

**MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Habilitační práce

Brno 2020

MUDr. Martina Doubková, Ph.D.

MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA
KLINIKA NEMOCÍ PLICNÍCH A TUBERKULÓZY

Difuzní parenchymatózní nemoci plic

Habilitační práce v oboru Vnitřní lékařství

Autor:

MUDr. Martina Doubková, Ph.D.

Brno 2020

Komentář

Úvod. Difuzní parenchymatózní nemoci plic neboli intersticiální plicní procesy (IPP) jsou širokou heterogenní skupinou onemocnění, které jsou charakterizovány různým stupněm zánětu a plicní fibrózy. U mnohých IPP neznáme etiologii, diferenciální diagnostika je mnohdy obtížná a vývoj onemocnění není často predikovatelný. Proto jsou tato onemocnění výzvou pro další výzkum.

Cíle. Habilitační práce je komentářem souboru publikací, obsahujících širokou problematiku IPP, kde je uchazečka prvním autorem nebo spoluautorem. Práce je rozdělena do šesti kapitol podle cílů. Cíl 1. Zjistit klinické prognostické faktory u sporadické formy idiopatické plicní fibrózy (IPF) ve vztahu k vývoji onemocnění a přežití. Cíl 2. Provést genetické analýzy (studie) v rodinách s výskytem familiární plicní fibrózy (FPF) a u podezření na vrozenou genetickou dispozici pro plicní fibrotizující onemocnění; zhodnotit efekt antifibrotické léčby ve vztahu ke genovému polymorfismu *MUC5B* (mucin5B) rs35705950 a *DSP* (desmoplakin) rs2076295. Cíl 3. Provést genetické studie u sarkoidózy a zjistit asociace HLA polymorfismů a klinických fenotypů. Cíl 4. Analýza časně detekce sarkoidózy srdce u asymptomatických pacientů s plicní formou sarkoidózy. Cíl 5. Analýza biomarkerů u idiopatické plicní fibrózy (IPF) a sarkoidózy – jejich význam pro diagnostiku a prognózu. Cíl 6. Popsat imunodeficienci v rámci diferenciální diagnostiky intersticiálních plicních procesů a jiné vzácné autoimunitní procesy.

Metody. Cíl 1. Retrospektivní studie pacientů s IPF z registru nemocných Kliniky nemocí plicních a TBC a z EMPIRE (*European MultiPartner IPF Registry*) hodnotící vliv klinických charakteristik, plicních funkčních parametrů, nálezů na HRCT hrudníku a léčby na prognózu onemocnění. Cíl 2. Exomové sekvenování u FPF a u pacienta s podezřením na vzácný Heřmanského-Pudlákův syndrom; vliv SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) rs35705950 *MUC5B* a rs2076295 *DSP* genů na přežití, klinický průběh nemoci a účinnost antifibrotické terapie. Cíl 3. Sekvenování další generace (NGS-*Next Generation Sequencing*) 212 pacientů se sarkoidózou, které umožňuje identifikaci na alelické úrovni, se zaměřením na asociace klinických fenotypů sarkoidózy a polymorfismů HLA. Cíl 4. Vyhodnocení magnetické rezonance (MR) srdce provedené novou metodikou u 113 pacientů se sarkoidózou, využívající techniky parametrického mappingu, pro detekci časných asymptomatických stadií sarkoidózy srdce. Cíl 5. Analýza vybraných markerů v kondenzátu vydechaného vzduchu (KVV) jako neinvazivní vyšetřovací metody u pacientů s IPP ve vztahu k vývoji onemocnění a komorbiditám (gastroezofageální reflux); analýza vlivu surfaktant proteinu A, D, Clara cell

protein 16, S100 proteinu, trefoil faktoru 3, prostatického sekretorického proteinu v krvi a bronchoalveolární tekutině na prognózu vybraných IPP. Cíl 6. Analýza autoprotiilátek u vaskulitid a systémových onemocnění pojiva pro diagnostiku a prognózu IPP. Diferenciální diagnostika granulomatózních procesů s popisem vzácných granulomatóz. Imunologická vyšetření v rámci diferenciální diagnostiky IPP. Doporučení pro diagnostiku a léčbu intersticiálních plicních postižení u systémových onemocnění pojiva.

Výsledky. Cíl 1. Při multivariační analýze českého EMPIRE (504 pacientů) byly vybrány faktory, které negativně ovlivňovaly přežití: věk ≥ 70 let, intersticiální skóre HRCT ≥ 3 a změna difuzní plicní kapacity DLCO o ≥ 15 % ve 12. měsíci. Změny DLco v čase se jevily jako lepší prediktor mortality ve srovnání se změnami FVC (forsírovaná vitální kapacita) v čase. Podle výsledku této analýzy je nutné začlenit do výstupů klinických studií a klinické praxe změny plicní difuzní kapacity spíše než změny FVC v čase.

Další analýza hodnotila vliv antifibrotické léčby pirfenidonem na přežití a plicní funkce. 841 IPF pacientů z EMPIRE (45,5 % na pirfenidonu ve srovnání s 25,9 % bez léčby) bylo sledováno retrospektivně po dobu 2 let; na pirfenidonu progredovala méně než čtvrtina pacientů (signifikantní pokles ≥ 10 % FVC a ≥ 15 % DLCO asociován s mortalitou). DLco oproti FVC byl klinicky signifikantně asociován s mortalitou (pokles DLco o více než 10 % v 6., 12., 18. a 24. měsíci; pokles DLco o více než 15 % v 6., 18. a 24. měsíci. Pirfenidon zde statisticky významně zlepšil 5leté přežití oproti skupině pacientů, kteří neužívali žádnou antifibrotickou léčbu (55,9 % vs. 31,5 %, $p = 0,002$).

Cíl 2. V rodině s FPF jsme objevili celoexomovým sekvenováním novou variantu genu *SFTPA1* (*surfactant protein A1*). Popsali jsme vzácný Heřmanského-Pudlákův syndrom, kde celoexomovým sekvenováním byl potvrzen složený heterozygot *HPS1* genu, a to již známá patogenní varianta c.1189delC; p.(Gln397Serfs*2) a ještě nepopsaná nová varianta c.15007C>T; p. (Gln503*) vedoucí k předčasnému stop kodonu a rychlé degradaci mRNA.

Genetickým sekvenováním vzorků krve získaného z českého EMPIRE registru jsme zjistili, že genotypy *MUC5B* a *DSP* mohou předpovídat riziko IPF v běžné populaci. Potvrdili jsme zvýšenou frekvenci výskytu *MUC5B* rs35705950 *T alely (55,2 % vs. 20,9 %, $P < 0,001$) a *DSP* rs2076295 *G alely (80,4 % vs. 68,3 %, $P < 0,001$) u IPF pacientů ve srovnání s kontrolami. Nosiči alely *DSP* rs2076295 * G profitovali na nintedanibu ve srovnání s pacienty s IPF s genotypem TT, kteří měli kratší přežití OS, *overall survival* (poměr rizika (HR) 7,99; 95% interval spolehlivosti (CI) = 1,56 - 40,90; $P = 0,013$) a rychlejší pokles ve funkci plic (HR 9,42; 95 % CI = 1,91-46,403; $P = 0,006$). Pacienti s rs2076295 TT genotypem profitovali z pirfenidonu při prodlouženém OS ($P = 0,040$; HR = 0,35; 95 % CI = 0,13-0,95) ve srovnání

s nintedanibem. Obě asociace byly potvrzeny analýzou křížové validace. U alely *MUC5B* rs3570595 *T nebyl pozorován žádný rozdíl ve výsledku léčby u nintedanibu nebo pirfenidonu ($P = 0,784$).

Cíl 3. Získané frekvence HLA alel byly porovnávány s daty z databáze alelických frekvencí. V porovnání se zdravými jedinci, byl u pacientů se sarkoidózou vyšší výskyt alel HLA-B*08:01:01, HLA-DRB1*15:01:01, HLA-DRB1*03:01:01, HLA-DPB1*01:01:01 a HLA-DQA1*05:01:01. Výskyt Löfgrenova syndromu koreloval s výskytem alely HLA-DRB1*03:01:01. Naproti tomu HLA-DRB1*11:01 a HLA-DQA1*05:09 byly častější u pacientů s pokročilým onemocněním (stadia III, IV dle zadopředního snímku hrudníku). HLA-DRB1*09:01, HLA-DQA1*01:04 a HLA-DQB1*05:03 byly častější u extrapulmonální formy sarkoidózy, zatímco HLA-DRB1*01:01 a HLA-DPB1*01:01 byly více zastoupeny u pacientů bez mimopulmonálních projevů. Cíl 4. Novou MR metodou využívající techniky parametrického mappingu, která dokáže rozlišit difuzní procesy v srdečním svalu nebo přesněji hodnotit celkové a regionální srdeční funkce pomocí hodnocení myokardiálního *strainu* včetně měření relaxačního času T1, jsme neprokázali u 113 našich pacientů s plicní sarkoidózou postižení srdce.

Cíl 5. Měřením koncentrací vybraných markerů v KVV (pH, dusičnan, butyrát, propionát, sodný kation) bylo možné selektovat pacienty s pravděpodobným kyselým nebo slabě kyselým refluxem (gastroezofageální a extraezofageální reflux). KVV by bylo možné použít jako doplňkovou metodu před zavedením poměrně invazivní MII-pH sondy, tj. k pre-selekcii pacientů, kteří vyžadují další diagnostické měření. Bohužel zatím není možné pomocí analýzy KVV spolehlivě rozdělit pacienty s kyselým a slabě kyselým refluxem.

Prokázali jsme, že analýza vzorků KVV získaných od pacientů s různými respiračními onemocněními (chronická obstrukční plicní nemoc, astma, plicní fibróza, sarkoidóza, cystická fibróza) je proveditelná za méně než pět minut a iontový profil lze porovnat se skupinou zdravých jedinců. Analýza iontového profilu vzorků KVV poskytuje data, ve kterých lze pozorovat statisticky významné rozdíly u několika klinicky relevantních iontů (dusitan, dusičnan, octan, laktát). Vyvinutý systém je vysoce reprodukovatelný, rychlý způsob sběru a analýzy KVV.

Bylo nalezeno několik významných korelací: 1) hladina BALT PSP94 korelovala s prognózou sarkoidózy ($p = 0,035$); 2) hladina BALT SP-D s plicními funkcemi u IPF ($p = 0,032$); 3) BALT SP-D a TFF3 s IPF mortalitou ($p = 0,049$, $p = 0,017$); 4) hladina TFF3 v séru s mortalitou na CHOPN ($p = 0,006$); 5) SP-A v séru se změnami plicních funkčních ukazatelů v čase u IPF ($p = 0,011$); 6) SP-D v séru byla asociována s hodnotou intersticiálního

skóre na HRCT hrudníku u IPF ($p = 0,0346$). Naše analýza navíc ukázala, že některé hladiny biomarkerů se mezi jednotlivými chorobami lišily: 1) hladiny BALT SP-D mezi sarkoidózou a IPF; 2) SP-A v séru mezi IPF, sarkoidózou a CHOPN mezi sebou a od zdravých kontrol; 3) S100A6, S100A11 v séru u IPF, sarkoidózou, CHOPN od zdravých kontrol; a 5) CC16, TFF3, PSP94 v séru mezi CHOPN a kontrolami.

Cíl 6. V pracech věnujících se autoimunitním procesům, imunodeficitům a systémovým onemocněním pojiva jsou shrnuty ucelená doporučení pro diagnostiku a terapii včetně imunologických vyšetření a významu autoprotilátek.

Závěr: Naše práce podpořily význam některých sledovaných parametrů (DLco více než FVC u IPF; přítomnost polymorfismů *MUC5B* a *DSP* u IPF oproti zdravým kontrolám; pozitivní efekt léčby pirfenidonu na přežití u IPF; pozitivní trend efektu terapie nintedanibem u nosičství *DSP* rs2076295 * G u IPF a rs20762955 TT genotypu u pirfenidonu; PSP94 u sarkoidózy, TFF u IPF pro diagnostiku a prognózu IPP. Popsali jsme nové patogenní varianty genů pro *SPAI* u FPF a *HPS1* u Heřmanského-Pudlákova syndromu, a tak přispěli k dalšímu objevování genetické podstaty plicních fibróz s návrhem doporučených postupů pro diagnostiku a léčbu FPF. NGS u pacientů se sarkoidózou potvrdila některé dříve popsané asociace HLA, ale i nové asociace polymorfismů HLA-DPB1 nebo HLA-DQA1 ke vzniku a vývoji onemocnění. S pomocí neinvazivní metody, zhotovením miniaturního odběrového zařízení a využitím kapilární elektroforézy pro analýzu KVV jsme provedli pilotní studie analyzující nejen markery oxidačního stresu, ale i markery, které by mohly být slibné pro diagnostiku gastroezofageálního refluxu jakožto časté plicní komorbidity.

Klíčová slova: biomarkery, genetika, imunologie, intersticiální plicní procesy, klinické charakteristiky, kondenzát vydechovaného vzduchu, sarkoidóza, prognóza, terapie

Commentary

Background. Diffuse parenchymal lung diseases, or interstitial lung diseases (ILDs), are a heterogeneous group of diseases characterized by varying degrees of inflammation and pulmonary fibrosis. In many ILDs etiology is unknown, differential diagnosis is often difficult and disease outcome unpredictable. Therefore, these diseases are a challenge for further research.

Aims. This thesis is a commented set of publications (first author/shared first author, coauthor) published in journals indexed in the Web of Science or Scopus databases. There are six main parts of the thesis which correspond to selected aims. Aim 1. To determine prognostic factors in sporadic form of idiopathic pulmonary fibrosis in relation to clinical course. Aim 2. To perform genetic analyses (studies) in families with familial pulmonary fibrosis (FPF) and suspected genetic predisposition for pulmonary fibrosis; evaluate the effect of antifibrotic treatment in relation to the gene polymorphism *MUC5B* (mucin5B) rs35705950 and *DSP* (desmoplakin) rs2076295. Aim 3. To perform genetic studies in sarcoidosis and identify associations of HLA polymorphisms with clinical phenotypes. Aim 4. Early detection of cardiac sarcoidosis in asymptomatic patients with pulmonary sarcoidosis. Aim 5. Biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis – their significance for diagnosis and prognosis. Aim 6. Immunodeficiency in differential diagnosis of interstitial lung processes and other autoimmune processes.

Methods. Aim 1. Retrospective study of patients with IPF from the registry of patients of our pulmonary department and EMPIRE database (European MultiPartner IPF Registry) evaluating the influence of clinical characteristics, lung function parameters, chest HRCT findings, and treatment on the prognosis. Aim 2. Whole exome sequencing of FPF case with suspicion of rare Heřmanský-Pudlák syndrome; analysis of *MUC5B* gene polymorphism rs35705950 and *DSP* gene polymorphism rs2076295 on clinical course and survival in IPF. Aim 3. Next Generation Sequencing (NGS) in 212 sarcoidosis patients to analyze associations of sarcoidosis clinical phenotypes and HLA polymorphisms. Aim 4. Evaluate cardiac magnetic resonance imaging using parametric mapping techniques including T1 relaxation time in 113 consecutive sarcoidosis patients to detect early asymptomatic stages of sarcoidosis of the heart. Aim 5. Analysis of selected markers in EBC (exhaled breath condensate) as a non-invasive examination method in patients with ILD in relation to disease development and comorbidities (gastroesophageal reflux); analysis of the influence of protein A, protein D, Clara cell protein 16, S100 protein, factor 3 trefoil, prostate secretory protein in

blood and bronchoalveolar fluid (BALF) on prognosis of selected ILDs. Aim 6. Analysis of the importance of autoantibodies in vasculitis and systemic connective tissue diseases for the diagnosis and prognosis of ILDs; differential diagnosis of granulomatous processes with description of rare granulomatosis; and analysis of the importance of immunological examinations in differential diagnosis of ILDs.

Results. Aim 1. In multivariate analysis, age ≥ 70 years, interstitial HRCT score ≥ 3 , and change in DL_{CO} of $\geq 15\%$ at month 12 were confirmed as factors negatively influencing IPF overall survival (OS). DL_{CO} changes over time were shown as a better predictor of mortality compared with FVC (forced vital capacity) changes. Based on this analysis, it is necessary to implement the DL_{CO} analysis into clinical trials and routine practice.

During a 2-yr follow-up (841 IPF patients, 45.5% received pirfenidone and 25.9% no antifibrotic treatment), less than a quarter of the patients progressed on pirfenidone as assessed by the decline of $\geq 10\%$ FVC and $\geq 15\%$ DL_{CO}. On pirfenidone, the DL_{CO} ($\geq 10\%$) declines at 6, 12, 18 and 24 months' and DL_{CO} ($\geq 15\%$) declines at 6, 18- and 24-months' follow-up were associated with increased mortality. The DL_{CO} decline showed higher predictive value for mortality than the FVC decline in IPF. In patients with no antifibrotics, FVC and DL_{CO} declines were not predictive for mortality. Pirfenidone increases 5-yr OS over no-antifibrotic treatment (55.9% vs 31.5% alive, P = 0.002).

Aim 2. We reported a novel *SFTPA1* gene variant in a family with idiopathic interstitial pneumonia (IIP). We identified a compound heterozygous genotype in *HPS1* gene in the proband. Moreover, we identified a pathogenic frameshift variant c.1189delC; p.(Gln397Serfs*2), resulting in a premature stop codon. This variant has been previously associated with HPS. Furthermore, we characterized previously undescribed nonsense variant c.1507C>T; p.(Gln503*), resulting in a premature stop codon and mRNA degradation through nonsense-mediated decay.

We have found by Next-Generation Sequencing (NGS) in IPF patients from the EMPIRE registry that *MUC5B* and *DSP* genotypes may predict IPF risk in general population.

We confirmed overexpression of *MUC5B* rs35705950*T allele (55.2% vs. 20.9%, P<0.001) and *DSP* rs2076295*G allele (80.4% vs. 68.3%, P<0.001) in IPF compared to controls. Carriers of *DSP* rs2076295*G allele profited on nintedanib compared to IPF patients with TT genotype who had a shorter OS (hazard ratio (HR) 7.99; 95% confidence interval (CI)=1.56-40.90; P=0.013) and a faster decline in lung function (HR 9.42; 95%CI=1.91-46.403; P=0.006). These patients with rs2076295 TT genotype benefit from pirfenidone by prolonged OS (P=0.040; HR=0.35; 95%CI=0.13-0.95) compared to nintedanib. Both associations were

confirmed by cross-validation analysis. After stratifying by *MUC5B* rs3570595*T allele carriage, no difference in treatment outcome was observed in nintedanib or pirfenidone (P=0.784).

Aim 3. HLA-B*08:01:01, HLA-DRB1*15:01:01, HLA-DRB1*03:01:01, HLA-DQA1*05:01 and HLA-DPB1*01:01:01 occurred with higher frequency in sarcoidosis compared to healthy subjects. Presence of LS associated with HLA-DRB1*03:01, by contrast HLA-DRB1*11:01 and HLA-DQA1*05:09 were more common in patients with progressing disease (stages III, IV). HLA-DRB1*09:01, HLA-DQA1*01:04 and HLA-DQB1*05:03 were more frequent in extrapulmonary sarcoidosis while HLA-DRB1*01:01 and HLA-DPB1*01:01 were overrepresented in patients without extrapulmonary manifestation.

Aim 4. The new MR method using parametric mapping techniques that can differentiate cardiac muscle diffusion processes or more accurate assessment of overall and regional cardiac function by evaluating myocardial strains did not show cardiac involvement in 113 patients with pulmonary sarcoidosis.

Aim 5. We have identified that selected ions – most notably sodium, butyrate, and propionate – were elevated in EBC samples of subjects suffering from GERD/EER (gastroesophageal reflux disease, extraesophageal reflux). In addition, pH was also elevated in both patient groups compared to healthy subjects. The ionic analysis and simultaneous pH measurement offer a simple, cheap, fast and non-invasive approach in GERD/EER diagnostics. These parameters of EBC sample alone are not yet able to distinguish the type, severity or the stage of GERD/EER, but can help in pre-selecting the subjects most likely suffering from GERD/EER that may require further confirmatory diagnosis by pH-MII measurement. It is demonstrated that the analysis of EBC samples obtained from patients with various respiratory diseases (chronic obstructive pulmonary disease, asthma, pulmonary fibrosis, sarcoidosis, cystic fibrosis) is feasible in less than five minutes and the ionic profile can be compared with the group of healthy individuals. The analysis of the ionic profile of EBC samples provides a set of data in which statistically significant differences among the groups of patients could be observed for several clinically relevant anions (nitrite, nitrate, acetate, lactate). The developed collection system and method provides a highly reproducible and fast way of collecting and analyzing EBC, with future applicability in point-of-care diagnostics.

In ILDs, seven significant correlations were found: 1) BALF PSP94 level correlated with prognosis of sarcoidosis (P=0.035); 2) BALF SP-D level with pulmonary functions in IPF (P=0.032); 3) BALF SP-D and TFF3 with IPF mortality (P=0.049 and 0.017, respectively); 4) serum TFF3 level with COPD mortality (P=0.006,); 5) serum SP-A with pulmonary functions

impairment in IPF ($P=0.011$); 6) serum SP-D level was associated with HRCT interstitial score in IPF ($P=0.0346$); and 7) serum SP-A was associated with staging of COPD according to spirometry ($P<0.001$). Moreover, our analysis showed that some biomarker levels differed significantly among the diseases: 1) BALF SP-D level differed between sarcoidosis and IPF; 2) serum SP-A level differed among IPF, sarcoidosis, COPD and was also different from healthy controls; 3) serum S100A6, S100A11 levels differed among IPF, sarcoidosis, COPD from healthy controls 4) serum SP-D, CC16, TFF-3 levels distinguished IPF patients from healthy controls; and 5) serum CC16, TFF3, PSP94 distinguished COPD patients from healthy controls. Our study shows that some of selected biomarkers should have prognostic value in the analysed lung disorders.

Aim 6. The work on autoimmune processes, immunodeficiencies and connective tissue diseases summarizes comprehensive recommendations for diagnosis and therapy, including immunological examinations and the importance of autoantibodies.

Conclusion. Our work find out the clinical importance of some parameters (DLco) in IPF; positive effect of pirfenidone on survival in IPF; the importance of *MUC5B* and *DSP* polymorphisms in IPF with positive trend of nintedanib treatment in *DSP* rs2076295*G carriers and pirfenidone in *DSP* rs2076295 TT genotype; the importance of PSP94 protein in sarcoidosis, and TFF in IPF. Moreover, we described new pathogenic variant of *SPAI* gene in FPF and *HPS1* gene in Heřmanský-Pudlák syndrome. We have also proposed recommendations for diagnosis and treatment of FPF. NGS in patients with sarcoidosis confirmed some of the previously described associations of HLA as well as new associations of HLA-DPB1 or HLA-DQA1 polymorphisms with disease clinical course. Moreover, we have developed a collection system and a method providing a highly reproducible analysis of exhaled breath condensate. We conducted pilot studies analyzing markers of oxidative stress and other biomarkers to diagnose gastroesophageal reflux as a frequent comorbidity in pulmonary diseases.

Key words: biomarkers, genetics, immunology, diffuse parenchymal lung disorders, interstitial lung diseases, exhaled breath condensate, clinical characteristics, sarcoidosis, therapy, prognosis

Prohlašuji, že jsem habilitační práci vypracovala samostatně. Při sepisování habilitační práce bylo využito možnosti dané Oborovou radou pro Vnitřní nemoci Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a do textu byly začleněny publikované práce, na nichž jsem se podílela jako autor nebo spoluautor a které se týkají předmětu mého výzkumu. Co se vlastní práce týká, podílela jsem se na jejím plánování, organizaci, sběru dat, vyhodnocení výsledků i přípravě publikací.

.....
MUDr. Martina Doubková, Ph.D.

Poděkování

Především chci poděkovat svému manželovi prof. MUDr. Michaelu Doubkovi, Ph.D. za podporu, odborné vedení, které mi byly nápomocné k dosažení mých profesních cílů. Mé poděkování za trpělivost, lásku, porozumění, náleží mým dcerám, Kateřině a Michaelu. Mé poděkování patří v neposlední řadě i prof. MUDr. Janě Skříčkové, CSc a přednostovi kliniky MUDr. Kristiánu Bratovi, Ph.D. za umožnění mého profesního rozvoje na půdě Kliniky nemocí plicních a tuberkulózy LF MU a FN Brno.

Podpora výzkumu:

Habilitační práce je komentovaným souborem vybraných publikací. Předkládané práce jsou členěny do šesti tematických kapitol, které dohromady tvoří celek, výsledek dlouhodobé vědecko-výzkumné činnosti autora. Práce vznikly díky spolupráci Kliniky nemocí plicních a tuberkulózy LF MU a FN Brno s pracovišti Středoevropského technologického institutu MU Brno, Ústavem patologické fyziologie LF UP v Olomouci, Ústavem klinické imunologie a alergologie FN U sv. Anny, I. interní kardiologicko-angiologickou klinikou a Mezinárodním centrem klinického výzkumu FN U sv. Anny a LF MU Brno a Centry pro diagnostiku a léčbu intersticiálních plicních procesů ČR.

Výzkum byl podpořen granty Ministerstva zdravotnictví České republiky:

- Grant AZV NV 17-31945 A „Development of non-invasive diagnosis of extraesophageal symptoms of gastroesophageal reflux disease“
- Grant AZV NV 18-05-00134 „Immunogenetic molecular profile of sarcoidosis: significance for disease course prediction“
- Grant MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705) „Analýza kondenzátu dechu jako alternativní diagnostická metoda nemoci z gastroezofageálního refluxu (GERD)“
- Grant MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705) „Analýza biomarkerů v kondenzátu vydechaného vzduchu, bronchoalveolární tekutině a krevní plazmě u pacientů s vybranými plicními onemocněními ve vztahu k prognóze“

Obsah

1. Úvod	19
1.1. Klasifikace idiopatických intersticiálních pneumonií doznala nových změn (Doubková a kol., 2015)	20
1.2. Epidemiologie intersticiálních plicních procesů (Štefániková a kol., 2019)	26
2. Idiopatická plicní fibróza	34
2.1. Patogeneze idiopatická plicní fibrózy	34
2.1.1. Idiopatická plicní fibróza (Doubková a kol., 2005)	36
2.2. Genetické dispozice pro plicní fibrózu	46
2.2.1. Familiární plicní fibróza	46
2.2.1.1. Familiární idiopatická intersticiální pneumonie (Doubková a kol., 2013)	52
2.2.1.2. A novel germline mutation of SFTPA1 gene in familial interstitial pneumonia (Doubková a kol., 2018)	57
2.2.1.3. Novel genetic variant of HPS1 gene in Hermansky-Pudlak syndrome with fulminant progression of pulmonary fibrosis (Doubková a kol., 2019)	63
2.2.2. Sporadická forma idiopatické plicní fibrózy	69
2.3. Diagnostika a diferenciální diagnostika idiopatické plicní fibrózy	80
2.3.1. Běžná intersticiální pneumonie nemusí být jen idiopatickou plicní fibrózou (Doubková a kol., 2017)	81
2.4. Klinické charakteristiky a prognostické faktory idiopatické plicní fibrózy	93
2.4.1. Idiopatická plicní fibróza a bronchogenní karcinom mají něco společného (Doubková a kol., 2018)	94
2.4.2. Jak včasná je diagnostika idiopatické plicní fibrózy a jak úspěšná je její léčba (Doubková kol., 2007)	103
2.4.3. Prognostické faktory idiopatické plicní fibrózy – analýza Českého registru IPF (Doubková a kol., 2016)	110
2.4.4. EMPIRE Registry, Czech Part: Impact of demographics, pulmonary functions and HRCT on survival and clinical course in idiopathic pulmonary fibrosis (Doubková a kol., 2018)	117
2.4.5. Význam HRCT hrudníku pro prognózu idiopatické plicní fibrózy (Doubková a kol., 2017)	127
2.5. Terapie idiopatické plicní fibrózy	134
2.5.1. Effect of pirfenidon on lung function decline and survival: 5yr experience from a real-life IPF cohort from the Czech EMPIRE registr (Žurková a kol., 2018)	135
2.6. Časná diagnostika idiopatické plicní fibrózy má význam pro prognózu	146
2.6.1. Idiopatická plicní fibróza – časná diagnostika má význam (Doubková a kol., 2017)	147
3. Sarkoidóza	150
3.1. Prognostic markers of sarcoidosis: an analysis of patients from everyday pneumological practice (Doubková a kol., 2015)	152
3.1.1. Zvýšená hladina kalcia může být prvním příznakem mnohočetného myelomu, ale může mít i jiné příčiny (Adam a kol., 2018)	159
3.2. Genetika a sarkoidóza	174
3.2.1. Allele level of HLA variation in Czech patients with sarcoidosis (Petřek a kol., 2019)	175
3.3. Sarkoidóza srdce	177
3.3.1. Jak diagnostikovat sarkoidózu srdce (Doubková a kol., 2018)	178
3.3.2. Myokardiální T1 mapování pomocí SMART1Map a MOLLI mapování u asymptomatických pacientů se sarkoidózou	183
4. Biomarkery	192

4.1. Biomarkery u idiopatické plicní fibróza-význam pro diagnostiku a prognózu idiopatické plicní fibrózy (Štefániková a kol., 2019)	193
4.2. Prognostic significance of surfactant protein A, surfactant protein D, Clara cell protein 16, S100 protein, trefoil factor 3, and prostatic secretory protein 94 in idiopathic pulmonary fibrosis, sarcoidosis, and chronic pulmonary obstructive disease (Doubková a kol., 2016)	205
5. Neinvazivní vyšetřovací metody a komorbidity	216
5.1. Monitoring the ionic content of exhaled breath condensate in various respiratory diseases by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection (Greguš a kol., 2015)	218
5.1. 1. Gastroezofageální reflux u plicních nemocí analyzovaný pomocí kondenzátu vydechaného vzduchu	228
5.1.2 Capillary electrophoretic analysis of ionic content in exhaled breath condensate and pH monitoring as a non-invasive method in gastroesophageal reflux disease diagnostics (Lačná a kol., 2019)	230
5.1.3. Evaluation of important analytical parameters of the Peptest immunoassay that limit its use in diagnosing gastroesophageal reflux disease (Dolina a kol., 2019)	237
6. Jiné intersticiální plicní procesy s přesahem do imunologie, revmatologie a genetiky ...	243
6.1. Intersticiální plicní postižení a systémová onemocnění pojiva (Doubková a kol., 2019)	245
6.2. Lymfangiomiomyomatóza (Doubková a kol., 2019)	268
6.3. Diagnostika a léčba plicní formy histiocytózy z Langerhansových buněk (Doubková a kol., 2020)	276
6.4. Autoprotilátky u systémových onemocnění pojiva a ANCA asociovaných vaskulitid, jejich vztah k intersticiálním plicním procesům a prognóze (Doubková a kol., 2017)	282
6.5. Granulomatózy u primárních imunodeficitů (Doubková a kol., 2017)	291
6.6. Vzácné granulomatózy – granulomatóza s polyangiitidou (Doubková a kol., 2019)	296
6.7. Imunodeficiency v rámci diferenciatní diagnostiky intersticiálních plicních procesů (Doubková a kol., 2019)	301
6.8. Necrotising sarcoid granulomatosis. A rare granulomatous disease (Doubková a kol., 2018)	310
6.9. Diagnosis of Bloom syndrome in a patient with short stature, recurrence of malignant lymphoma, and consanguineous origin (Trizuljak a kol., 2020)	314
6.10. Plicní onemocnění a autoimunitní hemolytická anémie asociována s IgG4 (Doubková a kol., 2020)	324
7. Diskuse	330
8. Závěr	334
9. Použitá literatura	336
10. Seznam odborných publikací autora k tématu habilitační práce	342
12. Souhrn poznatků habilitační práce	350

1. Úvod

Difuzní parenchymatózí nemoci plic neboli méně přesným názvem intersticiální plicní procesy (IPP) jsou heterogenní skupinou převážně chronických nenádorových chorob, které jsou charakterizovány různým stupněm zánětu na úrovni respiračních bronchiolů, alveolárních duktů, alveolů, plicních kapilár, plicního intersticia a různým stupněm fibrózy plicní tkáně. Plicním intersticiem rozumíme prostor ohraničený endoteliálními buňkami plicních kapilár a alveolárním epitelem, perilymfatické prostory a centrálněji uložené peribronchiální a peribronchiolární prostory (ATS/ERS, 2002).

Existuje velmi mnoho příčin IPP, řada těchto chorob však má neznámou etiologii. IPP dělíme na procesy známé příčiny (nemoci spojené s expozicí antigenům profesionálního, životního a domácího prostředí, poléková postižení), idiopatické intersticiální pneumonie (IIP), granulomatózní IPP (sarkoidóza, plicní histiocytóza z Langerhansových buněk, granulomatóza s polyangiitidou a jiné vaskulitidy) a jiné (lymfangioleiomyomatóza, alveolární proteinóza, eozinofilní pneumonie). Mezi idiopatické IPP lze zařadit jednotky, u nichž je intersticiální plicní proces izolovaným, primárním postižením (idiopatická plicní fibróza), nebo je tento proces sekundární, doprovodnou komplikací jiného případně systémového onemocnění (systémová onemocnění pojiva (SOP), vaskulitidy s plicní manifestací, imunodeficience) (ATS/ERS, 2002; Bradley a kol., 2008; Travis a kol., 2013).

Dělení intersticiálních plicních procesů a idiopatických intersticiálních pneumonií je popsáno v práci „Klasifikace idiopatických intersticiálních pneumonií doznala nových změn“ (Doubková a kol., 2015). Viz kapitola 1. 1. Epidemiologie vybraných IPP je popsána v práci „Epidemiologie intersticiálních plicních procesů“ (Štefánikova a kol., 2019). Viz kapitol 1.2.

1.1. Klasifikace idiopatických intersticiálních pneumonií doznala nových změn (Doubková M, Skříčková J. Stud Pneumol Pthiseol. 2015; 75(6): 225-230)

225

STUD. PNEUMOL. PHTHISEOL., 75, 2015, č. 6, s. 225–230

Klasifikace idiopatických intersticiálních pneumonií doznala nových změn

M. Doubková, J. Skříčková

Klinika nemocí plicních a tuberkulózy, LF Masarykovy univerzity a FN Brno, pracoviště Bohunice

SUMMARY

Classification of idiopathic interstitial pneumonias has undergone new changes

Interstitial lung diseases, also called diffuse parenchymal lung disorders, are characterized by a variable degree of inflammatory and fibrotic changes affecting the interstitial spaces, air spaces and alveolar walls. New knowledge about these diseases led in 2013 to creation of a new classification of one of the subgroups of interstitial lung diseases called idiopathic interstitial pneumonias. The 2013 classification brought about many changes that may contribute to a more accurate diagnostic and therapeutic algorithm.

Idiopathic interstitial pneumonias (IIPs) are divided into major, rare and unclassifiable. Major IIPs are subdivided into chronic, smoking-related and acute/subacute IIPs. A new clinical entity called pleuroparenchymal fibroelastosis has been described.

Key words: classification, interstitial lung diseases, idiopathic interstitial pneumonia

SOUHRN

Intersticiální plicní procesy neboli difúzní parenchymatózní onemocnění plic, jsou charakterizovány různým stupněm zánětu a různým stupněm plicní fibrózy, nejen na úrovni plicního intersticia. Nové poznatky o těchto nemocích vedly v roce 2013 k vytvoření nové klasifikace jedné z podskupin intersticiálních plicních procesů, nazývané idiopatické intersticiální pneumonie. Klasifikace z roku 2013 s sebou přinesla řadu změn, které mohou přispět ke zpřesnění diagnosticko-terapeutického algoritmu.

Idiopatické intersticiální pneumonie se nyní dělí na hlavní, vzácné a neklasifikovatelné. Hlavní se dále dělí na chronické, intersticiální pneumonie vázané na kuřáctví a akutní/subakutní. Byla popsána nová klinická entita zvaná pleuropulmonální fibroelastóza.

Klíčová slova: klasifikace, intersticiální plicní procesy, idiopatické intersticiální pneumonie

ÚVOD

Intersticiální plicní procesy (IPP), jinak zvané i difúzní parenchymatózní nemoci plic, jsou širokou skupinou onemocnění, čítající okolo 160 nosologických jednotek. IPP jsou charakterizovány různým stupněm zánětu a plicní fibrózy nejen na úrovni plicního intersticia, ale i plicních kapilár, endotelu, bronchiolů. Diferenciální diagnostika těchto nemocí patří k nejobtížnějším v pneumologii vůbec, protože tyto jednotky mají často podobné radiologické a mnohdy i histopatologické nálezy. V diagnostice se uplatňuje multidisciplinární přístup, vyžadující spolupráci mezi kliniky a radiology, mnohdy i patologi [1]. Na prvním místě je ale stále anamnéza. Tabulka 1 ukazuje klíč, který by mohl přispět s pomocí dalších diagnostických metod ke zjištění správné diagnózy [2].

KLASIFIKACE IDIOPATICKÝCH INTERSTICIÁLNÍCH PNEUMONIÍ

IPP můžeme dělit podle různých hledisek. IPP **známé příčiny** (nemoci spojené s expozicí antigenním profesionálního, životního a domácího prostředí, poléková postižení, systémové onemocnění pojiva), **idiopatické intersticiální pneumonie** (IIP), **granulomatózní** IPP (sarkoidóza, plicní histiocytóza z Langerhansových buněk, granulomatóza s polyangiitidou a jiné vaskulitidy) a **jiné** (lymfangioleiomyomatóza, alveolární proteinóza, eozinofilní pneumonie) [3]. Shrnutí v tabulce 2.

Klasifikace IIP prošly v minulosti řadou změn. Jako první byla klasifikace dle Liebowa a Carringtona z roku 1969 [4,5], následovala Katzensteinová [6] v roce 1998. V roce 2002 Americká hrudní společnost (ATS) a Evropská respirační společnost

Tabulka 1: Klíč k určení diagnózy intersticiálních plicních procesů (podle Meyera [2])

Anamnestická data	Podezření na jednotlivé intersticiální plicní procesy nebo jejich komplikace
Náhly začátek a zhoršení	Akutní intersticiální pneumonie, infekce, akutní hypersenzitivní pneumonie, akutní eozinofilní pneumonie, lékové reakce, kryptogenní organizující se pneumonie, onemocnění pojiva (akutní lupusová pneumonitida, difúzní alveolární hemoragie)
Kouření	Respirační bronchiolitida s intersticiálním plicním postižením, deskvamativní intersticiální pneumonie, granulomatóza z Langerhansových buněk
Profesionální expozice (horníci, pracovníci ve slévárně a jiné)	Pneumokoniózy
Expozice lékům	Poléková plicní postižení
Hemoptýza	Difúzní alveolární hemoragie, plicní kapilaritida, plicní venookluzivní nemoc, lymfangioleiomyomatóza, komplikace (plicní embolie, karcinom)
Pleurální bolesti	Systémová onemocnění pojiva (systémový lupus, revmatoidní artritida)
Pískoty	Hypersenzitivní pneumonitida, eozinofilní pneumonie
Oční symptomy	Systémová onemocnění pojiva, granulomatóza s vaskulitidou, sarkoidóza
Kožní změny	Sarkoidóza, systémová onemocnění pojiva
Expozice organickým antigenům v domácím, pracovním prostředí	Exogenní alergická alveolitida
Gastroezofageální reflux, dysfagie	Systémová onemocnění pojiva (sklerodermie), idiopatická plicní fibróza
Sicca syndrom	Sjögrenův syndrom
Raynodův fenomén	Systémová onemocnění pojiva
Artralgie, artritidy	Systémová onemocnění pojiva, sarkoidóza
Bolesti svalů, svalová únava	Dermatomyozitida/polymyozitida, sarkoidóza
Ranní ztuhlost kloubů	Systémová onemocnění pojiva (revmatoidní artritida)
Věk nad 70 let	Idiopatická plicní fibróza více než jiné idiopatické intersticiální pneumonie

Tabulka 2: Dělení intersticiálních plicních procesů. Podle American Thoracic Society/European Respiratory Society [3]

Známé příčiny	Idiopatické intersticiální pneumonie	Granulomatózní	Jiné
Polékové postižení Systémové choroby pojiva Exogenní inhalační noxy, radiace	IPF Ne-IPF (nyní dělení na hlavní, vzácné, neklasifikovatelné)	Sarkoidóza Plicní histiocytóza z Langerhansových buněk Vaskulitidy (granulomatóza s polyangiitidou)	Eozinofilní pneumonie Lymfangioleiomyomatóza Alveolární proteinóza

(ERS) rozdělily IIP na idiopatickou plicní fibrózu (IPF) s nálezem obvyklé intersticiální pneumonie (UIP, *usual interstitial pneumonia*) a na ne IPF (nespecifická intersticiální pneumonie NSIP, respirační bronchiolitida s postižením intersticia RB-ILD, deskvamativní intersticiální pneumonie DIP, lymfocytární intersticiální pneumonie LIP, kryptogenní organizující se pneumonie COP, akutní intersticiální pneumonie AIP) [3]. Klasifikace IIP z roku 2013 podle ATS/ERS odráží nové poznatky o IPP, respektive jejich podskupině IIP [7].

Důvody, které vedly k úpravě stávající klasifikace z roku 2002, byly následující:

1. Idiopatická NSIP byla nově přijata jako specifická samostatná klinicko-patologická entita, do té doby byla NSIP přijímána jako provizorní diagnóza;
2. Byla vyčleněna a do širšího povědomí uvedena skupina nemocí zvaných **smoking-related interstitial lung diseases**, IPP vázané na kuřáctví;
3. Upustilo se od termínu kryptogenní fibrotizující alveolitida, prognóza IPF byla shledána jako heterogenní, zatím nepředvídatelná a nemocní byli rozděleni dle vývoje na dlouhodobě stabilní, nemocné s pomalou a rychlou progresí;
4. Byla definována akutní exacerbace, její výskyt byl pozorován u pacientů s chronickou fibrotizující IIP, nejen IPF ale i NSIP;
5. Byl zaveden termín neklasifikovatelné IIP, neboli IIP špatně definovatelné pro nejasné

znaky klinické, radiologické a patologické, překryvy postižení;

6. Byl opět zdůrazněn multidisciplinární přístup a potřeba směřovat pacienty do center, kde je tento přístup uplatňován;
7. Byla popsána nová, vzácná klinická jednotka pleuropulmonální fibroelastóza, spočívající ve fibrotizaci pleury a subpleurálního plicního parenchymu, zejména v horních plicních lalocích;
8. Zkoumáním nových biomarkerů a genetickými a molekulárními studii se zvýšilo povědomí o IIP, predikci prognózy a terapeutické odpovědi [7].

IIP můžeme rozdělit dle této nové klasifikace na **hlavní** IIP, sem patří IPF, idiopatická NSIP, RB-ILD, DIP, COP, AIP. Dále na **vzácné** IIP, kam patří idiopatická LIP, idiopatická pleuropulmonální fi-

Tabulka 3: Dělení idiopatických intersticiálních pneumonií. Podle Travise et al. [7]

Hlavní idiopatické intersticiální pneumonie („major“)
Idiopatická plicní fibróza Idiopatická nespecifická intersticiální pneumonie Respirační bronchiolitida s intersticiálním plicním procesem Deskvamativní intersticiální pneumonie Kryptogenní organizující se pneumonie Akutní intersticiální pneumonie
Vzácné idiopatické intersticiální pneumonie („rare“)
Idiopatická lymfocytární intersticiální pneumonie Idiopatická pleuropulmonální fibroelastóza
Neklasifikovatelné idiopatické intersticiální pneumonie („unclassifiable“)

Tabulka 4: Dělení hlavních idiopatických intersticiálních pneumonií. Podle Travise et al. [7]

Kategorie	Klinicko-radiologicko-patologická diagnóza	Asociovaný morfologický nález
Chronické fibrotizující intersticiální pneumonie	Idiopatická plicní fibróza Idiopatická nespecifická intersticiální pneumonie	Obvyklá intersticiální pneumonie Nespecifická intersticiální pneumonie
Intersticiální pneumonie vázané na kuřáctví	Respirační bronchiolitida s intersticiálním plicním postižením Deskvamativní intersticiální pneumonie	Respirační bronchiolitida Deskvamativní intersticiální pneumonie
Akutní/subakutní intersticiální pneumonie	Kryptogenní organizující se pneumonie Akutní intersticiální pneumonie	Organizující se pneumonie Difúzní alveolární poškození

Tabulka 5: Klasifikace idiopatických intersticiálních pneumonií (IIP) a radiologické nálezy na HRCT hrudníku (výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností). Podle Travise et al. [7]

Idiopatické intersticiální pneumonie			Radiologické nálezy
Hlavní IIP	Chronické fibrotizující IIP	UIP	Retikulace, bronchiektazie, voština, bazální a subpleurální predilekce, absence příznaků nekonzistentních s UIP
		NSIP	Opacity mléčného skla, retikulace
	Smoking-related IIP	RB-ILD	Špatně definovatelné centrilobulární noduly, centrilobulární emfyzém a ztlustění bronchiálních stěn
		DIP	Difúzně opacity mléčného skla, nepravidelné lineární opacity, mikrocysty
	Akutní/subakutní IIP	COP	Periferní a peribronchiální konsolidace, opacity mléčného skla s tendencí k migraci, vzácně noduly, které mohou kavitovat („ <i>atol sign</i> “)
		AIP	Opacity mléčného skla s mozaikovou strukturou, zadržování vzduchu v dependentních oblastech plic
Vzácné	LIP		Perivaskulární cysty a opacity mléčného skla, centrilobulární a subpleurální noduly
	PPFE		Subpleurální ztlustění apikálních částí plic, malé subpleurální konsolidace

broelastóza (PPFE) a některé histopatologické nálezy (akutní fibrinózní a organizující se pneumonie), které ale nejsou samostatnými klinickými entitami, a na **neklasifikovatelné** IIP (tabulka 3) [7]. Neklasifikovatelné IIP jsou kategorií intersticiálních

pnemonií, u kterých nelze určit definitivní diagnózu. Jednak pro necharakteristické klinické, radiologické a patologické nálezy, nebo pro vzájemně nekorelující nálezy. Například se jedná o překryvy histopatologických nálezů u systémových onemocnění pojiva, přítomnost intersticiální pneumonie a folikulární bronchiolitidy u revmatoidní artritidy. V takových případech by měla být stanovena nejvíce pravděpodobná diagnóza s pomocí multidisciplinárního přístupu (pneumolog, radiolog, patolog) [7]. Diagnostický algoritmus IPF/UIP je součástí této klasifikace již jen okrajově, protože podrobná doporučení jsou uvedena v práci Raghu et al. z roku 2011 [8].

Hlavní IIP dělíme na **chronickou fibrotizující intersticiální pneumonii (IP)**, **IP ve vztahu ke kouření** (smoking-related IP) a **akutní/subakutní IP** s akutní nebo subakutní manifestací IP (klinické projevy trvající týdnů nebo několik málo měsíců) nebo s akutní exacerbací subklinické nebo dosud nerozpoznané chro-

Tabulka 6: Dělení intersticiálních plicních procesů ve vztahu ke kouření, tzv. smoking-related interstitial lung disease. Podle Travise et al. [7]

<p>Kouření jako kauzální faktor, silná asociace mezi kouřením a nemocí</p> <p>Granulomatóza z Langerhansových buněk (dříve histiocytóza X)</p> <p>Respirační bronchiolitida s intersticiálním plicním postižením</p> <p>Deskvamativní intersticiální pneumonie</p>
<p>Kouření jako možný rizikový faktor, jako modifikující faktor</p> <p>Idiopatická plicní fibróza</p> <p>Kombinace plicní fibrózy a emfyzému (combined pulmonary fibrosis and emphysema CPFE)</p> <p>Akutní eozinofilní pneumonie</p> <p>Revmatoidní artritida asociovaná s intersticiálním plicním onemocněním</p> <p>Difúzní alveolární hemoragie u pulmorenálního syndromu</p> <p>Plicní alveolární proteinóza</p>

Tabulka 7: Klasifikace idiopatických intersticiálních pneumonií (IIP) vzhledem k vývoji onemocnění. Podle Travise et al. [7]

Vývoj onemocnění	Cíl léčby	Monitorace onemocnění
Reverzibilní (respirační bronchiolitida s intersticiálním postižením)	Odstranění možné příčiny – kouření	Krátkodobá observace (3 až 6 měsíců) k potvrzení regrese onemocnění.
Reverzibilní onemocnění s rizikem progresu (buněčná forma nespecifické intersticiální pneumonie, deskvamativní intersticiální pneumonie, kryptogenní organizující se pneumonie, některé fibrotické typy nespecifické intersticiální pneumonie)	Iniciálně dosažení odpovědi a následně léčba dlouhodobá dle vývoje nemoci	Krátkodobá observace k potvrzení terapeutické odpovědi. Dlouhodobá observace k ujištění se, že stav je stabilní.
Stabilní onemocnění s reziduální nemocí (některé nespecifické intersticiální pneumonie)	Udržovat stávající stav	Dlouhodobá observace ke zhodnocení průběhu onemocnění.
Progresivní, ireverzibilní onemocnění s možností stabilizace (některé nespecifické intersticiální pneumonie)	Stabilizace	Dlouhodobá observace ke zhodnocení průběhu onemocnění.
Progresivní, ireverzibilní onemocnění navzdory léčbě (idiopatická plicní fibróza, některé fibrotizující nespecifické intersticiální pneumonie)	Pomalá progresu	Dlouhodobá observace ke zhodnocení průběhu nemoci a včasné zařazení na transplantaci listinu, nebo paliativní léčba.

nické IIP (tabulka 4) [7]. Tabulka 5 ukazuje jednotlivé IIP a jejich radiologické nálezy na HRCT hrudníku (výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností) [7].

Kouřáctví je rizikovým faktorem ve vývoji a průběhu řady IPP. Pokud víme, že kouření je kauzálním faktorem onemocnění, spolupráce s pacientem a odstranění expozice cigaretovému kouři by mohly vést k regresi některých intersticiálních plicních postižení. Existují entity, kde **kuřáctví je kauzálním faktorem se silnou epidemiologickou asociací**. Jedná se o RB-ILD, DIP, granulomatózu z Langerhansových buněk (dříve nazývaná histiocytóza X). Nebo **kuřáctví může být potenciálním rizikovým faktorem** pro jiné IPP, jako je IPF, kombinace plicní fibrózy a emfyzému (CPFE – combined pulmonary fibrosis and emphysema), akutní eozinofilní pneumonie (AEP), s revmatoidní artritidou asociované IPP, difuzní alveolární hemoragie u pulmoreálného syndromu, plicní alveolární proteinóza (tabulka 6) [7].

Další dělení IIP dle klasifikace z roku 2013 je možné dle průběhu, vývoje nemoci, dle reverzibili-

ty a ireverzibility plicního postižení (tabulka 7). Tento přístup nám může napomoci při léčebných postupech a sledování pacientů s IIP, které se vyznačují heterogenitou klinického průběhu. IIP tak lze rozdělit na vratné onemocnění (RB-ILD, například po zanechání kouření), reverzibilní s rizikem progresu (buněčná a některé formy fibrotické NSIP, DIP a COP), stabilní s reziduální nemocí (některé fibrotické NSIP), progresivní a nevratné s možností stabilizace (některé fibrotické NSIP) a progresivní a ireverzibilní navzdory léčbě (IPF a některé fibrotické NSIP) [7].

ZÁVĚR

IPP jsou širokou skupinou onemocnění asociovaných s morbiditou a mortalitou, IIP jsou jejich důležitou součástí. Klasifikační schémata IIP prošla řadou revizí. Ta poslední klasifikace z roku 2013 s sebou přinesla řadu změn, které mohou přispět ke zpřesnění diagnosticko-terapeutického algoritmu.

LITERATURA

1. Antoniou KM, Margaritopoulos GA, Tomassetti S et al. Interstitial lung disease. *Eur Respir Rev* 2014; 23:40-54.
2. Meyer KC. Diagnosis and management of interstitial lung disease. *Transl Respir Med* 2014;2:4. doi: 10.1186/2213-0802-2-4.
3. American Thoracic Society, European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:277.
4. Liebow AA, Carrington CB. The interstitial pneumonias. In Simon M, Potchen EJ, LeMay M, editors. *Frontiers of pulmonary radiology*. 1st edition. New York: Grune & Stratton; 1969, pp 102-141.
5. Liebow A. Definition and classification of interstitial pneumonias in human pathology. *Prog Respir Res* 1975; 8:1.
6. Katzenstein AL, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1301.
7. Travis WD, Costabel U, Hansell DM et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188:733.
8. Raghu G, Collard HR, Egan JJ et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183:788.

Došlo: 10. 6. 2015

Adresa:

MUDr. Martina Doubková
 Klinika nemocí plicních a tuberkulózy
 Fakultní nemocnice Brno, pracoviště Bohunice
 Jihlavská 20
 625 00 Brno
 Česká republika
 e-mail: doubkovamartina@seznam.cz

1.2. Epidemiologie intersticiálních plicních procesů (Štefániková M, Doubková M.
Stud Pneumol Pthiseol. 2019; 79(3): 96-103)

96

STUD. PNEUMOL. PHTHISEOL., 79, 2019, č. 3, s. 96–103

Epidemiologie intersticiálních plicních procesů

M. Štefániková, M. Doubková

Klinika nemocí plicních a tuberkulózy, FN Brno a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity

SUMMARY

Epidemiology of interstitial lung diseases

Interstitial lung disease (ILD) includes a broad spectrum of diseases characterized by inflammation and pulmonary fibrosis not only in the lung interstitium but also in pulmonary capillaries, alveolar ducts and bronchioles. This group contains approximately 160 nosologic entities that differ in incidence and prevalence. The differential diagnosis of ILD is one of the most complex in pulmonology, potentially leading to underdiagnosing of these conditions. The article deals with epidemiological data on selected interstitial lung diseases from the Czech Republic and abroad.

Keywords: epidemiology, interstitial lung diseases

SOUHRN

Intersticiální plicní procesy (IPP) jsou širokou skupinou onemocnění, která je charakterizována zánětem a fibrózou nejen na úrovni plicního intersticia, ale i plicních kapilár, alveolárních duktů a bronchiolů. Tato skupina zahrnuje cca 160 nozologických jednotek, které se liší incidencí a prevalencí. Diferenciální diagnostika IPP je široká a patří k nejsložitějším v pneumologii vůbec, což může vést k poddiagnostikovanosti těchto nemocí. Naše práce se věnuje epidemiologickým datům zahraničním a českým u vybraných IPP.

Klíčová slova: epidemiologie, intersticiální plicní procesy

ÚVOD

Intersticiální plicní procesy (IPP) jsou heterogenní skupinou převážně chronických nenádorových chorob, které jsou charakterizovány zánětem na úrovni respiračních bronchiolů, alveolárních duktů, alveolů, plicních kapilár, plicního intersticia a fibrózou plicní tkáně. Plicním intersticiem rozumíme prostor ohraničený endoteliálními buňkami plicních kapilár a alveolárním epitelem, perilymfatické prostory a centrálněji uložené peribronchiální a peribronchiolární prostory. Popsáno bylo více než 160 nozologických jednotek. Tato skupina chorob má řadu společných rysů, včetně podobných klinických příznaků, srovnatelného nálezu zobrazovacími metodami a obdobné patofyziologie. Z těchto důvodů není často diagnóza IPP snadná. Práce má za cíl podat přehled o výskytu námi vybraných IPP, se kterými se setkáváme v ambulantní plicní praxi. Data jsme získali ze zahraniční a české literatury. Ne u všech se nám podařilo dohledat aktuální incidenci a prevalenci. IPP nepodléhají statistickému hlášení a informace o výskytu

nemocí jsou získány z dotazníkových akcí, studií, databází pojišťoven i databází hospitalizací.

SARKOIDÓZA

Sarkoidóza je systémové granulomatózní onemocnění neznámé etiologie s plicními a mimoplicními projevy. Sarkoidóza má obecně dobrou prognózu a nízkou letalitu [1].

Deskriptivní definice nemoci zní: Sarkoidóza je systémové onemocnění neznámé příčiny. Obvykle postihuje dospělé pacienty mladého a středního věku a často se projevuje jako oboustranná hilová lymfadenopatie, plicní infiltrace, či oční a kožní léze. Mohou být také postiženy játra, slezina, další lymfatické uzliny, slinné žlázy, srdce, nervový systém, svaly, kosti a jiné orgány. Diagnózu sarkoidózy je možno stanovit, když klinické a radiologické nálezy podpoří průkaz nekaseifikujícího granulomu. Granulomy jiných známých příčin a lokální sarkoidní reakce musí být vyloučeny [2,3]. Diagnóza sarkoidózy může být pravděpodob-

ná při nepřítomnosti histologického ověření, pokud klinika, nálezy radiologické, laboratorní a nálezy při vyšetření bronchoalveolární tekutiny korelují s diagnózou sarkoidózy [2].

Epidemiologická data: Epidemiologická data jsou nepřesná, a to z několika důvodů: sarkoidóza může probíhat zcela asymptomaticky, může dojít ke spontánní regresi, manifestace onemocnění je značně heterogenní, a tím se komplikuje její diagnostika. Sarkoidózu nelze diagnostikovat na základě jednoho vyšetření nebo jednoho laboratorního markeru, který by byl dostatečně senzitivní a specifický. Diagnóza je stanovena syntézou výsledků více vyšetření, viz výše [4].

Na území České republiky byly první údaje zjištěny Levinským v 60. letech 20. století. Tehdy byla prevalence plicní sarkoidózy na území ČSSR 3,4/100 000 obyvatel (prevalence kolísala v jednotlivých okresech od 0 do 20,9/100 000) [5]. Druhá celostátní epidemiologická studie sarkoidózy na území ČSSR v roce 1971 ukázala tato data: incidence v celkové populaci činila 2,55/100 000 a prevalence 16,16 na 100 000 obyvatel [6]. V 80. letech byla provedena celomoravská epidemiologická dotazníková studie. V období 1981–1990 (údaje z 24 center) se incidence pohybovala od 3,3 do 4,4/100 000 a prevalence se zvýšila ze 41,3 na 63,1/100 000 [7]. V další studii MORSA – multicentrická moravská studie epidemiologických trendů sarkoidózy v letech 1991–2000 – byl zjištěn průměrný věk 46,4 let. Převažovaly ženy (poměr ženy:muži byl 1,8). Incidence se v jednotlivých letech měnila, od roku 1995 se incidence stabilizovala od 2,6 do 3,2/100 000 [8]. Nejčastější stádium bylo I (54,3 %) a stádium II (32 %). Klinický průběh byl příznivý. Spontánní ústup byl pozorován v 19,6 %, ústup po léčbě v 58 % [8]. V roce 2018 byla publikována práce Pastorové et al., zabývající se věkovými aspekty sarkoidózy, analyzována byla data 502 pacientů hospitalizovaných na Klinice plicních nemocí a tuberkulózy v Olomouci (1997–2017). Průměrný věk pacientů v době diagnózy byl 48 let, nejvyšší výskyt nemoci byl mezi 35 až 45 lety života. V souboru pacientů bylo zastoupeno 53 % žen a 47 % mužů. Věkový průměr u mužů byl 44 let a u žen 51 let. Ve vyšších věkových skupinách se vyskytovala pokročilejší RTG stadia – stádium I, skupina do 40 let (41 %), stádium III ve skupině nad 50 let (17,5 %) a stádium IV ve skupině nad 60 let (2,4 %) [9]. V naší práci analyzující 306 pacientů z naší kliniky byl průměrný věk 45 let, převažovaly ženy a většina byla nekuřáky [10].

Obraz o aktuální epidemiologické situaci ve světě nám poskytuje řada studií. Zjištěná data vykazují variabilitu mezi regiony a etnickými skupinami. Výskyt onemocnění se liší také věkem a pohlavím [4]. Nejvyšší incidence a prevalence sarkoidózy byla popsána ve skandinávských zemích a u Afroameričanů [4,11,12]. Podle švédské studie z roku

2016, která analyzovala data z národního registru, byla roční incidence onemocnění 11,5/100 000 obyvatel a prevalence 160/100 000 obyvatel. Věk v době diagnózy u žen byl 55 let a u mužů 45 let. V souboru pacientů převažovali muži [13]. Naopak nízká prevalence a incidence ve srovnání se západní Evropou a USA je popisována v Asii. V tchajwanské studii činila prevalence 2,17/100 000 obyvatel, incidence popsána nebyla. U mužů byl věk začátku onemocnění 42 let a u žen 51 let. Ve zkoumaném souboru převažovaly ženy [14]. Nízkou incidenci v asijských krajinách potvrzuje již japonská studie z roku 2008, kde byla popsána průměrná incidence 1,01/100 000 [15]. Ve francouzské studii byla zjištěna incidence 4,9/100 000 za rok a prevalence 30/100 000, převažovaly ženy ve věku 45–54 let [16]. Nejrozsáhlejší objem epidemiologických dat analyzoval v roce 2016 v USA Ungprasert et al., který sumarizoval data z parciálních studií v letech 1946–2013 z populace v distriktu Olmsted, Minnesota (USA). Incidence sarkoidózy činila 10/100 000 [17]. Podle americké studie Optum z roku 2016, která analyzovala administrativní údaje z databáze zdravotních pojišťoven (2010–2013), byla incidence sarkoidózy 7,6 až 8,8 /100 000 za rok. V této studii jsou popisovány rozdíly ve výskytu onemocnění u různých etnických skupin. U Afroameričanů byla popsána vysoká incidence i prevalence ve srovnání s kavkazskou, hispánskou a asijskou populací. Prevalence u Afroameričanů byla 140/100 000 a incidence 17,8/100 000 za rok ve srovnání s kavkazskou, kde prevalence činila 5/100 000 a incidence 8,1/100 000 za rok. U hispánské a asijské skupiny byly nejnižší hodnoty, a to prevalence 2/100 000 a incidence 3–4/100 000 za rok [11].

Ve většině výše zmíněných studií převažují ve zkoumaných souborech ženy. Průměrný věk počátku onemocnění je podle posledních studií mezi 47 a 51 roky [4]. Rozdíl ve věku v době stanovení diagnózy je zjevný například ve švédské studii, u mužů byl tento věk 45 let oproti 54 letům u žen [13]. V americké studii je tento rozdíl menší. U mužů byl věk v době stanovení diagnózy 43 a u žen 48 let [18]. Zmíněný věkový rozdíl v době diagnózy mezi muži a ženami může naznačovat možný rozdíl v patogenezi onemocnění u obou pohlaví [4].

U většiny pacientů má sarkoidóza asymptomatický průběh. Prognózu ovlivňují komorbidity pacienta a stádium onemocnění [19]. Podle studie Ungprasert et al., z Minnesoty, USA, publikované v roce 2016, se mortalita neliší od běžné populace [17]. Podle švédské studie z 2018 sarkoidóza zvyšuje riziko mortality a riziko koreluje se stadiem nemoci v době diagnózy. Mortalita pacientů se sarkoidózou činila 11/1 000 za rok ve srovnání s kontrolní skupinou, kde byla mortalita 6,7/1 000 za rok, významné odchylky podle pohlaví nebo věku nebyly popsány [20]. Od roku 1999 do roku 2010 byla sarkoidóza hlášena jako bezprostřední

příčina smrti v USA u 10 348 osob, s mortalitou 2,8/1 000 000 obyvatel [21].

IDIOPATICKÁ PLICNÍ FIBRÓZA

IPF (idiopatická plicní fibróza) je specifická forma chronické progredující fibrotizující intersticiální pneumonie, postihující pouze plíce a spojená s histopatologickým a/nebo radiologickým obrazem UIP [22]. V ČR není aktuální epidemiologická situace známa, ale nemoc má stoupající výskyt. Nové poznatky etiopatogeneze IPF zcela změnily pohled na její léčebné možnosti, proto je IPF předmětem zájmu pneumologů v posledních několika letech. IPF se vyskytuje s vyšší četností u mužů než u žen [23]. Etiologie nemoci není známa. Medián přežití se pohybuje od 2 do 5 let od stanovení u neléčebných pacientů [22,24].

Epidemiologická data: IPF je řazena mezi vzácné nemoci (vzácné onemocnění znamená výskyt méně než 5 případů/10 000 obyvatel za rok). Epidemiologická data nejsou přesně známa. V zahraniční literatuře převažují epidemiologické studie ze Severní Ameriky a Evropy. Možnosti validně a přesně srovnat jednotlivé studie je obtížné, vliv na to má rozdílná metodologie studií, včetně zařazovacích kritérií a měnící se definice IPF, a klasifikační kritéria idiopatických intersticiálních pneumonií [25]. Společným rysem je celosvětově stoupající trend incidence onemocnění [26]. Dle přehledové studie Hutchinson et al., která analyzovala epidemiologické studie od roku 2000, je předpokládaná míra incidence onemocnění 2,8–9,3/100 000 za rok v Evropě a Severní Americe. Nižší incidence byla popsána ve Východní Asii a Jižní Americe. Ve většině studií lze v jejich průběhu pozorovat nárůst incidence, která je srovnatelná s incidencí žlučedního, jaterního, testikulárního karcinomu a karcinomu děložního hrdla [26]. V přehledové práci z roku 2013 autorů Ley a Collard, která sumarizuje různé typy studií, byli zařazeni i pacienti diagnostikováni před rokem 2000, kdy došlo k úpravě diagnostických kritérií IPF. Předpokládaná prevalence byla od 0,7/100 000 na Tchajwanu po 63,0/100 000 obyvatel ve Spojených státech a roční incidence od 0,6/100 000 po 17,4/100 000 [25]. Vliv demografických a geografických rozdílů na riziko vzniku IPF není jasný [25].

V americké studii Raghu et al. z roku 2006 byla prevalence ve věku 18–34 let odhadnuta na 4,0 na 100 000 osob a 227,2 na 100 000 osob ve věku 75 let nebo starších. Roční incidence se odhadovala na 1,2 až 76,4 na 100 000 [27]. V další americké epidemiologické studii Raghu et al. z roku 2016 bylo zjištěno, že prevalence IPF se pohybovala mezi 13,4/100 000 osob v roce 2005 až na 18,2/100 000 v roce 2010. Roční incidence IPF se časem snížila od 7,9/100 000 v roce 2005 na 5,8/100 000 v roce 2010. Celkový pokles byl způsoben zejména

klesajícím trendem u mladších pacientů (ve věku 18–44 let), zatímco výskyt u starších pacientů zůstal stabilní [28]. V další americké studii Raghu et al., hodnotící výskyt IPF pro věk nad 65 let, byla čísla mnohem vyšší, incidence 93,7/100 000 a prevalence stoupla z 202,2 v roce 2001 na 494,5 v roce 2011 [29]. Ve studii Fernández-Peréz et al., z Minnesoty, USA, byla prevalence 27,9–63/100 000 a incidence 8,8–17,4/100 000 za rok (diagnóza IPF byla postavena na základě definice z roku 2000, tzv. malá a velká kritéria). Míra incidence zde v průběhu studie klesala [30].

V evropských epidemiologických studiích je popsána vyšší prevalence IPF na severu Evropy. V norské studii činila prevalence 23,4/100 000 a roční incidence 4,3/100 000 [31]. Zatímco na jihu Evropy v Řecku byla popsána prevalence 3,4/100 000 a roční incidence 0,9/100 000 [32]. V Turecku byla incidence IPF 4,9/100 000 za rok [33]. V britské studii Gribbin et al. byla zjištěna incidence onemocnění ročně 4,6/100 000. V průběhu studie incidence stoupla o 11 % za rok [34]. Nízký výskyt onemocnění je popisován v Asii a Jižní Americe. Na Tchajwanu byla popsána prevalence 0,7 až 6,4/100 000 a incidence 0,6 až 1,4/100 000 osob za rok [35]. V brazilské studii Rufino et al. činila incidence 0,48/100 000 za rok [36].

Prevalence a incidence IPF je výrazně vyšší u starších věkových skupin. Začíná stoupat ve skupině nad 50 let a nejvyšší je ve skupině nad 75 let [25]. Tento fakt odráží vliv stárnutí na patogenезi IPF [37]. IPF se častěji vyskytuje u mužů než u žen, dle některých studií [38,39] je ale tento rizikový faktor spíše asociovan s anamnézou kouření [25]. I mortalita v souvislosti s IPF má celosvětově stoupající tendenci a vyšší mortalita je zaznamenána u mužů [39]. Je pozorován výskyt plicní fibrózy v rodinách, ve studii Hodgson et al. bylo nalezeno 3,3–3,7 % případů familiárního výskytu IPF (postižení 2 a více členů téže rodiny) [40]. Míra mortality byla dle britské studie Hutchinson et al. 4–10/100 000 za rok, stoupá s věkem, vyšší je u pacientů mužského pohlaví. Její vzestup je ročně o 2–3 % [41].

V ČR není aktuální epidemiologická situace známa. KFA (kryptogenní fibrotizující alveolitida, starší název pro idiopatickou plicní fibrózu) se u nás věnoval již v roce 1953 docent Ladislav Levinský [42,43]. Studie hodnotící epidemiologii IPF na Moravě a Slezsku prokázala incidenci v letech 1981–1990 v rozmezí 0,74–1,28/100 000 obyvatel a prevalenci 6,5 až 12,1/100 000. Byl zaznamenán trend zvyšující se incidence. Poměr muži/ženy: 1 : 1,2. 54 % pacientů bylo mladších 40 let [44]. Dle údajů věkového rozmezí z registru IPF je většina pacientů středního věku a medián věku je 67 let [23]. Data z registru (v letech 2012–2018 bylo zadáno 952 pacientů) nejsou bohužel vhodná k epidemiologické analýze ze dvou důvodů: jedná se prvotně o lékový registr a přístup zadávat pacienty s IPF mají jen centra. Pacienti, kteří nejsou

sledování v centru, nejsou tedy v registru uvedeni [45].

ANCA ASOCIOVANÉ VASKULITIDY

Vaskulitidy jsou heterogenní skupinou onemocnění charakterizovaných zánětem cévní stěny. Na základě převažující velikosti a typu postižených cév se dělí na vaskulitidy malých, středních a velkých cév. Podle revidované nomenklatury vaskulitid z roku 2012 jsou vaskulitidy malých cév dále děleny na ANCA-asociované vaskulitidy (antineutrophil cytoplasmic antibody – associated vasculitis, AAV) a imunokomplexové vaskulitidy [46]. ANCA-asociované vaskulitidy jsou vzácná, ale velmi závažná, až život ohrožující onemocnění. Mezi AAV řadíme tři klinické entity, granulomatózu s polyangiitidou (GPA, dříve nazývaná Wegenerova granulomatóza), mikroskopickou polyangiitidu (MPA) a eozinofilní granulomatózu s polyangiitidou (EGPA, dříve zvaná Churg-Straussův syndrom) [46]. Jedná se o primární systémové nekrotizující vaskulitidy, postihující cévy malého až středního průsvitu. GPA je charakterizována nekrotizující vaskulitidou s extravaskulárním granulomatózním zánětem, který není přítomen u MPA. Ačkoliv plicní a ledvinové postižení je běžné u obou, GPA i MPA, granulomatózní postižení horních a dolních cest dýchacích se jeví být přítomno zejména u GPA. Plicní postižení, včetně intersticiálního, je častou komplikací ANCA vaskulitid a ovlivňuje jejich prognózu. Protilátky proti cytoplasmě neutro-

filů (ANCA) jsou serologické markery přítomné u některých idiopatických systémových vaskulitid, cév malého průsvitu, jako je GPA nebo MPA, a méně u EGPA. Termín ANCA-asociované vaskulitidy je používán pro primární vaskulitidy, u kterých jsou přítomny cirkulující ANCA protilátky.

Epidemiologická data: Nejvíce epidemiologických dat je k dispozici u GPA. Míra incidence GPA se dle řady populačních epidemiologických studií stabilně odhaduje mezi 8–9/1 000 000 za rok v Evropě, Spojených státech a na Novém Zélandu [47], v Japonsku je GPA vzácná [48]. Roční incidence GPA je vyšší v severních regionech, zatímco v jižních regionech je vyšší MPA [49]. Prevalence GPA je více heterogenní a pohybuje se od 24/1 000 000 ve Francii po 160/1 000 000 ve Švédsku [50,51]. Dle Mahr et al. je prevalence ANCA asociovaných vaskulitid vyšší v populaci s evropskými předky ve srovnání s nekavkazskou populací [47,50]. Omezená data jsou k dispozici u EGPA a MPA. Prevalence EGPA se pohybuje od 10,7/1 000 000 ve Francii po 24/1 000 000 v Německu [50,47]. U MPA se prevalence odhaduje od 28/100 000 v severním Německu po 94/1 000 000 ve Švédsku [47,51].

Nejkomplexnější pohled na epidemiologii ANCA asociovaných vaskulitid nabízí práce švédských autorů Mohammad et al., které mapují situaci v jižním Švédsku. V roce 2003 byla prevalence v této oblasti odhadována na 160/1 000 000 pro GPA, 94/1 000 000 pro MPA a 14/1 000 000 pro

Tabulka 1: Epidemiologie intersticiálních plicních procesů

	Incidence	Prevalence	Věk	Pohlaví
Idiopatická plicní fibróza	0,48–17,4/100 000 [25,36]	0,7–63/100 000 [25]	> 75 [25]	muži [25]
Sarkoidóza	1,01–17,8/100 000 [4]	2,17–160/100 000 [4]	47–51 [4]	ženy [4]
ANCA vaskulitidy	GPA 9,8/1 000 000 MPA 10,1/1 000 000 EGPA 0,9/1 000 000 [51]	GPA 160/1 000 000 MPA 94/1 000 000 EGPA 14/1 000 000 [52]	> nebo 75 [51]	–
Plicní histiocytóza z Langerhansových buněk	–	0,27/100 000 u mužů 0,07/100 000 u žen [71]	20–40 let [70]	1 : 1 [70]
LAM	–	3,3–7,7/1 000 000 [61]	ženy ve fertlním věku [57]	ženy [57]
Exogenní alergická alveolitida	1,28–1,94/100 000 [74]	1,67–2,71/100 000 [74]	52 let [74]	ženy [74]

Vysvětlivky: V tabulce jsou uvedeny vybrané studie. Citace viz seznam literatury. Více informací o epidemiologii je v textu u příslušných IPP.

EGPA [52]. Zde byla popsána nejvyšší prevalence pro GPA vůbec, důvodem může být vysoká incidence, klinické studie s vaskulitidami a záchyt nových pacientů, vysoká míra přežití [52]. Ve studii stejného autora z roku 2008 se incidence odhadovala 9,8 (7,4–12,2)/1 000 000 obyvatel pro GPA, 10,1 (7,7–12,6) pro MPA a 0,9 (0–1,7) pro EGPA. Nejvyšší výskyt byl zjištěn u pacientů ve věku nad 75 let. Míra přežití 1 a 5 let byla u všech pacientů 87,8 a 71,6 %, ale nižší u MPA (80 a 55 %) ve srovnání s GPA (95 a 83 %, $P = 0,001$), ačkoli rozdíl nebyl statisticky významný [51]. V Anglii v letech 1990–2005 bylo zjištěno celkem 295 pacientů (51,2 % mužů) s diagnózou GPA. Střední věk byl 59 let. Celková roční incidence GPA byla 8,4 na milion. Zvýšila se roční prevalence z 28,8 na milion v roce 1990 na 64,8 na milion v roce 2005 [53]. Stoupající prevalenci popisuje i německá studie Herlyn et al., která popisuje téměř dvojnásobný nárůst prevalence u ANCA asociovaných vaskulitid mezi 1994–2006 z 74 na 149/1 000 000 obyvatel [47]. 5leté přežití pacientů s GPA bylo 75 %, s MPA 45–75 % a EGPA 68–100 % [54]. U pacientů s AAV je riziko smrti 2,7krát vyšší než u běžné populace [55].

Stoupající trend v prevalenci AAV je možné vysvětlit zvýšeným povědomím o AAV, dostupností nových diagnostických metod a dostupností cílené léčby.

Epidemiologická data v ČR chybí. V českém registru AAV, založeném v roce 2009, bylo v letech 2009–2014 zaregistrováno 689 pacientů z 16 center z ČR [56].

LYMFANGIOLEIOMYOMATÓZA

Lymfangioleiomyomatóza (LAM) je méně běžné multisystémové onemocnění, vyskytující se samostatně, nebo s tuberózní sklerózou (TS). Původ nemoci je genetický: abnormality v TSC1 a TSC2 genech, kódujících tuberin a hamartin. Konstituční aktivace kinázy mammalian target of rapamycin mTOR. LAM je charakterizována proliferací abnormálních buněk hladké svaloviny v plicním intersticiu a podél axiálních lymfatických cest hrudníku a břicha, mediastinálních, břišních a krčních uzlin tenkostěnnými plicními cystami bez predilekce a přítomnosti angiomyolipomů. LAM vede k progresivní destrukci plicní tkáně a respiračnímu selhání. LAM se obvykle manifestuje PNO a dušností. LAM se vyskytuje ve 2 formách, sporadické a při TS.

Epidemiologická data: Ve světové literatuře je možné nalézt více než 1 500 prací pojednávajících o LAM. A stále jejich počet narůstá v souladu s poznáním nemoci a její přesnější diagnostikou. LAM dominantně postihuje ženy ve fertlím věku [57], i když byly popsány případy žen po menopauze [58], u dětí a také u mužů [59]. LAM se může vy-

skytovat ve formě sporadické nebo ve spojení s TS (tuberózní sklerózou). Některé případy LAM, které začaly již v reprodukčním věku ženy, mohou být při pomalé progresi diagnostikovány až postmenopauzálně. Dosud nebyl popsán familiární výskyt sporadické LAM a vyšší výskyt u některého z etnik [60]. Z velké části jsou pacienti nekuřáci nebo bývalí kuřáci [60]. Přesná data o výskytu nemoci v populaci nejsou známa. Sporadická LAM: 3,3 až 7,7 žen na milion obyvatel [61]. Odhadovaný medián přežití bez plicní transplantace je 29 let od začátku symptomů, 10leté přežití 86 % [62]. LAM prevalence u TSC: většinou u žen. Mezi 67 japonskými ženami s TSC bylo 54 % s LAM. Frekvence u mužů: 1/28. LAM frekvence narůstá po 20. roku věku [63]. Epidemiologická data v ČR chybí.

PLICNÍ HISTIOCYTÓZA Z LANGERHANSOVÝCH BUNĚK

Histiocytóza z Langerhansových buněk (LCH) je onemocnění charakterizované proliferací a infiltrací různých orgánů Langerhansovými buňkami. Poznáním původce Langerhansových buněk byl zaveden název histiocytóza z Langerhansových buněk [64,65]. LCH je onemocnění charakterizované abnormální akumulací buněk mononukleárního fagocytárního systému (dendritické buňky a makrofágy). Nemoc má tendenci ke spontánní remisi, ale jsou známy i recidivy onemocnění a život ohrožující multisystémové postižení s rychlým až fatálním průběhem. V současné době je zřejmé, že Langerhansovy buňky mají patologické rysy [65]. Dle nálezů z konce 90. let minulého století se plicní LCH dospělých liší od ostatních forem tím, že proliferující histiocyty jsou polyklonální, zatímco u ostatních forem jsou histiocyty spíše monoklonální. Izolovaná plicní forma LCH se považuje za reaktivní proces na kouření, či jiné stimuly a je odlišná od těžkých a smrtících plicních postižení u multisystémového onemocnění. U této formy bylo pozorováno, že v případech pacientů, kteří dokázali přestat kouřit, došlo ke spontánní regresii onemocnění [66].

Epidemiologická data: Plicní forma LCH je vzácné onemocnění, které se vyskytuje převážně u mladých kuřáků (souvislost s kouřením až v 95 %), s vrcholem mezi 20–40 lety [58,67,68]. Onemocnění se vyskytuje zejména u kavkazské populace, v populaci s africkými a asijskými předky se vyskytuje ojediněle. Výskyt nemoci u mužů a žen je téměř stejný. V minulosti se častěji popisovalo u mužů, v recentních pracích i u žen. Tento fakt může souviset se změnou kuřáckého návyku u žen [69]. Přesná epidemiologická data plicní formy nejsou známa jak v ČR, tak i ze zahraniční literatury máme k dispozici jen omezené informace. Určitý náhled na epidemiologickou situaci nabízí práce japonských autorů Watanabe et al. z roku

1997, kde se prevalence ve věkové skupině od 16 do 70 let odhadovala na 0,27/100 000 u mužů a 0,07/100 000 u žen [70].

EXOGENNÍ ALERGICKÁ ALVEOLITIDA

Hypersenzitivní pneumonitida (HP), známá i jako exogenní alergická alveolitida (EAA), je granulomatózní zánětlivé onemocnění plic, způsobené inhalací antigenů organických částic nebo prachů. Pojmy hypersenzitivní a alergická jsou ale zavádějící, HP není atopickým onemocněním. Prevalence HP kolísá v závislosti na rizicích prostředí (koncentrace antigenu, frekvence a trvání expozice, rozpustnost antigenu, velikost částic, použití respirátorů na pracovišti). Významnou úlohu ve vzniku nemoci hraje individuální vnímavost.

Epidemiologická data: Onemocnění je v české populaci pravděpodobně častější než IPF, epidemiologická data však chybí [71]. Podle prací zahraničních autorů může EAA představovat třetí nejčastější skupinu intersticiálních plicních procesů, a to po IPF a nespecifické intersticiální pneumonii [72]. Ve studii Pérez et al. z roku 2018, která hodnotila soubor pojištěných pacientů z USA, bylo zjištěno, že průměrný věk byl 52 let a 58 % bylo žen. Jednoroční míra prevalence se pohybovala od 1,67 do 2,71 na 100 000 osob a jednoroční kumulativní incidence se pohybovala od 1,28 do 1,94 na 100 000 osob. Prevalence se zvyšovala s věkem, v rozmezí 0,95 na 100 000 u dětí ve věku 0–9 let na 11,2 na 100 000 u osob ve věku 65 let a starších [73]. 5leté přežití u chovatelů holubů bylo 29 % [74].

ZÁVĚR

Přesné epidemiologické údaje o IPP chybí. Epidemiologická data se liší v závislosti na etniku, metodologii sběru dat, zařazovacích diagnostických kritériích. Vzhledem k tomu, že se v průběhu let měnila definice IPF/UIP, nelze epidemiologická data z dob minulých (před rokem 2000) vztahovat na současnost a je potřeba nových epidemiologických studií. V ČR zcela chybí aktuální epidemiologická data o vybraných IPP. Lze předpokládat, že při vzrůstajícím znečišťování životního a pracovního prostředí, zhoršujícím se genetickým vybavení populace, zvýšeném povědomí o těchto nemocech a se zlepšením diagnostiky se bude incidence IPP zvyšovat.

LITERATURA

- Travis WD, Costabel U, Hansell DM et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188:733–748.
- Hunnighake GW, Costabel U, Ando M et al. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders. *Sarc Vasc Diffuse Lung Dis* 1999; 16:149–173.
- Wells AU, Hirani N. Interstitial lung disease guideline. *Thorax* 2008; 63:1–58.
- Arkema E, Cozier Y. Epidemiology of sarcoidosis: current findings and future directions. *Ther Adv Chronic Dis* 2018; 9:227–240.
- Levínský L, Altmann V. Pokus o zjištění prevalence plicní sarkoidózy na území ČSSR. *Rozhl Tuberk* 1964; 24:220–230.
- Levínský L, Svandová E, Jeničková-Munzová J et al. Prevalence a incidence sarkoidózy v jednotlivých okresech ČSSR. *Čas Lék Čes* 1973; 112:1505–1509.
- Kolek V. Epidemiology study on sarcoidosis in Moravia and Silesia. *Sarcoidosis* 1994; 11:110–112.
- Kolek V, Hutýrová B, Lošťáková V. MORSA – multicentrická moravská studie epidemiologických trendů sarkoidózy 1991–2000 = MORSA – multicentric Moravian study of epidemiological trends in sarcoidosis 1991–2000. *Stud Pneumol Phthiseol* 2005; 65:17–20.
- Pastorová B, Kolek V, Žurková M et al. Věkové aspekty sarkoidózy. *Stud pneumol phthiseol* 2018; 78:102–106.
- Doubková M, Pospíšil Z, Skříčková J, Doubek M. Prognostic markers of sarcoidosis: an analysis of patients from everyday pneumological practice. *Clin Respir J* 2015; 9:443–449.
- Baughman RP, Field S, Costabel U et al. Sarcoidosis in America. Analysis based on health care use. *Ann Am Thorac Soc* 2016; 13:1244–1252.
- Dumas O, Abramovitz L, Wiley AS et al. Epidemiology of sarcoidosis in a prospective cohort study of U.S. women. *Ann Am Thorac Soc* 2016; 13:67–71.
- Arkema EV, Grunewald J, Kullberg S et al. Sarcoidosis incidence and prevalence: a nationwide register-based assessment in Sweden. *Eur Respir J* 2016; 48:1690–1699.
- Wu CH, Chung PI, Wu CY et al. Comorbid autoimmune diseases in patients with sarcoidosis: a nationwide case-control study in Taiwan. *J Dermatol* 2017; 44:423–430.
- Morimoto T, Azuma A, Abe S et al. Epidemiology of sarcoidosis in Japan. *Eur Respir J* 2008; 31:372–379.
- Duchemann B, Annesi-Maesano I, Jacobs de Naurois C et al. Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris. *Eur Respir J* 2017; 50. pii: 1602419. doi: 10.1183/13993003.02419-2016.
- Ungprasert P. Epidemiology of sarcoidosis: 1946–2013: A population based study. *Mayo Clin Proc* 2016; 91:183–188.
- Ungprasert P, Crowson CS, Matteson EL. Influence of gender on epidemiology and clinical manifestations of sarcoidosis: a population-based retrospective cohort study 1976–2013. *Lung* 2017; 195:87–91.
- Nowinski A, Puscinska E, Goljan A et al. The influence of comorbidities on mortality in sarcoidosis: a observational prospective cohort study. *Clin Respir J* 2017; 11:648–656.
- Rosside M, Kulberg S, Askling J et al. Sarcoidosis mortality in Sweden: a population-based cohort study. *Eur Respir J* 2018; 51. pii: 1701815. doi: 10.1183/13993003.01815-2017.
- Mirsaedi M, Machado RF, Schraufnagel D et al. Racial difference in sarcoidosis mortality in the United States. *Chest* 2015; 147:438–449.
- Raghu G, Collard HR, Egan JJ et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183:788–824.
- Doubková M, Uher M, Bartoš V, Sterclová M, Lacina L, Lošťáková V et al. Prognostické faktory idiopatické plicní fibrózy (IPF) – analýza Českého registru IPF. *Čas lék čes* 2016; 155:22–28.
- Vancheri C, Failla M, Crimi N, Raghu G. Idiopathic pulmonary fibrosis: a disease with similarities and links to cancer biology. *Eur Respir J* 2010; 35:496–504.

25. Ley B, Collard HR. Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Epidemiol* 2013; 5:483-492.
26. Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R, McKeever T. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *Eur Respir J* 2015; 46:795-806.
27. Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:810-816.
28. Raghu G, Chen SY, HOU G, Yeh WS, Collard HR. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis in US adults 18-64 years old. *Eur Respir J* 2016; 48:179-186.
29. Raghu G, Chen SY, Yeh WS et al. Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001-2011. *Lancet Respir* 2014; 2:566-572.
30. Fernández Pérez ER, Daniels CE, Schroeder DR et al. Incidence, prevalence, and clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis: a population-based study. *Chest* 2010; 137:129-137.
31. von Plessen C, Grinde O, Gulsvik A. Incidence and prevalence of cryptogenic fibrosing alveolitis in a Norwegian community. *Respir Med* 2003; 97:428-435.
32. Karakatsani A, Papakosta D, Rapti A et al. Hellenic Interstitial Lung Diseases Group Epidemiology of interstitial lung diseases in Greece. *Respir Med* 2009; 103:1122-1129.
33. Musellim B, Okumus G, Uzaslan E et al. Turkish Interstitial Lung Diseases Group. Epidemiology and distribution of interstitial lung diseases in Turkey. *Clin Respir J* 2014; 8:55-62.
34. Gribbin J, Hubbard RB, Le Jeune I et al. Incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis in the UK. *Thorax* 2006; 61:980-985.
35. Lai CC, Wang CY, Lu HM et al. Idiopathic pulmonary fibrosis in Taiwan - a population-based study. *Respir Med* 2012; 106:1566-1574.
36. Rufino RL, Costa CHD, Accar J et al. Incidence and mortality of interstitial pulmonary fibrosis in Brazil. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187:A1458.
37. King TE, Jr, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*. 2011; 378(9807):1949-1961.
38. Mannino DM, Etzel RA, Parrish RG. Pulmonary fibrosis deaths in the United States, 1979-1991. An analysis of multiple-cause mortality data. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(5):1548-1552.
39. Olson AL, Swigris JJ, Lezotte DC et al. Mortality from pulmonary fibrosis increased in the United States from 1992 to 2003. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176(3):277-284.
40. Hodgson U, Laitinen T, Tukiaainen P. Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax* 2002; 57(4):338-342.
41. Hutchinson JP, McKeever TM, Fogarty AW, Navaratnam V, Hubbard RB. Increasing global mortality from idiopathic pulmonary fibrosis in the twenty-first century. *Ann Am Thorac Soc* 2014; 11:1176-1185.
42. Levinský L. Chronická difúzní intersticiální plicní fibróza (idiopatická). 1. sdělení. *Čas lék čes* 1953; 92:976-981.
43. Levinský L, Houštek J, Hloušková Z et al. Prevalence idiopatické difúzní intersticiální fibrózy plic (kryptogenní fibrotizující alveolitis) v ČSSR. *Studia pneumologica et phthisiologica cecoslovaca* 1975; 35:441-448.
44. Kolek V. Epidemiology of cryptogenic fibrosing alveolitis in Moravia and Silesia. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis medicae. Biomedical papers* 1994; 137:49-50.
45. <http://ipf.registry.cz/> Navštíveno dne 30. 1. 2019
46. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA et al. 2012 Revised international Chapel Hill consensus conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013; 65:1-11.
47. Herlyn K, Buckert F, Gross WL, Reinhold-Keller E. Doubled prevalence rates of ANCA-associated vasculitides and giant cell arteritis between 1994 and 2006 in northern Germany. *Rheumatology (Oxford)* 2014; 53:882-889.
48. Fujimoto S, Uezono S, Hisanaga S et al. Incidence of ANCA-associated primary renal vasculitis in the Miyazaki Prefecture: the first population based, retrospective, epidemiologic survey in Japan. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; 1:1016-1022.
49. Watts RA, Gonzalez-Gay MA, Lane SE et al. Geoepidemiology of systemic vasculitis: comparison of the incidence in two regions of Europe. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:170-172.
50. Mahr A, Guillemin L, Poissonnet M, Aymé S. Prevalence of polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, Wegener's granulomatosis and Churg-Strauss syndrome in a French urban multi-ethnic population in 2000: a capture-recapture estimate. *Arthritis Care Res* 2004; 51:92-99.
51. Mohammad AJ, Jacobsson LT, Westman KW, Sturfelt G, Segelmark M. Incidence and survival rates in Wegener's granulomatosis, microscopic polyangiitis, Churg-Strauss syndrome and polyarteritis nodosa. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48(12):1560-1565.
52. Mohammad AJ, Jacobsson LTH, Mahr AD et al. Prevalence of Wegener's granulomatosis, microscopic polyangiitis, polyarteritis nodosa and Churg-Strauss syndrome within a defined population in southern Sweden. *Rheumatology* 2007; 46:1329-1337.
53. Watts RA, Al-Tajer A, Scott DG, Macgregor AJ. Prevalence and incidence of Wegener's granulomatosis in the UK general practice research database. *Arthritis Rheum* 2009; 61:1412-1416.
54. Phillip R, Lugmani R. Mortality in systemic vasculitis: a systematic review. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26(5 Suppl 51):S94-104.
55. Tan JA, Dehghan N, Chen W et al. Mortality in ANCA-associated vasculitis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis* 2017; 76:1566-1574.
56. Hrušková Z, Jančová E, Hanzal V et al. Chronické poškození u pacientů s ANCA-asociovanou vaskulitidou: data z celorepublikového registru. *Aktuality v nefrologii*. 2018; 24(Suppl. 1):17.
57. Taveira-DaSilva AM, Moss J. Epidemiology, pathogenesis and diagnosis of lymphangioleiomyomatosis. *Expert Opin Ophan Drugs* 2016; 4:369-378.
58. Homolka J, Haškovcová I. Granulomatóza z Langerhansových buněk. *Vnitř Lék* 2010; 56(Suppl 2):74-75.
59. Aubry MC, Myers JL, Ryu JH, Henske EP, Logginidou H, Jalal SM, Tazelaar HD. Pulmonary lymphangioleiomyomatosis in a man. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:749-752.
60. Urban T, Lazor R, Lancronique J et al. Pulmonary lymphangioleiomyomatosis: a study of 69 patients. *Groupe d'Etudes et de Recherche sur les Maladies 'Orphelines' Pulmonaires (GERM'OP)*. *Medicine (Baltimore)* 1999; 78:321-337.
61. Harknett EC, Chang WY, Byrnes S et al. Use of variability in national and regional data to estimate the prevalence of lymphangioleiomyomatosis. *QJM* 2011; 104:971-979.
62. Oprescu N, McCormack FX, Byrnes S, Kinder BW. Clinical predictors of mortality and cause of death in lymphangioleiomyomatosis: a population-based registry. *Lung* 2013; 191:35-42.
63. Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Hamasaki T, Katayama I. Trends in the prevalence of tuberous sclerosis complex manifestations: an epidemiological study of 1666 Japanese patients. *PLoS One* 2013; 8: e63910. Doi: 10.1371/journal.pone.0063910.
64. Lisá P, Vašáková M. Plicní histiocytóza z Langerhansových buněk. <http://www.pneumologie.cz/guidelines/>, Aktualizace 2016.
65. Doubková M, Tomášková M, Skříčková J. Plicní histiocytóza z Langerhansových buněk - nemoc kuřáků. *Stud Pneumol Phthiseol* 2014; 74(5):158-161.
66. Adam Z, Adamová Z, Krejčí M, Pour L, Szturz P. Představení histiocytárních chorob, o nichž pojednává toto supplementum časopisu *Vnitřní lékařství*. *Vnitř Lék* 2010; 56(Suppl 2):2S9-2S21.

67. Cordier JF, Johnson SR. Multiple cystic lung diseases. *Eur Respir Mon* 2011; 54:46–83.
68. Harari S, Caminati A. Pulmonary Langerhans' cell histiocytosis. *Eur Respir Mon* 2009; 46:155–175.
69. Vassallo R, Ryu JH. Pulmonary Langerhans' cell histiocytosis. *Clin Chest Med* 2004; 25:561.
70. Watanabe R, Tatsumi K, Hashimoto S et al. Clinico-epidemiological features of pulmonary histiocytosis X. *Intern Med* 2001; 40:998–1003.
71. Šterclová M. Exogenní alergické alveolity: minimum pro praxi. *Vnitřní lékařství*. 2017; 63:802–806.
72. Hyldgaard C, Hilberg O, Muller A, Bendstrup E. A cohort study of interstitial lung diseases in central Denmark. *Respir Med* 2014; 108:793–799.
73. Pérez F ER, Kong AM, Raimundo K, Koelsch TL, Kulkarni R, Cole AL. Epidemiology of hypersensitivity pneumonitis among an insured population in the United States: a claims-based cohort analysis. *Ann Am Thorac Soc* 2018; 15:460–469.
74. Pérez-Padilla R, Salas J, Chapela R et al. Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeder's lung compared with those with usual interstitial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:49–53.

Došlo: 4. 2. 2019

Adresa:
MUDr. Martina Doubková, Ph. D.
Klinika nemocí plicních a tuberkulózy
FN Brno, pracoviště Bohunice
Jihlavská 20
625 00 Brno
Česká republika
e-mail: doubkovamartina@seznam.cz

2. Idiopatická plicní fibróza

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je nejběžnějším typem idiopatické intersticiální pneumonie a má velmi špatnou prognózu, která je způsobena progresí rozsáhlé fibrotické přestavby plicního parenchymu. Řadí se mezi méně běžná plicní onemocnění (epidemiologické údaje viz výše) a její etiologie není přesně známa. Opakované alveolární epiteliální poškození a abnormální proliferace fibroblastů s tvorbou extracelulární matrix je základní etiopatogenetický mechanismus IPF. Zánět může být přítomen sekundárně (Selman a kol., 2001; Selman a kol., 2007).

Medián věku při stanovení diagnózy nemocných s IPF je 60–70 let (Raghu a kol., 2018). Rizikovými faktory jsou kouření cigaret, expozice prachům organickým i anorganickým, gastroesofageální reflux, infekce. Pacienti obvykle trpí postupně se zhoršující dušností, neproduktivním kašlem a umírají na respirační selhání mezi 2–3 lety po stanovení diagnózy, pokud nejsou léčeni (Raghu a kol., 2011; Vancheri a kol., 2010). Průběh nemoci a přežití je ovlivněno přítomností akutních exacerbací, které jsou spojeny se skokovým zhoršením plicních funkčních parametrů a progresí plicního nálezu (Raghu a kol., 2018).

Stanovení diagnózy IPF vyžaduje nález obvyklé intersticiální pneumonie (*usual interstitial pneumonia*-UIP) na HRCT hrudníku (*high resolution computed tomography*) v korelaci s klinickým obrazem nebo histologickým ověřením UIP plicní biopsií (Raghu a kol., 2018). Plicní biopsie již není zlatým standardem pro diagnostiku. IPF je spojena s UIP, ale ne každá UIP je IPF. UIP může být pozorována jako plicní postižení i u jiných onemocnění například revmatických nebo chronické formy exogenní alergické alveolity.

V ČR není aktuální epidemiologická situace známa. KFA (kryptogenní fibrotizující alveolity, starší název pro idiopatickou plicní fibrózu) se u nás věnoval již v roce 1953 docent Ladislav Levinský (Levinský a kol., 1953, 1975). Studie hodnotící epidemiologii IPF na Moravě a Slezsku prokázala incidenci v letech 1981-1990 v rozmezí 0,74 – 1,28/100 000 obyvatel a prevalenci 6,5 až 12,1/100 000. Byl zaznamenán trend zvyšující se incidence. Poměr muži/ženy: 1:1,2 (Kolek a kol., 1994). Dle údajů věkového rozmezí z registru IPF je většina pacientů středního věku a vyššího věku, medián věku je 67 let (Doubková a kol., 2016).

2.1. Patogeneze idiopatické plicní fibrózy

Původní hypotéza o patogenезi IPF popisovala primárně zánět, následkem kterého docházelo k fibrotické remodelaci plicní tkáně. Později se ukázalo, že zánět není dominantní a primárním patogenetickým procesem je nekontrolovatelná fibrogenese. IPF je tedy

výsledkem defektní epiteliální-mezenchymální interakce a patologického procesu hojení s omezenou zánětlivou reakcí. Poškození a apoptóza alveolárních epiteliálních buněk II. typu je důležitým časným znakem v patogenezi IPF. Transformující růstový faktor beta (*transforming growth factor-beta*, TGF-beta) je hlavním profibrotickým cytokinem účastnícím se patologické fibrogeneze, podporuje apoptózu epiteliálních buněk, přechod epiteliálních buněk v mezenchymální, syntézu kolagenu, proliferaci fibroblastů, transdiferenciaci fibroblastu v myofibroblast, angiogenezi a expresi matrix metaloproteináz (Selman a kol., 2001; Fernandez a kol., 2012). Porušení celistvosti alveolo-epiteliální bazální membrány je typickým znakem IPF. Toto narušení vede k aberantní aktivaci alveolárních epiteliálních buněk a ke zvýšení migrace mezenchymálních buněk a pronikání zánětlivých buněk do alveolárního prostoru. Fibroblasty a myofibroblasty jsou rezistentní vůči apoptóze a více odpovídají na stimulaci fibrogenními cytokiny, čímž podporují proces fibrogeneze. Patogeneticky se dále uplatňuje nerovnováha oxidačního a antioxidačního systému, proteáz a antiproteáz, hyperkoagulační stav, fibroproliferativní vzorec hojení, genetický podklad (mutace genu pro *MUC5B* – *mucin5B*, familiární forma IIP, zkrácení telomer, genové polymorfismy cytokinů) a senescence (stárnutí se zkrácením telomer, ztrátou epiteliární integrity, epigenetické změny) (White a kol., 2003; Vašáková a kol., 2019). Jedna z prvních prací u nás, která se zabývá IPF a novému pohledu na patogenezi je „Idiopatická plicní fibróza“ (Doubková a kol., 2005). Viz kapitola 2.1.1.

2.1.1. Idiopatická plicní fibróza (Doubková M, Skříčková J. Vnitř. Lék. 2005; 51(12): 1375-1384)

Idiopatická plicní fibróza

M. Doubková, J. Skříčková

Klinika nemocí plicních a tuberkulózy Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice, přednostka doc. MUDr. Jana Skříčková, CSc.

Souhrn: Idiopatická plicní fibróza (IPF), v Evropě známá i jako kryptogenní fibrotizující alveolitida, je vzácné a vždy progredující onemocnění, které většinou končí fatálně. Jde o jednu z forem idiopatické intersticiální pneumonie. Pro IPF je charakteristické selhání alveolární reepitelizace, perzistence fibroblastů v plicní tkáni, nadměrná tvorba extracelulární matrix a z toho plynoucí porucha plicní architektury, která končí respiračním selháním. Diagnostický histologický obraz u IPF se nazývá běžná intersticiální pneumonie (usual interstitial pneumonia, UIP) a je pro ni charakteristický nehomogenní mikroskopický obraz s ložisky intersticiální fibrózy, zánětu, voštinovité přestavby a normální plicce. V okrcích zánětu, fibrózy a voštiny jsou přítomny ostrůvky aktivně proliferujících myofibroblastů a fibroblastů (fibroblastické fokusy), které korelují s aktivitou onemocnění. Farmakoterapie IPF zůstává stále klinickým problémem, v současné době není známa léčba zvyšující celkově přežití. Přežití nemocných s IPF může být nicméně zlepšeno transplantací plic. Identifikace rozhodujících cest fibrogenese mohou odhalit nové léčebné možnosti ke zpomalení nebo zastavení progresu IPF.

Klíčová slova: fibrogenese – idiopatická intersticiální pneumonie – léčba – plicní fibróza

Idiopathic pulmonary fibrosis

Summary: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), known in Europe as cryptogenic fibrosing alveolitis, is a rare, progressive and usually fatal form of idiopathic interstitial pneumonia. IPF is characterized by failure of alveolar re-epithelization, persistence of fibroblasts, deposition of extracellular matrix, and distortion of lung architecture which ultimately results in respiratory failure. Current consensus statements reserve the term IPF to refer to a specific clinical entity associated with the histopathological pattern of usual interstitial pneumonia (UIP). UIP is characterized by temporal heterogeneity, with alternating areas of interstitial fibrosis, fibroblastic foci (areas of proliferating fibroblasts and myofibroblasts), inflammation, honeycomb lung, and normal parenchyma. Fibroblastic foci are associated with progressive disease. Treatment of IPF remains clinical problem. Currently, there is no conservative therapy improving the survival of patients. Lung transplantation, however, improves survival. Identification of pathways crucial to fibrogenesis might offer potentially novel therapeutic targets to slow or halt progression of IPF.

Key words: fibrogenesis – idiopathic interstitial pneumonia – pulmonary fibrosis – treatment

Úvod

Idiopatická plicní fibróza (IPF) patří do skupiny difuzních intersticiálních plicních procesů (IPP) je nejběžnější jednotkou mezi idiopatickými intersticiálními pneumoniemi [10,29] (tab. 1). Termín kryptogenní fibrotizující alveolitida (KFA) je synonymum IPF. IPF je charakterizována zánětem a fibrózou v plicním parenchymu. Etiologie IPF je dosud neznámá a předpokládá se delší, nebo opakované působení neznámé noxy. Všeobecně akceptovatelná představa vzniku IPF je ta, že je důsledkem iniciálního poškození plic neznámým agens. Do místa poškození migrují zánětlivé a imuno-kompetentní buňky a následně zde

dochází ke zvýšené aktivitě fibroblastů, k parenchymatózní remodelaci a plicní fibróze [21,49]. V poslední době se objevují zprávy, že primární úlohu ve vzniku plicní fibrózy u IPF zastávají alveolární epitelální buňky, zánět může být přítomen až sekundárně [48,49,59]. Nemoc je limitována pouze na plicce. V minulosti došlo k několika změnám klasifikace IPF. V současné době je IPF spojována pouze s histologickým obrazem běžné intersticiální pneumonie (usual interstitial pneumonia, UIP) [1,2]. UIP/IPF se odlišuje od jiných jednotek patřících do skupiny idiopatických intersticiálních pneumonií horší prognózou a rezistencí na léčbu [13,14].

Definice

Specifická progredující forma intersticiální pneumonie limitovaná na plicce a asociována s histologickým obrazem UIP ověřené chirurgickou biopsií plic [1,2].

Historie

Akutně probíhající formu onemocnění popsal Hamman a Rich ve 30. a 40. letech 20. století [18,19,20]. Tyto práce byly důležitým mezníkem v popisu nemoci a od této doby se medicínská literatura IPF systematicky věnuje. Hamman a Rich pozorovali u několika pacientů rychle progredující plicní fibrózu neznámé etiologie s progredující dušností, difuzními plicními infiltráty na skia-

gramu hrudníku a subakutním cor pulmonale. Onemocnění skončilo smrtí u všech popsaných pacientů do 6 měsíců od stanovení diagnózy. Podle moderních poznatků odpovídá syndrom popsaný Hammanem a Richem nejspíše akutní intersticiální pneumonii či akutnímu alveolárnímu poškození [10]. Familiární formu IPF poprvé popsal ve své doktorské práci Sandoz z Bernu, který pozoroval dva případy familiárních „bronchiectázií“ [46].

Epidemiologie

IPF je celosvětově se vyskytující vzácné onemocnění. Dle epidemiologických údajů je zřejmé, že prevalence nemoci má vzrůstající tendenci [22]. Jedním z důvodů tohoto nárůstu je postupné rozšiřování poznatků o této chorobě, což umožňuje její lepší diagnostiku. Nejpřesnější údaje u nás o prevalenci IPF v populaci jsou z bývalého Československa, které bylo jedinou zemí na světě, kde byla prevalence zjišťována opakovaně a nárůst prevalence byl dokumentován [23]. Podle Levinského et al byla prevalence nemoci v Československu v roce 1963 2,44 na 100 000 obyvatel. V roce 1973 již činila 5,14 na 100 000 obyvatel [34]. V roce 1985 byl zjištěn další nárůst prevalence na 6,94 na 100 000 obyvatel [23]. Práce Kolka [28] z roku 1994 uvádí incidenci a prevalenci IPF na Moravě a ve Slezsku v letech 1981–1990. Incidence nemoci v těchto letech kolísala od 0,74 do 1,28 případů na 100 000 obyvatel a prevalence kolísala od 6,5 do 12,1 případů na 100 000 obyvatel. Byl pozorován trend ke zvyšování incidence IPF. Ročně podle této práce umírá přibližně 10 % nemocných se zjištěnou IPF. Nebyla zaznamenána korelace mezi incidencí IPF a incidencí sarkoidózy nebo tuberkulózy. Rovněž nebyly pozorovány rozdíly ve výskytu nemoci v oblastech s těžbou uhlí nebo v regionech s rozvinutým zemědělstvím v porovnání s jinými regiony. Významně vyšší výskyt ne-

moci byl naopak zjištěn v regionech spadajících pod velká pneumologická diagnostická centra: průměrná incidence v oblastech spadajících pod tato centra byla 1,58/100 000 a průměrná prevalence 20,8/100 000. Tento výsledek potvrzuje, že úroveň diagnostických možností dominuje nad faktory zevního prostředí v detekci IPF. Coultas et al v roce 1994 publikovali následující údaje o prevalenci IPF: muži 20,2 na 100 000 obyvatel a ženy 13,2 na 100 000 obyvatel [5]. IPF je onemocnění lidí středního a vyššího věku. Incidence a mortalita s narůstajícím věkem stoupá. Postižení bývají častěji muži (poměr prevalence mužů a žen je 1,4 : 1) [27]. Doba od objevení prvních příznaků ke stanovení diagnózy trvá 6 měsíců až 2 roky. Onemocnění může probíhat 1 až 10 let. Medián přežití je od 2,5 do 3,5 roku [2,10,29].

Etiologie

Etiologie IPF je neznámá, předpokládá se delší nebo opakované působení neznámé noxy (1 až 5 let) [26,29]. Jako potenciální rizikové faktory asociované s nemocí jsou uváděny kouření, chronická aspirace při gastroezofageálním refluxu, léky (např. antidepressiva) a vlivy zevního prostředí (expozice organickým rozpouštědly a prachu vznikajícímu při zpracování dřeva a kovů – mosazi, olova nebo oceli) [4,7,10]. Dále se uvažuje o vlivech profese, které spolu s vyšším věkem a kuřáctvím vedou ke zvýšené incidenci IPF. Jsou jimi farmářství, chov dobytka a ptáků, kadeřnictví a kamenictví [4,10,27]. Není sice znám jasný vztah mezi virovou infekcí a patogenézí nemoci, nicméně spekuluje se, že by se na incidenci IPF mohl podílet virus Epstein-Barrův, virus chřipky A, virus hepatitidy C, parainfluenzy, HIV-1, herpesvirus 6 a další [4,27,59]. Je možné uvažovat i o genetické predispozici u případů familiární formy onemocnění. Familiární forma IPF je nejspíše autozomálně

dominantní s neúplnou penetrací [30,36]. Další možné faktory, které jsou dávány do souvislosti s touto nemocí, jsou vrozené abnormality proteinů surfaktantu a receptoru pro antagonistu receptoru interleukinu-1, polymorfizmy genu pro tumor nekrotizující faktor α a genu pro receptor C1 složky komplementu [4,10,48].

Patogeneze

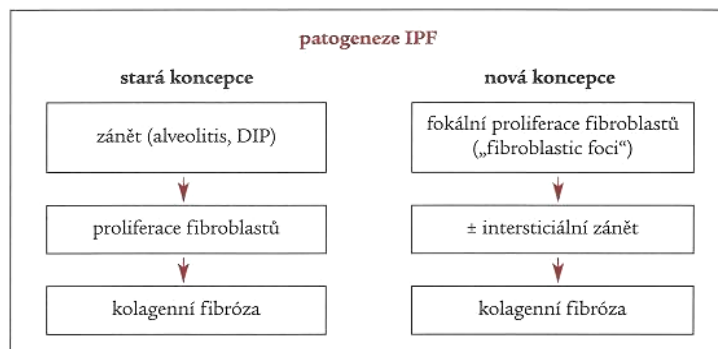
Normální alveolární bazální membrána je tvořena alveolárními epitelálními buňkami, které se dělí na pneumocyty I. a II. typu. Alveolární povrch je z 95 % tvořen pneumocyty I. typu. Tyto buňky jsou metabolicky aktivní a na svém povrchu nesou receptory pro různé substance, proteiny extracelulární matrix, růstové faktory a cytokiny. Pneumocyty I. typu jsou buňky terminálně diferencované a nedělí se. Pneumocyty II. typu tvoří surfaktant, umožňují transepiteliální pohyb vody, zastávají funkci antigen prezentujících buněk a mají schopnost proliferace, čímž regenerují alveolární epitelie po plicním poškození. Reparace škod v alveolech tedy neprobíhá množением pneumocytů I. typu, ale proliferací pneumocytů II. typu. Poškození endotelálních buněk způsobuje ztrátu jejich kontinuity. Schopnost regenerace těchto buněk je sporná [23,59].

Poznatky týkající se patogeneze IPF jsou zatím neúplné. Tradiční představa patogeneze je, že dosud neznámé agens vyvolává poškození pneumocytů I. typu nebo endotelii a na toto poškození navazuje zánětlivá a imunitní odpověď organismu (vznik alveolitidy s migrací alveolárních makrofágů, eozinofilů, neutrofilů, lymfocytů, žírných buněk), která postupně při přetrvávání agens vede k poškození alveolokapilární jednotky, k aktivaci fibroblastů spojené se zvýšenou produkcí extracelulární matrix a k postupnému ukládání kolagenu do plicního intersticia [16,23,55,59]. Zdá se, že zatímco

normální jedinec je schopen zánětlivou a imunitní odpověď utlumit, u nemocných s IPF tato zpětná vazba selhává [10,23]. Vývoj plicní fibrózy tak, jak je popisován výše, je dnes spojován především s jinými plicními fibrotickými procesy než s IPF, například s polékovým poškozením nebo kolagenózami [48,59]. V současné době je primární úloha zánětu při vzniku IPF zpochybňována. Studium plicní fibrózy na zvířecích modelech nebyla totiž primární role zánětu při vzniku IPF prokázána [27]. Podle nových poznatků primárně dochází k poškození (opakovaně mikroskopické fokusy, poškození trvající i několik let) a k aktivaci epiteliálních buněk. Následně pak bez přítomnosti zánětlivé stimulace dochází ke vzniku plicní fibrózy (proliferace fibroblastů, vznik fibroblastických fokusů, tvorba kolagenní extracelulární matrix). Sekundárně může být přítomen zánět (alveolární makrofágy, neutrofilie, prozánětlivé mediátory, kyslíkové radikály) [27,48,49] (obr. 1).

Alveolární epiteliální buňky: cíle časného poškození

Podle nynějších poznatků je základním předpokladem vzniku fibrózy u IPF porušení integrity alveolárního epitelia s alterací fenotypu alveolárních epiteliálních buněk dlouhodobě působící neznámou noxou [48]. Epiteliální buňky jsou následně zdrojem velkého počtu profibrotických cytokinů/růstových faktorů (transformující růstový faktor β 1 – TGF- β 1, růstový faktor z krevních destiček – PDGF, tumor nekrotizující faktor α – TNF- α , inzulinu podobný růstový faktor – IGF-1, základní růstový faktor fibroblastů) vedoucích v konečném důsledku k abnormální fibrogenézi [38,45]. Fibrogenní cytokiny umožňují proliferaci, migraci a diferenciaci fibroblastů. V nedávných studiích bylo dokázáno, že fenotyp alveolárních epiteliálních buněk z fibrotické tkáně se



Obr. 1. Patogeneze idiopatické plicní fibrózy (IPF). Podle [48].

odlišuje od fenotypu alveolárních buněk ze zdravých plic (jiná exprese cytokeratinu), což mění jejich funkci [24]. Fenotypicky odlišné alveolární epitelie více nekrotizují, podléhají apoptóze a chybí jim proliferační kapacita [53,58]. V normálním intaktním alveolu jsou alveolární epiteliální buňky v homeostáze s fibroblasty a mezenchymálními buňkami. Poškození alveolárních epitelii nebo snížení jejich kapacity vyvolává tvorbu prostaglandinu E2, který vytváří v alveolárním prostoru „profibrotické prostředí“ [48].

Je známo, že kmenové progenitorové buňky různých tkání se mohou diferencovat do mnoha buněčných linií včetně linií úplně jiných, než je původní tkáň. Kultury buněk kostní dřeně aplikované intravenózně myši po bleomycinem indukovaném plicním poškození jsou schopny diferenciaci v plicní alveolární epitelie. To je tedy jedna z možností reepitelizace po poškození alveolů [11,59]. Tato diferenciaci kmenových buněk v epiteliální alveolární buňky ale zatím nebyla prokázána u lidí [11,32].

Fibroblasty: klíčové efektorové buňky ve fibrogenézi

Fibroblasty jsou početnou skupinou buněk pojivové tkáně odlišujících se navzájem svými vlastnostmi (fenotypy). Jednotlivé fenotypy fibroblastů jsou důležité v odpovědi na různé typy poškození [25,59]. Primární funk-

cí fibroblastů je sekrece proteinů extracelulární matrix, která slouží pro migraci buněk a je potřebná k reparaci tkáně. Rozvoj fibrózy je tak důsledkem nedokonalé regenerace epiteliálních buněk a „přemrštěné“ abnormální fibrogenéze (abnormální proliferace fibroblastů, abnormální tvorba a ukládání kolagenu a extracelulární matrix) po poškození [27,48].

U UIP je přítomnost fibroblastických fokusů (agregáty proliferujících fibroblastů a myofibroblastů) základním příznakem onemocnění [33]. Velké množství fibroblastických fokusů je spojeno s progresí nemoci a jeho špatnou prognózou [13]. Bylo zveřejněno několik studií, které ukázaly, že fibroblasty a myofibroblasty u UIP jsou rezistentnější vůči apoptóze, více odpovídají na stimulaci fibrogenními cytokiny [43,57], nadměrně syntetizují proteiny extracelulární matrix, růstové faktory, cytokiny, integriny a oxidanty, což je provázáno změnami aktivity metaloproteináz odbourávajících extracelulární matrix a změnami aktivity jejich inhibitorů [20,38,45]. Fibroblasty a myofibroblasty proliferují a jsou aktivní i v nepřítomnosti zánětlivých buněk [48].

Neutrofilní granulocyty a jiné imunitní buňky

Role neutrofilů a jiných zánětlivých buněk (eozinofily, mastocyty, lymfo-

Tab. 1. Klasifikace difuzních intersticiálních plicních procesů, dle [10] a [29].

Vysvětlení zkratk - viz tab. 5

Klasifikace difuzních intersticiálních plicních procesů

- Intersticiální plicní procesy ze známých příčin
- idiopatické intersticiální pneumonie
- granulomatózní procesy
- jiné vzácné IPP
- pneumokoniózy, exogenní alergická alveolitida, poléková poškození, postiradiační poškození
- IPF, NSIP, RB-ILD, DIP, AIP, LIP
- sarkoidóza, vaskulitidy s plicní manifestací, histiocytóza X
- Lymfangioleiomyomatóza, alveolární lipoproteinóza

Tab. 2. Klinické příznaky idiopatické plicní fibrózy, dle [4].

- progresivní námahová dušnost: v 90 % případů
- chronický kašel: v 74 % případů
- typické krepitace bazálně bilaterálně: v 80 % případů
- paličkovité prsty: v 50–60 % případů

cyty) v patogenezi nemoci není dosud plně objasněna. Neutrofilny byly u plicní fibrózy studovány více než jiné zánětlivé buňky, ale data dokazující aktivní roli těchto buněk v některém stadiu UIP/IPF jsou nedosta- tečná. Je možné, že neutrofilní gran- ulocyty nehrají v patogenezi IPF aktivní roli, ale přicházejí do místa poškození pod vlivem mediátorů uvolněných během tvorby plicní fibrózy [59].

Neutrofilny ve svých granulích ob- sahují velký počet hydrolytických en- zymů a jiných toxických molekul, např. neutrofilní elastázu, kolagená- zu, lysozym, myeloperoxidázu a me- taloproteinázy, a jsou rovněž zdrojem kyslíkových radikálů. Extracelulární uvolnění těchto toxických substancí může vést k plicnímu parenchyma- tóznímu poškození [59].

Eozinofilní granulocyty byly první buňky, o kterých se uvažovalo, že hrají roli v patogenezi IPF. Jejich úlo- ha ve vzniku plicní fibrózy ale stále zůstává neobjasněna [59]. Mastocyty jeví při elektronmikroskopickém vy- šetření tkání plic s IPF známky de- granulace. Nacházejí se blízko fibro- blastů, což vede k domněnce, že v pa- togenezi IPF hrají nějakou roli [59]. Lymfocyty, tedy přesněji TH₂ buňky

(podskupina pomocných T lymfocy- tů) secernující interleukiny 4 a 13, se pravděpodobně patogeneze IPF účastní [48,59].

Bronchoalveolární laváž s vyšetře- ním bronchoalveolární tekutiny před- stavuje metodu, která přispívá k po- chopení patogeneze IPF. S její pomo- cí se diagnostika intersticiálních plicních procesů dostala na úroveň celulární, subcelulární a molekulár- ní. Použitím nových technologií mo- lekulární biologie (laserová mikrodisekce, DNA čipy, spektroskopie pro- teinů) můžeme dále prohlubovat poznatky o patogenezi UIP/IPF a na- lézt tak nové efektivnější terapeuti- ké možnosti [6].

Klinické příznaky

Typickým symptomem IPF je poma- lu progredující námahová dušnost a suchý dráždivý kašel. Z celkových nespecifických příznaků je v popředí únava, malátnost, někdy bývá hmot- nostní úbytek, bolesti kloubů, svalů a teplota. Při fyzikálním vyšetření je přítomen pozdně inspirační krepit- us nad oběma bázemi plic, u pokro- čilého onemocnění jsou slyšitelné krepitace po celém plicním křídle. Tento poslechový fenomén je možné připodobnit rozepínání suchého zi-

pu. Rovněž lze pozorovat, že nemoc- ní mají paličkovité prsty tvaru hodi- nového sklíčka. V pokročilém stadiu onemocnění je častým nálezem ta- chypnoe a centrální cyanóza. Pos- tupně dochází ke vzniku plicní hy- pertenze a pravostranného srdeční- ho selhání s cor pulmonale [4,7]. Příznaky IPF uvádí tab. 2.

Klasifikace

Klasifikace IPF se v průběhu let ně- kolikrát změnila. Podle převahy jed- notlivých histologických typů záně- tlivého poškození plicní tkáně (čili na základě patologicko-anatomických nálezů) rozdělili Liebow a Carrington [35] IPF do několika podskupin. Pa- tologické nálezy závisí na stupni pokročilosti nemoci (tab. 3). Choro- ba má nerovnoměrnou distribuci a rozsah postižení, takže u jednoho nemocného můžeme při vyšetření několika vzorků nalézt změny zapo- dávající do několika stupňů Liebowovy klasifikace.

V roce 1998 vychází práce Katzen- stainové a Myerse [26] s novou klasi- fikací IPF, která kromě nálezu pato- logicko-anatomického zohledňovala i klinický obraz, prognózu a odpov- ěď na léčbu. Tato klasifikace platila do roku 2000. Některé podjednotky z předchozí klasifikace byly vyřazeny z pojmu IPF s tím, že se nejedná o idiopatické procesy (LIP, GIP), ne- bo protože postihují především bronchioly (BIP). Naopak jiné pod- jednotky byly vytvořeny (tab. 3).

Nejnovější klasifikace vycházející ze závěrů Americké hrudní společnos- ti a Evropské respirační společnosti

[1,2] integruje klinický, radiologický a patologický přístup ke stanovení diagnózy. Tato klasifikace se neopírá jen o histopatologický obraz, ale kladě důraz na souvislost mezi klinicko-radiologickými nálezy a histopatologií. Tato klasifikace již nerozlišuje jednotky jako klasifikace předešlé a ztotožňuje IPF pouze s UIP. Ostatní klinicko-patologické jednotky (DIP, RBILD, NSIP, LIP, AIP, BOOP) jsou samostatnými entitami (tab. 4).

Kritéria pro stanovení diagnózy IPF

A. Kritéria pro stanovení diagnózy IPF při UIP potvrzené chirurgickou biopsií [1,2]:

1. Vyloučení jiných známých intersticiálních plicních procesů (IPP).
2. Restriktivní ventilační porucha (zvýšené hodnoty FEV₁/FVC), snížení difúzní kapacity plic.
3. Patologický nález na skiagramu hrudníku a HRCT plic (blíže viz diagnostika).

B. Kritéria pro stanovení diagnózy IPF při UIP nepotvrzené chirurgickou biopsií [1,2]:

Velká kritéria

1. Vyloučení známých příčin intersticiálních plicních procesů.
2. Přítomnost restriktivní ventilační poruchy s redukovanou vitální kapacitou a porucha výměny krevních plynů (zvýšení hodnot alveolo-arteriálního gradientu kyslíku, snížení

Tab. 3. Třídění idiopatické plicní fibrózy podle [35] a třídění podle [26].

Třídění idiopatické plicní fibrózy podle Liebowa [35]

- Běžná intersticiální pneumonie (UIP)
- Deskvamativní intersticiální pneumonie (DIP)
- Intersticiální pneumonie s obliterující bronchiolitidou (BIP)
- Lymfocytární intersticiální pneumonie (LIP)
- Intersticiální pneumonie s obrovskými buňkami (GIP)

Třídění idiopatické plicní fibrózy podle Katzensteinové [26]

- *Běžná intersticiální pneumonie (UIP)* – histologicky nehomogenní mikroskopický obraz s ložisky intersticiální fibrózy, aktivně proliferujících fibroblastů/myofibroblastů (fibroblastické fokusy), zánětu, voštinovité přestavby a okrsky normální plice. Špatná prognóza, medián přežití 3 roky, špatná odpověď na léčbu.
- *Deskvamativní intersticiální pneumonie (DIP)/zánět respiračních bronchiolů ve spojení s intersticiálním plicním postižením (RBILD)* – difúzní homogenní histologický obraz s převahou zánětu a minimem fibrózy, dominantně nahromadění makrofágů v alveolech, u RBILD spojeno s respirační bronchiolitidou, prognóza je dobrá, u RBILD tendence ke spontánní remisi.
- *Akutní intersticiální pneumonie (AIP)* – proces s aktivně proliferujícími fibroblasty a myofibroblasty s minimem kolagenu, jde o difúzní poškození alveolů (DAD), které se může rozvinout do obrazu jiného intersticiálního plicního procesu, vzácně onemocnění s fulminantním průběhem, vede rychle k respiračnímu selhání.
- *Nespecifická intersticiální pneumonie (NSIP)* – histologicky homogenní obraz s různým podílem zánětu a fibrózy, přičemž jen vzácně bývá dominujícím znakem fibróza. Prognóza je dobrá, onemocnění reaguje na kortikoidy s možným přechodem do remise.

parciálního tlaku kyslíku v klidu či při zátěži, snížení difuze).

3. Abnormální HRCT obraz s bilaterálně bazálně přítomnými retikulonodulárními opacitami a minimální nebo žádnou přítomností změn typu ground glass.
4. Transbronchiální biopsie nebo vyšetření bronchoalveolární tekutiny nepotvrdily jinou diagnózu (sarkoidóza, malignita, infekce).

Malá kritéria

1. Věk nad 50 let.
 2. Postupně narůstající dušnost.
 3. Trvání symptomů nemoci více než 3 měsíce.
 4. Auskultačně na plicích bilaterálně bazálně krepitus.
- Pokud nebyla chirurgická biopsie provedena, zůstává diagnóza IPF nejistá. Splněním všech čtyř velkých kritérií a alespoň tří malých kritérií

Tab. 4. Klasifikace idiopatických intersticiálních pneumonií, dle Americké hrudní společnosti a Evropské respirační společnosti [2].

Patologicko-anatomická jednotka

- běžná intersticiální pneumonie (UIP)
- nespecifická intersticiální pneumonie (NSIP)
- organizující se pneumonie (OP)
- difúzní alveolární poškození (DAD)
- deskvamativní intersticiální pneumonie (DIP)
- zánět respiračních bronchiolů
- lymfocytární intersticiální pneumonie (LIP)

Klinicko-rentgenologicko-patologická jednotka

- idiopatická plicní fibróza (IPF)
- nespecifická intersticiální pneumonie
- kryptogenní organizující se pneumonie (COP) obliterující bronchiolitida s organizující se pneumonií (BOOP)
- akutní intersticiální pneumonie (AIP)
- deskvamativní intersticiální pneumonie
- zánět respiračních bronchiolů u IPP (RBILD)
- lymfocytární intersticiální pneumonie

se ale zvyšuje pravděpodobnost správné diagnózy.

Diagnostika

Anamnesticky od pacienta získáváme údaje o příznacích a o délce trvání symptomů. Zjišťujeme jeho expozici potenciálním rizikovým faktorům (viz výše). I když je familiární forma onemocnění vzácná (popisována jsou asi 3 % všech případů KFA), ptáme se i na podobná onemocnění v rodině [30,36].

Laboratorní vyšetření jsou nespecifická. Mohou být zvýšeny markery zánětlivé aktivity. Dále mohou být elevovány hodnoty neutrofilů v periferní krvi, což může být zapříčiněno konkomitantní infekcí. Přítomna může být i hypergamaglobulinemie. Přibližně u 40 % nemocných jsou zjišťovány vyšší titry antinukleárních protilátek a revmatoidního faktoru, jejich význam je dosud nejasný [10,27].

Na skiagramu hrudníku je patrné zmenšení plicních polí, v iniciálním stadiu pak retikulonodulární zastínění v dolních a středních plicních polích. Difuzní mlhovitá zastínění (opacity mléčného skla, ground glass) odpovídají alveolitidě. V pozdních a pokročilejších stádiích nalézáme obraz voštinovité plice s bulózními formacemi a distenzí mediastina. RTG obraz není typický, nedovoluje specifickou diagnózu. Patologický nález na skiagramu hrudníku není přítomen asi u 10–15 % časně zachycených stádií IPF, a proto při přetrvávajícím podezření je indikováno HRCT vyšetření [4,17].

HRCT plic (počítačová tomografie s vysokou rozlišovací schopností) je vyšetřovací metoda s velkým přínosem ke stanovení diagnózy IPF. Je schopna odhalit intersticiální plicní postižení již v časných stádiích nemoci, kdy ještě nejsou přesvědčivé změny na skiagramu hrudníku. Patologickým nálezem na HRCT plic jsou periferní, subpleurální retikulární abnormality nacházející se pře-

vážně bilaterálně v plicních bazích. Subpleurálně bývají přítomny i trakční bronchiektázie a změny typu ground glass nejsou charakteristické pro IPF, v takovémto případě je třeba vyloučit jinou entitu např. DIP. HRCT plic je schopno objasnit rozsah fibrózy a stupeň zánětu (aktivitu procesu), je důležité k posouzení rozsahu plicních změn, k odhadu reverzibility procesu a prognózy nemoci. HRCT je rovněž přínosné pro stanovení vhodného místa k provedení plicní biopsie (např. se nehodí k odběru plicní tkáně ložiska voštinovité plice) a zároveň napomáhá stanovit léčebnou strategii. Určité intersticiální plicní procesy, jako je právě i pokročilá forma IPF, mají charakteristický nález na HRCT, v takových případech není nezbytně nutné provádět histologické ověření plicní biopsií a ke stanovení diagnózy IPF postačuje klinicko-radiologická (HRCT plic) korelace nálezů [1,2,7,10]. Progrese nálezů na HRCT plic dobře koreluje se změnami plicní difuze [41].

Izotopové vyšetřovací metody, mezi něž patří galiový plicní scan a vyšetřování alveolární permeability pomocí clearance techniciem značené kyseliny dietylen-tetraamino-pentaoctové (DTPA), nepatří spolu s magnetickou rezonancí k metodám běžně používaným v diagnostice či monitoraci onemocnění [54]. Od provádění galiového plicního scanu se ustupuje pro velkou radiační zátěž a především pro malou specifitu.

Častým nálezem při funkčním vyšetření plic je restriktivní ventilační porucha, tedy snížení celkové plicní kapacity – TLC, vitální kapacity plic – VC za zachování či zvýšení hodnoty FEV₁/FVC (poměr usilovné vitální kapacity za 1 sekundu a usilovné vitální kapacity). Pletyzmograficky jsou zjištěny snížené statické plicní objemy – celková plicní kapacita, funkční reziduální kapacita (FRC),

reziduální objem (RV), respektive nitrohruční objem plynů na konci klidného výdechu (TGV) [23]. Nález obstrukční ventilační poruchy nevylučuje plicní fibrózu [12,47]. Již v časných stádiích onemocnění dochází ke snížení plicní poddajnosti. Prakticky u všech pacientů bývá snížen transfer faktor (difuzní kapacita plic, DLCO), což je důsledek poruchy výměny plynů na alveolokapilární membráně. Patologický nález na skiagramu hrudníku nemusí být přítomen, ale nemocní již vykazují abnormální hodnoty plicní difuze a krevních plynů. Respirace bývá v počátečních stádiích nemoci v normě a k hypoxemii dochází až při námaze (latentní respirační insuficience), proto je důležité vyšetřovat krevní plyny po zátěži [12]. Kontrola plicních objemů, difuze a krevních plynů je optimální k monitoraci onemocnění. Změny v hodnotách vyšetření plicní difuze dobře korelují s rozsahem změn na HRCT plic [27,41].

Endobronchiální nález při bronchoskopii bývá normální. Přínosem je vyšetření bronchoalveolární tekutiny (BALT) pomocí bronchoalveolární laváže. V polovině 60. let 20. století bylo zjištěno, že nezávisle na typu difuzního intersticiálního postižení nebo etiologii je nejčastější manifestací intersticiálních plicních procesů alveolitida, tj. akumulace zánětlivých a efektorových buněk v alveolárních strukturách. Tyto buňky lze získat a studovat pomocí diagnostické bronchoalveolární laváže, kterou zavedl v roce 1974 Reynolds a Newball [44]. Vyšetření bronchoalveolární tekutiny (cytologické a imunocytochemické) není jednoznačně diagnostická metoda pro idiopatickou plicní fibrózu. Její význam spočívá v odlišení jiných klinických jednotek v rámci diferenciální diagnostiky. Sledování nálezů v bronchoalveolární tekutině se doporučuje v korelaci s HRCT plic a funkčním vyšetřením k monitorování průběhu onemocnění. Cytologickým nálezem v BALT u IPF

je zvýšení celkového počtu buněk, zmnožení neutrofilů, alveolárních makrofágů, eozinofilů, lymfocytů (smíšená alveolitida). Samotné zvýšení počtu lymfocytů není pro IPF běžné a je nutno vyloučit jinou entitu (např. sarkoidózu). Udává se, že zvýšení počtu neutrofilů a eozinofilů znamená závažnější prognózu onemocnění, naopak vyšší lymfocytóza je spojována s menším rozsahem voštinovitých změn, lepší prognózou a lepší odpovědí na steroidy [1,10].

Transbronchiální biopsie není vhodná ke stanovení diagnózy IPF. Její nevýhodou je nižší diagnostická výtěžnost způsobená často malým nereprezentativním vzorkem (nutno odebrat více vzorků tkáně, alespoň 8) a také tím, že plicní postižení je maximální na periférii plic [4,7]. Za pomoci této metody jsme ale schopni vyloučit jiné entity (sarkoidózu, malignitu, infekci) [1].

Zlatým standardem v diagnostice IPF je plicní biopsie [1]. Jedná se o histologické vyšetření části plice získané plicní biopsií při torakotomii nebo videotorakoskopii. Videotorakoskopie je v současné době více preferovaná metoda pro menší morbiditu, menší zátěž pro pacienta, kratší dobu hojení a kratší pobyt v nemocnici [7,23]. Vhodné místo k provedení plicní biopsie se určuje za pomoci HRCT plic tak, aby byla biopsie provedena z reprezentativního místa postižení, kde nejsou pouze terminální voštinovité struktury bez známek aktivity procesu. Při odběru je nutné dbát i na velikost vzorku a je třeba vzít vzorků více [25]. Histologické vyšetření by mělo být provedeno patologem, který má erudici v hodnocení vzorků z respiračního traktu. Plicní chirurgická biopsie není indikována u všech pacientů. Je doporučována tam, kde klinicko-radiologické nálezy s diagnózou IPF přesně nekorelují. Musíme vždy zvažovat profit z takto získané diagnózy a riziko chirurgického výkonu [2,27].

Diferenciální diagnostika

V případě, že byla provedena chirurgická plicní biopsie a byla prokázána UIP, pak při splnění základních podmínek diagnózy (viz výše) je diferenciální diagnostika zaměřena na vyloučení jiných entit spojených s histologickým nálezem běžné intersticiální pneumonie, což jsou kolagenózy, azbestóza, polékové poškození plic, chronická hypersenzitivní pneumonie. V případě, že chirurgická plicní biopsie dělána nebyla, je nutné vyloučit všechny nozologické jednotky patřící do podskupiny difuzních intersticiálních plicních procesů za využití klinicko-radiologických nálezů [2,50].

Terapie

Léčba IPF je obtížná a pouze empirická. Choroba navzdory terapii postupně progreduje do terminálního respiračního selhání. Důležitou otázkou je indikace léčby, vždy je nutné zvážit profit pro pacienta a možné nežádoucí účinky terapie. Vzhledem ke špatné prognóze je některými odborníky zastáván názor zahájit léčbu u všech pacientů, u kterých není kontraindikace (vážné přidružené choroby – cukrovka, ischemická choroba srdce, vředová choroba, atd.). Léčbu je vhodné začít včas, než dojde k plnému rozvoji fibrózy [1,2]. K dispozici je jen málo validních kontrolovaných studií hodnotících efekt terapie IPF. Je velmi problematické u této nemoci s mediánem přežití do 3 roků sestavit placebem kontrolované velké studie. Dalším úskalím v hodnocení výstupu studií pro praxi je vzhledem k nízké prevalenci i malý počet pacientů účastnících se studií [56]. Do dřívě prováděných studií byli zařazováni nemocní, kteří měli i jiný histologický obraz než UIP (např. NSIP a další entity, které se dnes již k IPF neřadí, tab. 3), což se odráželo nejen ve výsledném hodnocení průměrného přežívání, ale i ve výsledném efektu léčby kortikoidy [38,49]. Z etic-

kých důvodů nebyly a asi ani nikdy nebudou prováděny randomizované placebem kontrolované studie s glukokortikoidy. Současná v praxi používaná léčba vychází z předpokladu, že klíčovou roli v patogenezi nemoci hraje chronický zánět vedoucí ke tkáňovému poškození a vzniku plicní fibrózy (viz patogeneze). Právě tato strategie vycházející z předpokladu, že u pacientů dochází k fibróze na podkladě zánětlivého procesu, může být důvodem neefektivnosti stávající terapie [48,49].

V léčbě IPF se uplatňují systémově podávané kortikosteroidy, imunosupresiva, cytostatika a antifibroproliferativní látky. Od 50. let 20. století jsou glukokortikoidy hlavní složkou terapie IPF. Nejčastěji se podává prednison (per os). Několik prvních studií pacientů s IPF zaznamenalo 10–30% odpověď na léčbu kortikoidy buď v monoterapii nebo v kombinaci s imunosupresivou (zlepšení plicních funkcí, klinických symptomů, nálezu na skiagramu hrudníku), ale nebyl zjištěn signifikantní vliv na přežívání nemocných [15,52]. Tyto studie nebyly vztaženy na jednotlivé histologické typy (UIP, DIP, NSIP). Jestliže vezmeme v potaz jen nemocné s UIP, která je podle dnešních kritérií jediným histologickým obrazem IPF, je přežití a odpověď na jakoukoliv terapii velmi špatná (0–16 %) [39,49]. Jako výhodnější než samotné kortikoidy se v současné době jeví podávání kombinace kortikoidů s dalšími imunosupresivou (cytostatikou). Dávka kortikoidů je v průběhu terapie postupně snižována a imunosupresivum navyšováno [1,2,8,49]. Doporučuje se zahajovat terapii prednisonem v dávce 0,5 mg/kg a den. Po 4 týdnech se lék snižuje na dávku poloviční a po 8 týdnech na čtvrtinovou. Z imunosupresiv se nejvíce používá pacienty dobře tolerovaný azatioprin [8,9,45], který se ke kortikoidům přidává v denní dávce 2–3 mg/kg. Je vhodné zahájit podávání azatioprinu dávkou 25 mg

Tab. 5. Léčebné možnosti u IPF, dle [29].**Léčebné možnosti u idiopatické plicní fibrózy**

reálné	experimentální	pomocné
kortikoidy	interferon- γ (α , β)	oxygenoterapie
azatioprin	N-acetylcystein	antibiotika
cyklofosfamid	pirfenidon	antitusika
kolchicin	relaxin	rehabilitace
D-penicilamin	PGE-2, anticytokiny	transplantace

Tab. 6. Rizikové faktory progresu idiopatické plicní fibrózy, dle [10] a [25].

- věk nad 50 let
- mužské pohlaví (nebylo současnými studii potvrzeno)
- kuřáctví v minulosti (ne kuřák v době diagnózy)
- porucha plicních funkcí střední až těžká
- BALT: zvýšení neutrofilů a eozinofilů
- HRCT plic: retikulární opacity nebo změny typu voštinovitě plíce
- špatná odpověď na léčbu kortikoidy
- patologický nález: rozsáhlejší fibróza a početnější fibroblastické fokusy

a zvyšovat maximálně do denní dávky 150–200 mg. Dalším lékem, přidávaným ke kortikoidům, je cytostatikum cyklofosfamid, jehož užívání je ale spojeno s častými nežádoucími účinky (suprese kostní dřeně, hepatotoxicita, kancerogenita) [8,9,45].

Alternativní léčbou jsou další imunosupresiva a cytostatika (metotrexát, chlorambucil, cyklosporin A), léky s antifibroproliferativním účinkem (D-penicilamin, kolchicin, pirfenidon, prostaglandin E₂, interferon γ -1b), látky s antioxidantním účinkem (N-acetylcystein, niacin, glutation, taurin) [9,42]. Pirfenidon, kolchicin, penicilamin a látky interferující se syntézou kolagenu byly testovány v mnoha klinických studiích, bohužel šlo ale o studie na malých počtech pacientů. Ačkoliv u několika nemocných došlo ke zlepšení nebo stabilizaci plicních funkcí, žádná antifibrotická látka neměla efekt na snížení mortality [27]. Velké naděje se vkládaly do interferonu γ -1b, ve velké randomizované studii nebyl prokázán jeho signifikantní vliv na progresi nemoci, plicní funkce a kvalitu života u pacientů s IPF [42,51].

Navíc je jeho užití spojeno s celou řadou nežádoucích účinků [3]. Všechny zde uváděné alternativní imunosupresivní a antifibroproliferativní léky ale nevykazují lepší výsledky než stávající doporučená terapie [8,9,56]. Při zkoumání choroby na molekulární úrovni se před námi objevují možné další budoucí léčebné strategie zaměřující se na specifické cytokiny (transformující růstový faktor β – TGF- β , tumor nekrotizující faktor α – TNF- α), inhibitory proteinkináz a další [49]. V neposlední řadě je zájem směřován i na genovou terapii [49,59]. Léčebné modalitě u IPF představuje tab. 5.

Pokud je choroba pokročilá a vyvine se respirační insuficience, je indikována dlouhodobá domácí oxygenoterapie. Jedinou nadějí na prodloužení přežití nemocných s IPF je v současnosti transplantace plic. Transplantace se provádí většinou jednostranně a tři roky po transplantaci žije asi 60 % nemocných [10]. Studie zabývající se jednostrannou plicní transplantací neprokázala recidivu nemoci v transplantované plíci [37]. Problémem provedení trans-

plantace plic je většinou pokročilý věk nemocných s IPF, krátký medián přežití a celkový špatný stav pacienta [37,56].

Efekt léčby je nutné hodnotit nejdříve za 3 měsíce po jejím nasazení, definitivní rozhodnutí o jejím ukončení v případě neefektivnosti se dělá až po 6 měsících. V terapii pokračujeme jen tehdy, když přináší užitek, tj. ústup symptomů, zlepšení nálezu na skiagramu hrudníku a HRCT, vede ke zvýšení TLC nebo VC o 10 % a více (nebo o 200 ml), DLCO o 15 % a více, pO₂ o 4 % nebo o 4 mm Hg [1,2,56].

Prognóza

IPF je navzdory konzervativní léčbě progredující onemocnění. Ve světové literatuře není záznam o možné reverzibilitě plicní fibrózy [10]. Doba od příznaků do diagnózy trvá 6 měsíců až 2 roky [10,29]. Polovina nemocných umírá do 5 let od stanovení diagnózy [10]. Podle Selmana et al žije 10 let a více 10–20 % pacientů [48,49]. Kolek et al [31] udávají lepší celkové přežití, ale tato práce se neopírá o novou klasifikaci IPF. Tab. 6 ukazuje rizikové faktory ovlivňující negativně prognózu nemoci. Dřívější zprávy, že faktor mužského pohlaví zhoršuje prognózu IPF, nebyly v současnosti potvrzeny [9,25]. Ve studii Panose et al byly u 543 nemocných s IPF po dobu 7 let sledovány nejčastější příčiny úmrtí. Během tohoto období 60 % pacientů zemřelo, z toho 39 % na respirační selhání, 27 % na kardiovaskulární selhání, 10 % na bronchogenní karcinom, 3 % na plicní embolii, 3 % na plicní infekci a 18 % z jiné příčiny [40].

Závěr

Idiopatická plicní fibróza je progresivní onemocnění neznámé etiologie patřící do skupiny difúzních intersticiálních plicních procesů. Je definována histologickým obrazem běžné intersticiální pneumonie, čímž je oddělena od jiných idiopatických

intersticiálních pneumonií. Kauzální terapie nemoci dosud neexistuje. Současná používaná léčba sestávající s glukokortikoidů, imunosupresiv nebo cytostatik je v převážně většině případů neefektivní a nezvyšuje signifikantně přežití nemocných s IPF. Prognóza onemocnění je nepříznivá, IPF má tendenci progredovat i přes prováděnou terapii. Postupně probíhající poznávání etiopatogeneze bude klíčové pro objev nových terapeutických možností.

Literatura

1. American Thoracic Society/European Respiratory Society: Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 646–664.
2. American Thoracic Society/European Respiratory Society: International multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 277–304.
3. Antoniou KM, Ferdoutsis E, Bours D et al. Interferons and their application in the lung. *Chest* 2003; 123: 209–216.
4. Bourke SC, Clague H. Review of cryptogenic fibrosing alveolitis, including current treatment guidelines. *Postgrad Med J* 2000; 76: 618–624.
5. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC et al. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 967–972.
6. Crystal RG, Bitterman PB, Mossman B et al. Future research directions in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 236–246.
7. Cushley M, Davidson A, Du Bois R et al. Diagnosis and assessment of diffuse parenchymal lung disease. *Thorax* 1999; 54(Suppl): 1–30.
8. Davies HR, Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: current and future treatment options. *Am J Respir Med* 2002; 1: 211–224.
9. Davies HR, Richeldi L, Walters EH et al. Immunomodulatory agents for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 3: CD003134.
10. Demedts M, du Bois RM, Nemery B et al. Interstitial lung diseases: a clinical update. *Eur Respir J* 2001; 18: 1S–133S.
11. Dunsmore SE, Shapiro SD. The bone marrow leaves its scar: new concepts in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2004; 113: 180–182.
12. Fišerová J, Chlumský J, Satinská J et al. Funkční vyšetření plic. GEUM, Praha, 2003.
13. Flaherty KR, Colby TV, Travis WD et al. Fibroblastic foci in usual interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1410–1415.
14. Flaherty KR, Thwaite EL, Kazeerooni EA et al. Radiological versus histological diagnosis in UIP and NSIP: survival implications. *Thorax* 2003; 58: 143–148.
15. Flaherty KR, Toews GB, Lynch III JP et al. Steroids in idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective assessment of adverse reactions, response to therapy, and survival. *Am J Med* 2001; 110: 278–282.
16. Gazdík F, Zubo I, Gazdík K. Imunologické mechanismy při vybraných intersticiálních plicních procesech. *Stud Pneumol Phthiseol* 2003; 63: 199–207.
17. Green FHY. Overview of pulmonary fibrosis. *Chest* 2002; 122: 334S–339S.
18. Hamman L, Rich AR. A clinical-pathological conference. A case of heart failure. *International Clinics*, 43rd series, 1933, 1: 197–232.
19. Hamman L, Rich AR. Fulminant diffuse interstitial fibrosis of the lungs. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1935; 51: 154–163.
20. Hamman L, Rich AR. Acute diffuse interstitial fibrosis of the lung. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1944; 74: 177–212.
21. Hanáček J. Patofyziologie intersticiálních plicních chorob. *Stud Pneumol Phthiseol* 1999; 59: 246–254.
22. Homolka J, Altmann V, Votava V. Increasing prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis in the Czech Republic. *Chest* 1999; 116(Suppl. 2): 155.
23. Homolka J, Votava V. Intersticiální plicní procesy. Praha: Maxdorf 1999.
24. Ionaga K, Miyajima M, Suga M et al. Alteration in cyokeratin expression by the alveolar lining epithelial cells lung tissues from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol* 1997; 182: 217–224.
25. Kaminski N, Belperio JA, Bitterman PB et al. Idiopathic pulmonary fibrosis, supplement. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 1S–105S.
26. Katzenstein AA, Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1301–1315.
27. Khahil N, O'Connor R. Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment. *Can Med Assoc J* 2004; 171: 153–160.
28. Kolek V. Epidemiology of cryptogenic fibrosing alveolitis in Moravia and Silesia in the 1981–1990. *L'Internista* 1995; 3: 105–108.
29. Kolek V. Diagnostika a léčba idiopatických intersticiálních pneumonií. *Respirace* 2001; 7: 98–104.
30. Kolek V, Lenhart K, Bártová A. Imunogenetické aspekty kryptogenní fibrotizující alveolity. *Stud Pneumol Phthiseol* 1997; 57: 104–105.
31. Kolek V, Žurková M, Petřek M et al. Klinické zkušenosti s idiopatickou plicní fibrózou ve vztahu k nové klasifikaci. *Stud Pneumol Phthiseol* 2000; 60: 168–170.
32. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 2001; 128: 5181–5188.
33. Kuhn C, McDonald JA. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol* 1991; 138: 1257–1265.
34. Levinský L, Houšťek J, Hloušková Z et al. Prevalence idiopatické difúzní intersticiální plicní fibrosy v ČSSR (Československu). *Česk Pediatr* 1974; 29: 353–357.
35. Liebow A. Definition and classification of interstitial pneumonias in human pathology. *Prog Resp Res* 1975; 8: 1–33.
36. Marshall RP, Puddicombe A, Cookson WO et al. Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in United Kingdom. *Thorax* 2000; 55: 143–146.
37. Meyers BF, Lynch JP, Turlock EP et al. Single versus bilateral lung transplantation for idiopathic pulmonary fibrosis: a ten-year institutional experience. *J Thorax Cardiovasc Surg* 2000; 120: 99–107.
38. Millar A. Anti-cytokine therapy in fibrosing alveolitis: where are we now? *Respir Res* 2000; 1: 3–5.
39. Nicholson AG, Colby TV, du Bois RM et al. The prognostic significance of the histologic pattern of interstitial pneumonia in patients presenting with the clinical entity of cryptogenic fibro-

- ing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2213–2217.
40. Panos RJ, Mortenson RL, Niccoli SA et al. Clinical deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: cause and assessment. *Am J Med* 1990; 88: 396–404.
41. Polák J, Homolka J, Vašáková M et al. High-resolution počítačová tomografie v diagnostice kryptogenní fibrotizující alveolity. Korelace s plicním funkčním vyšetřením a bronchoalveolární laváží. *Čas Lék Česk* 1996; 135: 417–422.
42. Raghu G, Brown KK, Bradford WZ et al. A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2004; 350: 125–133.
43. Ramos C, Montano M, Garcia-Alvarez J et al. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24: 591–598.
44. Reynolds HY, Newball HH. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J Lab Clin Med* 1974; 84: 559–573.
45. Richeldi L, Davies HR, Ferrara G et al. Corticosteroids for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; 4: CD002880.
46. Sandoz E. Über zwei Fälle von „fötaler Bronchektasie“. Thesis (doctoral). Bern: Universität Bern 1906.
47. Satinská J. Význam funkčního vyšetřování u chronické obstrukční plicní nemoci. *Vnitř Lék* 2004; 50: 670–674.
48. Selman M, King TE, Pardo A et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001; 134: 136–151.
49. Selman M, Thannickal VJ, Pardo A et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs* 2004; 64: 405–430.
50. Skříčková J. Diferenciální diagnostika pneumonií z pohledu klinika. In: Ševčík P, Skříčková J, Šrámek V et al. Záněty plic v intenzivní medicíně. Praha: Galén 2004: 49–59.
51. Strieter RM, Starke KM, Enelow RI et al. Effects of interferon-1b on biomarker expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 133–140.
52. Turner-Warwick M, Burrows B, Johnson A et al. Cryptogenic fibrosin alveolitis: response to corticosteroid treatment and its effect on survival. *Thorax* 1980; 35: 593–599.
53. Uhal BD, Joshi I, True AL et al. Fibroblasts isolated after fibrotic lung injury induce apoptosis of alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 1995; 269: L819–L828.
54. Vašáková M. Idiopatická plicní fibróza (kryptogenní fibrotizující alveolity). In: Zatloukal P, Fiala P, Votruba J et al. Vnitřní lékařství. Díl IIIa. Pneumologie. Praha: Galén 2001: 145–149.
55. Votava V, Svobodová L, Homolka J. Intersticiální plicní procesy (přehledný článek). *Čas Lék Čes* 2002; 141: 445–448.
56. Vyšehradský R. Farmakoterapie kryptogenní fibrotizující alveolity. *Stud Pneumol Phthisiol* 2001; 61: 195–198.
57. Walker GA, Guerrero IA, Leinwand LA et al. Myofibroblasts: molecular crossers. *Curr Top Dev Biol* 2001; 51: 91–107.
58. Wang R, Ramos C, Joshi I et al. Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Am J Physiol* 1999; 277: L1158–L1164.
59. White ES, Lazar MH, Thannickal VJ. Pathogenetic mechanism in usual interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol* 2003; 201: 343–354.

MUDr. Martina Doubková
www.fnbrno.cz
e-mail: doubkovamartina@seznam.cz

Doručeno do redakce: 25. 3. 2005
Přijato po recenzi: 22. 6. 2005

www.kardiologickeforum.cz

2. 2. Genetické dispozice pro plicní fibrózu

Dědičné předpoklady byly prokázány u nemocných s tzv. familiární plicní fibrózou (FPF). V rodinách postižených FPF se plicní onemocnění může objevit již mezi 20-40. rokem věku. U jednotlivých členů rodiny se vyskytuje jakýkoliv typ plicní fibrózy nejen UIP, mohou být přítomny i mimoplicní příznaky, včetně jaterní cirhózy, předčasného šedivění vlasů a selhání kostní dřeně (Kaur a kol., 2017). Dědičné předpoklady byly prokázány i u nemocných s tzv. sporadickou IPF. U těchto pacientů choroba přichází ve vyšším věku (typicky kolem 70 let) a nebývají postiženi další rodinní příslušníci.

Variety genů, vzácné a běžné, jsou spojeny se sporadickou a familiární formou plicní fibrózy. U FPF (≥ 2 členy stejné rodiny postihuje idiopatická intersticiální pneumonie) nalézáme převážně vzácné varianty genů (frekvence alel $<0,1$ %, tzv. major geny, geny velkého dopadu). Jsou to jednak geny alveolární stability tzv. surfaktant proteiny (*SFTPC*, *SFTPA1*, *SFTPA2*), dále *ABCA3* (ATP-binding cassette) a *NAF1* a geny pro telomerázy (*TERT*, *TERC*, *DKC1*, *TINF2*, *RTEL1* a *PARN*) (Kaur a kol., 2017). Běžné varianty genů (frekvence alel >5 %, tzv. minor geny, geny malé váhy, malého dopadu) také hrají roli v riziku FPF, například polymorfismy *MUC5B* (*mucin5B*) rs3705950. GWAS studie s IPF (jak familiární, tak sporadické) potvrdily úlohy *TERT*, *TERC*, *MUC5B*, *FAM*, *DSP*, *OBFC1*, *ATP*, *DPP9* na patogenezi onemocnění (Fingerlin a kol., 2013; Noth a kol., 2013). Vzácné varianty genů jsou vysoce penetrantní a mají větší účinnost, ale s ohledem na jejich nízkou četnost představují menší podíl celkového rizika onemocnění u obecné populace. Obecně mají běžné varianty menší velikost účinku, ale jsou přítomny s vyšší frekvencí a celkově mohou přispět k většímu podílu rizika onemocnění. Varianta promotoru *MUC5B* rs35705950 je běžná varianta s velkou velikostí účinku, a proto představuje významné riziko pro vznik IPF (Kaur a kol., 2017).

2.2.1. Familiární plicní fibróza

Za familiární plicní fibrózu (FPF) je považován výskyt intersticiálního plicního procesu u dvou a více osob s intersticiálním plicním procesem, které jsou přímými příbuznými. Patogeneze onemocnění je pravděpodobně vícestupňový proces, na jehož počátku stojí patologie v germinálním genomu. Projevy FPF se neliší od projevů intersticiálních plicních procesů obecně. U části pacientů se můžeme setkat s izolovaným postižením v oblasti plicního parenchymu, možné je ale i postižení mimoplicní, zejména u komplexních syndromů a telomeropatií. Dosud nejčastěji popsané mutace se týkají genů uplatňujících se udržení homeostázy telomér (*TERT*, *TERC*, *RTEL1*, *PARN*, *DKC1*, *TINF2*, *NAF1*), surfaktantu

(*SFTPC*, *ABCA3*, *NFKX2-1*) nebo asociovaných s komplexními syndromy (*COPA*, *TMEM173*, *HPS-1-8*, *NF1*, *FAM111B*, *NDUFAF6*, *GATA 2*) (Borie a kol., 2019; Kaur a kol., 2017; Krauss a kol., 2019; Hortense a kol., 2019; Borie a kol., 2017).

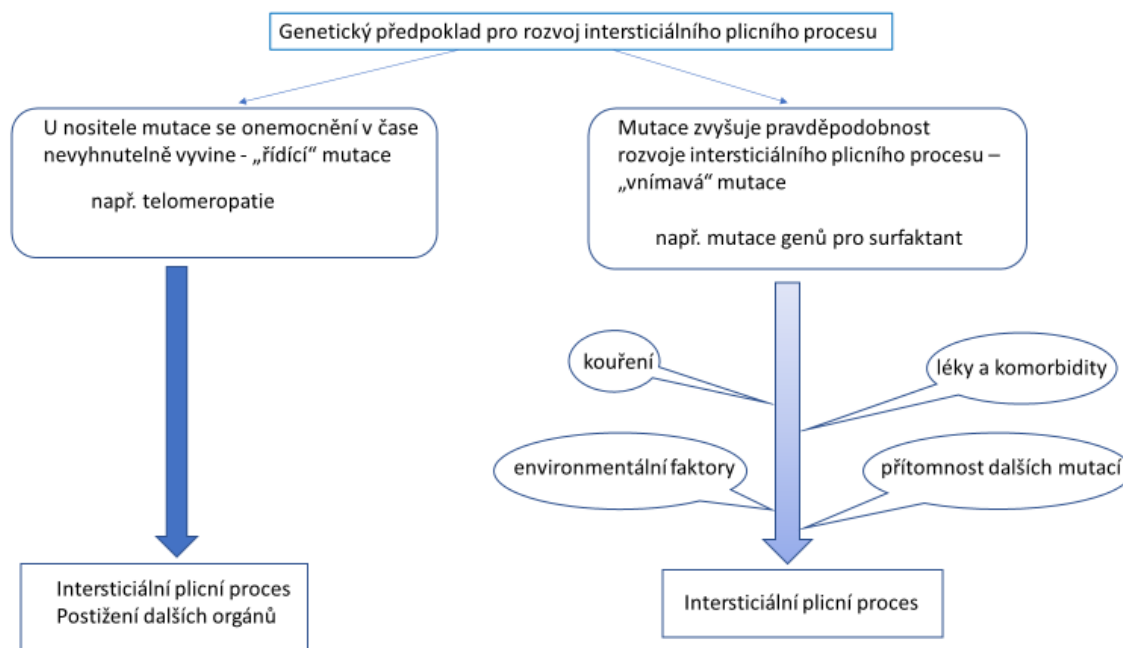
Původně byly FPF považovány za vzácné entity, postupem času se ale ukazuje, že minimálně u 10 % „sporadických“ idiopatických plicních fibróz (IPF) se jedná o hereditární stavy. FPF tak mohou tvořit 10-19,5 % všech případů intersticiálních plicních procesů. Nejčastější formou FPF je tak zvaný syndrom krátkých telomér (definováno jako délka teloméry <10 percentil), který je nalézán až u 15 % případů FPF (Kaur a kol., 2017; Kropski a kol., 2012).

Patogeneze FPF je několikastupňový proces, který shrnuje obrázek 1. Mutace konkrétních genů se pak mohou podílet na rozvoji fibrotického plicního postižení na podkladě různých mechanismů.

Některé mutace genů pro surfaktantové proteiny (genů *SFTBA1*, *SFTPA2* a *SFTPC*) vedou k nahromadění špatně sbalených proteinů v endoplazmatickém retikulu. Spouští se tzv. „*unfolded protein response*“, reakce buňky na stres endoplazmatického retikula, jejímž výsledkem může být v některých případech i apoptóza, nebo jsou aktivovány kaskády buněčné diferenciaci a postižená buňka získá fenotypové znaky buňky mesenchymální. Dojde k epitelu-mezenchymové transici se všemi jejími známými důsledky.

Telomeropatie jsou spojeny úzce s předčasným stárnutím a snížením schopnosti buněk vyrovnat se s opakovaným poškozením. Podobné mechanismy se mohou uplatňovat i u pacientů s mukociliární dysfunkcí v důsledku vysoké exprese genu pro mucin (*MUC5B*) nebo při poruše integrity epitelu v dýchacích cestách při aberantní expresi *DSP* (desmoplakinu). Aktivace remodelace plicní tkáně může vyústit až v její fibrotickou přestavbu (Kaur a kol., 2017).

Obrázek 1. Patogeneze familiárních plicních fibróz.



Tabulka 1. Familiární plicní fibróza (FPF) s rozvojem v dětském věku. Podle Borie a kol., 2019.

Onemocnění	Možná příčina	Projevy
Dyskeratosis congenita	Porucha stability telomer, defekt dyskerinu; X-vázaná nemoc (<i>DKC1</i>)	Mukokutánní triáda: - orální leukoplakie - dysplázie nehtů - nepravidelné retikulární pigmentace kůže - v druhé dekádě selhání kostní dřeně, plicní postižení často až po případné transplantaci kostní dřeně
Hoyeraad-Hreidarsonův syndrom	Výrazné zkrácení telomer (defekt <i>PARN</i> genu); X-vázaná nemoc	Intrauterinní retardace, mikrocefalus, opožděný vývoj, imunodeficit, selhání kostní dřeně
	Poruchy surfaktantu (<i>SFTPA1</i> , <i>SFTPA2</i> , <i>SFTPC</i>); autozomálně dominantní (13)	Syndrom dechové tísně (RDS) v dětství, rozvoj FPF před 45. rokem věku, v rodinné anamnéze bronchogenní karcinom
Syndrom mozek-plíce-štítná žláza	Mutace genu <i>NFKX2-1</i>	Syndrom dechové tísně novorozence, benigní chorea, hypotyreóza
Hereditární plicní alveolární proteinóza	Mutace methionyl-tRNA syntetázy (<i>MARS</i>). Deficit transkripčního faktoru <i>GATA2</i> . Autozomálně dominantní	Plicní alveolární proteinóza v dětství, jaterní steatóza, jaterní cirhóza. Plicní alveolární proteinóza v dětství, cytopenie, zvýšené riziko leukemií, imunologické defekty a plicní mykobakterióza (monoMAC syndrom).

Syndrom kombinované fibrózy a emfyzému (CPFE syndrom)	Genetická predispozice způsobená patogenními variantami genů <i>SFTPC</i> či <i>ABCA3</i> , telomeropatie	Kombinace plicní fibrózy a emfyzému
Acadianská varianta Fanconiho syndromu	Porucha genu <i>NDUFAF6</i> kódujícího proteiny komplexu dýchacího řetězce mitochondrie; autozomálně recesivní	Proximální renální tubulární acidóza, poruchy růstu, intersticiální plicní proces
STING (stimulator of interferon genes) asociovaná vaskulopatie	Porucha stimulatoru regulujícího syntézu interferonů (<i>TMEM173</i>); autozomálně dominantní	Autoinflamatorní syndrom s intersticiálním plicním postižením, horečky, alopecie, kožní vyrážka, vaskulitida
COPA (coatomer protein complex subunit alpha) syndrom	Porucha genů pro proteinový komplex řídící transport proteinů z Golgiho komplexu do endoplazmatického retikula; autozomálně dominantní	Autoinflamatorní a autoimunitní postižení, artritida, pozitivita autoprotilátek, nefritida, intersticiální plicní postižení, difuzní alveolární hemoragie

Tabulka 2. Klinické manifestace familární plicní fibrózy s projevy v dospělosti.

	Plicní projevy (100 %) Radiologické fenotypy dle HRCT	Jaterní projevy (32 %)	Hematologické projevy (20 %)
Manifestace	Obvyklá intersticiální pneumonie (UIP) Pravděpodobná UIP Neurčená fibróza Pleuro-parenchymální fibroelastóza Deskvamativní intersticiální pneumonie Nespecifická intersticiální pneumonie Hypersenzitivní pneumonie Rozsáhlé opacity mléčného skla Cysty Bronchiolitida	Jaterní cirhóza Venookluzivní choroba Steatóza	Myelodysplazie včetně excessu blastů Aplázie kostní dřeně Akutní myeloidní leukémie Izolovaná makrocytóza

HRCT – high resolution počítačová tomografie.

V souvislosti s FPF byly popsány patogenní varianty řady genů. U FPF nalézáme varianty genů, které jsou v populaci vzácné (alelické frekvence alel <0,1 % u tzv. genů velkého dopadu-major). Dědičnost FPF se řídí Mendelovými zákony (především autozomálně dominantní). Jak už ale bylo uvedeno výše, penetrance onemocnění je velice variabilní. Na rozdíl od vzácných variant genů s velkým dopadem mají běžné varianty menší účinek, ale jsou přítomny v populaci s vyšší frekvencí a celkově mohou přispět k většímu riziku rozvoje onemocnění – tyto varianty lze nalézt především u sporadických forem nemoci.

Genetické analýzy pacientů s FPF odhalily, že nemoc může být způsobena geny telomerázové katalytické aktivity (*TERT*-telomerase reverse transcriptase; *TERC*-telomerase RNA component); geny ovlivňující biogenezi telomeráz (*DKC1*-dyskerin; *PARN*-polyadenylation-specific ribonuclease deadenylation nuclease; *NAF1*-nuclear assembly factor 1 ribonucleoprotein) a geny, které mění telomery (*TINF2*-telomere-interacting factor 2; *RTEL1*-regulator of telomere-elongation helicase-1). Mutace spojené s FPF na počátku dospělosti se méně často nalézají v genech, které kódují surfaktantové proteiny (*SFTPA1*, *SFTPA2* a *SFTPC*). Byly také popsány vzácné bialelické varianty v genech kódujících surfaktant protein B (*SFTPB*) a v genu pro ATP-vázající kazetový protein (*ABCA3* – ATP-binding cassette subfamily A member). Celkem mutace v *SFTPC*, *SFTPA2*, *TERT* a *TERC* objasňují maximálně 20 % všech případů FPF. Byly však pozorovány i běžné varianty (frekvence alel v populaci nad 5 %) v genech spojených s rizikem FPF, nejčastěji byl pozorován jednonukleotidový polymorfismus (SNP) rs35705950 genu *MUC5B* (mucin 5B) (Armanious a kol., 2007; Tsakiri a kol., 2007; Fingerlin a kol., 2013; Roy a kol., 2014; Kropski a kol., 2012).

Specifická léčba FPF není známa. U pacientů s multiorgánovým postižením se nezdá setkáváme s postupnou manifestací obtíží, která může vést k selhání funkce postiženého orgánu před rozvojem intersticiálního plicního procesu. Např. u pacientů s defektem *GATA2* se může jednat o myelodysplastický syndrom nebo akutní leukémii, jejímž řešením může být transplantace krvetvorných buněk; u pacientů s Acadianskou variantou Fanconiho syndromu může jít o selhání ledvin s nutností jejich transplantace (Hartmannova a kol., 2016; Donadieu a kol., 2018). V těchto případech dochází k rozvoji intersticiálního plicního postižení po transplantaci, a to pak může být příčinou smrti postiženého jedince.

U COPA (coatamer protein complex subunit alpha) syndromu nebo STING (stimulator of interferon genes) syndromu je léčba symptomatická.

Poruchy surfaktantu, které vedou k rozvoji syndromu dechové tísně (RDS) v dětském věku, mohou odpovídat na léčbu systémovými kortikosteroidy, azitromycinem nebo hydroxychlorochinem (Kazzi a kol., 2018).

U dospělých pacientů je nezbytné vyloučit vliv faktorů, které mohou průběh manifestace onemocnění zhoršovat – samozřejmě by mělo být zanechání kouření, práce s fibrogenními prachy a vysazení potenciálně pneumotoxické medikace.

Pokud má FPF manifestaci familiární hypersenzitivní pneumonie a dominuje zánětlivý fenotyp s opacitami mléčného skla, může být kromě zamezení expozice vhodným léčebným opatřením systémová kortikoterapie.

Retrospektivní práce zahrnující pacienty s poruchami telomer ukazují, že podání azathioprinu a mykofenolátu může vést u této skupiny nemocných k akcentaci hematologických abnormalit a je dobré se jim vyhnout jak v posttransplantačních režimech (po transplantaci plic), tak nejspíše i v léčbě plicního postižení (připadalo by v úvahu u fenotypu nespecifické intersticiální pneumonie (NSIP) nebo hypersenzitivní pneumonie) (Silhan a kol., 2014).

U nemocných s fenotypem plicního postižení charakteru obvyklé intersticiální pneumonie (UIP), anebo s progresivní plicní fibrózou mohou být lékem volby antifibrotika, i když studie naznačují, že jejich efekt je ve srovnání se skupinou pacientů bez prokázané genetické abnormality horší. Studie srovnávající vývoj plicního postižení u nemocných s FPF léčených a neléčených antifibrotiky k dispozici není a jelikož minimálně pirfenidon je touto skupinou nemocných tolerován dobře, u nemocných s FPF a fenotypem plicního postižení UIP a u pacientů s progresivní plicní fibrózou léčbu lze léčbu antifibrotiky doporučit (Bennett a kol., 2019).

U nemocných s telomeropatiemi je předmětem klinických studií použití danazolu – data ukazují, že léčba danazolem vede ke stabilizaci plicních funkcí, prodloužení telomér a zlepšení hematologických abnormalit. Lék měl ve studii ale výrazné vedlejší účinky, zejména v oblasti jater, a vysoké riziko tromboembolické nemoci. Někteří autoři vidí potenciální využití danazolu zejména v předtransplantační přípravě pacientů s prokázaným syndromem krátkých telomér, a to kvůli výše zmíněnému vysokému riziku selhání funkce kostní dřeně při imunosupresivní léčbě po transplantaci plic (Mangaonkar a kol., 2018).

Genetické analýze se věnujeme u naší rodiny s familiární formou plicní fibrózy (FPF) neboli familiární intersticiální pneumonii s názvem: „Familiární idiopatická intersticiální pneumonie – případ jedné rodiny“ (Doubková a kol., 2013) a „A novel germline mutation of *SFTPA1* gene in familial interstitial pneumonia (Doubková a kol., 2019). Popisujeme zde novou patogenní variantu genu v *SFTPA1* u FPF. Viz kapitola 2.2.1.1. a 2.2.1.2.

Vzácný autosomálně recesivně dědičný syndrom zvaný Heřmanského-Pudlákův syndrom (HPS) je obsažen v publikaci: “Novel genetic variant of *HPS1* gene in Hermansky-Pudlak syndrome with fulminant progression of pulmonary fibrosis” (Doubková a kol., 2019), kde popisujeme případ pacientky s HPS s progresivní plicní fibrózou a novou patogenní variantou genu (složený heterozygot) pro *HPS1*. Viz kapitola 2.2.1.3.

Uvedené poznatky o FPF se pak staly podkladem pro práci „Familiární plicní fibróza – doporučené postupy pro diagnostiku a léčbu“ (Šterclová a kol., 2020).

2.2.1.1. Familiární idiopatická intersticiální pneumonie – případ jedné rodiny (Doubková M, Binková I, Skříčková J. Stud. Pneumol. Phtiseol. 2013; 73(5): 179-183)

179

STUD. PNEUMOL. PHTHISEOL., 73, 2013, č. 5, s. 179–183

Familiární idiopatická intersticiální pneumonie – případ jedné rodiny

M. Doubková, I. Binková, J. Skříčková

Klinika nemocí plicních a tuberkulózy, LF Masarykovy univerzity a FN Brno, pracoviště Bohunice

SUMMARY

Familial idiopathic interstitial pneumonia – a case of one family

Familial idiopathic interstitial pneumonia (IIP) is defined as disease observed in 2 or more members of the same family. The inheritance pattern of IIP is not clear, but it seems to be autosomal dominant with incomplete penetrance. The most frequent phenotype in familial IIP is idiopathic pulmonary fibrosis / usual interstitial pneumonia (IPF/UIP). Accurate epidemiological data are unavailable but the estimated prevalence of IIP is 0.5–3.7 % of all IPF cases. Presented are two IIP cases within one family (a mother and a son). Each patient had a different form, extent and outcome of IIP.

Keywords: familial idiopathic interstitial pneumonia, familial idiopathic pulmonary fibrosis, sporadic idiopathic pulmonary fibrosis, surfactant protein

SOUHRN

Familiární idiopatická intersticiální pneumonie (IIP) je definována jako onemocnění, které postihuje 2 nebo více členů téže rodiny a má klinické a histologické znaky intersticiální pneumonie. Způsob dědičnosti nemoci není plně rozpoznán, ale zdá se, že se jedná o autosomálně dominantní onemocnění s neúplnou penetrancí. Nejčastějším fenotypem u rodinného výskytu IIP je fenotyp IPF/UIP (idiopatická plicní fibróza obvyklého typu). Přesná prevalence familiární IIP není rovněž známa. Podle současných poznatků se odhaduje, že tvoří 0,5–3,7 % všech případů IPF. V naší práci popisujeme dva případy IIP – u matky a syna. Každý z nich má jinou formu a jiný rozsah intersticiální pneumonie.

Klíčová slova: familiární idiopatická intersticiální pneumonie, familiární idiopatická plicní fibróza, sporadická idiopatická plicní fibróza, surfaktant protein

ÚVOD

Idiopatické intersticiální pneumonie (IIP) patří do skupiny onemocnění zvaných difuzní parenchymatózní onemocnění plic nebo méně přesným názvem intersticiální plicní procesy. Je to heterogenní skupina převážně chronických chorob nenádorového původu, charakterizovaných různým stupněm zánětu a různým stupněm plicní fibrózy na úrovni plicního intersticia, alveolárních duktů, alveolů, plicních kapilár a respiračních bronchiolů [1,2]. Fibrotizující plicní nemoci jsou považovány za nemoci, v jejichž patogenезi hraje roli více genů. Hypotéza o rozvoji fibrotizujícího plicního procesu u náchylných jedinců po expozici nějakému spouštěcímu faktoru zevního prostředí je podpořena sledováním výskytu intersticiálních plicních procesů v rodinách [3]. Existuje několik podezření na genetický podklad fibrotizujících IIP: 1) rodinný výskyt, 2) výskyt familiární IIP spolu s výskytem ji-

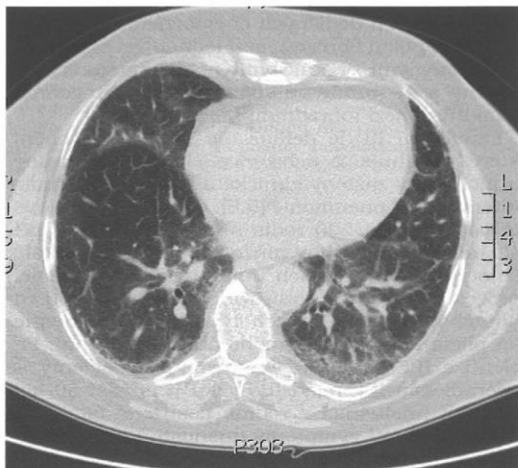
ných vzácných dědičných onemocnění, 3) různost postižení plicní fibrózou mezi jednotlivci exponovanými stejnými organickými nebo anorganickými prachy a 4) rozdíly ve vnímavosti k fibrogenním stimulům mezi inbredními kmeny myší [4].

Familiární IIP je definována jako onemocnění, které postihuje 2 nebo více členů téže rodiny, u nichž byly zjištěny klinické a histologické znaky intersticiální pneumonie [5,6]. Celkem bylo ve světě popsáno cca 200 rodin s familiární IIP. U příslušníků jedné rodiny může být přítomno několik fenotypů fibrotizujících intersticiálních plicních procesů. Nejčastěji pozorovaným fenotypem u rodinného výskytu IIP je fenotyp IPF/UIP (idiopatická plicní fibróza takzvaného obvyklého typu). Pacienti s IPF/UIP jsou ve srovnání s pacienty se sporadickou IPF mladšího věku (i mladší 50 let). Rodinní příslušníci v rodině postižené familiární IIP nemusí mít symptomy dušnosti a kašle vzhledem k časnému záchytu onemocnění.

POPIS PŘÍPADU

U dvou členů jedné rodiny byla zjištěna chronická IIP. Jednalo se o 66letou matku a 46letého syna. Matka byla bývalý kuřák a byla odeslána k plicnímu vyšetření pro dušnost při námaze a dráždivý kašel trvající několik měsíců. S ničím se do té doby neléčila. Pracovala v pohostinství. Fyzikálním vyšetřením auskultací byly slyšitelné oboustranné krepitace („*velcro rales*“ připodobňované rozepínání suchého zipu, jejichž podkladem je fibrotizující plicní proces) v dolních plicních třetinách. Nebyl přítomen fenotypický projev paličkovitých prstů s nehty tvaru hodinového sklíčka. Na zadopředním skiagramu hrudníku bylo popsáno difúzně oboustranné retikulonodulární zastínění. Plicním funkčním vyšetřením jsme zjistili lehkou restriktici se středně těžkou poruchou difuze a lehkou parciální respirační nedostatečností (TLC – celková kapacita plic byla 72 %, DLco – difúzní kapacita plic pro oxid uhelnatý byla 51 %, pO_2 – parciální tlak kyslíku byl 8,40 kPa). Autoprotilátky byly negativní. Bronchoskopický makroskopický nález byl normální. Cytologickým vyšetřením bronchoalveolární tekutiny získané bronchoalveolární laváží jsme zjistili leukocytární alveolitidu (makrofágy 79,7 – norma ≥ 80 %, neutrofilní granulocyty 8,3 – norma ≤ 3 %, eozinofilní granulocyty 6 % – norma $\leq 0,5$ %, lymfocyty 6 % – norma ≤ 15 %). Na HRCT hrudníku (*high resolution com-*

Obrázek 1: CT plic a mediastina a HRCT plic u 66leté pacientky naší rodiny. Je patrné výrazné zesílení interlobulárního a intralobulárního intersticia. Trakční bronchioloektazie a dorzobazálně minimálně voštiny. Difúzně opacitní mléčného skla.



puted tomography – výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností) byl popsán netypický nález pro UIP s převažujícími změnami typu opacit mléčného skla (*ground glass opacities*) (obrázek 1). Na základě nejednoznačného nálezu na HRCT hrudníku jsme indikovali histologickou verifikaci procesu cestou chirurgické plicní biopsie. Histologicky byla zjištěna UIP. I když byla u pacientky histologicky verifikována UIP, nebyl přítomen charakteristický HRCT nález UIP, a tudíž nebyla splněna dle současných platných kritérií diagnóza IPF. Pravděpodobně se tak jedná o variantu nespecifické intersticiální pneumonie (NSIP). Z tohoto důvodu byla pacientka léčena kombinací imunosupresiv. U matky byla zahájena v roce 2010 kombinovaná imunosuprese prednisonem + azathioprinem + N-acetylcysteinem. V současnosti je pacientka stabilizována a pokračujeme nadále v kombinované imunosupresi pro převažující změny typu opacit mléčného skla na HRCT hrudníku.

46letý syn nemocné byl odeslán k plicnímu vyšetření pro dušnost při větší námaze a dráždivý kašel v trvání 6 měsíců. Pacient byl nekuřák, řidič z povolání a nechoval žádná zvířata. Auskultací byly slyšitelné diskrétní krepitace oboustranně na plicních bazích. Inspekci jsme nezjistili přítomnost paličkovitých prstů. Autoprotilátky byly negativní. Na skiagramu hrudníku bylo popisováno bazálně retikulonodulární zastínění. Plicním funkčním vyšetřením jsme zjistili mírnou restriktivní ventilační poruchu (TLC – 68 %) s lehkou poruchou difuze (DLco – 65 %), bez respirační nedostatečnosti (pO_2 – 10,20 kPa). HRCT nález hrudníku byl hodnocen jako pravděpodobná NSIP (obrázek 2). Toto potvrdila i plicní biopsie se závěrem buněčná varianta NSIP. Bronchoskopie prokázala normální makroskopický nález. Cytologickým vyšetřením bronchoalveolární tekutiny získané bronchoalveolární laváží jsme zjistili normální diferenciální rozpočet (makrofágy 98 %, neutrofilní granulocyty 0,7 %, eozinofilní granulocyty 0 %, lymfocyty 1,3 %). U syna se jednalo o méně pokročilý intersticiální plicní proces, s mírnou progresí na HRCT hrudníku během našeho sledování. Nemocný byl léčen zprvu kombinací prednison + azathioprin, v současnosti užívá jen prednison.

Vyšetřili jsme i ostatní příbuzné a nebylo zjištěno v současné době plicní postižení dalších členů rodiny. Krev od všech členů rodiny byla odebrána a bude uchovávána pro plánovanou mutační analýzu DNA.

DISKUZE

IIP jsou poměrně velkou skupinou nemocí patřících do intersticiálních plicních procesů, charakterizovaných složkou zánětu a plicní fibrózy. Představují heterogenní skupinu onemocnění, která se liší klinikou, radiologickými, histopatologickými nálezy, léčbou i prognózou. Nejzávažnější jednot-

kou z této skupiny onemocnění se jeví IPF/UIP. IPF je vzácné a progredující onemocnění, které většinou končí fatálně [1]. Současná definice IPF popisuje jako specifickou formu chronické progredující fibrotizující intersticiální pneumonie nejasné etiologie, objevující se primárně u dospělých jedinců, postihující pouze plicě a spojené s histopatologickým a/nebo radiologickým obrazem obvyklé intersticiální pneumonie (UIP). Diagnóza IPF vyžaduje vyloučení jiných forem intersticiálních pneumonií, zvláště ostatní idiopatické intersticiální pneumonie (IIP), systémové nemoci pojiva a intersticiální plicní procesy (IPP) spojené s expozicí vlivům prostředí [1,2,3].

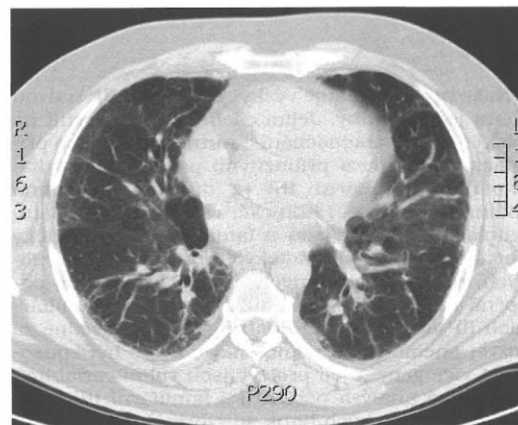
Ve světové literatuře existuje několik prací popisujících familiární IIP [7,8,9,10,11,12,13,14,15]. Přesná prevalence familiární IIP není známa a odhaduje se, že podle současných poznatků tvoří 0,5–3,7 % ze všech nemocných s IPF [14,16,17]. Způsob dědičnosti je pravděpodobně autosomálně dominantní s neúplnou penetrancí [5,6,13,18]. Autosomálně recesivní typ dědičnosti byl popsán jen v práci Marshalla a kol. [14]. U FIIP včetně familiární IPF je začátek nemoci posunut do mladšího věku, nejsou výjimkou pacienti mladší 50 let, na rozdíl od sporadické formy IPF, která se diagnostikuje obvykle ve středním a vyšším věku. Studie Leea a kol. srovnala klinické projevy (věk, pohlaví, kouření, symptomy, fyzikální nálezy paličkových prstů a krepitací) a přežití u nemocných se sporadickou a familiární IPF a nezjistila podstatného rozdílu mezi oběma skupinami [5,14]. Lee a kol. rovněž zjistili, že u pacientů s familiární IPF byl nižší výskyt voštinovité plicve ve srovnání s nemocnými s ne familiární IPF. Nishiyama a kol. porovnali HRCT nálezy u nemocných s familiární IPF a sporadickou IPF. Zjistili sice, že u nemocných s familiární IPF byly nálezy voštinovité plicve méně pokročilé, ale v průběhu sledování docházelo k progresi voštiny [19]. Bitterman a kol. vyšetřili přímé příbuzné pacientů s familiární IIP a zjistili, že mají přítomen alveolární zánět podobný nálezům nemocných s familiární IIP, ale nejví poruchu plicních funkčních parametrů nebo patologický nálezy na zadopředním snímku hrudníku. Tito pacienti nejví progresi v plicní fibrózu během 2–4 let sledování [10]. Rosas a kol. zkoumali členy rodiny pacientů s familiární IIP a zjistili, že u 22 % asymptomatických členů rodiny byl zjištěn patologický nálezy na zadopředním snímku hrudníku a HRCT hrudníku. Zvláště u kuřáků byl nálezy familiární IIP častější. Toto bylo doloženo i v jiných studiích a vyvolává to domněnku, že kouření a životní prostředí má vliv na vývoj onemocnění u pacienta s genetickou predispozicí. Proto by měli být pacienti s familiární IIP ale i asymptomatické příbuzné upozorněni na vztah kouření a vzniku plicní fibrózy. Jako vhodný diagnostický postup u asymptomatických členů rodiny, ve které se vyskytuje familiární IIP, je provedení plicního funkčního vyšetření, zadopředního snímku hrudníku a HRCT

hrudníku, a to zejména u rizikové skupiny kuřáků [20].

Histopatologické nálezy u pacientů (členů jedné rodiny) s familiární IIP jsou heterogenní a vliv na typ IIP má vzájemné působení genetické predispozice a zevního prostředí. Ve studii Steele a kol. bylo zjištěno hned několik histopatologických subtypů IIP (běžná intersticiální pneumonie, kryptogenní organizující, nespecifická intersticiální pneumonie) u členů jedné rodiny [5]. V rodinách se vyskytují tyto kombinace IIP: UIP a NSIP; UIP, NSIP a COP; UIP, NSIP a RB-ILD; UIP and neklasifikovatelná intersticiální plicní fibróza; nebo UIP a hypersenzitivní pneumonie. Ačkoliv klinické a morfologické znaky různých histologických typů IIP se odlišují od nejzávažnější jednotky UIP, jedna domněnka naznačuje, že tyto patologické jednotky reprezentují jen různé stupeň postižení při jednom procesu, jehož konečnou formou je právě UIP. Tuto hypotézu dokládají nálezy UIP a NSIP u téhož nemocného a podobnost v genové expresi mezi UIP a NSIP [21].

