

Univerzita Karlova

Lékařská fakulta v Plzni

Klinika pneumologie a ftizeologie LF UK v Plzni a FN Plzeň

Studijní program: Vnitřní nemoci

**Imunologické markery z krve, sputa, BALTE  
a plicních biopsií při posuzování aktivity  
a cílenosti léčby chronických zánětlivých  
a fibrotizujících nemocí plic a průdušek**

The role of biomarkers obtained from serum, sputum, BALF and lung tissue samples  
in assessing the activity and targeting therapy  
of chronic inflammatory and fibrotic diseases of the lungs and bronchi

Disertační práce

Plzeň, 2019

Autor práce: MUDr. Olga Růžicková Kirchnerová

Školitel: doc. MUDr. Milan Teřl, Ph.D.

### **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem předkládanou disertační práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité informační zdroje řádně uvedla v příloženém seznamu literatury. Dále prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Plzni dne 30.4.2019

MUDr. Olga Růžicková Kirchnerová

## **Předmluva**

Tato práce vznikla na základě spolupráce Kliniky pneumologie a ftizeologie FN a LF UK v Plzni, Ústavu klinické imunologie a alergologie, Otorhinolaryngologické kliniky, Šiklova ústavu patologie, Kliniky zobrazovacích metod FN Plzeň a Ústavu klinické imunologie a alergologie FN Hradec Králové, pod odborným vedením doc. MUDr. Milana Teřla, Ph.D.

Chtěla bych velice poděkovat svému školiteli doc. MUDr. Milanu Teřlovi, PhD. za jeho velkou podporu, vedení a předávání cenných zkušeností nejen v průběhu celého studia, ale i v běžné denní praxi a životě.

Dále mému konzultantovi prof. Petru Panznerovi a jeho týmu, jmenovitě MUDr. Ivaně Malkusové za skvělou spolupráci, dále prim. MUDr. Vladanovi Hraběti a MUDr. Janě Kuntscherové za spolupráci při odběru a zpracování vzorků nosních biopsií. Doc. MUDr. Janu Baxovi za odbornou pomoc při zpracování obrazové dokumentace. Mgr. Tomáši Valenovi za pomoc při zpracování souboru pacientů s těžkým astmatem na biologické terapii, MUDr. Jakubovi Novosadovi za odborné rady, pomoc a přizvání k zajímavé spolupráci. Dále musím poděkovat svým milým kolegům z plicní kliniky, kteří mě podpořili při psaní této práce, jmenovitě MUDr. Moláčková, MUDr. Bušková, MUDr. Břízová, MUDr. Aubrecht, MUDr. Langmajer, MUDr. Svatoň, MUDr. Pužman, a v neposlední řadě bych ráda poděkovala prof. MUDr. Miloši Peškovi, CSc. za jeho důvěru a podporu.

# ABSTRAKT

## Úvod

Chronické zánětlivé a fibrotizující nemoci plic a průdušek představují velmi nesourodou skupinu onemocnění, jejichž společným jmenovatelem je zánět. Zásadní odlišnosti v jeho etiopatogenezi a lokalizaci vedou k typickým obrazům jednotlivých nemocí. S postupující úrovní poznání je stále více zjišťována heterogenita povahy zánětu i v rámci jednotlivých diagnóz. Společným klinickým důsledkem se dnes stává úsilí o cílenější léčbu jednotlivých nemocí na základě endotypů, resp. fenotypů.

## Cíle

Cílem naší práce je I) podat ucelený přehled biomarkerů chronických zánětlivých a fibrotizujících nemocí plic a průdušek a II) posouzení klinické využitelnosti konkrétních biomarkerů při diagnostice a volbě fenotypicky cílené terapie u nemocných s těžkým refrakterním astmatem.

## Metody

Vlastní práce (ad II) je rozdělena do dvou částí.

V první části jsme zjišťovali korelace biomarkerů získaných z krve, indukovaného sputa, bronchoalveolární laváže a ORL nálezů včetně nosních biopsií u skupiny těžkých astmatiků a dále jejich změny před a po nasazení systémové kortikoterapie. Této problematice jsou věnovány tři navazující práce.

Druhá část je zaměřena na sledování efektu cílené terapie vybrané na podkladě fenotypizace pomocí imunologických biomarkerů a zahrnuje celkem 4 práce. Dvě se zaměřují na hodnocení efektu biologické terapie omalizumabem, jedna na přínos vyšetřování periostinu při výběru cílené terapie a poslední hodnotí efekt bronchiální termoplastiky. Statistické analýzy využívaly převážně Chí kvadrát test, Spermanův korelační koeficient, Kaplan-Maierův algoritmus, Friedmanovu ANOVU a model Coxovy regrese, pro všechny analýzy byla označena jako statisticky významná hodnota  $p < 0,05$ .

## Výsledky

V první části jsme získali vzorky indikovaného sputa (IS) a bronchoalveolární laváže (BALTE) od 29 pacientů s těžkým refrakterním astmatem a porovnávali jsme využitelnost metod průtokové cytometrie a rutinních cytologických (DCC) a imunocytochemických (ICC) metod při stanovení buněčného profilu získaných vzorků. Zjistili jsme, že metoda průtokové cytometrie není pro vyhodnocení IS a BALTE vhodná a že zlatým standardem zůstávají metody imunocytochemické. Dále jsme porovnávali vzorky z IS, BALTE a nosní biopsie (NB) u 30 pacientů před a po nasazení 40 mg prednisonu/den po dobu 1 měsíce. Zjistili jsme úzkou provázanost mezi eosinofilním zánětem (EOS) v horních a dolních cestách dýchacích. Korelací jsme našli v zastoupení eozinofilů v NB a IS, ne však mezi NB a BALTE. Hodnota ECP v NB korelovala s nálezy v IS i BALTE. Po 4 týdnech systémové kortikoterapie došlo k poklesu eozinofilů v IS, BALTE, hodnot ECP i FENO. Korelace mezi hodnotou EOS v NB a FENO před a po podání systémové kortikoterapie nebyla nalezena. Poslední práce této první části se detailněji zaměřila na využití ORL nálezů (128 pacientů) při fenotypizaci těžkých astmatiků. Potvrdili jsme význam nosní polypózy jako markeru eozinofilie v dolních cestách dýchacích a její korelaci s tíží nemoci a určitými konkrétními fenotypy.

