK, J.L. et al.: TGF β 1 induces IL-6 and inhibits IL-8 release in human bronchial epithelial cells: the role of Smad2/3. *J Cell Physiol.* 2010, roč. 226, s. 846-854.

GOETZL, E.J.: Changing paradigms in the immunological science of Allergy: 2008. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2008, roč. 8, s. 28-31

GREGORI, S.: Dendritic cells in networks of immunological tolerance. *Tissue Antigens.* 2011, roč. 77, s. 89-99.

GRUNIG, G., BANZ, A., DE WAAL MALEFYT, R.: Molecular regulation of Th2 immunity by dendritic cells. *Pharmacol Ther.* 2005, roč. 106, s. 75-96.

HALWANI, R., AL-MUHSEN, S., HAMID, Q.: Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pharmacol.* 2010, roč. 10, s. 236-245.

HAMILTON, J.A.: GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* 2002, roč. 23, s. 403-408.

HAY, D.W.P., SARAU, H.M.: Interleukin-8 receptor antagonists in pulmonary diseases. *Curr Opin Pharmacol.* 2001, roč.1, s. 242-247.

HOLGATE, S.T.: Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007, roč. 120, s. 1245-1246.

HOLGATE, S.T.: Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008, roč. 38, s. 872-879.

HOLGATE, S.T., DAVIES, D.E.: Rethinking the pathogenesis of asthma. *Immunity.* 2009, roč. 18, s. 362-367.

HONG, J., KANG, Y., YOON, D. et al.: Suppressing IL-32 in monocytes impairs the induction of the proinflammatory cytokines TNFalpha and IL-1 beta. *Cytokine.* 2010, roč. 49, s. 171-176.

CHAVAKIS, T., KEIPER, T., MATZ-WESTPHAL, R. et al.: The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2004, roč. 279, s. 55602-55608.

CHIN, D., BOYLE, G.M., PARSONS, P.G., COMAN, W.B.: What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)? Br J Plast Surg.2004, roč. 57, s. 215-221.

ISOZAKI, T., OTSUKA, K., SATO, M. et al.: Synergistic induction of CX3CL1 by interleukin-1 β and interferon- γ in human lung fibroblasts: involvement of signal transducer and activator of transcription 1 signaling pathways. Transl Res. 2011, roč. 157, s. 64-70.

JEONG, H.J., SHIN, S.Y., OH, H.A. et al.: IL-32 up-regulation is associated with inflammatory cytokine production in allergic rhinitis. J Pathol. 2011, roč. 224, s. 553-556.

JUNIOR, D.M., ARAÚJO, J.A., CATELAN, T.T et al. : Immune system – part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. Rev Bras Reumatol. 2010, roč. 50, s. 552-580.

KAHLER, C.M., PISCHEL, A., KAUFMANN, G., WIEDERMANN, C.J.: Influence of neuropeptides on neutrophil adhesion and transmigration through a lung fibroblast barrier in vitro. Exp Lung Res. 2001, roč. 27, s. 25-46.

KATO, A., SCHLEIMER, R.P.: Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. Curr Opin Immuno. 2007a, roč. 19, 711-720.

KAWKITINARONG, K., LINZ-MC GILLEM, L., BIRUKOV, K.G., GARCIA, J.G.: Differential regulation of human lung epithelial and endothelial barrier function by thrombin. Am J Respir Cell Mol Biol. 2004, roč. 31, s. 517-527.

KISHORE, U., GREENHOUGH, T.J., WATERS, P. et al.: Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. Mol Immunol. 2006, roč. 43, č. 1293-1315.

KO, N.Y., MUN, S.H., LEE, S.H. et al.: Interleukin-32 α production is regulated by MyD88-dependent and independent pathways in IL-1 β -stimulated human alveolar epithelial cells. *Immunobiology*. 2011, roč. 216, s. 32-40.

KOHAN, M., PUXEDDU, I., REICH, R. et al.: Eotaxin-2/CCL24 and eotaxin-3/CCL26 exert differential profibrogenic effects on human lung fibroblasts. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010, roč. 104, s. 66-72.

KOPECKÝ, J., KOPECKÝ, O.: NK buňky, chemokiny a chemokinové receptory. *Klin Onkol* . 2010, roč. 23, s. 5-9.