Genetické analýzy pacientů s familiární IIP odhalily, že nemoc může být způsobena mutací genů souvisejících s telomerami – TERT (*telomerase reverse transcriptase*) a TERC (*telomerase RNA component*) – a genů SFTPC (surfaktant proteinu C) a SFTPA2 (surfaktant proteinu A). Mutace genů TERT a TERC vedou k signifikantně kratší délce telomer oproti kontrolní skupině [22,23]. Cronkhite a kol. a Leon a kol. zjistili analýzou leukocytů periferní krve, že kratší délka telomer má poten-

Obrázek 2: CT plic a mediastina a HRCT plic u 46letého pacienta z naší rodiny. Intersticiální kresba zhrubělá a zahuštěná, bez voštiny. Přítomny opacities mléčného skla. Bez zvětšených mediastinálních uzlin.



ciální vliv na vznik familiární IIP. Nemoc ale vzniká i za absence mutací obou komponent telomerázy (role jiných genů, epigenetická dědičnost) [24,25]. Co se surfaktant proteinů (SP) týká, jsou známy 4 a dělí se do dvou skupin: hydrofilní proteiny SP-A a SP-D a hydrofobní proteiny SP-B a C. SP-A, SP-B a SP-D jsou syntetizovány v alveolárních epitelálních buňkách (pneumocytech I. a II. typu), zatímco SP-C je produkován pouze v pneumocytech II. typu. Gen SP-C je lokalizován na 8. chromozomu. Mutace genu pro SP-C vede k poškození respiračního epitelu s respiračním selháním a rizikem vzniku intersticiálního plicního procesu [17, 26,27,28,29,30,31]. SP může mít význam ve vzniku jak familiární IIP, tak i sporadické IPF [32]: ovlivněním funkce SP-C, popřípadě kumulací pro-surfaktant proteinu C. Mutace telomerázových genů byly zjištěny zatím jen u části nemocných s familiární IIP: 8–15 % [22,23]. Navíc byly detekovány i u pacientů s aplastickou anémií, kongenitální dyskeratózou, kryptogenní jaterní cirhózou a v menší míře i u sporadické IPF a jiných nemocí. Toto platí i pro mutace SP-C, které byly popsány i u jiných intersticiálních plicních nemocí, respiračního selhání [33,34,35]. Tredano a kol. zjistili mutaci genu pro SP-C, která se u dvou pacientů manifestovala plicní alveolární proteinózou, a nikoliv plicní fibrózou, což vede k domněnce, že mutace genu pro SP-C může mít variabilní fenotyp. U většiny rodin ale stále není genetická podstata nemoci poznána [36]. Zvažuje se například i role mutací v genu pro ATP-vázající kazetový protein ABCA3 (*ATP-binding cassette subfamily A member 3*) [37]. Tento gen kóduje protein, který se vyskytuje v membráně ohraničující lamelární tělíska v pneumocytech II. typu a má pravděpodobně úlohu v transportu lipidů a i v metabolismu surfaktantu.

Strategie léčby pacientů s familiárními IIP je tožná s léčbou sporadických případů IIP. Terapie se odvíjí od typu IIP. Plicní transplantace patří mezi léčebné možnosti.

ZÁVĚR

Naše práce popisuje výskyt familiární IIP u dvou členů jedné rodiny. Jejím cílem bylo upozornit na výskyt tohoto onemocnění a nutnost pátrat po příznacích IIP i mezi příbuznými pacientů. Pro diagnostiku familiární IIP je důležitá podrobná rodinná anamnéza. Klinické, radiologické a histopatologické nálezy jsou u familiární IIP prakticky neodlišitelné od sporadických forem. Hledání nových, dosud nepopsaných mutací je náročné odborně i ekonomicky. Bohužel u většiny familiárních IIP neznáme kandidátní geny zodpovědné za rozvoj onemocnění, nemoc navíc může být způsobena více geny a její projevy jsou velmi variabilní. Genetická analýza pacientů s familiární IIP a zakládání genetických bank se vzorky krve pacientů

s touto nemocí pomůže do budoucna v poznání dědičnosti tohoto onemocnění.

LITERATURA

1. Raghu G et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183:788–824.
2. Vašáková M, Šterclová M. Idiopatická plicní fibróza – doporučený postup pro diagnózu, léčbu a sledování. *Studia pneumologica et phthiseologica* 2012; 72:177–183.
3. Vašáková M, Polák J, Matěj R. Intersticiální plicní procesy. Od etiopatogeneze přes radiologický obraz k histopatologické diagnóze. Praha: Maxdorf Jessenius 2011; s. 410.
4. Spagnolo P, Luppi F, Richeldi L. Genetic testing in diffuse parenchymal lung disease. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 7:79.
5. Steele MP, Speer MC, Loyd JE et al. Clinical and pathologic feature of familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:1146–1152.
6. Lee HL, Ryu JH, Wittmer MH et al. Familial idiopathic pulmonary fibrosis: clinical features and outcome. *Chest* 2005; 127:2034–2041.
7. Adelman AG, Chertkow G, Hayton RC. Familial fibrocystic pulmonary dysplasia: a detailed family study. *Can Med Assoc J* 1966; 95:603–610.
8. Bonanni PP, Frymoyer JW, Jacox RF. A family study of idiopathic pulmonary fibrosis: a possible dysproteinemic and genetically determined disease. *Am J Med* 1965; 39: 411–421.
9. Javaheri S, Lederer DH, Pella JA. Idiopathic pulmonary fibrosis in monozygotic twins: the importance of genetic predisposition. *Chest* 1980; 78:591–594.
10. Bitterman PB, Rennard SI, Keogh BA et al. Familial idiopathic pulmonary fibrosis. Evidence of lung inflammation in unaffected family members. *N Engl J Med* 1986; 314:1343–1347.
11. Donohue WL, Laski B, Uchida I et al. Familial fibrocystic pulmonary dysplasia and its relation to the hamman-rich syndrome. *Pediatrics* 1959; 24:786–813.
12. Hewitt CJ, Hull D, Keeling JW. Fibrosing alveolitis in infancy and childhood. *Arch Dis Child* 1977; 52:22–37.
13. Musk AW, Zilko PJ, Manners P. Genetic studies in familial fibrosing alveolitis. Possible linkage with immunoglobulin allotypes (Gm). *Chest* 1986; 89:206–210.
14. Marshall RP, Puddicombe A, Cookson WO et al. Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the United Kingdom. *Thorax* 2000; 55:143–146.
15. Riedler J, Golser A, Hutteger I. Fibrosing alveolitis in an infant. *Eur Respir J* 1992; 5:359–361.
16. Hodgson U, Laitinen T, Tukiainen P. Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax* 2002; 57:338–342.
17. Moorsel CHM, Oosterhout MFM, Barlo NP et al. Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182:1419–1425.
18. Marney A, Lane KB, Phillips JA et al. Idiopathic pulmonary fibrosis can be an autosomal dominant trait in some families. *Chest* 2001; 120 (Suppl):56S.
19. Nishiyama O, Taniguchi H, Kondoh Y et al. Familial idiopathic pulmonary fibrosis: serial high resolution computed tomography findings in 9 patient. *J Comput Assist Tomogr* 2004; 28:443–448.
20. Rosas IO, Ren P, Avila NA et al. Early interstitial lung disease in familial pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:698–705.
21. Yang IV, Burch LH, Steele MP et al. Gene expression profiling of familial and sporadic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:45–54.

22. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ et al. Adult - onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:7552-7557.
23. Armanios MY, Chen JJ-L, Cogan JD et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2007; 356:1317-1326.
24. Cronkhite, JT, Xing Ch, Raghu G et al. Telomere shortening in familial and sporadic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178:729-737.
25. Leon AD, Cronkhite JT, Katzenstein ALA et al. Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (TERT) mutations. *PloS One* 2010; 5: e10680.
26. Amin RS, Wert SE, Baughman RP. Surfactant protein deficiency in familial interstitial lung disease. *J Pediatr* 2001; 139:85-92.
27. Nogee LM, Dunbar AE, Wert SE et al. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med* 2001; 344:573-579.
28. Thomas AQ, Lane K, Phillips J et al. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one's kindred. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1322-1328.
29. Whitsett JA. Genetic basis of familial interstitial lung disease: misfolding or fiction of surfaktant protein C? *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1201-1202.
30. Chibbar R, Gjevre JA, Shih F et al. Familial interstitial pulmonary fibrosis: a large family with atypical clinical features. *Can Respir J* 2010; 17:269-274.
31. Keller A, Stenhilber W, Schafer K et al. The C-terminal domain of the pulmonary surfactant protein C precursor contains signals for intracellular targeting. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6:601-608.
32. Selman M, Lin HM, Montano M et al. Surfactant protein A and B genetic variants predispose to idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet* 2003; 113:542-550.
33. Garcia CK, Wright WE, Snay JW. Human diseases of telomerase dysfunction: insights into tissue aging. *Nucleic Acids Research* 2007; 35:7406-7416.
34. Guillot L, Epaud R, Thouvenin G et al. Next surfactant protein C gene mutations associated with diffuse lung disease. *J Med Genet* 2009; 46:490-494.
35. Chibbar R, Shih F, Baga M et al. Nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia with mutation in surfactant protein C in familial pulmonary fibrosis. *Modern Pathology* 2004; 17:973-980.
36. Tredano M, Griese M, Brasch F et al. Mutation of SFTPC in infantile pulmonary alveolar proteinosis with or without fibrosing lung disease. *Am J Med Genet A* 2004; 126A: 18-26.
37. Brasch F, Schimanski S, Mühlfeld C et al. Alternation of the pulmonary surfactant system in full-term infants with hereditary ABCA3 deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:571-580.

Došlo: 20. 2. 2013

Adresa:
MUDr. Martina Doubková
Klinika nemocí plicních a tuberkulózy,
LF MU a FN
Jihlavská 20
625 00 Brno
Česká republika
e-mail: doubkovamartina@seznam.cz

2.2.1.2. A novel germline mutation of *SFTPA1* gene in familial interstitial pneumonia (Doubková M, Kozubík KS, Radová L, Pešová M, Trizuljak J, Pál K, Svobodová K, Réblová K, Svozilová H, Vrzalová Z, Pospíšilová Š, Doubek M. *Hum Genom Var.* 2019; 6: 12)

Doubková et al. *Human Genome Variation* (2019)6:12
<https://doi.org/10.1038/s41439-019-0044-z>

Human Genome Variation

ARTICLE

Open Access

A novel germline mutation of the *SFTPA1* gene in familial interstitial pneumonia

Martina Doubková¹, Kateřina Staňo Kozubík^{2,3}, Lenka Radová², Michaela Pešová², Jakub Trizuljak^{2,3}, Karol Pál², Klára Svobodová², Kamila Réblová², Hana Svozilová^{2,3}, Zuzana Vrzalová^{2,3}, Šárka Pospíšilová^{2,3} and Michael Doubek^{2,3}

Abstract

Different genes related to alveolar stability have been associated with familial interstitial pneumonia (FIP). Here, we report a novel, rare *SFTPA1* variant in a family with idiopathic interstitial pneumonia (IIP). We performed whole-exome sequencing on germline DNA samples from four members of one family; three of them showed signs of pulmonary fibrosis (idiopathic interstitial pneumonia) with autosomal-dominant inheritance. A heterozygous single nucleotide variant c.532 G > A in the *SFTPA1* gene has been identified. This variant encodes the substitution p.(Val178Met), localized within the carbohydrate recognition domain of surfactant protein A and segregates with the genes causing idiopathic interstitial pneumonia. This rare variant has not been previously reported. We also analyzed the detected sequence variant in the protein structure *in silico*. The replacement of valine by the larger methionine inside the protein may cause a disruption in the protein structure. The c.532 G > A variant was further validated using Sanger sequencing of the amplicons, confirming the diagnosis in all symptomatic family members. Moreover, this variant was also found by Sanger sequencing in one other symptomatic family member and one young asymptomatic family member. The autosomal-dominant inheritance, the family history of IIP, and the evidence of a mutation occurring in part of the *SFTPA1* gene all suggest a novel variant that causes FIP.

Introduction

Familial interstitial pneumonia (FIP) is defined as idiopathic interstitial pneumonia (IIP) and affects two or more first-degree relatives who have been diagnosed with characteristics of IIP¹. IIP belongs to a group of interstitial lung diseases (ILDs). ILDs are a heterogeneous group of predominantly chronic diseases characterized by various degrees of inflammation and pulmonary fibrosis at the level of the interstitium, alveolar ducts, alveoli, pulmonary capillaries and respiratory bronchioles².

There is evidence that the development of pulmonary fibrosis is genetically determined, and genetic testing is

considered for IIP cases with (1) familial clustering of IIP; (2) IIP associated with other inherited disorders; or (3) when there is significant variability in the development of pulmonary fibrosis among individuals exposed to a dusty environment³. Moreover, several phenotypes of fibrotic interstitial lung processes may be present in members of one family. Idiopathic pulmonary fibrosis/usual idiopathic pneumonia (IPF/UIP) is the most frequently observed phenotype in the familial occurrence of IIP⁴. There are no differences in clinical, radiologic, or histological features between familial IPF and nonfamilial IPF cases⁵.

In FIP, many genes may be pathogenic. FIP risk factor genes include telomerase catalytic activity genes (*TERT* – telomerase reverse transcriptase; *TERC* – telomerase RNA component), genes affecting telomerase biogenesis (*DKC1* – dyskerin; *PARN* – polyadenylation-specific ribonuclease deadenylation nuclease; *NAF1* – nuclear assembly factor 1 ribonucleoprotein) and genes that alter telomeres (*TINF2* – telomere-interacting factor 2;

Correspondence: Michael Doubek (doubekmichael@fnbrno.cz)

¹Department of Pneumology and Phthisiology, University Hospital and Faculty of Medicine, Brno, Czech Republic

²Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article.

These authors contributed equally: Martina Doubková and Kateřina Staňo Kozubík.

© The Author(s) 2019



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Official journal of the Japan Society of Human Genetics

RTEL1 – regulator of telomere-elongation helicase-1). Mutations associated with adult-onset FIP are also rarely found in genes that encode surfactant proteins, such as the heterozygous mutations of surfactant proteins A and C (*SFTPA1*, *SFTPA2*, and *SFTPC*). Rare biallelic variants in the genes encoding surfactant protein B (*SFTPB*) and branched-chain amino acid aminotransferase (*BCA3*) have also been described. Altogether, mutations in *SFTPC*, *SFTPA2*, *TERT*, and *TERC* clarify a maximum of 20% of all FIP cases^{6–17}. However, common variants (an allele frequency in the population above 5%) in genes associated with a risk of FIP and IPF have been observed. Most often, the single nucleotide polymorphism (SNP) rs35705950 of the *MUC5B* gene has been strongly associated with both FIP and IPF across multiple different cohorts^{18,19}.

Here, we present the FIP case in which we have revealed a novel germline pathogenic variant in the *SFTPA1* gene.

Materials and Methods

Subjects

The proband

Figure 1 (II-1) was a male nonsmoker who was referred to the Department of Pneumology and Phtiseology, University Hospital, Brno, Czech Republic because of IIP at the age of 46 years. The diagnosis of IIP was based on standard criteria². The proband presented with dyspnea and a dry cough. Lung function testing showed a restrictive syndrome with a mild reduction in diffuse lung capacity. High-resolution computed tomography (HRCT)

of the patient’s chest showed interlobular septal thickening and ground glass opacities, especially in the lower lung areas (Fig. 2a). Video-assisted thoracoscopic (VATS) lung biopsy revealed pulmonary fibrosis with a nonspecific interstitial pneumonia pattern. He died of respiratory failure due to acute exacerbation of pulmonary fibrosis 11 years after diagnosis.

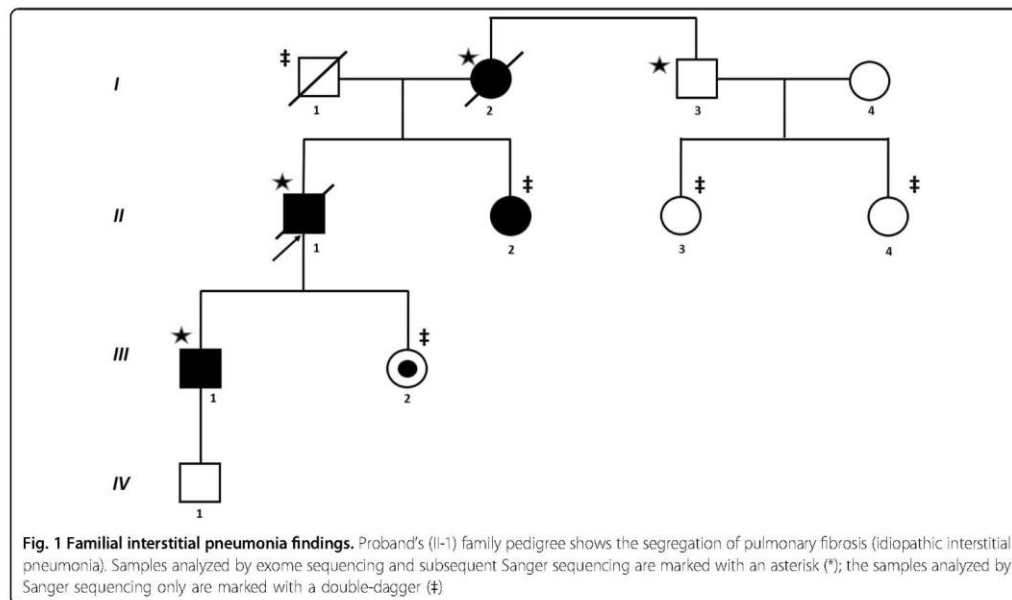
A detailed family history revealed that several of the patient’s family members had pulmonary fibrosis or interstitial lung involvement. The proband’s mother (I-2), a nonsmoker, died of respiratory failure at the age of 73 years. She was diagnosed with IIP seven years ago. HRCT of the thorax initially showed predominant ground glass opacities, inter- and intralobular septal thickening and bronchiectasis that did not correspond with the possible, typical interstitial pneumonia (Fig. 2b). However, a VATS lung biopsy and histological examination revealed a pattern of typical interstitial pneumonia. The clinical course gradually deteriorated over time despite therapy.

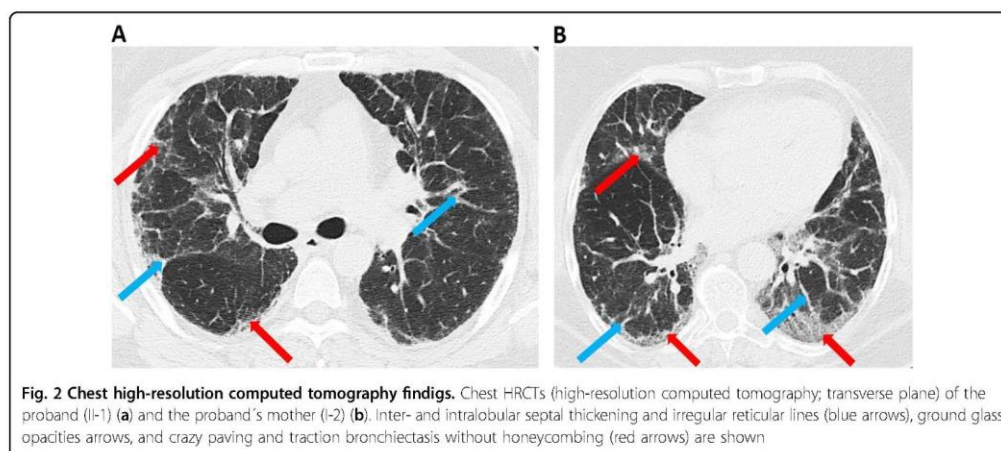
The proband’s sister

(II-2), a nonsmoker with digital clubbing, developed dyspnea at the age of 44 years. An HRCT of her thorax showed ventral and dorsobasal subpleural interlobular septal thickening.

The proband’s son

(III-1), a nonsmoker, had suffered from shortness of breath during exercise since the age of 25. He also developed digital clubbing. An HRCT of his thorax





revealed discrete nonspecific ground glass opacities in the upper and lower right lobes.

The proband's daughter

(III-2), a nonsmoker, was asymptomatic.

All results of the clinical and radiology examinations, functional tests and treatment of family members with pulmonary symptoms are summarized in Supplemental Table S1.

The pedigree analysis (Fig. 1) indicates an autosomal-dominant mode of inheritance.

IIP was therefore suspected, and diagnostics were extended by genetic testing of the family members, who gave written informed consent according to the Declaration of Helsinki.

Mutational screening

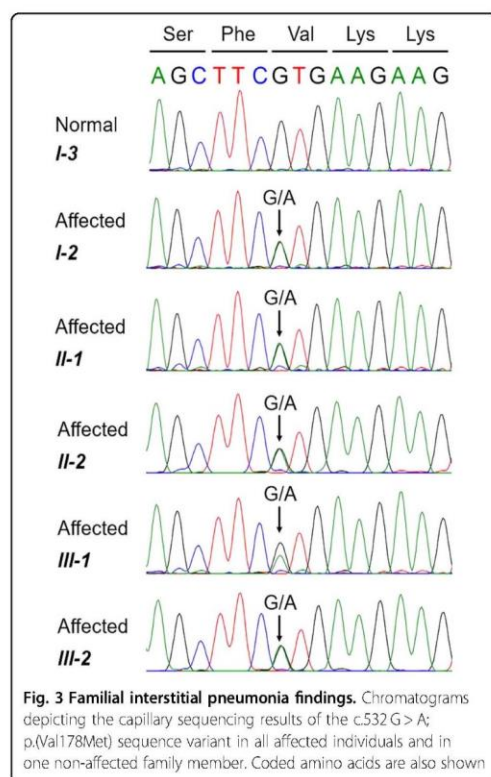
Blood samples from nine family members were collected and processed for genomic DNA isolation using the MagCore® Genomic DNA Whole Blood Kit (RBC Bioscience, USA). We performed whole-exome sequencing (WES) on samples from four family members (I-2, I-3, II-1, and III-1). Whole-exome libraries were prepared using the Kapa Hyper Prep Kit (Roche, USA) according to the protocol for NimbleGen SeqCap EZ Exome v3 (Roche, USA). Paired-end 2 × 75 bp sequencing was performed on an Illumina NextSeq 500 sequencer (Illumina Inc., USA). The raw sequencing reads were aligned to the GRCh37 human reference genome using the BWA mem algorithm, version 0.7.15. PCR duplicates were identified with the MarkDuplicates tool from Picard version 2.9.2. GATK HaplotypeCaller, version 3.7, was used to detect germline single nucleotide variants (SNV) and indels. Obtained variants/indels have been annotated using Annovar program version (2018Apr16).

On the basis of the current knowledge, we have chosen 30 candidate genes previously associated with IPF: *TERC*, *TERT*, *SFTPC*, *SFTPA1*, *SFTPA2*, *MUC5B*, *MUC5C*, *RTEL1*, *PARN*, *ABCA3*, *DKC1*, *TINF2*, *IL1RN*, *IL8*, *FAM13A*, *TLR3*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*, *DSP*, *OBFC1*, *MUC2*, *TOLLIP*, *ATP11A*, *MDGA2*, *MAPT*, *SPPL2C*, *DPP9*, *TGFB1*, *NAF1*, and *OBFC1*⁷⁻¹⁷. We then looked more deeply into the exonic variants of these genes.

Results

The analysis revealed a novel variation c.532 G > A in exon 6 of the *SFTPA1* gene (reference sequence: NM_005411.4), located within the carbohydrate recognition domain of surfactant protein A. The variant was found to be heterozygous in three affected family members (I-2, II-1, III-1) with IIP but was absent in the healthy individual I-3 (Fig. 1). The coverage range of c.532 G > A was 66–126 in all affected samples, and the variant allele frequency range was 41.41%–59.09%. This identified variant (c.532 G > A) has not been described previously and is absent in the ExAC, 1000 genomes, ESP (exome sequencing projects) 6500, KAVIAR, gnomAD, and HGMD databases^{20,21}.

The c.532 G > A variant was further validated using PCR and Sanger sequencing of the amplicons, confirming the diagnosis in all affected family members (I-2, II-1, and III-1). Due to the similarity of the *SFTPA1* and *SFTPA2* genes, we designed a specific primer set corresponding to the differences in the nucleotide sequence (forward primer: 5'-TGGTCAGTGGCCTGACCC-3' and reverse primer: 5'-AGAGTCAGGGCCCCATCAGA-3'). PCR was performed with an annealing temperature of 60 °C using Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs Inc., England) according to the manufacturer's protocol. PCR products were purified using a Qiaquick PCR



purification kit (QIAGEN, Germany). Capillary sequencing was performed using BigDye-terminator chemistry on a 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). The analysis showed that the variant c.532 G > A was heterozygous in the I-2, II-1, II-2 and III-1 family members (Fig. 3). Subsequently, PCR and Sanger sequencing of c.532 G > A was performed in the other family members (I-1, II-2, II-3, II-4, and III-2). Moreover, the c.532 G > A heterozygous variant was found in two additional family members: II-2 with disease symptoms and III-2, the young but still asymptomatic family member.

In silico analysis

Currently, there is no evidence for any known functional impacts of the c.532 G > A; p.Val178Met variant in the *SFPTA1* gene, which encodes the missense substitution valine to methionine in the α -helix (the carbohydrate recognition domain of surfactant protein A1). Valine178 is a highly conserved amino acid and is found in up to 11 frog species. We performed an assessment of the severity of the identified variant using *in silico* prediction analysis: the Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT), Polymorphism Phenotyping v2 (Poly-Phen-2), MutationTaster, Align

GVGD and CADD_phred programs (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.html; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>; <http://www.mutationtaster.org/>; http://agvgd.hci.utah.edu/agvgd_input.php)²². According to SIFT, this variant with a score of 0.01 was “deleterious” (the score of predicted damage was <0.05). The Poly-Phen-2 program evaluated p.Val178Met as “probably damaging” with a score of 1,0 (a maximum score). On the other hand, MutationTaster predicted this variant as a “polymorphism” with a p-value of 1 (score of predicted damage is <0.09), and the Align GVG (Grantham Variation and Grantham Deviation) defined “the lowest risk” for the prediction of missense substitutions with the grade C0 (C0 is the first of a total of seven grades). However, the scaled CADD_phred score was calculated as 16.72. This result of scaled transformation was assigned to the top 1% of single nucleotide variants and may predict a potentially pathogenic variant.

We therefore analyzed the c.532 G > A; p.Val178Met variant effects via protein structure modeling. Currently, there is no available crystal structure of this human protein, so we used the homolog protein structure of porcine surfactant protein D neck and carbohydrate recognition domains complexed with mannose (PDB code 4DN8), which shows 43% sequence homology with the human protein. In the homology model, valine178 is positioned in the α -helix, which is buried inside the protein. The replacement of this valine (its volume is 140.0 Å³)²³ by larger methionine (its volume is 162.9 Å³) will probably cause a disruption of the protein structure (supplemental Figure S1).

Discussion

Unfortunately, we do not have accurate FIP prevalence and incidence data. However, some studies estimate that the incidence of FIP is approximately 2-10% of all IIP cases^{1,3,8,12}. The inheritance of FIP is most commonly autosomal-dominant with incomplete penetrance^{4,5,19,24–26}. Autosomal-recessive types of inheritance have rarely been described²⁷. Our case shows signs of an autosomal-dominant inheritance.

Both familial and sporadic cases of pulmonary fibrosis are not clinically or histologically recognizable, although familial cases can be diagnosed in younger individuals³. Rosas et al.²⁸ determined the clinical, radiographic, and histological features of asymptomatic IILDs in the relatives of patients with FIP. Histopathological findings in patients with FIP are heterogeneous²⁹. Steele et al.⁴ described several histopathological subtypes of IIP found in members of one family. Our case also shows different histological, clinical and radiological findings in affected individuals.

FIP is caused mainly by rare pathogenic gene variants (with an allele frequency in the population of less than 0.1%)³⁰. Familial studies have found FIP-associated genes influencing alveolar stability: *SFTPA1*¹⁵, *SFTPA2*¹⁴,

and *SFTPC*^{30–32} *ABCA3* (ATP-binding cassette - type 3)³² genes related to telomerases, including *TERT*²⁹, and *TERC*^{6,29} *DKC1* (dyskeratin)^{8,29} *TINF2*^{7,9,29} or *RTEL1*^{10,11,29,33}. On the other hand, common variants are also observed in FIP; most often, the variant rs35705950 is located in the promoter region of the *MUC5B* gene^{29,34}.

Surfactant proteins (SPs) are divided into hydrophilic (SP-A and SP-D) and hydrophobic (SP-B and SP-C) categories. SP-A, SP-B, SP-C and SP-D are synthesized by type II alveolar epithelial cells. SP-A and SP-D play roles in lung defense, and SP-B and SP-C ensure proper surfactant function^{35,36}. The main protein of pulmonary surfactant is SP-A³⁷.

The two closely related genes, *SFTPA1* and *SFTPA2*, are located near *SFTPD* on chromosome 10q22.3 and encode SP-A. The nucleotide sequence of the *SFTPA1* gene is 70% identical to that of *SFTPA2*. The pathogenic variants of *SFTPA1* and *SFTPA2* can cause FIP and pulmonary adenocarcinoma. All pathogenic heterozygous mutations in the *SFTPA1* and *SFTPA2* genes are missense and lead to a decreased secretion of mature protein by alveolar cells^{15,38–40}.

In our case, the novel single nucleotide variant c.532 G > A was detected in the *SFTPA1* gene and encodes a p.Val178Met substitution.

To date, 5 missense/nonsense *SFTPA1* variants have been identified (<https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=SFTPA1>; 09 AUG 2018)^{15,20,41}. Nathan et al. described in detail a molecular defect in *SFTPA1* in FIP¹⁵.

Unfortunately, there is no consensus to determine which IPF patient could benefit from genetic testing. The international guidelines for IPF did not recommend genetic testing⁴², and genetic testing is not even mentioned in the guidelines⁴³. On the other hand, the international guidelines for IIP published in 2013 propose searching for genetic abnormalities in patients with FIP⁴⁴. As proposed by Kropski et al.⁴⁵, genetic testing is not recommended for every ILD patient. Genetic counseling should be offered to patients with FIP, to patients with IIP in the context of rare inherited disorders, to individuals with disease onset before the age of 18 years, or to patients with significant variability in the development of pulmonary fibrosis after exposure to a dusty environment^{3,45}. For asymptomatic patients (similar to our patient III-2), a chest HRCT is recommended at age 40 or 10 years before the age of disease onset in the proband. If signs of ILD are not present, an HRCT scan should be repeated every 5 years³⁵.

In conclusion, we have described a novel *SFTPA1* heterozygous variant in family members with IIP. Such findings are of the utmost importance, and an early FIP diagnosis for the patient's family members will allow for

effective therapies, including early lung transplantation or treatment, following clinical trials.

Acknowledgements

This work was supported by Research Grant AZV 16–29447 A of Ministry of Health, Czech Republic and CEITEC 2020 (LQ1601) of Ministry of Education, Youth and Sports. We also acknowledge the CF Genomics CEITEC MU supported by the NCMG research infrastructure (LM2015091 funded by MEYS CR) for their support in obtaining the scientific data presented in this paper.

Author contributions

All authors were involved in the data analysis and interpretation. Moreover, MD, JT, ZV and MD2 were involved in clinical data acquisition and manuscript preparation. All authors reviewed the manuscript and approved the final version for submission.

Author details

¹Department of Pneumology and Phtiseology, University Hospital and Faculty of Medicine, Brno, Czech Republic. ²Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic. ³Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital and Faculty of Medicine, Brno, Czech Republic

Conflict of interest

The authors have received reimbursement from the pharmaceutical industry to cover the costs of participating in several scientific meetings.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41439-019-0044-z>.

Received: 10 November 2018 Revised: 3 February 2019 Accepted: 3 February 2019

Published online: 05 March 2019

References

- Talbert, J. L., Schwartz, D. A. & Steele, M. S. Familial interstitial pneumonia. *Clin. Pulm. Med.* **21**, 120–127 (2014).
- American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *American Thoracic Society; European Respiratory Society. Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 277–304 (2002).
- Spagnolo, P., Luppi, F., Cerri, S. & Richeldi, L. Genetic testing in diffuse parenchymal lung disease. *Orphanet J. Rare Dis.* **7**, <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-79> (2012).
- Steele, M. P. et al. Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 1146–1152 (2005).
- Lee, H. L. et al. Familial idiopathic pulmonary fibrosis: clinical features and outcome. *Chest* **127**, 2034–2041 (2005).
- Armanicus, M. Y. et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1317–1326 (2007).
- Tsakiri, K. D. et al. Adult-onset pulmonary fibrosis cause by mutations in telomerase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 7552–7557 (2007).
- Kropski, J. A. et al. A novel dyskeratin (DKC1) mutation is associated with familial interstitial pneumonia. *Chest* **146**, e1–e7 (2014).
- Alder, J. K. et al. Exome sequencing identifies mutant TINF2 in family with pulmonary fibrosis. *Chest* **147**, 1361–1368 (2015).
- Cogan, J. D. et al. Rare variants in RTEL1 are associated with familial interstitial pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **191**, 646–655 (2015).

11. Stuart, B. D. et al. Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nat. Genet.* **47**, 512–517 (2015).
12. Moorseel, C. H. et al. Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **182**, 1419–1425 (2010).
13. Campo, I. et al. A large kindred of pulmonary fibrosis associated with a novel ABCA3 gene variant. *Respir. Res.* **15**, <https://doi.org/10.1186/1465-9921-15-43> (2014).
14. Wang, Y. et al. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 52–59 (2009).
15. Nathan, N. et al. Germ-line SFTPA1 mutation in familial idiopathic interstitial pneumonia and lung cancer. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 1457–1467 (2016).
16. Lawson, W. E., Loyd, J. E. & Degryse, A. L. Genetics in pulmonary fibrosis – familial cases provide clues to the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Med. Sci.* **341**, 439–443 (2011).
17. Doan, M. L. et al. Clinical, radiological and pathological features of ABCA3 mutations in children. *Thorax* **63**, 366–373 (2008).
18. Fingerlin, T. E. et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nat. Genet.* **45**, 613–620 (2013).
19. Roy, M. G. et al. Muc5b is required for airway defence. *Nature* **505**, 412–416 (2014).
20. Stenson, P. D. et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum. Genet.* **136**, 665–677 (2017).
21. Lek, M. et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* **536**, 285–291 (2016).
22. Kircher, M. et al. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat. Genet.* **46**, 310–315 (2014).
23. Zamyatnin, A. A. Protein volume in solution. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **24**, 107–123 (1972).
24. Hodgson, U., Laitinen, T. & Tukiainen, P. Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax* **57**, 338–342 (2002).
25. Musk, A. W., Zilko, P. J., Manners, P., Kay, P. H. & Kamboh, M. I. Genetic studies in familial fibrosing alveolitis. Possible linkage with immunoglobulin allotypes (Gm). *Chest* **89**, 206–210 (1986).
26. Marney, A., Lane, K. B., Phillips, J. A., Riley, D. J. & Loyd, J. E. Idiopathic pulmonary fibrosis can be an autosomal dominant trait in some families. *Chest* **120** (Suppl.1), 56S (2001).
27. Marshall, R. P., Puddicombe, A., Cookson, W. O. & Laurent, G. J. Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the United Kingdom. *Thorax* **5**, 143–146 (2000).
28. Rosas, I. O. et al. Early interstitial lung disease in familial pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **176**, 698–705 (2007).
29. Kaur, A., Mathai, S. K. & Schwartz, D. A. Genetics in idiopathic pulmonary fibrosis. Pathogenesis, prognosis, and treatment. *Front. Med.* **4**, <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00154> (2017).
30. Nogee, L. M. et al. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N. Engl. J. Med.* **344**, 573–579 (2001).
31. Tanjore, H. et al. Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* **286**, 30972–30980 (2011).
32. Crossno, P. F. et al. Identification of early interstitial lung disease in an individual with genetic variations in ABCA3 and SFTPC. *Chest* **137**, 969–973 (2010).
33. Kannegiesser, C. et al. Heterozygous RTEL1 mutations are associated with familial pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* **46**, 474–485 (2015).
34. Seibold, M. A. et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1503–1512 (2011).
35. Borrie, R. et al. Management of suspected monogenic lung fibrosis in a specialised centre. *Eur. Respir. Rev.* **26**, 160122 (2017). pii.
36. Whitsett, J. A. Genetic basis of familial interstitial lung disease: misfolding or function of surfactant protein C? *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **165**, 1201–1202 (2002).
37. Han, S. & Mallampalli, R. K. The role of surfactant in lung disease and host defense against pulmonary infections. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **12**, 765–774 (2015).
38. Kolbe, K., Lu, J., Mole, S. E., Kaluz, S. & Reid, K. B. Assignment of the human pulmonary surfactant protein D gene (SFTPD) to 10q22-q23 close to the surfactant protein A gene cluster. *Genomics* **17**, 294–298 (1993).
39. Lawson, W. E. et al. Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **249**, L1119–L1126 (2008).
40. Whitsett, J. A., Wert, S. E. & Weaver, T. E. Diseases of pulmonary surfactant homeostasis. *Annu. Rev. Pathol.* **10**, 371–393 (2015).
41. Selman, M. et al. Surfactant protein A and B genetic variants predispose to idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum. Genet.* **113**, 542–550 (2003).
42. Raghu, G. et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **183**, 788–824 (2011).
43. Raghu, G. et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline: treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: an update of the 2011 clinical practice guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **192**, e3–e19 (2015).
44. Travis, W. D. et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **188**, 733–748 (2013).
45. Kropinski, J. A. et al. Genetic evaluation and testing of patients and families with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **195**, 1423–1428 (2017).

2.2.1.3. Novel genetic variant of *HPS1* gene in Hermansky-Pudlak syndrome with fulminant progression of pulmonary fibrosis (Doubková M, Trizuljak J, Hrazdírová A, Blaháková I, Radová L, Pospíšilová Š, Doubek M. *BMC Pulm Med.* 2019; 19(1): 178)

Doubková et al. *BMC Pulmonary Medicine* (2019) 19:178
<https://doi.org/10.1186/s12890-019-0941-4>

BMC Pulmonary Medicine

CASE REPORT

Open Access

Novel genetic variant of *HPS1* gene in Hermansky-Pudlak syndrome with fulminant progression of pulmonary fibrosis: a case report



Martina Doubková¹, Jakub Trizuljak^{2,3}, Zuzana Vrzalová³, Anna Hrazdírová¹, Ivona Blaháková³, Lenka Radová³, Šárka Pospíšilová^{2,3} and Michael Doubek^{2,3*}

Abstract

Background: Hermansky-Pudlak syndrome (HPS) is an autosomal recessive disorder that is associated with oculocutaneous albinism, bleeding diathesis, granulomatous colitis, and highly penetrant pulmonary fibrosis in some subtypes. Homozygous or compound heterozygous pathological variants in *HPS1*, *HPS3*, *HPS4*, and several other genes lead to clinical manifestation of the disease.

Case presentation: A 57-year-old female was admitted with congenital oculocutaneous albinism, thrombocytopeny and late-onset accelerated pulmonary fibrosis (first symptoms from age 50 onwards). Chest high-resolution computed tomography identified thickening of peribronchovascular interstitium, bronchiectasis, reticulations, honeycombing, ground glass opacities and lung parenchyma consolidations. HPS was clinically suspected. We performed whole exome sequencing (WES), a form of massive parallel sequencing, of proband-parents trio. Whole exome libraries were processed using KAPA Hyper Prep Kit, SeqCap EZ MedExome Enrichment Kit and HyperCap Bead Kit according to the SeqCap EZ HyperCap Workflow. The paired-end 2 × 75 bp sequencing was performed on the Illumina NextSeq 500 Sequencer (Illumina Inc., USA). Furthermore, obtained variants by WES were evaluated using a virtual panel of genes: *HPS1*, *AP3B1*, *HPS3*, *HPS4*, *HPS5*, *HPS6*, *DTNBPI1*, *BLOC1S3*, and *PLDN*. We identified a compound heterozygous genotype in *HPS1* gene in the proband. We identified a pathogenic frameshift variant c.1189delC; p.(Gln397Serfs*2), resulting in a premature stop codon. This variant has been previously associated with HPS. Furthermore, we characterized previously undescribed nonsense variant c.1507C > T; p.(Gln503*), resulting in a premature stop codon and mRNA degradation through nonsense-mediated decay. Sanger sequencing validated the presence of both variants and simultaneously confirmed the heterozygous carrier status of parents. Unfortunately, the patient died due to fulminant progression of pulmonary fibrosis 2 months after diagnostics.

Conclusions: Compound heterozygous mutations in *HPS1* in the proband lead to disruption of *HPS1* gene and clinical manifestation of HPS with severe pulmonary fibrosis. This case illustrates the need to consider HPS in differential diagnostics of pulmonary fibrosis. Pulmonary fibrosis is a common cause of death in HPS patients. Earlier diagnosis may enable better treatment for these patients.

Keywords: Exome sequencing, Hermansky-Pudlak syndrome, Pulmonary fibrosis

* Correspondence: michaeldoubek@hotmail.com

²Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital and Faculty of Medicine, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic

³Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Hermansky-Pudlak syndrome (HPS) is an autosomal recessive disorder associated with oculocutaneous albinism (or some degree of hypopigmentation), decreased visual activity generally accompanied by horizontal nystagmus, bleeding diathesis, granulomatous colitis, and highly penetrant pulmonary fibrosis in some subtypes. The HPS spectrum includes ten disorders (HPS-1 to HPS-10). Homozygous or compound heterozygous mutations in *HPS1*, *HPS3*, *HPS4*, and several other genes lead to clinical manifestation of the disease [1–3]. The disease was described by two Czech hematologists František Heřmánský and Pavel Pudlák in 1959 [4].

Case presentation

A 57-year-old Caucasian female (proband), teacher, with oculocutaneous albinism (Fig. 1) was admitted for dry cough and rapid worsening of dyspnea. A thorough analysis of the medical history revealed that the patient had eye problems since childhood and that from the age of 45, her vision was significantly worse. Furthermore, it was found that she had several episodes of prolonged bleeding: after appendectomy, after minor injuries (including hematomas) and after childbirth. At the age of 50, she was examined by a hematologist. Platelet aggregation was performed, showing slightly prolonged PFA-100 time in the presence of collagen/ADP. No definite conclusion has been made regarding this finding. The first mild lung problems occurred at the age of 53. She was followed with diagnosis of bronchial asthma by a

regional pneumologist. There was no family history of these symptoms. She was a non-smoker.

Physical examination revealed clubbing fingers and bilateral end-inspiratory fine crackles in the lower and middle lung areas. The posteroanterior chest X-ray showed bilateral diffuse reticular opacities.

High-resolution computed tomography (HRCT) of the chest identified thickening of the peribronchovascular interstitium, bronchiectasis, reticulations, honeycombing, ground glass opacities and lung parenchyma consolidations. A comparison of HRCT images performed at 3-month intervals showed fulminant progression of pulmonary involvement (Figs. 2 and 3).

Pulmonary function testing revealed severe restrictive ventilation impairment and a severe decline of diffusing capacity of the lung for carbon monoxide (DLco 20%). Arterial blood gas analysis showed hypoxemia (pO₂ 7 kPa). Moderate pulmonary hypertension was found. Blood count, serum biochemistry, and immunologic parameters were normal.

Based on these findings, HPS was suspected. The negative family history of symptoms suggested an autosomal-recessive mode of inheritance. Therefore, whole exome sequencing (a form of massive parallel sequencing) of the proband-parent trio was carried out. Samples of peripheral blood were collected and processed for genomic DNA isolation using MagCore® Genomic DNA Whole Blood Kit (RBC Bioscience). Whole exome libraries were processed using KAPA Hyper Prep Kit, SeqCap EZ MedExome Enrichment Kit and HyperCap Bead Kit (Roche, USA) according to the SeqCap EZ HyperCap Workflow v2.1 following the recommended protocols. Paired-end 2 × 75 bp sequencing was performed on the Illumina NextSeq 500 Sequencer (Illumina Inc., USA). The raw sequencing reads were aligned to the GRCh37 (hg19) human reference genome using the BWA-mem algorithm, version 0.7.15. PCR duplicates were identified with the MarkDuplicates tool from Picard. Germline single nucleotide variants (SNV) and indels were detected by the GATK Haplotype-Caller, version 3.7. Annotation of obtained variants/indels was performed with Annovar. Furthermore, the processed variants/indels were matched to the virtual panel of genes including *HPS1*, *AP3B1*, *HPS3*, *HPS4*, *HPS5*, *HPS6*, *DTNBPI*, *BLOC1S3*, and *PLDN*. The virtual panel was created based on the literature review [1–3]. Exome sequencing identified a compound heterozygous genotype in the *HPS1* gene (NM_000195.3) in the proband: 1) pathogenic frameshift variant c.1189delC; p.(Gln397Serfs*2), resulting in a premature stop codon, associated with HPS; and 2) previously undescribed nonsense variant, c.1507C > T; p.(Gln503*), resulting in a premature stop codon, implying a loss of 197 amino acids or more likely, nonsense-mediated decay of the mRNA degradation (Fig. 4).

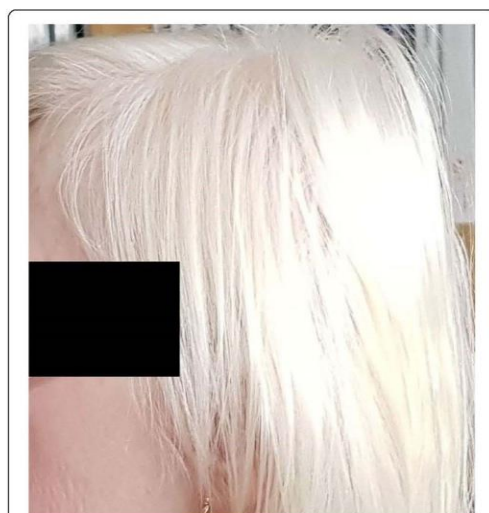


Fig. 1 Albinism in the Hermansky-Pudlak syndrome patient

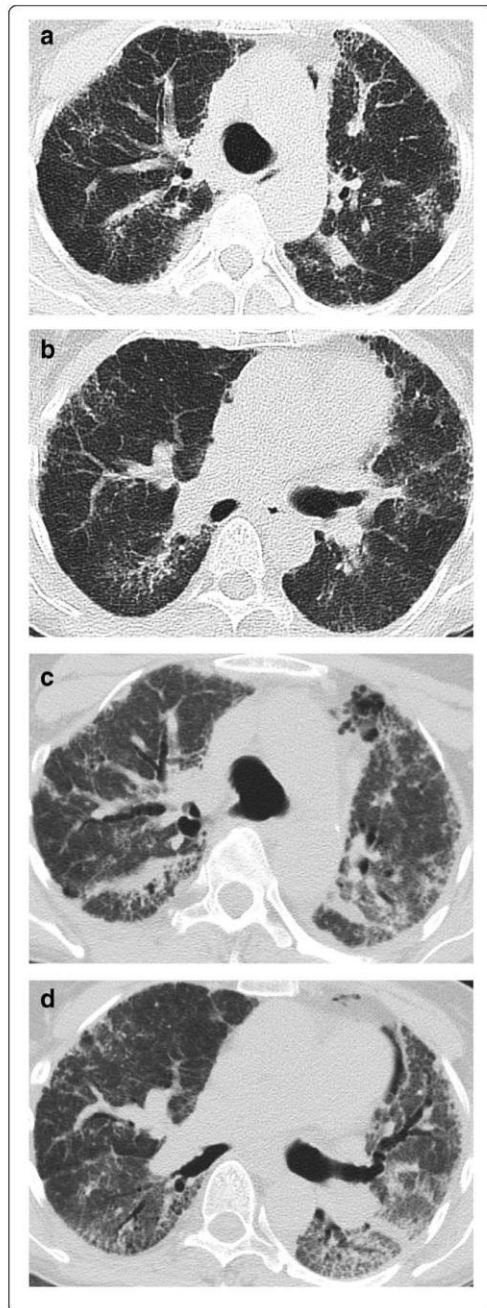


Fig. 2 High-resolution computed tomography (axial plane) of the chest showing worsening of lung fibrosis with thickening of peribronchovascular interstitium, bronchiectasis, reticulations, honeycombing, ground glass opacities and lung parenchyma consolidations. Initial examination (a, b) and three-month follow-up (c, d)

The coverage range of the novel variant c.1507C>T in the proband was 26 reads and variant allele frequency range 38.5%.

Subsequently, the diagnosis has been verified using PCR and Sanger sequencing of the amplicons in the proband, and also the presence of heterozygous carrier status of parents (Fig. 5). Primers were designed for exons 13 and 15, respectively (13F-primer: CTTAGGGTTG GCACGTCTTC, 13R-primer: TGGGTCTCACCTGA ATCTCC; 15F-primer: TTCTGCTGTAATGCCCTCT, 15R-primer: GAAGTCCTCCAGTCCGTCA). PCR was performed with the annealing temperature 60 °C using Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs Inc., England) according to the manufacturer’s protocol. PCR products were purified using the Qiaquick PCR purification kit (QIAGEN, Germany). Capillary sequencing was performed using BigDye-terminator chemistry on 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

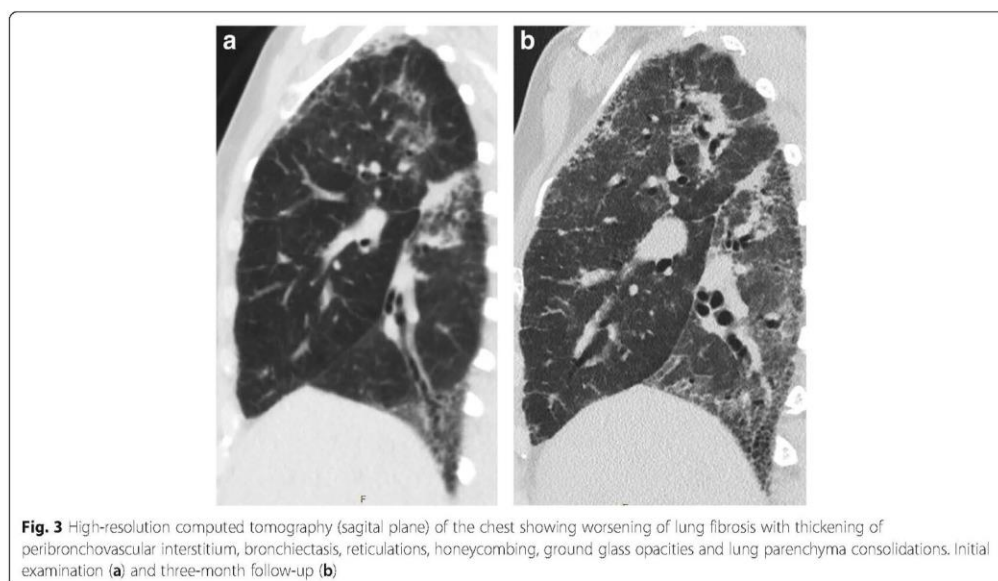
We could not analyze the structural effect of the variant p.(Gln503*) “in silico” because the crystal structure was not available. However, given the type of “nonsense” variant, we can assume that the novel variant including the nucleotide change C>T at the position 1507 leads to a shortened protein which most likely results in misfolding of the protein and impaired function.

Treatment with corticosteroids, started before HPS diagnosis was confirmed, had no effect on pulmonary functions. Therefore, lung transplantation began to be prepared. Unfortunately, 2 months after HPS diagnostics, the patient died due to ongoing fulminant lung fibrotization.

Discussion and conclusions

HPS is rare and heterogenous autosomal recessive disease characterized by abnormalities in both lysosomes and lysosome-related organelles. The disease is rare in Caucasians but is the most prevalent cause of albinism in Puerto Rico [5]. Ten subtypes of HPS (HPS-1 to HPS-10) have been reported; three HPS subtypes are associated with fibrotic lung disease: HPS-1, HPS-2, and HPS-4. HPS can be caused by at least nine genes: *HPS1*, *AP3B1*, *HPS3*, *HPS4*, *HPS5*, *HPS6*, *DTNBP1*, *BLOC1S3*, and *PLDN*.

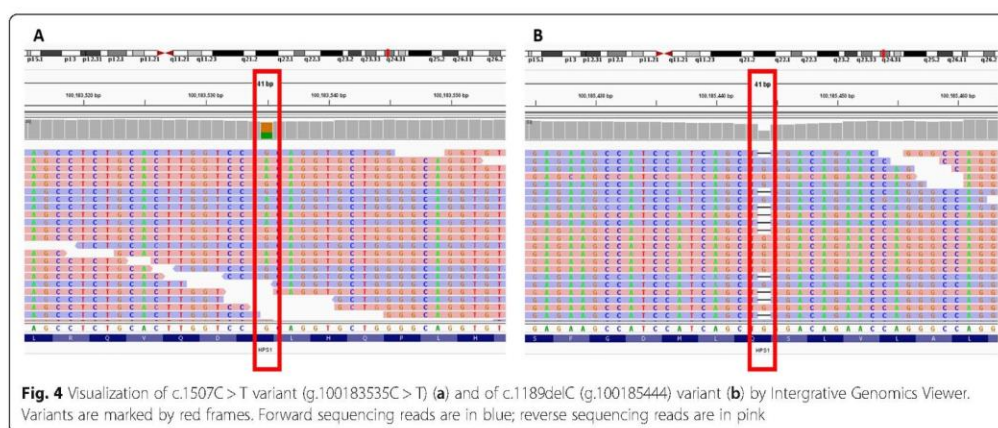
To date, 61 variants in the *HPS1* gene have been reported as disease causing or likely disease causing according to the Human Gene Mutation Database (Table 1) [7]. The most common pathogenic variants of *HPS1* gene are nonsense/missense or small deletions. Pulmonary fibrosis is seen in approximately one half of carriers of *HPS1* and *HPS4* gene mutations [2, 3, 6]. However,

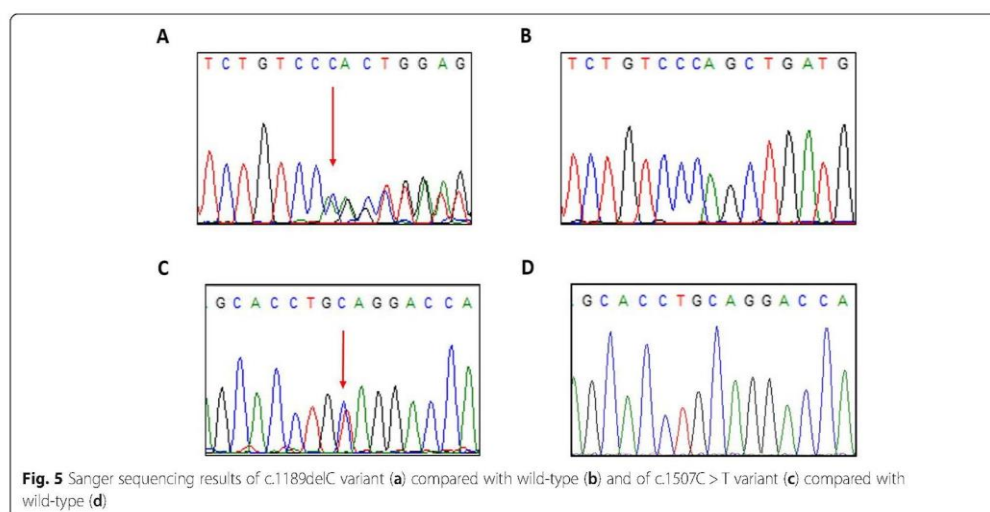


other *HPS1* gene variants are associated with milder symptoms like albinism, nystagmus, hypopigmentation, foveal hypoplasia or absent nails [7].

It has been described that the majority of HPS patients are compound heterozygotes [8]. Our proband was also a compound heterozygote carrying previously described frameshift variant c.1189delC and novel nonsense variant c.1507C > T. Theunissen et al. reported a patient who was compound heterozygote with the same c.1189delC variant as in our case and different nonsense variant c.517C > T. This patient suffered from an

oculocutaneous albinism and “multisystemic disease” since childhood [9]. Hermos et al. described four novel *HPS1* variants in non-Puerto Rican patients suffered from HPS, where small deletions of nucleotide C (c.561delC) and nucleotide A (c.1581delA) of *HPS1* gene producing no RNA have been found. One of these patients developed pulmonary fibrosis, two patients had granulomatous colitis [10]. So far eight disease-causing variants of the nonsense type have been described. In one Pakistani family, a nonsense variant p.(Gln686*) of the *HPS1* gene was segregating with the HPS phenotype.





An absence of pulmonary fibrosis in these affected individuals might be due to their relatively young age [11]. On the other hand, Abouelhoda et al. detected nonsense *HPS1* variant in exon 14 associated with absent nails only [12].

HPS subtypes with lung fibrosis have a poorer prognosis compared with other types of HPS. Clinical manifestations of HPS-associated pulmonary fibrosis occur usually in the fourth or fifth decade of life [1–3].

Radiological findings of HPS pulmonary fibrosis are variable: reticular opacities, septal and pleural thickening, bronchiectasis, ground-glass opacities, loss of lung volume, or honeycombing. Predominant radiographic findings are found in the lung periphery and progress toward the central portion of the lung [13].

Table 1 Phenotypes associated with various *HPS1* gene variants according to the Human Gene Mutation Database [6]

Variant type	Total number of described variants	Reported phenotype
Missense/nonsense	22	Hermansky-Pudlak syndrome; albinism; nystagmus; hypopigmentation; foveal hypoplasia; absent nails
Splicing substitutions	8	Hermansky-Pudlak syndrome
Small deletions	17	Hermansky-Pudlak syndrome
Small insertions/duplications	7	Hermansky-Pudlak syndrome
Small indels	1	Hermansky-Pudlak syndrome
Gross deletions	5	Hermansky-Pudlak syndrome
Complete rearrangements	1	Hermansky-Pudlak syndrome

The average life expectancy of patients with HPS is 40–50 years. Pulmonary fibrosis is a common cause of death in HPS patients [13, 14]. There is no known curative therapy for HPS. Corticosteroids are not effective. Pirfenidone, an antifibrotic agent, has been shown to slow fibrosis progression, but only in patients who have well-preserved residual lung volume [3, 7]. Thus, lung transplantation remains the only means of prolonging the survival of HPS patients with advanced pulmonary fibrosis [15]. A potential contraindication to performing lung transplant is thrombocytopeny associated with HPS. This condition can be managed by intravenous desmopressin administration and platelet transfusions [16].

Compound heterozygous mutations in *HPS1* in our proband led to the disruption of *HPS1* gene and clinical manifestation of HPS with severe pulmonary fibrosis. This case illustrates the need to consider HPS in differential diagnostics of pulmonary fibrosis. Earlier diagnosis of HPS may aid the timing of lung transplantation. Our case also shows that progression of HPS-associated fibrosis may be fulminant. Therefore, an indication for lung transplantation cannot be delayed.

Abbreviations

DLco: Diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; HPS: Hermansky-Pudlak syndrome; HRCT: High resolution computed tomography; NGS: Next-generation sequencing; SNV: Single nucleotide variants

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

MD and MD2 examined the patient and wrote the manuscript; JT and AH examined the patient; ZV, IB, LR and SP performed molecular genetic analyses. All authors read, revised and approved the final manuscript.

Authors' information

All authors were affiliated with the University Hospital and Faculty of Medicine, Brno, Czech Republic, or Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic. The views expressed in this paper are those of the authors and do not reflect the official policy of the University Hospital and Faculty of Medicine, Brno, or Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno.

Funding

Supported by Czech Ministry of Health (grant AZV 16-29447A) - reimbursement of the cost of study designing, data collection, chemicals for molecular analyzes, data interpretation and writing the manuscript, wages of some team members; the NPU CEITEC 2020 LQ1601 - providing facilities for molecular genetic analyses; and Masaryk University (grant MUN/A/1105/2018) - reimbursement of the cost of chemicals for molecular analyzes.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Written consent was obtained from the patient husband for publication of this case report.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Department of Pulmonary Diseases and Tuberculosis, Masaryk University, Faculty of Medicine and University Hospital, Brno, Czech Republic.

²Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital and Faculty of Medicine, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic.

³Central European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic.

Received: 22 May 2019 Accepted: 16 September 2019

Published online: 16 October 2019

References

1. Huizing M, Heliop-Wooley A, Westbrook W, Gunay-Aygun M, Gahl WA. Disorders of lysosome-related organelle biogenesis: clinical and molecular genetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:359–86.
2. Gahl WA, Brantly M, Kaiser-Kupfer MI, Iwata F, Hazelwood S, Shotelersuk V, et al. Genetic defects and clinical characteristics of patients with a form of oculocutaneous albinism (Hermansky-Pudlak syndrome). *N Engl J Med.* 1998;338(18):1258–64.
3. McElvaney OJ, Huizing M, Gahl WA, O'Donovan P, Horan D, Logan PM, et al. Hermansky-Pudlak syndrome with a novel genetic variant in HPS1 and subsequent accelerated pulmonary fibrosis: significance for phenocopy diseases. *Thorax.* 2018;73:1085–8.
4. Hermansky F, Pudlak P. Albinism associated with hemorrhagic diathesis and unusual pigmented reticular cells in the bone marrow: report of two cases with histochemical studies. *Blood.* 1959;14:162–9.
5. Witkop CJ, Nuñez Babcock M, Rao GH, Gaudier F, Summers CG, Shanahan F, et al. Albinism and Hermansky-Pudlak syndrome in Puerto Rico. *Bol Asoc Med P R.* 1990;82(8):333–9.
6. Gahl WA, Brantly M, Troendle J, Avila NA, Padua A, Montalvo C, et al. Effect of pifenidone on the pulmonary fibrosis of Hermansky-Pudlak syndrome. *Mol Genet Metab.* 2002;76(3):234–42.
7. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Evans K, Hazden M, Heywood S, et al. The human gene mutation database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet.* 2017;136:665–77.
8. Wei A, Yuan Y, Bai D, Ma J, Hao Z, Zhang Y, et al. NGS-based 100-gene panel of hypopigmentation identifies mutations in Chinese Hermansky-Pudlak syndrome patients. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016;29:702–6.
9. Theunissen TEJ, Sallevelt SCEH, Hellebrekers DMEI, de Koning B, Hendrickx ATM, van den Bosch BJC, et al. Rapid resolution of blended or composite multigenic disease in infants by whole-exome sequencing. *J Pediatr.* 2017;182:371–4.
10. Hermos CR, Huizing M, Kaiser-Kupfer MI, Gahl WA. Hermansky-Pudlak syndrome type 1: gene organization, novel mutations, and clinical-molecular review of non-Puerto Rican cases. *Hum Mutat.* 2002;20:482.
11. Yousaf S, Shahzad M, Tasleem K, Sheikh SA, Tariq N, Sabbir AS, et al. Identification and clinical characterization of Hermansky-Pudlak syndrome alleles in the Pakistani population. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016;29(2):231–5.
12. Abouelhoda M, Sobahy T, El-Kalioby M, Patel N, Shamseldin H, Monies D, et al. Clinical genomics can facilitate countrywide estimation of autosomal recessive disease burden. *Genet Med.* 2016;18:1244–9.
13. Vicary GW, Vergne Y, Santiago-Cornier A, Young LR, Roman J. Pulmonary fibrosis in Hermansky-Pudlak syndrome. *Ann Am Thorac Soc.* 2016;13(10):1839–46.
14. Brantly M, Avila NA, Shotelersuk V, Lucero C, Huizing M, Gahl WA. Pulmonary function and high-resolution CT findings in patients with an inherited form of pulmonary fibrosis, Hermansky-Pudlak syndrome, due to mutations in HPS-1. *Chest.* 2000;117(1):129–36.
15. Lederer DJ, Kawut SM, Sonett JR, Vakiani E, Seward SL Jr, White JG, et al. Successful bilateral transplantation for pulmonary fibrosis associated with the Hermansky-Pudlak syndrome. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24:1697–9.
16. El-Chemaly S, O'Brien KJ, Nathan SD, Weinhouse GL, Goldberg HJ, Connors JM, et al. Clinical management and outcomes of patients with Hermansky-Pudlak syndrome pulmonary fibrosis evaluated for lung transplantation. *PLoS One.* 2018;13(3):e0194193.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



2.2.2. Sporadická forma idiopatické plicní fibrózy

V naší další genetické analýze z českého EMPIRE registru jsme se zaměřili na vyšetření jednotlivých nukleotidových polymorfismů (SNP) těchto genů: *MUC5B*, *DSP*, *DNASE1L3*, *ACE*, *TOLLIP*, *IL8*, *ATM*, *CYP2C9*, *TP53*, *CYP2C19*, *IL4*, *TREH*, *DDX6*, *FAM13A*, *FASTKD3*, *CDKN1A*, *MTR*, *SPPL2C*, *MDGA2*, *BHMT*, *PON1*, *C2*, *OBFC1*, *IL1RN*, *ATP11A*, *PRMT8*, *TLR3*, *ATG5*, *TGF-B1*, *IL12A-AS1*, *DPP9*, *SFTPC* a sekvenační analýzy genů *TERC* a *TERT* ve vztahu k IPF. Pozorovali jsme asociaci mezi 5 vyšetřovanými geny (*MUC5B*, *DSP*, *FAM13A*, *TERC*, *TERT*) a IPF na rozdíl od zdravých kontrol. Konkrétně se věnujeme polymorfismu *MUC5B* (mucin5B) a *DSP* (desmoplakinu).

Studovali jsme asociace dvou běžných polymorfismů na efekt léčby nintedanibem a pirfenidonem, dvěma antifibrotiky schválenými pro léčbu IPF. Tyto léky působí prostřednictvím různých mechanismů. Nintedanib je inhibitor tyrosinkinázy zaměřující se na receptory vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (*VEGFR* 1-3), receptory fibroblastového růstového faktoru (*FGFR* 1-3) a receptory růstového faktoru odvozené od destiček (*PDGFR*) (Bonella a kol., 2015; Hilberg a kol., 2008). U pirfenidonu, in vitro studie normálních lidských plicních fibroblastů ukázaly, že pirfenidon narušuje syntézu kolagenu stimulovanou TGF- β 1, snižuje proliferaci fibroblastů, produkci aktinu alfa buněk hladkého svalstva indukovaného TGF- β a hladinu prokolagenu (Jin a kol., 2019). Nedávná studie na myším modelu bleomycinem indukované plicní fibrózy ukázala, že pirfenidon je účinnější v modelu profylaktické fibrózy, zatímco nintedanib v časných a pozdních modelech léčby (Li a kol., 2019).

V naší studii jsme nejprve analyzovali dopad promotorové varianty v genu *MUC5B* rs35705950, který je nejsilnějším rizikovým faktorem pro rozvoj idiopatických intersticiálních pneumonií a IPF (Fingerlin a kol., 2013; Seibold a kol., 2011; Noth a kol., 2013; Peljto a kol., 2013). Riziková alela T se nachází u 31–42 % pacientů s IPF (Fingerlin a kol., 2013; Noth a kol., 2013; Hambly a kol., 2015; Zhang a kol., 2011), v naší kohortě IPF byla tato varianta detekována u 55 % pacientů.

Nosičství T alely je spojeno se zvýšenou expresí *MUC5B* v pseudostratifikovaném mukociliárním epitelu, lepší prognózou a lepším přežitím (Nakano a kol., 2016; Mathai a kol., 2016). Navzdory klíčové úloze *MUC5B* v predispozici k plicní fibróze jsme v naší studii nepotvrdili žádné rozdíly v účinnosti léčby a vývoji plicních funkcí u nintedanibu nebo pirfenidonu, pokud jde o nositelství *MUC5B* rs3570595 * T alely.

Dále jsme zkoumali asociaci běžného polymorfismu rs2076295 v *DSP* genu asociovaném s IPF ve vztahu k efektu léčby nintedanibem a pirfenidonem. Desmoplakin, protein kódovaný

genem *DSP*, je důležitý pro mezibuněčné kontakty, hojení a funkci epiteliální bariéry (Fingerlin a kol., 2013; Mathai a kol., 2016; Allen a kol., 2017), a jeho exprese je zvýšena u IPF, převážně v epitelu dýchacích cest (Fingerlin a kol., 2013; Allen a kol., 2017). Riziková alela *DSP* rs2076295 * G, přítomná u 80,5 % našich pacientů s IPF, je spojena se sníženou expresí genů v proximálních i distálních dýchacích cestách (Mathai a kol., 2016). Naše data odhalila, že pacienti s IPF, kteří mají alelu *DSP* rs2076295 * G (GG a GT genotypy), prokázali při léčbě nintedanibem nižší mortalitu a pomalejší pokles plicních funkcí než TT genotypy. Lze proto předpokládat, že nižší exprese *DSP* v epitelu dýchacích cest způsobená alelou rs2076295 * G může přispět k lepší účinnosti nintedanibu u pacientů s IPF, což bylo zvláště pozorováno u GT genotypu. Nové poznatky ukazují, že nintedanib, ale nikoli pirfenidon, má vliv na plicní epitel a obnovuje expresi epiteliálních genů, zvyšuje expresi proteinu proSP-C a ovlivňuje sekreci SP-C u plicní fibrózy (Lehmann a kol., 2018). Protože desmoplakin je vysoce exprimován v epitelu, naše data ukazují na roli plicního epitelu nejen v patogenezi IPF, ale také v účinnosti antifibrotik.

Dalším zjištěním bylo, že pacienti s IPF s genotypem TT (19,5 %) by mohli mít prospěch z léčby pirfenidonem (delší přežití při léčbě pirfenidonem ve srovnání s nintedanibem). Nedávná studie totiž odhalila, že T alela je spojena s vývojem emfyzému u pacientů s chronickou obstrukční plicní nemocí (Kim a kol., 2019). Emfyzém je možné pozorovat u syndromu kombinované plicní fibrózy a emfyzému, který je ale odlišný patofyziologicky a prognózou od IPF (Keller a kol., 1997). Nicméně, jak alela *DSP* rs2076295 * T ovlivňuje antifibrotickou léčebnou odpověď není dosud známa a zaslouží si budoucí výzkum.

Shrnutím našich poznatků bylo, že polymorfismus rs35705950 *MUC5B* genotypu GT byl asociován s IPF ve srovnání se zdravou kontrolní skupinou (50,4 % vs. 18,5 %, $p < 0,001$). Genotyp GT byl také významně více přítomen u mužů (77,4 % vs. 22,6 %, $p < 0,02$). Genotypy GG a GT byly spojeny se signifikantním poklesem FVC (forsírovaná vitální kapacita) v čase ($p=0,019$ v 6. měsíci, $p=0,005$ v 12. měsíci a $p=0,011$ v 18. měsíci) a genotyp GG se signifikantním poklesem DLco (difuzní kapacita plic) v čase ($p=0,017$ v 18. měsíci). Jednonukleotidový polymorfismus rs2076295 *DSP* genotypu GG byl významně přítomen u pacientů s IPF ve srovnání s kontrolní skupinou (39 % vs. 18,5; $p < 0,001$); genotyp TT byl častější u kontrol (19,5 % vs. 31,7 %; $p < 0,001$). Nebyly zjištěny žádné další významné rozdíly v distribuci genotypů u mužů a žen v dalších analyzovaných parametrech s výjimkou intersticiálního skóre na HRCT hrudníku. Sledování trvalo 34,3 měsíců, 167 pacientů užívalo antifibrotika, z nich 127 (60,5 %) pirfenidon a 40 (19,0 %) pacientů nintedanib. Pokles plicních funkcí byl definován jako pokles FVC o více než 10 % a DLCO o více než 15 %.

Shrnutím naším práce bylo následující. Genetickým sekvenováním vzorků krve získaného z českého EMPIRE registru jsme zjistili, že genotypy *MUC5B* a *DSP* mohou předpovídat riziko IPF v běžné populaci. Potvrdili jsme zvýšenou frekvenci výskytu *MUC5B* rs35705950 *T alely (55,2 % vs. 20,9 %, $P < 0,001$) a *DSP* rs2076295 *G alely (80,4 % vs. 68,3 %, $P < 0,001$) u IPF pacientů ve srovnání s kontrolami. Nosiči alely *DSP* rs2076295 * G profitovali na nintedanibu ve srovnání s pacienty s IPF s genotypem TT, kteří měli kratší OS (poměr rizika (HR) 7,99; 95% interval spolehlivosti (CI) = 1,56 - 40,90; $P = 0,013$) a rychlejší pokles ve funkci plic (HR 9,42; 95 % CI = 1,91-46,403; $P = 0,006$). Pacienti s rs2076295 TT genotypem profitovali z pirfenidonu při prodlouženém OS ($P = 0,040$; HR = 0,35; 95 % CI = 0,13-0,95) ve srovnání s nintedanibem. Obě asociace byly potvrzeny analýzou křížové validace. U alely *MUC5B* rs3570595 *T nebyl pozorován žádný rozdíl ve výsledku léčby u nintedanibu nebo pirfenidonu ($P = 0,784$).

Závěry: Naše studie na reálné kohortě pacientů z EMPIRE registru odhalila pozitivní dopad alely *DSP* rs2076295 *G na výsledek léčby nintedanibem, naopak pacienti s genotypem TT profitovali na pirfenidonu. *MUC5B* rs35705950 neovlivnil léčebný efekt nintedanibu nebo pirfenidonu. Tyto výsledky budou confirmovány na nezávislé kohortě pacientů.

Viz tabulky 1. a 2. a obrázky 1, 2 a 3, 4.

Tabulka 1. Rozdělení genotypů, alel a fenotypů (allele carriers, carriage) zkoumaných variant *MUC5B* a *DSP* ve skupině pacientů s IPF a zdravých kontrolních subjektů.

	IPF N=210	Zdravé kontroly N=205	P value ¹
Pohlaví			
Ž	71 (33,8 %)	80 (39,0 %)	0.333
M	139 (66,2 %)	125 (61,0 %)	
Věk v době diagnózy (roky)			
	70 (52-82)	70 (51-88)	0.270
Median, min-max			
MUC5B rs35705950			
Genotypy TT	10 (4,8 %)	5 (2,4 %)	<0.001
GT	106 (50,4 %)	38 (18,5 %)	
GG	94 (44,8 %)	162 (79,0 %)	
Riziková alela T	126 (30,0 %)	48 (11,7 %)	<0.001
alela G	294 (70,0 %)	362 (88,3 %)	<0.001
Nosičství T	116 (55,0 %)	43 (20,9 %)	<0.001
Nosičství G	200 (95,2 %)	200 (97,6 %)	0.200
DSP rs2076295			
Genotypy GG	82 (39,0 %)	38 (18,5 %)	<0.001
GT	87 (41,4 %)	102 (49,8 %)	
TT	41 (19,5 %)	65 (31,7 %)	
Riziková alela G	251 (59,8 %)	178 (43,4 %)	<0.001
alela T	169 (40,2 %)	232 (56,6 %)	<0.001
Nosičství G	169 (80,5 %)	140 (68,3 %)	<0.001
Nosičství T	128 (61,0 %)	167 (81,5 %)	<0.001

¹ statistical significance was tested by Chi-square test for categorical variables and by Kruskal – Wallis test for continuous variables. The distribution of investigated genotypes complied with the Hardy-Weinberg equilibrium.

Tabulka 2. Charakteristiky pacientů u pacientů s IPF rozdělených podle genotypů rs35705950 MUC5B a DSP rs2076295.

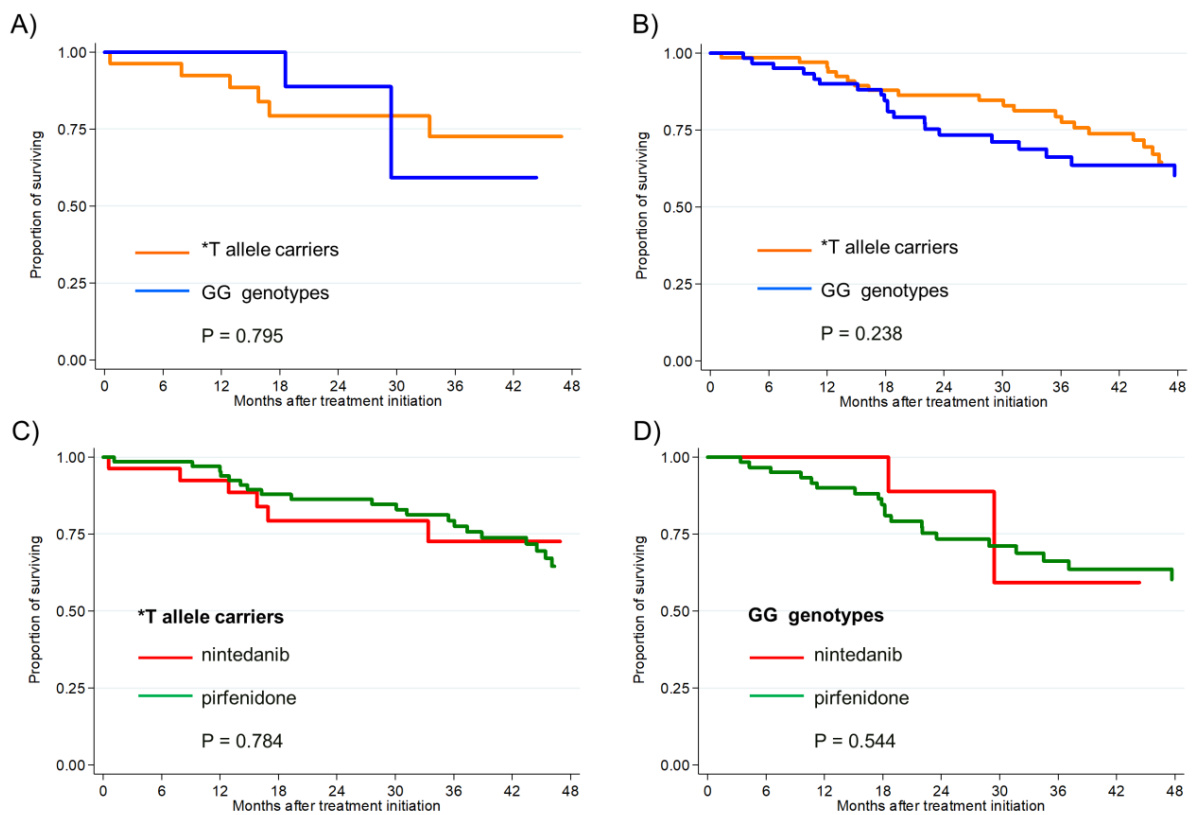
N (%)/ Median (5 th , 95 th percentile)	Total N=210	MUC5B rs35705950			P-value ¹	DSP rs2076295			P-value ¹
		GG N=94	GT N=106	TT N=10		GG N=82	GT N=41	TT N=87	
Pohlaví									
F	71(33,8 %)	42(44,7 %)	24(22,6 %)	5(50,0 %)	0.020	25(30,5 %)	15(36,6 %)	31(35,6 %)	0,714
M	139(66,2 %)	52(55,3 %)	82(77,4 %)	5(50,0 %)		57(69,5 %)	26(63,4 %)	56(64,4 %)	
Věk	68(49;80)	66(48;80)	68(51;81)	70(65;81)	0.122	67(54;82)	68(43;80)	68(49;77)	0,816
Trvání symptomů	12.0(3,0;48,0)	11.0(3,0;48,0)	12.0(3,0;48,0)	8.50(1,00;36,00)	0.662	9.50(3,00;36,00)	12.0(4,0;40,0)	12.0(3,0;48,0)	0,156
Paličky	102(48,6 %)	48(51,1 %)	51(48,1 %)	3(30,0 %)	0.444	43(52,4 %)	20(48,8 %)	39(44,8 %)	0,613
Kašel	146(7,7 %)	69(76,7 %)	71(71,7 %)	6(66,7 %)	0.657	54(70,1 %)	30(78,9 %)	62(74,7%)	0,580
Námahová dušnost									
1	2(1,0 %)	0(0,0 %)	2(2,0 %)	0(0,0 %)	0.094	2(2,6 %)	0(0,0 %)	0(0,0 %)	0,449
2	134(67,0 %)	55(62,5 %)	69(67,6 %)	10(100,0 %)		52(68,4 %)	26(65,0 %)	56(66,7 %)	
3	64(32,0 %)	33(37,5 %)	31(30,4 %)	0(0,0 %)		22(28,9 %)	14(35,0 %)	28(33,3 %)	
FVC									
Diagnóza	73(50;101)	71(48;99)	73(50;102)	96(68;106)	0.053	70(50;96)	76(44;98)	76(50;105)	0,366
6 měsíců	78(43;104)	78(42;104)	76(43;103)	97(88;104)	0.019	76(43;104)	77(41;100)	81(48;104)	0,244
12 měsíců	76(44;102)	73(44;102)	74(43;102)	99(85;108)	0.005	73(41;100)	83(42;103)	76(48;104)	0,393
18 měsíců	76(42;107)	73(42;97)	75(40;108)	98(79;112)	0.011	75(47;105)	81(38;97)	77(43;110)	0,576
DLco									
Diagnóza	46,9(29,0;72,3)	45.2(29,0;69,7)	47.5(29,0;75,0)	44.4(35,3;73,2)	0.786	47.7(24,2;67,9)	45.0(32,5;80,1)	46.0(33,2;73,7).	0,886
6 měsíců	47,9(25,5;77,9)	46.7(7,3;78,2)	48.2(27,0;77,9)	49.0(37,9;49,7)	0.997	48,3 (13,5;77,9)	44,1 (28,6;64,8)	47,0 (29,2;83,7)	0,903
12 měsíců	47,1(23,8;68,9)	47.1(25,2;71,6)	47.3(22,4;68,9)	43.6(38,1;57,1)	0.930	47.8(22,4;68,4)	44.7(23,2;79,2)	45.7(25,8;66,9)	0,879
18 měsíců	45,3(17,8;67,9)	39.6(14,8;66,2)	49.9(26,8;67,4)	49.6(39,8;82,5)	0.017	44.9(17,8;63,6)	41.2(0,0;82,5)	48.8(20,6;75,5)	0,404
Pacient Exacerbase (ano)	49(23,3%)	22(23,4 %)	25(23,6 %)	2(20,0 %)	0.967	18(22,0 %)	8(19,5 %)	23(26,4 %)	0,641

Exacerbation - počet										
1	33(67,3 %)	15(68,2 %)	16(64,0 %)	2(100,0 %)	0,668	12(66,7 %)	5(62,5 %)	16(69,6 %)	0,688	
2	13(26,5 %)	6(27,3 %)	7(28,0 %)	0(0,0 %)		5(27,8 %)	2(25,0 %)	6(26,1 %)		
3	2(4,1 %)	0(0,0 %)	2(8,0 %)	0(0,0 %)		0(0,0 %)	1(12,5 %)	1(4,3 %)		
4	1(2,0 %)	1(4,5 %)	0(0,0 %)	0(0,0 %)		1(5,6%)	0(0,0 %)	0(0,0 %)		
Histopatologický nálezn										
Probable UIP	58(27,6 %)	25(26,6 %)	31(29,2 %)	2(20,0 %)	0,912	19(23,2 %)	9(22,0 %)	30(34,5 %)	0,505	
Possible UIP	12(5,7 %)	7(7,4 %)	5(4,7 %)	0(0,0 %)		5(6,1 %)	1(2,4 %)	6(6,9 %)		
Unclassifiable fibrosis	5 (2,4 %)	3 (3,2 %)	2 (1,9 %)	0 (0,0 %)		1(1,2 %)	1(2,4 %)	3(3,4 %)		
Inconsistent with UIP	8 (3,8 %)	4 (4,3 %)	4 (3,8 %)	0 (0,0 %)		3(3,7 %)	1(2,4 %)	4(4,6 %)		
Not done	127 (60,5 %)	55 (58,5 %)	64 (60,4 %)	8 (80,0 %)		54(65,9 %)	29(70,7 %)	44(50,6 %)		
Radiologický nálezn HRCT										
UIP pattern	171 (81,4 %)	75 (79,8 %)	86 (81,1 %)	10 (100,0 %)	0,306	67 (81,7 %)	32 (78,0 %)	72(82,8 %)	0,408	
UIP pattern possible	34 (16,2 %)	15 (16,0 %)	19 (17,9 %)	0 (0,0 %)		12 (14,6 %)	7 (17,1 %)	15(17,2 %)		
Pattern inconsistent with UIP	5 (2,4 %)	4 (4,3 %)	1 (0,9 %)	0 (0,0 %)		3 (3,7 %)	2 (4,9 %)	0(0,0 %)		
HRCT alveolární skóre										
0	65 (41,4 %)	29 (4,3 %)	33 (41,8 %)	3 (50,0 %)	0,769	29 (43,9 %)	14 (48,3 %)	22(35,5 %)	0,523	
1	42 (26,8 %)	20 (2,8 %)	21 (26,6 %)	1 (16,7 %)		16 (24,2 %)	4 (13,8 %)	22(35,5 %)		
2	43 (27,4 %)	19 (26,4 %)	23 (29,1 %)	1 (16,7 %)		18 (27,3 %)	10 (34,5 %)	15(24,2 %)		
3	6 (3,8 %)	3 (4,2 %)	2 (2,5 %)	1 (16,7 %)		2 (3,0 %)	1 (3,4 %)	3(4,8 %)		
4	1 (0,6 %)	1 (1,4 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)		1 (1,5 %)	0 (0,0 %)	0(0,0 %)		
HRCT Intersticiální skóre										
1	15(9,6 %)	4(5,6 %)	9(11,4%)	2(33,3 %)	0,396	6(9,1%)	1(3,4%)	8(12,9 %)	0,020	
2	69(43,9 %)	34(47,2 %)	32(40,5%)	3(50,0 %)		31(47,0%)	11(37,9%)	27(43,5 %)		

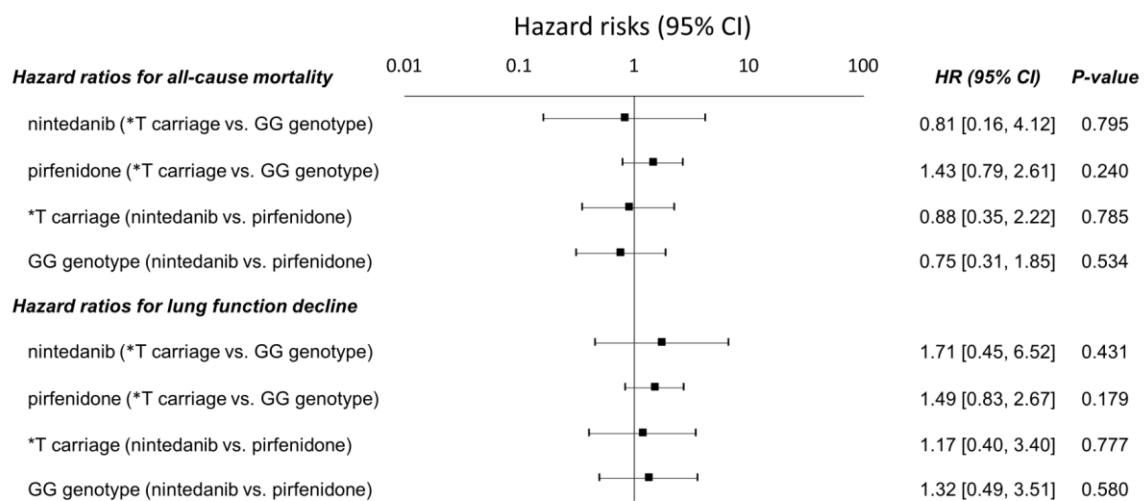
3	53(33,8 %)	23(31,9 %)	29(36,7 %)	1(16,7 %)		15(22,7 %)	13(44,8 %)	25(40,3 %)	
4	19(1,1 %)	10(13,9 %)	9(11,4 %)	0(0,0 %)		14(21,2 %)	4(13,8 %)	1(1,6 %)	
5	1(0,6 %)	1(1,4 %)	0(0,0 %)	0(0,0 %)		0(0,0 %)	0(0,0 %)	1(1,6%)	
Neutrofilní granulocyty (%)									
	7,00(0,00;30,00)	5,00(0,00;47,00)	7,00(0,00;30,00)	5,90(3,00;15,00)	0,158	5,00(0,00;24,00)	5,60(1,00;30,00)	7,00(1,00;51,00)	0,364
Neutrophil gr >3 %	121(69,9 %)	46(59,7 %)	67(77,0 %)	8(88,9 %)	0,025	45(66,2 %)	25(71,4 %)	51(72,9 %)	0,678
Lymfocyty (%)									
	8,00(1,00;32,00)	7,00(1,60;38,00)	8,00(1,00;29,00)	9,00(1,80;17,00)	0,956	8,20(1,60;33,00)	6,00(1,00;20,00)	7,00(2,00;38,00)	0,478
Lymfocytes > 15 %	34(19,5 %)	15(19,0 %)	18(20,9 %)	1(11,1 %)	0,768	14(20,6 %)	6(16,7 %)	14(20,0 %)	0,884
Kouření									
Ex-smoker	100(47,6 %)	44(46,8 %)	50(47,2 %)	6(60,0 %)	0,950	42 (51,2 %)	19 (46,3 %)	39 (44,8 %)	0,868
Smoker	2 (1,0 %)	1 (1,1 %)	1 (0,9 %)	0 (0,0 %)		1 (1,2 %)	0 (0,0 %)	1 (1,1 %)	
Non-smoker	108 (51,4 %)	49 (5,1 %)	55 (51,9 %)	4 (40,0 %)		39 (47,6 %)	22 (53,7 %)	47 (54,0 %)	
Medication									
Pirfenidone	127 (60,5 %)	61 (64,9 %)	62 (58,5 %)	4 (40,0 %)	0,086	48 (58,5 %)	25 (61,0 %)	54 (62,1 %)	0,865
Nintedanib	40 (19,0 %)	13 (13,8 %)	22 (20,8 %)	5 (50,0 %)		18 (22,0 %)	6 (14,6 %)	16 (18,4 %)	
Non IPF medication	43 (20,5 %)	20 (21,3 %)	22 (20,8 %)	1 (10,0 %)		16 (19,5 %)	10 (24,4 %)	17 (19,5 %)	
Terapeutická odpověď¹	22 (10,5 %)	12 (12,8 %)	10 (9,4 %)	0 (0,0 %)	0,403	7 (8,5 %)	5 (12,2 %)	10 (11,5 %)	0,758

¹ statistical significance was tested by Chi-square test for categorical variables and by Kruskal – Wallis test for continuous variables
FVC – forced vital capacity, DLco – lung diffusion capacity for carbon monoxide

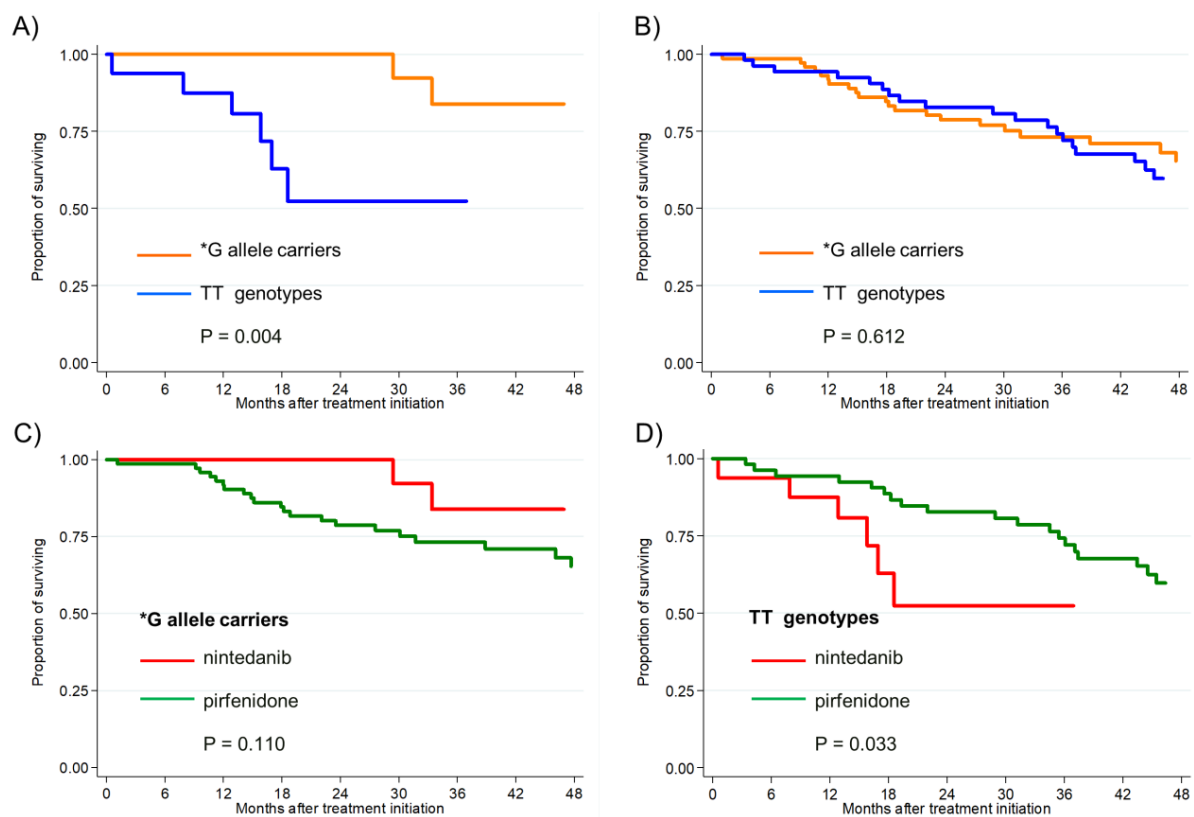
Obrázek 1. Mortalita u pacientů s IPF rozdělená podle nosičství alely MUC5B * T léčené nintedanibem (A) nebo pirfenidonem (B) a srovnání mezi léčbou nintedanibem a pirfenidonem pro nosiče * T alely (C) a GG genotypy (D).



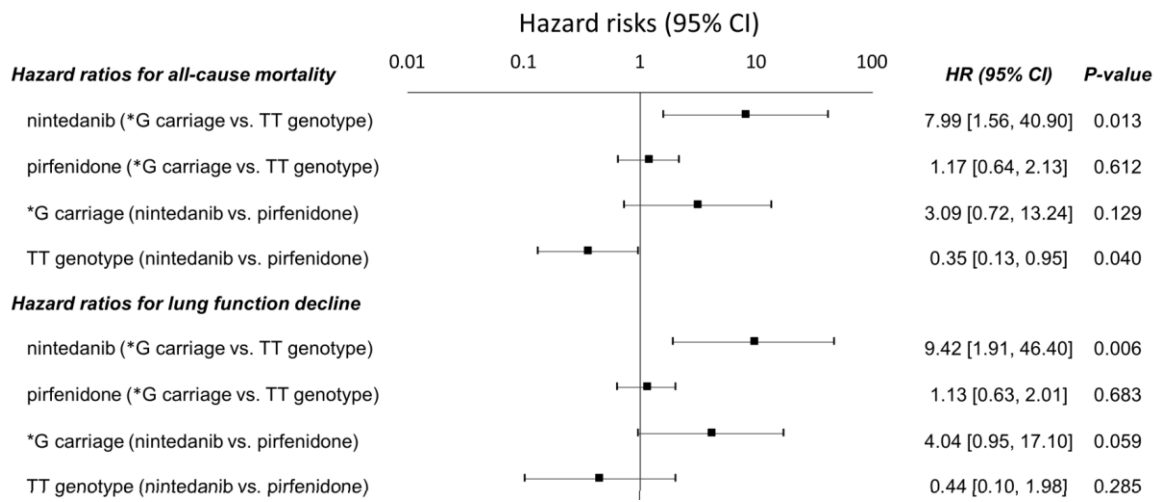
Obrázek 2. Hazard risk pro všechny příčiny smrti a poklesu plicních funkcí u pacientů s IPF s ohledem na MUC5B rs35705950. Hazard risks (HRs) jsou uvedena s 95% intervaly spolehlivosti uvedenými v závorkách.



Obrázek 3. Mortalita u pacientů s IPF podle nosičství alely DSP rs2076295 * G léčené nintedanibem (A) a pirfenidonem (B) a srovnání mezi léčbami nintedanibem a pirfenidonem pro nosiče G* alely (C) a TT (D).



Obrázek 4. Hazard risk pro všechny příčiny a poklesu plicních funkcí u pacientů s IPF vzhledem k variantám DSP rs2076295. Hazard risks (HRs) jsou uvedena s 95% intervaly spolehlivosti uvedenými v závorkách.



2.3. Diagnostika a diferenciální diagnostika idiopatické plicní fibrózy

Běžná intersticiální pneumonie v histopatologickém nálezu patří mezi idiopatické intersticiální pneumonie. Idiopatické intersticiální pneumonie (IIP) prošly mnoha děleními (klasifikacemi) od Liebowa a Carringtona až po současné dělení na hlavní, vzácné a neklasifikovatelné viz kapitola 1.1. UIP je ale termín jak histologický, tak radiologický. UIP v HRCT nálezu neznamena vždy jen diagnózu IPF. Diferenciální diagnostika je široká a zahrnuje chronickou exogenní alergickou alveolitidu, plicní postižení u nemocných se systémovými chorobami pojiva, poléková plicní postižení, azbestózu, familiární IPF, sarkoidózu IV. stádia, syndrom kombinace plicní fibrózy a emfyzému. Široká diferenciální diagnostika UIP je popsána v práci viz kapitola 2.3.1. (Doubková a kol., 2017).

2.3.1. Běžná intersticiální pneumonie nemusí být jen idiopatickou plicní fibrózou (Doubková M, Richter S. Stud. Pneumol. Phtiseol. 2017; 77(3): 115-126)

115

STUD. PNEUMOL. PHTHISEOL., 77, 2017, č. 3, s. 115–126

Běžná intersticiální pneumonie nemusí být jen idiopatickou plicní fibrózou

M. Doubková¹, S. Richter²

¹Klinika nemocí plicních a TBC, Fakultní nemocnice Brno
a Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, Brno;

²Klinika radiologie a nukleární medicíny, Fakultní nemocnice Brno
a Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, Brno

SUMMARY

Usual interstitial pneumonia may not only be idiopathic pulmonary fibrosis

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is characterized by radiological and histopathological findings of usual interstitial pneumonia (UIP). However, the presence UIP does not always mean a diagnosis of IPF. The aim of this paper is to focus on the differential diagnosis of diseases associated with the radiological picture of UIP.

Key words: differential diagnosis, HRCT of the chest, usual interstitial pneumonia

SOUHRN

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je charakterizována radiologickým a histopatologickým nálezem běžné intersticiální pneumonie (usual interstitial pneumonia). Nicméně přítomnost UIP neznamená vždy diagnózu IPF. Cílem práce je zaměřit se na diferenciální diagnostiku nemocí spojených s radiologickým obrazem UIP.

Klíčová slova: běžná intersticiální pneumonie, diferenciální diagnostika, HRCT hrudníku

ÚVOD

Běžná intersticiální pneumonie (UIP – usual interstitial pneumonia) v histopatologickém nálezu patří mezi idiopatické intersticiální pneumonie (IIP – idiopathic interstitial pneumonia). IIP prošly mnoha děleními (klasifikacemi) od Liebowa a Carringtona až po současné dělení na hlavní, vzácné a neklasifikovatelné [1,2]. UIP je ale termín jak histologický, tak radiologický. UIP v HRCT nálezů neznamená vždy jen diagnózu idiopatické plicní fibrózy (IPF). Diferenciální diagnostika je široká a zahrnuje chronickou exogenní alergickou alveolitidu, plicní postižení u nemocných se systémovými chorobami pojiva, poléková plicní postižení, azbestózu, familiární IPF, sarkoidózu IV. stadia, syndrom kombinace plicní fibrózy a emfyzému.

Diferenciální diagnostika UIP

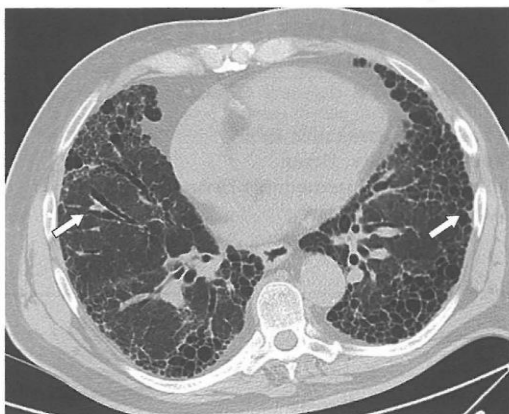
Idiopatická plicní fibróza

IPF je specifická forma chronické progredující fibrotizující intersticiální pneumonie, postihující pouze plicce a spojená s histopatologickým a/nebo

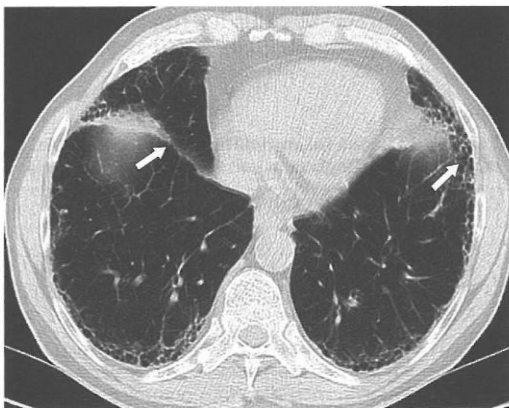
radiologickým obrazem UIP. IPF trpí kolem 5 milionů lidí na celém světě [2,3]. V ČR není aktuální

Tabulka 1: Běžná intersticiální pneumonie v HRCT nálezů. Podle Raghuva a kol. [3]

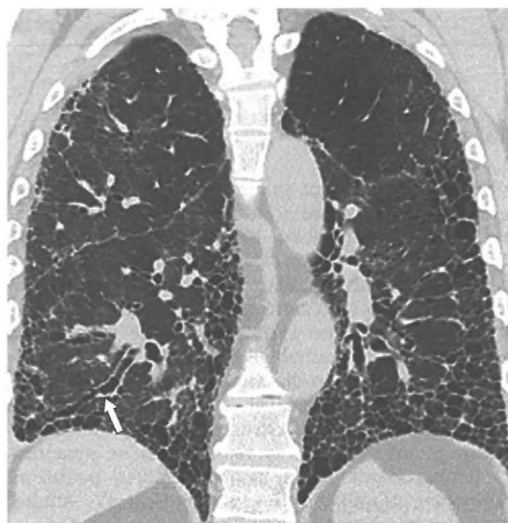
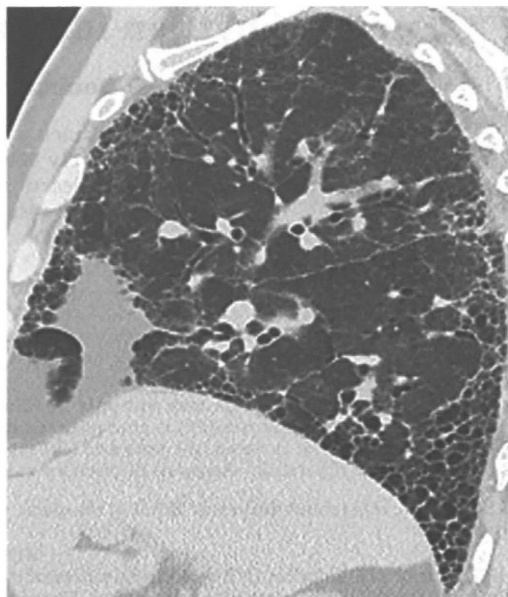
Čtyři kritéria typické UIP v HRCT nálezů
1. Retikulace.
2. Maximum změn subpleurálně a bazálně.
3. Voštiny (klastery neboli seskupení tenkostěnných cyst o průměru 3–10 mm) ± bronchiektázie.
4. Změny nekonzistentní s UIP (maximum změn v horních a středních lalocích, změny peribronchovaskulární, rozsáhlá mikronodulace, cysty mimo voštinu, mozaiková perfuze a air trapping, konsolidace v lalocích).
Tři kritéria možné UIP v HRCT nálezů
1. Retikulace.
2. Maximum změn subpleurálně bazálně.
3. Nepřítomnost změn konzistentních s UIP (viz bod. 4).

Obrázek 1: Pokročilá forma idiopatické plicní fibrózy

HRCT hrudníku-axiální řez. Obraz typické UIP u pokročilé formy idiopatické plicní fibrózy zachycuje voštinovitou přestavbu v dolních plicních lalocích s maximem v subpleurální a dorzobazální lokalizaci (šipka vlevo). „Voština“, český ekvivalent anglického „honeycombing“, je tvořena dobře ohraničenými cystickými lézemi, většinou s tenkou stěnou (šíře 1–3 mm). Vpravo patrné trakční bronchiektázie (šipka vpravo) větví pro střední lalok. Ve zbylém plicním parenchymu četné jemné retikulární opacity, prakticky bez výskytu denzit mléčného skla, bez konsolidací plicního parenchymu – tedy všechny změny zapadající do vzorce typické UIP.

Obrázek 2: Méně pokročilá forma IPF

HRCT-axiální řez. Obraz méně pokročilé typické UIP s méně nápadnými změnami v subpleurální lokalizaci s jen minimální voštinovitou přestavbou plicního parenchymu (šipka vlevo) dorzobazálně v dolních lalocích, ventrobazálně ve středním laloku vpravo, resp. lingule vlevo. Vpravo zachycené zesílené hlavní interlobium odělující horní a střední lalok (šipka vpravo). Opět jemné retikulace, bez nodulárních opacit.

Obrázky 3 a 4: Odlišení voštiny a bronchiektázií

HRCT hrudníku – koronální (obr. 3) a sagitální (obr. 4) řezy napomáhají k odlišení trakčních bronchiektázií (označeny šipkou) od voštiny, zvláště u pokročilých forem IPF. Dobře vystihují i apikobazální gradient postižení plicního parenchymu s maximem subpleurálních změn a relativním ušetřením plicních hrotů u obrazu typické UIP.

epidemiologická situace známa, ale nemoc má stoupající výskyt [4]. Nové poznatky etiopatogeneze IPF zcela změnily pohled na její léčebné možnosti, proto je IPF předmětem zájmu pneumologů v posledních několika letech. IPF se vyskytuje s vyšší četností u mužů než u žen [2,3,5]. Etiologie nemoci není známa [5]. Průměrná doba stanovení diagnózy od prvních příznaků se pohybuje od 6 měsíců do 2 let [4]. Nejčastějšími symptomy v době diagnózy jsou suchý kašel a střední až těžký stupeň dušnosti při zátěži. Paličkovité prsty jsou přítomny u 50 % případů a jsou spojeny s pokročilým stadiem [2,3]. Etiopatogeneze paliček (clubbing finger) není přesně známa, ale předpokládá se vliv chronické aktivity makrofágů a produkce profibrotických reparačních faktorů [4]. Medián přežití se pohybuje od 2 do 5 let od stanovení u neléčených pacientů. Příčina smrti je obvykle respirační selhání [3]. Nejčastějšími komorbiditami u IPF jsou diabetes mellitus, ischemická choroba srdeční a gastroezofageální reflux [4].

Medián věku v době stanovení diagnózy nemocných s IPF je 60–70 let [3]. Rizikovými faktory jsou kouření cigaret, expozice prachům organickým i anorganickým, gastroezofageální reflux, infekce [4]. Klinický průběh IPF neumíme jasně předpovídat a kritéria progresu IPF nejsou zcela dobře definována [4]. Známe tři rozdílné průběhy nemoci. Větší část pacientů vykazuje pozvolný pokles plicních funkcí, někteří jsou dlouhodobě stabilní, zejména starší nad 75 let a asi 10–20 % má rychlý pokles plicních funkčních parametrů [3,5]. AE-IPF (akutní exacerbace) je popsána u 5–10 % všech IPF pacientů [3], mortalita je vysoká, pohybující se mezi 50 až 100 % [4]. AE je asociována se zhoršením klinickým, funkčním i změnou radiologického nálezu [3]. Tabulka 1 ukazuje HRCT nálezy u UIP/IPF. Tabulka 2 obsahuje

Tabulka 2: Diagnostická kritéria idiopatické plicní fibrózy. Korelace HRCT nálezu a histopatologického nálezu. Podle Raghua [3] a Vašákové [6]

HRCT nálezu	Histopatologie	Diagnóza UIP
UIP	UIP pravděpodobná UIP možná UIP neklasifikovatelná fibróza nejde o UIP	ANO ANO ANO ANO NE
Možná UIP	UIP pravděpodobná UIP možná UIP neklasifikovatelná fibróza nejde o UIP	ANO ANO pravděpodobná pravděpodobná NE
Pravděpodobná UIP	UIP pravděpodobná UIP možná UIP neklasifikovatelná fibróza nejde o UIP	možná NE NE NE NE

Tabulka 3: Familiární idiopatická intersticiální pneumonie (FIIP) v HRCT nálezu

1. Radiologické nálezy jsou u familiární IIP prakticky neodlišitelné od sporadických forem, u kterých není rodinný výskyt IIP.
2. Nálezy na HRCT hrudníku závisí na typu IIP.
3. V rodinách se vyskytují tyto kombinace IIP: UIP a NSIP; UIP, NSIP, a COP; UIP, NSIP a RB-ILD; UIP a neklasifikovatelná intersticiální plicní fibróza; nebo UIP a hypersenzitivní pneumonie.

COP – kryptogenní organizující se pneumonie, IIP – idiopatická intersticiální pneumonie, NSIP – nespecifická intersticiální pneumonie, RB-ILD – respirační bronchiolitis s intersticiálním plicním postižením, UIP – běžná intersticiální pneumonie

Tabulka 4: Pomoc při diagnostice familiárních idiopatických intersticiálních pneumonií

1. Familiární IIP je definována tehdy, když onemocnění postihuje 2 nebo více členů rodiny.
2. U příslušníků jedné rodiny může být přítomno několik fenotypů fibrotizujících intersticiálních plicních procesů.
3. Pacienti s IPF/UIP jsou ve srovnání s pacienty se sporadickou IPF mladšího věku (i mladší 50 let).
4. Způsob dědičnosti je pravděpodobně autozomálně dominantní s neúplnou penetrancí.
5. Kouření a životní prostředí má vliv na vývoj onemocnění u pacienta s genetickou predispozicí. Jako vhodný diagnostický postup u asymptomatických členů rodiny, ve které se vyskytuje familiární IIP, je provedení klinického a plicního funkčního vyšetření, zadopředního skiaogramu hrudníku (HRCT hrudníku), a to zejména u rizikové skupiny kuřáků.

Vysvětlivky: IIP – idiopatická intersticiální pneumonie

Tabulka 5: Systémová onemocnění pojiva a HRCT nálezy

1. Nález závisí na typu IPP (UIP, NSIP, DIP, RB-ILD, AIP, LIP, OP)
2. Systémová sklerodermie: UIP, NSIP. UIP neodlišitelná od IPF
3. Revmatoidní artritida: UIP, OP, revmatoidní noduly, pleurální výpotky
4. Polymyozitida/dermatomyozitida: OP, NSIP, UIP
5. Sjögrenův syndrom: LIP, NSIP, UIP
6. Systémový lupus erythematosus: akutní lupusová pneumonitis, difuzní alveolární hemoragie
7. Radiologický obraz je ovlivněn infekční komplikací nebo nežádoucím účinkem léků (metotrexat, soli zlata, penicilamin, sulfasalazin, rituximab)

Vysvětlivky: AIP – akutní intersticiální pneumonie, DIP – deskvamativní intersticiální pneumonie, LIP – lymfatická intersticiální pneumonie, NSIP – nespecifická intersticiální pneumonie, OP – kryptogenní organizující pneumonie, RB-ILD – respirační bronchiolitis asociovaná s intersticiálním plicním postižením

Tabulka 6: Pomoc při diagnostice systémových onemocnění pojiva (SOP)

1. Na SOP pomýšlíme tehdy, pokud nacházíme v klinickém obraze jednak kombinaci různých typů postižení téhož systému, nebo při současném zdnlivě nesouvisejícím postižení různých orgánů a tkání.
2. U každého pacienta s IPP pomýšlíme na autoimunitní onemocnění a odebíráme panel základních autoprotilátek.
3. Celkové příznaky nemoci (hubnutí, teploty, pocení), postižení kloubů, svalů, fotosenzitivita, kožní eflorescence, radiální rýhy kolem úst, sklerodaktylie, paličkovité prsty, změny na nehtech, teleangiektázie, vazospastické fenomény Raynaudova typu (akrohypotermie s akrocyanózou a hyperhidrózou na rukou), oční záněty, recidivující nekrotizující aftózní stomatitidy, bolesti hlavy, opakované pleuritidy, suchosti sliznic, poruchy motility jícnu, podkožní kalcifikace, chronické těžké záněty vedlejších nosních dutin, glomerulonefritidy v minulosti, dlouhotrvající nevysvětlené zvýšené sedimentace erytrocytů, leukopenie, anémie, trombocytopenie, bolestivé zduření chrupavek nosu, ušních boltců, sternokostálních spojení, první projevy onemocnění po porodu nebo potratu.
4. 15–20 % pacientů s chronickou IPP může mít frustní (plně nevyjádřenou) formu SOP, nebo se může SOP následně plně vyvinout.
5. U pacientů s dušností nebo snížením plicní difuze nebo desaturací během cvičení, zvláště pokud je nesoulad s rozsahem postižení na radiologickém nálezu, zvažujeme plicní hypertenzi.

Tabulka 7: Detekovatelné autoprotilátky u systémových onemocnění pojiva. Podle Bonella [15]

Systémové onemocnění pojiva	Detekovatelné autoprotilátky
Systémová sklerodermie	ANA, anti-topoizoméráza I (Scl70), anti-centromera, RF
Revmatoidní artritida	ANA, RF, anti-CCP
Polymyozitida/dermatomyozitida	ANA, anti-aminoacyl-tRNA (anti-histidyl Jo1), anti-PL7, anti-PL12), anti-MDA5, anti-PM-Scl, anti-Mi-2
Systémový lupus erythematosus	ANA, anti-dsDNA, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Sm, protilátky proti fosfolipidům (APLA) Největší diagnostický význam má anti-dsDNA
Sjögrenův syndrom	ANA, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, RF
Smišené onemocnění pojiva	ANA, anti-U1-RNP, RF, anti-CCP
Nediferencované onemocnění pojiva	ANA, RF, anti-Scl-70, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Jo-1, anti-U1-RNP

Vysvětlivky: ANA – antinukleární protilátky, CCP – cyklický citrulinový peptid, dsDNA – protilátky proti dsDNA, Jo1 – histidyl-tRNA syntetáza, MDA5 – gen asociovaný s diferenciací melanomu, kódující RNA helikázu, anti-Mi-2 – antinukleární protilátka, RF – revmatoidní faktor, Scl70 – topoizoméráza I, SS-A, SS-B (Ro, La) – protilátky u Sjögren syndromu, U1-RNP – ribonukleoprotein

diagnostická kritéria UIP/IPF. Obrázky 1–4 jsou HRCT nálezy UIP/IPF s voštinovitou přestavbou a všemi dalšími kritérii typické UIP.

Familiární forma idiopatické intersticiální pneumonie

Familiární IIP (FIIP) je definována jako onemocnění, které postihuje 2 nebo více členů téže rodiny, u nichž byly zjištěny klinické a histologické znaky intersticiální pneumonie [6]. Celkem bylo ve světě popsáno více než 200 rodin s familiární IIP. U příslušníků jedné rodiny může být přítomno několik fenotypů fibrotizujících intersticiálních plicních procesů. Nejčastěji pozorovaným fenotypem zaznamenaným v rodinách s IIP je fenotyp IPF/UIP.

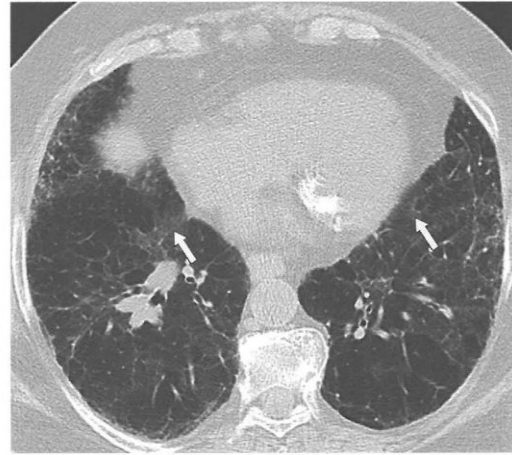
Přesná prevalence familiární IIP není známa a odhaduje se, že podle současných poznatků tvoří 0,5–3,7 % ze všech nemocných s IPF [6]. Způsob dědičnosti je pravděpodobně autozomálně dominantní s neúplnou penetrancí [7]. U FIIP včetně familiární IPF je začátek nemoci posunut do mladšího věku, nejsou výjimkou pacienti mladší 50 let, na rozdíl od sporadické formy IPF (bez familiárního výskytu), která se diagnostikuje obvykle ve středním a vyšším věku. Histopatologické nálezy u pacientů (členů jedné rodiny) s familiární IIP jsou heterogenní a vliv na typ IIP má vzájemné působení genetické predispozice a zevního prostředí. Ve studii Steele a kol. bylo zjištěno hned několik histopatologických subtypů IIP (běžná intersticiální pneumonie, kryptogenní organizující, nespecifická intersticiální pneumonie) u členů jedné rodiny [8]. V rodinách se vyskytují tyto kombinace IIP: UIP a NSIP; UIP, NSIP a COP; UIP, NSIP a RB-ILD; UIP a neklasifikovatelná intersticiální plicní fibróza; nebo UIP a hypersenzitivní pneumonie. Tabulka 3 popisuje změny v HRCT nálezu u FIIP. Tabulka 4 obsahuje pomoc při diagnostice FIIP. Obrázek 5 ukazuje HRCT nález a FIIP.

Systémová onemocnění pojiva (SOP) – zejména revmatoidní artritida a systémová sklerodermie

U SOP vidíme postižení dýchacích cest, alveolů, plicních cév, pleury a hrudní stěny. Jednotlivá intersticiální plicní postižení zahrnují: AIP – akutní intersticiální pneumonie, UIP, LIP – lymfocytární intersticiální pneumonie, BOOP (OP) – bronchiolitis obliterans organizující se pneumonie, NSIP – nespecifická intersticiální pneumonie, DIP – deskvamativní intersticiální pneumonie, DAH – difúzní alveolární hemoragie, granulomatózní plicní postižení, CPFE – kombinace plicní fibrózy a emfyzému. V raných studiích byla za nejběžnější histopatologický obraz u IPP-SOP považována UIP [9]. S lepší definicí jednotlivých histologických obrazů došlo k upřesnění nálezů a v několika případech

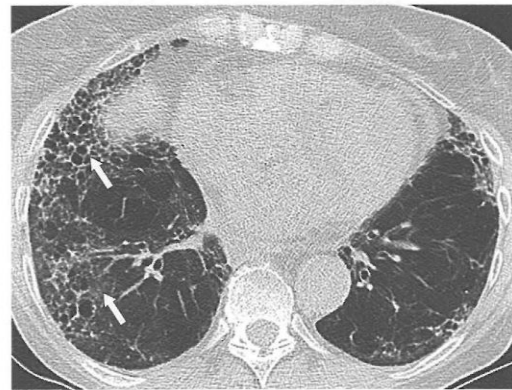
byla UIP překlasifikována na NSIP. Ve studii autorů Bouros a et al. [10] byla u 80 pacientů se SS

Obrázek 5: Familiární forma IIP, fibrotizující varianta NSIP



HRCT – axiální řez. Obraz fibrotizující varianty NSIP zachycuje oboustranné poměrně symetrické okrsky denzit mléčného skla (šípky) v dolních lalocích, spíše s difúzní než subpleurální distribucí změn. Méně retikulárních opacit a trakčních bronchiektází, bez voštinovité přestavby.

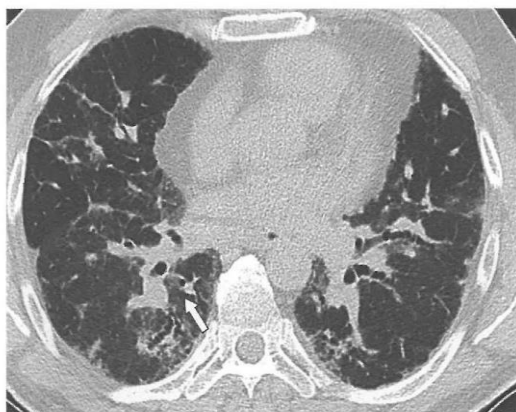
Obrázek 6: Obraz UIP u systémové sklerodermie



HRCT – axiální řez. Obraz typické UIP u pacienta se sklerodermií, nerozeznatelný od UIP/IPF. Voštinovitá přestavba s maximem v subpleurálních lokalitách středního a dolního laloku vpravo (ventrálnější šípka), nečetné denzity mléčného skla vpravo (dorzálnější šípka) a četnější retikulární opacities subpleurálně.

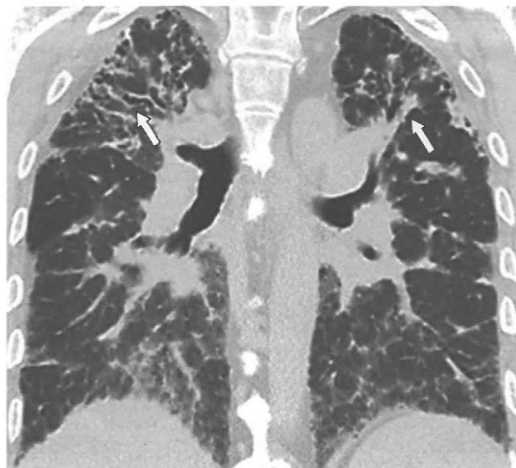
provedena plicní biopsie, u 62 z nich byla potvrzena NSIP a jen u 6 UIP. Ve studii autorů Tansey

Obrázek 7: Chronická forma exogenní alergické alveolity



HRCT – axiální řez. Fibrózní změny jsou u chronické EAA více centrálně, resp. peribronchiálně a bronchiolocentricky (šipka vpravo), postiženy jsou více horní a střední laloky. V důsledku bronchiální obstrukce menší okrsky mozaikovitě perfuze. Dále retikulace, centrilobulární a peribronchiální noduly, přítomny i denzity mléčného skla.

Obrázek 8. Peribronchiální postižení u chronické exogenní alergické alveolity



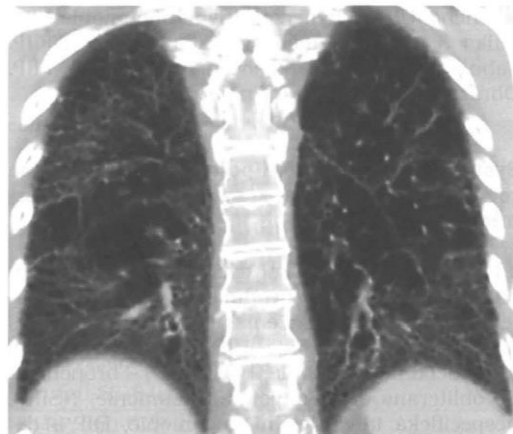
HRCT – koronální řez. Ukazuje predominanci fibrózních změn v horních a středních lalocích, bronchiolocentricky a peribronchiálně (šipka vlevo). Přítomnost trakčních bronchiektázií a voštiny nevelkého rozsahu v horním laloku vpravo (šipka vpravo).

et al. byla NSIP rovněž nejběžnějším patologicko-anatomickým nálezem u polymyozitidy/dermatomyozitidy spolu s organizující pneumonií [11]. U revmatoidní artritidy je větší zastoupení UIP než NSIP [12,13]. Většina nemocných s RA a plicní fibrózou jsou mladší než ti s idiopatickou UIP. U Sjögrenova syndromu nacházíme LIP, NSIP, UIP [14]. U smíšených onemocnění pojiva je hlavním histopatologickým příznakem NSIP [9]. Tyto IIP u SOP mají podobné radiologické a histologické charakteristiky jako jejich idiopatické formy, ale existuje mezi nimi signifikantní rozdíl v přežití. Tabulka 5 popisuje SOP a HRCT nálezy, tabulka 6, 7 pomocná diagnostická kritéria [15]. Na obrázku 6 je HRCT nález UIP u SOP.

Tabulka 8: Exogenní alergická alveolita v HRCT nález. Podle Jacoba a Wuytse [16 a 17]

1. Fibrózní změny jsou více bronchiolocentricky, nikoliv subpleurálně a bazálně.
2. Retikulace a trakční bronchiektázie.
3. Maximum změn ve středních a horních lalocích.
4. ± Mozaiková perfuze a air trapping.
5. ± Denzity mléčného skla.
6. ± Centrilobulární, peribronchiální noduly.
7. ± Voština.

Obrázek 9: HRCT hrudníku a „cystostatická plic“ (reakce na terapii busulfanem)



HRCT – koronální řez. Fibrózní změny s převahou retikulárních opacit, fibrózních pruhů s maximem změn dorzobazálně, subpleurálně, kde voštinovitá přestavba. Výraznější fibrózní postižení, ale i horního laloku vpravo. Nález u polékového postižení je nespecifický, variabilní, může probíhat i pod obrazem UIP.

Tabulka 9: Pomoc při diagnostice exogenní alergické alveolitidy

1. Historie expozice antigenu a vznik klinických příznaků.
2. Inspirační chrůpky až krepitace nebo drobné pískoty v inspiriu (projev bronchiolitidy).
3. HRCT nálezy viz výše (pro subakutní formu EAA: opacity mléčného skla, centrilobulární noduly, mozaiková perfuze a air trapping).
4. BAL: lymfocytární alveolitida ale i norma nebo neutrofilní alveolitida, snížený poměr CD4+/CD8+ < 1 (může být v normě nebo zvýšený).
5. Průkaz specifických IgG metodou ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).
6. Histopatologicky: UIP, fibrotizující NSIP, bronchiolocentrická fibróza, granulomy. Kombinace těchto změn. Predilekce v horních lalocích.

Tabulka 10: Polékové plicní postižení v HRCT nálezu

1. Radiologický nálezy je nespecifický a odpovídá různým typům postižení.
2. Postižení na úrovni dýchacích cest: obliterující bronchiolitida (BO, BOOP).
3. Postižení na úrovni intersticia a alveolů: pneumonitidy až fibróza (DAH, AIP, HP, PAP, UIP).
4. Poškození s převahou vaskulárních změn (nekardiální plicní edém, ARDS, vaskulitidy, plicní hemoragie).
5. Postižení pleury: pleurální výpotky ± postižení plicního intersticia.
6. Postižení mediastina: mediastinální lipomatóza, fibróza, lymfadenopatie.

Vysvětlivky: AIP – akutní intersticiální pneumonie, ARDS – akutní respirační dechová nedostatečnost, BO – obliterující bronchiolitida, BOOP – organizující se pneumonie s obliterující bronchiolitidou, DAH – difúzní alveolární hemoragie, EAA – exogenní alergická alveolitida, PAP – plicní alveolární proteinóza, UIP – běžná intersticiální pneumonie

Tabulka 11: Pomoc při diagnostice polékového postižení plic

1. Seznam léků způsobujících polékové plicní postižení: www.pneumotox.com
2. Klinický a radiologický obraz je variabilní a závislý na typu postižení.
3. Léky mohou vyvolávat imunitní reakce: plicní infiltráty, často migrující, s eozinofilií v BALu ± periferní eozinofilie; polékové granulomatózy, lipidní pneumonie, systémové vaskulitidy. Polékový lupus like syndrom – systémové postižení jako u SLE.
4. V BALte: lymfocytární, eozinofilní alveolitida. U DAH: hemoragické zbarvení s vyšší příměsí siderofágů (nad 20–30 %), u amiodaronové plíce pak pěnivé makrofágy vyplněné lipidovými inkluzemi.
5. Zmírnění či vymizení potíží nebo regrese radiologického nálezu po vysazení léku podporuje diagnózu polékového postižení. Výjimkou je přechod do nevratné plicní fibrózy.

Vysvětlivky: BALte – bronchoalveolární tekutina, DAH – difúzní alveolární hemoragie, SLE – systémový lupus erythematoses

Chronická exogenní alergická alveolitida

Exogenní alergická alveolitida (EAA), známá i jako hypersenzitivní pneumonitida (HP), patří do skupiny onemocnění zvaných difúzní parenchymatózní nemoci plic neboli intersticiální plicní nemoci (IPP). Pojmy hypersenzitivní a alergická jsou mírně zavádějící vzhledem k tomu, že se nejedná o atopické a alergické onemocnění spojené se zvýšeným počtem eozinofilů a tvorbou imunoglobulinu E. Pojem alveolitida rovněž nevystihuje skutečnost, protože onemocnění postihuje nejen plicní

alveoly, ale i plicní intersticiem a dýchací cesty. Klinické formy jsou akutní, subakutní a chronická.

Tabulka 8 ukazuje HRCT nálezy u EAA, tabulka 9 diagnostické kroky. Na obrázku 7 a 8 je chronická forma EAA na HRCT hrudníku.

Poléková plicní postižení

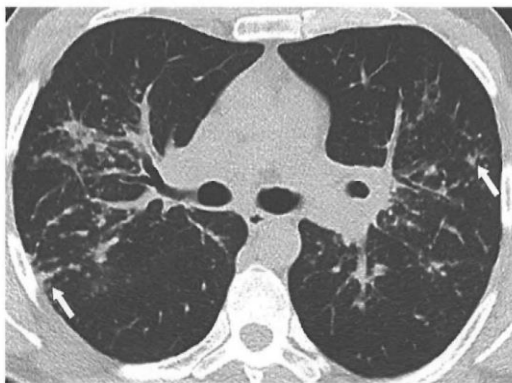
Existuje cca 400 léků, se kterými jsou spojena nežádoucí poléková plicní postižení. Jejich mecha-

nismus je přímý toxický účinek (kyslíkové radikály), nepřímý toxický účinek (systém proteáz a anti-proteáz) a hypersenzitivní reakce. Léky, se kterými se setkáváme v ambulanci pro intersticiální plicní procesy často a které způsobují intersticiální pneumonitidu až plicní fibrózu, jsou například cytostatika (bleomycin, busulfan), amiodaron. Plicní toxicita se obvykle může projevit po jakémkoliv dávce a v jakémkoliv čase [18]. Histologické a radiologické nálezy jsou rozmanité a necharakteristické. Tabulka 10 obsahuje HRCT nálezy u polékových postižení a tabulka 11 pomoc při diagnostice. Obrázek 9 ukazuje HRCT hrudníku a reakci na léčbu busulfanem.

Tabulka 12: Fibrotizující sarkoidóza (sarkoidóza IV. stadia) v HRCT nálezu. Podle Jacoba [16]

1. Mikronoduly v perilymfatické distribuci.
2. Maximum změn v horních a středních plicních lalocích.
3. Distorze plicní architektiky.
4. ± Konsolidace.
5. Galaxy sign u progresivní fibrózy (viz popis – obrázek 10).
6. ± Voština.

Obrázek 10: Sarkoidóza, chronická fibrózní forma



HRCT – axiální řez pod úrovní bifurkace. Dominují noduly v perilymfatické distribuci zejména horních laloků, které nepravidelně zesilují interlobulární septa. Větší shluky nodulů někdy vytvářejí „galaxy sign“ (šipka vlevo) – jelikož připomínají obraz galaxie. U fibrózní formy sarkoidózy je porušena plicní architektika, často apikalizované hily a subpleurálně může být obraz drobných konsolidací (šipka vpravo).

Sarkoidóza

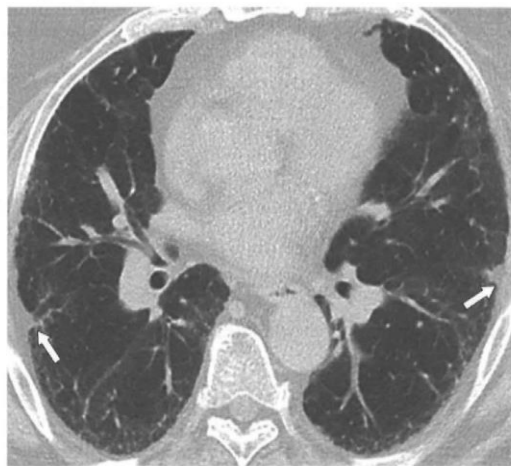
Sarkoidóza je systémové granulomatózní onemocnění neznámé etiologie s plicními a mimoplicními projevy. Toto onemocnění patří mezi záhady medicíny nejen kvůli nedostatečně poznané etiologii, ale i kvůli pestrosti klinických příznaků. Historie poznávání nemoci spadá do 19. století [19,20, 21].

Sarkoidóza ve většině případů obraz UIP nedělá. Pokročilá forma sarkoidózy může mít obraz voštinovité přestavby s centrálními bronchiectáziemi, ale v jiné lokalizaci než u UIP/IPF [22,23]. Tabulka 12 obsahuje HRCT nálezy u chronické formy sarkoidózy a tabulka 13 pomoc při diagnostice. Obrázek 10 ukazuje HRCT hrudníku a chronickou fibrózní formu.

Azbestóza

Pneumokonióza je charakterizována pomalu progredující intersticiální plicní fibrózou, způsobenou expozicí vláknům azbestu. Tabulka 14 popisuje HRCT nálezy u azbestózy a tabulka 15 je pomocí při diagnostice. Na obrázku 11 je HRCT nález u azbestózy.

Obrázek 11: Azbestóza



HRCT – axiální řez. Fibróza s převahou retikulárních opacit s maximum postižení subpleurálně a bazálně, obdobně jako u IPF. Výraznější je však postižení pleury. Zesílení pleury, až prorůstání fibrózních lézí pleury do intersticia (šipky), někdy vytváří obraz „crow's feet“.

Tabulka 13: Pomoc při diagnostice sarkoidózy

8. Nespecifické příznaky: teploty, noční poty, hubnutí. V 30 % případů asymptomatický průběh.
9. Klinické příznaky: často systémové postižení. Podobně jako SLE je sarkoidóza „magna simulatrix“ = napodobující různá onemocnění.
10. Zobrazovací metody: stadia 0–IV., HRCT nálezy viz výše.
11. Laboratorní diagnostika: kalcemie, kalciurie, angiotensin konvertující enzym, neopterin, solubilní interleukin 2.
12. Nález lymfocytární alveolity ale i neutrofilní alveolity u fibrózy, CD4+/CD8+≥3,5; ale může být i snížen nebo v normě.
13. Histopatologický nález nenekrotizujících granulomů. Fibrinoidní nekróza u 20 % případů.
14. Terapeutická odpověď na systémové kortikoidy.

Vysvětlivky: CD4+/CD8+ – poměr pomahačských: cytotoxickým T lymfocytům v bronchoalveolární tekutině

Tabulka 14: Azbestóza v HRCT nálezu. Podle Copleyové [24]

1. Kombinace plicních a pleurálních změn.
2. Obraz plicní fibrózy s retikulacemi na plicních bázích a šířící se kranálně.
3. ± Voššina je ve stejné lokalizaci jako IPF.
4. Pleurální hyalinóza: ohraničené léze pleury, pleuritidy, pleurální výpotky, difuzní pleurální ztlustění, kalcifikované ztlustění pleury, apikální pleurální ztlustění.
5. Okrouhlé atelektázy při hrudní stěně (prorůstání fibrózních lézí pleury do intersticia s deformací bronchů) – vrání nohy (crow's feet).
6. ± Emfyzém v horních lalocích.

Tabulka 15: Pomoc při diagnostice azbestózy

1. Expozice azbestu – starší budovy, brzdová obložení, střešní krytiny, obklady.
2. Nemoci vyvolané azbestem: azbestóza, hyalinóza pohrudnice, mezoteliom pohrudnice nebo pobřišnice, rakovina plic ve spojení s hyalinózou pleury nebo azbestózou.
3. Latence 15–30 let mezi expozicí a vznikem onemocnění.
4. Fyzikálním vyšetřením slyšitelné krepitace (nebo jemné inspirační chrůpky), i paličky.
5. Průkaz azbestových tělísek v BAL nebo v plicní biopsii.

Fibrotizující nespecifická intersticiální pneumonie

Je podjednotka IIP, která je na rozdíl od UIP/IPF charakterizována zánětlivými a fibrotickými změnami, které jsou časově uniformní. Existují 3 histologické podtypy NSIP (nespecifická intersticiální pneumonie): buněčný, fibrotický a smíšený. Tabulka 16 a 17 NSIP v HRCT nálezu a pomoc při diagnostice. Obrázek 12 ukazuje HRCT nález s NSIP.

Syndrom kombinace plicní fibrózy a emfyzému

Kombinace plicní fibrózy a emfyzému (CPFE – syndrome of combined pulmonary fibrosis and

emphysema) byla popsána, nikoliv poprvé, v roce 2005 na velkém souboru, čítajícím 61 pacientů [26]. Jde o kombinaci dvou samostatných entit.

Tabulka 16: Obraz nespecifické intersticiální pneumonie v HRCT nálezu. Podle Jacoba [16]

1. Opacity mléčného skla.
2. Retikulace.
3. Distribuce bazálně a periferně, může šetřit subpleurální prostory.
4. ± Voššina malého rozsahu.

Emfyzém je zaznamenán v zahraničních publikacích u 8–28 % nemocných s IPF [27]. Ve studii Sugino et al. byla popsána špatná prognóza pacientů

s CPFE oproti IPF. Pacienti s CPFE s paraseptálním emfyzémem a vyšším systolickým plicním arteriálním tlakem měli kratší dobu přežití [28]. Ta-

Tabulka 17: Pomoc při diagnostice. Podle Tomassettiové [25]

1. Idiopatická NSIP je komplex klinických entit, které zahrnují alespoň 3 různé fenotypy: NSIP s autoimunitními rysy, NSIP s emfyzémem, NSIP jako familiární forma.
2. Dvě základní radiologicko-patologické formy: <ul style="list-style-type: none"> A. „Zánětlivý typ“ s lymfocytární alveolitidou v BALte a plicní biopsii a HRCT nálezem kombinace NSIP/OP s léčebnou odpovědí na kortikosteroidy a jiná imunosupresiva. B. „Fibrotický typ“ bez lymfocytární alveolity v BALte, s fibrózou v plicní biopsii a HRCT nálezem převažujících retikulací a bronchiektázií a špatnou nebo žádnou odpovědí na kortikosteroidy nebo jiná imunosupresiva.

Vysvětlivky: BALte-bronchoalveolární tekutina získaná bronchoalveolární laváží, NSIP-nespecifická intersticiální pneumonie, OP-organizující pneumonie

Tabulka 18: HRCT nález u CPFE

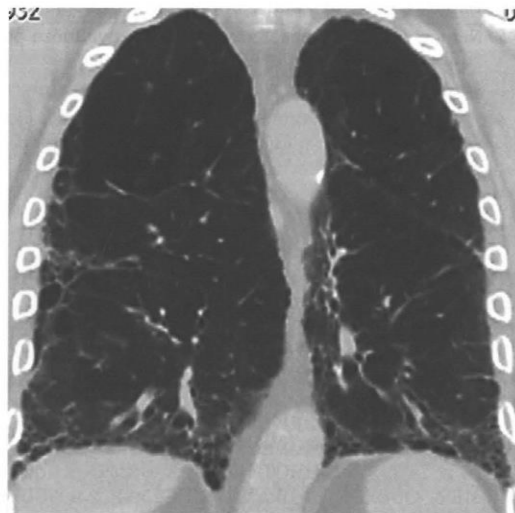
1. Kombinace emfyzému a fibrotizujícího plicního procesu typu UIP nebo NSIP.
2. Nejčastěji jsou emfyzematózní změny v horních plicních polích a v dolních plicních polích je přítomna fibróza.
3. Přítomnost emfyzému znesnadňuje odlišení UIP od NSIP (jemné retikulace, šetření subpleurálních prostor).

Obrázek 12: Nespecifická intersticiální pneumonie



HRCT – axiální řez. Četné opacity mléčného skla (šipka dorzálněji) s šetřením subpleurálních prostor. Vpravo ve středním laloku trakční bronchiektázie (šipka ventrálněji), difuzní retikulace, bez voštinovité přestavby. Typické změny u obrazu NSIP.

Obrázek 13: HRCT nález CPFE. Kombinace emfyzému a fibrózy



HRCT – koronální řez. V horních lalocích dominují objemné emfyzematózní buly. V dolních lalocích a subpleurálně převažují fibrózní změny s voštinovitou přestavbou plicního parenchymu. Emfyzém znesnadňuje odlišení od UIP či NSIP.

Tabulka 19: Pomoc při diagnostice kombinace plicní fibrózy a emfyzému

1. CPFE je častější u mužů a kuřáků.
2. CPFE bývá u systémových onemocnění pojiva (SLE, RA) a u EAA (expozice organickým antigenům), nebo je idiopatický.
3. Plicní funkční vyšetření prokazuje: vyšší TLC (může být i v normě) – důvodem je hyperinflace, nízký poměr FEV ₁ /FVC a nízké DL _{co} .
4. V BALte převažují obvykle neutrofilní leukocyty a/nebo eozinofilní leukocyty.
5. Léčba je neuspokojivá s malým efektem systémové kortikoterapie nebo kombinace imunosupresiv.
6. Prognóza CPFE oproti IPF je v závislosti na studiích různá s ohledem na typ emfyzému, přítomnost plicní arteriální hypertenze.

Vysvětlivky: CPFE – syndrom plicní fibrózy a emfyzému, DL_{co} – difuzní plicní kapacita, FEV₁ – forsírovaná vitální kapacita za 1 sekundu, FVC – forsírovaná vitální kapacita, TLC – totální plicní kapacita.

bulka 18 popisuje HRCT nálezy u CPFE a tabulka 19 je pomocí při diagnostice. Obrázek 13 CPFE a HRCT hrudníku.

ZÁVĚR

Diferenciální diagnostika radiologického obrazu UIP je široká a platí věta, že IPF = UIP, ale UIP ≠ IPF. V rámci diferenciální diagnostiky je neobtížnější odlišení od chronické formy exogenní alergické alveolitidy, UIP u systémových onemocnění pojiva, sarkoidózy IV. stadia a fibrotizující varianty NSIP.

LITERATURA

1. Travis WD, Costabel U, Hansell DM et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188:733–748.
2. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2011. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:277–304.
3. Raghu G, Collard HR, Egan JJ et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183:788–824.
4. Doubková M, Uher M, Bartoš V et al. Prognostické faktory idiopatické plicní fibrózy (IPF) – analýza českého registru IPF. *Cas Lek Cesk* 2016; 155(4):22–28.
5. Vašáková M. Idiopatická plicní fibróza – doporučený postup. <http://www.pneumologie.cz/guidelines/>. Navštíveno dne 11. 1. 2017.
6. Doubková M, Binková I, Skříčková J. Familiární idiopatická intersticiální pneumonie – případ jedné rodiny. *Studia Pneumol Phthiseol* 2013; 73:179–183.
7. Lee HL, Ryu JH, Wittmer MH et al. Familial idiopathic pulmonary fibrosis: clinical features and outcome. *Chest* 2005; 127:2034–2041.
8. Steele MP, Speer MC, Loyd JE et al. Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:1146–1152.
9. Bradley B, Bradley HM, Egan JJ et al. Interstitial lung disease guideline: the British thoracic in collaboration with the thoracic society of Australia and New Zealand and the Irish thoracic society. *Thorax* 2008; 63 Suppl 5:1–58.
10. Bouros D, Wells AU, Nicholson AG et al. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1581–1586.
11. Tansey D, Wells AU, Colby TV et al. Variations in histological patterns of interstitial pneumonia between connective tissue disorders and their relationship to prognosis. *Histopathology* 2004; 44:585–596.
12. Lee HK, Kim DS, Yoo B et al. Histopathologic pattern and clinical features of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Chest* 2005; 127:2019–2027.
13. Nicholson AG, Colby TV, Wells AU. Histopathological approach to patterns of interstitial pneumonia in patient with connective tissue disorders. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2002; 19:10–17.
14. Parambil JG, Myers JL, Lindell RM, Matteson EL, Ryu JH. Interstitial lung disease in primary Sjögren syndrome. *Chest* 2006; 130:1489–1495.
15. Bonela F, Costabel U. Biomarkers in connective tissue disease-associated interstitial lung disease. *Semin Respir Crit Care Med* 2014; 35(2):181–200.
16. Jacob J, Hansell DM. HRCT of fibrosing lung disease. *Respirology* 2015; 20:859–872.
17. Wuyts WA, Cavazza A, Rossi G et al. Differential diagnosis of usual interstitial pneumonia: when is it truly idiopathic? *Eur Respir Rev* 2014; 23:308–319.
18. Vašáková M. Sledování a vyšetřování u pacientů dlouhodobě užívajících léky s významným rizikem plicních imunopatologických a toxických reakcí. <http://www.pneumologie.cz/guidelines/>. Citováno dne 11. 1. 2017.
19. Hunninghake GW, Costabel U, Ando M et al. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1999; 16:149–173.
20. Wells AU, Hirani N. Interstitial lung disease guideline. *Thorax* 2008; 63:1–58.
21. Kolek V. Sarkoidóza. Známé a neznámé. Grada, Praha 1998; s. 239.

22. Valeyre D, Nunes H, Bernaudin JF. Advanced pulmonary medicine. *Curr Opin Pulm Med* 2014; 20:488-495.
23. Shigemitsu H, Azuma A. Sarcoidosis and interstitial pulmonary fibrosis; two distinct disorders or two ends of the same spectrum. *Curr Opin Pulm Med* 2011; 17:303-307.
24. Copley SJ, Wells AU, Sivakumaran P et al. Asbestosis and idiopathic pulmonary fibrosis: comparison of thin-section CT features. *Radiology* 2003; 229:731-736.
25. Tomasetti S, Ryu JH, Piciucchi S, Chilosi M, Poletti V. Nonspecific interstitial pneumonia: what is the optimal approach to management? *Semin Respir Crit Care Med* 2016; 37:378-394.
26. Cottin V et al. Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. *Eur Respir J* 2005; 26:586-593.
27. Mejia M, Carrillo G, Rojas-Serrano J et al. Idiopathic pulmonary fibrosis and emphysema: decreased survival associated with severe pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2009; 136:10-15.
28. Sugino K, Ishida F, Kikuchi N et al. Comparison of clinical characteristics and prognostic factors of combined pulmonary fibrosis and emphysema versus idiopathic pulmonary fibrosis alone. *Respirology* 2014; 19:239-245.

Došlo: 12. 1. 2017

Adresa:

MUDr. Martina Doubková, Ph.D.

Klinika nemocí plicních a TBC, FN a LF MU

Jihlavská 20

625 00 Brno

Česká republika

e-mail: doubkovamartina@seznam.cz

2.4. Klinické charakteristiky a prognostické faktory IPF

IPF je progresivní a obvykle fatální forma chronické idiopatické intersticiální pneumonie. Podobnost mezi IPF a bronchogenním karcinomem je nejen ve špatné prognóze obou onemocnění, některým podobným patogenetickým mechanismům včetně tyrozinkinázové signální cesty, ale i v rizikových faktorech vzniku onemocnění (Doubková a kol., 2018). Viz kapitola 2.4.1. Klinický průběh IPF neumíme jasně předpovídat a kritéria IPF progresu nejsou zcela dobře definována. Nicméně geny a epigenetické faktory mají vliv na vznik, vývoj a klinický fenotyp IPF (Barlo a kol., 2010; Martinez a kol., 2005; King a kol., 2001). V práci z roku 2018 jsme analyzovali údaje 514 pacientů s IPF, kteří byli od roku 2012 zařazeni do českého EMPIRE registru. Střední věk naší kohorty byl 67 let (50-82 let). Celková doba přežití (OS, *overall survival*) skupiny byla 63,1 měsíce. Zhoršení FVC o 10 % ve 12. měsíci sledování a DLCO o ≥ 15 % v 12., 18. a 24. měsíci významně ovlivnilo OS. Při multivariační analýze byly jako faktory, které negativně ovlivňovaly OS: věk ≥ 70 let, intersticiální skóre HRCT ≥ 3 a změna DLCO o ≥ 15 % ve 12. měsíci. DLco, její změny v čase se jevily jako lepší prediktor mortality ve srovnání se změnami FVC v čase. Podle výsledku této analýzy je nutné začlenit změny difuzní plicní kapacity do výstupů klinických studií více nežli změny FVC v čase (Doubková a kol., 2018). Klinické charakteristiky a prognostické faktory IPF jsou součástí těchto publikací, viz kapitoly 2.4.2., 2.4.3., 2.4.4. Přehledová práce z roku 2017 se zabývá významem HRCT hrudníku pro diagnostiku, diferenciální diagnostiku a prognózu IPF. Pokročilé stádium, rozsah plicní fibrózy, výskyt voštiny a bronchiektazií jsou negativními prognostickými faktory. Nicméně neumíme jednoznačně odlišit reverzibilitu a irreverzibilitu intersticiálních plicních změn na HRCT hrudníku, a tak predikovat odpověď na léčbu (Doubková a kol., 2017). Viz kapitola 2.4.5.

2.4.1. Idiopatická plicní fibróza a bronchogenní karcinom mají něco společného? (Doubková M, Jakubíková L. Stud. Pneumol. Phtiseol. 2018; 78(5): 160-168)

160

STUD. PNEUMOL. PHTHISEOL., 78, 2018, č. 5, s. 160 – 168

Idiopatická plicní fibróza a bronchogenní karcinom mají něco společného?

M. Doubková, L. Jakubíková

Klinika nemocí plicních a TBC Fakultní nemocnice Brno
a Lékařské fakulty Masarykovy univerzity Brno

SUMMARY

Is there anything common between idiopathic pulmonary fibrosis and lung cancer?

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and usually fatal form of idiopathic interstitial pneumonia. IPF is caused by chronic damage to the alveolar epithelium, leading to abnormal tissue repair and profound changes in the alveolar structure. The similarity between IPF and lung cancer (LC) is not limited to the poor prognosis of both diseases; there are also some common pathogenetic mechanisms and risk factor. The aim of this paper is to highlight certain similarities between IPF and LC. Cases illustrating the coincidence of IPF and LC are also reported.

Keywords: idiopathic pulmonary fibrosis, lung cancer, pathogenesis

SOUHRN

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je progresivní a obvykle fatální forma chronické idiopatické intersticiální pneumonie. IPF je charakterizována jako výsledek opakujícího se poškození alveolární výstelky, vedoucí k patologickému vzorci hojení. Podobnost mezi IPF a bronchogenním karcinomem je nejen ve špatné prognóze obou onemocnění, některých podobných patogenetických mechanismech, ale i v rizikových faktorech vzniku onemocnění. Cílem práce je upozornit na určité společné etiopatogenetické mechanismy IPF a bronchogenního karcinomu. Součástí práce jsou i kazuistiky včetně koincidence IPF a plicního nádoru.

Klíčová slova: bronchogenní karcinom, idiopatická plicní fibróza, patogeneze

ÚVOD

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je nejběžnějším typem idiopatické intersticiální pneumonie (IIP) a má obvykle špatnou prognózu, která je způsobena progresí rozsáhlé fibrotické přestavby plicního parenchymu [1].

Medián věku při diagnóze nemocných s IPF je 60–70 let [1]. Rizikovými faktory jsou kouření cigaret, expozice prachům organickým i anorganickým, gastroezofageální reflux, infekce. Pacienti obvykle trpí postupně se zhoršující dušností a neproduktivním kašlem. Průběh nemoci je nepředvídatelný [2]. V ČR není aktuální epidemiologická situace známa, ale nemoc má celosvětově stoupající výskyt [1]. Bronchogenní karcinom je v ČR druhým nejčastějším nádorem u mužů a čtvrtým u žen, u mužů se také vyznačuje vůbec nejvyšší mortalitou (81,5 úmrtí na 100 000 mužů). Obecně náleží bronchogenní karcinom mezi nejčastější zhoubné nádory v Evropě i ve světě, věkově standardizovaná

incidence činí v evropských zemích 30,2/100 000 obyvatel, přičemž ČR zaujímá 9. místo [3]. Většinu zhoubných nádorů (80–85 %) tvoří nemalobuněčný plicní karcinom (NSCLC), který je nutné považovat za systémové onemocnění, protože nadpoloviční většina případů je zjištěna v metastazujícím stadiu IV a také většina recidiv po radikální léčbě (operace, radioterapie, radiochemoterapie) se projevuje v podobě vzdálených metastáz. Medián věku je podobný jako u IPF kolem 65 let. Bronchogenní karcinom ovlivňuje negativně prognózu pacientů s IPF [4].

DISKUZE

Nové poznatky etiopatogeneze IPF zcela změnily pohled na její léčebné možnosti, proto je IPF předmětem zájmu posledních několika let. IPF je specifická forma chronické progredující fibrotizující intersticiální pneumonie nejasné etiologie, objevu-

jící se primárně u dospělých jedinců, postihující pouze plíce a spojené s histopatologickým a/nebo radiologickým obrazem obvyklé intersticiální pneumonie (UIP, usual interstitial pneumonia) [1]. IPF se vyskytuje s vyšší četností u mužů než u žen [1]. Etiologie nemoci není známa. Příčinou smrti je obvykle respirační selhání. Klinický průběh IPF neumíme jasně předpovídat a kritéria IPF progresu nejsou zcela dobře definována [1]. Střední doba přežití u neléčených pacientů s IPF se pohybuje mezi 2,5–3 roky [1].

Rada studií se zabývala klinickými rizikovými faktory spojenými s bronchogenním karcinomem a IPF [5,6,7]. Vyšší výskyt nádorů byl popsán u mužů kuřáků a u pacientů s kombinací plicní fibrózy a emfyzému (CPFE – combined pulmonary fibrosis and emphysema). Lokalizace plicního nádoru se lišila v různých studiích, ale většina nádorů byla lokalizována subpleurálně, blízko voštiny a fibrózy [8,9,10]. Prevalence bronchogenního karcinomu u pacientů s IPF je v různých studiích různá 3–45,7 % [11,12,13,14].

Podobnost mezi IPF a bronchogenním karcinomem je nejen ve špatné prognóze obou onemocnění, jak dokumentuje první kazuistika, některých podobných patogenetických mechanismů, ale i v rizikových faktorech vzniku onemocnění (kouření, vliv zevního prostředí). Většina nádorů u nemocných s IPF je lokalizována periferně, subpleurálně, v dolních lalocích, blízko voštiny a fibrotických úseků [15]. Stejná lokalizace byla dokumentována i v kazuistice I. Mnohdy je těžké nádorové změny rozpoznat v terénu IPF jako v kazuistice I, kdy i přes pravidelné sledování u nemocného byl zjištěn bronchogenní karcinom v generalizovaném stadiu. Nejčastějším histopatologickým nálezem je skvamózní karcinom, pak následuje adenokarcinom [16,17]. Genetické a epigenetické faktory mající vliv na obě nemoci jsou věk, kouření, vliv zevního prostředí prostřednictvím metylace supresorových genů nebo hypometylace onkogenů (změna DNA sekvencí). Mutace tumor supresorového genu p53 byla nalezena i u pacientů s IPF [18]. Hypermetylace Thy-1 genu vede k větší invazivitě nádorů. Th-1 je glykoprotein na povrchu buněk i fibroblastů, který se podílí na buněčné adhezii a buněčném kontaktu [18,19]. Mutace surfaktant proteinů SFTPA1, SFTPA2 byla nalezena u rodin s familiární plicní fibrózou a karcinomem plic [17,20]. Oxidační stres, mikrosatelitní nestabilita, chybění heterozygoty, zkrácení a poškození telomer mají vliv na kontrolu buněčného cyklu a apoptózu [18]. Na patogenezi nádoru se také může podílet bronchiolární metaplazie [21]. Zvýšené hladiny některých mikroRNA, nekódujících malých RNA regulujících prostřednictvím posttranskripčních mechanismů, se nachází v plicních biopsiích u nádorů plic a IPF [22]. Alterace mezi-buněčné komunikace a nekontrolovatelná proliferace z důvodů nízkých hladin konexinů (konexiny jsou spojovací mezibuněčné kanály zajišťující

interakci a koordinaci buněčných funkcí) je pozorována jak u karcinomu plic, tak IPF [18,23]. Obdobné cesty přenosu signálů do buněk nacházíme rovněž u obou nemocí, Wnt/ β -catenin [24], PI3K/AKT – the phosphoinositide3-kinase pathway [25], JAK/STAT – Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription proteins [18,26], tyrozin kinázové cesty [18,27]. Tyto cesty, pokud jsou aktivovány, jsou zodpovědné za regulaci mnoha buněčných funkcí: růst, diferenciace, adheze, motilita, regulace buněčné smrti. Což má vliv na vznik a růst nádorů a fibrogenézi. Aktivace drah buněčné signalizace prostřednictvím tyrosin kináz, jako je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF, vascular endothelial growth factor), fibroblastový růstový faktor (FGF, fibroblast growth factor) a růstový faktor odvozený od trombocytů (PDGF, platelet-derived growth factor), se podílejí na patogenezi IPF a bronchogenního karcinomu [27]. Rostoucí nádor je bez vlastního cévního zásobení schopen dosáhnout jen určité maximální velikosti kolem 2 mm, poté už výživa prostřednictvím difuze z okolí přestává být dostatečná. Nádor na to reaguje zahájením tvorby faktorů, které podněcují novotvorbu a růst kapilár z okolních cév směrem k nádorovému ložisku, což umožní jeho další, již velmi rychlý růst. Tento zvrát je nazýván angiogenní switch a je pro další vývoj nádoru zcela zásadní, odděluje dvě významně odlišné fáze vývoje nádoru – fázi nevasculární, kdy možnosti dalšího vývoje a růstu nádoru jsou velmi omezené, a fázi vaskulární. Za fyziologických podmínek je nejsilnějším stimulem k uvolnění VEGF z buněk hypoxie, dále zánět a metabolický stres, což by částečně vysvětlilo, proč je plicní fibróza považována za rizikový faktor pro vznik bronchogenního karcinomu [28,29].

Právě ovlivnění angiogeneze je oblíbeným cílem protinádorové léčby. Nintedanib byl původně pro svůj antiangiogenní účinek zamýšlen jen pro léčbu nádorů. U nintedanibu v léčbě plicního karcinomu využíváme jeho trojitý inhibiční účinek angiokináz, kdy blokuje aktivitu kináz receptorů pro VEGF 1-3, receptorů pro PDGF- α / β a FGF 1-3 (obrázek 6) [30]. Nintedanib se kompetitivně váže na ATP-vazebnou kapsu těchto receptorů a blokuje intracelulární signalizaci, která je zásadní pro proliferaci a přežití endoteliálních, stejně jako perivaskulárních buněk (pericyty a buňky hladké cévní svaloviny). Inhibovány jsou navíc také receptory pro Flt-3 (Fms-like tyrosine kinase 3, Lck a Src kinázy) [31]. Je tedy ovlivněna proliferace a přežití tří klíčových buněčných populací zúčastněných při neoangiogenezi – endoteliálních buněk, pericytů a buněk hladké svaloviny. Nádorová angiogeneze je klíčovým rysem, který přispívá k růstu nádorů, jejich progresi a tvorbě metastáz, přičemž k jejímu spuštění dochází zejména uvolněním proangiogenních faktorů vylučovaných nádorovou buňkou (VEGF a bFGF), jejichž úkolem je zajistit, aby endoteliální a perivaskulární buňky hostitele

podporovaly dodávání kyslíku a živin cévním systémem hostitele. První studie fáze III LUME-Lung 1 hodnotila účinnost a bezpečnost kombinace nintedanibu a docetaxelu u pacientů s pokročilým NSCLC (non-small cell lung carcinoma), u kterých došlo k progresi po chemoterapii 1. linie [32]. Do studie bylo zařazeno 1 314 pacientů s NSCLC stadia IIIB/IV, progredující po prvoliniové chemoterapii. Celkem se jednalo o 658 pacientů (50,1 %) s adenokarcinomem, 555 pacientů (42,2 %) s dlaždicobuněčným karcinomem a 101 pacientů (7,7 %) s nádory s jinou histologií. Pacienti byli randomizováni (1 : 1) k podávání nintedanibu 200 mg perorálně 2krát denně v kombinaci s 75 mg/m² docetaxelu i. v. každých 21 dnů (n = 655), nebo placebo per os 2krát denně v kombinaci se 75 mg/m² docetaxelu každých 21 dnů (n = 629). PFS (doba do progresu = progression-free survival) byla signifikantně prodloužena ve skupině s docetaxelem a nintedanibem v porovnání se skupinou s docetaxelem a placebem (medián 3,4 měsíce (95 % CI 2,9–3,9) vs. 2,7 měsíce (2,6–2,8); HR 0,79 (95 % CI 0,68–0,92); p = 0,0019). Po střední době sledování 31,7 měsíce bylo OS (celkové přežití – overall survival) signifikantně prodlouženo u pacientů s histologickým nálezem adenokarcinomu, u nichž došlo k progresi do devíti měsíců po zahájení léčby 1. linie ve skupině s docetaxelem a nintedanibem (206 pacientů) v porovnání se skupinou s docetaxelem a placebem (199 pacientů), medián 10,9 měsíce (95 % CI 8,5–12,6) vs. 7,9 měsíce (6,7–9,1); HR 0,75 (95 % CI 0,60–0,92); p = 0,0073. Podobné

výsledky byly zaznamenány u všech pacientů s histologickým nálezem adenokarcinomu (322 pacientů ve skupině s docetaxelem a nintedanibem a 336 ve skupině s docetaxelem a placebem; medián OS 12,6 vs. 10,3 měsíce; p = 0,0359), nikoliv však v celém souboru studie (medián 10,1 vs. 9,1 měsíce; p = 0,2720). Nežádoucí účinky stupně 3 nebo vyššího byly častější ve skupině s nintedanibem než ve skupině s placebem, vyskytl se průjem a reverzibilní vzestup alaninaminotransferázy a aspartátaminotransferázy. Celkem 35 pacientů (5,4 %) ve skupině s nintedanibem + docetaxel a 25 (3,8 %) ve skupině s placebem + docetaxel zemřelo v důsledku nežádoucích účinků patrně nesouvisejících s progresí onemocnění, nejčastějšími příhodami byly sepse (2 ve skupině s nintedanibem vs. 1 ve skupině bez nintedanibu), pneumonie (2 vs. 7), respirační nedostatečnost (4 vs. 0) a plicní embolie (0 vs. 3). Kombinace nintedanibu s pemetrexedem byla zkoumána ve studii III. fáze LUME-Lung 2 ve 2. linii léčby pacientů s neskvamózním NSCLC. Výsledkem bylo zlepšení doby přežívání bez progresu – 4,4 vs. 3,6 měsíce, HR 0,83, p = 0,0435 [33]. Stejně jako u ostatních přípravků zaměřených na angiogenezi není ani u nintedanibu znám prediktivní faktor účinnosti. Kazuistika III potvrzuje efektivní terapii nintedanibem ve druhé linii v kombinaci s docetaxelem, která navodila u našeho generalizovaného pacienta s plicním adenokarcinomem stabilizaci onemocnění na dobu 4 měsíců za přijatelné laboratorní myelotoxicity, která je obecně v této kombinaci význam-

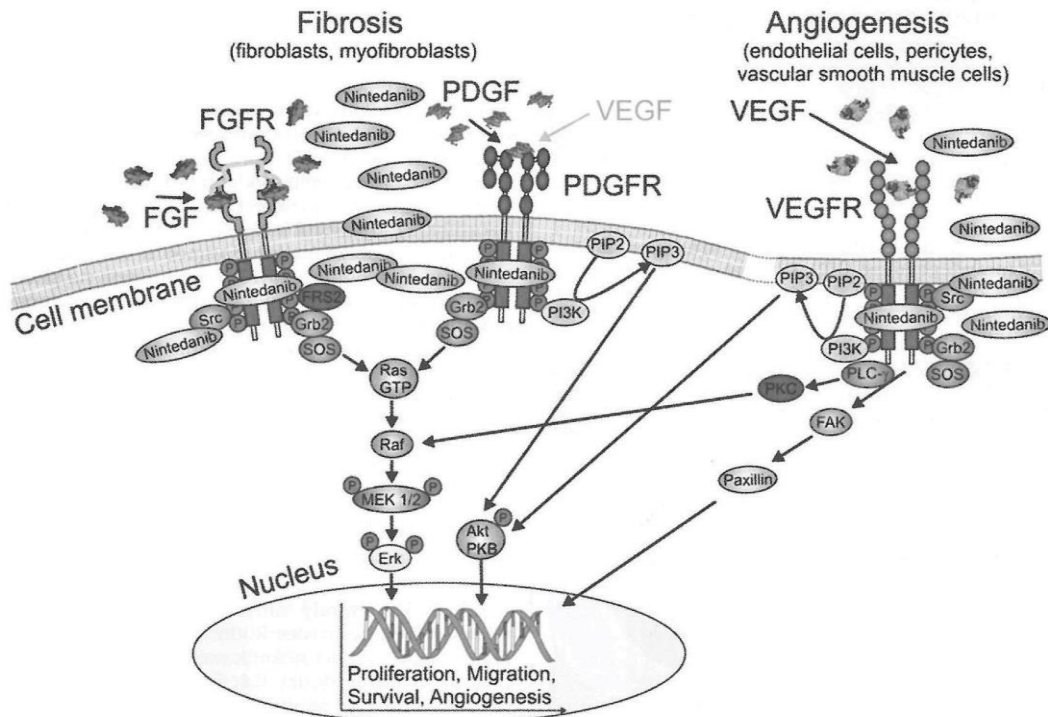
Tabulka 1: HRCT kritéria pro UIP dle [1]

Typický vzorec UIP (4 kritéria)	Možná UIP (3 kritéria)	Neodpovídá UIP (jakékoliv ze 7 kritérií)
maximum změn subpleurálně a bazálně	maximum změn subpleurálně a bazálně	maximum změn v horních a středních polích
retikulace	retikulace	převaha změn peribronchovaskulárně
voština s nebo bez bronchiectazií	nepřítomnost změn neodpovídajících UIP (viz 3. sloupec)	rozsáhlé opacity mléčného skla (převažují nad retikulárními)
nepřítomnost změn neodpovídajících UIP (viz 3. sloupec)		rozsáhlá mikronodulace (bilaterálně s převahou v horních polích)
		diskrétní cysty (mnohočetné, bilaterální, mimo oblast voštiny)
		difuzní obraz mozaikovitě perfuze a air-trapping (bilaterálně, ve 3 nebo více lalocích)
		konsolidace v bronchopulmonálních segmentech (lalocích)

Tabulka 2: HRCT upravená diagnostická kritéria IPF dle [40]

	Typický UIP CT nález	Pravděpodobný UIP CT nález	CT nález neurčitý pro UIP	CT nálezy ukazující na ne-IPF
Distribuce	bazálně (i difuzně), subpleurálně, často heterogenní	bazálně a subpleurálně; často heterogenní	variabilní nebo difuzní	horní nebo střední laloky, peribronchovaskulární se subpleurálním šetřením
Nálezy	voština; retikulace s periferními trakčními bronchi- nebo bronchioloektáziemi, nepřítomnost příznaků pro jiné diagnózy	retikulace s periferními trakčními bronchi- nebo bronchioloektáziemi, není voština nebo jiné příznaky pro jinou diagnózu	přítomnost fibrózy s nenápadnými znaky patřícími k ne-UIP příznakům	jakýkoliv: predominantně konsolidace, převažující ground glass (kromě AE), air-trapping, mozaika, difuzní noduly, cysty

Obrázek 5: Mechanismus účinku nintedanibu. Upraveno dle [30]. Nintedanib se váže do místa určeného pro vazbu ATP v intracelulární části receptorů: FGFR, PDGFR a VEGFR. To vede k blokování autofosforylace receptorů a navazujících signálních kaskád. Nintedanib může blokovat i nereceptorové tyrosinkinázy, jako je Src nebo Lck.



nější, než při monoterapii nintedanibem u IPF nebo monochemoterapii docetaxelem u NSCLC.

Nintedanib, kromě protinádorového účinku s využitím především inhibice neoangiogeneze, představuje jeden ze dvou u nás dostupných „antifibrotických léků“ u IPF. Účinek nintedanibu spočívá v omezení proliferace, migrace a přežívání fibroblastů a v negativním působení na angiogenezi [30,34]. U IPF byl nintedanib hodnocen ve třech studiích [35,36]. Léčba nintedanibem je v ČR hrazena u dospělých pacientů, u kterých byla stanovena diagnóza IPF, u nichž je usilovná vitální kapacita plic (FVC) v rozmezí 50–90 %, mají transfer faktor (TLCO) větší nebo rovný 30 % a kteří dodržují zákaz kouření. Účinnost nintedanibu na

zpomalení poklesu plicních funkcí ale byla prokázána v obou skupinách pacientů s IPF a FVC (forced vital capacity) $\leq 90\%$ a $> 90\%$ [35,36,37]. Což dokazuje kazuistika II. Nintedanib měl ve studiích efekt nejen na zpomalení plicních funkcí, ale i snížení rizika akutních exacerbací [36]. Zpomalení poklesu FVC bylo obdobné u pacientů léčených nintedanibem bez ohledu na snížení dávky, přerušení léčby nebo intenzitu dávky [35,36,38]. Efekt nintedanibu byl pozorován i u skupiny s možnou UIP na HRCT hrudníku bez histologické verifikace [39]. Opět možno dokumentovat v kazuistice II.

U kazuistiky II jsme s pomocí multidisciplinárního týmu postavili diagnózu IPF u možné UIP (nepřijímající všechna čtyři kritéria – viz tabulka 1) dle radiologického a pravděpodobné UIP dle histopatologického nálezu. Dle platného doporučení z roku 2011 ATS/ERS jsou HRCT nálezy klasifikovány na typickou, možnou UIP a nekonzistentní s UIP, viz tabulka 1 [1]. U možné UIP dle HRCT nálezu je k ověření UIP doporučována histopatologická diagnóza. Studie ale ukázaly, že nepřítomnost voštinovité přestavby na HRCT hrudníku nevylučuje diagnózu UIP [40,41]. 82–94 % pacientů s pravděpodobnou UIP (bez voštinovité přestavby) na HRCT má pravděpodobnou nebo definitivní UIP dle histopatologického nálezu [40]. Navíc v několika studiích nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v přežití mezi typickou a možnou UIP dle HRCT nálezu [40]. Proto v roce 2017 vyšla práce s návrhem změn pro diagnostiku UIP/IPF dle HRCT nálezu (tabulka 2). Pokud klinika odpovídá IPF a na HRCT hrudníku je nález typické nebo pravděpodobné UIP, pak lze uzavřít diagnózu jako IPF bez nutnosti histologické verifikace viz tabulka 2 [40]. Dle těchto návrhů bude upraveno doporučení diagnostiky IPF v ČR.

Nicméně i přes určité podobnosti, které jsme popsaly výše, nacházíme mezi IPF a karcinomem plic i rozdíly: 1) myofibroblasty ve fibroblastických fókusech jsou polyklonální, zatímco u nádorů jsou buňky monoklonální, 2) IPF je limitována na plíce, kdežto nádor metastazuje, 3) IPF je onemocnění postihující obě plíce, zatímco plicní nádor je obvykle jednostranný [42]. Tyto odlišnosti ale neplatí beze zbytku. Některé nádory mohou vykazovat stejnou heterogenitu buněčné populace jako u IPF. Některé typy nádorů vykazují lokálně agresivní růst, ale nemetastazují a 2–6 % tumorů má oboustrannou plicní lokalizaci [42].

KAZUISTIKA I – SPINOCELULÁRNÍ KARCINOM V PLICNÍ FIBRÓZE

57letý muž, bývalý silný kuřák, byl odeslán na plicní ambulanci v roce 2006 pro narůstající dušnost a kašel trvající několik měsíců. Pracoval jako technik a strojevedoucí. Léčil se na ischemickou chorobu srdce se syndromem anginy pectoris (po prodělaném infarktu myokardu), vysokým krev-

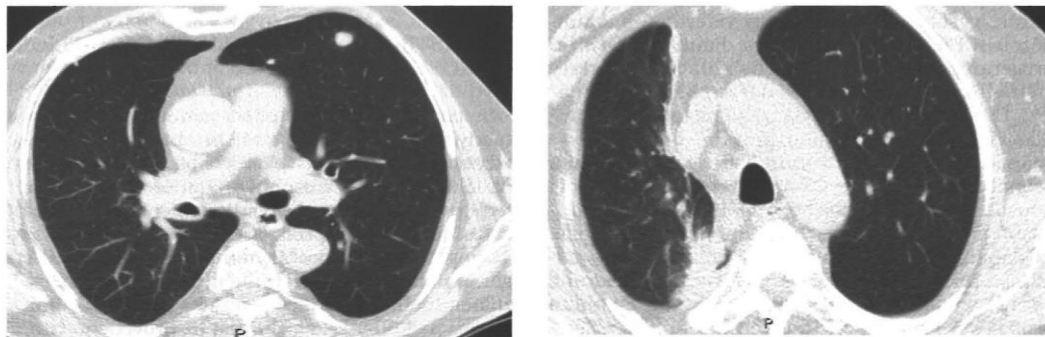
Obrázek 1: Kazuistika I. HRCT hrudníku. Koincidence IPF a bronchogenního karcinomu



Obrázek 2: Kazuistika II. HRCT hrudníku. Možná UIP (pravděpodobná UIP). Difúzně subpleurálně, zejména dorzobazálně zesílení inter- a intralobulárních sept, bronchioloektázie, bez voštinovité přestavby



Obrázek 3: Kazuistika III. HRCT hrudníku s adenokarcinomem horního laloku pravé plicé a meta ložiskem v levé plicí, mediastinální lymfadenopatií, léčený nintedanibem ve 2. linii (6 cyklů)



ním tlakem a cukrovkou. Poslechově byly slyšitelné krepitace v dolních třetinách, byly přítomny paličkovité prsty. Plicní funkční vyšetření prokázalo mírnou poruchu restriktce a mírnou poruchu difuze. Na HRCT (výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností) hrudníku byla převaha změn dorzobazálně s retikulacemi, zesílením interbulárních sept, voštinovitou přestavbou typu běžné intersticiální pneumonie (UIP, usual interstitial pneumonia). V bronchoalveolární tekutině byl nález neutrofilní alveolitidy. K histologickému vyšetření vzhledem k pokročilosti procesu a komorbiditám pacient nebyl indikován. Na základě dostupných vyšetření byla diagnóza uzavřena jako UIP/IPF po vyloučení jiných možných příčin. Od roku 2008 byl pacient léčen imunosupresivou, od roku 2015 pirfenidonem. Při této léčbě se plicní funkce stabilizovaly, pravděpodobně se tedy jednalo o pomalejší progresora. Na kontrolním HRCT hrudníku v roce 2018 bylo zjištěno nové zastínění v dolním laloku levé plicé v místě fibrózní přestavby, viz obrázek 1. Histologicky (odběr vzorku excízi při bronchoskopii) byl potvrzen spinocelulární karcinom, stadium T3N2M1b (IV. klinické stadium, meta játra, skelet, mozek, nadledvina). Z onkologického hlediska byl stanoven jen symptomatický postup. Jiná antifibrotická léčba, nintedanibem, nebyla již indikována. Pacient zemřel na progredující nádorové onemocnění s metastázami měsíc po zjištění diagnózy.

KAZUISTIKA II – NINTEDANIB U MOŽNÉ (PRAVDĚPODOBNĚ) UIP

66letá pacientka, žena, nekuřačka. Byla odeslána na plicní ambulanci v květnu 2015 pro 8 měsíců trvající dušnost při námaze (mírný kopec, rychlejší chůze) a dráždivý kašel. Pracovala jako úřednice. Léčila se s vysokým krevním tlakem. Fy-

zikálním vyšetřením auskultací byly slyšitelné oboustranné krepitace na bázích plic. Nebyl přítomen fenotypický projev paličkovitých prstů s nehytvaru hodinového sklíčka. Plicním funkčním vyšetřením nebyla zjištěna ventilační porucha a jen lehká porucha plicní difuze, bez respirační nedostatečnosti. Na HRCT hrudníku byl popsán nález pro možnou UIP (retikulace, subpleurální distribuce, bazálně, bronchiektázie a bronchioloektázie, bez voštiny, vše mírného rozsahu, počínající stadium), viz obrázek 2. Bronchoskopický nález ukázal převahu eozinofilních a neutrofilních granulocytů v cytologickém zpracování bronchoalveolární tekutiny, získané bronchoalveolárním výplachem, transbronchiálně klíštkovou excízi byl prokázán nález možné UIP. S pomocí mezioborového týmu a po vyloučení jiných příčin byla postavena diagnóza IPF. Nemocná byla indikována k biologické léčbě. Vzhledem k hodnotám FVC (forsírovaná vitální kapacita > 90 %) mimo indikační kritéria pro léčbu pirfenidonem, byla zařazena do patientského programu s nintedanibem od roku 2015. Užívala jej 2 × 150 mg denně. Během sledování na kardiologii pro hypertenzi byla u nemocné zjištěna fibrilace síní a nasazena antikoagulace. Dávka nintedanibu byla snížena na 2 × 100 mg z důvodů minimalizace nežádoucích účinků ze vzájemného působení antikoagulancia a nintedanibu. Při pravidelných kontrolách jsou plicní funkce stabilizovány (FVC 104 %, DLco 75 %), pacientka léčbu snáší dobře a nemá vedlejší nežádoucí účinky.

KAZUISTIKA III – NINTEDANIB U POKROČILÉHO PLICNÍHO ADENOKARCINOMU

Na našem pracovišti jsme měli možnost v rámci SLP (specifického léčebného programu) léčit kombinací nintedanib a docetaxel celkem 3 pacienty,

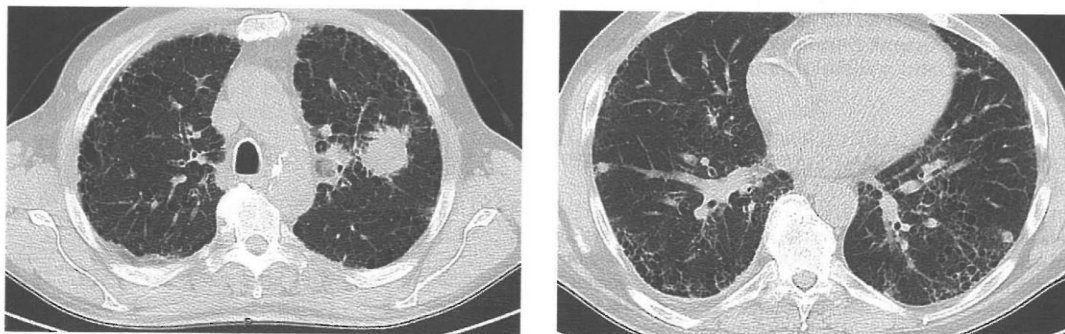
standardně tito pacienti nebyli pojišťovnou schváleni. Nejdříve léčeným pacientem byl v době prvního kontaktu na našem pracovišti tehdy 74letý muž, kuřák, vysokoškolsky vzdělaný veterinář, s anamnézou ICHS a hypertenze. Pro dlouhodobé vertebrogenní potíže absolvoval rehabilitační procedury a vyšetření a byl odeslán k došetření pro RTG nálezu. Bronchoskopicky byla zjištěna paréza pravé hlasivky, stenóza horního pravého bronchu i se známkami infiltrace, zúžení patrné i v hlavním bronchu vpravo. Dle CT vyšetření hrudníku byl popsán periferní tumor horního laloku pravé plic s oboustranným metastatickým postižením plic, mediastinální lymfadenopatií (obrázek 3), metastatické ložisko ve slezině a postižení 2. hrudního obratle s kompresí a destrukcí těla a intraspinální propagací. Histologicky byl verifikován níže diferencovaný adenokarcinom, T3N2M1b, epidermal growth factor receptor (EGFR) i anaplastic lymphoma kinase (ALK) negativní, performance status (PS) 1. U nemocného byla 5/2014 zahájena první linie léčby pemetrexedem s cisplatinou ve standardní dávce, po prvních dvou cyklech byl proces stabilní dle kontrolního CT, po 4. cyklu před rozhodnutím o maintenance léčbě pemetrexedem byla konstatována progresse centrální části nádoru, progresse karcinomatózní lymfangoitidy, lytický proces Th2, ložisko sleziny bylo stacionární. Vzhledem k možnosti SLP podávání byl ve druhé linii indikován režim docetaxel + nintedanib. U pacienta bylo aplikováno 6 cyklů docetaxel D1 po 3 týdnech v dávce 80 mg/m² a nintedanib per os v dávce 150 mg 2krát denně D2-21, tato léčba probíhala od 10/2014 do 2/2015 a během ní byla pozorována myelotoxicita, opakované neutropenie grading (G) 3 a anémie G2 způsobená docetaxelem. Pacient byl na kombinované terapii s nintedanibem stabilní, od března 2015 došlo k progresi onemocnění, byla zahájena další léčebná linie erlotinibem, která ale již nebyla efektivní a klinický stav se nadále zhoršoval. V červnu 2015 dochází k úmrtí ne-

mocného za příznaků progredujícího nádorového onemocnění a současné infekce.

KAZUISTIKA IV – ADENOKARCINOM U PLICNÍ FIBRÓZY

V září 2015 byl na plicní ambulanci vyšetřen tehdy 62letý pacient s kašlem, dušností, klinicky výrazné krepitace při plicních bázích a začínající paličkovité prsty. V osobní anamnéze byl léčen pro hypertenzi, diabetes a séropozitivní revmatoidní artritidu RA (Metypred 4 mg denně a metotrexát 10 mg 1× týdně), kuřák minimálně 30 let 20 cigaret denně. Plicním funkčním vyšetřením byla zjištěna lehká restrikce s těžkou poruchou difuze (TLCO pod 30 %). Pacient měl již provedené HRCT vyšetření plic s postižením plicního intersticia pod obrazem UIP, zesílené intersticiem, subpleurální retikulace a mnohočetné cystoidní okrsky dorzobazálně oboustranně, voštinovitá přestavba, v horních lalocích kombinace voštinovité přestavby a paraseptálního emfyzému, bazálně mírné trakční bronchiectázie. Vlevo v segmentu 1/2 bylo přítomno solidní nádorové ložisko velikosti 20 × 12 mm s cípatými okraji, další drobnější podezřelá ložiska subpleurálně v segmentu 9, zvětšené mediastinální uzliny pod bifurkací velikosti 35 mm, ložisko v levé nadledvině (obrázek 4). Spirometrií byla zjištěna restrikční ventilační porucha středního stupně, výrazné snížení difuze s TLco 34 % a Kco 56 % nh, hraniční pO₂ 8,93 kPa. Bronchoskopicky z prvního vyšetření nebyly zjištěny nádorové buňky z transbronchiální biopsie z horního laloku levé plic, z BALu lehce vyšší podíl neutrofilů 4 % a eozinofilů 1,2 %. Proto byla indikována znovu bronchoskopie a z punkce pod EBUS kontrolou byl z bifurkačních lymfatických uzlin verifikován plicní adenokarcinom G3, EGFR i ALK negativní. Intersticiální plicní proces byl hodnocen jako intersticiální plicní fibróza typu UIP. Pravděpodobně

Obrázek 4: Kazuistika IV – HRCT hrudníku u pacienta s adenokarcinomem horního laloku levé plic, dalšími ložisky subpleurálně a převážně voštinovitou přestavbou plicního parenchymu v rámci UIP



šlo o plicní postižení při séropozitivní RA, ale nebylo možné odlišit dle HRCT vyšetření UIP při RA od UIP/IPF. Nemocný byl dále sledován a léčen cestou pneumoonkologické ambulance, adenokarcinom byl klasifikován jako T4 (2 nádorová ložiska ve dvou lalocích jedné plicí) N2-3 M1b, stadium IV, PS 1 v době stanovení diagnózy. V první linii byla podávána kombinace bevacizumabu s chemoterapií navelbin + karboplatina. Celkem 6 cyklů bylo pro progresi ukončeno. Ve druhé linii byl podáván pemetrexed celkem 7 cyklů, pro další progresi zahájena 3. linie chemoterapie docetaxelem, pro klinické zhoršení a progresi ukončeno po 5 týdnech aplikace. Nadále probíhala symptomatická terapie, po celou dobu pacient užíval i dávku kortikoidů, která se pohybovala 5–10 mg prednisonu denně, v rámci intersticiálního plicního postižení a séropozitivní RA. Plicní nádor byl nemocnému diagnostikován v listopadu 2015, nemocný zemřel po 14 měsících od stanovení diagnózy. Nintedanib nebyl ve druhé linii, po selhání bevacizumabu s dvojkombinací navelbinu + karboplatiny indikován vzhledem k tomu, že pemetrexed v monoterapii je stejně účinný jako docetaxel s nintedanibem, s lepším bezpečnostním profilem, a možnost kombinace nintedanibu a pemetrexedu není registrována [33].

ZÁVĚR

IPF je progresivní a obvykle fatální forma chronické idiopatické intersticiální pneumonie. Podobnost mezi IPF a bronchogenním karcinomem je nejen ve špatné prognóze obou onemocnění, některých podobných patogenetických mechanismech, včetně tyrozinkinázové signální cesty, ale i v rizikových faktorech vzniku onemocnění. Karcinom plic je vzhledem ke své incidenci a nadpoloviční většině diagnostikovaných případů v pokročilé fázi onemocnění, tedy nevyléčitelné chronické a nakonec smrtící choroby, velmi závažnou, ekonomicky nákladnou chorobou. Pětileté přežívání při použití té nejúčinnější léčby je přibližně 60 % u stadia I, 40 % u stadia II, 20 % u stadia III a do 5 % u stadia IV s mediánem asi 12 měsíců [43]. Přítomnost plicní fibrózy je považována za rizikový faktor pro vznik karcinomu plic. Dne 21. 11. 2014 Evropská léková agentura (EMA) schválila nintedanib v kombinaci s přípravkem docetaxel pro léčbu pacientů s lokálně pokročilým, metastazujícím nebo lokálně rekurentním NSCLC, histologicky prokázaným adenokarcinomem, po chemoterapii 1. linie. Ve stejné indikaci je schválen i v ČR, ale dosud nebyla stanovena úhrada, proto je nutno žádat o povolení a úhradu při indikaci přípravku příslušnou pojišťovnu. Nintedanib je multipotentním inhibitorem angiokináz, s prokázanou účinností u plicního adenokarcinomu i u IPF, kde má konkrétně na našem pracovišti zatím častější využití.

Článek vznikl za podpory společnosti Boehringer Ingelheim.