V druhé části jsme potvrdili výborný efekt terapie omalizumabem u pacientů s těžkým IgE mediováným fenotypem astmatu v ČR (114 pacientů) během 2-letého sledování v registru. V další související práci jsme potvrdili její 10letý příznivý efekt i u pacientů z našeho centra (55 pacientů) a v podskupině pacientů s bronchopulmonální aspergilózou. Zjistili jsme, že produkce sérového periostinu je významně spojena s modalitou léčby a přítomností

chronické rinosinusitidy s nosními polypy (48 pacientů). Poslední pilotní práce (6 pacientů) potvrzuje dobrý efekt nefarmakologické terapie astmatu pomocí bronchiální termoplastiky u selektivně vybraných pacientů na základě funkčních biomarkerů.

## **Závěry**

Klíčovými a praktickými biomarkery pro bližší fenotypizaci pacientů s těžkým refrakterním astmatem, které se jeví stěžejní pro výběr cílené terapie, jsou dle našich poznatků: celkové a specifické IgE, ECP a eozinofilie v periferní krvi, eozinofilie sputa a nosní biopsie, dále přítomnost a stupeň nosní polypózy a reverzibilita bronchiální obstrukce. Pomocným biomarkerem T2-high fenotypové cesty astmatu a chronické rinosinusitidy s nosními polypy se jeví sérový periostin. Při stanovení buněčného profilu vzorků indukovaného sputa a bronchoalveolární laváže se jako zlatý standard jeví sklíčkové metody cytologické a imunocytochemické.

# ABSTRACT

Immunological markers from blood, sputum, BALF and pulmonary biopsies in assessing the activity and targeting therapy of chronic inflammatory and fibrotic diseases of the lungs and bronchi

## Introduction

Chronic inflammatory and fibrotic lung and airway diseases represent a heterogeneous group of respiratory tract diseases, both with an initial inflammatory background. Crucial differences in its etiopathogenesis and location significantly influence its clinical manifestation. Considering an extensive progression in science, it is obvious that there is certain heterogeneity among inflammatory processes as well as in etiopathogenesis within the differential diagnosis. Nowadays the aim is to choose best-targeted therapy based on specific endotypes and phenotypes.

## Aims

The aim of this study is I) to provide a comprehensive overview of biomarkers of chronic inflammatory and fibrotic lung and bronchi disorders II) to assess a diagnostic role of biomarkers in clinical practice as well as the role of biomarkers when deciding a type of phenotypically targeted therapy in patients with severe refractory asthma.

## Methods

The work (ad II) is divided into two parts.

In the first part, we correlated levels of serum biomarkers, biomarkers in induced sputum, bronchoalveolar lavage fluid and ENT findings including nasal biopsies before and after systemic glucocorticotherapy treatment in the group of severe asthmatics. There are three papers/studies dealing with this issue.

The second part is geared towards monitoring the effect of targeted therapy based on phenotypization due to biomarkers. The second part involves 4 papers/studies. Two studies focus on the evaluation of the effect of omalizumab therapy, one study focuses on the role of periostin in the selection of targeted therapy, and the last study evaluates the effect of bronchial thermoplasty.

Statistical analyses used predominantly the Chi-square test, the Spearman correlation coefficient, the Kaplan-Maier algorithm, Friedman's ANOVA, and the Cox regression model.

## Results

In the first part, we obtained samples of induced sputum (IS) and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from 29 patients with severe refractory asthma and compared the applicability of flow cytometry and routine cytological (DCC) and immunocytochemical (ICC) methods to determine the cell profile of the obtained samples. We found out that the flow cytometry method is not suitable for IS and BALF evaluation and that cytological and immunocytochemical method remain the gold standard. Furthermore, we compared samples from IS, BALF and nasal biopsy (NB) in 30 patients before and after treatment of 40 mg prednisone/day/1 month. We detected a close relationship between eosinophilic inflammation (EOS) in the upper and lower respiratory tract. We also detected correlation in eosinophil counts presented in NB and IS, but we did not detect any correlation in eosinophil counts in NB and BALTE. The value of ECP in NB correlated with findings in IS and BALTE. After 4 weeks of systemic glucocorticoid therapy, there was a significant reduction in eosinophil counts in IS, BALF and ECP and FENO values. There was not detected any correlation between EOS in NB and FENO before and after administration of systemic glucocorticotherapy. The last study of this first part focused in more detail on the use of ENT findings (128 patients) in the phenotyping of severe asthmatics. We confirmed the

importance of nasal polyposis as a marker of eosinophilia in the lower respiratory tract and its correlation with disease severity and certain specific asthma phenotypes.

In the second part, we confirmed an excellent effect of omalizumab therapy in patients with severe IgE-mediated asthma phenotype in the Czech Republic (114 patients) during the 2-year follow-up in the registry. In another related study with 10-year follow-up, we detected significant benefits in patients from our center for severe asthma (55 patients) and in the subgroup of patients with bronchopulmonary aspergillosis. We found that the production of serum periostin is significantly associated with a modality of treatment and the presence of chronic rhinosinusitis with nasal polyps (48 patients). The last pilot study (6 patients) confirmed the satisfying effects of bronchial thermoplasty, the non-pharmacological treatment of asthma, in preselected patients according to functional biomarkers.