KREJSEK, J., KOPECKÝ, O.: *Klinická imunologie*. 1. vyd., Hradec Králové: Nucleus HK, 2004, ISBN 80-86225-50-X

KUMAR, V., SHARMA, A.: Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol*. 2010, roč. 10, s. 1325-1334.

LEE, H.C., ZIEGLER, S.F.: Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NF κ B. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, roč. 104, s. 914-919.

LINDÉN, A.: Role of interleukin-17 and the neutrolil in asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001, roč. 126, s. 179-184.

LILLY, C.M., WOODRUFF, P.G., CAMARGO, C.A.Jr et al.: Elevated plasma eotaxin levels in patients with acute asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1999, roč. 104, s. 789-790.

LITVACK, M.L., DJIADEU P., RENGANANTHAN, S.D. et al.: Naturel IgM and innate immune collectin SP-D bind to late apoptic cells and enhance their clearance by alveolar macrophages in vivo. *Mol Immunol*. 2010, roč. 48, s. 37-47.

LIU, Y.J.: Thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand pathway in the initiation of dendritic cell-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, roč. 120, s. 245-256.

LLOYD, C.M.: IL-33 family members and asthma – bridging innate and adaptive immune responses. *Curr Opin Immunol*. 2010, roč. 22, s. 800-806.

LLOYD, C.M., HAWRYLOWICZ, C.M.: Regulatory T cells in asthma. *Immunity*. 2009, roč. 18, s. 438-449.

MALE, D., COOKE, A., OWEN, M. et al.: *Advanced immunology*. 3. vyd. Turin: Mosby. 1996, ISBN 07234 2059 9, s. 10.11, 10.12.

MARTÍNEZ-GARCÍA, M.A., PERPINÁ-TORDERA, M., ROMÁN-SÁNCHEZ, P. et al.: The association between bronchiectasis, systemic inflammation, and tumor necrosis factor alpha. *Arch Bronconeumol*. 2008, roč. 44, s. 8-14.

MATERA, M.G., CALZETTA, L., CAZZOLA, M.: TNF- α inhibitors in asthma and COPD: We must not throw the baby out with the bath water. *Pulm Pharmacol Ther*. 2010, roč. 23, s. 121-128.

MIZGERD, J.P.: Molecular mechanisms of neutrophil recruitment elicited by bacteria in the lungs. *Semin Immunol*. 2002, roč. 14, s. 123-132.

MOORE, B.B., MOORE, T.A., TOEWS, G.B.: Role of T- and B-lymphocytes in pulmonary host defense. *Eur Respir J*. 2001, roč. 2001, s. 846-856.

MORJARIA, J.B., BABU, K.S., HOLGATE, S.T., POLOSA, R.: Tumor necrosis factor- α as a therapeutic target in asthma. *Drug discovery today: Therapeutic strategies*. 2006, roč. 3, s. 309-315.

MUKAIDA, N.: Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003, roč. 284, s. 566-577.

MULLANE, K.: Asthma translational medicine: Report card. *Biochem Pharmacol.* 2011, roč. 82, s. 209-225.

MURDOCH, J.R., LLOYD, C.M.: Chronic inflammation and asthma. *Mutat Res.* 2010, roč. 690, s. 24-39.

MURRAY, L.A., SYED, F., GRISWOLD, D.E., DAS, A.M.: Role of chemokines in severe asthma. *Curr Drug Targets.* 2006, roč. 7. s. 579-588.

MURUGAN, V., PECK, M.J.: Signal transduction pathways linking the activation of alveolar macrophages with the recruitment of neutrophils to lungs in chronic obstructive pulmonary disease. *Exp Lung Res.* 2009, roč. 35, s. 439-485.

NELSON, S., MARTIN, T.R.: *Cytokines in pulmonary disease infection and inflammation. Lung biology in health and disease.* roč. 141. New York: Marcel Dekker. 2000, ISBN: 0-8247-1931-X, s. 246, 316.

NETEA, M.G., SIMON, A., VAN DE VEERDONK, F. et al.: IL-1 β processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathogens.* 2010, roč. 6, s. e1000661.

NEVEU, W.A., ALLARD, J.L., RAYMOND, D.M. et al.: Elevation of IL-6 in the allergic asthmatic airway is independent of inflammation but associates with loss of central airway function. *Respir Res.* 2010, roč.11, s. 2-10.