LITERATURA

1. Raghu G, Collard HR, Egan JJ et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 2011(183):788–824.
2. Doubková M, Uher M, Bartoš V et al. Prognostické faktory idiopatické plicní fibrózy (IPF) – analýza českého registru IPF. *Cas Lek Ces* 2016; 155:188–194.
3. Dušek L, Májek O, Mužík J et al. Epidemiologie zhoubných nádorů plic, průdušnice a průdušek v ČR. In *Základy moderní pneumoonkologie*. Maxdorf 2012. s: 12–18.
4. Kreuter M, Ehlers-Tenenbaum S, Schaaf M et al. Treatment and outcome of lung cancer in idiopathic interstitial pneumonias. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2015; 31:266–274.
5. Lee KJ, Chung MP, Kim YW et al. Prevalence, risk factors and survival of lung cancer in the idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorac Cancer* 2012; 3:150–155.
6. Nagai A, Chiyotani A, Nakadate T, Konno K. Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Tohoku J Exp Med* 1992; 167:231–237.
7. Park J, Kim DS, Shim TS et al. Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2001; 17: 1216–1219.
8. Koo HJ, Do KH, Lee JB, Alblushi S, Lee SM. Lung cancer in combined pulmonary fibrosis and emphysema: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2016; 11: e0161437.
9. Usui K, Tanai C, Tanaka Y et al. The prevalence of pulmonary fibrosis combined with emphysema in patients with lung cancer. *Respirology* 2011; 16:326–331.
10. Šterclová M, Vašáková M. Intersticiální plicní procesy a bronchogenní karcinom. *Stud Pneumol Phthiseol* 2015; 6:208–212.
11. Kato E, Takayanagi N, Takaku Y et al. Incidence and predictive factors of lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *ERJ Open Res* 2018; 4:pii:00111-2016. doi: 10.1183/23120541.00111-2016.
12. Kawai T, Yakumaru K, Suzuki M, Kageyama K. Diffuse interstitial pulmonary fibrosis and lung cancer. *Acta Pathol Jpn* 1987; 37:11–19.
13. Ma Y, Seneviratne CK, Koss M. Idiopathic pulmonary fibrosis and malignancy. *Curr Opin Pulm Med* 2001; 7: 278–282.
14. Thomasseti S, Gurioli C, Ryu JH et al. The impact of lung cancer on survival of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2015; 147:157–164.
15. Lee HJ, IM JG, Ahn JM, Yeon KM. Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: CT findings. *J Comput Assist Tomogr* 1996; 20:979–982.
16. Calò A, Lever V, Rossi A et al. Increased frequency of bronchiolar histiocytes in lung carcinomas associated with idiopathic pulmonary fibrosis. *Histopathology* 2017; 71:725–735.
17. Wang Y, Kuan PJ, Xing C et al. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet* 2009; 84:52–59.
18. Vancheri C. Common pathways in idiopathic pulmonary fibrosis and cancer. *Eur Respir Rev* 2013; 22:265–272.
19. Sanders YY, Kumbla P, Hagood JS. Enhanced myofibroblastic differentiation and survival in Thy-1(-)lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36:226–235.
20. Nathan N, Giraud V, Picard C et al. Germline SFTPA1 mutation in familial idiopathic interstitial pneumonia and lung cancer. *Hum Mol Genet* 2016; 25:1457–1467.
21. Hironaka M, Fukayama M. Pulmonary fibrosis and lung carcinoma: a comparative study of metaplastic epithelia in honeycombed areas of usual interstitial pneumonia

- with or without lung carcinoma. *Pathol Int* 1999; 49: 1060-1066.
22. Yang S, Banerjee S, de Freitas A et al. Participation of miR-200 in pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2012; 180: 484-493.
 23. Trovato-Salinaro A, Trovato Salinaro E, Failla M et al. Altered intercellular communication in lung fibroblast cultures from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2006; 7:122.
 24. Chilosi M, Poletti V, Zamo A et al. Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2003; 162:1495-1502.
 25. Cantley LC. The phosphoinositide-3-kinase pathway. *Science* 2002; 296:1655-1657.
 26. Bao Z, Zhang Q, Wan H, He P, Zhou X, Zhou M. Expression of suppressor of cytokines signaling 1 in the peripheral blood of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chin Med J* 2014; 127:2117-2120.
 27. Chaudhary NI, Roth GJ, Hilberg F et al. Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis. *Eur Respir J* 2007; 29:976-985.
 28. Sund M, Zeisberg M, Kalluri R. Endogenous stimulators and inhibitor of angiogenesis in gastrointestinal cancer: basic science to clinical application. *Gastroenterology* 2005; 129:2076-2091.
 29. Nishida N, Yano H, Nishida T et al. Angiogenesis in cancer. *Vas Health Risk Manag* 2006; 2:213-219.
 30. Wollin L, Wex E, Pautsch A et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2015; 45:1434-1445.
 31. Hilberg F, Roth GJ, Merger M et al. BIBF 1120. *Drugs future* 2010; 35:5-10.
 32. Reck M, Kaiser R, Mellemegaard A et al. Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomized, double-blind, phase III trial. *Lancet Oncol* 2014; 15:143-155.
 33. Hanna NH, Kaiser R, Sullivan RN et al. Nintedanib plus pemetrexed versus placebo plus pemetrexed in patients with relapsed or refractory, advanced non-small cell lung cancer (LUME-lung 2): a randomized, double-blind, phase III trial. *Lung Cancer* 2016; 102:65-73.
 34. Ellis PM, Kaiser R, Mellemegaard A et al. Phase I open-label study of continuous treatment with BIBF 1120, a triple angiokinase inhibitor, and pemetrexed in pretreated non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2010; 16:2881-2889.
 35. Richeldi L, Costabel U, Selman M et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2011; 365:1079-1087.
 36. Richeldi L, du Bois RM, Raghu RM et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014; 370:2071-2082.
 37. Kolb M, Richeldi L, Behr J et al. Nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and preserved lung volume. *Thorax* 2017; 72:340-346.
 38. Maher T, Inoue Y, Case AH et al. Effect of the dose reductions and/or interruptions of the efficacy of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): subgroup analysis of the INPULSIS trials. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 195:A5381.
 39. Raghu G, Wells AU, Nicholson AG et al. Effect of nintedanib in subgroups of idiopathic pulmonary fibrosis by diagnostic criteria. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 195: 78-85.
 40. Lynch DA, Sverzellati N, Travis WD et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a Fleischner Society White Paper. *Lancet Respir Med* 2018; 6:138-153.
 41. Chunt JH, Chawla A, Peljto AL et al. CT scan findings of probable usual interstitial pneumonitis have a high predictive value for histologic usual interstitial pneumonitis. *Chest* 2015; 147:450-459.
 42. Vancheri C. Idiopathic pulmonary fibrosis and cancer: do they really look similar? *BMC Med* 2015; 13:220. doi: 10.1186/s12916-015-0478-1.
 43. Zemanová M. Strategie cílené léčby pokročilého nemalobuněčného plicního karcinomu. *Farmakoterapie* 2013; 9(Suppl):41-48.

Došlo: 16. 7. 2018

Adresa:

MUDr. Martina Doubková, Ph. D.
 Klinika nemocí plicních a TBC FN a LF MU
 Jihlavská 20
 625 00 Brno
 e-mail: doubkovamartina@seznam.cz

2.4.2. Jak včasná je diagnostika idiopatické plicní fibrózy a jak úspěšná je její terapie? (Doubková M, Binková I, Jančíková J, Skříčková J. Stud. Pneumol. Phtiseol. 2007; 67(3): 113-119)

113

STUD. PNEUMOL. PHTHISEOL., 67, 2007, č. 3, s. 113-119

Jak včasná je diagnostika idiopatické plicní fibrózy a jak úspěšná je její terapie?

M. Doubková, I. Binková, J. Jančíková¹, J. Skříčková

Klinika nemocí plicních a tuberkulózy LF Masarykovy univerzity a FN Brno,
¹Sdružení zdravotnických zařízení II Brno

SUMMARY

How prompt is diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis and how successful is its treatment?

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a rare, progressive and usually fatal form of idiopathic interstitial pneumonia. IPF is characterized by failure of alveolar reepithelization, persistence of fibroblasts, excessive production of extracellular matrix and the resulting distortion of lung architecture ultimately leading to respiratory failure. The current consensus statements reserve the term IPF to refer to a specific clinical entity associated with the histopathological pattern of usual interstitial pneumonia (UIP). Forty-seven consecutive patients with IPF diagnosed at the Department of Pulmonary Diseases and Tuberculosis, Masaryk University Hospital Brno, in the years 2002–2005 were studied to verify prognostic features and outcome of the disease. There were 28 males and 19 females with the median age of 63 years. IPF was biopsy-proven in 32 % of the patients. The median time from the initial symptoms to diagnosis was 8 months. Evaluation of the effect of treatment on two consecutive visits 3 and 6 months after therapy showed that the condition improved in 3 (9 %) patients, remained stable in 9 (26 %) and progressed due to therapy failure in 22 (65 %). Better treatment results were observed in patients with lymphocytosis (> 20 %) in bronchoalveolar lavage fluid. Non-significant better survival was found in smokers and younger patients. There was no gender difference in survival of the patients. Nine patients died, however, the median overall survival was not achieved during the 40-month follow-up.

Keywords: idiopathic pulmonary fibrosis; prognosis; treatment

SOUHRN

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je vzácné a progredující onemocnění, které většinou končí fatálně. Jde o jednu z forem idiopatické intersticiální pneumonie. Pro IPF je charakteristické selhání alveolární reepitelizace, perzistence fibroblastů v plicní tkáni, nadměrná tvorba extracelulární matrix a z toho plynoucí porucha plicní architektiky, která končí respiračním selháním. Diagnostický histologický obraz u IPF se nazývá běžná intersticiální pneumonie (UIP). Provedli jsme analýzu všech 47 nemocných, u nichž byla IPF zjištěna, na Klinice nemocí plicních a tuberkulózy FN Brno v letech 2002–2005, s cílem ověřit prognostické faktory nemoci a osud našich pacientů s IPF. Bylo mezi nimi 28 mužů a 19 žen v mediánu věku 63 let. Histologicky byla IPF prokázána u 32 % pacientů. Medián doby od prvních příznaků do stanovení diagnózy byl 8 měsíců. Hodnocení efektu léčby ve dvou následujících návštěvách po 3 až 6 měsících od zahájení terapie ukázalo, že ke zlepšení došlo u 3 (9 %) pacientů, ke stabilizaci nemoci u 9 (26 %) pacientů a u 22 (65 %) bylo pozorováno selhání terapie a progresse nemoci. Zaznamenali jsme lepší léčebnou odpověď u pacientů s lymfocytózou (> 20 %) v tekutině z bronchoalveolární laváže. Zjistili jsme nesignifikantně lepší přežívání kuřáků a mladších nemocných. Mezi muži a ženami nebyl v přežívání rozdíl. Za dobu sledování zemřelo 9 nemocných. Mediánu celkového přežití ale zatím dosaženo nebylo.

Klíčová slova: idiopatická plicní fibróza, prognóza, léčba

ÚVOD

Idiopatická plicní fibróza (IPF), v Evropě známá i jako kryptogenní fibrotizující alveolitida (KFA), je vzácné a vždy progredující onemocnění, které většinou končí fatálně [1,2]. IPF patří do skupiny difúzních parenchymatózních nemocí plic (DPLD) a je nejběžnější jednotkou mezi idiopatickými intersticiálními pneumoniemi (IIP) [1,2].

Pro IPF je charakteristické selhání alveolární reepitelizace, perzistence fibroblastů v plicní tkáni, nadměrná tvorba extracelulární matrix a z toho plynoucí porucha plicní architektiky, která končí respiračním selháním [31,32]. Diagnostický histologický obraz u IPF se nazývá běžná inter-

sticiální pneumonie (*usual interstitial pneumonia*, UIP) a je pro ni charakteristický nehomogenní mikroskopický obraz s ložisky intersticiální fibrózy, zánětu, voštinovité přestavby a normální plice. V okrcích zánětu, fibrózy a voštiny jsou přítomny ostrůvky aktivně proliferujících myofibroblastů a fibroblastů (fibroblastická ložiska), které koreluje s aktivitou onemocnění [11]. Etiologie IPF je dosud neznámá a předpokládá se delší nebo opakované působení neznámé noxy [1,2].

Podle nových poznatků dochází u IPF primárně k poškození alveolárních epiteliálních buněk (opakované mikroskopické fokusy poškození trvající i několik let) a k jejich aktivaci [3]. Následně pak bez přítomnosti zánětlivé stimulace dochází ke

vniku plicní fibrózy. Zánět může být přítomen sekundárně [32,33]. Podrobně je patogeneze IPF popsána v přehledné práci publikované roku 2005 [11].

IPF je celosvětově se vyskytující vzácné onemocnění. Podle epidemiologických údajů je zřejmé, že prevalence nemoci má vzrůstající tendenci [17]. Prevalence je odhadována na 6–20 případů na 100 000 obyvatel [1,8].

Nejnovější klasifikace IIP vychází ze závěrů Americké hrudní společnosti (ATS) a Evropské respirační společnosti (ERS) [1,2] a integruje klinický, radiologický a patologický přístup ke stanovení diagnózy. Jak už bylo uvedeno, IPF je nyní spojována pouze s histologickým obrazem běžné intersticiální pneumonie (*usual interstitial pneumonia*, UIP) [1,2]. UIP/IPF se odlišuje od jiných jednotek patřících do skupiny idiopatických intersticiálních pneumonií horší prognózou a rezistencí na léčbu [1,2].

Definitivním potvrzením diagnózy IPF je chirurgickou biopsií plic ověřená UIP při splnění definovaných podmínek [1,2]. V případě, že chirurgická plicní biopsie nebyla provedena, zůstává diagnóza IPF nejistá. Přesto i přes neprovedení plicní biopsie vede naplnění všech takzvaných velkých kritérií spolu s přítomností minimálně tří ze čtyř takzvaných malých kritérií s velkou pravděpodobností ke správně stanovené diagnóze IPF [1,2].

Současná definice nemoci zní: IPF je specifická forma chronické intersticiální pneumonie limitovaná na plicě a asociovaná s histologickým obrazem UIP, ověřené chirurgickou biopsií plic [1,2].

Naší prací se pokoušíme o analýzu diagnostických postupů, rizikových prognostických faktorů a výsledků naší terapie ve světle čerstvých dat publikovaných v zahraničí.

MATERIÁL A METODIKA

Provedli jsme retrospektivní analýzu všech pacientů, jimž byla na našem pracovišti diagnostikována IPF v letech 2002–2005. Diagnóza musela být vždy postavena podle nové klasifikace a definice nemoci (viz výše) [1,2]. V případě neprovedení chirurgické plicní biopsie byla diagnóza stanovena na základě takzvaných velkých a malých kritérií [1,2]. V souboru našich pacientů jsme se zaměřovali na prognostické faktory nemoci v době diagnózy (věk, pohlaví, trvání obtíží a jejich závažnost, kuřáctví, funkční ventilační vyšetření plic včetně krevních plynů, nález neutrofilních granulocytů a eozinofilních granulocytů v bronchoalveolární tekutině [BALT], nález lymfocytů v BALT, určení imunoregulačního indexu [IRI] v BALT, přítomnost retikulárních opacit a voštiny na HRCT hrudníku, histologický obraz a efekt léčby po 3 a 6 měsících).

VÝSLEDKY

Ve sledovaných letech byla na našem pracovišti stanovena diagnóza IPF 47 pacientům (28 mužů a 19 žen). Histologicky byla IPF ověřena u 15 osob (32 %). Zbýlí nemocní byli diagnostikováni na zá-

kladě korelace klinických, radiologických a funkčních nálezů a při splnění všech takzvaných velkých kritérií spolu s přítomností minimálně tří ze čtyř takzvaných malých kritérií (viz výše). U 1 nemocného byla diagnóza UIP/IPF postavena na základě závěru pitvy. Dva pacienti nemohli podstoupit chirurgickou plicní biopsii pro špatný zdravotní stav s těžkou respirační nedostatečností a polymorbiditou. Jeden nemocný operaci odmítl a diagnóza IPF byla uzavřena na základě klinických a radiologických nálezů. U 9 (19 %) pacientů byla zjištěna na základě HRCT hrudníku (výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností) přítomnost IPF a emfyzému. U 25 (53 %) našich pacientů byly evidovány v době diagnózy počínající a pokročilé změny voštinovitě plic. Medián věku při stanovení diagnózy byl 63 let (31–86). Medián doby od začátku symptomů ke stanovení diagnózy byl 8 měsíců (2–60). Symptomy při stanovení diagnózy byly dušnost při námaze u 45 (96 %) pacientů, krepitace u 36 (77 %), suchý neproduktivní kašel u 31 (66 %) a paličkovité prsty u 12 (26 %) nemocných. V době diagnózy byl 1 pacient (2 %) asymptomatický a podezření na DPLD bylo zjištěno náhodně při vyšetření skiagramu hrudníku.

Plicní funkční vyšetření prokázalo při stanovení diagnózy restriktivní ventilační poruchu u 29 (61 %) pacientů, obstrukční u 5 (11 %) a kombinovanou poruchu u 6 (13 %) pacientů. U 7 (15 %) pacientů nebyla v době diagnózy prokázána klinicky významná ventilační porucha, ale u 3 z nich byla přítomna porucha difuze. Porucha difuzní plicní kapacity byla zjištěna při stanovení diagnózy u 34 (77 %) pacientů. U 10 (23 %) pacientů nebyla v době diagnózy prokázána porucha difuze. U 3 (6 %) pacientů nebyla plicní difuze provedena pro špatnou spolupráci nemocných. Vyšetřením krevních plynů v klidu v době diagnózy jsme u 11 (24 %) pacientů neprokázali respirační nedostatečnost, u 34 (72 %) pacientů byla přítomna parciální respirační nedostatečnost (snížený parciální tlak kyslíku PaO₂ a normální parciální tlak oxidu uhličitého PaCO₂) a u 2 (4 %) globální respirační nedostatečnost (snížený PaO₂ a zvýšený PaCO₂).

BALT byla hodnocena u 39 (83 %) pacientů. U zbylých nemocných nebyla bronchoskopie s BALT provedena pro celkový neuspokojivý zdravotní stav a respirační nedostatečnost. Diferenciální rozpočet buněk v BALT byl následující: makrofágy 76 % (medián 9 – 86 %), neutrofilny 11,6 % (medián 1,2 – 32 %), eozinofily 3,5 % (medián 0,3 – 23 %), lymfocyty 6,7 % (medián 1,3 – 74,2 %). Imunoregulační index (IRI, poměr subpopulací T lymfocytů CD4+ a CD8+) v BALT u 33 (85 %) pacientů byl 1,61 (medián 0,122 – 7,9). Problémem zjištění IRI je častá kontaminace vzorku epitelii dýchacích cest a poškození buněk během odběru.

Celkem bylo léčeno 42 (89 %) pacientů z celkového počtu 47 nemocných. Z toho 23 (55 %)

pacientů bylo léčeno monoterapií kortikoidy a 19 (45 %) pacientů bylo léčeno kombinací kortikoidů s dalším imunosupresivem (nejčastěji azatiopriemem). U 4 (9 %) starších nemocných s pokročilým stadiem choroby (HRCT obraz voštiny) bez známek aktivity plicního procesu a polymorbiditou jsme farmakologickou léčbu kortikoidy a imunosupresivy nezahajovali. Důvodem byly předpokládané nežádoucí vedlejší účinky terapie a neúčinnost léčby při již vzniklé plicní fibróze. U těchto nemocných jsme zavedli symptomatickou léčbu, kyslíkovou terapii, léčili komplikace, eventuálně jsme zvažovali plicní transplantaci. U 1 nemocného nebyla terapie zahájena, protože diagnóza IPF byla stanovena až ze závěru pítvy. 34 (81 %) pacientů bylo vhodné k analýze léčebné odpovědi. U 2 (5 %) nemocných jsme sice terapii zahájili, ti ale nespolupracovali a nechodili na kontroly, proto jsme nemohli hodnotit efekt léčby po 3 až 6 měsících. Ostatní nemocní nedosáhli ve sledovaném časovém období interval 3 až 6 měsíců od zahájení terapie, a nebyli proto zařazeni do souboru našich pacientů. Hodnocení efektu léčby podle kritérií ATS a ERS z roku 2000 [1,2] ve dvou následujících návštěvách po 3 až 6 měsících od zahájení terapie ukázalo, že ke zlepšení došlo u 3 (9 %) pacientů, ke stabilizaci nemoci u 9 (26 %) pacientů a u 22 (65 %) bylo pozorováno selhání terapie a progresse nemoci. Příčinami progresse, mimo vlastní základní onemocnění, byly bronchopneumonie u 11 (23 %) pacientů, kardiální dekompenzace s *cor pulmonale* u 12 (26 %), plicní embolie u 2 (4 %), sekundární plicní hypertenze u 8 (17 %) a pneumotorax u 2 (4 %) pacientů. Významně nejlepší odpovědi na terapii dosáhli pacienti s lymfocytózou v BALT nad 20 % (spojenou současně se zvýšením neutrofilů nad 5 % a/nebo eozinofilů nad 5 % v BALT). Viz obr. 1 a 2.

Z důvodu zhoršující se respirační insuficience bylo na domácí dlouhodobou oxygenoterapii indikováno 12 (26 %) nemocných. Nežádoucí vedlejší účinky kortikoidů a imunosupresiv se zhoršením zdravotního stavu byly důvodem snížení léčby, nebo jejího vysazení v průběhu 6 měsíců od začátku terapie u 4 (9 %) pacientů. Za dobu sledování zemřelo 9 pacientů. Bezprostředními příčinami smrti byly dle pitevních protokolů a listů o prohlídce mrtvého bronchopneumonie u 4 (45 %), srdeční selhání u 3 (33 %) a respirační selhání u 2 (22 %) pacientů.

Mediánu přežití nebylo za 40 měsíců sledování dosaženo. Celkové přežití všech pacientů a skupiny pacientů s histologicky ověřenou UIP ukazuje obr. 3. Starší nemocní (nad 50 let) a nekuřáci měli nesignifikantně horší prognózu než mladší nemocní a kuřáci (obr. 4 a 5). Rozdíl v přežívání mužů a žen nebyl zjištěn (obr. 6).

DISKUZE

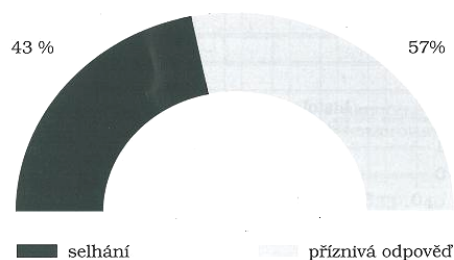
V naší práci hodnotíme soubor nemocných

s IPF, kteří byli na naší klinice od roku 2002 do roku 2005 diagnostikováni podle nových diagnostických kritérií [1,2]. Do souboru pacientů nebyli zařazeni nemocní se systémovým onemocněním pojiva (kolagenózami) a fibrotizující alveolitidou. Jsme si vědomi toho, že naše retrospektivní pozorování nestačí k detailní analýze dlouhodobého přežívání pacientů. Přesto je možné učinit některé závěry, popřípadě srovnat klinická data z publikovaných studií s těmi našimi.

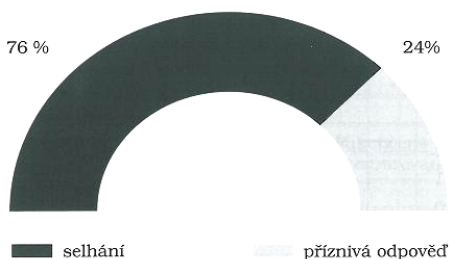
IPF je onemocnění lidí středního a vyššího věku. Incidence a mortalita s narůstajícím věkem stoupá. Ve studii Coultase et al. [8] byla zaznamenána prevalence nemoci u lidí ve věku 35 až 40 let 2,7 na 100 000 obyvatel, ale ve věkové skupině vyšší než 75 let až 175 na 100 000 obyvatel. Průběh je chronický, doba od příznaků do diagnózy trvá nejčastěji 6 měsíců až 2 roky. Medián přežití od stanovení diagnózy je uváděn od 2,8 do 3,6 roku [1,2,30]. Tato fakta potvrzuje i naše analýza.

Průměrný věk našich pacientů odpovídá tomu, který je uváděn v medicínské literatuře. IPF postihuje nemocné obvykle mezi 40 až 70 lety s průměrným věkem 66 let [8] a častěji je diagnostikována u mužů. Podle Coultase et al. [8] je poměr prevalence mužů a žen 1,4 : 1. V souboru našich pacientů jsme také zjistili vyšší výskyt nemoci

Obrázek 1: Odpověď na léčbu u pacientů s IPF a lymfocytózou nad 20 % v bronchoalveolární tektině (BALT)



Obrázek 2: Odpověď na léčbu u pacientů s IPF a lymfocytózou pod 20 % v bronchoalveolární tektině (BALT)



u mužů. Dřívější zprávy, že mužské pohlaví zhoršuje prognózu IPF [1,2,34], nebyly současnými studii potvrzeny [24]. V naší práci jsme rovněž nezjistili statisticky významný rozdíl v přežívání u obou pohlaví (obr. 6).

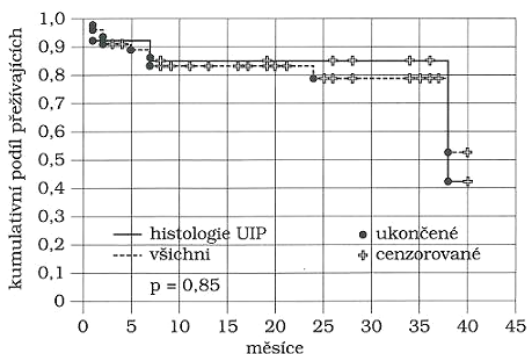
Hodnocením klinických nálezů jsme zjistili, že u 96 % našich pacientů byla přítomna dušnost při námaze, u 77 % pacientů suchý kašel a u 26 % pacientů paličkovité prsty. Extrapulmonální příznaky nebyly přítomny. Tyto nálezy se shodují s nálezy uváděnými v lékařské literatuře [1,2,35].

Chirurgická plicní biopsie patří do zlatého diagnostického standardu s velmi vysokou diagnostickou výtěžností (až 92 %) a nízkou morbiditou a mortalitou (2,5 a 0,3 %) [1,2]. Plicní biopsie je doporučována u pacientů s podezřením na IPF, pokud klinické a radiodiagnostické vyšetření nekoreluje zcela přesně s diagnózou IPF a pokud chirurgický výkon není kontraindikován [1,2,19]. I tak ale klinická praxe v USA, Velké Británii i v jiných zemích spoléhá ve značné míře při diagnostice IPF jen na klinické a radiologické nálezy. Stu-

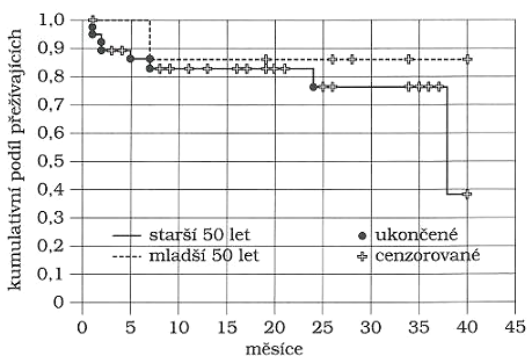
die ve Velké Británii potvrdily, že jen malá skupina pacientů s IPF (15 %) podstupuje chirurgickou plicní biopsii [6]. I my jsme ji neindikovali u všech našich pacientů. V našem souboru nemocných bylo histologické vyšetření pomocí chirurgické plicní biopsie provedeno u 15 (32 %) pacientů. Histologické vyšetření plicní tkáně jsme neprovedli u všech nemocných z těchto hlavních důvodů: aktuální špatný zdravotní stav, vyšší věk, přidružené choroby a charakteristický obraz UIP na HRCT hrudníku, korelující s klinickým obrazem, plicním funkčním vyšetřením a BALT při splnění takzvaných velkých a malých kritérií. Před provedením chirurgické plicní biopsie jsme u každého nemocného zvažovali riziko chirurgického výkonu na straně jedné a profit z možnosti upřesnění diagnózy a prognózy na straně druhé. UIP ale lze definitivně potvrdit jen histologickým vyšetřením. Platí věta, že IPF je asociována pouze s UIP, ale ne každá UIP je IPF! HRCT hrudníku je schopno spolehlivě stanovit diagnózu IPF/UIP se senzitivitou od 43 % do 78 % a specifitou 90 % až 97 % [19,21,26]. Studie zabývající se úlohou HRCT hrudníku v diagnostice IPF dokazují, že pokud jsou klinické a radiologické nálezy konzistentní s diagnózou IPF, nemoc může být spolehlivě diagnostikována i bez plicní biopsie. HRCT obraz IPF je asociován s obrazem UIP převážně v pokročilém a pozdním stadiu onemocnění [14,15,21,26]. Podmínkou spolehlivé diagnózy pomocí HRCT hrudníku je vyloučení UIP od jiných, nyní samostatných entit (nespecifická intersticiální pneumonie – NSIP, deskvamativní intersticiální pneumonie – DIP aj.), které se již neřadí do IPF a odlišují se prognózou a efektem léčby. Rozsáhlé změny na HRCT hrudníku charakteru opacit mléčného skla (*ground glass*) budí podezření na jinou entitu, než je IPF, zvláště na DIP, eventuálně NSIP [1,2,13,15].

U 19 % pacientů byla zjištěna na základě HRCT hrudníku přítomnost IPF a emfyzému. V literatuře je tento nález definován jako CT syndrom kombinované plicní fibrózy a emfyzému (CPFE) [7]. Je charakterizován abnormálním plicním funkčním vyšetřením (statické plicní objemy vzhledem k hyperinflaci mohou být normální, naproti tomu je markantně zhoršena plicní difuze), vyšší prevalencí plicní hypertenze a špatnou prognózou (přežití CPFE je horší než u emfyzému, ale lepší než u IPF). Ve vztahu k HRCT hrudníku je třeba se zmínit o studii Gaye et al. [16], která ukazuje, že pomocí HRCT hrudníku a histologického vyšetření plicní tkáně lze odhadnout prognózu dlouhodobého přežití u nemocných s IPF. Skóre fibrózy podle HRCT (HRCT *fibrosis score*; podíl opacit mléčného skla, retikulárních opacit, voštiny) mělo v této studii dokonce lepší předpovědní hodnotu pro přežití než *pathology fibrosis score* (podíl intersticiální fibrózy a množství fibroblastických fokusů). Jedním z vysvětlení je to, že vzorek plicní tkáně nemusel být ve všech případech odebrán z reprezentativního postiženého místa. Pokud

Obrázek 3: Přežívání všech nemocných s IPF a pacientů s histologicky ověřenou UIP



Obrázek 4: Přežívání pacientů s IPF podle věku



vzorek obsahuje pouze nález ireverzibilní plicní fibrózy a voštinovité plíce, nelze se vyjádřit k histopatologickému typu a etiologii. Situace je navíc komplikována tím, že v nedávných studiích byla pozorována u pacientů s provedenou biopsií z více než jednoho plicního laloku koexistence rozdílných histopatologických změn, například UIP znak v dolním laloku a NSIP v horním laloku [13, 15].

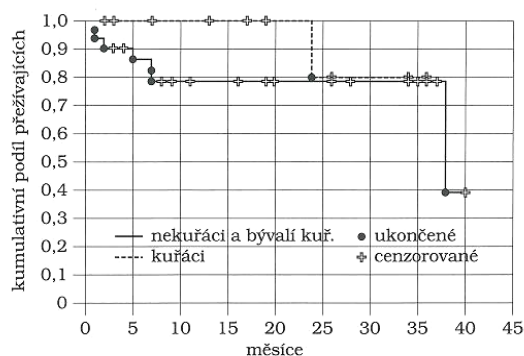
Častým nálezem při funkčním vyšetření plic u IPF je restriktivní ventilační porucha, tedy snížení celkové plicní kapacity (TLC) a vitální kapacity plic (VC) při zachování či zvýšení hodnoty FEV_1/FVC (poměr usilovné vitální kapacity za 1 sekundu a usilovné vitální kapacity) [18]. Nález obstrukční ventilační poruchy nevylučuje plicní fibrózu. U kuřáků může být přítomen současně emfyzém. V takovém případě dochází k relativní normalizaci statických plicních objemů [7]. Prakticky u všech pacientů bývá snížen transfer faktor (difuzní kapacita plic, DLCO), což je důsledek poruch výměny krevních plynů na alveolokapilární membráně, aniž by musela být prokázána přítomnost funkční ventilační poruchy. Respirace může být v počátečních stádiích nemoci v normě a k hypoxémii dochází až při námaze (latentní respirační insuficience). Proto je důležité vyšetřovat krevní plyny po zátěži. Uvedené údaje korespondovaly s našimi výsledky. Plicní funkční parametry (VC, TLC, FEV_1/FVC , DLCO) jsou sice řazeny mezi prognostické ukazatele, ale nemohou odlišit fibrózu od zánětlivých změn [20,34].

Vzhledem k našemu krátkodobému retrospektivnímu sledování a menšímu počtu nemocných nemůžeme předložit plně reprezentativní data, týkající se přežití našich nemocných a vztahovat je k jednotlivým rizikovým faktorům. Přesto hodnocením námi vybraných prognostických faktorů dostáváme křivky potvrzující novodobé poznatky, i když naše výsledky nejsou statisticky významné. Zjistili jsme delší přežívání nemocných mladších 50 let ve srovnání se staršími nemocnými. V literatuře je často uváděn vliv kouření na průběh nemoci. Ukazuje se, že příznivým prognostickým faktorem je kuřáctví v době diagnózy [24]. Vliv kouření na vznik a vývoj IPF není zcela objasněn [4]. Existují kusé informace o inhibici proliferace plicních fibroblastů i chemotaxe cigaretovým kouřem a o zlepšení reparace plicní tkáně po poškození u kuřáků [28]. Studie Kinga et al. [24] demonstrovala rozdíly v nálezech u současných kuřáků, bývalých kuřáků a nekuřáků. U kuřáků v době diagnózy, na rozdíl od nekuřáků, bylo v této studii zjištěno méně krepitací a paličkovitých prstů při fyzikálním vyšetření, menší evidence plicní hypertenze na skiagramu hrudníku, menší redukce plicních funkčních parametrů a další změny. Zajímavý je i histopatologický nález u této skupiny pacientů. Popisováno je i méně fibroblastických fokusů [24]. Obr. 5 naznačuje u našich pacientů trend lepší prognózy a delšího pře-

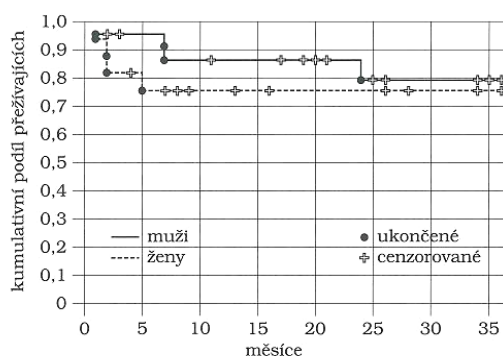
žívání u současných kuřáků ve srovnání s nekuřáky a bývalými kuřáky.

Bronchoskopie s bronchoalveolární laváží není vyšetřením pro IPF jednoznačně diagnostickým. Její význam spočívá v odlišení jiných klinických jednotek v rámci diferenciální diagnostiky. Hodnocení výsledků BALT u IPF je málo přínosné pro diagnózu, nejčastějším nálezem je zmožení vícebuněčných populací, což ukazují i naše hodnocení. U IPF je popisováno zvýšení počtu neutrofilních granulocytů nad 5 % u 70–90 % pacientů, eosinofilů nad 5 % u 40–60 % pacientů a lymfocytů u 10–20 % pacientů [34]. Obdobný nález však může mít řada jiných fibrotizujících procesů. Imunoregulační index lymfocytů ($CD4+/CD8+$) je u IPF snížen oproti normálu, což potvrzují i naše výsledky. Pro stanovení aktivity IPF a monitorování nemoci nepostačuje samotný nález alveolitydy, nutná je korelace s dalšími vyšetřovacími metodami. Obvykle se udává, že zvýšení počtu neutrofilů nad 5 % a/nebo eosinofilů nad 5 % je spojeno s horší prognózou [27,34] a zvýšení počtu lymfocytů nad 20 % s lepší prognózou, menším rozsahem voštinovitých změn a lepší odpovědí na léčbu

Obrázek 5: Přežívání pacientů s IPF podle kuřáctví



Obrázek 6: Přežívání pacientů s IPF podle pohlaví



kortikoidy [1,2,34]. Samotné zvýšení počtu lymfocytů ale není u IPF běžné [1,3]. Pokud je přítomno samostatně, je nutné vyloučit jiné entity (NSIP, sarkoidózu) [3]. U našich pacientů s lymfocytózou v BALT nad 20 % spojenou se zvýšením neutrofilů a/nebo eozinofilů v BALT jsme zjistili příznivou odpověď na léčbu (obr. 1).

Význam HRCT hrudníku spočívá nejen v diagnostice, ale i v monitoraci nemoci a ve zjištění prognózy. Rozsah plicní fibrózy je důležitým prediktivním faktorem přežití [16,26]. Přítomnost *ground glass* ukazuje na lepší prognózu a delší přežití. Naopak změny typu voštinové plíce (*honeycomb lung*) znamenají horší prognózu. U 53 % našich pacientů byly evidovány v době diagnózy ireverzibilní změny voštinovité plíce.

Jako další prognostický faktor je považováno zastoupení fibroblastických fokusů při histologickém vyšetření plicní tkáně. Velké množství fibroblastických fokusů je spojeno s progresí nemoci a její špatnou prognózou [12,23]. V naší práci jsme množství fibroblastických fokusů hodnotit nemohli, nebylo součástí standardního patologického popisu.

Léčba IPF je obtížná a pouze empirická. Choroba navzdory terapii postupně progreduje do terminálního respiračního selhání [32,33]. Současná léčba vychází z předpokladu, že klíčovou roli v patogenezi nemoci hraje chronický zánět vedoucí ke tkáňovému poškození a vzniku plicní fibrózy. Právě tato strategie, vycházející z předpokladu, že u pacientů dochází k fibróze na podkladě zánětlivého procesu, může být důvodem neefektivnosti stávající terapie [32,33]. Léčbu je vhodné začít včas, než dojde k plnému rozvoji fibrózy [1,2]. Několik prvních studií pacientů s IPF zaznamenalo 10%–30% odpověď na léčbu kortikoidy buď v monoterapii, nebo v kombinaci s imunosupresivou, ale nebyl zjištěn signifikantní vliv na přežívání nemocných [31,32,33,35]. Tyto studie nebyly vztaženy na jednotlivé histologické typy (UIP, DIP, NSIP). Jestliže vezmeme v potaz jen nemocné s UIP, která je podle dnešních kritérií jediným histologickým obrazem IPF, je ve světové literatuře uváděná odpověď na jakoukoliv terapii velmi špatná (0–17 %) [9,14,29,31,32]. Iniciální léčba IPF v souboru našich pacientů sestávala u 23 (55 %) pacientů z monoterapie kortikoidy a u 19 (45 %) pacientů z kombinace kortikoidů a imunosupresiva. Efekt léčby byl hodnocen na základě doporučení ATS/ERS z roku 2000 [1,2] ve dvou následujících návštěvách po 3 až 6 měsících od zahájení terapie. Léčebná odpověď byla definována na základě vývoje daných parametrů (symptomy, vývoj nálezů na skiagramu hrudníku a HRCT hrudníku, vývoj plicních funkčních parametrů – TLC, VC, DLCO, parciální tlak kyslíku) v tomto časovém rozmezí [1,2]. Jako pozitivní efekt léčby bylo považováno zlepšení nebo stabilizace nemoci. Na základě těchto výsledků je doporučováno definitivní rozhodnutí o pokračování nebo ukončení stávající

iniciální terapie, popřípadě zvážení transplantace plic. Minimální doba léčby by měla být 6 měsíců [1,2]. Selhání iniciální léčby je obecně považováno za jeden z rizikových prognostických faktorů. V naší práci jsme zaznamenali u 9 % pacientů zlepšení, u 26 % pacientů stabilizaci nemoci a u 65 % pacientů selhání terapie. Na výsledném součtu našich pozitivních léčebných odpovědí (zlepšení a stabilizace nemoci), který je ve srovnání s většinou publikovaných dat spíše vyšší, se podílela podle našeho názoru především včasná diagnóza a včasné zahájení terapie v době aktivity procesu. Vzhledem k tomu, že u všech nemocných nebyla potvrzena UIP chirurgickou plicní biopsií, můžeme spekulovat, zda se na konečném pozitivním léčebném výsledku mohlo v souboru našich pacientů podílet i zastoupení jiných entit než jen UIP (například DIP, NSIP). Na druhou stranu léčba nebyla indikována u všech nemocných, zejména u pacientů v konečném stadiu choroby a u starších polymorbidních osob pro pravděpodobný malý efekt a časté nežádoucí účinky.

IPF je navzdory konzervativní léčbě progredující onemocnění. V současnosti neexistuje jakákoliv konzervativní forma terapie, která by ovlivnila přirozený průběh nemoci [1,5,9,10,31,32]. Ve světové literatuře není záznam o možné reverzibilitě plicní fibrózy [1,2]. Klinický průběh nemoci je variabilní, rozsah a míra progresu je individuální. Data z velkých klinických studií potvrzují, že velký podíl pacientů s mírným až středně pokročilým stadiem nemoci zůstává dlouhodobě stabilní, zatímco ostatní přechází do akcelerované fáze s exacerbací nemoci [21,22]. Nejvíce pacientů umírá na respirační selhání během 3–8 let od začátku symptomů. 10 let od diagnózy přežívá méně než 15 % pacientů [23,24,32]. Vzhledem ke krátkodobému sledování našich pacientů nebyl medián přežití dosažen. Na obr. 3 můžeme pozorovat trend vývoje přežití u našich nemocných blízký se výše udávaným a všeobecně přijímaným údajům o nemocných s IPF. Práce Kolka et al. [25], hodnotící IPF podle starší klasifikace podle Katzensteinové, uvádí průměrné přežívání pacientů s IPF 9,9 let. Podle těchto výsledků se dá předpokládat, že podíl NSIP v prezentovaném souboru byl zřejmě významný.

Nejčastější příčinou smrti našich pacientů byla podle pitevních protokolů a listů o prohlídce mrtvého bronchopneumonie. Nejčastější příčiny úmrtí pacientů s IPF studoval Panos et al. [30] na souboru 543 nemocných po dobu 7 let. Během tohoto období 60 % pacientů zemřelo, z toho 39 % na respirační selhání, 27 % na kardiovaskulární selhání, 10 % na bronchogenní karcinom, 3 % na plicní embolii, 3 % na plicní infekci a 18 % z jiné příčiny.

ZÁVĚR

Výsledky naší analýzy potvrzují celosvětově pu-

blikované informace o diagnostice, prognóze a terapii IPF. Ukazuje se, že léčba onemocnění by měla být zahájena brzy, než dojde k rozvinutí ireverzibilní plicní fibrózy. V naší práci jsme pozorovali u nemocných s IPF a lymfocytózou v BALT příznivou léčebnou odpověď. Prognóza onemocnění definovaného podle nové klasifikace IPF je ale nepříznivá.

LITERATURA

- American Thoracic Society/European Respiratory Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 646–664.
- American Thoracic Society/European Respiratory Society. International multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:277–304.
- Baughman RP, du Bois RM, Lynch JP et al. Diffuse lung disease. A practical approach. 1. vydání, London, Arnold, 2004:294.
- Baumgartner KB, Samet J, Stidley CA et al. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:242–248.
- Bouros D, Antoniou KM. Current and future therapeutic approaches in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2005; 26:693–702.
- British Thoracic Society. The diagnosis, assesment and treatment of difuse parenchymal lung disease in adults. *Torax* 1999; 54:S1–S28.
- Cottin V, Nunes H, Brillet PY et al. Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. *Eur Respir J* 2005; 26:586–593.
- Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC et al. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:967–972.
- Davies HR, Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: current and future treatment options. *Am J Respir Med* 2002; 1:211–224.
- Davies HR, Richeldi L, Walters EH et al. Immunomodulatory agents for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 3:CD003134.
- Doubková M, Skříčková J. Idiopatická plicní fibróza. *Vnitř Lék* 2005; 51:1375–1384.
- Flaherty KR, Colby TV, Travis WD et al. Fibroblastic foci in usual interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1410–1415.
- Flaherty KR, Thwait EL, Kazerooni EA et al. Radiological versus histological diagnosis in UIP and NSIP: survival implications. *Thorax* 2003; 58:143–148.
- Flaherty KR, Toews GB, Lynch JP et al. Steroids in idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective assessment of adverse reactions, response to therapy, and survival. *Am J Med* 2001; 110:278–282.
- Flaherty KR, Travis WD, Colby TV et al. Histopathologic variability in usual and nonspecific interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1722–1727.
- Gay SE, Kazerooni EA, Toews GB et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. Predicting response to therapy and survival. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1063–1072.
- Homolka J, Altmann V, Votava V. Increasing prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis in the Czech Republic. *Chest* 1999; 116,Suppl. 2: p155.
- Homolka J, Votava V. Intersticiální plicní procesy. 1. vydání, Praha, Maxdorf, 1999; p 166.
- Hunninghake GW, Zimmerman B, Schwartz DA et al. Utility of a lung biopsy for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 193–196.
- Chetta A, Marangio E, Olivieri D. Pulmonary function testing in interstitial lung diseases. *Respir* 2004; 71:209–213.
- King TE Jr. Clinical advances in the diagnosis and therapy of the interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:268–279.
- King TE Jr, Safrin S, Starko KM et al. Analyses of efficacy end points in a controlled trial of interferon- γ 1b for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2005; 127:171–177.
- King TE Jr, Schwarz MI, Brown K et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. Relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1025–1032.
- King Jr TE, Tooze JA, Schwarz MI et al. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis. Scoring system and survival model. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1171–1181.
- Kolek V, Žurková M, Petřek M et al. Klinické zkušenosti s idiopatickou plicní fibrózou ve vztahu k nové klasifikaci. *Stud Pneumol Phthiseol* 2000; 60:168–170.
- Lynch DA, Godwin JD, Safrin S et al. High-resolution computed tomography in idiopathic pulmonary fibrosis. Diagnosis and prognosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:488–493.
- McCormack FX, King Jr TE, Voelker DR et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: abnormalities in the bronchoalveolar lavage content of surfactant protein A. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:160–166.
- Nakamura Y, Romberger DJ, Tate L et al. Cigarette smoke inhibits lung fibroblast proliferation and chemotaxis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1497–1503.
- Nicholson AG, Colgy TV, du Bois RM et al. The prognostic significance of the histologic pattern of interstitial pneumonia in patiens presenting with the clinical entity of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:2213–2217.
- Panos RJ, Mortenson RL, Niccoli SA et al. Clinical deterioration in patiens with idiopathic pulmonary fibrosis: cause and assessment. *Am J Med* 1990; 88:396–404.
- Richeldi L, Davies HR, Ferrara G et al. Corticosteroids for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; 4:CD002880.
- Selman M, Thannickal VJ, Pardo A et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs* 2004; 64:405–430.
- Selman M, King TE, Pardo A et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001; 134:136–151.
- Schwartz DA, Van Fossen DS, Davis CS et al. Determinant of progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:444–449.
- Turner-Warwick M, Burrows B, Johnson A et al. Cryptogenic fibrosis alveolitis: response to corticosteroid treatment and its effect on survival. *Thorax* 1980; 35:593–599.

Došlo: 13. 4. 2006

Adresa:

MUDr. Martina Doubková
Klinika nemocí plicních a tuberkulózy MU a FN
Jihlavská 20
625 00 Brno
Česká republika
e-mail: doubkovamartina@seznam.cz

2.4.3. Prognostické faktory idiopatické plicní fibrózy (IPF) – analýza Českého registru IPF (Doubková M, Uher M, Bartoš V, Šterclová M, Lacina L, Lošťáková V, Binková I, Plačková M, Žurková M, Bittenglová R, Pšikalová J, Šišková L, Lisá P, Petřík F, Polák J, Řihák V, Skříčková J, Vašáková M. Čas Lék Česk. 2016; 155(4): 22-28)

PŮVODNÍ PRÁCE

Prognostické faktory idiopatické plicní fibrózy (IPF) – analýza Českého registru IPF

¹Martina Doubková, ²Michal Uher, ³Vladimír Bartoš, ⁴Martina Šterclová, ⁵Ladislav Lacina, ⁶Vladimíra Lošťáková, ⁷Ilona Binková, ⁸Martina Plačková, ⁹Monika Žurková, ¹⁰Radka Bittenglová, ¹¹Jana Pšikalová, ¹²Lenka Šišková, ¹³Pavla Lisá, ¹⁴František Petřík, ¹⁵Jaroslav Polák, ¹⁶Vladimír Řihák, ¹⁷Jana Skříčková, ¹⁸Martina Vašáková

¹Klinika nemocí plicních a TBC LF MU a FN Brno, ²Institut biostatistiky a analýz LF MU Brno,

³Plicní klinika LF UK a FN Hradec Králové, ⁴Pneumologická klinika 1. LF UK a Thomayerovy nemocnice v Praze,

⁵Klinika pneumologie a hrudní chirurgie Nemocnice Na Bulovce v Praze,

⁶Klinika plicních nemocí a tuberkulózy LF UP a FN Olomouc,

⁷Klinika plicních nemocí a tuberkulózy LF OU a FN Ostrava, ⁸Klinika pneumologie a ftizeologie LF UK a FN Plzeň,

⁹Pneumologicko-alerologické oddělení Kroměřížské nemocnice,

¹⁰Plicní oddělení Krajské nemocnice T. Bati Zlín, ¹¹Pneumologická klinika 2. LF UK a FN Motol v Praze,

¹²Dopravní zdravotnictví a. s., Nemocnice s poliklinikou Praha Italská

Čas. Lék. čes. 2016; 155: 22–28

SOUHRN

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je progresivní a obvykle fatální forma idiopatické intersticiální pneumonie (IIP). IPF je charakterizována selháním alveolární reepitelizace, perzistencí fibroblastů, depozicí extracelulární matrix a poruchou alveolární architektury, která vede k respiračnímu selhání. Cílem naší práce bylo zjistit klinické charakteristiky, průběh nemoci a prognostické faktory u pacientů s IPF v běžné klinické praxi.

Analýzovali jsme 202 pacientů, kteří byli pro IPF sledováni v síti center pro diagnostiku a léčbu intersticiálních plicních procesů v České republice. Diagnostika IPF vycházela z doporučení American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS). Naším cílem bylo ověřit prognostické faktory nemoci a osud našich pacientů.

Do analýzy bylo zahrnuto 73 mužů a 129 žen, s mediánem věku 67 let. IPF byla histologicky ověřena u 66 (33 %) pacientů. Medián času od prvních klinických příznaků do stanovení diagnózy byl 12 měsíců. U 57 nemocných (28,3 %) byla diagnóza stanovena do 6 měsíců od začátku symptomů. Osm (4 %) pacientů mělo akutní exacerbaci.

V jednorozměrné analýze byly zjištěny následující faktory, negativně ovlivňující přežití v době diagnózy: vyšší věk, paličkovité prsty, vyšší stupeň dušnosti dle NYHA (New York Heart Association), průkaz neutrofilní alveolitisidy v bronchoalveolární tekutině (BALT), vyšší věk bez histologické verifikace, kardiovaskulární komorbidity, diabetes a osteoporóza. Jako příznivé prognostické faktory byly zjištěny: lepší hodnoty vitální kapacity (VC), celkové plicní kapacity (TLC) a plicní difuze (DLCO, KCO).

Vícerozměrná analýza ukázala, že nepříznivá prognóza nemoci je asociována s vyšším věkem a vyšším stupněm dušnosti. Průkaz lymfocytární alveolitisidy v BALT a lepší hodnoty vstupních parametrů VC a DLCO byly spojeny s lepším přežitím. Nebyl zjištěn žádný rozdíl v přežití mezi pohlavími a mezi kuřáky a nekuřáky. Přítomnost emfyzému neměla vliv na mortalitu a ani na rozsah plicní fibrózy na HRCT hrudníku. Medián přežití dosahoval 51,6 měsíce od diagnózy a nejčastější příčinou smrti bylo respirační selhání.

KLÍČOVÁ SLOVA

Idiopatická plicní fibróza, prognóza, léčba

SUMMARY

Doubková M. et al. Idiopathic pulmonary fibrosis prognostic factors – analysis of the Czech registry

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a rare, progressive and usually fatal form of idiopathic interstitial pneumonia. IPF is characterized by failure of alveolar re-epithelization, persistence of fibroblasts, deposition of extracellular matrix, and distortion of lung architecture, which ultimately results in respiratory failure.

We analysed 202 consecutive patients with IPF diagnosed at the Departments of Pulmonary Diseases and Tuberculosis in the Czech Republic, who they were included in the nationwide Czech IPF registry. Our aim was to determine prognostic factors of IPF and outcome of the disease.

There were 129 males and 73 females who were the median age 67 years. IPF was biopsy-proven in 66 (33 %) of patients. Median time from the first symptom to diagnosis was 12 months. Diagnosis was made in 57 patients (28.3 %) within 6 months from the onset of respiratory symptoms. 8 (4 %) patients had an acute exacerbation during the course of the disease.

In uniparametric (univariate) analysis as prognostic factors associated with poorer survival were found: higher age, higher degree dyspnoea scores, clubbing fingers, comorbidities (arterial hypertension, osteoporosis), patients without histology biopsy, and bronchoalveolar increased neutrophil count. We found these positive prognostic factors: higher levels of VC (vital capacity), TLC (total lung capacity) and DLCO (diffusing capacity for carbon monoxide).

In multiparametric (multivariate) analysis as prognostic factors associated with mortality were found: higher age, higher degree of dyspnoea score. Increased lymphocytes in bronchoalveolar fluid, higher level of VC a DLCO were associated with better survival. There was no difference in survival of patients by sex, by smoking status. No significant difference in survival rates was found between IPF with and without emphysema, between the extent of fibrosis on HRCT (high resolution computed tomography) of thorax and mortality. Median survival was 51.6 months. 58 (28.7 %) patients died. The most frequent reason of death was IPF progression with respiratory failure.

KEYWORDS

Idiopathic pulmonary fibrosis; prognosis; treatment

ÚVOD

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je nejběžnějším typem idiopatické intersticiální pneumonie a má velmi špatnou prognózu, která je způsobená progresí rozsáhlé fibrotické přestavby plicního parenchymu. Radí se mezi méně běžná plicní onemocnění a její etiologie není přesně známa. Základním etiopatogenetickým mechanismem IPF je opakované poškození alveolárního epitelu a abnormální proliferace fibroblastů s tvorbou extracelulární matrix. Zánět může být přítomen sekundárně (1).

Medián věku při diagnóze IPF se pohybuje mezi 60 a 70 roky (1, 2). Rizikovými faktory jsou kouření cigaret, expozice organickým i anorganickým prachům, gastroezofageální reflux a infekce (1–3). Pacienti obvykle trpí postupně se zhoršující dušností, neproduktivním kašlem a umírají na respirační selhání po 2–4 letech od stanovení diagnózy (1–3). Průběh nemoci a přežití jsou ovlivněny přítomností akutních exacerbací, které jsou spojené se skokovým zhoršením plicních funkčních parametrů a progresí plicního nálezu (1).

Stanovení diagnózy IPF vyžaduje nálezu obvyklé intersticiální pneumonie (UIP – *usual interstitial pneumonia*) na HRCT hrudníku (*high resolution computed tomography* – výpočetní tomografie s vysokým rozlišením) v korelaci s klinickým obrazem nebo histologickým ověřením UIP plicní biopsií. Plicní biopsie již není zlatým standardem pro diagnostiku. IPF je spojena s UIP, ale ne každá UIP značí IPF. UIP může být pozorována jako plicní postižení i u jiných onemocnění, například revmatických (1).

IPF trpí kolem 5 milionů lidí na celém světě (4). Epidemiologická data nejsou přesně známa, ale nemoc má stoupající výskyt. Prevalence se ve světě pohybuje mezi 13 a 20/100 000 a incidence činí 6,8–16,3/100 000 obyvatel (4).

V ČR není aktuální epidemiologická situace známa. Studie odhadovaly incidenci na 1/100 000 a prevalenci na 6,5–12/100 000 obyvatel, nicméně údaj je zřejmě podhodnocen vzhledem k poddiagnostikovanosti této nemoci (5). IPF se u nás věnoval již v roce 1953 docent Ladislav Levinský. První sdělení o IPF publikoval na stránkách *Časopisu lékařů českých* (6).

MATERIÁL A METODY

Celkem bylo analyzováno 202 pacientů zadaných do Českého registru IPF. Zadávacími centry podle počtu pacientů byly: Hradec Králové, Thomayerova nemocnice v Praze, Brno, Nemocnice Na Bulovce v Praze, Olomouc, Ostrava, Plzeň, Kroměříž, Zlín a Fakultní nemocnice Motol v Praze.

DIAGNOSTIKA A PACIENTI

IPF byla diagnostikována podle konsenzu *American Thoracic Society/European Respiratory Society* (ATS/ERS) z roku 2011 (1). Kritéria IPF jsou následující:

- vyloučení jiné známé příčiny intersticiálního plicního procesu;
- plicní funkční vyšetření s restriktivní ventilační poruchou a/nebo snížením plicní difuze;
- jinak nevysvětlitelná dušnost;
- potíže trvající více než 3 měsíce;
- bilaterálně bazálně při plicní auskultaci slyšitelné krepitace (*velcro crackles*, připodobňované rozepínání suchého zipu);

- charakteristický HRCT nálezu v plicní tkáni (změny maximálně subpleurálně bazálně typu retikulárních a lineárních opacit, voštinovitá plíce – *honeycomb lung*, trakční bronchiektazie, mimimum opacit mléčného skla – *ground glass*);
- negativní laboratorní testy na průkaz autoprotiláttek s negativním revmatologickým nálezem (3).

Všechny sporné nálezy HRCT byly ověřovány druhým čtením v Thomayerově nemocnici v Praze.

Zdrojem statistických dat byl Český registr IPF spuštěný v roce 2012. Jedná se o pilotní data.

METODY

U 202 pacientů zařazených do celorepublikového registru jsme analyzovali klinické, fyziologické a radiologické charakteristiky v době diagnózy. Jako prognostické faktory byly v době diagnózy (bazální ukazatele) hodnoceny:

- věk;
- pohlaví;
- klinické příznaky (dušnost, kašel, fenotypový projev palčkovitých prstů s nehty tvaru hodinového skla);
- fyziologické parametry v klidu:
 - spirometrie: FVC – forsírovaná vitální kapacita, *forced vital capacity*; FEV1 – jednosekundová forsírovaná vitální kapacita, *forced expiratory volume in 1 second*;
 - pletysmografie: VC – vitální kapacita, *vital capacity*; TLC – totální plicní kapacita, *total lung capacity*; plicní difuze (DLCO – difuzní kapacita plic, *diffusing lung capacity for carbon monoxid*; KCO – *transfer factor*);
- hodnoty krevních plynů (parciální tlak kyslíku, saturace kyslíku);
- status kuřáctví;
- *body mass index* (BMI);
- přítomnost akutní exacerbace;
- HRCT nálezu – alveolární a intersticiální skóre, přítomnost emfyzému na HRCT hrudníku,
- cytologické vyšetření bronchoalveolární tekutiny (BALT) získané bronchoalveolární laváží (BAL);
- léčebné modalilty.

Plicní funkční testy

Spirometrie, pletysmografie a plicní difuze byly prováděny ve shodě s doporučením ATS/ERS (7–9).

HRCT nálezy

U všech nemocných bylo provedeno HRCT hrudníku v době diagnózy a v průběhu sledování. HRCT skóre alveolární (0–5) a intersticiální (0–5) dle Gay et al. a Šterclové et al. (10, 11) bylo hodnoceno na úrovních aortálního oblouku, bifurkace trachey, maximální šíře pravé komory, kupole pravé poloviny bránice. Čím vyšší skóre, tím větší rozsah postižení. Hodnoceno bylo zesílení interlobárních sept, rozsah voštiny a opacit mléčného skla.

Bronchoalveolární laváž

Cytologické vyšetření bronchoalveolární tekutiny (BALT) získané bronchoalveolární laváží bylo provedeno v době diagnózy u všech nemocných (12). Normální nálezy byly definovány takto: lymfocyty < 15 %, neutrofilní granulocyty < 3 %, eozinofilní granulocyty < 0,5 %, makrofágy > 80 % (12).

Statistické metody

Byla provedena jednorozměrná analýza přežití, kde je každý faktor hodnocen samostatně a jeho vliv na přežití je

PŮVODNÍ PRÁCE

kvantifikován jako HR (*hazard ratio* – jakým způsobem daný parametr ovlivňuje riziko úmrtí: HR > 1 zvyšuje riziko úmrtí a naopak HR < 1 snižuje riziko úmrtí).

Dále byla provedena vícerozměrná analýza, která hodnotí všechny faktory najednou, přičemž méně významné jsou z modelu postupně vyřazeny (nicméně základní demografické proměnné jako je věk a pohlaví a primární léčbu v modelu ponecháváme vždy). Hladina významnosti $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY

Analyzována byla data 73 (36 %) žen a 129 (64 %) mužů. 66 (33 %) mělo diagnózu potvrzenou histologicky. Průměrný věk činil 67 let. 8 pacientů (3,5 %) mělo familiární formu IPF (rodinný výskyt). Anamnéza kuřáctví byla přítomná u 105 nemocných – 28 (14 %) současných a 77 (38 %) bývalých kuřáků. Hlavními symptomy byly dušnost u 193 (96 %) a kašel u 160 (79,2 %) pacientů. Fenotypový projev paličkovitých prstů s nehty tvaru hodinového skla byl zaznamenán u 113 (56 %). Medián času mezi začátkem symptomů a stanovením diagnózy dosahoval 12 měsíců. Základní charakteristiky pacientů s IPF jsou uvedeny v tab. 1. Mezi nejčastější komorbidity patřily arteriální hypertenze, diabetes mellitus a hyperlipidemie (viz tab. 2).

Tab. 1 Základní popis souboru pacientů registru IPF (n = 202)

Charakteristiky v době diagnózy	Zastoupení pacientů z celkových 202
Ženy	73 (36,1 %)
Muži	129 (63,9 %)
Věk v době dg.	67 let
Doba trvání symptomů do diagnózy	12 měsíců
Doba trvání symptomů ≤ 6 měsíců	57 (28,3 %)
BMI	28,4
BMI > 30	69 (34,2 %)
Námahová dušnost	193 (95,5 %)
NYHA I, II	129 (63,8 %)
NYHA III, IV	73 (36,2 %)
Krepitus	193 (95,5 %)
Paličkovité prsty	113 (56,2 %)
HRCT hrudníku	202 (100 %)
Histopatologický nálezn	
- typický	58 (28,7 %)
- netypický	8 (4 %)
- neprovedeno	136 (67,3 %)
Respirační infekce	63 (31,2 %)
Nekuřák	97 (48 %)
Bývalý kuřák	77 (38,1 %)
Kuřák	28 (13,9 %)
Pirfenidon	59 (29,2 %)
Trojkombinace SK + NAC + AZA	33 (16,3 %)
NAC + IPP	79 (39,1 %)
Žádná léčba	31 (15,3 %)

Pozn.: NYHA = *New York Heart Association* (klasifikace srdečního selhání); HRCT = *high resolution computed tomography* (výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností); BMI = *body mass index*; SK = systémové kortikoidy; NAC = N-acetylcystein; AZA = azathioprin; IPP = inhibitory protonové pumpy.

Restrikční ventilační porucha a snížení plicní difuze bylo nejčastější plicní funkční abnormalitou.

HRCT hrudníku bylo provedeno u všech pacientů; průměrné intersticiální skóre činilo 2,72 a alveolární 1,20. Výskyt emfyzému byl pozorován u 16 pacientů (7,9 %).

BAL byl proveden u všech nemocných v čase diagnózy; neutrofilní alveolitida byla zjištěna u 169 (83,7 %), lymfocytární u 46 (22,8 %), eozinofilní alveolitidou u 155 (76,7 %) pacientů.

KLINICKÝ PRŮBĚH A LÉČBA

33 (16,3 %) pacientů bylo léčeno kombinací kortikosteroidů s azathioprinem a N-acetylcysteinem, 59 (29 %) pirfenidonem, 79 (39 %) N-acetylcysteinem s inhibitory protonové pumpy, 31 (15,3 %) neužívalo žádnou léčbu (viz tab. 1). 10 pacientů je zařazeno na transplantační listinu. U 8 (4 %) pacientů byla zaznamenána akutní exacerbace.

PŘEŽITÍ

Medián přežití od stanovení diagnózy dosahoval 51,6 měsíce (4,3 roku). Během sledování 58 (28,7 %) subjektů zemřelo. Nejčastější příčinou smrti bylo respirační selhání (v 66 % případů).

V jednorozměrné analýze (viz tab. 3 a 4) jsme prokázali prognostické faktory mající negativně vliv na přežití v době diagnózy: vyšší věk, paličkovité prsty, závažnější stupeň dušnosti dle NYHA, alveolitida s převahou neutrofilních granulocytů v BALT, pacienti bez histologického ověření, komorbidity – kardiovaskulární (arytmie, hypertenze) a osteoporóza. Jako parametry snižující riziko úmrtí byly prokázány: vyšší hodnoty plicních funkcí (VC, TLC, DLCO, KCO) v době diagnózy.

Ve vícerozměrné analýze byly zjištěny tyto faktory ovlivňující negativně přežití: vyšší věk, vyšší stupeň dušnosti.

Tab. 2 Komorbidity u pacientů s IPF

Nemoc	Počet pacientů z celkových 202
Alergie	7 (3,5 %)
Arteriální hypertenze	107 (53 %)
Arytmie	16 (7,9 %)
Astma bronchiale	6 (3,0 %)
Cévní onemocnění mozku	11 (5,4 %)
Deprese	11 (5,4 %)
Diabetes mellitus	48 (23,8 %)
GERD	22 (10,9 %)
Hepatopatie	7 (3,5 %)
Hyperlipidemie	53 (26,2 %)
Chlopenní vada srdce	10 (5,0 %)
CHOPN	9 (4,5 %)
ICHS	43 (21,3 %)
Malignita	13 (6,4 %)
Neuropatie	7 (3,5 %)
Osteoporóza	24 (11,9 %)
Tyreopatie	18 (8,9 %)
Trombóza a embolie	10 (5,0 %)

Pozn.: GERD = *gastroesophageal reflux disease*; CHOPN = chronická obstrukční plicní nemoc; ICHS = ischemická choroba srdeční.

Naopak lymfocytární alveolitida v BALT, lepší vstupní hodnoty VC a DLCO byly spojeny s nižším rizikem mortality (viz tab. 5). Nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl mezi pohlavími, mezi kuřáky a nekuřáky, mezi rozsahem plicní fibrózy na HRCT hrudníku a přežitím. Žádná z léčebných modalit statisticky významně neovlivnila přežití.

Tab. 3 Komorbidity u pacientů s IPF

Faktor	HR (95% IS)	p-hodnota
Pohlaví - ženy	0,78 (0,45-1,37)	0,389
Věk v době diagnózy	1,05 (1,03-1,09)	< 0,001
Doba trvání symptomů v letech	1,14 (0,90-1,46)	0,280
Doba trvání symptomů ≤ 6 měsíců	0,97 (0,55-1,71)	0,909
BMI	1,01 (0,95-1,07)	0,822
Obezita: BMI > 30	0,82 (0,95-1,07)	0,481
Kašel	1,35 (0,58-3,16)	0,491
Námahová dušnost	1,80 (0,25-13,08)	0,563
NYHA III + IV vs. I + II	3,59 (2,11-6,13)	< 0,001
Paličkovité prsty	2,02 (1,12-3,65)	0,019
Emfyzém na HRCT hrudníku	1,30 (0,64-2,65)	0,470
HRCT nález typický vs. atypický	0,53 (0,24-1,16)	0,112
Histopatologický nález: netypický vs. typický	0,43 (0,06-3,28)	0,412
Histopatologický nález: neprovedeno vs. typický	2,16 (1,18-3,96)	0,013
Respirační infekce	1,21 (0,71-2,06)	0,477
Bývalý kuřák vs. nekuřák	0,73 (0,41-1,32)	0,297
Kuřák vs. nekuřák	0,59 (0,27-1,30)	0,190
Alergie	0,68 (0,16-2,78)	0,588
Arteriální hypertenze	1,84 (1,06-3,20)	0,030
Arytmie	2,90 (1,36-6,20)	0,006
Asthma bronchiale	0,04 (0,00-5,87)	0,211
Cévní onemocnění mozku	2,06 (0,93-4,56)	0,074
Deprese	2,46 (0,87-6,98)	0,090
Diabetes mellitus	1,99 (1,12-3,53)	0,019
GERD	0,70 (0,25-1,94)	0,492
Hepatopatie	1,14 (0,41-3,17)	0,800
Hyperlipidemie	1,08 (0,61-1,91)	0,786
Chlopenní vada srdce	2,15 (0,96-4,80)	0,062
CHOPN	0,89 (0,22-3,65)	0,869
ICHS	1,06 (0,59-1,91)	0,846
Malignita	0,85 (0,26-2,76)	0,787
Nefropatie	2,12 (0,76-5,87)	0,150
Tyreopatie	1,42 (0,60-3,34)	0,422
Tromboembolická nemoc	1,82 (0,72-4,60)	0,206
Osteoporóza	2,13 (1,10-4,11)	0,025

Pozn.: BMI = *body mass index*; NYHA = *New York Heart Association* (klasifikace srdečního selhání); HRCT = *high resolution computed tomography*; GERD = *gastroesophageal reflux disease*; ICHS = ischemická choroba srdeční; IPF = idiopatická plicní fibróza; HR = *hazard ratio* (HR > 1 zvyšuje riziko úmrtí a naopak HR < 1 snižuje riziko úmrtí).

Tab. 4 Jednorozměrná analýza faktorů v době diagnózy ovlivňujících přežití pacientů s IPF (n = 202). Statisticky významné hodnoty jsou vyznačeny tučně

Faktor	HR (95% IS)	p-hodnota
Lymfocyty (%)	0,97 (0,93-1,00)	0,086
Lymfocyty > 15 %	0,43 (0,17-1,07)	0,069
Neutrofilní granulocyty (%)	1,02 (1,00-1,04)	0,116
Neutrofilní granulocyty > 3 %	2,97 (1,18-7,46)	0,020
Eozinofilní granulocyty (%)	1,00 (0,94-1,06)	0,984
Eozinofilní granulocyty > 0,5 %	1,54 (0,75-3,14)	0,237
Makrofágy (%)	1,00 (0,99-1,02)	0,888
Vitální kapacita (% NH)	0,98 (0,97-0,99)	0,002
Jednotěřinová vitální kapacita (% NH)	1,00 (0,98-1,01)	0,577
Totální kapacita (% NH)	0,98 (0,96-1,00)	0,012
Transfer faktor (% NH)	0,96 (0,94-0,98)	< 0,001
Transfer koeficient (% NH)	0,98 (0,97-1,00)	0,016
Alveolární skóre	0,96 (0,72-1,28)	0,797
Intersticiální skóre	1,29 (0,93-1,80)	0,131

Pozn.: HR = *hazard ratio* (HR > 1 zvyšuje riziko úmrtí a naopak HR < 1 snižuje riziko úmrtí).

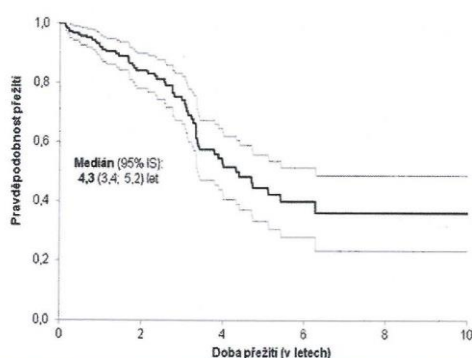
Tab. 5 Vicerozměrný model hodnotící vliv faktorů v době diagnózy významně ovlivňující přežití pacientů s IPF (n = 202)

Faktor	HR (95% IS)	p-hodnota
Pohlaví: ženy	0,54 (0,29-1,01)	0,053
Věk v době dg.	1,07 (1,03-1,11)	< 0,001
NYHA III + IV vs. I + II	2,40 (1,22-4,72)	0,001
Arteriální hypertenze	1,60 (0,85-3,02)	0,144
Pirfenidon vs. jiná léčba	1,23 (0,39-3,94)	0,724
Trojkombinace vs. jiná léčba	0,84 (0,42-1,67)	0,612
Neléčení vs. jiná léčba	1,18 (0,41-3,39)	0,761
Pirfenidon vs. trojkombinace	1,48 (0,43-5,10)	0,539
Pirfenidon vs. neléčení	1,05 (0,26-4,22)	0,950
Trojkombinace vs. neléčení	0,71 (0,23-2,16)	0,545
Lymfocyty v BALT > 15 %	0,19 (0,06-0,56)	0,002
Eozinofilní granulocyty > 0,5 %	2,05 (0,92-4,54)	0,078
Vitální kapacita (% NH)	0,97 (0,95-0,99)	< 0,001
Jednotěřinová vitální kapacita (% NH)	0,99 (0,97-1,00)	0,100
Transfer koeficient (% NH)	0,98 (0,97-1,00)	0,012

Pozn.: NYHA = *New York Heart Association* (klasifikace srdečního selhání); trojkombinace = kortikoidy + azathioprin + N-acetylcystein; BALT = bronchoalveolární tekutina; NH = normální hodnota; NH = normální hodnota; HR = *hazard ratio* (HR > 1 zvyšuje riziko úmrtí a naopak HR < 1 snižuje riziko úmrtí).

DISKUSE

Nové poznatky o etiopatogenezi IPF zcela změnily pohled na léčebné možnosti. IPF se vyskytuje s vyšší četností u mužů (13). Průměrný věk u našich pacientů při stanovení diagnózy 67 let je v souladu s celosvětovými daty (1). Etiologie nemoci není známa, ale kouření cigaret je asociováno s IPF (3, 14). Současné studie ukazují lepší přežití u nekuřáků (15), my



Obř. 1 Kaplanova-Meierova křivka přežití pacientů s idiopatickou plicní fibrózou (n = 202)

jsme však tuto souvislost nepozorovali. Familiární (rodinný) výskyt je pozorován do 5 % případů IPF, což je ve shodě s naším výsledkem (3). Průměrná doba stanovení diagnózy od prvních příznaků se pohybuje od 6 měsíců do 2 let (16). Nejčastějšími symptomy v době diagnózy jsou suchý kašel a střední až těžký stupeň dušnosti při zátěži. Paličkovité prsty jsou přítomné u 50 % pacientů (1). Etiopatogeneze paliček (*clubbing finger*) není přesně známa, ale předpokládá se vliv chronické aktivace makrofágů a produkce profibrotických reparačních faktorů (17).

Nejčastějšími komorbiditami v zahraničních publikacích jsou diabetes mellitus, ischemická choroba srdeční a gastroezofageální reflux (18). GER je zvažován jako možný rizikový faktor vzniku a progresu IPF (18). Tyto závěry potvrdila i naše studie.

Klinický průběh IPF neumíme jasně předpovídat a kritéria progresu IPF nejsou zcela dobře definována (19). Nicméně geny a epigenetické faktory (zevní prostředí, kouření) mají vliv na vznik, vývoj a klinický fenotyp IPF (20, 21). Známe tři rozdílné průběhy nemoci (22–24). Větší část pacientů vykazuje pozvolný pokles plicních funkcí, někteří jsou dlouhodobě stabilní (zejména osoby starší 75 let) a asi 10–20 % má rychlý pokles plicních funkčních parametrů (16, 20). Selman et al. ve své práci definují pacienta s rychlou progresí jako toho, u něhož doba mezi začátkem symptomů a diagnózou byla kratší než 6 měsíců a byla asociována se zhoršením klinickým, funkčním a radiologickým (20). V této studii byl zjištěn významný rozdíl v přežití mezi těmito dvěma skupinami: pacienti s rychlou progresí přežívali 27 měsíců, zatímco pacienti s pomalou progresí 93 měsíců (16, 20) – tyto dvě skupiny pravděpodobně reprezentují rozdílné fenotypy IPF. V naší práci nebyl dostatek dat pro potvrzení těchto závěrů.

Pro prognostické účely IPF se užívají různé klinické a fyziologické determinanty. Prediktory mortality rozdělujeme na základní (bazální v době diagnózy) a dynamické (longitudinální po dobu sledování) (22, 25).

Ve shodě se zahraničními daty nebyl prokázán vliv pohlaví (26, 27). Věk v novějších studiích není prognostickým faktorem (22, 28), ale v naší práci byl vyšší věk spojen s horším přežitím. Histologicky neověřeni pacienti měli horší prognózu než ti s plicní biopsií, pravděpodobným důvodem je opět věk a špatný zdravotní stav způsobený pokročilým plicním procesem. Stupeň dušnosti a paličkovité prsty jsou

označovány ve shodě s našimi závěry jako prognostické ukazatele a jsou obvykle dávány do vztahu k deštrujícím fibrotizujícím onemocnění, delší době do stanovení diagnózy a pokročilosti onemocnění (24).

Několik studií popsalo jako další negativní prognostický faktor přežití horší vstupní plicní funkční ukazatele FVC, VC, TLC a DL_{CO} (29, 30), což je v souladu s našimi závěry. Nižší hodnoty těchto parametrů, zejména DL_{CO} , jsou způsobeny větším rozsahem plicní fibrózy a závažností onemocnění. Další možný prediktor mortality je hodnota PaO_2 (parciální tlak kyslíku) v klidu (31), ačkoli existují i práce, které toto nepotvrdily (32). Údaje pro analýzu krevních plynů v našem souboru byly nedostatečné, proto jsme je nemohli hodnotit.

Prognostickým je i 6MWT (*six-minute walk test* – šestiminutový test chůze), absolvovaná vzdálenost a nejnižší desaturace kyslíku během chůze (33). Bohužel v naší kohortě chyběl dostatek dat pro analýzu 6MWT.

Pro IPF je charakteristické zmožnění neutrofilních granulocytů obvykle s malou příměsí eozinofilů v BALT, lymfocyty bývají zvýšeny minimálně. V naší kohortě byla lymfocytární alveolitida spojena s lepším přežitím a medián lymfocytů v BALT činil 22 %. Neutrofilie v BALT je popisována jako špatný prognostický faktor ve vztahu k přežití v uniparametrických analýzách (34), multiparametrické analýzy to však nepotvrzují (35, 36). Tyto výsledky jsou ve shodě s našimi.

Plicní hypertenze (PH) je uváděna jako další prediktor mortality v longitudinálních studiích a její přítomnost vede ke zhoršení plicních funkčních parametrů (28, 37). My jsme pro hodnocení vlivu PH na mortalitu neměli dostatečné množství dat. Vztah mortality a BMI (*body mass index*) popisují ve své studii Alakhas et al. – nejlepší přežití vykazovali pacienti s BMI > 30, i když vysoké BMI je samo o sobě relativní kontraindikací k provedení plicní transplantace (38). My jsme vliv BMI na přežití nepotvrdili.

HRCT nálezu rozsahu plicní fibrózy je zvažován jako jeden z možných prognostických faktorů (39). Kombinace plicní fibrózy a emfyzému (CPFE – *syndrome of combined pulmonary fibrosis and emphysema*) byla poprvé popsána v roce 2005 (40). Emfyzém je zaznamenán v zahraničních publikacích u 28–35 % nemocných (41, 42). Sugino et al. ve své studii popisují špatnou prognózu pacientů s CPFE oproti IPF. Pacienti s CPFE s paraseptálním emfyzémem a vyšším systolickým plicním arteriálním tlakem měli kratší dobu přežití (43). V naší práci toto zjištěno nebylo, pravděpodobně to souvisí s malým množstvím dat.

AE-IPF (akutní exacerbace) je popsána u 5–10 % všech IPF pacientů (23, 44), mortalita je vysoká, pohybující se mezi 50 a 100 % (16, 45). Výskyt AE-IPF nemá vztah k závažnosti vstupního plicního funkčního postižení (16). V naší kohortě bylo AE pozorováno u 8 (4 %) pacientů, což je v korelaci s výše uvedenými zahraničními daty. AE je asociována se zhoršením klinickým, funkčním i radiologickým (46).

Dalším hodnoceným faktorem byla terapie. Od roku 2012 již není pro IPF doporučována léčba trojkombinací kortikoidy + azathioprin + N-acetylcystein (47). Dle výsledků studie z roku 2014 nebyl zaznamenán ani pozitivní vliv léku s antioxidantním účinkem N-acetylcysteinu na plicní funkční parametry ve srovnání s placebem (48). V naší kohortě bylo touto trojkombinací léčeno jen 16 % nemocných. V léčbě se pokračovalo přechodně jen u pacientů, kteří z ní zaznamenali profit. Od roku 2011 máme možnost v ČR podávat pacientům s IPF a mírnou až středně těžkou formou onemocnění (FVC

50–80 %, $DL_{CO} > 35\%$) antifibrotický lék pirfenidon ovlivňující primární proces fibrogenese. U pacientů léčených pirfenididem bylo zaznamenáno zpomalení deklinace plicních funkcí v čase a lepší přežití oproti skupině neléčených (49). Žádná léčebná možnost v naší studii neměla vztah k přežití, důvodem byla krátká doba sledování.

Medián přežití, který je v různých studiích uváděn od 2 do 4 let od stanovení diagnózy, je ve shodě s našimi výsledky (19, 50). Příčinou smrti u nemocných s IPF je obvykle respirační selhání (51). Tento závěr potvrdila i naše analýza. Dalšími příčinami jsou kardiovaskulární choroby (srdeční selhání, ischemická choroba srdce), bronchogenní karcinom, infekce, plicní embolie (26, 52).

ZÁVĚR

IPF je méně běžné onemocnění se špatnou prognózou. IPF registr nám umožňuje získat první data o českých pacientech a srovnávat je se zahraničními.

V jednorozměrné analýze byly námi zjištěné negativní faktory ve vztahu k přežití v době diagnózy následující: vyšší věk, vyšší stupeň dušnosti, paličkovité prsty, nález zvýšených hodnot neutrofilních granulocytů v BALT, kardiovaskulární komorbidity, diabetes a osteoporóza, pacienti bez histologického ověření. V jednorozměrné analýze jsme zjistili jako pozitivní prognostický ukazatel lepší hodnoty plicních funkčních parametrů (VC, TLC, DL_{CO} , K_{CO}) v době diagnózy.

Ve vícerozměrné analýze byly v době diagnózy potvrzeny tyto negativní faktory ovlivňující přežití: vyšší věk, vyšší stupeň dušnosti. Lymfocytární alveolitida v BALT a lepší vstupní funkční ukazatele (VC, K_{CO}) byly spojeny s delším přežitím.

Literatura

- Raghu G, Collard HR, Egan JJ et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 788–824.
- American Thoracic Society; European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2011. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 277–304.
- Vašáková M, Šterclová M. Idiopatická plicní fibróza – doporučený postup pro diagnózu, léčbu a sledování (2. aktualizace). <http://www.pneumologie.cz/guidelines>
- Fernández Pérez ER, Daniels CE, Schroeder DR et al. Incidence, prevalence and clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2010; 137: 129–137.
- Kolek V. Epidemiology of cryptogenic fibrosing alveolitis in Moravia and Silesia. *Acta Palacki Olomuc Fac Med* 1994; 137: 49–50.
- Levinský L. Chronická difúzní intersticiální plicní fibróza (idiopatická). 1. sdělení. *Čas Lék Čes* 1953; 92: 976–981.
- Miller MR, Hankinson J, Brusasco V et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26: 319–338.
- Wanger J, Clausen JL, Coates A et al. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J* 2005; 26: 511–522.
- Macintyre N, Crapo JE, Viegi G et al. Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J* 2005; 26: 720–735.
- Gay SE, Kazerooni EA, Toews GB et al. Idiopathic pulmonary fibrosis – predicting response to therapy and survival. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1063–1072.
- Šterclová M, Vašáková M. Kvantifikace rozsahu postižení u nemocných s fibrózujícími intersticiálními procesy. *Čes Radiol* 2013; 67: 204–208.
- Skříčková J, Kolaříková R. Standardní postup při provádění bronchoalveolární laváže (BAL) a vyšetřování bronchoalveolární tekutiny (BAT). http://www.pneumologie.cz/soubory/BAL_Standard_Studia_po_recezi_8_2004.pdf
- Raghu G, Weycker D, Edelsberg J et al. Incidence a prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 810–816.
- Baumgartner KB, Samet JM, Stidley CA et al. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 242–248.
- Antonίου KM, Hansell DM, Rubens MB et al. Idiopathic pulmonary fibrosis outcome in relation to smoking status. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 190–194.
- Kim DS, Collard HR, King TE Jr et al. Classification and natural history of idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 285–292.
- Toovey OT, Eisenhauer HJ et al. A new hypothesis on the mechanism of digital clubbing secondary to pulmonary pathologies. *Med Hypotheses* 2010; 75: 511–513.
- Gribbin J, Hubbard R, Smith C et al. Role of diabetes mellitus and gastro-oesophageal reflux in the aetiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2009; 103: 927–931.
- Mura M, Poretta M, Bargagli E et al. Predicting survival in newly diagnosed idiopathic pulmonary fibrosis: a 3-year prospective study. *Eur Respir J* 2012; 40: 101–109.
- Selman M, Carrillo G, Estrada A et al. Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern. *PLoS One* 2007; 2: e482.
- Noth I, Zhang Y, Ma SF et al. Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med* 2013; 1: 309–317.
- Barlo NP, van Moersel Ch, van den Bosch et al. Predicting prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2010; 27: 85–95.
- Martinez FJ, Safrin S, Weycker D et al. The clinical course of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med* 2005; 142: 963–967.
- King TE Jr., Toozee JA, Schwarz MI et al. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1171–1181.
- Carbone R, Balleari J, Grosso M et al. Predictors of mortality of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2008; 12: 97–104.
- Lee SH, Shim HS, Cho SH et al. Prognostic factors for idiopathic pulmonary fibrosis: clinical, physiologic, pathologic and molecular aspects. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2011; 28: 102–112.
- Doubková M, Binková I, Jančíková J et al. Jak včasné je diagnostika idiopatické plicní fibrózy a jak úspěšná je její terapie? *Stud Pneumol Phtiseol* 2007; 67: 113–119.
- Nadrous HF, Myers JL, Decker PA et al. Idiopathic pulmonary fibrosis in patients younger than 50 years. *Mayo Clin Proc* 2005; 80: 37–40.
- Collard HR, King TE Jr, Bartelson BB et al. Changes in clinical and physiologic variables predict survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 538–542.
- Jegal Y, Kim DS, Shim TS et al. Physiology is a stronger predictor of survival than pathology in fibrotic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 639–644.
- Stephan S, de Castro Pereira, Coletta EM et al. Oxygen desaturation during a 4-minute step test: predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2007; 24: 70–76.
- Miki K, Maekura R, Hiraga T et al. Prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2003; 97: 482–490.
- Flaherty KR, Andrei AC, Murray S et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: prognostic value of changes in physiology and six-minute-walk test. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 803–809.
- Kinder BW, Brown KK, Schwarz MI et al. Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2008; 133: 226–232.
- Tabuena RP, Nagai S, Tsutsumi T et al. Cell profiles of bronchoalveolar lavage fluid as prognosticators of idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia among Japanese patients. *Respiration* 2005; 72: 490–498.
- Veeraraghavan S, Latsi PI, Wells AU et al. BAL findings in idiopathic nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia. *Eur Respir J* 2003; 22: 239–244.

PŮVODNÍ PRÁCE

37. Lettieri CJ, Nathan SD, Barnett SD et al. Prevalence and outcomes of pulmonary arterial hypertension in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2009; 135: 746-752.
38. Alakhras M, Decker PA, Nadrou HF et al. Body mass index and mortality in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2007; 131: 1448-1453.
39. Wells AU, Desai SR, Rubens MB et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. A Composite Physiologic Index derived from disease extent observed by computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 962-969.
40. Cottin V, Nunes H, Brillet PY et al. Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. *Eur Respir J* 2005; 26: 586-593.
41. Kurashima K, Takayanagi N, Tsuchiya N et al. The effect of emphysema on lung function and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 2010; 15: 843-848.
42. Mejía M, Carillo G, Rojas-Serrano J et al. Idiopathic pulmonary fibrosis and emphysema: decreased survival associated with severe pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2009; 136: 10-15.
43. Sugino K, Ischida F, Kikuchi N et al. Comparison of clinical characteristics and prognostic factors of combined pulmonary fibrosis and emphysema versus idiopathic pulmonary fibrosis alone. *Respirology* 2014; 19: 239-245.
44. Lazor R, Bonetti A, Nicod LP et al. Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Rev Med Suisse* 2010; 6: 2228-2230, 2232.
45. Song JW, Hong SB, Lim CM et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: incidence, risk factors and outcome. *Eur Respir J* 2011; 37: 356-363.
46. Hyzy R, Huang S, Myers J et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2007; 132: 1652-1658.
47. Raghu G, Anstrom KJ, King TE et al. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2012; 366: 1968-1977.
48. Martinez FJ, de Andrade JA, Anstrom KJ et al. Randomized trial of acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014; 370: 2093-2101.
49. King TE Jr., Bradford JZ, Castro-Bernardini S et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014; 370: 2083-2092.
50. Ley B, Collard HR, King TE JR et al. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 431-440.
51. Saydain G, Islam A, Afessa B et al. Outcome of patients with idiopathic pulmonary fibrosis admitted to the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 839-842.
52. Panos R, Mortenson RL, Nicolli SA. Clinical deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: cause and assessment. *Am J Med* 1990; 88: 396-404.

ADRESA PRO KORESPONDENCI:

MUDr. Martina Doubková

Klinika nemocí plicních a TBC Lékařské fakulty MU
a Fakultní nemocnice Brno
Jihlavská 20, 625 00 Brno
Tel.: 532 232 565
e-mail: doubkovamartina@seznam.cz


2.4.4. EMPIRE Registry, Czech Part: Impact of demographics, pulmonary function and HRCT on survival and clinical course in idiopathic pulmonary fibrosis (Doubková M, Švancara J, Svoboda M, Šterclová M, Bartoš V, Plačková M, Lacina L, Žurková M, Binková I, Bittenglová R, Lošťáková V, Merta Z, Šišková L, Tyl R, Lisá P, Šuldová H, Petřík F, Pšikalová J, Řihák V, Snížek T, Reiterer P, Homolka J, Musilová P, Lněnička J, Palúch P, Hrdina R, Králová R, Hortvíková H, Strenková J, Vašáková M. Clin Respir J. 2018; 12(4): 1526-1535)

Received: 27 May 2017 | Accepted: 14 August 2017
DOI: 10.1111/crj.12700

ORIGINAL ARTICLE

WILEY

EMPIRE Registry, Czech Part: Impact of demographics, pulmonary function and HRCT on survival and clinical course in idiopathic pulmonary fibrosis

Martina Doubková¹  | Jan Švancara² | Michal Svoboda² | Martina Šterclová³ | Vladimír Bartoš⁴ | Martina Plačková⁵ | Ladislav Lacina⁶ | Monika Žurková⁷ | Ilona Binková¹ | Radka Bittenglová⁸ | Vladimíra Lošťáková⁷ | Zdeněk Merta¹ | Lenka Šišková⁹ | Richard Tyl¹⁰ | Pavlína Lisá¹¹ | Hana Šuldová¹² | František Petřík¹¹ | Jana Pšikalová¹³ | Vladimír Řihák⁹ | Tomáš Snížek¹⁴ | Pavel Reiterer¹⁵ | Jiří Homolka¹⁶ | Pavlína Musilová¹⁴ | Jaroslav Lněnička¹⁵ | Peter Palúch³ | Roman Hrdina¹⁷ | Renata Králová¹⁸ | Hana Hortvíková⁵ | Jana Strenková² | Martina Vašáková³

¹ Department of Phthisiology Pulmonary Diseases and Tuberculosis, Masaryk University Faculty of Medicine and University Hospital, Brno, Czech Republic

² Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³ Department of Respiratory Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University, Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic

⁴ Department of Pneumology, Faculty of Medicine and Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

⁵ Department of Pneumology, University Hospital in Ostrava, Faculty of Medicine, Pilsen, Charles University, Czech Republic

⁶ Department of Pneumology and Thoracic Surgery, Hospital Na Bulovce, Prague, Czech Republic

⁷ Department of Respiratory Medicine, Faculty of Medicine and Palacky University Hospital Olomouc, Czech Republic

⁸ Department of Respiratory Diseases, Faculty of Medicine and Charles University Hospital Pilsen, Czech Republic

⁹ Department of Respiratory Diseases, Tomáš Baťa Regional Hospital, Zlín, Czech Republic

¹⁰ Department of Respiratory Diseases, Nový Jičín Hospital, Czech Republic

¹¹ Department of Pneumology, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

¹² Pulmonary Department, České Budějovice Hospital, Czech Republic

¹³ PneumoAllergolog Department, Kroměříž Hospital, Czech Republic

¹⁴ Department of Respiratory Diseases, Jihlava Hospital, Czech Republic

¹⁵ Department of Pulmonary Diseases and Tuberculosis, Masaryk Hospital, Ústí nad Labem, Czech Republic

¹⁶ First Department of Tuberculosis and Respiratory Diseases, General Hospital in Prague and The First Medical Faculty of Charles University, Czech Republic

¹⁷ Department of Respiratory Diseases, Znojmo Hospital, Czech Republic

¹⁸ Department of Respiratory Diseases, Pardubice Hospital, Czech Republic

Correspondence

Martina Doubková, MD, Department of Pneumology and Phthisiology, Faculty of Medicine and University Hospital, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic.
Email: doubkovamartina@seznam.cz

Summary

Introduction: Prognostic factors of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) currently recognized include changes in vital capacity and radiologic findings. However, most of the prognostic studies in IPF are based on clinical studies with preselected IPF

populations. Therefore, we decided to analyze the factors influencing IPF prognosis based on the real-practice data from our IPF registry.

Methods: Data of 514 subjects consecutively entered since 2012 into Czech EMPIRE IPF registry were analyzed.

Results: Median age of our patient cohort was 67 years (50–82). Median overall survival (OS) of the cohort was 63.1 months. The clinical course of IPF according to FVC (forced vital capacity) changes was stabilized in 32.8% of patients (29.7% according to DL_{CO} [diffuse lung capacity] changes), slowly progressive in 39.5% (45%), rapidly progressive in 23.5% (20.7%); and 1.7% patients had at least one acute exacerbation during follow-up. Deterioration in FVC of $\geq 10\%$ at month 12 and in DL_{CO} of $\geq 15\%$ at months 12, 18, and 24 influenced the OS significantly. The fast progressors defined by the DL_{CO} decline rate had higher risk of death compared to those defined by the FVC change over time. In multivariate analysis, age ≥ 70 years, interstitial HRCT scores ≥ 3 , and change in DL_{CO} of $\geq 15\%$ at month 12 were confirmed as factors negatively influencing OS.

Conclusions: DL_{CO} changes over time were shown as a better predictor of mortality compared with FVC changes in our study. In our opinion it is necessary to implement the DL_{CO} analysis into clinical trials and routine practice.

KEYWORDS

idiopathic pulmonary fibrosis, IPF registry, prognostic factors, pulmonary functions

1 | INTRODUCTION

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)—the most common type of idiopathic interstitial pneumonia—is a rare disorder characterized by a progressive, widespread fibrotic damage of the lung parenchyma. It usually occurs after the age of 50. The cause of IPF is unknown but probably multifactorial, and its prognosis dismal. Many IPF patients die from respiratory failure within 2–5 years after diagnosis.^{1,2} IPF patients usually suffer from non-productive cough and gradual-onset dyspnea. IPF course is characterized by exacerbations. Acute exacerbations are associated with decreased pulmonary functions and shorter overall survival (OS). However, these exacerbations are not frequent. IPF diagnosis is based on typical usual interstitial pneumonia (UIP) pattern on high-resolution computed tomography (HRCT) and on clinical features. Histology can confirm UIP if HRCT findings are not conclusive.¹

IPF affects about 5 million people worldwide. Disease incidence and prevalence is 6.8–16.3/100 000, and 13–20/100 000 respectively.³ Historical Czech analyses showed IPF incidence 1/100 000; however, these data are probably affected by the fact that the disease was formerly often underdiagnosed.^{4,5}

The aim of the study was to determine the impact of demographic parameters, pulmonary function parameters, and HRCT scores on survival and outcome of the disease, and to distinguish between the ‘rapid’ and the ‘slow’

progressors according to their pulmonary function parameters and clinical symptoms in everyday clinical practice. Therefore, we analysed 514 patients (359 males and 155 females) with IPF consecutively entered into the Czech part of the EMPIRE Registry.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patients

All subjects consecutively entered into the Czech part of the EMPIRE Registry (European MultiPartner IPF Registry) were analyzed (n = 514). These patients are followed at 11 Centres for ILD (interstitial lung diseases) recognized by the Czech Pneumological and Phthisiological Society’s Section for ILDs. The EMPIRE registry was initiated in the Czech Republic in 2012 by the Section for ILDs of the Czech Pneumological and Phthisiological Society. Further European countries joined the registry in 2015, namely Slovakia, Hungary, Poland and Serbia. All subjects are entered consecutively into the registry with their written informed consent and approved by local ethics committees. IPF diagnosis is based on the American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS) consensus classification.¹ Demographic (age, sex), clinical (body mass index—BMI; smoking status; disease course), laboratory, pulmonary function (forced expiratory volume in 1 second—FEV₁; forced vital capacity—FVC; lung diffusion capacity for

carbon monoxide—DL_{CO}), and radiologic (HRCT) parameters are monitored on a regular basis in all patients.

2.2 | Pulmonary function tests

Spirometry, bodyplethysmography and lung diffusion capacity were measured according to the ATS/ERS recommendation.^{6–8} Results were shown as percentage of the predicted values (% pred). As changes in FVC greater than 10% are known to have clinically significant impact on survival, and changes in DLCO greater than 15% are predictive of mortality,^{9,10} we defined as significant the decline in FVC by more than 10%, and the decline in DL_{CO} by more than 15%.

2.3 | HRCT

All subjects underwent HRCT scan at diagnosis. HRCT alveolar and interstitial scores were assessed by a pulmonologist experienced in radiology. The Gay's scoring system modified by Dutka and Vasakova was used.^{11–13} HRCT alveolar and interstitial changes (alveolar 0–5; interstitial 0–5) were evaluated in all subjects (higher value of the score means greater extent of the lesion).

2.4 | Clinical course of IPF patients

Clinical course of IPF was evaluated in all patients. Several studies have demonstrated that 6- to 12-month changes in FVC and DL_{CO} are highly predictive of the outcome.^{9–11,14–17} Therefore, the patients with the decline in FVC of less than 10%, and with the decline in DLCO of less than 15% at 12 months were defined as 'slow' progressors. The patients with the decline in FVC of more than 10% and the decline in DLCO of more than 15% at 12 months were defined as 'rapid or fast' progressors.⁹

2.5 | Statistical analysis

Differences in analyzed parameters were tested by the Fisher's exact test and the Mann-Whitney test. Continuous variables were described by Valid N, median and percentiles. Long-term survival was illustrated by Kaplan-Meier estimate in patients with the follow-up <120 months. The log-rank test was used to analyze the survival of patients at year 1, 2 and 5 of the follow-up. Changes in functional parameters were shown as differences between basal values (at diagnosis or at first control) and subsequent values (at months 6 ± 0.5, 12 ± 1, 18 ± 1.5 and 24 ± 2). Death risk factors were determined by the Cox proportional hazards model. All parameters significantly different in univariate analysis were re-evaluated by the multivariate analysis.

3 | RESULTS

3.1 | Baseline characteristics

Baseline characteristics of our IPF patients (n = 514; 70% of male, 30% of female) are presented in Table 1. The median age of study participants was 67 years (50–82). A smoking history was found in 271 (53%) patients. The median time between the first symptoms and the time of diagnosis was 12 months (2–48). Median FEV1% was 84.7%, median FVC was 80.0%, and median DL_{CO} was 45.6% at diagnosis. Fifty-one (22%) patients developed emphysema. Seven patients (1.7%) had acute exacerbation. One hundred thirty-five (26%) patients died during the follow-up. Median survival was 63.1 months. Nonsurvivors were more often men with alveolar score equal or higher than 2 and interstitial score equal or higher than 3.

3.2 | Clinical course

Clinical course according to FVC changes was stabilized in 32.8% (in 29.7% according to DL_{CO} respectively), slowly progressive in 39.5% of patients (in 45% according to DL_{CO} respectively), and rapidly progressive in 23.5% (in 20.7% according to DL_{CO} respectively). Seven (1.7%) of them even developed acute exacerbation of IPF (AE-IPF) with sudden worsening of respiratory symptoms, hypoxemia and new radiological infiltrates without a clear other cause.

3.3 | Survival

3.3.1 | Long-term survival

The median overall survival (OS) of the whole cohort of patients was 63.1 months (99.9 months in women, 56.9 months in men respectively; *P* = .059). Age over 70 years, alveolar (1–4) and interstitial (3–5) HRCT scores, FVC levels below 80% and DL_{CO} below 50% were associated with poorer long-term survival. On the other hand, gender, smoking (history), FEV1, symptoms at diagnosis and BMI (body mass index) had no significant influence on the OS. No significant difference in OS was found between the IPF patients with and without emphysema.

3.3.2 | Changes in FVC and DL_{CO} over time and their influence on survival

Decrease in FVC of ≥10% at month 12 was associated with significantly poorer survival (*P* = .004). Moreover, decrease in DL_{CO} of ≥15% at month 12, 18, 24 was associated with higher mortality (*P* < .001, *P* = .007 and *P* = .004). On the other hand, we did not observe any significant influence on survival of the FVC decline of ≥10% at months 18 and 24

TABLE 1 Baseline patient characteristics

Parameter		Total	Alive	Died	P value
Sex – Men		359 (69.8%)	252 (67.2%)	107 (77.0%)	.039
Age at diagnosis		N = 511	N = 373	N = 138	.938
		67.0 (50.0; 82.0)	67.0 (50.0; 81.0)	66.0 (52.0; 83.0)	
BMI		N = 512	N = 373	N = 139	.779
		28.7 (22.1; 35.8)	29.0 (22.2; 35.8)	28.4 (21.2; 36.7)	
Duration of symptoms at diagnosis		N = 502	N = 365	N = 137	.118
		12.0 (2.0; 48.0)	12.0 (2.0; 48.0)	9.0 (2.0; 48.0)	
Smoking		271 (52.8%)	196 (52.4%)	75 (54.0%)	.766
Alveolar score	0	137 (39.6%)	113 (45.9%)	24 (24.0%)	.001
	1	102 (29.5%)	63 (25.6%)	39 (39.0%)	
	2	76 (22.0%)	51 (20.7%)	25 (25.0%)	
	3	28 (8.1%)	16 (6.5%)	12 (12%)	
	4	3 (1.2%)	3 (1.2%)	0 (0.0%)	
Interstitial score	1	28 (8.1%)	25 (10.2%)	3 (3.0%)	.032
	2	129 (37.4%)	97 (39.6%)	32 (32.0%)	
	3	126 (36.5%)	84 (34.3%)	42 (42.0%)	
	4	56 (16.2%)	34 (13.9%)	22 (22.0%)	
	5	6 (1.7%)	5 (2.0%)	1 (1.0%)	
HRCT - changes	No	138 (59.7%)	94 (58.0%)	44 (63.8%)	.606
	Emphysema	51 (22.1%)	37 (22.8%)	14 (20.3%)	
FEV1 (%)		N=454	N=329	N=125	.549
		84.7 (64.0;98.4)	84.9 (6.9;97.9)	84.2 (59.0;99.0)	
FVC (%)		N=455	N=331	N=124	<.001
		80.0 (48.7;116.3)	81.7 (51.3;119.3)	71.6 (42.9;107.4)	
DLco		N=447	N=328	N=119	.002
		45.6 (21.3;72.3)	46.8 (21.8;73.7)	42.4 (18.1;67.4)	
Exacerbations		7 (1.7%)	4 (1.4%)	3 (2.8%)	.391

Bold values are statistically significant $P < 0.05$.

compared with the baseline values. The IPF course according to the FVC changes was stabilized in 32.8% of patients (29.7% according to changes in DL_{CO}), slowly progressive in 39.5% (45%), rapidly progressive in 23.5% (20.7%). Seven (1.7%) patients had at least one acute exacerbation of the disease during the follow-up. Among these groups of patients, a difference was found in the long-term survival ($P = .033$ and $P = .001$). Patients with stabilized disease course had significantly longer OS than the rapid progressors (67.4 vs 44.0 months; $P = .033$). There was no statistically significant difference in the time from the first symptoms to diagnosis between 'rapid' and 'slow' progressors ($P = 0.667$ for FVC and 0.922 for DL_{CO} respectively).

3.3.3 | Uniparametric analysis prognostic factors related to survival

The univariate analysis revealed that the age ≥ 70 years, alveolar HRCT score ≥ 1 , interstitial HRCT score ≥ 3 , decline in FVC of $\geq 10\%$ at month 12, decline of DL_{CO} $\geq 15\%$ at month 12 and at least one acute exacerbation were poor prognostic factors. The DL_{CO} changes over time are better predictor of mortality compared with the FVC changes. Fast progressors, as identified by the DLCO change over time, had a higher risk of death compared to those identified by the FVC change over time. Exacerbators had a higher risk of death compared to non-exacerbators.

3.3.4 | Multiparametric analysis prognostic factors related to survival

Multivariate analysis confirmed that age ≥ 70 years, interstitial HRCT scores ≥ 3 , and change of DL_{CO} $\geq 15\%$ at month 12 were prognostic factors negatively influencing the OS.

Results are summarized in Tables 1–3 and Figures 1–4.

4 | DISCUSSION

In this study, 514 consecutive patients with IPF from the Czech part of the EMPIRE Registry were analysed. The

TABLE 2 Risk factors of death—univariate analysis

Parameter	HR (95% IS)	P value
Sex—Men	1.464 (0.984;2.179)	.060
Age ≥ 70	1.899 (1.319;2.735)	.001
BMI ≥ 25	1.097 (0.715;1.685)	.671
Duration of symptoms ≥ 12	1.144 (0.811;1.162)	.443
Alveolar score:		
1	2.569 (1.518;4.348)	< .001
2	1.561 (0.879;2.772)	.128
3	1.755 (0.833;3.696)	.139
Interstitial score:		
2	2.458 (0.748;8.079)	.139
3	2.763 (0.855;8.931)	.090
4	6.071 (1.799;20.489)	.004
5	2.391(0.247;23.120)	.451
Alveolar score ≥ 1	1.987 (1.242;3.177)	.004
Interstitial score ≥ 3	1.548 (1.016;2.356)	.042
Change of FVC (%)— 12 months ≥ -10	2.784 (1.343;5.772)	.006
Change of DLco (%)— 12 months ≥ -15	4.039 (1.767;9.232)	.001
Change of FVC (%)— 12 months:		
Slow progressors	0.671 (0.252;1.789)	.426
Rapid progressors	2.099 (0.808;5.542)	.128
Exacerbations	2.142 (0.543;8.448)	.276
Change of DLco (%)—12 months:		
Slow progressors	2.454 (0.549;11.801)	.233
Rapid progressors	9.339 (2.037;42.823)	.004
Exacerbations	7.286 (1.197;44.351)	.031

Bold values are statistically significant $P < 0.05$.

TABLE 3 Risk factors of death—multivariate analysis

Parameter	HR (95% IS)	P value
Age ≥ 70	5.053 (1.528;16.702)	.008
Interstitial score ≥ 3	3.998 (1.194;13.384)	.025
Change of DLco (%)— 12 months $\geq -15\%$	3.691 (1.491;9.134)	.005

median survival after diagnosis was similar to that reported by other groups.¹ Median age at diagnosis was consistent with the literature, as well as the higher occurrence in males.¹⁸ We did not investigate cases of familial IPF, however these cases may be misdiagnosed. Cigarette smoking is strongly associated with IPF.¹⁹ According to our study, 53% of patients were smokers or former smokers. In IPF, the time from the first symptoms to final diagnosis ranges from 6 months to 2 years.²⁰ In this study, the median time between the first symptoms and the diagnosis was 12 months. The relationship between mortality and BMI (body mass index) was described by Alakhras et al.²¹ Patients with BMI greater than 30 had better survival compared to patients with BMI below 30. However, a high BMI is a relative contraindication of lung transplantation. In our study, the influence of BMI on survival has not been confirmed.

Chest HRCT represents an important part of IPF evaluation. The overall extent of fibrosis measured by HRCT has been consistently shown to correlate with pulmonary function tests and disease prognosis.⁹ In our study, we analyzed radiological alveolar and interstitial HRCT scores according to the Dutka/Vasakova scoring system.^{12,13} Alveolar and interstitial scores significantly affected the OS.

A syndrome described as combined pulmonary fibrosis and emphysema (CPFE) results from the association of IPF with emphysema.²² The percentage of CPFE found in our cohort (27%) corresponds with other analyses; (28–35%).^{23,24} Some authors describe a negative impact on prognosis when IPF is associated with emphysema. This negative impact is strongly connected with pulmonary hypertension.^{25–27} In our analysis we did not find any significant difference in OS in IPF patients with or without emphysema. Unfortunately, pulmonary hypertension has not been assessed in our study on a regular basis.

Clinical course of IPF is highly variable, with interindividual variability that impairs our ability to predict prognosis and to evaluate appropriate timing for lung transplantation. Moreover, criteria for classification of IPF progression are not well established and there is no clear definition of fast and slow disease progression.²⁸ On the other hand, some genetic and epigenetic factors (external environment, smoking) affecting clinical IPF phenotype have been identified.^{29,30} In the study of Selman et al, the definition of rapid progressors was based on the length of time-period between

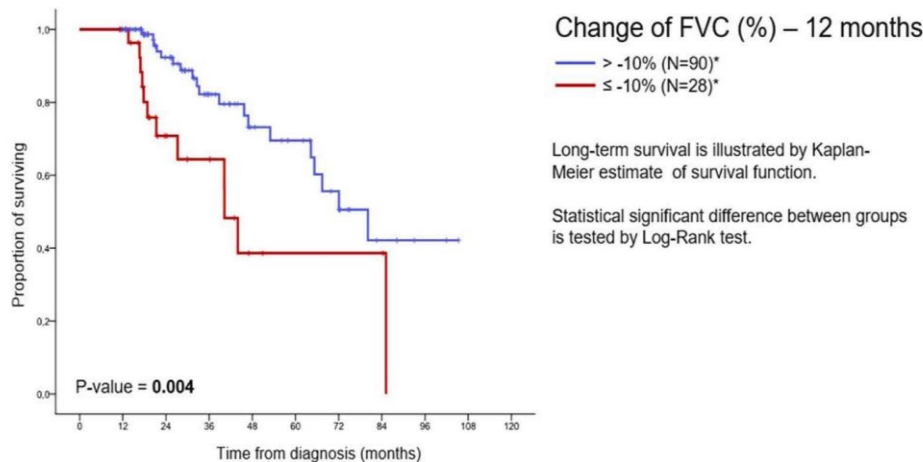


FIGURE 1 Influence of forced vital capacity (FVC) change at month 12 on long-term survival of IPF patients. Decrease in FVC of $\geq 10\%$ at month 12 was associated with significantly poorer survival ($P = .004$)

first symptoms and final diagnosis: rapid progressors had this period shorter than 6 months and usually associated with accelerated pulmonary functions decrease.^{20,29} The difference in OS between slow and rapid IPF progressors is remarkable: 93 vs 27 months. These groups of patients with different disease course represent different phenotypes of IPF.³¹ In our study there was no statistically significant difference in the time from the first symptoms to diagnosis between ‘rapid’ and ‘slow’ progressors ($P = .667$ for FVC and 0.922 for DL_{CO} respectively).

Disease progression remains difficult to predict in a particular individual. There are three different courses of illness. The majority of patients show gradual decrease in lung functions. Nevertheless some patients have long-term stable

disease, especially the elderly patients (over 75 years). Ten to twenty percent of patients show rapid decrease of lung functions.^{1,2,20,29} In our cohort we observed stabilized disease according to the FVC changes in 32.8% of patients (29.7% according to changes in DL_{CO} respectively), slowly progressive in 39.5% (45%), rapidly progressive in 23.5% (20.7%). Four point two percent (4.5% respectively) of patients had at least one acute exacerbation of the disease during the follow-up. The patients with stabilized disease course had OS significantly longer than the rapid progressors (67.4 vs 44.0 months; $P = .033$). There was no statistically significant difference in the time from the first symptoms to diagnosis between ‘rapid’ and ‘slow’ progressors ($P = .667$ for FVC and 0.922 for DL_{CO} respectively).

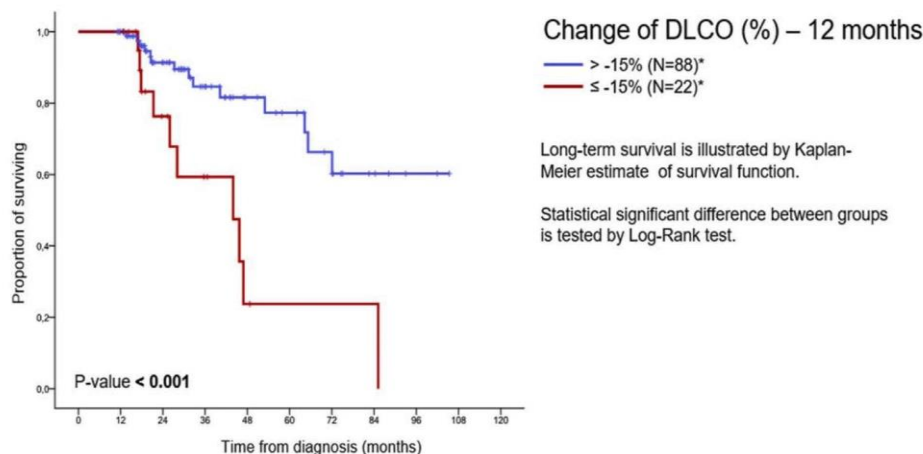


FIGURE 2 Influence of lung diffusion capacity for carbon monoxide (DLCO) change at month 12 on long-term survival of IPF patients. Decrease in DL_{CO} of $\geq 15\%$ at month 12 was associated with higher mortality ($P < .001$)

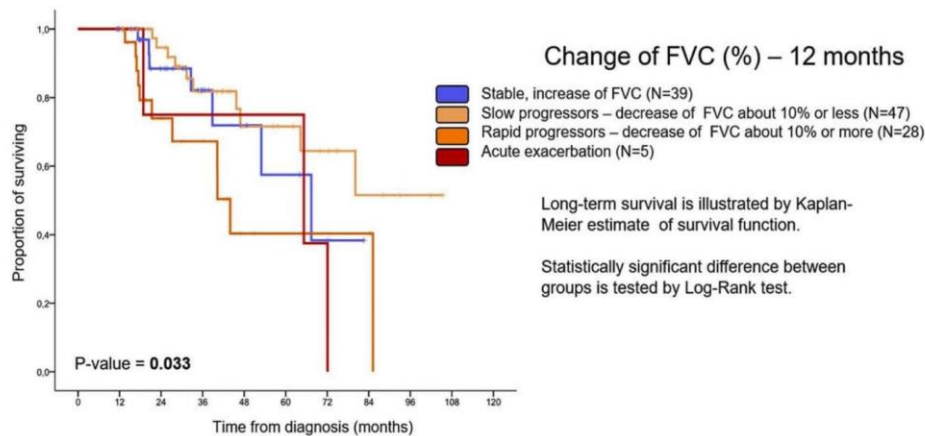


FIGURE 3 Patient cohort divided according to disease progression. Among these groups of patients, a difference was found in the long-term survival. Patients with stabilized disease course had significantly longer OS than the rapid progressors (67.4 vs 44.0 months; $P = .033$)

Different clinical and laboratory variables are used for prognostication in IPF. Predictors of mortality are divided into baseline (evaluated at the time of diagnosis) and dynamic predictors (longitudinal parameters during follow-ups).^{9,32,33} Therefore, prognosis determining should involve integration of baseline and longitudinal data in IPF. This could be a way to predict outcome more accurately and to estimate the time of disease progression more precisely. Baseline parameters that are predictive of clinical outcome include dyspnea, FVC, TLC (total lung capacity), DL_{CO} , desaturation on the six-minute walk test (6MWT), pulmonary arterial pressure, HRCT pattern and pathologic diagnosis of UIP (namely the presence of fibroblastic foci).^{9,10,16,34–36} Although baseline pulmonary function tests are useful for prognosis predicting, changes over time may improve predictive power. Several studies have demonstrated

that 6- to 12-month changes in FVC and DL_{CO} are highly predictive of outcome.^{9,14–17} Clinically significant changes in FVC greater than 10% have significant impact on survival.⁹ However, even marginal declines in FVC at 6 months (5–10%) are associated with higher risk for mortality.^{10,17} Only changes greater than 15% in DL_{CO} were predictive for mortality.^{9,17} In our cohort we have found that changes in FVC of $\geq 10\%$ at month 12 were clinically significant and associated with poorer survival, and changes in DL_{CO} of $\geq 15\%$ at months 12, 18, 24 were associated with increased risk of mortality. Serial changes in FVC, defined as percentage change from baseline, is the most widely accepted primary end-point for therapeutic studies in pulmonary fibrosis based upon prognostic evaluation in IPF. There are no clinical trials in IPF in which DL_{CO} has been used as marker of pulmonary function monitoring.^{37–39} However,

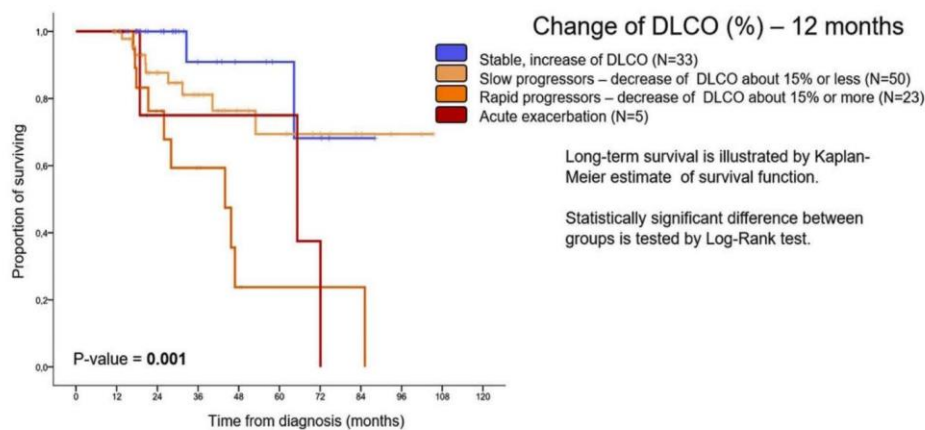


FIGURE 4 Patient cohort divided according to disease progression. Among these groups of patients, a difference was found in the long-term survival ($P = .001$)

DL_{CO} changes over time have been shown to be a better predictor of mortality compared with FVC changes in our study. Therefore, in our opinion, it is necessary to implement DL_{CO} analysis into clinical trials. This implementation of DL_{CO} analysis could precise the results of these trials.

A multifactorial staging system was developed for IPF to improve prognostication of this disease.^{40–42} For instance, the Composite Physiologic Index (CPI), which includes FVC, FEV₁, DL_{CO} and fibrosis extension on HRCT scan, has been successfully tested at baseline and longitudinal studies.⁴² However, the use of these composite systems is not widespread in routine clinical practice. Ley et al developed a multidimensional prognostic staging system using four baseline variables including gender, age and two respiratory physiology variables.⁴⁰ In our multiparametric analysis we confirmed that age ≥ 70 years, interstitial score more or equal to ≥ 3 , changes in DL_{CO} $\geq 15\%$ at month 12 have been prognostic factors influencing mortality.

The occurrence of AE-IPF is 5–15% of all IPF patients, and the mortality of AE is high, ranging between 50 and 100%.^{43,44} In our study only 1.7% of patients had AE; however, we confirmed a significant influence of AE on survival. Exacerbation or fast progression as identified by the DLCO decline in time were better predictors of the risk of death than the FVC changes over time.

Our analysis of IPF patients from the Czech IPF Registry confirmed features that characterize this disease, in terms of clinical, functional and radiologic parameters and outcome.

5 | CONCLUSIONS

IPF remains a devastating parenchymal lung disease with poor prognosis. It can lead to death resulting from slowly progressive respiratory failure. We defined as 'slow' progressors, patients with a 12 months' decline in FVC of less than 10% and/or 12 months' decline in DL_{CO} of less than 15%. As 'rapid' progressors were defined patients with 12 months' decline in FVC of more than 10% and DL_{CO} of more than 15%. We have found no statistically significant difference between 'rapid' and 'slow' progressors in the duration of time from symptom onset to diagnosis. We identified a subgroup of patients with stabilized, slowly progressive and rapidly progressive IPF course according to the changes in FVC and DL_{CO}. Among these groups of patients there were differences in long-term survival ($P = .033$ and $P = .001$). Patients with stabilized disease course had significantly longer OS than the rapid progressors (67.4 vs 44.0 months; $P = .033$).

We have found that, in uniparametric analysis, factors of poor prognosis are age ≥ 70 years, alveolar score of HRCT ≥ 1 , interstitial score of HRCT ≥ 3 , 12 months' decline in FVC of $\geq 10\%$, 12 months' decline in DLCO of $\geq 15\%$, and acute exacerbation—whereas in multiparametric analysis,

factors of poor prognosis (negatively influencing OS) are age ≥ 70 years, interstitial score ≥ 3 and changes of DLCO at 12 months $\geq 15\%$.

There are no clinical trials in IPF in which DL_{CO} has been used as a tool for monitoring pulmonary function. However, in our study, DL_{CO} changes over time have been shown to be a better predictor of mortality compared with FVC changes. Therefore, in our opinion, it is necessary to implement DL_{CO} analysis into clinical trials. The implementation of DL_{CO} analysis makes the results of these trials more accurate.

A more accurate prediction of the outcome would improve management of patients. Identification of patients with slow progression or with rapid progression would be useful for subsequent studies including genetic analyses and searching of IPF clinical phenotype. It might also have an influence on treatment decisions, including the timing of transplantation.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to declare.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors reviewed and approved the final manuscript.

Designed the research: Doubková, Vašáková

Wrote the manuscript: Doubková

Analyzed the data: Doubková, Vašáková

Performed the research: Doubková, Vašáková

Performed statistical analyses: Švancara, Svoboda, Strenkova

Collected patient data: Šterclová, Bartoš, Plačková, Lacina, Žurková, Binková, Bittenglová, Lošťáková, Merta, Šišková, Tyl, Lisá, Šuldová, Petřík, Pšikalová, Řihák, Snížek, Reiterer, Homolka, Musilová, Lněnička, Palúch, Hrdina, Králová, Hortvíková.

Edited the manuscript: Martina Vašáková.

ETHICS

The study was approved by the independent ethic committee and all subjects signed informed consent.

ORCID

Martina Doubková  <http://orcid.org/0000-0001-6536-3134>

REFERENCES

- [1] Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(6):788–824.
- [2] American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory

- Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(2):277–304.
- [3] Fernández-Pérez ER, Daniels CE, Schroeder DR, et al. Incidence, prevalence and clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2010;137(1):129–137.
- [4] Kolek V. Epidemiology of cryptogenic fibrosing alveolitis in Moravia and Silesia. *Acta Univ Palacki Olomouc Fac Med.* 1994;1:49–50.
- [5] Levinský L, Houštěk J, Hloušková Z, et al. Prevalence idiopatické difúzní intersticiální plicní fibrózy v ČSSR. *Studia Pneumol Phthiseol Cechoslov.* 1975;35(7):441–448.
- [6] Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J.* 2005;26(2):319–338.
- [7] Wanger J, Clausen JL, Coates A, et al. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J.* 2005;26(3):511–522.
- [8] Macintyre N, Crapo RO, Viegi G, et al. Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J.* 2005;26(4):720–735.
- [9] Ley B, Collard HR, Talmadge E, King E. Clinical course and prediction of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(4):431–440.
- [10] Collard HR, King TE Jr, Bartelson BB, Vourlekis JS, Schwarz M, Brown KK. Changes in clinical and physiological variables predict survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168(5):538–542.
- [11] Gay SE, Kazerooni EA, Toews GB, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis predicting response to therapy and survival. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;57(4 Pt 1):1063–1072.
- [12] Kocova E, Vanasek J, Koblizek V, et al. Scoring of the radiological picture of idiopathic interstitial pneumonia: a study to verify the reliability of the method. *Acta Radiol Open.* 2015;4(11):2058460115605865
- [13] Šterclová M, Vašáková M, Dutka J, Kalanin J. Extrinsic allergic alveolitis: comparative study of the bronchoalveolar lavage profiles and radiological presentation. *Postgrad Med J.* 2006;82(971):598–601.
- [14] Flaherty KR, Andrei AC, Murray S, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: prognostic value of changes in physiology and six-minute-walk test. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(7):803–809.
- [15] Hanson D, Winterbauer RH, Kirtland SH, Wu R. Changes in pulmonary function test results after 1 year of therapy as predictors of survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 1995;108(2):305–310.
- [16] Jegal Y, Kim DS, Shim TS, et al. Physiology is a stronger predictor of survival than pathology in fibrotic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171(6):639–644.
- [17] Zappala CJ, Latsi PI, Nicholson AG, et al. Marginal decline in forced vital capacity is associated with a poor outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2010;35(2):830–836.
- [18] Raghu G, Weycker D, Edelsberg J, Bradford WZ, Oster G. Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(7):810–816.
- [19] Baumgartner KB, Samet JM, Stidley CA, Colby TV, Waldron JA. Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;115(1):242–248.
- [20] Kim DS, Dollare HR, King JRTE. Classification and natural history of idiopathic interstitial pneumonias. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(4):285–292.
- [21] Alakhras M, Decker PA, Nadrous HF, Collazo-Clavell M, Ryu JH. Body mass index and mortality in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2007;131(5):1448–1453.
- [22] Cottin V, Nunes H, Brillet PY, et al. Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. *Eur Respir J.* 2005;26(4):586–593.
- [23] Kurashima K, Takayanagi N, Tsuchiya N, et al. The effect of emphysema on lung function and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology.* 2010;15(5):843–848.
- [24] Mejía M, Carrillo G, Rojas-Serrano J, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis and emphysema: decreased survival associated with severe pulmonary arterial hypertension. *Chest.* 2009;136(1):10–15.
- [25] Lettieri CJ, Nathan SD, Barnett SD, Ahmad S, Shorr AF. Prevalence and outcomes of pulmonary arterial hypertension in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2006;129(3):746–752.
- [26] Schmidt SL, Nambiar AM, Tayob N, et al. Pulmonary function measures predict mortality differently in IPF versus combined pulmonary fibrosis and emphysema. *Eur Respir J.* 2011;38(1):176–183.
- [27] Sugino K, Ishida F, Kikuchi N, et al. Comparison of clinical characteristics and prognostic factors of combined pulmonary fibrosis and emphysema versus idiopathic pulmonary fibrosis alone. *Respirology.* 2014;19(2):239–245.
- [28] Mura M, Porretta MA, Bargagli E, et al. Predicting survival in newly diagnosed idiopathic pulmonary fibrosis: a 3-year prospective study. *Eur Respir J.* 2012;40(1):101–109.
- [29] Selman M, Carrillo G, Estrada A, et al. Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behaviour and gene expression pattern. *PLoS One.* 2007;2(5):e482
- [30] Noth I, Zhang Y, Ma SF, et al. Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med.* 2013;1(4):309–317.
- [31] King TE, Jr, Tooze JA, Schwarz MI, Brown KR, Cherniack RM. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(7):1171–1181.
- [32] Barlo NP, van Moersel CH, van den Bosch JM, Grutters JC. Predicting prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung.* 2010;27(2):85–95.
- [33] Carbone R, Balleari E, Grosso M, Montanaro F, Bottino G, Ghio R. Predictors of mortality of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2008;12(2):97–104.
- [34] Lynch DA, Godwin JD, Safran S, et al. High-resolution computed tomography in idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and prognosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(4):488–493.
- [35] Sumikawa H, Johkoh T, Colby TV, et al. Computed tomography findings in pathological usual interstitial pneumonia: relationship to survival. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(4):433–439.

- [36] King TE, Jr, Schwarz MI, Brown K, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. Relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(6):1025–1032.
- [37] Noble PW, Albera C, Bradford WZ, et al. CAPACITY Study Group. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet.* 2011;377(9779):1760–1769.
- [38] King TE, Jr, Bradford WZ, Catro-Bernardini S, et al. ASCEND Study Group. A phase 3 trials of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2014;370(22):2083–2092.
- [39] Richeldi L, Du Bois RM, Raghu G, et al. INPULSIS Trial Investigators. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2014;370(22):2071–2082.
- [40] Ley B, Ryerson CJ, Vittinghoff E, et al. A multidimensional index and staging system for idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med.* 2012;156(10):684–691.
- [41] Du Bois RM, Weycker D, Albera C, et al. Ascertainment of individual risk of mortality for patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(4):459–466.
- [42] Wells AU, Desai SR, Rubens MB, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. A composite physiologic index derived from disease extent observed by computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(7):962–969.
- [43] Martínez FJ, Safrin S, Weycker D, et al. The clinical course of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med.* 2005;142(12 Pt 1):963–967.
- [44] Collard HR, Moore BB, Flaherty KR, et al. Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(7):636–643.

How to cite this article: Doubková M, Švancara J, Svoboda M, et al. EMPIRE Registry, Czech Part: Impact of demographics, pulmonary function and HRCT on survival and clinical course in idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Respir J.* 2018;12:1526–1535. <https://doi.org/10.1111/crj.12700>

2.4.5. Význam HRCT hrudníku pro prognózu idiopatické plicní fibrózy (Doubková M, Richter S. Stud Pneumol Pthiseol. 2017; 77(5): 177-183)

177

STUD. PNEUMOL. PHTHISEOL., 77, 2017, č. 5, s. 177-183

Význam HRCT hrudníku pro prognózu idiopatické plicní fibrózy

M. Doubková¹, S. Richter²

¹Klinika nemocí plicních a TBC, FN Brno a LF Masarykovy univerzity, Brno

²Klinika radiologie a nukleární medicíny, FN Brno a LF Masarykovy univerzity, Brno

SUMMARY

Value of chest HRCT in the prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is characterized by radiological and histopathological findings of usual interstitial pneumonia. HRCT findings have not only diagnostic and differential diagnostic but also prognostic value. The aim of this work is to describe pulmonary HRCT findings in IPF and their prognostic significance.

Keywords: high resolution computed tomography, idiopathic pulmonary fibrosis, prognosis

SOUHRN

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je charakterizována radiologickým a histopatologickým nálezem běžné intersticiální pneumonie (usual interstitial pneumonia). HRCT nálezy mají význam nejen diagnostický, diferenciativně diagnostický ale i prognostický. Cílem práce je popsat význam HRCT nálezů pro prognózu IPF.

Klíčová slova: idiopatická plicní fibróza, výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností, prognóza

ÚVOD

IPF (idiopatická plicní fibróza) je specifická forma chronické progredující fibrotizující intersticiální pneumonie, postihující pouze plice a spojená s histopatologickým a/nebo radiologickým obrazem UIP (usual interstitial pneumonia, běžné intersticiální pneumonie) [1]. IPF je charakterizována přemrštěnou depozicí extracelulární matrix, vedoucí k rozsáhlé plicní remodelaci. IPF tvoří cca 20 % všech případů intersticiálních plicních procesů a reprezentuje nejčastější a nejzávažnější idiopatickou intersticiální pneumonii (IIP, idiopathic interstitial pneumonia) [2]. Prognóza pacientů s IPF před zavedením antifibrotické léčby byla špatná a přežití se pohybovalo okolo 3 až 5 let [3]. Pro prognózu IPF se užívají různé klinické a fyziologické determinanty. Prediktory mortality rozdělujeme na základní (bazální, v době diagnózy) a dynamické (longitudinální, po dobu sledování) [5,6].

Průměrná doba stanovení diagnózy od prvních příznaků se pohybuje od 6 měsíců do 2 let [7]. Nejčastějšími symptomy v době diagnózy jsou suchý kašel a střední až těžký stupeň dušnosti při zátěži. Paličkovité prsty jsou přítomny u 50 % případů a jsou spojeny s pokročilým stadiem [3]. Klinický průběh IPF neumíme jasně předpovídat a kritéria IPF progresu nejsou zcela dobře definována [3,8].

AE-IPF (akutní exacerbace) je popsána u 5–15 % všech IPF pacientů, mortalita je vysoká, pohybující se mezi 50 až 100 %. AE je asociována se zhoršením klinickým, funkčním i radiologickým [3].

Současná diagnostická kritéria se opírají o doporučení z roku 2011 (ATS – American Thoracic Society, ERS – European Respiratory Society, JRS – Japanese Respiratory Society, ALAT – Latin-American Thoracic Society) [3]. HRCT hrudníku (high resolution computed tomography, výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností) je stěžejní metodou pro diagnostiku IPF. Je variantou CT (computed tomography), kdy se zhotovují velmi tenké vrstvy (ideálně do 1 mm) zpracovávané rekonstrukčním algoritmem, dovolujícím vysoké prostorové rozlišení. Rekonstrukce obrazů lze provést i v jiné než transverzální rovině [4]. To umožňuje dobré hodnocení intersticia, bronchů a cév plicního parenchymu. Obvykle je pacient vyšetřován v poloze na zádech, v nádechu pro optimální kontrast mezi plicní vzdušnou tkání a intersticiem a pro snížení počtu ploténkových atelektáz. Doplnění skenů v poloze na břiše je vhodné k hodnocení subpleurálních oblastí v dependentních (dorzobazálních) zónách u podezření na různé typy fibróz, včetně IPF. V poloze na břiše mizí dependentní denzity, které v poloze na zádech někdy napodobují obraz fibrózních změn. Charakteristické

nálezů UIP na HRCT hrudníku shrnují tabulka 1 a 2.

Obrázky zde prezentovaných HRCT nálezů pocházejí z databáze Kliniky nemocí plicních a TBC.

1. Retikulace

Retikulace jsou lineární, neboli retikulární opacity. Jsou podmíněny zesílením interlobulárních sept, intralobulárních sept a peribronchovaskulárního intersticia fibrózou, tekutinou nebo buňčnou infiltrací. Převaha retikulárních opacit s maximem v subpleurální a dorzobazální lokalizaci je typická právě pro obraz UIP [1,8]. Naopak u NSIP nad retikulacemi převládají bilaterální opacity mléčného skla a subpleurální oblasti mohou být šetřeny (subpleural sparing) [1].

Přítomnost retikulací a jejich rozsah na HRCT hrudníku je prognostickým faktorem IPF [9,10,11,12]. Rozsah plicní fibrózy v době diagnózy, nebo její změny po dobu sledování byly prediktory přežití v několika studiích [9,13,14,15]. Ve studii autorů Nagao et al. byly sledovány změny HRCT nálezů voštiny ve vztahu k prognóze [16]. V mnoha

studiích korelovala závažnost HRCT fibrózního skóre (rozsah retikulací a voštiny na HRCT hrudníku) s přežitím a plicními funkčními parametry [9,13,14,17]. Best et al. popsali rozsah změn na HRCT hrudníku jako nezávislý faktor mortality [9]. Lynch et al. zaznamenali, že rozsah retikulací a voštiny na HRCT hrudníku je nezávislým prognostickým faktorem mortality u IPF a že větší rozsah fibrotických změn vede ke zvýšenému riziku úmrtí [14]. Mura et al. našli korelaci plicních funkčních parametrů, včetně reziduálního objemu s HRCT fibrózním skóre [18].

Autoři King et al. navrhli klinicko-radiologicko-fyziologický skórovací systém (clinical-radiological-physiological scoring system, CRP) integrující kliniku (dušnost, paličky, krepitace), radiologické (voštinu, difúzní zastínění, plicní hypertenzi na zadopředním snímku hrudníku, nikoliv HRCT) a fyziologické (7 plicních funkčních ukazatelů + plicní mechaniku) parametry. Výsledek je ale příliš komplikovaný pro použití v běžné klinické praxi [10]. Ley et al. vyvinuli prognostický stagingový systém, používající parametry GAP (gender, age, physiology variables): pohlaví, věk, funkční ukazatele (FVC – forced vital capacity a DLCO, diffuse lung for carbon monoxide). Dle tohoto skórovacího systému byly identifikovány tři stadia závažnosti s různým rizikem mortality [19]. Viz tabulka 3 a 4. Wells et al. hodnotili tři plicní funkční parametry [DL_{CO}, FVC (forced vital capacity) a FEV₁ (forced vital capacity in 1 s)] a zjistili korelaci s rozsahem fibrózy na HRCT hrudníku. Vytvořili composite physiologic index, CPI: Rozsah onemocnění na HRCT hrudníku = 91,0 – (0,65 × % prediktivní hodnoty DL_{CO}) – (0,53 × procento prediktivní hodnoty FVC) + (0,34 × procento prediktivní hodnoty FEV₁). CPI index byl lepším prediktorem přežití nežli jednotlivé plicní funkční parametry [20]. Mura et al. našli nezávislé prediktory 3letého přežití; skóre dušnosti dle MRCDS (Medical Research Council Dyspnea Score) > 3, 6 MWT (six minute walk test, šestiminutový test chůze) ≤ 72 % prediktivních hodnot a CPI > 41. Viz tabulka 5. Mortalita ve 3. roce byla 19 %, 42 % a 100 % pro skupiny s nízkým, středním a vysokým rizikem [20]. Gay et al. v prospektivní studii s 38 pacienty zjistili, že HRCT nálezy byly schopny předpovědět dlouhodobé přežití IPF pacientů. HRCT intersticiální skóre (fibrózní) ≥ 2 mělo 80% senzitivitu a 85% specifitu v předpovědi mortality [15]. Mogulkoc et al. zaznamenali, že HRCT fibrózní skóre koreluje s přežitím. Rozdíl mezi přeživšími a zemřelými byl v hodnotě HRCT fibrózního skóre 2,25 [22].

Ve studii Le Rouzic et al. hodnotili vliv HRCT nálezů v době diagnózy na přežití. Pacienty rozdělili dle iniciálního HRCT hrudníku na definitivní UIP (všechna 4 kritéria), možnou UIP (tři charakteristické nálezy, bez voštiny) a na nekonzistentní s UIP. Mezi skupinami definitivní a možná UIP nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v přežití (p = 0.51) [23].

Tabulka 1: Běžná intersticiální pneumonie v HRCT nálezu [3]

Čtyři kritéria typické UIP v HRCT nálezu
1. Retikulace
2. Maximum změn subpleurálně a bazálně
3. Vošтина (kláštery neboli seskupení tenkostěnných cyst o průměru 3–10 mm) ± bronchiektázie
4. Změny nekonzistentní s UIP (maximum změn v horních a středních polích, změny peribronchovaskulární, rozsáhlá mikronodulace, cysty mimo voštinu, mozaiková perfuze a airtrapping, konsolidace v lalocích)
Tři kritéria možné UIP v HRCT nálezu
1. Retikulace
2. Maximum změn subpleurálně bazálně
3. Nepřítomnost změn neodpovídajících UIP (viz bod 4)
HRCT nález neodpovídá UIP
1. Maximum změn v horních a středních plicních polích
2. Převaha změn peribronchovaskulárně
3. Rozsáhlé opacity mléčného skla (převažují nad retikulacemi)
4. Rozsáhlé mikronodulace
5. Diskrétní cysty mimo oblast voštiny
6. Difúzně obraz mozaikové perfuze a airtrappingu
7. Konsolidace v bronchopulmonálních segmentech (lalocích)

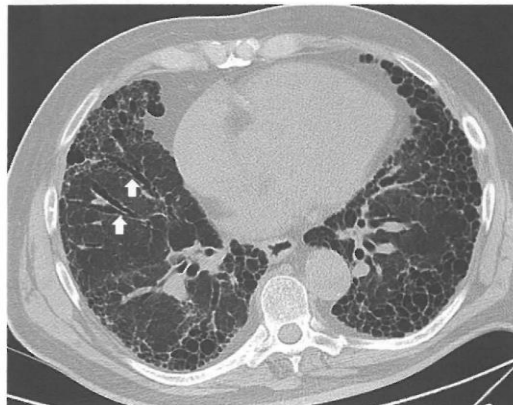
Hwang et al. sledovali změny HRCT nálezů v čase u IPF a zaznamenali, že retikulace obvykle progresují do voštiny a voštinovitá přestavba zvětšuje svůj rozsah [24]. Lee et al. pozorovali u fibrotizujících idiopatických intersticiálních pneumonií progresi retikulací a voštiny, neboli obraz medové pláště „honeycombing lung“ v čase a zmenšení rozsahu opacit mléčného skla GGO (ground glass opacities) [25].

2. Voštinovitá přestavba

Voština je konečným stadiem fibrotizujícího procesu, ale neplatí jednoznačně, že retikulace přechází do voštiny, anebo že opacity mléčného skla přecházejí do retikulací. Voština je charakterizována jako okrsky malých cystických formací velikosti 3–10 mm (výjimečně až 30 mm) s jasně definovanou stěnou, jejíž šíře je do 3 mm. Tyto cysty jsou uspořádány ve shlucích subpleurálně [26]. Její přítomnost je znakem pokročilé fibrózy a je spojena s horší prognózou [14]. Nejčastější příčinou „přehlédnutí“ voštiny jsou trakční bronchiektázie, bronchioloektázie a paraseptální emfyzém. „Mikrocystická“ voština (cysty ≤ 4 mm) je obvykle představitelem „jemného stupně fibrózy“ a nacházíme ji obvykle u NSIP a je asociována s lepší prognózou nežli makrocystická voština [27]. „Makrocystická“ voštinovitá přestavba je „hrubší a závažnější“ fibrózou [20,27,28].

Snaha o objektivizaci míry postižení plicního intersticia vedla k vytvoření skórovacích systémů [15,29]. U nás používáme skórovací systém podle Dutka/Vašáková [30], který je modifikací skórovacího systému dle Kazerooniho z roku 1997 [29] a Gaye z roku 1998 [15]. Je zde hodnoceno postižení pouze na čtyřech úrovních: aortálního oblouku, bifurkace trachey, maximální šíře pravé komory, vrcholu kupole pravé poloviny bránice. Čím vyšší skóre, tím větší rozsah postižení. Hodnotíme zde zesílení interlobárních sept, rozsah voštiny a opacity mléčného skla, tzv. intersticiální a alveolární skóre. Tento skórovací systém má své limity, zejména v objektivnosti a reprodukovatelnosti [31]. Viz tabulka 6 a 7. Rozsah postižení intersticia lze hodnotit vizuálně (viz výše) nebo pomocí automatických skórovacích systémů (počítačové programy) [31,32]. V práci autorů Maldonado et al. byly použity pro kvantifikaci fibrózních změn (retikulací a voštiny) automatizované softwary [11]. Retikulace a voština na HRCT hrudníku dobře koreluje s rozsahem plicní fibrózy při histologickém vyšetření v práci Flaherty et al. [33]. Pacienti s histologicky verifikovanou UIP rozdělili dle HRCT nálezu na definitivní UIP, možnou UIP a nekonzistentní s UIP. Pacienti s definitivní UIP a možnou UIP měli kratší přežití než nemocní s HRCT nekonzistentním s UIP (medián přežití 21 měsíců, versus 69 měsíců). Naopak ve studii autorů Sumikawa et al. rozdělili 98 nemocných s histologicky ověřenou UIP na definitivní UIP, možnou UIP a nekonzistentní s UIP na základě HRCT hrudníku. Nebyl u nich zjištěn statisticky významný rozdíl v přežití. Současně studie potvrdila, že závažnost fibrózy (rozsah retikulací, voštiny, bronchiektázií) spolu s DL_{CO} lépe koreluje s prognózou pacientů nežli dělení UIP podle HRCT nálezů (UIP, možná UIP, nekonzistentní s UIP) [13].

Obrázek 1: HRCT hrudníku, transversální rovina. Obraz pokročilé UIP u pacienta s pokročilou idiopatickou plicní fibrózou. Na řezu pod úrovní bifurkace jsou známky pokročilé fibrózy s voštinovitou přestavbou a retikulárními opacitami, změny výraznější vlevo a v subpleurální lokalizaci. Dále zachyceny trakční bronchiektázie (označeny šipkou)



Obrázek 2: HRCT hrudníku, transversální rovina. Voština s retikulárními opacitami nevelkého rozsahu subpleurálně v dolních lalocích u pacienta s méně pokročilou formou idiopatické plicní fibrózy. Prakticky bez přítomnosti opacit mléčného skla.



3. Bronchiektázie

Bronchiektázie jsou způsobené nevratnou dilatací bronchů na podkladě vrozené méněcennosti stěny, nebo v důsledku zánětu. Šíře bronchu není za normálních okolností větší než šíře doprovodné plicní tepny. Jestliže je průsvit bronchu větší, pak se jedná o bronchiektázie. Podle vzhledu se někdy dělí na cylindrické, cystické, varikózní [34]. Mohou být vyplněny vzduchem či tekutinovým obsahem (často je stagnující obsah příčinou recidivujících infekcí). Vzduchem vyplněné bronchiektázie vytvářejí na HRCT obraz tzv. pečetního prstenu, kde prstenem je rozšířený bronchus a pečetí prstenu

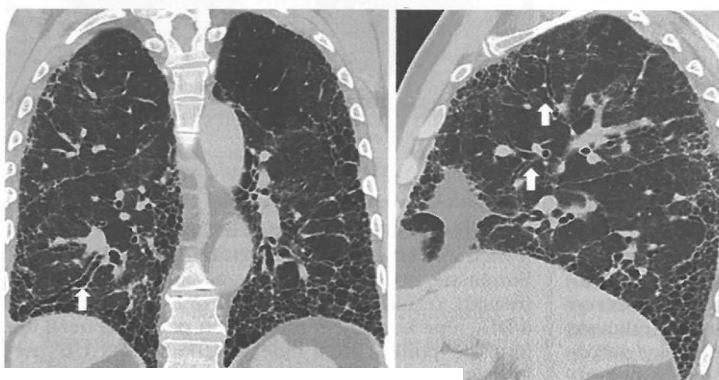
doprovodná tepna. U pacientů s fibrózou se díky tahu okolního parenchymu často sekundárně vytvářejí bronchiektázie trakční [34]. Nejde o další typ bronchiektázií, nýbrž o změny v důsledku postižení okolního plicního parenchymu (viz obrázky 1, 2, 3). Odlišení trakčních bronchiektázií od voštiny u pokročilých forem IPF je na HRCT někdy na axiálních řezech problematické, proto lze s výhodou využít koronálních a sagitálních rekonstrukcí.

Rozsah trakčních bronchiektázií je spojen s horší prognózou. Ve studii Sumikawa et al. popsali vliv přítomnosti a rozsahu trakčních bronchiektázií a rozsahu plicní fibrózy na přežití nemocných s IPF [13]. Walsh et al. hodnotili retrospektivně HRCT nálezy 162 pacientů s biopsicky ověřenou UIP nebo NSIP. Radiologické obrázky byly korelovány s fibroblastickými fokusy a dalšími histopatologickými nálezy. Zjistili, že existuje asociace mezi trakčními bronchiektáziemi, voštinou a množstvím fibroblastických fokusů. Autoři předpokládají, že trakční bronchiektázie a voština jsou součástí pokračujícího procesu bronchiolární dysplastické proliferace [35]. Edey et al. hodnotili HRCT nálezy u fibrotizujících IIP. Zaznamenali, že rozsah trakčních bronchiektázií (bez ohledu na charakter plicní fibrózy), retikulací a voštiny je negativním prognostickým markerem [36].

Tabulka 2: Korelace HRCT nálezu a histologického nálezu [3,7]

HRCT nález	Histopatologie	Diagnóza UIP
UIP	UIP pravděpodobná UIP možná UIP neklasifikovatelná fibróza nejde o UIP	ANO ANO ANO ANO NE
Možná UIP	UIP pravděpodobná UIP možná UIP neklasifikovatelná fibróza nejde o UIP	ANO ANO pravděpodobná pravděpodobná NE
Pravděpodobná UIP	UIP pravděpodobná UIP možná UIP neklasifikovatelná fibróza nejde o UIP	možná NE NE NE NE

Obrázek 3: HRCT hrudníku. Koronální (vlevo) a sagitální rovina (vpravo) napomáhají při odlišení voštiny od bronchiektázií. Na řezech je patrná voštinovitá přestavba plicního parenchymu v subpleurálních lokalitách s maximem postižení dorzobazálně (jedno z kritérií pro obraz typické UIP). Trakční bronchiektázie (označeny šipkou)



4. Opacity mléčného skla (ground glass)

Opacity „mléčného skla“ jsou charakterizovány zvýšením denzity plicního parenchymu na podkladě vyplnění alveolárního prostoru tekutinou nebo buňkami a/nebo jemným zesílením intersticia [34]. Cévy jsou v místech opacit mléčného skla patrné (na rozdíl od konsolidací). Jejich etiologie je široká. Převažující denzity mléčného skla jsou nálezem nekompatibilním s diagnózou UIP/IPF. Nicméně je zde zmiňujeme v rámci diferenciální diagnostiky.

Mnohé studie se zaměřují na to, zda je dle HRCT hrudníku možné odlišit aktivní a neaktivní onemocnění (studie u IPF a IPP asociovaných se systémovou sklerodermií). HRCT nález dává informaci o plicní denzitě, ale

nemůže jasně odlišit fibrózu od lézí s aktivním procesem fibrogenese [5]. Byl předpoklad, že ground glass opacities jsou projevem aktivního zánětlivého procesu a odpovídají na vhodnou terapii. Nicméně není prokázáno, že by vždy opacities mléčného skla předcházely retikulárním změnám nebo voštině [37,38,39]. Jako opacities mléčného skla byly zvažovány změny na úrovni alveolů, změny reverzibilní. Zatímco retikulace a voština reprezentovaly nevratné fibrózní změny. Toto ale jednoznačně neplatí a opacities mléčného skla nemusejí reprezentovat aktivní zánět, ale mohou být způsobeny fibrotizací nejjemnějšího intersticia a nejsou vždy léčebně ovlivnitelné [26,38,39]. Density mléčného skla jsou způsobeny u UIP, zejména akutní exacerbací (AE-IPF), infekční komplikací, tekutinou vyplněnými cystami (kardiální selhávání) nebo již zmiňovanými jemnými fibrózními intralobulárními změnami pod rozlišovací schopností HRCT hrudníku [26,38,39]. Některé opacities mléčného skla mohou regredovat, ale některé progredují do retikulárních změn a dále do voštinovité přestavby. Opacities mléčného skla s bronchiektáziemi nebo bronchiolektáziemi jsou pravděpodobně projevem nevratné plicní fibrózy, ale i infekční komplikace [40].

Akira et al. studovali HRCT u 58 pacientů s IPF před a v čase AE IPF. Ground glass opacities difúzně postižující plicní parenchym korelovaly s difúzním alveolárním postižením (DAD – diffuse alveolar damage – histopatologický nález). Tyto difúzní změny byly asociovány s horším přežitím nežli periferní nálezy [5,41].

5. Emfyzém

Emfyzém nepatří do HRCT kritérií typické UIP, ale u části nemocných se s určitou mírou emfyzematózních změn můžeme setkat [42]. Většinou se jedná o kombinaci emfyzému a fibrotizujícího plicního procesu typu UIP nebo NSIP, ale i DIP (deskvamativní intersticiální pneumonie) nebo RB (respirační bronchiolitida). Nejčastěji jsou emfyzematózní změny v horních plicních polích a v dolních plicních polích je přítomna fibróza. Paraseptální typ emfyzému se nachází v subpleurální lokalizaci a může napodobovat obraz voštinovité přestavby.

Ve studii Sugino et al. byla popsána špatná prognóza pacientů s CPFE oproti IPF. Pacienti s CPFE s paraseptálním emfyzémem a vyšším systolickým plicním arteriálním tlakem měli kratší dobu přežití [43]. Nicméně vliv emfyzému na přežití pacientů s IPF se různí v závislosti na studii, na typu emfyzému [42,44,45,46]. Ve studii Schmidt et al. změny CPI (composite physiologic index) v čase byly prognostickým faktorem u nemocných s CPFE [47]. CPI je využíván u CPFE, kde zohledňuje přítomnost emfyzému u IPF [20].

Ley et al. upravili skórovací systém GAP na CT-GAP. CT fibróza skóre nahradilo DL_{CO} v upraveném GAP modelu. V této studii použili CT-GAP

Obrázek 4: HRCT hrudníku, transverzální rovina. Pacient s akutní exacerbací IPF. Ne řezu je patrná pokročilá voštinovitá přestavba, retikulární opacities, trakční bronchiektázie vpravo. Kromě výše popsaných změn jsou zřetelné opacities mléčného skla v zachovalém plicním parenchymu, dominantně vpravo.



Tabulka 3: GAP [18]

	Faktor	Body
G (gender)	žena	0
	muž	1
A (age)	≤ 60	0
	61–65	1
	> 65	2
P (physiology)	FVC > 75	0
	FVC 50–75	1
	FVC < 50	2
	DL _{CO} > 55	0
	DL _{CO} 36–55	1
	DL _{CO} ≤ 35	2
	difúzi nelze provést	3

Tabulka 4: Míra mortality podle GAP [18]

Stadium	I	II	III
Body	0–3	4–5	6–8
Mortalita (v %)			
1. rok	5,6	10,9	16,3
2. rok	16,2	29,9	42,1
3. rok	39,2	62,1	76,8

v případech, kdy nelze provést plicní difúzi. Nicméně výpočet je komplikovaný a v praxi méně použitelný [48].

Tabulka 5: Skórovací systém podle [20]

Nízké riziko mortality (všechny body splněny)	Střední riziko mortality (jeden bod splněn)	Vysoké riziko mortality (všechny body splněny)
MRCDS ≤ 3	MRCDS > 3	MRCDS > 3
6 MWT > 72 % prediktivní hodnoty	6 MWT ≤ 72 % prediktivní hodnoty	6 MWT ≤ 72 % prediktivní hodnoty
CPI ≤ 41	CPI > 41	CPI > 41

Tabulka 6: Skórovací systém podle [28]

Skóre	Alveolární	Intersticiální
0	bez postižení	bez postižení
1	GGO < 5 % laloku (minimální, ale ne norma)	ztluštění interlobulárních sept bez voštiny
2	GGO 6–25 % laloku	voština (± ztlustění sept) < 25 % laloku
3	GGO 26–49 % laloku	voština (± ztlustění sept) 25–49 % laloku
4	GGO 51–75 % laloku	voština (± ztlustění sept) 50–75 % laloku
5	GGO > 75 % laloku	voština (± ztlustění sept) > 75 % laloku

Hodnocení na úrovni každého laloku obou plic. Zprůměrovány všechny laloky dohromady.

Tabulka 7: Modifikovaný skórovací systém [7,29]

Skóre	Alveolární	Intersticiální
0	bez postižení	bez postižení
1	GGO < 5 %	retikulace < 5 %
2	GGO 6–25 %	retikulace 6–25 %
3	GGO 26–50 %	retikulace 26–50 %
4	GGO 51–75 %	retikulace 51–75 %
5	GGO > 76 %	retikulace > 76 %

Hodnocení plic na čtyřech úrovních – aortálního oblouku, výše bifurkace trachey, maximální šíře pravé komory srdeční, vrcholu pravé kopule bránice. Hodnotí se zvlášť intersticiální (retikulace) a zvlášť alveolární (density mléčného skla GGO) postižení plicního parenchymu v procentech. Výsledná hodnota je průměr. Míra postižení 0–5.

ZÁVĚR

HRCT hrudníku má význam pro diagnostiku, diferenciální diagnostiku a prognózu IPF. Stadium plicní fibrózy (rozsah retikulací, voštiny), přítomnost bronchiektázií, progresse změn v čase jsou negativní prognostické faktory.

LITERATURA

1. Travis WD, Costabel U, Hansell DM et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188(6):733–748.
2. Sgala G, Biffi A, Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis, epidemiology and natural history. *Respirology* 2016; 21(3):427–437.
3. Raghu G, Collard HR, Egan JJ et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183(6):788–824.
4. Heřman M. Základy radiologie. Univerzita Palackého, Olomouc 2014; s. 314.
5. Barlo NP, van Moersel CH, van den Bosch JM, Grutters JC. Predicting prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarc Vasc Diff Dis* 2010; 27(2):85–95.
6. Carbone R, Balleari E, Grosso M et al. Predictors of mortality of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2008; 12(2):97–104.
7. Doubková M, Uher M, Bartoš V et al. Prognostické faktory idiopatické plicní fibrózy (IPF) – analýza českého registru IPF. *Čas Lék Čes* 2016; 155(4):188–194.
8. Vašáková M. Idiopatická plicní fibróza – doporučený postup. <http://www.pneumologie.cz/guidelines/>. Navštíveno dne 7. 5. 2017.
9. Best AC, Meng J, Lynch AM et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: physiologic tests, quantitative CT indexes, and CT visual scores as predictors of mortality. *Radiology* 2008; 246(3):935–940.
10. King TE Jr, Toozé JA, Schwarz MI, Brown KR, Cherniack RM. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(7):1171–1181.
11. Maldonado F, Moua T, Rajagopalan S et al. Automated quantification of radiological patterns predicts survival in

- idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2014; 43(1):204–212.
12. Shin KM, Lee KS, Chung MP et al. Prognostic determinants among clinical, thin-section CT, and histopathologic findings for fibrotic idiopathic interstitial pneumonias: tertiary hospital study. *Radiology* 2008; 249(1):328–337.
 13. Sumikawa H, Jakhoh T, Colby TV et al. Computed tomography findings in pathological usual interstitial pneumonia: relationship to survival. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177(4):433–439.
 14. Lynch DA, Godwin JD, Safran S et al. High-resolution computed tomography in idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and prognosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(4):488–493.
 15. Gay SE, Kazerooni EA, Toews GB et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: predicting response to therapy and survival. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(4 Pt 1):1063–1072.
 16. Nagao T, Nagai S, Hiramoto Y et al. Serial evaluation of high-resolution computed tomography findings in patients with idiopathic pulmonary fibrosis in usual interstitial pneumonia. *Respiration* 2002; 69(5):413–419.
 17. Oda K, Ishimoto H, Yatera K et al. High-resolution CT scoring system-based grading scale predicts the clinical outcomes in patient with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2014; 30(3):15:10.
 18. Mura M, Porretta MA, Bargagli E et al. Predicting survival in newly diagnosed idiopathic pulmonary fibrosis: a 3-year prospective study. *Eur Respir J* 2012; 40(1):101–109.
 19. Ley B, Ryerson CJ, Vittinghoff E et al. A multidimensional index and staging system for idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med* 2012; 156(10):684–691.
 20. Wells AU, Desai SR, Rubens MB et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: a composite physiologic index derived from disease extent observed by computed tomography. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(7):962–969.
 21. Mura M, Ferretti A, Fero O et al. Functional predictors of exertional dyspnea, 6min walking distance and HRCT fibrosis score in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration* 2006; 73(4):495–502.
 22. Mogulkoc N, Brutsche MH, Bishop PW et al. Pulmonary function in idiopathic pulmonary fibrosis and referral for lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(1):103–108.
 23. Le Rouzic O, Bendaoud S, Chenivesse C, Rémy J, Wallaert B. Prognostic value of the initial chest high-resolution CT pattern in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2016; 32(4):353–359.
 24. Hwang JH, Misumi S, Curran-Everett D et al. Longitudinal follow-up of fibrosing interstitial pneumonia: relationship between physiologic testing, computed tomography changes, and survival rate. *J Thorac Imaging* 2011; 26(3):209–217.
 25. Lee HY, Lee KS, Jeong YJ et al. High-resolution CT findings in fibrotic idiopathic interstitial pneumonias with little honeycombing: serial changes and prognostic implications. *AJR Am J Roentgenol* 2012; 199(5):982–989.
 26. Jacob J, Hansell DM. HRCT of fibrosing lung disease. *Respirology* 2015; 20(6):859–872.
 27. Mueller-Mang C, Grosse C, Schmid K, Stiebellehner L, Bankier AA. What every radiologist should know about idiopathic interstitial pneumonias. *Radiographics* 2007; 27(3):595–615.
 28. Desai SR, Veeraraghavan S, Hansell DM et al. *Radiology* 2004; 232(2):560–567.
 29. Kazerooni EA, Martinez F, Flint D et al. Thin-section CT obtained at 10 mm increments versus three-level thin-section CT for idiopathic pulmonary fibrosis: correlation with pathologic scoring. *Am J Roentgenol* 1997; 169(4): 977–983.
 30. Šterclová M, Vašáková M. Kvantifikace rozsahu postižení u nemocných s fibrotizujícími intersticiálními plicními procesy. *Ces Radiol* 2013; 67:204–208.
 31. Kočová E, Vaňásek J, Koblížek V et al. Scoring of the radiological picture of idiopathic interstitial pneumonia: a study to verify the reliability of the method. *Acta Radiol Open* 2015; 4(11):2058460115605865.
 32. Nakagawa H, Nagatani Y, Takahashi M et al. Quantitative CT analysis of honeycombing area in idiopathic pulmonary fibrosis: Correlations with pulmonary function tests. *Eur Respir J* 2016; 85(1):125–130.
 33. Flaherty KR, Thwaite EL, Kazerooni EA et al. Radiological versus histological diagnosis in UIP and NSIP: survival implications. *Thorax* 2003; 58(2):143–148.
 34. Ferda J, Kreuzberg B, Novák M. *Výpočetní tomografie*. Praha: Galén 2002; s. 663.
 35. Walsh SL, Wells AU, Sverzellati N et al. Relationship between fibroblastic foci profusion and high resolution CT morphology in fibrotic lung disease. *Medicine* 2015; 13:24.
 36. Edey AJ, Devarai AA, Barker RP et al. Fibrotic idiopathic interstitial pneumonias: HRCT findings that predict mortality. *Eur Radiol* 2011; 21(8):1586–1593.
 37. Thomeer M, Grutters JC, Wuyts WA, Willems S, Demedts MG. Clinical use of biomarkers of survival in pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2010; 11:89.
 38. Leung AN, Miller RR, Muller NL. Parenchymal opacification in chronic infiltrative lung diseases: CT-pathologic correlation. *Radiology* 1993; 188(1):209–214.
 39. Remy-Jardin M, Giraud F, Remy J et al. Importance of ground-glass attenuation in chronic diffuse infiltrative lung disease: pathologic-CT correlation. *Radiology* 1993; 189(3):693–699.
 40. Lee JS, Im JG, Ahn JM, Kim YM, Han MC. Fibrosing alveolitis: prognostic implication of ground-glass attenuation at high-resolution CT. *Radiology* 1992; 184(2): 451–454.
 41. Akira M, Kozuka T, Yamamoto S, Sakatani M. Computed tomography findings in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178(4):372–378.
 42. Cottin V, Nunes H, Brillet PY et al. Combined pulmonary fibrosis and emphysema: a distinct underrecognised entity. *Eur Respir J* 2005; 26(4):586–593.
 43. Sugino K, Ishida F, Kikuchi N et al. Comparison of clinical characteristics and prognostic factors of combined pulmonary fibrosis and emphysema versus idiopathic pulmonary fibrosis alone. *Respirology* 2014; 19(2):239–245.
 44. Mejía M, Carrillo G, Rojas-Serrano J et al. Idiopathic pulmonary fibrosis and emphysema: decreased survival associated with severe pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2009; 136(1):10–15.
 45. Kurashima K, Takayanagi N, Tsuchiya N et al. The effect of emphysema on lung function and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 2010; 15(5):843–848.
 46. Todd NW, Jeudy J, Lavania S et al. Centrilobular emphysema combined with pulmonary fibrosis results in improved survival. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011; 4(1):6.
 47. Schmidt SL, Nambiar AM, Tayob N et al. Pulmonary function measures predict mortality differently in idiopathic pulmonary fibrosis versus combined pulmonary fibrosis and emphysema. *Eur Respir J* 2011; 38(1):176–183.
 48. Ley B, Elicker BM, Hartman TE et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. CT and risk of death. *Radiology* 2014; 273(2): 570–579.

Došlo: 8. 8. 2017

Adresa:

MUDr. Martina Doubková, Ph.D.
 Klinika nemocí plicních a TBC FN a LF MU
 Jihlavská 20
 625 00 Brno
 Česká republika
 e-mail: doubkovamartina@seznam.cz

2. 5. Terapie idiopatické plicní fibrózy

Od roku 2011-2012 již není pro IPF doporučována léčba trojkombinací kortikoidy + azathioprin + N-acetylcystein (Raghu a kol., 2012; Raghu a kol., 2015; Noble a kol., 2011; King a kol., 2014; Richeldi a kol., 2014) a od tohoto roku máme možnost v ČR podávat pacientům s IPF a mírnou až středně těžkou formou onemocnění antifibrotický lék pirfenidon, který snižuje proliferaci fibroblastů a působků spojených s primárním procesem fibrogenese, pravděpodobně inhibicí transformujícího růstového faktoru β (TGFB) a lidského destičkového faktoru (PDGF, *platelet derived growth factor*). Dalším lékem volby je nintedanib, inhibitor tyrosinkináz, jenž současně blokuje receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), destičkový růstový faktor (PDGFR, *platelet-derived growth factor*) a fibroblastový růstový faktor (FGF, *fibroblast growth factor*). Efekt léčby pirfenidonu na plicní funkce u pacientů zařazených do českého EMPIRE (European MultiPartner IPF Registry) nalezneme v práci z roku 2019. Pirfenidon zde statisticky významně zlepšil 5leté přežití oproti skupině pacientů bez antifibrotické léčby (55,9 % vs. 31,5 %, $p = 0,002$) a měl efekt na zpomalení plicních funkcí v čase (Žurková a kol., 2019). Viz kapitola 2.5.1.

2.5.1. Effect of pirfenidone on lung function decline and survival: 5yr experience from a real-life IPF cohort from the Czech EMPIRE registry (Žurková M, Kriegová E, Kolek V, Lošťáková V, Šterclová M, Bartoš V, Doubková M, Binková I, Svoboda M, Strenková J, Janotová M, Plačková M, Lacina L, Řihák V, Petřík F, Lisá P, Bittenglová R, Tyl R, Ondrejka G, Šuldová H, Lněnička J, Pšikalová J, Snížek T, Homolka J, Králová R, Kervitzer J, Vašáková M. *Respir Res.* 2019; 20(1):16)

Zurkova et al. *Respiratory Research* (2019) 20:16
<https://doi.org/10.1186/s12931-019-0977-2>

Respiratory Research

RESEARCH

Open Access

Effect of pirfenidone on lung function decline and survival: 5-yr experience from a real-life IPF cohort from the Czech EMPIRE registry



Monika Zurkova¹, Eva Kriegova^{2*}, Vitezslav Kolek¹, Vladimira Lostakova¹, Martina Sterclova³, Vladimir Bartos⁴, Martina Doubkova⁵, Ilona Binkova⁵, Michal Svoboda⁶, Jana Strenkova⁶, Marketa Janotova⁶, Martina Plackova⁷, Ladislav Lacina⁸, Vladimir Rihak⁹, Frantisek Petrik¹⁰, Pavlina Lisa¹⁰, Radka Bittenglova¹¹, Richard Tyl⁷, Gustav Ondrejka¹², Hana Suldova¹³, Jaroslav Lnenicka¹⁴, Jana Pšikalova¹⁵, Tomas Snizek¹⁶, Jiri Homolka³, Renata Kralova¹⁷, Jan Kervitzer¹⁸, Martina Vasakova³, ILD section and IPF registry

Abstract

Introduction: Pirfenidone, an antifibrotic drug, slows-down the disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) over 12 months, however limited data on the decline of lung function and overall survival (OS) in real-world cohorts on longer follow-up exists.

Patients/methods: Of the enrolled Czech IPF patients ($n = 841$) from an EMPIRE registry, 383 (45.5%) received pirfenidone, 218 (25.9%) no-antifibrotic treatment and 240 (28.5%) were excluded (missing data, nintedanib treatment). The 2- and 5-yrs OS and forced vital capacity (FVC) and diffusing lung capacity for carbon monoxide (DL_{CO}) were investigated at treatment initiation and 6, 12, 18 and 24 months' follow-up.

Results: During a 2-yr follow-up, less than a quarter of the patients progressed on pirfenidone as assessed by the decline of $\geq 10\%$ FVC (17.0%) and $\geq 15\%$ DL_{CO} (14.3%). On pirfenidone, the DL_{CO} ($\geq 10\%$) declines at 6, 12, 18 and 24 months' and DL_{CO} ($\geq 15\%$) declines at 6, 18 and 24 months' follow-up were associated with increased mortality. The DL_{CO} decline showed higher predictive value for mortality than FVC decline. In patients with no-antifibrotics, FVC and DL_{CO} declines were not predictive for mortality. Pirfenidone increased 5-yrs OS over no-antifibrotic treatment (55.9% vs 31.5% alive, $P = 0.002$).

Conclusion: Our study observed the 2-yrs sustained effect of pirfenidone on the decline of lung function and survival in the real-world patient's IPF cohort. DL_{CO} decline of $\geq 10\%$ shows a potential as a mortality predictor in IPF patients on pirfenidone, and should be routinely evaluated during follow-up examinations.

Keywords: Idiopathic pulmonary fibrosis, Pirfenidone, Mortality prediction, Disease progression

* Correspondence: eva.kriegova@email.cz

Martina Vasakova is a senior author

²Department of Immunology, Faculty of Medicine and Dentistry, University Hospital Olomouc, Palacky University in Olomouc, Hnevotinska 3, 775 15 Olomouc, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Introduction

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) belongs to the idiopathic interstitial pneumonias; it is characterised by a progressively declining lung function, leading to respiratory failure and death, with a median survival of 2–3 years following initial diagnosis [1, 2]. Epidemiological data in many countries are likely underestimated as the diagnosis of IPF tends to be mistaken or missed completely [3] thus an extensive need to establish national and international registries occurred. The Czech IPF registry was launched in June 2012, and on its basis the EMPIRE (*European MultiPartner IPF Registry*) project was launched in 2014 aiming at the assessment of IPF incidence, prevalence, and mortality in Central and Eastern Europe and the determination of basic patients' characteristics and used treatment (<http://empire.registry.cz/index-en.php>).

Since 2015, antifibrotic therapy with either pirfenidone or nintedanib has been recommended in IPF patients [2, 4]. Although the treatment with pirfenidone is not curative, the clinical trials showed that it reduces disease progression, as reflected by lung function, exercise tolerance, and progression-free survival [5–7] and improves life expectancy [8]. There is a growing body of evidence that early diagnosis and early initiation of treatment by pirfenidone may preserve lung functional status and prolong life. A positive effect of pirfenidone on disease progression was also recently observed in patients with more advanced disease with less preserved lung function [9–12].

The effectiveness of pirfenidone in terms of reduced forced vital capacity (FVC) decline, decline in 6-min' walk test distance (6-MWT) and increase of progression-free survival at 12 months after administration has been proven in Phase III CAPACITY/ASCEND population [7, 8] and cohorts from Belgium and the Netherlands [13], Italy [11], Japan [14], Germany [15], the UK [16], Sweden [17], Denmark [18], and Greece [12]. However, long-term data on disease progression in IPF patients treated with pirfenidone is still limited [19, 20].

We therefore investigated 2- and 5-yrs overall survival and lung function declination in IPF patients during long-term treatment with i) pirfenidone and ii) no-antifibrotic drugs. Additionally, the relationship between lung function declination and mortality was estimated. Data was collected prospectively from IPF patients enrolled in the Czech IPF registry between December 2012 to December 2017 in a real-life approach.

Patients and methods

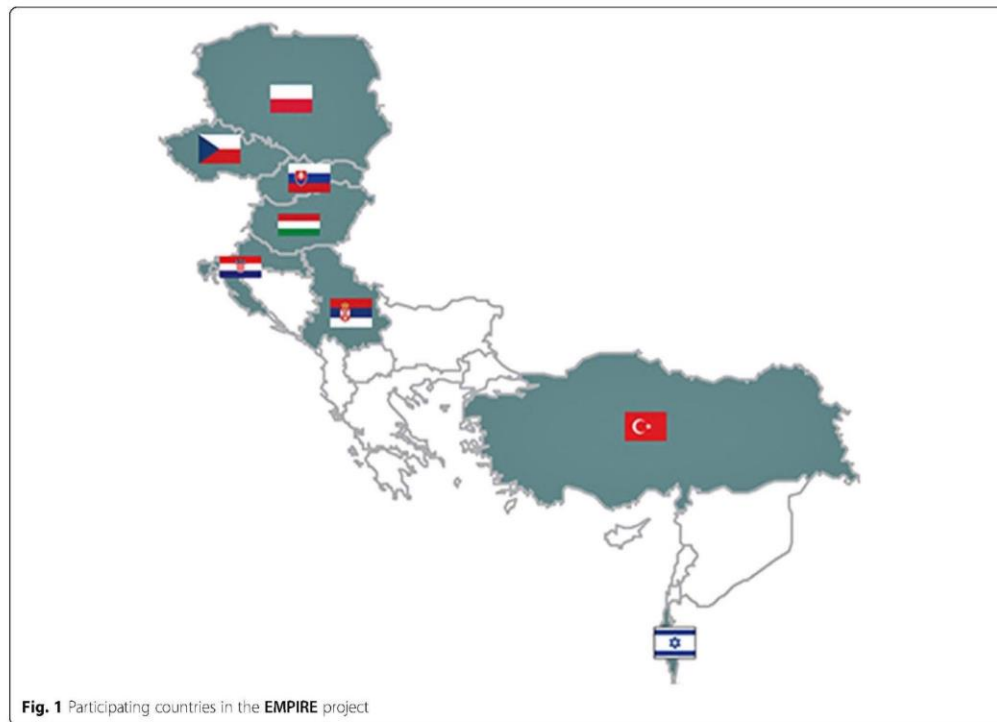
In this study, IPF patients ($n = 841$) from the Czech IPF registry, a national registry within an international multicentre database of patients with IPF in Central and Eastern Europe (EMPIRE, *European MultiPartner IPF*

Registry) were enrolled (Fig. 1). All patients were diagnosed according to the American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS) consensus classification [1] in 15 centres for interstitial lung diseases (ILDs) in the Czech Republic between December 2012 to December 2017. The complete clinical and demographical data (age, gender, treatment start, type of treatment, lung function before and during treatment, comorbidities) were available in 601 patients. 240 patients (28.5%) were excluded from further analysis due to a change of diagnosis ($n = 6$), unknown type of treatment or unknown date of treatment start ($n = 89$) or nintedanib treatment ($n = 145$). Of those with complete clinical and demographical data, 383 (63.7%) patients were treated with pirfenidone and 218 (36.3%) patients treated with other modalities (corticosteroids, N-acetylcystein (NAC), azathioprine and their combinations). Patient demographic and clinical characteristics are shown in Table 1. The assessment of forced vital capacity (FVC) and diffusing lung capacity for carbon monoxide (DL_{CO}) and mortality in enrolled patients were investigated at treatment initiation (max 1 month to treatment start) with 6 (± 1), 12 (± 1), 18 (± 2), and 24 (± 2) months follow-up. Disease progression as measured by FVC decline was considered at two values ($\geq 5\%$, $\geq 10\%$) and/or by DL_{CO} decline at two values ($\geq 10\%$, $\geq 15\%$) [21–23]. Patients on nintedanib were not included in this study because this drug was commercially available in the Czech Republic after September 2016, and most patients on this treatment were followed for less than one year at the end of this study.

In July 2012, the first Czech patients with IPF were selected for pirfenidone therapy in the frame of The European Named Patient Programme (InterImmune International AG) and continued from July 2014 with a commercially available drug. The Czech guidelines for treatment of IPF from 2014 recommend pirfenidone treatment for patients with measured FVC $\geq 50\%$ and $\leq 90\%$ predicted and $DL_{CO} \geq 35\%$ [24]. Pirfenidone was administrated at 2403 mg/day in 3 doses. The majority of patients enrolled by December 2014 obtained together with pirfenidone NAC at 3×600 mg based on recommendation from the clinical trials [25] and Czech IPF guidelines [24]. Since January 2015, pirfenidone has been administrated without NAC, according to the new evidence from clinical trials, mainly PANTHER trial [26, 27] and updated Czech IPF guidelines [28].

Statistics

For a basic description of the input characteristics of patients, the differences in continuous variables were tested using the independent t-test/Mann-Whitney U test and the difference between two different time points



by paired t-test/Wilcoxon paired test, based on the normality of the data assessed by the Shapiro–Wilk test. The differences in frequencies in categorical variables between groups were tested using Fisher’s exact test (four-field tables). Survival analysis was established using the Kaplan–Meier survival diagram, using the treatment

initiation time as the starting point and the end of follow-up or the last clinical follow-up visit as the endpoints. Statistical significance tested by Log Rank test and the median survival time is presented. The analysis was prepared in IBM SPSS Statistics 24.0.0.0 with level of significance $\alpha = 0.05$.

Table 1 Demographic data on IPF patients evaluated in this study

Number of patients (%)	Total	Pirfenidone treatment	No-antifibrotic treatment	P-value (pirfenidone vs no-antifibrotics)
Patients, %	601 (100.0%)	383 (63.7%)	218 (36.3%)	
Gender (male/female), number (%)	431 (71.7%)/170 (28.3%)	281 (73.4%)/102 (26.6%)	150 (68.8%)/68 (31.2%)	0.258
Age (< 60/60–69/> 70 yrs)	106/236/259	66/157/160	40/79/99	0.520
Smoking status				0.057
Non smokers	275 (45.8%)	166 (43.3%)	109 (50.0%)	
Exsmokers	316 (52.6%)	213 (55.6%)	103 (47.2%)	
Smokers	10 (1.7%)	4 (1.0%)	6 (2.8%)	
FVC (%), predicted, at the treatment initiation Mean \pm SD	71.7 \pm 15.9	70.7 \pm 13.2	74.2 \pm 20.8	0.068
DL _{CO} (%), predicted, at the treatment initiation Mean \pm SD	46.1 \pm 13.6	47.8 \pm 12.1	41.9 \pm 16.1	< 0.001
FVC \geq 50% and \leq 90% predicted & DL _{CO} \geq 35%, yes/no, number (%)	432/169 (71.9%/28.1%)	322/61 (84.1%/15.9%)	110/108 (50.5%/49.5%)	< 0.001

Results

Lung functions and its decline during treatment in IPF patients

Of the patients enrolled into the EMPIRE registry, the data on disease progression and other clinical data was available in 601 patients. The length of follow-up and the number of patients for whom data were available in the given follow-up months is shown in Table 2.

Lung function decline in the subgroups of IPF patients

In order to assess the lung function decline in patients on pirfenidone and those receiving no-antifibrotic treatment during the follow-up, the differences between FVC and DL_{CO} values at the treatment initiation and at 6, 12, 18 and 24-months follow-up were evaluated.

On pirfenidone, the percentages of patients who experienced a $\geq 10\%$ decline in FVC were at 6, 12, 18 and 24 months as follows: 5.3, 10.7, 16.6, 17.0%, respectively (Table 3). In those with no-antifibrotic treatment, $\geq 10\%$ decline in FVC was observed at 6, 12, 18 and 24 months for 18.3, 25.0, 24.2, 31.0% patients. When evaluating $\geq 5\%$ decline in FVC as cut-off for progression, the percentages of the patients with progression over time were at 6, 12, 18 and 24 months (17.3, 25.2, 35.5, 34.8%) comparing to no-antifibrotic treatment (35.0, 44.4, 51.5, 50.0%) (Table 3).

When using the DL_{CO} decline $\geq 15\%$ as the marker of progression, the percentage of patients on pirfenidone who progressed at 6, 12, 18 and 24 months were: 6.1, 11.3, 11.5, 14.3%, respectively. Percentage of patients who progressed with $\geq 15\%$ decline in DL_{CO} on no-antifibrotic therapy at 6, 12, 18 and 24 months were as follows: 8.5, 18.5, 12.5, 25.6%. Using the $\geq 10\%$ decline in DL_{CO}, the percentages of patients on pirfenidone who progressed were at 6, 12, 18 and 24 months: 15.4, 19.7, 22.4, 26.3%, respectively. The percentages of patients who progressed on no-antifibrotic therapy were at 6, 12, 18 and 24 months: (18.6, 30.8, 25.0, 33.3%) (Table 3).

Table 2 Length of follow-up of enrolled patients

	Pirfenidone treatment	No-antifibrotic treatment
Length of follow-up (months, mean \pm SD)	22.8 \pm 16.5	32.1 \pm 37.3
Number of patients at the treatment initiation	383 (100.0%)	218 (100.0%)
at posttreatment follow-up (in months):		
6 (± 1) mo	331 (86.4%)	174 (79.8%)
12 (± 1) mo	270 (70.5%)	144 (66.1%)
18 (± 2) mo	204 (53.3%)	117 (53.7%)
24 (± 2) mo	138 (36.0%)	98 (45.0%)
60 (± 3) mo	17 (4.4%)	32 (14.7%)

The association between FVC and DL_{CO} declines and mortality in IPF patients

Next, we investigated the decline of FVC and DL_{CO} in groups of patients treated with pirfenidone as well as those on no-antifibrotic treatment and its association with mortality at 6, 12, 18 and 24 months.

The mortality in patients on pirfenidone as well as on no-antifibrotic drugs was not associated with progression as assessed by the FVC decline of 5%, predicted at any of investigated follow-up time point during 2-yr follow-up (Table 4A). Similarly, a FVC decline of 10%, predicted was not associated with mortality, except for 24 months' follow-up only in pirfenidone group (Table 4A). Regarding DL_{CO}, the mortality in pirfenidone patients was associated with the decline $\geq 10\%$ at 6, 12, 18 and 24 months' follow-up (Table 4B). Also decline $\geq 15\%$ DL_{CO} was predictive for mortality on pirfenidone at 6, 18 and 24 months ($P < 0.05$), but it did not reach significance at 12 months' follow-up ($P = 0.182$) (Table 4B). In the no-antifibrotic-treated group, the decline $\geq 10\%$ and $\geq 15\%$ DL_{CO} showed a high predictive value for mortality only at 6 months' follow-up (Table 4B).

Number of hospitalizations and their reasons in treated IPF patients

Next, we evaluated the number of hospitalized patients and hospitalisation rates in groups of patients on pirfenidone and those with no-antifibrotic drugs, with special emphasis to acute exacerbations.

The comparison of percentages of hospitalized patients treated with pirfenidone (patients/percentage from whole subgroup: 122/31.9%) and those on no-antifibrotic treatment (86/39.4%) showed trend to lower percentages of hospitalized patients in pirfenidone group ($P = 0.062$). The percentage of patients hospitalized for acute exacerbations did not reach significance between pirfenidone (70/18.3%) and no-antifibrotic groups (53/24.3%, $P = 0.092$). Regarding the number of exacerbations, less patients on pirfenidone had one exacerbation (41/10.7% vs 30/13.8%), 2 exacerbations (21/5.5% vs 14/6.4%), and ≥ 3 exacerbations (8/2.1% vs 9/4.2%) then patients on no-antifibrotics, but the differences did not reach significance ($P = 0.371$).

Overall survival and reason for end of follow-up in enrolled patients

Next, we analysed the overall survival of patients on pirfenidone and those receiving no-antifibrotic treatments as well as investigated the reason for end-of-follow-up in both groups.

The pirfenidone treated patients had longer overall survival, evident at 12, 24 and 60 months after treatment

Table 3 The lung function decline and progression as assessed by decline of A) FVC %, predicted, and B) DL_{CO} %, predicted, in groups of patients on pirfenidone and no-antifibrotic treatments

		Pirfenidone treatment	No-antifibrotic treatment	P-value (pirfenidone vs no-antifibrotics)
A) FVC %, predicted				
6 mo	Decline FVC %, predicted	1.0 ± 8.2*	-2.1 ± 10.2	0.028
	% patients with decline ≥5%/decline < 5%	17.3%/82.7%	35.0%/65.0%	0.004
	% patients with decline ≥10%/decline < 10%	5.3%/94.7%	18.3%/81.7%	0.558
12 mo	Decline FVC %, predicted	0.2 ± 9.2	-4.9 ± 10.5*	< 0.001
	% patients with decline ≥5%/decline < 5%	25.2%/74.8%	44.4%/55.6%	0.003
	% patients with decline ≥10%/decline < 10%	10.7%/89.3%	25.0%/75.0%	0.064
18 mo	Decline FVC %, predicted	-1.1 ± 10.4	-6.0 ± 11.1*	0.016
	% patients with decline ≥5%/decline < 5%	35.5%/64.5%	51.5%/48.5%	0.116
	% patients with decline ≥10%/decline < 10%	16.6%/83.4%	24.2%/75.8%	0.818
24 mo	Decline FVC %, predicted	-0.9 ± 10.7	-6.7 ± 11.3*	0.003
	% patients with decline ≥5%/decline < 5%	34.8%/65.2%	50.0%/50.0%	0.102
	% patients with decline ≥10%/decline < 10%	17.0%/83.0%	31.0%/69.0%	0.420
B) DL _{CO} (%), predicted				
6 mo	Decline DL _{CO} (%), predicted	-1.6 ± 10.0*	-4.6 ± 10.3*	0.036
	% patients with decline ≥10%/decline < 10%	15.4%/84.6%	18.6%/81.4%	0.558
	% patients with decline ≥15%/decline < 15%	6.1%/93.9%	8.5%/91.5%	0.559
12 mo	Decline DL _{CO} (%), predicted	-2.4 ± 11.0*	-6.0 ± 11.6*	0.021
	% patients with decline ≥10%/decline < 10%	19.7%/80.3%	30.8%/69.2%	0.064
	% patients with decline ≥15%/decline < 15%	11.3%/88.7%	18.5%/81.5%	0.143
18 mo	Decline DL _{CO} (%), predicted	-3.6 ± 12.1*	-6.1 ± 12.6*	0.294
	% patients with decline ≥10%/decline < 10%	22.4%/77.6%	25.0%/75.0%	0.818
	% patients with decline ≥15%/decline < 15%	11.5%/88.5%	12.5%/87.5%	0.772
24 mo	Decline DL _{CO} (%), predicted	-4.7 ± 11.8*	-8.5 ± 10.1*	0.072
	% patients with decline ≥10%/decline < 10%	26.3%/73.7%	33.3%/66.7%	0.420
	% patients with decline ≥15%/decline < 15%	14.3%/85.7%	25.6%/74.4%	0.142

*Indicates significant difference between the treatment initiation and particular posttreatment time point
Progression is defined as decline of i) ≥ 5% or 10% FVC %, predicted or ii) ≥ 10% or 15% DL_{CO} (%), predicted

initiation, comparing to those treated with no-antifibrotic drugs ($P = 0.002$) (Fig. 2a). After 5-yr, the median survival was not reached in the pirfenidone group with more than half of patients still alive after 5-yr (55.9%) vs one-third on no antifibrotic treatment (31.5%) (Fig. 2a). End of follow-up was recorded in 141 (36.8%) of patients treated with pirfenidone and 161 (73.9%) of those with no-antifibrotic treatment (Table 5). In both groups, the main reason for end of follow-up was death (26.4% in the pirfenidone group, 55.5% in those with no-antifibrotic treatment). The major reason for death was the mortality for IPF related causes (acute exacerbation, suspected acute exacerbation) in both pirfenidone (67.3%) and no-antifibrotic treatment (73.6%, $P = 0.525$) groups (Fig. 2b). The loss of follow-up was recorded in 6.3% of patients on pirfenidone and 15.1% of those on no-antifibrotic treatment (Table 5). Lung transplantation

was performed in only 7 (1.8%) patients treated with pirfenidone, whereas the majority of them (4 patients) were transplanted after 24 months after diagnosis.

Discussion

This study on a large national real-life IPF cohort showed clinically meaningful reductions in disease progression as assessed by the decline of lung functions in patients with IPF treated 2-yr with pirfenidone comparing to no-antifibrotics. After 5-yr, more than half of patients on pirfenidone were alive comparing to one-third on no-antifibrotics. Moreover, our data highlights the importance of the decline in DL_{CO} of ≥10% as a predictor of mortality in pirfenidone treated patients.