## **Conclusion**

Key and practical biomarkers for more precise severe refractory asthma phenotyping, which are essential when selecting targeted therapy, are: total and specific IgE, ECP, peripheral blood eosinophilia, sputum and nasal biopsy eosinophilia, presence and degree of nasal polyposis and reversibility of bronchial obstruction. Serum periostin seems to be a promising biomarker of the phenotype of Th-2 high pathway in asthma and chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Cytological and immunocytochemical slide methods seem to be the gold standard in determining the cell profile of induced sputum and bronchoalveolar lavage samples.

# OBSAH

|                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ABSTRAKT .....                                                                                                                                                                                                                   | 4   |
| ABSTRACT .....                                                                                                                                                                                                                   | 6   |
| OBSAH.....                                                                                                                                                                                                                       | 8   |
| 1. ÚVOD .....                                                                                                                                                                                                                    | 15  |
| 2. CÍL PRÁCE.....                                                                                                                                                                                                                | 16  |
| 3. POPIS SOUČASNÉHO STAVU A PROBLEMATIKY .....                                                                                                                                                                                   | 17  |
| 3.1. <b>Chronické zánětlivé nemoci plic a průdušek se zaměřením na etiopatogenezi</b> .....                                                                                                                                      | 17  |
| 3.1.1. Nemoci s bronchiální obstrukcí .....                                                                                                                                                                                      | 17  |
| 3.1.2. Fibrotizující plicní nemoci .....                                                                                                                                                                                         | 37  |
| 3.1. <b>Biomarkery</b> .....                                                                                                                                                                                                     | 41  |
| 3.2.1. Základní charakteristika a rozdělení biomarkerů.....                                                                                                                                                                      | 41  |
| 3.2.2. Biomarkery u nemocí s bronchiální obstrukcí a fibrotizujících nemocí plic .....                                                                                                                                           | 42  |
| 3.2.3. Imunologické markery u chronických zánětlivých a fibrotizujících plicních nemocí se zaměřením na astma .....                                                                                                              | 54  |
| 4. ŘEŠENÍ VLASTNÍ STUDIE.....                                                                                                                                                                                                    | 67  |
| 4.1. <b>Hodnocení klinické použitelnosti jednotlivých invazivních a neinvazivních imunologických biomarkerů u pacientů s těžkým refrakterním astmatem</b> .....                                                                  | 67  |
| 4.1.1. Vliv systémové kortikoterapie u pacientů s těžkým refrakterním astmatem na změny invazivních a neinvazivních markerů sledovaných z krve, sputa, bronchoalveolární laváže, nosních biopsií a jejich klinické využití ..... | 67  |
| 4.1.1.1. Imunologické markery z indukovaného sputa a BALTE .....                                                                                                                                                                 | 69  |
| 4.1.1.2. Nosní biopsie v korelaci s ostatními markery .....                                                                                                                                                                      | 71  |
| 4.1.2 ORL nálezy a jejich využití při fenotypizaci pacientů s astmatem.....                                                                                                                                                      | 78  |
| 4.2. <b>Hodnocení klinických výsledků využití biomarkerů při fenotypicky cílené léčbě pacientů s těžkým refrakterním astmatem</b> .....                                                                                          | 86  |
| 4.2.1. Biomarkery eozinofilie a alergie z krve.....                                                                                                                                                                              | 86  |
| 4.2.1.1. Vyhodnocení efektu a bezpečnosti cílené biologické terapie omalizumabem v ČR....                                                                                                                                        | 86  |
| 4.2.1.2. Vyhodnocení efektu biologické terapie omalizumabem po 10 letech v NCTA Plzeň...                                                                                                                                         | 94  |
| 4.2.1.3. Význam měření periostinu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem.....                                                                                                                                                 | 100 |
| 4.2.2. <b>Ostatní biomarkery</b> .....                                                                                                                                                                                           | 103 |
| 4.2.2.1. Význam reverzibility bronchiální obstrukce při výběru pacientů pro ošetření bronchiální termoplastikou a sledování efektu této léčby na našem souboru pacientů. ....                                                    | 103 |
| 6. SEZNAM LITERATURY .....                                                                                                                                                                                                       | 109 |
| 7. SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A SCHÉMAT .....                                                                                                                                                                                       | 123 |
| 8. PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA.....                                                                                                                                                                                                | 126 |

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|              |                                                                                                                             |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AAT, A1AT    | alfa 1 antitrypsin                                                                                                          |
| ABPA         | alergická bronchopulmonální aspergilóza                                                                                     |
| ACOS         | překryvný syndrom asthma a CHOPN (Asthma COPD Overlap Syndrome)                                                             |
| ACP          | Acylpirin                                                                                                                   |
| ACT, ACQ     | (test kontroly astmatu), Asthma Control Test, Asthma Control Questionnaire                                                  |
| AQLQ         | dotazník kvality života u astmatiků, Asthma Quality of Life Questionnaire                                                   |
| ADAM 33      | gen patřící do rodiny ADAM 33 (a desintegrin and mettaloprotease domain)                                                    |
| AEC          | alveolární epitelové buňky                                                                                                  |
| AIA          | aspirinem indukované astma                                                                                                  |
| AIP          | akutní intersticiální pneumonie                                                                                             |
| ALT          | antileukotrien                                                                                                              |
| AMG 157, 317 | anti-TSLP, protilátka proti tymickému stromálnímu lymfopoetinu                                                              |
| Anti-IgE     | protilátka proti imunoglobulinu E                                                                                           |
| Anti-IL5     | protilátka proti interleukinu 5                                                                                             |
| APC          | antigen prezentující buňky                                                                                                  |
| API          | astma s prediktivními indiciemi v dětském věku                                                                              |
| AW           | alveolární stěna, alveolar wall                                                                                             |
| AZM, AZT     | azitromycin                                                                                                                 |
| ATS          | Americká hrudní společnost, American Thoracic Society                                                                       |
| β2 agonisté  | sympatomimetika stimulující β2 receptory                                                                                    |
| bb           | buňky                                                                                                                       |
| BAL          | bronchoalveolární laváž                                                                                                     |
| BALTE, BALF  | bronchoalveolární lavážní tekutina                                                                                          |
| BDT          | bronchodilatační test                                                                                                       |
| BKT          | bronchokonstrikční test                                                                                                     |
| BHR          | bronchiální hyperreaktivita                                                                                                 |
| B lymfocyty  | bílé krvinky-lymfocyty skupiny B                                                                                            |
| BLVR         | bronchoskopická redukce plicního parenchymu                                                                                 |
| BM           | biomarker                                                                                                                   |
| BMI          | body mass index                                                                                                             |
| BT           | bronchiální termoplastika                                                                                                   |
| BW           | bronchial wall, bronchiální stěna                                                                                           |
| CCL1         | CC chemokine ligand 1 neboli eotaxin-1, eosinofilní chemotaktický faktor                                                    |
| CLCA1        | (Chloride Channel Accessory 1) gen je členem rodiny proteinů kódující chloridový kanál, je asociován s CF, mekoniovým ileem |
| CD4          | CD 4 je znak, marker na povrchu T lymfocytů                                                                                 |