NEVEU, W.A., ALLARD, J.B, DIENZ, O. et al.: IL-6 is required for airway mucus production induced by inhaled fungal allergens. *J Immunol.* 2009, roč. 183. s. 1732-1738.

NEWTON, R., STAMPLES, K.J., HART, L.: GM-CSF expression in pulmonary epithelial cell is regulated negatively by posttranscriptional mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011, roč. 287, s. 249-253.

OBOOKI, K., NAKAE, S., MATSUMOTO, K., SAITO, H.: IL-33 and airway inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011, roč. 3, s. 81-88

O'GORMAN, M.T., JATOI, N.A., LANE, S.J., MAHON, B.P.: IL-1 beta and TNF-alpha induce increased expression of CCL28 by airway epithelial cells via an NFkappaB-dependent pathway. *Cell Immunol.* 2005, roč. 238, s. 87-96.

PALANIYAR, N., NADESALINGAM, J., REID, K.B.: Pulmonary innate immune proteins and receptors that interact with gram-positive bacterial ligands. *Immunobiology.* 2002, roč. 205, s. 575-594.

PEASE, J.E., WILLIAMS, T.J.: Eotaxin and asthma. *Curr Opin Pharmacol.* 2001, roč. 3, s. 248-253.

RANKIN, S.M., CONROY, D.M., WILLIAMS, T.J.: Eotaxin and eosinophil recruitment implication for human disease. *Mol Med Today.* 2000, roč. 6. S. 20-27.

REYNOLDS, J.M., ANGKASEKWINAI, P., DONG, C.: IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010, roč. 21, s. 413-423.

RITZ, S.A., STAMPFLI, M.R., DAVIES, D.E. et al.: On the generation of allergic airway diseases: from GM-CSF to Kyoto. *Trends Immunol.* 2002, roč. 23, s. 396-402.

ROCHMAN, Y., LEONARD, W.J.: Thymic stromal lymphopoietin: a new cytokine in asthma. *Curr Opin Pharmacol.* 2008, roč.8, s. 249-54.

ROT, A., VON ANDRIAN, U.H.: Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol.* 2004, roč. 22, s. 891-928.

PROUD, D., LEIGH, R.: Epithelial cells and airway diseases. *Immunol Rev.* 2011, roč. 242, s. 186-204.

RYAN, J.J., FERNANDO, J.F.: Mast cell modulation of the immune response. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2009, roč. 5, s. 353-359.

SACCO, O., SILVESTRI, M., SABATINI, F. et al.: Epithelial cells and fibroblasts: structural repair and remodelling in the airways. *Pediatr Respir Rev.* 2004, roč. 5, s. 35-40.

SAMITAS, K., LOTVALL, J., BOSSIONS, A.: B: cells: from early development to regulativ allergic diseases. *Arch Immunol Ther Exp.* 2011, roč. 58, s. 209-225.

SALLENAVE, J.M.: The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteinases in inflammatory lung disease. *Respir Res.* 2000, roč. 2, s. 87-92.

SEMLALI, A., JACQUES, E., KOSSIH, L. et al.: Thymic stromal lymphopoietin-induced human asthmatic airway epithelial cell proliferation through an IL-13-dependent pathway. *J Allergy Clin Immunol.* 2010, roč. 125, s. 844-850.

SCHIALE, B., SCHAFFER, K., TAYLOR, C. T.: Hypoxia, innate imunity and infection in the lung. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010, roč. 174, s. 235-243.

SCHLEIMER, P.R., KATO, A., KERN, R. et al.: Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol.* 2007, roč. 120, s. 1279-1284.

SCHUH, J.M., BLEASE, K., KUNKEL, S.L., HOGABOAM, C.M.: Chemokines and cytokine: axis and allies in asthma and allergy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003, roč. 14, s. 503-510.

SCHUTYSER, E., STRUYF, S., VAN DAMME, J.: The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003, roč. 14, s. 409-426.

SIVEEN, K.S., KUTTAN, G.: Role of macrophages in tumor progression. *Immunol Lett.* 2009, roč. 123, s. 97-102.

SMITH, D.E.: IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma. *Clin Exp Allergy.* roč. 40, 200-208.