Several studies in various populations proved that pirfenidone slows-down the disease progression in terms of declining the lung functions during the first year of

Table 4 Relationship between (A) FVC, % predicted and (B) DL_{CO}, % predicted and mortality in enrolled IPF patients treated with pirfenidone and no-antifibrotic drugs

A)	Pirfenidone	P-value	No antifibrotic treatment	P-value
Mortality				
No	73.8 (52.1; 95.3)	<0.001	80.5 (45.7; 111.6)	0.050
Yes	63.0 (45.9; 81.2)		69.2 (40.6; 101.1)	
Decline of FVC ≥10%				
6mo				
No	71.6 (48.6; 91.6)	0.901	90.6 (53.6; 121.0)	0.057
Yes	67.5 (55.8; 89.1)		78.2 (45.7; 106.5)	
12mo				
No	74.7 (54.1; 95.4)	0.120	82.0 (56.9; 121.0)	0.237
Yes	71.6 (48.6; 95.3)		78.3 (45.1; 107.2)	
18mo				
No	72.8 (57.7; 88.2)	0.671	81.6 (57.5; 117.0)	0.501
Yes	71.6 (50.1; 97.3)		76.5 (46.5; 119.4)	
24mo				
No	78.1 (51.3; 95.7)	0.020	78.2 (46.5; 98.6)	0.596
Yes	71.4 (49.7; 92.5)		72.3 (45.1; 102.8)	
Decline of FVC ≥5%				
6mo				
No	72.1 (50.0; 93.4)	0.494	86.9 (53.6; 117.0)	0.170
Yes	71.4 (48.6; 88.8)		76.5 (41.2; 119.4)	
12mo				
No	71.3 (53.2; 97.3)	0.557	81.6 (56.9; 119.4)	0.282
Yes	72.2 (49.7; 92.3)		73.2 (43.3; 105.0)	
18mo				
No	72.0 (53.6; 98.4)	0.242	81.0 (46.5; 119.4)	0.773
Yes	71.6 (49.7; 95.3)		78.6 (41.2; 119.9)	
24mo				
No	75.2 (50.0; 95.7)	0.209	80.1 (53.6; 98.6)	0.213
Yes	72.0 (49.7; 92.5)		70.8 (45.1; 95.2)	
B)	Pirfenidone	P-value	No antifibrotic treatment	P-value
Mortality				
No	48.1 (33.9; 73.5)	<0.001	38.0 (22.1; 70.4)	0.485
Yes	40.9 (30.3; 52.1)		41.3 (17.8; 62.0)	
Decline of DL _{CO} ≥15%				
6mo				
No	55.3 (36.9; 82.6)	0.021	52.2 (47.7; 56.4)	0.264
Yes	45.9 (33.2; 71.0)		41.4 (20.1; 65.7)	
12mo				
No	49.0 (33.4; 81.0)	0.182	55.7 (29.5; 71.8)	0.108
Yes	46.0 (33.9; 71.1)		43.6 (18.9; 65.9)	
18mo				
No	59.7 (37.7; 82.6)	0.001	61.3 (47.4; 71.8)	0.046
Yes	46.4 (33.9; 72.5)		41.4 (15.6; 63.9)	

Table 4 Relationship between (A) FVC, % predicted and (B) DL_{CO}, % predicted and mortality in enrolled IPF patients treated with pirfenidone and no-antifibrotic drugs (Continued)

24mo				
No	61.4 (36.3; 83.7)	0.002	50.6 (35.4; 67.6)	0.247
Yes	47.0 (33.2; 69.1)		42.4 (21.4; 65.7)	
Decline of DL _{CO} ≥ 10%				
6mo				
No	56.3 (35.4; 81.0)	0.004	52.2 (39.2; 60.5)	0.077
Yes	45.8 (32.4; 67.3)		38.6 (20.1; 65.7)	
12mo				
No	51.4 (35.7; 83.7)	0.017	54.3 (30.2; 69.7)	0.147
Yes	45.8 (33.5; 66.8)		40.4 (18.9; 65.9)	
18mo				
No	56.0 (34.5; 81.0)	0.041	51.8 (29.6; 71.8)	0.223
Yes	46.5 (33.9; 72.8)		41.4 (15.6; 63.9)	
24mo				
No	55.2 (36.3; 83.7)	0.012	48.6 (35.4; 67.6)	0.108
Yes	46.9 (32.4; 67.3)		40.1 (21.4; 63.9)	

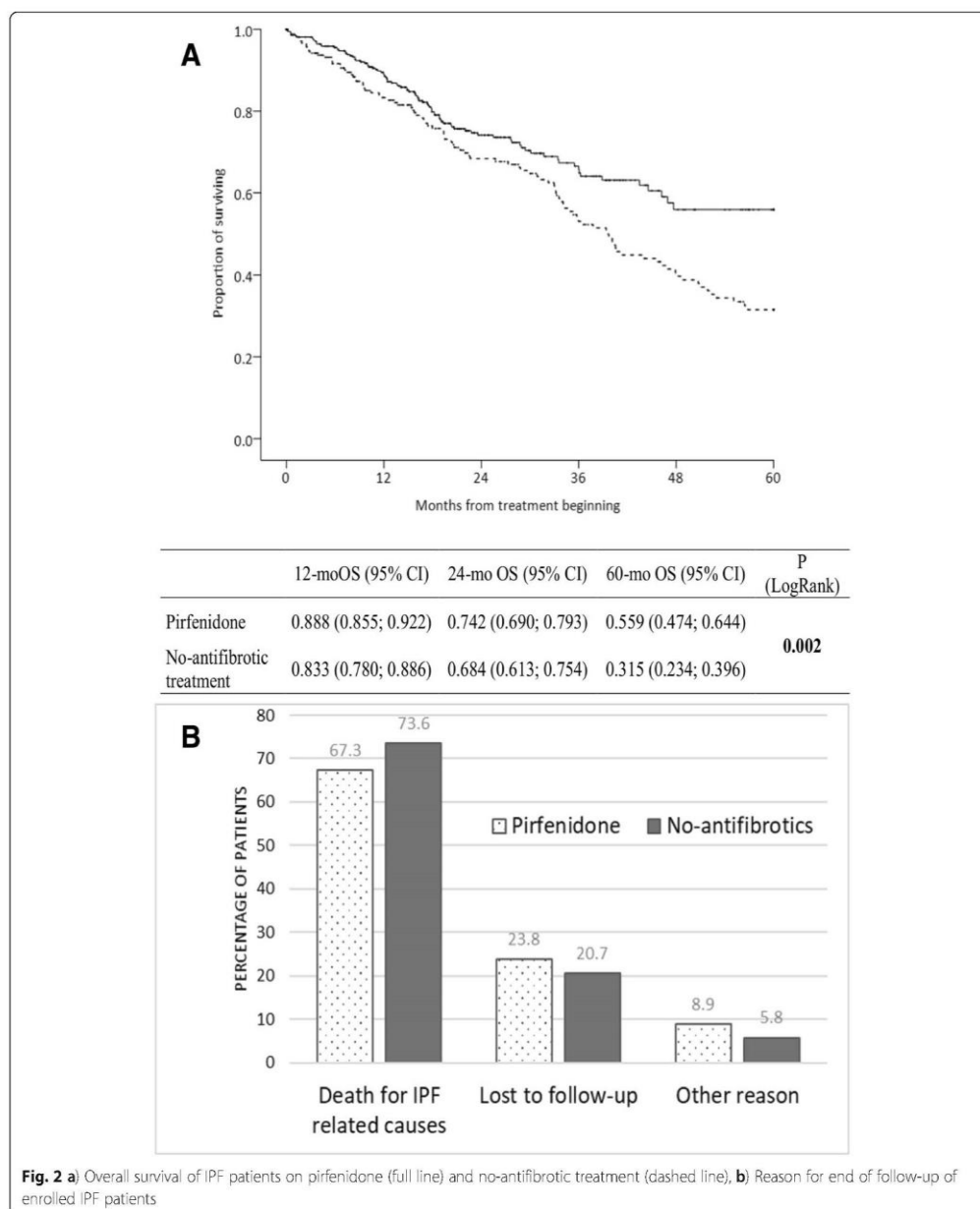
Differences between two groups were tested by Mann-Whitney test

administration [11–18]. Nowadays, there is the need for extended follow-up [19]. Since the registration trials of IPF treatments have not been designed to estimate long-term survival, an open-label extension study (RECAP) [29, 30] based on patients from randomised controlled clinical studies CAPACITY and ASCEND [5, 6] has been designed. The RECAP study supports the safety and long-term efficacy of pirfenidone with median survival of 72.2 months, which corresponds to our data where at 5-yrs (60 months) follow-up the median OS has not been reached. Importantly, 55.9% of our patients on pirfenidone were on follow-up for 5-yrs, which is also in line with the RECAP study showing that 49% of patients from the CAPACITY trial were 5-yrs on pirfenidone follow-up [19, 30]. Other recent study estimated the mean life expectancy with pirfenidone to be 8.72 years (95% confidence interval, 7.65–10.15) [8, 31]. Nevertheless, our study brings additional proof-of-effect of the first antifibrotic treatment to the results of randomized controlled trials CAPACITY and ASCEND [5, 6] and their extension study RECAP [29, 30] in real-world settings. These observations further support pirfenidone treatment benefit in patients who continued receiving therapy.

Next, we were wondering about the dynamics of progression during the 2-yr follow-up on pirfenidone in our real-life cohort of IPF patients. Although it is crucially important to assess disease progression in IPF, there is still no consensus how to classify it [32]. The evidence-based guidelines for management of IPF suggests that an absolute decline of FVC (more than 10%) and decline DL_{CO} (more than 15%) is an acceptable

method for assessing disease severity and estimating the risk of mortality [21]. However, some studies highlight the clinical utility of marginal declines FVC (more than 5%) and DL_{CO} (more than 10%) [22, 23]. In our patients on pirfenidone, the progression measured by decline in FVC (≥10%) was evident in 5.3% of patients at month 6. Similar observations (5.5%) were reported in a large cohort of 618 patients on pirfenidone in the ASCEND and CAPACITY trials [31, 33]. Also, the number of our patients progressing on pirfenidone in month 12 (10.7%) were in lines with reported data [9, 11, 13–17]. Importantly, almost twice as many patients progress on no-antifibrotic treatment comparing to pirfenidone during 1-yr follow-up.

Our study further focused on the decline of lung functions in IPF patients at 18 and 24 months after pirfenidone administration. Among patients from RECAP cohort, 16.3% experienced FVC decline ≥10% on pirfenidone at week 60 (month 15) [29, 30], compared with 16.6% in our cohort at month 18. Similar data on slow progression on pirfenidone treatment were also reported in current studies on national real-life cohorts of Danish [18] and Greek [12] IPF patients. Our study proved that even 2-years on pirfenidone administration, less than one-quarter of IPF patients progress as assessed by the decline of ≥10% FVC (17.0%) and ≥15% DL_{CO} (14.3%). When comparing pirfenidone to no-antifibrotic treatment, twice as many patients progressed on no-antifibrotic treatment in our cohort. The long-term slow-down impairment of lung function on pirfenidone and other antifibrotic treatments has an important issue also in terms of timing for lung transplantation. Prolonged time



with no disease progression may increase the chance for lung transplant in IPF patients. Despite the short mean waiting time of 6 months for lung transplantation for patients with interstitial lung diseases (ILD) in the Czech Republic, the number of transplanted patients in our cohort was very low (less than 2%). The main reason for the small number of transplanted patients may be the size of

requested donor lungs for IPF patients as well as the current age limit of 65 yrs. for recipients of lung transplant in the Czech Republic.

There is also evidence that pirfenidone therapy is associated with a reduction in the relative risk of mortality compared with placebo over 120 weeks [31]. We were therefore interested whether the decline in lung function

Table 5 Reason for end of follow-up in enrolled IPF patients

	Pirfenidone (N = 383)	No-antifibrotics (n = 218)	P-value (pirfenidone vs no-antifibrotics)
Number of lost patients (%)	141 (36.8%)	161 (73.9%)	< 0.001
Death ^a	101 (26.4%)	121 (55.5%)	< 0.001
< 12 months	37 (9.7%)	32 (14.7%)	< 0.001
12–24 months	39 (10.2%)	23 (10.6%)	
> 24 months	22 (5.7%)	66 (30.3%)	
Lost to follow-up	24 (6.3%)	33 (15.1%)	0.001
< 12 months	11 (2.9%)	16 (7.3%)	0.002
12–24 months	9 (2.3%)	7 (3.2%)	
> 24 months	4 (1.0%)	10 (4.6%)	
Lung transplantation	7 (1.8%)	0 (0.0%)	0.052
< 12 months	1 (0.3%)	0 (0.0%)	0.345
12–24 months	2 (0.5%)	0 (0.0%)	
> 24 months	4 (1.0%)	0 (0.0%)	
Other	9 (2.3%)	7 (3.2%)	0.601
< 12 months	4 (1.0%)	3 (1.4%)	0.885
12–24 months	2 (0.5%)	1 (0.5%)	
> 24 months	3 (0.8%)	3 (1.4%)	

^aThe date of death is missing in 3 patients treated by pirfenidone

on particular treatment may be associated with increased mortality in our patients as shown in previous studies [34, 35]. Indeed, the DL_{CO} ($\geq 10\%$) declines at 6, 12, 18 and 24 months' and DL_{CO} ($\geq 15\%$) decline at 6, 18 and 24 months' follow-up were associated with increased mortality in our patients on pirfenidone. This finding suggests that in some IPF patients, fibrotic processes ongoing in the lungs are not completely controlled by antifibrotic therapy, which is first seen in changes of DL_{CO}. Importantly, the DL_{CO} decline of $\geq 10\%$ showed higher predictive value for mortality on pirfenidone at all investigated time intervals than FVC decline. This observation is in line with previous studies [35–37], where the DL_{CO} declines were more predictive of mortality risk than FVC ones. In patients with no-antifibrotics, both FVC and DL_{CO} declines were not predictive for mortality. This may be due to the high heterogeneity of lung function impairment in our patients treated with no-antifibrotic drugs, including more than half of patients with severe lung impairment. Our data may also suggest that the decrease in lung function in "severe" IPF is less informative in regards to mortality than in those with "mild" and "moderate" disease. Also the fact that treatment with no-antifibrotics does not lead to functional and symptomatic stabilisation together with higher number of acute exacerbations may contribute to our observation. These results further support the profit of antifibrotic treatments in IPF and need to be validated in future studies. Our study further confirmed the

clinical utility of declines in DL_{CO} of more than 10% for the identification of risk patients with poor prognosis on pirfenidone, for whom timely transplantation is required. Therefore, we suggest the DL_{CO} assessment as a part of routine follow-up examinations in IPF patients on pirfenidone. The clinical usefulness the DL_{CO} decline as a mortality predictor deserves future investigation on larger independent cohorts. Moreover, we are aware that this retrospective study requires future testing in a prospectively recruited cohort of patients.

Despite the European Medicines Agency approving and introducing in most European countries antifibrotic treatment of IPF in 2011, many patients with confirmed IPF still do not receive approved antifibrotic treatment as shown by the current study in five European countries (France, Germany, Italy, Spain, and the UK) [38]. According to this study, in 2016 71% of "mild" IPF, 41% of "moderate" and 60% of patients with "severe" IPF did not receive any approved antifibrotic treatment. Also, in our cohort, half of the patients with no-antifibrotic treatment fulfil the Czech criteria for indication of antifibrotic treatment [28]. The majority of those patients were entering the study before introducing the commercially available antifibrotic drug. Moreover, some patients fulfilling the criteria for antifibrotic treatment might not receive this drug shortly after its introduction due to the need of establishment of communication between local pneumologists and ILD centres in the Czech Republic, which may only prescribe antifibrotic drugs. Although pirfenidone treatment is mainly recommended for patients with mild to moderate IPF, the recent opinion also suggests the initiation of treatment in patients with severe functional impairment. There is already a growing body of evidence that patients with advanced IPF (FVC < 50% and/or DL_{CO} < 35%) profit from pirfenidone leading to functional and symptomatic stabilisation [9–11, 39]. Despite symptomatic stabilisation and slowing down the disease progression, our study showed more deaths in a group of IPF patients with more severe pulmonary function impairment in both pirfenidone and no-antifibrotic treatments. Therefore, efforts for early diagnosis of the condition increases as there is evidence about more effective therapeutic efficiency, less complications and lower mortality comparing to severe disease. More studies are needed to include patients with severe functional impairment in antifibrotic treatment indications by the health authorities. Our data further supports the importance of registries in the understanding of this devastating rare disease, disease progression, quality of life and outcomes on the treatment.

Conclusion

Our data proved that pirfenidone has a 2-yr's lasting effect on the slowing down of lung function decline, as

well as on reducing mortality compared to no-antifibrotic treatments in IPF patients from the Czech part of the EMPIRE registry. Our data provide further evidence of the effect of the first antifibrotic treatment in IPF to the results of randomized controlled trials in real-world settings. The 5-yr OS was markedly higher in patients treated with pirfenidone compared to no-antifibrotic treatment, with more than half of patients on pirfenidone still living comparing to one-third on no-antifibrotics. Finally, the DL_{CO} assessment should be part of routine follow-up investigations in IPF patients on pirfenidone, as its decline was highly associated with mortality and those risk patients are candidates for timely lung transplantation.

Acknowledgements

Not applicable. We apologize to many authors which work could not be cited based on the limits for references.

Funding

This work was supported by grants from Internal Grant Agency of Palacky University IGA_LF_2019_014 and MH CZ – DRO (FNOI, 00098892). The EMPIRE registry is financially supported as an investigator initiated study by Boehringer Ingelheim.

Availability of data and materials

The datasets used and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

MZ and EK designed the study, interpreted the data and drafted the manuscript. MS, JS and MJ performed the statistical data analysis. VK, VL, VB, MD, IB, MP, LL, VR, FO, PL, RB, RT, GO, HS, JL, JP, TS, JH, RK and JK collected the patient characteristics and contributed to the data interpretation. MV and MS collected the patient characteristics, interpreted the data and edited the manuscript for critical intellectual content. All authors read the final manuscript version.

Ethics approval and consent to participate

Written informed consent was obtained from all the patients who were enrolled in accordance with the Helsinki Declaration, and the study was approved by the Institutional Review Board of Thomayer Hospital Prague.

Consent for publication

Written informed consent for publication of patient clinical details was obtained from the patients. A copy of the consent forms is available for review by the Editor of this journal.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Department of Pulmonary Diseases and Tuberculosis, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University in Olomouc, University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic. ²Department of Immunology, Faculty of Medicine and Dentistry, University Hospital Olomouc, Palacky University in Olomouc, Hnevotinska 3, 775 15 Olomouc, Czech Republic. ³Department of Respiratory Medicine, 1st Faculty of Medicine Charles University in Prague, Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic. ⁴Department of Pulmonary Medicine, Faculty of Medicine in Hradec Kralove at Charles University in Prague, University Hospital Hradec Kralove, Prague, Czech Republic. ⁵Department of Pulmonary Diseases and Tuberculosis, Faculty of Medicine at Masaryk

University, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic. ⁶Institute of Biostatistics and Analyses, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic. ⁷Department of Pulmonary Diseases and Tuberculosis, Faculty of Medicine at University of Ostrava, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic. ⁸Department of Pulmonary Medicine and Thoracic Surgery, Hospital Na Bulovce, Prague, Czech Republic. ⁹Department of Pulmonary Medicine, Tomas Bata Regional Hospital, Zlin, Czech Republic. ¹⁰Department of Pulmonary Medicine, 2nd Faculty of Medicine at Charles University in Prague, University Hospital in Motol, Prague, Czech Republic. ¹¹Department of Pulmonary Medicine, University Hospital Plzen, Plzen, Czech Republic. ¹²Department of Pulmonary Medicine, Hospital Novy Jicin, Novy Jicin, Czech Republic. ¹³Department of Pulmonary Medicine, Hospital Ceske Budejovice, Ceske Budejovice, Czech Republic. ¹⁴Department of Pulmonary Diseases and Tuberculosis, Regional Medical Association, JSC – Masaryk Hospital in Usti nad Labem, Usti nad Labem, Czech Republic. ¹⁵Department of Pulmonary Medicine and Allergology, Hospital Kromeriz, Kromeriz, Czech Republic. ¹⁶Department of Pulmonary Medicine, Hospital Jihlava, Jihlava, Czech Republic. ¹⁷Department of Pulmonary Medicine, Regional Hospital Pardubice, Pardubice, Czech Republic. ¹⁸Department of Pulmonary Medicine, Hospital Znojmo, Znojmo, Czech Republic.

Received: 19 September 2018 Accepted: 6 January 2019

Published online: 21 January 2019

References

- Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, Colby TV, Cordier JF, Flaherty KR, Lasky JA, Lynch DA, Ryu JH, Swigris JJ, Wells AU, Ancochea J, Bourou D, Carvalho C, Costabel U, Ebina M, Hansell DM, Johkoh T, Kim DS, King TE Jr, Kondoh Y, Myers J, Müller NL, Nicholson AG, Richeldi L, Selman M, Dudden RF, Griss BS, Protzko SL, Schönemann HJ. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: Idiopathic Pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 183:788–824.
- Raghu G, Rochwerf B, Zhang Y, Garcia CAC, Azuma A, Behr J, Brozek JL, Collard HR, Cunningham W, Horima S, Johkoh T, Martinez FJ, Myers J, Protzko SL, Richeldi L, Rind D, Selman M, Theodore A, Wells AU, Hoogsteden H, Schönemann HJ. An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline: treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: executive summary. An update of the 2011 clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192:238–48.
- Caminati A, Madotto F, Cesana G, Conti S, Harari S. Epidemiological studies in idiopathic pulmonary fibrosis: pitfalls in methodologies and data interpretation. *Eur Respir Rev.* 2015;24:436–44.
- Raghu G, Chen SY, Yeh WS, Maroni B, Li Q, Lee YC, Collard HR. Idiopathic pulmonary fibrosis in US Medicare beneficiaries aged 65 years and older: incidence, prevalence, and survival, 2001–11. *Lancet Respir Med.* 2014;2:566–72.
- Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, King TE Jr, Lancaster L, Sahn SA, Swartzberg J, Valeyre D, du Bois RM, CAPACITY Study Group. CAPACITY study group Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet.* 2011;377(9779):1760–9.
- King TE Jr, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glasspole I, Glassberg MK, Gorina E, Hopkins PM, Kardatzke D, Lancaster L, Lederer DJ, Nathan SD, Pereira CA, Sahn SA, Sussman R, Swigris JJ, Noble PW; ASCEND Study Group. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2014;370:2083–92.
- Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, du Bois RM, Fagan EA, Fishman RS, Glasspole I, Glassberg MK, Lancaster L, Lederer DJ, Leff JA, Nathan SD, Pereira CA, Swigris JJ, Valeyre D, King TE Jr. Pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis: analysis of pooled data from three multinational phase 3 trials. *Eur Respir J.* 2016;47:243–53.
- Fisher M, Nathan SD, Hill C, Marshall J, Dejonckheere F, Thureson PO, Maher TM. Predicting Life Expectancy for Pirfenidone in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Manag Care Spec Pharm.* 2017;23(3-b Suppl):S17–24.
- Albera C, Costabel U, Fagan EA, Glassberg MK, Gorina E, Lancaster L, Lederer DJ, Nathan SD, Spirig D, Swigris JJ. Efficacy of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis with more preserved lung function. *Eur Respir J.* 2016;48:843–51.
- Ogura T, Azuma A, Inoue Y, Taniguchi H, Chida K, Bando M, Niimi Y, Kakutani S, Suga M, Sugiyama Y, Kudoh S, Nukiwa T. All-case post-marketing

- surveillance of 1371 patients treated with pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Investig*. 2015;53:232–41.
11. Harari S, Caminati A, Albera C, Vancheri C, Poletti V, Pesci A, Luppi F, Saltini C, Agostini C, Bergagli E, Sebastiani A, Sanduzzi A, Giunta V, Della Porta R, Bandelli GP, Puglisi S, Tomassetti S, Biffi A, Cerri S, Mari A, Cinetto F, Tirelli F, Farinelli G, Bocchino M, Specchia C, Confalonieri M. Efficacy of pirfenidone for idiopathic pulmonary fibrosis: an Italian real life study. *Respir Med*. 2015;109:904–13.
 12. Tzouveleki A, Karampitsakos T, Ntoliou P, Tzilas V, Bouros E, Markozannes E, Malliou I, Anagnostopoulos A, Granitsas A, Steiropoulos P, Dimakou K, Chrysikos S, Koulouris N, Bouros D. Longitudinal "Real-World" Outcomes of Pirfenidone in Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Greece. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:213.
 13. Wijsenbeek MS, Grutters JC, Wuyts WA. Early experience of Pirfenidone in daily clinical practice in Belgium and the Netherlands: a retrospective cohort analysis. *Adv Ther*. 2015;32:691–704.
 14. Okuda R, Hagiwara E, Baba T, Kitamura H, Kato T, Ogura T. Safety and efficacy of pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis in clinical practise. *Respir Med*. 2013;107:1431–7.
 15. Oltmanns U, Kahn N, Palmowski K, Träger A, Wenz H, Heussel CP, Schnabel PA, Puderbach M, Wiebel M, Ehlers-Tenenbaum S, Warth A, Herth FJ, Kreuter M. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis: real life experience from German tertiary referral center for interstitial lung diseases. *Respiration*. 2014;88:199–207.
 16. Chaudhuri N, Duck A, Frank R, Holme J, Leonard C. Real world experiences: pirfenidone is well tolerated in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 2014;108:224–6.
 17. Sköld CM, Janson C, Elf AK, Fiaschi M, Wiklund K, Persson HL. A retrospective chart review of pirfenidone-treated patients in Sweden: the REPRIS study. *Eur Clin Respir J*. 2016;3:2035.
 18. Salih GN, Shaker SB, Madsen HD, Bendstrup E. Pirfenidone treatment in idiopathic pulmonary fibrosis: nationwide Danish results. *Eur Clin Respir J*. 2016;3:32608.
 19. Cottin V, Maher T. Long-term clinical and real-world experience with pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev*. 2015;24:58–64.
 20. Taguchi Y, Ebina M, Hashimoto S, Ogura T, Azuma A, Taniguchi H, Kondoh Y, Suga M, Takahashi H, Nakata K, Sugiyama Y, Kudoh S, Nukiwa T. Pirfenidone Clinical Study Group in Japan. Efficacy of pirfenidone and disease severity of idiopathic pulmonary fibrosis: Extended analysis of phase III trial in Japan. *Respir Investig*. 2015;53:279–87.
 21. Guyatt G, Gutterman D, Baumann MH, Addrizzo-Harris D, Hylek EM, Phillips B, Raskob G, Lewis SZ, Schunemann H. Grading strength of recommendations and quality of evidence in clinical guidelines: report from an American College of Chest Physicians Task Force. *Chest*. 2006;129:174–81.
 22. Taniguchi H, Kondoh Y, Ebina M, Azuma A, Ogura T, Taguchi Y, Suga M, Takahashi H, Nakata K, Sato A, Sugiyama Y, Kudoh S, Nukiwa T. Pirfenidone Clinical Study Group in Japan. The clinical significance of 5% change in vital capacity in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: extended analysis of the pirfenidone trial. *Respir Res*. 2011;12:93.
 23. du Bois RM, Weycker D, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Kartashov A, King TE Jr, Lancaster L, Noble PW, Sahn SA, Thomeer M, Valeyre D, Wells AU. Forced vital capacity in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: test properties and minimal clinically important difference. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:1382–9.
 24. Vasakova M. Idiopathic pulmonary fibrosis. News for diagnostics and treatment [in Czech]. *Postgraduate Medicine*. 2014;2:43.
 25. Demedts M, Behr J, Buhl R, Costabel U, Dekhuijzen R, Jansen HM, MacNee W, Thomeer M, Wallaert B, Laurent F, Nicholson AG, Verbeken EK, Verschakelen J, Flower CD, Capron F, Petruzzelli S, De Vuyst P, van den Bosch JM, Rodriguez-Becerra E, Corvasce G, Lankhorst I, Sardino M, Montanari M. High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2005;353:2229–42.
 26. Martinez FJ, de Andrade JA, Anstrom KJ, King TE Jr, Raghu G, et al. Randomized trial of acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2014;370:2093–101.
 27. Behr J, Bendstrup E, Crestani B, Günther A, Olschewski H, Sköld CM, Wells A, Wuyts W, Koschel D, Kreuter M, Wallaert B, Lin CY, Beck J, Albera C. Safety and tolerability of acetylcysteine and pirfenidone combination therapy in idiopathic pulmonary fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir Med*. 2016;4:445–53.
 28. Vasakova M, Sterclová M. Idiopathic pulmonary fibrosis – recommendations for the diagnostics, treatment and follow-up (1. Up-date) [in Czech]. 2016. <http://www.pneumologie.cz/guidelines>. Accessed 13 Jan 2019.
 29. Costabel U, Albera C, Bradford WZ, Hormel P, King TE Jr, Noble PW, Sahn SA, Valeyre D, du Bois RM. Analysis of lung function and survival in RECAP: an open-label extension study of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Diffus Lung Dis*. 2014;31:198–205.
 30. Costabel U, Albera C, Lancaster LH, Lin CY, Hormel P, Hulter HN, Noble PW. An open-label study of the long-term safety of Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (RECAP). *Respiration*. 2017;94:408–15.
 31. Nathan SD, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glaspole I, Glassberg MK, Kardatzke DR, Daigl M, Kirchgassler KU, Lancaster LH, Lederer DJ, Pereira CA, Swigris JJ, Valeyre D, Noble PW. Effect of pirfenidone on mortality: pooled analyses and meta-analyses of clinical trials in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet Respir Med*. 2017;5:333–41.
 32. Hasti R, Daccord C, Chua F, Devaraj A. Evaluating disease severity in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir Rev*. 2017;26:170051.
 33. Nathan SD, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, du Bois RM, Fagan EA, Fishman RS, Glaspole I, Glassberg MK, Glasscock KF, King TE Jr, Lancaster L, Lederer DJ, Lin Z, Pereira CA, Swigris JJ, Valeyre D, Noble PW, Wells AU. Effect of continued treatment with pirfenidone following clinically meaningful declines in forced vital capacity: analysis of data from three phase 3 trials in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*. 2016;71:429–35.
 34. Zappala CJ, Latsi PI, Nicholson AG, Colby TV, Cramer D, Renzoni EA, Hansell DM, du Bois RM, Wells AU. Marginal decline in forced vital capacity is associated with a poor outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2010;35:830–6.
 35. Doubková M, Švancara J, Svoboda M, Šterclová M, Barcoš V, Plačková M, Lacina L, Žurková M, Binková I, Bittenglová R, Ložáková V, Merta Z, Šířková L, Tyl R, Lisá P, Sulďová H, Petřík F, Pšikalová J, Řihák V, Snižek T, Reiterer P, Homolka J, Musilová P, Lněnička J, Palúch P, Hrdina R, Králová R, Hortvíková H, Strenková J, Vašková M. EMPIRE Registry, Czech Part: Impact of demographics, pulmonary function and HRCT on survival and clinical course in idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Respir J*. 2018;12:1526–35.
 36. Taylor Gonzalez A, Maher T. Predicting mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. Which parameters should be used to determine eligibility for treatment? Analysis of a UK prospective cohort. *Eur Respir J*. 2016;48(Suppl 60):OA282.
 37. Nathan SD, Shlobin OA, Weir N, Ahmad S, Kaldjian JM, Battle E, Sheridan MJ, du Bois RM. Long-term course and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis in the new millennium. *Chest*. 2011;140:221–9.
 38. Maher TM, Molina-Molina M, Russell AM, Bonella F, Jouneau S, Ripamonti E, Axmann J, Vancheri C. Unmet needs in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis—insights from patient chart review in five European countries. *BMC Pulm Med*. 2017;17:124.
 39. Tzouveleki A, Ntoliou P, Karampitsakos T, Tzilas V, Anevlavis S, Bouros E, Steiropoulos P, Koulouris N, Stratakos G, Froudarakis M, Bouros D. Safety and efficacy of pirfenidone in severe idiopathic pulmonary fibrosis: a real-world observational study. *Pulm Pharmacol Ther*. 2017;46:48–53.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



2. 6. Časná diagnostika idiopatické plicní fibrózy má význam pro prognózu onemocnění

Současné léčebné postupy neumí zvrátit již existující vazivovatění plic, ale v posledních letech došlo ke změnám v pohledu na etiopatogenezi onemocnění. Jak bylo zmíněno výše, již není doporučována protizánětlivá terapie glukokortikoidy samostatně a ani v kombinaci s dalšími imunosupresivy, protože zánět není primárním důvodem onemocnění. Od roku 2012 máme možnost v ČR podávat pacientům s mírnou až středně těžkou formou onemocnění (forsírovaná vitální kapacita, FVC 50–90 %, difuzní kapacita plic, DLco \geq 30 %) antifibrotické léky ovlivňující primární proces fibrogeneze. Léčba vede ke stabilizaci plicních funkčních ukazatelů, snížení počtu pacientů s progresí onemocnění a akutních exacerbací (Richeldi a kol., 2014; King a kol., 2014). Z těchto důvodů je snaha pneumologů zvýšit povědomí o IPF, diagnostikovat IPF časně a léčit co nejdříve. Pro osud pacienta má význam časná diagnostika. Jen v počátečním stádiu nemoci lze ovlivněním zánětlivé fáze nebo primární fibrogeneze zvrátit rozvoj či progresi plicní fibrózy (Doubková a kol., 2017). Viz kapitola 2.6.1.

2.6.1. Idiopatická plicní fibróza – časná diagnostika má stále význam. (Doubková M. Interní medicína pro praxi. 2017; 14(1): 45-48)

SDĚLENÍ Z PRAXE

IDIOPATICKÁ PLICNÍ FIBRÓZA – ČASNÁ DIAGNOSTIKA MÁ STÁLE VÝZNAM

Idiopatická plicní fibróza – časná diagnostika má stále význam

MUDr. Martina Doubková, Ph.D.

Klinika nemocí plicních a TBC, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity Brno

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je progresivní a obvykle fatální forma idiopatické intersticiální pneumonie (IIP). V posledních letech se mění pohled na etiopatogenezi a léčbu IPF, proto včasná diagnostika má význam pro prognózu onemocnění. Součástí práce jsou dvě kazuistická sdělení pacientů s IPF a různými stadiem onemocnění.

Klíčová slova: diagnóza, idiopatická plicní fibróza, prognóza.

Idiopathic pulmonary fibrosis – early diagnosis is important

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and usually fatal form of idiopathic interstitial pneumonia (IIP). In recent years, the views on etiopathogenesis and treatment of IPF have been changing, so early diagnosis is important for prognosis. We describe two case reports of IPF patients with different stages of the disease.

Key words: diagnosis, idiopathic pulmonary fibrosis, prognosis.

Úvod

Idiopatická plicní fibróza (IPF) je nejběžnějším typem idiopatické intersticiální pneumonie (IIP) a má velmi špatnou prognózu, která je způsobena progresí rozsáhlé fibrotické přestavby plicního parenchymu. Řadí se mezi méně běžná plicní onemocnění (epidemiologické údaje viz níže) a její etiologie není přesně známa.

Medián věku při diagnóze nemocných s IPF je 60–70 let (1, 2). Rizikovými faktory jsou kouření cigaret, expozice prachům organickým i anorganickým, gastroesofageální reflux, infekce (1, 2, 3). Pacienti obvykle trpí postupně se zhoršující dušností, neproduktivním kašlem a umírají na respirační selhání mezi 2–5 lety po stanovení diagnózy (1, 2, 3). Průběh nemoci a přežití je ovlivněn přítomností akutních exacerbací, které jsou spojeny se skokovým zhoršením plicních funkčních parametrů a progresí plicního nálezu (1).

IPF trpí kolem 5 milionů lidí na celém světě (1). V ČR není aktuální epidemiologická situace známa, ale nemoc má stoupající výskyt (4).

Kazuistika I. – pokročilé onemocnění aneb zázraky se nedějí

66letý pacient, muž, bývalý kuřák. Byl odeslán na plicní ambulanci v květnu 2015 pro 8 měsíců trvající dušnost při námaze (mírný kopec, rychlejší chůze) a dráždivý kašel. Pracoval jako zámečnický. Léčil se s vysokým krevním tlakem. Fyzikálním vyšetřením auskultací byly slyšitelné oboustranné krepitace („velcro rales“ připodobněné rozepínání suchého zipu, jejichž podkladem je fibrotizující plicní proces) v dolních a středních plicních třetinách. Byl přítomen fenotypický projev paličkovitých prstů s nehty tvaru hodinového sklíčka. Na zadopředním snímku hrudníku bylo popsáno difuzně oboustranně retikulární zastínění. Plicním funkčním vyšetřením jsme zjistili lehkou restriktivní poruchu se středně těžkou poruchou plicní difuze a lehkou respirační nedostatečností. Bronchoskopický náález ukázal převahu eozinofilních a neutrofilních granulocytů v cytologickém zpracování

bronchoalveolární tekutiny získané bronchoalveolárním výplachem. Na HRCT hrudníku (výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností) byl popsán typický náález pro běžnou intersticiální pneumonii s nevratnými změnami typu voštinovité přestavby (obraz medové plástve, pokročilé stadium vazivovatení plic, tzv. honeycombing).

S pomocí mezioborového týmu (pneumolog + radiolog) byla postavena diagnóza „pravé fibrózy“ neboli idiopatické plicní fibrózy charakterizované nekontrolovaným jizvením plic bez zjevné příčiny. Náález na HRCT hrudníku byl hodnocen jako pokročilé stadium, nicméně plicní funkční vyšetření (pomezí středně těžké až těžké poruchy) ještě dovolovalo zažádat o biologickou léčbu. Pacient užíval antifibrotický lék. Záhy po stanovení diagnózy byl zařazen na transplantáčnickou listinu. Bohužel i přes zavedenou medikaci se stav pacienta zhoršoval, došlo k dalšímu poklesu plicních funkčních parametrů, zhoršení dechových obtíží a kašle. Pacient prodělal akutní exacerbaci IPF cha-

KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA:

MUDr. Martina Doubková, Ph.D., doubkovamartina@seznam.cz
Klinika nemocí plicních a TBC FN a LF MU, Jihlavská 20, 625 00 Brno

Převzato z: Med. praxi 2017; 14(1): 45–48

Článek přijat redakcí: 4. 11. 2016

Článek přijat k publikaci: 2. 12. 2016

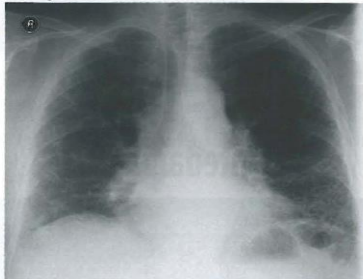
SDĚLENÍ Z PRAXE

IDIOPATICKÁ PLICNÍ FIBRÓZA – ČASNÁ DIAGNOSTIKA MÁ STÁLE VÝZNAM

Tab. 1. Diagnostika IPF v klinické praxi

Shrnutí
<ul style="list-style-type: none">■ Idiopatická plicní fibróza je charakterizována krepitacemi při fyzikálním vyšetření. Tento fenomén je připodobňován rozeptávání suchého žípu. V začátku onemocnění je slyšitelný na bazích plic, později již difuzně. Někteří pacienti s pokročilým stádiem nemoci mají fenotypický projev paličkovitých prstů s nehty tvaru hodinového skla.■ Poslechem zjistitelné krepitace s nebo bez přítomnosti paličkovitých prstů jsou indikací k odeslání pacienta k plicnímu specialistovi k vyloučení plicní fibrózy.■ Základními symptomy IPF je dušnost při námaze a kašel. Při pokročilém procesu je dušnost i v klidu.■ Charakteristickým nálezem na ZP snímku hrudníku je retikulární zastínění s predilekcí v dolních plicních polích. Při pokročilém procesu je nález difuzní.■ Spirometricky zjišťujeme restriktivní ventilační poruchu. Tvar křivky je podobný tvaru prstu z důvodu fibrotizace plic (jizvení). Křivka se tak odlišuje od obstrukčního tvaru například u chronické obstrukční plicní nemoci (CHOPN).■ IPF je onemocnění izolované na plicce, nemá systémové příznaky. Podobně jako u CHOPN může být průběh nemoci ovlivněn skokovým zhoršením, tzv. akutní exacerbací, která je ve většině případů fatální.■ V současné době neumíme zvrátit již vzniklou plicní fibrózu, ale máme snahu alespoň zabránit jejímu zhoršení. Pro mírné až středně těžké formy IPF je doporučována léčba antifibrotická (pacient nesmí kouřit). Tato terapie zpomaluje progresi onemocnění. Kortikosteroidy jsou indikovány jen v době akutních exacerbací IPF.

Obr. 1. Kazuistika I. Zadopřední snímek hrudníku ukazuje retikulární zastínění difuzně



Obr. 2. Kazuistika I. HRCT nález hrudníku ukazuje voštinovitou plíci připodobňující medové plástvi

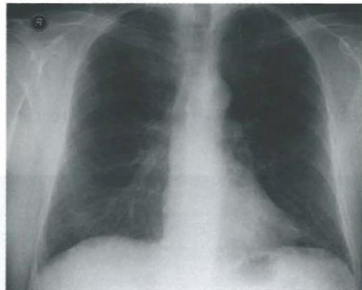


rakterizovanou zhoršením symptomů, funkčních ukazatelů a radiologickou progresí. V té době nemocný přechodně užíval systémové kortikosteroidy. Domů byl propuštěn s domácí kyslíkovou léčbou. Během čekací doby na transplantaci listině došlo k další progresi plicní fibrózy a nemocný zemřel na respirační selhání v říjnu 2016.

Kazuistika II. – časná diagnóza a časná léčba ovlivňuje pozitivně vývoj onemocnění

69letý pacient, muž, bývalý kuřák. Pracoval jako mistr ve strojírenství. Byl odeslán v roce

Obr. 3. Kazuistika II. Zadopřední snímek hrudníku. Lehce zhrubělá retikulární kresba (zastínění) v dolních třetinách



Obr. 4. Kazuistika II. HRCT hrudníku. Voština nevelkého rozsahu subpleurálně bazálně



2012 na naši plicní ambulanci pro suchý kašel a dechové potíže při větší námaze, trvající asi 2–3 měsíce. S ničím se neléčil. Fyzikálním vyšetřením byly zjistitelné krepitace na bazích plic, bez paličkovitých prstů. Na zadopředním snímku hrudníku byla lehce zhrubělá retikulární kresba oboustranně bazálně. Na HRCT hrudníku byla přítomna subpleurálně bazálně oboustranně voština nevelkého rozsahu. Plicním funkčním vyšetřením byla zjištěna mírná restriktivní ventilační porucha s mírnou poruchou plicní difuze

(výměna krevních plynů přes alveolokapilární membránu, velmi citlivý ukazatel postižení alveolokapilární jednotky), bez respirační nedostatečnosti (krevní plyny byly v normě). Po vyloučení jiných možných jednotek spojených s běžnou intersticiální pneumonií byla stanovena diagnóza IPF. Pacient byl indikován k antifibrotické léčbě, kterou užívá dosud. Funkční vyšetření prokázalo v čase jen mírný pokles funkčních ukazatelů. Pacient nemá klinicky významné zhoršení dušnosti, vykonává běžně své každodenní činnosti a léky snáší dobře. Po celou dobu onemocnění nedošlo k akutním exacerbacím IPF.

Diskuze

Nové poznatky etiopatogeneze IPF zcela změnily pohled na její léčebné možnosti, proto je IPF předmětem zájmu posledních několika let. IPF se vyskytuje s vyšší četností u mužů než u žen (1, 2). Etiologie nemoci není známa (1, 2). Průměrná doba stanovení diagnózy od prvních příznaků se pohybuje od 6 měsíců do 2 let (1, 2). Nejčastějšími symptomy v době diagnózy jsou suchý kašel a střední až těžký stupeň dušnosti při zátěži. Paličkovité prsty jsou přítomny u 50% případů a jsou spojeny s pokročilým stádiem (1). Etiopatogeneze paliček (clubbing finger) není přesně známa, ale předpokládá se vliv chronické aktivity makrofágů a produkce profibrotických reparačních faktorů (4). Medián přežití se pohybuje od 2 do 5 let od stanovení diagnózy. Příčina smrti je obvykle respirační selhání (1). Nejčastějšími komorbiditami v zahraničních publikacích jsou diabetes mellitus, ischemická choroba srdeční a gastroesofageální reflux (4). Klinický průběh IPF neumíme jasně předpovídat a kritéria IPF progresu nejsou zcela dobře definována (1, 2). Známe tři rozdílné průběhy nemoci. Větší část pacientů vykazuje pozvolný pokles plicních funkcí, někteří jsou dlouhodobě stabilní, zejména starší nad 75 let, a asi 10–20% má rychlý pokles plicních funkčních parametrů (1, 2, 3).

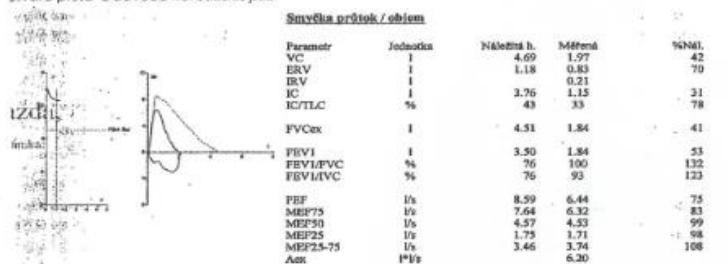
AE-IPF (akutní exacerbace) je popsána u 5–10% všech IPF pacientů (3), mortalita je vysoká, pohybující se mezi 50 až 100% (3). AE je asociována se zhoršením klinickým, funkčním i radiologickým (1).

Současné léčebné postupy neumí zvrátit již existující vazivovatění plic, ale v posledních letech došlo ke změnám v pohledu na etiopatogenezi onemocnění. Od roku 2012 již není

SDĚLENÍ Z PRAXE

IDIOPATICKÁ PLICNÍ FIBRÓZA – ČASNÁ DIAGNOSTIKA MÁ STÁLE VÝZNAM

Obr. 5. Plicní funkční vyšetření, spirometrie, s nálezem restriktivní ventilační poruchy. Tvar křivky odpovídá „tvaru prstu“ z důvodu fibrotizace plic



doporučována protizánětlivá terapie glukokortikoidy samostatně a ani v kombinaci s dalšími imunosupresivy, protože zánět není primárním důvodem onemocnění. U pacientů s IPF s mírnou až středně těžkou formou onemocnění (definováno dle plicních funkčních ukazatelů,

forsírovaná vitální kapacita, FVC, 50–90% a difúzní kapacita plic, DLco \geq 30%) jsou indikovány antifibrotické léky ovlivňující primární proces fibrogenese. V současnosti máme k dispozici dva protifibrotické léky, pirfenidon a nintedanib, s odlišným mechanismem zásahu do procesu

nekontrolovatelného vazivovatění plic. Léčba vede ke stabilizaci plicních funkčních ukazatelů, snížení počtu pacientů s progresí onemocnění a AE (3, 4). Z těchto důvodů je snaha pneumologů zvýšit povědomí o IPF, diagnostikovat IPF časně a léčit co nejdříve. Popisovaný první případ pacienta s IPF poukazuje na pokročilé plicní onemocnění již v době diagnózy s převahou voštinovité plice (pokročilý obraz medové plástve jako projev nevratného poškození plic žilvením), kde i přes léčbu plicní onemocnění progreduje a vede k respiračnímu selhání. U druhého pacienta včasná diagnostika a léčba vedla ke stabilizaci plicního nálezu.

Závěr

IPF je méně běžné onemocnění charakterizované nekontrolovatelnou fibrotizací plic. Včasná diagnostika IPF má význam pro prognózu pacienta.

LITERATURA

1. Raghu G, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 201(1): 183: 788–824.
2. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classifi-

cation of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2011. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165: 277–304.

3. Vařáková M. Idiopatická plicní fibróza – doporučený postup. <http://www.pneumologie.cz/guidelines/>. Navštíveno dne 3. 11. 2016.
4. Doubková M, et al. Prognostické faktory idiopatické plicní fibrózy (IPF) – analýza českého registru IPF. *Čas. Lék. Čes.* 2016. 155: 188–194.

3. Sarkoidóza

Sarkoidóza je systémové granulomatózní onemocnění neznámé etiologie s plicními a mimoplicními projevy (Baughmann a kol., 2001; Hunnighake a kol., 1999). Toto onemocnění patří mezi záhady medicíny nejen kvůli nedostatečně poznané etiologii, ale i kvůli pestrosti klinických příznaků. Soubory pacientů se sarkoidózou se liší podle věku, pohlaví, etnika, začátku onemocnění a postižení jednotlivých orgánů. Klinický průběh je variabilní od spontánní regrese po chronické postižení. Závažnými komplikacemi jsou plicní fibróza, renální selhání, srdeční postižení, neurosarkoidóza, lupus pernio a ztráta zraku v důsledku posteriorní uveitidy. Tato fenotypová variabilita je ovlivněna genotypem, zevním prostředím a sociálně-ekonomickým vlivem. Začátek onemocnění je akutní nebo subakutní. Akutní začátek je charakterizován horečkou, únavou, ztrátou hmotnosti a/nebo triádou příznaků: erytéma nodosum, oboustranná hilová lymfadenopatie a artritida tzv. Löfgrenův syndrom. Zatímco subakutní úvod nemoci je typicky nespecifický, s kašlem, dušností (Lošťáková a kol., 2020).

Předchozí epidemiologické studie ACCESS (*A Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis*), WATL (*Scientific Working Group for the Therapy of Lung Diseases*) a MUSC (*Medical University of South Carolina*) popisují klinickou heterogenitu sarkoidózy a zdůrazňují potřebu nových studií klinických fenotypů s cílem lépe porozumět patogenetickému mechanismu onemocnění (Baughmann a kol. 2001; Loddenkemper a kol. 1998; Judson a kol. 2012). Projekt GenPhenReSa je evropská multicentrická studie zaměřená na vyšetřování vlivu genotypů na fenotypy onemocnění u více než 2000 pacientů se sarkoidózou (Schupp a kol., 2018). V této studii bylo zjištěno, že pacienti s akutním nástupem byly převážně mladé ženy, s vyšším zastoupením sarkoidózy kůže a očí, únavy a rentgenového stádia I nebo II. Na základě výsledků byli pacienti rozděleni do pěti fenotypů podle převažujícího postižení: 1) postižení břišních orgánů, 2) očí, kůže, centrální nervové soustavy, 3) muskuloskeletální-kožní postižení, 4) plíce a nitrohruďní uzliny a 5) mimoplicní postižení.

Etiologie sarkoidózy je neznámá. Základním předpokladem vzniku nemoci je genetická predispozice spolu s reakcí na specifický antigenní podnět. Zřejmě se jedná o polygenní onemocnění. Mezi geny, hrající roli při vzniku sarkoidózy, patří zejména geny pro MHC (*major histocompatibility complex*, hlavní histokompatibilní komplex) a cytokiny. Klíčovou roli v patogenezi sarkoidózy mají geny Hlavního histokompatibilního systému člověka, HLA I. a II. třídy. U pacientů se sarkoidózou byl ve srovnání se zdravými jedinci popsán vyšší výskyt HLA A1, B8, B13, B27, DR3. Byla popsána asociace HLA alel DRB1*03 a DQB1*02 s akutní formou nemoci – Löfgrenovým syndromem (Grunewald a kol., 2010). U pacientů s progredujícím onemocněním byla nalezena asociace s alelami HLA-DRB1*15 (Voorter a

kol., 2005) a HLA-DQB1*06:02 (Voorter a kol., 2005). Dále byla pozorována celá řada asociací mezi dalšími kandidátními geny a sarkoidózou. Mezi nejvýznamnější nálezy patří asociace s genem kódujícím butyrofilin (*BTNL2*, rs2076530) (Valentonyte a kol., 2005), který se podílí na aktivaci a regulaci T-lymfocytů. Dalším z nich je gen kódující annexin 11 (*ANXA11*, rs1049550) (Hofmann a kol., 2008), gen pro *RAB23* (rs1040461) (Hofmann a kol., 2011), *NOTCH4* (rs715299) (Adrianto a kol., 2012) a gen kódující *OS9* (rs1050045), který hraje roli v degradaci proteinů a podílí se na aktivaci myeloidních buněk indukované TLR (Hofmann a kol., 2011). Infekční původ nemoci nebyl přesvědčivě doložen. Jako potenciální infekční agens jsou stále nejvíce uváděny mykobakterie, ale i jiná agens (bakterie, viry) (Baughmann a kol., 2001).

Tématu sarkoidózy jsme se věnovali v pracích „Skrytá cystická fibróza u nemocného se sarkoidózou“ (Doubková a kol., 2012), „Je sarkoidóza spojená s vyšším výskytem nádorových onemocnění? (Doubková a kol., 2012). Dále „Diagnostika, prognostické faktory a léčba sarkoidózy – retrospektivní analýzy“ (Doubková a kol., 2012) a „Prognostic markers of sarcoidosis: an analysis of patients from everyday pneumological practice“ (Doubková a kol., 2015). Tyto publikace byly součástí mé disertační práce. V této poslední práci o 306 nemocných jsme zjistili uniparametrickou analýzou, že stádium onemocnění dle zadopředního snímku hrudníku, orgánové postižení, poměr CD4+/CD8+ v bronchoalveolární tekutině, hladina vápníku a plicní funkční parametry mají vliv na spontánní remisi. Multiparametrickou analýzou jsme prokázali vliv ženského pohlaví, méně pokročilého stádia onemocnění dle rentgenového snímku hrudníku, vyšší CD4+/CD8+ v bronchoalveolární tekutině získané bronchoalveolární laváží, přítomnost lymfocytární alveolitidy a normálních plicních funkčních parametrů v době diagnózy na spontánní regresi. Viz kapitola 3.1. Diferenciální diagnostice hyperkalcémie a její léčby, jako jednoho z možných průvodních jevů sarkoidózy, se zabýváme v přehledové práci: „Zvýšená hladina kalcia může být prvním příznakem mnohočetného myelomu, ale může mít i jiné příčiny.“ (Adam a kol., 2018). Viz kapitola 3.1.1.

3.1. Prognostic markers of sarcoidosis: an analysis of patients from everyday pneumological practice (Doubková M, Pospíšil M, Skříčková J, Doubek M. *Clin Resp J* 2015; 9(4): 443-449)

Prognostic markers of sarcoidosis: an analysis of patients from everyday pneumological practice

Martina Doubková¹, Zdeněk Pospíšil², Jana Skříčková¹ and Michael Doubek³

¹ Department of Pneumology and Phtiseology, Faculty of Medicine and University Hospital, Brno, Czech Republic

² Department of Mathematics and Statistics, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³ Central European Institute of Technology, CEITEC, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Abstract

Introduction: Although sarcoidosis is a well-known disease, sarcoidosis patient outcome and the role of prognostic markers in everyday practice have not yet been well described. Therefore, the goal of the present study was to analyse the fate of sarcoidosis patients and the factors influencing the disease's behaviour in routine practice.

Methods: The study was a retrospective analysis of 306 consecutive patients (181 females and 125 males; median age 45 years) diagnosed with sarcoidosis in the years 2003–2012.

Results: Through the use of uniparametric analysis, it was determined that the stage of the disease, organ involvement, CD4/CD8 ratio in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), serum and urine calcium levels, smoking, and pulmonary functions had a significant influence on spontaneous sarcoidosis resolution. Multiparametric analysis revealed that spontaneous resolution was significantly positively influenced by female gender, a less advanced disease stage, a higher CD4/CD8 ratio in the BALF, lymphocytosis in the BALF and normal pulmonary functions at diagnosis. During follow-up, only three patients died. The causes of death were respiratory failure with pneumonia ($n = 2$) and heart attack caused by sarcoidosis heart involvement ($n = 1$).

Conclusion: The data show sarcoidosis as a disorder with high variability in clinical and laboratory findings but with good general prognosis.

Please cite this paper as: Doubková M, Pospíšil Z, Skříčková J and Doubek M. Prognostic markers of sarcoidosis: an analysis of patients from everyday pneumological practice. *Clin Respir J* 2015; 9: 443–449. DOI:10.1111/crj.12160.

Key words

diagnosis – prognostic factors – sarcoidosis – therapy

Correspondence

Martina Doubková, MD, Department of Pneumology and Phtiseology, Faculty of Medicine and University Hospital, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic.
Tel: +420 532 232 565
Fax: +420 532 232 554
email: doubkovamartina@seznam.cz

Received: 01 December 2013

Revision requested: 20 April 2014

Accepted: 02 May 2014

DOI:10.1111/crj.12160

Authorship and contributorship

MD was involved in design, acquisition of data, data interpretation, and manuscript writing. ZP was involved in statistical analysis. JS was involved in data analysis and manuscript revision. MD was involved in conception, design, data interpretation, and manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics

The study was approved by the Ethical Commission of the University Hospital Brno.

Conflict of interest

The authors have had the costs of participating in certain scientific meetings reimbursed by the pharmaceutical industry.

Introduction

Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease of unknown aetiology with pulmonary and extra-pulmonary symptoms. The lungs are the most frequently affected organ (over 90% of patients); however, the disease can affect any organ. According to published data, sarcoidosis has a wide range of manifestations and a variable prognosis (1). Sarcoidosis diagnostic criteria are summarised in the American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (ATS/

ERS/WASOG) consensus statement (1). In routine clinical practice, histopathological disease evaluation is not necessary in Löfgren's syndrome and patients with complementary findings [characteristic high-resolution computed tomography (HRCT) picture, lymphocytic alveolitis with CD4+/CD8+ ratio more than 3.5 in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), careful clinical observation, elevated serum angiotensin-converting enzyme (ACE) level and exclusion of other diseases] (1). Treatment of sarcoidosis is only recommended in patients with life-threatening organ involvement, persistent hypercalcaemia and

hypercalciuria, symptomatic pulmonary impairment, serious pulmonary function changes, or in patients with a progressive disease (1).

Although sarcoidosis is a well-known disease, sarcoidosis patient outcome and the role of prognostic markers in everyday practice have yet to be fully described. Therefore, the goal of the present study was to analyse the fate of sarcoidosis patients and the factors influencing disease behaviour in routine practice.

Materials and methods

Subjects

A retrospective analysis was made of all consecutive patients ($n = 306$) diagnosed with sarcoidosis and consequently followed at the Department of Pneumology and Phthisiology, Faculty of Medicine and University Hospital, Brno, which is a specialised centre, in 9 years (2003–2012). The aim of the analysis was to describe the characteristics of our cohort of sarcoidosis patients, to find prognostic factors and to describe the course of the disease in everyday practice.

Sarcoidosis diagnosis was based on ATS/ERS/WASOG criteria [clinical picture, laboratory tests, pulmonary function tests, radiological methods, bronchoscopy with bronchoalveolar lavage and histology (performed in 63% of patients)] (1). The diagnosis of sarcoidosis in patients without a bronchoscopy was based on HRCT and affected extrapulmonary organ biopsy (i.e. lymph nodes, skin). Extrapulmonary involvement examinations were also performed in order to exclude other diseases. The laboratory tests consisted of serum and urine calcium and serum ACE analyses. The pulmonary function test was composed of spirometry, plethysmography, lung diffusion capacity for carbon monoxide (DL_{CO}) and blood gas measurement.

The definitions of pulmonary function defects were as follows: (i) obstructive ventilation defect: mild [FEV1 (forced expiratory volume on 1 s) 60%-lower limit of normal (LLN)], moderate (FEV1 45%–59%) and severe (FEV1 <45%); (ii) restrictive ventilation defect: mild [total lung capacity (TLC) 60%-LLN], moderate (TLC 45%–59%) and severe (TLC <45%); (iii) DL_{CO} : mild impairment (60%-LLN), moderate (40%–59%) and severe (<40%); and (iv) oxygen pressure (PaO_2): mild hypoxaemia (8–9.9 kPa), moderate hypoxaemia (6.5–8 kPa) and severe hypoxaemia (<6.5 kPa) (2–5).

The radiological methods comprised an X-ray and HRCT. BALF analysis consisted of cytological (differential cell count) and flow cytometric (CD4+/

CD8+ ratio) examination. Histology samples were obtained by bronchoscopy (transbronchial lung biopsy, endobronchial lung biopsy), lung biopsy or biopsy of other involved organ.

Parameters monitored

The parameters monitored were age, radiological stage at diagnosis, smoking status, pulmonary functions, extrapulmonary involvement, need for therapy and outcome.

Statistical analysis

An analysis of each factor's influence on survival, need for therapy and outcome (log rank test, Gehan-Wilcoxon test), and a multiparametric analysis of prognostic factors (Cox proportional hazard), were made. All of the computations were performed using R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) with the 'survival' package (R package version 2.34-1). *P* values of less than 0.05 were considered significant.

Results

Three hundred six consecutive patients were analysed. The patients were Caucasians, median age at diagnosis was 45 years (20–79), and female : male ratio was 1.4:1 (181 females and 125 males). Non-smoker : smoker (or former smoker) ratio was 3.6:1. At diagnosis, stage 0 was found in nine patients (3%), stage I in 126 (41%), stage II in 134 (44%), stage III in 35 (11%) and stage IV in 2 (0.7%). The baseline patients' characteristics are summarised in Table 1.

Table 1. Baseline characteristics of study cohort ($n = 306$)

Parameters	
Median age	45 years
Women : men	1.4:1
Smoker : non-smoker	1:3.6
Extrapulmonary involvement	102 patients (33%)
Histological finding of sarcoidosis	192 patients (63%)
Pulmonary function impairment (spirometry, plethysmography and lung diffuse capacity)	92 patients (30%)
Spontaneous resolution	133 patients (43%)
Treatment/treatment with corticosteroids only	173 patients (57%)/159 patients (92% of treated patients)
Deaths during follow-up	3 patients (1%)

Table 2. Organ involvement at diagnosis ($n = 306$)

Location/type	<i>n</i>
Lungs	306 (100%)
Löfgren's syndrome	53 (17%)
Peripheral lymph nodes	35 (11%)
Skin	34 (11%)
Liver	20 (6.5%)
Eye	14 (4.6%)
Spleen	10 (3.3%)
Bone	6 (2%)
Cranial nerve dysfunction	2 (0.7%)
Nephrolithiasis	2 (0.7%)
Bone marrow	1 (0.3%)
Hypersplenism	2 (0.7%)
Heerfordt's syndrome	1 (0.3%)
Heart	1 (0.3%)

Pulmonary involvement was present in all patients. Extrapulmonary involvement was found in 102 (33%) patients. Löfgren's syndrome was observed in 53 (17%) patients (Table 2). There was no evidence of seasonality in the occurrence of Löfgren's syndrome. In 37 (12%) patients, sarcoidosis coincided with another disease (Table 3).

Laboratory examinations showed elevated ACE (normal range 12–68 U/L) in 124 (41%) patients, hypercalcaemia (normal range 2.15–2.55 mmol/L) in 48 of 301 patients examined (16%) and hypercalciuria (normal range 2.4–7.5 mmol/L) in 83 of 253 (33%) patients.

Pulmonary function tests (spirometry, plethysmography, DL_{CO} and blood gases) did not prove any pulmonary impairment in 214 patients (70%) at diagnosis, while restrictive lung function impairment was found in 28 patients (9%), obstructive impairment in 47 (15%) and combined impairment in 17 (6%). A decrease of DL_{CO} was found in 65 patients (21%) and hypoxaemia was observed in nine patients (3%). Analysis of FEV1 and forced vital capacity (FVC) showed improved parameters in both untreated and treated patients during follow-up.

Bronchoscopy was performed in 255 patients (83%). The BALF analysis revealed the following results:

Table 3. The coincidence of sarcoidosis with other diseases ($n = 306$)

Diseases	<i>n</i>
Malignancies	18 (6%)
Connective tissue disease	10 (3%)
Thromboembolic disease	8 (2.6%)
Cystic fibrosis	1 (0.3%)

lymphocytic alveolitis (175 patients; 57%), normal cytological finding (48 patients; 16%), elevated number of neutrophil granulocytes and lymphocytes (17; 6%), and neutrophil alveolitis (15 patients; 5%). The median CD4/CD8 ratio was 6.723 (195 patients analysed; 34%). In patients with spontaneous disease resolution, the median of this ratio was significantly higher (7.33) compared with patients requiring therapy (5.797) ($P = 0.008$) (Table 4).

Spontaneous resolution was observed in 133 untreated patients. In these 133 patients, only three relapses (2%) were recorded during follow-up. However, the relapse rate was higher in treated patient ($n = 173$; 23 relapses; 13%) ($P < 0.001$) (Table 4). Median time to relapse was 6 months (2–34) after ending therapy.

Treatment was required in 173 (57%) patients: 159 patients received corticosteroids, 14 had a combination of corticosteroids plus another immunosuppressive agent (methotrexate or hydroxychloroquine) (Table 1). In our patients, treatment indications were as follows: severe lung impairment with pulmonary function impairment, progressive lung involvement and involvement of more organs.

Chronic sarcoidosis lasting more than 2 years was present in 29% of patients.

Through the use of uniparametric analysis, it was determined that the stage of the disease, organ involvement, the CD4+/CD8+ ratio in the BALF, serum calcium, urine calcium, smoking and pulmonary functions significantly influenced spontaneous sarcoidosis resolution (Table 4).

Multiparametric analysis ($n = 306$) revealed that spontaneous resolution was significantly positively influenced by female gender, a less advanced disease stage in chest X-ray, a higher CD4/CD8 ratio in BALF, lymphocytosis in BALF and pulmonary functions within normal range at diagnosis (Table 5).

During follow-up, three patients died (1%). The causes of death were respiratory failure with pneumonia ($n = 2$) and a cardiac failure caused by sarcoid cardiomyopathy ($n = 1$).

Discussion

The incidence of sarcoidosis in the Czech population is 3.1 cases per 100 000 inhabitants; its prevalence is 63.1 cases per 100 000 (6). The disease is more frequent in women and people in young and middle age (1, 7, 8). In the study published by Baughman *et al.* (9), 46% of patients with sarcoidosis were younger than 40 years. The median age of the cohort (45 years) is comparable

Table 4. Influence of prognostic factors on spontaneous resolution of patients with sarcoidosis; results of uniparametric analyses ($n = 306$)

Parameter	Comparison		<i>P</i> value
Gender	Males ($n = 125$; 42 spontaneous resolutions)	Female ($n = 181$; 91 spontaneous resolutions)	NS
Age	Patients under 50 years ($n = 182$; 91 spontaneous resolutions)	Patients over 50 years ($n = 124$; 42 spontaneous resolutions)	NS
	Patients under 45 years ($n = 154$; 79 spontaneous resolutions)	Patients over 45 years ($n = 152$; 54 spontaneous resolutions)	
CD4/CD8 ratio in BALF	CD4/CD8 ratio above the median ($n = 97$; 6.723)	CD4/CD8 ratio under the median ($n = 98$; 6.723)	0.008
BALF lymphocytes above 15%	Yes ($n = 106$; 48 spontaneous resolutions)	No ($n = 149$; 55 spontaneous resolutions)	NS
Smoking	Yes ($n = 26$; 10 spontaneous remissions)	No ($n = 228$; 137 spontaneous remissions)	0.037
Disease stage	Stages I and II	Stages III and IV	0.002
	I: 74 spontaneous resolutions from 126 cases II: 53 spontaneous resolutions from 134 cases	III: 5 spontaneous resolutions from 35 cases IV: 0 spontaneous resolutions from 2 cases	
Serum calcium	Elevated ($n = 48$; 7 spontaneous remissions)	Normal ($n = 253$; 126 spontaneous remissions)	<0.001
Urine calcium	Elevated ($n = 83$; 18 spontaneous remissions)	Normal ($n = 170$; 93 spontaneous remissions)	<0.001
Pulmonary functions	Impaired ($n = 92$; 25 spontaneous resolutions)	Normal ($n = 214$; 111 spontaneous resolutions)	<0.001
Organ involvement	Pulmonary involvement only ($n = 204$; 112 spontaneous resolutions)	Pulmonary and extrapulmonary involvement ($n = 102$; 21 spontaneous resolutions)	<0.001

P values of less than 0.05 were considered significant.

BALF, bronchoalveolar lavage fluid; NS, not significant.

with these data. Similar to other authors, no evidence of disease seasonality was observed (10).

In medical literature, there are sporadic reports describing the fact that sarcoidosis coincides with other diseases (connective tissue disease, thyroiditis, pulmonary embolism) (11, 12), and we observed this phenomena in 12% of patient cohort.

The clinical picture of sarcoidosis is variable; however, pulmonary lesions are found in 90% of patients, and extrapulmonary impairment is present in 10%–90% of patients depending on the analysis

(1, 9, 13, 14). In our study, 33% patients had extrapulmonary lesions. The percentage of patients with central nervous system or heart involvement was lower than the numbers reported in published literature. It is necessary to use a precise diagnostic method with respect to heart involvement. At the time of our study (2003–2012), we examined heart involvement using ultrasound examination and electrocardiography (from 2011 also Holter electrocardiography). Magnetic resonance imaging should be performed when there is persistent suspicion of heart involvement (13, 14).

Table 5. Influence of prognostic factors on spontaneous resolution of patients with sarcoidosis; results of multiparametric analysis ($n = 306$)

Prognostic factor	Estimation (of β direct proportion coefficient of odds ratio logarithm)	Standard deviation	<i>P</i> value
Gender – males	–0.9741	0.4833	0.044
Age	–0.0053	0.0289	0.855
CD4/CD8 ratio in BALF	0.0879	0.0441	0.046
Lymphocytes in BALF	1.1620	0.4967	0.019
Stage – advanced	–1.0930	0.3215	0.001
Smoking	0.0216	0.7141	0.976
Serum calcium	–0.8613	0.6462	0.183
Urine calcium	–0.3411	0.5246	0.516
Pulmonary functions – normal	1.0820	0.5137	0.035

P value – significance of the factor impact, i.e. probability that the hazard ratio equals one. *P* values of less than 0.05 were considered significant (bold).

BALF, bronchoalveolar lavage fluid.

Sarcoidosis can be divided into five classic stages according to the chest X-rays (Scadding scale) (15). Stage 0 is found in 5%–15% of cases, stage I in 75%–80%, stage II in 30%–40%, stage III in 15% and stage IV in 5% (9, 15). Kolek (6) published data on Czech sarcoidosis patients and found stage I in 54.3%, stage II in 32%, stage III 8.2% and stage IV in 1.9% of them. In stage I patients, spontaneous radiological remission is observed in 40%–80% of them, in stage II in 40%–70%, and in stage III in 10%–20% (9, 15). In stage IV, spontaneous radiological resolution is unlikely because of irreversible fibrosis. Moreover, stage IV is rare (in our cohort <1%), and therefore our results apply to patients with a mild-to-moderate disease.

According to published data, normal pulmonary functions are seen in up to 80% of patients with stage I and 35% of patients with stages II and III (16). A restrictive pattern of ventilatory impairment occurs in 30%–50% of all sarcoidosis patients. There is a significant proportion of patients with bronchial obstruction (16). In our cohort, pulmonary ventilation function tests showed all kinds of results: normal, restrictive, obstructive or combined pulmonary impairment. An improvement in pulmonary function was observed in both treated and untreated patients.

Selecting sarcoidosis patients at high risk of lung fibrosis or other unfavourable outcomes could/can be a hard task for physician. The ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis (from 1999) lists sarcoidosis prognostic factors. These factors include lupus pernio, chronic uveitis, age of onset >40 years, chronic hypercalcaemia, nephrocalcinosis, black race, progressive pulmonary sarcoidosis, nasal mucosal involvement, bone lesions, neurosarcoidosis, myocardial involvement and chronic respiratory insufficiency (1). Elevated serum calcium concentrations may be found in about 11% of patients with sarcoidosis, abnormal urinary calcium loss in about 40% of patients and nephrocalcinosis in about 10% (17). Persistent hypercalcaemia and abnormal urinary calcium may be an indication to treat (OR 'may indicate a need for treatment') (1). All these data correspond with our results.

ACE has been the most widely used laboratory marker in sarcoidosis. Unfortunately, elevated ACE serum concentration is not specific only for sarcoidosis. Only about 60% of patients with active sarcoidosis have elevated ACE (18). ACE level may also be influenced by polymorphism of the ACE gene (19) and ACE inhibitor usage (20). In our cohort, an elevated ACE serum level was found in 41% of patients. The majority of our patients taking ACE inhibitors had normal ACE

levels. ACE level measurement should, therefore, be replaced by the analysis of serum-soluble receptor of interleukin 2 (sIL2R) or neopterin (21).

Bronchoscopy with bronchoalveolar lavage is an important diagnostic tool (22). Many authors have not found any difference in BALF lymphocytes counts in different prognostic subgroups (23), whereas some authors reported a higher proportion of lymphocytic alveolitis in patients with stage I than those with stage III (24). High CD4+ lymphocyte count or high CD4+/CD8+ ratio in BALF appear to be better markers of disease activity than total BALF lymphocytes (25). Patients with radiological improvement have higher numbers of CD4+ cells and higher CD4+/CD8+ ratio in BALF than patients with no improvement (26). Patients with higher CD4+/CD8+ ratio at initial diagnosis also respond better to treatment (27). Some authors reported the possible prognostic role of BALF neutrophils and eosinophils (24, 28, 29). Normal BALF differential cell count ranges are as follows: macrophages 80%–90%, lymphocytes 5%–15%, neutrophils 1%–3% and eosinophils below 0.5% (28, 30). Our BALF analysis results are comparable with published data. In the BALF of our patients with spontaneous disease resolution, the CD4+/CD8+ ratio was significantly higher than patients requiring therapy.

In general, prognosis of sarcoidosis is good. In 50%–70% of patients, a spontaneous resolution is observed. The majority of remissions occur within the first 6 months after diagnosis (31, 32). Moreover, Löfgren's syndrome also has an excellent prognosis (33). Patients with a less advanced disease have a higher probability of spontaneous resolution (9, 32). On the other hand, treated patients have a higher probability of relapse (16%–70%) (9). The lethality of sarcoidosis is 1%–4%. Common causes of death in sarcoidosis patients are advanced pulmonary fibrosis, pneumonia or heart failure caused by myocardial sarcoidosis (34). The results from this study do not differ.

Treating sarcoidosis is only recommended in patients with life-threatening organ involvement, persistent hypercalcaemia and hypercalciuria, symptomatic pulmonary impairment, serious pulmonary function changes, or in patients with a progressive disease (1, 31). Recommendations for sarcoidosis treatment include the following: (i) asymptomatic patients do not require treatment; (ii) corticosteroids are the treatment of first choice in symptomatic patients; (iii) pulmonary sarcoidosis is treated usually with initial dose of 30–40 mg prednisone per day, the dose is tapered to less than 10 mg/day within 3 months; and (iv) methotrexate is recommended as second-line

treatment (1, 31, 35–38). We followed these recommendations in our patients.

Multiparametric analysis revealed that good prognostic factors of spontaneous disease resolution are female gender, less advanced disease stage in chest X-ray, higher CD4+/CD8+ ratio in BALF, lymphocytosis in BALF and good pulmonary functions at diagnosis. These data have been supported by the results of uniparametric analyses. Apart from the analysed parameters, disease outcome should also be predicted by analysing the DRB1 allele (DRB1*0301/DQB1*0201), which predicts an excellent outcome in patients presenting with features of Löfgren's syndrome (39, 40). However, this examination was not a part of our study. In addition, there is no consensus stating that genetic investigation should be done in all sarcoidosis patients.

Conclusion

Our data show sarcoidosis as a disorder with high clinical and laboratory variability in the findings but with good prognosis in general, although the retrospective nature of our study should signify a limitation of the analysis. Good prognostic factors influencing spontaneous resolution are mainly considered to be female gender, less advanced disease stage in chest X-ray, higher CD4+/CD8+ ratio in BALF, lymphocytosis in BALF and normal pulmonary functions at diagnosis.

Acknowledgement

This study was supported in part by research grants MSMT CR CZ.1.05/1.1.00/02.0068 (CEITEC) and MH CZ-DRO (FNBr. 65269705).

References

- Hunninghake GW, Costabel U, Ando M, *et al.* ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 1999;16: 149–73.
- Wanger J, Clausen JL, Coates A, *et al.* Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J.* 2005;26: 511–22.
- Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, *et al.* Standardisation of spirometry. *Eur Respir J.* 2005;26: 319–38.
- Macintyre N, Crapo RO, Viegi G, *et al.* Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J.* 2005;26: 720–35.
- Chlumský J, Fišerová J, Kociánová J, Zindr V, Koblížek V. Guidelines for interpretation of pulmonary functions analyzes (In Czech). Available at: <http://www.pneumologie.cz/guidelines/> (accessed 09 February 2014).
- Kolek V. Epidemiological study on sarcoidosis in Moravia and Silesia. *Sarcoidosis.* 1994;11: 110–2.
- Newman LS, Rose CS, Bresnitz EA, *et al.* A case control etiologic study of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170: 1324–30.
- Morimoto T, Azuma A, Abe S, Usuki J, Kudoh S, Sugisaki K, Oritsu M, Nukiwa T. Epidemiology of sarcoidosis in Japan. *Eur Respir J.* 2008;31: 372–9.
- Baughman RP, Teirstein AS, Judson MA, *et al.* Clinical characteristics of patients in a case control study of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164: 1885–9.
- Gerke AK, Tang F, Yang M, Cavanaugh JE, Polgreen PM. An analysis of seasonality of sarcoidosis in the United States veteran population: 2000–2007. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2012;29: 155–8.
- Swigris JJ, Olson AL, Huie TJ. Increased risk of pulmonary embolism among US descendants white sarcoidosis from 1988 to 2007. *Chest.* 2011;140: 1261–6.
- Judson MA, Shapiro L, Freitas S, Polychronopoulos VS, Highland KB. Concomitant sarcoidosis and connective tissue disease: a review of the clinical findings and postulations concerning their association. *Respir Med.* 2013;107: 1453–9.
- Judson MA, Baughman RP, Teirstein AS, Terrin ML, Yeager H Jr. Defining organ involvement in sarcoidosis: the ACCESS proposed instrument. ACCESS research group. A case control etiologic study of sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 1999;16: 75–86.
- Judson MA, Boan AD, Lackland DT. The clinical course of sarcoidosis: presentation, diagnosis, and treatment in a large white and black cohort in the United States. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2012;29: 119–27.
- Scadding J. Prognostic of intrathoracic sarcoidosis in England: a review of 136 cases after five years' observation. *Br Med J.* 1961;2: 1165–72.
- Winterbauer RH, Hutchinson JF. Use of pulmonary function tests in the management of sarcoidosis. *Chest.* 1980;78: 640–7.
- Iannuzzi MC, Rybicki BA, Teirstein AS. Sarcoidosis. *N Engl J Med.* 2007;21: 2153–65.
- Gupta RG, Oparil S, Szidon J, Daise M. Clinical significance of serum angiotensin-converting enzyme levels in sarcoidosis. *J Lab Clin Med.* 1979;93: 940–9.
- Arbustini E, Graso M, Leo G, *et al.* Polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153: 851–4.
- Lieberman J, Zakria F. Effect of captopril and enalapril medication on the serum ACE test for sarcoidosis. *Sarcoidosis.* 1989;6: 118–23.
- Prasse A, Katic C, Germann M, Buchwald A, Zissel G, Muller-Quernheim J. Phenotyping sarcoidosis from a pulmonary perspective. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177: 330–6.

22. Costabel U, Bonella F, Ohshimo S, Guzman J. Diagnostic modalities in sarcoidosis: BAL, EBUS, and PET. *Semin Respir Crit Care Med.* 2010;31: 404–8.
23. Ziegenhagen MW, Rothe ME, Schlaak M, Quernheim J. Bronchoalveolar and serological parameters reflecting the severity of sarcoidosis. *Eur Respir J.* 2003;21: 407–13.
24. Danila E, Jurgauskienė L, Malickaitė R. BAL fluid cells and pulmonary function in different radiographic stages of newly diagnosed. *Adv Med Sci.* 2008;53: 228–33.
25. Costabel U, Bross KJ, Guzman J, Nilles A, Rühle KH, Matthys H. Predictive value of bronchoalveolar T-cell subsets for the course of pulmonary sarcoidosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1986;465: 418–26.
26. Verstraeten A, Demedts M, Verwilghen J, van den Eeckhout A, Mariën G, Lacquet LM, Ceuppens JL. Predictive value of bronchoalveolar lavage in pulmonary sarcoidosis. *Chest.* 1990;98: 560–7.
27. Baughman RP, Fernandez M, Bosken CH, Mantil J, Hurtubise P. Comparison of gallium-67 scanning, bronchoalveolar lavage, and serum angiotensin-converting enzyme levels in pulmonary sarcoidosis. Predicting response to therapy. *Am Rev Respir Dis.* 1984;129: 676–81.
28. Drent M, Jacobs JA, de Vries J, Lamers RJS, Liem IH, Wouters EFM. Does the cellular bronchoalveolar lavage fluid profile reflect the severity of sarcoidosis? *Eur Respir J.* 1999;13: 1338–44.
29. Kollert F, Geck B, Suchy R, Jörres RA, Arzt M, Heidinger D, Hamer OW. The impact of gas exchange measurement during exercise in pulmonary sarcoidosis. *Respir Med.* 2011;105: 122–9.
30. Costabel U. Technic and method and broncho-alveolar lavage in interstitial lung diseases. *Schweiz Med Wochenschr.* 1986;116: 1238–44.
31. Bradley B, Branley HM, Egan JJ, *et al.* Interstitial lung disease guideline: the British Thoracic Society in collaboration with the Thoracic Society of Australia and New Zealand and the Irish Thoracic Society. *Thorax.* 2008;63: 1–58.
32. Judson MA, Baughmann RP, Thompson BW, *et al.* Two year prognosis of sarcoidosis: the ACCESS experience. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2003;20: 204–11.
33. James DG. In memoriam Sven Löfgren (1910–1978). *Sarcoidosis.* 1988;5: 77–8.
34. Swigris JJ, Olson AL, Huie TJ, Fernandez-Perez ER, Solomon J, Sprunger D, Brown KK. Sarcoidosis-related mortality in the United States from 1988 to 2007. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183: 1524–30.
35. Judson MA. An approach to the treatment of pulmonary sarcoidosis with corticosteroids: the six phases of treatment. *Chest.* 1999;115: 1158–65.
36. Schutt AC, Bullington WM, Judson MA. Pharmacotherapy for pulmonary sarcoidosis: a Delphi consensus study. *Respir Med.* 2010;104: 717–23.
37. McKinzie BP, Bullington WM, Mazur JE, Judson MA. Efficacy of short course, low-dose corticosteroid therapy for acute pulmonary sarcoidosis exacerbations. *Am J Med Sci.* 2010;339: 1–4.
38. Baughman RP, Winget DB, Lower EE. Methotrexate is steroid sparing in acute sarcoidosis: results of a double blind, randomized trial. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2000;17: 60–6.
39. Grunewald J. HLA association and Löfgren's syndrome. *Expert Rev Clin Immunol.* 2012;8: 55–62.
40. Grunewald J, Eklund A. Sex-specific manifestations of Löfgren syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175: 40–4.

3.1.1. Zvýšená hladina kalcia může být prvním příznakem mnohočetného myelomu, ale může mít i jiné příčiny (Adam Z, Starý K, Zajíčková K, Řehák Z, Koukalová R, Šprláková-Puková A, Tomiška M, Doubková M, Čermáková Z, Krejčí M, Sandecká V, Štork M, Ostřížková L, Čermák A, Pour L. *Transfuzze Hematol. Dnes.* 2018; 24(4):238-252)

SOUHRNNÉ/EDUKAČNÍ PRÁCE

Zvýšená hladina kalcia může být prvním příznakem mnohočetného myelomu, ale může mít i jiné příčiny

Adam Z.¹, Starý K.², Zajíčková K.³, Řehák Z.⁴, Koukalová R.⁴, Šprláková-Puková A.⁵, Tomiška M.¹, Doubková M.⁶, Čermáková Z.⁷, Krejčí M.¹, Sandecká V.¹, Štork M.¹, Ostřížková L.¹, Čermák A.⁸, Pour L.¹

¹Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

²Interní gastroenterologická klinika LF MU a FN Brno

³Endokrinologický ústav, Praha

⁴Oddělení nukleární medicíny, centrum PET, RECAMO, Masarykův onkologický ústav, Brno

⁵Klinika radiologie a nukleární medicíny FN Brno a LF MU v Brně

⁶Klinika nemocí plicních a tuberkulózy LF MU a FN Brno

⁷Oddělení klinické biochemie FN Brno a Katedra laboratorních metod LF MU Brno

⁸Urologická klinika LF MU a FN Brno

Transfuzze Hematol. dnes, 24, 2018, No. 4, p. 238-252

SOUHRN

Hyperkalcemie asociovaná s maligním onemocněním je relativně častým problémem, který v průběhu onemocnění postihne 20–30 % pacientů s nádorovým onemocněním. Nejčastější maligní choroby, u nichž v počátku či v průběhu nemoci se manifestuje hyperkalcemie, je mnohočetný myelom, karcinom prsu, karcinom plic a karcinom ledviny. V diferenciálně diagnostické úvaze je však třeba zmínit hyperparatyroidózu, granulomatózní procesy, hlavně sarkoidózu a hereditární či získané endokrinní choroby. Příznaky hyperkalcemie jsou často nespecifické, jako je patologická únava, nevolnost, zvracení, zácpa a také spavost a zmatenost, což ztěžuje stanovení diagnózy. Tyto příznaky totiž lze vysvětlit také obecnými příznaky nádorové nemoci nebo nežádoucími účinky farmakoterapie, třeba podaných cytostatik. Hyperkalcemie je stále nepříznivým prognostickým znamením. V textu je popsána diferenciální diagnostika a léčba hyperkalcemie.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyperkalcemie – bisfosfonáty – denosumab – mnohočetný myelom – hyperparatyroidóza – sarkoidóza – vrozená hyperkalcemie

SUMMARY

Adam Z., Starý K., Zajíčková K., Řehák Z., Koukalová R., Šprláková-Puková A., Tomiška M., Doubková M., Čermáková Z., Krejčí M., Sandecká V., Štork M., Ostřížková L., Čermák A., Pour L.

Hypercalcemia may be the first sign of multiple myeloma, but not only that

Hypercalcemia associated with malignancy is relatively common, occurring in up to 20–30% of cancer patients. It can occur in patients with both solid tumours and haematological malignancies, the most common being multiple myeloma, breast cancer, lung cancer and renal cell carcinoma. However, hyperparathyroidism, sarcoidosis and hereditary or acquired endocrine disorders should be considered in the differential diagnosis. The signs and symptoms of hypercalcemia are often nonspecific and include fatigue, nausea, vomiting, constipation and confusion, making the diagnosis challenging. These clinical features often mimic general symptoms of the underlying cancer itself or the adverse effects of treatment such as chemotherapy. The development of hypercalcemia of malignancy indicates a poor prognosis for patients with multiple myeloma or other cancer. This text describes the differential diagnosis and therapy.

KEYWORDS

hypercalcemia – bisphosphonates – denosumab – multiple myeloma – hyperparathyroidism – sarcoidosis – hereditary hypercalcemia

ÚVOD

Klinické projevy hyperkalcemie jsou velmi pestré a pro samotné symptomy lze najít vždy více vysvětlení. Nevolnost, zvracení oblenění pasáže a zácpu lze u nemocného vysvětlit vlivem opioidů či dalších léků (chemoterapie) nebo onemocněním zažívacího traktu. Zmatečnost lze považovat za nástup psychiatrické nemoci či medikamenty indukované zmatečnosti. Selhání ledvin lze vysvětlit četnými léky či samostatným onemocněním ledvin. A špatná interpretace příznaků zavedla třeba jednoho našeho pacienta nejprve na psychiatrické oddělení. A psychiatři po vyšetření hladiny vápníku diagnostikovali zmatečnost při hyperkalcemii. Nejznámější krevní chorobou, která způsobuje hyperkalcemii, je mnohočetný myelom. A proto právě nemocní s hyperkalcemií jsou odesíláni do ambulancí specializovaných pro mnohočetný myelom s otázkou, má-li či nemá-li pacient právě tuto krevní chorobu. V souboru téměř 5 tisíc pacientů mělo 13 % nemocných hyperkalcemii při stanovení diagnózy jako jeden z prvních projevů nemoci [1]. To, že jedním z prvních příznaků jsou projevy hyperkalcemie, signalizuje signifikantně horší prognózu ve srovnání s pacienty s mnohočetným myelomem, u nichž při stanovení diagnózy byla hladina kalcia v normě [2].

Mnohočetný myelom je častou příčinou hyperkalcemie, ne však jedinou nemocí, která hyperkalcemii způsobuje. Pokud nalezneme hyperkalcemii a monoklonální imunoglobulin, neznamená to vždy, že je to hyperkalcemie u mnohočetného myelomu. Monoklonální gamapatie se vyskytuje relativně často až u 3 % osob starších 50 let, a může být provázena hyperkalcemií neplazmocytární etiologie. Hyperparatyreózu lze snadno zjistit vyšetřením hladiny parathormonu, ale jako příčina byla například popsána i sarkoidóza u pacienta s MGUS. Část textu je proto věnována diferenciální diagnostice hyperkalcemie z úhlu pohledu hematologů, endokrinologů, specialistů na sarkoidózu a také zobrazovacích lékařů a biochemiků. V závěru je uveden přehled léčby.

Cílem článku je také připomenout, že je vhodné stanovit vápník při vyšetřování každého nejasného onemocnění a je vhodné vápník vyšetřit i v rámci preventivních prohlídek.

FYZIOLOGICKÁ HOMEOSTÁZA KALCIA

Ionizované a celkové kalcium

Z celkového kalcia v těle je 99 % deponováno v hydroxyapatitu, který je základním kamenem pro tvorbu kostí a rezervoárem kalcia pro další tkáňové kompartmenty. Pouze malá část celkového kalcia je lokalizována v intracelulární a extracelulární tekutině. Udržování

stabilní fyziologické koncentrace kalcia v těchto tekutinách je zásadní pro normální průběh akčních potenciálů ve svalových a nervových buňkách, pro svalovou kontrakci, pro exocytózu neurotransmiterů a hormonů, pro regulaci buněčného růstu, pro aktivaci koagulace. Také aktivita četných enzymů je regulována koncentrací kalcia [3].

Kalcium se v krvi vyskytuje ve třech formách. Přibližně 50 % kalcia je vázáno na bílkoviny, dominantně na albumin. Malá část kalcia je vázána v komplexech citrátů a fosfátů. Zbylé množství, 45–50 % se v séru vyskytuje jako ionty Ca^{2+} . A pouze toto ionizované kalcium je biologicky aktivní [3].

Dříve byly pro pacienty se zásadní odchylkou koncentrace celkové bílkoviny a albuminu používány vzorce pro přepočítání hladiny vápníku na normální hladiny albuminu a celkové bílkoviny. Dnes je jednodušší vyšetřit ionizované kalcium u všech pacientů s abnormálními hodnotami albuminu anebo celkové bílkoviny.

Jedno z pravidel pro přepočítání hladiny vápníku zní: „na každých 10 g albuminu/l, chybějících do průměrné normální hladiny 40 g/l, je třeba přičíst 0,2 mmol/l Ca^{2+} “ [4].

Poměr vázaného a ionizovaného kalcia souvisí s pH, při poklesu pH na nižší hodnoty (při acidóze) se zvyšuje koncentrace ionizovaného kalcia.

Regulační mechanismy

Za fyziologických okolností je hladina ionizovaného kalcia udržována ve velmi úzkém rozmezí. Na regulaci se podílí parathormon (PTH), metabolity vitamínu D a kalcitonin. Tyto tři zásadní fyziologické regulační faktory ovlivňují rychlost přestupu kalcia mezi kostí a extracelulární tekutinou, prostupy kalcia tubuly ledvin a mukózou trávicího traktu.

Množství kalcia vstřebaného trávicím traktem se pohybuje mezi 15–60 % množství přijatého potravou. Aktivní vstřebávání střevní mukózou je stimulováno 1,25-dihydroxyvitamínem D a nepřímo PTH díky jeho vlivu na metabolismus vitamínu D [3].

Kalcium je v ledvině volně filtrováno v glomerulu, denně 8–10 g, ale většina vápníku (98 %) je zpět vstřebána, takže močí je vyloučeno 100–300 mg/24 hodin, což odpovídá 2,5–7,5 mmol/24 hod.

Většina vápníku je vstřebána v proximálním tubulu v procesu spjatém se vstřebáváním sodíku, nezávisle na parathormonu. Parathormon stimuluje vstřebávání vápníku v distálním tubulu a současně inhibuje vstřebávání fosfátů.

Kosti neustále podléhají postupné přestavbě, asi 500 mg kalcia je denně z kosti uvolněno a na jiném

místě uloženo. Jak PTH, tak 1,25-dihydroxyvitamin D stimuluje resorpční pochody z kosti, zatímco kalcitonin inhibuje resorpci [3].

Parathormon

Je polypeptid obsahující 84 aminokyselin, je produkován buňkami příštítných tělísek a secernován v závislosti na koncentraci ionizovaného kalcia v prostředí. Informace o koncentraci kalcia v okolním prostředí je přenášena do buňky receptorem pro kalcium (*calcium sensing receptor*). Při vzestupu kalcia v okolním prostředí se *calcium sensing receptor* aktivuje a potlačí tvorbu parathormonu.

Ten samý receptor je přítomný v parafolikulárních buňkách ve štítné žláze, tvořících kalcitonin. Aktivace receptoru v buňkách tvořících kalcitonin zvýší tvorbu kalcitoninu.

Dále aktivace *calcium sensing receptoru* v tubulárních buňkách v ledvině snižuje reabsorpci vápníku.

Mutace, které vedou k inaktivaci *calcium sensing receptoru*, způsobují hyperkalcemii s hypokalcemií. Tato nemoc je autosomálně dominantně dědičná [5]. Naopak, mutace, které vedou ke zvýšené aktivitě *calcium sensing receptoru* vedou k autosomálně dominantní hypokalcemii [5].

Laboratorní vyšetřování hyperkalcemie

Stanovení kalcia je dnes standardizovanou metodou a fyziologické hodnoty se udávají 2,15–2,55 mmol/l. Pro stanovení vápenatého kationtu je při odběru nutné zabránit nadměrnému zatažení paže manžetou, což může způsobit zvýšení hladiny vápníku o 0,12–0,25 mmol/l v důsledku vytlačení vody z cévního kompartmentu. Odebírá se srážlivá nebo nesrážlivá krev s přidávkou heparinátu litného. Je nutno zabránit kontaminaci vzorku cheláty, jako je EDTA nebo citrát, které jsou používány pro vyšetření krevního obrazu. EDTA či jiné cheláty na sebe pevně vážají kalcium, což snižuje hodnotu kalcia ve vyšetřovaném vzorku.

V rámci diferenciální diagnostiky hyperparatyreózy se často zdůrazňuje důležitost vyšetření odpadu kalcia močí za 24 hod. Pro stanovení kalcia ve sbírané moči je nutno brát vzorek z celého promíchaného množství a v laboratoři je nutno provést acidifikaci pro uvolnění vápníku z vazby. Je vhodné též stanovit kreatinin pro posouzení správnosti sběru moče. Problémem stanovení kalcia v moči sbírané po 24 hodin spočívá v obvykle nízké kvalitě (přesnosti) sběru. V praxi se nyní nepoužívá pro stanovení kalcie standardní dieta. Referenční hodnoty kalcie nejsou většinou udávány současně s údajem o dietě. Rozmezí kalcie pro muže je 2,4–7,5 mmol/24 hod,

pro ženy je horní referenční mez 6,2 mmol/24 hod. Za hyperkalcemii lze považovat zvýšený odpad vápníku za 24 hodin nad referenční mez a současně je poměr Ca/kreatinin v moči nad 0,6. Při dietě s dostatečným množstvím kalcia by kalcie neměla být nižší než 2,0 mmol/24 hod [3].

K dalším parametrům, které se vyšetřují při diferenciální diagnostice hyperkalcemie, zmíníme koncentraci fosfátů v séru, aktivitu alkalické fosfatázy, 25-hydroxyvitamin D, případně 1,25-dihydroxyvitamin D a dále sbíranou moč za 24 hodin a v ní nejen kalcii, ale také poměr kalcia a kreatininu v moči.

Příznaky hyperkalcemie

Příznaky hyperkalcemie se odvíjejí od výše ionizovaného kalcia. Nádorové hyperkalcemie obvykle mají rychlý vzestup kalcemie v čase a s tím související rychlý nástup symptomů. Chronická hyperkalcemie, provázející hyperparatyreózu, má podstatně méně intenzivní příznaky. Pacienti s hyperparatyreózou a hyperkalcemií mají často i vyšší krevní tlak, který se normalizuje po odstranění nadprodukce parathormonu. A tak vyšetření kalcia patří ke standardním vyšetřením u všech osob s hypertenzí.

Ale nejenom dehydratace, zvracení a selhání ledvin jsou příznaky hyperkalcemie. Zvýšené hladiny kalcia způsobuje také různé poruchy funkce CNS, z nichž nejčastější je zmatenost. Vyšetření hladiny kalcia by proto mělo patřit ke standardu i při všech nově vzniklých psychiatrických odchylkách. Klinické příznaky podle jednotlivých orgánů shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1. Příznaky hyperkalcemie

Renální příznaky
Porucha schopnosti ledvin koncentrovat moč vede k polyurii, která sice způsobuje pocit žízně, ale vzhledem k nevolnosti není nemocný schopen ztráty tekutin uhradit pitím. To způsobí hypovolemii a renálním selháním. V případě dlouhodobé, jen mírně zvýšené koncentrace kalcia nad fyziologickou mez, provázející hyperparatyreózu, dochází k precipitaci solí kalcia v ledvině, ke vzniku nefrolitiázy a nefrokalcinózy.
Gastrointestinální projevy
Zpomalení pasáže trávicím traktem, zácpa, nevolnost, zvracení, anorexie, někdy bolesti břicha, zácpa může vyústit až v paralytický ileus. Žaludeční vředy. Hyperkalcemií indukovaná pankreatitida.
Změny ve funkci CNS a neuromuskulární poruchy
Bolesti hlavy, deprese, psychózy, poruchy osobnosti, podrážděnost, somnolence, halucinace, zmatenost až kóma, svalová slabost.
Kardiovaskulární
Hypertenze, zkrácený QT interval, arytmie.
Kostní příznaky
Osteoporóza, kostní bolesti.

Přehled příčin hyperkalcemie

Hyperkalcemie je nejčastěji způsobena buď hyperparatyreoidózou, nebo maligní chorobou, která nějakým způsobem zvyšuje hladinu kalcia. Ostatní příčiny, zmíněné v textu, jsou méně časté. Pro diferenciální diagnostiku je vhodné rozdělit hyperkalcemie na:

- hyperkalcemii se zvýšenou hodnotou parathormonu (PTH dependentní),
- hyperkalcemie s nezvýšenou hodnotou parathormonu (PTH independentní) [3].

Jednotlivé příčiny pak uvádí tabulka 2.

Tabulka 2. Přehled etiologie hyperkalcemie

<p>Hyperkalcemie se zvýšenou hodnotou parathormonu Primární hyperparatyreoidóza: adenom, difúzní hyperplazie, vzácně karcinom Familiární hypokalcierická hyperkalcemie Terciální hyperparatyreoidóza Intoxikace lithiem</p>
<p>Hyperkalcemie s nezvýšenou hodnotou parathormonu způsobené maligní chorobou Invaze malignity do skeletu: metastázy karcinomů, infiltrace skeletu myelomem ale i lymfoproliferací, difúzní infiltrace kostní dřeně maligní chorobou Hyperkalcemie bez infiltrace skeletu maligními buňkami vlivem tvorby aktivátorů osteolýzy, nádorem v měkkých tkáních, nejčastěji PTHrP nebo 1,25-dihydroxyvitamin D</p>
<p>Hyperkalcemie s nezvýšenou hodnotou parathormonu, způsobená jiným než onkologickým onemocněním Sarkoidóza, ale i jiné granulomatózní choroby Tyreotoxikóza Léky: thiazidová diuretika, vápník, vitamin D, vitamin A, teriparid Insuficience nadledvin</p>

Primární hyperparatyreoidóza

Dříve bývala hyperparatyreoidóza diagnostikována až při závažném poškození organismu, při nefrolithiáze či nefrokalcinóze, a tak panovala představa, že jde o nemoc velmi vzácnou. V posledních letech, kdy je hladina kalcia vyšetřována rutinně v rámci laboratorního vyšetření, indikovaného z jiných důvodů, či z důvodů preventivních, tak většina případů hyperparatyreoidózy bývá diagnostikována zcela náhodně v době, kdy zvýšení kalcia a parathormonu je bezpříznakové. Mnozí pacienti nemají žádné příznaky či jejich příznaky jsou jen mírné a hladina kalcia zůstává stabilní po více let. K nespecifickým příznakům nezávažné hyperkalcemie patří deprese, bolesti svalů, svalová slabost, ale také zácpa, projevy nefrolithiázy, nefrokalcinózy a urolithiázy, nebo i kostní projevy. Příznaky jsou podobné, ale méně intenzivní než při nádorem indukované hyperkalcemii. Pacienti s hyperparatyreoidózou mají často vyšší krevní tlak, který se po úspěšné operaci snižuje [6].

Broulík uvádí, že v sedmdesátých letech minulého století byla incidence hyperparatyreoidózy 8 nových případů/100 000 obyvatel, zatímco v současnosti se incidence zvýšila na 24 případů/100 000 obyvatel a je 4krát častější u žen než u mužů [6]. Příčina tohoto prudkého vzestupu není jasná, podílet se na ní bude možná častější vyšetřování kalcia v rámci preventivních vyšetření.

Z uvedených důvodů by rozhodnutí o léčbě mělo být opřeno o přítomnost komplikací, způsobených primární hyperparatyreoidózou [6].

Rozlišují se následující stavy:

1. Primární hyperparatyreoidóza – primární odchylka s nadměrnou tvorbou PTH.
2. Sekundární hyperparatyreoidóza – nadměrná tvorba parathormonu je odpovědí na nízkou koncentraci vápníku v těle, většinou u pacientů s nemocemi ledvin, příčinou mohou být i malabsorbční poruchy a další.
3. Terciální hyperparatyreoidóza – chronická stimulace přístítných tělísek hypokalcemií u renální insuficience vede nakonec k autonomní hyperfunkci [6].

Existuje i normokalcemická nebo epizodická hyperparatyreóza. Léčba je identická, jen diagnostika je složitější. Přestože laboratorně se jedná o méně nápadné formy primární hyperparatyreózy, lze i u nich očekávat typické komplikace.

Morfologickým podkladem zvýšené tvorby PTH je v 80–90 % benigní adenom přístítného tělíska.

V 10–15 % jde o onemocnění více tělísek nebo o difúzní parathyreoidální hyperplazii.

V méně než 1 % jde o karcinom přístítných tělísek [6]. Zcela raritně je PTH produkován ektopicky, například funkčními neuroendokrinními nádory pankreatu.

Obtížnou diferenciálně diagnostickou otázkou pak představují hereditární formy hyperparathyreoidózy [7].

Projevy primární hyperparatyreoidózy

Biochemicky prokazujeme hyperkalcemii a normo- nebo hypofosfatemii (v důsledku inhibice reabsorpce fosfátu v proximálním tubulu). Hodnota PTH je zvýšená, někdy jen mírně, někdy značně. Normální PTH při hyperkalcemii také může znamenat PTH podmíněnou hyperkalcemie. Neboli je-li při hyperkalcemii hodnota PTH jiná než přiměřeně nízká, může jít o PTH podmíněnou hyperkalcemii.

Kalcium je ve zvýšené míře vylučováno močí – hyperkalciurie obvykle > 400 mg/den, což odpovídá 10 mmol/24 hod., která diferencuje primární hyperparatyreózu od familiární hypokalcierické hyperkalcemie. S délkou trvání hyperfunkce přístítných tělísek

se progresivně snižuje hodnota kostní hmoty měřené pomocí dvoufotonové denzitometrie (DEXA) a vzniká rentgenový obraz subperiostální resorpce s tvorbou hnědých tumorů nebo *osteitis fibrosa*, což svědčí pro delší trvání onemocnění. Časté jsou fraktury obratlů či v oblasti kyčlí po neadekvátním traumatu nebo i zcela bez úrazového děje. Hyperkalcemie spolu s nadprodukcí 1,25 (OH)2D vytvářejí podmínky pro ukládání kalcia v ledvině, k tubulointersticiálnímu poškození nebo nefrolitiáze či urolitiáze. Hyperkalcemie u některých nemocných s primární hyperparatyroidózou poškozuje tubulární funkce ledvin a způsobuje nefrogenní diabetes insipidus, a tedy polyurii [6]. Přibližně 5 % pacientů s ledvinými kameny má diagnostikovanou hyperparatyroidózu. Takže urologové jsou jednou z odborností, která tuto endokrinní abnormalitu diagnostikuje. Hyperkalcemie však může také indukovat žaludeční vředy a pankreatitidu [6] a v neposlední řadě zvyšuje krevní tlak v důsledku kalcie-indukované vazokonstrikce [6].

Zobrazovací možnosti adenomu příštítného tělíska

Sonografické a scintigrafické vyšetření jsou základem pro zobrazení parathyreoideální tkáně nadměrně produkující parathormon.

Sonograficky lze zobrazit většinu hyperfunkčních příštítných tělísek. Správnost diagnózy můžeme v případě potřeby ověřit biochemickým vyšetřením punktátu.

Je nutné uvést, že „normální“ příštítné tělísko přiměřené velikosti a funkce nelze zobrazit zpravidla žádnou zobrazovací metodou. Zobrazovací metody se proto využívají prakticky jenom k lokalizaci patologicky zvětšených a/nebo hyperfunkčních příštítných tělísek, nejedná se o diagnostické vyšetření příštítných tělísek v pravém slova smyslu. Zobrazení a lokalizace hyperprodukcující parathyreoideální tkáně má hlavní význam pro chirurgický výkon. Přesná lokalizace (zejména ektopických adenomů příštítných tělísek) ovlivňuje zásadně úspěšnost operace a umožňuje v řadě případů provést jenom miniinvazivní výkon. Zobrazovací techniky jsou efektivní zejména na pracovištích, kde se provádí větší počet vyšetření a je zpětná vazba z operačních nálezů.

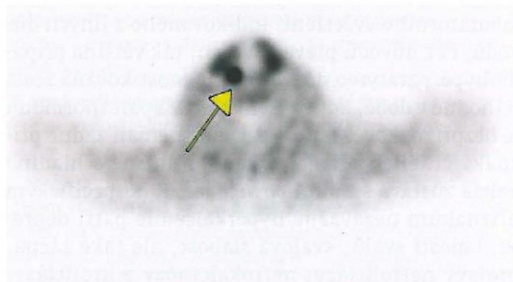
Standardem scintigrafického vyšetření je dnes zobrazení pomocí isonitrilů (scintigrafie ^{99m}Tc -methoxyizobutylisonitril = MIBI). Je to lipofilní kationt, který byl do klinické praxe zaveden koncem 80. let minulého století k vyšetření perfuze myokardu. Brzy byla zjištěna jeho akumulace v nejrůznějších maligních nádorech. Začal být proto využíván i v nespecifické onkologické diagnostice. Přesný mechanismus akumulace v nádorech nebyl u radiofarmak značených ^{99m}Tc zatím

zcela objasněn. MIBI je převážně akumulován v mitochondriích viabilních buněk a v cytoplasmě. Hlavním mechanismem akumulace je pravděpodobně elektrostatická přitažlivost mezi kladným nábojem lipofilní molekuly MIBI a negativním nábojem v mitochondriích. ^{99m}Tc -MIBI je po nitrožilní aplikaci akumulován ve štítné žláze a v adenomech příštítných tělísek [8]. Ze štítné žlázy je poměrně rychle vyplavován, na rozdíl od příštítných tělísek a tím se mění poměr aktivity. Vyšetření se provádí obvykle jako dvoufázová scintigrafie (snímáme za 10 a 120 minut po nitrožilní aplikaci cca 700–800 MBq ^{99m}Tc MIBI) s možností odečtu časných a pozdních snímků.

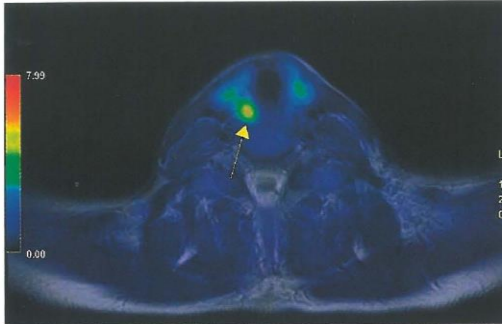
Senzitivita metody na pracovištích, která se touto problematikou zabývají, je udávána okolo 90 %, specificita okolo 95 %. Podmínkou je dostatečná zkušenost a kvalitní přístrojové vybavení. Vysoké diagnostické



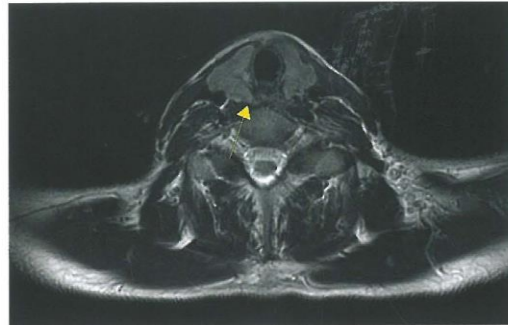
Obr. 1. Sagitální rovina PET (pozitronové emisní tomografie) po aplikaci 18fluorocholinu (18-FCH) Šipka označuje místo zvýšené akumulace radiofarmaka, tedy na oblast hyperfunkčního příštítného tělíska.



Obr. 2. PET zobrazení v rovině transverzální Šipka směřuje k místu hypermetabolismu, k hyperfunkčnímu příštítnému tělísku.



Obr. 3. Fúze obrazů PET a MR v transverzální rovině přesně dokumentuje místo zvýšené akumulace radiofarmaka (^{18}F -FCH) K ložisku směřuje šipka. Náběr dat pro PET i MR část je provázen simultánně, nejedná se o fúzi prováděnou až po jednotlivých vyšetřeních. Vyšetření probíhá na přístroji PETMR GE Signa 3.0T.



Obr. 4. MR obrázek v transverzální rovině, T2 sekvenca Šipka směřuje k dorzokraniálnímu okraji pravostranného laloku štítné žlázy, kde je patrná drobná nodularita v T2 sekvenci vykazující na fúzovaných (PET a MR) obrázcích hypermetabolismus odpovídající hyperfunkčnímu příštítnému tělísku.

přesnosti se nejčastěji dosahuje pomocí tomografické techniky SPECT (*single photon emission computed tomography*) ve spojení s CT zobrazením. To dovolí přesnou anatomickou identifikaci ložisek se zvýšenou kumulací aktivity. Tyto informace jsou cenné před chirurgickým výkonem, při kterém je možné použít scintilační sondu a provést navigovaný chirurgický výkon.

Nejnověji se k zobrazování využívá PET (*positron emission tomography*) ve spojení s CT nebo MR po aplikaci radiofarmaka ^{18}F -fluorocholinu (FCH) [9]. PET má lepší rozlišení než SPECT a ^{18}F -fluorocholin se akumuluje v příštítných tělíscích jiným způsobem než MIBI. PET/CT s fluorocholinem může být rozhodujícím vyšetřením v případech, kdy nebylo úspěšné ultrazvukové a MIBI vyšetření [9].

V ČR je tato metoda již dostupná. Díky vysoké efektivitě PET/CT s fluorocholinem téměř vymizí situace, kdy jsme nechali chirurga exstirpovat příštítné tělísko „naslepo“. Jedná se o inovativní diagnostický postup, a proto není možno odhadnout četnost indikací. Již nyní lze ale říci, že má metoda své místo v diagnostickém algoritmu PHP. Obrázky 1–4 ukazují, jak vypadá zobrazení adenomu příštítného tělíška pomocí PET/MR vyšetření s aplikací radiofarmaka fluorocholinu, provedené na PET/MR přístroji ve FN Brno.

Užití radioizotopových zobrazovacích technik pro lokalizaci hyperprodukcující parathyroideální tkáně má smysl jen v případech, pokud je významně zvýšena hladina parathormonu. Nejlepších výsledků dosahuje scintigrafie právě při vysoké hladině parathormonu i kalcia. Při hraničních hodnotách scintigrafie zpravidla selhává (nedostatečně zvětšené tělísko s malou metabolickou aktivitou). Klasické CT a MR vyšetření má také své místo v diagnostice, ale nejpřínosnější je

kombinace CT nebo případně i MR s radioizotopovým zobrazením [9].

Léčba hyperparatyroidózy

Pokud se podaří zobrazit a detekovat suspektní příštítné tělísko, je léčba operační [10]. Vhodné je provádět resekce adenomů příštítných tělísek na specializovaných pracovištích. Při operačním řešení se používá peroperační sonografie či detekce pomocí označení příštítného tělíška radiofarmakem MIBI s následnou detekcí ložiska zářením (gammanavigovaná explorace).

Pokud se nepodaří najít příštítné tělísko, zbývá jediná léčba farmakologická, pokud se nesáhne k exploraci krku zkušeným chirurgem. Kličková diuretika mohou mírně snížit kalcemii, naopak nezbytné je vysazení thiazidových diuretik, která mají opačný efekt. Klasické antiresorptivní léky, jako jsou bisfosfonáty nebo raloxifen, sice nemají významný vliv na hladinu kalcia a parathormonu, ale snižují resorpci kosti a zvyšují kostní denzitu osob léčených s hyperparatyroidózou.

Jako kalcimimetické léky se označují takové látky, která aktivují *calcium sensing receptor*. Výsledkem je pokles koncentrace parathormonu a kalcia. V současnosti je k dispozici tabletová forma kalcimimetického agens zvaná cinacalcet (Mimpara). Používá se u pacientů, u kterých není možná operační léčba [11]. Nízkokalciová dieta zvýší efekt farmakologické léčby. Pro pacienta je často velmi neoblíbená. Pozitivní motivací je příslib vysokokalciové diety po úspěšné resekci příštítného adenomu.

Hyperkalcemie související s maligní chorobou

K hyperkalcemii může dojít až po dlouhodobějším normokalcemickém průběhu maligní choroby, a pak hyperkalcemie signalizuje transformaci do agresivnější

formy nemoci a tedy obvykle špatnou prognózu. Někdy však mohou být symptomy hyperkalcemie, například zmatenost, prvními příznaky dosud nerozpoznaného mnohočetného myelomu. Jeden z našich pacientů s mnohočetným myelomem byl po první návštěvě svého lékaře poslán na psychiatrii pro závažnou zmatenost. Až tam vyšetřili kalcium a přeměřovali jej na interní oddělení, kde byla stanovena diagnóza dříve nepoznaného mnohočetného myelomu.

Z maligních chorob, které svými buňkami infiltrují (invadují) skelet a indukují osteolýzu, je třeba zmínit mnohočetný myelom a karcinom prsu, plic nebo ledvin s metastázami do skeletu.

Hyperkalcemie při maligní chorobě může vzniknout i bez invaze maligních buněk do kosti. Nejčastěji se to popisuje u dlaždicobuněčných tumorů plic, jícnu, nádorů hlavy a krku, gynekologických malignit, karcinomu prsu a karcinomu ledvin. Ale prakticky i každá jiná neoplazie může být příčinou hyperkalcemie.

Molekulární příčiny hyperkalcemie u maligních chorob jsou velmi pestré. V případě mnohočetného myelomu jde o sekreci četných cytokinů, které ve svém důsledku aktivují osteoklasty (tumor necrosis factor beta, interleukin-1, interleukin-6). V případě lymfomů se v některých případech prokázala zvýšená tvorba 1,25-dihydroxyvitaminu D, nebo peptidu zvaného *parathormon related peptide* (PTHrP). Případy, kdy by tumor produkoval přímo parathormon, jsou vzácné, spíše šlo o koincidenci hyperparatyreózy a maligní nemoci.

Hyperkalcemie u solidních nádorů je většinou způsobena látkami, které jsou kategorizovány jako PTHrP, což je bílkovina, která má s parathormonem četné společné biologické vlastnosti a sekvenci prvních 13 aminokyselin, které odpovídají za jeho aktivitu. Parathormon se skládá pouze z 84 aminokyselin, zatímco PTHrP má více izoforem, které obsahují od 139 do 173 aminokyselin. Biologická aktivita PTH a PTHrP je téměř identická, ale ne zcela, PTHrP neaktivuje 1-alfa hydroxylázu 25-hydroxyvitaminu D. Pacienti, kteří mají hyperkalcemii způsobenou PTHrP, mají obvykle nízké koncentrace jak PTH, tak i 1,25-dihydroxyvitaminu D, protože PTHrP není detekovatelný klasickým testem používaným k průkazu PTH. PTHrP není nádorově specifický, je to fyziologicky tvořený peptid různými buňkami s fyziologickými funkcemi. V případě nádorových buněk je však produkován v nadbytku a to vede k vzestupu hladiny kalcia [12, 13, 14].

V aktivaci osteolýzy má zásadní význam aktivace signalizace dráhy RANK-RANKL. Kostní tkáň podléhá neustálé přestavbě, starší struktury hydroxyapatitu jsou odstraňovány a nahrazovány novými. Klíčové

role v tomto procesu mají osteoblasty, které kost budují a osteoklasty, které ji odbourávají. Prekurzory osteoblastů mají na svém povrchu receptor zvaný RANK (receptor activator of NF- κ B, nuclear factor-kappa B). RANK je aktivován pomocí RANKL (RANK-Ligand), které se mimo jiné nachází na povrchu osteoblastů. Aktivace RANK pomocí RANKL stimuluje vyzrávání pre-osteoclastů do aktivních osteoklastů a tím osteolýzu [14]. Cílem léčby hyperkalcemie je zastavit patologicky zvýšenou aktivitu osteoklastů. Toho lze dosáhnout aplikací bisfosfonátů, jímž bylo v české literatuře věnováno hodně publikací a nejnověji pomocí denosumabu. Denosumab inhibuje maturaci osteoklastů tím, že váže a inaktivuje RANKL. To odpovídá přirozené aktivitě osteoprotegerinu, endogenního inhibitoru RANKL. Aktivita osteoprotegerinu za některých okolností nestačí regulovat nádorem zvýšenou osteolýzu a v případech pacientů s osteoporózou není zcela jasná příčina snížené aktivity osteoprotegerinu.

SARKOIDÓZA A DALŠÍ ZÍSKANÉ PŘÍČINY HYPERKALCEMIE

Sarkoidóza

Granulomatózní choroby jsou další známou příčinou hyperkalcemie. Sarkoidóza je systémové granulomatózní nekaseifikující onemocnění nejasné etiologie, které může postihnout jakýkoliv orgán v lidském těle. V 90 % případů postihuje respirační systém, proto je sarkoidóza doménou plicních lékařů. Vyskytuje se zejména u jedinců mladšího a středního věku. Prognóza je většinou příznivá a závisí na typu a rozsahu postižení. Sarkoidóza může mít akutní či pozvolný chronický průběh. Z mimoplicních lokalizací sarkoidózy je nutno zmínit kůži, na které tvoří uzlovité infiltráty a plaky, a také erythema nodosum může být signálem přítomnosti sarkoidózy.

Sarkoidóza se může projevit zvětšením periferních uzlin a imitovat tak lymfom. Sarkoidóza může způsobit uveitidu a iridocyklitidu, ale také postižení srdce, nervového systému a kostí. Starší literatura označovala kostní změny jako *ostitis multiplex cystoides Jüngling* [15]. Typickou kostní lokalizací, kde bývají často detekovány kostní změny způsobené sarkoidózou, jsou kosti ruky a nohy. Tvoří je drobná, ostře ohraničená cystoidní projasnění v prořídle „síťovitě“ spongióze. Ale jak dokumentují v poslední době FDG-PET/CT studie, postižení skeletu je prokazatelné i v dlouhých kostech a axiálním skeletu [15].

Se zvyšující se dostupností PET/CT vyšetření se zvyšuje i počet pacientů se sarkoidózou, kteří prošli tímto vyšetřením. A to poněkud mění pohled na tuto nemoc. Ukazuje se, že mimo plicní a uzlinová postižení jsou

často pomocí PET/CT detekována také postižení sleziny, kostí i dalších orgánů a kombinovaná systémová postižení až s obrazem připomínajícím lymfomy [16, 17].

V souboru 158 pacientů vyšetřených metodou FDG-PET/CT byla PET pozitivita prokázána u 75 % z nich. V této skupině PET pozitivních pacientů bylo mimořádně postižení prokázáno u 75 % [18].

Optimální pro zjištění rozsahu sarkoidózy se však zdá být kombinace FDG-PET/CT vyšetření s magnetickou rezonancí (MR). MR může prokázat kardiální, svalová a CNS ložiska sarkoidózy, zatímco PET/CT lépe informuje o postižení lymfatických uzlin a kostí [18].

Plicní formy jsou diagnostikovány pomocí laboratorních vyšetření (skiagram hrudníku, výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností - HRCT), bronchoskopie s bronchoalveolární laváží. Sarkoidózu v jiných lokalizacích většinou prokazujeme odběrem vzorku postižené tkáně.

Z laboratorních parametrů bývá vyšší sedimentace erytrocytů, a popsáno bylo i polyklonální zmnožení imunoglobulinů [19]. Diferenciálně diagnosticky je nutno odlišit sarkoidózu od multicentrické formy Castlemanovy choroby, která způsobuje zvýšení zánětlivých markerů a zvýšení koncentrace polyklonálních imunoglobulinů, ale někdy i zvýšení koncentrace monoklonálního imunoglobulinu.

V 70–80 % případů sarkoidózy bývá zvýšená aktivita ACE (*angiotensin converting enzyme*) v séru. Hyperkalcemie je popisována u 2–10 % pacientů se sarkoidózou [20]. Hyperkalcemie je častější a nachází se až v 40 % případů [20]. Více se projeví v letních měsících, kdy se vápník zvýšeně resorbuje střevem při zevní aktivaci vitamínu D. V případě, kdy byla podána vyšší dávka vitamínu D pacientovi s nerozpoznanou sarkoidózou, došlo k jeho rychlé hydroxylaci na kalcitriol a ke vzniku hyperkalcemie, a tak i k odhalení sarkoidózy [20].

Příčinou hyperkalcemie a hyperkalcie u sarkoidózy jsou makrofágy granulomů transformované na epiteloidní buňky. Makrofágy mají vysokou aktivitu 1-alfahydroxylázy vitamínu D, což vede ke zvýšené hydroxylaci 25-hydroxyvitamínu D a jeho přeměně na 1,25-dihydroxyvitamín D. Za fyziologických podmínek dochází k této hydroxylaci jen vlivem PTH, ale v případě sarkoidózy je tato hydroxylace nezávislá na PTH [21].

Nic však neplatí absolutně, v literatuře lze nalézt případy hyperkalcemie u sarkoidózy, kdy příčinou byl PTHrP [22].

Další získané příčiny hyperkalcemie

Granulomatózní ložiska však mohou mít i jinou příčinu než je sarkoidóza. Literatura například popisuje případ jihoamerické ženy, které si z kosmetických dů-

vodů nechala aplikovat do gluteální krajiny metylmetakrylátové injekce. Depozita metylmetakrylátu způsobila chronický zánět, detekovaný zvýšenou akumulací fluorodeoxyglukózy při PET/CT vyšetření. Autoři sdělení předpokládají jako příčinu hyperkalcemie zvýšenou tvorbu kalcitriolu granulomatózní tkání kolem depozit metakrylátu [23]. A podobné granulomatózní reakce s hyperkalcemií byla popsána kolem implantovaného silikonu, který se uvolní mimo implantát [24]. Na tuto možnost je vhodné upozornit osoby se silikonovými implantáty. Granulomatózní tkáň vzniká také kolem případné nekrózy tuku a i v tomto případě může způsobit hyperkalcemii [25, 26].

Hypertyreóza způsobuje taktéž zvýšenou resorpci vápníku, ale obvykle se projeví pouze zvýšenou kalcie bez signifikantní hyperkalcemie.

Imobilizace také způsobuje zvýšenou resorpci kalcia, ale obvykle jen do té míry, že se projeví samotnou hyperkalcie, ale již ne hyperkalcemií.

Z léků nutno zmínit thiazidová diuretika, která snižují kalcii, ale obvykle již nezpůsobují signifikantní hyperkalcemii.

Z dalších léků, zvyšujících kalcemii, je nutno zmínit lithium. To však již není tak často podáváno jako dříve. Také teriparid, léčebně používaný derivát parathormonu, může někdy zvýšit hladinu kalcia. Zvýšení hladiny kalcia může být způsobeno také intoxikací vitamínem D nebo vitamínem A.

Sami jsme pozorovali případ chybné diagnózy u pacienta s předávkováním vitamínem D v podobě veterinárního preparátu, který si pacient sám aplikoval intramuskulárně s cílem vybudovat svalovou hmotu. Pacient přišel pro nejasné zvracení, naneštěstí však hladina vápníku nebyla vyšetřena, pouze byla zjištěna vyšší hladina amylázy a v důsledku toho byla diagnostikována akutní pankreatitida. Po přechodném zlepšení stavu a propuštění do domácího léčení se potíže opakovaly, při návratu do nemocnice však znovu nebyl vápník vyšetřen a stav byl hodnocen jako recidiva akutní pankreatitidy. Teprve při třetí hospitalizaci byla již na interním pracovišti laboratorně zjištěna vysoká hyperkalcemie a neměřitelně vysoká hladina vitamínu D, která pak přetrvávala ještě několik týdnů.

U mladíků vášnivě oddaných *body building* aktivitám se lze setkat nejen vzestupem hodnot CK a myoglobinu, ale i další publikované zkušenosti popisují hyperkalcemie u těchto jedinců, zapálených pro budování svalů, osob, kteří polykají různé potravinové doplňky prodávané v posilovnách [27].

Je důležité si uvědomit, že i u pacientů s nádorem se může současně vyskytnout nenádorová příčina hy-

perkalciemie. Přehled možných příčin hyperkalciemie shrnuje tabulka 2.

Hereditární hyperkalciemie

Endokrinolog se ve své praxi setkává nejčastěji s hyperkalciemí na podkladě primární hyperparatyroidózy, která může být vzácně součástí familiárního syndromu buď jako izolovaná porucha, nebo asociovaná s jinými endokrinními i neendokrinními nádory, ale také hereditárními poruchami [28, 29]. Podle některých autorů na hereditární formu připadá každá desátá primární hyperparatyroidóza, nejčastěji jako iniciální projev mnohočetné endokrinní neoplazie 1. typu (MEN1) [30]. K abnormální sekreci parathormonu (PTH) a následně hyperkalciemii dochází na podkladě zárodečných mutací vedoucích k aktivaci protoonkogenů (např. tyrozinkinázy RET u MEN2A) nebo k inaktivaci nádorových supresorů (např. meninu u MEN1) [30].

Hereditární forma primární hyperparatyroidózy se v rodině dědí nejčastěji autosomálně dominantně a vedle MEN1 může být součástí dalších syndromů jako jsou MEN2A, MEN4, syndrom hyperparatyroidózy asociované s nádory čelisti, familiární hypokalciurická hyperkalciemie (FHH) nebo jako familiární izolovaná hyperparatyroidóza. Vedle běžného biochemického vyšetření a zobrazovacích metod používaných u sporadické formy primární hyperparatyroidózy jsou u některých syndromů k dispozici také mutační analýzy příslušných genů.

V klinické praxi na hereditární formu onemocnění pomýšlíme zejména, pokud je primární hyperparatyroidóza diagnostikována u pacientů mladších 40 let, pokud je adenomem nebo hyperplazií postiženo současně více příštítných tělísek nebo pokud má primární hyperparatyroidóza rekurentní průběh. Mezi další faktory, které by mohly svědčit pro genetické pozadí onemocnění, patří pozitivní rodinná anamnéza primární hyperparatyroidózy a/nebo jiných endokriniopatií, které by mohly být součástí familiárních syndromů. Nebo pokud jsou tyto endokriniopatie nalezeny u jednoho pacienta současně s primární hyperparatyroidózou [28, 29]. Pokud primární hyperparatyroidóza vzniká na podkladě karcinomu příštítných tělísek je doporučována analýza genu pro parafibromin [31]. Tento jinak vzácný karcinom se může až v 15 % vyskytovat u syndromu hyperparatyroidózy asociované s nádory čelisti. Každý ze zmíněných syndromů má svá specifika, nicméně od ostatních se svým průběhem odlišuje familiární hypokalciurická hyperkalciemie. U této poruchy je hyperkalciemie přítomna již od narození, je asymptomatická, proto bývá zjištěna často náhodně a na rozdíl

od jiných syndromů není vhodná paratyroidektomie. U homozygotní formy onemocnění (neonatalní závažná primární hyperparatyroidóza) je naopak totální paratyroidektomie nutná co nejdříve po narození. Přesný popis uvedených syndromů, jejich diagnostická kritéria a indikace ke genetickému vyšetření přesahují rámec tohoto odstavce [30, 31].

Vedle zmíněného genu pro menin u MEN1, RET u MEN2A a parafibrominu u syndromu hyperparatyroidózy asociované s nádory čelisti je možné geneticky vyšetřit ještě gen CDKN1B u syndromu MEN4 a gen pro calcium-sensing receptor (CASR) u familiární hypokalciurické hyperkalciemie [31]. Některá z těchto vyšetření jsou dostupná i v České republice, proto při podezření je vhodné se obrátit na Endokrinologický ústav v Praze. Genetické vyšetření neodhalí mutaci v příslušném genu u všech pacientů. U MEN1 se např. uvádí, že mutaci se podaří identifikovat asi v 75 %. Nález mutace umožní včas odhalit další rodinné příslušníky ještě před klinickými projevy onemocnění.

Pro doplnění přehledu se k hereditárním hyperkalciemím řadí i tzv. PTH-nondependentní hyperkalciemie s nízkou nebo normální hodnotou PTH. K takovému biochemickému obrazu dochází např. u autosomálně recesivní mutace v genu pro 24-hydroxylázu vitamínu D3 (CYP24A1). Klinický obraz těchto pacientů doplňuje častý nález nefrokalcinózy. Vzhledem k nízké aktivitě enzymů metabolizujících vitamín D3 může suplementace vitamínem D při neznalosti této poruchy zhoršit hyperkalciemii, hyperkalciurii, a tak vést k postižení ledvin [32].

DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA HYPERKALCEMIE

Zásadní pro nasměrování dalšího postupu je ověření hyperkalciemie vyšetřením ionizovaného kalcia, pokud jsou odchylky v koncentraci albuminu a celkové bílkoviny. Následuje vyšetření parathormonu a případně 1,25-hydroxyvitamínu D, je-li dostupné a také vyšetření odpadu kalcia za 24 hodin (kalciurie). Snížený odpad kalcia při hyperkalciemii by mohl svědčit pro familiární hyperkalciemii s hypokalciurií.

V případě zvýšeného parathormonu je etiologie jasná a endokrinologové dále upřesňují, zda jde o izolovanou hyperparatyroidózu, či o projev mnohočetné endokrinní neoplazie.

V případě hyperkalciemie a hyperkalciurie s nezvýšenou hodnotou parathormonu, či přesněji s adekvátně sníženou hodnotou parathormonu, je třeba pátrat po nádorech, případně po granulomatózních chorobách.

Vzhledem k tomu, že řada malignit metastazuje do kostí a může být provázena hyperkalciemí, je možné

v rámci pátrání po okultní malignitě doporučit i FDG-PET/CT vyšetření. Některé malignity s osteoplastickými kostními metastázemi (například karcinom prostaty) bývají provázeny variabilní a často i nízkou akumulací FDG a kostní postižení takového typu může být lépe zobrazitelné pomocí konvenční scintigrafie skeletu. Nádory s osteolytickým typem kostního postižení jsou naopak FDG-PET/CT vyšetřením zobrazitelné zpravidla dobře, a to v místech primárního nádoru i kostních metastáz. Míra akumulace fluorodeoxyglukózy s nádorovým ložiskem jak známo přímo souvisí s mírou aktivity metabolismu nádorové tkáně. U rychle progredujících nádorů, ale aktivních zánětů je proto aktivita vysoká, zatímco u pomalu rostoucích nádorů a jejich metastáz je aktivita metabolismu maligních buněk a tedy i akumulace FDG nižší. Výhodou FDG-PET/CT v diferenciální diagnostice hyperkalcemie s nezvýšenou hodnotou parathormonu je to, že pozitivní obraz mohou mít také ložiska zánětu (zejména granulomatózního), nevýhodou je však to, že nemusíme diferenciálně diagnosticky rozlišit ložiska granulomatózního zánětu od nádorových (obr. 5). FDG-PET/CT může mít místo u všech nejasných případů hyperkalcemie s nezvýšenou hodnotou PTH.

V případě hyperkalcemie u dětí je nutno pátrat i po hereditárních příčinách. Ale i u pacienta s nádorem je

třeba myslet na možnost nenádorové příčiny hyperkalcemie a pro jistotu vyšetřit i parathormon a při zvýšení parathormonu se často podaří zobrazit adenom pomocí MIBI vyšetření (viz obr. 2).

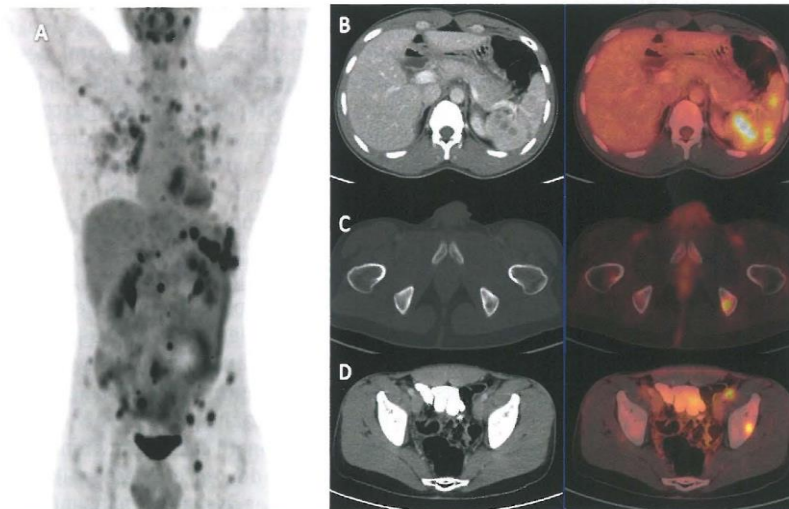
V případě hyperkalcemie u dětí či spíše obecně, když se nepodaří prokázat ani maligní onemocnění, ani granulomatózní onemocnění a ani primární hyperparatyreoidózu, je třeba pátrat také po hereditárních příčinách, což je doménou specializovaných endokrinologů, jak uvádí Žofková a další [29].

LÉČBA HYPERKALCEMIE

Intenzita léčby se odvíjí od výše kalcemie. Pacienti s kalcielem do 3 mmol/l jsou často bez přítomnosti klinicky závažných příznaků. Se vzestupem kalcemie nad 3,0 mmol/l se prohlubuje intenzita příznaků, deplece intravaskulární a extracelulární tekutiny, dramatický pokles glomerulární filtrace se vzestupem koncentrace kreatininu a urey, hypotenzí a celkovým oblužením, zpomalení fyziologické motility trávicího traktu, takže člověk není schopen uhradit deficit tekutin pitím, protože zvrací.

Na EKG křivce se zkracuje QT interval. V případě, že pacient užívá digitalis, zvyšuje se jeho toxicita.

Léčba se proto zahajuje podáváním iontových roztoků, které mají upravit hypovolemii [33].



Obr. 5. FDG-PET/CT vyšetření pacienta s histologicky prokázanou sarkoidózou
 A) FDG-PET/CT vyšetření detekující mnohočetná metabolicky aktivní ložiska v plicích, slezině, lymfatických uzlinách a kostech – MIP PET trup.
 B) Axiální řez CT a PET/CT nezvětšené sleziny prostoupené hypodenzními splyňujícími, metabolicky aktivními ložisky velikosti do 17 mm, SUVmax do 8,5.
 C) Axiální řez CT a PET/CT v místě metabolicky aktivního osteolytického ložiska v levé sedací kosti 11 mm v průměru, SUVmax 5,6.
 D) Axiální řez CT a PET/CT v místě ovoidní uzliny ventrálně od společného ilického cévního svazku vlevo velikosti 12 x 8 mm v příčném průměru, SUVmax 5,6.

Hydratace iontovými roztoky bez kalcia

Hyperkalcemie způsobuje poruchu koncentrace moče a tedy polyurii. Většina pacientů s klinicky významnou hyperkalcemií má proto snížený objem intravaskulární tekutiny. Léčbu je vždy nutno zahájit nitrožilním podáním iontových roztoků bez obsahu vápníku. Lze použít Plasmalyte nebo fyziologický roztok, ale nikoliv Ringerův roztok nebo roztok EL 1/1, v nichž je vápník obsažen. Zásadní je přívod sodíku ve velkém objemu, první den často 3–6 litrů s ohledem na klinický stav nemocné-

ho, optimálně za monitorování centrálního žilního tlaku.

A co furosemid?

Podání furosemidu je sice při zvládnutí hyperkalcemie také zmiňováno, ale furosemid neovlivní nijak zásadně hladinu kalcemie, a tak by jeho místo mělo být u těch pacientů, u nichž hydratace způsobila již nežádoucí převodnění, jak uvádí v podrobném přehledu Maier [34].

Furosemid tím, že poruší vstřebávání sodíku, může prohloubit zmenšení intravaskulárního objemu. Furosemid také zvyšuje vylučování kalia, může vést k hypokalemii a mít za následek metabolickou alkalózu [35]. Podávání furosemidu s cílem snížit kalcemii tedy nedoporučujeme, jeho místo vidíme v případě převodnění pacienta při rychlé hydrataci.

Kalcitonin

Kalcitonin byl standardním preparátem pro akutní snížení hyperkalcemie. Jeho účinek trval však jen několik hodin, a proto jej bylo nutno podávat opakovaně. V době, kdy byl standardně dostupný, jsme jej podávali podkožně po 6 hodinách až do poklesu kalcemie na normální hodnoty. Pokles kalcia po bisfosfonátech se objeví až po 48 hodinách od podání, a tak pro akutní snížení hyperkalcemie měl kalcitonin svůj nezastupitelný význam. Jeho aplikace umožňovala výrazně snížit kalcemii již v prvních 24 hodinách, tedy v době, kdy ještě nenastoupil efekt nitrožilně podaných bisfosfonátů [33]. Nyní však kalcitonin není dostupný.

Bisfosfonáty

Bisfosfonáty jsou standardním lékem již po několik desetiletí. Pro léčbu hyperkalcemie lze použít kterýkoliv z nitrožilně aplikovaných preparátů. Otázkou pouze je v jaké dávce.

Pokud se podaří aktivitu maligní nemoci zvládnout chemoterapií, tak je dostačující pouze jedna aplikace bisfosfonátů. Pokud ovšem je onemocnění na chemoterapii či jinou léčbu rezistentní a způsobuje hyperkalcemii, je nutno intervaly mezi nitrožilními aplikacemi bisfosfonátů stanovit podle vývoje kalcemie. V těchto případech je někdy nutné podávat bisfosfonáty nitrožilně i vícekrát do měsíce, tedy častěji, než jsou jejich standardní intervaly při dlouhodobé profylaktické léčbě pacientů s kostními metastázami či kostními infiltráty mnohočetného myelomu či lymfomu).

Klodronat

Pro léčbu hyperkalcemie lze použít klodronat v dávce 1500 mg v 4hodinové infuzi fyziologického roztoku či

roztoku 5% glukózy. Roztok je po naředění chemicky stabilní nejméně po 24 hodin. V případě renální insuficience je doporučena redukce. O redukcí uvažujeme při dlouhodobé chronické aplikaci, ne však při léčbě hyperkalcemie.

Námi často používanou alternativou je podání 900 mg i. v. ve 4-6hodinové infuzi 2 dny po sobě, nebo podání 1500 mg v kontinuální 24hodinové infuzi. Hyperkalcemie způsobuje velmi často reverzibilní renální selhání, dominantně z dehydratace. V těchto případech proto neprovádíme redukcí dávky klodronatu podle firemního doporučení, ale zásadně prodloužíme délku aplikace.

Toto naše praxi ověřené doporučení vychází ze známého velmi krátkého plazmatického poločasu, který souvisí mimo jiné s tím, že z krve, která proteče kostními kapilárami, je prakticky vychytán veškerý klodronat hydroapatitovými strukturami.

Při podání 1500 mg klodronatu formou 24hodinové infuze pacientovi s hyperkalcemií provázenou renálním selháním jsme nepozorovali nikdy nežádoucí účinky klodronatu a uvedenou neredukovanou dávkou jsme dosáhli rychlé normalizace hyperkalcemie. Díky 24hodinové kontinuální infuzi se plazmatické hladiny klodronatu nijak zásadně nezvyšují [33].

Pamidronat

Pamidronat se doporučuje podávat po naředění do fyziologického roztoku nebo 5% glukózy, roztok nesmí obsahovat kalcium. Infuzní rychlost podle posledního doporučení nemá překročit 60 mg/hodinu. Pro celkové množství 90 mg pamidronatu je dostačující zředění ve 250 ml infuzního roztoku a podání během dvou hodin. U pacientů s hyperkalcemií se doporučuje podávat 90 mg v 500 ml roztoku v průběhu nejméně 4 hodin. Při dlouhodobém podávání je vhodné sledovat vývoj hodnot urey a kreatininu. V případě renální insuficience jakéhokoliv stupně není doporučena redukce dávek.

Při nedostatečném poklesu do 3-7 dnů je možné opakovat podání pamidronatu a léčba se vždy opakuje při opětovném vzestupu koncentrace kalcia.

Původní firemní materiály doporučovaly obezřetnost při podávání pamidronatu pacientům s renální insuficiencí, blíže však toto doporučení nespecifikovaly. V současnosti je přijat názor, že pamidronat není nutno při renální insuficienci redukovat, je však nutno infuzi s pamidronatem nechat kapat déle než u pacientů s normální funkcí ledvin. Stejná dávka u pacienta s renální insuficiencí má větší hypokalcemizující efekt, jinak ale žádné negativní dopady. Obrovské plochy hydroxyapatitu lze přirovnat k rozsáhlým bažinám, kterým je celkem jedno, zda pohltí větší či menší množství pami-

dronatu. V informacích k preparátu pamidronatu proto není uvedena nutnost redukce dávky ani při závažném selhání ledvin. U pacientů se selháním funkce ledvin se doporučuje podstatně pomalejší infuzní podání, 20 mg/hodinu [33].

Ibandronat

Pro léčbu hyperkalcemie se doporučuje 6 mg ibandronatu v nitrožilní infuzi. U ibandronatu se v dokumentaci objevuje doporučení redukovat dávku při chronické renální insuficienci. Pokud je kreatininová clearance nad 30 ml/minutu (0,5 ml/sec), podává se plná dávka, při clearance pod 30 ml/min (0,5 ml/s) se doporučuje podávat 2 mg v intervalu 3–4 týdnů a infuze by měla trvat nejméně 1 hodinu.

Nicméně v literatuře lze najít více publikací malých sérií pacientů s hyperkalcemií, léčených neredukovanou dávkou ibandronatu i při renální insuficienci, u nichž nebylo popsáno žádné poškození ledvin. Autoři těchto sdělení na základě vlastních zkušeností doporučí neredukovat dávku ibandronatu u pacientů s akutní hyperkalcemií a zhoršenou funkcí ledvin [36, 37, 38]. Tyto práce tedy podstatně rozšiřují podání oproti informacím z SPC.

Zoledronat

V případě zoledronatu byla popsána renální toxicita podstatně častěji, než je tomu u ostatních bisfosfonátů, a proto zde je vhodné i při léčbě hyperkalcemie zoledronatem respektovat doporučení pro úpravu dávky v závislosti na funkci ledvin [34].

DALŠÍ LÉKY

Glukokortikoidy

Glukokortikoidy snižují vstřebávání vápníku tím, že snižují tvorbu 1,25-dihydroxyvitaminu D. Používají se proto pro léčbu hyperkalcemie provázející granulomatózní choroby a případně pro léčbu hyperkalcemie způsobené mnohočetným myelomem nebo lymfomy [34]. U sarkoidózy, jako zástupce granulomatózních procesů, se prednison podává v ranní dávce 20–40 mg.

Denosumab

Denosumab je protilátka vázající se na RANKL, centrální stimulátor osteoklasické aktivity. Denosumab má u metastatického postižení skeletu podobnou protektivní roli jako bisfosfonáty. Denosumab se proto podává jako dlouhodobá léčba, jejímž cílem je brzdit progresi postižení skeletu maligním procesem. Dále jej lze úspěšně použít pro léčbu hyperkalcemie u solidních tumorů. U mnohočetného myelomu zatím není

v této indikaci registrován, byť z mechanismu účinku je zřejmé, že bude také účinný. Výhodou denosumabu je, že jeho dávkování není závislé na funkci ledvin, protože denosumab je metabolizován intracelulárně. Vzhledem k tomu, že hyperkalcemie způsobuje poruchu funkce ledvin a vzestup kreatininu, je nezávislost dávkování denosumabu na hodnotě kreatininu jeho velkou předností. Denosumab se podává v dávce 120 mg podkožně [39, 40].

V březnu 2017 byla poprvé přednesena na 16. myelomovém workshopu a v březnu 2018 zveřejněna *in extenso* první velká klinická studie srovnávající denosumab a zoledronat u nově diagnostikovaných pacientů s mnohočetným myelomem [41]. Pacienti byli randomizováni do skupin dostávající podkožní injekce denosumabu 120 mg 1krát měsíčně anebo do skupiny dostávající 4 mg zoledronatu 1krát měsíčně. Celkem bylo randomizováno 1718 pacientů, takže v každé skupině bylo 859 osob. Renální toxicita byla hlášena u 85 (10 %) pacientů s denosumabem a u 146 (17 %) se zoledronatem. Hypokalcemie jako nežádoucí účinek byla hlášena u 144 (17 %) pacientů s denosumabem a u 106 (12 %) se zoledronatem. Incidence osteonekrózy čelisti byla 35 (4 %) u pacientů s denosumabem oproti 24 (3 %) se zoledronatem ($p = 0,147$). Při mediánu sledování 17,4 měsíce mělo 43,8 % dostávajících denosumab a 44,6 % pacientů dostávajících zoledronat první kostní komplikaci (*skeletal related event*). Medián intervalu do první kostní komplikace byl 22,83 měsíců při léčbě denosumabem a 23,98 měsíce při léčbě zoledronatem. Ze statistického hodnocení vyplývá, že denosumab neměl horší účinnost než zoledronat z hlediska délky intervalu do první kostní komplikace. Celkové přežití (OS) nebylo signifikantně odlišné v obou skupinách, ale medián PFS vycházel lepší při denosumabu. Takže co je lepší, denosumab či zoledronat? Pokud odhlédneme od rozdílnosti cen obou léků, tak denosumab má přednost oproti zoledronatu v podkožní aplikaci, zoledronat vyžaduje aplikaci infuzí. U denosumabu je výhoda nezávislost dávkování na funkci ledvin a absence nefrotoxicity. To, že v klinické studii byl hlášen vzestup kreatininu neboli nefrotoxicita ve skupině léčené denosumabem, neznámá, že zde byla příčinná souvislost, protože pacienti konzumují hodně léků a myelom samotný má potenciál zhoršovat funkci ledvin [41].

Jaké jsou zkušenosti s použitím denosumabu v případě nádorové hyperkalcemie? Publikací na téma hyperkalcemie s renálním selháním a její řešení denosumabem je zatím málo.

Při podávání poloviční dávky 60 mg denosumabu pacientům s hyperkalcemií, nereagující na léčbu bisfosfonáty a se střední či závažnou renální dysfunkcí,

docházelo k signifikantní a prolongované hypokalcemii. A tak jako alternativu autoři zvolili dávku 0,3 mg/kg jako přijatelnou alternativu pro pacienty s hyperkalcemií a renálním selháním, protože tato dávka minimalizovala riziko hyperkalcemie. Tato dávka je sice spojena s možným poddávkováním, a tak doporučují po týdnu zkontrolovat hladinu kalcia a případně podat další dávku denosumabu [42, 43].

A podobné zkušenosti – zvýšené riziko následující hypokalcemie popisují i další autoři s podáním denosumabu v případě renální insuficience a hyperkalcemie. Vysvětlení je pouze spekulativní. I když farmakokinetika denosumabu není funkcí ledvin zásadně ovlivněna, již jednou proběhlé poškození ledvin snížilo jejich kompenzační mechanismus a zvyšuje riziko iontových dysbalancí a tedy i hypokalcemie po denosumabu [44–48].

S aplikací denosumabu pacientům s renálním selháním a hyperkalcemií nemáme vlastní zkušenosti, takže pouze upozorňujeme na možnou symptomatiku hypokalcemií, popisovanou zahraničními autory, což je však problém lehce řešitelný infuzí s kalcielem. Citovaná literatura popisuje i efektivitu v případě selhání bisfosfonátů. Faktem je, že u velmi agresivního onemocnění mnohočetným myelomem jsme byli nuceni podávat bisfosfonáty v 14denním intervalu, abychom udrželi normokalcemii a někdy i častěji. Šlo o terminální stavy onemocnění se značnou agresivitou. V těchto případech bychom rádi vyzkoušeli denosumab.

Kalcimimetikum cinacalcet (MIMPARA)

Snižuje kalcemii v případě zvýšené hladiny parathormonu. Jeho předepisování spadá do kompetence endokrinologů [5]. Podání cinacalcetu sníží kalcemii, kalcii a má tak protektivní účinek na denzitu skeletu. Endokrinolog ale při jeho indikaci musí zvážit nejen efekt, ale i náklady a svůj rozpočet.

Specifika léčení hyperkalcemie u sarkoidózy

V případě sarkoidózy lze použít jak výše uvedené léky inhibující osteolýzu, tak při méně intenzivních příznacích použít léky, které potlačí chorobu a tím také tvorbu 1,25-dihydroxyvitaminu D. S tímto cílem se podávají jak glukokortikoidy, tak i další léky, hydroxychlorochin a i infliximab byl použit k normalizaci kalcemie u pacienta se sarkoidózou [49].

Hemodialýza

Hemodialýza je metoda vedoucí k velmi rychlé úpravě kalcemie, vhodná pro kritické stavy, kde nelze čekat na nástup účinku bisfosfonátů.

ZÁVĚRY PRO PRAXI

- Vyšetření kalcia by mělo být běžnou součástí laboratorních vyšetření v případně nejasných potížích, ale i v rámci preventivního vyšetření, protože může odhalit zatím asymptomatickou hyperkalcemii.
- V případě abnormalit v koncentraci celkové bílkoviny a albuminu je vhodné doplnit i vyšetření koncentrace ionizovaného kalcia.
- Vyšší hladina kalcia vyžaduje akutní diferenciativní diagnostiku, základem je vyšetření hladiny parathormonu.
- V případě vyšší hladiny parathormonu se zaměřit vyšetření na příštítná tělíska.
- V případě nezvýšeného parathormonu je nejpravděpodobnější příčinou maligní onemocnění anebo granulomatózní onemocnění, např. sarkoidóza.
- Pokud akutní rentgenový snímek plic a sonografie břišní neodhalí solidní tumor, vyšetření monoklonálního imunoglobulinu je negativní, vyšetření kostní dřeně neodhalí mnohočetný myelom či maligní infiltraci kostní dřeně, tak je vhodné provést FDG-PET/CT vyšetření, které může odhalit jak maligní, tak i zánětlivý granulomatózní proces.
- V případě potřeby lokalizace adenomu příštítného tělíska je v roce 2018 již dostupné i PET/CT nebo PET/MR vyšetření s radioizotopem fluorocholinem.
- Pokud se neprokáže jakékoliv vyvolávající onemocnění, může jít o hereditární odchylku, například o familiární hyperkalcemickou hypokalciurii a tyto pacienty je třeba odeslat na specializovaná endokrinologická pracoviště.

LITERATURA

1. Blimark CH, Turesson I, Genell A, et al. Swedish Myeloma Registry. Outcome and survival of myeloma patients diagnosed 2008–2015. Real world data on 4904 patients from the Swedish Myeloma Registry (SMR). *Haematologica* 2018;103(3):506–513.
2. Zagouri F, Kastritis E, Zomas A, et al. Greek Myeloma Study Group. Hypercalcemia remains an adverse prognostic factor for newly diagnosed multiple myeloma patients in the era of novel antimyeloma therapies. *Eur J Haematol* 2017;99(5):409–414.
3. Felsenfeld A, Rodriguez M, Levine B. New insights in regulation of calcium homeostasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2013;22(4):371–376.
4. Payne RB, Little AJ, Williams RB, et al. Interpretation of serum calcium in patients with abnormal serum proteins. *Brit Med J* 1973;4(5893):643–646.
5. Egbuna OI, Brown EM. Hypercalcaemic and hypocalcaemic conditions due to calcium-sensing receptor mutations. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008;22(1):129–148.

6. Broulík P. Diferenciální diagnóza hyperkalcémie. *Vnitř Lék* 2007;53(7-8):826-830.
7. Giusti F, Cavalli L, Cavalli T, et al. Hereditary hyperparathyroidism syndromes. *J Clin Densitom* 2013;16(1):69-74.
8. Hindí E, Zanotti-Fregonara P, Tabarin A. The role of radionuclide imaging in the surgical management of primary hyperparathyroidism. *J Nucl Med* 2015;56(5):737-744.
9. Kluijfhout WP, Vriens MR, Valk GD, et al. (18)F-Fluorocholine PET-CT enables minimal invasive parathyroidectomy in patients with negative sestamibi SPECT-CT and ultrasound: A case report. *Int J Surg Case Rep* 2015;13:73-75.
10. Adámek S, Libánský P, Lischke R, et al. Surgical therapy of primary hyperparathyroidism in the context of orthopaedic diagnosis and treatment: our experiences in 441 patients. *Acta Chir Orthop Traumatol Czech* 2011;78(4):355-360.
11. Yousaf F, Charytan C. Review of cinacalcet hydrochloride in the management of secondary hyperparathyroidism. *Ren Fail* 2014;36(1):131-138.
12. Turan S. Current nomenclature of pseudohypoparathyroidism: inactivating parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein signaling disorder. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2017;9(Suppl 2):58-68.
13. Jin J, Chung JO, Chung MY, et al. Causes and survival in 115 cancer patients with parathyroid hormone related protein-mediated hypercalcemia. *J Bone Metab* 2017;24(4):249-255.
14. Krug S, Michl P. Metabolic disorders as paraneoplastic syndromes. *Internist (Berl)* 2018;59(2):114-124.
15. Baltzer G, Behrend H, Behrend T. Incidence of cystic bone alterations (ostitis cystoides multiplex Jüngling) in sarcoidosis. *Dtsch Med Wochenschr* 1970;95(38):1926-1929.
16. Talmi D, Smith S, Mulligan ME. Central skeletal sarcoidosis mimicking metastatic disease. *Skel Radiol* 2008;37(8):757-761.
17. Sobic-Saranovic D, Grozdic I, Videnovic-Ivanov J, et al. The utility of ¹⁸F-FDG PET/CT for diagnosis and adjustment of therapy in patients with active chronic sarcoidosis. *J Nucl Med* 2012;53(10):1543-1549.
18. Cremers JP, Van Kroonenburgh MJ, Mostart RL, et al. Extent of disease activity assessed by ¹⁸-FDG-PET-CT in Dutch sarcoidosis population. *Sarcoidosis BASF Difuse Lung Dis* 2014;31(1):37-45.
19. Nageshwaran S, Majumdar K, Russell S. Hypergammaglobulinemia, normal serum albumin and hypercalcaemia: a case of systemic sarcoidosis with initial diagnostic confusion. *BMJ Case Rep* 2012; publikováno elektronicky 21. června, DOI: 10.1136/bcr.01.2012.5478.
20. Baughman RP, Teirstein AS, Judein MA, et al. Clinical characteristics of patient in a case control study of sarcoidosis. *Am J Resp Crit Care Med* 2001;164(10):1885-1889.
21. Baughman RP, Lower EE. Goldilocks, vitamin D and sarcoidosis. *Arthritis Res Ther* 2014;16(3):111.
22. van Reale DH, Goorden SM, Kemper EA, et al. Sarcoidosis related hypercalcaemia due to production of parathyroid hormone related peptide. *Brit Med J Case Rep* 2015; publikováno elektronicky 9. července, DOI: 10.1136/bcr-2015-210189.
23. Rados DV, Furlanetto TW. An unexpected cause of severe and refractory PTH-independent hypercalcemia: case report and literature review. *Arch Endocrinol Metab* 2015;59(3):277-280.
24. Amiraian DE, Accurso JM, Jain MK. Severe hypercalcemia related to silicone granulomas, as discovered by FDG-PET. *Indian J Nucl Med* 2017;32(4):343-344.
25. Samedi VM, Yusuf K, Yee W, et al. Neonatal hypercalcemia secondary to subcutaneous fat necrosis successfully treated with pamidronate: a case series and literature review. *AJP Rep* 2014;4(2):e93-96.
26. Zhang JT, Chan C, Kwun SY, et al. A case of severe 1,25-dihydroxyvitamin D-mediated hypercalcemia due to a granulomatous disorder. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(8):2579-2583.
27. Schäfer CN, Guldager H, Jørgensen HL. Multi-organ dysfunction in bodybuilding possibly caused by prolonged hypercalcemia due to multi-substance abuse: case report and review of literature. *Int J Sports Med* 2011;32(1):60-65.
28. Hrdličková E, Kutlík S. Idiopatická infantilní hyperkalcémie. *Čas Lék Čes* 1990;129(44):1397-1400.
29. Žofková I. Osteologie a kalcium – fosfátový metabolismus. Praha, Grada 2012, s. 214.
30. Thakker RV, Newey PJ, Walls GV, et al. Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2990-3011.
31. Hendy GN, Cole D. Genetic defects associated with familial and sporadic hyperparathyroidism. *Front Horm Res* 2013;41:149-165.
32. Molin A, Baudoin R, Kaufmann M, et al. CYP24A1 mutations in a cohort of hypercalcemic patients: evidence for a recessive trait. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E1343-1352.
33. Wagner J, Arora S. Oncologic metabolic emergencies. *Emerg Med Clin North Amer* 2014;32(3):509-525.
34. Maier JD, Levine SN. Hypercalcemia in the intensive care unit: a review of pathophysiology, diagnosis, and modern therapy. *J Intens Care Med* 2015;30(5):235-252.
35. Reiser IW, Ali S, Gottlieb V, et al. Hypercalcemia-induced hypokalemic metabolic alkalosis in a multiple myeloma patient: the risk of furosemide use. *Case Rep Oncol* 2015;8(3):389-393.
36. Henrich DM, Hoffmann M, Uppenkamp M, et al. Tolerability of dose escalation of ibandronate in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease: a case series. *Onkologie* 2009;32(8-9):482-486.
37. Bergner R, Henrich DM, Hoffmann M, et al. Renal safety and pharmacokinetics of ibandronate in multiple myeloma patients with or without impaired renal function. *J Clin Pharmacol* 2007;47(8):942-950.
38. Bergner R, Henrich DM, Hoffmann M, et al. Therapy of hypercalcemia with ibandronate in case of acute renal failure. *Internist (Berl)* 2006;47(3):293-296.
39. Freeman A, El-Amm J, Aragon-Ching JB. Use of denosumab for renal cell carcinoma-associated malignant hypercalcemia: a case report and review of the literature. *Clin Genitourin Cancer* 2013;11(4):e24-26.
40. Dietzek A, Connelly K, Cotugno M, et al. Denosumab in hypercalcemia of malignancy: a case series. *J Oncol Pharm Pract* 2015;21(2):143-147.

41. Raje N, Terpos E, Willenbacher W, et al. Denosumab versus zoledronic acid in bone disease treatment of newly diagnosed multiple myeloma: an international, double-blind, double-dummy, randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2018; publikováno elektronicky 8. února. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30072-X.
42. Ciccì JD, Buie L, Bates J, et al. Denosumab for the management of hypercalcemia of malignancy in patients with multiple myeloma and renal dysfunction. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014;14(6):e207-211.
43. Thosani S, Hu MI. Denosumab: a new agent in the management of hypercalcemia of malignancy. *Future Oncol* 2015;11(21):2865-2871.
44. Hu MI, Glezerman IG, Leboulleux S, et al. Denosumab for treatment of hypercalcemia of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(9):3144-3152.
45. Uehara A, Yazawa M, Kawata A, et al. Denosumab for treatment of immobilization-related hypercalcemia in a patient with end-stage renal disease. *CEN Case Rep* 2017;6(1):111-114.
46. Dahmani O, Sophoclis C, Kebir M, et al. Denosumab for the treatment of bisphosphonate resistant hypercalcemia in a hemodialysis patient. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2017;28(1):154-157.
47. Ashihara N, Nakejima K, Nakamura Y, et al. Denosumab is effective for controlling serum calcium levels in patients with humoral hypercalcemia of malignancy syndrome: a case report on parathyroid hormone-related protein-producing cholangiocarcinoma. *Intern Med* 2016;55(23):3453-3457.
48. Sparks JA, McSparron JL, Shah N, et al. Osseous sarcoidosis: clinical characteristics, treatment, and outcomes--experience from a large, academic hospital. *Semin Arthritis Rheum* 2014;44(3):371-379.
49. Huffstutter JG, Huffstutter JE. Hypercalcemia from sarcoidosis successfully treated with infliximab. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2012;29(1):51-52.

Podíl autorů na přípravě rukopisu

KS, KZ – sestavili a zodpovídají za pohled z úhlu endokrinologa.

ZŘ, RK, AŠP – odpovídají za pohled z úhlu zobrazovacích metod.

MT – odpovídá za text z pohledu lékaře specializovaného na metabolismus a výživu.

MD – odpovídá za text z pohledu lékaře specializovaného na plicní chorobu a sarkoidózu.

ZČ – zodpovídá za text z pohledu biochemika.

AČ – zodpovídá za text z pohledu urologa, který je zkušený v řešení nefro- a ureterolitiázy a diagnostiky jejich příčin.

ZA, LP, MK, VS, MŠ – zodpovídají za text z úhlu pohledu lékařů myelomové ambulance, kam jsou posíláni s otázkou: „Není hyperkalcemie projevem myelomu?“

LO – zodpovídá za text z úhlu pohledu lékařů solidní onkologie

Poděkování

Vytvoření textu bylo podpořeno grantem MUNI/A/0968/2017.

Čestné prohlášení autorů

Autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

Doručeno do redakce dne 15. 2. 2018.

Přijato po recenzi dne 23. 3. 2018.

doc. MUDr. Luděk Pour, Ph.D.

Interní hematologická a onkologická klinika
LF MU a FN Brno
Jihlavská 20
625 00 Brno-Bohunice
e-mail: adam.zdenek@fnbrno

3.2. Genetika a sarkoidóza

Sarkoidóza a její souvislosti s HLA jsou předmětem dlouhodobého zájmu klinických i výzkumných pracovníků. Aktuální trendy představují zejména projekty zaměřené na zpřesnění dosavadních poznatků o asociacích mezi HLA polymorfismy a sarkoidózou, respektive jejími klinickými fenotypy pomocí moderních metod a současně snaha o translaci (přenos) výsledků genetických analýz do praxe. V naší studii jsme analyzovali data od 212 pacientů z plicní kliniky diagnostikovaných dle kritérií American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders (ATS/ERS/WASOG, 1999). Rozložení rentgenologických stádií I/II/III/IV bylo následující: 73/96/38/5. U 43 z nich byl diagnostikován Löfgrenův syndrom (LS) a 59 nemocných mělo mimoplicní postižení. Bylo typizováno 7 HLA lokusů (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPA1). Získané frekvence HLA alel byly porovnávány s daty z databáze alelických frekvencí. V porovnání se zdravými jedinci, byl u pacientů se sarkoidózou vyšší výskyt alel HLA-B*08:01:01, HLA-DRB1*15:01:01, HLA-DRB1*03:01:01, HLA-DPB1*01:01:01 a HLA-DQA1*05:01:01. Výskyt Löfgrenova syndromu koreloval s výskytem alely HLA-DRB1*03:01:01. Výskyt alely HLA-DRB1*11:01 a HLA-DQA1*05:09 byl četnější u pacientů s pokročilým onemocněním (stadium III, IV dle zadopředního snímku hrudníku). HLA-DRB1*09:01, HLA-DQA1*01:04 a HLA-DQB1*05:03 byly častější u mimoplicní formy sarkoidózy, zatímco HLA-DRB1*01:01 a HLA-DPB1*01:01 byly více zastoupeny u pacientů bez mimopulmonálních projevů. Tato předběžná analýza první skupiny pacientů se sarkoidózou analyzovaných pomocí sekvenování nové generace potvrdila některé dříve zjištěné asociace alel i nové asociace polymorfismů HLA-DPB1 a HLA-DQA1 ke vzniku a vývoji onemocnění. Nadále budeme pokračovat v analýze a v plánu máme zvětšení souboru nemocných, abychom mohli přispět k rozšíření znalostí o asociacích sarkoidózy s HLA včetně klinických fenotypů a jejich případné aplikaci v klinické praxi. Viz kapitola 3.2.1.

3.2.1. Allele level of HLA variation in Czech patients with sarcoidosis (Petřek M, Sikorová K, Žižková V, Kocourková L, Doubková M. Eur J Immunol. 2019; 49(Suppl 4): 1-75)

Eur. J. Immunol. 2019. 49 (Suppl. 4): 1–75

Abstracts
DOI: 10.1002/eji.201970500

Allele level of HLA variation in Czech patients with sarcoidosis

Martin Petrek^{1,4}

Co-authors:

Katerina Sikorova¹, Veronika Zizkova¹, Lenka Kocourkova², Martina Doubkova³

¹Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Czech Republic

²University Hospital, Olomouc, Czech Republic

³Faculty of Medicine and University Hospital, Brno, Czech Republic.

⁴martin.petrek@fnol.cz

Sarcoidosis is a systemic disease in which immune and genetic factors have been implicated. HLA variation has been investigated in sarcoidosis since the 1990's, first defining antigens by serology and later describing allelic groups using DNA typing. The recent standard of HLA typing is represented by next generation sequencing (NGS) characterising the allele level. Our laboratory has adopted NGS HLA typing for analysing sarcoidosis relationship with HLA [1] and here we report the first data from this research supported from [2].

110 patients with sarcoidosis were diagnosed according to ATS guidelines at the Brno University Hospital. The distribution of chest-X-ray (CXR) stages (I/II/III/IV) was: 36/53/19/2; 23 patients presented with Löfgren syndrome (LS), 33 patients had extrapulmonary sarcoidosis. The HLA was genotyped on 7 loci (HLA-A,-B,-C,-DRB1,-DQA1,-DQB1,-DPA1) using Omixon Holotype. The obtained frequencies of HLA alleles were compared with the allele distribution in 168 healthy unrelated Czech subjects [3].

The alleles most overrepresented in sarcoidosis patients compared with our control population were HLA-DRB1*15:01:01, -DRB1*03:01:01, -DRB1*13:02:01:02, and of the HLA-B locus the alleles -B*08:01:01:01 and -B*18:01:01. By contrast, the alleles HLA-DRB1*07:01:01:01 and HLA-DRB1*01:01:01 occurred more frequently in healthy subjects and thus could be of a protective function. The presence of LS correlated with HLA-DRB1*03:01:01. The less favourable course of disease was linked to the allele HLA-DRB1*15:01:01.

This first data from NGS assessment of HLA variation in sarcoidosis confirm and extend some previous observations. Currently, we have been expanding our cohorts in order to analyze associations with distinct disease phenotypes including remitting/progressing disease and/or treatment response. We also aim at assessing HLA-C and HLA-DPB1 loci, which have not been analysed in sarcoidosis context in detail.

References:

- 1] Kishore A et al. Next-generation sequencing based HLA typing: deciphering immunogenetic aspects of sarcoidosis. *Front Genet.* 2018; 9:503
- 2] Grant support: NV18-05-00134, IGA PU: LF_2019_009, RVO: 61989592, 00098892
- 3] Petrek M et al. Determination of HLA haplotypes in Czech population using NGS typing – a family study. *HLA* 2019;93(5): 343-4

Your abstract for the 34th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference has been successfully submitted. The reference number is: EFI2020103

Your abstract details:

Submitting User Prof. Martin Petrek

Corresponding Authors Prof. Martin Petrek

Authors Martin Petrek¹, Katerina Sikorova¹, Veronika Zizkova¹, Jana Petrakova², Lenka Kocourkova², Martina Doubkova³

Affiliation ¹Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital, Olomouc, Czech Republic
²University Hospital Olomouc, Olomouc, Czech Republic
³University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

Title HLA in Czech patients with pulmonary and extrapulmonary sarcoidosis: investigation on the allele level

Text Sarcoidosis is immune-mediated systemic disease with unknown aetiology affecting predominantly the lung, however patients often present with coexisting extrapulmonary manifestation such as skin, bone, eye and cardiac sarcoidosis. To explore association between sarcoidosis and HLA polymorphisms at allele level we have used next-generation sequencing in Czech subjects: 212 patients diagnosed at Brno University Hospital according to guidelines were enrolled. The chest X-ray stages (I/II/III/IV) were 73/96/38/5; Löfgren syndrome (LS), a benign sarcoidosis phenotype, occurred in 43 cases; 28% cases (n=59) presented with extrapulmonary symptoms of sarcoidosis. Seven HLA loci (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPB1) were determined by Omixon Holotype™ kit and HLATwin software™. The obtained HLA allele frequencies were compared with HLA allele distribution in 168 unrelated Czech subjects [1]. HLA-B*08:01:01, HLA-DRB1*15:01:01, HLA-DRB1*03:01:01, HLA-DQA1*05:01 and HLA-DPB1*01:01:01 occurred with higher frequency in sarcoidosis compared with healthy subjects. Presence of LS associated with HLA-DRB1*03:01, by contrast HLA-DRB1*11:01 and HLA-DQA1*05:09 were more common in patients with progressing disease (stages III, IV). HLA-DRB1*09:01, HLA-DQA1*01:04 and HLA-DQB1*05:03 were more frequent in extrapulmonary sarcoidosis while HLA-DRB1*01:01 and HLA-DPB1*01:01 were overrepresented in patients without extrapulmonary manifestation. Our study performed within grant funding [2] confirms some previously described associations of HLA with sarcoidosis and extends their spectrum, also to HLA-DQA1 and HLA-DPB1 loci. Relationship between HLA alleles and disease stages / extrapulmonary manifestations, especially of the heart, should be explored in detail after expanding our cohorts.
[1] Petrek M, Osoegawa K et al. Determination of HLA haplotypes in Czech population using NGS typing-a family study. HLA 2019; 93:343 [2] MZ ÈR: NV18-05-00134, IGA UP: LF_2019_009/2020_004, RVO: 00098892.

Topic Reproduction, Autoimmunity, Infection and Cancer

Presentation Type Oral/Poster

3.3. Sarkoidóza srdce

Sarkoidóza je systémové granulomatózní onemocnění neznámé etiologie, které může postihnout kterýkoliv orgán včetně srdce. Klinická manifestace srdečního onemocnění je pozorována asi u 5 % pacientů, ale histologickým vyšetřením lze najít postižení u většího počtu nemocných (Matsui a kol., 1976). Důvodem nízkého záchytu může být klinicky bezpříznakový průběh, ale i skutečnost, že se na postižení srdce sarkoidózou nemyslí. Echokardiografie, Holterovo monitorování, magnetická rezonance, pozitronová emisní tomografie/výpočetní tomografie, thaliová scintigrafie a endomyokardiální biopsie jsou vyšetřovací metody indikované při podezření na postižení srdce sarkoidózou. Zejména magnetická rezonance a PET/CT si získává v poslední době na oblibě při diagnostice sarkoidózy srdce. V naší práci rozvádíme diagnostické kroky při stanovení sarkoidózy srdce a hledáme další možnosti zpřesnění její diagnostiky pomocí magnetické rezonance. Viz kapitola 3.3.1. a 3.3.2.

3.3.1. Jak diagnostikovat sarkoidózu srdce? (Doubková M, Panovský R. Vnitř Lék. 2018; 64(7-8): 729-733)

Jak diagnostikovat sarkoidózu srdce?

Martina Doubková¹, Roman Panovský^{2,3}

¹Klinika nemocí plicních a TBC LF MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

²I. interní kardiologická klinika LF MU a FN u sv. Anny v Brně

³Mezinárodní centrum klinického výzkumu FN u sv. Anny v Brně

Souhrn

Sarkoidóza je systémové granulomatózní onemocnění neznámé etiologie, které může postihnout kterýkoliv orgán včetně srdce. Klinická manifestace srdečního onemocnění je pozorována asi u 5 % pacientů, ale histologickým vyšetřením lze najít postižení u většího počtu nemocných. Důvodem nízkého zachytu může být klinicky bezpříznakový průběh, ale i fakt, že se na postižení srdce sarkoidózou nemyslí. Echokardiografie, Holterovo monitorování, magnetická rezonance, pozitronová emisní tomografie/výpočetní tomografie, thaliová scintigrafie a endomyokardiální biopsie jsou vyšetřovací metody indikované při podezření na postižení srdce sarkoidózou. Zejména magnetická rezonance si získává v poslední době na oblibě při diagnostice sarkoidózy srdce.

Klíčová slova: diagnostika – sarkoidóza srdce – terapie

How to diagnose cardiac sarcoidosis?

Summary

Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease of unknown etiology that can affect any organ including the heart. Clinical manifestations of heart disease are seen in about 5 % of patients, but histology shows a higher rate of heart involvement by sarcoidosis. Therefore, heart sarcoidosis is underdiagnosed because of clinically non-symptomatic course in some patients or physicians simply do not think about this heart involvement. Echocardiography, Holter monitoring, magnetic resonance imaging, positron emission tomography/computed tomography, thallium scintigraphy, and endomyocardial biopsy are methods of investigation when suspected of heart involvement by sarcoidosis. In particular, magnetic resonance has gained importance recently in the diagnosis of cardiac sarcoidosis.

Key words: cardiac sarcoidosis – diagnostics – therapy

Úvod

Sarkoidóza je systémové onemocnění charakterizované tvorbou granulomů v různých orgánových systémech, nejčastěji v plicích. Sarkoidóza může postihnout jakýkoliv orgán či orgánový systém včetně srdce. Naše práce se věnuje diagnostickým kritériím a vyšetřovacím metodám za účelem zvýšení povědomí a zachytu postižení srdce sarkoidózou.

Diagnostické postupy u sarkoidózy srdce

Sarkoidóza je systémové granulomatózní onemocnění neznámé etiologie s plicními a mimoplicními projevy. Sarkoidóza má obecně dobrou prognózu a nízkou letalitu [1,2].

Deskriptivní definice nemoci zní: sarkoidóza je systémové onemocnění neznámé příčiny. Obvykle postihuje dospělé pacienty mladého a středního věku a často se projevuje jako oboustranná hilová lymfadenopatie, plicní infiltrace, či oční a kožní léze. Mohou být také postižena játra, slezina, další lymfatické uzliny, slinné žlázy,

srdce, nervový systém, svaly, kosti a jiné orgány. Diagnózu sarkoidózy je možno stanovit, pokud klinické a radiologické nálezy podpoří průkaz nekaseifikujícího granulomu. Granulomy jiných známých příčin a lokální sarkoidní reakce musí být vyloučeny [1].

Diagnóza sarkoidózy může být pravděpodobná při nepřítomnosti histologického ověření, pokud klinické, radiologické a laboratorní nálezy a nálezy při vyšetření bronchoalveolární tekutiny korelují s diagnózou sarkoidózy [1].

Morfologická definice nemoci zní: nemoc je charakterizována granulomy z epitelioidních buněk v různých orgánech a tkáních složených z transformovaných makrofágů (epitelioidní a obrovskobuněčné buňky) a T-lymfocytů. V granulomech nedochází ke kaseifikaci, ačkoliv fibrinoidní nekróza může být v jejich centru přítomna. Granulomy vedou k úplné rezoluci nebo k hyalinní fibróze [1].

První popis sarkoidózy srdce je datován do roku 1929 [3]. Incidence sarkoidózy srdce není známa a je různá v závislosti na studiích. Okolo 5 % pacientů s chronickou sarkoidózou má klinické manifestní postižení

srdce. Autoptickým vyšetřením se obvykle prokazuje větší míra postižení [4]. Ve studii ACCESS (A Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis) z roku 2001 byla incidence postižení srdce u 2,3 % pacientů [5]. Srdeční postižení se většinou vyskytuje mezi 40.-50. rokem věku [6]. V posledních letech dochází k nárůstu prevalence tohoto onemocnění, což je způsobeno přesnějšími diagnostickými metodami včetně zobrazení magnetickou rezonancí (magnetic resonance imaging – MRI) srdce [7,8]. Nejčastější příčinou úmrtí je náhlá smrt a srdeční selhání.

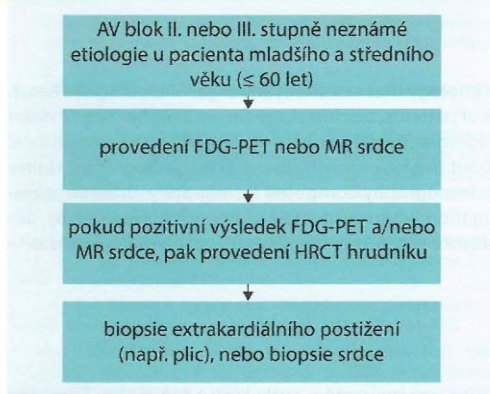
Onemocnění srdce se může vyvinout jak v době diagnózy, tak i v průběhu nemoci. Etiologie sarkoidózy srdce tak jako sarkoidózy obecně není známa. Je zvažováno více faktorů, genetická predispozice je jednou z nich. V japonské studii byla popsána asociace mezi HLA DQB*0601 a genovými polymorfizmy TNF α (tumor necrosis factor α) u pacientů se sarkoidózou srdce [9,10]. Ungprasert et al pozorovali vyšší incidence kardiovasculárních onemocnění včetně ischemické choroby

srdce u pacientů se sarkoidózou [11]. Za možný spouštěcí faktor je zvažován chronický zánět, protože některé zánětlivé cytokiny, jako je interleukin 1 a TNF α , mohou přispívat k předčasné aterosogenezi [11]. Chronický zánět vyvolává iniciaci a šíření koagulační kaskády, potlačuje antikoagulační kaskádu a inhibuje odstranění fibrinu [11–15].

Sarkoidóza se může manifestovat v širokém spektru arytmií od benigních až po fatální [16]. Nejčastějšími arytmiemi jsou atrioventrikulární blok a komorová tachykardie/fibrilace [17]. Dle některých prací až 34 % (11 z 32) nemocných ve věku 18–60 let a AV blokem II. a III. stupně mělo dosud nediodagnostikovanou sarkoidózu srdce [18]. Ve studii se 182 pacienty, kteří podstoupili screening na monomorfní komorovou tachykardii (monomorphic ventricular tachycardia – MMVT) a neměli diagnózu sarkoidózy v anamnéze, byl záchyt 4 se sarkoidózou srdce ze všech 14 nemocných s MMVT [19]. Algoritmus, jak postupovat při zjištění arytmiie k vyloučení nebo potvrzení sarkoidózy, ukazuje schéma.

Kromě arytmií mohou být další manifestací onemocnění myokardu (myokarditidy), perikardu (výpotky, perikarditidy), cév (mikroangiopatie), chlopní (nejčastější je mitrální) a aneuryzmata. Definice myokardiálního postižení u sarkoidózy je různá v závislosti na studii. Někteří autoři vyžadují přítomnost granulomů z biopsie, jiní akceptují „pouze“ nález fibrózy a ztlustění stěn s vyloučením jiných příčin [6]. ATS/WASOG z roku 1999 doporučuje pro diagnózu postižení sarkoidózy následující kritéria: kardiální dysfunkce, patologický elektrokardiogram (EKG), thaliová scintigrafie (defekt vychytávání thalia) s nebo bez endomyokardiální biopsie (EMB) u pacienta se sarkoidózou [1,6]. Ve studii ACCESS byla kritéria srdečního onemocnění sarkoidózou následující: kardiomyopatie reagující na terapii kortikoidy, intraventrikulární porucha vedení nebo nodální blok a pozitivní galiový sken [5]. Pro diagnózu pravděpodobného postižení používali thaliový sken. Defekt vychytávání thalia ale může být přítomen i u ischemické choroby srdce, proto muselo být vylou-

Schéma. Diagnostický screening sarkoidózy srdce při AV blok II. a III. stupně. Upraveno dle [18,19]



Tab. 1. Kritéria pro diagnostiku sarkoidózy srdce dle konsensu Světové organizace srdečního rytmu (Heart Rhythm Society). Upraveno dle [7,8]

histologická diagnóza postižení myokardu sarkoidózou	Sarkoidóza srdce je stanovena při potvrzení nekaseifujícího granulomu z histopatologického vyšetření myokardu při vyloučení jiné příčiny.
pokud není přítomna histopatologická diagnóza z tkáně myokardu – sarkoidóza srdce je pravděpodobná, jestliže splňuje a) i b) i c)	a) potvrzení extrakardiální sarkoidózy histologicky
	b) je splněna alespoň jedna z následujících podmínek:
	kardiomyopatie nebo blokáda převodu odpovídající na léčbu imunosupresivou (kortikoidy)
	nevysvětlitelná redukce funkce levé komory LK (ejekční frakce EF < 40 %)
	nevysvětlitelná setrvalá ventrikulární tachykardie
	atrioventrikulární (AV) blok II. stupně Mobitz II. nebo AV blok III. stupně
	pozdní vychytávání radiofarmaka na PET srdce
pozdní syčení gadolinia na MRI srdce	
pozitivní galiový sken	
	c) Jiné příčiny nežli sarkoidóza byly vyloučeny

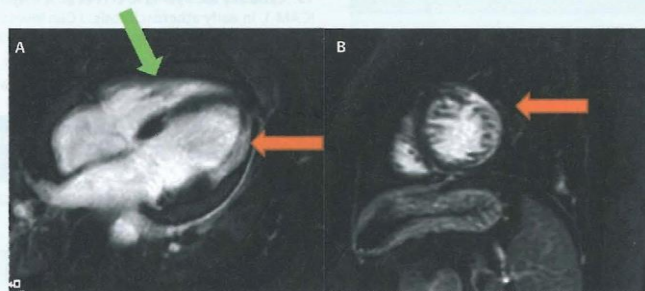
čeno postižení koronárních tepen [5]. Doporučení Světové organizace srdečního rytmu (Heart Rhythm Society) z roku 2014 shrnuje tab. 1 a poprvé se v ní objevuje MRI jako průkaz fibrózy nebo granulomu [7,8].

Diagnóza sarkoidózy srdce většinou sestává z korelace několika vyšetření [20]. Neexistuje žádný serologický marker, který by potvrdil sarkoidózu srdce. V případě bolesti na hrudníku odebíráme troponin T a NT-proBNP (N-terminální fragment natriuretického peptidu B). Z diagnostických metod začínáme anamnézou, zadopředním snímkem hrudníku, na němž můžeme prokázat dilataci srdečního stínu. Elektrokardiografie (nejlépe 24hodinové Holterovo monitorování) ukáže nálezy arytmií typu komorových extrasystol, sinoatriálních i atrioventrikulárních (AV) bloků, bloků Tawarových ramének (častěji pravého), bifascikulárních bloků, fibrilace komor nebo supraventrikulárních tachykardií [7]. Echokardiografie může i u asymptomatických pacientů prokázat dilataci komor, systolickou a diastolickou dysfunkci, nízkou ejekční frakci (EF) levé komory (LK), mitrální regurgitaci, ztlustění mezikomorového septa, hypertrofickou kardiomyopatii nebo perikardiální výpotky. Mehta et al ve své studii jako screeningové vyšetření použili kardiologickou anamnézu, EKG, holterovské EKG monitorování a echokardiografii. Pacienti s patologickými nálezy podstupovali MRI nebo pozitronovou emisní tomografii (PET) [21]. Na stránkách pneumologické společnosti www.pneumologie.cz je jako screening sarkoidózy srdce doporučováno provedení holterovského EKG monitorování, neboť prosté EKG bývá často normální, stejně jako echokardiografické vyšetření [22]. Radionuklidové metody zahrnují zejména thaliovou scintigrafii (radionuklid thalium, ²⁰¹Tl). Fibrogranulomatózní postižení je detekováno jako snížené vychytávání TI [6]. Nevýhodou je vizualizace patologií pravé komory. FDG-PET/CT (PET/CT s využitím fluorodeoxyglukózy) může vyhodnotit různé metabolické a anatomické postižení včetně sarkoidózy [9,23]. PET má pro detekci lézí myokardu při sarkoidóze srdce vysokou senzitivitu srovnatelnou nebo vyšší než MRI. Ukázalo se však, že MRI srdce má větší spe-

cifitu a negativní prediktivní hodnotu nežli PET [24,25]. Ke zvýšení specifity je před FDG-PET nutná příprava s protražovaným lačněním s dietou bez karbohydrátů a bohatou na tuky [17]. MRI je excelentní minimálně invazivní metoda, která nepoužívá radioaktivní záření, vhodná pro detekci třídimenzionálních morfologických a funkčních abnormalit myokardu s odlišením aktivního granulomatózního zánětu od fibrózy [23]. Významnou částí vyšetření je zhodnocení pozdního syčení gadoliníem (late gadolinium enhancement – LGE), které zobrazuje myokardiální nekrózu, fibrózu nebo granulomatózní tkáň. Nejvíce postižené jsou bazální části mezikomorového septa a laterální stěna levé komory, obr. [26]. MRI je poměrně nová metoda, která dokáže zobrazit strukturu myokardu a prokázat i malé postižení srdečního svalu. Potvrzení či vyloučení postižení srdce je pro další terapii a odhad vývoje onemocnění zásadní. Dle nálezu z MRI je možné lépe posoudit stadium nemoci a případně upravit léčbu pacienta. Je to rovněž metoda vhodná pro určení místa biopsie. Jedinou absolutní kontraindikací MRI je přítomnost feromagnetického materiálu v těle, relativní kontraindikací potom klaustrofobie (strach z vyšetření v tzv. „tunelu“). Rychlý rozvoj nových MRI metod je velkou nadějí k posunutí celé diagnostiky srdeční sarkoidózy do ještě časnějších stadií. Jsou zkoumány např. techniky tzv. parametrického mappingu, které dokáží rozlišit difuzní procesy v srdečním svalu nebo přesnější hodnocení celkové a regionální srdeční funkce pomocí hodnocení myokardiálního strainu (deformace myokardu).

Jen u malého počtu nemocných se provádí endomyokardiální biopsie (EMB). Její nevýhodou je nedostupnost odběru vzorků z některých často postižených míst sarkoidózou, např. mezikomorového septa [6]. Nekaseifikující granulomy jsou zastíženy jen asi u 25 % pacientů se sarkoidózou srdce [27]. Při histopatologickém nálezu z autopsií nebo EMB jsou prokazovány granulomy, zánětlivá celulizace, fibróza, hypertrofie nebo ztlustění stěn [6]. Tyto změny se nacházejí zejména hlouběji v myokardu nebo perikardu nežli v endokardu, převážně v horních nebo bazálních částech interventri-

Obr. Magnetická rezonance srdce nemocného se srdeční sarkoidózou. (A) 4dutinová projekce (B) projekce na krátkou osu levé komory. Je patrné rozsáhlé transmuranální pozdní syčení gadolinia (LGE) na boční stěně levé komory (oranžová šipka) a drobné intramurální syčení na mezikomorovém septu (zelená šipka).



kulárních sept. Léze sarkoidózy mohou být chybně diagnostikovány jako ischemické změny.

Léčba

Léčba sarkoidózy srdce je empirická, sestává z kortikoidů či jiných imunosupresiv. Standardním doporučením pro léčbu sarkoidózy srdce jsou systémové kortikoidy, které byly v minulosti podávány ve větších počátečních dávkách 60–80 mg oproti plicním indikacím v dávkách 30–40 mg/den [6]. Větší účinnost prednisonu v dávce ≥ 40 mg/den oproti dávce ≤ 30 mg/den nebyla prokázána [28]. Dle navrhovaného algoritmu léčby klinicky manifestní sarkoidózy srdce začínáme dávkami 0,5 mg/kg hmotnosti a den s maximem 40 mg denně [8]. Optimální doba léčby je 9–12 měsíců při nejvyšší možné účinné dávce 5–15 mg prednisonu na den. Glukokortikoidy měly efekt na obnovení sinusového rytmu u AV-blokád [29]. Klinické situace, v nichž je zvažována léčba imunosupresivy u pacientů se sarkoidózou srdce, ukazuje tab. 2 [7,8]. Dilatační kardiomyopatie vyžaduje vedle kortikoidů i léčbu kardiálního selhávání. Antiarytmická terapie je obvykle jako u jiných srdečních arytmií, u AV-blokád pak implantace kardiostimulátoru. Transplantace srdce není u sarkoidózy kontraindikována. Algoritmus léčby sarkoidózy obecně včetně postižení srdce dle Baughmana ukazuje tab. 3 [30].

Sarkoidóza je onemocnění s všeobecně dobrou prognózou a až u 60 % pacientů pozorujeme spontánní vyléčení [31]. Mortalita sarkoidózy obecně je nízká a pohybuje se mezi 3–5 % [32]. Nicméně v případě sarkoidózy srdce je prognóza nepříznivá. Sarkoidóza srdce má podíl až 85 % na úmrtnosti ze sarkoidózy [17,33]. U nemocných s postižením srdce na základě MRI, ale bez klinické manifestace, není prognóza známa [7,8].

Závěr

Na otázku, zda je sarkoidóza srdce častá, zatím nedovedeme přesně odpovědět. Každopádně zadopřední

Tab. 2. Klinické situace, v nichž je zvažována léčba imunosupresivy u pacientů se sarkoidózou srdce. Upraveno podle [7,8]

AV blokáda Mobitzova typu II nebo III a nálezy zánětu myokardu
četná komorová extrasystolie nebo nesetřvalá komorová arytmie a nálezy zánětu myokardu
setřvalé komorové arytmie a nálezy zánětu myokardu
dysfunkce LK a nálezy zánětu myokardu

Tab. 3. Algoritmus léčby symptomatické sarkoidózy včetně sarkoidózy srdce. Tříkrokový postup dle Baughmana. Upraveno podle [30]

krok 1	Lékem první volby jsou kortikosteroidy. Pokud se dostaví efekt léčby, snižujeme dávku na nejvyšší možnou účinnou a tolerovanou. Pokud dochází k progresi, přistoupíme ke kroku 2.
krok 2	Progrese onemocnění: přidat ke kortikoidům na 6 měsíců terapii metotrexátem ev. s azatioprinem, leflunomidem nebo mykofenolátem. Pokud nastane progresse onemocnění nebo se objeví nežádoucí účinky léčby, pak přistoupíme ke kroku 3.
krok 3	Progrese onemocnění: přidat ke kortikoidům infliximab nebo adalimumab.