|                  |                                                                                                                 |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CD 28            | znak 28 na povrchu T lymfocytů                                                                                  |
| CRP              | C-reaktivní protein                                                                                             |
| CT               | computed tomografie                                                                                             |
| CTGF             | růstový faktor pojivové tkáně                                                                                   |
| CXC              | chemokiny                                                                                                       |
| CYSLT1           | receptor pro cysteinové leukotrieny                                                                             |
| Coeff            | koeficient                                                                                                      |
| COP              | kryptogenní organizující se pneumonie                                                                           |
| CPFE             | syndrom fibrózy a emfyzému                                                                                      |
| CRS              | chornická rinosinitida, chronic rhinosinusitis                                                                  |
| CRTH2            | Chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells, váže se na prostaglandin D2                |
| CRSwNP           | chronická rinosinitida s nosními polypy                                                                         |
| DAH              | difuzní alveolární hemoragie                                                                                    |
| DAMP             | poškození molekulárních vzorců (Damage Associated Molecular Patterns)                                           |
| DNA              | deoxyribonukleová kyselina                                                                                      |
| DMARDS           | chorobu modifikující antirevmatické léky (disease modifying antirheumatic drugs)                                |
| DC               | dýchací cesty                                                                                                   |
| DCC count        | diferenciální rozpočet buněk (klasické barvení na sklíčku), differential cell count                             |
| DCD              | dolní cesty dýchací                                                                                             |
| DDOT             | dlouhodobá domácí oxygenoterapie                                                                                |
| DIP              | deskvamativní intersticiální pneumonie                                                                          |
| DPP-4            | dipeptidylpeptidáza -4                                                                                          |
| DTT              | dithyotritol                                                                                                    |
| ECP              | eosinofilní kationický protein                                                                                  |
| EDN              | eosinofilní neutotoxin                                                                                          |
| ECM              | extracelulární matrix                                                                                           |
| EGFR             | (Epithelial-Cell Growth-Factor), epiteliální růstový faktor                                                     |
| EIA              | astma provokované námahou (Exercise Induced Asthma)                                                             |
| EOS              | eosinofily                                                                                                      |
| EPO/EPX          | eosinofilní peroxidáza                                                                                          |
| EU               | Evropská unie                                                                                                   |
| Faktor K $\beta$ | nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, proteinový komplex kontrolující transkripci DNA |
| FENO             | frakcionovaný vydechovaný oxid dusnatý (Fractional Exhaled Nitric Oxide)                                        |
| FEF 25-75        | střední výdechová rychlost 25-75, forced expiratory flow                                                        |
| FEV1             | usilovně vydechnutý objem za první sekundu                                                                      |

|                                                |                                                                                  |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| FEV1/VC                                        | max poměr usilovně vydechnutého objemu za 1 vteřinu a vitální kapacity           |
| FEV1/VC                                        | max poměr usilovně vydechnutého objemu za 1 vteřinu a usilovné vitální kapacity  |
| FEV1/SVC                                       | max poměr usilovně vydechnutého objemu za 1 vteřinu a klidové vitální kapacity   |
| FC                                             | flowcytometry – metoda průtokové cytometrie                                      |
| FDA                                            | Federální agentura USA pro potraviny a léky (Food and Drug Administration)       |
| FFM                                            | fat free mass, index tuku prosté tkáně                                           |
| FR                                             | fyziologický roztok                                                              |
| VC                                             | usilovná vitální kapacita (Forced Vital Capacity)                                |
| GATA 3                                         | vazebný protein 3                                                                |
| GER                                            | gastroezofageální reflux                                                         |
| GERD                                           | gastroezofageální refluxní choroba/nemoc                                         |
| GINA                                           | Globalní iniciativa pro astma                                                    |
| GPRA                                           | G protein related receptor for asthma                                            |
| GM-CSF                                         | faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů                               |
| HRCT                                           | high resolution CT                                                               |
| CHOPN                                          | chronická obstrukční plicní nemoc                                                |
| IgE                                            | Imunoglobulin E                                                                  |
| IgG1                                           | Imunoglobulin G, podtyp 1                                                        |
| IIA                                            | infekcí indukované astma                                                         |
| IL1 $\beta$                                    | interleukin 1beta                                                                |
| IL-4, 5, 13, 9,17, 25, 33 a další interleukiny |                                                                                  |
| IL-4Ra/IL13Ra1                                 | receptor pro interleukin 4 a 13                                                  |
| ILC                                            | přirozené lymfoidní buňky (innate lymphoid cells)                                |
| ICC                                            | imunocytochemistry (metoda na sklíčku, na buňky se váží monoklonární protilátky) |
| IKS, ICS                                       | inhalační kortikosteroidy                                                        |
| IPF                                            | idiopatická plicní fibróza                                                       |
| IPP                                            | intersticiální plicní proces                                                     |
| IS                                             | indukované sputum                                                                |
| ITT                                            | intent-to-treat (s úmyslem léčit)                                                |
| IU/l                                           | mezinárodní jednotky měřené na litr (International unit)                         |
| KIT ligand                                     | for the receptor type protein tyrosine kinase                                    |
| KO                                             | krevní obraz                                                                     |
| KVV                                            | kondenzát vydechovaného vzduchu                                                  |
| LA                                             | lokální anestezie                                                                |
| LABA                                           | inhalační beta-agonisté s dlouhodobým účinkem (Long-Acting Beta Agonists)        |