SNELGROVE, R.J. Targeting of a common receptor shared by CXCL8 and N-Ac-PGP as a therapeutic strategy to alleviate chronic neutrophilic lung diseases. *Eur J Pharmacol.* 2011, roč. 667, s. 1-5.

SORENSEN, O.E., THAPA, D.R., ROSENTHAL, A. et al.: Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J Immunol.* 2005, roč. 174, s. 4870-4879.

SORURI, A., GRIGAT, J., FORSSMANN, U. et al.: beta-Defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. *Eur J Immunol.* 2007, roč. 2007, s. 2474-2486.

STRÍŽ, I.: Imunita respiračního ústrojí. *Allergie, Supplementum.* 2007, roč. 2, s. 28-30.

SWINDLE, E.J., COLLINS, J.E., DAVIES, D.E.: Breakdown in epithelial barrier function in patients with asthma: identification of novel therapeutic approaches. *Allergi Clin Immuno.* 2009, roč. 124, s. 23-34.

ŠTERCLOVÁ, M., VAŠÁKOVÁ, M., METLICKÁ, M. et al.: Angiostatic versus angiogenic chemokines in IPF and EAA. *Respir Med.* 2009, roč. 103, s. 1651-1656.

TAYLOR, A.W.: Review of the activation of TGF-beta in immunity. *J Leukoc Biol.* 2009, roč. 85, s. 29-33.

TERAN, L.M.: CCL chemokines and asthma. *Immunol Today*. 2000, roč. 21. s. 234-242.

TJABRINGA, G.S., AARBIOU, J., NINABER, D.K.: The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J. Immunol*. 2003, roč. 171, s. 6690-6696.

THOMAS, L.H., WICKREMASINGHE, M.I., FRIEDLAND, J.S.: IL-1 beta stimulates divergent upper and lower airway epithelial cell CCL5 secretion. *Clin Immunol*. roč. 122, s. 229-238.

TURVEY, S.E., BROIDE, D.H.: Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2009, roč.125, s. 24-32.

VAŠÁKOVÁ, M.: Idiopatická plicní fibróza – kryptogenní fibrotizující alveolitida. *Postgraduální medicína*. 2009, roč.11, s. 133-137.

VAN ZOELLEN, M.A., VERSTEGE, M.I., DRAING, D.: Endogenous MCP-1 promotes lung inflammation induced by LPS and LTA. *Mol Immunol*. 2011, roč. 48, s. 1468-1476.

YANG, Y., BIN, W., AKSOY, M.O., KELSEN, S.G.: Regulation of interleukin-1 β inhibitor rease by human airway epithelial cells. *Eur Respir J*. 2004, roč. 24, s. 360-366.

WANG, Y., BAI, C., LI, K. et al.: Role of airway epithelial cells in development of asthma and allergic rhinitis. *Respir Med*. 2008, roč. 107, s. 945.

WANG, Y.H., LIU, Y.J.: Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand, and interleukin-25 in allergic responses. *Clin Exp Allergy*. 2009, roč. 39, s. 798-806.

WARD, N.: Interleukins/IL-6 (abstrakt) [databáze online] [citováno 20.7.2011] dostupné na:

http://www.sciencedirect.com.ezproxy.is.cuni.cz/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=1800447988&_st=13&view=c&_acct=C000053052&_version=1&_urlVersion=0&_userid=1490772&md5=b210135d5de78cae5cce6fa4f7b47c8a&searchtype=a

WENDEL, I.M., GIESSMANN, U., BEHREND, P. et al.: Inflammatory-activated microvascular endothelial cells regulate interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression of A549 cells in a paracrine fashion. *Exp Lung Res.* 2008, roč. 34, s. 85-100.

WHITE, S.R., FISHER, B.M., MARROQUIN B.A., STEM, R.: Interleukin-1 mediates human airway epithelial cell migration via NF- κ B. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008, roč. 295, s. 1018-1027.

YADAV, A., SAINI, V., ARONA, S.: MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta.* 2010, roč. 411, s. 1570-1579.

ZHANG, J., WU, L., QU, J.M. Inhibited proliferation of human lung fibroblasts by LPS is through IL-6 and IL-8 release. *Cytokine.* 2011, roč. 54, s. 289-295.

ZIEGLER, S.F.: The role of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in allergic disorders. *Curr Opin Immunol.* 2010, roč.22, s. 795-799.