Vnitř Lék 2018; 64(7–8): 729–733

snímek hrudníku, EKG, holterovské EKG monitorování a echokardiografie jsou základní vyšetření, která by měl každý pacient se sarkoidózou absolvovat. Při podezření na sarkoidózu srdce pak doporučujeme provedení MRI nebo PET/CT.

Podpořeno projektem č. LQ1605 z Národního programu udržitelnosti II (MŠMT).

Literatura

- Hunninghake GW, Costabel U, Ando M et al. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 1999; 16(2):149–173.
- Bradley B, Branley HM, Egan JJ et al. Interstitial lung disease guideline: the British Thoracic Society in collaboration with the Thoracic Society of Australia and New Zealand and the Irish Thoracic Society. Thorax 2008; 63(Suppl 5): v1–v8. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/thx.2008.101691>. Erratum in Thorax 2008; 63(11): 1029.
- Bernstein M, Konzelmann F, Sidlick D. Boeck's sarcoid: report of a case with visceral involvement. Arch Intern Med 1929; 44: 721–734.
- Matsui Y, Iwai I, Tachibana T et al. Clinico-pathological study on fatal myocardial sarcoidosis. Ann NY Acad Sci 1976; 278: 455–469.
- Judson MA, Baughmann RP, Teirstein SS et al. Defining organ involvement in sarcoidosis: the ACCESS proposed instrument. ACCESS Research Group. A Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 1999; 16(1): 75–86.
- Padilla ML. Cardiac sarcoidosis. In: Baughman RP (ed). Sarcoidosis. Inform a Healthcare USA: New York 2010: 515–551.
- Birnie DH, Sauer WH, Bogun F et al. HRS expert consensus statement on the diagnosis and management of arrhythmias associated with cardiac sarcoidosis. Heart Rhythm 2014; 11(7): 1305–1323. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hrthm.2014.03.043>.
- Birnie DH, Nery PB, Ha AC et al. Cardiac Sarcoidosis. J Am Coll Cardiol 2016; 68(4): 411–421. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2016.03.605>.
- Naruse TK, Matsuzawa Y, Ota M et al. HLA-DQB1*0601 is primarily associated with the susceptibility to cardiac sarcoidosis. Tissue Antigens 2000; 56(1): 52–57.
- Takashige N, Naruse TK, Matsumori A et al. Genetic polymorphisms at the tumour necrosis factor loci (TNFA and TNFB) in cardiac sarcoidosis. Tissue Antigens 1999; 54(2): 191–193.
- Ungprasert P, Crowson CS, Matteson EL. Risk of cardiovascular disease among patients with sarcoidosis: a population-based retrospective cohort study, 1976–2013. Eur Respir J 2017; 49(2). pii: 1601290. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.01290-2016>.
- Montecucco F, Mach F. Common inflammatory mediators orchestrate pathophysiological processes in rheumatoid arthritis and atherosclerosis. Rheumatology (Oxford) 2009; 48(1): 11–22. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/ken395>.
- Cybulska MI, Iiyama K, Li H et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. J Clin Invest 2001; 107(10): 1255–1262. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI11871>.
- Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS et al. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expres-

- ssion of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 1999; 274(17): 11924–11929.
15. Xu J, Lupu F, Esmon CT. Inflammation, innate immunity and blood coagulation. *Hemostaseologie* 2010; 30(1): 5–6, 8–9.
 16. Suzuki T, Kanda T, Kubota S et al. Holter monitoring as a noninvasive indicator of cardiac involvement in sarcoidosis. *Chest* 1994; 106(4): 1021–1024.
 17. Kusano KF, Satomi K. Diagnosis and treatment of cardiac sarcoidosis. *Heart* 2016; 102(3): 184–190. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1136/heartjnl-2015-307877>>.
 18. Nery PB, Beanlands RS, Nair GM et al. Atrioventricular block as the initial manifestation of cardiac sarcoidosis in middle-aged adults. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2014; 25(8): 875–881. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/jce.12401>>.
 19. Nery PB, Ardle BA, Redpath CJ et al. Prevalence of cardiac sarcoidosis in patients presenting with monomorphic ventricular tachycardia. *Pacing Clin Electrophysiol* 2014; 37(3): 364–374. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/pace.12277>>.
 20. Žurková M, Lošťáková V, Kolek V et al. Postižení srdce jako primární projev sarkoidózy. *Stud Pneumol Phthiseol* 2017; 77(6): 227–233.
 21. Mehta D, Lubith SA, Frankel Z et al. Cardiac involvement in patients with sarcoidosis: diagnostic and prognostic value of outpatient testing. *Chest* 2008; 133(6): 1426–1435. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1378/chest.07-2784>>.
 22. Lošťáková V, Kolek V, Vašáková M et al. Sarkoidóza (Doporučený postup diagnostiky, terapie a sledování vývoje onemocnění. Dostupné z WWW: <<http://www.pneumologie.cz/guidelines/>>.
 23. Bakker AL, Grutters JC, Keijsers RG et al. Cardiac sarcoidosis: challenges in clinical practice. *Curr Opin Pulm Med* 2017; 23(5): 468–475. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1097/MCP.0000000000000410>>.
 24. Ohira H, Tsujino I, Ishimaru S et al. Myocardial imaging with 18F-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography and magnetic resonance imaging in sarcoidosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35: 933–941.
 - Burke AP, White CS et al. Cardiac sarcoidosis: the challenge c-pathologic correlation: from the radiologic pathology arthrographs 2015; 35(3): 657–679. Dostupné z DOI: <<http://0.1148/rg.2015140247>>.
 26. Smedema JP, Snoep G, van Kroonenburgh MP et al. Evaluation of the accuracy of gadolinium – enhanced cardiovascular magnetic resonance in the diagnosis of cardiac sarcoidosis. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45(10): 1683–1690. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2005.01.047>>.
 27. Bennett MK, Gilotra NA, Harrington C et al. Evaluation of the role of endomyocardial biopsy in 851 patients with unexplained heart failure from 2000–2009. *Circ Heart Fail* 2013; 6(4): 676–684. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.000087>>.
 28. Yasaki Y, Isobe M, Hiroe M et al. For the Central Japan Heart Study Group. Prognostic determinants of long-term survival in Japanese patients with cardiac sarcoidosis treated with prednisone. *Am J Cardiol* 2001; 88(9): 1006–1010.
 29. Sadek MM, Yung D, Birnie DH et al. Corticosteroid therapy for cardiac sarcoidosis: a systematic review. *Am J Cardiol* 2013; 29(9): 1034–1041. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cjca.2013.02.004>>.
 30. Baughman RP, Grutters JC. New treatment strategies for pulmonary sarcoidosis: antimetabolites, biological drugs, and other treatment approaches. *Lancet Respir Med* 2015; 3(10): 813–822. Dostupné z DOI: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00199-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00199-X)>.
 31. Baughman RP, Sharma OP, Lynch JP. Sarcoidosis: is therapy effective? *Semin Respir Infect* 1998; 13(3): 255–273.
 32. Siltzbach LE, James DG, Neville E et al. Course and prognosis of sarcoidosis around the world. *Am J Med* 1974; 57(6): 847–852.
 33. Selkiguchi M, Hiroe M, Také M et al. Clinical and histopathological profile of sarcoidosis of the heart and acute idiopathic myocarditis. Concepts through a study employing endomyocardial biopsy. II. Myocarditis. *Jpn Circ J* 1980; 44(4): 264–273.

MUDr. Martina Doubková, Ph.D.

✉ doubkova.martina@fnbrno.cz

Klinika nemocí plicních a TBC LF MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

www.fnbrno.cz

Doručeno do redakce 5. 1. 2018

Přijato po recenzi 23. 2. 2018

3.3.2. Myokardiální T1 mapování pomocí SMART1Map a MOLLI mapování u asymptomatických pacientů s recentní diagnózou mimokardiální sarkoidózy

Sarkoidóza je systémové granulomatózní onemocnění postihující zejména respirační trakt. Projekt, na kterém pracujeme, se zaměřuje na vyšetření magnetické rezonance srdce (MR), včetně měření T1 relaxačního času, které by potenciálně mohlo detekovat časná stádia srdeční sarkoidózy. Zaměřujeme se na vyhodnocení T1 mappingu v odhalování časného srdečního postižení u asymptomatických pacientů se sarkoidózou.

Do naší studie bylo zahrnuto 113 pacientů s extrakardiální sarkoidózou, bez jakéhokoliv předchozího srdečního onemocnění. Sto třináct z nich podstoupilo MR vyšetření. Dynamické sekvence pro hodnocení funkčních parametrů levé komory (LK), nativní a postkontrastní T1 mapping s využitím saturačních sekvencí SMART₁Map a sekvencí Modified Look-Locker Inversion recovery (MOLLI) byly pořízeny kvůli posouzení nativního T1 relaxačního času a extracelulárních objemů (ECV). Naměřené parametry byly srovnány mezi pacienty se sarkoidózou a 22 zdravými kontrolami.

Výsledkem bylo zjištění, že nemocní se sarkoidózou měli normální celkovou a segmentární funkci systolické LK – ejekční frakce (EF) LK byla $65 \pm 5 \%$ vs $66 \pm 7 \%$ ($p=NS$). Průměrné nativní T1 relaxační časy nebyly prodlouženy - 1464 ± 93 msec vs 1482 ± 88 msec ($p=NS$) – měřeno pomocí SMART₁Map a 1317 ± 60 msec vs 1313 ± 83 msec ($p=NS$) - měřeno za použití MOLLI sekvence. Stejně tak průměrné hodnoty ECV nebyly zvýšeny - $16.3 \pm 3.4 \%$ vs $17.9 \pm 3.7 \%$ ($p=NS$) - měřeno pomocí SMART₁Map a 30.9 ± 2.9 msec vs $30.7 \pm 5.0 \%$ ($p=NS$) – měřeno za použití MOLLI sekvence.

Závěrem bylo možné říci, že u nemocných s časně diagnostikovanou extrakardiální sarkoidózou nebylo v naší studii zjištěno postižení myokardu s využitím T1 relaxačních časů a ECV.

Myocardial T_1 mapping using SMART₁Map and MOLLI mapping in asymptomatic patients with recent extracardiac sarcoidosis (Panovský R, Doubková M, Holeček T, Máchal J, Feitová V, Masárová L, Opatřil L, Mojica-Pisciotti ML, Kincl V. *NMR in Biomedicine*. 2020; e4388)

Received: 7 May 2020 | Revised: 15 July 2020 | Accepted: 17 July 2020
DOI: 10.1002/nbm.4388



RESEARCH ARTICLE

NMR
IN BIOMEDICINE WILEY

Myocardial T_1 mapping using SMART₁Map and MOLLI mapping in asymptomatic patients with recent extracardiac sarcoidosis

Roman Panovský^{1,2} | Martina Doubková³ | Tomáš Holeček^{1,4} | Jan Máchal^{1,5} |
Věra Feitová^{1,4} | Lucia Masárová^{1,2} | Lukáš Opatřil^{1,2} |
Mary Luz Mojica-Pisciotti¹ | Vladimír Kincl^{1,2}

¹International Clinical Research Center, St. Anne's Faculty Hospital, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

²1st Department of Internal Medicine/Cardioangiology, St. Anne's Faculty Hospital, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³Department of Pulmonary Diseases and Tuberculosis, Masaryk University Faculty of Medicine and University Hospital, Brno, Czech Republic

⁴Department of Medical Imaging, St. Anne's Faculty Hospital, Brno, Czech Republic

⁵Department of Pathophysiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Correspondence

Assoc. Prof. MUDr Roman Panovský, PhD, 1st Department of Internal Medicine/Cardioangiology, International Clinical Research Center—ICRC, St. Anne's University Hospital and Faculty of Medicine, Masaryk University, Pekařská 53, 656 91 Brno, Czech Republic.
Email: panovsky@fnusa.cz

Funding information

Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MEYS CR), Grant/Award Numbers: LQ1605 from the National Program of Sustainability, Specific University Research (MUNI/A/1493/2018)

Introduction: Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease affecting in particular the respiratory tract. Cardiac magnetic resonance (CMR), including a measurement of T_1 relaxation time, could potentially detect early stadia of sarcoidosis of the heart. The study aims to assess T_1 mapping in the detection of early cardiac involvement in asymptomatic patients with sarcoidosis.

Methods: One hundred and twenty patients with extracardiac sarcoidosis and without any heart disease history were included. One hundred and thirteen of them underwent a CMR examination. The mean time from the diagnosis of sarcoidosis was 0.8 (0.2–3.3) years. Cine images for the assessment of left ventricular (LV) functional parameters and pre- and post-contrast saturation method using adaptive recovery times for cardiac T_1 mapping (SMART₁Map) and modified Look-Locker inversion recovery (MOLLI) images were acquired for the assessment of native T_1 relaxation time and extracellular volume (ECV). The measured parameters were compared between sarcoidosis patients and 22 controls.

Results: The sarcoidosis patients had normal global and regional systolic LV function—LV ejection fraction $65 \pm 5\%$ versus $66 \pm 7\%$ (p NS). The mean native T_1 relaxation times were not prolonged— 1465 ± 93 ms versus 1480 ± 88 ms (p NS) measured by SMART₁Map and 1317 ± 60 ms versus 1313 ± 83 ms (p NS) measured using a MOLLI sequence. Similarly, the mean ECV values did not increase— $16.9 \pm 3.9\%$ versus $17.9 \pm 3.7\%$ (p NS) measured by SMART₁Map and $30.9 \pm 2.9\%$ versus $31.6 \pm 8.3\%$ (p NS) measured using a MOLLI sequence.

Conclusion: Myocardial native T_1 relaxation times were not prolonged and ECV was not increased in asymptomatic patients with extracardiac sarcoidosis.

KEYWORDS

cardiac magnetic resonance, extracellular volume, parametric mapping, sarcoidosis

Abbreviations: ASSET, Array Spatial Sensitivity Encoding Technique; BMI, body mass index; CMR, cardiac magnetic resonance; ECV, extracellular volume; EF, ejection fraction; EMB, endomyocardial biopsy; FIESTA, Fast Imaging Employing Steady-state Acquisition; FOV, field of view; ICC, intraclass correlation coefficient; LGE, late gadolinium enhancement; LV, left ventricle; MOLLI, modified Look-Locker inversion recovery; SASHA, saturation-recovery single-shot acquisition; SAX, short axis; SMART₁Map, saturation method using adaptive recovery times for cardiac T_1 mapping; T_E , echo time; T_I , inversion time; T_R , repetition time.

Preliminary data of this study were presented at the Euroecho 2019 congress and consequently published as a conference abstract.

NMR in Biomedicine. 2020;e4388.
<https://doi.org/10.1002/nbm.4388>

wileyonlinelibrary.com/journal/nbm

© 2020 John Wiley & Sons, Ltd. | 1 of 8

1 | INTRODUCTION

Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease of unknown aetiology affecting in particular the respiratory tract. Sarcoidosis threatens patients with heart and central nervous system inflection, hypercalcemia and progressive impairment of pulmonary function. An estimated 5% of the patients with respiratory tract sarcoidosis manifest clinical symptoms of sarcoidosis of the heart—the most frequent symptoms are arrhythmias (premature contractions, atrioventricular blockades).¹ Real incidence varies by the type of study performed and the chosen criteria, ranging from 10% up to 40%, because the granulomatous process is sometimes asymptomatic.^{2,3} Occasionally, sudden cardiac death is the first symptom of cardiac sarcoidosis, so early diagnosis in such asymptomatic patients brings them great benefit.^{4,5}

The diagnosis of cardiac sarcoidosis is generally very challenging and includes many pitfalls. In addition to commonly used diagnostic methods for cardiac sarcoidosis (Holter recording, echocardiography, and nuclear techniques), cardiac magnetic resonance imaging (CMR) offers a relatively new approach for making an examination of the heart.⁶ CMR not only allows exact anatomical and functional depiction, but also can depict structural changes in the myocardium, including inflammatory changes and granuloma formation.^{7–9} It has been already proven that late gadolinium enhancement (LGE) not only confirms cardiac involvement, but is even strongly associated with a risk of adverse events.^{10–17} Parametric mapping techniques have brought about new possibilities for assessing very early cardiac involvement, even before left ventricular (LV) ejection fraction (EF) decline and even before the appearance of LGE.^{18,19} Nevertheless, data on using parametric imaging in patients with sarcoidosis are still limited.

The study aimed to assess T_1 mapping in the detection of early cardiac involvement in asymptomatic patients with sarcoidosis.

2 | EXPERIMENTAL/METHODS

2.1 | Patient population and CMR data acquisition

Both patients with newly diagnosed sarcoidosis and patients followed up with sarcoidosis of the respiratory tract and/or extrapulmonary sarcoidosis were enrolled in this prospective study. Exclusion criteria were (1) Löfgren syndrome, (2) pre-existing known cardiovascular disease and/or cardiac symptoms, (3) any contraindication for CMR contrast examination (the presence of ferromagnetic material in the patient's body, pacemaker, claustrophobia, allergy to a gadolinium contrast agent), and (4) patients in severe clinical condition and patients unable to follow all the study's procedures. Patients with normal CMR findings, normal results from other cardiac investigations, and no other relevant medical history were used as controls.

CMR examinations were performed using a 3.0 T MR Discovery 750 scanner (GE Healthcare, Chicago, IL). A balanced steady-state gradient echo sequence (fast imaging employing steady-state acquisition—FIESTA) for the assessment of LV volumetric and functional parameters, and a T_2 -weighted sequence (triple inversion recovery fast spin echo) for oedema imaging were acquired. LGE images in all long-axis views and the short-axis (SAX) view were acquired 10 min after an intravenous bolus of 0.2 mmol/kg of the gadolinium-based contrast agent gadobutrol (Gadovist, Bayer-Schering Pharma, Germany).

Pre- and post-contrast saturation method using adaptive recovery times for cardiac T_1 mapping (SMART₁Map) and modified Look-Locker inversion recovery (MOLLI) images in middle SAX slices were acquired for the assessment of native T_1 relaxation time and extracellular volume (ECV). MOLLI sequences were acquired with a 3(3 s)3(3 s)5 heartbeat pattern, breath-hold, end-diastolic trigger, echo time (T_E) 1.5 ms, repetition time (T_R) 3.4 ms, first inversion time (T_I) 200 ms, T_1 increment 80 ms, flip angle 45°, bandwidth 125 kHz, slice thickness 8 mm, field of view (FOV) 320 cm, phase FOV 75%, matrix 192 × 128. SMART₁Map was acquired, as previously described,²⁰ with an A-SA-SA-SA-SA-S-A-S-P-A-S-P-P-A pattern (A stands for data acquisition, S for saturation RF pulse, and P for pause heartbeat, and hyphens separate different heartbeats from each other), breath-hold, end-diastolic trigger, T_E 1.5 ms, T_R 3.4 ms, flip angle 45°, bandwidth 125 kHz, slice thickness 8 mm, FOV 320 cm, phase FOV 75%, matrix 192 × 128. The default MOLLI and SMART₁MAP protocols were used with ASSET (array spatial sensitivity encoding technique) parallel imaging (undersampling factor of 2.0).

The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki (2000) of the World Medical Association, and was approved by the institutional ethics committee. Written informed consent was obtained from the subjects and/or their legally authorized representative.

2.2 | CMR data analysis

T_1 native, T_1 enhanced, and ECV maps from both SMART₁Map and MOLLI images were constructed on a pixel-by-pixel basis by using CVI42 dedicated analysis software (Circle Cardiovascular Imaging, Calgary, Canada). The global and segmental ECV of all six LV segments were calculated according to the established formula from native and enhanced T_1 times. For the ECV calculation, a value of haematocrit obtained just before the CMR examination was used (Figure 1).

To assess interobserver agreement, 10 native and post-contrast T_1 maps were blindly evaluated by two experienced observers (T.H. and R.P.).

2.3 | Statistical analysis

Continuous variables (data from CMR and age) followed the normal distribution and were compared using an unpaired Student t -test, while binary variables were compared using the two-tailed Fisher exact test. To compare possible correlation of disease stage with native T_1 or ECV values, the Spearman rank coefficient was determined with the respective p value. The native T_1 and ECV values were then compared with the control group using ANOVA with the Dunnett post-hoc test. Also, native T_1 and ECV values were compared between the patients with less than one year between the diagnosis and CMR and those with a longer time period between the two events. Interobserver agreement was expressed by the intraclass correlation coefficient (ICC). The value of $\alpha = 0.05$ was set as the level of statistical significance.

3 | RESULTS

One hundred and twenty consecutive patients with sarcoidosis and without any heart disease history or symptoms were screened. One hundred and thirteen of them underwent a CMR examination (Group S) and were included in the study. Another seven patients were too large to enter the gantry and could not undergo CMR. An age- and gender-matched control group included 22 patients (Group C). The basic characteristics of both groups are shown in Table 1. A higher number of sarcoidosis patients suffered from dyspnoea (60%), most likely due to the main pulmonary diagnosis. No patients had angina pectoris. Group S also had higher body mass index (BMI), which was likely due to corticosteroid treatment.

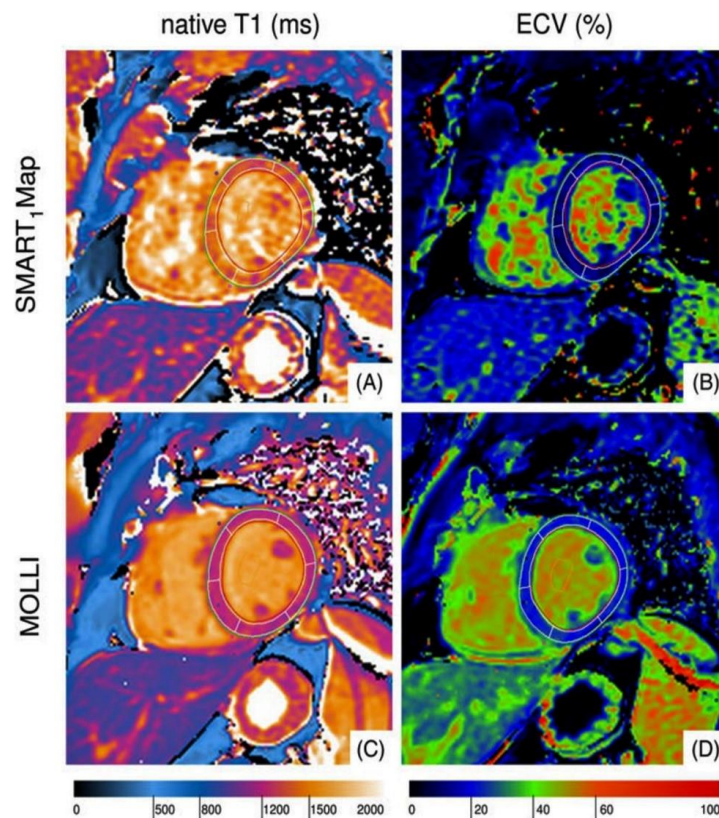


FIGURE 1 Native T_1 relaxation times and ECV assessment by SMART₁Map and MOLLI: A, SMART₁ T_1 native map; B, SMART₁ ECV map; C, MOLLI native map; D, MOLLI ECV map

TABLE 1 Basic characteristics of the study groups

	Group S total n = 113	Group C total n = 22	P value
Age [years]	52.0 ± 10.8	52.7 ± 11.1	0.78
Female [n (%)]	51 (45%)	8 (36%)	0.49
BMI [kg/m²]	29.1 ± 4.4	26.4 ± 4.7	0.009
Heart rate [beats per minute]	79 ± 9	76 ± 7	0.28
Dyspnoea [n (%)]	68 (60%)	1 (5%)	<0.001
Hypertension [n (%)]	35 (31%)	7 (32%)	1.00
Diabetes [n (%)]	6 (5%)	0 (0%)	0.59
Corticosteroids [n (%)]	64 (57%)	0 (0%)	<0.001
ACE inhibitors [n (%)]	14 (12%)	4 (18%)	0.49
ARBs [n (%)]	13 (12%)	0 (0%)	0.12
β-blockers [n (%)]	16 (14%)	1 (5%)	0.31
Diuretics [n (%)]	5 (4%)	1 (5%)	1.00
Statins [n (%)]	11 (10%)	1 (5%)	0.69

Continuous variables are expressed as the mean ± standard deviation; binary variables as count (percentage).

ACE, angiotensin converting enzyme; ARBs, angiotensin receptor blockers.

p values less than 0.05 are marked in **bold**.

TABLE 2 Characteristic of sarcoidosis patients

	Group S total n = 113
Radiologic stage	
stage 1	24 (21%)
stage 2	59 (52%)
stage 3	23 (20%)
stage 4	7 (6%)
Extrapulmonary sarcoidosis—all	34 (30%)
nodes	11 (10%)
spleen	10 (9%)
neurosarcoidosis	1 (1%)
eyes	3 (3%)
skin	7 (6%)
liver	1 (1%)
bones	2 (2%)
epididymis	1 (1%)

Categorical variables are expressed as a count (percentage).

The mean time from the diagnosis of sarcoidosis was 0.8 (0.2–3.3) years; 57 patients were less than 1 year and 56 patients more than 1 year. The majority of the patients were in Stage 2 according to their X-ray findings, and 30% of the patients also had extrapulmonary sarcoidosis (Table 2).

All patients of Group S had preserved global and regional systolic LV function—the LVEF of the cohort was 66 ± 7%. Left ventricles were not enlarged (end-diastolic LV volume of 97 ± 20 mL), and no patient had any signs of myocardial oedema in T₂-weighted images. LGE was found only in eight patients (7%) of Group S; however, the patterns of LGE were rather atypical from the viewpoint of expected LGE in cardiac sarcoidosis in all patients. One patient had LGE at the ventricular insertion point, which reflected myocardial disarray rather than granulomas, one patient had an LGE typical of ischaemic aetiology after a silent anterior myocardial infarction, and six patients had very tiny, uncertain focal intramural or sub-epicardial LGE (four in the lateral wall and two in the septum). Of course, sarcoidosis as the cause of these LGEs cannot be completely excluded in these cases.

The mean native T₁ relaxation times were not prolonged—1465 ± 93 ms versus 1480 ± 88 ms (p NS) measured by SMART₁Map, and 1317 ± 60 ms versus 1313 ± 83 ms (p NS) measured using a MOLLI sequence. Similarly, the mean ECV values did not increase—16.9 ± 3.9% versus 17.9 ± 3.7% (p NS) measured by SMART₁Map and 30.9 ± 2.9% versus 31.6 ± 8.3% (p NS) measured using a MOLLI sequence. Similarly,

TABLE 3 Comparison of segmental and global native T_1 values and ECV assessed by SMART₁Map

	T_1 native			ECV		
	Group S	Group C	P value	Group S	Group C	P value
Anterior	1458 ± 99	1448 ± 102	0.65	0.174 ± 0.037	0.165 ± 0.041	0.37
Anteroseptal*	1492 ± 108	1441 ± 94	0.044	0.183 ± 0.045	0.170 ± 0.043	0.24
Inferoseptal	1494 ± 92	1461 ± 103	0.14	0.186 ± 0.042	0.183 ± 0.039	0.77
Inferior	1508 ± 148	1501 ± 106	0.85	0.185 ± 0.044	0.170 ± 0.043	0.19
Inferolateral	1473 ± 193	1473 ± 116	0.99	0.172 ± 0.038	0.168 ± 0.046	0.68
Anterolateral	1451 ± 112	1451 ± 120	1.00	0.175 ± 0.037	0.174 ± 0.045	0.92
Global	1480 ± 88	1465 ± 93	0.45	0.179 ± 0.037	0.169 ± 0.039	0.27

Variables are expressed as the mean ± standard deviation.

T_1 native, T_1 relaxation time (ms). p values less than 0.05 are marked in bold.

TABLE 4 Comparison of segmental and global native T_1 values and ECV assessed by MOLLI

	T_1 native			ECV		
	Group S	Group C	P value	Group S	Group C	P value
Anterior	1309 ± 89	1320 ± 75	0.59	0.307 ± 0.083	0.302 ± 0.034	0.78
Anteroseptal	1332 ± 85	1336 ± 58	0.86	0.328 ± 0.083	0.329 ± 0.036	0.95
Inferoseptal	1315 ± 82	1321 ± 57	0.76	0.324 ± 0.086	0.323 ± 0.040	0.95
Inferior	1312 ± 89	1320 ± 63	0.71	0.318 ± 0.086	0.313 ± 0.034	0.82
Inferolateral	1304 ± 92	1299 ± 77	0.82	0.311 ± 0.088	0.298 ± 0.031	0.51
Anterolateral	1308 ± 89	1309 ± 61	0.95	0.310 ± 0.085	0.292 ± 0.033	0.35
Global	1313 ± 83	1317 ± 60	0.83	0.316 ± 0.083	0.309 ± 0.029	0.71

Variables are expressed as the mean ± standard deviation.

T_1 native, T_1 relaxation time (ms). p values less than 0.05 are marked in bold.

regional T_1 relaxation times and ECV were not altered, with the only exception of borderline significance in anteroseptal native T_1 measured by SMART₁Map (Tables 3 and 4).

There was no difference in haematocrit values (0.44 ± 0.04 versus 0.43 ± 0.03 ; p NS), native blood T_1 values (SMART₁Map, 1809 ± 153 ms versus 1768 ± 152 ms; MOLLI, 1687 ± 170 ms versus $1,672 \pm 133$ ms; p NS in both cases), post contrast blood values (SMART₁Map, 268 ± 49 ms versus 271 ± 70 ms; MOLLI, 404 ± 70 ms versus 414 ± 72 ms; p NS in both cases) or post contrast myocardium values (SMART₁Map, 600 ± 78 ms versus 271 ± 70 ms; MOLLI, 404 ± 70 ms versus 414 ± 72 ms; p NS in both cases).

Neither regional nor global native T_1 /ECV values correlated with disease stage, with $r < 0.15$ in all cases, with the exception of borderline significance in anterior ECV measured by SMART₁Map ($p = 0.042$; $r = -0.21$). Stage 4 had higher global ECV values measured using a MOLLI sequence compared with the control group ($p = 0.012$), which was also observed regionally in anteroseptal, inferoseptal, inferior and inferolateral segments ($p < 0.05$ in all cases). There was no difference in global native T_1 /ECV values when the patients with < 1 year and > 1 year diagnosis—CMR interval were compared.

There were no significant interobserver differences ($p > 0.05$), with the ICC > 0.9 for both native T_1 relaxation time and ECV using either the SMART₁Map or MOLLI sequence method; p values for agreement less than 0.01.

4 | DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is so far the largest study using myocardial T_1 mapping in patients with sarcoidosis. The main finding is the fact that myocardial native T_1 relaxation times were not prolonged and ECV was not increased in asymptomatic patients with extracardiac sarcoidosis. This fact was independent of the T_1 mapping sequence used, MOLLI or SMART₁Map.

These results are not concordant with the findings of the other two trials determining T_1 mapping in patients with sarcoidosis. In the largest published CMR study to date that evaluated parametric mapping in these patients, Greulich et al¹⁸ described higher native T_1 relaxation times and ECV in 61 sarcoid patients with preserved LVEF. The reason for such different results is questionable. Different scanners were used (1.5 T Magnetom Aera and 3.0 T Discovery 750), but this fact should not influence the results with regards to the comparisons with the local normative

values. MOLLI sequences were used on both sides; in our study, the SMART₁Map even confirmed the results. The differences between the examined cohorts must be considered. The main characteristics are very similar—preserved LVEF (65% and 66%) as well as the comparable percentages of patients on steroids (54% and 57%). The criteria for inclusion in the studies were quite similar with one exception—cardiac symptoms. In our study, patients with cardiac symptoms were excluded. Despite this fact, the cohorts had the same frequency of dyspnoea (60% and 60%), in both cases most likely from extracardiac reasons. On the other hand, a difference can be seen in angina (30% and 0% of the patients). The cause of angina in the Greulich study is unclear as angina pectoris is not a typical symptom of cardiac sarcoidosis and patients with known coronary artery disease were not included in the study. Nevertheless, coronary angiography was not routinely performed before inclusion and some portion of the patients may already had coronary artery disease. In any case, the influence of this fact on T_1 mapping results remains uncertain. Moreover, the difference in the presence of LGE (25% and 7%) could increase the suspicion that the patients in our study were less advanced. Another difference can be found in the time since diagnosis—while this period in our study was 0.8 (0.2–3.3) years, the other study included 20% of its patients who were 5–9 years since diagnosis and even 13% who were more than 10 years after their diagnosis of sarcoidosis.

Similarly, Puntmann et al¹⁹ discovered prolonged native T_1 relaxation times in 53 patients with biopsy-proven extracardiac sarcoidosis. While the time since their diagnosis is not available in the manuscript, they found LGE in 34%. Thus, a very probable cause of the different results among these three trials could be the slightly "healthier" population in our study, or earlier, latent stages of the disease respectively. It is likely that at the beginning of the disease the heart could remain unaffected and granulomatous depositions in the myocardium might appear later and only subsequently affect the myocardial relaxation time. The absence of any significant increase in myocardial T_2 signal in our study is another point that could support this theoretical explanation.

This study is also the first one published using the SMART₁Map sequence for the assessment of T_1 mapping in patients. Matsumoto et al²¹ described the reference range of native T_1 values using the SMART₁Map sequence in 24 healthy volunteers. Similarly, Burkhardt et al²⁰ established paediatric normal native T_1 values using the SMART₁Map sequence. Although there is limited experience using this sequence, theoretically as a saturation-recovery-based sequence it is supposed to have several advantages in comparison to inversion-recovery techniques, such as the lower dependency of several other factors, including heart rate, magnetization transfer and the T_2 time of the myocardium.^{22–24} In our study, both SMART₁Map and MOLLI were used. As the measured features are not the same (true T_1 and apparent $T_1 - T_1^*$), different T_1 times were found as expected,²⁵ with the values obtained by the SMART₁Map being approximately 150 ms higher compared with MOLLI in our study. Because the T_1 values assessed by all available mapping techniques are scanner dependent and even centre specific, the control group was necessary to set local normative values. The study showed comparable results using the two sequences.

The ECV values reported with SMART₁Map were lower than expected, with an average of $16.9 \pm 3.9\%$. As this is the first published study evaluating ECV measured by SMART₁Map, there is no reference for these values. Regarding other saturation methods for T_1 mapping, saturation-recovery single-shot acquisition (SASHA) has been used in several clinical studies for ECV evaluation. Average ECV values between 20 and 22% were often found using both 3.0 T scanners^{26,27} and 1.5 T scanners.^{28,29} On the other hand, Roujol et al²⁴ found ECV values around 18%, which are very close to our results. The reason for the different results is not fully clear—generally saturation methods show significantly lower ECV values in comparison with inversion recovery methods, so standardized thresholds need to be defined independently for each sequence, ideally for each CMR unit and scanner. Similarly, the MOLI ECV values ($30.9 \pm 2.9\%$ and $31.6 \pm 8.3\%$) were moderately higher than previously reported MOLLI ECV values (25–27%) at 3.0 T scanners.^{26,27,30,31} However, this is the first study performed using a GE 3.0 T scanner for ECV measurement, and so far data have been gained using scanners from different vendors and also different MOLLI sequences, so the comparison is problematic. Certainly, more data about ECV assessment using both SMART₁Map and MOLLI with a 3.0 T GE scanner are needed.

The study has several limitations. First, no endomyocardial biopsy (EMB) as a standard for cardiac involvement was performed. Nevertheless, EMB is an invasive technique that is not routinely clinically performed in such patients and only very rarely used for research purposes, as its accuracy is not optimal. Second, this is a single-centre study, so the results may be potentially affected by local process settings and centre-specific bias. On the other hand, mapping techniques require local normative values and any potential multi-centre study should solve the problem of different normative values in centres. The local normative values from controls were used in this study. However, parametric mapping is quite challenging at higher field strengths such as 3.0 T and no validation of the measurement with phantoms was performed. Moreover, sarcoid granulomas could have only focal findings and could be theoretically missed by evaluation of only the middle SAX slice. The control group has an overweight BMI ($26.4 \pm 4.7 \text{ kg/m}^2$) and over 30% have hypertension. These findings represent the overall overweight population and matched the sarcoidosis cohort. Nevertheless, T_1 times and ECV values of these controls may not represent a normal healthy value. Third, T_2 mapping was not done because it was not available in our scanner when the study protocol was set and the study started. T_2 mapping could certainly add interesting information about the myocardium in this study. However, evidence of its diagnostic value was not well known at that time and was published later.

5 | CONCLUSION

Myocardial native T_1 relaxation times were not prolonged and ECV did not increase in asymptomatic patients with recent extracardiac sarcoidosis. This fact was independent of the T_1 mapping sequence used, whether MOLLI or SMART₁Map.

DECLARATIONS

The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki (2000) of the World Medical Association, and was approved by the institutional ethics committee (Ethics Committee of St Anne's University Hospital Brno, reference number 65 V/2015). Written informed consent was obtained from the subjects and/or their legally authorized representative.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

FUNDING INFORMATION

The work was supported by Project LQ1605 from the National Program of Sustainability II, Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MEYS CR), and the Specific University Research (MUNI/A/1493/2018) provided by the MEYS CR in the year 2018.

ORCID

Roman Panovsky  <https://orcid.org/0000-0001-8489-132X>

REFERENCES

- Sharma OP, Maheshwari A, Thaker K. Myocardial sarcoidosis. *Chest*. 1993;103(1):253-258.
- Mehta D, Lubitz SA, Frankel Z, et al. Cardiac involvement in patients with sarcoidosis: diagnostic and prognostic value of outpatient testing. *Chest*. 2008;133(6):1426-1435.
- Kandolin R, Lehtonen J, Airaksinen J, et al. Cardiac sarcoidosis: epidemiology, characteristics, and outcome over 25 years in a nationwide study. *Circulation*. 2015;131(7):624-632.
- Boglioli LR, Taff ML, Funke S, Mihalakis I. Sudden death due to sarcoid heart disease. *J Forensic Sci*. 1998;43(5):1072-1073.
- Kavanagh T, Huang S. Cardiac sarcoidosis: an unforeseen cause of sudden death. *Can J Cardiol*. 1995;11(2):136-138.
- Birnie DH, Sauer WH, Bogun F, et al. HRS expert consensus statement on the diagnosis and management of arrhythmias associated with cardiac sarcoidosis. *Heart Rhythm*. 2014;11(7):1305-1323.
- Nadel J, Lancefield T, Voskoboinik A, Taylor AJ. Late gadolinium enhancement identified with cardiac magnetic resonance imaging in sarcoidosis patients is associated with long-term ventricular arrhythmia and sudden cardiac death. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2015;16(6):634-641.
- Smedema JP, Snoep G, van Kroonenburgh MP, et al. The additional value of gadolinium-enhanced MRI to standard assessment for cardiac involvement in patients with pulmonary sarcoidosis. *Chest*. 2005;128(3):1629-1637.
- Doubkova M, Panovsky R. How to diagnose cardiac sarcoidosis. *Vnitř Lék*. 2018;64(7/8):729-733.
- Patel MR, Cawley PJ, Heitner JF, et al. Detection of myocardial damage in patients with sarcoidosis. *Circulation*. 2009;120(20):1969-1977.
- Greulich S, Deluigi CC, Gloekler S, et al. CMR imaging predicts death and other adverse events in suspected cardiac sarcoidosis. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2013;6(4):501-511.
- Murtagh G, Laffin LJ, Beshai JF, et al. Prognosis of Myocardial Damage in Sarcoidosis Patients With Preserved Left Ventricular Ejection Fraction. *Circ Cardiovascular Imaging*. 2016;9(1). <https://doi.org/10.1161/circimaging.115.003738>
- Hulten E, Agarwal V, Cahill M, et al. Presence of Late Gadolinium Enhancement by Cardiac Magnetic Resonance Among Patients With Suspected Cardiac Sarcoidosis Is Associated With Adverse Cardiovascular Prognosis. *Circ Cardiovascular Imaging*. 2016;9(9). <https://doi.org/10.1161/circimaging.116.005001>
- Ekström K, Lehtonen J, Hänninen H, Kandolin R, Kivistö S, Kupari M. Magnetic Resonance Imaging as a Predictor of Survival Free of Life-Threatening Arrhythmias and Transplantation in Cardiac Sarcoidosis. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(5). <https://doi.org/10.1161/jaha.115.003040>
- Ise T, Hasegawa T, Morita Y, et al. Extensive late gadolinium enhancement on cardiovascular magnetic resonance predicts adverse outcomes and lack of improvement in LV function after steroid therapy in cardiac sarcoidosis. *Heart*. 2014;100(15):1165-1172.
- Crawford T, Mueller G, Sarsam S, et al. Magnetic resonance imaging for identifying patients with cardiac sarcoidosis and mildly reduced left ventricular function at risk of ventricular arrhythmias. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2014;7(6):1109-1115.
- Shafee MA, Fukuda K, Wakayama Y, et al. Delayed enhancement on cardiac magnetic resonance imaging is a poor prognostic factor in patients with cardiac sarcoidosis. *J Cardiol*. 2012;60(6):448-453.
- Greulich S, Kitterer D, Latus J, et al. Comprehensive Cardiovascular Magnetic Resonance Assessment in Patients With Sarcoidosis and Preserved Left Ventricular Ejection Fraction. *Circ Cardiovascular Imaging*. 2016;9(11). <https://doi.org/10.1161/circimaging.116.005022>
- Puntmann VO, Isted A, Hinojar R, Foote L, Carr-White G, Nagel E. T1 and T2 mapping in recognition of early cardiac involvement in systemic sarcoidosis. *Radiology*. 2017;285(1):63-72.
- Burkhardt BE, Menghini C, Rücker B, Kellenberger CJ, Valsangiacomo Buechel ER. Normal myocardial native T1 values in children using single-point saturation recovery and modified look-locker inversion recovery (MOLLI). *J Magn Reson Imaging*. 2019;51(3):897-903. <https://doi.org/10.1002/jmri.26910>
- Matsumoto S, Okuda S, Yamada Y, et al. Myocardial T1 values in healthy volunteers measured with saturation method using adaptive recovery times for T1 mapping (SMART1Map) at 1.5 T and 3 T. *Heart Vessels*. 2019;34(11):1889-1894. <https://doi.org/10.1007/s00380-019-01401-5>
- Chow K, Flewitt J, Pagano J, Green J, Friedrich M, Thompson R. T2-dependent errors in MOLLI T1 values: simulations, phantoms, and in-vivo studies. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2012;14(S1):282-295. <https://doi.org/10.1186/1532-429X-14-S1-P281>
- Robson MD, Piechnik SK, Tunnicliffe EM, Neubauer S. T1 measurements in the human myocardium: the effects of magnetization transfer on the SASHA and MOLLI sequences. *Magn Reson Med*. 2013;70(3):664-670.
- Roujol S, Weingärtner S, Foppa M, et al. Accuracy, precision and reproducibility of four T1 mapping sequences: a head-to-head comparison of MOLLI, ShMOLLI, SASHA, and SAPPHERE. *Radiology*. 2014;272(3):683-689.

25. Slavin GS, Stainsby JA. True T1 mapping with SMART1Map (saturation method using adaptive recovery times for cardiac T1 mapping): a comparison with MOLLI. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2013;15(S1). <https://doi.org/10.1186/1532-429x-15-s1-p3>
26. Weingärtner S, Meßner NM, Budjan J, et al. Myocardial T1-mapping at 3T using saturation-recovery: reference values, precision and comparison with MOLLI. *J Cardiovas Magn Reson*. 2017;18(1). <https://doi.org/10.1186/s12968-016-0302-x>
27. Heidenreich JF, Weng AM, Donhauser J, et al. T1- and ECV-mapping in clinical routine at 3T: differences between MOLLI, ShMOLLI and SASHA. *BMC Med Imaging*. 2019;19(1). <https://doi.org/10.1186/s12880-019-0362-0>
28. Pagano JJ, Chow K, Paterson DI, et al. Effects of age, gender, and risk-factors for heart failure on native myocardial T₁ and extracellular volume fraction using the SASHA sequence at 1.5T. *J Magn Reson Imaging*. 2018;48(5):1307-1317.
29. Thompson RB, Chow K, Khan A, et al. T₁ mapping with cardiovascular MRI is highly sensitive for Fabry disease independent of hypertrophy and sex. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2013;6(5):637-645.
30. Dong Y, Yang D, Han Y, et al. Age and Gender Impact the Measurement of Myocardial Interstitial Fibrosis in a Healthy Adult Chinese Population: A Cardiac Magnetic Resonance Study. *Front Physiol*. 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00140>
31. Chin CW, Semple S, Malley T, et al. Optimization and comparison of myocardial T1 techniques at 3T in patients with aortic stenosis. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2014;15(5):556-565.

How to cite this article: Panovský R, Doubková M, Holeček T, et al. Myocardial T₁ mapping using SMART₁Map and MOLLI mapping in asymptomatic patients with recent extracardiac sarcoidosis. *NMR in Biomedicine*. 2020:e4388. <https://doi.org/10.1002/nbm.4388>

4. Biomarkery

Biomarkery, neboli biologické markery, jsou definovány jako objektivně měřitelné indikátory fyziologického/patologického procesu nebo farmakologické odpovědi na terapeutický zásah. Ideální biomarker by měl mít vysokou senzitivitu a specificitu a měl by poskytovat informace o prognóze onemocnění. Jeho hladina by se měla měnit v souladu s vývojem onemocnění nebo ještě lépe hodnota biomarkeru by měla odrážet změny předtím, než jsou patrné v klinickém nálezů. V ideálním případě by měl reflektovat rozsah onemocnění, být reprodukovatelný, dostupný a cenově efektivní (Tzouveleakis a kol., 2005). V souvislosti s IPF existuje několik potenciálních biomarkerů, dosud ale nebyla identifikována molekula nebo sloučenina, která by splňovala požadované vlastnosti a mohla být efektivně používána v běžné klinické praxi.

Studiem biomarkerů u pacientů s IPF a sarkoidózou se zabýváme ve dvou pracech, přehledové „Biomarkery u idiopatické plicní fibrózy – jejich význam pro diagnostiku a prognózu“ (Štefániková a kol., 2019) a „Prognostic significance of surfactant protein A, surfactant protein C, Clara cell protein 16, S100 protein, trefoil factor 3, and prostatic secretory protein 94 in idiopathic pulmonary fibrosis, sarcoidosis, and chronic pulmonary obstructive disease“ (Doubková a kol., 2016). Viz kapitola 4.1 a 4.2.

V této druhé studii, která byla v nepublikované podobě součástí mé disertační práce, jsme se věnovali analýze biomarkerů surfaktant proteinu A, surfaktant proteinu C, Clara cell proteinu 16, S100 proteinu, trefoil faktoru 3 a prostatickému sekretorickému proteinu 94 v krvi a bronchoalveolární tekutině (BALT) získané bronchoalveolární laváží u různých plicních nemocí. Bylo nalezeno několik významných korelací: 1) hladina BALT PSP94 korelovala s prognózou sarkoidózy ($p = 0,035$); 2) hladina BALT SP-D s plicními funkcemi u IPF ($p = 0,032$); 3) BALT SP-D a TFF3 s IPF mortalitou ($p = 0,049$, $p = 0,017$); 4) hladina TFF3 v séru s mortalitou na CHOPN ($p = 0,006$); 5) SP-A v séru se změnami plicních funkčních ukazatelů v čase u IPF ($p = 0,011$); 6) SP-D v séru byla asociována s hodnotou intersticiálního skóre na HRCT hrudníku u IPF ($p = 0,0346$). Naše analýza navíc ukázala, že některé hladiny biomarkerů se mezi jednotlivými chorobami lišily: 1) hladiny BALT SP-D mezi sarkoidózou a IPF; 2) SP-A v séru mezi IPF, sarkoidózou a CHOPN mezi sebou a od zdravých kontrol; 3) S100A6, S100A11 v séru u IPF, sarkoidózou, CHOPN od zdravých kontrol; 4) SP-D, CC16, TFF3 v séru se odlišovali u IPF pacientů od zdravých kontrol a 5) CC16, TFF3, PSP94 v séru mezi CHOPN a kontrolami.

4.1. Biomarkery u idiopatické plicní fibrózy – jejich význam pro diagnostiku a prognózu (Štefániková M, Chovancová Z, Kubáň P, Doubková M. Stud Pneumol Phthiseol. 2019; 79(5): 164-175)

164

STUD. PNEUMOL. PHTHISEOL., 79, 2019, Č. 5, S. 164–175

Biomarkery u idiopatické plicní fibrózy – jejich význam pro diagnostiku a prognózu

M. Štefániková¹, Z. Chovancová², P. Kubáň³, M. Doubková¹

¹Klinika nemocí plicních a tuberkulózy, FN Brno a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity Brno;

²Ústav klinické imunologie a alergologie, FN u sv. Anny v Brně a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity; ³Oddělení bioanalytické instrumentace, Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno

SUMMARY

Biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis – their significance for the diagnosis and treatment

Interstitial lung disease (ILD) is a heterogeneous group of diseases affecting the lung interstitium as well as lung capillaries, alveolar ducts and bronchioles. The differential diagnosis is broad, requiring a multidisciplinary consensus based on piecing together clinical, radiological and histopathological information. The most severe ILD is idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). The median survival in untreated patients is 2–4 years from diagnosis. IPF differs from other ILDs in terms of not only prognosis, but also treatment. Therefore, efforts have been made to find biomarkers to be used in the diagnosis of IPF, monitoring of the disease activity, prognosis and predicting the treatment response. The article aims to provide a summary report on biomarkers in IPF and their clinical significance.

Keywords: biomarkers, idiopathic pulmonary fibrosis, prognosis

SOUHRN

Intersticiální plicní procesy (IPP) jsou heterogenní skupinou onemocnění, která postihuje nejen plicní interstitium, ale i plicní kapiláry, alveolární dukty a bronchioly. Diferenciální diagnóza těchto onemocnění je široká. Ke stanovení diagnózy vede multidisciplinární konsenzus, syntéza klinických, radiologických a histopatologických nálezů. Nejzávažnějším onemocněním ze skupiny IPP je idiopatická plicní fibróza (IPF). Medián přežití se u neléčených pacientů pohybuje mezi 2–4 roky od stanovení diagnózy. IPF se odlišuje od jiných IPP nejen prognózou, ale i léčbou. Proto je snaha nalézt biomarkery, které by se uplatnily v diagnostice IPF, monitorování aktivity onemocnění, prognóze a k predikci odpovědi na léčbu. Cílem práce bylo podat souhrnný přehled o biomarkerech u IPF a jejich klinickém významu.

Klíčová slova: biomarkery, idiopatická plicní fibróza, prognóza

ÚVOD

Intersticiální plicní procesy (IPP) tvoří širokou skupinu onemocnění. Jejich diferenciální diagnostika patří v pneumologii k té nejobtížnější. Etiologie a patogenese těchto procesů není zcela známá. Jednotlivé nosologické jednotky mohou mít řadu společných rysů (klinické příznaky, nálezy zobrazovacích metod, histopatologické obrazy), proto se na stanovení diagnózy často podílí multidisciplinární tým, sestávající se z radiologů, pneumologů,

patologů a chirurgů. Provedení jednotlivých diagnostických vyšetření může být limitováno klinickým stavem pacienta. Většina nemocných s podezřením na IPF je totiž vyššího věku (medián 65–70 let) a trpí četnými komorbiditami [1]. Riziko pro ně může představovat odběr vzorku plicní tkáně, jak chirurgicky, tak při transbronchiální kryobiopsii, i když tato posledně jmenovaná metoda je asociována s nižším rizikem mortality ve srovnání s chirurgickou plicní biopsií [2]. Při bronchoalveolární laváži (BAL) bylo popsáno až čtyřnásobné riziko

akutní exacerbace základního onemocnění [3]. Nejméně 10 % pacientů s IPP neklasifikované onemocnění s překryvem rysů různých jednotek ze skupiny IPP [4]. Vzhledem k tomu, že v posledních letech byla lépe objasněna patogeneze idiopatické plicní fibrózy (IPF), je rozlišení mezi IPF a jinými IPP zcela zásadní, a to nejen s ohledem na prognózu, ale také terapeutický postup.

IDIOPATICKÁ PLICNÍ FIBRÓZA A JEJÍ PATOGENEZE

IPF je specifická forma chronické progredující fibrotizující intersticiální pneumonie, postihující pouze plicce. Je spojená s histopatologickým a/nebo radiologickým obrazem UIP (usual interstitial pneumonia). Histopatologicky je přítomná patologická proliferace mezenchymálních buněk a nekoordinované ukládání kolagenu [5]. Původní hypotéza o patogenezi IPF popisovala primárně rozvoj zánětu, následkem kterého docházelo k fibrotické remodelaci plicní tkáně. Posléze se ukázalo, že zánět není dominantní a primárním patogenetickým procesem je nekoordinovaná fibrogenese [1,5]. IPF je tedy výsledkem defektní epiteliální – mezenchymální interakce a patologického procesu hojení. Poškození a apoptóza alveolárních epiteliálních buněk II. typu je důležitým časným znakem v patogenezi IPF. Epiteliální buňky exprimují několik cytokinů a růstových faktorů, které podporují migraci a proliferaci fibroblastů a akumulaci extracelulární matrix [5]. Hlavním profibrotickým cytokinem účastnícím se patologické fibrogenese je transformující růstový faktor beta (transforming growth factor-beta; TGF- β). Jedná se o růstový faktor, který má po své aktivaci chemotaktické a proliferativní vlastnosti. Podporuje apoptózu epiteliálních buněk, přechod epiteliálních buněk v mezenchymální, syntézu kolagenu, proliferaci fibroblastů, transdiferenciaci fibroblastu v myofibroblast a expresi matrix metaloproteinázy [6]. Porušení celistvosti alveolo-epiteliální bazální membrány je typickým znakem IPF. Narušení bazální membrány vede k aberantní aktivaci alveolárních epiteliálních buněk a ke zvýšení migrace mezenchymálních buněk a pronikání zánětlivých buněk do alveolárního prostoru [5,7]. Fibroblasty a myofibroblasty jsou rezistentní vůči apoptóze a více odpovídají na stimulaci fibrogenními cytokiny, čímž podporují proces fibrogenese [6,8].

BIOMARKERY INTERSTICIÁLNÍ PLICNÍ FIBRÓZY

Biomarkery jsou obecně definovány jako objektivně měřitelné indikátory fyziologického/patologického procesu, nebo farmakologické odpovědi na terapeutický zásah [9]. Ideální biomarker by měl mít vysokou senzitivitu a specifitu, informo-

vat o prognóze onemocnění, jeho hladina by se měla měnit v souladu s vývojem onemocnění nebo odrážet vývoj základního onemocnění ještě před nástupem klinických příznaků. V ideálním případě by měl reflektovat zátěž a rozsah onemocnění. Analytické metody pro jeho stanovení by měly být reprodukovatelné a cenově dostupné [10]. Stanovení optimálních biomarkerů pro diagnostiku IPP, včetně IPF, které by bylo možné získat pro pacienta minimálně invazivním a šetrným způsobem (např. vyšetřením periferní krve, kondenzátu vydechovaného vzduchu nebo sputa), by bylo jistě velmi užitečným pomocným vyšetřením pro stanovení diagnózy, případně monitorování průběhu onemocnění, efektu léčby nebo určení prognózy.

Nicméně i když v souvislosti s IPF existuje několik potenciálních biomarkerů (tabulka 1), dosud nebyly identifikovány molekuly nebo sloučeniny, které by splňovaly požadované vlastnosti a mohly by být efektivně používány v běžné klinické praxi.

1. BIOMARKERY SPOJENÉ S DYSFUNKCÍ ALVEOLÁRNĚ-EPITELIÁLNÍCH BUNĚK

Porušení integrity alveolárního epitelu s alterací fenotypu alveolárních epiteliálních buněk, které získávají mesenchymální fenotyp [6], je základním předpokladem pro vznik plicní fibrózy. Proteiny, které jsou produkovány epiteliálními buňkami dýchacích cest a alveolů, se díky jejich zvýšené tvorbě a poškozené epiteliální bariéře dostanou do krevního oběhu [11]. Jsou nespecifické pro jednotlivé IPP, včetně IPF, a proto nejsou vhodné pro stanovení diagnózy. Mohou ale sloužit jako prognostické ukazatele.

Krebs von den Lungen 6 (KL-6) je glykoprotein s vysokou molekulární hmotností, klasifikovaný jako humánní transmembránový mucin 1 (MUC-1), který se nachází na povrchu extracelulární membrány pneumocytů II. typu. KL-6 podporuje migraci, proliferaci a přežívání plicních fibroblastů [12]. Zvýšená sérová hladina KL-6 sice odliší pacienty s IPF od zdravých kontrol [13,14], ale toto zvýšení koncentrace se vyskytuje i u řady jiných IPP [15]. Proto je jako diagnostický biomarker nespecifický, nicméně lze ho využít jako biomarker prognostický. Koncentrace KL-6 je totiž asociována s progresí onemocnění a akutní exacerbací [14,15,16] a také s progresí onemocnění u pacientů s IPF a zachovalým plicním objemem [17]. Studie Raghu et al. z roku 2018 jeho prognostickou funkci ale nepotvrdila [13]. Nedávná studie Yoshikawa et al. popisuje signifikantní změny v sérových hladinách surfaktantových proteinů A, D a KL-6 u pacientů s antifibrotickou léčbou. To by mohlo znamenat možnost využití KL-6 jako biomarkeru v predikci terapeutické odpovědi na antifibrotické léky pirfenidon a nintedanib [18]. Ukázalo se také, že koncentrace KL-6 v séru je ovlivněna genotypem paci-

enta a jeho distribuce se liší podle etnicity [19]. Stanovování koncentrace KL-6 v séru se rutinně využívá v klinické praxi v Japonsku [20].

Surfaktantové proteiny A a D (SP-A a SP-D) jsou lipoproteinové komplexy, jejichž syntéza a sekrece probíhá v pneumocytech II. typu. Slouží ke snížení povrchového napětí v alveolech na rozhraní vzduchu a tekutiny. Podle některých prací mohou taky modulovat funkci imunitních buněk a chránit před fibrogenézí prostřednictvím indukce apoptózy a snížením akumulace kolagenu [21]. Sérové hladiny SP-A a SP-D jsou zvýšeny u pacientů s IPF, proto by mohly pomoci odlišit pacienty s IPF od zdravých kontrol [13]. Jsou ale stejně jako KL-6 nespecifické a jejich zvýšená sérová hladina

je charakteristická i pro jiné intersticiální plicní procesy, například pro alveolární proteinózu, hypersenzitivní pneumonitidu nebo sarkoidózu [22,23]. Dle studie Maher et al. je zvýšená hladina SP-D asociována s progresí onemocnění u pacientů s IPF se zachovalým plicním objemem [17], studie Raghu et al. jeho prognostickou funkci nepotvrdila [13]. Při metaanalýze možnosti použití SP-A a SP-D v diferenciální diagnostice IPP bylo zjištěno, že pacienti s IPF mají vyšší hladinu sérového SP-A, ale ne SP-D, ve srovnání s pacienty s jinými IPP [24]. Také bylo prokázáno, že hladiny SP-A a SP-D v séru a BAL u pacientů s IPF se odlišují od hladin zjištěných u pacientů se sarkoidózou nebo chronickou obstrukční plicní nemocí [25]. Navíc koncentrace SP-A byla asociována s funkčním postiže-

Tabulka 1: Patogenetické procesy vzniku fibrózy v plicní tkáni a potenciální biomarkery, které při jednotlivých procesech vznikají [110]

Patogenetický proces	Biomarkery
Angiogeneze/Angiostáza	ICAM 1 VCAM 1 CXCL8 CXCL10 MIG
Přeměna fibroblastů	Fibrocyty
Zánět	IL-6 CCL-18 CCL-2 CCL-5 CRP LDH
Poškození epitelia	KL-6 SP-A SP-B SP-D Napsin A Ca 19-9 Ca 15-3
Remodelace extracelulární matrix	MMP1 MMP7 LOXL2
Profibrotické a růstové faktory	TGF VEGF HGF
Buněčná imunita	CCL-18 CXCL-13 IFN Anti-Hsp-70 CD28 YLK-40 E-selektin S100A12 Osteopontin Periostin

Patogenetický proces	Biomarkery
Oxidační stres	Látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou Kyselina linoleová Železo vázané na desferrioxamin Hyperperoxydy 8-isoprostan TEAC – metoda stanovení antioxidační kapacity Thiolovaný protein Fluidita erytrocytové membrány

Zkratky: **ICAM** – intercellular cell adhesion molecule (nitrobuněčná adhezivní molekula), **VCAM** – vascular cell adhesion molecule (adhezivní molekula cévních buněk), **CXCL** – C-X-C chemokin motif a ligand, **MIG** – monokine induced by interferone gamma (monokin indukovaný interferonem gamma), **IL** – interleukin, **CCL** – chemokine ligand (ligand pro chemokin), **CRP** – C-reaktivní protein, **LDH** – laktát dehydrogenáza, **KL-6** – Krebs von den Lungen 6, **SP** – surfaktantový protein, **CA** – carbohydrate antigen (karbohydrátový antigen), **MMP** – matrix metalo-proteináza, **LOXL** – lysyl oxidase like (lyzyl oxidáze podobný), **TGF** – transforming growth factor (transformující růstový faktor), **VEGF** – vascular endothelial growth factor (vaskulární endotelový růstový faktor), **HGF** – hepatocyte growth factor (růstový faktor hepatocytů), **IFN** – interferon, **Ab** – antibody (protilátka), **HSP** – heat shock protein (proteiny teplotního šoku), **CD** – cluster of differentiation (diferenciační skupina), **YLK** – human cartilage glycoprotein 39 (lidský chrupavkový glykoprotein 39) and chitinase 3-like 1 (chitináze podobný protein 1)

ním a SP-D s rozsahem nálezu na HRCT hrudníku [25]. Sérové hladiny SP-A a SP-D se významně snížily vlivem antifibrotické terapie pirfenidonem a nintedanibem, navíc byla popsána výrazně negativní korelace mezi jejich hladinami a dynamikou změny ve forsírované vitalní kapacitě (forced vital capacity; FVC) a difúzní plicní kapacitě (difussion lung capacity for carbon monoxide; DLCO) [18]. Stanovování koncentrace surfaktantových proteinů SP-A a SP-D v séru se stejně jako KL-6 rutinně využívají v klinické praxi v Japonsku [20].

2. BIOMARKERY SPOJENÉ S FIBROPROLIFERACÍ A REMODELACÍ EXTRACELULÁRNÍ MATRIX

Matrix metaloproteinázy jsou endopeptidázy, které se podílejí na degradaci a remodelaci komponentů extracelulární matrix (ECM) [26] a hrají významnou roli v patogenezi fibrózy. Většina extracelulárního kolagenu je štěpená matrixmetaloproteinázami (MMP-1, 3, 7, 8, 13, 14, 16 a 18). Produkty tohoto štěpení jsou dále degradovány za pomoci MMP-2 a 9 [27]. Vyšší plazmatické hladiny MMP-1 a 7 byly popsány u pacientů s IPF, a to ve srovnání se zdravými jedinci [28,29], ve srovnání s pacienty s jinými IPP nežli IPF (například UIP u systémové sklerodermie, revmatoidní artritidy) [30] nebo s jinými chronickými plicními nemocemi (hypersenzitivní pneumonitidou, sarkoidózou nebo chronickou obstrukční plicní nemocí) [28]. Plazmatické hladiny MMP-7 mohou souviset se závažností IPF. Roasas et al. popsali signifikantní korelaci mezi zvýšenou plazmatickou hladinou MMP-7 a závažností onemocnění, která byla hodnocena dle poklesu hodnot FVC a DLCO (pokles FVC o 4,0 % a DLCO o 4,1 % koreloval s přírůstkem MMP-7 v plazmě o 1 ng/ml) [28]. Bylo prokázáno, že zvýšená hladina MMP-7 v plazmě koreluje s progresí onemocnění [14,29,31] i s mortalitou [32]. Hladina tohoto markeru byla zvýšená také u nemocných s incipientní IPF, ve srovnání se zdravými jedinci, ale tyto hladiny byly nižší než u pacientů s pokročilou formou IPF, což podtrhuje možnost využití tohoto biomarkeru ke sledování progresse onemocnění a detekci časných forem IPF [28].

Neoepitopy jsou fragmenty, vznikající štěpením jednotlivých proteinů ECM specifickými matrix-metaloproteinázami při přeměně extracelulární matrix, které pronikají do krevního oběhu [33]. Ukázalo se, že neoepitopy jsou přesnějšími diagnostickými a prognostickými biomarkery jednotlivých fibroproliferativních onemocnění než jejich mateřské proteiny [33]. V rozsáhlé prospektivní studii PROFILE bylo zjištěno, že koncentrace proteinových fragmentů, které vznikají jejich odbouráváním pomocí MMP, je u pacientů s IPF ve srovnání se zdravými kontrolami zvýšená. Změna

v koncentraci některých proteinových fragmentů byla spojena s progresí onemocnění a délkou přežití. Zvýšené koncentrace neoepitopů mohou identifikovat fenotyp IPF, charakteristický rychlou přestavbou ECM a horší prognózou [34]. Dle studie Maher et al. mohou být neoepitopy CRPM (z anglického „C-reactive protein degraded by MMP-1/8“) a C3M (z anglického „collagen 3 degraded marker“) společně s dalšími biomarkery, které byly zkoumány, prediktory progresse onemocnění u pacientů se zachovalým plicním objemem [17].

Lysoz oxidáza a lysoz oxidáze podobné proteiny (Lysoz oxidase like protein; LOXL) se významně podílejí na přestavbě extracelulární matrix, podporují mezimolekulární zesíťování kolagenu, a tak participují na stabilizaci ECM. LOXL 2 a LOXL 3 se významně podílejí na transdiferenciaci fibroblastu v myofibroblastu [35]. Zvýšené sérové hladiny LOXL jsou asociovány se zvýšeným rizikem progresse IPF a rizikem mortality [36]. Studie zkoumající efekt cílené anti-LOXL 2 léčby monoklonální protilátkou simtuzumabem ale neprokázala zlepšení v přežití bez progresse onemocnění ve srovnání s placebem [37].

Periostin je protein ECM, který hraje důležitou úlohu v patogenezi IPF. Podílí se na diferenciaci myofibroblastů, mezimolekulárním zesíťování kolagenu a produkci kolagenu I. typu. Profibrotické cytokiny TGF-beta a IL-13 podporují zvýšenou expresi periostinu v plicním parenchymu [38]. Sérové hladiny periostinu byly zvýšené u pacientů s IPF oproti zdravým kontrolám [39], proto se poměr celkového periostinu a jeho monomerní formy může uplatnit jako biomarker při stanovení diagnózy IPF [40]. Vzhledem k tomu, že jeho hladina koreluje s poklesem plicních funkcí, může být využit i jako prognostický biomarker [39].

Osteopontin je prozánětlivý cytokin, který se podílí na reparaci tkáně, může aktivovat MMP-7 a podporuje migraci a proliferaci fibroblastů [41]. Zvýšené hladiny osteopontinu byly popsány u pacientů s IPF, ale i u jiných IPP. Osteopontin společně s SP-D a MMP-7 napomáhá rozlišení mezi IPF a jinými idopatickými intersticiálními pneumoniemi [42].

3. RŮSTOVÉ A ADHEZIVNÍ FAKTORY

Inzulínu podobný růstový faktor vázající protein (IGFBP) se podílí na buněčné proliferaci a diferenciaci. Ve studii Guiota et al. bylo popsáno, že sérové hladiny IGFBP-1 a IGFBP-2 jsou zvýšeny u nově diagnostikovaných pacientů s IPF ve srovnání se zdravými kontrolami. Hladina IGFBP-2 byla snížena u pacientů užívajících antifibrotickou léčbu pirfenidonem nebo nintedanibem ve srovnání se skupinou pacientů bez této léčby [43].

Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) je glykoprotein, který je exprimován na alveolárních epitelálních buňkách. Je klíčovým regulátorem angiogeneze, která je součástí patogeneze IPF. Sérová hladina VEGF je u pacientů s IPF asociována se závažností onemocnění. Hladina VEGF negativně koreluje s vitální kapacitou plic v čase. Pětileté přežití bylo sniženo u pacientů, u kterých byla hladina VEGF v krvi vyšší než 207 pg/ml [44]. Toho se využívá při léčbě IPF, kdy se využívá antifibrotikum nintedanib, který zabraňuje progresi plicní fibrózy v důsledku inhibice receptoru VEGFR [45].

4. CÍRKULUJÍCÍ FIBROCYTY

Fibrocyty jsou mezenchymální buňky, které se podílejí na reparaci tkáně. Cirkulující fibrocyty představují progenitorové buňky fibroblastů a myofibroblastů a produkují proteiny ECM, konkrétně kolagen I. a III. typu, vimentin a fibronectin, a tím se pravděpodobně podílejí na patogenezi plicní fibrózy [46,47]. U pacientů s IPF byl popsán zvýšený počet cirkulujících fibrocytů v periferní krvi [48,49] a byl asociován s horší prognózou onemocnění [48].

5. MARKERY SOUVISEJÍCÍ S DYSFUNKCÍ IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Rozvoj plicní fibrózy není pravděpodobně způsoben přímo dysfunkcí buněk imunitního systému. Zdá se, že se podílí spíše na umožnění, podpoření nebo potlačení fibroproliferace, která je jinak řízená plicními fibroblasty [47].

Biomarkery asociované s vrozenou imunitou neslouží k diferenciální diagnostice IPF od jiných IPP, ale jejich koncentrace má vztah k průběhu nemoci a mortalitě. **Chemokín CCL-18 (C-C motif ligand 18)** je produkovan myeloidními buňkami a je markerem alternativní aktivace profibrotických makrofágů, které se podílejí na hojení poškozené tkáně s následným rozvojem fibrózy. Může být využit jako prognostický biomarker, protože jeho zvýšené sérové koncentrace CCL-18 koreluje se zvýšenou mortalitou a zrychlenou progresí onemocnění [50]. Studie Raghu et al. prognostickou funkci CCL-18 nepotvrdila [13]. Antifibrotický lék pirfenidon významně redukuje expresi CCL-18 na makrofázích [51]. Dalším proteinovým markerem jsou **chitináze podobné lektiny (z anglického "chitinase-3-like protein 1"; YKL-40)**. Jsou produkované alveolárními makrofágy a alveolárními epitelárními buňkami, které regulují proliferaci různých typů buněk. Zvýšené sérové hladiny YKL-40 byly popsány kromě IPF i u řady dalších IPP, například u azbestózy, hypersenzitivní pneumonitidy, sarkoidózy a u idiopatických intersticiálních pneumonií, konkrétně u nespecifické intersticiální pneumonie

(NSIP), intersticiální plicní pneumonie asociované s kouřením (SR-ILD) a kryptogenní organizující se pneumonie (COP) [52,53,54]. Sérová hladina YLK-40 může odrážet stupeň fibrotické aktivity. U IPF zůstávají sérové hladiny vysoké a jsou spojeny se zvýšenou mortalitou a s horším přežitím. U jiných idiopatických intersticiálních pneumonií (NSIP, SR-ILD, COP) mohou hladiny YLK-40 klesat, což je asociováno s lepší prognózou [54]. **S100A12 protein**, který aktivuje vrozenou i adaptivní imunitu, po navázání se na receptory pro konečné produkty pokročilé glykace (receptor for advanced glycation end product; RAGE). RAGE hrají protektivní úlohu v plicní tkáni. U pacientů s IPF pozorujeme významné snížení těchto receptorů, což je spojeno s maladaptivní přestavbou plicní tkáně [55]. Zvýšené sérové hladiny S100A12 proteinu jsou u pacientů s IPF asociovány se zhoršením celkového přežití, přežití bez nutnosti transplantace i přežití bez progresse onemocnění [56]. Do této skupiny markerů patří i **defenziny**, jedná se o proteiny s cytotoxickou a antimikrobiální aktivitou, které jsou produkovány zánětlivými a epitelárními buňkami. Sérové hladiny alfa defenzinu jsou zvýšeny u pacientů s IPF ve srovnání se zdravými jedinci. Jejich hladina koreluje s plicním funkčním zhoršením, mohou sloužit jako marker aktivity a závažnosti onemocnění [57].

Mezi biomarkery asociované s adaptivní imunitou odpovědí patří **protilátky proti proteinu tepelného šoku (anti-Hsp)**, které zvyšují produkci zánětlivých mediátorů. U zvířecích modelů s bleomycin indukovanou fibrózou chránila přítomnost Hsp-70 před zánětem a rozvojem fibrózy [58]. Anti-Hsp-70 autoprotilátky byly nalezeny také u pacientů s IPF a jejich zvýšené hladiny asociovány s rychlejší progresí onemocnění a mortalitou [59]. Zvýšená sérová hladina chemokinu **CXCL-13 (C-X-C motif ligand 13)** byla nalezena u pacientů s IPF a je asociována se zvýšenou mortalitou. Nejvyšší hladiny CXCL-13 byly nalezeny v séru pacientů s akutní exacerbací IPF a s plicní hypertenzí [60]. U pacientů s IPF byly taky nalezeny zvýšené sérové hladiny **anti-vimentinových protilátek**, které jsou spojeny se zhoršenou funkcí plic a prognózou [61]. **Interleukin-8 (IL-8)** je cytokin, který atrahuje neutrofile do místa zánětu. Také jeho sérová hladina je zvýšená u pacientů s IPF. Studie prokázaly negativní korelaci mezi hladinou IL-8 a parametry funkčního vyšetření plic (vitální kapacity nebo plicní difuze) [62] a s délkou přežití pacientů s IPF [56].

6. MIKROBIOM

Plicní mikrobiom je souhrnné označení pro mikroorganismy, které osídlují plicní tkáň. V pneumologii je tato oblast dlouhodobě zkoumána zejména v souvislosti s chronickou obstrukční plicní nemocí nebo cystickou fibrózou, kde hraje bakte-

riální infekce významnou roli v patogenezi těchto onemocnění [63]. I u pacientů s IPF byla v tekutině získané bronchoalveolární laváží (BAT) zjištěna zvýšená bakteriální nálož a významné rozdíly ve složení a diverzitě mikroorganismů ve srovnání se zdravými kontrolami [64,65]. Plicní mikrobiom může sloužit jako prognostický biomarker. Ukázalo se, že u pacientů, kteří v době stanovení diagnózy IPF měli v BAT zvýšenou bakteriální nálož, mělo onemocnění rychlejší progresi a měli zvýšené riziko mortality [64]. Práce Han et al. popisuje, že progresi IPF je asociována s přítomností specifických členů rodiny *Staphylococcus* a *Streptococcus* [66]. Interakce mezi vrozenou imunitou pacienta a plicním mikrobiomem může ovlivňovat patogenezi onemocnění. Alveolární poškození může být následkem působení většího množství méně rozmanitého mikrobiomu, které představuje přetrvávající stimulus, vedoucí k aktivaci imunitního systému. Zvýšená bakteriální nálož v BAT u pacientů s IPF je taky asociována s polymorfismem MUC5B rs35705950, který vede k vyšší expresi MUC5B a rozvoji IPF [64]. Znalost složení plicního mikrobiomu u pacientů s IPF by mohla pomoci odpovědět na otázky týkající se patogeneze onemocnění, sloužit jako prognostický biomarker a umožnit cílený terapeutický přístup [65].

7. BIOMARKERY SOUVISEJÍCÍ S GENOMEM, GENOVÝM POLYMORFISMEM A EPIGENETICKÝMI FAKTORY

Vzhledem ke skutečnosti, že mezi jednotlivými IPP byly pozorovány rozdíly v genomu jednotlivých pacientů [67], mohou mít biomarkery související s genomem svůj význam. Práce Selman et al. identifikovala genový podpis (charakteristickou expresi genů) pro IPF a HP (hypersenzitivní pneumonitidu). V genovém podpisu pro HP se nacházel zvýšený počet genů, které jsou funkčně asociovány se zánětem, zatímco v genovém podpisu pro IPF převažovaly geny pro epitelální buňky, myofibroblasty a tkáňovou remodelaci. Využití těchto biomarkerů by bylo užitečné zejména ve skupině nemocí s překryvem různých fenotypů, jako např. IPF a fibrotizující hypersenzitivní pneumonitida s fenotypem UIP [67].

Mucin 5B (MUC5B) je glykoprotein s vysokou molekulární vahou. Jeho funkce spočívá v ochraně a lubrikaci respirační, gastrointestinální a reprodukční orgánové soustavy [68]. Buňky produkující MUC5B se nacházejí také v distálních dýchacích cestách a v epitelích voštinovité přestavby, které jsou charakteristickým znakem IPF [69]. Studie autorů Seibold et al. z roku 2011 popisuje, že jednonukleotidový polymorfismus MUC5B rs35705950 promotoru na chromozomu 11 je asociován s vyšší expresí MUC5B a s rozvojem IPF a rodinné formy plicní fibrózy. Studie taky naznačuje, že neregulova-

ná exprese MUC5B může být součástí patogeneze IPF [70]. Podle studie Peljo et al. byl polymorfismus rs35705950 překvapivě asociován se sníženou a ne se zvýšenou úmrtností [71].

52-genový podpis (52-gene expression signature) charakteristická exprese genů pro určitou nemoc je odvozen z mononukleárních buněk v periferní krvi. Jedná se o 4 geny kódující kostimulační receptor T-lymfocytů CD28, inducibilní kostimulační receptor T-lymfocytů ICOS, pro lymfocyty specifickou protein-tyrosin kinázu LCK a IL-2 inducibilní T-buněčnou kinázu ITK, které patří do T-buněčné signální dráhy. 52-genový podpis lze využít jako prognostický biomarker. Down-regulace těchto genů u pacientů s IPF je silně asociována se zhoršením přežití [72]. Kombinace 52-genového podpisu a klinických prediktorů (věk, pohlaví a forsírovaná vitální kapacita) zvyšuje přesnost predikce prognózy onemocnění [72]. Změna v profilu 52-genového podpisu během antifibrotické terapie koreluje se signifikantním zlepšením plicních funkcí [73].

Toll-interacting protein (TOLLIP) je protein, který se podílí na regulaci vrozené imunity. Polymorfismus TOLLIP je asociován s IPF (polymorfismus rs5743890 sice chrání před rozvojem IPF, ale je asociován se zvýšenou mortalitou u pacientů s již stanovenou diagnózou IPF [74]). Podle studie PANTHER-IPF, která hodnotila účinnost trojkombinace prednisonu, azathioprinu a N-acetylcysteinu oproti placebo u IPF, prokázala souvislost mezi lepší terapeutickou odpovědí na N-acetylcystein u nositelů rs 5743890 polymorfismu TOLLIP [75].

Toll-like receptory se účastní rozvoje vrozené imunitní odpovědi, podílejí se na včasném rozpoznání antigenu a imunitní reakci. Polymorfismus Toll-like receptoru 3 (L412F) je příčinou pozměněné cytokinové produkce a vede k dysregulované proliferaci plicních fibroblastů u pacientů s IPF. Tento polymorfismus je asociován s rapidně progresujícím typem onemocnění a včasnou mortalitou [76].

Telomery jsou opakující se nekódující nukleotidové sekvence, které se nacházejí na konci chromozomů a chrání je před postupným zkracováním při buněčné replikaci. U IPF byly převážně zkoumány mutace genů u telomerázy reverzní transkriptázy (kódována TERT) a telomerázy RNA (kódována TERC), což jsou dvě hlavní komponenty telomeráz, které obnovují délku telomer. Mutace TERT a TERC a následně abnormální zkrácení telomer je rizikovým faktorem pro vznik IPF, negativně ovlivňuje vývoj onemocnění a může se spolupodílet na horší prognóze po transplantaci plic [77]. Detekce délky telomer by tedy mohla sloužit

jako prognostický marker. Ukázalo se, že kratší telomery predikují rychlejší pokles FVC u pacientů s IPF [78], ale souvislost mezi délkou telomer a odpovědí na léčbu pirfenidonem prokázána nebyla [78].

EPIGENETICKÉ FAKTORY

Vznik IPF je pravděpodobně výsledkem interakce mezi vlivy životního prostředí a genetickou výbavou jedince. Epigenetika představuje změny v expresi genů beze změn v samotné DNA. S rozvojem plicní fibrózy jsou asociovány tři epigenetické změny: nekódující RNA, histonová modifikace a methylace DNA [79]. Jako prognostické biomarkery u IPF by mohly sloužit nekódující ribonukleové kyseliny. Například Mi-R29 (mikro RNA), které prokazují antifibrotickou aktivitu, se podílejí na regulaci aktivity fibroblastů, regulují produkci a depozici ECM a epiteliálně-mezenchýmální přechod. Mi-R29 jsou v plicní tkáni u pacientů s IPF downregulovány [80], zatímco miR-154 s profibrotickými vlastnostmi jsou tam naopak upregulovány [81]. 5 mikro RNA bylo signifikantně upregulováno v plicní tkáni pacientů s IPF, u kterých byla pozorována rychlá progresse onemocnění, konkrétně miR-302c, miR-423-5p, miR-210, miR-376c, a miR-185. Jejich kombinace slouží jako maker závažnosti onemocnění a identifikuje pacienty s rychlou progresí IPF [82].

8. BIOMARKERY VE VYDECHOVANÉM VZDUCHU

Odběr vzorku vydechaného vzduchu představuje neinvazivní metodu pro následnou analýzu biomarkerů. V řadě studií byla popsána celá škála molekul s potenciálem diagnostického či prognostického biomarkeru. Bohužel, žádná z těchto molekul zatím nemá vlastnosti, které by umožnily jejich využití v běžné klinické praxi [83]. Vzorek vydechaného vzduchu je analyzován přímo v plynné fázi (frakční analýza vydechaného vzduchu (FeNO), analýza těkavých sloučenin) nebo po jeho ochlazení a kondenzaci ve formě kondenzátu vydechaného vzduchu (KVV) [84].

Frakčně exhalovaný oxid dusnatý (FeNO) je měřený převážně chemiluminiscencí. Oxid dusnatý (NO) má v dýchacích cestách vasodilatační, bronchodilatační účinky, prozánětlivé vlastnosti a jeho přítomnost je známkou oxidačního stresu. NO může také zvyšovat u pacientů s plicní fibrózou expresi profibrotických mediátorů, například transformujícího růstového faktoru beta (TGF- β) [85]. Zatímco FeNO ve vydechaném vzduchu pomůže odlišit mezi eozinofilním a neozinofilním zánetem u pacientů s bronchiálním astmatem [86], hladiny FeNO u IPF nevykazují konzistenci. Někte-

ré studie sice našly zvýšené hladiny vydechaného NO u pacientů s IPF [87,88], výsledky jiné studie tyto nálezy nepotvrdily [89]. Další studie popisují možnosti využití FeNO v diferenciální diagnostice IPP [90,91]. Větší potenciál u pacientů s IPF má měření **alveolárního oxidu dusnatého (C_{alv}NO)**. Metoda měření C_{alv}NO spočívá v měření FeNO při různých průtocích a následně se za pomoci matematických modelů odhaduje jeho koncentrace v alveolu [84]. Zvýšené koncentrace alveolárního NO ve vydechaném vzduchu byly popsány kromě IPF u hypersenzitivní pneumonitidy, azbestózy nebo postižení plicního intersticia při systémovém onemocnění pojiva [91,92]. Proto bude tento marker využitelný spíše k monitorování onemocnění než k jeho diferenciální diagnostice. V několika studiích bylo popsáno, že hodnoty C_{alv}NO jsou nepřímo úměrné parametrům plicních funkcí u fibrotických intersticiálních plicních procesů [93,94]. Práce Cameli et al. popisuje negativní korelaci C_{alv}NO s plicními funkcemi, která predikovala rychlejší progresi onemocnění při hodnotě C_{alv}NO \geq 9 ppb, přičemž hodnota C_{alv}NO \geq 6 ppb je spojena se zvýšeným rizikem úmrtí [94]. Hodnoty C_{alv}NO by mohly být použity jako možný prognostický biomarker u IPF [94].

Analýza těkavých organických sloučenin je dalším zdrojem biomarkerů ve vydechaném vzduchu u pacientů s IPF. Výhodou těkavých organických sloučenin je skutečnost, že tyto látky přecházejí z krve i intersticia nepoškozeny do vydechaného vzduchu, a tedy obsahují metabolity, které jsou více specifické pro fibrotický intersticiální proces [84]. Yamada et al. identifikovali **isopren** (diagnosticky nejpřesnější, ale pro IPF málo specifický) a **p-cymen**, který je slibným biomarkerem souvisejícím se závažností IPF [95]. Kanoh et al. zjistili zvýšené koncentrace ethanu ve vydechaném vzduchu u pacientů s IPP v porovnání se zdravými kontrolami. Zvýšené koncentrace ethanu (> 5,0 pmol/dL) u pacientů s IPF souvisely se zhoršenou prognózou nemoci, zatímco u pacientů s koncentrací ethanu nižší než 5,0 pmol/dL došlo ke stabilizaci nebo dokonce zlepšení stavu [96]. Gaugg et al. zkoumali obsah aminokyselin ve vydechaném vzduchu pomocí citlivé metody SESI-MS (secondary electrospray ionization-mass spectrometry). Prolin, 4-hydroxyprolin, alanin, valin, leucin/isoleucin a allysin byly signifikantně zvýšené u pacientů s IPF nezávisle na hodnotách plicních funkcí (FVC a DL_{CO}) [97].

Další metodou získání vzorku vydechaného vzduchu je jeho ochlazení ve vhodném sběrném zařízení ve formě tzv. **kondenzátu vydechaného vzduchu (KVV)**. KVV obsahuje kondenzované vodní výparu s malým množstvím netěkavých a ve vodě rozpustných těkavých molekul, které jsou analyzovány pomocí spektrometrie, chromatografie, imunoeseje nebo kapilární elektroforézy [98,99,100]. Tato metoda je atraktivní, protože je

neinvasivní a umožňuje různé způsoby zpracování a další analýzy vzorků. Její nevýhodou však je, že analyzuje tekutinu z dýchacích cest, která neodráží přesně intersticiální procesy [84]. Touto metodou byly analyzovány zejména látky související s oxidačním a nitrosativním stresem. V kondzátu vydechovaného vzduchu byly u pacientů popsány zvýšené hladiny H_2O_2 (reaktivního oxidačního agens) a **8-isoprostanu** (sloučeniny utvářené při lipidové peroxidaci) [101] a také **dušitanů** [102]. Zvýšená hladina 8-isoprostanu byla popsána v KVV i u jiných fibrotických IPP [103], stejně jako u bronchiálního astmatu a sarkoidózy [104,101]. Hladiny dalšího biomarkeru **malondialdehydu (MDA)**, který vzniká při lipidové peroxidaci, nebyly zvýšeny ve srovnání se zdravými kontrolami [105]. Vystavení organismu působení environmentálních faktorů hraje důležitou roli ve vývoji intersticiálních plicních nemocí. Corradi et al. zjistili zvýšené hladiny některých kovových prvků, považovaných za pneumotoxické (Cr, Ni, Si) ve všech skupinách pacientů s IPP (sarkoidóza, IPF, NSIP) [106].

Také cytokiny se významně podílejí na patogenezi IPF. Jedná se zejména o **tumor nekrotizující**

faktor alfa (TNF- α) a **transformující růstový faktor beta** (TGF- β). Práce Furukawy et al. analyzovala hladiny 42 cytokinů v KVV u pacientů s IPF, eozinofilní pneumonií a u zdravých kontrol. Hladiny cytokinů u těchto tří skupin se mezi sebou významně nelišily [89]. V práci Majewski et al. byly u pacientů s IPF nalezeny v KVV zvýšené hodnoty IL-33 (interleukinu 33), zatímco hodnoty IL-25 se nelišily ve srovnání se skupinou zdravých kontrol [107].

V několika pracích jsou také popisovány zvýšené hladiny **bioaktivních fosfolipidů** nebo jejich enzymů. Bioaktivní fosfolipidy se podílejí na migraci fibroblastů [108]. Jedná se konkrétně o bioaktivní fosfolipid **docosatetraenol**, jehož hladiny bývají v KVV u pacientů s IPF zvýšené [109].

DISKUZE

Diferenciální diagnostika IPP včetně IPF zůstává nelehkou výzvou pro plicní lékaře a vyžaduje mnohdy multidisciplinární přístup. I když se naše poznatky o patogenezi onemocnění v posledních desetiletích značně rozšířily, což vedlo k lepším te-

Tabulka 2: Modely klinické predikce u IPP a popis jejich funkce a výhod jejich kombinace oproti použití jednotlivých markerů samostatně [111]

Model (autor)	Popis
MMP1 a MMP7 [28]	Kombinace biomarkerů zvyšuje pozitivní i negativní prediktivní hodnotu pro diagnózu IPF ve srovnání s použitím biomarkerů samostatně.
KL-6 a MMP-7 [14]	Kombinace biomarkerů identifikuje s vyšší přesností pacienty s horším přežitím.
MMP7, ICAM-1, IL-8, VCAM-1, S100A12 [56]	Kombinace markerů koreluje s rizikem progresse onemocnění nebo mortalitou s vyšší přesností než jednotlivé markery samostatně.
Pohlaví, FVC%, DLCO% MMP7 [56]	Kombinace klinických markerů s biologickým koreluje s rizikem mortality s vyšší přesností.
FVC %, DLCO %, věk, změna FVC za 6 měsíců MMP7, SP-A, KL-6 [32]	Kombinace klinických a biologických markerů = prediktivní model přežití
Pohlaví, věk, plicní funkce (GAP model, gender, age, pulmonary function) [112]	Predikce progresse onemocnění u IPF, IPP u SOP, hypersenzitivní pneumonitidy
SP-D, MMP-7, osteopontin [42]	Kombinace markerů zvyšuje přesnost diagnózy IPF versus ne-IPF IPP.
miR-302c, miR-423, miR-210, miR-376C, miR-185 [82]	Kombinace markerů odlišuje pacienty s IPF s pomalou progresí od pacientů s rychlou progresí IPF.
52-genový podpis Pohlaví, věk, plicní funkce [73]	Kombinace markerů koreluje s prognózou onemocnění s vyšší přesností.

Zkratky: **MMP** – matrix metaloproteináza, **KL-6** – Krebs von den Lungen 6, **SP** – surfaktantový protein, **ICAM** – intercellular cell adhesion molecule (nitrobuněčná adhezivní molekula), **IL** – interleukin, **VCAM** – vascular cell adhesion molecule (adhezivní molekula cévních buněk), **FVC** – forsírovaná vitální kapacita, **DLCO** – difuzní kapacita plic pro oxid uhelnatý, **miR** – microRNA (mikro ribonukleová kyselina)

rapeutickým možnostem, všeobecná prognóza tohoto onemocnění zůstává špatná. Antifibrotická léčba sice zpomaluje zhoršování plicních funkcí, nicméně změny plicní tkáně, které jsou přítomny v době diagnózy, jsou již nevratné. Proto klíčovým krokem zůstává včasná diagnóza, která umožňuje též včasné nasazení léčby.

K včasné diagnóze onemocnění by mohly přispět právě molekulární biologické markery, které lze získat jednoduchou neinvazivní cestou (krevní sérum, vydechovaný vzduch). Zatím neexistuje biomarker, který by se rutinně celosvětově používal. Výjimku představuje Japonsko, kde se přibližně 20 let v klinické praxi používá KL-6 a surfaktantové proteiny A a D. U KL-6 je jeho sérová hladina ovlivněna genovým polymorfismem MUC5B, jehož frekvence je zvýšená právě v japonské populaci [19]. Z tohoto důvodu není možné validně srovnat jeho využití v klinické praxi v Japonsku a možné využití v našich podmínkách.

Rada studií popisuje potenciál u KL-6, SP-A, SP-D jako slibných prognostických biomarkerů, např. Hamai et al., Maher et al., Tzouvelekis et al. [14, 17, 29]. Multicentrická studie Raghu et al. z roku 2018 ale nepotvrdila prognostickou funkci ani u jednoho ze zkoumaných biomarkerů (CCL18, ICAM1, KL-6, SP-A, SP-D, MMP7) [13]. I proto jsou další prospektivní studie zaměřené na prognostické biomarkery velmi potřebné.

V současné době jsou pro pacienty s IPF k dispozici dva antifibrotické léky – pirfenidon a nintedanib, proto se v posledních letech některé studie, například Yoshikawa et al. [18], zaměřují na možnosti využití biomarkerů v monitorování léčebné odpovědi, a tak efektivnějšímu využití těchto léků.

Vzhledem k tomu, že dosud nebyl identifikován marker, který by byl dostatečně senzitivní, specifický a efektivně využitelný v běžné klinické praxi, zkoumá se i možnost využití jejich kombinace a kombinace biomarkerů s klinickými parametry s cílem zvýšit jejich prediktivní schopnost (některé příklady viz tabulka 2).

Značným přínosem, zejména pro sledování aktivity onemocnění nebo terapeutické odpovědi, by byl rozvoj metod, které analyzují biomarkery ve vydechovaném vzduchu, a to zejména z toho důvodu, že se jedná o neinvazivní a pro pacienta maximálně šetrný způsob odběru materiálu. I v této oblasti jsou další studie velmi žádané a opodstatněné.

I když jednotlivé biomarkery nebo prediktivní modely mají slibný potenciál, ve srovnání s biomarkery v onkologii, je možnost jejich využití v praxi u IPF pacientů omezená. Je potřeba dalších prospektivních studií s biomarkery, které by nám následně umožnily lépe porozumět patogenezi fibrózy u různých jednotek v rámci skupiny IPP, zpřesnit diagnostické postupy s využitím neinvazivních metod. Důležitým přínosem biomarkerů by byla i možnost rozdělení pacientů do podskupin, na základě predikce klinických projevů a vývoje

onemocnění. Tato skutečnost by mohla vést k časnému zahájení cílené léčby, jako například indikace k transplantaci plic u pacientů s agresivním profibrotickým fenotypem onemocnění nebo u onemocnění, o kterém na základě biomarkerů víme, že nebude reagovat na antifibrotickou terapii.

ZÁVER

I když jednotlivé biomarkery mají slibný potenciál, možnost jejich využití v rámci diagnostiky intersticiálních plicních procesů zůstává omezená. Nespornou výhodou většiny biomarkerů však zůstává možnost jejich neinvazivního vyšetření.

LITERATURA

1. Raghu G, Collard HR, Egan JJ et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: Idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183(6):788–824.
2. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med* 2018; 198(5):e44–e68.
3. Sakamoto K, Taniguchi H, Kondoh Y et al. Acute exacerbation of IPF following diagnostic bronchoalveolar lavage procedures. *Respir Med* 2012; 106(3):436–442.
4. Ryerson CJ, Urbani TH, Richeldi L et al. Prevalence and prognosis of unclassifiable interstitial lung disease. *Eur Respir J* 2013; 42(3):750–757.
5. Selman M, King TE, Pardo A. American Thoracic Society, European Respiratory Society, American College of Chest Physicians. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001; 134(2):136–151.
6. Fernandez IE, Eickelberg O. The Impact of TGF- on Lung Fibrosis: From Targeting to Biomarkers. *Proc Am Thorac Soc* 2012; 9(3):111–116.
7. O'Dwyer DN, Ashley SL, Moore BB. Influences of innate immunity, autophagy, and fibroblast activation in the pathogenesis of lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2016; 311(3):L590–601.
8. Schafer MJ, White TA, Iijima K et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* 2017; 8:14532.
9. Kaarteenaho R, Lappi-Blanco E. Tissue is an issue in the search for biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2015; 8:3.
10. Tzouvelekis A, Kouliatsis G, Anevlavis S, Bouros D. Serum biomarkers in interstitial lung diseases. *Respir Res* 2005; 6:78.
11. Hermans C, Bernard A. Lung Epithelium-specific Proteins: Characteristics and Potential Applications as Markers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(2):646–678.
12. Ohshimo S, Yokoyama A, Hattori N, Ishikawa N, Hirasawa Y, Kohno N. KL-6, a human MUC1 mucin, promotes proliferation and survival of lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338(4):1845–1852.
13. Raghu G, Richeldi L, Jagerschmidt A et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prospective, Case-Controlled Study of Natural History and Circulating Biomarkers. *Chest* 2018; 154(6):1359–1370.
14. Hamai K, Iwamoto H, Ishikawa N et al. Comparative Study of Circulating MMP-7, CCL18, KL-6, SP-A, and SP-D as Disease Markers of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Dis Markers* 2016; 2016:4759040.

15. Yokoyama A, Kondo K, Nakajima M et al. Prognostic value of circulating KL-6 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 2006; 11(2):164–168.
16. Collard HR, Calfee CS, Wolters PJ et al. Plasma biomarker profiles in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 299(1):L3–7.
17. Maher T, Jenkins G, Cotti V et al. Blood biomarkers predicting disease progression in patients with IPF: data from the INMARK trial. Prezentováno na kongresu Evropské respirační společnosti v Madridu konaném ve dnech 28. 9.–2. 10. 2019. Abstrakt v tisku.
18. Yoshikawa T, Otsuk M, Ikeda K et al. Change in serum surfactant protein (SP)-A, SP-D and KL-6 predict the therapeutic effect of antifibrotic drugs in IPF. Prezentováno na kongresu Evropské respirační společnosti v Madridu konaném ve dnech 28. 9.–2. 10. 2019. Abstrakt v tisku.
19. Horimasu Y, Hattori N, Ishikawa N et al. Different MUC1 gene polymorphisms in German and Japanese ethnicities affect serum KL-6 levels. *Respir Med* 2012; 106(12):1756–1764.
20. Chiba H, Otsuka M, Takahashi H. Significance of molecular biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis: A mini review. *Respiratory Investigation* 2018; 56(5):384–391.
21. De Lara LV, Becerril C, Montaña M et al. Surfactant components modulate fibroblast apoptosis and type I collagen and collagenase-1 expression. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2000; 279(5):L950–L957.
22. Honda Y, Kuroki Y, Matsuura E et al. Pulmonary surfactant protein D in sera and bronchoalveolar lavage fluids. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(6):1860–1866.
23. Günther A, Schmidt R, Nix F et al. Surfactant abnormalities in idiopathic pulmonary fibrosis, hypersensitivity pneumonitis and sarcoidosis. *Eur Respir J* 1999; 14(3):565–573.
24. Wang K, Ju Q, Cao J, Tang W, Zhang J. Impact of serum SP-A and SP-D levels on comparison and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96(23):e7083.
25. Doubková M, Karpíšek M, Mazoch J, Skříčková J, Doubek M. Prognostic significance of surfactant protein A, surfactant protein D, Clara cell protein 16, S100 protein, trefoil factor 3, and prostatic secretory protein 94 in idiopathic pulmonary fibrosis, sarcoidosis, and chronic pulmonary obstructive disease. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2016; 33(3):224–234.
26. Oikonomidi S, Kostikas K, Tsilioni I, Tanou K, Kiroopoulos KIG and TS. Matrix Metalloproteinases in Respiratory Diseases: From Pathogenesis to Potential Clinical Implications. *Current Medicinal Chemistry* 2009; 16(10):1214–1228.
27. McKleroy W, Lee T-H, Atabai K. Always cleave up your mess: targeting collagen degradation to treat tissue fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013; 304(11):L709–L721.
28. Rosas IO, Richards TJ, Konishi K et al. MMP1 and MMP7 as Potential Peripheral Blood Biomarkers in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS Med* 2008; 5(4):e93.
29. Tzouvelekis A, Herazo-Maya JD, Slade M et al. Validation of the prognostic value of MMP-7 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Respirology* 2017; 22(3):486–493.
30. Morais A, Beltrão M, Sokhatska O et al. Serum metalloproteinases 1 and 7 in the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial pneumonias. *Respir Med* 2015; 109(8):1063–1068.
31. Bauer Y, White ES, de Bernard S et al. MMP-7 is a predictive biomarker of disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *ERJ Open Res* 2017; 3(1):00074–2016.
32. Song JW, Do KH, Jang SJ, Colby TV, Han S, Kim DS. Blood Biomarkers MMP-7 and SP-A: Predictors of Outcome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* 2013; 143(5):1422–1429.
33. Karsdal MA, Krarup H, Sand JMB et al. Review article: the efficacy of biomarkers in chronic fibroproliferative diseases – early diagnosis and prognosis, with liver fibrosis as an exemplar. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2014; 40(3):233–249.
34. Jenkins RG, Simpson JK, Saini G et al. Longitudinal change in collagen degradation biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis from the prospective, multicentre PROFILE study. *Lancet Respir Med* 2015; 3(6):462–472.
35. Aumiller V, Strobel B, Romeike M, Schuler M, Stierstorfer BE, Kreuz S. Comparative analysis of lysyl oxidase (like) family members in pulmonary fibrosis. *Sci Rep* 2017; 7(1):149.
36. Chien JW, Richards TJ, Gibson KF et al. Serum lysyl oxidase-like 2 levels and idiopathic pulmonary fibrosis disease progression. *Eur Respir J* 2014; 43(5):1430–1438.
37. Raghu G, Brown KK, Collard HR et al. Efficacy of simtuzumab versus placebo in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a randomised, double-blind, controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir Med* 2017; 5(1):22–32.
38. Izuhara K, Conway SJ, Moore BB et al. Roles of Periostin in Respiratory Disorders. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193(9):949–956.
39. Okamoto M, Hoshino T, Kitasato Y et al. Periostin, a matrix protein, is a novel biomarker for idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J* 2011; 37(5):1119–1127.
40. Ohta S, Okamoto M, Fujimoto K et al. Efficacy of monomeric periostin as a biomarker for idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS ONE* 2017; 12(3):e0174547.
41. Pardo A, Gibson K, Cisneros J et al. Up-Regulation and Profibrotic Role of Osteopontin in Human Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS Med* 2005; 2(9):e251.
42. White ES, Xia M, Murray S et al. Plasma Surfactant Protein-D, Matrix Metalloproteinase-7, and Osteopontin Index Distinguishes Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Other Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 194(10):1242–1251.
43. Guiot J, Bondue B, Henket M et al. Raised serum levels of IGFBP-1 and IGFBP-2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med* 2016; 16(1):86.
44. Ando M, Miyazaki E, Ito T et al. Significance of Serum Vascular Endothelial Growth Factor Level in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung* 2010; 188(3):247–252.
45. Wollin L, Wex E, Pautsch A et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2015; 45(5):1434–1445.
46. Gomperts BN, Strieter RM. Fibrocytes in lung disease. *J Leuko Biol* 2007; 82(3):449–456.
47. Desai O, Winkler J, Minasyan M, Herzog EL. The Role of Immune and Inflammatory Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front Med (Lausanne)* 2018; 5:43.
48. Moeller A, Gilpin SE, Ask K et al. Circulating fibrocytes are an indicator of poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179(7):588–594.
49. Alhamad EH, Shakoob Z, Al-Kassimi FA et al. Rapid detection of circulating fibrocytes by flowcytometry in idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Thorac Med* 2015; 10(4):279.
50. Prasse A, Probst C, Bargagli E et al. Serum CC-Chemokine Ligand 18 Concentration Predicts Outcome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179(8):717–723.
51. Saito Y, Azuma A, Matsuda K, Kamio K, Abe S, Gemma A. Pirfenidone exerts a suppressive effect on CCL18 expression in U937-derived macrophages partly by inhibiting STAT6 phosphorylation. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2016; 38(6):464–471.
52. Väänänen T, Lehtimäki L, Vuolteenaho K et al. Glycoprotein YKL-40 Levels in Plasma Are Associated with Fibrotic Changes on HRCT in Asbestos-Exposed Subjects. *Mediators Inflamm* 2017; 2017:1797512.
53. Long X, He X, Ohshimo S et al. Serum YKL-40 as predictor of outcome in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 2017; 49(2):1501924.

54. Korthagen NM, van Moorsel CHM, Barlo NP et al. Serum and BALF YKL-40 levels are predictors of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2011; 105(1):106-113.
55. Queisser MA, Kouri FM, Königshoff M et al. Loss of RAGE in pulmonary fibrosis: molecular relations to functional changes in pulmonary cell types. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 39(3):337-345.
56. Richards TJ, Kaminski N, Baribaud F et al. Peripheral Blood Proteins Predict Mortality in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185(1):67-76.
57. Mukae H, Iiboshi H, Nakazato M et al. Raised plasma concentrations of α -defensins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 2002; 57(7):623-628.
58. Tanaka K-I, Tanaka Y, Namba T, Azuma A, Mizushima T. Heat shock protein 70 protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Biochem Pharmacol* 2010; 80(6):920-931.
59. Kahloon RA, Xue J, Bhargava A et al. Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis with Antibodies to Heat Shock Protein 70 Have Poor Prognoses. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187(7):768-775.
60. Vuga LJ, Tedrow JR, Pandit KV et al. C-X-C Motif Chemokine 13 (CXCL13) Is a Prognostic Biomarker of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189(8):966-974.
61. Li FJ, Surlia R, Li H et al. Autoimmunity to Vimentin Is Associated with Outcomes of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Immunol* 2017; 199(5):1596-1605.
62. Tsoutsou PG, Gourgoulanis KI, Petinaki E et al. Cytokine levels in the sera of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2006; 100(5):938-945.
63. Faner R, Sibila O, Agustí A et al. The microbiome in respiratory medicine: current challenges and future perspectives. *Eur Respir J* 2017; 49(4):1602086.
64. Molyneux PL, Cox MJ, Willis-Owen SA et al. The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 190(8):906-913.
65. Salisbury ML, Han MK, Dickson RP, Molyneux PL. Microbiome in interstitial lung disease: from pathogenesis to treatment target. *Curr Opin Pulm Med* 2017; 23(5):404-410.
66. Han MK, Zhou Y, Murray S et al. Lung microbiome and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis: an analysis of the COMET study. *The Lancet Respiratory Medicine* 2014; 2(7):548-556.
67. Selman M, Pardo A, Barrera L et al. Gene Expression Profiles Distinguish Idiopathic Pulmonary Fibrosis from Hypersensitivity Pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(2):188-198.
68. Sharma P, Dudus L, Nielsen PA et al. MUC5B and MUC7 are differentially expressed in mucous and serous cells of submucosal glands in human bronchial airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19(1):30-37.
69. Seibold MA, Smith RW, Urbanek C et al. The idiopathic pulmonary fibrosis honeycomb cyst contains a mucociliary pseudostratified epithelium. *PLoS One* 2013; 8(3):e58658.
70. Seibold MA, Wise AL, Speer MC et al. A Common MUC5B Promoter Polymorphism and Pulmonary Fibrosis. *N Eng J of Med* 2011; 364(16):1503-1512.
71. Peljto AL, Zhang Y, Fingerlin TE et al. Association Between the MUC5B Promoter Polymorphism and Survival in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *JAMA* 2013; 309(21):2232-2239.
72. Herazo-Maya JD, Noth I, Duncan SR et al. Peripheral Blood Mononuclear Cell Gene Expression Profiles Predict Poor Outcome in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Sci Transl Med* 2013; 5(205):205ra136.
73. Herazo-Maya JD, Sun J, Molyneux PL et al. Validation of a 52-gene risk profile for outcome prediction in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: an international, multicentre, cohort study. *Lancet Respir Med* 2017; 5(11):857-868.
74. Noth I, Zhang Y, Ma S-F et al. Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med* 2013; 1(4):309-317.
75. Oldham JM, Ma S-F, Martinez FJ et al. TOLLIP, MUC5B, and the Response to N-Acetylcysteine among Individuals with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 192(12):1475-1482.
76. O'Dwyer DN, Armstrong ME, Trujillo G et al. The Toll-like Receptor 3 L412F Polymorphism and Disease Progression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188(12):1442-1450.
77. Bilgili H, Białas AJ, Górski P, Piotrowski WJ. Telomere Abnormalities in the Pathobiology of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J Clin Med* 2019; 8(8):1232.
78. Dressen A, Abbas AR, Cabanski C et al. Analysis of protein-altering variants in telomerase genes and their association with MUC5B common variant status in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a candidate gene sequencing study. *Lancet Respir Med* 2018; 6(8):603-614.
79. Tzouveleki A, Kaminski N. Epigenetics in idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochem Cell Biol* 2015; 93(2):159-170.
80. Cushing L, Kuang P, Lü J. The role of miR-29 in pulmonary fibrosis. *Biochem Cell Biol* 2014; 93(2):109-118.
81. Milosevic J, Pandit K, Magister M et al. Profibrotic Role of miR-154 in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 47(6):879-887.
82. Oak SR, Murray L, Herath A et al. A Micro RNA Processing Defect in Rapidly Progressing Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS One* 2011; 6(6):e21253.
83. Krauss E, Froehler M, Degen M et al. Exhalative Breath Markers Do Not Offer for Diagnosis of Interstitial Lung Diseases: Data from the European IPF Registry (eurIPFreg) and Biobank. *J Clin Med* 2019; 8(5):643.
84. Hayton C, Terrington D, Wilson AM, Chaudhuri N, Leonard C, Fowler SJ. Breath biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *Respir Res* 2019; 20(1):7.
85. Hsu Y-C, Wang L-F, Chien YW. Nitric oxide in the pathogenesis of diffuse pulmonary fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine* 2007; 42(5):599-607.
86. Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC et al. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FeNO) for Clinical Applications. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184(5):602-615.
87. Cameli P, Barbagli E, Rottoli P. Exhaled nitric oxide is not increased in pulmonary sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2016; 33(1):39-40.
88. Zhao Y, Cui A, Wang F et al. Characteristics of pulmonary inflammation in combined pulmonary fibrosis and emphysema. *Chin Med J* 2012; 125(17):3015-3021.
89. Furukawa K, Sugiura H, Matsunaga K et al. Increase of nitrosative stress in patients with eosinophilic pneumonia. *Respir Res* 2011; 12(1):81.
90. Guilleminault L, Saint-Hilaire A, Favelle O et al. Can exhaled nitric oxide differentiate causes of pulmonary fibrosis? *Respir Med* 2013; 107(11):1789-1796.
91. Cameli P, Barbagli E, Bergantini L et al. Evaluation of multiple flows exhaled nitric oxide in idiopathic and non-idiopathic interstitial lung disease. *J Breath Res* 2019; 13(2):026008.
92. Sandrini A, Johnson AR, Thomas PS, Yates DH. Fractional exhaled nitric oxide concentration is increased in asbestosis and pleural plaques. *Respirology* 2006; 11(3):325-329.
93. Kotecha J, Shulgina L, Sexton DW et al. Plasma vascular endothelial growth factor concentration and alveolar nitric oxide as potential predictors of Disease progression and mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Med* 2016; 5(9):80.
94. Cameli P, Bergantini L, Salvini M et al. Alveolar concentration of nitric oxide as a prognostic biomarker in idiopathic pulmonary fibrosis. *Nitric Oxide* 2019; 89:41-45.
95. Yamada Y, Yamada G, Otsuka M et al. Volatile Organic Compounds in Exhaled Breath of Idiopathic Pulmonary

- Fibrosis for Discrimination from Healthy Subjects. *Lung* 2017; 195(2):247–254.
96. Kanoh S, Kobayashi H, Motoyoshi K. Exhaled Ethane: An In Vivo Biomarker of Lipid Peroxidation in Interstitial Lung Diseases. *CHEST* 2005; 128(4):2387–2392.
 97. Gaugg MT, Engler A, Bregy L et al. Molecular breath analysis supports altered amino acid metabolism in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 2019; 24(5):437–444.
 98. Effros RM, Hoagland KW, Boshous M et al. Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(5):663–669.
 99. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26(3):523–548.
 100. Greguš M, Foret F, Kindlová D et al. Monitoring of ionic content of exhaled breath condensate in various respiratory diseases by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *J Breath Res* 2015; 9:027107.
 101. Psathakis K, Mermigkis D, Papatheodorou G et al. Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Clin Investig* 2006; 36(5):362–367.
 102. Rihák V, Zatloukal P, Chládková J, Zimulová A, Havlínová Z, Chládek J. Nitrite in exhaled breath condensate as a marker of nitrosative stress in the airways of patients with asthma, COPD, and idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Lab Anal* 2010; 24(5):317–322.
 103. Chow S, Thomas PS, Malouf M, Yates DH. Exhaled breath condensate (EBC) biomarkers in pulmonary fibrosis. *J Breath Res* 2012; 6(1):016004.
 104. Ferraro V, Carraro S, Bozzetto S, Zanconato S, Baraldi E. Exhaled biomarkers in childhood asthma: old and new approaches. *Asthma Res Pract* 2018; 4:9.
 105. Bartoli M, Novelli F, Costa F et al. Malondialdehyde in Exhaled Breath Condensate as a Marker of Oxidative Stress in Different Pulmonary Diseases. *Mediators of Inflammation* 2011; 2011:891752.
 106. Corradi M, Acampa O, Goldoni M et al. Metallic elements in exhaled breath condensate of patients with interstitial lung diseases. *J Breath Res* 2009; 3(4):046003.
 107. Majewski S, Tworek D, Szewczyk K et al. Epithelial alarmin levels in exhaled breath condensate in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: A pilot study. *The Clinical Respiratory Journal* 2019; 13(10):652–656.
 108. Tager AM, LaCamera P, Shea BS et al. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med* 2008; 14(1):45–54.
 109. Montesi SB, Mathai SK, Brenner LN et al. Docosahexaenoic acid LPA is elevated in exhaled breath condensate in idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med* 2014; 14:5.
 110. De Lauretis A, Renzoni EA. Molecular biomarkers in interstitial lung diseases. *Mol Diagn Ther* 2014; 18(5): 505–522.
 111. Drakopanagiotakis F, Wujak L, Wygrecka M, Markart P. Biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Matrix Biol* 2018; 68–69:404–421.
 112. Ryerson CJ, Vittinghoff E, Ley B, Lee JS, Mooney JJ, Jones KD et al. Predicting survival across chronic interstitial lung disease: the ILD-GAP model. *Chest* 2014; 145: 723–728.

Došlo: 9. 11. 2019

Adresa:

MUDr. Marianna Štefániková
 Klinika nemocí plicních a tuberkulózy
 Fakultní nemocnice Brno, pracoviště Bohunice
 Jihlavská 20
 625 00 Brno
 Česká republika
 e-mail: stefanikova.marianna@fnbrno.cz

4.2. Prognostic significance of surfactant protein A, surfactant protein D, Clara cell protein 16, S100 protein, trefoil factor 3, and prostatic secretory protein 94 in idiopathic pulmonary fibrosis, sarcoidosis, and chronic pulmonary obstructive disease (Doubková M, Pospíšil Z, Skříčková J, Doubek M. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2016; 33(3): 224-234)

ORIGINAL ARTICLE: CLINICAL RESEARCH

SARCOIDOSIS VASCULITIS AND DIFFUSE LUNG DISEASES 2016; 33: 224-234

© Mattioli 1885

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF SURFACTANT PROTEIN A, SURFACTANT PROTEIN D, CLARA CELL PROTEIN 16, S100 PROTEIN, TREFOIL FACTOR 3, AND PROSTATIC SECRETORY PROTEIN 94 IN IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS, SARCOIDOSIS, AND CHRONIC PULMONARY OBSTRUCTIVE DISEASE

Martina Doubková¹, Michal Karpíšek², Jiří Mazoch², Jana Skříčková³, Michael Doubek³

¹Department of Pneumology and Phthisiology, Faculty of Medicine and University Hospital, Brno, Czech Republic; ²Analytical Testing Service, BioVendor, Brno, Czech Republic; ³Central European Institute of Technology (CEITEC), Masaryk University, Brno, Czech Republic

ABSTRACT. *Background:* Identification of serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) biomarkers may facilitate diagnosis and prognostication in various lung disorders. *Objective:* Serum and BALF levels of surfactant protein A (SP-A), surfactant protein D (SP-D), Clara cell protein 16 (CC16), S100 protein, trefoil factor 3 (TFF3), and prostatic secretory protein 94 (PSP94) were evaluated in 94 consecutive patients (idiopathic pulmonary fibrosis (IPF; n=18), sarcoidosis (n=25), chronic obstructive pulmonary disease (COPD; n=51)), and in 155 healthy controls. *Methods:* Biomarkers were measured at diagnosis and compared with disease characteristics. Both uniparametric and multiparametric analyses were used. *Results:* Seven significant correlations were found: 1) BALF PSP94 level correlated with prognosis of sarcoidosis (P=0.035); 2) BALF SP-D level with pulmonary functions in IPF (P=0.032); 3) BALF SP-D and TFF3 with IPF mortality (P=0.049 and 0.017, respectively); 4) serum TFF3 level with COPD mortality (P=0.006); 5) serum SP-A with pulmonary functions impairment in IPF (P=0.011); 6) serum SP-D level was associated with HRCT interstitial score in IPF (P=0.0346); and 7) serum SP-A was associated with staging of COPD according to spirometry (P<0.001). Moreover, our analysis showed that some biomarker levels differed significantly among the diseases: 1) BALF SP-D level differed between sarcoidosis and IPF; 2) serum SP-A level differed among IPF, sarcoidosis, COPD and was also different from healthy controls; 3) serum S100A6, S100A11 levels differed among IPF, sarcoidosis, COPD from healthy controls 4) serum SP-D, CC16, TFF-3 levels distinguished IPF patients from healthy controls; and 5) serum CC16, TFF3, PSP94 distinguished COPD patients from healthy controls. Our study shows that some of selected biomarkers should have prognostic value in the analysed lung disorders. On the other hand, these biomarkers do not appear to be unequivocally suitable for differential diagnosis of these disorders. (*Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2016; 33: 224-234)

KEY WORDS: surfactant protein A, surfactant protein D, Clara cell protein 16, S100 protein, trefoil factor 3, prostatic secretory protein 94, idiopathic pulmonary fibrosis, sarcoidosis, chronic pulmonary obstructive disease

Received: 30 March 2015
Accepted after revision: 18 September 2015
Correspondence: Martina Doubková, MD
Department of Pneumology and Phthisiology
Faculty of Medicine and University Hospital
Jihlavská 20
625 00 Brno - Czech Republic
Fax: +420 532 232 554
E-mail: doubkovamartina@seznam.cz

INTRODUCTION

Biomarkers are defined as characteristics that are objectively measured and evaluated as indicators of normal biologic processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention (1). Various biomarkers have been tested in many pneumological disorders, including idiopathic

pulmonary fibrosis (IPF) (2), sarcoidosis (3), and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (4). There are currently no biomarkers broadly accepted and established for routine clinical application in pneumology. Therefore, novel and possibly more specific biomarkers should be tested. Surfactant protein A (SP-A), surfactant protein D (SP-D), Clara cell protein 16 (CC16), S100 protein, trefoil factor 3 (TFF3), and beta microseminoprotein/prostatic secretory protein 94 (PSP94) belong to these potentially suitable biomarkers. SP-A and SP-D are mainly synthesized in type II pneumocytes (5,6), and CC16 in Clara cells 16 but also in other extrapulmonary epithelial cell. CC16 is a protein with molecular weight of approximately 16 kd (7). S100 proteins are calcium-binding proteins. This protein complex was termed "S100" because of its solubility in 100% ammonium sulfate solution (8,9). PSP94, an unglycosylated protein of 94 amino acids, is one of the predominating proteins in the secretion of the human prostate gland. PSP is a member of immunoglobulin binding factor family that binds human IgG (10, 11, 12). TFF3 is a member of the trefoil factor family, which includes three members: TFF1 also called pS2, TFF2 or spasmodic peptide (SP) and TFF3 or intestinal trefoil factor (ITF) (13, 14, 15).

Serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) levels of SP-A, SP-D, CC16, S100, TFF3, PSP94 could indicate worse prognosis of IPF, sarcoidosis and COPD. Moreover, PSP94 and TFF3 have never been evaluated in BALF in these disorders. Therefore, the aim of this study was to evaluate the diagnostic and prognostic value of SP-A, SP-D, CC16, S100A6, S100A11, PSP94, TFF3 levels (measured in both BALF and serum) in IPF, sarcoidosis and COPD.

PATIENTS AND METHODS

Study subjects

All consecutive patients with IPF (n=18), sarcoidosis (n=25) and COPD (n=51), who were diagnosed and followed at the Department of Pulmonary Medicine of the University Hospital Brno, Czech Republic, since 2010, were included in this study. The IPF diagnosis was based on current American Thoracic Society/European Respiratory Society (ATS/ERS) guidelines (typical histological or radiologic

pattern of interstitial pneumonia) (2). The diagnosis of sarcoidosis was based on clinical examination, laboratory tests, pulmonary function test, radiologic methods, bronchoscopy with bronchoalveolar lavage, and histological finding of granuloma according to the World Association for Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders (WASOG) (3). The diagnosis of COPD was defined according to the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) criteria (4).

Healthy subjects (n=155) served as a control group in order to assess the discriminative value of the serum markers. "Health" was confirmed using a medical checklist, the healthy subjects were blood donors. Clinical and demographic characteristics of the patient cohort are summarised in Table 1.

The study was approved by the independent ethic committee and all subjects signed informed consent.

Pulmonary function tests

Pulmonary function tests were performed in accordance with ERS recommendations (16, 17, 18). Forced vital capacity (FVC), forced expiratory volume in 1 second (FEV1) and diffusing capacity for carbon monoxide (DL_{CO}) were measured. All values were stated as percentage of predicted value.

Radiologic imaging methods

High-resolution computed tomography (HRCT) alveolar (0-5) and interstitial scores (0-5) were assessed in IPF patients according to the criteria published by Gay *et al.* (19). Chest X-ray was used to divide sarcoidosis into 5 classical stages (0 - normal X-ray; I - presence of bilateral hilar lymphadenopathy; II - bilateral hilar lymphadenopathy and parenchymal infiltrates; III - parenchymal infiltrates; IV - pulmonary fibrosis (3)).

Biomarkers measurement

Biomarkers were measured at diagnosis and compared with disease characteristics. Concentrations of SP-A, SP-D, CC16, S100A6, S100A11, PSP94 and TFF3 in serum and BALF samples were assessed by commercially available colorimetric sandwich ELISA kits (Biovendor - Laboratorni

Table 1. Basic clinical and demographic characteristics of analysed cohorts

	IPF	Sarcoidosis	COPD	Healthy controls
Number	18 patients	25 patients	51 patients	155 patients
Age, yr	68.5	38	65	40
F/M (gender)	8/10 patients	20/5 patients	15/36 patients	66/89 patients
Smoker	1 patients	3 patients	17 patients	ND
Non smoker	11 patients	21 patients	2 patients	ND
Ex-smoker	6 patients	1 patient	32 patients	ND
FVC% predicted (median)	68	91	51	ND
FEV1% predicted (median)	85	92	37	ND
DLco% predicted (median)	52	80.5	ND	ND
HRCT alveolar score - mean	1.16	ND	ND	ND
HRCT interstitial score - mean	2.5			
Stage of sarcoidosis (according to X-ray) – number patients	ND	I: 12, II: 12 III: 1, IV: 0	ND	ND
Stage of COPD according to GOLD – number patients	ND	ND	I: 3, II: 7, III: 7, IV: 34	ND
Spontaneous resolution	0	15 patients	0	NA
Deaths	6 patients	0	25 patients	ND

COPD – chronic obstructive pulmonary disease, DLco – diffuse lung capacity, F – female, FEV1% – forced expiratory volume in 1 s, FVC – forced vital capacity, GOLD (*Global Initiative for Chronic Obstructive lung disease* stage): stage I (FEV1/FVC < 0.70, FEV1 ≥ 80% normal), stage II (FEV1/FVC < 0.70, FEV1 50–79% normal), stage III (FEV1/FVC < 0.70, FEV1 30–49% normal), stage IV FEV1/FVC < 0.70, FEV1 < 30% normal), HRCT – high resolution computed tomography, IPF – idiopathic pulmonary fibrosis, NA – not applicable; ND – not done

medicina, Brno, Czech Republic) according to the manufacturer's protocol. Serial dilution linearity testing was performed to select the proper BALF sample dilution with assay buffer for determination of S100A6 (1:500), S100A11 (1:10), PSP94 (1:100) and TFF-3 (1:5).

Statistical analysis

The One-Way ANOVA and Mann-Whitney tests were used to compare results among the analysed groups of patients. The Spearman rank test was used to assess correlations of two variables. Uniparametric and multiparametric analyses were performed as well. Differences were considered significant when P-value was < 0.05. Laboratory data were expressed as mean or median +/-SD (standard deviation). All statistical analyses were performed using SigmaPlot software, version 11.2 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

RESULTS

Biomarkers were analysed in 18 IPF patients, 25 sarcoidosis patients, 51 COPD patients, and 155

healthy controls. Clinical characteristics of this cohort are summarised in Table 1. Median age was 68.5 (49–79) years in IPF, 38 (26–68) years in sarcoidosis, and 65 (49–92) years in COPD.

Regarding evaluated biomarkers, seven significant correlations were found: 1) BALF PSP94 level correlated with prognosis of sarcoidosis (spontaneous disease resolution) (P=0.035); 2) BALF SP-D level correlated with pulmonary functions in IPF (P=0.032); 3) BALF SP-D and TFF3 with IPF mortality (P=0.049 and 0.017, respectively); 4) serum TFF3 level with COPD mortality (P=0.006); 5) serum SP-A correlated with pulmonary functions impairment in IPF (P=0.011); 6) serum SP-D level was associated with HRCT interstitial score in IPF (P=0.0346); and 7) serum SP-A was associated with stages of COPD according to spirometry (0.011). Moreover, our analysis has showed that some biomarker levels differed significantly among the diseases: 1) BALF SP-D level differed between sarcoidosis and IPF; 2) serum SP-A level differed among IPF, sarcoidosis, COPD and was also different from healthy controls; 3) serum S100A6, S100A11 levels differed between IPF, sarcoidosis, COPD and healthy controls; 4) serum SP-D, CC16, TFF-3 levels distinguished IPF patients from healthy controls;

and 5) serum CC16, TFF3, PSP94 distinguished COPD patients from healthy controls. There were no statistically significant differences between BALF biomarkers' levels and the extent of diseases in sarcoidosis and IPF (measured by chest X-ray in sarcoidosis, and by alveolar and interstitial HRCT score

in IPF), and between serum biomarkers' levels and disease stage in sarcoidosis. Moreover, we found no statistically significant differences in the serum and BALF biomarkers' levels in treated and untreated patients with IPF and sarcoidosis. All these results are summarized in Tables 2-11 and Figures 1-14.

Table 2. Serum concentrations of analysed markers in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), sarcoidosis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and healthy controls

	SP-A ng/ml (median)	SP-D ng/ml (median)	S100A6 ng/ml (median)	S100A11 ng/ml (median)	CC16 ng/ml (median)	TFF-3 ng/ml (median)	PSP94 ng/ml (median)
IPF	98.107	623.1	123.376	24.29	17.615	1.248	17.203
Sarcoidosis	40.611	148.155	118.367	14.546	6.043	0.796	11.111
COPD	65.023	155.175	75.136	10.38	3.584	1.416	19.016
Healthy controls	17.426	155.119	54.869	5.597	5.821	0.681	13.492

CC16 – clara cells 16, COPD – chronic obstructive pulmonary disease, S100 A6, A11 – S100 protein SP-A – surfactant protein A, SP-D – surfactant protein D, IPF – idiopathic pulmonary fibrosis, PSP 94 – prostatic secretory protein 94, TFF3 – trefoil factor 3

Table 3. Prognostic significance of analysed serum markers in sarcoidosis in relation to disease remission. P value ≤ 0.05 is considered to be significant

	SP-A ng/ml (median)	SP-D ng/ml (median)	S100A6 ng/ml (median)	S100A11 ng/ml (median)	CC16 ng/ml (median)	TFF-3 ng/ml (median)	PSP94 ng/ml (median)
Resolution	46.817	138.071	122.139	12.686	6.377	0.883	9.521
Without resolution	37.483	153.475	118.367	18.835	6.763	0.654	12.714
P-value	0.206 (NS)	0.396 (NS)	0.642 (NS)	0.311 (NS)	0.741 (NS)	0.396 (NS)	0.106 (NS)

CC16 – clara cells 16, S100 A6, A11 – S100 protein SP-A – surfactant protein A, SP-D – surfactant protein D, NS – non significant, PSP 94 – prostatic secretory protein 94, TFF3 – trefoil factor 3

Table 4. Prognostic significance of serum markers in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in relation to pulmonary function tests. P-value ≤ 0.05 is considered to be significant

	SP-A ng/ml	SP-D ng/ml	S100A6 ng/ml	S100A11 ng/ml	CC16 ng/ml	TFF-3 ng/ml	PSP94 ng/ml
Deterioration	51.773	155.618	71.1	10.748	3.746	1.472	19.007
Stabilization	50.302	153.458	84.448	7.352	3.141	1.022	19.25
P-value	0.397 (NS)	0.828 (NS)	0.499 (NS)	0.384 (NS)	0.552 (NS)	0.423 (NS)	0.97 (NS)

CC16 – clara cells 16, S100 A6, A11 – S100 protein SP-A – surfactant protein A, SP-D – surfactant protein D, NS – non significant, PSP 94 – prostatic secretory protein 94, TFF3 – trefoil factor 3

Table 5. Prognostic significance of serum markers in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) according to survival. P-value ≤ 0.05 is considered to be significant

	SP-A ng/ml (median)	SP-D ng/ml (median)	S100A6 ng/ml (median)	S100A11 ng/ml (median)	CC16 ng/ml (median)	TFF-3 ng/ml (median)	PSP94 ng/ml (median)
Survivors	61.252	166.178	72.343	9.49	3.17	1.015	19.007
Non-survivors	70.271	132.447	85.851	10.38	3.902	1.743	20.085
P-value	0.346 (NS)	0.190 (NS)	0.468 (NS)	0.391 (NS)	0.258 (NS)	0.006	0.631 (NS)

CC16 – clara cells 16, S100 A6, A11 – S100 protein SP-A – surfactant protein A, SP-D – surfactant protein D, NS – non significant, PSP 94 – prostatic secretory protein 94, TFF3 – trefoil factor 3

Table 6. Prognostic significance of serum markers in relation to pulmonary function tests in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). P value ≤ 0.05 is considered to be significant

Pulmonary function tests	SP-A ng/ml (median)	SP-D ng/ml (median)	S100A6 ng/ml (median)	S100A11 ng/ml (median)	CC16 ng/ml (median)	TFF-3 ng/ml (median)	PSP94 ng/ml (median)
Improvement	155.883	861.413	111.411	32.835	17.288	1.138	10.028
Deterioration	87.148	669.664	119.489	17.457	18.098	1.433	18.775
Stabilization	113.927	802.832	173.635	27.553	20.395	1.248	21.392
P-value	0.011	0.757 (NS)	0.569 (NS)	0.975 (NS)	0.916 (NS)	0.790 (NS)	0.242 (NS)

CC16 – clara cells 16, S100 A6, A11 – S100 protein SP-A – surfactant protein A, SP-D – surfactant protein D, NS – non significant, PSP 94 – prostatic secretory protein 94, TFF3 – trefoil factor 3

Table 7. Prognostic significance of serum analysed markers in relation to survival in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). P value ≤ 0.05 is considered to be significant

	SP-A ng/ml (median)	SP-D ng/ml (median)	S100A6 ng/ml (median)	S100A11 ng/ml (median)	CC16 ng/ml (median)	TFF-3 ng/ml (median)	PSP94 ng/ml (median)
Survivors	115.286	718.869	123.376	24.29	16.822	1.263	17.576
Non-survivors	92.018	800.297	144.609	32.31	17.615	1.86	19.415
P-value	0.229 (NS)	0.714 (NS)	0.963 (NS)	0.426 (NS)	0.888 (NS)	0.119 (NS)	0.711 (NS)

CC16 – clara cells 16, S100 A6, A11 – S100 protein SP-A – surfactant protein A, SP-D – surfactant protein D, NS – non significant, PSP 94 – prostatic secretory protein 94, TFF3 – trefoil factor 3

Table 8. Prognostic significance of bronchoalveolar fluid (BALF) concentration of analysed markers in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and sarcoidosis. P value ≤ 0.05 is considered to be significant

	SP-A ng/ml (median)	SP-D ng/ml (median)	S100A6 ng/ml (median)	S100A11 ng/ml (median)	CC16 ng/ml (median)	TFF-3 ng/ml (median)	PSP94 ng/ml (median)
IPF	2796.929	536.542	127.036	136.94	420.524	2.576	72.51
Sarcoidosis	3862.516	1586.062	122.424	110.469	394.274	1.616	82.202
P-value	0.079 (NS)	0.003	0.0854 (NS)	0.758 (NS)	0.680 (NS)	0.150 (NS)	1.000 (NS)

CC16 – clara cells 16, COPD – chronic obstructive pulmonary disease, S100 A6, A11 – S100 protein SP-A – surfactant protein A, SP-D – surfactant protein D, IPF – idiopathic pulmonary fibrosis, NS – non significant, PSP 94 – prostatic secretory protein 94, TFF3 – trefoil factor 3

Table 9. Prognostic significance of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) concentration of analysed markers in relation to sarcoidosis spontaneous remission. The results were considered significant if P ≤ 0.05

	SP-A ng/ml (median)	SP-D ng/ml (median)	S100A6 ng/ml (median)	S100A11 ng/ml (median)	CC16 ng/ml (median)	TFF-3 ng/ml (median)	PSP94 ng/ml (median)
Resolution	4048.203	1689.349	134.601	135.585	413.238	1.944	122.19
Without resolution	3716.619	1688.57	115.555	104.98	370.17	1.321	48.102
P-value	0.674 (NS)	0.999 (NS)	0.529 (NS)	0.258 (NS)	0.562 (NS)	0.286 (NS)	0.035

CC16 – clara cells 16, S100 A6, A11 – S100 protein SP-A – surfactant protein A, SP-D – surfactant protein D, NS – non significant, PSP 94 – prostatic secretory protein 94, TFF3 – trefoil factor 3

Table 10. Prognostic significance of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) analysed markers in relation to pulmonary function tests in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). The results were considered significant if $P \leq 0.05$

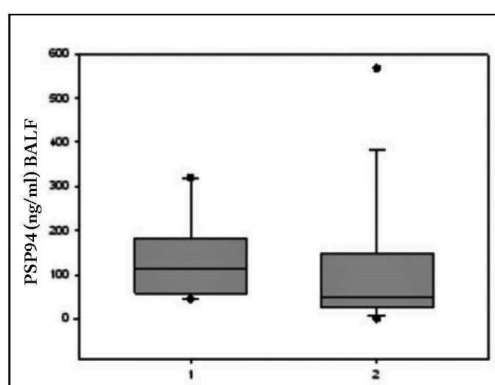
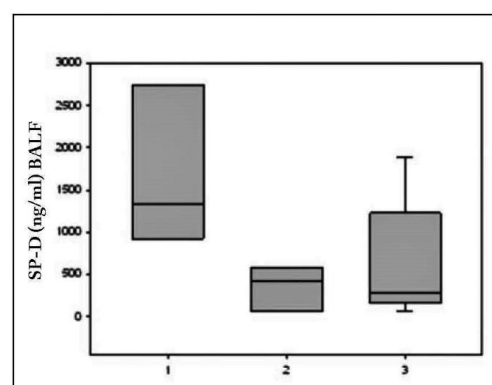
	SP-A ng/ml (mean)	SP-D ng/ml (mean)	S100A6 ng/ml (mean)	S100A11 ng/ml (mean)	CC16 ng/ml (mean)	TFF-3 ng/ml (mean)	PSP94 ng/ml (mean)
Improvement	1944.641	1665.012	318.442	190.009	652.887	2,862	74.431
Deterioration	2339.068	637.811	81.696	50.784	333.822	4.964	63.978
Stabilization	2940.809	447.444	117.963	109.433	434.396	2.611	75.399
p-value	0.983 (NS)	0.032	0.185 (NS)	0.451 (NS)	0.122 (NS)	0.259 (NS)	0.930 (NS)

CC16 – clara cells 16, S100 A6, A11 – S100 protein SP-A – surfactant protein A, SP-D – surfactant protein D, NS – non significant, PSP 94 – prostatic secretory protein 94, TFF3 – trefoil factor 3

Table 11. Prognostic significance of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) concentration of analysed markers in relation to survival in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). P value ≤ 0.05 is considered to be significant

	SP-A ng/ml (mean)	SP-D ng/ml (mean)	S100A6 ng/ml (mean)	S100A11 ng/ml (mean)	CC16 ng/ml (mean)	TFF-3 ng/ml (mean)	PSP94 ng/ml (mean)
Survivors	2773.261	226.325	209.981	181.461	462.253	2.732	73.83
Non-survivors	2009.703	620.605	67.868	47.353	337.064	6.026	67.884
P-value	0.482 (NS)	0.049	0.242 (NS)	0.206 (NS)	0.302 (NS)	0.017	0.815 (NS)

CC16 – clara cells 16, S100 A6, A11 – S100 protein SP-A – surfactant protein A, SP-D – surfactant protein D, NS – non significant, PSP 94 – prostatic secretory protein 94, TFF3 – trefoil factor 3.

**Fig. 1.** Prostatic secretory protein (PSP94) in bronchoalveolar fluid (BALF) in sarcoidosis. Prognostic significance in relation to spontaneous resolution. 1 - no spontaneous resolution, 2 - spontaneous resolution**Fig. 2.** Prognostic significance of surfactant protein D (SP-D) in bronchoalveolar fluid (BALF) in relation to pulmonary function tests in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). 1 - improvement, 2 - stable disease, 3 - deterioration

DISCUSSION

Lung specific secretory proteins can be potential evaluative biomarkers that can help assess disease severity and progression, predict outcomes, and assess treatment effectiveness (20). SP-A and SP-D play an important role in pathogenesis of the some lung disorders (5). A complex of S100 proteins is involved in

the regulation of many cellular processes such as cell division and differentiation (9). PSP94 is one of the predominating proteins in the human prostate gland secretion (10). However, the expression of PSP94 is not restricted to the prostate only. This protein has a widespread presence in the human body fluids. The highest concentrations of PSP94 were found in the respiratory tract secretion. Its concentrations in the

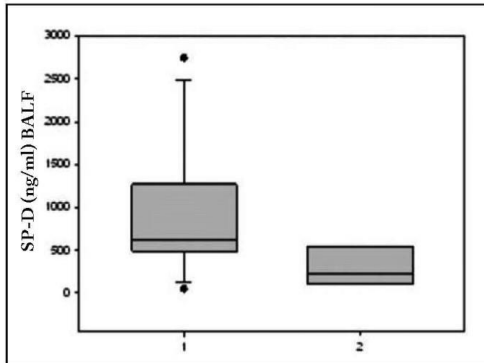


Fig. 3. Surfactant protein D (SP-D) in bronchoalveolar fluid (BALF) in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Prognostic significance in relation to survival. 1 - alive, 2 - deceased

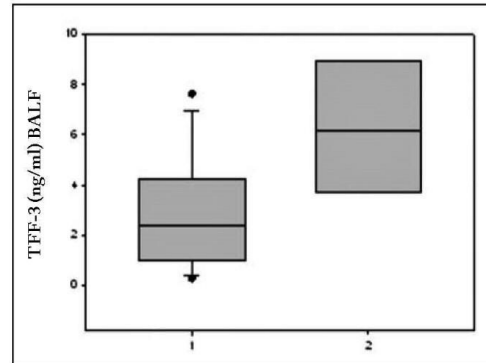


Fig. 4. Trefoil factor-3 (TFF-3) in bronchoalveolar fluid (BALF) in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Prognostic significance in relation to survival. 1 - alive, 2 - deceased.

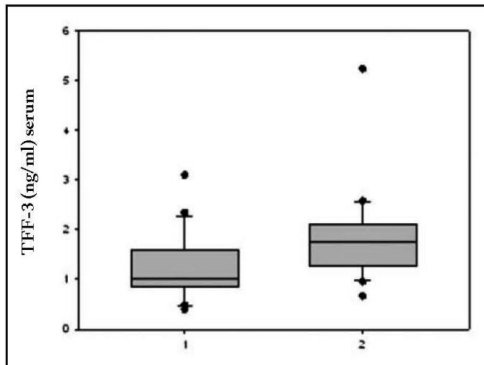


Fig. 5. Serum trefoil factor-3 (TFF-3) in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Prognostic significance in relation to survival. 1 - alive, 2 - deceased

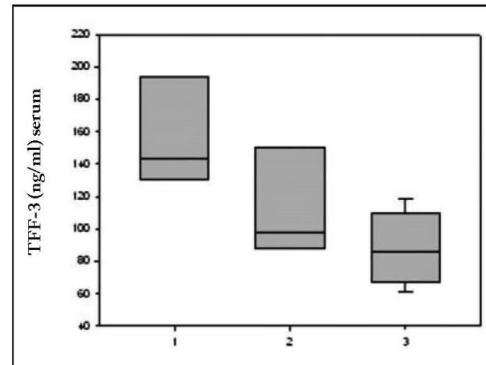


Fig. 6. Serum surfactant protein-A (SP-A) in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Prognosis according to pulmonary function tests. 1 - improvement, 2 - stable disease, 3 - deterioration

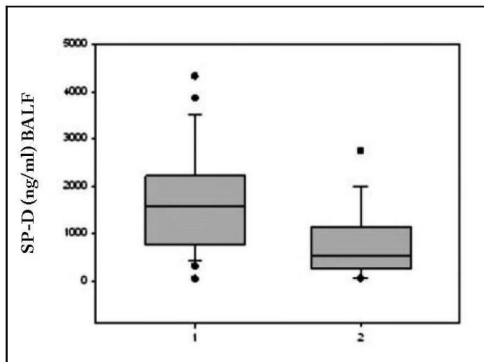


Fig. 7. Comparison of surfactant protein D (SP-D) levels in bronchoalveolar fluid (BALF) in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). 1 - sarcoidosis, 2 - IPF

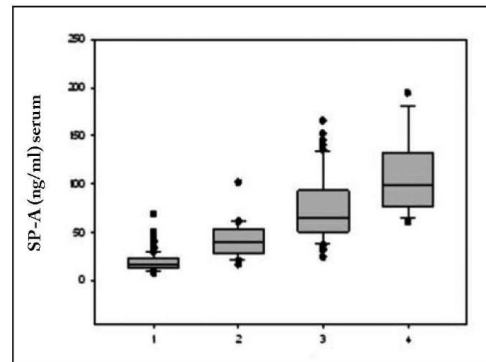


Fig. 8. Serum surfactant protein-A (SP-A) levels in analysed lung diseases and healthy controls. 1 - healthy controls, 2 - sarcoidosis, 3 - chronic obstructive pulmonary disease (COPD), 4 - idiopathic pulmonary fibrosis (IPF).

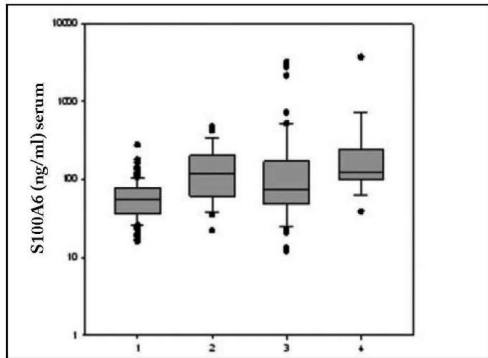


Fig. 9. Serum S100A6 levels in healthy controls (1), sarcoidosis (2), chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (3), and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (4)

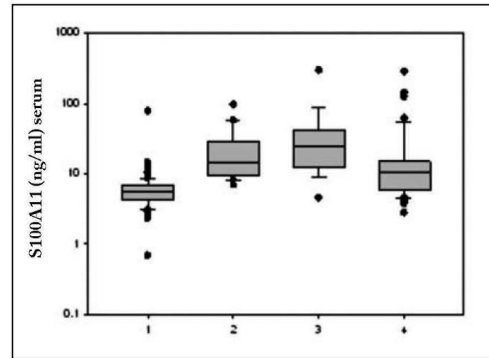


Fig. 10. Serum S100A11 levels in healthy controls (1), sarcoidosis (2), chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (3), and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (4)

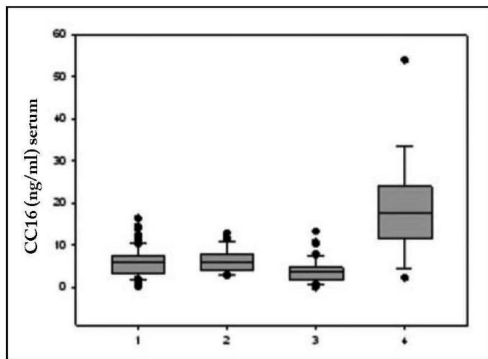


Fig. 11. Serum CC16 levels in healthy controls (1), sarcoidosis (2), chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (3), and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (4)

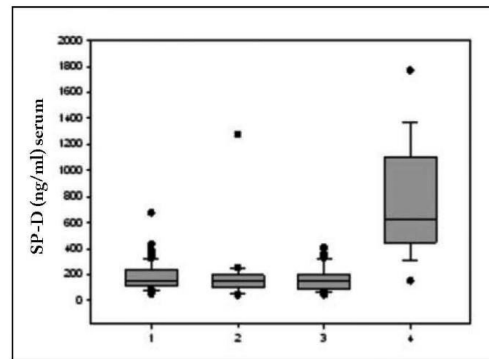


Fig. 12. Serum SP-D levels in healthy controls (1), sarcoidosis (2), chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (3), and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (4)

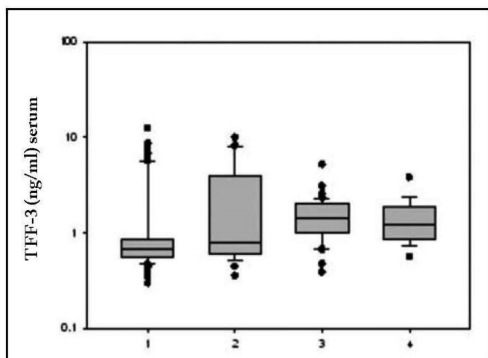


Fig. 13. Serum TFF-3 levels in healthy controls (1), sarcoidosis (2), chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (3), and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (4)

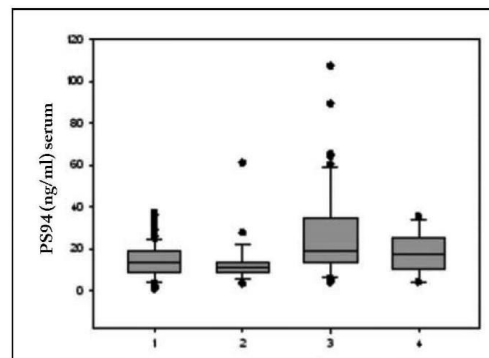


Fig. 14. Serum PSP94 levels in healthy controls (1), sarcoidosis (2), chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (3), and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (4)

tracheobronchial fluid are even comparable to that in the seminal fluid. PSP94 is also localized in the cilia of the ciliated epithelium of respiratory tract (11, 12). The TFF protein family is produced by mucin-secreting epithelial cells and play a crucial role in mucosal defense and healing. Although TFFs have been involved in the protection of the gastrointestinal tract against mucosal damage, their oncogenic potential has been extensively reported, including their role in cell proliferation, apoptosis, migration and invasion and angiogenesis (13, 14). TFF1 and TFF3 are expressed and secreted by normal and inflamed airways (15).

No specific prognostic markers for IPF, sarcoidosis and COPD have been identified to the date. There are currently no biomarkers broadly accepted and established for routine clinical application in pneumology, except for Japan, where Krebs von den Lungen-6 (KL-6), SP-A and SP-D are used in clinical practise as markers in diagnostics of interstitial lung diseases, although their lack of specificity for IPF has been acknowledged (20). As stated previously, identification of serum and BALF biomarkers may facilitate diagnostics and prognostication of various lung disorders, may distinguish between lung diseases and may help to identify treatment responders.

Increased leakage of SP-A, SP-B and CC16 from the air spaces into the circulation occurs in many respiratory conditions. Although increased serum SP-A, SP-D, CC-16, S100 levels are most likely the result of increased secretion and/or leakage of these molecules across the alveolar-capillary membrane, it cannot be ruled out that there are other cells in the circulation that secrete some biomarkers (6, 21). Some clinical studies have suggested a predictive role of SP-A, SP-D and KL-6 for interstitial lung diseases (22). Serum SP-A was found at significantly higher levels in IPF than non-specific interstitial pneumonia (NSIP), sarcoidosis, and COPD (22). Significantly elevated serum SP-A and BALF SP-D have also been observed in our IPF patients compared to sarcoidosis.

Kunitake et al. found that SP-D, but not SP-A levels were significantly increased in pulmonary sarcoidosis compared with controls. SP-D levels probably reflect the damage to epithelial cells or release of these markers from these cells due to the inflammatory response (23). In our study, BALF SP-D differed between sarcoidosis and IPF but we did not

confirm any relationship between SP-A or SP-D and staging of sarcoidosis.

Serum SP-A and SP-D levels appears to be highly predictive for survival of IPF patients (24, 25). A study Honda et al. showed that measurement of serum SP-D can provide an easily identifiable and useful clinical marker for the diagnosis of IPF and can predict the disease activity (25). Increased serum SP-A level was observed as a strong and independent predictor of early mortality among IPF patients (26). Song et al. compared plasma levels of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7), KL-6 antigen, SP-A, and SP-D with a clinical course of 118 IPF patients. The combination of three markers (MMP-7, KL-6 and SP-A) predicted mortality of IPF compared with clinical parameters (27). In our study, BALF SP-D was associated with survival in IPF unlike BALF SP-A. Takahashi et al. demonstrated that SP-A and SP-D concentrations correlated significantly with the extent of alveolitis (a reversible change), whereas there was no correlation with fibrosis progression (an irreversible change). The SP-D concentration, unlike that of SP-A, was also related to the extent of parenchymal collapse and the rate of deterioration per year in pulmonary function (28). IPF patients with higher serum levels of SP-A and SP-D had a worse 3-year survival rate (29). In our cohort, a relationship between some markers and the extent of IPF was also observed. We detected significant correlation between serum SP-D and HRCT interstitial score (the extent of pulmonary fibrosis), and between BALF SP-D, serum SP-A and pulmonary function parameters in IPF patients.

A study of Hara et al. found that S100A9 levels were significantly higher in BALF in patients with IPF than in patients with other interstitial lung diseases and healthy volunteers (30). In our cohort, we found no prognostic significance of S100 (namely S100A6, A11) proteins in evaluated disorders. However S100 levels differed between these diseases and healthy controls.

Published data suggest that smokers, and especially current smokers, exhibit significantly reduced BALF SP-D and phospholipids compared to non-smokers (31). BALF and serum SP-D levels were indicated as markers related to smoking, airway obstruction, and disease state (32). Changes in serum SP-D levels correlated well with changes in health status over a 3 month period in patients with severe

COPD (33, 34). Serum CC-16 levels were decreased in COPD and there was a positive correlation with disease severity (FEV1 decline over time) (35). In our study, we found only positive correlation of CC-16 levels with serum SP-A in COPD patients divided according to pulmonary function tests (GOLD I-IV stages).

PSP94 and TFF3 have not been evaluated yet in IPF, sarcoidosis and COPD. These markers play an important role mainly in oncology. The oncogenic potential of TFF3 has been reported. This protein is involved in cell proliferation, apoptosis, migration, invasion and angiogenesis (36). Fibrotic process that characterizes IPF is commonly considered to be a result of a recurrent injury to the alveolar epithelium followed by an uncontrolled proliferation of fibroblasts. Therefore, IPF might be considered a neoproliferative disorder of the lung, which exhibits several pathogenic features similar to cancer. Epigenetic and genetic abnormalities (altered cell-to-cell communications, uncontrolled proliferation, abnormal activation of specific signal transduction pathways) are biological hallmarks that characterize the pathogenesis of both IPF and cancer (37). Indeed, BALF TFF3 correlated with IPF mortality and serum TFF3 correlated with COPD mortality in our study. Moreover, BALF PSP94, as the only one of the analysed markers, correlated with prognosis of sarcoidosis according to spontaneous resolution.

We conclude that some of selected biomarkers should have a prognostic role in the analysed lung disorders. SP-A, SP-D, CC-16, S100 A6, A11, TFF3, PSP94 are markers that can be easily determined in serum and BALF. PSP94 seems to have a prognostic role in sarcoidosis, SP-D and TFF3 in IPF, and TFF3 in COPD patients. SP-A, SP-D, TFF3 reflect some aspects of pulmonary disease severity. On the other hand, these biomarkers do not appear to be unequivocally suitable for differential diagnosis of these disorders. Especially the very interesting results regarding to PSP94 and TFF-3 should be the aim of further studies.

REFERENCES

1. Biomarkers definitions working group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69(3): 89-95.
2. Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: Idiopathic Pulmonary fibrosis: Evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183(6): 788-824.
3. Hunninghake GW, Costabel U, Ando M et al. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1999; 16(2): 149-73.
4. Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. 2013; http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report2014_Feb07.
5. Selman M, Pardo A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Pro Am Thorac Soc* 2006; 3(4): 364-372.
6. Madsen J, Kliem A, Tornøe I, Skjødt K, Koch C, Holmskov U. Localization of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues. *J Immunol* 2000; 164(11): 5866-70.
7. Broeckaert F, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(4): 469-75.
8. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1965; 19(6): 739-44.
9. Zimmer DB, Conwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* 1995; 37(4): 417-29.
10. Kamada M, Mori H, Maeda N, et al. Beta-microseminoprotein/prostatic secretory protein is a member of immunoglobulin binding factor family. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1388(1): 101-10.
11. Ulvsbaeck M, Lindstroem C, Weiber H, Abrahamsson PA, Lilja H, Lundwall A. Molecular cloning of a small prostate protein, known as beta-microseminoprotein, PSP94 or beta-inhibin, and demonstration of transcripts in non-genital tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164(3): 1310-5.
12. Ohkubo I, Tada T, Ochiai Y, Ueyama H, Eimoto T, Sasaki M. Human seminal plasma β -microseminoprotein: its purification, characterization, and immunohistochemical localisation. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; 27(6): 603-11.
13. Graness A, Chwieralski CE, Reinhold D, Thim L, Hoffmann W. Protein kinase C and ERK activation are required for TFF-peptide-stimulated bronchial epithelial cell migration and tumor necrosis factor- α -induced interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secretion. *J Biol Chem* 2002; 277(21): 8440-6.
14. Qu Y, Yang Y, Ma D, Xiao W. Increased trefoil factor 3 levels in the serum of patients with three major histological subtypes of lung cancer. *Oncology reports* 2012; 27(4): 1277-83.
15. dos Santos Silva E, Ulrich M, Döring G, Botzenhart K, Gött P. Trefoil factor family domain peptides in the human respiratory tract. *J Pathol* 2000; 190(2): 133-42.
16. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26(2): 319-38.
17. Wanger J, Clausen JL, Coates A, et al. Standardisation of the measurement of lung volumes. *Eur Respir J* 2005; 26(3): 511-22.
18. Macintyre N, Crapo RO, Viegi G, et al. Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J* 2005; 26(4): 720-35.
19. Gay S, Kazerooni E, Toews G, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis. Predicting response to therapy and survival. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157 (4 Pt 1): 1063-72.
20. Huang HB, Peng XN, Nakajima J. Advances in the study of biomarkers of idiopathic pulmonary fibrosis in Japan. *Biosci Trends* 2013; 7(4): 172-7.
21. Greene KE, King TE, Kuroki Y, et al. Serum surfactant proteins-A and D as biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2002; 19(3): 439-46.

22. Doyle TJ, Pinto-Plata V, Morse D, Celli BR, Rosas IO. The expanding role of biomarkers in the assessment of smoking-related parenchymal lung diseases. *Chest* 2012; 142(4): 1027-34.
23. Kunitake R, Kuwano K, Yoshida K, et al. KL-6, surfactant protein A and D in bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary sarcoidosis. *Respiration* 2001; 68(5): 488-95.
24. Barlo NP, van Moorsel CH, Ruven HJ, Zanen P, van den Bosch JM, Grutters JC. Surfactant protein-D predicts survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarcoidosis Vasc Difuse Lung Dis* 2009; 26(2): 155-61.
25. Honda Y, Kuroki Y, Matsuura E, et al. Pulmonary surfactant protein D in sera and bronchoalveolar lavage fluids. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(6 Pt 1): 1860-66.
26. Kinder BW, Brown KK, McCormack FX, et al. Serum surfactant protein-A is a strong predictor of early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2009; 135(6): 1557-63.
27. Song JW, Do KH, Jang SJ, Colby TV, Han S, Kim DS. Blood biomarkers MMP-7 and SP-A: predictors of outcome in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2013; 143(5): 1422-9.
28. Takahashi H, Fujishima T, Koba H, et al. Serum surfactant proteins A and D as prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis and their relationship to disease extent. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162 (3 Pt 1): 1109-14.
29. Takahashi H, Shiratori M, Kanai A, Chiba H, Kuroki Y, Abe S. Monitoring markers of disease activity for interstitial lung disease with serum surfactant proteins A and D. *Respirology* 2006; 11 Suppl: S51-4.
30. Hara A, Sakamoto N, Ishimatsu Y, et al. S100A9 in BALF is a candidate biomarker of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* 2012; 106(4): 571-80.
31. More JM, Voelker DR, Silveira LJ, Edwards MG, Chan ED, Bowler RP. Smoking reduces surfactant protein D and phospholipids in patients with and without chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulm Med* 2010; 10: 53.
32. Winkler C, Atochina-Vasserman EN, Holz O, et al. Comprehensive characterisation of pulmonary and serum surfactant protein D in COPD. *Respir Res* 2011; 12: 29.
33. Sin DD, Vestbo J. Biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6(6): 543-5.
34. Sin DD, Lejny R, Gan WQ, Man SP. Circulating surfactant protein D as a potential lung-specific biomarker of health outcomes in COPD: a pilot study. *BMC Pulm Med* 2007; 7: 13.
35. Lomas DA, Silverman EK, Edwards LD, et al. Evaluation of serum CC-16 as a biomarker for COPD in the ECLIPSE cohort. *Thorax* 2008; 63(12): 1058-63.
36. Emami S, Rodrigues S, Rodrigue CM, et al. Trefoil factor family (TFF) peptides and cancer progression. *Peptides* 2004; 25(5): 885-98.
37. Vancheri C. Idiopathic pulmonary fibrosis: an altered fibroblast proliferation linked to cancer biology. *Proc Am Thorac Soc* 2012; 9(3): 153-7.

5. Neinvazivní vyšetřovací metody a komorbidit

Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu (KVV, EBC – *exhaled breath condensate*) je atraktivní vyšetřovací metoda představující neinvazivní metodu k získání materiálu k analýze biomarkerů. V řadě studií bylo popsáno několik molekul s potenciálem diagnostického či prognostického biomarkeru. Žádná z těchto molekul ale nemá vlastnosti, které by umožnily jejich využití v běžné klinické praxi u IPF, jako je tomu například u bronchiálního astma a FeNO (frakčně exhalovaný oxid dusnatý). Vzorek vydechovaného vzduchu může být analyzován přímo v plynné fázi (frakční analýza vydechovaného vzduchu (FeNO)), dále analýzou těkavých sloučenin nebo po jeho ochlazení a kondenzaci ve formě kondenzátu vydechovaného vzduchu (KVV) (Hayton kol., 2019).

KVV je tekutina získaná chlazením vydechovaného vzduchu při klidovém dýchání ústy. KVV obsahuje kondenzované vodní výpary s malým množstvím netěkavých a ve vodě rozpustných těkavých molekul, které jsou analyzovány pomocí spektrometrie, chromatografie, imunoeseje nebo kapilární elektroforézy (Effros a kol., 2002; Horvath a kol., 2005; Greguš a kol., 2015). Tato metoda je atraktivní, protože je neinvazivní a umožňuje různé způsoby zpracování a další analýzy vzorků. Tento biologický materiál obsahuje velké množství mediátorů zánětu sliznice dýchacích cest včetně oxidačního a nitrosativního stresu (peroxid vodíku, dusitany, dusičnany, leukotrieny i proteiny – eozinofilní kationický protein, nádorové markery, cytokiny). V průběhu analýzy se stanovuje množství specifických látek v kondenzátu u jednotlivých onemocnění, takzvaných biomarkerů, které se vyskytují v uvedené tělní tekutině a jejich koncentrace je v důsledku probíhajícího patologického procesu v dolních dýchacích cestách významně zvýšená. Její nevýhodou však je, že analyzuje tekutinu z dýchacích cest, která neodráží přesně intersticiální plicní proces (Hayton a kol., 2019). Využití KVV u IPP je proto omezené a je stále předmětem výzkumu.

Zajímavostí naší práce oproti komerčně vyráběným přístrojům ve sběru KVV, je ve dvou na sobě závislých aspektech, zhotovení miniaturního odběrového zařízení a dále v použití kapilární elektroforézy pro analýzu KVV. Vyvinuté zařízení pro sběr KVV je přenosné, miniaturní a umožňuje sběr KVV z několika (2-3) výdechů, případně i jen z jediného výdechu. Z 2-3 výdechů získáme cca 50-60 uL KVV, což je množství, které není jednoduše analyzovatelné většinou používaných metod, obvykle je potřeba 1 ml vzorku KVV. S malým množstvím vzorku souvisí zajímavost použití kapilární elektroforézy, protože ta je jako jedna z mála separačních metod schopna analyzovat opakovaně látky v 60 uL KVV. Kapilární elektroforéza se v klinické praxi tolik nepoužívá. Jedním z důvodů je horší opakovatelnost analýz než u kapalinové chromatografie. Kapilární elektroforéza je ale nezastupitelná právě pro analýzy velice malých objemů vzorků nebo například při sekvenování DNA, kde má díky

mnohem lepšímu rozlišení než chromatografie dominantní postavení. My jsme schopni stanovit z KVV celou řadu iontů: aniontů (Cl, dusitan, dusičnan, síran, acetát, laktát, butyrát) a kationtů (NH₄⁺, K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺). Pouze některé z nich jsou relevantní jako markery oxidačního stresu: dusitany, dusičnany, případně jiných procesů v plicích: laktát, acetát a ostatní ionty, jejichž význam není znám nebo není významný.

V druhé části našeho projektu byl sestrojen přístroj pro dělení KVV. Přístroj umožňuje rozdělení celkového objemu KVV na dva alikvoty, z nichž jeden (obvykle ca 10-20 % celkového objemu) odpovídá vzduchu v dutině ústní a horních dýchacích cestách, kde se předpokládá největší zatížení a poškození refluxní kapalinou (extraezofageální reflux viz kapitola 5.1.1.) a druhý (ca 80-90 %), který odpovídá vzduchu z dolních cest dýchacích. Přístroj se skládá ze senzorové části, která detekuje obsah CO₂ (senzor obsahu oxidu uhličitého) ve vydechovaném vzduchu a pomocí programově řízeného mikroprocesoru přepíná solenoidní ventil tak, že vydechovaný vzduch je směřován do dvou vzorkovacích zařízení, kde je sbírán kondenzát dechu. V takto oddělených dvou frakcích KVV bylo měřeno pH a analyzován obsah iontů a kyselin.

Analýzou KVV jsme se zabývali u respiračních nemocí (sarkoidóza, intersticiální plicní fibróza, astma bronchiální a chronická obstrukční plicní nemoc) v práci „Monitoring of ionic content of exhaled breath condensate in various respiratory diseases by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection“ (Greguš a kol., 2015). Jde o pilotní data s využitím nové metody analýzy KVV pomocí jednoduchého principu dechového testu u různých plicních nemocí. Celkem bylo hodnoceno 14 iontů. Reprezentativní vzorek KVV o objemu 10-60 µl byl získán pomocí již zmiňovaného miniaturního vzorkovacího zařízení z 3 vydechnutí za méně než 1 minutu. V KVV bylo analyzováno celkem 14 iontů a organických kyselin kapilární elektroforézou s bezkontaktní konduktometrickou detekcí, umožňující rychlé (<5 min) simultánní stanovení několika biomarkerů. Hodnoty byly statisticky významné při hladině $p < 0,05$. Hladina dusitanů byla signifikantně zvýšená u chronické obstrukční plicní nemoci (průměr 4,53 µM (1,61-11,34)), astma (průměr 4,84 µM (1,38-9,97)), intersticiální plicní fibrózy (průměr 2,62 µM (0,79-5,48)) a cystické fibrózy (průměr 2,33 µM (0,99-9,78)), ale ne u sarkoidózy oproti zdravým kontrolám (0,43 µM (0,30-1,86)). Dusičnany a acetáty byly také signifikantně zvýšené, ale laktáty byly významně nižší nežli u zdravých kontrol (Greguš a kol. 2015). Viz kapitola 5.1.

Do budoucna se budeme i nadále věnovat problematice KVV a zaměříme se na přítomnost prozánětlivých a profibrotických cytokinů u IPP s využitím naší unikátní odběrové soustavy.

5.1. Monitoring the ionic content of exhaled breath condensate in various respiratory diseases by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. (Greguš M, Foret F, Kindlová D, Pokojová E, Plutinský M, Doubková M, Merta Z, Binková I, Skříčková J, Kubáň P. *J Breath Res.* 2015; 9:027107)



PAPER

Monitoring the ionic content of exhaled breath condensate in various respiratory diseases by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection

RECEIVED
6 December 2014REVISED
20 February 2015ACCEPTED FOR PUBLICATION
2 March 2015PUBLISHED
6 May 2015Michal Greguš^{1,2}, František Foret¹, Dagmar Kindlová³, Eva Pokojová³, Marek Plutinský³, Martina Doubková³, Zdeněk Merta³, Ilona Binková³, Jana Skříčková³ and Petr Kubáň¹¹ Bioanalytical Instrumentation, CEITEC Masaryk University, Veveří 97, 602 00, Brno, Czech Republic² Department of Chemistry, Masaryk University, Kotlarska 2, 611 37 Brno, Czech Republic³ Department of Respiratory Diseases and TB, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, 601 77 Brno, Czech Republic

E-mail: petr.kuban@ceitec.muni.cz

Keywords: exhaled breath condensate, capillary electrophoresis, contactless conductivity detection, anions and cations, respiratory diseases

Abstract

The analysis of an ionic profile of exhaled breath condensate (EBC) by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection and double opposite end injection, is demonstrated. A miniature sampler made from a 2 ml syringe and an aluminium cooling cylinder was used for the fast collection of EBC (under one minute). Analysis of the collected EBC was performed in a 60 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, 60 mM L-histidine background electrolyte with 30 μ M cetyltrimethylammonium bromide and 2 mM 18-crown-6 at pH 6, and excellent repeatability of migration times (RSD < 1.3% ($n = 7$)) and peak areas (RSD < 7% ($n = 7$)) of 14 ions (inorganic anions, cations and organic acids) was obtained. It is demonstrated that the analysis of EBC samples obtained from patients with various respiratory diseases (chronic obstructive pulmonary disease, asthma, pulmonary fibrosis, sarcoidosis, cystic fibrosis) is possible in less than five minutes and the ionic profile can be compared with the group of healthy individuals. The analysis of the ionic profile of EBC samples provides a set of data in which statistically significant differences among the groups of patients could be observed for several clinically relevant anions (nitrite, nitrate, acetate, lactate). The developed collection system and method provides a highly reproducible and fast way of collecting and analyzing EBC, with future applicability in point-of-care diagnostics.

1. Introduction

The examination of exhaled breath in medical diagnosis dates back to the age of Hippocrates, who described *fetor oris* and *fetor hepaticus* in his treatise on breath aroma and disease [1]. Only the development of modern analytical instrumentation in the last century has made the analysis of breath available for clinical diagnosis and several new diagnostic devices for breath monitoring have been approved by U.S. Food and Drug Administration [2]. There are also methods based on the chemical analysis of various exhaled breath biomarkers [3]. Fractional exhaled nitric oxide (FeNO) [4] is one of the few biomarkers used nowadays in asthma diagnosis [5, 6]. Nitric oxide (NO) is enzymatically produced within the human airways and is detectable in the exhaled air of healthy

individuals [7, 8]. Induction of NO synthases during airway inflammation increases the concentration of NO in some respiratory diseases, such as asthma or bronchiectasis, but elevated NO as an airway inflammation marker is not generally applicable to all respiratory diseases. For instance, in cystic fibrosis (CF), lower or normal concentrations of NO have been found [9–11] and there is a need for other diagnostic options to monitor the airway inflammation and nitrosative stress. Fortunately, interconversion easily occurs among the NO-species, resulting in the formation of their degradation products, nitrate and nitrite, nonvolatile, stable and water soluble anions that can be analyzed in the aqueous part of the exhaled breath. The aqueous part of the exhaled breath can be obtained as an EBC by a simple cooling procedure. EBC contains a variety of volatile and nonvolatile compounds and has been

extensively studied for the past 30 years, since the first publications on the subject [12–14]. Despite a very simple sampling process and simple matrix (aqueous solution) EBC has not yet reached the status of a reliable diagnostic sample. Several issues were identified that need significant improvement before EBC can be accepted for diagnostics [15, 16]. These include low sampling efficiency and reproducibility, nonexistence of reference values for the marker compounds and low concentrations of the analytes. By choosing a suitable analytical technique which is able to cope with microliter sample volumes and which has high detection sensitivity, some of the above drawbacks can be tackled. Although separation methods offer many advantages in this respect, surprisingly for the analysis of nitrogen reactive species, colorimetric assays including the Griess reaction [17–19], enzymatic reactions [20] and fluorimetric measurements [21, 22] still dominate. These techniques, apart from being time consuming and requiring relatively large sample volumes, can only analyze one analyte at a time. Ion chromatography (IC) [23–26] was employed for the analysis of anions [23, 25, 26] and cations [24, 25] in EBC including nitrogen reactive species and other ionic constituents. The authors demonstrated the power of separation techniques that are able to analyze multiple ions with very good sensitivity. Greenwald *et al* [25] have, for instance, analyzed 18 ions in the EBC samples of healthy athletes and monitored the composition prior to and after an exhausting exercise. Liquid chromatographic techniques such as IC or high performance liquid chromatography (HPLC) can analyze relatively small sample volumes when used with low microliter-volume injectors, but the sample volume necessary for filling the connection tubing of the sampling valve is still large (several hundreds of microliters) and, consequently, rather a lengthy EBC collection is required to obtain a sufficient sample quantity.

In contrast, capillary electrophoresis (CE) requires only about 10–20 nL of sample per injection. Repeated injections from the same sample vial with EBC without any filling of the injection manifold are possible, because standard injection in CE utilizes sample siphoning (hydrodynamic injection). CE is thus perfectly suitable for the analysis of very small volumes of EBC samples and has recently been used for EBC analysis for the first time [27]. CE is popular in the analysis of other samples of biological origin because of its analysis speed, high resolution and low sensitivity to the sample matrix [28, 29]. The introduction of contactless conductivity detection (C⁴D) [30, 31] has meant that CE can now be used in the analysis of low molecular weight compounds because their relatively high conductivity provides a sensitive detection response. C⁴D is also one of the best detection modes to be used in portable and point-of-care instrumentation [32–34] due to its compact size and low power demand. Another significant asset of CE is the ability to analyze anions and cations simultaneously in a single run, by applying double

injection from the opposite capillary ends (DOEI—double opposite end injection), a technique originally developed by Kuban and Karlberg [35, 36]. Surprisingly, only a few reports are available on the application of CE in EBC analysis [27, 37, 38].

The sampling of EBC is a relatively simple non-invasive procedure, in which a person breathes into a sampling device. There are various types of condenser devices, both commercial (ECoScreen, RTube, Turbo DECCS) and laboratory built prototypes. An overview of the devices used for EBC collection can be found in recent reviews [15, 39], where various device designs and their respective advantages and disadvantages are discussed. The collection times used in most published studies vary between 10 and 30 min. Recently we have developed a miniature sampling device for EBC collection that is simple, inexpensive and can provide fast and reproducible sampling of EBC from a single breath [37], significantly reducing the EBC collection time.

The use of this device in conjunction with CE analysis opens up new avenues to simple, point-of-care diagnostics, without the need for time consuming EBC sampling and complicated breathing pattern control/monitoring. This is particularly important in clinical settings with patients who may have difficulties in breathing for extended periods of time, including small children and patients with serious lung obstruction. In this contribution, we show a practical application of this sampling device and CE analysis in a clinical setting. EBC samples obtained from patients with various respiratory diseases (chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma, pulmonary fibrosis (PF), sarcoidosis, CF) were compared with the EBC samples from a group of healthy individuals. The use of CE with DOEI allowed the analysis of the complete anionic and cationic profile of EBC to be completed in a very short time (<5 min). Statistically significant differences among several ions detected in the EBC were observed. This applied to anions that are considered nitrosative stress markers (nitrite, nitrate) but also to other anions (acetate, lactate) that have not been extensively studied previously and may have some clinical implications. The potential of DOEI-CE-C⁴D in the analysis of multiple ionic species of interest in EBC from clinical practice has been demonstrated.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

All chemicals were of reagent grade (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany) and deionized (DI) water (Purite, Neptune, Watrex, Prague, Czech Republic) was used for stock solution preparation and dilutions. Background electrolyte (BGE) for CE measurements was prepared daily by diluting 200 mM stock solutions of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), L-Histidine (HIS) and 100 mM 18-crown-6 (all Sigma–Aldrich) to the required concentration. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, Sigma–

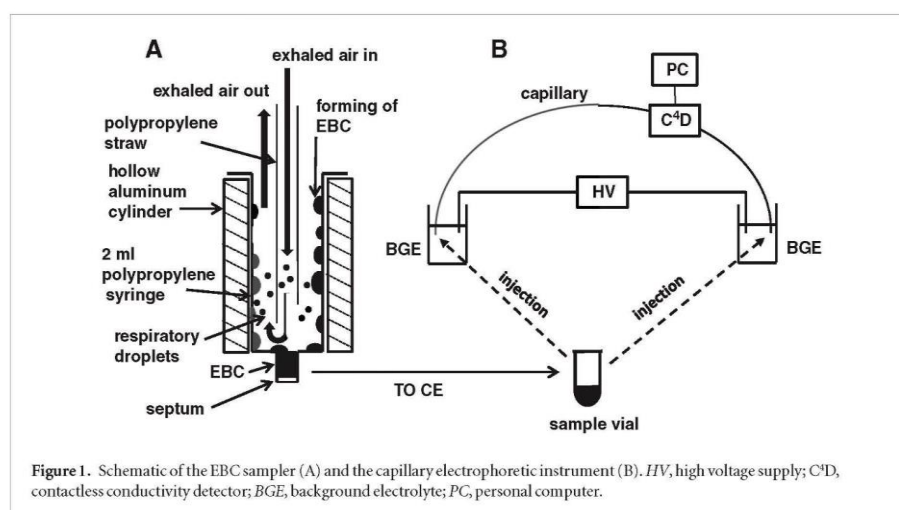


Figure 1. Schematic of the EBC sampler (A) and the capillary electrophoretic instrument (B). *HV*, high voltage supply; *C⁴D*, contactless conductivity detector; *BGE*, background electrolyte; *PC*, personal computer.

Aldrich) was prepared as 10 mM stock solution in 5% acetonitrile and was added to the BGE to yield the final concentration of 30 μM . Standards were prepared from sodium chloride, sodium nitrite, potassium nitrate, potassium sulfate, lithium lactate, propionic acid, butyric acid (all Sigma–Aldrich), calcium chloride, ammonium acetate, acetic acid, and magnesium chloride hexahydrate (all Lach–Ner, Neratovice, Czech Republic) as 10 mM stock solutions and diluted to the required concentration with DI water.

2.2. EBC collection device and procedure

2.2.1. EBC sampler

The sampler for the collection of EBC was described previously [37] and is schematically shown in figure 1(A). In brief, it was constructed from a 2 ml syringe and a 5 cm long hollow aluminium cylinder of 2.5 cm outer diameter (O.D.) with an inner diameter (I.D.) precisely matching the O.D. of the syringe. The cylinder was kept in a freezer at -15°C prior to sampling and an insulation sleeve was used during the collection to maintain its constant temperature at -15°C . The cooling temperature was stable for at least two minutes and this time interval was sufficient for the whole sampling procedure. The air was exhaled through a straw with O.D. 6 mm, and wall thickness 0.2 mm (purchased in a local store) into the sampler. The end of the sampler syringe was enclosed in a parafilm septum to avoid EBC loss. In our sampler, the flow of exhaled breath is partially restricted by the diameter of the straw used for sampling and higher pressure has to be applied during exhalation compared to most of the commercial devices. Therefore, a typical single exhalation will take no more than a few seconds. The flow restriction, however, has a positive effect on the amount of EBC collected. In our previous work [37] we obtained approximately the same amount of EBC from our device and from a commercial Rtube sampler [40]. As our device has a condensing area which

is about ten times smaller, the efficiency is much higher. We believe that this is partly due to the lower air flow rates and more confined condensation area due to the concentric sampler design.

Single breath sampling was performed by following a specific ventilatory manoeuvre that allowed reproducible sampling and maintained the same ventilatory pattern for everyone studied. The people were asked to exhale completely until their lungs were empty, inhale quickly (1–2 s) and exhale completely into the sampler (typically 8–10 s). This procedure was described by Almstrand *et al* [41] and typically yields the highest concentration of the respiratory particles in the exhaled breath. Three deep exhalations were sufficient to collect on average 70 μL of EBC. After the EBC sampling was completed, the condensate from the syringe walls was swept with the plunger to the syringe tip and transferred to the sample vial for CE analysis. During the sweeping procedure, the condensate collected from the walls is naturally mixed and a representative EBC sample is thus obtained. The collected EBC was analyzed using CE with *C⁴D*. When not analyzed directly, the EBC samples were stored at -20°C until the analysis.

2.3. CE device

2.3.1. Electrophoretic system

A purpose-built CE instrument was employed for all electrophoretic separations and its schematic is shown in figure 1(B). The separation voltage of $\pm 15\text{ kV}$ was provided by a high voltage power supply unit (Spellman CZE2000R Start Spellman, Pulborough, UK). Two Pt wires (0.5 mm I.D., 3 cm length, Advent Research Materials Ltd., Eynsham, England) were used as electrodes. Fused-silica (FS) capillaries (50 μm I.D., 375 μm O.D., 50 cm total length, Microquartz GmbH, Germany) were used for the separation. Prior to the first use, the separation capillary was preconditioned by flushing with 0.1 M NaOH for 30 min, DI water for 30 min and BGE solution for 10 min. Between two

successive injections, the capillary was flushed with BGE solution for 1 min. At the end of a working day, the capillaries were flushed with DI water for 15 min, followed by the application of a vacuum for 5 min and stored dry overnight. All CE experiments were performed at ambient temperature.

2.3.2. Double opposite end injection

Manual injection of standard solutions and EBC samples was carried out hydrodynamically from both capillary ends. The sample was first injected into one capillary end, followed by the injection of the BGE. The same sample was then injected from the other capillary end. The same injection duration (30 s) and height difference (15 cm) was applied for both sample aliquots and BGE, resulting in the samples being located at the opposite capillary ends after the injection sequence. Upon application of the separation voltage, the anions and cations from the opposite sample plugs inside the separation capillary moved towards the opposite electrode and were detected by the C⁴D detector placed at 28 cm from the anodic side.

2.3.3. Detection system

A custom made C⁴D detector (Version 5.06, ADMET s.r.o., Prague, Czech Republic) operating at a frequency of 1.8432 MHz and a voltage 50 V_{p-p} was used for the detection of the separated analytes. Data were collected using an ORCA 2800 24-bit A/D converter and ECOMAC software ver. 0.254 (ECOM spol s.r.o., Praha, Czech Republic).

2.3.4. pH measurements

pH was measured by the Orion Star A111 pH Benchtop Meter (Thermo Scientific, Chelmsford, MA, USA) equipped with a microelectrode (MI-410 Combination pH Electrode, Microelectrodes, Inc., Bedford, NH, USA) that was suitable for pH measurements from as little as 10 µL of EBC. The pH of the EBC samples was measured as is, i.e. no degassing was applied.

2.4. Patient selection

2.4.1. Control subjects

Ten healthy volunteers were recruited from Masaryk University (mean age 24 years, five males, five females) and formed the control group. Controls were defined as individuals without a significant history of respiratory disease who had not experienced a respiratory infection during the four weeks prior to the study. All were non-smokers.

2.4.2. Asthma patients

Twelve asthmatics (mean age 57 years, five males, seven females) were recruited. All were in a clinically stable phase at the time of the study. FEV1 (forced expiratory volume in 1 s) median: 70%. All patients were treated with inhaled corticosteroids. Two patients were treated with systemic corticosteroids. All patients were non-smokers.

2.4.3. COPD patients

Thirteen patients with COPD (mean age 64 years, eight males, five females) were studied. All were in a stable phase of the disease at the time of the study. FEV1 median: 69%. At the time of the study, COPD patients were not being treated with corticosteroids. None reported an exacerbation of their disease in the month preceding the study.

2.4.4. CF patients

Ten CF patients (mean age 31.5 years, five males, five females) were studied. FVC (forced vital capacity) median: 59.5%, FEV1 median: 40%, DLco (diffusing lung capacity) median: 66.6%. At the time of the study, all patients were treated with inhaled corticosteroids. All were non-smokers.

2.4.5. PF patients

Fifteen patients (mean age 67 years, 6 males, 9 females) in a stable phase of the disease were studied. FVC median: 67%, TLC median: 67%, DLco median: 56%. None reported an exacerbation of their disease in the month preceding the study. All patients were non-smokers. 12 patients were treated with systemic corticosteroids.

2.4.6. Sarcoidosis patients

Eight patients (mean age 56 years, four males, four females), in a stable phase of the disease, were studied. FVC median: 76%, FEV1 median: 81.5%, DLco median: 80.5%. At the time of the study, three of the patients were being treated with systemic corticosteroids, one patient was being treated with inhaled corticosteroids. All patients were non-smokers.

Participants gave free and informed consent to participate in this study in compliance with the ethical standards required by the local Ethical Commission at University Hospital and the Masaryk University in Brno. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

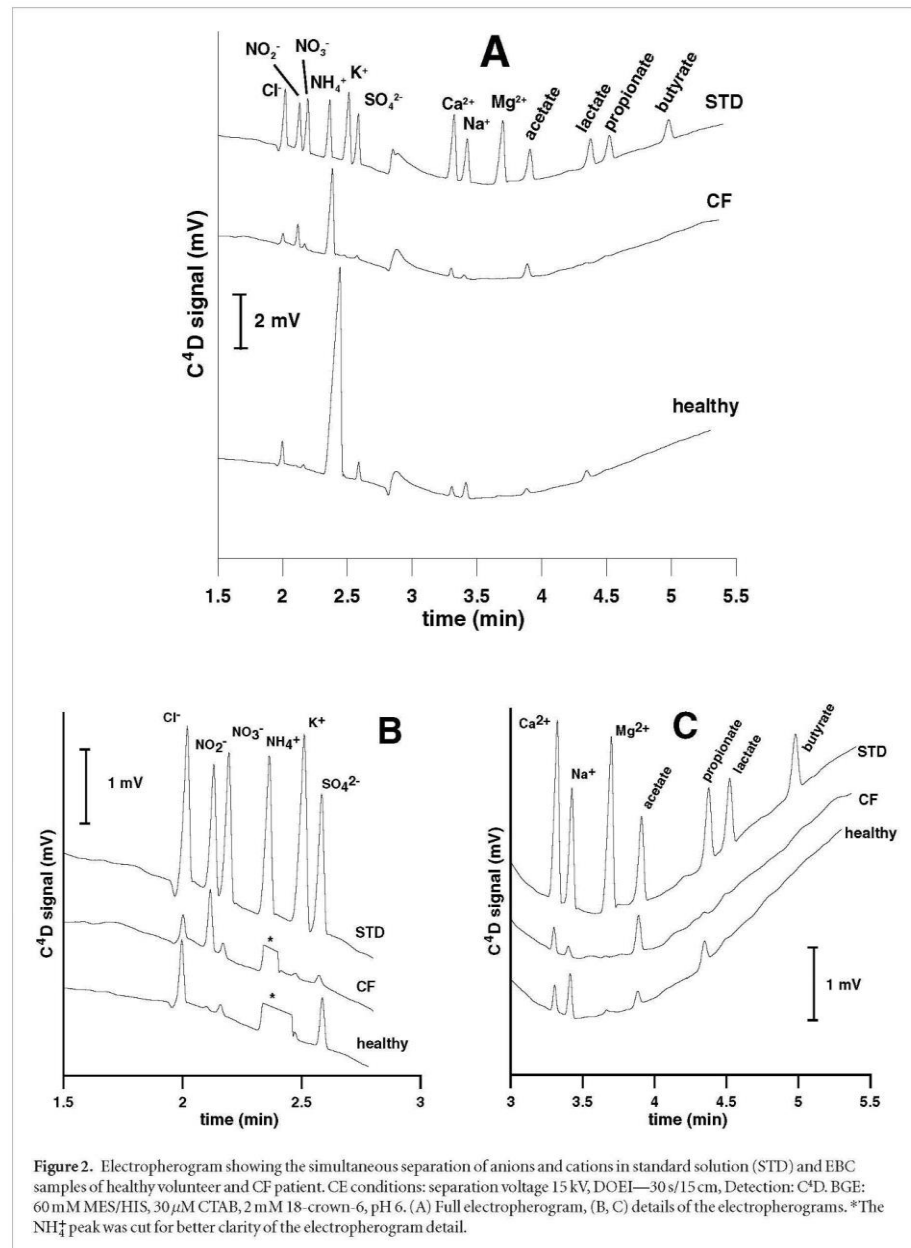
2.5. Statistical evaluation of the results

Data are expressed as medians (interquartile range) when appropriate. The between-group comparison (patients versus control) of anion and cation values was performed using the Mann–Whitney U test. The results were considered significant if $p \leq 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of BGE for simultaneous analysis of anions and cations in EBC

The composition of the BGE for simultaneous separation of anions and cations is important, as its ionic strength, pH and various additives should allow baseline separation of all ions in EBC. A 60 mM MES, 60 mM HIS, 30 µM CTAB and 2 mM 18-crown-6 at pH 6 was found suitable for simultaneous separation of all anions and cations found in EBC using the DOEI



principle. A 2 mM 18-crown-6 was included in the BGE to allow the separation to occur of large concentrations of NH₄⁺ present in EBC (typically 10 to 100 fold larger than K⁺) from K⁺. The incorporation of K⁺ into the cavity of 18-crown-6 during separation causes a significant decrease of its effective mobility [42] and it can be baseline separated from NH₄⁺ cation. Further, by employing a 30 μM concentration of CTAB, the electro-osmotic flow (EOF) was reversed to allow fast analysis to take place of even slowly migrating anions of organic acids, such as lactate, propionate and butyrate.

The detector was positioned at an optimum distance of 28 cm from the cation injection side (anodic side) and 22 cm from the anion injection side (cathodic side). Figure 2 shows a simultaneous separation of a standard solution, an EBC sample from a healthy individual and an EBC sample from a CF patient.

Note that CE analysis shows elevated values of some anions in the EBC of the CF patient, used as an example here. For instance, nitrite is significantly elevated. The nitrites (and nitrates) are the end products of NO transformation in the airways. Exhaled NO is typically not

Table 1. Analytical parameters of the developed DOEI-CE-C⁴D method.

Ion	RSD(tM)% ^a	RSD (PA)% ^a	LOD (μ M)	r^2	Calibration range (μ M)
Chloride	1.2	4.8	0.8	0.9967	0–100
Nitrite	1.1	6.5	1.4	0.9977	0–50
Nitrate	1.1	5.6	1.3	0.9926	0–50
Sulfate	0.9	5.0	0.8	0.9960	0–50
Acetate	0.7	5.5	2.7	0.9981	5–200
Lactate	0.8	3.9	2.9	0.9985	0–150
Propionate	0.8	6.3	2.6	0.9991	0–100
Butyrate	0.9	6.4	3.7	0.9987	0–50
Ammonium	0.6	2.4	0.5	0.9994	10–1000
Potassium	0.6	2.3	1.3	0.9992	0–100
Calcium	0.6	4.1	0.6	0.9993	0–100
Sodium	0.6	2.7	0.6	0.9945	0–150
Magnesium	0.6	2.5	0.8	0.9997	0–50

^a analysis of standards ($n = 7$)

RSD, relative standard deviation; tM, migration time; PA, peak area.

elevated in CF patients and cannot be used as a marker of airway inflammation, as it is commonly employed in asthma.