|                    |                                                                                      |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| U-LABA             | inhalační beta-agonisté s ultra dlouhodobým účinkem (UltraLong-Acting Beta Agonists) |
| LAM                | lymfangioleiomyomatóza                                                               |
| LAMA               | inhalační anticholinergika s dlouhodobým účinkem                                     |
| U-LAMA             | inhalační anticholinergika s ultra dlouhodobým účinkem                               |
| LIP                | lymfocytární intersticiální pneumonie                                                |
| LT                 | leukotrieny (C4, D4, E4)                                                             |
| LTA4H              | leukotrienA4 hydroláza                                                               |
| LVRS<br>emfyzému   | Lung Volume Reduction Surgery, chirurgická resekční metoda terapie plicního          |
| MAPK               | mitogenem aktivovaná proteinkináza                                                   |
| MAPK p38           | mitogenem aktivovaná proteinkináza p38                                               |
| MBNW               | multiple breath nitrogen washout                                                     |
| MBP                | hlavní bazický protein (main basic protein)                                          |
| MEFT               | multiple exhalation flow technique                                                   |
| mini-AQLQ          | dotazník kvality života astmatiků (Asthma Control Quality Life Questionnaire)        |
| MMP                | matrixové metaloproteinázy                                                           |
| MMP9               | matrixmetaloproteináza                                                               |
| MPO                | myeloperoxidáza                                                                      |
| MR                 | magnetická rezonance                                                                 |
| NaCl               | chlorid sodný                                                                        |
| NCTA               | Národní centrum pro těžké astma                                                      |
| NE                 | neutrofilní elastáza                                                                 |
| NIVP               | neinvazivní plicní ventilace                                                         |
| NM/NB              | nasal mucosa – nosní biopsie                                                         |
| NO syntáza         | syntáza oxidu dusnatého neboli NOS                                                   |
| NO                 | oxid dusnatý                                                                         |
| iNOS               | cytokiny indukovaná syntetáza oxidu dusnatého                                        |
| eNOS               | epiteliální syntetáza oxidu dusnatého                                                |
| NP                 | nasal polyps, nosní polypy                                                           |
| NSAID              | nesteroidní protizánětlivé léky (Non Steroid Antiinflammatory Drugs)                 |
| NSIP               | nespecifická intersticiální pneumonie                                                |
| OCS                | orální kortikosteroidy                                                               |
| OMA                | omalizumab                                                                           |
| ORL                | otorhinolaryngologie                                                                 |
| ORMDL3<br>retikula | člen rodiny genů, které kódují transmembránové proteiny endoplasmatického            |
| 5-oxo-ETE          | 5-oxo-eikosatetraenová kyselina                                                      |

|           |                                                                                                                                               |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PAI-1     | inhibitor aktivátoru plasminogenu-1                                                                                                           |
| PAMP      | molekulární vzory spojené s patogenem (Pathogen Associated Molecular Patterns)                                                                |
| PAS       | barvení histologických preparátů k vyloučení mykotické infekce (Periodic Acid Schiff)                                                         |
| PBS       | protein bovinní sérum                                                                                                                         |
| PCR       | polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)                                                                                      |
| PDE       | fosfodiesteráza                                                                                                                               |
| PDE4      | fosfodiesteráza 4                                                                                                                             |
| PDGF      | destičkami tvořený růstový faktor                                                                                                             |
| PE        | prolyl endopeptidáza                                                                                                                          |
| PGLD2     | (PG-D2) prostaglandin D2                                                                                                                      |
| PGP       | proline-glycerin-proline                                                                                                                      |
| PET       | pozitronová emisní tomografie                                                                                                                 |
| PET-CT    | pozitronová emisní počítačová tomografie                                                                                                      |
| ppb       | parts per billion                                                                                                                             |
| POSTN     | gen kódující periostin                                                                                                                        |
| QT        | EKG interval mezi Q a T vlnou                                                                                                                 |
| RABA      | inhalační beta 2 agonisté s rychlým nástupem účinku (Rapid-Acting Beta2 Agonists)                                                             |
| RB-ILD    | respirační bronchiolitida s intersticiálním plicním postižením                                                                                |
| RANTES    | regulated on activation, normal T cell expressed and secreted, chemoreaktant regulovaný na aktivaci, exprimován a vylučován normální T buňkou |
| RV        | reziduální objem                                                                                                                              |
| RV/TLC    | poměr reziduálního objemu ku totální plicní kapacitě                                                                                          |
| SABA      | inhalační beta-agonisté s rychlým krátkodobým účinkem (Short-Acting Beta Agonists)                                                            |
| SACE      | enzym konvertující angiotenzin                                                                                                                |
| SAD       | onemocnění malých dýchacích cest, small airway disease                                                                                        |
| SAE       | závažné nežádoucí účinky (Severe Adverse Event)                                                                                               |
| SAFS      | severe asthma with fungal senzitisování, těžké astma s přecitlivělostí na plísně                                                              |
| SCF       | kmenové buňky stimulující faktor                                                                                                              |
| SCS       | systemic corticosteroids, systémové kortikoidy                                                                                                |
| SD        | směrodatné odchytky                                                                                                                           |
| Serpin B2 | Serpin Family B Member – člen genové rodiny                                                                                                   |
| SMA       | hladké svalové aktiny                                                                                                                         |
| SMI       | aerosolový dávkovač produkující jemnou mlžinu (Soft Mist Inhaler)                                                                             |
| SPECT     | jednofotonová emisní computerová tomografie                                                                                                   |
| SP-D      | surfaktantový protein D                                                                                                                       |