It remains unclear whether decreased airway NO concentrations in CF result from reduced NO formation or clearance of NO within the airway fluids. Higher concentrations of nitrite were found in cystic fibrosis patients in several studies [18, 43] which suggests that a significant amount of airway NO metabolites in CF are retained in the airway fluid and may thus be present in the EBC samples. In our study, the majority of the CF patients had elevated concentrations of both NO₂ and NO₃ compared to healthy controls. The same applied to patients with other respiratory diseases, as will be discussed later.

3.2. Performance of the analytical method

The analytical parameters of the developed CE method with DOEI were assessed and are shown in table 1. The data on repeatability are based on manual, hydrodynamic injection from both capillary ends, as described earlier. The repeatability of migration times was excellent, with RSD values of less than 1.3% ($n = 7$). Also the repeatability of the peak areas was very good (below 7%). The five point calibration graphs were constructed by preparing the calibration solutions of all ions in DI water in the concentration ranges given in table 1, to match the concentration ranges found in EBC, and the corresponding calibration parameters are also listed in table 1. Limits of detection were in the low micromolar range for all analyzed ions (0.5–3.7 μ M).

3.3. Analysis of EBC in various respiratory diseases

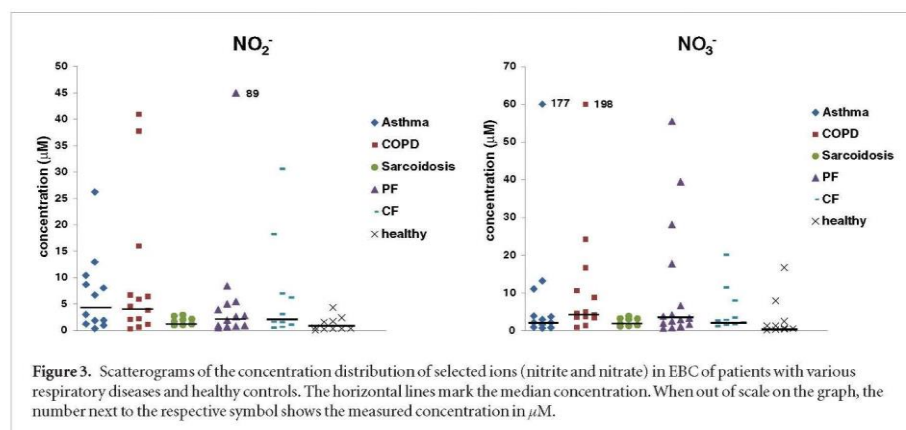
The developed DOEI-CE-C⁴D method was applied in the analysis of the total ionic content of 58 patients with various respiratory diseases, and compared to ten healthy controls. The EBC samples were collected as described earlier and the content of all ions present

therein was quantified based on the calibration curves. The pH of each sample was also measured. Table 2 shows the results of the analysis. The data from each group was compared to the healthy control group by using a two tailed Mann–Whitney U test at $p \leq 0.05$. There was no statistically significant difference in pH values among the groups. The median pH values ranged from 6.40 to 6.66. The analysis of ionic profiles, however, revealed some interesting results. In general, the ionic content of EBC from patients with respiratory diseases showed elevated levels of several anions. For instance, the median values of nitrite were statistically higher in COPD (4.53 μ M (1.61–11.34)), asthma (4.84 (1.38–9.97)), PF (2.62 μ M (0.79–5.48)) and CF (2.33 μ M (0.99–9.78)) compared to healthy controls (0.43 μ M (0.30–1.86)), but not in sarcoidosis (1.81 μ M (1.05–2.56)). Similarly elevated values were also observed for nitrate in COPD (4.58 μ M (3.47–13.59)), PF (3.31 μ M (1.64–17.72)) and CF (2.75 μ M (1.65–8.83)) versus 0.93 μ M (0.33–3.82) in healthy controls, but again not in sarcoidosis (2.38 μ M (1.27–3.19)) and not in asthma (2.55 μ M (1.07–9.24)). These results are in line with numerous previous studies in which elevated nitrite and nitrate were detected in various studied respiratory diseases, but not in sarcoidosis [44–47]. Figure 3 shows the scattergrams for significant anions, nitrite and nitrate, in all studied groups.

Another group of anions that was detected in the micromolar range in the EBC was that of weak organic acid anions (acetate, lactate, propionate and butyrate). Among these anions, the most remarkable results were obtained for lactate, which showed decreased levels in all patients with all respiratory diseases (see table 2). Another volatile anion, acetate, was significantly elevated, but only in asthma and COPD. The levels in PF, sarcoidosis and CF were not statistically different from the healthy controls. Figure 4 shows the scattergrams of the concentrations of acetate and lactate in these groups.

Table 2. Median (interquartile range) concentrations (μM) of all ions detected in EBC of the patients and healthy controls and pH.

	Cl^-	NO_2^-	NO_3^-	SO_4^{2-}
Asthma	3.47 (1.49–7.28)	4.84 (1.38–9.97)	2.55 (1.07–9.24)	1.88 (0.99–2.56)
COPD	7.58 (3.95–67.75)	4.53 (1.61–11.34)	4.58 (3.47–13.59)	1.12 (0.74–1.84)
Sarcoidosis	1.60 (0.68–4.21)	1.81 (1.05–2.56)	2.38 (1.27–3.19)	0.80 (0.58–1.65)
PF	1.57 (1.10–16.34)	2.62 (0.79–5.48)	3.31 (1.64–17.72)	0.31 (0.16–1.20)
CF	5.84 (3.40–13.36)	2.33 (0.99–9.78)	2.75 (1.65–8.83)	0.74 (0.59–1.57)
Healthy	60.86 (5.11–87.37)	0.43 (0.30–1.86)	0.93 (0.33–3.82)	1.51 (0.54–2.22)
	Acetate	Lactate	Propionate	Butyrate
Asthma	132.20 (28.71–176.03)	1.14 (0.00–2.18)	44.03 (10.75–78.88)	1.74 (0.00–12.60)
COPD	102.06 (58.12–130.51)	1.68 (0.53–7.70)	18.85 (11.71–41.48)	1.15 (0.00–4.10)
Sarcoidosis	50.19 (20.76–120.20)	1.64 (0.75–4.59)	10.70 (3.11–53.24)	2.02 (0.00–6.02)
PF	76.18 (17.65–153.08)	0.87 (0.40–8.83)	23.80 (4.00–55.55)	5.48 (0.00–10.16)
CF	40.20 (16.13–114.31)	2.21 (1.57–3.84)	15.04 (7.09–29.50)	0.51 (0.00–2.95)
Healthy	18.80 (8.06–48.79)	26.05 (8.60–112.09)	4.63 (2.14–29.77)	0.81 (0.64–2.36)
	NH_4^+	K^+	Ca^{2+}	
Asthma	381.39 (221.02–494.21)	3.36 (2.88–5.20)	4.81 (3.36–8.09)	
COPD	383.26 (335.50–662.92)	2.74 (1.42–15.25)	6.84 (3.61–13.30)	
Sarcoidosis	320.38 (128.69–453.69)	1.70 (1.03–3.54)	3.75 (2.07–4.26)	
PF	368.54 (250.10–607.35)	2.39 (1.15–9.56)	4.69 (2.67–31.31)	
CF	281.50 (235.46–380.33)	2.53 (1.27–4.66)	7.59 (4.10–12.92)	
Healthy	309.97 (207.48–511.57)	60.71 (20.94–88.69)	8.01 (5.05–14.81)	
	Na^+	Mg^{2+}	pH	
Asthma	5.79 (4.43–10.62)	0.96 (0.51–1.21)	6.40 (6.28–6.52)	
COPD	9.93 (1.66–29.80)	1.09 (0.79–1.65)	6.49 (6.24–6.89)	
Sarcoidosis	2.14 (1.31–5.25)	0.50 (0.33–0.66)	6.56 (6.10–6.85)	
PF	5.01 (2.03–12.31)	0.76 (0.59–2.03)	6.64 (6.23–7.09)	
CF	4.48 (2.55–7.98)	0.74 (0.57–1.18)	6.58 (6.51–6.84)	
Healthy	55.41 (19.92–116.92)	1.09 (0.69–1.50)	6.66 (6.38–7.21)	



The occurrence of acetate and lactate in EBC was proposed on the basis of their metabolic paths and evolution into the gas phase [48]. Recently, acetate was identified as a unique marker of gastro-esophageal reflux disease, detected in exhaled breath [49] by SIFT-MS. The occurrence was linked to the acidification of

the airways due to the interaction of gastric fluid (HCl and pepsin) with the airway tissue.

Interestingly, acidification of airways has also been shown to occur in various respiratory diseases, including asthma and COPD, and the measured elevated acetate in this work may be of interest in the clarification

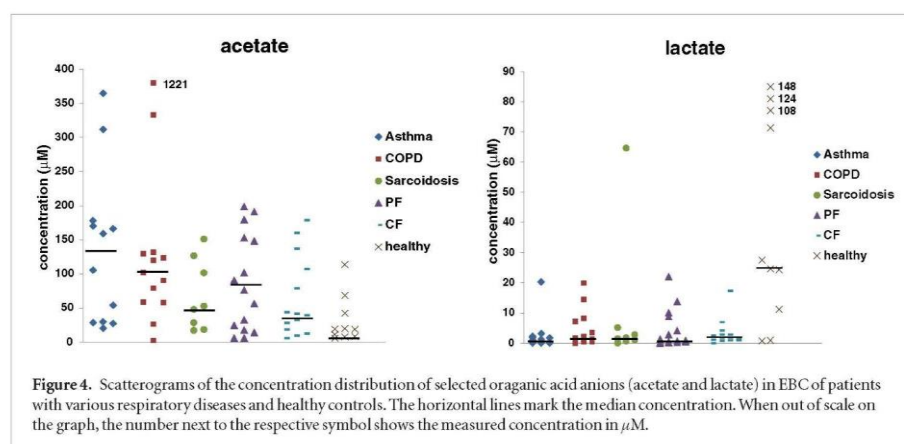


Figure 4. Scattergrams of the concentration distribution of selected organic acid anions (acetate and lactate) in EBC of patients with various respiratory diseases and healthy controls. The horizontal lines mark the median concentration. When out of scale on the graph, the number next to the respective symbol shows the measured concentration in μM .

of the acidification causes. However, lactate is present in high concentration in blood, and its occurrence in EBC was studied mainly as a surrogate for blood determinations, during training and exercise [50]. The reason for decreased concentrations of lactate in various respiratory diseases is at the moment unclear, but the correlation between blood and EBC lactate in patients with respiratory diseases might provide some clues. The levels of lactate in healthy individuals were similar to those obtained by other authors [25, 50]. No statistical difference in butyrate levels was detected for any patient group compared to healthy controls. Propionate, chloride and sulfate also showed no statistical difference for most of the patient groups. As these anions have not demonstrated clinical value they were not considered significant.

The analysis of cations revealed that there is about a 10- to 100-fold higher concentration of ammonia in EBC compared to other cations. However, the differences in NH_4^+ concentration among all groups were not statistically large. Due to its inherent volatility, ammonia has always been difficult to measure *in vivo* and measuring breath ammonia is additionally challenging due to many confounding factors (protein metabolism, metabolic activities of mouth bacteria). Potassium and sodium cations were significantly elevated in the healthy control group compared to all groups. No differences were found for calcium or magnesium cations, except for sarcoidosis, in which the values were statistically lower. As there is no known clinical importance of the studied cations (except ammonia as discussed above), the differences can probably be ascribed to compensate the neutrality of the EBC solution. Since elevated lactate was found in healthy subjects, the change in these EBC samples must be counterbalanced by high concentrations of some cations (NH_4^+ , K^+ , Na^+). This CE analysis of total ionic content is one of a few studies in which cations have been analyzed in EBC [24, 25] and more work is needed to establish whether the analyzed cations in the EBC have any significance.

4. Conclusions

In this work we have used the miniaturized EBC sampling device for the quick and simple collection of EBC from patients with several respiratory diseases. The EBC sampling was fast (under one minute) and allowed the collection of ca. $70 \mu\text{L}$ of EBC, sufficient for subsequent analysis by DOEI-CE-C⁴D. The developed collection system provides a highly reproducible and fast way of collecting EBC, with a subsequent CE analytical method allowing the screening of multiple anions and cations in the EBC samples in less than five minutes. The major strengths of the presented approach are that it allows us to analyse several markers in EBC at the same time with very few sample requirements and that it has a sensitivity superior to other approaches, for instance, enzyme-linked immune-assays (ELISA) or spectrophotometric reactions [51]. Another asset is the speed of both sampling and analysis that can provide the required data in real time, opening up new avenues to simple point-of-care diagnostics. Statistically significant differences in the content of several anions (nitrite, nitrate, acetate, lactate) were revealed between the patients with respiratory diseases (asthma, COPD, PF, CF) and healthy controls. Among the patient groups, sarcoidosis patients did not show elevated levels for any of the studied ions. Although the work represents only the pilot screening study, the usefulness of CE in monitoring the markers in EBC has been demonstrated. We are currently working on the development of a portable CE instrument with a specially designed interface for direct injection of EBC from the sampler that could be used as a point-of-care analytical tool for EBC analysis in the future. It is worth noting that the developed concept is not limited to the analysis of small ions. Provided a suitable detection method, i.e. laser induced fluorescence (LIF), is used, other markers of oxidative stress can be analyzed. For instance, tripeptide glutathione or various nitrosylated compounds, can be sensitively

detected by CE-LIF at low nanomolar concentrations and such methods are currently being developed in our laboratory.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support from the Grant Agency of the Czech Republic (grant no. P206/13/21919S). Part of the work was realized in CEITEC—Central European Institute of Technology, with research infrastructure supported by the project CZ.1.05/1.1.00/02.0068 financed from the European Regional Development Fund.

References

- [1] Hippocrates 2008 *The Corpus: the Hippocratic Writings* (New York: Kaplan Publishing)
- [2] US Food and Drug Administration 2015 Recently-approved devices (www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm430692.htm)
- [3] Kharitonov S A and Barnes P J 2006 Exhaled biomarkers *Chest* **130** 1541–46
- [4] Silkoff P E, Carlson M, Bourke T, Katial R, Ogren E and Szeffer S J 2004 The AeroCrine exhaled nitric oxide monitoring system NIOX is cleared by the US Food and Drug Administration for monitoring therapy in asthma *J. Allergy Clin. Immunol.* **114** 1241–56
- [5] Dweik R A, Boggs, P B, Erzurum S C, Irvin C G, Leigh M W, Lundberg J O, Olin A C, Plummer A L and Taylor D R 2011 An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184** 602–15
- [6] Van den Toorn L M, Overbeek S E, DeJongste J C, Leman K, Hoogsteden H C and Prins J-B 2001 Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164** 2107–13
- [7] Gustafsson L E, Leone A M, Persson M G, Wiklund N P and Moncada S 1991 Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181** 852–7
- [8] Borland C, Cox Y and Higenbottam T 1993 Measurement of exhaled nitric oxide in man *Thorax* **48** 1160–2
- [9] Balfour-Lynn I M, Laverty A and Dinwiddie R 1996 Reduced upper airway nitric oxide in cystic fibrosis *Arch. Dis. Child.* **75** 319–22
- [10] Lundberg J O N, Nordvall S L, Weitzberg E, Kollberg H and Alving K 1996 Exhaled nitric oxide in paediatric asthma and cystic fibrosis *Arch. Dis. Child.* **75** 323–6
- [11] Dötsch J, Demirakça S, Terbrack H G, Hüls G, Rascher W and Kühl P G 1996 Airway nitric oxide in asthmatic children and patients with cystic fibrosis *Eur. Respir. J.* **9** 2537–40
- [12] Larson T V, Covert D S and Frank R 1979 A method for continuous measurement of ammonia in respiratory airways *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* **46** 603–7
- [13] Sidorenko G I, Zborovskii E I and Levina D I 1980 Surface-active properties of the exhaled air condensate (a new method of studying lung function) *Ter. Arkh.* **52** 65–8
- [14] Kurik M V, Rolik L V, Parkhomenko N V, Tarakhan L I and Savitskaia N V 1987 Physical properties of a condensate of exhaled air in chronic bronchitis patients *Vrach. Delo* **7** 37–9
- [15] Rosias P 2012 Methodological aspects of exhaled breath condensate collection and analysis *J. Breath Res.* **6** 027102
- [16] Reinhold P and Knobloch H 2010 Exhaled breath condensate: lessons learned from veterinary medicine *J. Breath Res.* **4** 017001
- [17] Formanek W, Inci D, Lauener R P, Wildhaber J H, Frey U and Hall G L 2002 Elevated nitrite in breath condensates of children with respiratory disease *Eur. Respir. J.* **19** 487–91
- [18] Ho L P, Innes J A and Greening A P 1998 Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide *Thorax* **53** 680–4
- [19] Ganas K, Loukides S, Papatheodorou G, Panagou P and Kalogeropoulos N 2001 Total nitrite/nitrate in expired breath condensate of patients with asthma *Respir. Med.* **95** 649–54
- [20] Misko T P, Schilling R J, Salvemini D, Moore W M and Currie M G 1993 A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples *Anal. Biochem.* **214** 11–6
- [21] Marteus H, Törnberg D C, Weitzberg E, Schedin U and Alving K 2005 Origin of nitrite and nitrate in nasal and exhaled breath condensate and relation to nitric oxide formation *Thorax* **60** 219–25
- [22] Ratnawati M, Morton J, Henry R L and Thomas P S 2006 Exhaled breath condensate nitrite/nitrate and pH in relation to pediatric asthma control and exhaled nitric oxide *Pediatr. Pulmonol.* **41** 929–36
- [23] Griese M, Noss J and Schramel P 2003 Elemental and ion composition of exhaled air condensate in cystic fibrosis *J. Cyst. Fibros.* **2** 136–42
- [24] Svensson S, Isacson A C, Ljungkvist G, Toren K and Olin A C 2005 Optimization and validation of an ion chromatographic method for the simultaneous determination of sodium, ammonium and potassium in exhaled breath condensate *J. Chromatogr. B* **814** 173–7
- [25] Greenwald R, Ferdinands J M and Teague W G 2009 Ionic determinants of exhaled breath condensate pH before and after exercise in adolescent athletes *Pediatr. Pulmonol.* **44** 768–77
- [26] Chladkova J, Krcmova I, Chladek J, Cap P, Micuda S and Hanzalkova Y 2006 Validation of nitrite and nitrate measurements in exhaled breath condensate *Respiration* **73** 173–9
- [27] Kuban P, Kobrin E G and Kaljurand M 2012 Capillary electrophoresis—a new tool for ionic analysis of exhaled breath condensate *J. Chromatogr. A* **1267** 239–45
- [28] Timerbaev A R 2008 Inorganic analysis of biological fluids using capillary electrophoresis *J. Sep. Sci.* **31** 2012–21
- [29] Baena B, Cifuentes A and Barbas C 2005 Analysis of carboxylic acids in biological fluids by capillary electrophoresis *Electrophoresis* **26** 2622–36
- [30] Zemann A, Schnell E, Volgger D and Bonn G K 1998 Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis *Anal. Chem.* **70** 563–7
- [31] Fracassi da Silva J A and do Lago C L 1999 An oscillometric detector for capillary electrophoresis *Anal. Chem.* **70** 4339–43
- [32] Mai T D, Pham T T, Pham H V, Sáiz J, Ruiz C G and Hauser P C 2013 Portable capillary electrophoresis instrument with automated injector and contactless conductivity detection *Anal. Chem.* **85** 2333–9
- [33] Fernandez-la-Villa A, Bertrand-Serrador V, Pozo-Ayuso D F and Castano-Alvarez M 2013 Fast and reliable urine analysis using a portable platform based on microfluidic electrophoresis chips with electrochemical detection *Anal. Methods* **5** 1494–501
- [34] Ryvolova M, Preisler J, Brabazon D and Macka M 2010 Portable capillary-based (non-chip) capillary electrophoresis *Trends Anal. Chem.* **29** 339–53
- [35] Kuban P and Karlberg B 1998 Simultaneous determination of small cations and anions by capillary electrophoresis *Anal. Chem.* **70** 360–5
- [36] Kuban P, Karlberg B, Kuban P and Kuban V 2002 Application of a contactless conductometric detector for the simultaneous determination of small anions and cations by capillary electrophoresis with dual-opposite end injection *J. Chromatogr. A* **964** 227–41
- [37] Greguš M, Foret F and Kuban P 2015 Single breath analysis using a novel simple sampler and capillary electrophoresis with contactless conductometric detection *Electrophoresis* **36** 526–33

- [38] Fumagali M, Dolcini M, Sala A, Stolk J, Fregonese L, Ferrari F, Viglio S, Luisetti M and Iadarola P 2008 Proteomic analysis of exhaled breath condensate from single patients with pulmonary emphysema associated to $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency *J. Proteomics* **71** 211–21
- [39] Kuban P and Foret F 2013 Exhaled breath condensate: determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review *Anal. Chim. Acta* **805** 1–18
- [40] Respiratory Research 2009 RTube™ (www.respiratoryresearch.com/)
- [41] Almstrand A C, Bake B, Ljungström E, Larsson P, Bredberg A, Mirgorodskaya E and Olin A C 2010 Effect of airway opening on production of exhaled particles *J. Appl. Physiol.* **108** 584–8
- [42] Bachmann K, Boden J and Haumann I 1992 Indirect fluorimetric detection of alkali and alkaline earth metal ions in capillary zone electrophoresis with cerium(III) as carrier electrolyte *J. Chromatogr. A* **626** 259–65
- [43] Grasemann H, Ioannidis I, Tómkiewicz R, de Groot H, Rubin B and Ratjen F 1998 Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease *Arch. Dis. Child.* **78** 49–53
- [44] Wilsher M, Fergusson W, Milne D and Wells A 2005 Exhaled nitric oxide in sarcoidosis *Thorax* **60** 967–70
- [45] Choi J, Hoffman L A, Sethi J M, Zullo T G and Gibson K F 2009 Multiple flow rates measurement of exhaled nitric oxide in patients with sarcoidosis: a pilot feasibility study *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* **26** 98–109
- [46] O'Donnell D M, Moynihan J, Finlay G A, Keatings V M, O'Connor C M, McLoughlin P and Fitzgerald M X 1997 Exhaled nitric oxide and bronchoalveolar lavage nitrite/nitrate in active pulmonary sarcoidosis *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156** 1892–6
- [47] Worlitzsch D, Meyer K C and Döring G 2013 Lactate levels in airways of patients with cystic fibrosis and idiopathic pulmonary fibrosis *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188** 111
- [48] Greenwald R, Fitzpatrick A M, Gaston B, Marozkina N V, Erzurum S, Teague W G 2010 Breath formate is a marker of airway S-nitrosothiol depletion in severe asthma *PLOS One* **5** e11919
- [49] Dryahina K, Pospisilova V, Sovova K, Shestivska V, Kubista J, Spesyvyj A, Pehal F, Turzikova J, Votruba J and Spanel P 2014 Exhaled breath concentrations of acetic acid vapour in gastroesophageal reflux disease *J. Breath Res.* **8** 037109
- [50] Marek E M, Volke J, Hawener I, Platen P, Muckenhoff K and Marek W 2010 Measurements of lactate in exhaled breath condensate at rest and after maximal exercise in young and healthy subjects *J. Breath Res.* **4** 017105
- [51] Horvath I, Hunt J and Barnes P J 2005 *Eur. Respir. J.* **26** 523–48

5.1.1. Gastroesofageální reflux u plicních nemocí analyzovaný pomocí kondenzátu vydechaného vzduchu (KVV)

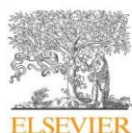
Gastroezofageální reflux (GER) a nemoc z gastroezofageálního refluxu (GERD – gastroesophageal reflux disease) je onemocnění způsobené nadměrným návratem žaludečního obsahu do jícnu. Patologický GER je častou příčinou řady obtíží, které se mimo jiné projevují jako onemocnění respiračního systému – ať už akutní, chronická nebo recidivující. Diagnostika GERD se opírá o endoskopické vyšetření jícnu a žaludku a 24hodinovou jícnovou kombinovanou pH-impedancetrii, metody, které jsou značně invazivní a nejsou příliš dobře snášeny. Odběr KVV pro diagnostiku GERD je v tomto případě zcela rychlá a jednoduchá, v krátkém čase opakovatelná technika monitorování stavu dýchacích cest a nepřímo také stavu jícnu a s ním související refluxní choroby. Dechové testy obecně představují moderní, neinvazivní diagnostický nástroj také v gastroenterologii a hepatologii, například testy založené na měření koncentrace vodíku nebo uhlíku pro průkaz infekce *Helicobacter pylori*, laktózoové intolerance, bakteriálního přerůstání v tenkém střevě, stanovení rychlosti pasáže, vyprazdňovací funkce žaludku, pankreatické insuficienci a jaterní funkce (De Vincentis a kol., 2019).

V naší práci „Capillary electrophoretic analysis of ionic content in exhaled breath condensate nad pH monitoring as a non-invasive method in gastroesophageal reflux disease diagnostics“ se zabýváme obsahem pH a iontů v KVV u pacientů s podezřením na gastroezofageální reflux. Odběr KVV by tak mohl představovat inovativní neinvazivní metodu odběru vzorků. Měřením pH a obsahu iontů v KVV pomocí kapilární elektroforézy s bezkontaktní konduktometrickou detekcí jsme se statistickou významností odlišily pacienty s kyselým a slabě kyselým refluxem od zdravých kontrol. pH korelovalo silně s amonnými a sodnými kationty. pH bylo také signifikantně odlišné u skupiny zdravých a skupiny s kyselým i slabě kyselým refluxem (Mann-Whitney test). Měřením koncentrací vybraných markerů v KVV (pH, dusičnan, butyrát, propionát, sodný kation) bylo možné selektovat pacienty s pravděpodobným kyselým nebo slabě kyselým refluxem. Na základě našich prvních výsledků by KVV bylo možné použít jako doplňkovou metodu před zavedením poměrně invazivní MII-pH sondy, tj. k pre-selekcii pacientů, kteří vyžadují další diagnostické měření. Bohužel není možné pomocí analýzy KVV rozdělit pacienty s kyselým a slabě kyselým refluxem. Vývoj a využití přístroje pro dělení KVV poskytuje zajímavé pilotní výsledky, u kterých předpokládáme využití pro podrobnější klasifikaci pacientů s kyselým a slabě kyselým refluxem. Viz kapitola 5.1.2.

Jako vedlejší nález naší studie s KVV bylo zjištění, že Peptest sloužící k selekci pacientů s gastroezofageálním refluxem má malou senzitivitu a specifitu, s nízkou opakovatelností a nehodí se jako skrínink žaludečního refluxu. Viz kapitola 5.1.3.

5.1.2. Capillary electrophoretic analysis of ionic content in exhaled breath condensate nad pH monitoring as a non-invasive method in gastroesophageal reflux disease diagnostics (Lačná J, Ďurč P, Greguš M, Skříčková J, Doubková M, Pokojová E, Kindlová D, Dolina J, Konečný Š, Foret F, Kubáň P. *Journal of Chromatography B*. 2019; 1134-1135:121857)

Journal of Chromatography B 1134–1135 (2019) 121857



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jchromb



Capillary electrophoretic analysis of ionic content in exhaled breath condensate and pH monitoring as a non-invasive method in gastroesophageal reflux disease diagnostics



Júlia Lačná^{a,b}, Pavol Ďurč^{a,b}, Michal Greguš^a, Jana Skříčková^c, Martina Doubková^c, Eva Pokojová^c, Dagmar Kindlová^c, Jiří Dolina^d, Štefan Konečný^d, František Foret^a, Petr Kubáň^{a,*}

^a Department of Bioanalytical Instrumentation, CEITEC Masaryk University, Veveří 97, Brno 602 00, Czech Republic

^b Department of Chemistry, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic

^c Department of Respiratory Diseases and Tuberculosis, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Jihlavská 20, Brno 625 00, Czech Republic

^d Internal Gastroenterology Department, University Hospital Brno, and Faculty of Medicine, Masaryk University, Jihlavská 20, Brno 625 00, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Capillary electrophoresis
Contactless conductivity detection
Exhaled breath condensate
Anions and cations
pH
Gastroesophageal reflux disease

ABSTRACT

In this study, the ionic profile and pH of exhaled breath condensate (EBC) in a group of patients with acid and weakly acid reflux and no-reflux controls were compared. A portable sampler was used for non-invasive EBC collection from five exhalations. The ionic profile (anions, cations, organic acids) and pH of the collected EBC samples were measured by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection and a pH micro-electrode, respectively. Several ions were elevated in the patient groups. Sodium cation was elevated in weakly acid reflux (significance level $p < 0.01$) and acid reflux ($p < 0.05$) compared to no-reflux controls. Butyrate and propionate were elevated in both acid reflux and weakly acid reflux compared to no-reflux controls (butyrate: $p < 0.01$, propionate: $p < 0.05$). The median values of pH (after de-aeration with N_2) were also significantly higher ($p < 0.01$) in groups with acid reflux and weakly acid reflux than in the control group with no reflux. The ionic analysis and simultaneous pH measurement offer a simple, cheap, fast, and non-invasive approach in gastroesophageal reflux disease diagnostics.

1. Introduction

Analysis of non-invasively acquired biological samples is becoming increasingly important in medical diagnostics [1–3] because they are easy to obtain, sampling is fast, painless and comfortable, and the sample matrix is often quite simple. Exhaled breath bears a significant promise to become a convenient substitute to invasive biological samples, especially in diagnosing lung diseases and/or lung cancer. For instance, a prototype of breath analyzer for early cancer diagnostics that can analyze a non-specific breath print by using multitude of sensors and chemometric data evaluation has been recently presented [4–6]. Exhaled breath condensate (EBC) is an aqueous fraction of exhaled breath that contains numerous non-volatile and water-soluble volatile compounds in low concentrations. EBC is suitable for analysis by liquid phase separation techniques, such as high performance liquid chromatography or capillary electrophoresis (CE). Obtaining an EBC sample is simple, as it only requires the subject to breathe into a specially designed device with cooled surface, at which the exhaled breath

condenses. EBC sampling devices can be made portable [7–9] and ideally, the EBC collection from a single breath or few exhalations is desirable. In one of our previous articles we have developed a simple and portable EBC sampler that allows EBC collection from single exhalation and analysis from as little as 10 μ L of such EBC sample [9]. CE with contactless conductivity detection (C^4D) was used for analysis of ionic content of EBC in patients with various respiratory diseases, such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease, sarcoidosis, and cystic fibrosis [10].

EBC analysis may be attractive in other diagnostic areas, for instance in the diagnosis of gastroesophageal reflux disease (GERD) that currently relies on invasive procedures. GERD is a most common chronic digestive disease with a prevalence of 20%–40% in the western world [11,12] and can lead to esophageal and extraesophageal symptomatology [13]. Typical esophageal symptoms are heartburn and regurgitation, but they may be absent in the so called extraesophageal reflux (EER). EER is a condition where acidic refluxate penetrates above the upper esophageal sphincter into the oral cavity, pharynx and upper

* Corresponding author.

E-mail address: petr.kuban@ceitec.muni.cz (P. Kubáň).

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121857>

Received 10 September 2019; Received in revised form 22 October 2019; Accepted 29 October 2019

Available online 12 November 2019

1570-0232/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

and lower respiratory tract. It has been shown that esophagus can tolerate much higher concentrations of acidic refluxate than airway lining tissues [14,15] and therefore, the damage of respiratory tract due to the reflux may be detectable by EBC.

Currently, the golden standard diagnostic method for both GERD and EER is a 24-hour multichannel intraluminal impedance and pH measurement (MII-pH) [16,17] that introduces a thin catheter into one's esophagus. MII-pH is, however, uncomfortable and it is not tolerated well by a great number of patients. Additionally, although MII-pH will detect the pH changes and the number of reflux episodes by measuring the changes of impedance in the lumen of the esophagus, its diagnostic power in assessing EER is significantly weaker.

Monitoring the airway damage due to the EER may require development of an alternative, preferably non-invasive diagnostic method, but currently there is none available. Analysis of exhaled breath and EBC is thus attractive. Dryahina et al. [18] explored the exhaled breath analysis and have found that acetate vapors were significantly elevated in GERD patients compared to healthy controls. Elevated acetate in exhaled breath is however not unique to GERD, it was also found in cystic fibrosis [19,20] or lung cancer [21] patients. In EBC, several compounds for GERD/EER diagnosis were proposed, such as pepsin [22], interleukins, 8-isoprostane [23], and magnesium to calcium ratio [24]. Apart from measuring the above compounds, measurement of pH in EBC is one of the simplest assays that can be readily performed [25,26]. Although it is alluring to use pH as a simple diagnostic marker for GERD/EER, the results of previous studies provide somewhat inconsistent findings. Some researchers found that EBC pH is lower in GERD/EER patients [27–29], while others reported no differences in pH among the studied subjects [30–32].

The aim of this study was to use CE with C^4D to identify the ionic compounds from EBC that can be helpful in diagnosing GERD/EER. CE with C^4D was used for the first time for such investigation. The measurements of the ionic content of EBC samples were also complemented by measuring the pH of EBC. The EBC samples from patient groups diagnosed with acid and weakly acid reflux were compared to a group with no reflux and statistically significantly elevated concentrations of several ions and pH were found.

2. Experimental

2.1. Chemicals and standards

All chemicals were of reagent grade (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Deionized (DI) water (Purite, Neptune, Watrex, Prague, Czech Republic) was used for stock solution preparation and dilutions. Background electrolyte (BGE) for CE measurements was prepared daily by diluting 200 mM stock solutions of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), L-Histidine (HIS) and 200 mM 18-crown-6 (all Sigma-Aldrich) to the required concentration. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, Sigma-Aldrich) was prepared as 10 mM stock solution in 5% acetonitrile and was added to the BGE to yield the final concentration of 30 μ M. Standards were prepared from sodium chloride, sodium nitrite, potassium nitrate, potassium sulfate, lithium lactate, propionic acid, butyric acid (all Sigma-Aldrich), calcium chloride, ammonium acetate, acetic acid, magnesium chloride hexahydrate (all Lach-Ner, Neratovice, Czech Republic) as 10 mM stock solutions and diluted to the required concentration with DI water.

2.2. EBC collection

EBC was collected by a miniature and portable EBC sampling device that was described in detail in our previous publications [9,33]. The sampling device consists of a cooled Al-cylinder (-20°C) that was placed in an insulation sleeve (polyethylene foam) to keep its temperature constant. A 2 mL polypropylene syringe (B-Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) purchased from a local pharmacy was

inserted into the Al-cylinder to collect the EBC. The exhaled air was blown through a polypropylene straw into the syringe, where it condensed on its walls and was collected at the syringe tip using a syringe plunger. Typically, five deep exhalations were sufficient to collect about 100 μ L of the EBC sample that was split into two aliquots. For pH measurements, 30 μ L of EBC was transferred to a 500 μ L polypropylene vial (Eppendorf, Hamburg, Germany). The remaining EBC sample was stored in another 500 μ L polypropylene vial at -80°C until the CE analysis. All patients and healthy controls were asked not to drink, eat and brush their teeth for at least 12 h before EBC collection, except that they were allowed to drink a small amount of water in the morning, typically 2–3 h before EBC sample collection.

2.3. Capillary electrophoresis system and analysis

A purpose-built CE instrument with a custom made C^4D (Version 5.06, ADMET s.r.o., Prague, Czech Republic) operating at a frequency of 1.8432 MHz and voltage $50 V_{p-p}$ was used for the analysis of the ionic content of all EBC samples. The separation voltage of ± 15 kV was provided by a high voltage power supply unit (EMCO DX250, Emco High voltages/XP Power, Sunnyvale, CA, USA). Two Pt wires (0.5 mm outer diameter, 3 cm length, Advent Research Materials Ltd., Eynsham, England) were used as electrodes. Data from the detector were collected using an ORCA 2800 24-bit A/D converter and ECOMAC software ver. 0.254 (ECOM spol s.r.o., Prague, Czech Republic). Fused-silica (FS) capillaries (50 μ m inner diameter, 375 μ m outer diameter, 50 cm total length, Microquartz GmbH, Germany) were used for the separation. All CE experiments were performed at ambient temperature. A separation electrolyte consisting of 20 mmol/L MES, 20 mmol/L HIS, 2 mmol/L 18-crown-6 and 30 μ mol/L CTAB was applied for the ion analysis in the second EBC aliquot without any sample pretreatment. Hydrodynamic injection of samples into the CE system was accomplished by manually elevating the sample vials to the height of 10 cm and keeping them in injection position for 20 s.

2.4. Capillary conditioning

Before its first use, the separation capillary was preconditioned by flushing with 0.1 mol/L NaOH for 30 min, DI water for 30 min and BGE solution for 10 min. Between two successive injections, the capillary was flushed with the separation electrolyte for 1 min. At the end of a working day, the capillary was flushed with DI water for 15 min and stored in DI water overnight.

2.5. pH measurements

pH was measured in the 30 μ L EBC aliquot using an Orion Star A111 pH Benchtop Meter (Thermo Scientific, Chelmsford, MA, USA) equipped with a pH microelectrode (MI-410 Combination pH Electrode, Microelectrodes, Inc., Bedford, NH, USA). The electrode was calibrated before each set of measurements using pH buffers of 4.01 and 7.00 (Thermo Scientific, All-in-one buffer kit no. 916099). The pH of EBC samples was measured immediately after the collection (referred to as native pH). After the native pH measurement, samples were de-aerated using the following procedure and apparatus: one end of a fused-silica capillary (length 10 cm, inner diameter 50 μ m) was connected to a miniature, portable, high-pressure gas cylinder containing N_2 gas (99.5% purity) using a set of fittings and tubings and a miniature regulation valve. The regulation valve was set to 1 bar resulting in a gentle N_2 flow through the fused silica capillary. The free end of the fused silica capillary was inserted into the EBC sample, and the sample was de-aerated for 5 min.

2.6. MII-pH measurements

An MII-pH (Omega, MMS, Enschede, the Netherlands) study was performed in all patients. A catheter containing antimony pH electrode

Table 1
Analytical parameters of the developed CE-C⁴D method.

Ion	RSD tM % STD (EBC)	RSD PA% STD (EBC)	LOD (μM)	r ²	Calibration range (μM)	Calibration equation y = ax + b
chloride	1.2 (0.3)	4.8 (2.5)	0.3	0.9957	0–25	y = 0.0278x + 0.0258
nitrite	1.1 (0.3)	6.5 (2.3)	0.5	0.9994	0–10	y = 0.0270x + 0.0023
nitrate	1.1 (0.3)	5.6 (1.9)	0.3	0.9987	0–25	y = 0.0315x + 0.0166
sulfate	0.9 (0.4)	5.0 (1.0)	0.2	0.9980	0–10	y = 0.0656x + 0.0143
acetate	0.7 (0.6)	5.5 (8.3)	0.4	0.9995	5–200	y = 0.0156x + 0.0200
lactate	0.8 (0.6)	3.9 (6.5)	0.3	0.9996	0–25	y = 0.0207x + 0.0097
propionate	0.8 (0.6)	6.3 (4.1)	0.3	0.9983	0–25	y = 0.0189x + 0.0024
butyrate	0.9 (0.7)	6.4 (1.9)	0.3	0.9990	0–25	y = 0.0188x – 0.0001
ammonium	0.6 (0.9)	2.4 (1.1)	1.2	0.9993	25–1000	y = 0.0211x – 0.1437
potassium	0.6 (1.1)	2.3 (5.6)	0.4	0.9994	0–10	y = 0.0347x + 0.0013
calcium	0.6 (1.0)	4.1 (4.8)	0.3	0.9995	0–25	y = 0.0528x + 0.0059
sodium	0.6 (1.0)	2.7 (5.8)	0.4	0.9996	0–10	y = 0.0356x + 0.0079
magnesium	0.6 (1.1)	2.5 (10.9)	0.3	0.9995	0–10	y = 0.0618x – 0.0054

tM – migration time, PA – peak area, STD – analysis of standards (n = 7), EBC – analysis of EBC sample (n = 5).

(at 5 cm above the esophagogastric junction (EGJ)) and six impedance recording channels (at 3, 5, 7, 9, 15, and 17 cm from the EGJ) was used. The pH electrodes were calibrated externally with buffers of pH 4.01 and 7.00. During the study, patients kept a diary of events, noting the time of meals, sleep, and symptoms that they experienced. The pH-impedance recordings were analyzed using dedicated software and tracings were manually reviewed to confirm reflux episodes and the parameters were calculated. The patient classification was based on acid exposure time greater than 6% and a De Meester score [34] more than 14.72 or more than 50 reflux episodes extending to the proximal parts of the esophagus. The patients were divided into two groups, Group I with a dominant acid reflux (pH < 4, n = 17) and Group II with a dominant weakly acid reflux (pH 4–7, n = 8). Two patients had a negative MII-pH (no reflux) and were thus included in the no reflux control group together with twelve healthy subjects (no reflux group, total subjects, n = 14). The healthy volunteers did not undergo the MII-pH testing for ethical reasons. Their selection was based on the criteria of not having any GERD/EER related symptoms during the last five years and not taking any GERD/EER related medication.

2.7. Statistical evaluation of the results

Data are expressed as median (interquartile range) when appropriate. The between-group comparison (patients vs. controls) of pH, anion and cation values was performed using the Mann–Whitney *U* test. *P*-value < 0.05 was considered as significant. All statistical analyses were performed using Origin 9 Pro, 13.0 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA).

2.8. Study subjects

A total of 39 age-matched subjects were enrolled. Twenty-two patients were recruited from the Department of Respiratory Diseases and Tuberculosis at the University Hospital in Brno (15 males, 7 females, age range 32–75, average age 58 years) and five patients were recruited from the ear, nose, and throat specialists. All patients were referred to the Internal Gastroenterology Department because of the suspected EER. From these 27 patients, 13 were previously diagnosed with idiopathic pulmonary fibrosis, six with asthma, eight had chronic cough without any respiratory disease diagnosis. All patients were in a clinically stable phase at the time of the study and all except one were non-smokers. Twelve healthy volunteers were recruited from Masaryk University and Faculty hospital (7 males, 5 females, age range 38–77, average age 52 years). The healthy subject group had no history of prior GERD/EER diagnosis or therapy for acid reflux. All participants completed a detailed questionnaire assessing their current and past medical history, current medication and information on subject demographics

(age, sex, and race). Participants gave free and informed consent to participate in this study. This study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital in Brno (Approval no. 03–200616, June 20, 2016) and was performed by the ethical principles outlined in the Declaration of Helsinki.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of analytical parameters of the CE-C⁴D system

CE-C⁴D is a powerful analytical technique that can repeatedly analyze ionic content from a very small sample volume (< 10 μL) and is therefore very well suited for the analysis of EBC samples. For analysis of inorganic anions and anions of organic acids as well as cations, a separation electrolyte consisting of 20 mmol/L MES, 20 mmol/L HIS, 30 μmol/L CTAB and 2 mmol/L 18-crown-6 was employed. First, a set of EBC samples was measured and 13 analytes occurring in the EBC samples were identified. The analytical parameters of the CE-C⁴D method were assessed, and Table 1 shows the calibration range, linearity (slope, intercept, r²), limits of detection (defined as signal-to-noise ratio 3:1), and repeatability of migration times and peak areas in both standards and EBC samples. The calibration ranges were selected to cover the concentration ranges of all analytes in the EBC samples.

3.2. CE analysis of ionic content of EBC

To gain an insight into the ionic composition of the collected EBC samples, CE-C⁴D was used for the ionic analysis of all samples. Fig. 1 shows an example of CE-C⁴D analysis of EBC samples from three study subjects (control subject with no reflux (NR), a patient diagnosed with acid reflux (AR) and patient diagnosed with weakly acid reflux (WAR)). For the analysis of anions (a) and cations (b), the same CE system and separation electrolyte were used, and only the polarity of the high voltage power supply was reversed, respectively. In each EBC sample, between 9 and 13 compounds were identified and quantified. It can be noted that the concentrations of several ions in the electropherograms in patient with AR and WAR are higher than in the electropherogram of a healthy person. All concentrations, corresponding concentration ranges and median values are shown in Tables S1, S2 (Supplementary material). The statistical analysis of all EBC samples followed. The data were first tested for normal distribution. From all normally distributed analytes, median Na⁺ concentrations in the AR and WAR groups were 1.2 and 2.1 μM, while in the control group with no reflux the median Na⁺ concentration was 0.9 μM. Na⁺ cations were elevated (*p* < 0.01) in WAR vs. NR controls and in AR vs. NR controls (*p* < 0.05). Median propionate concentrations in the AR and WAR groups were 7.8 and 9.2 μM, compared to 3.4 μM in the control group with no reflux. Median

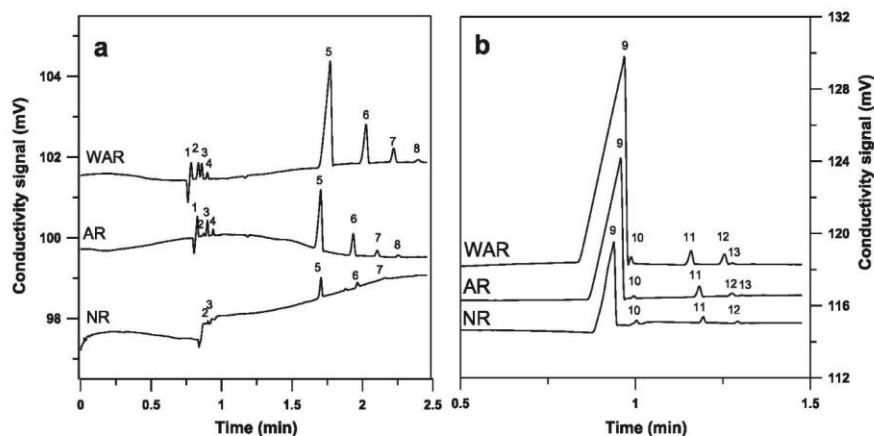


Fig. 1. Electropherograms showing the separation of anions (a) and cations (b) in EBC samples of subject with no reflux (NR), patient with acid reflux (AR) and patient with weakly acid reflux (WAR). CE conditions: Separation voltage 15 kV, Separation electrolyte: 20 mmol/L MES/HIS, 30 μ mol/L CTAB, 2 mmol/L 18-crown-6, pH 6. Peak description: 1-chloride, 2-nitrite, 3-nitrate, 4-sulfate, 5-acetate, 6-lactate, 7-propionate, 8-butyrate, 9-ammonia, 10-potassium, 11-calcium, 12-sodium, 13-magnesium.

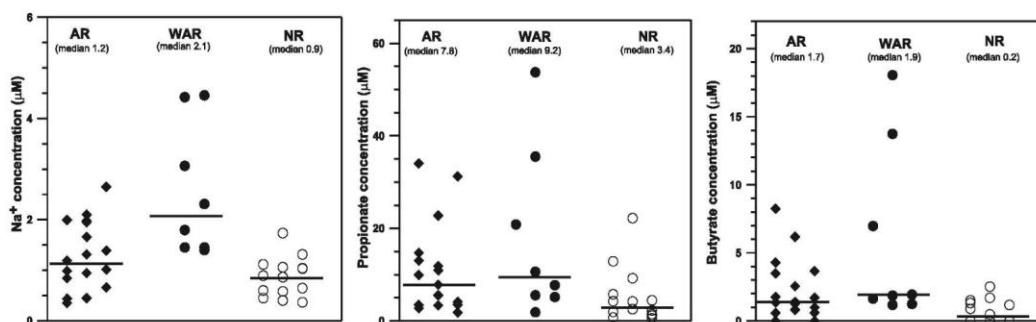


Fig. 2. EBC concentrations of Na^+ , propionate, and butyrate in the three studied groups (acid reflux-AR ($n = 17$), weakly acid reflux-WAR ($n = 8$) and no reflux-NR ($n = 14$). The horizontal lines represent the median values.

butyrate concentrations in the AR and WAR groups were 1.7 and 1.9 μM , compared to 0.2 μM in the control group with no reflux. Butyrate and propionate were elevated in both AR and WAR vs. NR controls (butyrate: $p < 0.01$, propionate: $p < 0.05$). The selected graphs with the concentrations of Na^+ , butyrate, and propionate in EBC are shown in Fig. 2. Na^+ , propionate, and butyrate were elevated in both groups of patients compared to no reflux controls. The role of Na^+ is currently unknown. Short chain fatty acids, propionate and butyrate, were found elevated in EBC samples of both groups (acid reflux, weakly acid reflux) compared to no reflux controls. These acids are produced in significant amounts in the gut (about 5 g per day of butyric acid is produced in the colon of normal subjects [35]) and there may be a possibility that they can be transported via reflux into the esophagus, oral cavity or parts of the respiratory system in trace amounts and thus be present in the EBC.

3.3. pH measurements and correlations of pH with ions analyzed in EBC

Additionally to ionic analyses, simultaneous pH measurements were also performed in all samples. The pH of EBC samples was measured before and after de-aeration with N_2 gas.

Typical sample loss due to the de-aeration/evaporation was $< 3\%$ ($< 1 \mu\text{L}$). The sample loss was measured by weighing the samples

before and after the de-aeration, using a precision analytical balance. Typically, pH was measured in triplicates, and the average value with a relative standard deviation (RSD) is reported (RSD for triplicate pH measurements was less than 0.9%).

The data from pH measurements of all samples before (a) and after (b) the de-aeration are shown in Fig. 3. In native samples, the pH values in all samples ranged from 6.15 to 7.43 and were not statistically different (based on Mann-Whitney U test) among the groups with AR, WAR and NR controls (Fig. 3a). The horizontal lines in the figures correspond to the median pH values. After de-aeration, the pH values ranged from 5.94 to 7.72 (Fig. 3b). The median pH increased most in the group of subjects with WAR (from 6.77 to 7.27), followed by an increase in the group with AR (from 6.67 to 7.16) and only a slight increase was observed in the control group with no reflux (from 6.80 to 6.91). The median values of pH in EBC samples after de-aeration were significantly higher ($p < 0.01$) in the groups with WAR and AR (median pH values: 7.27 and 7.16, interquartile ranges: 7.18–7.54, 7.08–7.39) than in the control group with no reflux (median pH value 6.91, interquartile range 6.72–7.00).

pH is the most simple parameter that can be measured in EBC [36]. Acidic EBC pH has been found in various respiratory diseases such as asthma [23], COPD [37], cystic fibrosis [38] or chronic cough [25], primarily due to the pathological effect of airway acidification.

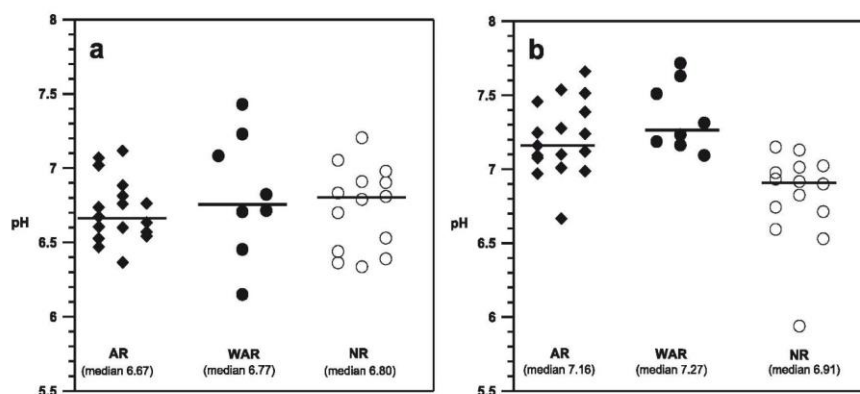


Fig. 3. (a)-native EBC pH of the three groups (acid reflux-AR, weakly acid reflux-WAR, no-reflux-NR), no statistically significant differences ($p = 0.01$ and $p = 0.05$) in pH between the three groups were found. (b)-de-aerated EBC pH of three groups (acid reflux-AR ($n = 17$), weakly acid reflux-WAR ($n = 8$), no-reflux-NR ($n = 14$)), statistically significant differences in pH between these three groups ($p = 0.01$) were found. The horizontal lines represent the median values.

Table 2

Pearson's correlation coefficients of statistically significant ions measured in EBC, de-aerated pH values were used. $n = 39$, $p < 0.05$.

Correlation	Pearson's correlation coefficient, r
pH/ NH_4^+	0.6882
pH/ Na^+	0.5330
pH/butyrate	0.3154

Measurement of EBC pH seems a logical step also in the GERD diagnosis, especially in the case of suspected EER. Up to date, several research groups have studied the pH of EBC to be used as a biomarker for GERD/EER diagnostics with somewhat conflicting findings. Hunt et al. [27] showed that multiple EBC sampling during acid reflux cough episodes in GERD patients leads to EBC acidification and EBC pH can help to distinguish the patients that respond to proton pump inhibitor (PPI) therapy and the non-responders. Niimi et al. [25] found that EBC pH in patients with chronic cough is decreased. Terada et al. [28] reported a lower pH of EBC samples in COPD patients with GERD symptoms (pH 6.47) compared to COPD patients without GERD symptoms (pH 7.17). On the other hand, Shimizu et al. [29] found no difference in EBC pH in the group of asthmatics with GERD symptoms and EBC pH in the group of asthmatics without GERD symptoms. In other studies, researchers found that pH of EBC does not discriminate GERD patients [30,31].

The pH of EBC samples can be influenced by many factors, and the EBC collection should be performed in a standardized manner [7,39]. For instance, ingestion of an acidic drink before EBC collection can result in an intermittent decrease of pH by several pH units [27,40]. The decreased pH can last for up to 2 h after the ingestion [27]. Chewing a chewing gum, drinking tea, coffee or brushing the teeth also induce pH changes to the EBC [41]. To avoid any influence of the food ingestion, the subjects in our study were asked not to eat, drink and brush their teeth at least 12 h before the EBC collection. Those who did not comply with these requirements were excluded from the study. Additionally, the patients did not report to have any reflux episode immediately before and during EBC collection. The EBC collection temperature was set to -20°C in our experiment. The median EBC pH values after de-aeration from our study were 6.91, 7.16 and 7.27 (NR, AR, WAR). These values are in close agreement with the work of Timms et al. [31], who used similar collection temperature and who observed higher mean EBC pH values in COPD and asthma patients than in healthy controls.

3.4. Correlation between the ions and pH

The normally distributed ion concentrations were correlated with pH values. Statistically significant ($p < 0.05$) correlations between pH and the measured ion concentration were calculated in all samples, and the most significant Pearson's correlation coefficients are shown in Table 2. The highest positive correlation between pH and ammonium

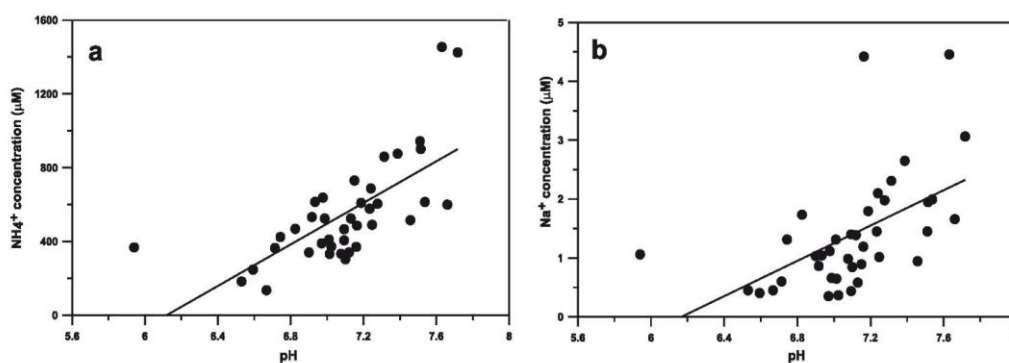


Fig. 4. (a)-Correlation between concentration of ammonium ions and de-aerated pH in EBC, $n = 39$, $p < 0.05$, $r = 0.6882$. (b)-Correlation between concentration of sodium ions and de-aerated pH in EBC, $n = 39$, $p < 0.05$, $r = 0.5330$.

cation concentration was obtained for all samples ($r = 0.6882$). There was an even stronger correlation between pH and ammonium cation in the acid reflux group ($r = 0.9403$). The other ion with a strong positive correlation was sodium cation ($r = 0.5330$), followed by butyrate ($r = 0.3154$). The correlation graphs for ammonium and sodium cations and pH are shown in Fig. 4. It is important to note that the concentration of ammonium cation was significantly higher than the concentration of any other ion (median values were between 400 and 735 $\mu\text{mol/L}$), but its concentration was not significantly different among the three subject groups.

4. Conclusions

In this work, we have identified that selected ions, most notably sodium, butyrate, and propionate were elevated in EBC samples of subjects suffering from GERD/EER. In addition, pH was also elevated in both patient groups compared to healthy subjects. The ionic analysis and simultaneous pH measurement offer a simple, cheap, fast and non-invasive approach in GERD/EER diagnostics. These parameters of EBC sample alone are not yet able to distinguish the type, severity or the stage of GERD/EER but can help in pre-selecting the subjects most likely suffering from GERD/EER that may require further confirmatory diagnosis by pH-MII measurement.

Declaration of Competing Interest

All authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

Funding: The authors acknowledge the financial support from the Ministry of Health of the Czech Republic (Grant No. 17-31945A). The research was also supported by the Ministry of Health of the Czech Republic - conceptual development of research organization (FNBr, 65269705) and CEITEC 2020 (LQ1601) with financial support from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic under the National Sustainability Programme II. All authors have no conflict of interest to declare.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121857>.

References

- [1] M. Di Venere, S. Viglio, M. Cagnone, A. Bardoni, R. Salvini, P. Iadarola, Advances in the analysis of "less-conventional" human body fluids: An overview of the CE- and HPLC-MS applications in the years 2015–2017, *Electrophoresis* 39 (2018) 160–178.
- [2] T.M. Phillips, Recent advances in CE and microchip-CE in clinical applications: 2014 to mid-2017, *Electrophoresis* 39 (2018) 126–135.
- [3] A. Mena-Bravo, M.D. Lague de Castro, Sweat: A sample with limited present applications and promising future in metabolomics, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 90 (2014) 139–147.
- [4] G. Peng, U. Tisch, O. Adams, M. Hakim, N. Shedada, Y.Y. Broza, S. Billan, R. Abdah-Bortnyak, A. Kuten, H. Haick, Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles, *Nat. Nanotechnol.* 4 (2009) 669–673.
- [5] N. Shedada, J.C. Cancelli, J.S. Torecilla, E.S. Pariente, G. Brünstrup, S. Christiansen, D.W. Johnson, M. Leja, M.P.A. Davies, O. Liran, N. Peled, H. Haick, Silicon nanowire sensors enable diagnosis of patients via exhaled breath, *ACS Nano* 10 (2016) 7047–7057.
- [6] Sniffphone, Smart Phone for Disease Detection from Exhaled Breath, <https://www.sniffphone.eu/> (accessed 6 September 2019).
- [7] K.O. Zamuruyev, A.A. Aksenov, A. Pasamontes, J.F. Brown, D.R. Pettit, S. Foutouhi, B.C. Weimer, M. Schivo, N.J. Kenyon, J.-P. Delplanque, C.E. Davis, Human breath metabolomics using an optimized noninvasive exhaled breath condensate sampler, *J. Breath Res.* 11 (2016) 016001.
- [8] P. Kubáň, F. Foret, Exhaled breath condensate: Determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review, *Anal. Chim. Acta.* 805 (2013) 1–18.
- [9] M. Greguš, F. Foret, P. Kubáň, Single-breath analysis using a novel simple sampler and capillary electrophoresis with contactless conductometric detection, *Electrophoresis* 36 (2015) 526–533.
- [10] M. Greguš, F. Foret, D. Kindlová, E. Pokojová, M. Plutinský, M. Doubková, Z. Merta, I. Binková, J. Skříčková, P. Kubáň, Monitoring the ionic content of exhaled breath condensate in various respiratory diseases by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *J. Breath Res.* 9 (2015) 027017.
- [11] J. Dent, H.B. El-Serag, M.A. Wallander, S. Johansson, Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review, *Gut* 54 (2005) 710–717.
- [12] J. Shaheen, R.A. Hansen, D.R. Morgan, L.M. Gangarosa, Y.M.T. Ringel, M.T. Thiny, M.W. Russo, R.S. Sandler, The burden of gastrointestinal and liver diseases, *Am. J. Gastroenterol.* 101 (2006) 2128–2138.
- [13] C. Hom, M.F. Vaezi, Extra-esophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease: diagnosis and treatment, *Drugs* 73 (2013) 1281–1295.
- [14] D.N. Tuchman, J.T. Boyle, A.L. Pack, J. Schwartz, M. Kokonos, A.R. Spitzer, S. Cohen, Comparison of airway responses following tracheal or esophageal acidification in the cat, *Gastroenterology* 87 (1984) 872–881.
- [15] N. Johnston, F. Ondrey, R. Rosen, B.P. Hurley, J. Gould, J. Allen, J. DelGaudio, K.W. Altman, Airway reflux, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1381 (2016) 5–13.
- [16] D. Sifrim, D. Castell, J. Dent, P.J. Kahrilas, Gastro-oesophageal reflux monitoring: review and consensus report on detection and definitions of acid, non-acid, and gas reflux, *Gut* 53 (2004) 1024–1031.
- [17] S. Roman, C.P. Gyawali, E. Savarino, R. Yadlapati, F. Zerbib, J. Wu, M. Vela, R. Tutuian, R. Tatum, D. Sifrim, J. Keller, M. Fox, J.E. Pandolfino, A.J. Bredenoord, GERD consensus group. Ambulatory reflux monitoring for diagnosis of gastro-oesophageal reflux disease: Update of the Porto consensus and recommendations from an international consensus group, *Neurogastroenterol. Motil.* 29 (2017) 1–15.
- [18] K. Dryahina, V. Pospíšilová, K. Sovová, V. Šestivská, J. Kubišta, A. Špesyvyi, F. Peňal, J. Turžíková, J. Votruba, P. Španěl, Exhaled breath concentrations of acetic acid vapour in gastro-oesophageal reflux disease, *J. Breath Res.* 8 (2014) 037109.
- [19] D. Smith, K. Sovová, K. Dryahina, T. Doušová, P. Dřevínek, P. Španěl, Breath concentration of acetic acid vapour is elevated in patients with cystic fibrosis, *J. Breath Res.* 10 (2016) 021002.
- [20] P. Španěl, K. Sovová, K. Dryahina, T. Doušová, P. Dřevínek, D. Smith, Acetic acid is elevated in the exhaled breath of cystic fibrosis patients, *J. Cyst. Fibros.* 16 (2017) e17–e18.
- [21] D. Smith, P. Španěl, J. Sulé-Susso, Advantages of breath testing for the early diagnosis of lung cancer, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 10 (2010) 255–257.
- [22] A. Fahim, P.W. Dettmar, A.H. Morice, S.P. Hart, Gastroesophageal reflux and idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective study, *Medicina* 47 (2011) 200–205.
- [23] G.E. Carpanano, O. Resta, M.T. Ventura, A.C. Amoroso, G. Di Gioia, T. Giliberti, L. Refolo, M.P. Foschino-Barbaro, Airway inflammation in subjects with gastro-oesophageal reflux and gastro-oesophageal reflux-related asthma, *J. Int. Med.* 259 (2006) 323–331.
- [24] S. Dodig, Z. Vlasic, I. Čepelak, R.Z. Topić, M. Turkalj, B. Nogalo, Magnesium and calcium in exhaled breath condensate of children with asthma and gastroesophageal reflux disease, *J. Clin. Lab. Anal.* 23 (2009) 34–39.
- [25] A. Niimi, L.T. Nguyen, O. Usmani, B. Mann, K.F. Chung, Reduced pH and chloride levels in exhaled breath condensate of patients with chronic cough, *Thorax* 59 (2004) 608–612.
- [26] L. Liu, W.G. Teague, S. Erzurum, A. Fitzpatrick, S. Mantri, R. Dweik, et al., Determinants of exhaled breath condensate pH in a large population with asthma, *Chest* 139 (2011) 328–336.
- [27] J.F. Hunt, K. Fang, R. Malik, A. Snyder, N. Malhotra, T.A. Platts-Mills, B. Gaston, Endogenous airway acidification. implications for asthma pathophysiology, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 161 (2001) 694–699.
- [28] K. Terada, S. Muro, S. Sato, T. Ohara, A. Haruna, S. Marumo, D. Kinose, E. Ogawa, Y. Hoshino, A. Niimi, T. Terada, M. Mishima, Impact of gastro-oesophageal reflux disease symptoms on COPD exacerbation, *Thorax* 63 (2008) 951–955.
- [29] Y. Shimizu, K. Dobashi, J.J. Zhao, T. Kawata, A. Ono, N. Yanagitani, K. Kaira, M. Utsugi, T. Hisada, T. Ishizuka, M. Mori, Proton pump inhibitor improves breath marker in moderate asthma with gastroesophageal reflux disease, *Respiration* 74 (2007) 558–564.
- [30] A.M. Fitzpatrick, J.T. Holbrook, C.Y. Wei, M.S. Brown, R.A. Wise, W.G. Teague, Exhaled breath condensate pH does not discriminate asymptomatic gastro-oesophageal reflux or the response to lansoprazole treatment in children with poorly controlled asthma, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2 (2014) 579–586.
- [31] C. Timms, P.S. Thomas, D.H. Yates, Detection of gastro-oesophageal reflux disease (GORD) in patients with obstructive lung disease using exhaled breath profiling, *J. Breath Res.* 6 (2012) 016003.
- [32] A. Torrego, S. Cimbollek, M. Hew, K.F. Chung, No effect of omeprazole on pH of exhaled breath condensate in cough associated with gastro-oesophageal reflux, *Cough* 1 (2005) 1–4.
- [33] P. Kubáň, P. Durč, J. Lačná, M. Greguš, F. Foret, J. Dolina, Š. Konečný, M. Doubková, D. Kindlová, E. Pokojová, J. Skříčková, Capillary electrophoretic analysis of exhaled breath condensate in diagnosis of gastroesophageal reflux disease, *Hung. J. Ind. Chem.* 46 (2018) 23–27.
- [34] L.F. Johnson, T.R. Demeester, Twenty-four-hour pH monitoring of the distal esophagus. A quantitative measure of gastroesophageal reflux, *Am. J. Gastroenterol.* 62 (1974) 325–332.
- [35] I. Spina, F. Cavallaro, N.I. Fardowza, P. Lagoussis, D. Bonac, D. Piscato, A. Riganite, M. Vecchi, Butyric acid: pharmacological aspects and routes of administration, *Digest. Liver Dis.* 1 (2007) 7–11.
- [36] J. Vaughan, L. Ngamtrakulpanit, T.N. Pajewski, R. Turner, T.A. Nguyen, A. Smith, P. Urban, S. Hom, B. Gaston, J. Hunt, Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity, *Eur. Respir. J.* 22 (2003) 889–894.

- [37] K. Kostikas, G. Papatheodorou, K. Ganas, K. Psathakis, P. Panagou, S. Loukides, pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165 (2002) 1364–1370.
- [38] S.S. Yoon, R. Coakley, G.W. Lau, S.V. Lyman, B. Gaston, A.C. Karabulut, R.F. Hennigan, S.-H. Hwang, G. Buettner, M.J. Schurr, J.E. Mortensen, J.L. Burns, D. Speert, R.C. Boucher, D.J. Hassett, Anaerobic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* by acidified nitrite under conditions characteristic of the cystic fibrosis airway, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 436–446.
- [39] I. Horvath, P.J. Barnes, S. Loukides, P.J. Sterk, M. Högman, A.-C. Olin, A. Amann, B. Antus, E. Baraldi, A. Bikov, A.W. Boots, L.D. Bos, P. Brinkman, C. Bucca, G.E. Carpagnano, M. Corradi, S. Cristescu, J.C. de Jongste, A.-T. Dinh-Xuan, E. Dompeling, N. Fens, S. Fowler, J.M. Hohlfeld, O. Holz, Q. Jöhsis, K. Van De Kant, H.H. Knobel, K. Kostikas, L. Lehtimäki, J.O. Lundberg, P. Montuschi, A. Van Muylem, G. Pennazza, P. Reinhold, F.L.M. Ricciardolo, P. Rosias, M. Santonico, M.P. Van der Schee, F.-J. Van Schooten, A. Spanevello, T. Tonia, T.J. Vink, A European Respiratory Society technical standard: exhaled biomarkers in lung disease, *Eur. Respir. J.* 49 (2017) 1600965.
- [40] A. Bikov, J. Pako, D. Montvá, D. Kovacs, Z.S. Koller, G. Losonczy, I. Horvath, Exhaled breath condensate pH decreases following oral glucose tolerance test, *J. Breath Res.* 9 (2015) 47112.
- [41] M. Greguš, P. Đurč, J. Lačná, F. Foret, P. Kubáň, Study of various parameters that influence the content of exhaled breath condensate used in diagnosis of gastroesophageal reflux disease, *Hung. J. Ind. Chem.* 46 (2018) 29–33.

5.1.3. Evaluation of important analytical parameters of the Peptest immunoassay that limit its use in diagnosing gastroesophageal reflux disease (Dolina J, Konečný Š, Ďurč P, Lačná J, Greguš M, Foret F, Skříčková J, Doubková M, Kindlová M, Pokojová E, Kubáň P. *J Clin Gastroenterol.* 2019; 53(5): 355-360)

ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of Important Analytical Parameters of the Peptest Immunoassay that Limit its Use in Diagnosing Gastroesophageal Reflux Disease

Jiří Dolina, MD, PhD,* Štefan Konečný, MD,* Pavol Ďurč, MSc,†‡
Júlia Lačná, MSc,†‡ Michal Greguš, PhD,† František Foret, PhD,†
Jana Skříčková, MD, PhD,§ Martina Doubková, MD, PhD,§
Dagmar Kindlová, MD,§ Eva Pokojová, MD,§ and Petr Kubáň, PhD†

Goal: To evaluate the analytical parameters of a lateral flow (LF) pepsin immunoassay (Peptest) and assess its suitability in the diagnostics of gastroesophageal reflux disease (GERD).

Background: Peptest is a noninvasive assay to analyze pepsin in saliva, intended for use in GERD diagnostics. Although commercialized, fundamental studies on its performance are missing. The assay therefore requires basic analytical parameter evaluation to assess its suitability in clinical practice.

Study: Assay reaction's time dependence, reader device repeatability, and individual LF devices and longitudinal pepsin concentration reproducibility in individual subjects was evaluated. Salivary pepsin was analyzed in 32 GERD patients with extraesophageal reflux symptoms and 13 healthy individuals.

Results: The assay's signal increase is not completed at the recommended readout time and continues to increase for another 25 minutes. The relative standard deviation of measurement was good when using the same LF device, ranging from 2.3% to 12.9%, but the reproducibility of 10 different individual LF devices was poor. The random error when analyzing the same saliva sample on 10 LF devices was as high as 36 ng/mL and this value is thus suggested as the positivity cut-off. Pepsin concentration in individual subjects during a 10-day period varied significantly. The sensitivity of the Peptest was 36.8% in the group with acid reflux and 23.1% in the group with weakly acid reflux. The specificity was 61.5%.

Conclusions: The Peptest assay's sensitivity and specificity is low, the results are highly variable and it should not be used as a near-patient diagnostic method in primary care.

Key Words: GERD, pepsin, peptest, saliva, noninvasive test

(*J Clin Gastroenterol* 2019;53:355–360)

Received for publication December 13, 2017; accepted April 16, 2018. From the *Internal Gastroenterology Department; §Department of Pulmonary Diseases and Tuberculosis, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University; †Department of Bioanalytical Instrumentation, CEITEC Masaryk University; and ‡Department of Chemistry, Masaryk University, Brno, Czech Republic.

Supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (Grant No. 17-31945A).

The authors declare that they have nothing to disclose.

Address correspondence to: Petr Kubáň, PhD, Department of Bioanalytical Instrumentation, CEITEC Masaryk University, Veveří 97, Brno 602 00, Czech Republic (e-mail: petr.kuban@ceitec.muni.cz).

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website, www.jcge.com.

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved. DOI: 10.1097/MCG.0000000000001066

Gastroesophageal reflux disease (GERD) is one of the most common diseases in developed countries with a prevalence of 10% to 20% in the western world.¹ Extraesophageal reflux (EER) is a condition where refluxate penetrates above the upper esophageal sphincter into the oral cavity, pharynx, and upper and lower respiratory tract. Prolonged or repeated exposure to gastric contents leads to mucosal damage and pathologic changes.^{2–4} Experimental studies suggest that the damage caused by reflux in patients with EER is not only due to the acidic nature of the refluxate, but is also caused by pepsin and bile acids.^{5,6} Pepsin has been found to be taken up by receptor-mediated endocytosis by laryngeal epithelial cells and reactivated inside the intracellular compartments of lower pH.^{7,8} It has been identified in the sputum,⁹ saliva,¹⁰ and bronchoalveolar lavage fluid¹¹ and these findings suggest pepsin as a reliable marker to diagnose EER.¹² A 24-hour multichannel intraluminal impedance and pH monitoring (MII-pH) is considered to be the most suitable method to diagnose EER,^{13,14} but it has some disadvantages, such as being invasive, uncomfortable, expensive, and not widely used. Therefore, a simple, more specific, low-cost, accurate, and minimally invasive test is needed to assess the reflux in typical and extraesophageal manifestation. A recently developed noninvasive rapid salivary pepsin lateral flow (LF) device, Peptest, was introduced as a commercially available method to diagnose reflux. The reported Peptest data, such as sensitivity and specificity are highly variable among the research groups. Some researchers report sensitivity from 78.6%¹⁰ to 87%,¹⁵ Other groups report significantly worse values (sensitivity 42%).¹⁶ In addition, pepsin concentrations in samples from the same person differ if taken in the morning or after a meal.^{10,17} These discrepant results warrant thorough Peptest assay scrutiny. The aim of this work was to evaluate the Peptest assay's basic analytical parameters, such as the assay reaction's time dependence, measurement repeatability with one and the same LF device and longitudinal signal dependence reproducibility of individual LF devices in order to try to explain the inconsistent results obtained in different studies.

MATERIALS AND METHODS

MII-pH Measurements

A 24-hour esophageal MII-pH study was performed (Ohmega; MMS, Enschede, the Netherlands). A catheter containing an antimony pH electrode (at 5 cm above the esophago-gastric junction) and 6 impedance recording

channels (at 3, 5, 7, 9, 15, and 17 cm from the esophago-gastric junction) was used. The pH electrodes were calibrated externally with buffers of pH 4.01 and 7.01. During the study, the esophageal pH electrode was positioned 5 cm above the superior margin of the lower esophageal sphincter, as determined by high resolution esophageal manometry (MMS). The patients kept a diary of events, noting the time of meals, sleep, and symptoms that they experienced. Data were analyzed and summarized by computer. The pH-impedance recordings were analyzed using dedicated software and tracings were manually reviewed to confirm reflux episodes and the parameters were calculated. Patient diagnosis was based on acid exposure time (AET) >6%, De Meester score >14.72 or >50 reflux episodes extending to the proximal parts of the esophagus.

Saliva Sample Collection

Saliva samples were collected into 30 mL collection tubes with 0.5 mL 0.01 mol/L citric acid. Approximately 1 mL of saliva was collected from each person. Typically, the saliva sample was collected immediately after waking up (study of basic analytical parameters of the assay) or within 1 to 3 hours after waking up, before the MII-pH catheter was introduced (clinical study). Subjects were asked not to eat, drink nor brush their teeth before sampling. For the repeatability study, a subject was asked to provide a 3 mL saliva sample collected into a 30 mL collection tube with 1.5 mL 0.01 mol/L citric acid. For the longitudinal study, each subject provided morning saliva samples for 10 consecutive days. For the clinical study, the patients and healthy subjects provided one sample of morning saliva on the day of their visit to the physician's office. All saliva samples were treated according to the procedure described below.

Analysis of Saliva Samples

Analysis was performed blinded as to whether the subjects were healthy controls or GERD/EER patients. Typically, 0.6 mL of the collected saliva containing citric acid was pipetted into a 1.5 mL Eppendorf vial and centrifuged at 4000 rpm for 5 minutes (Biosan MSC-6000 Centrifuge; Biosan, Latvia) until a clear supernatant layer was obtained. If a clear supernatant was not obtained, the samples were centrifuged again (additional 5 min at 4000 rpm). When repeated centrifugation did not produce a clear supernatant, the sample was considered invalid. A volume of 80 μ L of the clear supernatant from the centrifuged sample was drawn up with an automated pipette, transferred to another clean 1.5 mL Eppendorf vial containing 240 μ L of migration buffer solution and vortexed for 10 seconds (Biosan Vortex V-1 plus, Biosan, Latvia). A second automated pipette was used to transfer 80 μ L of this final mixture to the circular well of an LF device containing two unique human monoclonal antibodies; one to detect and one to capture pepsin in the saliva sample (Peptest; RD Biomed, Hull, UK). Unless otherwise stated, the assay result was read using an LF device reader (LFDR 101; Forsite Diagnostics, York, UK) after exactly 15 minutes from saliva application to the sample well and pepsin concentration was calculated. The analysis and sample storage procedures strictly followed the producer's recommendation, that is the samples were placed in the refrigerator immediately after collection and were analyzed no later than 7 days thereafter. Three independent signal readings from each LF device were always recorded from the LF device reader and the average pepsin concentration and SD were calculated.

The pepsin concentrations are reported in ng/mL throughout. The cut-off value for positivity was set to 36 ng/mL as it corresponds to the "random error" caused by the irreproducibility of the individual LF devices.

LF Device Signal Time Dependence

In the experiment designed to evaluate the assay signal's time dependence, an 80 μ L volume of the processed saliva sample (centrifuged and mixed with the migration buffer) was applied to the circular well of the LF device kept in a horizontal position inside the LF device reader. A saliva sample containing \sim 90 ng/mL of pepsin was used. This concentration corresponds to the average calculated pepsin concentration (84.7 ng/mL) obtained from 45 clinical saliva samples from our study subjects. The signal from the LF device reader was read every 30 seconds (minimum time interval possible to accomplish repeated readings) during the first 30 minutes and then every 120 seconds.

LF Device Reader Repeatability Assessment

To assess the repeatability of the LF reader signal, 80 μ L of the processed saliva sample was applied to the circular well of the LF device and the reaction was allowed to develop for 75 minutes. Three saliva samples that contained <16, \sim 150, and \sim 250 ng/mL of pepsin were selected and applied to the LF device. The specified pepsin concentrations were selected to approximately cover the 45 clinical saliva samples' concentration span measured in this study. Each LF device was then inserted repeatedly 10 times into the LF device reader, the signal was read and the pepsin concentration was calculated.

Reproducibility of Individual LF Devices

In the study assessing the reproducibility of individual LF devices, 240 μ L of the processed saliva was added to 720 μ L of migration buffer, resulting in a total of 960 μ L of the final mixture. A volume of 80 μ L of this solution were applied successively onto 10 individual LF devices and measured with the LF device reader. For this experiment, 2 saliva samples with low pepsin concentration (<16 ng/mL) were deliberately selected. Each device was measured using the LF device reader after 15 minutes from applying the saliva (triplicate measurements at 14.5, 15, and 15.5 min).

Longitudinal Measurement of Pepsin Concentrations

For the purpose of the longitudinal pepsin concentration measurement, 2 subjects not included in the clinical study were selected based on the results from the 24-hour MII-pH. Subject 1 was healthy, according to the 24-hour MII-pH (AET 2.1%, De Meester score 7.35 and the number of reflux episodes <50), while subject 2 was EER-positive, having a chronic cough but no typical GERD symptoms (without heartburn or regurgitation, AET >6%, De Meester score 17.42 and the number of reflux episodes 54).

Study Population

A total of 32 patients with asthma, idiopathic pulmonary fibrosis, chronic cough, and confirmed GERD were recruited from the Department of Pulmonary Diseases and Tuberculosis. They included 18 men and 14 women, with a mean age of 54 years (age range, 17 to 75 y). All patients had no antireflux medication. All patients were tested positive using the 24-hour MII-pH. The patients were divided into 2 groups, group I with a dominant acid reflux (pH <4,

n = 19) and group II with a dominant weakly acid reflux (pH 4 to 7, n = 13). The group of 13 healthy subjects served as controls. They included 8 men and 5 women, with a mean age of 50 years (age range, 38 to 67 y). The healthy subject control group was selected based on the questionnaire criteria of not having any GERD/EER-related symptoms in the last 5-year and not taking any GERD/EER-related medication. For ethical reasons the group of healthy subjects did not undergo the MII-pH testing. All participants completed a detailed questionnaire assessing their current and past medical history, current medication and information on subject demographics (age, sex, and race). This study was approved by the University Hospital Ethics Committee and was performed in accordance with the ethical principles outlined in the Declaration of Helsinki. All patients provided written informed consent before initiating the study.

Statistical Analysis

Continuous data were presented as an average ± SD. The analytical parameters, such as SD and relative standard deviation (RSD) were calculated and shown in tables and graphs. To compare the datasets, nonparametric Mann-Whitney *U* test was used. A *P*-value of <0.05 was inferred as statistically significant. All statistical analyses were performed using an Origin 9 Pro, 13.0 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA).

RESULTS

LF Device Signal Time Dependence

The signal from the LF device reader was recorded and the values were plotted against the time in Figure 1. There is an initial 3-minute period when the device is not capable of reading the signal, because the liquid has not yet reached the control line and an “invalid device” reading was registered. The values in the graph were therefore plotted from the

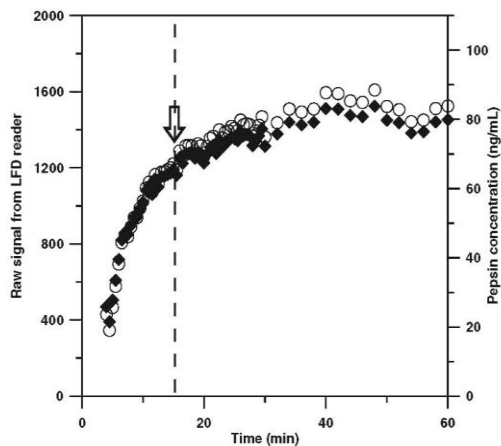


FIGURE 1. Peptest lateral flow (LF) assay time dependence. (◆) Raw signal from the LF device reader, (○) pepsin concentration in ng/mL calculated using the quadratic calibration equation from the producer’s data for the particular LF devices batch. The left y-axis shows the raw signal plot from the LF device reader, the right y-axis shows the calculated pepsin concentration in ng/mL. The arrow indicates the recommended readout time (15 min).

fourth minute. The reaction is not finished after 15 minutes (indicated by an arrow in Fig. 1) and the intensity of the assay signal continues to increase until 40 minutes.

LF Device Reader Repeatability Assessment

Figure 2 shows the experiment’s results with confidence and prediction intervals at 95%. The repeatability of measuring one and the same LF device 10 times expressed as RSD was between 2.3% and 12.9% (calculated from pepsin concentration in ng/mL). The raw data for each of the 3 LF devices and also the values recalculated to ng/mL of pepsin and other parameters from the LF device reader are shown in the Table, Supplemental Digital Content 1 (<http://links.lww.com/JCG/A408>). The largest RSD was observed in the sample containing the lowest pepsin concentration (< 16 ng/mL). The difference in the measured pepsin concentration from a single LF device reading can be as high as 28.2 ng/mL (Table, Supplemental Digital Content 1 (<http://links.lww.com/JCG/A408>)).

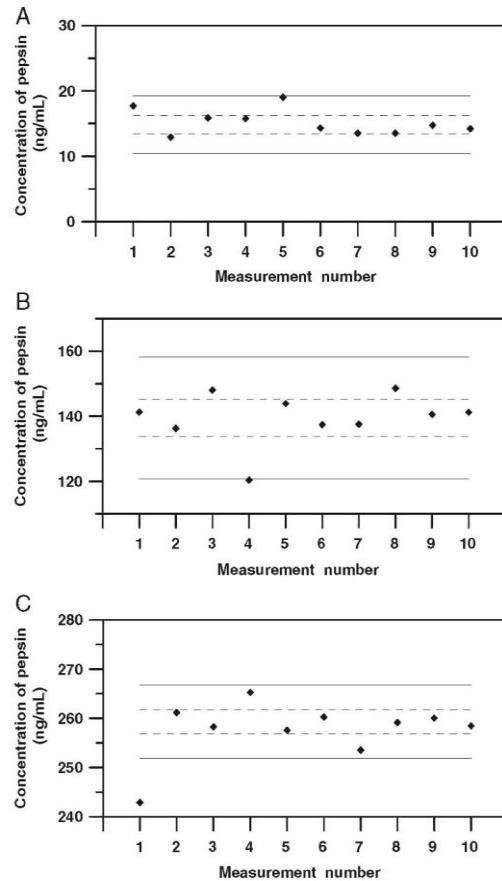


FIGURE 2. Repeatability of 10 measurements from the same lateral flow device at 15 (A), 150 (B), and 250 ng/mL (C). The relative SD at each concentration level are as follows: relative standard deviation (RSD)= 12.9% at 15 ng/mL, RSD = 5.7% at 150 ng/mL, and RSD = 2.3% at 250 ng/mL. The dashed lines represent the 95% confidence intervals and the solid lines represent the 95% prediction intervals.

TABLE 1. Repeatability of Measurements (Raw Signal From the Lateral Flow Device Reader and Pepsin Concentration) in 2 Saliva Samples Containing Low Pepsin Concentration

Measurement #	Sample 1		Sample 2	
	Raw Signal*†	Pepsin (ng/mL)†‡	Raw Signal*†	Pepsin (ng/mL)†‡
1	134.3 (4.7)	4.4 (0.2)	477.3 (30.3)	24.0 (1.5)
2	142.0 (29.5)	4.9 (1.0)	448.0 (51.2)	22.3 (2.5)
3	103.3 (24.0)	2.7 (0.6)	126.3 (30.7)	4.0 (1.0)
4	164.3 (24.8)	6.1 (0.9)	694.0 (40.8)	36.8 (2.2)
5	73.7 (7.6)	1.0 (0.1)	146.7 (43.2)	5.1 (1.5)
6	86.7 (9.1)	1.8 (0.2)	136.0 (6.2)	4.5 (0.2)
7	83.0 (7.2)	1.6 (0.1)	86.3 (20.6)	1.8 (0.4)
8	84.0 (20.7)	1.6 (0.4)	74.3 (21.6)	1.1 (0.3)
9	193.3 (24.4)	7.8 (1.0)	424.0 (26.9)	20.9 (1.3)
10	109.0 (22.3)	3.0 (0.6)	131.0 (5.2)	4.3 (0.2)
Average	117.4	3.5	274.4	12.5
SD	39.8	2.2	216.8	12.4
RSD (%)	33.9	64.1	79.0	99.7
Minimum	73.7	1.0	74.3	1.1
Maximum	193.3	7.8	694.0	36.8

*Calculated as an average from 3 measurements
 †The values in the parentheses are the SD of 3 measurements.
 ‡Calculated using the quadratic equation: $y = -0.015x^2 + 17.9x + 55.0$, $R^2 = 0.9987$.

Reproducibility of Individual LF Devices

The reproducibility of 10 individual LF devices and the average pepsin concentrations with SD are shown in Table 1. In the first saliva sample, the average pepsin concentration was 3.5 ng/mL, while in the second sample the average pepsin concentration was 12.5 ng/mL. The measurement’s repeatability using 10 different LF devices is rather poor and the calculated concentrations range between 1.0 and 7.8 ng/mL for the first sample and between 1.1 and 36.8 ng/mL for the second sample. The maximum difference in the measured pepsin values from the same saliva on different LF devices was 35.7 ng/mL (the difference between the highest and lowest value of pepsin) and this value corresponds to the “random

error” caused by the irreproducibility of the individual LF devices.

Longitudinal Measurement of Pepsin Concentrations

Pepsin was analyzed in the samples of the 2 subjects and the results are shown in Figure 3. The pepsin concentrations in the saliva of one and the same individual were highly variable within the studied 10-day period. While in subject 1 (no GERD/EER diagnosis), the pepsin concentrations fluctuate below the limit of detection (LOD) of the assay (16 ng/mL), the pepsin concentration in subject 2 (with GERD/EER symptomatology) varies between 0 and 160 ng/mL.

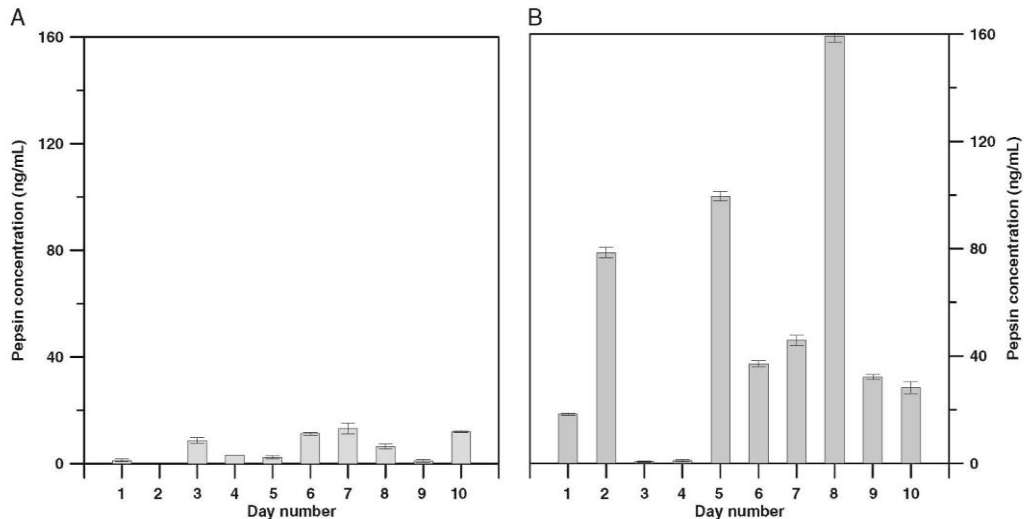


FIGURE 3. Longitudinal study in which pepsin was measured in the saliva of a healthy individual—subject 1 (A) and a person suffering from extraesophageal reflux—subject 2 (B) during 10 consecutive days. The error bars are the SD from 3 repeated measurements.

TABLE 2. The Average Concentrations of Pepsin in ng/mL in the 3 Studied Groups of Subjects

Study Group	No. Subjects	Pepsin (ng/mL)*	Sensitivity/ Specificity at 36 ng/mL (%)	Sensitivity/ Specificity at 25 ng/mL (%)
Acid reflux	19	116.4	36.8	52.6
Weakly acid reflux	13	38.7	23.1	53.8
Healthy controls	13	86.1	61.5†	53.8†

*Average pepsin values. The results were not statistically different (Mann-Whitney *U* test, *P* < 0.05) between the groups.

†Specificity.

Clinical Study

Table 2 shows the average pepsin concentrations in all studied groups and values for sensitivity and specificity using the cut-off positivity values of 36 and 25 ng/mL (Table, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/JCG/A409>, shows all data). With the pepsin cut-off value of 36 ng/mL, the sensitivity in group I was 36.8% and the sensitivity in group II was 23.1%. Using the LOD of the assay (25 ng/mL) as the positivity cut-off value, the sensitivity improved marginally to 52.6% for group I and to 53.8% for group II. For the group of healthy controls, the pepsin specificity at 36 and 25 ng/mL was 61.5% and 53.8%, respectively. A Mann-Whitney *U* test showed that there is no statistical difference (*P* < 0.05) between groups I, II and the healthy controls.

DISCUSSION

The first experiment was to define and confirm the Peptest assay's standard operating conditions, which are important to obtain consistent and accurate results. Contrary to our assumption, the reaction was not finished at 15 minutes and the intensity of the assay detection line continued to increase further until 40 minutes. As the information on the reaction and its time-course is not provided in the product's instructions, we assumed that the Peptest calibration curve provided by the producer with each batch of LF devices was calculated from the assay signal read at exactly 15 minutes. It is thus essential to comply with the specified time, because any deviation from this may cause a serious quantitation error and produce false results.

The LF device reader performance is another important parameter because the LF device reader is often used to more accurately evaluate pepsin concentration than with the naked eye, as used in some studies.¹⁵ The repeatability of measuring one and the same LF device was satisfactory (between 2.3% and 12.9% RSD) and the LF device reader itself is thus a reliable analytical tool. Another important aspect of the Peptest assay is, however, the actual performance of each individual LF device to which the saliva sample is applied. For a reliable analysis, each individual LF device should give the same result (within the known assay variability) when the same saliva is applied. The information on the reproducibility of the individual LF devices was not provided by the producer. The performance of the individual devices is most critical at low pepsin concentration, often used as a cut-off for positivity.^{10,18,19} Our data confirm that the results obtained from individual LF

devices vary significantly, rendering this assay unreliable, especially at low pepsin concentrations in saliva. We therefore suggest that the pepsin concentration "positivity" should be set to 36 ng/mL, as this value is above the "random error" caused by the irreproducibility of the individual LF devices. When lower cut-off values are used, as in many articles (cut-off values of 16^{10,18} or 25 ng/mL¹⁹), a significant number of samples may be false-positive, thus showing an apparently higher assay sensitivity.

Because the main intended use of the Peptest is as a near-patient test in primary care, it is also important to know the longitudinal variability in pepsin concentration in an individual subject. There is evidence that repeated saliva sampling during 1 day with at least 1 positive sample leads to improved assay sensitivity.¹⁰ The pepsin concentration in saliva can be influenced by the time of sampling, food ingestion, and other factors. The optimal saliva sampling time of the day is unfortunately a matter of controversy. For instance, Na et al¹⁷ observed the highest pepsin concentrations in morning saliva samples, taken just after waking up. Hayat et al¹⁰ observed that the highest pepsin concentration was in postprandial samples, taken within 1 hour after a meal. Using the second approach, pepsin levels can vary significantly depending on the food type and individual digestion variability. The morning sample is, in our opinion, the most standardized one because it is taken after a long period of sleep, during which saliva is not swallowed and should give the most repeatable results. The changes in pepsin concentration in the same subject over a long-time period have not been measured before. It is important to know whether a person with no GERD/EER symptoms (subject 1) will consistently test negative over an extended period of time, and vice versa, whether a person with confirmed GERD/EER (subject 2) will consistently test positive. Our 10-day study confirmed that the pepsin concentrations in saliva samples of one and the same individual are highly variable. Although there is a higher probability that subject 2 will have a pepsin sample positive, this cannot be guaranteed every day. Considering the positivity cut-off value of 36 ng/mL we suggested earlier, subject 2 would test positive in 50% cases, while 50% of the results would be negative during the 10-day period. On the contrary, subject 1 had all samples negative, thus the specificity would be 100%. The high sensitivity is the most important parameter in evaluating any clinical method and the Peptest fails severely in this aspect. To confirm the conclusions about the limited use of the Peptest assay in the near-patient setting, a study with a cohort of 32 patients and 13 healthy controls was performed. The sensitivity values were significantly lower than the data shown by some research groups^{10,20} but were in good agreement with other recent studies.^{16,18} The discrepancies in the reported data depend mainly on the pepsin positivity cut-off values, sampling procedure and data evaluation. For instance, Hayat et al¹⁰ reported 78.6% sensitivity and 60.4% specificity when at least one of 3 saliva samples tested positive (positivity cut-off value, 16 ng/mL). The sensitivity decreased significantly when the positivity cut-off value was changed to 210 ng/mL (sensitivity 44%, specificity 98.2%). Sensitivity and specificity of 87% was reported in another study.¹⁵ In contrast, in a recent study by Dy et al¹⁶ pepsin in saliva samples of 50 children with GERD was analyzed with low sensitivity (42%) and specificity (58%) at 16 ng/mL positivity cut-off value. The sensitivity decreased to 17% and the specificity increased to 100% when the cut-off value was increased to 74 ng/mL.

Our data are close to this study. Even when using the LOD of the assay as the positivity cut-off value (25 ng/mL), the sensitivity in our study improves only marginally to 52.6% for group I and to 53.8% for group II.

In conclusion, our results show that there are serious limitations to using the Peptest assay in diagnosing GERD/EER in a primary care setting. Although the LF device reader can provide the readouts with reasonable repeatability, the reproducibility of the individual LF devices is poor. We suggest increasing the cut-off value to at least the maximum measured difference between individual LF devices, that is 36 ng/mL. Using the cut-off value of 36 ng/mL, the assay sensitivity and specificity values are unfortunately low. The procedure applied in some articles,^{10,20} in which the patient is instructed to take multiple saliva samples within few days and is considered to have tested positive if at least one of the samples is positive, can certainly improve the assay sensitivity. The cost of such test would, however, increase significantly and will not be suitable for primary care testing, still carrying a relatively high risk that a person with GERD/EER will test negative.

REFERENCES

- Dent J, El-Serag HB, Wallander MA, et al. Epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut*. 2005;54:710–717.
- Koufman JA. The otolaryngologic manifestations of gastro-oesophageal reflux disease (GERD): a clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24-hour pH monitoring and an experimental investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal injury. *Laryngoscope*. 1991;101:1–78.
- Ossakaow SJ, Elta G, Colturi T, et al. Esophageal reflux and dysmotility as the basis for persistent cervical symptoms. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1987;96:387–392.
- Little FB, Koufman JA, Kohut RI, et al. Effect of gastric acid on the pathogenesis of subglottic stenosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1985;94:516–519.
- Aldhahrani A, Verdon B, Ward C, et al. Effects of bile acids on human airway epithelial cells: implications for aerodigestive diseases. *ERJ Open Res*. 2017;3:00107–02016.
- Sasaki CT, Issaeva N, Vageli DP. In vitro model for gastroduodenal reflux-induced nuclear factor-kappaB activation and its role in hypopharyngeal carcinogenesis. *Head Neck*. 2016;38:E1381–E1391.
- Johnston N, Dettmar PW, Bishwokarma B, et al. Activity/stability of human pepsin: implications for reflux attributed laryngeal disease. *Laryngoscope*. 2007;117:1036–1039.
- Johnston N, Wells CW, Blumin JH, et al. Receptor-mediated uptake of pepsin by laryngeal epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2007;116:934–938.
- Grabowski M, Kasran A, Seys S, et al. Pepsin and bile acids in induced sputum of chronic cough patients. *Respir Med*. 2011;105:1257–1261.
- Hayat JO, Gabieta-Somnez S, Yazaki E, et al. Pepsin in saliva for the diagnosis of gastro-oesophageal reflux disease. *Gut*. 2015;64:373–380.
- Decalmer S, Stovold R, Houghton LA, et al. Chronic cough: relationship between microaspiration, gastroesophageal reflux, and cough frequency. *Chest*. 2012;142:958–964.
- Johnston N, Knight J, Dettmar PW, et al. Pepsin and carbonic anhydrase isoenzyme III as diagnostic markers for laryngopharyngeal reflux disease. *Laryngoscope*. 2004;114:2129–2134.
- Sifrim D, Castell D, Dent J, Kahrlas PJ. Gastro-oesophageal reflux monitoring: review and consensus report on detection and definitions of acid, non-acid, and gas reflux. *Gut*. 2004;53:1024–1031.
- Roman S, Gyawali CP, Savarino E, et al. Ambulatory reflux monitoring for diagnosis of gastro-oesophageal reflux disease: update of the Porto consensus and recommendations from an international consensus group. *Neurogastroenterol Motil*. 2017;29:1–15.
- Yuksel ES, Hong SKS, Strugala V, et al. Rapid salivary pepsin test: blinded assessment of test performance in gastroesophageal reflux disease. *Laryngoscope*. 2012;122:1312–1316.
- Dy F, Amirault J, Mitchell PD, et al. Salivary pepsin lacks sensitivity as a diagnostic tool to evaluate extraesophageal reflux disease. *J Pediatr*. 2016;177:53–58.
- Na SY, Kwon OE, Lee YC, et al. Optimal timing of saliva collection to detect pepsin in patients with laryngopharyngeal reflux. *Laryngoscope*. 2016;126:2770–2773.
- Yadlapati R, Atkins C, Jaiyeola DM, et al. Abilities of oropharyngeal pH Tests and salivary pepsin analysis to discriminate between asymptomatic volunteers and subjects with symptoms of laryngeal irritation. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016;14:535–542.
- Spyridoulas A, Lillie S, Vyas A, et al. Detecting laryngopharyngeal reflux in patients with upper airways symptoms: symptoms, signs or salivary pepsin? *Res Med*. 2015;109:963–969.
- Strugala V, McGlashan JA, Watson MG, et al. Evaluation of a non-invasive pepsin dipstick test for the diagnosis of extra-oesophageal reflux—results of a pilot study. *Gastroenterology*. 2007;132:A99–A100.

6. Jiné intersticiální plicní procesy s přesahem do imunologie, revmatologie a genetiky

Imunologické vyšetření je nedílnou součástí v diagnostickém a diferenciativně diagnostickém algoritmu IPP. Je zcela zásadní pro diagnostiku autoimunitních chorob, vaskulitid, systémových onemocnění pojiva, ale také pro diferenciativní diagnostiku difuzních plicních procesů u jedinců s primární nebo sekundární poruchou imunity. Diagnostický algoritmus IPP spočívá v syntéze anamnestických údajů, fyzikálního vyšetření, laboratorních testů, zobrazovacích metod, bronchoskopie s bronchoalveolární laváží, odběru vzorku plicní tkáně k histopatologickému vyšetření. Diagnostice méně běžných intersticiálních plicních procesů jsem se věnovala v pracích „Exogenous lipid pneumonia caused by chronic improper use of baby body oil in adult patient“ (Doubková a kol., 2013), „Plicní histiocytóza z Langerhansových buněk – nemoc kuřáků“ (Doubková a kol., 2013), „Intersticiální plicní procesy a granulomatózy asociované s běžným variabilním imunodeficitem“ (Doubková a kol., 2015), „Lymfangioleiomyomatóza (kasuistika a přehled případů popsanych v české a slovenské literatuře“ (Doubková a kol., 2005). Diagnostice a diferenciativní diagnostice systémových onemocnění pojiva a intersticiálních plicních procesů jsem se zabývala v práci „Intersticiální plicní postižení a systémová onemocnění pojiva“ (Doubková a kol., 2013). Výše jmenované články byly součástí mé disertační práce. Tato poslední práce pak byla rozvedena v doporučených postupech s názvem „Intersticiální plicní postižení a systémová onemocnění pojiva – doporučení pro diagnostiku a léčbu“ (Doubková a kol., 2019, kapitola v knize Doporučené postupy v pneumologii 3). Viz kapitola 6.1. Klinické charakteristiky vlastního souboru pacientů s lymfangioleiomyomatózou s důrazem na mezioborovou spolupráci a zkušenosti s léčbou inhibitory mTOR jsem popsala v manuskriptu „Lymfangioleiomyomatóza“ (Doubková a kol., 2019). Viz kapitola 6.2.

Problematika IPP a jejich přesah do imunologie, revmatologie, genetiky a dalších interních oborů je obsažena v publikacích „Diagnostika a léčba plicní formy histiocytózy z Langerhansových buněk“ (Doubková a kol., 2020), „Autoprotilátky u systémových onemocnění pojiva a ANCA asociovaných vaskulitid, jejich vztah k intersticiálním plicním procesům a prognóze“ (Doubková a kol., 2017), „Granulomatózy u primárních imunodeficitů“ (Doubková a kol., 2017) „Vzácné granulomatózy – granulomatóza s polyangiitidou“ (Doubková a kol., 2019). „Imunodeficiencie v rámci diferenciativní diagnostiky intersticiálních plicních procesů“ (Doubková a kol., 2019). Nekrotizující sarkoidní granulomatózu jako vzácné systémové onemocnění charakterizované tvorbou granulomů sarkoidního typu s centrální nekrózou a s rysy vaskulitidy popisujeme v textu článku „Necrotising sarcoid granulomatosis“ (Doubková a kol., 2018). Vzácný Bloomův syndrom (autosomálně recesivní typ dědičnosti), který se projevuje mimo jiné

imunodeficiencí s predispozicí k recidivujícím pneumoniím, je popsán v publikaci „Diagnosis of Bloom syndrome in a patient with short stature, recurrence of malignant lymphoma, and consanguineous origin“ (Trizuljak a kol., 2020). Jako poslední práci uvádím vzácnou koincenci „Plicní onemocnění a autoimunitní hemolytická anémie asociována s IgG4“ (Doubková a kol., 2020). Viz kapitoly 6.3., 6.4., 6.5., 6.6., 6.7., 6.8., 6.9., 6.10.

6.1. Intersticiální plicní postižení a systémová onemocnění pojiva (Doubková M. Intersticiální plicní postižení a systémová onemocnění pojiva. In Kolek V. et al. Doporučené postupy v pneumologii. 3. vydání Maxdorf 2019, s. 367-387. ISBN 978-80-7345-624-5)

Intersticiální plicní postižení a systémová onemocnění pojiva

- doporučení diagnostiky a léčby

Martina Doubková

Klinika nemocí plicních a tuberkulózy LF Masarykovy univerzity a FN Brno,

pracoviště Bohunice

1 Úvod

Systémová onemocnění pojiva (SOP), starším názvem kolagenózy, jsou heterogenní skupina imunologicky podmíněných zánětlivých onemocnění projevujících se multiorgánovým postižením. U pacientů se SOP bývá postižena jakákoliv část respiračního ústrojí: dýchací cesty (bronchiektázie, bronchiolitidy, trachea s relabující polychondritidou, postižení hlasových vazů), pleura, plicní parenchym (intersticiální plicní procesy-IPP, difuzní alveolární krvácení, aspirační pneumonie, pneumonie/oportunní infekce, malignity), plicní cévní řečiště, dýchací svaly (bránice). IPP jsou heterogenní skupina převážně chronických nenádorových a neinfekčních onemocnění alveolů a intersticia. Fenotypy postižení plicního intersticia jsou nespecifické pro dané SOP a obvykle kopírují fenotypy idiopatických intersticiálních pneumonií (IIP). IIP jsou skupinou akutních, subakutních a chronických intersticiálních plicních nemocí charakterizovaných různým stupněm zánětu a různým stupněm plicní fibrózy. Postižení plicního intersticia v rámci SOP je nejčastěji přítomno u systémové sklerodermie (SSc), revmatoidní artritidy (RA), polymyozitidy/dermatomyozitidy (PM/DM), Sjögrenova syndromu (SS), systémového lupusu erytematodu (SLE), smíšených chorob pojiva (MCTD-mixed connective tissue disease, Sharpův syndrom), nediferencovaných SOP (UCTD-undifferentiated connective tissue disease); u ankylozující spondylitidy (AS), vzácné relabující polychondritidy (RP) - i když dvě poslední jednotky dle revmatologického dělení do SOP nepatří. Frekvence výskytu IPP u SOP, klinický obraz, prognóza a odpověď na léčbu závisí na histopatologickém a/nebo radiologickém obrazu (akutní intersticiální pneumonie AIP, běžná intersticiální pneumonie UIP, nespecifická intersticiální pneumonie NSIP, lymfocytární intersticiální pneumonie LIP, obliterující bronchiolitida s organizující se pneumonií BOOP/OP, deskvamativní intersticiální pneumonie DIP, difuzní alveolární hemoragie DAH, granulomatózní plicní postižení, fibrobulózní

postižení a syndrom kombinované fibrózy a emfyzému CPFE-combined pulmonary fibrosis and emphysema) a na typu SOP.

2 Význam autoprotilátek pro diagnózu a prognózu IPP u SOP

Autoprotilátky u SOP vznikají proti vlastním orgánovým strukturám. Jejich detekce v případě nově diagnostikovaného IPP vyvolává podezření na systémovou nemoc pojiva s IPP, který někdy může být i prvním projevem SOP. U již diagnostikovaných SOP pak přítomnost autoprotilátek může předurčovat vývoj některého typu plicního postižení a jeho prognózu. Přítomnost anti-topoisomerázy I (anti-Scl-70) u SSc je spojována s vývojem IPP a je častějším nálezem u pacientů s difuzním kožním postižením, nekoreluje však s tíží fibrózy. Anticentromerové protilátky jsou častěji spojeny s limitovanou kožní sklerodermií a plicním vaskulárním onemocněním (plicní arteriální hypertenze) a nebývají většinou spojovány s těžkou intersticiální plicní fibrózou. Výskyt IPP – PM/DM bývá přítomen u 73 % nemocných s pozitivitou anti-histidyl-tRNA syntetázy (anti-Jo-1). Přítomnost protilátek anti-Jo-1 u nemocných s PM/DM znamená vyšší riziko IPP v rámci antisyntetázového syndromu. Projevy tohoto syndromu jsou IPP, teploty, artritidy, Raynaudův fenomén a zhrubělé, rozpraskané, radiální okraje ukazováčků na ruce („prsty mechanika“).

Laboratorní diagnostika-detekce autoprotilátek a jejich prognostický význam u jednotlivých SOP

Imunologická vyšetření zahrnují průkaz **antinukleárních protilátek ANA** s různými typy fluorescence (homogenní, granulární, nukleolární, centromery aj.) a další typizaci antinukleárních protilátek (proti dvouvláknové jaderné deoxyribonukleové kyselině **ds-DNA**, proti nukleosomům a histonům) a proti extrahovatelným jaderným antigenům **ENA** (anti-SS-A (Ro), anti-SS-B (La), anti-Sm, ribonukleoproteinu UI-RNP, anti-DNA-topoisomeráze Scl-70, anti-histidyl-tRNA syntetázy). Dále vyšetřujeme přítomnost **revmatoidního faktoru (RF)**, protilátky proti **cyklickému citrulinovému peptidu anti-CCP**, anti-Mi-2, „lupus antikoagulans“, **antifosfolipidové protilátky**. Některé autoprotilátky jsou vysoce specifické a jsou součástí diagnostických kritérií. Základní panel vyšetřovaných autoprotilátek u SOP a detekovatelné protilátky u jednotlivých SOP uvádí tabulka 1 a 2.

- **Systémový lupus erythematoses (SLE)**. Více než 100 autoprotilátek může být nalezeno u SLE. Protilátky ds-DNA a anti-Smith antigen jsou specifické pro SLE. Nebyla prokázána korelace plicního postižení se žádnou z autoprotilátek, i když v jedné studii byl popsán vztah anti-SS-A a chronické intersticiální pneumonitidy a UI-RNP a IPP.

- **Revmatoidní artritida (RA).** Nalézáme pozitivitu RF, ACPA – protilátky proti citrulinovým peptidům (anticyclic citrullinated peptide anti-CCP, antimutated citrullinated vimentin anti-MCV, fibrinogen), anti-hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins antibodies). Hladina IgM RF byla signifikantně zvýšená u nemocných s RA a IPP. Anti-CCP byly prediktorem plicního postižení u RA.
- **Sjögrenův syndrom (SS).** Nacházíme pozitivitu anti-Ro (anti-SS-A) (antiSjögren's syndrome related antigen A) a anti-La (anti-SS-B). Obě autoprotiilátky jsou prediktory plicního postižení.
- **Systémová sklerodermie (SSc).** Anti-topoisomeráza I (anti-Scl-70) je asociována s plicní fibrózou. Přítomnost Scl-70 značí horší prognózu a ve 20–65 % se vyvine difuzní forma onemocnění. Protilátky proti centromerám se vyskytují u CREST syndromu (C – calcinosis, R – Raynaudův fenomén, E – porucha motility ezofágu, S – sklerodaktylie, T – teleangiektázie) u 60-80 % a jsou spojeny s plicní hypertenzí a jen vzácně s IPP. Anti-RNP (ribonucleoproteins antibodies): anti-U11/U12 RNP mají vztah k IPP. AECA (antiendothelial cell antibodies) se mohou vázat na fibroblasty a podílet se na vzniku fibrózy.
- **Dermatomyozitida/polymyozitida (DM/PM).** Anti-aminoacyl-tRNA syntetázy (anti-ARS) jsou detekovány u PM/DM a korelují s přítomností IPP. Mezi anti-aminoacyl-tRNA syntetázy patří: anti-Jo1 (histidyl-tRNA syntetáza), anti-threonyl (anti-PL-7), anti-PL7, anti-PL12, anti-EJ, anti-OJ, anti-KS a jiné t-RNA syntetázy. Přítomnost anti-SRP (anti-signal recognition particle): anti-7SL RNA znamená obecně špatnou prognózu a tito pacienti mají nejkratší přežití. Pacienti s anti-Mi-2 jsou z hlediska mortality na stejné úrovni jako ti bez přítomnosti této autoprotiilátky. Antisyntetázový syndrom je kombinací myozitidy, artritidy, intersticiálního plicního procesu, Raynaudova fenoménu, prstů mechanika, horečky a positivity některé z antisyntetázových autoprotiilátek. IPP je častěji přítomno u pacientů s pozitivitou anti-Jo1, anti-PL12, anti-KS. U nemocných s pozitivitou anti-PL7 nebyla asociace s rozvojem rychle zhoršujícího se IPP. Anti-MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) mají ze všech autoprotiilátek nejintimnější asociaci s rapidně progredujícím plicním postižením intersticia u dermatomyozitidy, respektive především u amyopatické dermatomyozitidy. V 10–15 % případů může být DM/PM projevem paraneoplastického syndromu (karcinom ovarií, plic, kolorektálního karcinomu). Přítomnost anti-TIF-1 (transcriptional intermediary factor 1) je asociována s 50 % s tumorem.

- **Smíšené onemocnění pojiva.** MCTD (Mixed Connective Tissue Disease) je kombinací SLE/SSc/PM. Pozitivita anti-U1-RNP a anti-SS-A (anti-Ro52) má vztah k IPP.

3 Diferenciální diagnostika idiopatických IPP a IPP v rámci SOP

Udává se, že 15–20 % pacientů s chronickou IPP může mít frustrní (plně nevyjádřenou) formu SOP nebo se může SOP následně plně vyvinout. Homma a kol., sledovali 68 nemocných s IPP po dobu 1–11 let. U 13 nemocných (19 %) v průběhu sledování došlo k vývoji SOP. Nediferencovaná onemocnění pojiva mají rysy několika SOP, ale nesplňují kritéria jednotlivých SLE, SSc, PM/DM, SS (tabulka 3). Překryvné syndromy splňují kritéria dvou nebo více SOP. **Intersticiální pneumonie s autoimunitními rysy (IPAF, interstitial pneumonitis with autoimmune features)** zahrnují jak pacienty s IPP při nediferencovaném onemocnění pojiva, tak skupinu nemocných s IPP, kteří nesplňují diagnostická kritéria systémové choroby pojiva, a přesto vykazují známky autoimunitního onemocnění.

4 Prevalence

Plicní postižení včetně IPP je častou příčinou smrti pacientů se SOP, zejména u SSc a PM/DM. Současná data ukazují, že přibližně 10 % pacientů s diagnózou intersticiální plicní fibrózy má ověřené SOP, z toho nejvíce pacientů tvoří ti s RA u 80 % pacientů, SSc u 14 % pacientů a PM/DM u 4 % pacientů.

IPP je zjišťováno u 15–20 % nemocných s RA. Až u 10 % případů je IPP první manifestací RA. U SSc je odhadovaná prevalence IPP 70–80 %. U nemocných s PM/DM je IPP jednou z hlavních extramuskulárních komplikací a je přítomno u 5–64 % nemocných v závislosti na použitých diagnostických metodách (skiagram hrudníku, výpočetní tomografie). U SS je odhadovaná prevalence IPP 5–20 %. U SLE je klinicky významné postižení popisováno v 1–15 %. U smíšených chorob pojiva charakterizovaných kombinací klinických projevů SLE, SSc, RA, PM/DM a protilátkami proti ribonukleoproteinu (U1-RNP), je prevalence IPP zjišťována až u 65 % nemocných. U nediferencovaných SOP, charakterizovaných klinickými příznaky SOP, ale nesplňující diagnostická kritéria žádného konkrétního SOP, je prevalence IPP odhadována na 10 %. U AS je plicní postižení popisováno v 1,3–15 % případů. Procentuální zastoupení výskytu IPP se liší dle provedené studie.

V posledních letech pozorujeme rostoucí prevalenci subklinických forem plicních postižení při SOP. Při nich prokazujeme jen mírné změny na HRCT hrudníku a/nebo abnormální buněčný rozpočet při vyšetření bronchoalveolární tekutiny bez klinické symptomatologie. Tato skupina pacientů je stabilizována během delšího období sledování.

5 Etiologie a patogeneze

Etiologie IPP u SOP není zcela objasněna a dle klinického pozorování rozsah plicního postižení nekoreluje s postižením ostatních orgánů nebo aktivitou choroby. U SOP se pravděpodobně podílí na tkáňovém a tím i plicním postižení **autoprotilátky**. Zkoumány jsou i další rizikové faktory, které přispívají ke vzniku IPP u SOP. Jednak vliv **genetické predispozice**, u SSc je popisována asociace s HLA II. třídy (hlavní histokompatibilní systém), HLA-DRB1*11, HLA DPB1*1301, u RA HLA-BRB1 0405, HLA B40. A rovněž **vlivy zevního prostředí** jako je kouření, D-penicilamin, tryptofan, bleomycin, benzen, toluen, infekce.

Základním mechanismem vzniku plicního postižení u SOP je pravděpodobně autoimunitní reakce, která vede k tvorbě autoprotilátek zaměřených proti vlastním strukturám tělesných tkání se vznikem imunokomplexů. Proces může být vyvolán modifikací vlastních struktur například zánětem, který vede ke ztrátě imunologické tolerance vůči takto pozměněnému antigenu. Není to ale jen mechanismus imunokomplexů podílejících se na vzniku IPP u SOP, protilátkami navozená cytotoxicita a buněčný typ přecitlivělosti se rovněž účastní na rozvoji plicního postižení u SOP. Pod vlivem cytokinů produkovaných buňkami zánětu dochází k nakupení a proliferaci fibroblastů a k rozvoji plicní fibrózy.

6 Diagnostika

Časná diagnostika plicního postižení u SOP je důležitá pro iniciaci léčby a její úspěšnost, protože plicní postižení může být v době začátku respiračních symptomů již nevratné. Diagnostika SOP a IPP bývá nezřídka problematická. Na diagnózu IPP u SOP má myslet i revmatolog, a to i přesto, že v diagnostických kritériích pro jednotlivé SOP chybí IPP (s výjimkou malých kritérií SSc). Pokud je spolu s plicní tkání postižena i pleura, svaly hrudního koše, klouby nebo i další orgány, pravděpodobně se jedná o IPP v rámci SOP. U každého nemocného s IPP je doporučeno pátrat po autoimunitních systémových příznacích a odebrat autoprotilátky (viz níže). Někdy je ale obtížně diferenciatně diagnosticky odlišit, zda se jedná o primární IPP v rámci SOP, nebo zda je obraz IPP dán polékovým postižením (viz www.pneumotox.com) při léčbě SOP nebo infekční komplikaci u imunokompromitovaného pacienta léčeného imunosupresivou. Setkáváme se i tím, že IPP mohou předcházet systémové manifestaci SOP o několik měsíců nebo let s nutností pozdějšího překlasifikování původní diagnózy NSIP nebo UIP/IPF (idiopatická plicní fibróza) na plicní manifestaci SOP. Je pravděpodobné, že u signifikantní části nemocných s idiopatickou NSIP není dosud diagnostikováno SOP. Dalším úskalím diagnostiky SOP je existence takzvaných „frustrních, okultních forem“, u kterých nejsou plně vyjádřeny charakteristické systémové příznaky SOP. V neposlední řadě nesmíme opomenout, že IPP může být komplikací léčby základní choroby,

methotrexatová pneumonitida byla pozorována u 0.5-12 % pacientů s RA léčených methotrexatem.

Klinické vyšetření

Podrobná anamnéza a fyzikální vyšetření je důležité pro stanovení diagnózy SOP vzhledem k jejich rozmanitým systémovým příznakům. Na SOP pomyslíme tehdy, pokud nacházíme v klinickém obraze jednak kombinaci různých typů postižení téhož systému, nebo při současném zdánlivě nesouvisajícím postižení různých orgánů a tkání. Je třeba pátrat po celkových příznacích nemoci (hubnutí, teploty, pocení), postižení kloubů, svalů, fotosenzitivitě, kožních eflorescencích, radiálních rýhách kolem úst, sklerodaktylii, paličkovitých prstech, změnách na nehtech, teleangiektaziích, vazospastických fenoménech Raynaudově typu (akrohypotermie s akrocyanózou a hyperhidrózou na rukou), očních zánětech, recidivujících nekrotizujících aftózních stomatitidách, bolestech hlavy, opakovaných pleuritidách, suchosti sliznic, poruchách motility jícnu, podkožních kalcifikacích, chronických těžkých zánětech vedlejších nosních dutin, glomerulonefritidě v minulosti, dlouhotrvající nevysvětlené zvýšené sedimentaci erytrocytů, leukopenii, anemii, trombocytopenii, bolestivém zduření chrupavek nosu, ušních boltců, sternokostálních spojení, prvních projevech onemocnění po porodu nebo potratu. Viz tabulka 4.

Běžnými respiračními symptomy IPP u SOP jsou dušnost a suchý kašel. Korelace mezi závažností IPP a tíží mimoplicního postižení u SOP nebyla zaznamenána. Poslechovým nálezem na plicích u intersticiální plicní fibrózy jsou bilaterálně bazálně krepitace. U pokročilého onemocnění je přítomna cyanóza, pravostranné srdeční selhávání, známky plicní hypertenze. Projevy plicní hypertenze (PH), které vznikají sekundárně u pokročilého plicního onemocnění, neodlišíme od těch, které vidíme u primární plicní hypertenze.

Laboratorní vyšetření

*Laboratorní testy nejsou pro diagnózu SOP vysoce senzitivní a specifické, ale v kombinaci s klinickými nálezy mohou pomoci při diferenciální diagnostice. Výjimkou jsou některé autoprotilátky, které zvyšují pravděpodobnost IPP a SOP. V případě DAH nacházíme anémii, většinou sideropenickou. Standardními testy jsou hematologická a biochemická vyšetření: sedimentace erytrocytů, kompletní krevní obraz, koagulační parametry, Creaktivní protein, složky komplementu, CD subpopulace lymfocytů, HLA znaky, kyselina močová, jaterní testy, urea, kreatinin, ionty, laktátdehydrogenáza, kreatinfosfokináza, sérové imunoglobuliny, vyšetření moče včetně proteinurie, clearance kreatininu, odpady iontů. Imunologická vyšetření zahrnují průkaz **antinukleárních protilátek ANA** – při pozitivním výsledku je nutné provést titraci a další typizaci antinukleárních protilátek na protilátky proti deoxyribonukleoproteinu anti-DNP (proti dvouvláknové jaderné deoxyribonukleové kyselině*

*ds-DNA, proti nukleosomům a histonům) a proti extrahovatelným jaderným antigenům ENA (anti SS-A (Ro), anti SS-B (La), anti Sm, ribonukleoproteinu U1-RNP, anti DNA-topoizomeráze Scl-70, anti histidyl tRNA syntetáza, anti Jo-1 antigen). Dále vyšetřujeme přítomnost revmatoidního faktoru (RF), případně specifitější protilátky proti **cyklickému citrulinovému peptidu anti-CCP**, protilátky antimitochondriální anti-Mi-2, „lupus antikoagulans“, antikardiolipinové protilátky tabulka 2.*

Předmětem výzkumu je význam zvýšených hladin různých biomarkerů (surfaktantového proteinu A, D, Krebs von der Lungen – 6, Interleukinu-6 a jiné) v séru nemocných s IPP a SOP. Senzitivita a specifita těchto markerů je ve vztahu k aktivitě plicního procesu dosud nejasná. Současně jsou popisovány zvýšené hladiny těchto sérových biomarkerů i u různých forem IPP.

Plicní funkční vyšetření

Plicní funkční vyšetření (PFV) je součástí nejen diagnostiky, ale i monitorace nemoci, prognózy a efektu léčby. Parametry plicních funkcí mohou poukázat na možnou přítomnost IPP dříve než skiagram hrudníku. Nejčastějším nálezem je restriční ventilační porucha, tedy snížení celkové plicní kapacity-TLC, vitální kapacity plic – VC za zachování či zvýšení hodnoty FEV1/FVC (poměr usilovné vitální kapacity za 1 sekundu a usilovné vitální kapacity), se snížením transfer faktoru pro CO (DLco) a snížením plicní poddajnosti. Arteriální krevní plyny jsou v klidu většinou v normě. U SSc hodnota DLCO reflektuje závažnost a rozsah plicní fibrózy na HRCT hrudníku více než jiné plicní funkční abnormality. Dawson a kol., v své práci na souboru nemocných s RA zaznamenává předpovědní hodnotu redukovaného DLco ve vztahu k progresi plicní fibrózy. Restriční ventilační porucha s normálními hodnotami DLco se vyskytuje při oslabení dýchacích svalů nebo kostovertebrálního postižení, například při ankylozující spondylitidě. Bronchiektázie a obliterující bronchiolitida mohou vést ke vzniku obstrukční plicní ventilační poruchy. Nemocní s BOOP/OP, například v rámci RA, mají buď normální parametry ventilace, nebo obstrukční ventilační poruchu v důsledku obstrukční bronchiolitidy.

Funkční zátěžové vyšetření (kardiopulmonální zátěžový test, šestiminutový test chůzí) může prokázat hypoxémii při zátěži (latentní respirační insuficience) a zvýšený alveolo-arteriální kyslíkový gradient. Spiroergometrie je navíc citlivým ukazatelem závažnosti intersticiálního i plicního postižení a dokáže odlišit funkční limitaci z příčin mimo plicní parenchym, tj. cévních (plicní arteriální hypertenze) či kardiálních.

Zobrazovací metody

Nálezy na skiagramu hrudníku a HRCT hrudníku (high resolution computed tomography, výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností) závisí na typu IPP. Na skiagramu

hrudniku často prokazujeme v raných stádiích nemoci převážně periferně bazálně retikulonodulární stíny. U DAH můžeme vidět oboustranně difuzně snížení transparence. U pokročilé choroby vidíme difuzní retikulonodulaci s redukcí plicního objemu a v terminální fázi voštinovitou plíci (honeycomb lung). Další změny zahrnují opacity mléčného skla (ground glass), apikalizace plicních hilů, hyperinflace, zesílení pleury, pleurální výpotky. HRCT hrudniku je senzitivnější metodou a umožňuje stanovit charakter, závažnost IPP, má význam v prognóze a monitoraci plicního postižení. Nejčastějším nálezem jsou retikulární opacity (nepravidelné lineární zastínění s cystickými formacemi nebo honeycombing) až retikulonodulace s cystami, distorze plicní architektiky, zmenšení objemu plic, mozaiková perfuze, konsolidace, noduly včetně tree-in-bud, nebo vzácně voština. U postižení typu obvyklé intersticiální pneumonie (UIP) nalézáme subpleurální dorzobazální retikulární opacity s žádným nebo minimálním zastoupením ground glass (opacity mléčného skla), nebo voštinovitou plíci jako projev terminální plicní fibrózy. U fibrotizující nespecifické intersticiální pneumonie (NSIP) je vidět jiná distribuce fibrotických změn a prakticky není přítomna voština nebo jen minimálně. U BOOP/OP převažují na HRCT skenech splývající denzity typu mléčného skla. Plicní fibrózu v oblasti horních plicních laloků, zesílení pleury a tvorbu mycetomů vidíme například u AS.

U všech nemocných se SOP a dušností nebo abnormálním plicním funkčním vyšetřením (snížením DLco nebo arteriální desaturací během cvičení), zvláště pokud je nesoulad s rozsahem plicního postižení na radiologickém nálezu, zvažujeme možnost plicní hypertenze. Četné studie potvrzují, že 10 % - 20 % nemocných se SSc má plicní hypertenzi (PH), ta je častěji pozorována v nepřítomnosti klinicky významného IPP. Transtorakální echokardiografie je vhodnou screeningovou metodou v odhalení PH u všech pacientů se SOP.

Bronchoskopie

Bronchoskopie s bronchoalveolární laváží (BAL) a vyšetřením bronchoalveolární tekutiny (BAT) umožňuje vyšetření buněčných a nebuněčných elementů, které jsou přítomny na povrchovém epitelu bronchů a alveolů. Její význam spočívá v odlišení jiných klinických jednotek v rámci diferenciální diagnostiky, hlavně infekce a malignity. Řada prací zejména u SSc se věnuje úloze BAL ve stanovení aktivity plicního procesu, prognóze, rozhodování o léčbě. Obvykle bývá přítomna smíšená alveolitida, kde převažují neutrofilů. Zvýšené bývají i eozinofily a mastocyty a usuzuje se, že tento nálezn je spojen s horší prognózou. Zatím pouze předmětem výzkumu je profil cytokinů ve vzorcích lavážní tekutiny (BAT). Kupříkladu u SSc-IPP je příznivější poměr mezi fibrogenními a antifibrogenními nebo protizánětlivými faktory (interleukin-12 a interleukin-10) než u UIP/IPF (idiopatická plicní fibróza).

U nemocných s IPP a SOP existuje skupina pacientů se subklinickou lymfocytární alveolitidou, s žádnými klinickými symptomy a negativním radiologickým nálezem. Není dosud zcela jasné, zda tato izolovaná lymfocytóza v BAT předurčuje vznik progresivní plicní fibrózy.

Plicní biopsie

Chirurgickou plicní biopsii většinou u této skupiny chorob většinou neindikujeme. Fenotyp postižení u známého SOP je obvykle dobře definován HRCT. Biopsii indikujeme v případech rozpaků, kdy v diferenciální diagnostice by byl kupříkladu nádor, obvykle si pak můžeme vystačit s méně invazivní bronchoskopickou transbronchiální biopsií či kryobiopsií. Pro definitivní uzavření diagnózy SOP-IPP nám slouží multidisciplinární tým složený z radiologů, pneumologů, patologů, který by měl být součástí každého Centra pro diagnostiku a léčbu IPP. Histopatologický obraz SOP zahrnuje postižení dýchacích cest, alveolů, plicních cév, pleury a hrudní stěny. Jednotlivá intersticiální plicní postižení zahrnují: AIP, UIP, LIP, BOOP (OP), NSIP, DIP, DAH, granulomatózní plicní postižení, CPFE. Viz tabulka 5. V raných studiích byla za nejběžnější patologickoanatomický obraz u IPP-SOP považována UIP. S lepší definicí jednotlivých histologických obrazů došlo k upřesnění nálezů a v několika případech byla UIP překlasifikována na NSIP. Ve studii Bouros a kol., u 80 pacientů se SSc byla provedena plicní biopsie, u 62 z nich byla potvrzena NSIP a jen u 6 UIP. NSIP je rovněž nejběžnějším patologickoanatomickým nálezem u PM/DM. U RA je větší zastoupení UIP než NSIP. Většina nemocných s RA a plicní fibrózou jsou mladší než ti s idiopatickou UIP. U SS pacientů můžeme pozorovat LIP, NSIP, UIP. Pacienti se SS, mají zvýšené riziko lymfomů. U MCTD je hlavním histopatologickým příznakem NSIP. Tyto IIP v rámci SOP mají podobné radiologické a histologické charakteristiky jako jejich idiopatické formy, ale existuje mezi nimi signifikantní rozdíl v přežití.

7 Diferenciální diagnostika

Nemocní se SOP mají často kombinaci plicních změn. Diagnóza IPP při potvrzené diagnóze SOP je poměrně snadná. Pokud ale je plicní postižení první manifestací SOP, je diferenciální diagnostika široká a představuje vyloučení všech jiných difuzních intersticiálních plicních procesů. SOP u kterých IPP mohou být jedinými či dominantními projevy a tak napodobovat chronickou IIP jsou zejména PM/DM, SSc, RA, SS, MCTD a nediferencované onemocnění pojivové tkáně. V řadě případů jsme nuceni původní diagnózu IPF překlasifikovat na plicní manifestaci systémového onemocnění pojiva.

Udává se, že 15–20 % pacientů s chronickou IPP může mít frustní (plně nevyjádřenou) formu SOP nebo se může SOP následně plně vyvinout. Homma a kol., sledovali 68 nemocných s IIP

po dobu 1–11 let. U 13 nemocných (19 %) v průběhu sledování došlo k vývoji SOP. Nediferencovaná onemocnění pojiva mají rysy několika SOP, ale nesplňují kritéria jednotlivých SLE, SSc, PM/DM, SS (tabulka 5). Překryvné syndromy splňují kritéria dvou nebo více SOP. **Intersticiální pneumonie s autoimunitními rysy** (IPAF, interstitial pneumonitis with autoimmune features) zahrnují jak pacienty s IPP při nediferencovaném onemocnění pojiva, tak skupinu nemocných s IPP, kteří nesplňují diagnostická kritéria systémové choroby pojiva, a přesto vykazují známky autoimunitního onemocnění.

Proč je u pacientů s IPP nutné pátrat po SOP? Na přesné a včasné diagnóze závisí její léčba, prognóza a možné další specifické komplikace. Vzhledem k systémovému poškození u SOP je třeba pátrat po poškození dalších orgánů (srdce s perikardiálními výpotky a plicní cévy u sklerodermie, malignity u PM/DM, poškození ledvin u SLE). V neposlední řadě je nutné myslet na plicní komplikace navozené léčbou základní choroby (cytostatika-metotrexát, soli zlata, penicilamin, sulfasalazin, rituximab).

8 Komplikace

Plicní poškození včetně intersticiální plicní fibrózy se stává významnou příčinou smrti pacientů se SOP. V pokročilých stádiích intersticiálního plicního poškození dochází k pravostrannému přetížení srdce s jeho selháním. Nemocní na imunosupresivní léčbě jsou ohroženi infekcemi. Další komplikací jsou léky používané v léčbě SOP (viz výše). U PM/DM nebo Sjögrenova syndromu je pozorován vyšší výskyt nádorových onemocnění. Možnou komplikací dlouhodobě probíhajících SOP, zejména RA, je amyloidóza.

9 Terapie

Konsenzuální doporučení terapie IPP-SOP jsou nedostatečná z důvodu chybění velkých randomizovaných placebem kontrolovaných klinických studií (kromě studie s CF u sklerodermie). Kauzální léčba intersticiální plicní fibrózy při SOP neexistuje. Lepší léčebné odpovědi je dosaženo tehdy, pokud je terapie zahájena včas, než dojde k pokročilému rozvinutí ireverzibilní plicní fibrózy (primárně fibrotizující UIP, fibrotizující NSIP). Na vytvoření terapeutického plánu by se měl podílet revmatolog i pneumolog. Obecná doporučení léčby viz tabulka 6 a 7.

Kdy bychom měli zahájit léčbu SOP – IPP? Na rozhodnutí o zahájení léčby mají vliv tyto okolnosti: 1) Trvání systémového onemocnění v délce kratší 4–5 let, v této době je vyšší riziko vzniku a progresu plicního poškození. 2) Stupeň plicního poškození v závislosti na hodnotách plicních funkčních testů a jejich vývoji, zejména DL_{CO}, a HRCT nálezu (predominance zánětlivého plicního poškození).

Jaké léčebné postupy jsou používány? V klinické praxi obvykle používáme podobné léčebné režimy u všech typů IPP a SOP, kombinace glukokortikoidů (GK; prednison (PR)) a imunosupresiv. V úvodu se jedná o terapii indukční, na kterou navazuje pokračovací. Dle doporučení Britské hrudní společnosti (BTS) z roku 2008 sestává léčba SSc a IPP většinou v kombinaci nízkých dávek GK (10 mg/den) a/nebo cyklofosfamidu (CF, orálního či intravenózního). Vyšším dávkám GK nad 10–15 mg se vyhýbáme pro riziko vzniku sklerodermické renální krize. Pro většinu ostatních SOP a IPP jsou doporučovány jako iniciální terapie orální GK v denní dávce 0,5 – 1 mg/kg po dobu 4 týdnů s postupným pomalým snižováním během 3 měsíců na udržovací dávku 5-15 mg denně. Obvykle v kombinaci s imunosupresivem, nejčastěji s CF v denní dávce 1,5 - 2 mg/kg perorálně (maximální denní dávka je 150 mg) nebo častěji intravenózně v pulzech 500–1000 mg/m²/měsíc (obvyklá dávka 500–1000 mg CF). S ohledem na toxicitu je preferováno intermitentní intravenózní podání. Místo CF můžeme použít spolu s GK i azathioprin (AZA) v denní dávce 100–150 mg denně, s výjimkou velmi závažných a progresivních onemocnění, a vždy v kombinaci s kortikoidy. Ve většině případů ale podání AZA indikujeme jako následnou léčbu po indukční terapii CF. AZA má méně nežádoucích účinků než CF (suprese kostní dřeně, hepatotoxicitu, kancerogenita), ale je pravděpodobně méně účinný než CF, což potvrdila jedna provedená randomizovaná studie u SSc-IPP (ve skupině s AZA byl větší pokles FVC a DLco oproti skupině s CF). U fulminantních stavů jsou obvykle používány velké dávky kortikosteroidů v pulzním intravenózním režimu (1 g methylprednisolonu 3 dny po sobě) samostatně nebo v kombinaci s dalším imunosupresivem (cyklofosfamid). Nicméně jasné doporučení pro akutní exacerbace IPP neexistují.

Pro SSc a IPP v doporučeních EULAR (The European League Against Rheumatism) není žádné univerzální dávkovací schéma podání CF doporučeno. Každé pracoviště používá jiné a my používáme protokol intravenózního podání CF 10 mg/kg měsíčně nebo 500mg/m² (6-12 pulzů). Pokud i přes tuto léčbu dochází ke zhoršení klinickému a/nebo funkčnímu a/nebo v zobrazovacích metodách, pak je na místě vyzkoušet alternativu s minimálně stejnou účinností jako u CF a to je mykofenolát mofetil (MMF) v dávce 1,5-3 g/d nebo rituximab (anti-CD20 monoklonální protilátka) v dávce 1000 mg D1 a D15 a následně 1 g každého půl roku (tzv. revmatologický režim, který preferujeme na našem pracovišti; nebo v hematologickém režimu 375 mg/m² týdně po dobu měsíce, pak po půl roce). Pokud je přítomný klinický efekt indukční terapie nízkými dávkami GK + CF, je možné přejít v udržovací terapii GK + AZA. U pacientů se SS často převažuje postižení plicní fibrózou nad zánětlivými změnami, proto je vhodná léčba tzv. antifibrotiky zabraňujícími progresi dalšího vazivovatění plicního parenchymu. Slibným lékem u SSc se v tomto případě jeví nintedanib,

inhibitor tyrozinkinázových receptorů. Běžně indikován pro nemocné s idiopatickou plicní fibrózou jako primárně fibrotizujícím onemocněním. U pacientů užívajících tento lék v dávce 2 x 150 mg perorálně (+ prednison a/nebo MMF či methotrexát) byl pozorován menší roční pokles plicních funkcí (FVC o – 52,4 ml ve skupině s nintedanibem oproti – 93,3 ml ve skupině s placebem; nebyl vliv na plicní difuzi) v čase oproti placebo. Po dobu studie neměl nintedanib efekt na žádné další postižení v rámci SSc. Další antifibrotikum, které je nyní pod klinickým zkoušením u SSc, je pirfenidon. V případě progresse závažného orgánového postižení může být zvážována autologní transplantace kmenových buněk, které je ovšem spojená s periprocedurální mortalitou. U SSc doporučujeme léčbu u pacientů s respiračními příznaky a recentní diagnózou SSc. A to proto, že většina IPP-SOP se vyskytuje v rozmezí 2-5 let od stanovení diagnózy SOP. Další indikací léčby je: nízké FVC a/nebo DLco; ≥ 20 % plicního postižení na HRCT hrudníku; progresse plicních funkčních parametrů v čase

*U pacientů s **PM/DM a IPP** je dle BTS jako iniciální léčba doporučován orální prednison v denní dávce 0,75 mg – 1 mg/kg spolu s CF nebo jiným imunosupresivem. Nicméně neexistuje žádná randomizovaná placebem kontrolovaná studie. V případě progresse při monoterapii kortikoidy nebo při nutnosti vysokých dávek GK je možné přidat další imunosupresiva: mykofenolát mofetil, již zmiňovaný cyklofosfamid, azathioprin, cyklosporin, methotrexát, rituximab, tacrolimus (imunosupresivum ze třídy makrolidů a inhibitor kalcineurinu).*

*U nemocných s **RA a IPP** nejsou v současné době k dispozici výsledky žádných randomizovaných placebem kontrolovaných studií a chybí všeobecně akceptovatelná doporučení pro vyhledávání a léčbu RA-IPP. Obecně je doporučeno především tyto pacienty sledovat a při zahájení léčby se řídit klinickým stavem, vývojem nemoci v čase a posouzením benefitu léčby s rizikem jejich možných komplikací. Nejvíce dat z retrospektivních studií se týká kombinace systémového kortikosteroidu a azathioprinu, mykofenolátu, cyklofosfamidu nebo rituximabu. U léčby metotrexátem, leflunomidem a inhibitory TNF α (tumor nekrotizující faktor alfa) je riziko pneumotoxicity. Další nekonvenční léky pro léčbu RA zahrnují tocilizumab (monoklonální protilátka proti receptoru IL-6), abatacept (CTLA-4 fúzní protein), ale indikace pro RA-IPP není jednoznačně doporučena a efekt na IPP není zcela objasněn. Prokážeme-li přítomnost PH, máme k dispozici specifickou léčbu namířenou na plicní hypertenzi a warfarinizaci.*

*U **SLE-IPP** jsou opět základní terapií kortikoidy, buď v pulzním režimu, nebo perorálně dle klinického stavu. Ke kortikoidům je možno přidat cyklofosfamid, mykofenolát mofetil eventuálně rituximab. CF se aplikuje ve dvou režimech, buď nízké dávky s nižší toxicitou (i. v. 500 mg CF à 14 dní) nebo ve stejné účinnosti podaný CF 0,5-1 g/m² à 1 měsíc. MMF se*

obvykle podává v dávce 2-3 g/den na 6 měsíců. Následná udržovací terapie zahrnuje azathioprin, methotrexát, leflunomid, MMF.

U **SS-IPP** jsou lékem volby kortikoidy, azathioprin, cyklofosfamid, methotrexat, popřípadě rituximab.

Z dalších nekonvenčních léků jsou zkoušeny nebo byly zkoušeny imatinib, bortezomib, dabigatran, abituzumab, pomalidomide, ale bez velkých úspěchů nebo je zapotřebí dalších studií k potvrzení nebo vyvrácení jejich účinnosti a jejich bezpečnosti na IPP.

Narůstající prevalence subklinických forem intersticiálních plicních postižení u SOP nás staví před rozhodnutí, jak a zda tyto pacienty léčit. Rozhodnutí léčit tyto subklinické formy, dle některých autorů, by mělo záviset na míře plicního funkčního postižení. Pokud je plicní funkční postižení mírné, nezahajujeme léčbu a sledujeme nemocného v 3–6. měsíčních intervalech. Nezahajujeme léčbu, pokud má pacient na HRCT hrudníku jen diskrétní postižení anebo zjistíme abnormální diferenciální rozpočet v BAT. Léčbu bychom měli zahajovat tehdy, pokud prokážeme středně těžké plicní funkční postižení nebo během sledování pozorujeme zhoršení plicních funkčních parametrů.

Pokud je IPP pokročilý a vyvine se respirační nedostatečnost je indikována dlouhodobá domácí oxygenoterapie (DDOT). I když na rozdíl od chronické obstrukční plicní nemoci (CHOPN), chybí data potvrzující, že DDOT zlepšuje přežití pacientů s IPP a chronickou hypoxémií. V konečném stádiu onemocnění je zvažována i transplantace plic, ale není vždy možná, závisí na komorbiditách a na charakteru a tíži systémového postižení. Pokud je SOP v remisi a není postižení srdce (srdeční arytmie) a ledvin (nestabilní ledvinové funkce v posledních 3 měsících), digitální ulcerace, aktivní zánětlivá myopatie, pokud není významný gastroezofageální reflux bez odezvy na léčbu či patologicky změněný polykací akt (vysoké riziko aspirací), mohla by být transplantace plic zvažována.

10 Sledování pacientů

Kontroly pacientů s IPP-SOP by měly probíhat ve 3-6-12 měsíčních intervalech. Nejlépe na spadových plicních ambulancích nebo v Centrech pro diagnostiku a léčbu IPP. Frekvence kontrol závisí na typu postižení a na typu SOP. Například u SSc, pokud nejsou v úvodu známky IPP, pak stačí provést vstupní klinické a plicní funkční vyšetření (spirometrie, pletysmografie, plicní difuze, krevní plyny) a pak za 6-12 měsíců po dobu 3-5 let od začátku onemocnění a poté každý rok. Pokud je přítomno IPP v rámci SSc, pak provádět klinická vyšetření v 3-4. měsíčních intervalech. Jako progrese je hodnocen pokles FVC o 10 % a/nebo DLco o 15 % oproti předešlé kontrole. Pravidelná vyšetření zahrnují: klinický nález, zobrazovací metody (skiagram hrudníku nebo HRCT hrudníku), komplexní plicní funkční

vyšetření (spirometrie, pletysmografie, plicní difuze, krevní plyny eventuálně saturace kyslíkem), některý z ukazatelů aktivity onemocnění (autoprotilátky, CRP) nebo nežádoucích účinků léčby (krevní obraz, biochemie).

11 Prognóza

Prognóza intersticiální plicní fibrózy u této skupiny onemocnění je závislá na stádiu IPP, rozsahu intersticiální plicní fibrózy na HRCT hrudníku, závažnosti plicního funkčního postižení a komplikujících faktorech (plicní infekce, postižení cév PH. Neexistuje léčba, která by dokázala účinně zvrátit fibrózu plicní tkáně. Data potvrzují, že většina nemocných s IPP u SOP žije déle než 10 let od stanovení diagnózy a má efekt imunosupresivní léčby na průběh IPP a plicní funkce ve srovnání s UIP/IPF. I v případě SOP může dojít k tzv. akutním exacerbacím, které vidíme u UIP/IPF. Jednotlivé histologické typy intersticiálních plicních postižení (UIP, NSIP a jiné) u SOP mají menší prognostickou výpovědní hodnotu než u idiopatických intersticiálních pneumonií. Ve studii Park a kol., nebyl u nemocných se SSc zjištěn signifikantní rozdíl v prognóze mezi UIP-SSc a NSIP-SSc, ale u nemocných s UIP-SOP byla zjištěna horší prognóza než u UIP/IPF navzdory stejným histopatologickým nálezům. V práci Flaherty a kol., byla srovnávána prognóza IPF a UIP/SOP. Prognóza UIP/SOP byla lepší ve srovnání s UIP/IPF, protože u skupiny nemocných se SOP bylo zaznamenáno histologicky méně fibroblastických fokusů. Je možné, že na lepší prognóze v této studii měl vliv časný záchyt IPP u SOP. Ve studii Lee a kol., byla u nemocných s RA zaznamenána horší prognóza u UIP nežli u NSIP. Ve studii Wellse a kol., byla srovnávána prognóza a přežití na souboru 205 nemocných s IPF a 68 nemocných s intersticiální plicní fibrózou a SSc. Prognóza a přežití byly lepší u pacientů se SSc než u IPF. Ve studii Yoshinouchi a kol., byl pozorován rozdíl v prognóze nemocných s UIP-RA a u UIP/IPF na základě odlišného charakteru myofibroblastů podílejících se na vzniku plicní fibrózy a přítomnosti S-100 (protein 100 % solubilní v amonium sulfátu při neutrálním pH) pozitivních dendritických buněk. Ve studii Bourose a kol., bylo analyzováno zastoupení jednotlivých histologických typů intersticiální plicní fibrózy u SOP a jejich vztah k prognóze. Prognóza IPP byla závislá na závažnosti nemoci v době diagnózy a na vývoji DLCO v čase více než na patologickoanatomickém obrazu. V 5letém přežití byl malý rozdíl mezi NSIP a UIP.

13 Závěr

Plicní intersticiální postižení je běžnou komplikací u nemocných se SOP, ale u mnoha z nich patologický plicní proces probíhá bez klinických projevů (subklinicky). Vzhledem k tomu, že

IPP je častou příčinou smrti u pacientů se SOP, je potřeba, co nejdříve odhalit přítomnost plicní fibrózy. Myslet na IPP – SOP by měli nejen pneumologové ale i revmatologové.

Zkratky

SOP – systémová onemocnění pojiva, IPP – intersticiální plicní procesy, IIP – idiopatické intersticiální pneumonie, SSc – systémová sklerodermie, RA – revmatoidní artritida, PM/DM – polymyozitida/dermatomyozitida, SS – Sjögrenův syndrom, SLE – systémový lupus erythematoses, MCTD – smíšená onemocnění pojiva, AS – ankylozující spondylitida, RP – relaxující polychondritida, AIP – akutní intersticiální pneumonie, UIP – běžná intersticiální pneumonie, NSIP – nespecifická intersticiální pneumonie, LIP – lymfocytární intersticiální pneumonie, BOOP/OP - obliterující bronchiolitida s organizující se pneumonií, DIP – deskvamativní intersticiální pneumonie, DAH – difuzní alveolární hemorrhagie, CPFE – kombinace plicní fibrózy a emfyzému, ANA – antinukleární protilátky, ENA – protilátky proti extrahovatelným antigenům, RF – revmatoidní faktor, CCP – cyklický citrulinový peptid, DLco – difuzní kapacita pro oxid uhelnatý (transfer faktor), PH – plicní hypertenze, BAL – bronchoalveolární laváž, BAT – bronchoalveolární tekutina.

Korespondence:

MUDr. Martina Doubková, Ph.D.

Klinika nemocí plicních a tuberkulózy

Fakultní nemocnice Brno, pracoviště Bohunice

Jihlavská 20

62500 Brno

doubkovamartina@seznam.cz

Literatura

- 1. American Thoracic Society/European Respiratory Society: Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. Am. J. Respir. Crit. Care Med 2000; 161 (2 Pt1): 646-664.*
- 2. American Thoracic Society, European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165 (2): 277-304.*

3. Antoniou KM, Margaritopoulos G, Economidou F, Siakafas NM. Pivotal clinical dilemmas in collagen vascular disease associated with interstitial lung involvement. *Eur Respir J* 2009; 33 (4): 882–896.
4. Aubart F, Crestani B, Nicaise-Roland P et al. High levels of anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies are associated with co-occurrence of pulmonary diseases with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011; 38 (6): 979-982.
5. Bodolay E, Szekanecz Z, Dévényi K et al. Evaluation of interstitial lung disease in mixed connective tissue disease (MCTD). *Rheumatology* 2005; 44 (4): 656-661.
6. Bonela F, Costabel U. Biomarkers in connective tissue disease-associated interstitial lung disease. *Semin Respir Crit Care Med* 2014; 35 (2): 181-200.
7. Boumpas DT, Austin HA 3rd, Vaughn EM, et al. Controlled trial of pulse methylprednisolone versus two regimens of pulse cyclophosphamide in severe lupus nephritis. *Lancet* 1992; 340 (8822): 741-745.
8. Boulware DW, Hedgpeth MT. Lupus pneumonitis and anti-SSA(Ro) antibodies. *J Rheumatol* 1989; 16 (4): 479–481.
9. Bouros D, Wells AU, Nicholson AG, et al. Histopathologic subsets of fibrosing alveolitis in patients with systemic sclerosis and their relationship to outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165 (12): 1581–1586.
10. Bradley B, Branley HM, Egan JJ et al. British Thoracic Society Interstitial Lung Disease Guideline Group, British Thoracic Society Standards of Care Committee; Thoracic Society of Australia; New Zealand Thoracic Society; Irish Thoracic Society. Interstitial lung disease guideline: the British thoracic in collaboration with the thoracic society of Australia and New Zealand and the Irish thoracic society. *Thorax* 2008; 63 Suppl 5: 1–58.
11. Cavagna L, Nuño L, Scirè CA et al. AENEAS (American, European NEtwork of Antisynthetase Syndrome) collaborative group. Clinical Spectrum Time Course in Anti Jo-1 Positive Antisynthetase Syndrome: Results From an International Retrospective Multicenter Study. *Medicine (Baltimore)* 2015;94 (32): e1144.
12. Cohen JM, Millier A, Spiera H. Interstitial pneumonitis complicating rheumatoid arthritis. Sustained remission with azathioprine therapy. *Chest* 1977; 72 (4): 521-524.
13. Corte TJ, Copley SJ, Desai SR et al. Significance of connective tissue disease features in idiopathic interstitial pneumonia. *Eur Respir J* 2012; 39 (3): 661-8.
14. Costabel U. Ask the expert – diffuse interstitial lung disease. *Breathe* 2007; 4: 165–171.

15. Cottin V. *Interstitial lung disease: are we missing formes frustes of connective tissue disease?* *Eur Respir J* 2006; 28 (5): 893–896.
16. Cottin V. *Idiopathic interstitial pneumonias with connective tissue diseases features: A review.* *Respirology*. 2016; 21 (2): 245-58.
17. Dawson JK, Fewins HE, Desmond J, et al. *Fibrosing alveolitis in patients with rheumatoid arthritis as assessed by high resolution computed tomography, chest radiography and pulmonary function tests.* *Thorax* 2001; 56 (8): 622–627.
18. Dawson JK, Fewins HE, Desmond J, et al. *Predictors of progression of HRCT diagnosed fibrosing alveolitis in patients with rheumatoid arthritis.* *Ann Rheum Dis* 2002; 61 (6): 517–521.
19. Distler O, Highland KB, Gahlemann M, et al. *Nintedanib for systemic sclerosis-associated interstitial lung disease.* *N Eng J Med* 2019; 380 (26): 2518-2528.
20. Doubková M, Skříčková J. *Intersticiální plicní postižení a systémová onemocnění pojiva.* *Stud Pneumol Phtiseol* 2013; 73 (2): 76-83.
21. Fertig N, Domsic RT, Rodriguez-Reyna T et al. *Anti-U11/U12 RNP antibodies in systemic sclerosis: a new serologic marker associated with pulmonary fibrosis.* *Arthritis Rheum*. 2009; 61 (7): 958-65.
22. Fisher A, Brown KK, Du Bois RM. *Mycophenolate mofetil improves lung function in connective tissue disease-associated interstitial lung disease.* *J Rheumatol* 2013; 40 (5): 640-646.
23. Fischer A, Antoniou KM, Brown KK et al *An official European Respiratory Society/American Thoracic Society research statement: interstitial pneumonia with autoimmune features.* <http://www.ers-education.org/guidelines.aspx>. Navštíveno dne 19. 5. 2016
24. Flaherty KR, Colby TV, Travis WD. *Fibroblastic foci in usual interstitial pneumonia: idiopathic versus collagen vascular disease.* *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167 (10): 1410–1415.
25. Groen H, ter Borg EJ, Postma DS et al. *Pulmonary function in systemic lupus erythematosus is related to distinct clinical, serologic, and nailfold capillary patterns.* *Am J Med* 1992; 93 (6): 619-627.
26. Hamaguchi Y, Fujimoto M, Mathushita T, et al. *Common and distinct of clinical features in adult patients with anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies: heterogeneity within the syndrome.* *PLos One* 2013; 8 (4): e60442.
27. Hill MB, Phipps JL, Cartwright RJ et al. *Antibodies to membranes of endothelial cells and fibroblasts in scleroderma.* *Clin Exp Immunol* 1996; 106 (3): 491-497.

28. Homma Y, Ohtsuka Y, Tanimura K, et al. Can interstitial pneumonia as the sole presentation of collagen vascular diseases be differentiated from idiopathic interstitial pneumonia? *Respiration* 1995; 62 (5): 248–251.
29. Hoshino K, Muro Y, Sugiura K et al. Anti-MDA5 and anti-TIF1-gamma antibodies have clinical significance for patients with dermatomyositis. *Rheumatology* 2010;49 (9): 1726-1733.
30. Hoyles RK, Ellis RW, Wellsbury J, et al. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of corticosteroids and intravenous cyclophosphamide followed by oral azathioprine for the treatment of pulmonary fibrosis in scleroderma. *Arthritis Rheum* 2006; 54 (12): 3962-3970.
31. Houssiau FA, Vasconcelos C, D'Cruz D, et al. Immunosuppressive therapy in lupus nephritis: the EuroLupus Nephritis Trial, a randomized trial of low-dose versus high-dose intravenous cyclophosphamide. *Arthritis Rheum* 2002; 46 (8): 2121-2131.
32. Jee AS, Corte TJ. Current and emergin drug therapies for connective tissue disease-interstitial lung disease (CTD-ILD). *Drugs*. doi: 10.1007/s40265-019-01178-x. V tisku.
33. Kinder BW. Interstitial lung disease with autoimmune features. In Cordier JF: *European respiratory monograph. Orphan lung diseases*. Plymouth, UK: Latimer Trend & Co.Ltd 2011:104–117.
34. Lamblin C, Bergoin C, Saelens T et al. Interstitial lung diseases in collagen vascular disease. *Eur Respir J Suppl* 2001; 32: 69–80.
35. Lee HK, Kim DS, Yoo B, et al. Histopathologic pattern and clinical features of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Chest* 2005; 127 (6): 2019–2027.
36. Love LA, Leff RL, Fraser DD, et al. A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine (Baltimore)* 1991; 70 (6): 360-74.
37. Mathai SC, Danoff SK. Management of interstitial lung disease associated with connective tissue disease. *BMJ* 2016; 352:h6819. Doi: 10.1136/bmj.h6819.
38. Matteson EL, Bongartz T, Ryu JH. Open-Label, Pilot Study of the Safety and Clinical Effects of Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Pneumonia. *Open Journal of Rheumatology and Autoimmune Diseases*. 2012; 2: 53–58.
39. Meloni F, Caporali R, Marone BA et al. BAL cytokine profile in different interstitial lung diseases: a focus on systemic sclerosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2004; 21 (2): 111–118.

40. Mimori T, Imura Y, Nakashima R et al. Autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathy: an update on clinical and pathophysiological significance. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19 (6): 523-529.
41. Mimori T, Nakashima R, Shida N et al. Interstitial lung diseases in myositis: clinical subsets, biomarkers, and treatment. *Curr Rheumatol Rep* 2012; 14 (3): 264-274.
42. Nadashkevich O, Davis P, Fritzler M, et al. A randomized unblinded trial of cyclophosphamide versus azathioprin in the treatment of systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* 2006; 25 (2): 205–212.
43. Nicholson AG, Colby TV, Wells AU. Histopathological approach to patterns of interstitial pneumonia in patient with connective tissue disorders. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2002; 19 (1): 10–17.
44. Papiris SA, Kagouridis K, Bouros D. Serologic evaluation in idiopathic interstitial pneumonias. *Curr Opin Med* 2012; 18 (5): 433-440.
45. Parambil JG, Myers JL, Lindell RM, et al. Interstitial lung disease in primary Sjögren syndrome. *Chest* 2006; 130(5): 1489–1495.
46. Park JH, Kim DS, Park I-N, et al. Prognosis of fibrotic interstitial pneumonia. Idiopathic versus collagen vascular disease-related subtypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175 (7): 705–711.
47. Saunders P, Tshipouri V, Keir GJ, et al. Rituximab versus cyclophosphamide for the treatment of connective tissue disease-associated interstitial lung disease (RECITAL): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials* 2017; 18 (1): 275. Doi: 10.1186/s13063-017-2016-2.
48. Self SE. Autoantibody testing for autoimmune disease. *Clin Chest Med* 2010; 31 (3): 415-422.
49. Sircar G, Goswami RP, Sircar D, et al. Intravenous cyclophosphamide vs rituximab for the treatment of early diffuse scleroderma lung disease: open label, randomized, controlled trial. *Rheumatology (Oxford)* 2018; 57 (12): 2106-2113.
50. Smallwood DM, Wells AU, du Bois RM. Collagen vascular diseases and associated complications. In Baugman RP, du Bois RM, Lynch JP, et al. *Diffuse lung disease. A practical approach*. 1. vydání, London, Arnold, 2004: 294 s.
51. Tachikawa R, Tomii K, Ueda H, et al. Clinical features and outcome of acute exacerbation of interstitial pneumonia: collagen vascular diseases-related versus idiopathic. *Respiration* 2012; 83 (1): 20–27.

52. Tansey D, Wells AU, Colby TV, et al. Variations in histological patterns of interstitial pneumonia between connective tissue disorders and their relationship to prognosis. *Histopathology* 2004; 44 (6): 585–596.
53. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, et al. Cyclophosphamide for scleroderma interstitial lung disease. *N Engl J Med* 2006; 354 (25): 2655-2666.
54. Tashkin DP, Roth MD, Clements PJ, et al. Mycophenolate mofetil versus oral cyclophosphamide in scleroderma-related interstitial lung disease (SLS II): a randomised controlled, double-blind, parallel group trial. *Lancet Respir Med* 2016; 4 (9): 708-719.
55. Teruya A, Kawamura K, Ichikado K, et al. Successful polymyxin B hemoperfusion treatment associated with serial reduction of serum anti-CADM-140/MDA-5 antibody levels in rapidly progressive interstitial lung disease with amyopathic dermatomyositis. *Chest* 2013; 144 (6): 1934-1936.
56. Tzelepis GE, Toya SP, Moutsopoulos HM. Occult connective tissue diseases mimicking idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J* 2008; 31 (1): 11-20.
57. Vašáková M, Polák J, Matěj R. Postižení plic u systémových onemocnění. In: Vašáková M, Polák J, Matěj R. *Intersticiální plicní procesy. Od etiopatogeneze přes radiologický obraz k histopatologické diagnóze.* Praha: Maxdorf 2011; 285-312.
58. Vašáková M, Bečvář R, Lukáš M, et al. Plicní postižení u systémových nemocí pojiva, vaskulitid a idiopatických zánětů v gastroenterologii. 1. vyd. Mladá fronta. Praha. 2016, 207 s.
59. Vencovský J. Jak pomáhá vyšetřování autoprotilátek v diagnostice a hodnocení autoimunitních revmatických chorob? *Vnitř Lék* 2006; 52 (7-8): 679-701.
60. Wallace B, Vummidi D, Khanna D. Management of connective tissue diseases associated interstitial lung disease: a review of the published literature. *Curr Opin Rheumatol* 2016; 28 (3): 236-245.
61. Wells AU. Lung disease in association with connective tissue diseases. *Eur Respir Mon* 2000; 5 (14): 137–164.
62. Wells AU, Cullinan P, Hansell DM et al. Fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis has a better prognosis than lone cryptogenic fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149 (6): 1583–1590.
63. Wells AU, Hansell DM, Haslam PL, et al. Bronchoalveolar lavage cellularity. Lone cryptogenic fibrosing alveolitis compared with the fibrosing alveolitis of systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157 (5 Pt1): 1474–1482.

64. Wells AU, Hansell DM, Rubens MB, et al. Fibrosing alveolitis in systemic sclerosis: indices of lung function in relation to extent of disease on computed tomography. *Arthritis Rheum* 1997; 40 (7): 1229–1236.
65. www.pneumotox.com. Navštíveno dne 18. 6. 2019
66. Yanaba K, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Comparative study of serum surfactant protein-D and KL-6 concentrations in patients with systemic sclerosis as markers for monitoring the activity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2004; 31 (6): 1112–1120.
67. Yazisiz V, Arslan G, Ozbudak IH, et al. Lung involvement in patients with primary Sjögren's syndrome: what are the predictors? *Rheumatol Int* 2010; 30 (10): 1317–1324.
68. Yoshinouchi T, Ohtsuki Y, Ueda R, et al. Myofibroblasts and S-100 protein positive cells in idiopathic pulmonary fibrosis and rheumatoid arthritis – associated interstitial pneumonia. *Eur Respir J* 1999; 14 (3): 579–584.
69. Závada J, Buková K, Filková M, et al. *Revmatologie v klinických scénářích*. 1. vyd. Mladá fronta. 2018, 268 s.

Tabulky

Tabulka 1. Základní panel vyšetřovaných autoprotilátek u podezření na systémové onemocnění pojiva a vaskulitidy.

antinukleární protilátky (ANA) metodou NIF
protilátky proti dvouvláknové DNA (anti-dsDNA) metodou NIF nebo ELISA
protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům (anti-ENA): - pozitivita anti-ENA → detekce protilátek proti konkrétním antigenům (SSA, SSB, Scl-70, RNP, Sm, Jo-1) metodou ELISA
revmatoidní faktor (RF) a protilátky proti cyklickým citrulinovaným peptidům (anti-CCP) metodou ELISA
protilátky proti cytoplazmě neutrofilů (c-ANCA a p-ANCA) metodou NIF nebo ELISA (primární a sekundární vaskulitidy; sekundární vaskulitidy jsou vaskulitidy nasedající na jiné onemocnění například autoimunitní)
protilátky proti bazální membráně glomerulů (anti-GBM) metodou NIF nebo ELISA
antifosfolipidové protilátky (APLA) metodou ELISA-pozitivita APLA → detekce protilátek proti kardiolipinu (ACLA) a proti β 2-glykoproteinu 1 (anti-B2GPI)
stanovení orgánově specifických protilátek v případě podezření na orgánově specifická autoimunitní onemocnění
Vysvětlivky: NIF (nepřímá imunofluorescence), ELISA (enzymová imunoanalýza)

Vysvětlivky: ANA antinuclear antibodies, APLA antiphospholipid antibodies, CCP cyclic citrullinated protein, dsDNA double-stranded DNA, ELISA enzyme-linked immunosorbent assay, ENA anti-extractable nuclear

antigens, IF immunofluorescence, Jo1 histidyl-tRNAsynthetase, RF rheumatoid factor, Scl70 topoisomerase I, SS-A, anti SS-B (Ro, La) Sjögren's syndrome related antigen A, B, UI-RNP ribonucleoprotein.

Tabulka 2. Detekovatelné autoprotílátky u systémových onemocnění pojiva.

<i>Systémové onemocnění pojiva</i>	<i>detekovatelné autoprotílátky</i>
<i>Systémová sklerodermie</i>	<i>ANA, anti-topoisomerase I (Scl70), anti-centromera, RF</i>
<i>Revmatoidní artritida</i>	<i>ANA, RF, anti-CCP</i>
<i>Polymyozitida/dermatomyozitida</i>	<i>ANA, anti-aminoacyl-tRNA (anti-histidyl Jo1, anti-PL7, anti-PL12), anti-MDA5, anti-PM-Scl, anti-Mi-2</i>
<i>Systémový lupus erythematoses</i>	<i>ANA, anti-dsDNA, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Sm, protílátky proti fosfolipidům (APLA). Největší diagnostický význam má anti-dsDNA.</i>
<i>Sjögrenův syndrom</i>	<i>ANA, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, RF</i>
<i>Smišené onemocnění pojiva</i>	<i>ANA, anti-UI-RNP, RF, anti-CCP</i>
<i>Nediferencované onemocnění pojiva</i>	<i>ANA, RF, anti-Scl-70, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Jo-1, anti-UI-RNP</i>

Vysvětlivky: ANA antinuclear antibodies, CCP cyclic citrullinated protein, dsDNA double-stranded DNA, Jo1 histidyl-tRNAsynthetase, MDA5 melanoma differentiation-associated protein, MI-2 nuclear antigen (a component of the nucleosome of remodeling deacetylase complex (NuRD), PM-Scl antibodies associated with polymyositis and systemic scleroderma, RF rheumatoid factor, Scl70 topoisomerase I, SS-A, SS-B (Ro, La) Sjögren's syndrome related antigen A, B, UI-RNP nuclear ribonucleoprotein,

Tab. 3. Diagnostická kritéria nediferencovaného onemocnění pojiva. Diagnóza vyžaduje 1 nebo více příznaků pod A + 1 nebo více příznaků pod B.

A. Alespoň jeden: Raynaudův fenomén, 2. artralgie, 3. fotosenzitivita, 4. úbytek váhy, 5. ranní ztuhlost, 6. suché sliznice, 7. poruchy polykání, 8. horečky, 9. gastroezofageální reflux, 10. kožní změny, 11. ulcerace v ústech, 12. neandrogenní alopecie, 13. proximální svalová slabost
B. Pozitivita alespoň jednoho: 1. ANA, 2. RF, 3. anti-Scl-70, 4. anti-SS/A a anti-SS/B, 5. anti-Jo1, 6. sedimentace a CRP

Tabulka 4 Klinické příznaky u systémových onemocnění pojiva.

<i>Orgán</i>	<i>Klinická manifestace</i>
<i>Periferní cirkulace</i>	<i>Raynaudův fenomén</i>
<i>Kůže</i>	<i>Sklerodakrylie Digitální ulcerace a jizvy Teleangiektázie Gottronovy papuly Heliotropní exantém kolem očí Heliotropní exantém na krku, horní části hrudníku,</i>

	ramenech Fotosenzitivita Ruce mechanika
Klouby	Bolesti kloubů, otoky, ranní ztuhlost
Svaly	Bolesti svalů, svalová slabost
Ústa, oči	Suchost sliznic (sicca syndrom)

Tabulka 5. Fenotypy intersticiálního plicního postižení u systémových onemocnění.

Fenotypy intersticiálního plicního postižení
Akutní intersticiální pneumonie-AIP
Obvyklá intersticiální pneumonie-UIP
Lymfocytární intersticiální pneumonie-LIP
Obliterující bronchiolitida s organizující se pneumonií – BOOP (OP)
Nespecifická intersticiální pneumonie-NSIP
Deskvamativní intersticiální pneumonie-DIP
Difúzní alveolární hemorhagie-DAH
Granulomatózní plicní postižení
Fibrobulózní postižení a syndrom kombinované plicní fibrózy a emfyzému-CPFE

Tab. 6. Iničiální terapie u SOP-ILD.

Typ	Dávka
Kortikosteroid	Prednison 0,5 – 1 mg/kg (s výjimkou SSc) iničiální dávka a pak udržovací dávka 5-15 mg/kg
Cyklofosfamid	1,5-2 mg/kg nebo lépe v pulzním režimu viz text
Azathioprin	2-3 mg/kg
Mykofenolát mofetil	1,5-3 g/den
Rituximab	1 g D1, D15 nebo 375mg/m ² týdně 4 dávky
Methotrexát* (*revmatology často podávaný lék, který pneumologové u nemocných s SOP-IPP indikují obezřetněji)	15-25 mg/týdně

Tab. 7. Léčebné možnosti u SOP-ILD.

Typ SOP	Terapie
SSc-ILD	CF, MMF, AZA, GK, Nintedanib, Rituximab
RA-ILD	GK, MMF, CF, Rituximab
DM/PM-ILD	GK, MMF, CF, AZA, Tacrolimus, Rituximab
Jiné SOP-ILD	GK, CF, MMF, AZA, Rituximab

Vysvětlivky: GK – glukokortikoidy, CF – cyklofosfamid, AZA – azathioprin, MMF – mykofenolát mofetil. Více viz text.

Lymfangioleiomyomatóza

Lymphangiomyomatosis

Doubková M.¹, Štefániková M.¹, Čan V.², Merta Z.¹, Svoboda M.^{3,4}

¹ Klinika nemocí plicních a tuberkulózy LF MU a FN Brno

² Chirurgická klinika LF MU a FN Brno

³ Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

⁴ Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Lymfangioleiomyomatóza (LAM) je vzácné systémové onemocnění, které se vyskytuje sporadicky (S/LAM) nebo je součástí tuberózní sklerózy (TS/LAM). Onemocnění je charakterizováno proliferací abnormálních buněk hladkého svalstva. LAM se klinicky manifestuje zhoršující se námahovou dušností a pneumotoraxy. Bývá zvětšení uzlin v abdominální a pánevní oblasti vedoucí k lymfatické obstrukci. LAM je asociována s angiomyolipomy v ledvinách. Diagnóza je stanovena histologicky a/nebo kombinací anamnézy a typického nálezu při vyšetření plic výpočetní tomografií s vysokým rozlišením. V histopatologickém nálezu je diagnóza podporována nálezem charakteristických LAM buněk. Je to onemocnění progredující, s možností kauzální léčby inhibitory mTOR. **Materiál a metody:** Na našem pracovišti bylo v letech 2002–2018 sledováno celkem deset pacientek s LAM (osm S/LAM, dvě TS/LAM) a plicním postižením. Popisujeme jednotlivé klinické charakteristiky a naše zkušenosti s léčbou. **Výsledky:** LAM je prezentována na deseti případech s různým stupněm pokročilosti. Stanovení prognózy u konkrétního nemocného s plicní formou LAM je těžké. Nejlepším ukazatelem vývoje onemocnění je sledování hodnot plicních funkčních parametrů (usílovná vitální kapacita, usílovně vydechnutý objem za první sekundu, difuzní kapacita plic) v čase. V současné době jsou léčeni čtyři naši pacienti mTOR inhibitory, u všech vedla terapie ke stabilizaci plicních funkčních parametrů. Medián sledování byl 48 měsíců (12–132). Nebyl dosažen medián přežití, zemřeli jen tři pacienti. **Závěr:** Společná mezioborová spolupráce pneumologa, chirurga, onkologa a genetika je základem naší péče o pacientky s LAM. Terapie inhibitory mTOR vedla ke stabilizaci LAM u našich nemocných. Nežádoucí účinky léčby byly dobře zvládnutelné.

Klíčová slova

lymfangiomyomatóza – rapamycin – sirolimus

Summary

Background: Lymphangiomyomatosis (LAM) is a rare systemic disease that occurs sporadically (S/LAM) or as part of tuberous sclerosis (TS/LAM). LAM is characterized by proliferation of abnormal smooth muscle cells. This disease clinically manifests as dyspnea on exertion and pneumothorax. Lymphadenopathy in the abdominal and pelvic region leading to lymphatic obstruction can also occur. LAM is associated with kidney angiomyolipoma and meningioma. The disease is diagnosed histologically and/or using typical high-resolution computed tomography findings and anamnestic information. In histopathological studies, the diagnosis is supported by detection of characteristic LAM cells. Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors are possible treatment options. **Material and methods:** Ten consecutive patients diagnosed with LAM and pulmonary manifestation (eight with S/LAM and two with TS/LAM) in 2002–2018 were retrospectively analyzed. Their individual clinical characteristics and our treatment experience are described. **Results:** The patients varied in terms of disease stage. The best predictors of prognosis were lung function parameters (forced vital capacity, forced expiratory volume in 1 second, and diffusing capacity for carbon monoxide). Four patients are currently being treated with mTOR inhibitors. This treatment stabilized lung functions in all four patients. The median follow-up was 48 months (12–132 months). Median survival was not achieved and only three patients died. **Conclusion:** An interdisciplinary approach is required to care for LAM patients. Cooperation of pneumologists, surgeons, oncologists, and geneticists is needed. Treatment with mTOR inhibitors led to stabilization in our patients. The side effects were well managed.

Key words

lymfangiomyomatosis – rapamycin – sirolimus

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Martina Doubková, Ph.D.

Klinika nemocí plicních

a tuberkulózy

LF MU a FN Brno

Jihlavská 20

625 00 Brno

e-mail: doubkovamartina@seznam.cz

Přijato/Accepted: 5. 8. 2019

doi: 10.14735/amko2019367

Úvod

Lymfangioleiomyomatóza (LAM) je vzácné onemocnění, které bylo poprvé popsáno v lékařské literatuře v roce 1918 Lauterbacherem [1]. Druhé pozorování publikoval von Stössel v roce 1937 [2]. Názvoslovní nemoci se postupně vyvíjelo ze slova lymfangiomyom k lymfangiomyomatóze a následně lymfangioleiomyomatóze. Jako samostatná nosologická jednotka byla LAM vymezena až v roce 1958 [3]. Přestože je LAM vzácné onemocnění, bylo v naší a slovenské literatuře zaznamenáno hned několik případů nemoci. Jako první u nás LAM diagnostikoval Dvořáček v roce 1974. Tento první případ nemoci byl zmíněn v práci Miřejovského et al [4] a v práci Halíkové et al [5]. Dvořáček svůj případ časopisecky nepublikoval.

Známe dvě formy LAM – sporadická forma a forma v rámci tuberózní sklerózy (TS) [6]. Příčina nemoci je pravděpodobně genetická. Patologické nálezy u LAM jsou identické s těmi, které vidíme u TS, autozomálně dominantně dědičného onemocnění, u nějž jsou mutované tumor supresorové geny *TSC1* a *TSC2* na 9. a 16. chromozomu (9q34, 16p13) [7,8]. Sporadická LAM je zapříčiněna mutací *TSC2* genu [9–11]. Komplex tuberózní sklerózy (tuberous sclerosis complex – TSC) je zapříčiněn mutací *TSC1* nebo *TSC2* [9,11]. Vzhledem k predilekčnímu postižení žen v reprodukčním věku a přítomnosti hormonálních receptorů v LAM tkáni byla za možnou příčinu nemoci považována nerovnováha mezi hladinou estrogenů a gestagenů v cirkulaci nebo ve tkáních a mezi počtem tkáňových receptorů pro tyto hormony [12,13]. Úloha hormonální regulace v patogenezi nemoci není stále jasná. Progresí nemoci je možné vidět během těhotenství, menstruační a užívání estrogenů [14,15].

Ve světové literatuře je možné nalézt více než 1 500 prací pojednávajících o LAM. Jejich počet stále narůstá v souladu s poznáním nemoci a její přesnější diagnostikou. LAM dominantně postihuje ženy ve fertilním věku [7,16,17], i když byly popsány případy žen po menopauze [18], u dětí a také u mužů [19]. LAM se může vyskytovat ve formě sporadické nebo ve spojení s TS. Některé případy LAM, které začaly již v reproduk-

ním věku ženy, mohou být při pomalé progresi diagnostikovány až postmenopauzálně. Dosud nebyl popsán familiární výskyt sporadické LAM a vyšší výskyt u některého z etnik [19]. Z velké části jsou pacienti nekuřáci nebo bývalí kuřáci [20]. Přesná data o výskytu nemoci v populaci nejsou známa. Sporadická LAM se vyskytuje u 3,3–7,7 žen na 1 milion obyvatel [21]. Odhadovaný medián přežití bez plicní transplantace je 29 let od začátku symptomů, 10leté přežití je 86 % [22]. LAM prevalence u TSC je většinou u žen. Mezi 67 japonskými ženami s TSC bylo 54 % s LAM. Frekvence u mužů je 1/28. LAM frekvence narůstá po 20. roku věku [23]. V jiné studii se LAM u TS vyskytovala až u 80 % žen [7,24]. Epidemiologická data v ČR chybí.

Materiál a metody

Provedli jsme retrospektivní analýzu pacientů sledovaných a léčených na našem pracovišti pro lymfangioleiomyomatózu v letech 2002–2018. V roce 2015 jsme vytvořili jako reakci na nová doporučení léčby LAM inhibitory mTOR (target of rapamycin), pracovní skupinu sestávající ze společné mezioborové spolupráce pneumologa, dětského onkologa, genetika a chirurga. Tato spolupráce má za cíl zlepšit diagnostiku a péči o pacienty a zajistit lepší dostupnost léčby inhibitory mTOR. Cílem práce bylo provést charakteristiku souboru našich pacientů s LAM, analyzovat přirozený vývoj onemocnění, příčiny úmrtí, léčebné postupy a jejich efekt a porovnat naše údaje s údaji publikovanými v české a světové lékařské literatuře.

Diagnóza LAM byla stanovena standardními postupy (klinický nález, sérologický biomarker vaskulární endoteliální růstový faktor D (vascular endothelial growth factor – VEGF-D), funkční vyšetření plic, zobrazovací metody, bronchoskopie s bronchoalveolární laváží k vyloučení jiných intersticiálních plicních procesů, histologický průkaz). Pro stanovení diagnózy jsme vyžadovali korelaci histologického nálezu, klinického nálezu, zobrazovacích a laboratorních vyšetření [6]. V případě absence histopatologického nálezu byla diagnóza stanovena na základě shody kliniky s výsledky zobrazovacích a laboratorních

vyšetření (VEGF-D), vyšetření bronchoalveolární tekutiny, observací a vyloučením jiných intersticiálních plicních onemocnění.

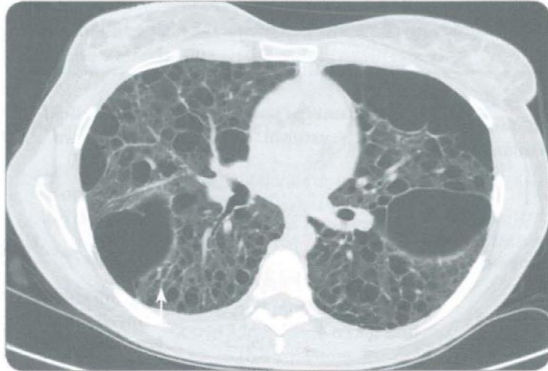
Výsledky

V letech 2002–2018 bylo na našem pracovišti sledováno deset pacientů (žen) s diagnózou LAM a plicním postižením, dvě S/LAM a osm TS/LAM. Dvě pacientky byly kuřáčky, jeden pacient byl bývalý kuřák. Medián věku při stanovení diagnózy byl 44,5 roku, průměrný věk 41 let. Hodnocením klinických nálezů našich pacientů jsme zjistili, že v době stanovení diagnózy byla u čtyř (40 %) přítomna dušnost, u šesti (60 %) pneumotorax, u jednoho (10 %) chylotorax, u pěti (50 %) angiomyolipom a u čtyř (40 %) lymfangioleiomyom. Histologický průkaz LAM byl potvrzen u čtyř nemocných. U zbylých nemocných byla diagnóza stanovena na základě korelace klinického nálezu, zobrazovacích metod, laboratorních vyšetření s odběrem VEGF-D a vyloučením jiných intersticiálních plicních procesů.

Plicní funkční vyšetření neprokázalo při zjištění diagnózy ventilační poruchu u šesti pacientů (60 %). Obstrukční ventilační porucha byla u čtyř (40 %) nemocných. Bez poruchy difuze byli tři (30 %) pacienti, ostatní měli poruchu difuze od mírné po těžkou. Vyšetřením krevních plynů (arterializovaná krev z ušního laičku) v klidu v době diagnózy jsme u šesti (60 %) neprokázali respirační nedostatečnost.

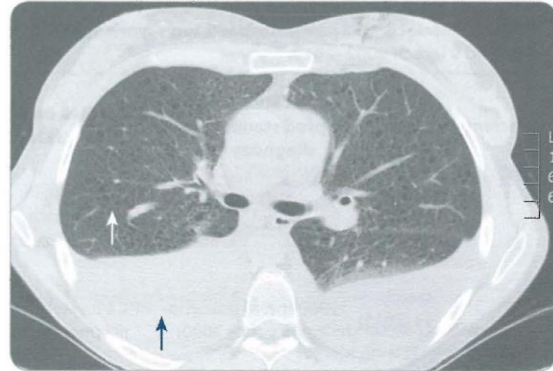
Bronchoskopie s bronchoalveolárním výplachem byla provedena u všech pacientů k vyloučení jiných intersticiálních plicních procesů s cystickou plicní přestavbou. Vyšetření výpočetní tomografií s vysokou rozlišovací schopností (high-resolution computed tomography – HRCT) hrudníku, ultrazvuk nebo CT břicha bylo provedeno u všech nemocných. Charakteristické nálezy na HRCT hrudníku u našich pacientek ukazují obr. 1, 2. K vyloučení TS pacienti podstoupili neurologické, kožní a oční vyšetření a při podezření na TS bylo provedeno i vyšetření genetické.

Kromě plicní rehabilitace, bronchodilatační léčby u nemocných s bronchiální obstrukcí, chemické a chirurgické



Obr. 1. HRCT hrudníku u pacientky s lymfangioleiomyomatózou. Difúzně mnohočetné cysty splývající v objemné buly (šípka), bez pneumotoraxu.

HRCT – výpočetní tomografie s vysokým rozlišením



Obr. 2. HRCT hrudníku s charakteristickým nálezem lymfangioleiomyomatózy. Cystická přestavba plicního parenchymu (bílá šípka) a pleurální výpotek charakteru chylothoraxu (modrá šípka).

HRCT – výpočetní tomografie s vysokým rozlišením

pleurodýzy (ošetření viscerální a parietální pleury za účelem srůstu obou listů a zamezení recidiv pneumotoraxu a pleurálních výpotků) terapie sestávala z hormonální léčby a z léčby inhibitory mTOR. Progesteron byl podáván u dvou pacientek, antiestrogen (tamoxifen) u jedné pacientky, radiační kastrace (ooforektomie) u jedné pacientky. Hormonální léčba nevedla ani u jedné z nich ke stabilizaci plicních nálezů a ke stabilizaci plicních funkčních parametrů v čase. U jedné pacientky ale měla antiestrogenová terapie vliv na redukci velikosti lymfangioleiomyomů v břiše. Čtyři pacienti jsou v současnosti léčeni inhibitory mTOR, snášenlivost je dobrá. Jen u jedné pacientky musela být léčba krátce přerušena z důvodu mírných kožních změn (purpura) a nevysvětlitelných pocitů chladu. U nemocných s mTOR inhibitory je pravidelně kontrolována hladina sirolimu, aby se pohybovala mezi doporučenými hodnotami 4–10 ng/ml. U všech čtyř pacientek vedly inhibitory mTOR ke stabilizaci plicních funkčních parametrů v čase nebo mírnému zlepšení. Hodnoceny byly intervaly 6, 12, 18 měsíců a porovnávaly se parametry usilovné vitální kapacity (forced vital capacity – FVC), usilovně vydechnutého objemu za první sekundu (forced expiratory volume in one second – FEV1) a difúzní kapacity plic (diffusing capacity of carbon monoxide – DLco) v čase oproti předešlé kontrole.

Za dobu sledování tři pacienti zemřeli. Příčinou smrti bylo respirační selhání u nemocné s pokročilým plicním postižením na domácí dlouhodobé kyslíkové léčbě a v přípravě na plicní transplantaci; další příčinou bylo multiorgánové selhání u pacientky po plicní transplantaci s rejekcí transplantátu; v posledním případě se jednalo o kardiální selhání u nemocné s diagnózou LAM v menopauze, se třemi dětmi a pokročilým plicním postižením s těžkou plicní hypertenzí. Medián sledování (follow-up) byl 48 (12–132) měsíců. Nebylo dosaženo mediánu přežití, zemřeli jen tři pacienti. Shrnutí klinických charakteristik viz tab. 1, 2.

Diskuze

Lymfangioleiomyomatóza je méně běžné multisystémové onemocnění vyskytující se samostatně nebo s TS. LAM je nově klasifikována jako nádor s nízkým stupněm metastazování (nízkým stupněm malignity) a je řazena do kategorie perivaskulárních epitelioidních buněčných tumorů [7]. Původ nemoci je genetický a LAM buňky obsahují abnormality (mutace a epigenetické modifikace) v *TSC1* a *TSC2* genech kódujících tuberin a hamartin, dva proteiny kontrolující signální dráhu kinázy mTOR. Nemoc je charakterizována: 1) proliferací abnormálních buněk hladké svaloviny v plicním intersticiu a podél axiálních lymfatických cest hrudníku a břicha a kolem mediastinálních, abdominálních a dol-

ních krčních uzlin; 2) tenkostěnnými plicními cystami; 3) vyšší incidencí angiomylipomů (abdominálních) [6,25]. Proliferující LAM buňky mají charakteristiky buněk hladké svaloviny a melanocytů pronikají do tkání plic, formují se do svazků a prorůstají do stěn dýchacích cest, krevních a lymfatických cév, čímž vedou k jejich poškození a obstrukci. Proto při vyšetření plicních funkčních parametrů nejčastěji zjišťujeme obstrukční ventilační poruchu se známkami plicní hyperinflace, současně bývá snižena difúzní kapacita plic. Obstrukce plicních krevních cév může vést k plicní hemoragii, hemoptýze a hemosideróze. Obstrukce lymfatických cest vede k chylothoraxům a chylózním ascitům [7].

Průměrný věk stanovení diagnózy je 35 let [26]. V naší skupině byl průměrný věk 41 let. Dvěma nejčastějšími klinickými manifestacemi jsou dušnost a pneumotorax [7]. Klinické příznaky se různí dle studií, zahrnují dušnost (73 % u S/LAM, 71 % u TS/LAM), spontánní pneumotorax (57 % u S/LAM, 47 % u TS/LAM), hemoptýzu (10 % u S/LAM, 3 % u TS/LAM), abdominální angiomylipomy (41 % u S/LAM, 96 % u TS/LAM), lymfangioleiomyom (38 % u S/LAM, 13 % u TS/LAM), chylothorax (20 % u S/LAM, 14 % u TS/LAM), méně často chylózní ascites, chylurie, chyloptysis a abdominální krvácení způsobené renálními angiolipomy [7,8]. Uvedené údaje korespondují s našimi výsledky.

Tab. 1. Charakteristika souboru deseti žen s lymfangioleiomyomatózou sledovaných na Klinice nemocí plicních a tuberkulózy FN Brno v letech 2002–2018.

Pacient	Věk při stanovení diagnózy	Začátek potíží před stanovením diagnózy LAM	Diagnóza postavena na základě	S/LAM, TS	Plicní funkční parametry vstupní	Mimoplicní postižení
1.	49 (2011)	2009 (plicní příznaky: dušnost, kašel)	HRCT hrudníku (cysty) + chylotorax (bez anamnézy PNO)	S/LAM	obstrukce střední (FEV1 50 %, FVC 47 %), těžká porucha difuze (DLco 21 %), střední hypoxemie (pO ₂ 6,67)	lymfangioleiomy v břišní dutině
2.	53 (2015)	2000 (první pneumotorax v roce 2000)	HRCT (cysty) + recidivující pneumotoraxy	TS	obstrukce mírná (FEV1 68 %, FVC 77 %), střední porucha difuze (DLco 46 %), lehká hypoxemie (pO ₂ 8,5)	renální angiomyolipomy, lymfadenopatie,
3.	52 (2015)	– (náhodný nález v rámci prevence)	HRCT hrudníku (cysty)	S/LAM	norma (FEV1 110 %, FVC 119 %), bez poruchy difuze (DLco 81 %), normoxemie	lymfangioleiomyom v břiše (v rámci prevence na onkologii)
4.	50 (2014)	2006 (první pneumotorax v roce 2006)	HRCT hrudníku (cysty) + recidivující pneumotoraxy	S/LAM	norma (FEV1 87 %, FVC 89 %), difuze těžká (DLco 23 %), střední hypoxemie (pO ₂ ; 7,06 kPa)	renální angiomyolipom
5.	44 (2015)	4 měsíce před diagnózou (kašel, dušnost, hemoptýza)	HRCT hrudníku (cysty)	S/LAM	norma (FEV1 81 %, FVC 89 %), difuze mírná (DLco 69 %), bez hypoxemie	–
6.	38 (2016)	bez plicních potíží kožních změn si všimla kožní lékařka v roce 2016	HRCT	TS	norma (FEV1 84 %, FVC 77 %), difuze norma (DLco 90 %), bez hypoxemie	–
7.	33 (2015)	4 měsíce před diagnózou (dušnost, hemoptýza)	HRCT hrudníku (cysty, 1krát PNO) + plicní biopsie	S/LAM	norma (FEV1 92 %, FVC 82 %), difuze norma (DLco 83 %), bez hypoxemie	lymfangioleiomyomy, angiomyolipomy
8.	25 (2008)	2008 (bolesti břicha)	HRCT hrudníku (cysty, recidivující PNO od 2014) + biopsie tumoru retroperitonea	S/LAM	obstrukce mírná (FEV1 70 %, FVC 77 %), difuze mírná (DLco 64 %), bez hypoxemie	lymfangioleiomyom retroperitonea
9.	24 (2010)	14 dní před stanovením diagnózy (dušnost, bolesti na hrudníku)	HRCT hrudníku (cysty, recidivující PNO) + plicní biopsie	S/LAM	norma (FEV1 82 %, FVC 84 %), mírná difuze (DLco 69 %), bez hypoxemie	renální angiomyolipom
10.	45 (2002)	1991 (dušnost – pacientka vedena pod diagnózami astma, chronická obstrukční plicní nemoc)	HRCT hrudníku (cysty, recidivující PNO) + plicní biopsie	S/LAM	obstrukce těžká (FEV1 42 %, FVC 70 %), difuze těžká (DLco 36 %), střední hypoxemie (pO ₂ ; 7 kPa)	–

LAM – lymfangioleiomyomatóza, S/LAM – sporadická forma lymfangioleiomyomatózy, TS – tuberkulózní skleróza, HRCT – výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností, PNO – pneumotorax, FEV1 – usilovně vydechnutý objem za první sekundu, FVC – forsírovaná vitální kapacita, DLco – difúzní kapacita plic

LAM vede obvykle k progresivní destrukci plicní tkáně a respiračnímu selhání. Doba od začátku symptomů ke stanovení diagnózy je podle zahraniční

literatury 3–4 roky [20]. U některých našich pacientek to bylo i déle. LAM se může projevovat i jako mimoplicní postižení, což jsme pozorovali i v našem

souboru. Matsui et al popisují ve své práci 22 nemocných s postižením lymfatických uzlin mediastina a retroperitonea. U většiny těchto pacientů diagnóza

Tab. 2. Charakteristika souboru deseti žen s lymfangioleiomyomatózou sledovaných na Klinice nemocí plicních a tuberkulózy FN Brno v letech 2002–2019 (pokračování tab. 1).

Pacient	Terapie LAM	Efekt terapie LAM (inhib. mTOR nebo hormonální léčba)	Transplantace plic	Přežití
1.	progesteron	bez efektu	ano	dosud
2.	inhibitory mTOR (od 5/2016)	stabilizace plicních funkcí a stabilizace velikosti amgiomyolipomu	budoucí kandidát	dosud
3.	bez léčby	–	budoucí kandidát	dosud
4.	bez léčby	–	zvažována	zemřela na kardiální selhání při těžké PH (2014)
5.	inhibitory mTOR (od 5/2018)	stabilizace plicních funkcí	budoucí kandidát	dosud
6.	bez léčby	–	budoucí kandidát	dosud
7.	inhibitory mTOR (od 4/2019)	stabilizace plicních funkcí	budoucí kandidát	dosud
8.	antiestrogeny (tamoxifen) progesteron (vysazen pro nežádoucí účinky) inhibitory mTOR (od 4/2016)	stabilizace plicních funkcí při inhibitech mTOR	budoucí kandidát	dosud
9.	–	–	budoucí kandidát	zemřela na respirační selhání (2018) během předtransplantačních vyšetření
10.	ooforektomie	bez efektu	ano	zemřela 2 roky po transplantaci na chronickou rejekci transplantátu (2004)

LAM – lymfangioleiomyomatóza, mTOR – target of rapamycin, PH – plicní hypertenze

extrapulmonální LAM předcházela plicní projevy obvykle o 1–2 roky [27]. Častým nálezem u 20–54 % pacientů s LAM je benigní angiomyolipom. Jde většinou o malý, bilaterální, často bezpříznakový útvar složený z tuku, hladké svaloviny a krevních cév [28].

Diagnostická kritéria jsou následující (spolehlivá diagnóza LAM): charakteristický nález cyst na HRCT hrudníku + jeden z následujících klinických příznaků: TSC, renální angiomyolipomy, cystický lymfangioleiomyom, chylózní pleurální výpotek nebo chylózní tekutina v břišní dutině. V případě, že není diagnóza jistá a některé z následujících příznaků nejsou přítomny, pak je indikována plicní biopsie [25]. V našem souboru pacientů byla histologická verifikace provedena u čtyř nemocných. Vyšetření sérové hladiny VEGF-D je vhodné v případě kontraindikace invazivního odběru vzorku. VEGF-D je lymfangio-
genetický faktor (přispívá k lymfangio-

genezi, invazi a metastazování); je zvýšen v séru pacientů s LAM [7,29] a pomáhá při stanovení diagnózy u pacientů s LAM bez mimoplicního postižení nebo TSC a k vyloučení jiných cystických plicních postižení [7,25]. Hladiny VEGF-D v séru nad 800 pg/ml jsou diagnostické pro LAM [7,25,30]. Vyšetření VEGF-D jsme využívali i my pro diagnostiku LAM v případech, že nebyla provedena histologická verifikace. Sérové koncentrace VEGF-D mají i prognostický význam, hladiny klesají u nemocných léčených inhibitory mTOR oproti placebo [25].

Na HRCT hrudníku je nález homogenně difuzně rozložených tenkostěnných cyst různých velikostí (od mm po cm) (obr. 1, 2). Na diagnózu LAM je nutno pomýšlet v diferenciální diagnostice plicních intersticiálních procesů, zvláště pokud jsou spjaty s recidivujícími pneumotoraxy, chylotoraxem a obstrukční ventilační poruchou u mladých žen. U pacientů s početnými cystami

na CT skenech hrudníku by mohlo v diagnostické rozvaze pomoci i provedení abdominálního CT vyšetření k ověření extrapulmonální LAM. U pacientů s lymfatickým postižením vidíme pleurální tekutinu charakteru chylotoraxu a plicní infiltráty způsobené kumulací chylu v intersticiu. Další nálezy zahrnují již zmiňované angiomyolipomy, lymfadenopatie, lymfangioleiomyomy a ascites [7]. Diferenciálně diagnosticky je potřeba odlišit S/LAM od TS/LAM (nejeví sexuální predilekci, je charakterizována mnohčetnými hamartomy, epilepsií, mentální retardací a kožními změnami typu adenoma sebaceum).

Nejvíce specifickou metodou průkazu LAM je plicní biopsie demonstrující přítomnost LAM buněk, buď pro jejich typický histologický obraz, nebo pro jejich reakci s HMB-45 protilátkami (myší monoklonální protilátka reagující s extraktem z humánního maligního melanomu) způsobenou nekompletní formou mela-

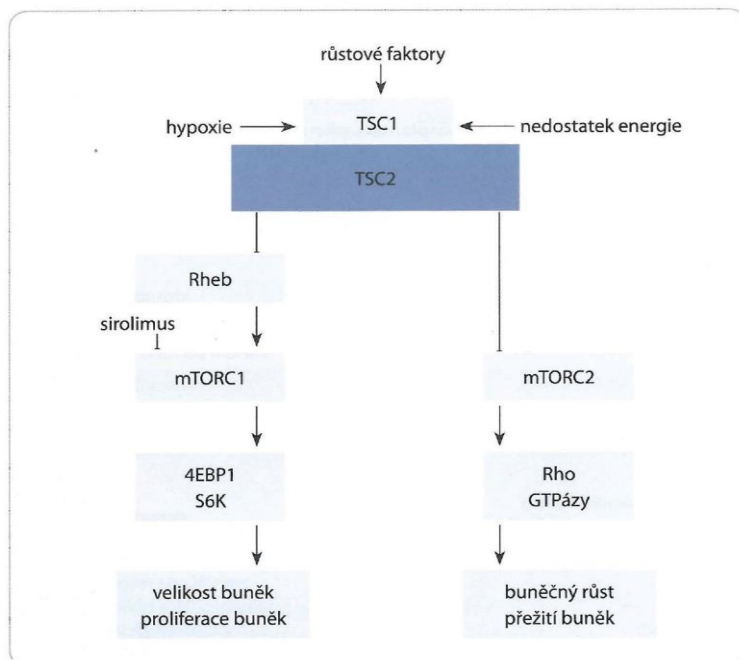


Schéma 1. Signalizační dráha mTOR a působení inhibitoru mTOR sirolimu. Podle Taveira-DaSilva [7].

Zjednodušené schéma mTOR signalizační cesty. Proteiny TSC1/2 integrují řadu signálů růstových faktorů či hypoxie a ovlivňují proliferaci a velikost buněk. TSC1/2 negativně regulují mTORC1 prostřednictvím proteinu Rheb. Aktivace mTORC1 vede k růstu buněk a proliferaci. mTORC2 reguluje aktin cytoskeletu prostřednictvím Rho GTPázy, což má za následek změny buněčné migrace a přežití. Absence TSC1/2 vede k aktivaci mTORC1. Sirolimus blokuje mTORC1, a tím snižuje proliferaci a zmenšuje velikost buněk.

mTOR – target of rapamycin, TSC – komplex tuberózní sklerózy, Rheb – Ras homolog enriched in brain

nogeneze v LAM buňkách. LAM buňky exprimují kromě markerů buněk melanozomů, estrogenových a progesteronových receptorů [7,31], chemokinových receptorů [32], CD44v6 (glykoproteinu spojeného s metastazováním) [33] a matrix metaloproteináz rovněž receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF-D3) [7,29].

Současná terapie vychází z několika doporučení [25,34]. Obecně je doporučováno ženám udržovat normální tělesnou hmotnost (negativní vliv estrogenů tvořených v tukové tkáni) a nekouřit. Ve světě existuje sdružení na podporu žen (samy sobě si říkají „LAMies“), které poskytují informace o nemoci a doporučení pro život a podporu dalšího výzkumu (www.thelamfoundation.org).

U nás zatím takové patientské sdružení není. Vhodné je zvýšení rehabilitačního potenciálu, proto i většina našich pacientek podstupuje dechovou plicní rehabilitaci. Symptomaticky všem nemocným s bronchiální obstrukcí podáváme bronchodilatační léčbu, protože obstrukce může být částečně reverzibilní a může pomáhat ke zlepšení subjektivního vnímání dušnosti [6].

Gravidita představuje pro pacientku s LAM a jejího lékaře velké dilema. Je prokázáno, že estrogeny v průběhu těhotenství zhoršují průběh onemocnění. To byl i případ naší pacientky (případ č. 9). Nemocná ale byla pečlivě informována o rizicích, aby se mohla svobodně rozhodnout, zda je ochotna podstoupit riziko zhoršení nemoci. Hormonální fak-

tory pravděpodobně hrají úlohu v patogenezi nemoci, a to proto, že onemocnění prakticky výlučně jen ženy [25], stabilizace nemoci bývá vidět v postmenopauzálním období [35], zhoršení LAM je spojené s menstruačním cyklem [36], těhotenstvím [37,38], hormonální forma antikoncepce obsahující estrogeny zhoršuje průběh onemocnění [39]. I přes tyto skutečnosti (viz výše) užívání progesteronu u žen s LAM neposkytlo jasný důkaz o jeho účinnosti. Obdobně nejsou v léčbě LAM doporučovány antiestrogenová léčba ve formě tamoxifenu, ooforektomie nebo podávání agonistů gonadotropinů uvolňujících hormony [40–42]. My jsme podali hormonální léčbu dvěma pacientkám, ani u jedné nebylo dosaženo efektu na průběh nemoci a plicní funkce (případ 1 a 8). Třetí podstoupila v roce 2002 radiační kastraci, opět bez pozitivního efektu na plicní funkce. Nemocné byla posléze provedena plicní transplantace (případ č. 10).

V roce 2015 byla americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (U.S. Food and Drug Administration – FDA) schválena kauzální léčba inhibitory mTOR (tato terapie ale není v ČR pro indikaci LAM dosud schválena a musí se žádat pojišťovnu o úhradu). Patologická proliferace LAM buněk je totiž zapříčiněna dysregulací mTOR dráhy, která přes hamartin a tuberin, proteiny kódované TSC1 a TSC2 geny, reguluje intracelulární serin/threonin kinázu mTOR signalizační cesty. Ta pak ve výsledku kontroluje velikost, proliferaci, dělení a přežití buněk. mTOR obsahuje dva komplexy (mTORC1, mTORC2). mTORC1 je citlivý na mTOR inhibitory (sirolimus, everolimus) (schéma 1). Sirolimus stabilizuje nebo zlepšuje plicní funkce (FEV1 a FVC), kvalitu života, redukuje velikost angiomyolipomů, lymfangoioleiomomů a množství chylózní tekutiny [25,43]. Sirolimus je na základě uvedených studií indikován pro LAM pacienty s FEV1 menší než 70 % [25,43]. Indikací u našich nemocných byla rovněž obstrukční ventilační porucha s FEV1 menší než 70 % a progresse plicních funkčních parametrů v čase nebo progresse velikosti angiomyolipomů. Doporučená dávka pro pacienty s LAM/TSC je 2 mg/den s případnou korekcí,

aby hladina sirolimu v krvi byla mezi 4–10 ng/ml, max. 15 ng/ml [25,43]. Nejběžnější nežádoucí účinky jsou stejné jako u jiných indikací, např. mukozitidy, zažívací potíže (průjemy, zvracení), hypercholesterolemie, kožní změny (purpura), otoky dolních končetin, elevace jaterních testů, infekce, dysmenorea, proteinurie, cysty ovaria [25,43,44]. U našich pacientek jsme se setkali s mírnými nežádoucími účinky většinou typu mukozitidy. U žádné ze čtyř pacientek jsme nemuseli z důvodů nežádoucích účinků zcela vysadit terapii.

Dalším lékem, který byl klinicky studován, je doxycyklin. Doxycyklin je tetracyklinové antibiotikum, které inhibuje produkci a aktivitu matrix metaloproteináz (MMP-2, MMP-9). Degradace extracelulární matrix proteolytickými enzymy, jako jsou MMP, přispívá k tvorbě cyst [45]. Bohužel terapie doxycyklinem neprokázala žádnou účinnost na plicní funkce [46]. Jiné léčebné možnosti se nadále hledají, zejména inhibitory autofagie, hydroxychlorochin a simvastatin jsou nyní pod klinickým testováním, protože inhibice mTORC1 sirolimem vede ke zvýšení autofagie a přežití buněk [7]. Kombinace mTOR s dalšími léčebnými modalitami tedy čeká na výsledky dalších studií.

Symptomatická léčba se zaměřuje na ovlivnění recidivujících pneumotoraxů, pleurálních výpotků a chylózních ascitů. Pleurodéz, plerectomie, pleurální abrace se mohou použít k minimalizování rizika opakujících se pneumotoraxů, zároveň ale mohou komplikovat provedení plicní transplantace [6,34,47]. V našem souboru pacientů byla chirurgická pleurodéz pro recidivující pneumotorax provedena u čtyř nemocných. V případě, že dochází k progresi, je indikována plicní transplantace, která obvykle přináší nemocným dlouhodobý benefit. V naší kohortě byla plicní transplantace provedena u dvou nemocných. Transplantace plic bývá zvažována v případě, že se pacientka funkčně posune do stadia dušnosti NYHA III–IV s klidovou hypoxemií a těžkým postižením plicních funkcí. Komplikací pro pacienty s LAM jsou pneumotoraxy v nativní plicí po jednostranné plicní transplantaci, chylotorax a v literatuře zřídka

popisy rekurence nemoci v transplantované plicí, které bývají často asymptomatické [6,48–51]. Jsou známy zkušenosti s retransplantací plic pro selhání štěpu nebo při recidivě plicního postižení v transplantátu [50,51].

Klinický průběh je variabilní a nemoc většinou pomalu progreduje a vede k respiračnímu selhání a ke smrti v horizontu let. Prognostické faktory jsou závislé na plicních funkčních parametrech a histopatologickém zastoupení obou složek: cystické degenerace a proliferace abnormálních buněk hladké svaloviny. Mladší, premenopauzální ženy mají obvykle rychlejší pokles plicních funkčních parametrů nežli ženy starší, postmenopauzální [6,7]. Předpokládá se, že pacienti s TS/LAM mají ve srovnání se S/LAM mírnější a méně progresivní onemocnění [52,53]. V našem souboru máme jen dvě pacientky s TS/LAM. První je ve sledování od roku 2000 a je stabilní na léčbě inhibitory mTOR, druhá je diagnostikována v roce 2016 a nemá respirační potíže ani plicní funkční poruchu. Mladší pacienti, kteří se prezentují pneumotoraxem jako první manifestací LAM, mají lepší prognózu než ti, kteří trpí progredující dušností bez anamnézy pneumotoraxu [7,54]. S tímto závěrem se plně neshodujeme, protože pacienti, kteří se prezentují dlouhodobou dušností, mohou být často vedeni pod jinými diagnózami (viz pacientka 10, která byla 11 let léčena pro astma, pak pro chronickou obstrukční plicní nemoc) a LAM je pak diagnostikována až v pokročilém stadiu. Pacientka č. 9 se prezentovala jen recidivujícími pneumotoraxy, bez subjektivně udávané dušnosti, byla premenopauzální a u ní i vzhledem ke dvěma graviditám nemoc rychle progredovala. Ve studii Hayashida et al pacienti s poklesem plicních funkčních parametrů v čase (FEV1) a DLco pod 40 % projevující se dušností bez pneumotoraxu měli horší prognózu [54]. U našich pacientek byla také deklinace FEV1, DLco v čase spojena s progresí a závažností plicního procesu, a funkční parametry tak byly citlivé ukazatele pokročilosti plicního postižení.

Závěr

LAM je pomalu progresivní, metastatické onemocnění způsobené *TSC1/TSC2* mutací. Negativními prognostickými faktory

jsou gravidita a pokles plicních funkčních parametrů v čase. Předpovědět průběh onemocnění neumíme, ale základem správné péče o naše pacienty je dobrá mezioborová spolupráce s cílem časné diagnostiky a léčby, která je v současné době již kauzální. mTOR inhibitory jsou indikovány u progredujícího onemocnění a u tří našich pacientek vedly ke stabilizaci plicních funkcí, u jedné pacientky ke stabilizaci plicních funkcí a stabilizaci velikosti angiomyolipomu. Nežádoucí účinky asociované s mTOR u LAM jsou v našem souboru shodné s těmi u jiných indikací a jsou dobře terapeuticky zvládnutelné.

Literatura

1. Lauterbacher R. Dysembriomes metatypiques des reins carcinomose submilliere aigue poumon avec emphysemie generalisee et double pneumothorax. *Ann Med Interne (Paris)* 1918; 5: 435–450.
2. Van Stössel E. Über muskuläre Cirrhose der Lunge. *Beitr Klin Tuberk* 1937; 90: 432–442.
3. Laipply TC, Sherrick JC. Intrathoracic angiomyomatous hyperplasia associated with chronic chylothorax. *Lab Invest* 1958; 7(4): 387–400.
4. Mifejovský P, Kulhánková J. Plicní lymfangioleiomatomy. *Česk Patol* 1980; 16(3): 132–138.
5. Haliková J, Mifejovský P, Fučík J et al. Plicní lymfangioleiomatomy. *Stud Pneumol Phtiseol Czechoslov* 1990; 50(4): 239–243.
6. Johnson SR, Cordier JF, Lazor R et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis and management of lymphangioleiomatosis. *Eur Respir J* 2010; 35(1): 14–26. doi: 10.1183/09031936.00076209.
7. Taveira-DaSilva AM, Moss J. Epidemiology, pathogenesis and diagnosis of lymphangioleiomatosis. *Expert Opin Ophan Drugs* 2016; 4(4): 369–378. doi: 10.1517/21678707.2016.1148597.
8. Ryu JH, Moss J, Beck GJ et al. The NHLBI lymphangioleiomatosis registry: characteristics of 230 patients at enrollment. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(1): 105–111. doi: 10.1164/rccm.200409-1298OC.
9. Smolarek TA, Wessner LL, McCormack FX et al. Evidence that lymphangioleiomatosis is caused by TSC2 mutations. chromosome 16p13 loss of heterozygosity in angiomyolipomas and lymph nodes from women with lymphangioleiomatosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62(4): 810–815. doi: 10.1086/301804.
10. Carsillo T, Astrinidis A, Henske EP. Mutation in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangioleiomatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(11): 6085–6090. doi: 10.1073/pnas.97.11.6085.
11. Yu J, Astrinidis A, Henske EP. Chromosome 16 loss of heterozygosity in tuberous sclerosis and sporadic lymphangioleiomatosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(8Pt1): 1537–1540. doi: 10.1164/ajrccm.164.8.2104095.
12. Colley MH, Geppert E, Franklin WA. Immunohistochemical detection of steroid receptors in case of pulmonary lymphangioleiomatosis. *Am J Surg Pathol* 1989; 13(9): 803–807. doi: 10.1097/0000478-198909000-00011.
13. Matsui K, Takeda K, Yu ZX et al. Down regulation of estrogen and progesterone receptors in the abnormal smooth muscle cells in pulmonary lymphangioleiomatosis following therapy: an immunohistochemical

- study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(3Pt1): 1002–1009. doi: 10.1164/ajrccm.161.3.9904009.
14. Oberstein EM, Fleming LE, Gomez-Marín O et al. Pulmonary lymphangioliomyomatosis (LAM): examining oral contraceptive pills and the onset of disease. *J Women Health* 2003; 12(1): 81–85. doi: 10.1089/154099903321154176.
15. Silerstein EF, Ellis K, Wolff M et al. Pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Am J Roentgenol* 1974; 120(4): 832–850.
16. Doubková M, Turčáni P, Pokojová E et al. Lymfangioliomyomatóza (kazuistika a přehled případů popsaných v české a slovenské lékařské literatuře). *Stud Pneumol Phtiseol* 2005; 65(4): 154–159.
17. Svatoň M, Pešek M, Ferda J. Lymfangioliomyomatóza – cesta do nitra buněk. Kazuistika v alergologii, pneumologii a ORL 2013; 10(3): 3–8.
18. Homolka J, Svobodová L, Slováková A. Lymfangioliomyomatóza u postmenopauzální ženy. *Cas Lek Cesk* 2003; 142(2): 117–119.
19. Aubry MC, Myers JL, Ryu JH et al. Pulmonary lymphangioliomyomatosis in a man. *Am J Respir Crit Care Med* 2000(2Pt1); 162: 749–752. doi: 10.1164/ajrccm.162.2.9911006.
20. Urban T, Lazor R, Lanconique J et al. Pulmonary lymphangioliomyomatosis: a study of 69 patients. *Groupe d'Etudes et de Recherche sur les Maladies "Orphelines" Pulmonaires (GERM"O" P)*. *Medicine (Baltimore)* 1999; 78(5): 321–337. doi: 10.1097/00005792-199909000-00004.
21. Harknett EC, Chang WY, Byrnes S et al. Use of variability in national and regional data to estimate the prevalence of lymphangioliomyomatosis. *QJM* 2011; 104(11): 971–979. doi: 10.1093/qjmed/hcr116.
22. Opreacu N, McCormack FX, Byrnes S et al. Clinical predictors of mortality and cause of death in lymphangioliomyomatosis: a population-based registry. *Lung* 2013; 191(1): 35–42. doi: 10.1007/s00408-012-9419-3.
23. Wataya-Kaneda M, Tanaka M, Hamasaki T et al. Trends in the prevalence of tuberous sclerosis complex manifestations: an epidemiological study of 1666 Japanese patients. *PLoS One* 2013; 8(5): e63910. doi: 10.1371/journal.pone.0063910.
24. Cudžilo CJ, Szczesniak RD, Brody AS et al. Lymphangioliomyomatosis screening in women with tuberous sclerosis. *Chest* 2013; 144(2): 578–585. doi: 10.1378/chest.12-2813.
25. McCormack FX, Gupta N, Finlay GR et al. Official American Thoracic Society/Japanese Respiratory Society clinical practice guidelines: lymphangioliomyomatosis diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 194(6): 748–761. doi: 10.1164/rccm.201607-1384ST.
26. Gupta N, Vassallo R, Wikenheiser-Brokamp KA et al. Diffuse cystic lung disease: part I. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191(12): 1354–1366. doi: 10.1164/rccm.201411-2094CI.
27. Matsui K, Tatsuguchi A, Valencia J et al. Extrapulmonary lymphangioliomyomatosis (LAM): clinicopathologic features in 22 cases. *Hum Pathol* 2000; 31(10): 1242–1248. doi: 10.1053/hupa.2000.18500.
28. Avilla NA, Kelly J, Chu S et al. Lymphangioliomyomatosis: abdominopelvic CT and US findings. *Radiology* 2000; 216(1): 147–153. doi: 10.1148/radiology.216.1.r00j42147.
29. Glasgow CG, Avila NA, Lin JP et al. Serum vascular endothelial growth factor-D prospectively distinguishes lymphangioliomyomatosis from other disease. *Chest* 2009; 135(5): 1293–1300. doi: 10.1378/chest.08-1160.
30. Young L, Lee HS, Inoue Y et al. Serum VEGF-D a concentration as a biomarker of lymphangioliomyomatosis severity and treatment response: a prospective analysis of the Multicenter International Lymphangioliomyomatosis Efficacy of Sirolimus (MILES) trial. *Lancet Respir Med* 2013; 1(6): 445–452. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70090-0.
31. Grzegorek I, Lenze D, Chabowski M et al. Immunohistochemical evaluation of pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Anticancer Res* 2015; 35(6): 3353–3360.
32. Pacheco-Rodriguez G, Kumaki F et al. Chemokine-enhanced chemotaxis of lymphangioliomyomatosis cells with mutation in the tumor suppressor TSC2 gene. *J Immunol* 2009; 182(3): 1270–1277. doi: 10.4049/jimmunol.182.3.1270.
33. Pacheco-Rodriguez G, Steagall WK et al. TSC2 loss in lymphangioliomyomatosis cells correlated with expression of CD44v6, a molecular determinant of metastasis. *Cancer Res* 2007; 67(21): 10573–10581. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1356.
34. Gupta N, Finlay GA, Kotloff RM et al. Lymphangioliomyomatosis diagnosis and management: high-resolution chest computed tomography, transbronchial lung biopsy, and pleural disease management. An official American Thoracic Society/Japanese Respiratory Society clinical practice guideline. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 196(10): 1337–1348. doi: 10.1164/rccm.201709-1965ST.
35. Johnson SR, Tattersfield AE. Decline in lung function in lymphangioliomyomatosis: relation to menopause and progesterone treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(2): 628–633. doi: 10.1164/ajrccm.160.2.9901027.
36. Sandrini A, Silverstone E, Yates DH. Menstrual cycle variation of retroperitoneal lymphangioliomyomas in lymphangioliomyomatosis. *Intern Med J* 2011; 41(12): 832–835. doi: 10.1111/j.1445-5994.2011.02593.x.
37. Yockey CC, Riepe RE, Ryan K. Pulmonary lymphangioliomyomatosis complicated by pregnancy. *Kans Med* 1986; 87(10): 277–278, 293.
38. Yano S. Exacerbation of pulmonary lymphangioliomyomatosis by exogenous oestrogen used for infertility treatment. *Thorax* 2002; 57(12): 1085–1086. doi: 10.1136/thorax.57.12.1085.
39. Shen A, Iseman MD, Waldron JA et al. Exacerbation of pulmonary lymphangioliomyomatosis by exogenous estrogens. *Chest* 1987; 91(5): 782–785. doi: 10.1378/chest.91.5.782.
40. Taveira-Da Silva AM, Stylianou MP, Hedin CJ et al. Decline in lung function in patients with lymphangioliomyomatosis treated with or without progesterone. *Chest* 2004; 126(6): 1867–1874. doi: 10.1378/chest.126.6.1867.
41. Banner AS, Carrington CB, Emory WB et al. Efficacy of oophorectomy in lymphangioliomyomatosis and benign metastasizing leiomyoma. *N Engl J Med* 1981; 305(4): 204–209. doi: 10.1056/NEJM198107233050406.
42. Harari S, Cassandro R, Chiodini I et al. Effect of a gonadotrophin-releasing hormone analogue on lung function in lymphangioliomyomatosis. *Chest* 2008; 133(2): 448–454. doi: 10.1378/chest.07-2277.
43. McCormack FX, Inoue Y, Moss J et al. National Institutes of Health Rare Lung Diseases Consortium; MILES Trial Group. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioliomyomatosis. *N Engl J Med* 2011(17); 364: 1595–1606. doi: 10.1056/NEJMoa1100391.
44. Gao N, Zhang T, Ji J et al. The efficacy and adverse events of mTOR inhibitors in lymphangioliomyomatosis: systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis* 2018; 13(1): 134. doi: 10.1186/s13023-018-0874-7.
45. Bendeck MP, Conte M, Zhang M et al. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am J Pathol* 2002; 160(3): 1089–1095. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64929-2.
46. Chang WY, Cane JL, Kumaran M et al. A 2-year randomised placebo-controlled trial of doxycycline for lymphangioliomyomatosis. *Eur Respir J* 2014; 43(4): 1114–1123. doi: 10.1183/09031936.00167413.
47. Can V, Doubková M, Hanke I, Penka I. Lymfangioliomyomatóza z pohledu chirurga. Kazuistika v alergologii, pneumologii a ORL 2016; 13(2): 10–15.
48. Bittmann I, Dose TB, Muller C et al. Lymphangioliomyomatosis: recurrence after single-lung transplantation. *Hum Pathol* 1997; 26(12): 1420–1423. doi: 10.1016/s0046-8177(97)90233-1.
49. Zaki KS, Aryan Z, Mehta AC et al. Recurrence of lymphangioliomyomatosis: nine years after a bilateral lung transplantation. *World J Transplant* 2016; 6(1): 249–254. doi: 10.5500/wjtv6.i1.249.
50. Pechet TT, Meyers BF, Guthrie TJ et al. Lung transplantation for lymphangioliomyomatosis. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23(3): 301–308. doi: 10.1016/S1053-2498(03)00195-5.
51. Sakompani P, Kasemsam C, Yottasurodom C. Retransplantation after single lung transplantation. *Transplant Proc* 2008; 40(8): 2617–2619. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.07.120.
52. Taveira-DaSilva AM, Pacheco-Rodriguez G, Moss J. The natural history of lymphangioliomyomatosis: markers of severity, rate of progression and prognosis. *Lymphat Res Biol* 2010; 8(1): 9–19. doi: 10.1089/lrb.2009.0024.
53. Gupta N, Lee HS, Young LR et al. Analysis of the MILES cohort reveals determinants of disease progression and treatment response in lymphangioliomyomatosis. *Eur Respir J* 2019; 53(4): 1802066. doi: 10.1183/13993003.02066.2018.
54. Hayashida M, Seyama K, Inoue Y et al. The epidemiology of lymphangioliomyomatosis in Japan: a nationwide cross-sectional study of presenting features and prognostic factors. *Respirology* 2007; 12(4): 523–530. doi: 10.1111/j.1440-1843.2007.01101.x.

6.3. Diagnostika a léčba plicní formy histiocytózy z Langerhansových buněk (Doubková M, Adam Z, Doubek M, Horvát T, Pour L, Řehák Z, Koukalová R, Král Z. Stud Pneumol Phtiseol. 2020; 80(2): 70-75)

70

STUD. PNEUMOL. PHTHISEOL., 80, 2020, Č. 2, S. 70-75

Diagnostika a léčba plicní formy histiocytózy z Langerhansových buněk

M. Doubková¹, Z. Adam², M. Doubek², T. Horvát³, L. Pour², Z. Řehák⁴, R. Koukalová⁴, Z. Král²

¹Klinika nemocí plicních a TBC, LF MU a FN Brno;

²Interní hematologická a onkologická klinika, LF MU a FN Brno;

³Chirurgická klinika, LF MU a FN Brno;

⁴Oddělení nukleární medicíny, Masarykův onkologický ústav, Brno

SUMMARY

Diagnosis and treatment of pulmonary Langerhans cell histiocytosis

Pulmonary Langerhans cell histiocytosis is a rare disorder that occurs mainly in young smokers. It is characterized by proliferation and infiltration of Langerhans cells in the lungs. The etiology is unknown, but in some cases, mutations in the BRAF or NRAS, KRAS and MAP2K1 genes may be found. The disease may resolve spontaneously or require systemic corticosteroid or cytostatic drug therapy. The authors present their experience with the disease and also provide X-ray documentation.

Keywords: Langerhans cell histiocytosis, smoking, genes, cladribine, vinblastine

SOUHRN

Plicní forma histiocytózy z Langerhansových buněk je vzácné onemocnění, které se vyskytuje zejména u mladých kuřáků. Je charakterizována proliferací a infiltrací Langerhansových buněk v plicích. Etiologie je neznámá, ale v některých případech můžeme nalézt mutace genu BRAF nebo NRAS, KRAS a MAP2K1. Onemocnění může vést ke spontánní regresii, nebo je nutné nasazení léčby systémovými kortikosteroidy či cytostatiky. Autoři sdělí své zkušenosti s nemocí, včetně rentgenové dokumentace.

Klíčová slova: Langerhans cell histiocytosis, smoking, genes, cladribine, vinblastine

ÚVOD

Plicní forma histiocytózy z Langerhansových buněk (*Langerhans cell histiocytosis = LCH*) má svá specifika, a proto jí věnujeme samostatný text. Diagnostika plicní formy LCH je plně v rukou pneumologů, eventuálně ve spolupráci s hrudními chirurgy. Léčba pak někde zůstává v rukou plicních lékařů a jinde ji předávají hematologům-onkologům, podle lokálních zvyklostí. Vždy je však nutný spolupracující hrudní chirurg, který může provést diagnostickou biopsii plic a v případě nutnosti bude řešit spontánní pneumotoraxy. A proto tento text přináší společný pohled hematologů, plicních specialistů a hrudních chirurgů na diagnostiku a léčbu LCH.

U plicní formy LCH stojíme před otázkou, která se nevyskytuje u mimoplicní formy LCH: „**Je příčinou plicní formy LCH kouření, z cigaret či ne?**“ To ukáže jedině sledování. Vymizení potíží po absolutním ukončení kouření a při pečlivém vyhýbání se kuřáckým prostorám prokáže souvislost izolované plicní formy LCH s cigaretovým kouřem. Tyto formy, vyvolané cigaretovým kouřem, jsou totiž považovány za reaktivní, za atypickou imunitní reakci na cigaretový kouř. Pokud je plicní forma LCH aktivní i po eliminaci cigaretového kouře ze života nemocného, tak je obvykle zapříčiněna klonální (maligní) proliferací Langerhansových buněk [1].

PŘÍZNAKY PLICNÍ FORMY HISTIOCYTÓZY Z LANGERHANSOVÝCH BUNĚK

Langerhansova histiocytóza (LCH) je velmi divergentní onemocnění s variabilním průběhem. Buňky LCH jsou klonální, s výjimkou primární plicní formy LCH. LCH může postihnout kterýkoliv orgán či systém, nejčastěji však bývají postiženy kosti, kůže a hypofýza. Méně často jsou pak postiženy lymfatické uzliny, játra, slezina, střevo a hemopoetický systém. Plicce mohou být postiženy současně či následně při postižení jiných orgánů. U dospělých se však často vyskytuje izolovaná plicní forma (PLCH) a postižení plic může předcházet postižení dalších orgánů.

Primární pulmonální forma LCH postihuje převážně mladé osoby ve věkové skupině 20–40 let [2–4]. Prevalence případů plicní formy LCH tvoří kolem 5 % ze všech intersticiálních plicních chorob [1–4].

Plicní forma LCH, podobně jako jiné plicní choroby, se může projevit kašlem, který mimo komplikující bronchitidy je neproduktivní, dále dušností a dalšími nespecifickými potížemi – známkami závažné reakce organismu (úbytkem hmotnosti, nočním pocením a subfebriliemi či febriliemi s patologickou únavou). Infekce dolních dýchacích cest je typickou komplikací plicní formy LCH.

Opakované záněty plic jsou často příčinou zhoršení celkového stavu a jsou vždy indikací k intenzivní léčbě. Proto se také doporučuje vakcinace proti pneumokokovým infekcím a každoroční vakcinace proti chřipce [1–4].

Asi 20 % osob neudává žádné symptomy a prvním příznakem plicní formy LCH je spontánní pneumotorax [5–7]. Obzvláště při cestování letadlem je vyšší riziko vzniku spontánního pneumotoraxu, a proto by na to měli být upozorněni všichni pacienti s plicní formou LCH. V případě kašle a/nebo bolesti na hrudníku by pacienti s plicní formou LCH měli konzultovat před letem svého plicního specialistu a probrat míru rizika spontánního pneumotoraxu v letadle [8]. A naopak při každém spontánním pneumotoraxu by mělo být v rámci diferenciální diagnostiky pomýšeno i na možnost plicní formy LCH [9].

STANOVENÍ DIAGNÓZY

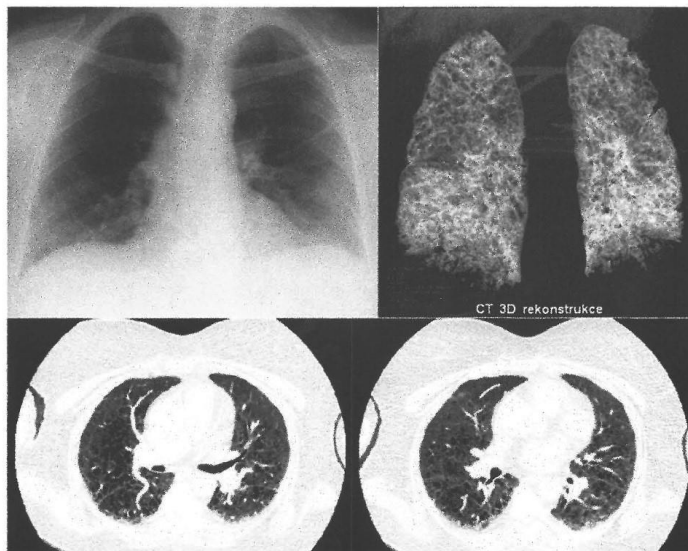
Zadopřední snímek hrudníku obvykle není velkým přínosem

pro diagnostiku plicní formy LCH, jak ilustruje obr. 1, i když retikulo-nodulární zastínění mohou být patrná. Výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností má zásadní význam pro diagnostiku, zvláště pokud je přítomna kombinace nodulů (s centrilobulární distribucí), nodulů s kavitací, které se postupně mění v tlustostěnné a posléze v tenkostěnné cysty. Změny postihují obě plicce, dominantně střední a horní plicní pole a chybí v kostofrenických oblastech [1,2]. S rozvojem nemoci přibývá cystických změn [10], jak ilustruje obrázek 2.

Vyšetření plicních funkcí často prokazuje sníženou difuzní kapacitu plic asi u 70–90 % vyšetřených. Obvykle je snižena vitální kapacita a zvýšený reziduální objem. Celková plicní kapacita tak může být v normě. U většiny pacientů pozorujeme obstrukční ventilační poruchu. Zcela vzácně se může objevit i restriktivní komponenta [11].

Při bronchoskopii bývá obvykle normální makroskopický nález. Bronchoalveolární laváž (výplach, BAL) obvykle provádíme z té části bronchiálního stromu, která ventiluje nejvíce postiženou část plic. Fibrobronchoskop se zavádí do segmentárního či subsegmentárního bronchu tak, aby byl vzduchotěsně zaklíněn a aby bylo optikou fibroskopu patrné další bronchiální větvení. Posléze provádíme aplikaci fyziologického roztoku (FR) opako-

Obrázek 1: Skiagram hrudníku pacientky s histiocytózou z Langerhansových buněk ukázal jen mírné změny typu retikulonodulací v dolních a středních plicních polích, zatímco HRCT hrudníku, zobrazení 3D rekonstrukce, prokázalo těžké postižení plicního parenchymu mnohočetnými cystami. Jednalo se o pokročilou formu plicní formy histiocytózy z Langerhansových buněk. Z archivu autorů.



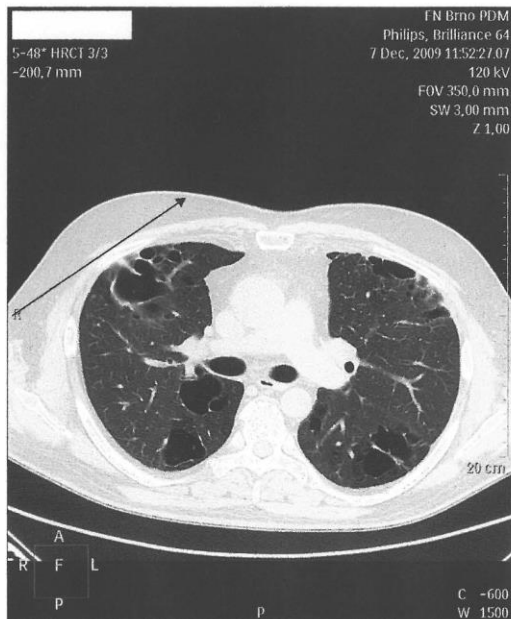
ivaně ve frakcích (20–50 ml, celkově 100–150 ml) a následně zpětně odsáváme. Množství aplikovaného FR se řídí především návratností tekutiny, která by neměla poklesnout pod 50 % (www.pneumologie – standardy, doporučení pro provádění BAL) [12]. V diferenciálním rozpočtu buněk z bronchoalveolární tekutiny (BAT) získané z BAL převládají u LCH alveolární makrofágy, což odráží expozici cigaretovému kouři. Nález Langerhansových buněk (LB), zjištěný imunohistochemicky pomocí monoklonálních protilátek, především proti CD1a (CD transmembránové znaky, zkratka cluster of differentiation; CD1a je glykoprotein exprimovaný na antigen prezentujících buňkách), může vést k diagnóze. Za „diagnostický“ považujeme zvýšený počet LB v BAT nad 5 % v korelaci s klinickým a radiologickým nálezem (kavitované noduly, tenkostěnné cysty, mladý silný kuřák). Tento test vykazuje vysokou specifitu, ale nízkou senzitivitu, proto samotný průkaz LB v BAT diagnózu nedělá [13]. Kromě CD1a jsou dalšími diagnostickými markery LB zjistitelné imunohistochemicky: protein S100, langerin (CD207; receptor na Langerhansových buňkách), Birbeckova granula.

Za standardní diagnostickou metodu volby se proto stále považuje plicní biopsie, kde místo odběru je určeno podle HRCT nálezu. U asymptomatických pacientů s makrofágovou alveolitidou a ty-

pickým nálezem na HRCT hrudníku (viz. výše), se považuje průkaz CD1a+ LB v BAT za dostatečnou metodu [12,13,14]. V případě, kdy nález z BAL není diagnostický a dle HRCT hrudníku je podezření na plicní formu LCH, je indikována plicní biopsie (transbronchiální, chirurgická plicní biopsie). U pacientů s velkými cystickými ložisky je nutno zvážit riziko a přínos plicní biopsie. Výhodou plicní biopsie je možnost získat reprezentativní vzorek plicní tkáně s histologickým průkazem granulomu, LB a typických mutací genu *BRAF* (gen kódující proteinkinázu B-raf) nebo *NRAS* (homolog RAS virového onkogenu neuroblastomu, kóduje proteinkinázu N-Ras), *KRAS* (homolog V-KI-RAS2 virového onkogenu sarkomu potkanů, kóduje proteinkinázu K-Ras) a *MAP2K1* genu (mitogeny aktivovaná proteinkinázová kináza 1), jejichž průkaz otevře cestu do budoucna pro biologickou léčbu [15–19]. U 25 % až 65 % případů LCH je nalézána patogenetická varianta *BRAF* V600E. Protein BRAF hraje důležitou roli v MAPK signální dráze. Tato dráha ovlivňuje tvorbu transkripčních faktorů důležitých pro buněčný růst a proliferaci. Mutace *BRAF* V600E je spouštěcí mutací i řady jiných nádorových nemocí – melanom, leukemie z vlasatých buněk a další [15–19].

Diferenciálně diagnosticky je nutné odlišit jiné granulomatózní procesy a v případě pokročilých forem i jiné fibrotizující intersticiální plicní procesy.

Obrázek 2: HRCT hrudníku a splývající silnostěnné cysty v konglomeráty, které byly důvodem opakovaných pneumotoraxů. Z archivu autorů.



LÉČBA PLICNÍ FORMY LCH

Prognózu izolované formy LCH není možné v době stanovení diagnózy dostupnými metodami stanovit. Asi u 40–50 % pacientů dojde k parciálnímu či úplnému vymizení abnormalit na HRCT vyšetření bez terapeutického zásahu. Spontánní vymizení plicní formy se však popisuje pouze v souvislosti s ukončením kouření, vyléčením závislosti na cigaretovém kouři [1,18]. Obrázek 3 ukazuje regresí nálezu u mladé silné kuřáčky (abusus 20 cigaret denně po dobu 20 let) po zanechání kouření.

Pacienty je potřeba komplexně sledovat, včetně funkčních plicních vyšetření, a myslet na možnost rozvoje plicní hypertenze.

Pokud vyloučení cigaretového kouře ze života pacienta s plicní formou nevede k regresí v průběhu několika měsíců, pokud je nemoc stále aktivní a jsou zřetelné nové plicní noduly na HRCT hrudníku, pokud dochází k progresí plicních funkčních ukazatelů v čase, pak je nutno zvážit medikamentózní léčbu.

Za léčbu první linie u primární plicní formy LCH se stále považují glukokortikosteroidy. Jejich účinnost je sice popisována, ale nebyla prokázána klinickými studiemi. Za standardní se považuje podávání prednisonu v dávce 1 mg/kg/den po dobu 1 měsíce, s následující redukcí dávky v průběhu několika dalších měsíců [21].

Onemocnění refrakterní k léčbě prednisonem, nebo při intoleranci dlouhodobého podávání prednisonu, je pak indikováno, stejně jako u multisystémové formy, k léčbě 2-chlordeoxyadenosinemem, synonymem kladribinemem. Lék se podává v dávce 5 mg/m² ve formě podkožní injekce, 5 dní po sobě v 4–5 týdenních intervalech. Obvykle se podávají 4 cykly [22–25]. Ale i použití vinblastinu je přínosné dle klinické studie u těchto pacientů [26].

U pacientů s plicní formou LCH je třeba řešit opakované spontánní pneumotoraxy hrudními drenážemi nebo s pomocí pleurodéz (iatrogenní srůst viscerální a parietální pleury za účelem snížení rizika pneumotoraxu, například chirurgickým ošetřením) [27].

Při průkazu odpovídajících cytogenetických změn lze použít i nové léky (inhibitory BRAF nebo MAPK) [28].

Transplantace plic je řešení pouze pro pacienty s respirační a ventilační insuficiencí anebo s pokročilou plicní hypertenzí. Recidiva plicní formy LCH je popisována u 20 % nemocných po provedení transplantace plic [29–31].

Pokud se v souvislosti s LCH prokáže plicní hypertenze, je to indikace k specifické vazodilatační léčbě [32–35].

SLEDOVÁNÍ PO LÉČBĚ

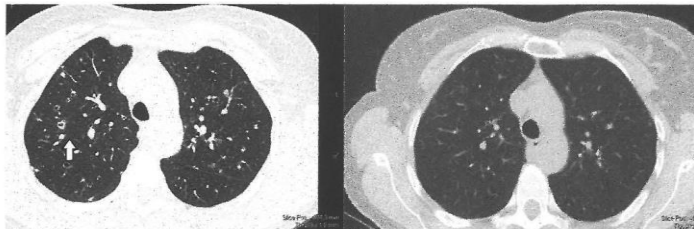
LCH může přejít do chronického stadia, ale může také recidivovat i po dosažení remise nemoci. Proto pacienty po ukončené léčbě je třeba sledovat. A protože LCH je také spojena s vyšším rizikem dalších malignit ve srovnání s průměrnou populací, je cílem kontrol jak včasné podchycení recidivy této nemoci, tak i časná diagnostika jiných maligních onemocnění [36,37].

Po ukončení léčby by měla první kontrola následovat ve 2–3 měsíčních intervalech. Posléze lze intervaly kontrol protáhnout na 3–12 měsíců.

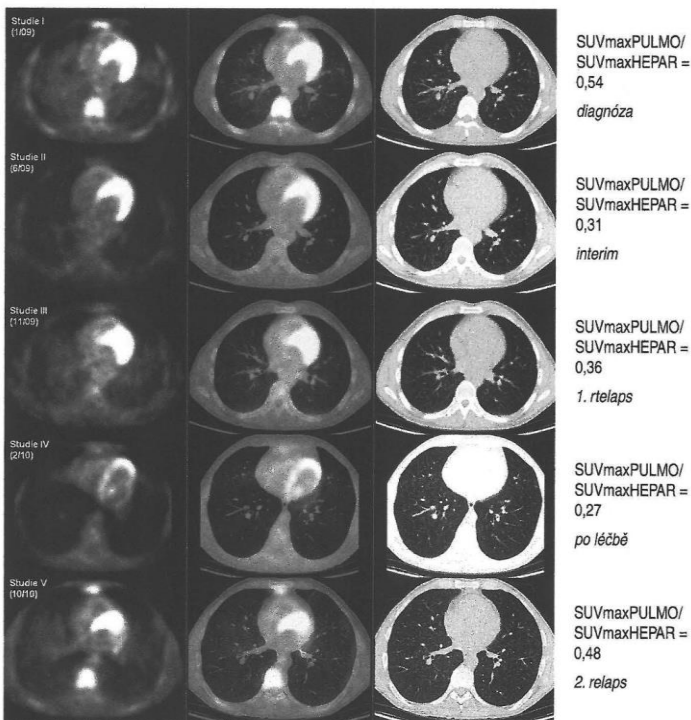
Metody pro sledování plicní formy LCH jsou limitované. Vhodné

je opakovaně provádět v rámci kontrol komplexní funkční plicní vyšetření, včetně plicní difuze. Pro

Obrázek 3: HRCT hrudníku u ženy kuřačky v době stanovení diagnózy a po zanechání kouření, s regresí nálezů cystoidních ložisek a kavitujičích cyst (viz šipka). Z archivu autorů.



Obrázek 4: Korelace PET-CT plic, HRCT hrudníku a poměru $SUV_{max}^{pulmo}/SUV_{max}^{hepar}$ po 4 cyklech léčby 2-chlordeoxyadenosinemem, dále v době relapsu nemoci a po dvou cyklech léčby relapsu režimem CHOEP (cyklofosamid, etoposid, adriamycin, vinkristin a prednison). Uvedený poměr koreloval s aktivitou nemoci. V čitateli je akumulace plicní – ta by měla být u zdravé plicce co nejnižší, optimálně pod 1,0; ve jmenovateli se hodnotí játra – tam se čeká kolem 3,0; takže optimálně pro zdravé plicce je poměr pod 0,3. Jakýkoliv intersticiální plicní proces by mohl vést k podobným výsledkům jako u LCH, ale pro sledování aktivity onemocnění u jednoho pacienta lze této metody využít. Z archivu autorů.



detekci nových nodulů je nutné HRCT zobrazení, jak ilustruje obr. 1.

Přínosné se jeví FDG- PET/CT zobrazení s metodou měření difúzní aktivity definovaného objemu plicního parenchymu a její vyjadřování jak ve formě SUV_{max} , ale také ve formě poměru SUV_{max} pulmo : SUV_{max} hepar. A právě tento poměr difúzní aktivity v definovaném objemu plice k aktivitě v definovaném objemu v játrech umožňuje i dlouhodobé sledování těchto pacientů. U našich pacientů jsme tuto metodu sledování opakovaně použili a korelovala s klinickým průběhem [38,39]. Obrázek 4 ilustruje použití této metody sledování aktivity LCH v plicním parenchymu pomocí FDG-PET/CT. Zobrazení pomocí HRCT hrudníku sice ukáže také velmi dobře plicní noduly, ale vyhodnocování, zda nodulů přibýlo, či ubylo na HRCT obraze, je velmi obtížné a zdlouhavé a vyžaduje nadstandardní nasazení lékaře, který vyhodnocuje HRCT hrudníku. Ložiska LCH poměrně dobře vychytávají fluorodeoxyglukózu, a proto je FDG-PET/CT poměrně často používáno pro sledování osob s LCH [40–46].

ZÁVĚRY PRO PRAXI

- Plicní forma histiocytózy z Langerhansových buněk je vzácné onemocnění, na něž je nutné myslet při diferenciální diagnostice intersticiálního plicního postižení.
 - Diagnostika plicní formy LCH je dominantně histologická, ale ta vyžaduje odběr plicní tkáně. Flow-cytometrický (imunohistochemicky) průkaz CD1a pozitivních buněk v bronchoalveolární laváži nad 5 % je pro tuto nemoc také diagnostický, pokud koreluje s klinikou a radiologickým nálezem.
 - Po průkazu plicní formy LCH je vždy zásadní zodpovědět otázku, zda plicní postižení je izolované, či je součástí multiorgánové formy nemoci.
 - V případě izolovaného postižení plice je vždy nutno otestovat souvislost s vdechováním cigaretového kouře. U některých osob je plicní forma LCH reaktivní proces, který spontánně regreduje po ukončení expozice kouřem. Někdy však může jít o klonální proces, který neregreduje, a je nutná další systémová léčba.
 - Při neúčinnosti eliminace cigaretového kouře se testuje prednison, i když jeho efekt není potvrzen klinickou studií. V případně neúčinnosti prednisonu je lékem volby kladribin. Dříve to byl vinblastin, který ale u dospělých je spojen s četnými nežádoucími účinky.
 - V případně prokázané mutace genu BRAF V600E je možné po schválení plátcem zdravotní péče otestovat biologickou léčbu vemurafenibem, či další alternativy biologické léčby dle prokázané mutace.
- Pacienty s LCH je nutno sledovat s cílem průkazu recidivy v plicích či mimo plice, ale také sledovat, zda nevznikají případně jiné malignity, protože riziko vzniku další malignity je vyšší než v průměrné populaci.

Publikace vznikla za institucionální podpory MZ ČR RVO (FNBR, 65269705, MOÚ, 00209805).

LITERATURA

1. Doubková M, Tomášková M, Skříčková J. Plicní histiocytóza z Langerhansových buněk – nemoc kuřáků. *Stud Pneumol Phthiseol* 2014; 74:158–161.
2. Tazi A. Adult pulmonary Langerhans' cell histiocytosis. *Eur Respir J* 2006; 27:1272–1285.
3. Watanabe R, Tatsumi K, Hashimoto S, et al. Clinicopathological features of pulmonary histiocytosis X. *Intern Med* 2001; 40:998–1003.
4. Vassallo R, Ryu JH, Schroeder DR, et al. Clinical outcomes of pulmonary Langerhans' cell histiocytosis in adults. *N Engl J Med* 2002; 346:484–490.
5. Radzikowska E. Pulmonary Langerhans' cell histiocytosis in adults. *Adv Respir Med* 2017; 85:277–289.
6. DeMartino E, Go RS, Vassallo R. Langerhans Cell Histiocytosis and Other Histiocytic Diseases of the Lung. *Clin Chest Med* 2016; 37:421–30.
7. Radzikowska E, Blasińska-Przerwa K, Wiatr E, et al. Pneumothorax in Patients with Pulmonary Langerhans Cell Histiocytosis. *Lung* 2018; 196:715–720.
8. Wajda N, Gupta N. Air Travel-Related Spontaneous Pneumothorax in Diffuse Cystic Lung Diseases. *Curr Pulmonol Rep* 2018; 7:56–62.
9. Cooley J, Lee YCG, Gupta N. Spontaneous pneumothorax in diffuse cystic lung diseases. *Curr Opin Pulm Med* 2017; 23:323–333.
10. Stone S, Lynch D. National Jewish Health classical pulmonary radiology case reports: imaging features of Langerhans cell histiocytosis. *QJM* 2018; 111:739–740.
11. Tazi A, Marc K, Dominique S, et al. Serial CT and lung function testing in pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Eur Respir J* 2012; 40:905–912.
12. Skříčková J, Kolaříková R. Standardní postup při provádění bronchoalveolární laváže (BAL) a vyšetřování bronchoalveolární tekutiny (BAT). <http://www.pneumologie.cz/guidelines>. Navštíveno dne 12. 12. 2019.
13. Auerswald U, Barth J, Magnussen H. Value of CD-1-positive cells in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of pulmonary histiocytosis X. *Lung* 1991; 169:305–309.
14. Lommatzsch M, Bratke K, Stoll P, et al. Bronchoalveolar lavage for the diagnosis of Pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Respir Med* 2016; 119:168–174.
15. Pierry C, Caumont C, Blanchard E, et al. Assessment of BRAF(V600E) mutation in pulmonary Langerhans cell histiocytosis in tissue biopsies and bronchoalveolar lavages by droplet digital polymerase chain reaction. *Virchows Arch*. 2018; 472:247–258.
16. Héritier S, Emile JF, Barkaoui MA, et al. BRAF Mutation Correlates With High-Risk Langerhans Cell Histiocytosis and Increased Resistance to First-Line Therapy. *J Clin Oncol* 2016; 34:3023–3030.
17. Mourah S, How-Kit A, Meignin V, et al. Recurrent NRAS mutations in pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Eur Respir J* 2016; 47:1785–1796.
18. Alayed K, Medeiros LJ, Patel KP, et al. BRAF and MAP2K1 mutations in Langerhans cell histiocytosis: a study of 50 cases. *Hum Pathol* 2016; 52:61–67.

19. Roden AC, Yi ES. Pulmonary Langerhans Cell Histiocytosis: An Update From the Pathologists' Perspective. *Arch Pathol Lab Med* 2016; 140:230-240.
20. Vassallo R, Harari S, Tazi A. Current understanding and management of pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Thorax* 2017; 72:937-945.
21. Kumar A, Cherian SV, Vassallo R, Yi ES, Ryu JH. Current Concepts in Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Smoking-Related Interstitial Lung Diseases. *Chest* 2018; 154:394-408.
22. Lazor R, Etienne-Mastroianni B, Khouatra C, et al. Progressive diffuse pulmonary Langerhans cell histiocytosis improved by cladribine chemotherapy. *Thorax* 2009; 64:274-275.
23. Lorillon G, Bergeron A, Detourmignies L. Cladribine is effective against cystic pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186:930-932.
24. Lorillon G, Tazi A. How I manage pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Eur Respir Rev* 2017; 26(145). pii: 170070. doi: 10.1183/16000617.0070-2017.
25. Nasser M, Tracllet J, Cottin V. Effect of cladribine therapy on lung cysts in pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *ERJ Open Res* 2018; 4(1). pii: 00089-2017.
26. Tazi A, Lorillon G, Haroche J, et al. Vinblastine chemotherapy in adult patients with langerhans cell histiocytosis: a multicenter retrospective study. *Orphanet J Rare Dis* 2017; 12:95. doi: 10.1186/s13023-017-0651-1.
27. Mendez JL, Nadrous HF, Vassallo R, Decker PA, et al. Pneumothorax in pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Chest* 2004; 125:1028-1032.
28. Lorillon G, Jouenne F, Baroudjian B, et al. Response to Trametinib of a Pulmonary Langerhans Cell Histiocytosis Harboring a MAP2K1 Deletion. *Am J Respir Crit Care Med* 2018; 198:675-678.
29. Dauriat G, Mal H, Thabut G. Lung transplantation for pulmonary langerhans' cell histiocytosis: a multicenter analysis. *Transplantation* 2006; 81:746-750.
30. Wajda N, Zhu Z, Jandarov R, Dilling DF, Gupta N. Clinical outcomes and survival following lung transplantation in patients with pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Respirology* 2019; doi: 10.1111/resp.13671. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31407478.
31. Gómez-Román J, Zarrabeitia MT, Santurtún A, et al. Pulmonary Langerhans cell histiocytosis „de novo“ after lung transplantation. *Pathol Int* 2017; 67:632-637.
32. Karampitsakos T, Tzouveleki A, Chrysikos S, et al. Pulmonary hypertension in patients with interstitial lung disease. *Pulm Pharmacol Ther* 2018; 50:38-46.
33. Nemoto K, Oh-Ishi S, Inui T, et al. Long-term improvement during tadalafil therapy in a patient with pulmonary hypertension secondary to pulmonary Langerhans cell histiocytosis. *Respir Med Case Rep* 2016; 25:54-57.
34. May A, Kane G, Yi E, Frantz R, et al. Dramatic and sustained responsiveness of pulmonary Langerhans cell histiocytosis-associated pulmonary hypertension to vasodilator therapy. *Respir Med Case Rep* 2014; 14:13-15.
35. Kinoshita Y, Watanabe K, Sakamoto A, et al. Pulmonary Langerhans Cell Histiocytosis-associated Pulmonary Hypertension Showing a Drastic Improvement Following Smoking Cessation. *Intern Med* 2016; 55:491-495.
36. Madan R, Matalon S, Vivero M. Spectrum of Smoking-related Lung Diseases: Imaging Review and Update. *J Thorac Imaging* 2016; 31:78-91.
37. Tazi A, de Margerie C, Naccache JM, et al. The natural history of adult pulmonary Langerhans cell histiocytosis: a prospective multicentre study. *Orphanet J Rare Dis* 2015; 10:30. doi: 10.1186/s13023-015-0249-2.
38. Szturz P, Řehák Z, Koukalová R. Measuring diffuse metabolic activity on FDG-PET/CT: new method for evaluating Langerhans cell histiocytosis activity in pulmonary parenchyma. *Nucl Med Biol* 2012; 39:429-436.
39. Adam Z, Řehák Z, Koukalová R, et al. Pulmonary Langerhans cell histiocytosis-evaluation of the disease activity and treatment response using PET-CT (SUV(max) Pulmo/SUV(max) Hepar index). Description of own experience and literature review. *Vnitř Léč* 2010; 56:1228-1250.
40. Prabhu M, Raju S, Chakraborty D, et al. Spectrum of 18F-FDG Uptake in Bilateral Lung Parenchymal Diseases on PET/CT. *Clin Nucl Med*. 2019 Sep 12. doi: 10.1097/RLU.0000000000002758. [Epub ahead of print]
41. Albano D, Bosio G, Giubbini R, Bertagna F. Role of (18)F-FDG PET/CT in patients affected by Langerhans cell histiocytosis. *Jpn J Radiol* 2017; 35:574-583.
42. Garcia JR, Riera E, Bassa P, et al. (18)F-FDG PET/CT in follow-up evaluation in pediatric patients with Langerhans histiocytosis. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol* 2017; 36:325-328.
43. Obert J, Vercellino L, Van Der Gucht A, et al. (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography in the management of adult multisystem Langerhans cell histiocytosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017; 44:598-610.
44. Agarwal KK, Seth R, Behra A, et al. 18F-Fluorodeoxyglucose PET/CT in Langerhans cell histiocytosis: spectrum of manifestations. *Jpn J Radiol* 2016; 34:267-276.
45. Hansen NJ, Hankins JH. Pulmonary langerhans cell histiocytosis: PET/CT for initial workup and treatment response evaluation. *Clin Nucl Med* 2015; 40:153-155.
46. Lee HJ, Ahn BC, Lee SW, Lee J. The usefulness of F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in patients with Langerhans cell histiocytosis. *Ann Nucl Med* 2012; 26:730-737.

Došlo: 16. 12. 2019

Adresa:

MUDr. Martina Doubková, Ph. D.
 Klinika nemocí plicních a tuberkulózy
 FN Brno, pracoviště Bohunice
 Jihlavská 20
 625 00 Brno
 Česká republika
 e-mail: doubkovamartina@seznam.cz

6.4. Autoprotilátky u systémových onemocnění pojiva a ANCA asociovaných vaskulitid, jejich vztah k intersticiálním plicním procesům a prognóze (Doubková M, Pokorná J. Vnitř Lék. 2017; 63(2): 98-106)

98 | přehledné referáty

Autoprotilátky u systémových onemocnění pojiva a ANCA asociovaných vaskulitid, jejich vztah k intersticiálním plicním procesům a prognóze

Martina Doubková¹, Jana Pokorná²

¹Klinika nemocí plicních a tuberkulózy LF MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

²Laboratoř autoimunitní diagnostiky Dermatovenerologického oddělení LF MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

Souhrn

Plicní postižení včetně intersticiálního plicního postižení (IPP) jsou častou komplikací systémových onemocnění pojiva (SOP) a ANCA asociovaných vaskulitid (AAV – antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis). Plicní komplikace jsou prognostickým faktorem SOP a vaskulitid. Vyšetření autoprotilátek je součástí diferenciativního diagnostického algoritmu plicních onemocnění. Jejich význam je převážně klinicko-diagnostický. Pomocí některých autoprotilátek, zejména u SOP, je možné se vyjádřit k prognóze plicní nemoci.

Klíčová slova: autoprotilátky – intersticiální plicní procesy – prognóza – systémové onemocnění pojiva – vaskulitidy

Autoantibodies in systemic connective tissue disease and ANCA-associated vasculitis, their relationship to interstitial lung diseases and prognosis

Summary

Lung disease, including interstitial lung disease (ILD), is a frequent complication of systemic connective tissue disorders (CTD) and ANCA (anti-neutrophil cytoplasmic antibody) associated vasculitis (AAV). Pulmonary manifestations are prognostic factor of CTDs and vasculitis. Autoantibodies assessment is a part of differential diagnosis algorithm of lung diseases. Autoantibodies importance is mainly clinical-diagnostic. Using detection of some autoantibodies it is possible to determine prognosis of lung involvement, especially in CTDs.

Key words: autoantibodies – connective tissue disease – interstitial lung diseases – prognosis – vasculitis

Úvod

Plicní postižení včetně intersticiálního plicního postižení (IPP) jsou častou komplikací systémových onemocnění pojiva (SOP) a ANCA asociovaných vaskulitid (AAV – antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis). Obsahem práce je klinický a prognostický význam autoprotilátek u SOP a ANCA vaskulitid ve vztahu k plicnímu nálezu, zejména intersticiálnímu plicnímu postižení.

I. Autoprotilátky u systémových onemocnění pojiva

Systémová onemocnění pojiva (SOP), starším názvem kolagenózy, jsou heterogenní skupina imunologicky podmíněných zánětlivých onemocnění projevujících se multiorganovým postižením [1]. U pacientů se SOP bývá postižena jakákoliv část respiračního ústrojí: dýchací cesty (bronchiektázie, bronchiolitidy), pleura, plicní parenchym

(intersticiální plicní postižení – IPP, difúzní alveolární krvácení, aspirační pneumonie, pneumonie/oportunní infekce, malignity), plicní cévní řečiště, dýchací svaly (bránice). IPP jsou heterogenní skupina převážně chronických nenádorových a neinfekčních onemocnění alveolů a intersticia. Fenotypy postižení plicního intersticia jsou pro dané SOP nespecifické a obvykle kopírují fenotypy idiopatických intersticiálních pneumonií (IIP). IIP jsou skupinou akutních, subakutních a chronických intersticiálních plicních nemocí charakterizovaných různým stupněm zánětu a různým stupněm plicní fibrózy [2,3]. Postižení plicního intersticia v rámci SOP je nejčastěji přítomno u systémové sklerodermie (SSc), revmatoidní artritidy (RA), polymyozitidy/dermatomyozitidy (PM/DM), Sjögrenova syndromu (SS), systémového lupus erythematos (SLE), smíšených chorob pojiva (mixed connective tissue disease – MCTD), nediferencovaných SOP [1]. Frekvence výskytu IPP u SOP,

klinický obraz, prognóza a odpověď na léčbu závisí na histopatologickém obrazu (akutní intersticiální pneumonie – AIP, běžná intersticiální pneumonie – UIP, nespecifická intersticiální pneumonie – NSIP, lymfocytární intersticiální pneumonie – LIP, obliterující bronchiolitida s organizující se pneumonií – BOOP/OP, deskvamativní intersticiální pneumonie – DIP, difúzní alveolární hemoragie – DAH, granulomatózní plicní postižení, fibrobulozní postižení a syndrom kombinované fibrózy a emfyzému – CPFE – combined pulmonary fibrosis and emphysema) a na typu SOP [4].

Autoprotilátky u SOP vznikají proti vlastním orgánovým strukturám. Proces jejich vzniku může být vyvolán modifikací vlastních struktur např. zánětem, který vede ke ztrátě imunologické tolerance. Přítomnost anti-topoizomerázy I (anti-Scl-70) u SSc je spojována s vývojem IPP a je častějším nálezem u pacientů s difúzním kožním postižením, nekoreluje však s tíží fibrózy [5–7]. Centromerové protilátky jsou častěji spojeny s limitovanou kožní sklerodermií a plicním vaskulárním onemocněním (plicní arteriální hypertenze) a nebývají většinou spojovány s těžkou intersticiální plicní fibrózou [6]. Výskyt IPP – PM/DM bývá přítomen u 73 % nemocných s pozitivitou anti-histidyl-tRNA syntetázy (anti-Jo-1) [8]. Přítomnost protilátek anti-Jo-1 u nemocných s PM/DM znamená vyšší riziko IPP v rámci antisyntetázového syndromu [8].

Patogenetický význam autoprotilátek u SOP

Jich etiopatogenetický význam není plně objasněn. Základním mechanismem vzniku plicního postižení u SOP je pravděpodobně autoimunitní reakce, která

vede k tvorbě autoprotilátek zaměřených proti vlastním strukturám tělesných tkání se vznikem imunokomplexů. Není to ale jen mechanismus imunokomplexů podílejících se na vzniku plicního postižení u SOP, protilátkami navozená cytotoxicita a buněčný typ přecitlivělosti se rovněž účastní na rozvoji plicního postižení u SOP [8]. Pod vlivem cytokinů, prozánětlivých a fibroproliferativních, může docházet i k nakupení a proliferaci fibroblastů a k rozvoji plicní fibrózy [9,10].

Laboratorní diagnostika – detekce autoprotilátek a jejich prognostický význam u SOP

Imunologická vyšetření zahrnují průkaz **antinukleárních protilátek** (ANA) s různými typy fluorescence (homogenní, granulární, nukleolární, centromery aj) a další typizaci antinukleárních protilátek (proti dvouvláknové jaderné deoxyribonukleové kyselině **ds-DNA**, proti nukleozomům a histonům) a proti extrahovatelným jaderným antigenům **ENA** [anti-SS-A (Ro), anti-SS-B (La), anti-Sm, ribonukleoproteinu U1-RNP, anti-DNA-topoizomeráze Scl-70, anti-histidyl-tRNA syntetázy]. Dále vyšetřujeme přítomnost **revmatoidního faktoru** (RF), protilátky proti **cyklickému citrulinovému peptidu** anti-CCP, anti-Mi-2, „lupus antikoagulans“, **antifosfolipidové protilátky**. Některé autoprotilátky jsou vysoce specifické a jsou součástí diagnostických kritérií. Základní panel vyšetřovaných autoprotilátek u SOP a detekovatelné protilátky u jednotlivých SOP uvádí **tab. 1** a **tab. 2**.

Tab. 1. Základní panel vyšetřovaných autoprotilátek u podezření na systémové onemocnění pojiva

ANA (obligátně IF a ELISA metody), ev. imunoblot
ENA screening a typizace (ELISA alespoň na tyto Ag: SSA, SSB, Scl-70, RNP, Sm, Jo-1, ev. imunoblot
anti-dsDNA (IF, ELISA), ev. imunoblot
RF IgM kvantitativně a další izotypy (ELISA, resp. jiné techniky), anti-CCP (ELISA)
stanovení c-ANCA a p-ANCA pro diagnostiku vaskulitid (IF a ELISA metody), event. imunoblot
antifosfolipidové protilátky (APLA)
▪ screening protilátek IgG (ELISA) proti APLA
▪ s následnou (ELISA) typizací pozitivních sér proti monospecifickým antigenům
▫ ACLA (anti-kardiolipin)
▫ Aβ2GP1 (anti-β2 glykoprotein1)
v jednotlivých izotypech Ig
stanovení orgánově specifických protilátek metodami IF a dalšími imunoanalytickými technikami

ANA – antinuclear antibodies APLA – antiphospholipid antibodies CCP – cyclic citrullinated protein dsDNA – double-stranded DNA ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay ENA – anti-extractable nuclear antigens IF – immunofluorescence Jo-1 – histidyl-tRNA synthetase RF – rheumatoid factor Scl-70 – topoisomerase I SSA, anti SSB (Ro, La) – Sjögren's syndrome related antigen A, B U1-RNP – ribonucleoprotein

Tab. 2. Detekovatelné autoprotilátky u systémových onemocnění pojiva. Upraveno podle [11]

systémové onemocnění pojiva	detekovatelné autoprotilátky
systémová sklerodermie	ANA, anti-topoizomeráza I (Scl70), anti-centromera, RF
revmatoidní artritida	ANA, RF, anti-CCP
polymyozitida/ dermatomyozitida	ANA, anti-aminoacyl-tRNA (anti-histidyl Jo-1, anti-PL7, anti-PL12), anti-MDA5, anti-PM-Scl, anti-Mi-2
systémový lupus erythematoses	ANA, anti-dsDNA, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Sm, protilátky proti fosfolipidům (APLA) největší diagnostický význam má anti-dsDNA
Sjögrenův syndrom	ANA, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, RF
smíšené onemocnění pojiva	ANA, anti-U1-RNP, RF, anti-CCP
nediferencované onemocnění pojiva	ANA, RF, anti-Scl-70, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-Jo-1, anti-U1-RNP

ANA – antinuclear antibodies CCP – cyclic citrullinated protein dsDNA – double-stranded DNA Jo-1 – histidyl-tRNA synthetase MDA5 – melanoma differentiation-associated protein MI-2 – nuclear antigen (a component of the nucleosome of remodeling deacetylase complex (NuRD) PM-Scl – antibodies associated with polymyositis and systemic sclerosis RF – rheumatoid factor Scl-70 – topoisomerase I SS-A, SS-B (Ro, La) – Sjögren's syndrome related antigen A, B U1-RNP – nuclear ribonucleoprotein

Systémový lupus erythematoses (SLE)

Více než 100 autoprotilátek může být nalezeno u SLE [11]. Protilátky ds-DNA a anti-Smith antigen jsou specifické pro SLE [11,12]. Korelace plicního postižení se žádnou z autoprotilátek nebyla prokázána, i když v jedné studii byl popsán vztah anti-SS-A a chronické intersticiální pneumonitidy a U1-RNP a IPP [11,13,14].

Revmatoidní artritida (RA)

Nalézáme pozitivitu RF, ACPA – protilátky proti citrulinovým peptidům (anticyclic citrullinated peptide anti-CCP, antimutated citrullinated vimentin anti-MCV, fibrinogen), anti-hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins antibodies). RF a anti-CCP byly prediktorem plicního postižení u RA, včetně IPP [11,15].

Sjögrenův syndrom (SS)

Nacházíme pozitivitu anti-Ro (anti-SS-A) (antiSjögren's syndrome related antigen A) a anti-La (anti-SS-B). Obě autoprotilátky jsou prediktory plicního postižení [11,16,17].

Systémová sklerodermie (SSc)

Anti-topoizomeráza I (anti-Scl-70) je asociována s plicní fibrózou. Přítomnost Scl-70 značí horší prognózu a ve 20–65 % se vyvine difuzní forma onemocnění. Protilátky proti centromerám se vyskytují u CREST syndromu (C – kalcinóza, R – Raynaudův fenomén, E – porucha motility ezofagu, S – sklerodaktylie, T – teleangiektazie) u 60–80 % a jsou spojeny s plicní hypertenzí a jen vzácně s IPP [7,11]. Anti-RNP (ribonucleoproteins antibodies): anti-U11/U12 RNP mají vztah k IPP [11,18]. AECA (antiendothelial cell antibodies) se mohou vázat na fibroblasty a podílet se na vzniku fibrózy [11,19].

Dermatomyozitida/polymyozitida (DM/PM)

Anti-aminoacyl-tRNA syntetázy (anti-ARS) jsou detekovány u PM/DM a korelují s přítomností IPP [11,20,21]. Mezi anti-aminoacyl-tRNA syntetázy patří: anti-Jo-1 (histidyl-tRNA syntetáza), anti-threonyl (anti-PL7), anti-PL7, anti-PL12, anti-EJ, anti-OJ, anti-KS a jiné t-RNA syntetázy. Přítomnost anti-SRP (anti-signal recognition particle): anti-7SL RNA znamená obecně špatnou prognózu a tyto pacienti mají nejkratší přežití [20]. Pacienti s anti-Mi-2 jsou z hlediska mortality na stejné úrovni, jako ti bez přítomnosti této autoprotilátky [21]. Antisyntetázový syndrom je kombinací myozitidy, artritidy, intersticiálního plicního procesu, Raynaudova fenoménu, „prstů mechanika“, horečky a positivity některé z antisyntetázových autoprotilátek [22]. IPP je častěji přítomno u pacientů s pozitivitou anti-Jo-1, anti-PL12, anti-KS. U nemocných s pozitivitou anti-PL7 nebyla popsána asociace s rozvojem rychle zhoršujícího se IPP [23]. Anti-MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) mají ze všech autoprotilátek nejintimnější asociaci s rapidně progredujícím plicním postižením intersticia u dermatomyozitidy, respektive především u amyopatické dermatomyozitidy [24,25]. V 10–15 % případů může být DM/PM projevem paraneo-

plastického syndromu (karcinom ovaríí, plic, kolorektálního karcinomu). Přítomnost anti-TIF-1 (transcriptional intermediary factor 1) je asociována v 50 % s tumorem [26].

Směšené onemocnění pojiva

MCTD (Mixed Connective Tissue Disease) je kombinací SLE/SSc/PM. Pozitivita anti-U1-RNP a anti-SS-A (anti-Ro52) má vztah k IPP [27].

Diferenciální diagnostika IPP a SOP

Udává se, že 15–20 % pacientů s chronickou IPP může mít frustrní (plně nevyjádřenou) formu SOP nebo se může SOP následně plně vyvinout [8]. Homma et al sledovali 68 nemocných s IPP po dobu 1–11 let. U 13 nemocných (19 %) v průběhu sledování došlo k vývoji SOP [28]. Nediferencovaná onemocnění pojiva mají rysy několika SOP, ale nespĺňují kritéria jednotlivých SLE, SSc, PM/DM, SS (tab. 3). Překryvné syndromy splňují kritéria 2 nebo více SOP [11,29,30]. Intersticiální pneumonie s autoimunitními rysy (interstitial pneumonitis with autoimmune features – IPAF) zahrnují jak pacienty s IPP při nediferencovaném onemocnění pojiva, tak skupinu nemocných s IPP, kteří nespĺňují diagnostická kritéria systémové choroby pojiva, a přesto vykazují známky autoimunitního onemocnění [31].

Tab. 3. Diagnostická kritéria nediferencovaného onemocnění pojiva. Diagnostika vyžaduje 1 nebo více příznaků ze skupiny A + 1 nebo více příznaků ze skupiny B. Upraveno podle [30]

	Raynaudův fenomén
	artralgie
	fotosenzitivita
	úbytek váhy
	ranní ztuhlost
	suché sliznice
A. alespoň jeden	poruchy polykání
	horečky
	gastroezofageální reflux
	kožní změny
	ulcerace v ústech
	neandrogenní alopecie
	proximální svalová slabost
	ANA
	RF
B. pozitivita alespoň jednoho	anti-Scl-70
	anti-SS-A a anti-SS-B
	anti-Jo-1
	sedimentace a CRP

ANA – antinuclear antibodies anti-Scl-70 – anti-topoisomerase I
CRP – C-reaktivní protein ENA – anti-extractable nuclear antibody
RF – rheumatoid factor SS/A SS/B – anti-SLE and Sjögren's antibodies

II. Protilátky proti cytoplasmě neutrofilních granulocytů u systémových vaskulitid

Vaskulitidy jsou heterogenní skupinou onemocnění charakterizovaných zánětem cévní stěny. Na základě převažující velikosti a typu postižených cév se dělí na vaskulitidy malých, středních a velkých cév. Podle revidované nomenklatury vaskulitid z roku 2012 jsou vaskulitidy malých cév dále děleny na ANCA-asociované vaskulitidy (antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis – AAV) a imunokomplexové vaskulitidy [32,33]. ANCA-asociované vaskulitidy jsou vzácná, ale velmi závažná až život ohrožující onemocnění. Mezi AAV řadíme 3 klinické entity: granulomatózu s polyangiitidou (GPA, dříve nazývaná Wegenerova granulomatóza), mikroskopickou polyangiitidou (MPA) a eozinofilní granulomatózu s polyangiitidou (EGPA, dříve zvaná Churgův-Straussův syndrom) [32,33]. Jedná se o primární systémové nekrotizující vaskulitidy postihující cévy malého až středního průsvitu, které jsou asociovány ve většině případů s pozitivitou ANCA. GPA je charakterizována nekrotizující vaskulitidou s extravaskulárním granulomatózním zánětem, který není přítomen u MPA. Ačkoliv plicní a ledvinné postižení je běžné u obou GPA i MPA, granulomatózní postižení horních a dolních cest dýchacích se jeví být přítomno zejména u GPA. Plicní postižení včetně intersticiálního je častou komplikací ANCA vaskulitid a ovlivňuje jejich prognózu.

Protilátky proti cytoplasmě neutrofilů (ANCA) jsou sérologické markery přítomné u některých idiopatických systémových vaskulitid, cév malého průsvitu, jako je GPA nebo MPA, a méně u EGPA. Termín ANCA-aso-

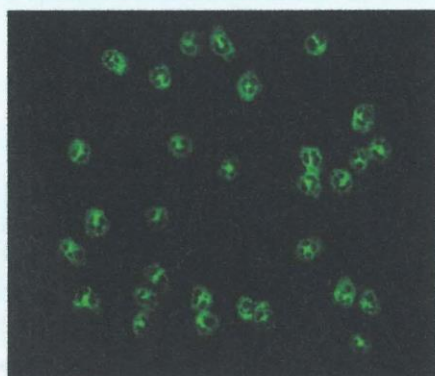
ciované vaskulitidy je používán pro primární vaskulitidy, u kterých jsou přítomny cirkulující ANCA protilátky. První popis ANCA je z roku 1982 u nemocných s nekrotizující glomerulonefritidou a symptomy systémové vaskulitidy [34]. V roce 1985 byla ANCA popsána u Wegenerovy granulomatózy [35].

Patogeneze ANCA u AAV

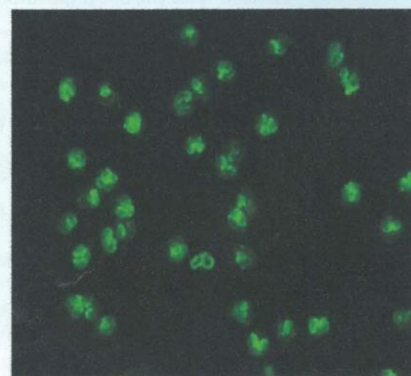
ANCA jsou přítomny u AAV, u jiných vaskulitid (Kawasakiho nemoc nebo obrovskobuněčná temporální arteriitida) nejsou detekovány nebo jen v malých titrech [36]. Tyto autoprotilátky pravděpodobně nebudou hlavní příčinou AAV, nicméně mohou zesilovat zánětlivé procesy u některých pacientů a přispívat k orgánovému postižení. Současné studie ukazují na úlohu ANCA a buněčné imunity v patogenezi AAV. ANCA, T buňky, makrofágy a jiné složky imunitního systému jsou zapojeny do patogeneze onemocnění. V patogenezi onemocnění se mohou rovněž uplatňovat vlivy genetické a zevního prostředí [37–41]. Je popsána genetická vazba mezi MPO-ANCA a HLA-DQ a PR3-ANCA a HLA-DP [37,42].

Na patogenezi ANCA-asociovaných vaskulitid se pravděpodobně podílí více faktorů. Jedním z možných vysvětlení je předpoklad především vlivu virové nebo bakteriální (stafylokokové) infekce, která aktivuje antigen prezentující buňky (antigen presenting cells – APC) k produkci IL23 (interleukin 23). Z naivních T-lymfocytů pod vlivem IL23 vznikají Th17 (T helper 17). Th17 způsobuje uvolnění prozánětlivých cytokinů TNF α (tumor necrotizing factor α) a IL1 β z makrofágů, které stimulují

Obr. 1. Přítomnost c-ANCA protilátek (cytoplazmatická reakce) na etanolem fixovaných neutrofilních granulocytech. Nález c-ANCA vzniká jako produkt vazby těchto protilátek s neutrálními nebo méně „vyjádřenými“ cytoplazmatickými proteiny. Jejich zrna jsou volně rozptýlena v cytoplasmě. Originální fotografie, zvětšení 800krát (nepřímá IF, konjugát FITC)



Obr. 2. Přítomnost p-ANCA protilátek (perinukleární reakce). Nález p-ANCA vzniká jako produkt vazby těchto protilátek se solubilními kationickými proteiny, které po permeabilizaci při etanolové fixaci migrují směrem k opačně nabitému jádru buňky, zrna a vzniklý IF obraz se tedy nacházejí v blízkosti jádra. Originální fotografie, zvětšení 800krát (nepřímá IF, konjugát FITC)



neutrofilní granulocyty k expresi PR3 nebo MPO na svém povrchu. To vede k tvorbě ANCA, které reagují s těmito antigeny a způsobují aktivaci, adhezi, degranulaci neutrofilů, uvolnění kyslíkových radikálů a lyzozomálních enzymů vedoucích k poškození cévní stěny. Zhoršená funkce Treg a zvýšené uvolnění BAFF (B-cell activating factor) z aktivovaných neutrofilních granulocytů vede k diferenciaci B buněk v plazmatické buňky produkující ANCA [38].

Laboratorní diagnostika – detekce ANCA a jejich význam u ANCA vaskulitid

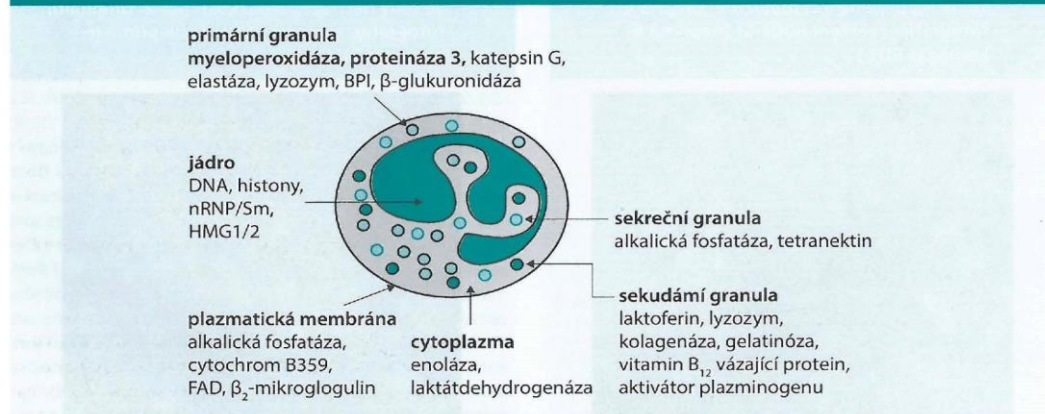
ANCA byly poprvé in vitro detekovány technikou nepřímé imunofluorescence (indirect immunofluorescence – IIF), a to na etanolem fixovaných lidských granulocytech. Jednotlivé složky cytoplazmatických granulí se zde redistribuují podle svého elektrického náboje. IF (imunofluorescence) – reakce se jeví jako difúzní, granulární, tj. cytoplazmatická (cytoplasmic pattern, c-ANCA) a perinukleární (perinuclear pattern, p-ANCA), obr. 1 a obr. 2. Klinické indikace testování ANCA uvádíme v přehledu [46,47].

Klinické indikace testování ANCA protilátek:

- glomerulonefritidy
- plicní hemoragie, pulmorenální syndrom
- kožní vaskulitida se systémovými příznaky
- mnohočetné plicní noduly
- destruktivní onemocnění horních cest dýchacích
- dlouhodobá sinusitida a otitida
- subglotická tracheální stenóza
- mononeuritis multiplex
- retroorbitální masa
- plicní fibróza se systémovými příznaky
- episkleritida, uveitida, retinální vaskulitida

Komplikované je zejména přiřazování a hodnocení p-ANCA obrazu nalézaného na etanolem fixovaných granulocytech. Tento typ fluorescence mohou vykazovat také některé protilátky proti jaderným antigenům – ANA. Pozitivita p-ANCA IF pozorovaná na etanolem fixovaných neutrofilních granulocytech je pak výsledkem pouhého „překryvu“ se souběžnou přítomností protilátek ANA. ANA protilátky specifické pro buňky myeloidní řady jsou označovány jako NANA (neutrophil associated nuclear antibodies) nebo GS-ANA (granulocyte-specific anti-nuclear antibodies) a vyskytují se velmi často u zánětlivých onemocnění gastrointestinální soustavy. Před vyslovením závěru, že se jedná o p-ANCA, je důležité **verifikovat (respektive vyloučit) je na substrátu granulocytů fixovaných formalinem: p-ANCA IF – obraz/ETOH (etanol) se zde mění na typickou c-ANCA – fluorescenci, zatímco protilátky ANA žádný IF – vzor v cytoplasmě v prostředí s formalinem netvoří.** Jednotlivé ANCA lze detekovat a kvantifikovat (stanovením jejich koncentrace) metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), do současné doby ale nebyly rozpoznány všechny antigenní cíle ANCA [43–45]. Cílovým antigenem pro c-ANCA bývá ve většině případů autoprotilátka zaměřená proti serinové proteináze-3 (PR3-ANCA). Nicméně **neplatí, že pozitivita c-ANCA rovná se pozitivita anti-PR3-ANCA.** PR3 je protein patřící mezi serinové proteázy a je obsažen nejvíce v azurofilních granulech neutrofilních granulocytů. Nejčastějším cílovým antigenem při pozitivitě p-ANCA je protilátka proti myeloperoxidáze (MPO-ANCA). Také v tomto případě platí, že **p-ANCA nerovná se pozitivita anti-MPO-ANCA.** MPO je protein, enzym charakterizovaný baktericidní aktivitou. Antigeny PR3 a MPO jsou lokalizovány v primárních azurofilních granulech

Obr. 3. Neutrofilní granulocyt – obsah granulí a cíle autoprotilátek. Obrázek ukazuje cílové antigeny u neutrofilního granulocytu, nicméně autoprotilátky ANCA jsou namířeny i proti strukturám jiných buněk, například lyzozomů monocytů. Upraveno podle [47]



BPI – bactericidal/permeability-increasing protein HMG1/2 – high mobility group protein 1–2 MPO – myeloperoxidase nRNP – ribonucleoproteins PR3 – proteinase 3

polymorfonukleárů a monocytů (obr 3). Pod obrazem p-ANCA se mohou objevit protilátky proti laktoferinu, katepsinu, lysozymu, elastáze a BPI (bacterial permeability increasing protein). V běžné praxi tak ANCA zjišťujeme IF s antigen-specifickou konfirmací ELISA, tato kombinace metod dovoluje až 99% specifitu [46–48]. Další metody průkazu ANCA zahrnují chemiluminiscenci, nové metody ELISA [49,50].

Méně častá je přítomnost cytoplazmatických atypických (atypické c-ANCA), a atypických ANCA (a-ANCA, atypické ANCA nálezy perinukleární a cytoplazmatické IF). Cílové antigeny jsou obvykle rozdílné od PR3 a MPO a jsou namířeny proti komponentám jádra, cytosolu nebo granulím. Patří sem laktoferin, BPI, katepsin G, elastáza, lysozym, kataláza, a enoláza, aktin, histon.

Jejich přítomnost není všeobecně vztahována k AAV [49]. Souhrnně se jedná o IgG-ANCA protilátky izotypu IgG (třída imunoglobulin IgG) [49]. Senzitivita IF-ANCA pro AAV je vysoká ($\geq 80\%$), zatímco specifita je nízká ($< 80\%$). To je způsobeno přítomností p-ANCA (nejsoú pozitivní protilátky proti MPO, atypická p-ANCA) např. u idiopatických střevních onemocnění, systémových onemocnění pojiva a také interferencí s ANA. P-ANCA pozitivitu/MPO-ANCA negativitu můžeme vidět u zánětlivých střevních onemocnění, systémových onemocnění pojiva, primární sklerotizující cholangitidy [47]. Pozitivitu PR3-ANCA vidíme i u idiopatického střevního onemocnění (ulcerózní kolitida) [49], v takových případech je většinou pozitivita PR3-ANCA spojena s atypickou p-ANCA (dle IF) [49]; c-ANCA byly zaznamenány také

Tab. 4. Imunofluorescenční nálezy, antigen, specifita a klinická asociace. Upraveno podle [46,47]

	imunofluorescenční obraz (fixace substrátu ETOH)	cílový antigen	asociované onemocnění
c-ANCA	granulární fluorescence pravidelně distribuovaná po celé ploše granulocytů, s centrálním nebo interlobulárním zvýrazněním, kdy buněčná jádra zůstávají nezasažena	PR3	granulomatóza s polyangiitidou (40–90 %) mikroskopická polyangiitida (15–20 %) eozinofilní granulomatóza s polyangiitidou ($\leq 10\%$) primární paucimunní nekrotizující glomerulonefritida (20–40 %) infekce (subakutní bakteriální endokarditida)
c-ANCA atypická	ploché homogenní cytoplazmatické skvrny bez interlobulárního zvýraznění	BPI BPI, MPO, katepsin G často více antigenních cílů dohromady	cystická fibróza (90 %) zánětlivá střevní onemocnění revmatoidní artritida primární sklerotizující cholangitida
p-ANCA	převážně hladká fluorescence, místy s jemnými granulemi stužkovitě obalujícími buněčná jádra granulocytů, nejvíce fluoreskují úseky okolí jádra u MPO dochází při fixaci substrátu HCOH k redistribuci granulí do jaderné membrány cytoplazmy granulocytů	MPO	mikroskopická polyangiitida (35–90 %) primární paucimunní nekrotizující glomerulonefritida (70–90 %) eozinofilní granulomatóza s polyangiitidou (30–40 %)
	bez perinukleárního zesílení	více antigenních cílů: HMG 1/2, kataláza, enoláza, aktin, laktoferin, elastáza, katepsin G, lysozym, BPI	zánětlivá střevní onemocnění revmatoidní artritida systémový lupus erythematosus systémová sklerodermie polékové vaskulitidy lupus-like syndrom autoimunitní jaterní onemocnění
atypická ANCA	široce nehomogenní perinukleární zbarvení, případně společně s difúzním cytoplazmatickým vzorem bez zvýraznění interlobulární zóny, možná kombinace c-ANCA a p-ANCA IF	MPO katepsin G, lysozym, BPI, laktoferin elastáza (anti-PR3 pozitivní u 30–40 %)	eozinofilní granulomatóza s polyangiitidou polékové vaskulitidy lupus-like syndrom zánětlivá střevní onemocnění revmatoidní artritida systémový lupus erythematosus kokain

BPI – bactericidal/permeability-increasing protein ETOH – ethanol, HCOH – formol HMG1/2 – high mobility group protein 1–2 IF – imunofluorescence MPO – myeloperoxidase PR3 – proteinase 3

u infekčních onemocnění [46,47]; c-ANCA/PR3-ANCA jsou zejména u pacientů s GPA, zatímco p-ANCA/MPO-ANCA jsou více u MPA a CSS [49]. U 10–20 % pacientů s klasickou WG můžeme prokázat p-ANCA (MPO-ANCA), a dokonce pacienti s MPA nebo EGPA mohou být c-ANCA (PR3-ANCA) pozitivní [46]. ANCA jsou detekovány u 70–90 % aktivních a generalizovaných GPA, ale pouze u 40–50 % lokoregionálních forem [49]. U EGPA jsou ANCA pozitivní jen u 40 % případů [49]. Ve studii Sinico et al EGPA ANCA pozitivita korelovala s jistým orgánovým postižením (glomerulonefritida, mononeuritis multiplex, purpura a plicní hemoragie). ANCA negativita u EGPA byla spojena s vyšší prevalencí srdečního onemocnění a plicního postižení [51].

Souvislost mezi IPP a ANCA, zejména pozitivita MPO, byla popsána v řadě publikací [52,53]. Kromě toho byly také zaznamenány případy pacientů s IPP a ANCA pozitivitou, ale bez jiných projevů systémové vaskulitidy. IPP (až typu plicní fibrózy) může předcházet klinické manifestaci AAV. Ve většině studií pacienti AAV s IPP mají horší prognózu než pacienti bez IPP [54].

Atypická ANCA-IF s cílovým antigenem neutrofilní elastázy je zjištělná při kokainem indukovaném orgánovém postižení, které může napodobovat klinicky GPA a u 30–40 % je popisována pozitivita anti-PR3 [55]. Další ANCA, jiné než PR3 a MPO, které by mohly být přítomny u vaskulitid, jsou předmětem dalších výzkumů [56,57].

Detekce ANCA má diagnostický a prognostický význam, nicméně vyšetření ANCA pozitivity v čase má nejistý prognostický význam v určení aktivity onemocnění nebo jeho vzplanutí [57–63]. V práci Tomasson et al zjistili, že opakované měření ANCA v měsíčních intervalech během remise má omezený význam pro předpověď relapsu AAV [61]. Verstockt et al ve své práci popisují nízkou předpovědní hodnotu rizika relapsu jen na základě rutinního sledování ANCA v čase bez klinického korelátu. Pravděpodobnost relapsu se zvyšuje při současném klinickém podezření a nárůstu nebo znovuoobjevení ANCA. U pacientů s pozitivitou ANCA v době diagnózy je návrat nemoci méně pravděpodobný při negativitě ANCA po dobu sledování [63]. PR3-ANCA ve srovnání s MPO-ANCA jsou spojeny s vyšší mortalitou a jsou nezávislým prediktorem relapsu [63–66].

Diferenciálně diagnostický význam ANCA a jejich uplatnění v klinické praxi shrnuje tab. 4.

Význam ANCA (anti-neutrophil cytoplasm antibodies) k průkazu AAV v klinické praxi – shrnutí

- detekce ANCA má diagnostický a prognostický význam pro AAV v době diagnózy, nicméně pozitivita ANCA bez klinického korelátu a histopatologického potvrzení není diagnostická pro AAV
- ANCA negativita u pacientů s klinickými a histopatologickými příznaky nevylučuje diagnózu AAV
- vyšetření ANCA v čase jsou využívána pro monitoraci aktivity onemocnění, ale mají omezený význam

pro predikci relapsů v době remise, proto by jejich zvýšení nebo přetrvávání bez klinického korelátu nemělo být důvodem k rozhodnutí o zahájení léčby

- pozitivita ANCA protilátek: 75–95 % pacientů s GPA nebo MPA, 40–70 % u EGPA
- PR3-ANCA oproti MPO-ANCA jsou nezávislým prediktorem relapsu onemocnění a mortality
- ANCA pozitivita se vyskytuje u infekčních, zánětlivých střevních onemocnění, maligních hematologických onemocnění, cystické fibrózy a při užívání kokainu
- přítomnost ANCA u intersticiálních plicních postižení, bez klinického korelátu AAV, je rizikem vývoje AAV v čase
- ANCA specifita má pravděpodobně vliv na fenotyp klinického onemocnění
- ANCA pozitivita koreluje u EGPA s jistým orgánovým postižením (glomerulonefritida, mononeuritis multiplex, purpura a plicní hemoragie)
- ANCA negativita u EGPA bývá spojena s vyšší prevalencí srdečního onemocnění a plicního postižení

Závěr

Plicní postižení je běžnou komplikací u nemocných se SOP a vaskulitidami. Plicní komplikace jsou prognostickým faktorem SOP a vaskulitid. Vyšetření autoprotilátek je součástí diferenciálně diagnostického algoritmu plicních onemocnění. Pomocí některých autoprotilátek, zejména u SOP, je možné se na základě jejich detekce vyjádřit k prognóze nemoci.

Literatura

1. Doubková M, Skříčková J. Intersticiální plicní postižení a systémová onemocnění pojiva. *Stud Pneumol Phthisiol* 2013; 73(2): 76–83.
2. Antoniou KM, Margaritopoulos GA, Tomassetti S et al. Interstitial lung disease. *Eur Respir Rev* 2014; 23(131): 40–54. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1183/09059180.00009113>>.
3. Antoniou KM, Margaritopoulos G, Economidou F et al. Pivotal clinical dilemmas in collagen vascular diseases associated with interstitial lung involvement. *Eur Respir J* 2009; 33(4): 882–896. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00152607>>.
4. [American Thoracic Society; European Respiratory Society]. American Thoracic Society, European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(2): 277–304. Erratum in *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(3): 426.
5. Vencovský J. Jak pomáhá vyšetřování autoprotilátek v diagnostice a hodnocení autoimunitních revmatických chorob? *Vnitř Lék* 2006; 52(7–8): 697–701.
6. Tzelepis GE, Toya SP, Moutsopoulos HM. Occult connective tissue diseases mimicking idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J* 2008; 31(1): 11–20. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00060107>>.
7. Self SE. Autoantibody testing for autoimmune disease. *Clin Chest Med* 2010; 31(3): 415–422. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccm.2010.04.001>>.
8. Bradley B, Branley HM, Egan JJ et al. [British Thoracic Society Interstitial Lung Disease Guideline Group, British Thoracic Society Standards of Care Committee; Thoracic Society of Australia; New Zealand Thoracic Society; Irish Thoracic Society]. Interstitial lung disease

- guideline: the British Thoracic in collaboration with the thoracic society of Australia and New Zealand and the Irish thoracic society. *Thorax* 2008; 63(Suppl 5): v1-v58. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1136/thx.2008.101691>>. Erratum in *Thorax* 2008; 63(11): 1029.
9. Vašáková M, Polák J, Matěj R. Postižení plic u systémových onemocnění. In: Vašáková M, Polák J, Matěj R. Intersticiální plicní procesy. Od etiopatogeneze přes radiologický obraz k histopatologické diagnóze. Maxdorf: Praha 2011: 285–312. ISBN 978–80–7345–251–3.
 10. Lamblin C, Bergoin C, Saelens T et al. Interstitial lung diseases in collagen vascular disease. *Eur Respir J Suppl* 2001; 32: 69s–80s.
 11. Bonela F, Costabel U. Biomarkers in connective tissue disease-associated interstitial lung disease. *Semin Respir Crit Care Med* 2014; 35(2): 181–200. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1371527>>.
 12. Papiříš SA, Kagouridis K, Bouros D. Serologic evaluation in idiopathic interstitial pneumonias. *Curr Opin Med* 2012; 18(5): 433–440. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1097/MCP.0b013e3283560840>>.
 13. Groen H, ter Borg EJ, Postma DS et al. Pulmonary function in systemic lupus erythematosus is related to distinct clinical, serologic, and nailfold capillary patterns. *Am J Med* 1992; 93(6): 619–627.
 14. Boulware DW, Hedgpeth MT. Lupus pneumonitis and anti-SSA(Ro) antibodies. *J Rheumatol* 1989; 16(4): 479–481.
 15. Aubart F, Crestani B, Nicaise-Roland P et al. High levels of anti-cyclic citrullinated peptide autoantibodies are associated with co-occurrence of pulmonary diseases with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011; 38(6): 979–982. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.3899/jrheum.101261>>.
 16. Yazisiz V, Arslan G, Ozbudak IH et al. Lung involvement in patients with primary Sjögren's syndrome: what are the predictors? *Rheumatol Int* 2010; 30(10): 1317–1324. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00296-009-1152-8>>.
 17. Fertig N, Domsic RT, Rodriguez-Reyna T et al. Anti-U11/U12 RNP antibodies in systemic sclerosis: a new serologic marker associated with pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009; 61(7): 958–965. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1002/art.24586>>.
 18. Hill MB, Phipps JL, Cartwright RJ et al. Antibodies to membranes of endothelial cells and fibroblasts in scleroderma. *Clin Exp Immunol* 1996; 106(3): 491–497.
 19. Mimori T, Imura Y, Nakashima R et al. Autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathy: an update on clinical and pathophysiological significance. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19(6): 523–529.
 20. Love LA, Leff RL, Fraser DD et al. A new approach to the classification of idiopathic inflammatory myopathy: myositis-specific autoantibodies define useful homogeneous patient groups. *Medicine (Baltimore)* 1991; 70(6): 360–374.
 21. Mimori T, Nakashima R, Shida N et al. Interstitial lung diseases in myositis: clinical subsets, biomarkers, and treatment. *Curr Rheumatol Rep* 2012; 14(3): 264–274. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11926-012-0246-6>>.
 22. Hamaguchi Y, Fujimoto M, Mathushita T et al. Common and distinct of clinical features in adult patients with anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibodies: heterogeneity within the syndrome. *PLoS One* 2013; 8(4): e60442. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0060442>>.
 23. Teruya A, Kawamura K, Ichikado K et al. Successful polymyxin B hemoperfusion treatment associated with serial reduction of serum anti-CADM-140/MDA5 antibody levels in rapidly progressive interstitial lung disease with amyopathic dermatomyositis. *Chest* 2013; 144(6): 1934–1936. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1378/chest.13-0186>>.
 24. Cavagna L, Nuño L, Scirè CA et al. [AENEAS (American, European Network of Antisynthetase Syndrome) collaborative group]. Clinical Spectrum Time Course in Anti Jo-1 Positive Antisynthetase Syndrome: Results From an International Retrospective Multicenter Study. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(32): e1144. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1097/MD.0000000000001144>>.
 25. Hoshino K, Muro Y, Sugiura K et al. Anti-MDA5 and anti-TIF-1-gamma antibodies have clinical significance for patients with dermatomyositis. *Rheumatology* 2010; 49(9): 1726–1733. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/keq153>>.
 26. Bodolay E, Szekanez Z, Dévényi K et al. Evaluation of interstitial lung disease in mixed connective tissue disease (MCTD). *Rheumatology* 2005; 44(5): 656–661.
 27. Homma Y, Ohtsuka Y, Tanimura K et al. Can interstitial pneumonia as the sole presentation of collagen vascular diseases be differentiated from idiopathic interstitial pneumonia? *Respiration* 1995; 62(5): 248–251.
 28. Corte TJ, Copley SJ, Desai SR et al. Significance of connective tissue disease features in idiopathic interstitial pneumonia. *Eur Respir J* 2012; 39(3): 661–668. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00174910>>.
 29. Cottin V. Idiopathic interstitial pneumonias with connective tissue diseases features: A review. *Respirology* 2016; 21: 245–258.
 30. Fischer A, Antoniou KM, Brown KK et al. An official European Respiratory Society/American Thoracic Society research statement: interstitial pneumonia with autoimmune features. *Eur Respir J* 2015; 46(4): 976–987. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1183/13993003.00150-2015>> a <<http://www.ers-education.org/guidelines.aspx>>. [19. 5. 2016].
 31. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 1994; 37(2): 187–192.
 32. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA et al. 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013; 65(1): 1–11. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1002/art.37715>>.
 33. Davies DJ, Moran JE, Niall JF et al. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982; 285(6342): 606.
 34. Van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985; 1(8426): 425–429.
 35. Basu N, Watts R, Bajema I et al. EULAR points to consider in the development of classification and diagnostic criteria in systemic vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(10): 1744–1750. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1136/ard.2009.119032>>.
 36. Griffith ME, Coulthart A, Pusey CD. T cell responses to myeloperoxidase (MPO) and proteinase 3 (PR3) in patients with systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol* 1996; 103(2): 253–258.
 37. Kallenberg CG. Pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides. *Clin Exp Rheumatol* 2015; 33(4 Suppl 92): S11–S14.
 38. Pendergraft WF, Preston GA, Shah RR et al. Autoimmunity is triggered by cPR-3(105–201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nat Med* 2004; 10(1): 72–79.
 39. Harper L, Cockwell P, Adu D et al. Neutrophil priming and apoptosis in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Kidney Int* 2001; 59(5): 1729–1738.
 40. Radford DJ, Savage CO, Nash GB. Treatment of rolling neutrophils with antineutrophil cytoplasmic antibodies causes conversion to firm integrin-mediated adhesion. *Arthritis Rheum* 2000; 43(6): 1337–1345.
 41. Lyons PA, Rayner TF, Trivedi S et al. Genetically distinct subsets within ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* 2012; 367(3): 214–223. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMo1108735>>.
 42. Savige J, Davies D, Falk RJ et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies and associated diseases: a review of the clinical and laboratory features. *Kidney Int* 2000; 57(3): 846–862.
 43. Savige JA, Paspaliaris B, Silvestrini R et al. Immunofluorescent patterns associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies. *J Clin Pathol* 1998; 51(8): 568–575.
 44. Savige J, Gillis D, Benson E et al. International consensus statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Am J Clin Pathol* 1999; 111(4): 507–513.
 45. Radice A, Sinico RA. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Autoimmunity* 2005; 38(1): 93–103.

46. Radice A, Bianchi L, Sinico RA. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: methodological aspects and clinical significance in systemic vasculitis. *Autoimmunity Rev* 2013; 12(4): 487–495. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2012.08.008>>.
47. Savige J, Dimech W, Fritzl M et al. [International group for Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA)]. Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of neutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. *Am J Clin Path* 2003; 120(3): 312–318.
48. Shulte-Pelkum J, Radice A, Norman GL et al. Novel clinical and diagnostic aspects of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J Immunol Res* 2014; 2014: 185416. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/185416>>.
49. Csernok E, Moosig F. Current and emerging techniques for ANCA detection in vasculitis. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10(8): 494–501. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2014.78>>.
50. Sinico RA, Di Toma L, Maggioro U et al. Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Churg-Strauss syndrome. *Arthritis Rheum* 2005; 52(9): 2926–2935.
51. Katsumata Y, Kawaguchi Y, Yamanaka H. Interstitial lung disease with ANCA-associated vasculitis. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med* 2015; 9(Suppl 1): 51–56. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.4137/CCRP.M.S23314>>.
52. Kagiyama N, Takayanagi N, Kanauchi T et al. Antineutrophil cytoplasmic antibody-positive conversion and microscopic polyangiitis development in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *BMJ Open Respir Res* 2015; 2(1): e000058. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1136/bmjresp-2014-000058>>.
53. Arulkumaran N, Periselneris N, Gaskin G et al. Interstitial lung disease and ANCA-associated vasculitis: a retrospective observational cohort study. *Rheumatology* 2011; 50(11): 2035–2043. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/ker236>>.
54. Wiesner O, Russell KA, Lee AS et al. Antineutrophil cytoplasmic antibodies reacting with human neutrophil elastase as a diagnostic marker for cocaine-induced midline destructive lesions but not autoimmune vasculitis. *Arthritis Rheum* 2004; 50(9): 2954–2965.
55. Lally L, Spiera R. Current landscape of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Rheum Dis Clin N Am* 2015; 41(1): 1–19, vii. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rdc.2014.09.003>>.
56. Kain R, Tadema H, McKinney EF et al. High prevalence of autoantibodies to hLAMP2 in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23(3): 556–566. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/ASN.2011030273>>.
57. Finkelman JD, Merkel PA, Schroeder D et al. [WGET Research Group]. Antiproteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies and disease activity in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 2007; 147(9): 611–619.
58. Birck R, Schmitt WH, Kaelsch IA et al. Serial ANCA determinations for monitoring disease activity in patients with ANCA-Associated vasculitis: systematic review. *Am J Kidney Dis* 2006; 47(1): 15–23.
59. Kerr GS, Fleisher TA, Hallahan CW et al. Limited prognostic value of changes in antineutrophil cytoplasmic antibody titer in patients with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1993; 36(3): 365–371.
60. Tomasson G, Grayson PC, Mahr AD et al. Value of ANCA measurements during remission to predict a relapse of ANCA-associated vasculitis—a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51(1): 100–109. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1093/rheumatology/ker280>>.
61. Boomsma MM, Stegeman CA, van der Leij MJ et al. Prediction of relapses in Wegener's granulomatosis by measurement of antineutrophil cytoplasmic antibody levels: a prospective study. *Arthritis Rheum* 2000; 43(9): 2025–2033.
62. Verstockt B, Bossuyt X, Vanderschueren S et al. There is no benefit in routinely monitoring ANCA titres in patients with granulomatosis with polyangiitis. *Clin Exp Rheumatol* 2015; 33(2 Suppl 89): S72–S76.
63. Lionaki S, Blyth ER, Hogan SL et al. Classification of antineutrophil cytoplasmic autoantibody vasculitides. The role of ANCA specificity for myeloperoxidase or proteinase 3 in disease recognition and prognosis. *Arthritis Rheum* 2012; 64(10): 3452–3462. 10.1002/art.34562
64. Walsh M, Flossmann O, Berden A et al. [European Vasculitis Study Group]. Risk factors for relapse of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 2012; 64(2):542–548.
65. Mahr A, Katsahian S, Varet H et al. [French Vasculitis Study Group (FVSG) and the European Vasculitis Society (EUVAS)]. Revisiting the classification of clinical phenotypes of anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis – a cluster analysis. *Ann Rheum Dis* 2013; 72(6): 1003–1010. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201750>>.

MUDr. Martina Doubková, Ph.D.

✉ doubkovamartina@seznam.cz

Klinika nemocí plicních a tuberkulózy LF MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

www.fnbrno.cz

Doručeno do redakce 11. 8. 2016

Přijato po recenzi 9. 1. 2017

Granulomatózy u primárních imunodeficitů

MUDr. Martina Doubková, Ph.D.

Masarykova univerzita, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Brno, Klinika nemocí plicních a tuberkulózy

SOUHRN

Granulomatózní procesy u primárních imunodeficitů vidíme nejčastěji u běžného variabilního imunodeficitu, ale také u mnohem vzácnější chronické granulomatózní choroby. U pacientů s granulomatózou a hypogamaglobulinémií musíme na prvním místě vyloučit oportunní infekci. Granulomatózy a intersticiální plicní postižení neinfekční etiologie se obvykle manifestují již v době diagnózy CVID a jsou většinou špatným prognostickým faktorem onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

granulomatózy • běžný variabilní imunodeficit • chronická granulomatózní choroba

SUMMARY

Doubkova, M. Granulomatosis in primary immunodeficiency

Granulomatous processes in primary immunodeficiency are seen most frequently in common variable immunodeficiency but also in rare chronic granulomatous disease. In patients with granulomatosis and hypogamaglobulinemia we must exclude opportunistic infection. Granulomatosis and interstitial lung fibrosis usually manifest at diagnosis of CVID and they are negative prognostic factors of the disease.

KEY WORDS

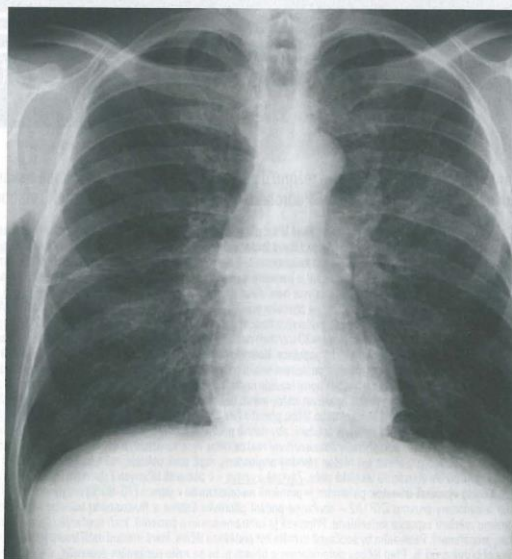
granulomatosis • common variable immunodeficiency • chronic granulomatous disease

Pojem granulom použil poprvé Virchow v roce 1865.^(1, 2, 3) Granulomatózní (granulum = zrno, -oma = zduření) onemocnění plic jsou častá. Diagnostika a diferenciální diagnostika granulomu je mnohdy složitá. Tvorba granulomu je vývojově starý proces obrany organismu proti různým agens, jejich pronikání do okolní tkáně. Diferenciální diagnostika granulomů je široká a mikroskopický vzhled granulomu, přítomnost nekrózy, její rozsah a typ (kaseózní, fibrinoidní), charakter a rozsah zánětlivé reakce, stav okolních struktur a distribuce změn v plicní tkáni jsou hlavními diferenciačními znaky v morfoloické diagnostice plicních granulomů. Granulom, respektive jeho centrum, se skládá z makrofágů, z nichž některé jsou přeměněny do vzhledu epiteloidních buněk. Centrum je obklopeno lemem mononukleárních leukocytů, především lymfocytů a plazmocytů. Starší granulomy jsou obkrouženy vrstvou fibroblastů s tvorbou kolagenu. Granulom se může vstřebat *ad integrum* nebo přejít do fibrózy. Příčiny granulomů mohou být infekční, chemické (křemík, beryllium), imunologické (hypersenzitivní) a nádorové.^(1, 2, 3) Granulomatózní procesy u imunodeficitů jsou převážně infekční (mykobakteriální tuberkulózy, atypické mykobaktérie, nokardiózy, houbové

infekce aspergily) nebo neinfekční etiologie. Cílem práce je popis granulomatózních a intersticiálních plicních procesů neinfekční příčiny u vrozených imunodeficitů.

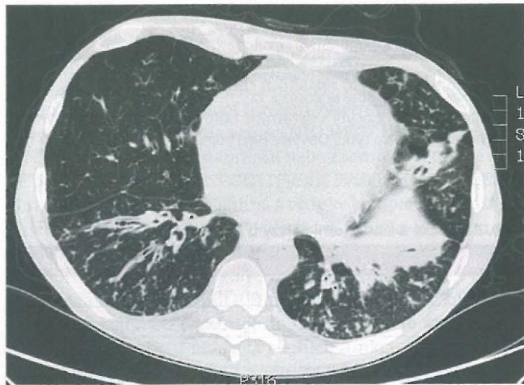
BĚŽNÁ VARIABILNÍ IMUNODEFICIENCE

Klasifikace imunodeficitů je možná z mnoha hledisek. Pro klinickou praxi je využíváno dělení podle důsledku, ke kterému určitá porucha vede, na poruchy protilátkové, buněčné, kombinované, fagocytární a komplementové. Běžná variabilní imunodeficience (CVID – common variable immunodeficiency) je soubor onemocnění nejasné patogeneze, variabilní klinické manifestace i laboratorních ukazatelů.⁽⁴⁾ Nová navrhovaná diagnostická kritéria uvádí Tab. 1. CVID patří k nejběžnějším primárním imunodeficitům, je charakterizovaný hypogamaglobulinémií a je často provázen bakteriálními infekcemi a bronchiektaziemi (nevratné rozšíření průdušek a průdušinek malého a středního průsvitu provázené chronickou zánětlivou reakcí). CVID není jen onemocněním B-lymfocytů, ale také zahrnuje patologie v T-lymfocytech; proto jsou zde častá autoimunitní a lymfoproliferativní onemocnění. Intersticiální

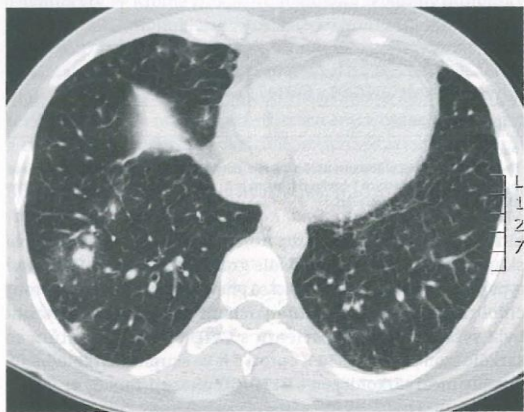


Obr. 1 Zadopřední snímek hrudníku u pacienta s běžným variabilním imunodeficitem (CVID) a intersticiálním plicním postižením s bronchiektaziemi. Nehomogenní retikulární zastínění je přítomno oboustranně difúzně.

www.postgradmed.cz



Obr. 2 CT plic a mediastina a HRCT plic u pacienta s CVID. Difúzně jsou přítomny bronchiektázie a intersticiální plicní proces (histologicky verifikován jako nespecifická intersticiální pneumonie).



Obr. 3 HRCT hrudníku u pacientky se vzácným onemocněním, CTLA-4 deficiencí (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4 deficiencí), onemocněním, které je charakterizováno granulomy obsahujícími CD4+ T-lymfocyty (GD, GDILD). Zárodečná mutace v CTLA-4 genu je rizikovým faktorem pro vznik imunitní dysregulace-imunodeficitu s hypogamaglobulinémií a s autoimunitními projevy. Cytotoxický T-lymfocytární antigen-4 (CTLA-4) hraje dominantní úlohu v potlačení odpovědi T-buněk v imunitním systému. Protein je například expričován na regulačních T-lymfocytech (Treg), které zprostředkovávají periferní toleranci a prevenci autoimunitních onemocnění. Pacientka je léčena profylaxí antibiotik, substituční imunoglobulinovou léčbou a kombinovanou imunosupresí.

plicní procesy jsou přítomny obvykle již v době diagnózy CVID a vyskytují se u 5–22 % pacientů s CVID.^(5, 6, 7, 8) CVID asociovaný s granulomatózním onemocněním (GD, granulomatous disease) se označuje jako CVID/GD.^(7, 9, 10, 11) Kombinace plicních granulomů a lymfoproliferace se nazývá granulomatous lymphocytic interstitial lung disease (GLILD).^(6, 12, 13) Pojem lymfoproliferace zahrnuje lymfocytární intersticiální pneumonii (LIP), folikulární bronchiolitidu a lymfoidní hyperplazii. GLILD je často doprovázeno splenomegalií a difúzní lymfadenopatií se zvýšeným výskytem vzniku lymfomu.⁽¹³⁾ Histologicky nacházíme u pacientů s CVID/GD a GLILD sarkoid-like granulomy (granulomy podobné sarkoidóze), organizující se pneumonii, folikulární bronchiolitidu, lymfocytární intersticiální pneumonii a nespecifickou intersticiální pneumonii.⁽¹⁴⁾ Nálezy se mohou vyskytovat samostatně nebo se mohou kombinovat.⁽¹⁴⁾

PLICNÍ POSTIŽENÍ A CVID

Plicní onemocnění při CVID můžeme rozdělit na obstrukční (bronchiektázie – abnormální rozšíření dýchacích cest způsobené opakovanými záněty, obliterující bronchiolitida, granulomy) a restriktivní (intersticiální plicní postižení s fibrózou). Další dělení je možné na postižení respiračního traktu jako důsledek recidivujících infekcí se strukturálním postižením a na neinfekční.⁽¹⁵⁾

Diagnostika plicních postižení při CVID sestává z klinického a fyzikálního vyšetření, kde při plicním fibrotizujícím procesu (vazivovatění plic) můžeme auskultací prokázat krepitace, u bronchiektázií chrůpky. Fenomén krepitací je připodobňován rozepínání suchého zipu („opening velcro“) a je slyšitelný pouze v inspirační fázi dýchání. Plicním funkčním vyšetřením zjistíme jak normální ventilační plicní parametry, tak i restriktivní nebo obstrukční ventilační poruchu s poruchou plicní difúze (přenos krevních plynů přes alveolokapilární membránu). Radiologické metody zahrnují zadopřední snímek hrudníku a výpočetní tomografii s vysokou rozlišovací schopností (HRCT hrudníku – high resolution computed tomography) (Obr. 1, 2, 3). Charakteristickými nálezy na HRCT hrudníku jsou difúzní bronchiektázie, ztlustění stěny bronchů, difúzní intersticiální změny, centrilobulární noduly, air trapping (mozaiková perfúze způsobená „uvězněním, zadržením“ vzduchu v alveolech).^(6, 16) Další vyšetřovací metodou je bronchoskopie s bronchoalveolární laváží a transbronchiální plicní biopsií. Plicní biopsie cestou transbronchiální nebo chirurgickou cestou torakoskopicky by měla být provedena k vyloučení jiného lymfoproliferativního onemocnění včetně lymfomu.⁽¹³⁾

Histologické plicní nálezy asociované s CVID zahrnují jak granulomy, tak intersticiální plicní postižení. Intersticiální plicní postižení postihuje intersticiium („vmezeřenou tkáň“). Plicním intersticiem rozumíme prostor ohraničený endotelovými buňkami kapilár a alveolárním epitelem, perilymfatické a perivaskulární interseptální prostory a centrálně uložené peribronchiální prostory. Kromě intersticia jsou různým stupněm zánětu a plicní fibrózy postiženy i respirační bronchioly, alveolární dukty, alveoly a plicní kapiláry. Histologicky nacházíme: sarkom-like granulomy, organizující se pneumonie OP, nespecifické intersticiální pneumonie NSIP, folikulární bronchiolitidy a lymfocytární intersticiální pneumonie LIP. Tyto nálezy se mohou u jednoho pacienta kombinovat. CVID asociovaný s GD se označuje jako CVID/GD.^(7, 10, 11) Kombinace

Tab. 1 Nová navrhovaná diagnostická kritéria CVID

1. Alespoň jedna klinická manifestace imunodeficitu – infekce, autoimunita, lymfoproliferace. Pokud jsou ale splněny body 2–5, není tato manifestace bezpodmínečně nutná, zejména u osob s pozitivní rodinnou anamnézou.
2. Opakovaně musí být prokázáno snížení koncentrace IgG pod dolní referenční mez (hraniční sérová koncentrace IgG <5 g/l).
3. Musí být snížena koncentrace IgA nebo IgM, opět stačí pod dolní referenční mez.
4. U pacienta by měla být prokázána porušená protilátková odpověď po vakcinaci. Ke splnění tohoto kritéria stačí nízká odpověď po imunizaci proteinovým nebo polysacharidovým antigenem.
5. Je potřeba vyloučit jiné příčiny hypogamaglobulinémie.
6. Není potřeba provádět molekulárněgenetické testy na geny asociované s fenotypem CVID.

Podle ICON (International consensus ON) a⁽⁹⁾

Tab. 2 Histopatologické rozdíly granulomů u sarkoidózy a CVID

Histologický průkaz granulomů u pacienta s CVID	Histologický průkaz granulomů u pacienta se sarkoidózou
Granulomy při CVID se podobají granulomům u sarkoidózy. Jsou menší, bez nekrotizace, na rozdíl od sarkoidózy jsou však hůře ohraničené. Morfologie granulomů při CVID je ovšem variabilní a závisí na případném přidruženém infekčním onemocnění. V literatuře jsou v souvislosti s CVID popisovány také granulomy s kaseózními nekrotizacemi.	Granulomy při sarkoidóze mají charakteristický vzhled. Jsou menší, ostře ohraničené, poměrně uniformní, bez nekrotizace a jsou tvořené především epitelioidními histiocyty s nečetnými obrovskými mnohojadernými buňkami Langhansova typu. Obvykle jsou hojně a hustě nakupené.

Podle⁽²⁰⁾

placních granulomů a lymfoproliferace (patří sem lymfocytární intersticiální pneumonie, folikulární bronchiolitida, lymfoidní hyperplazie) se nazývá granulomatus lymphocytic interstitial lung disease (GLILD).^(5, 17) GLILD může být první manifestací CVID a může také předcházet i o několik let diagnózu CVID.⁽¹¹⁾ U poloviny pacientů s plicními granulomy jsou také přítomny granulomy v mimoplicní lokalizaci (slezina, játra, lymfatické uzliny, ledviny, kůže, gastrointestinální ústrojí).^(5, 8, 11, 14) Jedná se většinou o nenekrotizující (nekaseifikující) granulomy,⁽⁶⁾ pozorovány ale byly i granulomy nekrotizující.⁽¹⁸⁾ V klinické praxi se často setkáváme s tím, že je pacient veden pod dvěma diagnózami, CVID a sarkoidóza. Odlišení od sarkoidózy může být obtížné a je vhodné odlišit, zda jde o koincidenci sarkoidózy a CVID, nebo o CVID/GD nebo GLILD.⁽¹⁹⁾ Ačkoliv má granulomatózní zánět v obou případech určité podobnosti, u CVID/GD je granulom obvykle složen převážně z vágně organizovaného shluku makrofágů, histiocyty a mnohojaderných obrovskobuněčných buněk v kontrastu s dobře definovanými organizovanými granulomy u sarkoidózy (podrobněji histopatologické rozdíly granulomů sarkoidózy a CVID/GD, Tab. 2).^(14, 20, 21) Na rozdíl od sarkoidózy, kde může být pozorována polyklonální hypergamaglobulinémie bez průkazu monoklonální gamapatie, jsou CVID/GD, GLILD provázeny hypogamaglobulinémií, často s progresivním vývojem plicního postižení bez tendence ke spontánní regresi a rezistencí na kortikoidní léčbu. Častý je výskyt splenomegalie s trombocytopenií a pancytopenií.⁽²²⁾ Ve studii Bouvryho et al. bylo dvacet pacientů s průkazem granulomů plic a jiných orgánů a/nebo jiným typem intersticiálního plicního postižení (organizující se pneumonie, folikulární bronchiolitida, lymfocytární intersticiální pneumonie) porovnávalo se 60 kontrolami se sarkoidózou. Bylo zjištěno, že u pacientů s CVID ve srovnání se sarkoidózou jsou fenotypické rozdíly ve vyšší frekvenci autoimunitních onemocnění, ve fyzikálním vyšetření plic (u pacientů s CVID významně přítomen poslechový plicní nálezkreptací, nálezkreptací na HRCT hrudníku (u CVID signifikantně vyšší výskyt bronchiektazií, periferních nodulů s hladkými konturami predilekčně v dolních plicních polích, obklopené opacitami mléčného skla a vzduchový bronchogram, na rozdíl od sarkoidózy s perilymfatickým šířením nodulů lokalizovaných převážně v horních a středních plicních polích), v bronchoalveolární tekutině získané laváží (u obou skupin byla nalezena lymfocytární alveolitida, ale u pacientů s CVID převažoval snížený poměr CD4+/CD8+ 1,6 ± 1,1 oproti 5,3 ± 4 u sarkoidózy, poměr subpopulace pomocných a cytoto-

Tab. 3 Klinické a laboratorní nálezy u GLILD a sarkoidózy

Příznaky	CVID	Sarkoidóza
opakující se infekce	++++	+/-
autoimunita	+++	+
splenomegalie	+++	+/-
hepatomegalie	++	+/-
hypogamaglobulinémie	++++	-
granulomy	++++	++++
lymfocytární intersticiální pneumonie	++++	+
folikulární bronchiolitida	++++	++
zvýšený poměr CD4+/CD8 v BALte	+	+++
spontánní remise	+/-	+++

Podle⁽²⁰⁾ a⁽²⁰⁾

Počet + ukazuje vyšší přítomnost dané patologie, poměr CD4+/CD8 = poměr subpopulace pomocných a cytotoxických T-lymfocytů, norma je 2 : 1. BALte = bronchoalveolární tekutina získaná bronchoalveolární laváží.

xických T-lymfocytů). Histopatologickým vyšetřením byly ve skupině s CVID prokázány vedle granulomatózních lézí i jiné typy postižení jako organizující se pneumonie, folikulární bronchiolitida a lymfocytární intersticiální pneumonie. Mortalita byla vyšší ve skupině pacientů s CVID oproti pacientům se sarkoidózou bez CVID (30 % oproti 0 % ve skupině sarkoidózy).⁽¹⁴⁾ Rozdíly mezi sarkoidózou a CVID/GD ukazují Tab. 3, 4.

TERAPIE PLICNÍCH KOMPLIKACÍ U CVID

Primární léčbou CVID je substituce imunoglobuliny, dávka se odvíjí od přítomnosti plicních komplikací. Optimální terapie CVID/GD/GLILD není známa, substituce imunoglobuliny není účinná, nezabraňuje progresi plicního onemocnění. Plicní komplikace CVID vznikají nezávisle na substituční léčbě. Kortikosteroidy jsou nejvíce používané léky, ale nejsou zcela účinné a po jejich vysazení dochází obvykle k návratu nemoci. V retrospektivní studii Boursiquot analyzoval 59 pacientů s CVID/GD.⁽⁸⁾ Čtyřicet dva procent nemocných s granulomatózním postižením nevyžadovalo léčbu v době diagnózy a bylo stabilních po dobu několika let. Pouze u pacientů s klinickými potížemi, středně těžkým až těžkým plicním funkčním vyšetřením nebo se zhoršováním plicního nálezu byla indikována imunosupresivní léčba spočívající v monoterapii prednisonem nebo v kombinaci s jinými imunosupresivy (cyklofosfamid, cyklo-

Tab. 4 Radiologické nálezy u GLILD a sarkoidózy

Nálezy a lokalizace	CVID	Sarkoidóza
difúzní plicní infiltráty	převažují dolní plicní pole	převažují horní plicní pole
hilová lymfadenopatie	+	+++
noduly	difúzní náhodná distribuce, různé velikosti	mikronoduly, perilymfatické šíření
		+

Podle⁽²⁰⁾ a⁽²⁰⁾

sporin, azathioprin, mykofenolát mofetil). Kortikosteroidy se používají v léčbě i u granulomatózního postižení jiných orgánů než plic (lymfatické uzliny, játra, slezina).⁽⁸⁾

Vzhledem k tomu, že u GLILD může být přítomen „normální“ skiagram hrudníku a plicní funkční vyšetření bez poruchy, je vhodné provést v čase diagnózy CVID HRCT hrudníku a začít s léčbou včas, abychom zabránili nebo zpomalili vznik nevratné plicní fibrózy.⁽¹⁵⁾ Léčba GLILD je ale svízelná, monoterapie glukokortikoidy je méně účinná a vede ke kompletní remisi jen u některých nemocných.^(5, 8) Jako steroid šetřící léky jsou přidávána další imunopresiva, cyklosporin, rituximab, hydroxychlorochin, cyklofosfamid a metotrexát. V práci Chase et al. byla u pacientů s GLILD prokázána účinnost kombinované imunoprese (azathioprin, rituximab) se signifikantním zlepšením HRCT nálezu a plicních funkcí. Kombinovaná imunoprese byla zvolena proto, že v histologickém vzorku plicní tkáně u GLILD jsou přítomny B- i T-lymfocyty a rituximab ovlivňuje B-lymfocyty (anti-CD20, monoklonální protilátka proti povrchovému antigenu na B-lymfocytech) a azathioprin T-lymfocyty.⁽²³⁾ Kromě glukokortikoidů byly zkoušeny inhibitory anti TNF-alfa (monoklonální protilátka proti TNF-alfa) s úspěchem pouze v kazuistikách.^(18, 23, 24) Další léčba sestává z plicní rehabilitace, nutriční podpory, řádné léčby infekcí po dobu 2–3 týdnů, preventivní antimikrobiální terapie podle kolonizace bakterií u pacientů s recidivujícími infekcemi a bronchodilatační a mukolytické léčby u pacientů s bronchiektaziemi a preventivní profylaxi pneumocysty při terapii kortikoidy. V případě plicní progresie je u nemocných s respirační nedostatečností indikována dlouhodobá domácí oxygenoterapie (minimálně 16 hodin inhalace kyslíku). S plicními transplantacemi u těchto nemocných mnoho zkušeností není. Diagnóza CVID není kontraindikací k provedení plicní transplantace, i když je provázána infekčními komplikacemi.⁽²⁵⁾

PROGNÓZA

GLILD je spojována s vyšší mortalitou ve srovnání s pacienty s CVID bez tohoto postižení.^(7, 8, 12, 14, 26, 27, 28) Ve studii Cunnighama a Ardenize ale nebyl zjištěn rozdíl v přežití mezi pacienty s CVID a CVID/GD.^(10, 11) Ve studii Bouvyho et al. bylo přežití pacientů s CVID a IPP ovlivněno výskytem lymfomů, infekcí a nikoliv přítomností intersticiálního plicního postižení.⁽³⁴⁾ Ve studii Resnicka et al. bylo přežití pacientů s CVID ovlivněno negativně výskytem lymfomu, hepatitidou, chronickým plicním (funkční a strukturální postižení) a gastrointestinálním onemocněním. Přežití nebylo ovlivněno přítomností bronchiektazií, autoimunit, jinými nádory než lymfomy, granulomatózním onemocněním a předešlou splenektomií.⁽²⁶⁾

CHRONICKÁ GRANULOMATÓZNÍ CHOROBA

Chronická granulomatózní choroba (CGD – chronic granulomatous disease) patří mezi poruchy fagocytózy a je vzácnější onemocnění nežli CVID. Jedná se o dědičnou poruchu vázanou na pohlaví (X chromosom) nebo autosomálně recesivní formu. Baktericidní defekt u CGD je způsoben poruchou respiračního vzplanutí u leukocytů, nepřítomností radikálů kyslíku (defekt enzymového systému nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfát, NADPH oxidáza). Neschopnost tvorby toxických kyslíkových produktů vede k neschopnosti zabít bakterie produkující katalázu (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). Z důvodu této dysfunkce dochází ke kumulaci nestrávených zbytků v buňkách a tvorbě granulomů i mimo infekci. Jako neinfekční postižení jsou pozorovány: Crohnova nemoc (Crohn's-like co-

litis), obstrukce granulomů vedoucí ke strikturně jícnu a uretry a granulomatózní oční a plicní komplikace. Ve studii Liese et al. byla plicní fibróza pozorována u 10 % pacientů, granulomatózní proces u 13 %.⁽²⁹⁾ Ve studii Salvator et al. bylo pozorováno 28 % neinfekčních plicních nálezů (granulomy, intersticiální plicní postižení).⁽³⁰⁾ Ve většině těchto případů byly tyto plicní nálezy provázány infekcí zejména aspergilovou.⁽³⁰⁾

K léčbě byla použita imunopresiva (kortikosteroidy, thalidomid, hydroxychlorochin, metotrexát, mykofenolát mofetil, cyklofosfamid, rituximab), ale s malým efektem na intersticiální plicní postižení.⁽³⁰⁾

ZÁVĚR

Primární imunodeficity jsou komplikovány výskytem granulomatózních plicních procesů. Nejběžnějším primárním imunodeficitem je CVID. Léčba neinfekčních plicních komplikací je svízelná a často neúčinná, protože chybí kontrolované studie a standardizované léčebné postupy.

Obrazová dokumentace archiv autorky.

Prohlášení: autoři v souvislosti s tématem práce nemají střet zájmů.

Literatura

1. KOLEK, V., et al. *Sarkoidóza. Známé a neznámé*. Praha: Avicenum, 1998, 239 s.
2. KOLEK, V. *Sarkoidóza*. Postgraduální medicína, 2006, 8, s. 656–663.
3. KOLEK, V. *Granulomatózy – epidemiologie a rozdělení*. Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL, 2008, 5, s. S4–S5.
4. LITZMAN, J., STREKOVÁ, J. *Běžná variabilní imunodeficiency – CVID nová diagnostická kritéria* (ICON. Alergie, 2016, 4, s. 225–231).
5. PRASSE, A., KAYSER, G., WARNATZ, K. *Common variable immunodeficiency-associated granulomatous and interstitial lung disease*. *Curr Opin Pulm Med*, 2013, 19, p. 503–509.
6. PARK, J.H., LEVINSON, A.I. *Granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease (GLILD) in common variable immunodeficiency (CVID)*. *Clinical Immunology*, 2010, 134, p. 97–103.
7. CHAPEL, H., LUCAS, M., LEE, M., et al. *Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes*. *Blood*, 2008, 111, p. 77–85.
8. BOURSQUOT, J.N., LUCAS, M., PATEL, S., et al. *Granulomatous disease in CVID: retrospective analysis of clinical characteristics and treatment efficacy in a cohort of 59 patients*. *J Clin Immunol*, 2013, 33, p. 84–95.
9. CUNNINGHAM-RUNDLES, C. *Human B cell defects in perspective*. *Immunol Res*, 2012, 54, p. 227–232.
10. CUNNINGHAM-RUNDLES, C., BODIAN, C. *Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients*. *Clin Immunol*, 1999, 92, p. 34–48.
11. ARDENIZ, O., CUNNINGHAM-RUNDLES, C. *Granulomatous disease in common variable immunodeficiency*. *Clin Immunol*, 2009, 133, p. 198–207.
12. BATES, CA., ELLISON, MC., LYNCH, DA., et al. *Granulomatous-lymphocytic lung disease shortens survival in common variable immunodeficiency*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114, p. 415–421.
13. PÉREZ, ERF. *Granulomatous lymphocytic interstitial lung disease*. *Immunol Allergy Clin N Am*, 2012, 32, p. 621–632.
14. BOUVRY, D., MOUTHON, L., BRILLET, PY., et al. *Granulomatous-associated common variable immunodeficiency disorder: a case-control study versus sarcoidosis*. *Eur Respir J*, 2013, 41, p. 115–122.
15. PARK, JES., BEAL, I., DILWORTH, JP., et al. *The HRCT appearance of granulomatous pulmonary disease in common variable immune deficiency*. *Eur J Radiol*, 2005, 54, p. 359–364.
16. TORIGIAN, DA., LAROSA, DF., LEVINSON, AI., et al. *Granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease associated with common variable immunodeficiency*. *J Thorac Imaging*, 2008, 23, p. 162–169.
17. CHUA, I., QUINTI, I. *Lymphoma in common variable immunodeficiency: interplay between immune dysregulation, infection and genetics*. *Curr Opin Hematol*, 2008, 15, p. 368–374.
18. HATAB, AZ., BALLAS, ZK. *Caseating granulomatous disease in common variable immunodeficiency treated with infliximab*. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116, p. 1161–1162.
19. DRAJNA, M., KOLEK, V., KALABUSOVÁ, B. *Koincidence CVID a sarkoidózy*. *Kazuistiky v Alergologii, pneumologii a ORL*, 2007, 1, s. 20–24.

20. VERBSKY, JW., ROUTES, JM. *Sarcoidosis and common variable immunodeficiency: similarities and differences.* Semin Respir Crit Care Med, 2014, 35, p. 330–335.

21. DOUBKOVÁ, M., MOULIS, M., SKŘIČKOVÁ, J. *Intersticiální plicní procesy a granulomatózy asociované s běžným variabilním imunodeficitem.* Vnitř Lek, 2015, 61, s. 119–124.

22. MORIMOTO, Y., ROUTES, JM. *Granulomatous disease in common variable immunodeficiency.* Current Allergy and Asthma Reports, 2005, 5, p. 370–375.

23. CHASE, NM., VERBSKY, JW., HINTERMEYER, MK., et al. *Use of combination chemotherapy for treatment of granulomatous and lymphocytic interstitial lung disease (GLILD) in patients with common variable immunodeficiency (CVID).* J Clin Immunol, 2013, 33, p. 30–39.

24. THATAYATIKOM, A., THATAYATIKOM, S., WHITE, AJ. *Infliximab treatment for severe granulomatous disease in common variable immunodeficiency: a case report and review of the literature.* Ann Allergy Asthma Immunol, 2005, 95, p. 293–300.

25. BUTON, CM., MILMAN, N., ANDERSEN, CB., et al. *Common variable immune deficiency and lung transplantation.* Scand J Infect Dis, 2007, 39, p. 362–367.

26. RESNICK, ES., MOSHIER, EL., GODBOLD, JH., et al. *Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades.* Blood, 2012, 119, p. 1650–1657.

27. MECHANIC, LJ., DIKMAN, S., CUNNINGHAM-RUNDLES, C. *Granulomatous disease in common variable immunodeficiency.* Ann Intern Med, 1997, 127, p. 613–617.

28. QUINTI, I., SORESINA, A., SPADALO, G., et al. *Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency.* J Clin Immunol, 2007, 27, p. 308–316.

29. LIESE, J., KLOOS, S., JENDROSSEK, V., et al. *Long-term follow-up and outcome of 39 patients with chronic granulomatous disease.* J Pediatr, 2000, 137, p. 687–693.

30. SALVATOR, H., MAHLAOU, N., CATHERINOT, E., et al. *Pulmonary manifestations in adult patients with chronic granulomatous disease.* Eur Respir J, 2015, 45, p. 1613–1623.

e-mail: doubkovamartina@seznam.cz

Vzácné granulomatózy – granulomatóza s polyangiitidou

MUDr. Martina Doubková, Ph.D.

Masarykova univerzita, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Brno, Klinika nemocí plicních a tuberkulózy

SOUHRN

Granulomatóza s polyangiitidou (GPA), dříve nazývaná Wegenerova granulomatóza (WG), je nekrotizující granulomatózní vaskulitida postihující respirační systém spojený s fokální segmentární nekrotizující glomerulonefritidou a různým stupněm diseminované vaskulitidy, postihující zejména cévy malého kalibru. GPA se řadí k vzácným autoimunitním onemocněním, patřícím mezi ANCA asociované vaskulitidy (AAV) a charakterizovaným granulomy a vaskulitidou. Popisujeme případ ženy s GPA s postižením životně důležitých orgánů a refrakterním průběhem onemocnění na konvenční terapii kortikoidy a cyklofosfamidem.

KLÍČOVÁ SLOVA

granulomatóza • vaskulitida • autoimunitní onemocnění • kortikoidy

SUMMARY

Doubková, M. Rare granulomatoses – granulomatosis with polyangiitis Polyangiitis with granulomatosis (GPA), formerly called Wegener's granulomatosis, is necrotizing granulomatous vasculitis affecting respiratory system. Disease is associated with focal segmental necrotic glomerulonephritis and varying degree of disseminated vasculitis affecting particularly small vessels. GPA is rare autoimmune disease belonging to ANCA associated vasculitis (AAV) characterized by granulomas and vasculitis. We describe a case of a woman with GPA with vital organ involvement and refractory to conventional therapy with corticoids and cyclophosphamide.

KEY WORDS

granulomatosis • vasculitis • autoimmune disease • corticoids

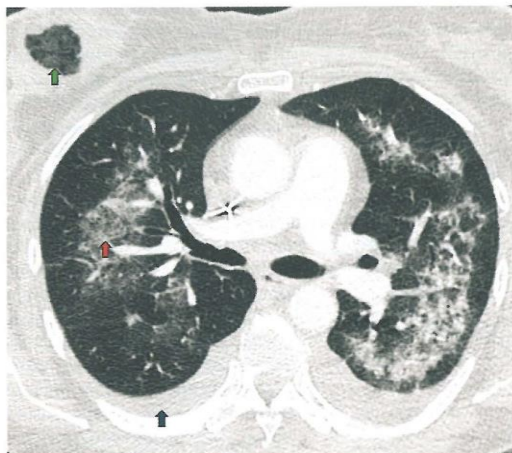
ÚVOD

Vaskulitidy jsou heterogenní skupina klinicko-patologických jednotek charakterizovaných zánětem cévní stěny s jejím možným poškozením až úplným zničením. Příznaky jsou celkové a lokální známky zánětu, spolu s následky poruchy zásobení tkání postiženou cévou. Granulomatóza s polyangiitidou (GPA) neboli starším názvem Wegenerova granulomatóza (WG) je nekrotizující granulomatózní vaskulitida postihující respirační systém, spojená s fokální segmentární nekrotizující glome-

rulonefritidou a různým stupněm diseminované vaskulitidy malých až středně velkých cév. Charakteristickým znakem GPA je koexistence vaskulitidy a granulomů. V **klasické formě** je GPA charakterizována triádou příznaků zahrnujících postižení horních a dolních dýchacích cest, plic a ledvin. Poprvé byla WG popsána v roce 1897 McBridem, detailněji v roce 1931 Klingerem a přesně definována byla Wegenerem v roce 1936.^(1,2)

POPIS PŘÍPADU

Padesátidvouletá pacientka (nekuřačka) byla vyšetřována mimo naši nemocnici pro patologický nález v pravém prsu, podle punkční biopsie bylo podezření na karcinomu *in situ*. Nález byl indikován k mastektomii. Pacientka pracovala jako vychovatelka a dosud se s ničím neléčila. Operace (mastektomie) ale musela být odložena, protože nastalo zhoršení nemocné. Nedříve došlo k zánětu středouší s teplotami, pak následovala hemoptýza a progredující oboustranná plicní infiltrace s respiračním selháním a těžkou hypoxemií. Nemocná byla indikována k umělé plicní ventilaci a současně byla zahájena léčba širokospektrými antibiotiky (úvodní C-reaktivní protein byl 104). Pro zvýšené renální parametry (urea 43, kreatinin 181) proběhla hemodialýza. Vzhledem k hemoptýze, dušnosti, anemii a radiologickému nálezu bylo vysloveno podezření na difuzní alveolární hemoragii. Na HRCT hrudníku byla difuzní oboustranná plicní infiltrace (opacita mléčného skla, noduly s kavitacemi, pleurální výpotek) (obr. 1). Bronchoskopické vyšetření s bronchoalveolární laváží potvrdilo diagnózu difuzní alveolární hemoragie (každá další porce získaná aspirací bronchoalveolární tekutiny byla zbarvena více hemoragicky). Mikrobiologické vyšetření bronchoalveolární tekutiny bylo negativní. Dále bylo zjištěno neurologické postižení (polyneuropatie). Na základě systémových projevů (postižení více různých orgánů, difuzní alveolární hemoragie, neuspokojivá reakce na antibiotickou léčbu) a při zjištěné výrazné pozitivitě PR3-c-ANCA (PR3 > 200 U/ml, norma do 5) bylo vysloveno podezření na c-ANCA vaskulitidu. Pro difuzní alveolární hemoragii, elevaci renálních parametrů a vysoký titer c-ANCA pacientka podstoupila pět plazmaferéz. Byla zahájena indukční léčba pulzy solumedrolu a cyklofosfamidu (v úvodní dávce 15 mg/kg) v režimu po dvou a třech týdnech. V mezidobí byla excízi ze sfenoidální dutiny potvrzena vaskulitida s nekrotózou a granulomy typu granulomatózy s polyangiitidou. Po 4. pulze cyklofosfamidu byla nemocná přeložena na chirurgii k mastektomii. Histopatologický nález z prsní tkáně ukázal



Obř. 1 HRCT hrudníku u pacientky s c-ANCA vaskulitidou typu granulomatózy s polyangiitidou. Oboustranná plicní infiltrace difúzní (červená šipka), pleurální výpotky (modrá šipka) a projasnění v měkkých tkáních pravého prsu (zelená šipka).

nekrotizující abscedující mastitidu bez průkazu vaskulitidy. Po šesti pulzech CF byla pacientka převedena na udržovací léčbu sestávající z kombinace kortikoidů + azathioprinu v konečné dávce 150 mg denně. Za 2,5 měsíce dochází opět ke vzestupu CRP, ANCA a ke klinickému zhoršení (plicní relaps – nová plicní zastínění, progresse v ORL oblasti, celkové příznaky únavy a teplot bez reakce na antibiotickou terapii). Podány opět pulzy solumedrolu i. v. a zajišťovací dva pulzy CF po dvou týdnech. Během léčby byl stav zkomplikován infekcí močových cest (etiologie: *Escherichia coli*). Vzhledem ke kumulativní dávce cyklofosfamidu a časnému relapsu po ukončení první indukční léčbě jsme přistoupili k podání rituximabu v „revmatologickém režimu“ 1 g D1, D15 a pak každého půl roku. Při léčbě trvá remise onemocnění a nejsou přítomny nežádoucí účinky léčby (sekundární hypogamaglobulinemie, pancytopenie, infekce).

DISKUSE

Klasifikace vaskulitid není jednotná a existuje mnoho způsobů jejich dělení. Na základě převažující velikosti a typu postižených cév se dělí na vaskulitidy malých, středních a velkých cév. Podle revidované nomenklatury vaskulitid z roku 2012 jsou vaskulitidy malých cév dále děleny na ANCA-asociované vaskulitidy (antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis, AAV) a imunokomplexové vaskulitidy.⁽³⁾ AAV jsou autoimunitní onemocnění charakterizované nekrotizujícím zánětlivým postižením malých cév. AAV jsou vzácná, ale velmi závažná až život ohrožující onemocnění. Mezi AAV řadíme tři klinické entity: granulomatózu s polyangiitidou (GPA, dříve nazývaná Wegenerova granulomatóza), mikroskopickou polyangiitidu (MPA) a eozinofilní granulomatózu s polyangiitidou (EGPA, dříve nazývaná syndrom Churga-Straussové).^(3, 4, 5) Diagnóza GPA vyžaduje splnění následujících kritérií podle American College of Rheumatology z roku 1990: pozitivní nález v ORL oblasti (záněty nosu a/nebo dutiny ústní), patologický nález na skiagramu hrudníku (zastínění s projasněním, noduly, plicní infiltráty), abnormální močový sediment (erytrocytární válečky), pozitivní biopsie s průkazem granulomatózního zánětu (tab. 1).⁽⁶⁾ Splnění dvou a více diagnostických kritérií bylo

spojeno se senzitivitou 88,2 % a specifitou 92 %. V práci z roku 1994 (Chapel Hill Conference Consensus) byla WG definována jako přítomnost granulomatózního zánětu respiračního traktu, nekrotizující vaskulitidy postihující cévy malého a středního kalibru (kapiláry, venuly, arterioly, arterie) a běžným nálezem je nekrotizující glomerulonefritida (tab. 2).⁽⁷⁾ Součástí výše uvedených kritérií není vyšetření ANCA (antineutrophil cytoplasmic antibody). Vzhledem k tomu, že existují rozdíly mezi anti-PR3-ANCA a anti-MPO-ANCA pozitivními pacienty, a to nejen podle klinických projevů, ale také v odpovědi na léčbu, můžeme očekávat, že typ ANCA pozitivivity bude součástí nových doporučení.^(8, 9) Nová klasifikační a diagnostická kritéria o vaskulitidách by měla být výsledkem studie DCVAS (Diagnostic and Classification of Criteria in Vasculitis) www.dcvas.org.^(4, 5) Výsledky zatím ale ještě nejsou k dispozici.

Tab. 1 Dělení vaskulitid malých cév. Nomenklatura podle konsenzu z konference Chapel Hill z roku 2012⁽³⁾

Vaskulitidy malých cév:

ANCA asociované vaskulitidy

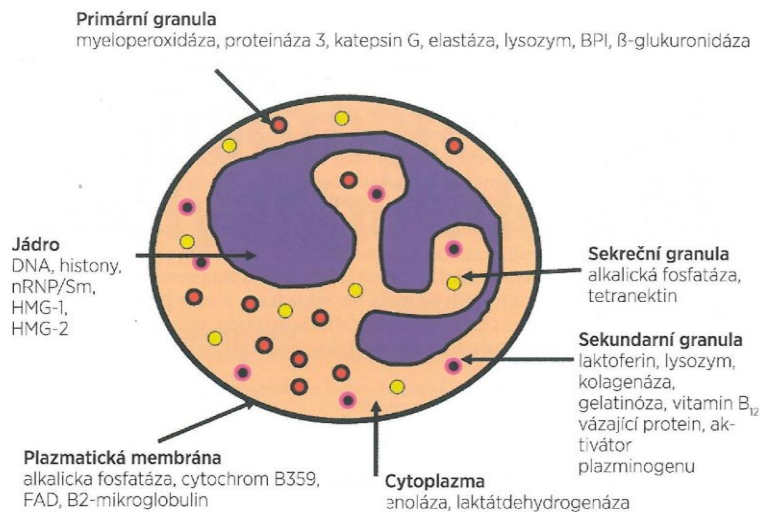
mikroskopická polyangiitida – MPA
granulomatóza s polyangiitidou (Wegenerova) – GPA
eozinofilní granulomatóza s polyangiitidou (Churga-Straussové) – EGPA

Tab. 2 Klasifikační kritéria pro diagnostiku Wegenerovy granulomatózy. Podle American College of Rheumatology z roku 1990. Pro diagnózu platí splnění dvou nebo více kritérií.⁽⁶⁾

zánět nosní nebo ústní sliznice charakterizovaný vznikem vředu nebo hnisavým či krvavým výtokem z nosu
přítomnost abnormalit na skiagramu hrudníku (uzly, fixní okrouhlé infiltráty nebo dutiny)
glomerulární mikroskopická hematurie nebo nález erytrocytárních válečků v sedimentu
granulomatózní zánět intra-, peri- nebo extravaskulárně prokázaný biopsií

Nejvíce epidemiologických dat o AAV je právě o GPA. Míra incidence GPA se podle řady populačních epidemiologických studií stabilně odhaduje mezi 8–9/1 000 000 za rok v Evropě, Spojených státech a na Novém Zélandu, v Japonsku je GPA vzácná. Roční incidence GPA je vyšší v severních regionech, zatímco v jižních regionech je vyšší MPA. Prevalence GPA je více heterogenní a pohybuje se od 24/1 000 000 ve Francii po 160/1 000 000 ve Švédsku. V Anglii v letech 1990–2005 bylo zjištěno celkem 295 pacientů (51,2 % mužů) s diagnózou GPA. Střední věk byl 59 let. Celková roční incidence GPA byla 8,4 na milion. Zvýšila se roční prevalence z 28,8 na milion v roce 1990 na 64,8 na milion v roce 2005. Stoupající prevalenci potvrzuje i německá studie Herlyn et al., která popisuje téměř dvounásobný nárůst prevalence u ANCA asociovaných vaskulitid mezi lety 1994–2006 ze 74 na 149/1 000 000 obyvatel.^(10, 11, 12) Pětileté přežití pacientů s GPA bylo 75 %, s MPA 45–75 % a EGPA 68–100 %. U pacientů s AAV je riziko smrti 2,7krát vyšší než u běžné populace.⁽¹³⁾

Na patogenезi AAV se pravděpodobně podílí více faktorů a neexistuje jedna univerzální příčina. Jedním z možných vysvětlení je předpoklad především vlivu virové nebo bakteriální (stafylokokové) infekce, která aktivuje antigen prezentující buňky (APC – antigen presenting cells) k produkci IL-23 (interleukin-23). Z naivních T-lymfocytů pod vlivem IL-23 vznikají Th-17 (T-helper 17). Th-17 způsobuje uvolnění prozánětlivých



Obr. 2 Neutrofilní granulocyt – schéma, obsah granulí a cíle autoprotilátek. Obrázek ukazuje cílové antigeny u neutrofilního granulocytu, nicméně autoprotilátky ANCA jsou namířeny i proti strukturám jiných buněk, například lyzosomů monocytů. Podle ^(14,20)

BPI – bactericidal/permeability-increasing protein, HMG1/2 – high mobility group protein 1-2, MPO – myeloperoxidáza, nRNP – ribonukleoprotein, PR3 – proteináza 3

cytokinů TNF- α (tumor necrosis factor α) a IL-1 beta z makrofágů, které stimulují neutrofilní granulocyty k expresi PR3 nebo MPO na svém povrchu. To vede k tvorbě ANCA, které reagují s těmito antigeny a způsobují aktivaci, adhezi, degranulaci neutrofilů, uvolnění kyslíkových radikálů a lyzosomálních enzymů vedoucích k poškození cévní stěny. Zhoršená funkce Treg a zvýšené uvolnění BAFF (B-cell activating factor) z aktivovaných neutrofilních granulocytů vedou k diferenciaci B-buněk v plazmatické buňky produkující ANCA (obr. 2). ^(14,19) ANCA jsou přítomny u AAV, u jiných vaskulitid (Kawasakio nemoc nebo obrovskobuněčná temporální arteriitida) nejsou detekovány nebo jen v malých titrech. Tyto autoprotilátky pravděpodobně ale nebudou hlavní příčinou AAV, nicméně mohou zesilovat zánětlivé procesy u některých pacientů a přispívat k orgánovému poškození. Současné studie ukazují i na úlohu buněčné imunity v patogenezi AAV. T-buňky, makrofágy a jiné složky imunitního systému včetně komplementu jsou zapojeny do patogeneze onemocnění. V patogenezi onemocnění se tak mohou uplatňovat jak vlivy infekční (*Staphylococcus aureus*), viz výše, tak i genetické a zevního prostředí (organické a anorganické látky – křemík, zevní znečištění, pesticidy). Je popsána genetická vazba mezi PR3-ANCA a variantami v genech *HLA-DP*, *SERPINA1* a *PRTN3*. ⁽⁷⁾ Základním histologickým obrazem při GPA je granulom, který může být lokalizován v cévě i mimo cévu, a základními buňkami jsou neutrofilní a částečně monocytární. Granulom vzniká shlukováním a dezintegrací neutrofilů, které jsou postupně obkloповány makrofágy a obrovskými mnohojadernými buňkami. Pro plně rozvinutý klinický obraz GPA je charakteristické následující histologické trias: nekrotizující granulomy v dýchacích cestách, nekrotizující anebo granulomatózní vaskulitida v plicích, ale i v jiných orgánech, a fokální segmentární nekrotizující glomerulonefritida.

Plně rozvinutý klinický obraz GPA je charakterizován přítomností nekrotizujícího granulomatózního zánětu respiračního

systému, systémovou nekrotizující vaskulitidou a nekrotizující glomerulonefritidou. Časté jsou i neúplně vyvinuté klinické formy, jako například poškození respiračního systému bez poškození ledvin. Právě tyto latentní, nekompletní, abortivní varianty GPA vedly k vypracování **ELK klasifikace**, kde písmeno E znamená horní dýchací cesty, L plíce, K ledviny. Klasická forma GPA se vyznačuje ELK triádou a představuje generalizované, systémové stadium nemoci, které obvykle začíná fází EL, kdy jsou zasaženy horní dýchací cesty a plíce. ⁽¹⁶⁾ Toto EL stadium se označovalo jako počáteční a nebylo a není možné předpovědět časové období, kdy přejde do generalizace. V klinickém obraze GPA jsou přítomny nespecifické celkové příznaky (teplota, únava, hubnutí, bolesti svalů a kloubů), spolu s projevy vyplývajícími z poškození jednotlivých orgánů. GPA může zasáhnout jakýkoliv orgán. Plíce jsou postiženy v 60-90 % případů, horní cesty dýchací v 75-93 % případů a ledviny v 85 % případů. ^(17, 18, 19) Poškození

horních dýchacích cest se projevuje pansinusitidou, vředy na sliznici nosu s destrukcí nosní přepážky a epistaxi, záněty středního ucha. Poškození dolních dýchacích cest a plic se projevuje kašlem, dušností, pohrudniční bolestí a hemoptýzou. Poškození ledvin se projevuje jako fokální segmentární glomerulonefritida s hematurií a proteinurií, eventuálně renálním selháním. GPA může postihnout i kůži, oči, nervový systém, srdce, prostata, děložní čípek, gastrointestinální trakt. Přesná diagnóza může být obtížná, ale je nutná, protože terapie GPA je život zachraňující. Diagnostika se kromě již popsaného klinického obrazu opírá o následující vyšetření. Bývá zvýšená sedimentace, leukocytóza, C-reaktivní protein, někdy i pozitivní revmatoidní faktor. Detekce c-ANCA je dobrým diagnostickým vodítkem. Přítomnost c-ANCA-PR3 se pozoruje u většiny pacientů, avšak c-ANCA nejsou zcela specifickým sérologickým znakem pro GPA. U malého množství nemocných může být pozitivní i p-ANCA-MPO. ANCA byly poprvé *in vitro* detekovány technikou nepřímé imunofluorescence (IIF indirect immunofluorescence), a to na etanolem fixovaných lidských granulocytech. Jednotlivé složky cytoplazmatických granulí se zde redistribuují podle svého elektrického náboje. IIF (immunofluorescence) – reakce se jeví jako difuzní, granulární, tj. cytoplazmatická (cytoplasmic pattern, c-ANCA), a perinukleární (perinuclear pattern, p-ANCA). Jednotlivé ANCA (antigeny) lze detekovat a kvantifikovat (stanovením jejich koncentrace) metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), do současné doby ale nebyly rozpoznány všechny antigenní cíle ANCA. Cílovým antigenem pro c-ANCA bývá ve většině případů autoprotilátka zaměřená proti serinové proteináze-3 (PR3-ANCA). Nicméně neplatí, že pozitivita c-ANCA rovná se pozitivita anti-PR3-ANCA. ⁽²⁰⁾ Pro průkaz ANCA je plně dostačující metoda ELISA (nebo jiná enzymová imunoanalýza), IIF (nepřímá imunofluorescence) jen u ANCA negativních. ⁽²¹⁾ Protilátky ANCA jsou obecně považovány za špatné biomar-

kery aktivity AAV, ale jsou vhodným prediktorem vzplanutí renálních a plicních projevů. Bylo zjištěno, že pacienti s AAV a pozitivitou PR3 reagují lépe na rituximab než na konvenční cyklofosfamid a dosahují častěji remise v 6. měsíci léčby nežli s cyklofosfamidem.⁽⁹⁾ Hlubší poznání patogeneze AAV vede k objevování dalších potenciálních biomarkerů a prediktorů.⁽²²⁾ Další vyšetření důležité pro diagnostiku a monitoraci onemocnění je vyšetření renálních funkcí, při kterém zjišťujeme pokles renálních funkcí, v moči bývá hematurie a proteinurie. Na skiagramu hrudníku nacházíme mnohočetné oboustranné nodulární stíny velikosti 1–9 cm. Většinou jsou dobře ohraničené, často s rozpadem. Někdy napodobují bronchogenní karcinom nebo metastázy. Zřídka se GPA projevuje jako difúzní intersticiální postižení. Rozsáhlejší zastínění může být projevem alveolárního krvácení. V porovnání se skiagramem hrudníku je při odhalování plicního postižení přesnější výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností (HRCT hrudníku). Plicní funkční vyšetření nemusí prokázat ventilační poruchu nebo je přítomna obstrukce, popřípadě restrikce se snížením difúze. Otorinolaryngologicky zjišťujeme postižení nosu a vedlejších nosních dutin. Často bývá přítomen zánět středního ucha. Diagnózu AAV lze mnohdy správně určit i bez znalosti biopsie. Rozhodnutí o biopsii a jejím místě se musí zvážit podle závažnosti procesu, náležitosti zahájení léčby, invazivitu procedury a pravděpodobné výtěžnosti. Biopsie ale diagnózu jednoznačně potvrdí a pomůže určit prognózu pacienta. Pro GPA je charakteristická vaskulitida s převahou neutrofilů, granulomy a nekróza. Při podezření na postižení ledvin má přednost biopsie ledvin (patologická klasifikace s kategoriemi určujícími prognostický význam stran renálního postižení). K usnadnění rozhodnutí o terapeutickém postupu jsou pacienti zařazeni do kategorií podle různé úrovně závažnosti onemocnění. Podle **klasifikace EUVAS** (European Vasculitis Society) lze na základě závažnosti projevů rozlišit pět kategorií vaskulitidy: formu lokalizovanou (postižení horních a dolních dýchacích cest, bez renálního postižení), časnou systémovou (život neohrožující), generalizovanou (ohrožení životních funkcí), těžkou renální (ohrožení životních funkcí a kreatinin > 500 μmol/l) a refrakterní.⁽²³⁾ Při určování aktivity onemocnění lze využít skórovací systémy, které jsou používány při léčbě vaskulitid. U GPA je to nejčastěji Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS).⁽²⁴⁾ Skóre zahrnuje jednak celkové příznaky (teploty, bolesti kloubů aj.), jednak dále hodnotí osm hlavních orgánových systémů (kůže, sliznice, uši, nos, krk, kardiovaskulární systém, gastrointestinální, renální a nervový systém). Míru chronického poškození hodnotí VDI (Vasculitis Damage Index).⁽²⁵⁾ Standardní léčbou GPA je podávání **cyklofosfamidu** v úvodní dávce 2 mg/kg/den perorálně nebo lépe pulzní režim 10–15 mg/kg intravenózně à 2–3 týdny spolu s **prednisonem** 1 mg/kg hmotnosti (nebo pulzy v celkové dávce 1–3 g) s postupným snižováním dávky.⁽²⁶⁾ Vysokodávkované kortikoidy jsou pravděpodobně zodpovědné za infekční komplikace více než cyklofosfamid.⁽²⁷⁾ Alternativním léčebným režimem je podávání jiných cytotoxických látek, většinou již méně účinných nebo spojených s časnými relapsy onemocnění (mykofenolát mofetil, metotrexát, imunosupresivní dávky imunoglobulinů), spolu s prednisonem.^(28, 29) Efekt léčby hodnotíme zejména podle klinických příznaků pacienta, zobrazovacích metod, laboratorních hodnot (renální funkce, CRP, eventuálně i podle poklesu titru c-ANCA). Onemocnění má značný sklon k relapsům (relaps se vyvine při dlouhodobém sledování až u 50 % nemocných), proto je nutno podávat dlouhodobě udržovací léčbu – azatioprin, rituximab,

mykofenolát mofetil a nízké dávky kortikoidů.^(30, 31) Udržovací terapie by měla být podávána nejméně 1,5–2 roky, i déle.⁽³²⁾ Léčba trimetoprim/sulfametoxazolem je účinná při manifestaci GPA v oblasti dýchacích cest a plic jako prevence infekce dýchacích cest, kdy snižuje výskyt relapsů onemocnění. U závažných forem s rychle progredujícím těžkým renálním postižením je na zvážení plazmaferéza.^(33, 34) Plazmaferéza by mohla být přínosná i u difúzní alveolární hemoragie (difúzní krvácení do plic), důkazy z randomizovaných studií chybí. Rituximab, chimérická monoklonální protilátka proti molekule CD20, je indikována v indukční terapii zejména u refrakterních a opakovaně relabujících pacientů s vysokou kumulativní dávkou nebo nežádoucími účinky cyklofosfamidu.^(35, 36, 37, 38) U refrakterních nebo relabujících pacientů jsou další léčebnou možností intravenózní imunoglobuliny, dalším slibným lékem se zdál být belimumab (monoklonální protilátka blokující aktivační faktor B-lymfocytů) nebo avacopan (selektivní inhibitor receptoru pro C5a). Nicméně podle posledních dostupných poznatků zůstává stále nejúčinnější dostupnou léčbou kombinace cyklofosfamidu a kortikoidů nebo rituximabu a kortikoidů.^(39, 40)

GPA je onemocnění provázené relapsy a remisemi. Lepší prognózu má izolované plicní postižení, významně horší prognóza je u pacientů s postižením ledvin. Zavedení léčby kortikoidy, a zejména cyklofosfamidem prodloužilo medián přežívání. Onemocnění má ale značný sklon k relapsům. Pětileté přežití nemocných se pohybuje okolo 50–60 %, někteří starší nemocní umírají na choroby nesouvisející se základní nemocí, k úmrtí mohou vést zejména infekční komplikace při imunosupresivní léčbě.^(19, 41)

ZÁVĚR

Etiopatogenetické mechanismy vzniku vaskulitid jsou komplexní a nejsou dosud zcela objasněny. Přesná a včasná diagnóza je stěžejní pro prognózu pacienta, ale může být obtížná. V některých případech a při fulminantním průběhu onemocnění se totiž nemůžeme opírat o histopatologický průkaz onemocnění, jak jsme ukázali v naší kazuistice (diagnóza byla potvrzena po zahájení indukční léčby), protože onemocnění má rychle se zhoršující průběh a včasně podaná terapie GPA sestávající z kombinované imunosuprese je život zachraňující.

Prohlášení: autorka nemá v souvislosti s tématem práce žádný střet zájmů.

Literatura

1. KLINGER, H. Grenzformen der periarteriitis nodosa [Borderline forms of periarteritis nodosa]. *Frankfurter Zeitschrift für Pathologie*. 1931, 42, p. 455–480.
2. WEGENER, F. Über generalisierte, septische Gefäßerkrankungen. *Verhandlungen der deutschen pathologischen Gesellschaft*, Stuttgart, 1936, 29, p. 202.
3. JENETTE, J.C., FALK, R.J., BACON, P.A., et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum*, 2013, 65, p. 1–11.
4. HRUŠKOVÁ, Z., TESAŘ, V. Novinky v klasifikaci (ANCA-asociovaných) vaskulitid. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL*, 2013, 10, p. 18–22.
5. HRUŠKOVÁ, Z., TESAŘ, V. Novinky v léčbě ANCA-asociovaných vaskulitid. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL*, 2013, 10, p. 3–8.
6. LEAVITT, R.Y., FAUCI, A.S., BLOCH, D.A., et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum*, 1990, 33, p. 1101–1107.
7. JENETTE, J.C., FALK, R.J., ANDRASSY, K., et al. Nomenclature of systemic vasculitides: The proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum*, 1994, 37, p. 187–192.
8. LYONS, P.A., RAYNER, T.F., TRIVEDI, S., et al. Genetically distinct subsets within ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med*, 2012, 367, p. 214–223.
9. DE UNIZONY, S., VILLARREAL, M., MILOSLAVSKY, E.M., et al. Clinical outcomes of treatment of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis based on ANCA type. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75, p. 1166–1169.
10. HERLYN, K., BUCKERT, F., GROSS, W.L., REINHOLD-KELLER, E. Doubled

- prevalence rates of ANCA-associated vasculitides and giant cell arteritis between 1994 and 2006 in northern Germany. *Rheumatology (Oxford)*, 2014, 53, p. 882–889.
11. MAHR, A., GUILLEVIN, L., POISSONNET, M., et al. Prevalence of polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, Wegener's granulomatosis and Churg-Strauss syndrome in a French urban multi-ethnic population in 2000: a capture-recapture estimate. *Arthritis Care Res*, 2004, 51, p. 92–99.
12. MOHAMMAD, AJ, JACOBSSON, LT., WESTMAN, KW., et al. Incidence and survival rates in Wegener's granulomatosis, microscopic polyangiitis, Churg-Strauss syndrome and polyarteritis nodosa. *Rheumatology (Oxford)*, 2009, 48, p. 1560–1565.
13. TAN, JA., DEGHAN, N., CHEN, W., ET AL. Mortality in ANCA-associated vasculitis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76, p. 1566–1574.
14. RADICE, A., SINICO, RA. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Autoimmunity*, 2005, 38, p. 93–103.
15. KALLENBERG, CG. Pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides. *Clin Exp Rheumatol*, 2015, 33, p. S11–14.
16. DE REMEE, RA. Wegener's granulomatosis: classification and therapy. *Acta Med Austriaca*, 1988, 15, p. 65–68.
17. HOLLE, JU., LAUDIEN, M., GROSS, WL. Clinical manifestations and treatment of Wegener's granulomatosis. *Rheum Dis Clin North Am*, 2010, 36, p. 507–526.
18. REINHOLD-KELLER, E., BEUGE, N., LATZA, U., et al. An interdisciplinary approach to the care of patients with Wegener's granulomatosis: long-term outcome in 155 patients. *Arthritis Rheum*, 2000, 43, p. 1021–1032.
19. HOFFMAN, GS., KERR, GS., LEAVITT, RY., et al. Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. *Ann Intern Med*, 1992, 116, p. 488–498.
20. DOUBKOVÁ, M., POKORNÁ, J. Autoprotiátky u systémových onemocnění pojivá a ANCA asociovaných vaskulitid, jejich vztah k intersticiálním plicním procesům a prognóze. *Vnitř Lék*, 2017, 63, p. 98–106.
21. DAMOISEAUX, J., CSERNOK, E., RASMUSSEN, N., et al. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76, p. 647–653.
22. BEČVÁR, R. Nové trendy v monitorování a léčbě ANCA asociovaných vaskulitid. *Vnitř Lék* 2018, 64, p. 164–168.
23. JAYNE, D. Update on the European Vasculitis Study Group trial. *Curr Opin Rheumatol*, 2001, 13, p. 48–55.
24. SUPPIAH, R., MUKHTYAR, C., FLOSSMANN, I., et al. A cross-sectional study of the Birmingham Vasculitis Activity Score version 3 in systemic vasculitis. *Rheumatology (Oxford)*, 2011, 50, p. 899–905.
25. EXLEY, AR., BACON, PA., LUGMANI, RA., et al. Development and initial validation of the Vasculitis Damage Index for the standardized clinical assessment of damage in the systemic vasculitides. *Arthritis Rheum*, 1997, 40, p. 371–380.
26. DE GROOT, K., HARPER, L., JAYNE, DR., et al. Pulse versus daily cyclophosphamide for induction of remission in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: a randomized trial. *Ann Intern Med*, 2009, 150, p. 670–680.
27. WALSH, M., MERKEL, PA., PEH, CA., et al.; PEXIVAS Investigators. *Trials*, 2013; 14:73.
28. JONES, RB., HIEMSTRA, TF., BALLARIN, J., et al. Mycophenolate mofetil versus cyclophosphamide for remission induction in ANCA-associated vasculitis: a randomised, non inferiority trial. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78, p. 399–405.
29. DE GROOT, K., RASMUSSEN, N., BACON, PA., et al. Randomized trial of cyclophosphamide versus methotrexate for induction of remission in early systemic antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum*, 2005, 52, p. 2461–2469.
30. JAYNE, D., RASMUSSEN, N., ANDRASSY, K., et al. A randomized trial of maintenance therapy for vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *N Engl J Med*, 2003, 349, p. 36–44.
31. GUILLEVIN, L., PAGNOUX, C., KARRAS, A., et al. Rituximab versus azathioprine for maintenance in ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med*, 2014, 371, p. 1771–1780.
32. HOLLE, JU., GROSS, WL. Treatment of ANCA-associated vasculitides (AAV). *Autoimmune Rev*, 2013, 12, p. 483–486.
33. JAYNE, DR., GASKIN, G., RASMUSSEN, N., et al. Randomized trial of plasma exchange or high-dosage methylprednisolone as adjunctive therapy for severe renal vasculitis. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18, p. 2180–2188.
34. WALSH, M., CASIAN, A., FLOSSMANN, O., et al. Long-term follow-up of patients with severe ANCA-associated vasculitis comparing plasma exchange to intravenous methylprednisolone treatment is unclear. *Kidney Int*, 2013, 84, p. 397–402.
35. JONES, RB., TERVAERT, JW., HAUSER, T., et al. Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis. *N Engl J Med*, 2010, 363, p. 211–220.
36. JONES, RB., FURUTA, S., TERVAERT, JW., et al. Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis: 2 year results of a randomised trial. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74, p. 1178–1182.
37. STONE, JH., MERKEL, PA., SPIERA, R., et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med*, 2010, 363, p. 211–232.
38. GEETHA, D., SPECKS, U., STONE, JH., et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26, p. 976–985.
39. JAYNE, DRW., BRUCHFELD, AN., HARPER, L., et al. Randomized trial of C5a receptor inhibitor Avacopan in ANCA-associated vasculitis. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28, p. 2756–2767.
40. LENERT, A., LENERT, P. Current and emerging treatment options for ANCA-associated vasculitis: potential role of belimumab and other BAFF/APRIL targeting agents. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9, p. 333–347.
41. COMARMOND, C., CACOUB, P. Granulomatosis with polyangiitis (Wegener): clinical aspects and treatment. *Autoimmun Rev*, 2014, 13, p. 1121–1125.

e-mail: doubkovamartina@seznam.cz

6.7. Imunodeficiency in the differential diagnosis of interstitial lung processes (Doubková M, Špeldová J, Chovancová Z. *Vnitř Lék.* 2019; 65(11): 685-693)

přehledné referáty | 685

Imunodeficiency in the differential diagnosis of interstitial lung processes

Martina Doubková¹, Jana Špeldová¹, Zita Chovancová²

¹ *Klinika nemocí plicních a tuberkulózy LF MU a FN Brno, pracoviště Bohunice*

² *Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny v Brně*

Souhrn

Intersticiální plicní procesy (IPP), neboli difúzní parenchymatózní onemocnění plic, jsou širokou skupinou onemocnění, která jsou charakterizována různým stupněm plicní fibrózy a zánětu, a to nejen na úrovni plicního intersticia. IPP se vyskytují zejména v dospělosti s maximem manifestace mezi 40.–70. rokem věku. Ačkoli se IPP vyskytují nejčastěji samostatně jako základní diagnóza, patří též do portfolia plicního postižení u pacientů s některými primárními imunodeficiencemi. Autoři prezentují kazuistiky pacientů s primárními imunodeficiencemi, u kterých se vyskytuje intersticiální plicní postižení a které se zároveň mohou manifestovat až v dospělém věku. Jedná se zejména o běžnou variabilní imunodeficienci (Common Variable Immunodeficiency – CVID) a deficienci cytotoxického T-lymfocytárního antigenu 4 (CTLA4). Navíc uvádí kazuistiku pacienta se silikózou, u kterého byla zjištěna významná lymfocytopenie. U pacientů s nově zjištěným intersticiálním plicním postižením tedy musíme myslet na rozvoj primární poruchy imunitního systému. Základní imunologické laboratorní vyšetření humorální a buněčné imunity by proto mělo tvořit nezbytnou součást diferenciativně diagnostického algoritmu intersticiálních plicních postižení.

Klíčová slova: běžná variabilní imunodeficiency – deficiency cytotoxického T-lymfocytárního antigenu 4 – imunologické laboratorní vyšetření – intersticiální plicní procesy – primární imunodeficiency

Immunodeficiency in the differential diagnosis of interstitial lung diseases

Summary

Interstitial lung processes (IPP), or diffuse parenchymal lung diseases, are a broad group of diseases characterized by varying degrees of pulmonary fibrosis and inflammation affecting predominantly, but not exclusively, pulmonary interstitium. IPP mostly occur in adulthood with maximum manifestation between 40 and 70 years of age. Although IPP mostly present as a primary diagnosis, they also belong to the portfolio of pulmonary disorders in patients with primary immunodeficiencies. The authors present case reports of patients with interstitial lung involvement and primary immunodeficiencies [particularly those manifesting also in adulthood, such as common variable immunodeficiency (CVID), and cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) deficiency]. In addition, we report the case of silicosis patient with severe lymphopenia. Therefore, in patients with newly diagnosed interstitial lung disease, congenital immune system disorder should be considered. Basic immunological laboratory examination of humoral and cellular immunity should be an essential part of the differential diagnosis algorithm for interstitial lung disease.

Key words: common variable immunodeficiency – cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) deficiency – immunology laboratory investigation – interstitial lung disease – primary immunodeficiencies

Úvod

Intersticiální plicní procesy (IPP), jinak zvané i difúzní parenchymatózní nemoci plic, jsou širokou skupinou onemocnění. IPP jsou charakterizovány různým stupněm zánětu a plicní fibrózy nejen na úrovni plicního intersticia, ale i plicních kapilár, endotelu a bronchiolů

(dle Americké hrudní společnosti/American Thoracic Society – ATS) [1]. Tato skupina chorob má řadu společných rysů, včetně podobných klinických příznaků, radiologického nálezu a obdobné patofyziologie. Z těchto důvodů není často diferenciativní diagnostika snadná. Uplatňuje se multidisciplinární přístup vyžadující spolupráci mezi

Vnitř Lék 2019; 65(11): 685–693

kliniky a radiology, chirurgie a patology. IPP se třídí do skupin podle různých hledisek: na IPP ze známých příčin, idiopatické intersticiální pneumonie, granulomatózní procesy a jiné [1]. IPP mohou být primární (sarkoidóza) nebo sekundární spojené s jinými onemocněními a setkáváme se s nimi také u jedinců s primárními či sekundárními poruchami imunitního systému.

Etiopatogeneze IPP není sice dosud objasněna, nicméně se předpokládá, že se na jejich rozvoji významným způsobem podílejí mechanismy imunitního systému [1]. V roce 1973 byla poprvé popsána přítomnost folikulárních agregátů v bronchiální stěně králíků, která byla nazvána „s bronchy asociovaná lymfatická tkáň“ (Bronchus Associated Lymphoid Tissue – BALT), která byla řazena původně mezi sekundární lymfatické orgány (SLO) podobně jako lymfatické uzliny, slezina nebo s gastrointestinálním traktem asociovaná lymfatická tkáň (GALT) včetně Peyerových plátů ve střevě [2,3]. SLO vytvářejí optimální prostředí pro rozvoj imunitní odpovědi a dochází v nich ke kontaktu mezi T-lymfocyty a B-lymfocyty a antigen prezentujícími dendritickými buňkami. Později bylo zjištěno, že se BALT značně odlišuje od SLO charakteru Peyerových plátů ve střevě [4], a proto byla následně zařazena mezi tzv. terciární lymfatické orgány (TLO). Ty představují vysoce organizované imunologické struktury, které vznikají v místě infekce, autoimunitních procesů, chronické imunitní stimulace nebo nádorového bujení [5]. Podílejí se na rozvoji a udržování imunitní odpovědi zejména v případech přetrvávající extravazace leukocytů a přítomnosti dostatečného množství antigenů, tak jak je tomu např. v místě chronické infekce, autoimunitních procesů nebo rejekce transplantátu [5]. BALT byla nalezena u IPP v rámci CVID, systémových onemocnění pojiva, idiopatické plicní fibrózy, hypersenzitivní pneumonie, a podílí se tak pravděpodobně na rozvoji zánětu a plicní fibrózy [6,7].

Většina imunodeficientních onemocnění není dnes chápána pouze jako porucha funkce imunitního systému ve smyslu prostého snížení jeho funkce, ale komplexněji též v rámci přítomné dysregulace imunitního systému. S tím souvisí také to, že s celou řadou imunodeficientních onemocnění se pojí vyšší výskyt autoimunitních procesů. Prakticky všechny imunodeficientní stavy mohou mít i respirační symptomatologii. Navíc u některých z nich může dojít přímo k rozvoji intersticiálního plicního procesu tak jako v následujících kazuistikách.