|                       |                                                      |
|-----------------------|------------------------------------------------------|
| STAT4                 | Signal Trasnducer And Activator Of Traskription 4    |
| STAT6                 | signální transduktor a aktivátor transkripce 6       |
| SVC                   | klidová vitální kapacita                             |
| TBB                   | transbronchiální biopsie                             |
| TCR                   | T buněčný receptor                                   |
| Th lymfocyty          | bílé krvinky, lymfocyty skupiny T                    |
| Th                    | pomocný lymfocyt (podtypy Th1 a Th2)                 |
| Tc                    | cytotoxický lymfocyt                                 |
| TGFβ                  | transformující růstový faktor beta                   |
| TLCO                  | transferfaktor                                       |
| TNF                   | tumor nekrotizující faktor                           |
| TNFα                  | tumor nekrotizující faktor alfa                      |
| TRA                   | na terapii rezistentní astma                         |
| TSLP                  | tymický stromální lymfopoetin                        |
| Type -2 -low fenotyp  | astmatu s nízkým zastoupením eosinofilů              |
| Type -2 -high fenotyp | astmatu s vysokým zastoupením eozinofilů             |
| VCAM-1                | vascular cell adhesion molecule (adhezivní molekula) |
| VEGF                  | vaskulární endoteliální růstový faktor               |
| UIP                   | usual interstitial pneumonia                         |
| ULS                   | microarray analýza                                   |
| Urinary BrTyr         | močový bromotyrosine                                 |
| Urinary LTE4          | močový leukotrien L4                                 |
| YLK-40                | chitinase-like protein                               |

# 1. ÚVOD

V posledních letech napříč medicínskými obory, a obor pneumologie nevyjímaje, narůstá potřeba podrobnější diagnostiky jednotlivých nemocí ve snaze o nalezení efektivnější a cílenější terapie.

Tato potřeba přichází ruku v ruce s tím, jak narůstají poznatky o tom, že onemocnění, zahrnovaná do jednotlivých „historických“ diagnóz, vykazují různě významné odlišnosti. Poznání, že v rámci jedné zastřešující diagnózy existují specifické podmožiny, zdaleka není nové. Již v minulosti činilo potíže vymezení obsahu jednotlivých diagnóz, resp. nozologických jednotek. Jako příklady lze uvést diabetes I. a II. typu, primární a sekundární systémovou hypertenzi, primární a postprimární tuberkulózu atp. Uvedená dělení vycházela především z klinických charakteristik.

Dnešní doba přináší raketový nástup poznatků o nemocech na molekulárně-buněčné úrovni. Děje se tak především v souvislosti s hledáním a testováním nových léků, určených pro těžké formy jednotlivých nemocí. Ukazuje se, že tyto nové léky („biologika“), cílené na dílčí mechanismy, na rozdíl od pleiotropně působících klasických léčiv, bývají účinné pouze u části pacientů se stejnou diagnózou. Jako ilustrativní případy k výše uvedenému lze uvést „univerzální“ protizánětlivý efekt kortikosteroidů prakticky u všech astmatiků, anti-IgE terapie je však efektivní pouze u části z nich. Podobné příklady nalezneme i v léčbě např. Crohnovy nemoci (kortikosteroidy vs anti-TNF terapie), revmatoidní artritidy (DMARDS vs biologická léčba) a dalších. V rámci jedné nemoci tak existují různé etiopatogenetické mechanismy, resp. nověji molekulárně-buněčné signální dráhy, dnes označované jako "endotypy". Různorodost jednotlivých diagnóz na molekulárně-buněčné úrovni narůstá a jejich hranice se stávají neostře. Z hlediska klinické praxe tak dochází k paradoxu. Navenek tyto různé signální dráhy (endotypy) vedou všechny k zastřešujícímu jednotnému klinickému obrazu konkrétní diagnózy, zároveň však jsou výsledkem heterogenních etiopatogenetických cest. Pro klinickou praxi je třeba hledat praktické výstupy. Za prvé stanovení základní diagnózy na základě jasných kritérií, v dalším kroku pak pomocí biomarkerů stanovit jednotlivé fenotypy, tak aby odrážely konkrétní endotypy dané nemoci, umožňující racionální indikaci cílené biologické léčby.

Chronická zánětlivá a fibrotizující plicní onemocnění představují velmi heterogenní skupinu nemocí. S postupující úrovní poznání (viz výše) je rovněž stále více zjišťována výrazná imunoetiopatogenetická heterogenita i v rámci jednotlivých diagnóz. Vzhledem k enormně narůstající šíři problematiky v rámci rozsáhlého tématu dizertační práce jsme se – vzhledem k zaměření našeho pracoviště na pacienty s těžkým astmatem – rozhodli zacílit naše úsilí právě na tuto skupinu nemocných.

Cílem práce bylo identifikovat ty biomarkery, které by pomohly odlišit a rozdělit pacienty do jednotlivých fenotypických, resp. endotypických podskupin, a na jejich základě pak určit konkrétní typ cílené léčby a/nebo predikovat její efekt u daného pacienta.