Kazuistiky

Kazuistika 1: Běžná variabilní imunodeficiency (CVID)

22letá pacientka (nekuřačka) byla přijata na plicní kliniku pro oboustrannou plicní infiltraci s podezřením na pneumonii. Její osobní anamnéza byla z pohledu sledovaných onemocnění bez pozoruhodností. Udávala však, že od 16 let trpěla častějšími infekcemi horních dýchacích cest. Nicméně otitidu, sinusitidu, meningitidu nebo pneumonii v minulosti nikdy neprodělala. Pracovala v obchodě

s textilem. Kromě hormonální antikoncepce neužívala pravidelně žádné léky. Biochemické vyšetření a krevní obraz byly v normě. Po přeléčení pneumonie antibiotickou léčbou nedošlo k regresi radiologického nálezu. Na HRCT hrudníku byla stále přítomna oboustranná nehomogenní plicní infiltrace s hraniční hilovou a mediastinální lymfadenopatií (obr. 1). Bronchoskopie s bronchoalveolární laváží (BAL) ukázala lymfocytární alveolitidu (60 % lymfocytů v BAL; norma < 15 %), mikrobiologie byla negativní. Pro podezření na intersticiální plicní proces bylo u pacientky indikováno provedení plicní biopsie. Histopatologicky (chirurgická plicní biopsie) byl prokázán intersticiální plicní proces s bronchiolární akcentací lymfocytárních infiltrátů s mírnou plicní fibrózou a přítomností granulomů bez nekrozy. V diferenciální diagnostice se zvažovala hypersenzitivní pneumonie, systémové onemocnění pojiva nebo polékové postižení. Vytvářející příčina plicního postižení zjištěna nebyla. Pacientce byla nasazena imunosupresivní léčba systémovými kortikoidy (metylprednisolon v dávce 24 mg denně), při které došlo k téměř kompletní radiologické regresi. Snižování dávek kortikoidů však vedlo k relapsu onemocnění. Při doplnění základního imunologického laboratorního vyšetření byla prokázána hypogamaglobulinemie ve všech imunoglobulinových třídách [IgG 1,51 g/l (referenční rozmezí 7,51–15,6 g/l); IgM 0,10 g/l (0,4–2,3 g/l); IgA 0,08 g/l (0,7–4,0 g/l); IgE < 1 U/l (0–90 U/l)]. Proto bylo u pacientky vysloveno podezření na diagnózu běžné variabilní imunodeficiency (CVID). U pacientky byly vyloučeny sekundární ztráty imunoglobulinů a zjištěna snížená koncentrace specifických protilátek proti proteinovým i polysacharidovým antigenům (protilátky ve třídě IgG proti tetanickému toxoidu 0,037 IU/ml – protektivní hodnoty > 0,12 IU/ml), proti pneumokokovým pouzderým polysacharidům

Obr. 1. HRCT hrudníku u pacienta s GLID/CVID.

Hraniční lymfadenopatie mediastinální a hilová, nepravidelné centrilobulární opacity (bílá šipka), nodularity zejména subpleurální (červená šipka), bronchiektázie/bronchioloektázie (zelená šipka). IPP byla histologicky verifikována jako GLILD/CVID. Z archivu autorky



< 3,3 mg/l (protektivní hodnoty > 15,4 mg/l) a proti *Haemophilus influenzae* typu b 0,011 mg/l (> 0,09 mg/l). U pacientky byla zahájena intravenózní substituční imunoglobulinová léčba v dávce 25 g měsíčně. Histopatologický plicní nálezn byl na podkladě výše uvedených skutečností přehodnocen a změněn na diagnózu granulomatózního lymfatického intersticiálního onemocnění plic (Granulomatous and Lymphocytic Interstitial Lung Disease – GLILD), které patří do obrazu možného intersticiálního postižení plicní tkáně u pacientů s CVID. V terapii IPP bude i nadále pokračováno s imunosupresivní léčbou kortikoidy v udržovací dávce mezi 5–15 mg/kg/den. Vzhledem k rozsahu IPP, funkčnímu postižení, nutnosti vyšších dávek kortikoidů (> 15 mg/kg/den) a netoleranci azatioprinu, je plánována kombinovaná léčba s antiCD20-monoklonální protilátkou.

Běžná variabilní imunodeficiency (Common Variable Immunodeficiency – CVID) patří mezi nejčastější symptomatické protilátkové imunodeficiency. Z této heterogenní skupiny onemocnění bylo do dnešní doby vyčleněno několik nových nozologických jednotek, protože byly identifikovány genetické mutace vedoucí ke klinickému a laboratornímu obrazu CVID [8]. Toto onemocnění je charakterizováno snížením koncentrace celkových imunoglobulinů ve třídě IgG a IgA nebo IgM; pacienti mají také porušenou protilátkovou odpověď po antigenní stimulaci a jsou vyloučeny ostatní příčiny hypogamaglobulinémie. V roce 2016 byla publikována nová diagnostická kritéria tohoto onemocnění (tab. 1) [9]. V popředí

klinických příznaků pacientů s diagnózou CVID stojí opakované závažné infekce zejména ORL oblasti a dýchacích cest (otitidy, sinusitidy, pneumonie). Nejčastějším chronickým plicním nálezem jsou bronchiektázie jako výsledek opakujících se plicních zánětů. Do obrazu plicního postižení patří u těchto pacientů i kombinace granulomatózního plicního postižení v kombinaci s lymfoproliferací (GLILD). Výrazem dysregulace funkce imunitního systému těchto pacientů je vyšší frekvence výskytu autoimunitních onemocnění (zejména hematologických, ale i jiných), lymfoproliferativních poruch (generalizovaná lymfadenopatie, splenomegalie), ale také zvýšená frekvence maligních onemocnění zejména gastrointestinálního a lymfatického systému (tab. 2) [10]. Základem léčby těchto pacientů je substituční imunoglobulinová léčba, která je aplikována buď intravenózně nebo subkutánně, a dále symptomatická léčba infekcí a dalších přidružených komplikací tohoto onemocnění [11].

Kazuistika 2: Deficiency cytotoxického T-lymfocytárního antigenu 4 (CTLA4)

25letá pacientka (nekuřačka) dlouhodobě sledovaná pro juvenilní revmatoidní artritidu, opakované iridocyklidy, kortikodependentní ložiskové postižení mozku manifestující se epileptickými záchvaty typu grand mal, neuropatií a zánětlivě střevní onemocnění, byla odeslána pro dušnost a podezření na intersticiální plicní proces dle zobrazovacích metod. Na HRCT hrudníku byla patrná nodulární plicní infiltrace s predilekcí vpravo (obr. 2). Bron-

Tab. 1. Diagnostická ICON kritéria stanovení diagnózy běžné variabilní imunodeficiency (CVID). Upraveno podle [9]

alespoň jedna klinická manifestace imunodeficiency: infekce, autoimunita, lymfoproliferace (pokud jsou ale splněny body 2 a 5, není tato manifestace bezpodmínečně nutná, zejména u osob s pozitivní rodinnou anamnézou)

opakovaně prokázané snížení koncentrace IgG pod dolní referenční mez

snížení koncentrace IgA nebo IgM pod dolní referenční mez

prokázání porušené protilátkové odpovědi po vakcinaci (nízká odpověď po antigenní stimulaci proteinovým nebo polysacharidovým antigenem)

vyloučení jiných příčin hypogamaglobulinémie

není třeba provádět molekulárně genetické testy na geny asociované s fenotypem CVID

CVID diagnózu se nedoporučuje stanovovat u pacienta mladšího 4 let, nicméně věkový faktor v ICON kritériích zahrnut přímo není

Tab. 2. Základní klinické příznaky u pacientů s dg. CVID, CTLA4 deficiency a CD4 lymfocytopenie

CVID [10]	pneumonie (32 %), autoimunitní onemocnění (29 %), splenomegalie (26 %), bronchiektázie (23 %), granulomy (9 %), enteropatie (9 %), solidní tumory (5 %), meningitidy/encefalitidy (4 %), lymfomy (3 %)
CTLA4 deficiency [15]	plicní postižení (GLILD, fibróza, bronchiektázie), cytopenie (autoimunitní hemolytická anémie, trombocytopenie nebo neutropenie), gastrointestinální postižení (průjmy, enteropatie), autoimunitní onemocnění (diabetes mellitus 1. typu, autoimunitní tyreoiditida, artritida, psoriáza, uveitida, vitiligo, myastenia gravis), lymfadenopatie, splenomegalie, lymfocytární infiltrace nelymfoidních orgánů (plíce, kostní dřeň, střevo, mozek), malignity
CD4 lymfocytopenie [18]	infekce 75 % : virové infekce (lidský papilomavirus, herpetická meningoencefalitida, diseminovaný herpes, hepatitida, progresivní multifokální leukoencefalopatie, infekce <i>Mycobacterium tuberculosis</i> nebo jinými mykobakteriemi, pneumonie způsobená <i>Pneumocystis jirovecii</i>); houbové infekce (orální, kožní a vaginální kandidóza, kryptokoková meningitida a osteomyelitida, onychomykóza); malignity 40 % (leptomeningeální lymfom, Hodgkinův a nonHodgkinův lymfom, karcinom – prostaty, štítné žlázy, tlustého střeva, invazivní skvamózní buněčný karcinom, adrenokortikotropní hormon produkující adenom); autoimunitní onemocnění 21 % (idiopatická trombocytopenická purpura a anémie, Sjögrenův syndrom, systémový lupus erythematosus, lichen planus); neurologická onemocnění 13 % (subakutní zánětlivá demyelinizační polyradikuloneuropatie, neuropatie)

choskopicky z bronchoalveolární laváže byla potvrzena lymfocytární alveolitida a transbronchiální plicní biopsie prokázala lymfocytární celulizaci s mnohоядерnými pěnitými buňkami. Nemocná užívala vzhledem ke své diagnóze juvenilní revmatoidní artritidy imunosupresivní léčbu (kortikoidy a cyklosporin). Plicní nález byl uzavřen jako intersticiální plicní proces v rámci zatím neklasifikovaného systémového onemocnění s multiorgánovým postižením (plíce, klouby, CNS, oči, gastrointestinální trakt). Při imunologickém laboratorním vyšetření byla zjištěna snížená koncentrace imunoglobulinů (IgG 2,71 g/l, IgM 0,22 g/l, IgA 0,08 g/l) a nemocná byla pro nespecifický imunodeficientní syndrom nejasné etiologie podávána intravenózní substituční imunoglobulinová terapie (IntraVenous ImmunoGlobulin – IVIG). V průběhu let došlo i přes zavedenou léčbu (IVIg, metotrexát, azatioprin, cyklosporin, leflunomid) k progresi intersticiálního plicního postižení, zhoršení neurologického nálezu a zánětlivého střevního onemocnění. Histologické vyšetření vzorků střevní tkáně nepotvrdilo diagnózu idiopatického zánětlivého střevního onemocnění. U pacientky bylo následně provedeno genetické vyšetření, které prokázalo deficit cytotoxického T-lymfocytárního antigenu 4 (CTLA4). Tato mutace by mohla být kauzální a vést k výše uvedeným autoimunitním projevům. Pacientka je indikována k terapii abataceptem (molekula CTLA4 fúzovaná s Fc částí imunoglobulinu IgG), ovlivňujícím činnost T-lymfocytů a působícím imunosupresivně.

Cytotoxický T-lymfocytární antigen 4 (CTLA4) je zásadním velmi významným regulátorem imunitní odpovědi. Je konstitutivně exprimován na povrchu regulačních T-lymfocytů (Treg), přičemž na ostatních T-lymfocytech se objevuje až po jejich stimulaci [12].

Obr. 2. HRCT hrudníku u pacientky se vzácným onemocněním, CTLA4 deficiencí (cytotoxický T-lymfocyte-associated protein 4 deficiencí), onemocněním, které je charakterizováno granulomy obsahujícími CD4⁺ T-lymfocyty. Nodulární zastínění s predilekcí vpravo (červená šipka). Z archivu autorky



Vnitř Lék 2019; 65(11): 685–693

CTLA4 hraje zásadní roli v udržování imunitní homeostázy, protože představuje kontrolní bod (checkpoint) sloužící k regulaci imunitní odpovědi. CTLA4 jako inhibiční receptor na povrchu T-lymfocytů soutěží s aktivním receptorem CD28 o vazbu 2 společných ligandů CD80 a CD86 na povrchu antigen prezentujících buněk, přičemž afinita a avidita vazby CTLA4 na CD80 a CD86 je v porovnání s CD28 vyšší [13]. Po vazbě ligandů CD80 a CD86 na receptor CTLA4 dochází k jejich internalizaci do nitra buňky, čímž dochází ke snížení aktivity T-lymfocytů zprostředkované antigen prezentujícími buňkami. Pacienti s CTLA4 deficiencí tedy vykazují klinické příznaky související s dysregulací imunitního systému. Mezi základní příznaky patří náchylnost k závažným respiračním infekcím, průjmy, rozvoj nejrůznějších autoimunitních onemocnění a přítomnost lymfocytárních infiltrátů a tvorby granulomů (tab. 2). Kromě náchylnosti k infekčním komplikacím pacienti trpí autoimunitním onemocněním (tyreoiditidy, cytopenie). Podobně jako u CVID i v tomto případě nacházíme IPP typu GLLD s plicními noduly a lymfocytárními infiltráty, splenomegalií a lymfadenopatií. Léčba těchto pacientů spočívá v řešení imunodeficiency i dysregulace imunitního systému. Imunodeficiency je zmírňována podáváním substituční imunoglobulinové léčby, někdy též s nutností antibiotické profylaxe. Pro léčbu dysregulace imunitního systému však neexistují žádné doporučené postupy. Nejčastěji se používají kortikoidy, jisté zkušenosti jsou i s používáním jiných imunosupresivních léčiv (rituximab, mykofenolát mofetil, cyklosporin A nebo anti-TNF léčba či vedoluzimab) [14,15]. Možností léčby těchto pacientů je také podávání abataceptu (CTLA4 fúzního proteinu, který je registrován pro léčbu revmatoidní artritidy), který by mohl sloužit jako substituce CTLA4 při jeho nedostatku u těchto pacientů [16]. U těžkých případech je ke zvažení též provedení transplantace hematopoetických krevních buněk [15].

Kazuistika 3: Deficit buněčné imunity (lymfocytopenie; podezření na idiopatickou CD4⁺ lymfocytopenii)

57letý pacient (bývalý kuřák) byl přijat na plicní kliniku pro rozsáhlou oboustrannou plicní infiltraci s pleurálním výpotkem charakteru exsudátu s mediastinální lymfadenopatií (obr. 3), teplotami a zánětlivou aktivitou (CRP 90 mg/l; referenční rozmezí 0–10 mg/l). Chronicky žádnou medikaci neužíval. Pracoval jako výtvarník a sochař (práce s pískovcem). V předchorobí netrpěl na opakované infekce. V diferenciálním rozpočtu leukocytů byl patrný pokles absolutního počtu lymfocytů ($0,21 \times 10^9/l$; referenční rozmezí $0,8–4,0 \times 10^9/l$). Tato lymfocytopenie přetrvávala po celou dobu našeho sledování, a to i po přeléčení pneumonie s poklesem zánětlivých parametrů. Stav byl uzavřen jako oboustranná pneumonie, ale vzhledem k pouze částečné regresi plicního nálezu po antibiotické léčbě a podezření na IPP proces včetně pneumokoniózy byla s odstupem provedena plicní biopsie. Histologicky (chirurgická plicní biopsie) byla prokázána chronická forma silikózy s nevratnými fibrotic-

kými změnami (vazivovatění jemné plicní tkáně). Při laboratorním vyšetření se zaměřením na imunologické parametry byly vyšetřeny základní buněčné lymfocytární subpopulace s nálezem sníženého absolutního i relativního počtu pomocných CD4⁺ Th lymfocytů: 0,01 × 10⁹/l (referenční mez 0,30–1,40 × 10⁹/l), 10 % (referenční mez 28–57 %). Koncentrace celkových imunoglobulinů byla v normě, vyšetřené autoprotilátky (ANA, anti-ENA, RF, anti-CCP, ANCA) byly negativní. Při pátrání po etiologii těžké CD4⁺ lymfocytopenie jsme vyloučili HIV infekci. V diferenciálním rozpočtu leukocytů odebraném praktickým lékařem před 2 a 7 lety byl též přítomen pokles absolutního počtu lymfocytů (0,10 × 10⁹/l a 0,15 × 10⁹/l). Další imunologické vyšetření již pacient nepodstoupil, protože zemřel měsíc po chirurgické plicní biopsii na virovou pneumonii (virus influenzae typu A). Při pitvě se nezjistila jiná patologie (autoimunita nebo malignita) než silikóza a oboustranná pneumonie. I když pacient trpěl několik let opakovaně prokázanou lymfopenií v absolutních počtech, diagnóza idiopatické CD4⁺ lymfocytopenie u něj nebyla jednoznačně prokázána, protože pro její stanovení je zapotřebí potvrdit pokles CD4⁺ více než jednou (tab. 3). Nicméně jako kazuistiku jej zde uvádíme, abychom upozornili i na méně běžné imunodeficiency s plicními projevy.

Idiopatická CD4⁺ lymfocytopenie (ICL) je vzácný heterogenní syndrom, popsán poprvé v roce 1992 [17]. Příčina ICL není známa. ICL je charakterizována perzistujícím snížením počtu CD4⁺ T-lymfocytů. Diagnóza je stanovena per exclusionem po vyloučení přítomnosti HIV infekce a všech ostatních příčin sekundární lymfocytopenie (tab. 3) [18]. Celosvětově bylo popsáno méně než 300 případů tohoto onemocnění, ale skutečná prevalence, stejně tak jako patogeneze tohoto stavu zůstávají neznámé [19]. I když jsou někteří pacienti asymptomatictí, většina pacientů trpí oportunními in-

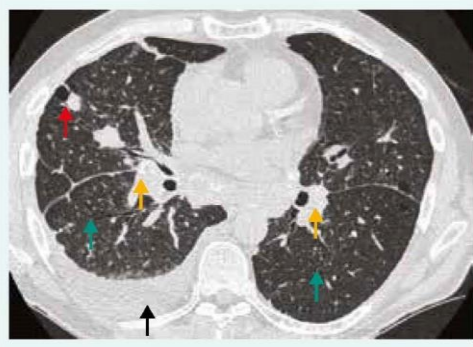
fekcemi připomínajícími infekce u HIV pozitivních pacientů a také mají vyšší riziko rozvoje zejména hematologických malignit [20]. Mezi další klinické příznaky patří rozvoj autoimunitních nebo neurologických onemocnění (tab. 2). Z autoimunitních onemocnění postihujících intersticiu je to např. systémový lupus erythematoses nebo Sjögrenův syndrom. Kromě profylaktické antibiotické léčby neexistuje žádná standardní doporučená léčba a u symptomatických pacientů je doporučováno při prevenci oportunních infekcí postupovat podobně jako u HIV pacientů. Profylaktické podání antibiotika (nejčastěji sulfametoxazol/trimetoprim) je indikováno, pokud počet CD4⁺ T-lymfocytů poklesne pod 200 buněk/mm³ [19].

Patogeneze IPP

Přesný mechanismus a charakteristika vyvolávajících příčin rozvoje řady IPP nejsou známy. Nicméně základním obecným imunopatologickým podkladem většiny IPP je zánět plicní tkáně, který je i základním profibrotickým procesem. Mechanismus se u jednotlivých IPP liší. Všechny imunokompetentní buňky spolu se svými cytokiny, které se podílejí na vzniku a udržování zánětu (makrofágy, lymfocyty, polymorfonukleární leukocyty), mají potenciál vyvolat proces plicní fibrotické přestavby. Tradiční představa patogeneze většiny IPP je, že známé či neznámé agens vyvolá poškození pneumocytů I. typu nebo endotelií, a na toto poškození navazuje zánětlivá a imunitní odpověď organismu (rozvoj alveolitisy s migrací alveolárních makrofágů, eozinofilních a neutrofilních leukocytů, lymfocytů, žírných buněk), která postupně při přetrvávající přítomnosti vyvolávajícího činitele vede k poškození alveolokapilární jednotky, k aktivaci fibroblastů spojené se zvýšenou produkcí extracelulární matrix a postupnému ukládání kolagenu do plicního intersticia [21].

U pacientů s primárními imunodeficiency vidíme často lymfoproliferativní onemocnění, která zasahují také plicní tkáň. Mezi nejčastější formy tohoto postižení patří folikulární bronchiolitida, nodulární lymfoidní hyperplazie, lymfocytární intersticiální pneumonie (LIP) a GLILD. Dále se u nich vyskytují nenekrotizující granulomatózní procesy, organizující se pneumonie a nespecifická intersticiální pneumonie [22–24]. LIP se částečně prolíná s pojmem folikulární bronchiolitida. Obě tyto jednotky zřejmě tvoří pouze různý obraz hyperplazie lymfoidní tkáně v plicním parenchymu. Vzhledem k riziku rozvoje klonality existuje těsná souvislost mezi

Obr. 3. HRCT hrudníku pacienta se silikózou, pneumonií s pleurální reakcí a podezřením na CD4⁺ lymfocytopenie. Oboustranná lymfadenopatie s kalcifikacemi (žlutá šipka), bronchioloektázie/bronchiektázie (zelená šipka), nodularity (červená šipka), pleurální výpotek (černá šipka). Z archivu autorky



Tab. 3. Diagnostická kritéria idiopatické CD4 lymfocytopenie (ICL). Upraveno podle [17]

absolutní počty CD4 T-lymfocytů < 300/mm ³ nebo < 20 % celkových T-lymfocytů zjištěné více než 1krát
vyloučení přítomnosti infekce virem HIV1 nebo HIV2, lidským T-buněčným lymfotropním virem typu 1 nebo 2
vyloučení všech jiných známých imunodeficiency nebo terapeutických postupů, které mohou snižovat počty T-lymfocytů

hyperplazií lymfoidní tkáně a přechodem do plicního lymfomu. Proliferace reaktivních intrapulmonálních lymfatických folikulů může být podporována porušenou B-buněčnou homeostázou, zatímco tvorba granulomů se zdá být způsobena spíše T-lymfocyty. Nicméně někteří autoři uvádějí, že se v patogenezi LIP uplatňují také autoreaktivní T-lymfocyty [23,25]. Tomu odpovídá i to, že většina imunodeficiencí je asociována s porušením T-buněčné nebo B-buněčné homeostázy nebo porušením signalizace přes antigenní a cytokinové receptory [26].

Patofyziologické mechanismy IPP jsou asi nejvíce prozkoumány u diagnózy CVID. Ektopická lymfoidní tkáň tvořící zárodečná centra je zodpovědná za terciární lymfogenezi v plicní tkáni pacientů s CVID. Lymfoidní hyperplazie se u těchto pacientů projevuje také perzistující lymfadenopatií a splenomegalii.

Četnější výskyt granulomů, autoimunitních projevů a splenomegalie byl nalezen u CVID pacientů s významným snížením počtu izotypově přesmyknutých paměťových B-lymfocytů [27,28]. Také u pacientů s CVID a expanzí CD21^{low} B-lymfocytů byl zjištěn vyšší výskyt autoimunitní cytopenie a splenomegalie [29]. Bylo prokázáno, že se zvyšující se koncentrací celkových IgM imunoglobulinů v séru stoupá i riziko rozvoje polyklonální lymfocytární infiltrace nebo lymfoidní malignity (s každým 1 g/l IgM o 16 %, respektive 31 %). Navíc se snižujícím se relativním počtem CD8⁺Tc-lymfocytů stoupá riziko rozvoje autoimunitních fenoménů [22].

Imunitní dysregulace nezávislá na přítomnosti infekce má pravděpodobně vliv na patogenезi lymfoproliferativních procesů a současně se podílí také na rozvoji IPP a autoimunitních onemocnění. Bylo prokázáno, že periferní paměťové a lymfatické folikulární CD4⁺ Th-lymfocyty pacientů s CVID tvoří ve srovnání s kontrolní populací více IFN γ [30]. Také u pacientů s CVID s vyšší mírou infekčních komplikací, v porovnání s ostatními pacienty s CVID, s X vázanou agamaglobulinémií (XLA) a kontrolní skupinou, byl zjištěn významně vyšší výskyt genů odpovídajících na stimulaci prostřednictvím interferonu [31]. U těchto pacientů byla též popsána porušená tvorba zárodečných center s nahromaděním T-box transkripčního faktoru (T-bet)⁺ B-lymfocytů v lymfatických uzlinách a T-bet⁺CD21^{low} B-lymfocytů v periferní krvi [30], významné snížení absolutního počtu lymfocytů, cirkulujících B-lymfocytů a izotypově přesmyknutých paměťových B-lymfocytů [31]. Chronická upregulace interferonových signalizačních drah se mimo jiné vyskytuje také u autoimunitních onemocnění v důsledku aktivity Toll-like receptorů (TLR) a dalších zatím nepopsaných cytoplazmatických senzorů. Zdá se, že významná porucha adaptivní imunitní odpovědi u pacientů s CVID vede k chronické aktivaci interferonových mechanismů vrozené imunity v odpovědi na antigeny prostředí [31]. Zvýšená tvorba IFN γ u pacientů s CVID a současně přítomnými zánětlivými a autoimunitními komplikacemi včetně IPP také koreluje s přítomností vysoce prozánětlivé populace přirozených lymfoidních buněk (ILC) v cir-

kulaci i slizničních tkáních [32]. U pacientů s CVID se současně přítomnými granulomy a autoimunitními onemocněními byl popsán zvýšený počet folikulárních pomocných T-lymfocytů (T_{HP}) ve srovnání s CVID pacienty bez granulomatózních nebo autoimunitních projevů [33]. Folikulární pomocné T-lymfocyty (T_{HP}) hrají ústřední roli v tvorbě zárodečných center, což je zásadní pro správný průběh humorální imunitní odpovědi. Funkce těchto buněk se zdá být u pacientů s CVID neporušená, nicméně vzhledem k jejich zvýšenému počtu u pacientů s granulomatózními a autoimunitními komplikacemi by se tyto buňky mohly nějakým způsobem podílet na patogenезi těchto komplikací [33]. Kromě výše popsáných faktorů se v rámci rozvoje IPP zvažuje také vliv infekčních příčin. Jedná se zejména o viry HHV8 a EBV, které vedou k zvýšené proliferaci lymfocytů, a tím k lymfocytární infiltraci orgánů [34,35].

Příčina rozvoje IPP a autoimunitních onemocnění není známá ani u pacientů s CTLA4 deficiencí nebo ICL. Na rozvoji IPP u pacientů s CTLA4 haploinsuficiencí se může podílet dysregulace regulačních T-lymfocytů a hyperaktivity efektorových T-lymfocytů [36]. U pacientů s ICL byl popsán relativně vyšší počet aktivovaných CD25⁺CD4⁺ a HLA-DR⁺CD4⁺ Th-lymfocytů. Tento hyperaktivovaný stav může být důsledkem CD4⁺ T-lymfocytémie (inverzní korelace mezi HLA DR⁺CD4⁺ T-lymfocytů a CD4⁺ T-lymfocytů) a může být zodpovědný za autoimunitní manifestaci [37].

Výskyt IPP a jeho léčba u popsáných primárních imunodeficiencí

IPP jsou obvykle přítomny již v době diagnózy CVID [23]. CVID asociovaná s granulomatózním onemocněním (GD) se označuje jako CVID/GD [22,38,39]. Kombinace plicních granulomů a lymfoproliferace se pak nazývá granulomatózní lymfocytární intersticiální plicní onemocnění (Granulomatous Lymphocytic Interstitial Lung Disease – GLILD) [40–43]. Přítomnost GLILD u pacientů s CVID je spojena s významnou morbiditou [44,45]. Pojem lymfoproliferace zahrnuje lymfocytární intersticiální pneumonii (LIP), folikulární bronchiolitidu a lymfoidní hyperplazii. GLILD je často doprovázeno splenomegalii a difúzní lymfadenopatií se zvýšeným rizikem rozvoje lymfomu [42]. Granulomatózní zánět u sarkoidózy (systémové onemocnění spadající do IPP a postihující zejména respirační trakt) je podobný jako u GD/CVID. Nicméně určité klinické, radiologické, laboratorní a histologické odlišnosti pozorovat možné je [46,47]. Na rozdíl od sarkoidózy, u níž může být přítomna polyklonální hypermaglobulinémie bez průkazu monoklonální gamapatie, jsou CVID/GD nebo GLILD provázeny hypogamaglobulinémií, často s progresivním vývojem plicního postižení bez tendence ke spontánní regresi a rezistencí na kortikoidní léčbu. Optimální terapie CVID/GD/GLILD není známa. Chybí totiž kontrolované studie věnující se léčbě CVID a IPP. Substituční imunoglobulinová léčba, která je pacientům pravidelně podávána ve snaze zmírnit dopady nedostatečné tvorby jejich vlastních protilátek, však nezabraňuje progresi IPP [48]. Vět-

šina pacientů je nejprve léčena perorálními kortikoidy, přičemž dávky se pohybují v rozmezí od 10 mg do 1–2 mg/kg denně, většina odborníků však užívá dávky 40 mg denně [45]. Pokud nejsou samotné kortikoidy dostatečně účinné, další terapie zahrnuje podávání azatioprinu, mykofenolátu mofetilu nebo rituximabu, samostatně nebo v kombinaci [23,45]. Pacienti s GLILD/CVID byly také úspěšně léčeny monoklonální protilátkou namířenou proti tumor nekrotizujícímu faktoru alfa (infliximabem), cyklosporinem nebo kombinací rituximabu a azatioprinu [49,50]. Bylo zjištěno, že u 6 pacientů s GLILD zlepšila kombinací léčba rituximabu s azatioprinem jak radiografické abnormality, tak pulmonální funkci [50]. Rituximab je chimérickou myší monoklonální protilátkou namířenou proti molekule CD20 na povrchu B-lymfocytů. Ovlivňuje však také funkci T-lymfocytů [51]. Léčba namířená proti B-lymfocytům může u těchto pacientů ovlivnit CVID asociovanou lymfocytární hyperplazii [24]. Hodnocení terapeutické odpovědi pacientů s IPP a zmíněnými primárními imunodeficiencemi sestává z opakovaných plicních funkčních vyšetření včetně plicní difuze a zobrazovacích metod (HRCT hrudníku nebo PET/CT).

Základní laboratorní vyšetření v rámci diferenciální diagnostiky u pacientů s IPP

Diagnóza IPP je sice definitivně stanovena až na základě korelace klinických, radiologických a histopatologických nálezů, nicméně laboratorní vyšetření tvoří nedílnou součást vyšetřovacího algoritmu. Kromě krevního obrazu s diferenciálním rozpočtem leukocytů, základního biochemického vyšetření a stanovení koncentrace C-reaktivního proteinu, který bývá zvýšen i u některých neinfekčních onemocnění včetně vaskulitid, má své nezastupitelné místo také vyšetření imunologické (tab. 4). Je důležité nejen pro diagnostiku autoimunitních onemocnění (ve vztahu k plicnímu postižení zejména vaskulitid nebo systémových onemocnění pojiva), ale i k diferenciální diagnostice IPP u primárních či sekundárních poruch imunitního systému. Na významnou poruchu funkce imunitního systému nás mohou anamnesticky upozornit opakující se infekce horních i dolních dýchacích cest (sinusitidy, otitidy, pneumonie), opakované meningitidy či další prodělané závažnější infekce.

V rámci imunologického vyšetření hodnotíme základní parametry humorální a buněčné imunity. Sérolo-

Tab. 4. Souhrn laboratorních vyšetření v rámci diferenciální diagnostiky u IPP

krevní obraz a diferenciální rozpočet leukocytů a základní biochemické vyšetření
vyloučení infekční etiologie (mikrobiologické serologické nebo kulturační vyšetření)
stanovení koncentrace autoprotilátek, markerů systémového zánětu (CRP, FW), koncentrace C3 a C4 složky komplementu, stanovení koncentrace cirkulujících imunokomplexů
stanovení koncentrace specifických IgE protilátek proti <i>Aspergillus fumigatus</i> a IgG protilátek proti příčinným antigenům k vyloučení alergické bronchopulmonální aspergilózy respektive hypersenzitivní pneumonitidy
stanovení koncentrace celkových imunoglobulinů ve třídě IgG, IgA, IgM a IgE včetně IgG podtříd
vyšetření základních buněčných subpopulací ze séra: stanovení počtu celkových CD3 ⁺ T-lymfocytů, CD4 ⁺ pomocných (Th) a CD8 ⁺ cytotoxických (Tc) T-lymfocytů, CD19 ⁺ B-lymfocytů a CD16 ⁺ /56 ⁺ přirozených zabijců (Natural Killers – NK-buněk); z bronchoalveolární laváže: CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ a poměr CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T-lymfocytů
v případě podezření na poruchu funkce imunitního systému další specializovaná imunologická vyšetření: stanovení protilátkové odpovědi po antigenní stimulaci proteinovou a polysacharidovou vakcínou, podrobnější stanovení T-lymfocytárních a B-lymfocytárních subpopulací, vyšetření fagocytózy a komplementového systému, proliferační lymfocytární testy a další

Tab. 5. Základní panel vyšetřovaných autoprotilátek u podezření na intersticiální plicní procesy

antinukleární protilátky (ANA) metodou NIF
protilátky proti dvouvláknové DNA (anti-dsDNA) metodou NIF nebo ELISA
protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům (anti-ENA):
- pozitivita anti-ENA → detekce protilátek proti konkrétním antigenům (SSA, SSB, Scl-70, RNP, Sm, Jo-1) metodou ELISA
revmatoidní faktor (RF) a protilátky proti cyklickým citrulinovaným peptidům (anti-CCP) metodou ELISA
protilátky proti cytoplazmě neutrofilů (c-ANCA a p-ANCA) metodou NIF nebo ELISA
protilátky proti bazální membráně glomerulů (anti-GBM) metodou NIF nebo ELISA
antifosfolipidové protilátky (APLA) metodou ELISA - pozitivita APLA → detekce protilátek proti kardiolipinu (ACLA) a proti β2-glykoproteinu 1 (anti-B2GP1)
stanovení orgánově specifických protilátek v případě podezření na orgánově specifická autoimunitní onemocnění

NIF – nepřímá imunofluorescence ELISA – enzymová imunoanalýza

gické vyšetření se opírá o stanovení koncentrace jednotlivých imunoglobulinových tříd (IgG, IgA, IgM a IgE). Při rozvoji fibrotického postižení plic je nutno pomýšlet i na diagnózu IgG4 asociovaného onemocnění, k jehož diagnostice může dopomoci stanovení koncentrace podtřídy IgG4. Stanovení koncentrace celkových IgE imunoglobulinů a specifických IgE protilátek proti *Aspergillus fumigatus* se provádí při podezření na alergickou bronchopulmonální aspergilózu, která se projevuje přítomností oboustranných plicních infiltrátů. Určení specifických IgG protilátek proti příčinným antigenům pomůže při diagnostice hypersenzitivní pneumonie. K vyloučení monoklonální gamapatie je nutné doplnit imunoelktroforetické vyšetření séra. Systémová onemocnění pojiva doprovází polyklonální aktivace B-lymfocytů společně s hypergamaglobulinemií. Při podezření na systémové autoimunitní onemocnění pojiva se stanovují koncentrace autoprotilátek (tab. 5) [52]. Využívá se i detekce koncentrace složek komplementu (zejména C3 a C4) a cirkulujících imunokomplexů pro potvrzení konsumpce komplementu při jeho aktivaci v rámci autoimunitního onemocnění a imunokomplexových reakcí.

Buněčné imunologické vyšetření se opírá o stanovení absolutního a relativního zastoupení lymfocytárních subpopulací pomocí průtokové cytometrie buď z periferní krve nebo bronchoalveolární laváže (BAL). Jedná se o stanovení celkových CD3⁺ T-lymfocytů, CD3⁺CD4⁺ pomocných (Th) a CD3⁺CD8⁺ cytotoxických (Tc) T-lymfocytů, CD19⁺ B-lymfocytů a CD16⁺56⁺ přirozených zabíječů NK buněk (tab. 4). U sarkoidózy obvykle pozorujeme poměr CD4⁺/CD8⁺ v bronchoalveolární tekutině > 3,5, hodnoty poměru < 1,0 mohou být přítomny u hypersenzitivní pneumonie. Zvýšený počet Langerhansových buněk (CD1⁺ ≥ 5 %) nacházíme u kuřáků s plicní formou granulomatózy z Langerhansových buněk. Při poklesu CD4⁺ T-lymfocytů < 200 buněk/μl je pravděpodobnost infekce oportunními patogeny vyšší a je doporučována antibiická profylaxe Pneumocystis jirovecii [21,53].

Závěr

Základní imunologické laboratorní vyšetření humorální a buněčné imunity je nezbytnou součástí diferenciálně diagnostického algoritmu intersticiálního plicního postižení. Na možný rozvoj intersticiálního plicního postižení musíme myslet nejen u pacientů s primárními imunodeficiencemi, ale na možnou přítomnost dosud neodhalené primární poruchy funkce imunitního systému musíme myslet i u pacientů s nově zjištěným intersticiálním plicním postižením. Některé poruchy se totiž, jak bylo ukázáno ve výše uvedených kazuistikách, manifestují až v dospělém věku.

Literatura

1. [American Thoracic Society; European Respiratory Society]. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the

- ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165(2): 277–304. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.165.2.ats01>>.
- Bienenstock J, Johnston N, Perey DY. Bronchial lymphoid tissue. I. Morphologic characteristics. Lab Invest 1973; 28(6): 686–692.
 - Bienenstock J, Johnston N, Perey DY. Bronchial lymphoid tissue. II. Functional characteristics. Lab Invest 1973; 28(6): 693–698.
 - Pabst R, Tschernig T. Bronchus-associated lymphoid tissue: an entry site for antigens for successful mucosal vaccinations? Am J Respir Cell Mol Biol 2010; 43(2): 137–141. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2010-0152RT>>.
 - Neyt K, Perros F, Geurtsvan Kessel CH et al. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. Trends Immunol 2012; 33(6): 297–305. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.04.006>>.
 - Rangel-Moreno J, Hartson L, Navarro C et al. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis. J Clin Invest 2006; 116(12): 3183–3194. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1172/JCI28756>>.
 - Jordan M, Haczu A. Autoreactive bronchus-associated lymphoid tissue in interstitial lung disease: friend or foe? Am J Respir Cell Mol Biol 2013; 48(4): 397–398.
 - Saikia B, Gupta S. Common Variable Immunodeficiency. Indian J Pediatr 2016; 83: 338–344. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12098-016-2038-x>>.
 - Bonilla FA, Barlan I, Chapel H et al. International Consensus Document (ICON): Common Variable Immunodeficiency Disorders. J Allergy Clin Immunol Pract 2016; 4(1): 38–59. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaip.2015.07.025>>.
 - Gathmann B, Mahlaoui N, Gérard L et al. Clinical picture and treatment of 2212 patients with common variable immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol 2014; 134(1): 116–126. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.12.1077>>.
 - Abbott JK, Gelfand EW. Common Variable Immunodeficiency: Diagnosis, Management, and Treatment. Immunol Allergy Clin North Am 2015; 35(4): 637–658. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.iac.2015.07.009>>.
 - Lo B, Abdel-Motal UM. Lessons from CTLA-4 deficiency and checkpoint inhibition. Curr Opin Immunol 2017; 49: 14–19. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2017.07.014>>.
 - Rowshanravan B, Halliday N, Sansom D. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. Blood 2018; 131(1): 58–67. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2017-06-741033>>.
 - Králičková P, Kubcová Š, Kočová E et al. Successful rituximab treatment of granulomatous/lymphocytic interstitial lung disease in common variable immunodeficiency. Epidemiol Mikrobiol Immunol 2018; 67(3): 142–148.
 - Verma N, Burns SO, Walker LSK et al. Immune deficiency and autoimmunity in patients with CTLA-4 (CD152) mutations. Clin Exp Immunol 2017; 190(1): 1–7. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/cei.12997>>.
 - Chitale S, Moots R. Abatacept: the first T lymphocyte co-stimulation modulator, for the treatment of rheumatoid arthritis. Expert Opin Biol Ther 2008; 8(1): 115–122. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1517/14712598.8.1.115>>.
 - [Centers for Disease Control (CDC)]. Unexplained CD4+ T-lymphocyte depletion in persons without evident HIV infection – United States. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1992; 41(30): 541–545.
 - Yarmohammadi H, Cunningham-Rundles C. Idiopathic CD4 lymphocytopenia: Pathogenesis, etiologies, clinical presentations and treatment strategies. Ann Allergy Asthma Immunol 2017; 119(4): 374–378. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ana.2017.07.021>>.
 - Asher I, Mahlab-Guri K, Elbirt D et al. Idiopathic CD4 Lymphopenia: Severe CD4 Lymphopenia in the Absence of Human Immunodeficiency Virus Infection. Isr Med Assoc J 2016; 18(10): 627–629.
 - Walker UA, Warnatz K. Idiopathic CD4 lymphocytopenia. Curr Opin Rheumatol 2006; 18(4): 389–395. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1097/01.bor.0000231908.57913.2f>>.
 - Vašáková M, Polák J, Matěj R. Intersticiální plicní procesy: od etiopatogeneze přes radiologický obraz k histopatologické diagnóze. Maxdorf: Praha 2016. ISBN 978–80–7345–488–3.

22. Chapel H, Lucas M, Lee M et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood* 2008; 112(2): 277–286. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-11-124545>>.
23. Prasse A, Kayser G, Warnatz K. Common variable immunodeficiency-associated granulomatous and interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2013; 19(5): 503–509. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1097/MCP.0b013e3283642c47>>.
24. Maglione PJ, Ko HM, Beasley MB et al. Tertiary lymphoid neogenesis is a component of pulmonary lymphoid hyperplasia in patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133(2): 535–542. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.08.022>>.
25. Giovannetti A, Pierdominici M, Mazzetta F et al. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J Immunol* 2007; 178(6): 3932–3943. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3932>>.
26. Warnatz K, Voll RE. Pathogenesis of autoimmunity in common variable immunodeficiency. *Front Immunol* 2012; 3: 210. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00210>>.
27. Sánchez-Ramón S, Radigan L, Yu JE et al. Memory B cells in common variable immunodeficiency: clinical associations and sex differences. *Clin Immunol* 2008; 128(3): 314–321. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2008.02.013>>.
28. Wehr C, Kivioja T, Schmitt C et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008; 111(1): 77–85. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-06-091744>>.
29. Warnatz K, Wehr C, Dräger R et al. Expansion of CD19(hi)CD21(lo/neg) B cells in common variable immunodeficiency (CVID) patients with autoimmune cytopenia. *Immunobiology* 2002; 206(5): 502–513. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1078/0171-2985-00198>>.
30. Unger S, Seidl M, van Schouwenburg Pet al. The TH1 phenotype of follicular helper T cells indicates an IFN- γ -associated immune dysregulation in patients with CD21low common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2018; 141(2): 730–740. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.041>>.
31. Park J, Munagala I, Xu H et al. Interferon signature in the blood in inflammatory common variable immune deficiency. *PLoS One* 2013; 8(9): e74893. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0074893>>.
32. Cols M, Rahman A, Maglione PJ et al. Expansion of inflammatory innate lymphoid cells in patients with common variable immune deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137(4): 1206–1215. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.09.013>>.
33. Coraglia A, Galassi N, Fernández Romero DS et al. Common Variable Immunodeficiency and Circulating TFH. *J Immunol Res* 2016; 2016: 4951587. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/4951587>>.
34. Wheat WH, Cool CD, Morimoto Y et al. Possible role of human herpesvirus 8 in the lymphoproliferative disorders in common variable immunodeficiency. *J Exp Med* 2005; 202(4): 479–484. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1084/jem.20050381>>.
35. Andiman WA, Eastman R, Martin K et al. Opportunistic lymphoproliferations associated with Epstein-Barr viral DNA in infants and children with AIDS. *Lancet* 1985; 2(8469–8470): 1390–1393. Dostupné z DOI: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(85\)92557-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(85)92557-7)>.
36. Schussler E, Beasley MB, Maglione PJ. Lung Disease in Primary Antibody Deficiencies. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2016; 4(6): 1039–1052. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaip.2016.08.005>>.
37. Régent A, Autran B, Carcelain G et al. Idiopathic CD4 lymphocytopenia: clinical and immunologic characteristics and follow-up of 40 patients. *Medicine (Baltimore)* 2014; 93(2): 61–72. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1097/MD.000000000000017>>.
38. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999; 92(1): 34–48. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1006/clim.1999.4725>>.
39. Ardeniz O, Cunningham-Rundles C. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2009; 133(2): 198–207. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2009.05.001>>.
40. Park JH, Levinson AI. Granulomatous-lymphocytic interstitial lung disease (GLILD) in common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Immunol* 2010; 134(2): 97–103. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2009.10.002>>.
41. Bates CA, Ellison MC, Lynch DA et al. Granulomatous-lymphocytic lung disease shortens survival in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114(2): 415–421. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2004.05.057>>.
42. Perez RL, Rivera-Marrero CA, Roman J. Pulmonary granulomatous inflammation: From sarcoidosis to tuberculosis. *Semin Respir Infect* 2003; 18(1): 23–32. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1053/srin.2003.50005>>.
43. Bouvry D, Mouthon L, Brillet PY et al. Granulomatosis-associated common variable immunodeficiency disorder: a case-control study versus sarcoidosis. *Eur Respir J* 2013; 41(1): 115–122. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00189011>>.
44. Resnick ES, Moshier EL, Godbold JH et al. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood* 2012; 119(7): 1650–1657. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-09-377945>>.
45. Boursiquot JN, Gérard L, Malphettes M et al. Granulomatous disease in CVID: retrospective analysis of clinical characteristics and treatment efficacy in a cohort of 59 patients. *J Clin Immunol* 2013; 33(1): 84–95. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10875-012-9778-9>>.
46. Verbsky JW, Routes JM. Sarcoidosis and common variable immunodeficiency: similarities and differences. *Semin Respir Crit Care Med* 2014; 35(3): 330–335. <<http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1376862>>.
47. Doubková M, Moulis M, Skříčková J. Intersticiální plicní procesy a granulomatózy asociované s běžným variabilním imunodeficientem. *Vnitř Lék* 2015; 61(2): 119–124.
48. Quinti I, Soresina A, Spadaro G et al. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2007; 27(3): 308–316. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10875-007-9075-1>>.
49. Hatab AZ, Ballas ZK. Caseating granulomatous disease in common variable immunodeficiency treated with infliximab. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(5): 1161–1162. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2005.08.041>>.
50. Chase NM, Verbsky JW, Hintermeyer MK et al. Use of combination chemotherapy for treatment of granulomatous and lymphocytic interstitial lung disease (GLILD) in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *J Clin Immunol* 2013; 33(1): 30–39. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10875-012-9755-3>>.
51. Stasi R, Del Poeta G, Stipa E et al. Response to B-cell depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2007; 110(8): 2924–2930. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-02-068999>>.
52. Doubková M, Pokorná J. Autoprotiilátky u systémových onemocnění pojiva a ANCA asociovaných vaskulitid, jejich vztah k intersticiální plicní procesům a prognóze. *Vnitř Lék* 2017; 63(2): 98–106.
53. Boesecke C, Rockstroh JK, Thoden J. Opportunistic infections: What's new?. *Dtsch Med Wochenschr* 2018; 143(24): 1755–1758. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1055/a-0641-9456>>.

MUDr. Martina Doubková, Ph.D.

✉ doubkovamartina@seznam.cz

Klinika nemocí plicních a tuberkulózy LF MU a FN Brno,
pracoviště Bohunice
www.fnbrno.cz

Doručeno do redakce 22. 2. 2019

Přijato po recenzi 28. 4. 2019

6.8. Necrotising sarcoid granulomatosis. A rare granulomatous disease (Doubková M., Hausnerová J, Výška O, Richter S, Merta Z. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 2018; 35(4): 395-398)

CASE REPORT

SARCOIDOSIS VASCULITIS AND DIFFUSE LUNG DISEASES 2018; 35: 395-398 DOI: 10.36141/svdlid.v35i4.7047

© Mattioli 1885

NECROTISING SARCOID GRANULOMATOSIS. A RARE GRANULOMATOUS DISEASE

Martina Doubková¹, Jitka Hausnerová², Ondřej Výška³, Svatopluk Richter⁴, Zdeněk Merta¹

¹Department of Pulmonary Diseases and Tuberculosis, Masaryk University Faculty of Medicine and University Hospital, Brno, Czech Republic; ² Institute of Pathological Anatomy, University Hospital, Brno, Czech Republic; ³Department of Internal Medicine, Geriatrics and Practical Medicine, University Hospital, Brno, Czech Republic; ⁴Department of Radiology and Nuclear Medicine, Masaryk University Faculty of Medicine and University Hospital, Brno, Czech Republic

ABSTRACT. *Introduction:* Necrotizing sarcoid granulomatosis (NSG) is a very rare disease of unknown etiology characterized by sarcoid-like granulomas, vasculitis and necrosis in pulmonary and extrapulmonary localizations. *Case report:* We describe a case of a 34-year-old Caucasian male with fever, pleural pain, and nodular pulmonary opacities on chest radiograph. Histological examination of the lung tissue confirmed NSG. Diagnostically, infectious causes, vasculitis, and malignancy were excluded. A tendency to partial regression was observed, without the need for corticosteroid treatment. *Conclusion:* NSG is a rare disease which must be distinguished from other systemic diseases including vasculitides. The key to diagnosis, emphasized in our paper, is the histopathological finding. The course of NSG is similar to sarcoidosis. Corticosteroids are considered the treatment of choice, but the disease exhibits a tendency towards spontaneous regression. (*Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 2018; 35: 395-398*)

KEY WORDS: differential diagnosis, histopathological diagnosis, necrotising sarcoid granulomatosis

INTRODUCTION

Necrotizing sarcoid granulomatosis (NSG) is a rare systemic disease characterized by sarcoid-like granulomas, central necrosis and vasculitis (1-3). It was first described by American pathologist, Averill Abraham Liebow in 1973 (1).

CASE REPORT

A 34-year-old Caucasian male, an ex-smoker, presented with fever and breathing-related pleural

pain. The patient had a long-term antihypertensive medication. His family history was negative. Physical examination revealed pleural friction rub on the right side of the chest; the rest of the physical examination was unremarkable. The posteroanterior chest radiograph showed nodular opacities mostly in the right lung. Multiple subpleural nodular opacities, the largest 13mm in diameter, were seen on the chest CT (Figures 1, 2, 3). Pulmonary function testing revealed no ventilation or diffusion defect. Arterial blood gas analysis was also normal. Laboratory tests at admission showed (reference values between brackets): C-reactive protein (CRP) 45mg/L (0-5), serum calcium 2.57 mmol/l (2.25-2.55), IgE 1.281 g/l (reference value <90 g/l), angiotensin-converting enzyme (ACE) 8 U/L (20-70) – the low ACE probably being influenced by the ACE inhibitor medication for high blood pressure. Total IgG, IgA, IgM concentrations were normal. The IgG4 subtype concentration was increased to 2.46 g/L (0.08-1.40 g/L). Serum protein electrophoresis complete with

Received: 19 February 2018
Accepted after revision: 30 August 2018
Correspondence: MUDr. Martina Doubková, Ph.D.
Department of Pulmonary Diseases and Tuberculosis,
Masaryk University Faculty of Medicine and
University Hospital - Jihlavská 20 -
625 00 Brno - Czech Republic
Tel. +420 532 232 554
E-mail: doubkovamartina@seznam.cz



Fig. 1. Chest HRCT, transverse plane, initial examination. At the aortic arch level, a subpleural nodule in the apical S1+2 segments of the left upper lobe with pleural thickening in the adjacent area. Subpleural lesions are quite typical for necrotizing sarcoid granulomatosis (NSG) without predilection for upper or lower lobe involvement. In the right lung dorsally, a slight thickening of the pleura and of the major interlobar fissure



Fig. 3. Chest HRCT, transverse plane, two-month follow-up. A tiny 'consolidation' of the pulmonary parenchyma with isolated calcifications and fibrous streaks extending towards the thickened pleura is present at the upper left lobe level in S1+2. The original S1+2 nodule adjacent to the pleura has partially regressed – a sign of a certain development of the disease over time



Fig. 2. Chest HRCT, initial examination, transversal plane at the level of lower lobes shows spherical nodules with smooth edges, with no apparent spiculations extending into the surrounding pulmonary parenchyma. A larger, 18 mm nodule in the S10 segment of the right lower lobe; a smaller one, 11 mm, in the S9 segment of the left lower lobe. Among frequent findings in NSG are nodular lesions with smooth or slightly irregular borders that may exhibit cavitations

paraprotein and clonal IgE was normal. Complete blood count including white blood cell differential was normal, without eosinophilia. The liver function tests were normal.

Treatment with antibiotics (amoxicillin) was started – without any effect on the pulmonary lesions. As the finding persisted and metastatic disease has to be excluded, video-assisted thoracoscopic surgery (VATS) with pulmonary biopsy was indicated.

Histopathological examination then confirmed necrotizing sarcoid granulomatosis. Pulmonary parenchyma with peribronchovascular epithelioid granulomas including a few multinucleated giant cells, with a sparse perifocal lymphocytic inflammatory infiltrate. Minute, spotty areas of necrosis are present in the centre of some granulomas. Granulomas are well-circumscribed, well-formed, of the sarcoid type. In some places, granulomas merge into nodules with large central necrosis with chromatin dust. Granulomas are visible both in the lung parenchyma and, abundantly, in the vessel wall (with focal destruction). No cavitation is present. While granulomatous vasculitis is predominant, focally the inflammation is lymphocytic in character. The pleura exhibits identical lesions. Special staining on mycobacteria and fungi are negative (Figure 4). Searching for NSC's extrapulmonary manifestations, hypodense deposits were discovered in the liver and renal cortex. A tiny (6mm) deposit was also found in a non-enlarged spleen. Further investigations were focussed on the exclusion of infectious causes or systemic diseases including vasculitides. The immunological screening including ANCA (antineutrophil cytoplasmic antibodies) was negative. For the detection of elevated serum IgG4, immunohistological examination of the lung tissue was performed but no increase in the number of IgG4-positive plasma cells was found, and the histopathological finding did not meet the criteria of IgG4-related disease. Infectious exami-

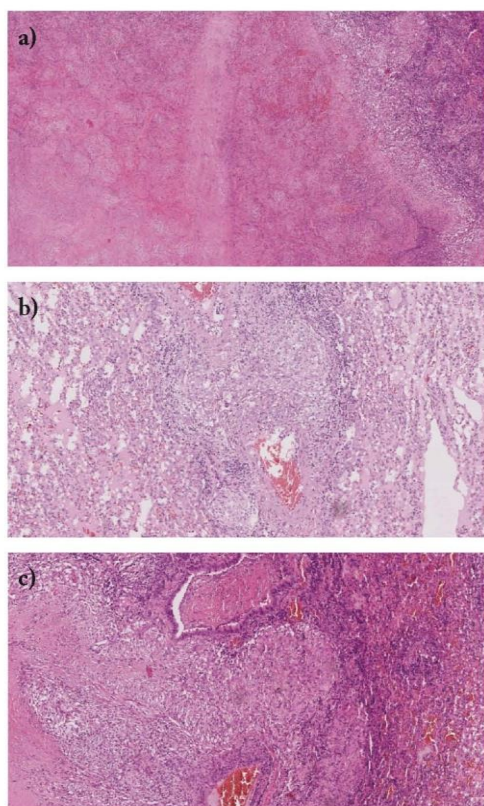


Fig. 4. Histopathological findings. Microscopically, confluent non-caseating granulomas with extensive necrosis are seen in the lung parenchyma. The granulomas are of the sarcoid type, palisaded by Langerhans-type giant cells and mononuclear lymphohistiocytes with central necrosis. Another typical finding is the presence of vasculitis, usually granulomatous, and a large zone of necrosis. **a)** Large zone of necrosis (x50); **b)** granulomatous vasculitis (x100); **c)** confluent granulomas and vasculitis (x 100).

nation including serology of chlamydia, mycoplasma, and atropozoonoses was negative. The allergologic examination confirmed dust mite allergy. Serum *Aspergillus* galactomannan antigen testing by ELISA yielded negative results in pulmonary tissue, serum and BALF (bronchoalveolar fluid obtained by bronchoalveolar lavage). Specific IgE, IgG against *Aspergillus* were not detected. Evaluation of panfungal antigen in BALF and serum was also negative. The macroscopic finding in bronchoscopy was normal. The bronchoalveolar lavage samples collected for cytological examination revealed increased

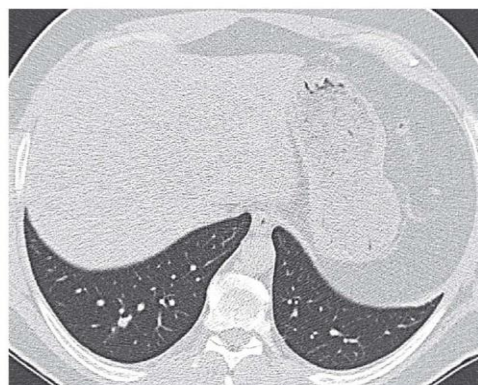


Fig. 5. Chest HRCT, transverse plane, two-month follow-up. Compared with the initial examination, multiple nodules in the pulmonary parenchyma, predominantly in subpleural localization, have partially or completely disappeared. An 8 mm nodule (previously 18 mm) is present in S10 of the left lower lobe (indicated by the arrow)

neutrophil granulocyte count (9.2%; reference range $\leq 3\%$) and a slightly increased eosinophil granulocyte count (2.2%; reference range $\leq 0.5\%$); macrophages 83% (reference range $\geq 80\%$), lymphocytes 4.9% (reference range $\leq 15\%$). The CD4+/CD8+ ratio was not increased.

Three months later, regression of nodular opacities on chest HRCT was observed (Figure 5). The control abdominal ultrasound was normal. Currently, the patient is asymptomatic – without dyspnea, chest pain, or fever. The patient is being monitored, without the need for corticosteroid therapy.

DISCUSSION

Necrotizing sarcoid granulomatosis (NSG) is a disease showing features of both vasculitis and granulomatous disease. Whether NSG is a separate entity or a variant of sarcoidosis is not yet clear (4,5,6,7). Etiopathogenesis is not known; infectious causes such as *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Aspergillus fumigatus* (4,8,9) have been mooted. NSG primarily affects younger patients (median, 42 years of age) (10). Family occurrence has not been reported. Clinical symptoms are nonspecific and include pleural pain, weight loss, cough, dyspnea and fever. Extrapulmonary involvement can mimic sarcoidosis (10). Radiological find-

ings vary; most often, nodular opacities are observed in the lung parenchyma, either solitary or multiple, with or without hilar and mediastinal lymphadenopathy (11,12). No specific laboratory biomarker for NSG diagnosis is available. ACE is usually normal (4). Pulmonary function tests are either normal or demonstrate a variety of abnormal patterns (13). The CD4/CD8 ratio in the bronchoalveolar fluid may be normal – in contrast to sarcoidosis (4).

The histopathological finding is central to, and indispensable for, the diagnosis of NSG. NSG should meet the following criteria: granulomas, necrosis and granulomatous vasculitis with no evidence to support an infectious etiology (7). The differential diagnosis includes granulomatous infection, nodular sarcoidosis and Wegener's granulomatosis (granulomatosis with polyangiitis). The most difficult – and mostly impossible – to exclude is granulomatous infection that can cause necrotizing granulomatous inflammation and vasculitis resembling NSG. However, histological features typical of pulmonary sarcoidosis – non-necrotizing confluent granulomas surrounded by hyaline fibrosis and necrosis – are not characteristically seen in NSG. Still, some experts believe that NSG is essentially the same disease as sarcoidosis. Necrotizing granulomatous inflammation with vasculitis is also seen in Wegener's granulomatosis. However, the presence of sarcoid-like granulomas and absence of the classic pattern of necrosis in Wegener's granulomatosis, i.e. geographical areas of basophilic necrosis, favour NSG (10),

The clinical course of NSG is mostly benign with a tendency to spontaneous remission except for potentially lethal neurological lesions (14). Corticosteroids are the treatment of choice (4).

CONCLUSION

This work describes a rare systemic disease called necrotizing sarcoid granulomatosis (NSG). Empha-

sis is placed on histopathological findings and differentiation from other vasculitides or granulomatous diseases of the sarcoidosis type.

REFERENCES

1. Liebow AA. The J. Burns Amberson lecture – pulmonary angitis and granulomatosis. *Am Rev Respir Dis* 1973;108(1): 1-18
2. Churg A. Pulmonary angitis and granulomatosis revisited. *Hum Pathol* 1983; 14(10): 868-883
3. Churg A, Carrington GB, Gupta R. Necrotizing sarcoid granulomatosis. *Chest* 1979; 76(4): 406-413.
4. Quaden C, Tillie-Leblond I, Delobbe A, et al. Necrotizing sarcoid granulomatosis: clinical, functional, endoscopic and radiographical evaluations. *Eur Respir J* 2005; 26(5): 778-85.
5. Bouman KP, Slabbynck H, Cuykens JJ, Geldermans D, Coolen D, Kock M. Necrotizing sarcoid granulomatosis with uveitis: a variant of sarcoidosis? *Acta Clin Belg* 1997; 52(6): 367-370.
6. Rolfes DB, Weiss MA, Sanders MA. Necrotizing sarcoid granulomatosis with suppurative features. *J Clin Pathol* 1978; 38(5): 602-607.
7. Popper HH, Klemen H, Colby TV, Churg A. Necrotizing sarcoid granulomatosis--is it different from nodular sarcoidosis? *Pneumologie* 2003; 57(5): 268-271.
8. Tauber E, Wojnarowski C, Horcher E, Dekan G, Frischer T. Necrotizing sarcoid granulomatosis in a 14-yr-old female. *Eur Respir J* 1999; 13(3): 703-705.
9. Koss MN, Hochholzer L, Feigin DS, Garancis JC, Ward PA. Necrotizing sarcoid-like granulomatosis: clinical, pathologic, and immunopathologic findings. *Hum Pathol* 1980; 11(5 Suppl.): 510-519.
10. Karpathiou G, Batistatou A, Boglou P, Stefanou D, Froudarakis ME. Necrotizing sarcoid granulomatosis: A distinctive form of pulmonary granulomatous disease. *Clin Respir J* 2017 Jul 29. doi: 10.1111/crj.12673.
11. Alliberti S, Falleni M, Tarsia P, et al. A 13-year-old female with shortness of breath and pleuritic chest pain. *Eur Respir J* 2006; 28(4): 876-882.
12. Niimi H, Hartmann TE, Müller NL. Necrotizing sarcoid granulomatosis: computed tomography and pathologic findings. *J Comput Assist Tomogr* 1995; 19(6): 920-923.
13. Chittock DR, Joseph MG, Paterson NM, McFaden RG. Necrotizing sarcoid granulomatosis with pleural involvement. Clinical and radiographic features. *Chest* 1994; 106(3): 672-676.
14. Beach RC, Corrin B, Scopes JW, Graham E. Necrotizing sarcoid granulomatosis with neurologic lesions in a child. *J Pediatr* 1980; 97(6): 950-953.

6.9. Diagnosis of Bloom syndrome in a patient with short stature, recurrence of malignant lymphoma, and consanguineous origin (Trizuljak J, Petruchová T, Blaháková I, Vrzalová Z, Hořínová V, Doubková M, Michalka J, Mayer J, Pospíšilová Š, Doubek M. Mol Syndromol. 2020; 11: 73-82)

Diagnosis of Bloom Syndrome in a Patient with Short Stature, Recurrence of Malignant Lymphoma, and Consanguineous Origin

Jakub Trizuljak^{a-c} Terezie Petruchová^a Ivona Blaháková^{b, c}
Zuzana Vrzalová^{b, c} Věra Hořínová^d Martina Doubková^e Jozef Michalka^{a, b}
Jiří Mayer^{a-c} Šárka Pospíšilová^{a-c} Michael Doubek^{a-c}

^aFaculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic; ^bDepartment of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic; ^cCentral European Institute of Technology, Masaryk University, Brno, Czech Republic; ^dOutpatient Ward for Genetics, Hospital Jihlava, Jihlava, Czech Republic; ^eDepartment of Pulmonary Diseases and Tuberculosis, University Hospital, Brno, Czech Republic

Keywords

Autosomal recessive variant · *BLM* · Bloom syndrome · Consanguinity · Lymphoma

Abstract

Bloom syndrome is an autosomal recessive disorder characterized by prenatal and postnatal growth deficiency, photosensitive skin changes, immune deficiency, insulin resistance, and a greatly increased risk of early-onset cancer and development of multiple malignancies. Loss-of-function variants of the *BLM* gene, which codes for a RecQ helicase, cause Bloom syndrome. We report a consanguineous family, with 2 siblings showing clinical signs of suspected chromosome breakage disorder. One of them developed recurrent malignant lymphoma during lifetime. We performed next-generation sequencing analysis, focusing on cancer predisposition syndromes. We identified a homozygous pathogenic nonsense variant c.1642C>T (p.Gln548*) in the *BLM* gene in the proband, associated with Bloom syndrome. Sanger sequencing validated the presence of a homozygous pathogenic variant in the proband and also in the brother

with short stature. In this article, we will focus on the clinical presentation of the syndrome in this particular family as well as the characteristics of malignancies found in the proband.

© 2020 S. Karger AG, Basel

Bloom syndrome is an autosomal recessive disorder characterized by prenatal and postnatal growth deficiency, photosensitive skin changes, immune deficiency, insulin resistance, pulmonary involvement, and cancer predisposition [German, 1969; Gretzula et al., 1987; Diaz et al., 2006; McGowan et al., 2009; Nair et al., 2009; Masmoudi et al., 2012; Arora et al., 2014; Relhan et al., 2015]. Bloom syndrome is caused by loss-of-function variants in the *BLM* gene. The absence of a functional BLM protein causes chromosome instability, excessive homologous recombination, and a greatly increased number of sister chromatid exchanges that are typical for the syndrome [Ellis et al., 1995; Karow et al., 1997]. Bloom syndrome is an extremely rare disease. The estimated carrier frequency is 1/500 in the Czech population and 1/120 in the Ashkenazi Jewish population [Shahrabani-Gargir et al., 1998;



Fig. 1. Picture of the proband with short stature and facial dysmorphism. Note the narrow, prolonged face, protruding nose, and retrognathia.

Seemanová et al., 2002]. Recurrent founder mutations are present in individuals with Bloom syndrome, notably the *BLM*^{Asht} mutation [German et al., 2007; Kaseb and Hozayen, 2019] and c.1642C>T in the Slavic population [Sokolenko et al., 2012; Prokofyeva et al., 2013]. Bloom syndrome has an estimated risk of malignancy around 40–50% [Foretová and Petráková, 2019]. There is a wide variety of cancer types and anatomic sites in patients with Bloom syndrome. Cancer typically occurs at a younger age and might be recurrent. Hematologic malignancies (acute myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia, and lymphoma) are the most common malignancies in individuals with Bloom syndrome. Among solid tumors, digestive tract cancers are the most common, particularly adenocarcinoma of the upper and lower intestinal tract. Squamous cell carcinomas of the head and neck as well as breast cancer have also been frequently reported. In addition to common malignancies, persons with Bloom syndrome have an excess of rare cancers, particularly Wilms

tumor [Cairney et al., 1987; Berger et al., 1996]. Although there is currently no treatment for the underlying genetic abnormality, persons with Bloom syndrome benefit from sun protection, aggressive treatment of infections, surveillance for endocrinopathies, and early identification of cancer [Cunniff et al., 2017; Flanagan and Cunniff, 2019].

Case Report

Personal History

We report a female patient with short stature and facial dysmorphism (Fig. 1). She had a medical history of failure to thrive, dermatological symptoms (café-au-lait spots, keratosis pilaris, and onychodystrophy), hypothyreosis, premature ovarian failure, persistent bronchial asthma, bronchiectasis, and recurring episodes of pneumonia during her childhood and adolescence.

Manifestation of First Malignancy

At the age of 15, the patient was diagnosed with non-Hodgkin lymphoma. Few data are available due to the patient's treatment in



Fig. 2. Picture of the sibling with short stature and facial dysmorphism. Note the prolonged face, abnormal chin, and high forehead.

the year 1998. The disease was classified as centroblastic B-cell non-Hodgkin lymphoma of the neck and nasopharynx. The treatment was administered per NHL-BFM 95 protocol and consisted of vincristine, etoposide, cytarabine, methotrexate, ifosfamide, cyclophosphamide, prednisolone, and doxorubicin with concomitant intrathecal applications of chemotherapy. The final assessment confirmed complete remission.

Manifestation of Second Malignancy

In December 2017, the proband was admitted to the surgical department because of abdominal pain, intussusception, and suspicion of tumor in the cecum per imaging procedures. She complained about 2–3 months of nonspecific gastrointestinal problems, cramps, obstipation, and 2 kg weight loss. Her actual weight was only 29 kg, height was 140 cm, and BMI was 14.8 kg/m² per duBois formula. The patient also referred to previous sus-

picion of celiac disease. Laparotomic hemicolectomy with terminal ileostomy was performed, and a 45-mm tumor in the cecum was removed together with 12 regional mesenteric lymph nodes. Histopathological evaluation of the involved tissues (tumor, bowel, mesenteric lymph nodes) was performed by the experienced pathologist with the conclusion of high-grade B-lymphoma, not otherwise specified, possibly Burkitt-like lymphoma with 11q aberration. The clinical stage was II AE per Ann Arbor classification, aaIPI 1 (LDH level 4.59 slightly above normal range). Microscopically, the tumor consisted of medium-sized immunoblasts and centroblasts with high mitotic activity, Ki67 80–100%. Immunophenotyping of malignant cells showed positivity on CD20, CD10, bcl-6, MUM-1 and MYC, and negativity on CD3, bcl-2, CD5, cyclin D1 and CD30. Due to her poor nutritional status, radical surgical resection of the involved tissues, low-risk aaIPI, and a lack of therapeutic guidelines in such cases, we ad-

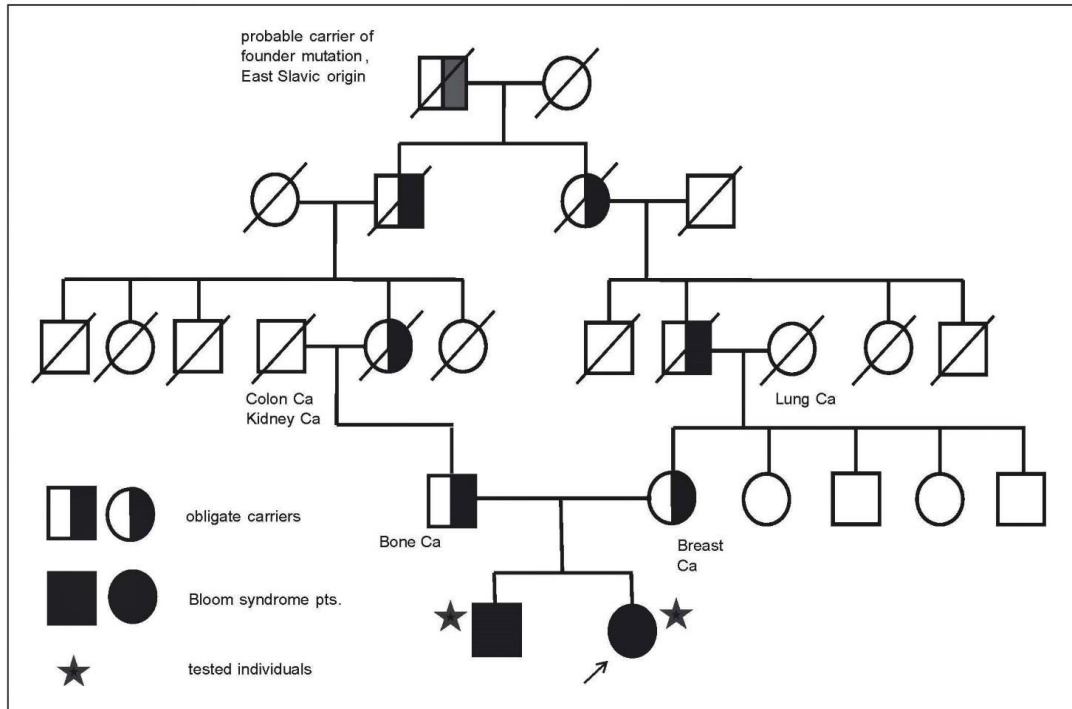


Fig. 3. Pedigree of the consanguineous family with Bloom syndrome showing the obligate carriers and the potential founding mutation carrier.

ministered “standard” combined chemotherapy regimen consisting of 6 R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone) cycles with respect to cumulative doses of anthracyclines used before and initial omission of vincristine. One more single agent rituximab was administered in May 2018. The whole treatment was not accompanied by significant adverse events, and the final restaging PET/CT scan was evaluated as complete remission of the lymphoma. In June 2018, terminal ileostomy was canceled. So far, the patient remains in complete remission more than one year after treatment completion. The main ongoing problem is severe malnutrition, weight 27.5 kg and BMI 14.0 kg/m².

Family History

The brother of the proband also displayed short stature and facial dysmorphism (Fig. 2). He was diagnosed with growth restriction, pubertas praecox, retention of testes, and teleangiectasias on sun-exposed areas. There was no history of cancer or other difficulties. The parents of the siblings were consanguineous, with a potential carrier of the founder mutation, originating from the east Ukraine/Russian region (Fig. 3). There was a sporadic occurrence of solid cancer in the pedigree, not segregating with obligate carriers.

Methods and Results

Mutational Screening and Confirmation

A homozygous pathogenic variant c.1642C>T (p.Gln548*) in the *BLM* gene (NM_000057.3) was detected in the proband (Fig. 4). This variant results in a premature termination codon predicted to cause a truncated or absent BLM protein due to nonsense-mediated decay. The variant is classified as pathogenic – class 5, according to ACMG/AMP standards and guidelines [Richards et al., 2015; Kleinberger et al., 2016]. The presence of the pathogenic variant was confirmed by Sanger sequencing (Fig. 5).

Predictive testing was performed in the male sibling. Testing by Sanger sequencing confirmed the presence of a homozygous c.1642C>T pathogenic variant in the *BLM* gene.

Cytogenetic Studies

Samples from the proband and her brother were studied by conventional karyotyping, followed by chromosome breakage analysis. Cytogenetic study determined a normal female karyotype (46,XX) in the proband and a normal male karyotype (46,XY) in her brother. Acquired chromosomal aberrations were present in 27% of all metaphase nuclei in the proband, and in 7% in her brother, respectively (Fig. 6, 7).

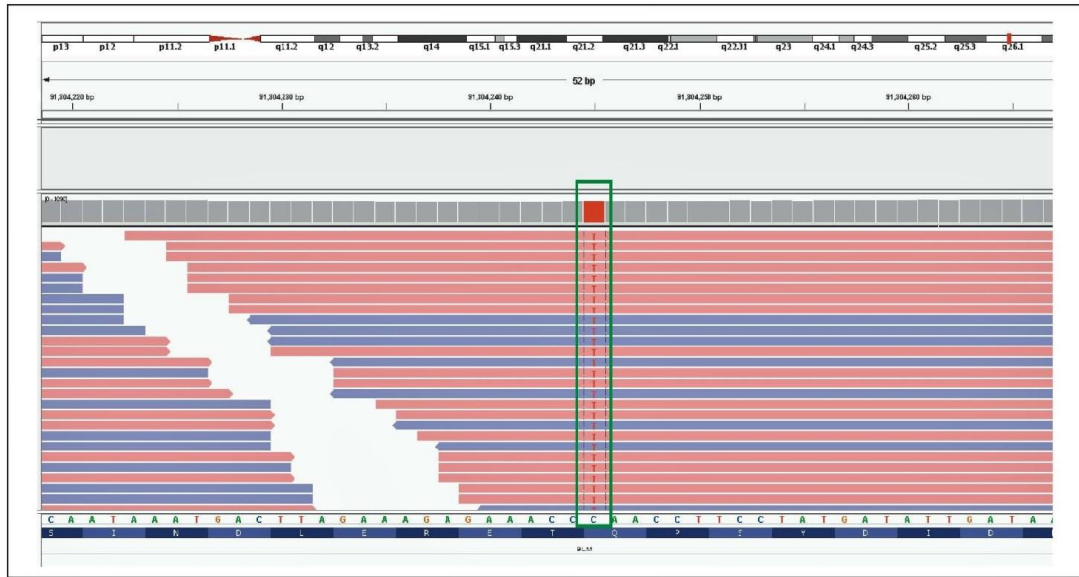


Fig. 4. Analysis of the c.1642C>T pathogenic variant (g.100183535C>T) by Integrative Genomics Viewer (green box). Forward sequencing reads are in blue; reverse sequencing reads are in pink.

Discussion

In this report, we describe a 35-year-old woman with Bloom syndrome. She presented with short stature, facial dysmorphism, premature ovarian failure, endocrine abnormalities, lung involvement, and recurrent malignant lymphoma at 15 and 34 years. At the time of the second oncological diagnosis, we considered other chromosome instability syndromes, notably Nijmegen breakage syndrome, Werner syndrome, and ataxia teleangiectasia. Other RecQ-related disorders: Rothmund Thomson, RAPADILINO, and Baller Gerold syndrome, associated with *RECQL4* pathogenic variants, and disorders caused by pathogenic variants in *RMI1*, *RMI2*, and *TOP3A* helicase genes (OMIM 610404, 612426, and 618097) were also considered (for phenotypic comparison, and see Table 1).

According to medical records, in the year 2000, the proband tested negative for the c.657del5 *NBN* pathogenic variant, and positive for chromosomal instability. Definitive diagnosis of Bloom syndrome was confirmed only after the identification of a homozygous c.1642C>T pathogenic variant in the *BLM* gene. These results were consistent with consanguineous origin, identifying a probable founder from Slavic East-Europe in the pedigree.

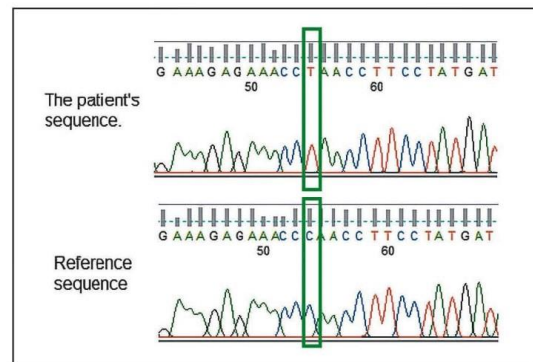


Fig. 5. Sanger sequencing results of homozygous c.1642C>T pathogenic variant compared with wild type.

The treatment with immunochemotherapy was started without prior knowledge of NGS results. Therefore, it was tailored more to the clinical and nutritional state of the patient than genetics. Standard combined chemotherapy regimen with curative intent was used, consisting of 6 R-CHOP cycles with initial omission of vincristine.

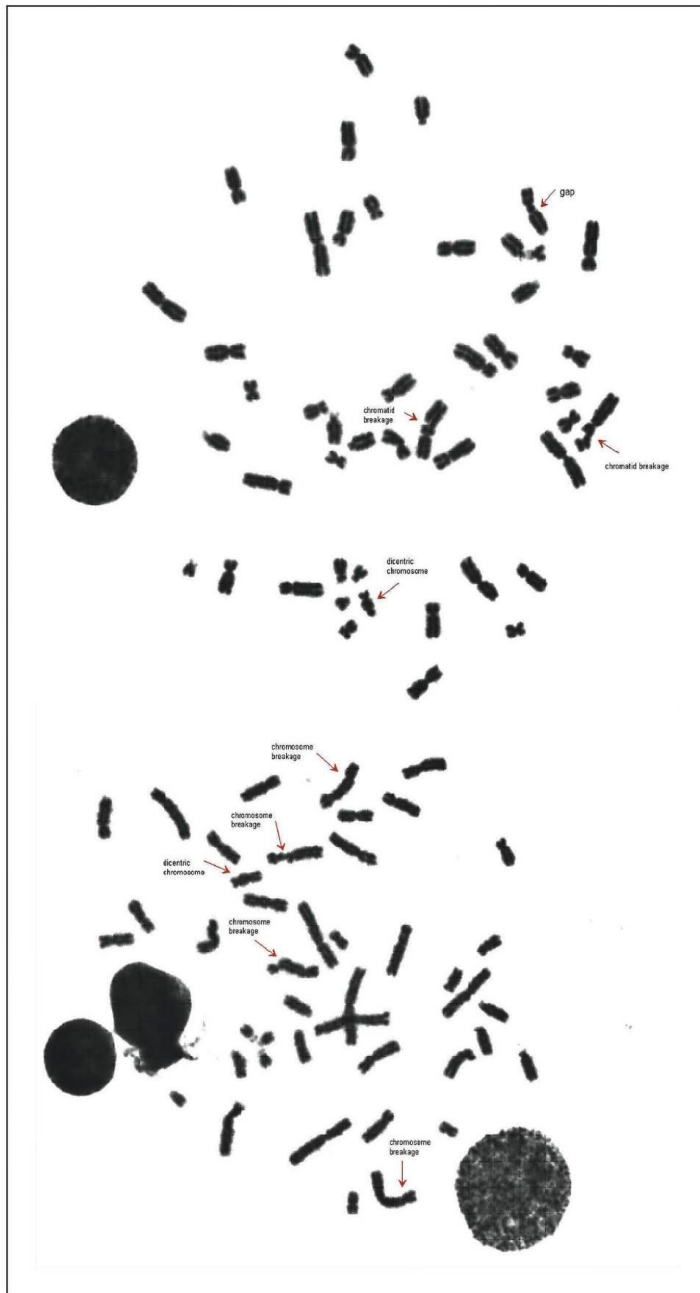


Fig. 6. Metaphase nuclei of the proband showing acquired chromosomal aberrations.



Fig. 7. Metaphase nuclei of the sibling showing acquired chromosomal aberrations. Frequency of breakages is much lower than in the proband.

The patient experienced no major complications, such as cytopenias or life-threatening infections. In hindsight, a nonintensive regimen was definitely optimal. With prior knowledge of Bloom syndrome diagnosis, an even more moderate treatment, such as Nijmegen protocol with 20%

dose reduction [Dembowska-Baginska et al., 2009], could have been used. In the recent reviews, dose reduction up to 50% is recommended [Cunnif et al., 2018]. Some authors report more dramatic toxicity of treatment [Fedhila-Ben Ayed et al., 2016], while others report successful

Table 1. Comparison of clinical findings in chromosome breakage disorders and helicase disorders

Clinical features	Nijmegen breakage syndrome	Werner syndrome	Bloom syndrome	Ataxia teleangiectasia	Beller-Gerold	Rotmund-Thompson	RAPADILINO	Helicase disorders: RML1, RML2, TOP3A
IUG	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+
Short stature	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+
Microcephaly	+	+	+	+/-	+	+	+	+
Facial dysmorphism	Receding mandibula, + bird-like face		Long and narrow face, retrognathia, micrognathia	+/-	Oxycephaly, turicephaly	Craniosynostosis	+	+/-
Skeletal abnormalities	-	-	-	-	Radial aplasia, ulnar hypoplasia	Frontal bossing, saddle nose, radial ray defects	Radial and patellar aplasia	-
Skin manifestations	Café-au-lait patches, teleangiectasia	Scleroderma, cataract	Café-au-lait patches, malar rash	Teleangiectasia	Poikiloderma	Pigmentation, teleangiectasia, poikiloderma	-	Café-au-lait patches
Intellectual disability	Normal/mild	-	-	-	+/-	-	-	Mild
Cardiac malformations	-	-	-	-	+/-	-	-	+
Endocrine dysfunction	+	Premature diabetes mellitus	Premature diabetes, hypothyroidism	-	-	-	-	-
Pulmonary manifestations	Bronchiectasia	-	Pulmonary fibrosis, bronchiectasia	Bronchiectasia	-	-	-	-
GIT manifestations	-	-	-	-	Anogenital malformations	Anorectal malformations, pylorostenosis	Persistent diarrhea	GE reflux
Neurological manifestations	-	-	-	Ataxia, progressive degeneration	-	-	-	-
Infertility	+	+	+	+	-	+	-	Unknown
Immune deficiency	+	+	+	+	-	+/-	-	+
Increased risk of malignancy	Lymphomas, leukemias, CNS tumors	+	Lymphomas, leukemias, solid cancers	Leukemias, breast cancer	Unknown	Osteosarcoma, skin cancer	Unknown	Unknown
Chromosome instability	+	+	+	+	-	-	-	+

CNS, central nervous system; GE, gastroesophageal; GIT, gastrointestinal tract; IUG, intrauterine growth restriction

treatment with similar regimens [Jastaniah, 2017]. Despite generally high treatment response rates in some of the aggressive B-cell lymphomas, relapses can occur, mostly in the first 2–3 years after treatment completion. In the case report as described above, there is not only a high risk of another relapse, but also of secondary malignancies.

Classifications of lymphoid malignancies developed dramatically during the last decades, reflecting morphology, immunophenotype, clinical presentation, cytogenetics, and molecular genetics. During the manifestation of the first malignancy in the 1990s, REAL (Revised European-American Lymphoma) classification was used. The tumor was classified as centroblastic B-

NHL. During the manifestation of the second malignancy in 2017, revised WHO classification was used [Swerdlow et al., 2016]. The patient's lymphoma was classified as high-grade B-lymphoma, not otherwise specified, possibly Burkitt-like lymphoma with 11q aberration. We cannot rule out the possibility of a late relapse because the tumors share some features (presence of centroblasts, sudden onset and aggressivity). However, due to different anatomical locations of onset, we suggest that an entirely new lymphoproliferative disease might have occurred. This could be confirmed only using genome profile expression techniques. Unfortunately, no histological sample was available from the time of first diagnosis.

Table 2. Comparison of clinical findings in the female proband and her brother

Clinical findings	Proband	Brother
Short stature	Yes	Yes
Microcephaly	Yes	Yes
Facial dysmorphism	Prolonged face, micrognathia, retrognathia, gothic plate, prominent features	Prolonged face, retrognathia
Skin manifestations	Keratosis plaris, café-au-lait spots	Teleangiectasia
Intellectual disability	No	No
Endocrine dysfunction	Yes	No
Pulmonary manifestations	Pulmonary fibrosis, asthma, bronchiectasia	No
Infertility	Primary amenorrhea	Yes
Immune deficiency	Yes	Unknown
Malignancies	Duplicity of malignant lymphoma	No
Chromosome instability	29% aberrant nuclei	7% aberrant nuclei

Our case also demonstrates individual variability in patients with Bloom syndrome, even within a single family. While the proband developed recurrent malignant lymphoma and suffered from multiple endocrine dysfunctions as well as severe underweight, the brother had no major health conditions, apart from increased sensitivity to sun (Table 2). Interestingly, there were significant differences in the rate of spontaneous chromosomal aberrations between the siblings. This could be partially attributed to the genotoxic treatment undergone by the proband. However, more factors (functionality of other gene-repair mechanisms, immune surveillance for cancer) could have caused this difference.

Conclusions

We present a sibling pair with Bloom syndrome with consanguineous origin and recurrence of lymphoid malignancies in the proband. These are among the first reported cases of Bloom syndrome in the Czech Republic.

References

- Arora H, Chacon AH, Choudhary S, McLeod MP, Meshkov L, et al: Bloom syndrome. *Int J Dermatol* 53: 798–802 (2014).
- Berger C, Frappaz D, Leroux D, Blez F, Vercherat M, et al: Wilms tumor and Bloom syndrome (in French). *Arch Pediatr* 3:802–805 (1996).
- Cairney AE, Andrews M, Greenberg M, Smith D, Weksberg R: Wilms tumor in three patients with Bloom syndrome. *J Pediatr* 111:414–416 (1987).
- Cunniff C, Bassetti JA, Ellis NA: Bloom's syndrome: clinical spectrum, molecular pathogenesis, and cancer predisposition. *Mol Syndromol* 8:4–23 (2017).
- Cunniff C, Djavid AR, Carrubba S, Cohen B, Ellis NA, et al: Health supervision for people with Bloom syndrome. *Am J Med Genet A* 176: 1872–1881 (2018).
- Dembowska-Baginska B, Perek D, Brozyna A, Wakulinska A, Olczak-Kowalczyk D, et al: Non-Hodgkin lymphoma (NHL) in children with Nijmegen Breakage syndrome (NBS). *Pediatr Blood Cancer* 52:186–190 (2009).
- Diaz A, Vogiatzi MG, Sanz MM, German J: Evaluation of short stature, carbohydrate metabolism and other endocrinopathies in Bloom's syndrome. *Horm Res* 66:111–117 (2006).
- Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen, J, Lennon DJ, et al: The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 83: 655–666 (1995).
- Fedhila-Ben Ayed F, Douira-Khomsy W, Rhayem S, Jelassi M, Zribi H, et al: Burkitt lymphoma in a child with Bloom syndrome. *Arch Pediatr* 23:382–384 (2016).
- Flanagan M, Cunniff CM: Bloom syndrome, in Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, et al (eds): *GeneReview®* [Internet] (University of Washington, Seattle 1993–2020). Initial posting: March 22, 2006; last update: Feb 14, 2019.

Early diagnosis of similar disorders may lead to early cancer detection and prevention, correct dosage of cytostatic regimens, improved clinical outcomes, and improved life expectancy of affected individuals.

Statement of Ethics

The authors have no ethical conflicts to disclose.

Disclosure Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding Sources

This study was supported by the Czech Ministry of Health (grant AZV NU20-08-00137 16-29447A) and the Masaryk University (grant MUNI/A/1395/2019).

- Foretová L, Petráková K: Hereditární nádorová onemocnění V. Klin Onkol 32(Suppl) (2019).
- German J: Bloom's syndrome. I. Genetical and clinical observations in the first twenty-seven patients. Am J Hum Genet 21:196–227 (1969).
- German J, Sanz MM, Ciocci S, Ye TZ, Ellis NA: Syndrome-causing mutations of the *BLM* gene in persons in the Bloom's Syndrome Registry. Hum Mut 28:743–753 (2007).
- Gretzula JC, Hevia O, Weber PJ: Bloom's syndrome. J Am Acad Dermatol 17:479–488 (1987).
- Jastaniah W: Successful treatment of mature B-cell lymphoma with rituximab-based chemotherapy in a patient with Bloom syndrome. Pediatr Blood Cancer 64 (2017).
- Karow JK, Chakraverty RK, Hickson ID: The Bloom's syndrome gene product is a 3'-5' DNA helicase. J Biol Chem 272:30611–30614 (1997).
- Kaseb H, Hozayen S: Chromosome Instability Syndromes, in StatPearls [Internet] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing (2019).
- Kleinberger J, Maloney KA, Pollin TT, Jeng LJ: An openly available online tool for implementing the ACMG/AMP standards and guidelines for the interpretation of sequence variants. Genet Med 18:1165 (2016).
- Masmoudi A, Marrakchi S, Kamoun H, Chaaben H, Ben Salah G, et al: Clinical and laboratory findings in 8 patients with Bloom's syndrome. J Dermatol Case Rep 6:29–33 (2012).
- McGowan J, Maize J, Cook J: Lupus-like histopathology in Bloom syndrome: reexamining the clinical and histologic implications of photosensitivity. Am J Dermatopathol 31:786–791 (2009).
- Nair G, Lobo I, Jayalaksmi TK, Uppe A, Jindal S, et al: Bloom syndrome with lung involvement. Lung India 26:92–94 (2009).
- Prokofyeva D, Bogdanova N, Dubrowskaja N, Bermisheva M, Takhirova Z, et al: Nonsense mutation p.Q548X in *BLM*, the gene mutated in Bloom's syndrome, is associated with breast cancer in Slavic populations. Breast Cancer Res Treat 137:533–539 (2013).
- Relhan V, Sinhan S, Bhatnagar T, Garg VK, Kochhar A: Bloom syndrome with extensive pulmonary involvement in a child. Indian J Dermatol 60:217 (2015).
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al: Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med 17:405–424 (2015).
- Seemanová E, Seeman P, Jarolím P: Význam syndromů chromozomální instability. Čas Lék Čes 141:16–22 (2002).
- Shahrabani-Gargir L, Shomrat R, Yaron Y, Orr-Urtreger A, Groden J, Legum C: High frequency of a common Bloom syndrome Ashkenazi mutation among Jews of Polish origin. Genet Test 2:293–296 (1998).
- Sokolenko AP, Iyevaeva AG, Preobrazhenskaya EV, Mitiushkina NV, Aбыsheva SN, et al: High prevalence and breast cancer predisposing role of the *BLM* c.1642C>T (Q548X) mutation in Russia. Int J Cancer 130:2867–2873 (2012).
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, et al: The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood 127:2375–2390 (2016).

6.10. Plicní onemocnění a autoimunitní hemolytická anémie asociována s IgG4 (Doubková M, Matěj R, Chovancová Z, Doubek M. Vnitř Lék. 2020; 66(4): e22-e27)

E22 | KAZUISTIKA

Plicní onemocnění a autoimunitní hemolytická anémie asociovaná s IgG4

Plicní onemocnění a autoimunitní hemolytická anémie asociovaná s IgG4

Martina Doubková¹, Radoslav Matěj², Zita Chovancová³, Michael Doubek^{4,5}

¹Klinika nemocí plicních a tuberkulózy LF MU a FN Brno, pracoviště Bohunice

²Ústav patologie a molekulární medicíny 3. LF UK a Thomayerovy nemocnice, Praha

³Ústav klinické imunologie a alergologie LF MU a FN u sv. Anny Brno

⁴Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno pracoviště Bohunice

⁵Středoevropský technologický institut MU Brno

IgG4 asociovaná onemocnění představují relativně novou a poměrně vzácnou skupinu systémových zánětlivých onemocnění, která je charakterizována zánětlivým, fibrotizujícím či sklerotizujícím postižením jednoho nebo více orgánů doprovázené lymfoplazmocelulární infiltrací tkání s výrazným zastoupením IgG4 plazmatických buněk a většinou zvýšenou koncentrací sérových IgG4 imunoglobulinů (dle definice > 1,35 g/l; referenční rozmezí 0,08–1,40 g/l). Pro stanovení diagnózy je klíčový histopatologický nálezn. Autoři prezentují kazuistiku pacienta s IgG4 asociovaným systémovým onemocněním projevujícím se vzácnou kombinací autoimunitní hemolytické anémie a plicního postižení napodobujícího radiologicky metastatický proces.

Klíčová slova: autoimunitní hemolytická anémie, IgG4 asociované onemocnění, intersticiální plicní proces.

Lung diseases and autoimmune hemolytic anemia associated with IgG4 disease

IgG4 related disease (IgG4-RD) is a rare and relatively new group of systemic inflammatory diseases characterized by inflammatory, fibrotic or sclerotic involvement of one or more organs accompanied by increased IgG4 plasma cells tissue infiltration and usually elevated serum IgG4 (IgG4 > 1.35g/l, normal range 0.08–1.40 g/l) level. Histopathological findings are crucial for the diagnostics of this disease. The authors present a case report of a patient with IgG4 associated disease manifested by a rare combination of autoimmune hemolytic anemia and pulmonary involvement.

Key words: autoimmune haemolytic anemia, IgG4 associated disease, interstitial lung disease.

Úvod

S imunoglobulinem IgG4 asociovaná onemocnění (z anglického IgG4-related disease; IgG4-RD) tvoří relativně vzácnou a v současnosti zatím málo probádanou heterogenní skupinu systémových zánětlivých onemocnění. Jsou charakterizována přítomností fibrotizujícího nebo sklerotizujícího postižení jednoho nebo více orgánů, pro které je histologicky typická přítomnost lymfoplazmocelulární infiltrace bohaté na IgG4 plazmatické buňky (1). Toto onemocnění bývá doprovázeno také zvýšenou sérovou koncentrací IgG4 podtřídy imunoglobulinů (dle definice > 1,35 g/l; referenční rozmezí 0,08–1,40 g/l) (2), přičemž až u jedné třetiny pacientů s IgG4-RD může být koncentrace IgG4 v séru v normě (3, 4). Choroby asociované s IgG4 mohou postihnout

celou řadu orgánů (např. žlučové cesty, slinné žlázy, periorbitální tkáň, ledviny, plíce, mízní uzliny, meningy, cévy, měkké tkáně nebo prostatu). Postižení tkání může vést až k orgánovému selhání, navíc často imituje maligní nádorové onemocnění.

V našem sdělení prezentujeme vzácný případ pacienta s IgG4 asociovaným systémovým onemocněním projevujícím se vzácnou kombinací autoimunitní hemolytické anémie (AIHA) a plicního postižení napodobujícího radiologicky metastatickou diseminací nádorového procesu.

Kazuistika

Šedesátisedmiletý pacient, nekuřák, byl přijat na hematologicko-onkologickou kliniku pro nově zjištěnou autoimunitní hemolytickou

KORISPONDENČNÍ ADRESA AUTORA:

MUDr. Martina Doubková, Ph.D., doubkovamartina@seznam.cz

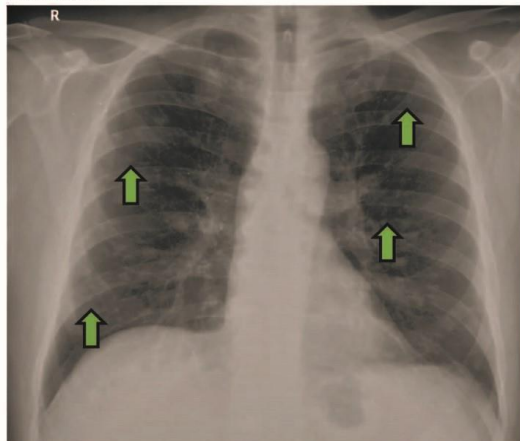
Klinika nemocí plicních a tuberkulózy LF MU a FN Brno, pracoviště Bohunice, Jihlavská 20, 625 00 Brno

Čít. zkr: Vnitř Lék 2020; 66(4): e22–e27

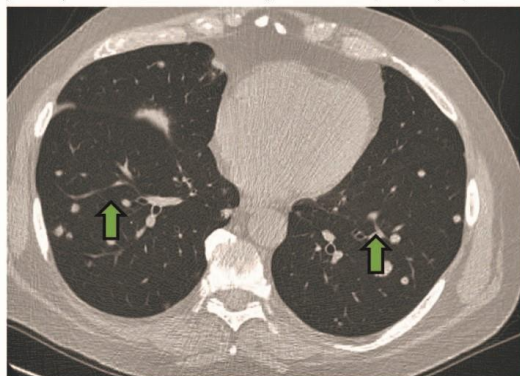
Článek přijat redakcí: 18. 8. 2019

Článek přijat k publikaci: 24. 9. 2019

Obr. 1. Zadopřední snímek hrudníku pacienta s IgG4 asociovaným onemocněním a plicním postižením. Nodulární zastínění oboustranně difúzně (zelená šipka).



Obr. 2. HRCT hrudníku pacienta s IgG4 asociovaným onemocněním a plicním postižením. Difúzní nodularity oboustranně (zelená šipka)



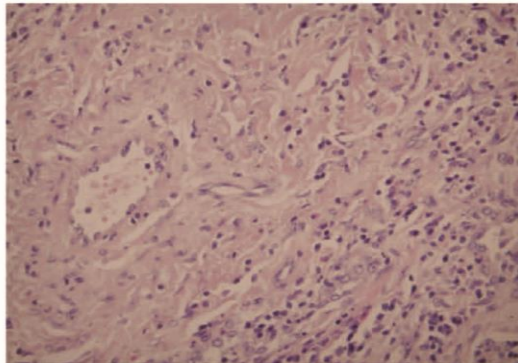
anémii s tepelnými protilátkami. Pacient trpěl únavou, úbytkem hmotnosti, bolestmi svalů, bez teplot. Nestěžoval si na dušnost či kašel. Léčil se jen s arteriální hypertenzí. V pracovní anamnéze nebylo pozoruhodností, dříve pracoval jako počítačový technik, nyní dýchodce zpívající v opeře. Kromě antihypertenziv neužíval pravidelně žádné léky. Biochemické vyšetření bylo v normě. Byla zjištěna imunitní hemolytická anémie s tepelnými protilátkami (koncentrace hemoglobinu 64 g/l). Vyšetřením kostní dřeně nebyla zjištěna infiltrace patologickou buněčnou populací. Vzhledem k těžké anémii byla zahájena terapie intravenózními kortikoidy a pro známky anemického syndromu bylo nutné podat transfuzi erytrocytů. V rámci základního diagnostického algoritmu bylo pátráno po příčinách anémie. Na zadopředním snímku hrudníku byly četné difúzní nodulární zastínění (Obr. 1). Na HRCT hrudníku byla přítomna mnohočetná ložiska a hladké, okrouhlé noduly, některé i neostře s naznačenou spikulací do okolí a hraniční mediastinální a hilová lymfadenopatie (Obr. 2). Plicní funkční vyšetření neprokázalo ventilační poruchu, poruchu plicní difúze ani hypoxemii. Bronchoskopie s bronchoalveolární laváží (BAL) ukázala neutrofilní alveolitidu (79 % neutro-

Tab. 1. Přehled nomenklatury IgG4-RD. Současný – dřívější název. Podle (2,6)

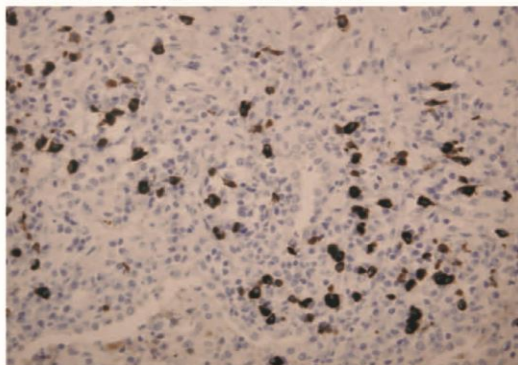
IgG4-related hypophysitis – autoimmune hypophysitis
IgG4-related related ophthalmic disease – Miculicz's disease
IgG4-related dacryoadenitis
IgG4-related pseudotumor
IgG4-related orbital myositis
IgG4-related orbital myositis
IgG4-related sialoadenitis (Miculicz's disease)
IgG4-related parotitis
IgG4-related submandibular gland disease (Miculicz's disease, Küttner tumor)
IgG4-related pachymeningitis (Hypertrophic pachymeninges)
IgG4-related thyroiditis (Riedel thyroiditis)
IgG4-related aortitis/arteritis (Inflammatory aortic aneurysm)
IgG4-related pericarditis
IgG4-related mediastinitis (Fibrosing mediastinitis)
IgG4-related lung disease (Interstitial pneumonia)
IgG4-related pleuritis
IgG4-related mastitis
IgG4-related pancreatitis (autoimmune pancreatitis) (type 1 autoimmune pancreatitis)
IgG4-related sclerosing cholangitis
IgG4-related kidney disease (Tubulointerstitial nephritis)
IgG4-related retroperitoneal fibrosis (Ormond disease)
IgG4-related prostatitis
IgG4-related skin disease (Cutaneous pseudolymphoma)

filních granulocytů v BAL; norma < 5 %), ale výsledný diferenciální rozpočet byl limitován regresivními změnami a mikrobiologické vyšetření prokázalo méně než 10^4 CFU/ml β -hemolytického streptokoka. Transbronchiální plicní biopsie zastihla drobnou část plicního parenchymu, která byla histologicky bez patologie. Autoantilátky byly negativní (antinukleární protilátky, protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům, dvouvláknové DNA, cyklickým citrulinovaným peptidům, cytoplazmě neutrofilů a revmatoidní faktor). Základní imunologické vyšetření prokázalo zvýšené sérové hladiny celkových IgG a IgE imunoglobulinů (IgG 18,19 g/l (referenční rozmezí 7,51–15,6 g/l); IgM 1,64 g/l (0,4–2,3 g/l); IgA < 0,05 g/l (0,7–4,0 g/l); IgE 684 U/l (0–90 U/l)). Pro podezření na metastazující plicní proces bylo u pacienta indikováno provedení plicní biopsie pomocí videoasistované hrudní torakoskopie (VATS). Dle histopatologického vyšetření se jednalo o fibrotizující plicní proces nejasné etiologie, diferenciálně diagnosticky bylo pomýšleno na silikotický uzlík. Vzhledem k tomu, že pacient nebyl exponován křemíčitému prachu a nepracoval v rizikovém prašném prostředí, byla diagnóza pneumokoniózy nepravděpodobná. Během léčby kortikoidy v úvodní dávce 2 mg/kg/den, kterou pacient podstoupil na hematologické klinice, došlo k postupnému ústupu anémie. Patologická zastínění na zadopředním snímku hrudníku však i nadále přetrvávala. Vzhledem ke stále nejasné diagnóze byl histopatologický vzorek zaslán ke konziliárnímu vyšetření. Diagnóza silikózy byla vyloučena a nálezy byly uzavřeny jako diagnóza IgG4 plicního asociovaného onemocnění. Pro tuto diagnózu byla splněna všechna histopatologická kritéria (hustý lymfocytární-plazmocelulární infiltrát s vyšším zastoupením IgG4 plazmocytů a eozinofilních granulocytů, výrazná fibróza uspořádaná do vírovitých vzorců a obliterující flebitida) (Obr. 3 a 4). Imunologické laboratorní vyšetření ukázalo hraniční elevaci IgG4 podtřídy imunoglobulinů (IgG4 1,43 g/l), ostatní imunologické parametry humorální i buněčné imunity byly v normě. Pacient tak splňoval všechna kritéria s IgG4 asociovaného onemocnění. V současnosti je pacient stabilní,

Obr. 3. Histopatologický nálezu u pacienta s IgG4 asociovaným plicním onemocněním znázorňující infiltraci plicního parenchymu zánětem s četnými plazmocytami a eozinofilními granulocyty a cévními změnami (hematoxylin a eozin, 400krát)



Obr. 4. Imunohistochemický nálezu u pacienta s IgG4 asociovaným plicním onemocněním. Průkaz IgG4+ plazmocytu (400krát)



nemá žádné klinické potíže, užívá malou udržovací dávku kortikoidů z indikace hematologické. Na kontrolním HRCT hrudníku byl po 8 měsících léčby kortikoidy zatím stacionární nálezu. Vzhledem k tomu, že pacient nemá žádné potíže, nyní nepředáváme další imunosupresivní léčbu.

Diskuze

IgG4 asociovaná onemocnění představují skupinu chronických relabujících zánětlivých onemocnění, pro jejichž diagnostiku je zásadní imunohistochemický průkaz denzní lymfoplazmocelulární proliferace s přítomností zvýšené koncentrace IgG4 plazmatických buněk, různě akcentovaná fibróza až skleróza, obliterující flebitida a mírná eozinofilie se znaky fibrózy, obliterující flebitida a mírná eozinofilie (2).

Zpočátku byly tyto změny popisovány v různých orgánech a považovány za samostatná onemocnění (Tab. 1), nicméně později se zjistilo, že se jedná o stejný patogenetický projev v různých orgánech. Proto byla tato onemocnění sloučena pod soubornou diagnózu tzv. IgG4-asociovaných onemocnění (IgG4-RD) (4, 5). První mezinárodní kongres věnovaný této problematice se konal v roce 2011 v Bostonu a první diagnostická kritéria tohoto onemocnění byla publikována v roce 2012 (Tab. 2) (4–6). Navrhovaná

Tab. 2. Diagnostická kritéria pro IgG4-RD. Podle (2, 6)

1. Klinický průkaz difúzního/lokalizovaného otoku nebo tumorózní masy v jednom či více orgánech
2. Sérová koncentrace IgG4 > 1,35 g/l
3. Histopatologický nálezu: a) Lymfoplazmocytární infiltrace a fibróza b) Infiltrace IgG4 plazmatickými buňkami: poměr IgG4+/IgG+ plazmatických buněk > 40 % a > 10 IgG4+ plazmatických buněk/HPF (zorné pole velkého zvětšení)
Definitivní diagnóza: 1. + 2. + 3.
Pravděpodobná: 1. + 3.
Možná: 1. + 2.

Tab. 3. Diagnostická kritéria pro IgG4 asociované plicní onemocnění. Podle (7)

A. Diagnostická kritéria
I. Zobrazovací metody (ZP snímek hrudníku, HRCT hrudníku) (hilová/mediastinální lymfadenopatie, ztlustění stěny bronchů, bronchovaskulárních svazků, ztlustění interlobulárních sept, nodulární zastínění, jiné infiltrace, pleurální ztlustění/pleurální výpotky)
II. Sérologie Elevace sérových hladin IgG4 \geq 135 mg/dl (1,35 g/l)
III. Histologie 2 nebo více následujících příznaků musí být splněno a: \geq 3 body; b: 2 body
1. Hustý lymfoplazmocelulární infiltrát postihující intersticiu peribronchovaskulárních svazků, interlobulárních sept a/nebo pleury
2. Infiltrace IgG4 plazmatickými buňkami, poměr IgG4/IgG > 40 % a/nebo > 10 IgG4 plazmatických buněk/zorné pole velkého zvětšení
3. Obliterující flebitida nebo obliterující arteritida
4. Denzní fibróza se stroriformním uspořádáním obsahující proliferující vřetenité buňky v lymfocytárním infiltrátu.
IV. Postižení jiných orgánů Přítomnost postižení jiných orgánů splňující kritéria v bodě III (sklerotizující dakroadenitida/sialoadenitida, autoimunitní pankreatitida, IgG4 asociovaná sklerotizující cholangitida, IgG4 asociovaná postižení ledvin, a retroperitoneální fibróza).
V. Vedlejší nálezu Hypokomplementemie
B. Diagnóza
1. Definitivní diagnóza: I + II + IIIa, nebo I + II + IIIb + IV Histopatologická diagnóza (definitivní): I + všechny 4 z III
2. Pravděpodobná diagnóza: I + II + IV, nebo I + II + IIIb + V
3. Možná diagnóza: I + II + IIIb
C. Diferenciální diagnóza
Je důležité oddělit následující onemocnění s podobnými příznaky: systémová onemocnění pojiva, granulomatózu s polyangitidou, eozinofilní granulomatózu s polyangitidou, sarkoidózu, infekci, Rosaiovou-Dorfmanovu nemoc, zánětlivý myofibroblastický tumor, lymfomy, karcinomy plic.

diagnostická kritéria z roku 2011 pro IgG4-RD s plicním postižením shrnují Tab. 3 a 4 (7).

Přesná epidemiologická data nejsou známa a prevalence nemocí asociovaných s IgG4 je pravděpodobně podhodnocená, a to zejména v Evropě a Jižní Americe. V těchto zemích je povědomí o tomto onemocnění nižší než v Asijských zemích (zejména Koreji a Japonsku), kde byla nemoc prvně popsána (8, 9).

Přesný patofyziologický mechanismus a charakteristika vyvolávajících příčin rozvoje IgG4 asociovaných onemocnění není plně objasněna. K rozvoji fibroinflatomního procesu však zřejmě přispívá více imunopatologických mechanismů, přičemž by se na něm mohly podílet genetické faktory, prodělané infekce nebo mechanismy autoimunitní (4, 5, 10, 11). Hlavní úlohu v patogenezi onemocnění hrají pravděpodobně T-lymfocyty (12–14). Naivní

Th-lymfocyty se pod vlivem cytokinů diferencují na pomocné (Th1 a Th2), regulační (Treg) a Th17 T-lymfocyty. IgG4 asociovaná onemocnění jsou charakterizována převahou Th2 imunitní odpovědi s expresí odpovídajících cytokinů (zejména IL4, IL5, IL10 a IL13), viz Obr. 5 (15). Tyto interleukiny (zejména IL5) jsou zodpovědné také za eozinofilii. Na vzniku nemoci mají podíl rovněž Treg lymfocyty, které jsou zdrojem hlavního profibrotického cytokinu transformujícího růstového faktoru β (TGF β), který se zásadně podílí na vzniku fibrózy. Produkce IgG4 je závislá na Th2 cytokinech (IL5, IL13) a Treg cytokinech (IL10) (13, 14). Koncentrace celkových IgG imunoglobulinů v séru je dána součtem koncentrace 4 jeho podtříd (IgG1–IgG4), IgG4 tvoří méně než 5 % celkového IgG u zdravých osob a je zároveň nejméně zastoupenou podtřídou IgG imunoglobulinů. U nemocných s IgG4-RD může být tvorba IgG4 zvýšená. IgG4 je považován za nezáštlivý nebo spíše protizánětlivý imunoglobulin, protože prakticky neváže C1q složku komplementu a nespouští klasickou dráhu aktivace komplementu a má nízkou afinitu k Fc receptorům (16). Nicméně u některých onemocnění se na jejich patogenезi podílí (např. pemphigus vulgaris, idiopatická membranozní glomerulonefritida nebo myasthenia gravis) (17–19). Původně se myslelo, že přítomnost zvýšené koncentrace IgG4 podtřídy imunoglobulinů v séru je u pacientů s IgG4-RD pouze epifenomenem bez patogenetického významu, nicméně v pokusech na myších se ukázalo, že při podání IgG imunoglobulinů pacientů s IgG4-RD myším, u nich dochází ke stejnému orgánovému postižení jako u pacientů s IgG4-RD (20). To by mohlo ukázat na možnou úlohu IgG4 v rámci patogenезe tohoto onemocnění (Obr. 4 – imunologická podstata onemocnění s histopatologickými nálezy).

Vzhledem k vzácnému výskytu a heterogenitě této skupiny onemocnění chybí dosud široce používané a obecně akceptované standardy pro diagnostiku a léčbu (1). Zvýšená koncentrace IgG4 podtřídy imunoglobulinů (> 1,35 g/l) není pro IgG4-RD specifická a může se vyskytovat i u jiných onemocnění, např. některých malignit nebo infekcí (6).

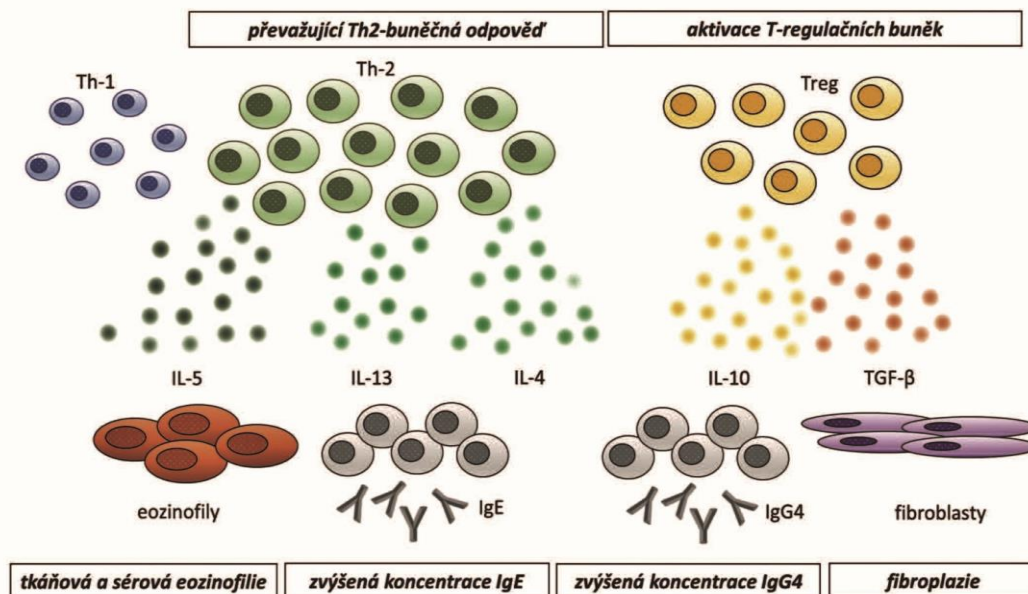
IgG4-RD se řadí mezi autoimunitní onemocnění, protože obvykle dobře odpovídají na léčbu systémovými kortikoidy (1). Pacienti s IgG4-RD můžeme dle typu a rozsahu jejich onemocnění buď jen sledovat (tzv. strategie „watch and wait“) nebo léčit imunosupresivní terapií. Pouhé sledování je možné např. u pacientů s asymptomatickou lymfadenopatií nebo mírným zvětšením podčelistních žláz v případě histopatologicky ověřené diagnózy (21). Nicméně musíme mít na paměti, že i subklinické asymptomatické formy onemocnění mohou postupně vést k nevratnému a závažnému poškození postižených orgánů. Naopak fibrotické léze mohou být projevem nevratných fibrotických změn, tzv. „vyhoření“ („burnout“) a nemusí reagovat na terapii. Na druhou stranu nasazení imunosupresivní léčby vyžadují všichni symptomatizující pacienti s aktivní IgG4-RD. Podobně jako u jiných systémových zánětlivých onemocnění i zde dochází k relapsům či recidivám onemocnění. Základním lékem první linie jsou systémové kortikoidy v dávkách 30–40 mg/denně po dobu 2–4 týdnů s postupným snižováním každé 1–2 týdny na co nejmenší účinnou dávku. Délka terapie se různí od 3–6 měsíců až po dobu 3 let (8, 21–24). Dalším lékem v případě kortikorezistence nebo recidiv jsou jiná imunosupresiva (azathioprin, mykofenolát mofetil, methotrexát, takrolimus, cyklofosfamid) (21, 25). Slibnou možností léčby je u kortikorezistentních pacientů s IgG4-RD terapie pomocí anti-CD20 monoklonálních protilátek (21, 25, 26). Rituximab je chimérickou myší monoklonální protilátkou namířeno proti molekule CD20 na povr-

Tab. 4. Diagnostická kritéria IgG4 asociovaných respiračních (plicních) onemocnění. Doplnění tabulky 3. Podle (7)

Nálezy na zobrazovacích metodách
(RTG snímek hrudníku, výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností) – jsou nespecifické a je třeba vyloučit infekce a malignity
Hilová a mediastinální lymfadenopatie
Ztlustění stěn bronchů a ztlustění bronchovaskulárních svazků
Postižení intersticia interlobulárních sept a pleury
Nodulární zastínění, konsolidace
Klinika/laboratorní testy
Mohou být přítomny alergické projevy (rinitis, astma)
Zvýšené hladiny IgG, IgE; zvýšení hladin IgA a IgM je vzácné
Positivita autoprotilátek ANA a RF, snížení hladin komplementu
Většinou nenalézáme známky zánětu (CRP a leukocytóza)
Patologické nálezy
Přítomnost úseků fibrotizace prostoupené lymfoplazmocelulární celulizací ve tkáni, např. v plicním intersticiu, bronchovaskulárních svazcích, interlobulárních septech, pleure a přilehlých interalveolárních septech.
Denzní fibróza se stroriformním uspořádáním obsahující proliferující vřetenité buňky v lymfocytárním infiltrátu.
Uspořádání fibrotických proliferátů je nepravidelné někdy vírovité. Fibrotické masy místy budí dojem z destrukce alveolárních prostor vzhledem k přítomnosti ložiskovité akcentace fibrózy prostoupené zánětlivým infiltrátem, ale významnější destrukce plicního parenchymu patrná není.
Do obrazu postižení spadá i přítomnost různého počtu eozinofilních granulocytů, zatímco zvýšené zastoupení neutrofilních granulocytů a granulomatózních formací není pro postižení typické.
Pro histopatologickou diagnózu je zpravidla nutná chirurgická plicní biopsie.
Postižení mimohrudních orgánů
Mimohrudní postižení orgánů je takové, které spolehlivě splňuje definovaná orgánově specifická diagnostická kritéria (pankreas, žlučové cesty nebo ledviny), nebo takové, které jeví charakteristický histopatologický nálezy výrazné fibrotizace prostoupené lymfoplazmocelulárním zánětlivým infiltrátem se zvýšeným zastoupením IgG4+ plazmocytů odpovídající orgánově specifickým nálezům v klinickém vyšetření a ve vyšetření pomocí zobrazovacích metod (slinná a slzná žláza nebo retroperitoneum).

chu B-lymfocytům. Pacienti s IgG4-RD mají zvýšený počet cirkulujících plazmablastů. Marker CD20 není přítomen na povrchu plazmablastů a plazmatických buněk, proto rituximab přímo tyto buňky neovlivňuje, ale přes depleci celkových B-lymfocytů vede k depleci také cirkulujících IgG4 plazmocytů a cirkulujících plazmablastů (25).

V naší kazuistice prezentujeme případ pacienta s autoimunitní hemolytickou anémií a plicním postižením, imitujícím dle zobrazovacích metod metastatický rozsev nádorového onemocnění, které bylo nakonec diagnostikováno jako IgG4-RD. Koincidence tohoto onemocnění s autoimunitní hemolytickou anémií je vzácná (27–29). Patogenetickým podkladem rozvoje AIHA je tvorba autoprotilátek proti povrchovým antigenům červených krvinek. Vzniklý imunokomplex může aktivovat komplement klasickou cestou, což vede k intravaskulární hemolýze. Druhým mechanismem destrukce erytrocytů je vazba Fc receptoru fagocytů na Fc fragmenty autoprotilátek nebo receptoru pro komplement na povrchu fagocytů na opsonizační C3b složku komplementu, což vede k extravaskulární hemolýze ve slezině či játrech. Fc receptory fagocytů rozpoznávají navázané autoprotilátky podtřídy IgG1 a IgG3, které jsou zároveň nejpotentnějšími aktivátory komplementového systému. Patogenезe koincidence AIHA a IgG4-RD zatím zůstává ne-

Obr. 5. Imunologická podstata onemocnění a histopatologický nálezn. Podle (15)

objasněna, nicméně se předpokládá účast cytokinového prostředí Th2 typu imunitní odpovědi. To se pravděpodobně významných způsobem podílí jednak na rozvoji plicní fibrózy, ale také na produkci autoprotilátek způsobujících AIHA (30). V tkáních pacientů s IgG4-RD byla sice prokázána zvýšená exprese Th2 cytokinů (IL4, IL5 a IL13) a regulátorů jejich produkce (IL10 a TGFβ) (12), což by mohlo svědčit na propojení mezi IgG4-RD a AIHA skrz Th2 cytokinový profil, přesto se ale nepředpokládá, že by se IgG4 imunoglobuliny účastnily patogenese AIHA, protože špatně aktivují komplementový systém a mechanismy fagocytózy (31).

Závěr

IgG4 asociovaná onemocnění představují relativně vzácnou skupinu chronických relabujících zánětlivých onemocnění postihujících různé orgány lidského těla. Rozmanitý klinický obraz odvíjející se od typu postižených orgánů sťažuje diagnostiku tohoto onemocnění. Hlavním klíčem pro diagnózu IgG4-RD je histopatologické vyšetření, ale to vyžaduje, aby v rámci diferenciální diagnostiky bylo na toto onemocnění primárně pomyšleno. Kazuistika našeho pacienta ukazuje možnost vzácné koincidence IgG4-RD a AIHA, nicméně vzájemný vztah obou nemocí není plně objasněn.

LITERATURA

- Laccarino L, Talario R, Scirè CA, et al. IgG4-related diseases: state of the art on clinical practice guidelines. *RMD Open* 2019; 4: (Suppl. 1): e000787.
- Umehara H, Okazaki K, Nakamura T, et al. Current approach to the diagnosis of IgG4-related disease-Combination of comprehensive diagnostic and organ-specific criteria. *Mod Rheumatol* 2017; 27: 381–391.
- Bozzala Cassione E, Stone JH. IgG4-related disease. *Curr Opin Rheumatol* 2017; 29: 223–227.
- Stone JH, Zen Y, Deshpande V. IgG4-related disease. *N Engl J Med*. 2012; 366: 539–551.
- Stone JH, Khosroshahi A, Deshpande V, et al. Recommendations for the nomenclature of IgG4-related disease and its individual organ system manifestations. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 3061–3067.
- Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, et al. Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011. *Mod Rheumatol* 2012; 22: 21–30.
- Matusi S, Yamamoto H, Minamoto S, et al. Proposed diagnostic criteria for IgG4-related respiratory disease. *Respir Investig* 2016; 54: 130–132.
- Kamisawa T, Funata N, Hayashi Y, et al. A new clinicopathological entity of IgG4-related autoimmune disease. *J Gastroenterol* 2003; 38: 982–984.
- Masaki Y, Dong L, Kurose N, et al. Proposal for a new clinical entity, IgG4-positive multi-organ lymphoproliferative syndrome. Analysis of 64 cases of IgG4-related disorders. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1310–1315.
- Mikulová Š, Jílek D, Richter J. Nemoc asociovaná s IgG4. Úvod, patogenese, diagnostika. 1. část. *Alergie* 2015; 17: 16–24.
- Mikulová Š, Jílek D, Richter J. Nemoc asociovaná s IgG4. Klinický obraz, orgánová postižení a terapie. 2. část. *Alergie* 2015; 17: 91–99.
- Zen Y, Fujii T, Harada K, et al. Th2 and regulatory immune reactions are increased in immunoglobulin G4-related sclerosing pancreatitis and cholangitis. *Hepatology* 2007; 45: 1538–1546.
- Aalberse RC, Stapel SO, Schuurman J et al. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 469–477.
- Satoguina JS, Weyand E, Larbi J, et al. T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *J Immunol* 2005; 174: 4718–4726.
- Deshpande V, Khosroshahi A. Diagnostic guidelines for IgG4-related disease with a focus on histopathological criteria. *Diagnostic histopathology* 2013; 19: 119–127.
- Nirula A, Glaser SM, Kalled SL, et al. What is IgG4? A review of the biology of a unique immunoglobulin subtype. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23: 119–124.
- Anhalt GJ, Labib RS, Voorhees JJ et al. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *N Engl J Med* 1982; 306: 1189–1196.
- Beck jr. LH, Salant DJ. Membranous nephropathy: recent travels and new roads ahead. *Kidney Int* 2010; 77: 765–770.
- Plomp JJ, Huijbers MG, van der Maarel SM, et al. Pathogenic IgG4 subclass autoantibodies in MuSK myasthenia gravis. *Ann NY Acad Sci* 2012; 1275: 114–122.
- Shiokawa M, Kodama Y, Kuriyama K, et al. Pathogenicity of IgG in patients with IgG4-related disease. *Gut* 2016; 65: 1322–1332.
- Khosroshahi A, Wallace ZS, Crowe JL, et al. International consensus guidance statement on the management and treatment of IgG4-related disease. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67: 1688–1699.
- Ghazale A, Chari ST, Zhang L, et al. Immunoglobulin G4-associated cholangitis: clinical profile and response to therapy. *Gastroenterology* 2008; 134: 706–715.

23. Raina A, Yadav D, Krasinskas AM, et al. Evaluation and management of autoimmune pancreatitis: experience at a large US center. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 2295–306.
24. Losse S, Žurková M. Plicní projevy nemoci asociované s IgG4. *Postgrad Med* 2017; 19: (Suppl. 2): 50–54.
25. Khoroshahi A, Bloch DB, Desphande V, et al. Rituximab therapy leads to rapid decline of serum IgG4 levels and prompt clinical improvement in IgG4-related systemic disease. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 1755–1762.
26. Adam Z, Chovancová Z, Nová M, et al. Remise „the disease associated/related with immunoglobulin IgG4“ provázeného mnohočetnou lymfadenopatií po léčbě rituximabem a dexametazonem: kazuistika. *Vnitř Lék* 2018; 64: 290–299.
27. Hasegawa S, Mine S, Hagiwara S. IgG4-related disease combined with autoimmune hemolytic anemia and steroid-responsive transient hypercalcemia. *Clin Med Insights Case Rep* 2015; 8: 51–55.
28. Wang KC, Liao HT, Tsai CY. IgG4-related disease coexisting with autoimmune haemolytic anaemia. *BMJ Case Rep* 2018; pii: bcr-2018-224814.
29. Yoshida M, Marumo Y, Naitoh I, et al. Autoimmune hemolytic anemia obscured by the obstructive jaundice associated with IgG4-related sclerosing cholangitis in a patient with type 1 autoimmune pancreatitis: a case report and review of the literature. *Intern Med* 2018; 57: 1725–1732.
30. Noguchi S, Yatera K, Jinbo M, et al. IgG4-related lung disease associated with autoimmune hemolytic anemia: a case report and a literature review. *Intern Med* 2016; 55: 2469–2474.
31. Masutani H, Okuwaki K, Kida M, et al. First case of IgG4-related sclerosing cholangitis associated with autoimmune hemolytic anemia. *World J Gastroenterol* 2014; Doi: 10.3748/wjg.v20.i26.8740.

7. Diskuse

Intersticiální plicní procesy (IPP) neboli přesnějším ale méně užívaným názvem difuzní parenchymatózní nemoci plic, jsou širokou skupinou převážně chronických onemocnění. IPP jsou charakterizovány různým stupněm zánětu a plicní fibrózy nejen na úrovni plicního intersticia ale i plicních kapilár, endotelu, bronchiolů. Diferenciální diagnostika těchto nemocí patří k nejobtížnějším v pneumologii vůbec, protože tyto jednotky mají často podobné radiologické a mnohdy i histopatologické nálezy (Bradley a kol., 2008).

IPF je nejběžnějším typem idiopatické intersticiální pneumonie a má velmi špatnou prognózu, která je způsobena progresí rozsáhlé fibrotické přestavby plicního parenchymu. Řadí se mezi méně běžná plicní onemocnění a její etiologie není přesně známa. Opakované alveolární epiteliální poškození a abnormální proliferace fibroblastů s tvorbou extracelulární matrix je základní etiopatogenetický mechanismus IPF. Klinický průběh IPF neumíme jasně předpovídat a kritéria IPF progresse nejsou zcela dobře definována. Nicméně geny a epigenetické faktory mají vliv na vznik, vývoj a klinický fenotyp IPF. Pro prognostické účely IPF se užívají různé klinické a fyziologické determinanty. Prediktory mortality rozdělujeme na základní (bazální v době diagnózy) a dynamické (longitudinální, v době sledování). Parametry ovlivňující prognózu v době diagnózy jsou stupeň dušnosti, těžká porucha plicní difuze, desaturace během šestiminutového testu chůze, rozsah voštinovité přestavby na HRCT hrudníku, přítomnost plicní hypertenze. Jako longitudinální ukazatele mající vliv na prognózu jsou uváděny zhoršení dušnosti v čase, snížení plicních funkčních ukazatelů FVC (forsírovaná vitální kapacita) o 10 % a snížení difuzní kapacity plic o 15 %, zhoršení rozsahu fibrózy na HRCT hrudníku (Vašáková a kol, 2019). V naší práci z roku 2016 jsme sledovali bazální ukazatele v době diagnózy IPF. V jednorozměrné analýze byly zjištěny následující faktory ovlivňující negativně přežití v době diagnózy: vyšší věk, paličkovité prsty, vyšší stupeň dušnosti dle NYHA (*New York Heart Association*), průkaz neutrofilní alveolity v bronchoalveolární tekutině (BALT), starší pacienti bez histologické verifikace, kardiovaskulární komorbidity, diabetes a osteoporóza. Jako příznivé prognostické faktory byly zjištěny: lepší vstupní hodnoty vitální kapacity (VC), celkové plicní kapacity (TLC) a plicní difuze (DLco, Kco). Vícerozměrná analýza ukázala, že nepříznivá prognóza nemoci je asociována s: vyšším věkem, vyšším stupněm dušnosti. Průkaz lymfocytární alveolity v BALT a lepší hodnoty vstupních parametrů VC a DLco byly asociovány s lepším přežitím. Nebyl zjištěn žádný rozdíl v přežití mezi pohlavími a mezi kuřáky a nekuřáky. Medián přežití byl 51,6 měsíců od diagnózy a nejčastější příčinou smrti bylo respirační selhání (Doubková a kol., 2016). Ve studii z roku 2018 jsme se pokusili nalézt prognostické faktory české části EMPIRE registru a zjistili jsme, že změny plicní difuze DLco v čase jsou lepším prediktorem

mortality nežli změny FVC. Tyto výsledky nás vedly k závěru, aby se analýza změn DLco v čase stala součástí rutinních vyšetření v rámci klinických studií (Doubková a kol., 2018).

U sporadické i familiární formy plicní fibrózy se předpokládá vliv genetických faktorů, které zvyšují vnímavost k onemocnění a mohou mít podíl na heterogenitě onemocnění (Spagnolo a kol., 2012, 2014; Kropski a kol., 2013). Mezi klíčové geny predisponující k IPF patří geny kódující telomerázu (*TERC* a *TERT*), jejich mutace ovlivňuje délku telomer a tím přispívá ke stárnutí (Mushiroda a kol., 2008). Dále patogenní varianty genů kódujících proteiny plicního surfaktantu (van Moorsel a kol., 2010). Další z genů je patogenní varianta genu pro *MUC5B* (rs35705950) (Noth a kol., 2013; Peljto a kol., 2015). Polymorfismus v genu *TOLLIP* (*TOLL-interacting protein*), který je důležitou součástí vrozené imunity, rovněž predisponuje k IPF (Noth a kol., 2013). Vybrané polymorfismy v genech *TOLLIP* a *MUC5B* mají vliv na účinnost imunosupresivní terapie (Oldham a kol., 2015). Naše práce pojednávající o vlivu polymorfismů *MUC5B* a *DSP* na efekt antifibrotické terapie ukázala, že výsledek léčby antifibrotiky může být ovlivněn běžným polymorfismem rs2076295 v genu *DSP*, ale nikoli *MUC5B* rs35705950 a tím zdůraznit přínos farmakogenetiky a možnosti identifikovat genetické podskupiny s benefitem pro určitý typ antifibrotické terapie. Naše výsledky ukázali zvýšenou frekvenci výskytu *MUC5B* rs35705950 *T alely (55,2 % vs. 20,9 %, $P < 0,001$) a *DSP* rs2076295 *G alely (80,4 % vs. 68,3 %, $P < 0,001$) u IPF pacientů ve srovnání s kontrolami. Nosiči alely *DSP* rs2076295 * G profitovali na nintedanibu ve srovnání s pacienty s IPF s genotypem TT, kteří měli kratší OS (poměr rizika (HR) 7,99; 95% interval spolehlivosti (CI) = 1,56 - 40,90; $P = 0,013$) a rychlejší pokles ve funkci plic (HR 9,42; 95 % CI = 1,91-46,403; $P = 0,006$). Pacienti s rs2076295 TT genotypem profitovali z pirfenidonu při prodlouženém OS ($P = 0,040$; HR = 0,35; 95 % CI = 0,13-0,95) ve srovnání s nintedanibem. Obě asociace byly potvrzeny analýzou křížové validace. U alely *MUC5B* rs3570595 *T nebyl pozorován žádný rozdíl ve výsledku léčby u nintedanibu nebo pirfenidonu ($P = 0,784$).

Sarkoidóza je systémové granulomatózní onemocnění neznámé etiologie postihující prakticky jakýkoliv orgán nebo orgánový systém. Respirační trakt je postižen ve více než 90 %, proto je sarkoidóza doménou plicních lékařů. Incidence sarkoidózy srdce není známa a je různá v závislosti na studiích. Okolo 5 % pacientů s chronickou sarkoidózou má klinické manifestní postižení srdce (Baughmann a kol., 2001). Autoptickým vyšetřením se ale obvykle prokazuje větší míra postižení. Vzhledem k možné poddiagnostikovanosti tohoto postižení jsme se rozhodli ve spolupráci s kardiologem vyšetřit naše plicní pacienty se sarkoidózou a klinicky něnou kardiální anamnézou novou metodou MR s použitím T1 mappingu. Očekávali jsme stejně jako u pozdního sycení gadoliniem záchyt srdeční sarkoidózy. Možným vysvětlením,

proč tomu tak nebylo oproti výsledkům z jiných studií je, že průměrná doba našich nemocných od diagnózy plicní formy sarkoidózy byla 0,8 roku, kdežto v jiných studiích to bylo 5-10 let (viz kapitola 3.3.2.).

Zásadní roli v patogenezi sarkoidózy má genetická predispozice. Jedná se o geneticky komplexní onemocnění, kde byla popsána celá řada genů predisponujících ke vzniku sarkoidózy i genů ovlivňujících průběh onemocnění. Klíčovou roli v patogenezi mají zejména geny HLA systému I. a II. třídy. Dále byla popsána celá řada asociací mezi dalšími kandidátními geny a sarkoidózou. Součástí této práce byla předběžná analýza zaměřená na studie pacientů se sarkoidózou a vztahu k HLA. Tato první skupina pacientů se sarkoidózou vyšetřených pomocí NGS potvrdila některé dříve popsané asociace ale i nové asociace polymorfismů HLA-DPB1, HLA-DQA1 ke vzniku a vývoji onemocnění.

Klinický průběh je variabilní a prognóza sarkoidózy je všeobecně příznivá (Lošťáková a kol., 2020). Pacienti s méně pokročilým onemocněním mají vyšší pravděpodobnost remise. Nicméně léčení pacienti mají vyšší riziko relapsů. Letalita sarkoidózy je nízká. Běžnou příčinou úmrtí je pokročilé plicní postižení, pneumonie, srdeční selhání způsobené sarkoidózou. Multiparametrickou analýzou jsme zjistili, že příznivou prognózu ve shodě se zahraničními daty má ženské pohlaví, méně pokročilé stádium sarkoidózy na zadopředním snímku hrudníku, vyšší poměr pomocných a cytotoxických T-lymfocytů v BALT, lymfocytární alveolitida v BALT a méně závažné plicní funkční postižení (Doubková a kol., 2015).

Odběr vzorku vydechaného vzduchu představuje neinvazivní metodu analýzy biomarkerů. V řadě studií bylo popsáno několik molekul s potenciálem diagnostického či prognostického biomarkeru. Žádná z těchto molekul ale nemá vlastnosti, které by umožnily jejich využití v běžné klinické praxi u IPP. Vzorek vydechaného vzduchu je analyzován několika způsoby: frakční analýza vydechaného vzduchu (FeNO), analýza kondenzátu vydechaného vzduchu (KVV) a analýza těkavých sloučenin. Frakčně exhalovaný oxid dusnatý (FeNO) je měřený převážně chemiluminiscencí. Oxid dusnatý (NO) je volný radikál, který se podílí na řadě fyziologických a patologických procesů. Jako biomarker ve vydechaném vzduchu je jednoduše měřitelný a již se využívá v péči o pacienty s bronchiálním astmatem. NO působí v dýchacích cestách jako vasodilatační a bronchodilatační neurotransmitter, má zánětlivé vlastnosti a je známkou oxidačního stresu. NO může zvyšovat expresi profibrotických mediátorů TGF-beta u plicní fibrózy (Hsu a kol., 2007). Některé studie autorů našli zvýšené hladiny vydechaného NO u pacientů s IPF, ale výsledky dalších studií s FeNO50 toto nepotvrdili u IPF, ani u jiných IPP (Cameli a kol., 2019). Jiné práce našli zvýšené hladiny NO a peroxynitritu u pacientů s IPF v mírném až

středně těžkém stádiu nemoci. Toto stadium bylo spojeno se zvýšenou zánětlivou a alveolární expresí nitrotyrosinu a syntázy oxidu dusnatého (NOS podílejícího se na poškození plicní tkáně při oxidačním stresu). Větší potenciál u pacientů s IPF má měření alveolárního oxidu dusnatého (*concentration of NO at the level of the alveolus*, $C_{alv}NO$). Jeho zvýšená hladina byla popsána u pacientů s IPF ve srovnání se zdravými jedinci (Hayton a kol., 2019). Zvýšené hladiny NO ve vydechovaném vzduchu byly popsány i u hypersenzitivní pneumonitidy, azbestózy, postižení plicního intersticia při systémovém onemocnění pojiva. Vzhledem k tomuto faktu se bude využívat spíše než v diferenciální diagnostice k monitorování onemocnění. V několika studiích bylo popsáno, že hladiny $C_{alv}NO$ jsou nepřímým úměrným parametrem plicních funkcí u fibrotických intersticiálních plicních procesů (Kotecha a kol., 2016; Cameli a kol., 2019).

Další metoda, jak získat vzorek vydechovaného vzduchu, je jeho kondenzát (KVV). KVV obsahuje kondenzované vodní výpary s malým množstvím netěkavých a ve vodě rozpustných těkavých molekul, které jsou analyzovány za pomoci spektrometrie, chromatografie, imunoesejí, kapilární elektroforézy. Tato metoda je atraktivní, protože je neinvazivní a umožňuje různé způsoby zpracování a další analýzy vzorků. Na druhou stranu její nevýhodou je, že analyzuje tekutinu z dýchacích cest, která nereflektuje úplně přesně procesy v intersticiu (Hayton a kol., 2019). Touto metodou byly analyzovány zejména látky související s oxidačním stresem. V KVV byly u pacientů popsány zvýšené hladiny H_2O_2 (reaktivní oxidační agens) a 8 - isoprostanu (sloučenina utvářená při lipidové peroxidaci) (Psathakis a kol., 2006). Zvýšená hladina 8 – isoprostanu byla popsána v KVV i u jiných fibrotických IPP, stejně jako u bronchiálního astmatu, CHOPN a sarkoidózy. Hladiny dalšího biomarkeru, který vzniká při lipidové peroxidaci malondialdehyd (MDA), nebyly zvýšeny ve srovnání se zdravými kontrolami (Bartoli a kol., 2011).

V naší analýze KVV, využívající námi vyvinutou odběrovou soustavu, jsme byli schopni analyzovat v krátké době iontový profil a pozorovat statisticky významné rozdíly mezi vybranými plicními nemocemi (chronická obstrukční plicní nemoc, astma, plicní fibróza, sarkoidóza, cystická fibróza) a zdravými kontrolami. V další naší analýze měření koncentrací vybraných markerů (pH, dusičnan, butyrát, propionát, sodný kation) v KVV bylo možné selektovat pacienty s pravděpodobným kyselým nebo slabě kyselým refluxem oproti zdravým kontrolám. KVV by bylo možné použít jako doplňkovou metodu před zavedením poměrně invazivní MII-pH sondy, tj. k pre-selekcí pacientů kteří vyžadují další diagnostické měření. Zatím ale neumíme pomocí analýzy KVV rozdělit pacienty s kyselým a slabě kyselým refluxem.

8. Závěr

Difuzní parenchymatózní nemoci plic jsou heterogenní širokou skupinou onemocnění s přesahem do jiných vědních oborů. To nám dovoluje spolupráci na poli pneumologie, genetiky, imunologie, biochemie, hematologie, kardiologie, revmatologie. Cílem naší práce bylo analyzovat klinické charakteristiky, průběh nemoci a prognostické faktory u pacientů s IPF a sarkoidózou v běžné klinické praxi. Sarkoidóza prokazuje velkou variabilitu v klinických projevech, ale má celkově dobrou prognózu. Analýza IPF pacientů nám umožnila získat údaje o českých pacientech a porovnat je s těmi zahraničními. IPF je závažné onemocnění se špatnou prognózou. Výsledky našich analýz potvrzují celosvětově publikované informace o diagnostice, prognóze a terapii IPF. Naše genetická analýza pacientů s IPF z EMPIRE přichází s novými poznatky o vlivu přítomnosti SNPs u *MUC5B* rs35705950 a *DSP* rs2076295 na vznik IPF a na efekt antifibrotické léčby.

Vlivu genetických faktorů se věnujeme v pracech o familiární formě plicní fibrózy. Popisujeme případ rodiny s autosomálně dominantním typem dědičnosti a novou patogenní variantou genu pro *SFT1*. Naše výsledky nám umožňují identifikovat rizikové členy rodiny a zahájit včasnou diagnostiku a léčbu. Zároveň je tato práce stimulem pro sepsání doporučených postupů pro diagnostiku a léčbu FPF, a to spolu s genetiky a dalšími pneumology. Další spoluprací na poli genetickém je potvrzení Heřmanského-Pudlákova syndromu, vzácné nemoci u kavkazské populace, u naší pacientky s akcelerovanou formou plicní fibrózy. Pokud by bylo na tuto diagnózu pomýšleno včas a nemocná byla poslána do našeho centra, šancí by byla plicní transplantace.

Senzitivní a specifické biomarkery, které by napomohly v diferenciální diagnostice IPP a v predikci průběhu onemocnění, nejsou zatím k dispozici. SP-A, SP-D, CC-16, S100 A6, A11, TFF3, PSP94 jsou markery snadno zjistitelné z krve a bronchoalveolární tekutiny. PSP94 mohou mít dle našich výsledků prognostický význam u sarkoidózy, SP-D a TFF3 u IPF. SP-A, SP-D, TFF3 mají vztah k závažnosti onemocnění. Zejména PSP94 a TFF3 by mohly být součástí další studií.

Zatím existuje poměrně málo informací o využití biomarkerů získaných z KVV v klinické praxi u námi sledovaných plicních onemocnění včetně IPP. Naše práce je pilotní studií zabývající se analýzou KVV pomocí kapilární elektroforézy. Spojení odběru KVV a kapilární elektroforézy představuje jednoduchou, neinvazivní metodu, kterou lze analyzovat v krátké době hned několik biomarkerů. Častou komorbiditou našich pacientů je extraezofageální reflux. Jako slibné markery získané z KVV od těchto pacientů se jeví kyselina máselná a propionová. Využití této metody a hledání potenciálně vhodných biomarkerů pro diagnostiku,

diferenciální diagnostiku a prognózu u námi sledovaných respiračních onemocnění včetně IPP a komorbidit bude předmětem dalších experimentů/analýz.

V neposlední řadě mezi IPP patří i autoimunity včetně vaskulitid a imunodeficitů, proto součástí diferenciální diagnostiky je nutnost imunologického vyšetření. V našich pracech se zabýváme významem autoprotilátek u vaskulitid a systémových onemocnění pojiva, imunologickému skríninku a záchytu imunodeficiencí primárních i sekundárních a jejich léčbou.

9. Použitá literatura

Allen RJ, Porte J, Braybrooke R, a kol. Genetic variants associated with susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis in people of European ancestry: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med*. 2017; 5(11): 869-880.

American Thoracic Society, European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(2):277.

Arianto I, Lin CP, Hale JJ, a kol. Genome-wide association study of African and European Americans implicates multiple shared and ethnic specific loci in sarcoidosis susceptibility. *PLoS One*. 2012; 7(8): e43907.

Armanious MY, Chen JJ-L, Cogan JD, a kol. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2007; 356(13):1317-1326.

Barlo, van Moorsel CH, van den Bosch JM, Grutters JC. Predicting prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sarc Vasc Diff Dis*. 2010;27(2):85-95.

Bartoli M, Novelli F, Costa F, a kol. Malondialdehyde in exhaled breath condensate as a marker of oxidative stress in different pulmonary diseases. *Mediators Inflamm*. 2011; 2011:891752.

Baughman RP, Teirstein AS, Judson MA, a kol. Case Control Etiologic Study of Sarcoidosis (ACCESS) research group. Clinical characteristics of patients in a case control study of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(10 Pt 1):1885-1889.

Bennett D, Refini RM, Valentini ML, a kol. Pirfenidone Therapy for Familial Pulmonary Fibrosis: A Real-Life Study. *Lung*. 2019; 197(2):147-153.

Bonella F, Stowasser S, Wollin L. Idiopathic pulmonary fibrosis: current treatment options and critical appraisal of nintedanib. *Drug Des Devel Ther*. 2015; 9: 6407-6419.

Borie R, Crestani B. Familial pulmonary fibrosis: a world without frontiers. *J Bras Pneumol*. 2019; 45(5): e20190303.

Borie R, Kannengiesser C, Fontbrune FS, a kol. Management of suspected monogenic lung fibrosis in a specialised center. *Eur Respir Rev*. 2017; 26(144): 160122.

Bradley Branley HM, Egan JJ, a kol.; British Thoracic Society Interstitial Lung Disease Guideline Group, British Thoracic Society Standards of Care Committee; Thoracic Society of Australia; New Zealand Thoracic Society; Irish Thoracic Society. Interstitial lung disease guideline: the British Thoracic Society in collaboration with the Thoracic Society of Australia and New Zealand and the Irish Thoracic Society. *Thorax*. 2008;63 (Suppl 5): v1-58.

Cameli P, Bargagli E, Bergantini L, a kol. Evaluation of multiple-flows exhaled nitric oxide in idiopathic and non-idiopathic interstitial lung disease. *J Breath Res*. 2019; 13(2):026008.

- De Vincentis, Vespasiani-Gentilucci A, Sabatini A, a kol. Exhaled breath analysis in hepatology: State-of-the-art and perspectives. *World J Gastroenterol.* 2019; 25(30):4043-4050.
- Donadieu J, Lamant M, Fieschi C, a kol. Natural history of GATA2 deficiency in a survey of 79 French and Belgian patients. *Haematologica* 2018; 103(8): 1278-1287.
- Doubková M, Binková I, Skříčková J. Skrytá cystická fibróza u nemocného se sarkoidózou. *Vnitř Lék* 2012;58(4):329-334.
- Doubková M, Binková I, Skříčková J. Je sarkoidóza spojená s vyšším výskytem nádorových onemocnění? *Stud Pneumol Phtiseol.* 2011;71(3):129-134.
- Doubková M, Binková I, Skříčková J. Diagnostika, prognostické faktory a léčba sarkoidózy – retrospektivní analýza. *Vnitř Lék.* 2012;58(10):735-742.
- Doubkova M, Pospíšil Z, Skříčková J, a kol. Prognostic markers of sarcoidosis: an analysis of patients from everyday pneumological practice. *Clin Respir J.* 2015; 9(4):443-449.
- Doubkova M, Švancara J, Svoboda M, a kol. EMPIRE registry, Czech part: Impact of demographics, pulmonary function and HRCT on survival and clinical course in idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Respir J.* 2018 Apr;12(4):1526-1535.
- Doubkova M, Uher M, Bartoš V, a kol. Prognostické faktory idiopatické plicní fibrózy (IPF) – analýza Českého registru IPF. *Čas lék čes.* 2016. 155(4):22-28.
- Effros RM, Hoagland KW, Bosbous M, a kol. Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165(5):663-669.
- Fernandez IE, Eickelberg O. The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers. *Proc Am Thorac Soc.* 2012;9(3):111-116.
- Fingerlin TE, Murphy E, Zhang W, a kol. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nat Genet.* 2013; 45(6):613-620.
- Greguš M, Foret F, Kindlová D, a kol. Monitoring of ionic content of exhaled breath condensate in various respiratory diseases by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *J Breath Res.* 2015; 9(2):027107.
- Grunewald J. Review: role of genetics in susceptibility and outcome of sarcoidosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2010;31(4): 380-389.
- Hambly N, Shimbori C, Kolb M. Molecular classification of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 2015; 20(7): 1010-1022.
- Hartmannová H, Piherová L, Tauchmannová K, a kol. Acadian variant of Fanconi syndrome is caused by mitochondrial respiratory chain complex I deficiency due to a non-coding mutation in complex I assembly factor NDUFAF6. *Hum Mol Genet.* 2016;25(18):4062-4079.
- Hayton C, Terrington D, Wilson AM, a kol. Breath biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *Respir Res.* 2019; 20(1):7.

- Hilberg F, Roth GJ, Krssak M, Kautschitsch S, a kol. BIBF 1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Res* 2008; 68(12): 4774-4782.
- Hofmann S, Franke A, Fisher A, a kol. Genome-wide association study identifies ANXA11 as a new susceptibility locus for sarcoidosis. *Nat Genet.* 2008; 40(9):1103-1106.
- Hofmann S, Fischer A, Till A, a kol. A genome-wide association study reveals evidence of association with sarcoidosis at 6p12.1. *Eur Respir J.* 2011; 38(5):1127-1135.
- Hortense AB, Santos MK, Wada D, a kol. Familial pulmonary fibrosis: a heterogenous spectrum of presentations. *J Bras Pneumol.* 2019; 45(5): e20180079.
- Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, a kol.; ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J.* 2005;26(3):523-548.
- Hsu Y-C, Wang L-F, Chien YW. Nitric oxide in the pathogenesis of diffuse pulmonary fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine.* 2007; 42(5):599-607.
- Hunninghake GW, Costabel U, Ando M, a kol. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 1999; 16(2):149-173.
- Jin J, Togo S, Kadoya K, Tulafu M, a kol. Pirfenidone attenuates lung fibrotic fibroblast responses to transforming growth factor- β 1. *Respir Res.* 2019; 20: 119.
- Judson MA, Boan AD, Lackland DT, a kol. The clinical course of sarcoidosis: presentation, diagnosis, and treatment in a large white and black cohort in the United States. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2012; 29(2): 119–127.
- Kazzi B, Lederer D, Arteaga-Solis E, a kol. Recurrent diffuse lung disease due to surfactant protein C deficiency. *Respir Med Case Rep* 2018; 25:91-95.
- Kaur A, Mathai SK, Schwartz DA. Genetics in idiopathic pulmonary fibrosis pathogenesis, prognosis and treatment. *Front Med (Lausanne).* 2017; 4: 154.
- Keller CA, Naunheim KS, Osterloh J, a kol. Histopathologic diagnosis made in lung tissue resected from patients with severe emphysema undergoing lung volume reduction surgery. *Chest.* 1997; 111(4): 941-947.
- Kim W, Cho MH, Sakornsakolpat P, a kol. DSP variants may be associated with longitudinal change in quantitative emphysema. *Respir Res.* 2019; 20(1): 160.
- King TE Jr, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, a kol.; ASCEND Study Group. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2014;370(22):2083-2092.
- King TE Jr, Tooze JA, Schwarz MI, a kol. Predicting survival in idiopathic pulmonary fibrosis: scoring system and survival model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(7):1171-1181.

Kolek V. Epidemiology of cryptogenic fibrosing alveolitis in Moravia and Silesia. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultatis medicae. Biomedical papers.* 1994; 137:49-50.

Kotech J, Shulgina L, Sexton DW, a kol. Plasma vascular endothelial growth factor concentration and alveolar nitric oxide as potential predictors of disease progression and mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Med.* 2016; 5(9):80.

Krauss E, Gehrken G, Drakopanagiotakis F, a kol. Clinical characteristics of patients with familial idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulmonay Medicine.* 2019; 19(1):130.

Kropski JA, Lawson WE, Young LR, a kol. Genetic studies provide clues on the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Dis Model Mech.* 2013;6(1):9-17.

Lehmann M, Buhl L, Alsafadi HN, a kol. Differential effects of Nintedanib and Pirfenidone on lung alveolar epithelial cell function in ex vivo murine and human lung tissue cultures of pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2018; 19(1): 175.

Levinský L, Houštěk J, Hloušková Z, a kol. Prevalence idiopatické difúzní intersticiální plicní fibrózy (kryptogenní fibrotizující alveolitis) v ČSSR. *Stud Pneumol Pthiseol.* 1975;35(7):441-448.

Li XH, Lv ZW, Huang K, a kol. Comparison of in-vivo anti-fibrotic effects of pirfenidone and nintedanib in bleomycin-induced pulmonary fibrosis model. *Eur Respir J.* 2019; 54: PA5377.

Loddenkemper R, Kloppenborg A, Schonfeld N, a kol. Clinical findings in 715 patients with newly detected pulmonary sarcoidosis – results of a cooperative study in former West Germany and Switzerland. WATL Study Group. *Wissenschaftliche Arbeitsgemeinschaft für die Therapie von Lungenkrankheiten. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 1998; 15(2): 178–182.

Lošťáková V, Kolek V, Vašáková M, a kol. Sarkoidóza (doporučený postup pro diagnostiku, terapii a sledování vývoje onemocnění). <http://www.pneumologie.cz/guidelines/>. Navštíveno dne 3. 1. 2020.

Mangaonkar AA, Ferrer A, Pinto E Vairo F, a kol. Clinical Correlates and Treatment Outcomes for Patients With Short Telomere Syndromes. *Mayo Clin Proc.* 2018; 93(7):834-839.

Martinez FJ, Safrin S, Weycker D, a kol. IPF Study Group. The clinical course of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med.* 2005;142(12 Pt 1):963-967.

Mathai S, Pedersen BS, Smith K, a kol. Desmoplakin variants are associated with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193(10): 1151-1160.

Matsui Y, Iwai K, Tachibana T, a kol. Clinicopathological study of fatal myocardial sarcoidosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1976; 278:455-469.

Mushiroda T, Wattanapokayakit S, Takahashi A, a kol. A genome-wide association study identifies an association of a common variant in TERT with susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis. *J Med Genet.* 2008; 45(10):654-656.

Nakano Y, Yang IV, Walts AD, a kol. MUC5B promoter variant rs35705950 affects MUC5B expression in the distal airways in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016; 193(4): 464-466.

Noble PW, Albera C, Bradford WZ, a kol.; CAPACITY Study Group. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet.* 2011;377(9779):1760-1769.

Noth I, Zhang Y, Ma SF, a kol. Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med.* 2013;1(4):309-317.

Oldham JM, Ma SF, Martinez FJ, a kol. TOLLIP, MUC5B, and the response to N-acetylcysteine among individuals with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015; 192(12):1475-1482.

Peljto AL, Selman M, Kim DS, a kol. The MUC5B promoter polymorphism is associated with idiopathic pulmonary fibrosis in a Mexican cohort but is rare among Asian ancestries. *Chest.* 2015; 147(2):460-464.

Peljto AL, Zhang Y, Fingerlin TE, a kol. Association between the MUC5B promoter polymorphism and survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *JAMA* 2013; 309(21): 2232-2239.

Psathakis K, Mermigkis D, Papatheodorou G, a kol. Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Clin Investig.* 2006; 36(5):362-367.

Raghu G, Anstrom KJ, King TE Jr, a kol. Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network, Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2012; 366(21): 1968-1977.

Raghu G, Collard HR, Egan JJ, a kol.; ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 183(6):788-824.

Raghu G, Collard HR, Egan JJ, a kol.; ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192(2): e3-19.

Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, a kol.; American Thoracic Society, European Respiratory Society, Japanese Respiratory Society, and Latin American Thoracic Society. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018 Sep 1;198(5): e44-e68.

Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, a kol.; INPULSIS Trial Investigators. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2014;370(22):2071-2082.

Roy MG, Livraghi-Buttrico A, Fletcher AA, a kol. Muc5b is required for airway defence. *Nature* 2014; 505(7483): 412-416.

Seibold MA, Wise AL, Speer MC, a kol. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2011; 364(16): 1503-1512.

Selman M, Carrillo G, Estrada A, a kol. Accelerated variant of idiopathic pulmonary fibrosis: clinical behavior and gene expression pattern. *PLoS One*. 2007;2(5): e482.

Selman M, King TE, Pardo A; American Thoracic Society; European Respiratory Society; American College of Chest Physicians. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med*. 2001;134(2):136-151.

Schupp JC, Freitag-Wolf S, Bargagli E, a kol. Phenotypes of organ involvement in sarcoidosis. *Eur Respir J*. 2018;51(1). pii:1700991.

Silhan LL, Shah PD, Chambers DC, a kol. Lung transplantation in telomerase mutation carriers with pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2014; 44(1):178-87.

Spagnolo P, Grunewald J, du Bois RM. Genetic determinants of pulmonary fibrosis: evolving concepts. *Lancet Respir Med*. 2014; 2(5):416-428.

Spagnolo P, Luppi F, Cerri S, Richeldi L. Genetic testing in diffuse parenchymal lung disease. *Orphanet J Rare Dis*. 2012; 7: 79.

Šterclová M, Doubek M, Doubková M. Familiární plicní fibróza – doporučení pro diagnostiku a léčbu. <http://www.pneumologie.cz/guidelines/>. Navštíveno dne 2. 7. 2020.

Travis WD, Costabel U, Hansell DM, a kol.; ATS/ERS Committee on Idiopathic Interstitial Pneumonias. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188(6):733-748.

Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, a kol. Adult – onset pulmonary fibrosis cause by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(18): 7552-7557.

Tzouvelekis A, Kouliatsis G, Anevlaivis S, a kol. Serum biomarkers in interstitial lung diseases. *Respir Res*. 2005; 6(1):78.

Valentonyte R, Hampe J, Huse K, a kol. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet*. 2005; 37(4): 357-364.

van Moorsel Ch, van Oosterhout MF, Barlo NP, a kol. Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182(11):1419-1425.

Vancheri C, Failla M, Crimi N, a kol. Idiopathic pulmonary fibrosis: a disease with similarities and links to cancer biology. *Eur Respir J*. 2010;35(3):496-504.

Vašáková M., Šterclová M. Idiopatická plicní fibróza, doporučený postup. <http://www.pneumologie.cz/guidelines/>. Navštíveno dne 3. 1. 2020.

Voorter CE, Drent M, van den Berg-Loonen EM. Severe pulmonary sarcoidosis is strongly associated with the haplotype HLA-DQB1*0602- DRB1*150101. *Hum Immunol.* 2005;66(7):826-835.

White ES, Lazar MH, Thannickal VJ. Pathogenetic mechanisms in usual interstitial pneumonia/idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol.* 2003;201(3): 343-345.

Zhang Y, Noth I, Garcia JG, et al. A variant in the promoter of MUC5B and idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2011; 364(16): 1576-1577.

10. Seznam odborných publikací autora k tématu habilitační práce

Article published in a scholarly journal listed in the WoS database

2020

[1] TRAN, Tanja, Martina STERCLOVA, Nesrin MOGULKOC, Katarzyna LEWANDOWSKA, Veronika MULLER, Marta HAJKOVA, Mordechai R. KRAMER, Dragana JOVANOVIĆ, Jasna TEKAVEC-TRKANJEC, Michael STUDNICKA, Natalia STOEVA, Karel HEJDUK, Ladislav DUSEK, Samy SUISSA, Martina VASAKOVA, Beata ZOLNOWSKA, Vladimír BARTO, Martina PLACKOVA, Robert SLIVKA, Ladislav LACINA, **Martina DOUBKOVA**, Radka BITTENGLOVA, Magdalena MARTUSEWIA-BOROS, Monika ZURKOVA, Imrich JONNER, Amelia SZYMANOWSKA-NARIOCH, Ilona BINKOVA, Malgorzata SOBIECKA, Vladimira LOSTAKOVA, Marzena TRZASKA-SOBCZAK, Richard TYL, Pawel SLIWINSKI, Miklos ZSIRAY, Pavlina LISA, Aniko BOHACS, Sebastian MAJEWSKI, Hana SULDOVA, Bohumil MATULA, Lenka SISKOVA, Jan PLUTINSKY, Ana JAKIC, Stefan TOTH, Zoltan BALIKO, Margita BUCEKOVA, Jana PSIKALOVA, Tomasz STACHURA, Frantisek PETRIK, Jan ANTON, Jaroslav LNENICKA, Marina Roksandic MILENKOVIC, Imre LAJKO, Vladimír RIHAK, Zsuzsanna SZALAI, Paulina JUREK, Aleksander KANIA, Stefan LASSAN, Tatjana PEJCIC, Pavel REITERER, Lukasz BORUCKI, Renata KRALOVA, Pavlina MUSILOVA, Tomas SNIZEK, Daniel DOLEZAL, Jiri HOMOLKA, Hana HORTVIKOVA, Suzana MLADINOV, Peter PALUCH, Roman HRDINA, Maria SZILASI, Violeta VUCINIC-MIHAILOVIC, Robert VYSEHRADSKY, Radka MOKOSOVA, Agata NOWICKA a Tatjana Radjenovic PETKOVIC. The European MultiPartner IPF registry (EMPIRE): validating long-term prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research* [online]. 2020, 21(1), 11. Dostupné z: [doi:10.1186/s12931-019-1271-z](https://doi.org/10.1186/s12931-019-1271-z) Document Type: Article; IF = 3,924/ medián 2,680; RESPIRATORY SYSTEM Q2 (vše pro rok 2019)

[2] TRIZULJAK, Jakub, Terezie PETRUCHOVA, Ivona BLAHAKOVA, Zuzana VRZALOVA, Vera HORINOVA, **Martina DOUBKOVA**, Jozef MICHALKA, Jiri MAYER, Sarka POSPISILOVA a Michael DOUBEK. Diagnosis of Bloom Syndrome in a Patient with Short Stature, Recurrence of Malignant Lymphoma, and Consanguineous Origin. *Molecular Syndromology* [online]. 2020, 11(2), 73–82. ISSN 1661-8769. Dostupné z: [doi:10.1159/000507006](https://doi.org/10.1159/000507006) Document Type: Article; IF = 1,198/ medián 2,809; GENETICS & HEREDITY Q4 (vše pro rok 2019)

2019

[3] LACNA, Julia, Pavol DURC, Michal GREGUS, Jana SKRICKOVA, **Martina DOUBKOVA**, Eva POKOJOVA, Dagmar KINDLOVA, Jiri DOLINA, Stefan KONECNY, Frantisek FORET a Petr KUBAN. Capillary electrophoretic analysis of ionic content in exhaled breath condensate and pH monitoring as a non-invasive method in gastroesophageal

reflux disease diagnostics. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2019, 1134, 121857. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:[10.1016/j.jchromb.2019.121857](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121857) Document Type: Article; IF = 3,004/medián 2,624; BIOCHEMICAL RESEARCH METHODS Q2; CHEMISTRY, ANALYTICAL Q2

[4] **DOUBKOVA, Martina**, Jakub TRIZULJAK, Zuzana VRZALOVA, Anna HRAZDIROVA, Ivona BLAHAKOVA, Lenka RADOVA, Sarka POSPISILOVA a Michael DOUBEK. Novel genetic variant of HPS1 gene in Hermansky-Pudlak syndrome with fulminant progression of pulmonary fibrosis: a case report. *Bmc Pulmonary Medicine* [online]. 2019, 19(1), 178. ISSN 1471-2466. Dostupné z: doi:[10.1186/s12890-019-0941-4](https://doi.org/10.1186/s12890-019-0941-4) Document Type: Article; IF = 2,813/ medián 2,680; RESPIRATORY SYSTEM Q2

[5] DOLINA, Jiri, Stefan KONECNY, Pavol DURC, Julia LACNA, Michal GREGUS, Frantisek FORET, Jana SKRICKOVA, **Martina DOUBKOVA**, Dagmar KINDLOVA, Eva POKOJOVA a Petr KUBAN. Evaluation of Important Analytical Parameters of the Peptest Immunoassay that Limit its Use in Diagnosing Gastroesophageal Reflux Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology* [online]. 2019, 53(5), 355–360. ISSN 0192-0790. Dostupné z: doi:[10.1097/MCG.0000000000001066](https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000001066) Document Type: Article; IF = 2,973/medián 3,250; GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY Q3

[6] **DOUBKOVA, Martina**, Katerina Stano KOZUBIK, Lenka RADOVA, Michaela PESOVA, Jakub TRIZULJAK, Karol PAL, Klara SVOBODOVA, Kamila REBLOVA, Hana SVOZILOVA, Zuzana VRZALOVA, Sarka POSPISILOVA a Michael DOUBEK. A novel germline mutation of the SFTPA1 gene in familial interstitial pneumonia. *Human Genome Variation* [online]. 2019, 6, UNSP 12. Dostupné z: doi:[10.1038/s41439-019-0044-z](https://doi.org/10.1038/s41439-019-0044-z) Document Type: Article;

[7] ZURKOVA, Monika, Eva KRIEGOVA, Vitezslav KOLEK, Vladimira LOSTAKOVA, Martina STERCLOVA, Vladimir BARTOS, **Martina DOUBKOVA**, Ilona BINKOVA, Michal SVOBODA, Jana STRENKOVA, Marketa JANOTOVA, Martina PLACKOVA, Ladislav LACINA, Vladimir RIHAK, Frantisek PETRIK, Pavlina LISA, Radka BITTENGLOVA, Richard TYL, Gustav ONDREJKA, Hana SULDOVA, Jaroslav LNENICKA, Jana PSIKALOVA, Tomas SNIZEK, Jiri HOMOLKA, Renata KRALOVA, Jan KERVITZER a Martina VASAKOVA. Effect of pirfenidone on lung function decline and survival: 5-yr experience from a real-life IPF cohort from the Czech EMPIRE registry. *Respiratory Research* [online]. 2019, 20, 16. ISSN 1465-993X. Dostupné z: doi:[10.1186/s12931-019-0977-2](https://doi.org/10.1186/s12931-019-0977-2) Document Type: Article; IF = 3,924/medián 2,680; RESPIRATORY SYSTEM Q2

2018

[8] KUBAN, Petr, Pavol DURC, Julia LACNA, Michal GREGUS, Frantisek FORET, Jiri DOLINA, Stefan KONECNY, **Martina DOUBKOVA**, Dagmar KINDLOVA, Eva POKOJOVA a Jana SKRICKOVA. Capillary Electrophoretic Analysis of Exhaled Breath Condensate in the Diagnosis of Gastroesophageal Reflux Disease. *Hungarian Journal of Industry and Chemistry* [online]. 2018, 46(1), 23–27. ISSN 0133-0276. Dostupné z: doi:[10.1515/hjic-2018-0006](https://doi.org/10.1515/hjic-2018-0006) Document Type: Article; IF = 0,084/medián 2,260; CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY Q4

[9] **DOUBKOVA, Martina**, Jan SVANCARA, Michal SVOBODA, Martina STERCLOVA, Vladimir BARTOS, Martina PLACKOVA, Ladislav LACINA, Monika ZURKOVA, Ilona BINKOVA, Radka BITTENGLOVA, Vladimira LOST'AKOVA, Zdenek MERTA, Lenka SISKOVA, Richard TYL, Pavlina LISA, Hana SULDOVA, Frantisek PETRIK, Jana

PSIKALOVA, Vladimir RIHAK, Tomas SNIZEK, Pavel REITERER, Jiri HOMOLKA, Pavlina MUSILOVA, Jaroslav LLENICKA, Peter PALUCH, Roman HRDINA, Renata KRALOVA, Hana HORTVIKOVA, Jana STRENKOVA a Martina VASAKOVA. EMPIRE Registry, Czech Part: Impact of demographics, pulmonary function and HRCT on survival and clinical course in idiopathic pulmonary fibrosis. *Clinical Respiratory Journal* [online]. 2018, 12(4), 1526–1535. ISSN 1752-6981. Dostupné z: doi:[10.1111/crj.12700](https://doi.org/10.1111/crj.12700) Document Type: Article; IF = 1,751/medián 2,669; RESPIRATORY SYSTEM Q4

[10] DOUBKOVA, Martina, Jitka HAUSNEROVA, Ondrej VYSKA, Svatopluk RICHTER a Zdenek MERTA. Necrotising Sarcoid Granulomatosis. a Rare Granulomatous Disease. *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases*. 2018, 35(4), 395–398. ISSN 1124-0490. Document Type: Article; IF = 0,889/medián 2,669; RESPIRATORY SYSTEM Q4

2016

[11] DOUBKOVA, Martina, Michal KARPISEK, Jiri MAZOCH, Jana SKRICKOVA a Michael DOUBEK. Prognostic Significance of Surfactant Protein a, Surfactant Protein D, Clara Cell Protein 16, S100 Protein, Trefoil Factor 3, and Prostatic Secretory Protein 94 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis, Sarcoidosis, and Chronic Pulmonary Obstructive Disease. *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases*. 2016, 33(3), 224–234. ISSN 1124-0490. Document Type: Article; IF = 1,575/medián 2,576; RESPIRATORY SYSTEM Q4

2015

[12] DOUBKOVA, Martina, Zdenek POSPISIL, Jana SKRICKOVA a Michael DOUBEK. Prognostic markers of sarcoidosis: an analysis of patients from everyday pneumological practice. *Clinical Respiratory Journal* [online]. 2015, 9(4), 443–449. ISSN 1752-6981. Dostupné z: doi:[10.1111/crj.12160](https://doi.org/10.1111/crj.12160) Document Type: Article; IF = 2,147/medián 2,330; RESPIRATORY SYSTEM Q3

[13] GREGUS, Michal, Frantisek FORET, Dagmar KINDLOVA, Eva POKOJOVA, Marek PLUTINSKY, Martina DOUBKOVA, Zdenek MERTA, Ilona BINKOVA, Jana SKRICKOVA a Petr KUBAN. Monitoring the ionic content of exhaled breath condensate in various respiratory diseases by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Journal of Breath Research* [online]. 2015, 9(2), 027107. ISSN 1752-7155. Dostupné z: doi:[10.1088/1752-7155/9/2/027107](https://doi.org/10.1088/1752-7155/9/2/027107) Document Type: Article; IF = 4,177/medián 2,330; RESPIRATORY SYSTEM Q1

2013

[14] DOUBKOVA, M., M. DOUBEK, M. MOULIS a J. SKRICKOVA. Exogenous lipoid pneumonia caused by chronic improper use of baby body oil in adult patient. *Revista Portuguesa De Pneumologia* [online]. 2013, 19(5), 233–236. ISSN 0873-2159. Dostupné z: doi:[10.1016/j.rppneu.2013.05.002](https://doi.org/10.1016/j.rppneu.2013.05.002) Document Type: Article; IF = 0,855/medián 2,529; RESPIRATORY SYSTEM Q4

Article published in a scholarly journal listed in the Scopus database

2019

[1] ŠTEFÁNIKOVÁ, M. a M. DOUBKOVÁ. Epidemiology of interstitial lung diseases. *Studia Pneumologica et Phthiseologica*. 2019, 79(3), 96–103. Document Type: Article

[2] DOUBKOVÁ, M., M. ŠTEFÁNIKOVÁ, V. ČAN, Z. MERTA a M. SVOBODA. Lymphangiomyomatosis. *Klinická Onkologie* [online]. 2019, 32(5), 367–374. Dostupné z: doi:[10.14735/amko2019367](https://doi.org/10.14735/amko2019367) Document Type: Article

[3] **DOUBKOVÁ, M.**, J. ŠPELDOVÁ a Z. CHOVANCOVÁ. Immunodeficiency in the differential diagnosis of interstitial lung diseases. *Vnitřní Lekarství*. 2019, 65(11), 685–693. Document Type: Article

[4] ADAM, Z., K. STARÝ, K. ZAJÍČKOVÁ, Z. ŘEHÁK, R. KOUKALOVÁ, A. ŠPRLÁKOVÁ-PUKOVÁ, M. TOMÍŠKA, **M. DOUBKOVÁ**, Z. ČERMÁKOVÁ, M. KREJČÍ, V. SANDECKÁ, M. ŠTORK, L. OSTRŽÍKOVÁ, A. ČERMÁK a L. POUR. Hypercalcemia may be the first sign of multiple myeloma, but not only that. *Transfúze a Hematologie Dnes*. 2019, 24(4), 238–252. Document Type: Article

2018

[5] **DOUBKOVÁ, M.** a R. PANOVSÝ. Jak diagnostikovat sarkoidózu srdce? *Vnitřní lékařství*. 2018, 64(7–8), 729–733. Document Type: Article

[6] **DOUBKOVÁ, M.** a L. JAKUBÍKOVÁ. Is there anything common between idiopathic pulmonary fibrosis and lung cancer? *Studia Pneumologica et Phthiseologica*. 2018, 78(5), 160–168. Document Type: Article

2017

[7] **DOUBKOVÁ, M.** a S. RICHTER. Value of chest HRCT in the prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Studia Pneumologica et Phthiseologica*. 2017, 77(5), 177–183. Document Type: Article

[8] **DOUBKOVÁ, M.** a S. RICHTER. Usual interstitial pneumonia may not only be idiopathic pulmonary fibrosis. *Studia Pneumologica et Phthiseologica*. 2017, 77(3), 115–126. Document Type: Article

[9] **DOUBKOVA, M.** a J. POKORNA. Autoantibodies in systemic connective tissue disease and ANCA-associated vasculitis, their relationship to interstitial lung diseases and prognosis. *Vnitřní Lekarství*. 2017, 63(2), 98–106. Document Type: Article

[10] **DOUBKOVÁ, M.** Idiopathic pulmonary fibrosis - Early diagnosis is important. *Interni Medicina pro Praxi*. 2017, 19(2), 88–91. Document Type: Article

2016

[11] **DOUBKOVÁ, M.**, M. UHER, V. BARTOŠ, M. ŠTERCLOVÁ, L. LACINA, V. LOŠTÁKOVÁ, I. BINKOVÁ, M. PLAČKOVÁ, M. ŽURKOVÁ, R. BITTENGLOVÁ, J. PŠIKALOVÁ, L. ŠIŠKOVÁ, P. LISÁ, F. PETŘÍK, J. POLÁK, V. ŘIHÁK, J. SKŘIČKOVÁ a M. VAŠÁKOVÁ. Idiopathic pulmonary fibrosis prognostic factors - Analysis of the Czech registry. *Casopis Lekarů Ceskych*. 2016, 155(4), 22–28. Document Type: Article

[12] **DOUBKOVÁ, M.** Idiopathic pulmonary fibrosis - or what new in idiopathic interstitial pneumonia. *Interni Medicina pro Praxi*. 2016, 18(2), 61–65. Document Type: Article

[13] ADAM, Z., K. STARÝ, J. KUBINYI, K. ZAJÍČKOVÁ, Z. ŘEHÁK, R. KOUKALOVÁ, M. TOMÍŠKA, **M. DOUBKOVÁ**, J. PRÁŠEK, E. POUROVÁ, Z. ČERMÁKOVÁ, L. POUR, M. KREJČÍ, V. SANDECKÁ, E. ŠEVČÍKOVÁ, S. ŠEVČÍKOVÁ, Z. KRÁL a A. ČERMÁK. Hypercalcemia, symptoms, differential diagnostics and treatment, or importance of calcium investigation. *Vnitřní Lekarství*. 2016, 62, 370–383. Document Type: Article

2015

[14] DOUBKOVÁ, M. a J. SKŘIČKOVÁ. Classification of idiopathic interstitial pneumonias has undergone new changes. *Studia Pneumologica et Phthiseologica*. 2015, 75(6), 225–230. Document Type: Article

[15] DOUBKOVÁ, M., M. MOULIS a J. SKŘIČKOVÁ. Interstitial lung diseases and granulomatoses associated common variable immunodeficiency. *Vnitřní Lekarství*. 2015, 61(2), 119–124. Document Type: Article

2014

[16] DOUBKOVÁ, M., M. TOMÍŠKOVÁ a J. SKŘIČKOVÁ. Pulmonary Langerhans cell histiocytosis - Disease of smokers. *Studia Pneumologica et Phthiseologica*. 2014, 74(5), 158–161. Document Type: Article

2013

[17] DOUBKOVÁ, M. a J. SKŘIČKOVÁ. Interstitial lung diseases and connective tissue diseases. *Studia Pneumologica et Phthiseologica*. 2013, 73(2), 76–83. Document Type: Article

[18] DOUBKOVÁ, M., I. BINKOVÁ a J. SKŘIČKOVÁ. Familial idiopathic interstitial pneumonia - A case of one family. *Studia Pneumologica et Phthiseologica*. 2013, 73(5), 179–183. Document Type: Article

2012

[19] DOUBKOVÁ, M., I. BINKOVÁ a J. SKŘIČKOVÁ. Hidden cystic fibrosis in patient suffering from sarcoidosis. *Vnitřní Lekarství*. 2012, 58(4), 329–334. Document Type: Article

[20] DOUBKOVÁ, M., I. BINKOVÁ a J. SKŘIČKOVÁ. Sarcoidosis - diagnostics, prognosis and therapy. A retrospective analysis. *Vnitřní Lekarství*. 2012, 58(10), 735–742. Document Type: Article

2011

[21] DOUBKOVÁ, M., I. BINKOVÁ a J. SKŘIČKOVÁ. Is sarcoidosis associated with increased occurrence of malignancy? *Studia Pneumologica et Phthiseologica*. 2011, 71(3), 129–134. Document Type: Article

2010

[22] ADAM, Z., Z. ŘEHÁK, R. KOUKALOVÁ, P. SZTURZ, T. NEBESKÝ, J. NEUBAUER, M. KREJČÍ, L. POUR, I. HANKE, M. DOUBKOVÁ, Z. MERTA, R. HÁJEK a J. MAYER. Pulmonary Langerhans cell histiocytosis - Evaluation of the disease activity and treatment response using PET-CT (SUVmax Pulmo/SUV max Hepar index). Description of own experience and literature review. *Vnitřní Lekarství*. 2010, 56(12), 1228–1250. Document Type: Article

[23] ADAM, Z., T. NEBESKÝ, P. SZTURZ, J. NEUBAUER, M. KREJČÍ, L. POUR, I. HANKE, M. DOUBKOVÁ, Z. MERTA, R. HÁJEK, Z. ŘEHÁK, R. KOUKALOVÁ a J. MAYER. Pulmonary involvement in patients with multiorgan Langerhans cell histiocytosis. Eight case studies and literature review. *Vnitřní Lekarství*. 2010, 56(SUPPL. 2), 2S105–2S122. Document Type: Article

[24] DOUBKOVÁ, M. a J. SKŘIČKOVÁ. Dyspnoea in elderly subjects caused by respiratory diseases. *Praktický Lekar*. 2010, 90(10), 589–592. Document Type: Article

2007

[25] **DOUBKOVÁ, M.** Pulmonary alveolar proteinosis--the past and the present--editorial. *Vnitřní lékařství*. 2007, 53(10), 1031–1032. Document Type: Article

2005

[26] **DOUBKOVÁ, M.** a J. SKŘIČKOVÁ. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Vnitřní Lekarství*. 2005, 51(12), 1375–1384. Document Type: Article

[27] **DOUBKOVÁ, M., P. TURČÁNI, E. POKOJOVÁ a J. SKŘIČKOVÁ.** Lymphangiomyomatosis (a case report and a review of cases described in Czech and Slovak medical literature). *Studia Pneumologica et Phthiseologica*. 2005, 65(4), 154–159. ISSN 1213810X (ISSN). Document Type: Review

2003

[28] **DOUBKOVÁ, M., J. SKŘIČKOVÁ, A. HRAZDIROVÁ a P. KLÍMA.** Lung injury in renal diseases - Case reports. *Studia Pneumologica et Phthiseologica*. 2003, 63(6), 208–211. Document Type: Article

Article published in a Czech peer-reviewed journal included in the List of non-impact peer-reviewed journals published in the Czech Republic¹

2019

[1] ŠTEFÁNIKOVÁ, Marianna, Zita CHOVANCOVÁ, Petr KUBÁŇ a **Martina DOUBKOVÁ.** Biomarkery u idiopatické plicní fibrózy - jejich význam pro diagnostiku a prognózu. *Studia pneumologica et phthiseologica: časopis Slovenskej pneumologickej a ftizeologickej spoločnosti a České pneumologické a ftizeologické společnosti*. 2019, 79(5), 164–175. ISSN ISSN: 1213-810X.

[2] **DOUBKOVÁ, Martina.** Vzácné granulomatózy - granulomatóza s polyangiitidou. *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře*. 2019, 21(Příl. 2), 44–48. ISSN ISSN: 1212-4184.

[3] **DOUBKOVÁ, Martina.** Idiopatická plicní fibróza - časná diagnostika má vliv na prognózu onemocnění. *Profi medicína: odborné fórum pracovníků ve zdravotnictví*. 2019, 4(3), 16–20. ISSN ISSN: cnb003070940.

2018

[4] SKŘIČKOVÁ, Jana, Marcela TOMÍŠKOVÁ a **Martina DOUBKOVÁ.** Dušnost – jeden příznak, mnoho příčin i u nádorových onemocnění. *Farmakoterapeutická revue*. 2018, 2018(2), 165–169. ISSN ISSN: cnb002881585.

[5] **DOUBKOVÁ, Martina,** Jana SKŘIČKOVÁ, Jiří DOLINA, Dagmar KINDLOVÁ, Eva POKOJOVÁ, P. ĎURČ, J. LAČNÁ, M. GREGUŠ, Štefan KONEČNÝ, František FORET a Petr KUBÁŇ. Analýza kondenzátu dechu jako alternativní diagnostická metoda gastroezofageálního refluxu (GERD). *Alergie: časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii*. 2018, 20(Suppl. 2), 83–84. ISSN ISSN: 1212-3536.

[6] ADAM, Zdeněk, Karel STARÝ, Kateřina ZAJÍČKOVÁ, Zdeněk ŘEHÁK, Renata KOUKALOVÁ, Andrea ŠPRLÁKOVÁ-PUKOVÁ, Miroslav TOMÍŠKA, Martina DOUBKOVÁ, Zdeňka ČERMÁKOVÁ, Marta KREJČÍ, Viera SANDECKÁ, Martin ŠTORK, Lenka OSTŘÍŽKOVÁ, Aleš ČERMÁK a Luděk POUR. Zvýšená hladina kalcia

může být prvním příznakem mnohočetného myelomu, ale může mít i jiné příčiny. *Transfuze a hematologie dnes: časopis Společnosti pro transfuzní lékařství a Hematologické společnosti*. 2018, 24(4), 238–252. ISSN ISSN: 1213-5763.

2017

[7] SKŘIČKOVÁ, Jana a **Martina DOUBKOVÁ**. Pacient s dušností – častý návštěvník ambulance. *Alergie: časopis pro kontinuální vzdělávání v alergologii a klinické imunologii*. 2017, 19(4), 243–247. ISSN ISSN: 1212-3536.

[8] **DOUBKOVÁ, Martina**. Idiopatická plicní fibróza – časná diagnostika má stále význam. *Interní medicína pro praxi*. 2017, 19(2), 88–92. ISSN ISSN: 1212-7299.

[9] **DOUBKOVÁ, Martina**. Idiopatická plicní fibróza - časná diagnostika má stále význam. *Medicína pro praxi: časopis praktických lékařů*. 2017, 14(1), 45–48. ISSN ISSN: 1214-8687.

[10] **DOUBKOVÁ, Martina**. Granulomatózy u primárních imunodeficitů. *Postgraduální medicína: odborný časopis pro lékaře*. 2017, 19(Příl. 2), 30–34. ISSN ISSN: 1212-4184.

2016

[11] ČAN, Vladimír, **Martina DOUBKOVÁ**, Ivo HANKE a Igor PENKA. Lymfangiomyomatóza z pohledu chirurga. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL: české a slovenské vydání*. 2016, 13(2), 10–15. ISSN ISSN: 1802-0518.

2015

[12] ŠTEFÁNIKOVÁ, Marianna, **Martina DOUBKOVÁ**, Jana SKŘIČKOVÁ a Katarína MÚČKOVÁ. Úskalí histologické diagnózy u granulomatózního postižení plic. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL: české a slovenské vydání*. 2015, 12(2), 23–25. ISSN ISSN: 1802-0518.

[13] **DOUBKOVÁ, Martina**. Idiopatická plicní fibróza - z fatálního onemocnění se stává léčitelné. *AM review: aktuality z medicíny a systému zdravotní péče*. 2015, 2015(22), 12–14. ISSN ISSN: 2336-7326.

[14] ČAN, Vladimír, **Martina DOUBKOVÁ** a Ivo HANKE. Od renální koliky k transplantaci plic. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL: české a slovenské vydání*. 2015, 12(4), 4–7. ISSN ISSN: 1802-0518.

2014

[15] **DOUBKOVÁ, Martina**. Polékové plicní postižení. *Angis revue: odborný pohled do světa lékařů*. 2014, 7(1), 36–38. ISSN ISSN: 2464-5435.

2012

[16] SKŘIČKOVÁ, Jana a **Martina DOUBKOVÁ**. Dušnost v ambulanci. *Časopis lékařů českých*. 2012, 151(6), 315–317. ISSN ISSN: 0008-7335.

Article published in another peer-reviewed journal (not listed in the above categories)

[1] JANÍKOVÁ-OBOŘILOVÁ, Andrea, **Martina DOUBKOVÁ** a Michael DOUBEK. Hematologické malignity postihující mediastinum a plíce. In: *Základy moderní pneumoonkologie* [online]. 2017, s. 464–471. ISBN ISBN: 978-80-7345-551-4. Dostupné z: <http://www.medvik.cz/link/bmc19016865>

[2] **DOUBKOVÁ, Martina.** Idiopatická plicní fibróza - časná diagnostika má stále význam. In: *Výběr článků z pneumologie* [online]. 2017, s. 16–18. Dostupné z: <http://www.medvik.cz/link/bmc18011842>

[3] **DOUBKOVÁ, Martina.** Idiopatická plicní fibróza - aneb co nového v idiopatických intersticiálních pneumoniích. In: *Výběr článků z pneumologie* [online]. 2017, s. 8–11. Dostupné z: <http://www.medvik.cz/link/bmc18011835>

[4] **MALÁSKOVÁ, Lenka, Jitka ŘEHOŘOVÁ, Jakub ŠEVČÍK, G. ŠLEZINGROVÁ, Ilona BINKOVÁ a Martina DOUBKOVÁ.** Jak důležitá je mezioborová spolupráce u onemocnění Wegenerovou granulomatózou? – kazuistika. *Vnitřní lékařství: orgán Československé společnosti pro vnitřní lékařství, sekce Československé lékařské společnosti J. E. Purkyně* [online]. 2012, 58. ISSN: 0042-773X. Dostupné z: <http://www.medvik.cz/link/bmc13018180>

11. Souhrn poznatků habilitační práce

Cílem naší práce bylo popsat některé IPP v naší klinické praxi, sledovat klinické charakteristiky, průběh onemocnění, prognostické faktory a biomarkery. Tato habilitační práce, předkládaná jako komentovaný soubor publikovaných prací, se zaměřila na pochopení a poznání: 1) klinického průběhu a prognostických faktorů u idiopatické plicní fibrózy a sarkoidózy; 2) genetických dispozic k fibrotizujícím plicním procesům (sporadická, familiární forma plicní fibrózy a vzácný Heřmanského-Pudlákův syndrom) a sarkoidóze; vlivu genového polymorfismu na účinnost antifibrotické léčby; 3) hledání vhodných biomarkerů včetně pomocí neinvazivní metody odběru kondenzátu vydechaného vzduchu; a 4) imunopatogeneze u autoimunitních plicních procesů, imunodeficitů v diferenciální diagnostice IPP.

Jméno a podpis