V naší práci jsme se snažili vyhledat a porovnat klinickou významnost jednotlivých biomarkerů přímých i nepřímých, získaných pomocí invazivních i neinvazivních technik, se zaměřením na pacienty s těžkými formami astmatu. Porovnávali jsme výhody a nevýhody biomarkerů získaných z krve, sputa, bronchoalveolární laváže a nosních biopsií. Pozornost jsme věnovali i souvisejícím méně invazivním a v praxi lépe dostupným klinickým a funkčním markerům ze spirometrických a otorhinolaryngologických vyšetření. Získané údaje nám pomohly rozdělit nemocné do jednotlivých fenotypických a endotypických podskupin, u řady z nich byla poté nasazena cílená terapie, jejíž efekt jsme následně vyhodnocovali. Naše plicní klinika patří mezi jedno z největších Národních center pro těžké astma v ČR, pacienti pro tuto práci byli vybíráni právě mezi těžkými astmatiky.

## 2. CÍL PRÁCE

Disertační práce se zabývá klinickým využitím přímých i nepřímých imunologických markerů při diagnostice a volbě cílené terapie u nemocných s těžkým refrakterním astmatem a sledováním účinnosti zvolené terapie.

Této problematice bylo věnováno celkem 7 dílčích prací, rozdělených do 2 částí.

V první části jsme porovnávali výpovědní hodnotu, vzájemné korelace a klinickou použitelnost biomarkerů získaných z krve, indukovaného sputa, bronchoalveolární laváže a nosních biopsií u skupiny těžkých astmatiků, včetně jejich změn před a po nasazení systémové kortikoterapie. Význam tohoto tématu je dán skutečností, že v běžné klinické praxi je řada nemocných s těžkými formami astmatu různě dlouho léčena systémovou kortikoterapií, jako donedávna jedinou možnou alternativou léčby těžkého astmatu, která však zároveň může interpretační hodnotu biomarkerů významně ovlivnit.

Této problematice jsou věnovány celkem 3 navazující práce. Sledujeme zde kromě výše uvedeného i možnosti využití ORL nálezů při diagnostice a výběru terapie u pacientů s těžkým refrakterním astmatem, stanovení negativních prognostických faktorů rozvoje a vzniku těžké formy nemoci.

Druhá část je zaměřena na sledování efektu cílené terapie vybrané na podkladě fenotypizace pomocí imunologických a ev. ostatních biomarkerů a zahrnuje celkem 4 dílčí práce. Prvé dvě pojednávají o biomarkerech alergie/atopie a vyhodnocení efektu cílené léčby. Konkrétně se jedná o více než 10leté zkušenosti s biologickou terapií pomocí anti-IgE protilátky. Třetí práce se zabývá klinickou použitelností vyšetřování periostinu při výběru cílené biologické léčby. Čtvrtá práce posuzuje použití funkčně-klinického biomarkeru (bronchiální reverzibility) při racionální indikaci bronchiální termoplastiky.

### 3. POPIS SOUČASNÉHO STAVU A PROBLEMATIKY

Zánět a remodelace jsou patofyziologické procesy, které jsou součástí rozvoje řady nemocí. Pestré etiopatogenetické/imunopatologické mechanismy vedou k rozvoji zánětu, vyúsťujícího v různou míru a vzájemné poměry destrukce a reparace, resp. remodelace.

V případě astmatu tyto změny postihují průdušky všeho kalibru, klinicky vedoucí k bronchiální obstrukci, spojenou s bronchiální hyperreaktivitou. Bronchiální obstrukce má složku konstriční, která dobře reaguje na bronchodilatační terapii, složku zánětlivou, reagující na protizánětlivou léčbu a složku remodelační, kterou z velké části nelze dostupnou farmakoterapií ovlivnit. S tíží astmatu stoupá podíl zánětlivé a remodelační složky, což se odráží v symptomatologii a léčbě onemocnění. (Milan Teřl et al., n.d.)

V případě intersticiálních plicních procesů jde o difuzní poškození plicní tkáně, kde prognóza a léčba onemocnění je závislá na tom, do jaké míry je zastoupena reverzibilní složka zánětu anebo ireverzibilní složka fibrózy, tedy remodelace plicní tkáně. (Intersticiální plicní procesy - Martina Vašáková, Jaroslav Polák, Radoslav Matěj - Maxdorf - Lékařské knihkupectví :... , n.d.)

#### 3.1 Chronické zánětlivé nemoci plic a průdušek se zaměřením na etiopatogenezi

Chronické zánětlivé nemoci plic a průdušek lze rozdělit na ty postihující především průdušky, tedy nemoci s bronchiální obstrukcí (kam řadíme především CHOPN a astma), a nemoci postihující plicní intersticiu, tedy intersticiální a fibrotizující plicní nemoci.

##### 3.1.1 Nemoci s bronchiální obstrukcí

###### ASTMA

Této kapitole je z pohledu patofyziologie, fenotypizace a cílené léčby věnována největší pozornost jako ústřednímu tématu naší studie.

Bronchiální astma je velice různorodé onemocnění charakterizované chronickým zánětem a remodelací průdušek, remodelace je pak spojena s jejich hyperreaktivitou a variabilní, často reverzibilní obstrukcí. Projevuje se opakovanými stavy hvízdavého dýchání, kašlem, dušností a svíráním na hrudi. (Milan Teřl et al., n.d.) (Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2018 update, n.d.)

###### Epidemiologie

Celosvětová prevalence astmatu se uvádí 1-18 %, tedy přibližně 300 miliónů lidí trpí astmatem, a především v ekonomicky vyspělých zemích, toto číslo neustále narůstá. Odhadovaná prevalence pro ČR je 8 % populace, u dětí je vyšší cca 10 %. Celková mortalita na astma je dána především chybějící či nedostačující preventivní protizánětlivou terapií. Celosvětová mortalita je odhadována na 250 000 osob ročně. V ČR je mnohem nižší, za posledních 8 let cca 100 osob. (Kolek et al., n.d.) (Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2018 update, n.d.)

###### Etiologie a patogeneze

Na vzniku astmatu se podílejí faktory dědičné, které jsou ovlivněny epigenetickými mechanismy a negativní vlivy vnějšího prostředí. Astma je onemocnění s polygenní multifaktoriální dědičností, to znamená, že geny se různým způsobem ovlivňují navzájem a také dochází k jejich interakcím s vlivy vnějšího prostředí. Byla identifikována celá řada genů, které kontrolují imunitní odpovědi a bronchiální hyperreaktivitu (ADAM33, GPRA,

ORMDL3). (Oxford Handbook of Respiratory Medicine PDF 2nd Edition Free Download, n.d.) Dle recentních studií je to také POSTN, spolu s CLCA1 a serpinB2, které patří mezi nejvíce exprimované geny v bronchiálním epitelu pacientů s astmatem. (Woodruff et al., 2007b)

Každý jedinec dostává část genetického materiálu (DNA) od matky, část od otce a tento genetický materiál je nakonec poskládán do výsledného genotypu. To, jak je genetická informace poskládána, a případné odchylky v uspořádání, pak výsledně ovlivní konkrétní vlastnosti různých bílkovin, které jsou na základě aktivace příslušných genů vytvářeny. Výsledná kvalita jednotlivých bílkovin majících v organismu různé funkce pak ovlivňuje konkrétní vlastnosti jedince, resp. jeho fenotyp. Současně však vzájemný vliv genetických faktorů a vnějšího prostředí může vést v různých situacích u téhož genetického základu ke zcela odlišným klinickým fenotypům. Jednotlivé geny se mohou aktivovat až během života.

Nejznámějším genetickým predisponujícím faktorem je atopie, tedy tvorba abnormálního množství IgE protilátek vůči obecně neškodným, indifferntním antigenům/alergenům vnějšího prostředí, prostřednictvím B lymfocytů. (Teřl and Rybníček, 2008) Atopie bývá přítomna u více než poloviny astmatiků. Na základě genetických a epidemiologických studií se uvádí riziko vzniku alergického onemocnění u dítěte s oběma rodiči alergiky 50-75 %. Riziko přenosu atopického onemocnění z postižené matky na dítě je přibližně 4krát vyšší než u otce. Fenotypizace nemoci, tj. co nejpřesnější rozřídění všech projevů nemoci do definovaných fenotypů, je klíčem úspěchu identifikace genotypu. (Teřl and Rybníček, 2008)

Podstatou astmatu je chronický zánět průduškové stěny a patofyziologickými koreláty astmatického zánětu jsou bronchiální hyperreaktivita, obstrukce dýchacích cest a příznaky nemoci. (Kolek et al., n.d.)

Zásadní jsou změny, které zužují průsvit průdušek – edém (později s remodelací stěny), spasmus hladké svaloviny a dyskrinie, tedy produkce nadměrného množství hlenu nebo nadměrně vazkého hlenu. Výsledkem těchto změn je pak bronchiální obstrukce. Zánět u astmatu mohou v prostředí různé genetické dispozice navozovat jak alergické (běžné aeroalergeny, profesní senzibilizace) i nealergické mechanismy (viry, emoce, smog, kouř) a výsledný typ zánětu je charakteristický konkrétními buňkami a mediátory, které jsou odlišné od jiných chronických plicních onemocnění (např. CHOPN, fibrózy). (Kolek et al., n.d.)

Klíčovou roli na vzniku astmatického zánětu hrají především epitelové a dendritické buňky, dále Th2 lymfocyty, eozinofily, žírné buňky a jejich mediátory. Neutrofilové a myofibroblasty hrají důležitou roli u těžkých forem astmatu (tato složka více inklinuje k ireverzibilní obstrukci). (Teřl astma, Pneumologie3, GINA, Oxford, Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2018 update, n.d.)

Z imunologického hlediska jsou dnes rozlišovány dvě základní cesty astmatického zánětu, z nichž druhá má dvě větve. Vedou tak ke 3 fenotypům nemoci, které dobře korelují s národní fenotypickou klasifikací (viz schéma 1).

**Type-2 low fenotyp** je méně častý a je charakterizován nízkým zastoupením eozinofilů. Etiopatogeneze není zcela jasná, ale zvažuje se, že se u části nemocných původně jednalo o eozinofilní fenotyp, který se vlivem času, komorbidit, kortikoterapie a kouření mohl změnit.

**Type-2 high fenotyp** je charakterizován vysokým zastoupením eozinofilů a mohou k němu vést 2 cesty: alergická a nealergická.

Alergická cesta je cestou specifické imunity, zprostředkovávají ji především Th2 lymfocyty. Po expozici alergenům dojde k jejich zpracování především dendritickými buňkami, ty následně prezentují fragmenty alergenů (antigeny) naivním Th lymfocytům. Po kontaktu se specifickým antigenem daného alergenu jsou tyto lymfocyty diferencovány a aktivovány, přestávají být naivní a produkují signální molekuly, tzv. cytokiny, které ovlivňují především leukocyty. Nejdůležitější cytokiny této cesty jsou: interleukin 4, 5, 9 a 13. viz schéma č. 1.

Většina cytokinů působí na několik druhů buněk (pleiotropně), často působí v kaskádě, anebo synergicky a jednotlivé cytokiny mohou být nahrazeny jinými. (Katial et al., 2017)

**Nealergická cesta** je cestou vrozené, nespecifické imunity. Označuje se také jako nemoc zprostředkována přirozenými lymfoidními buňkami (innate lymphoid cells, ILC) vrozené imunity. Hlavní roli zde nehrají antigen prezentující (APC) buňky, ale buňky epitelu dýchacích cest, které jsou aktivovány řadou nespecifických podnětů (polutanty, mikroby). Aktivované epitelové buňky produkují signální molekuly (alarminy), IL-33, IL-25 a TSLP (tymický stromální lymfopoetin), které pak dále aktivují lymfoidní buňky nespecifické, vrozené imunity ILC (ne tedy specifické T lymfocyty). Výsledkem je tvorba interleukinů s převahou tvorby IL-5 (vede dále k eozinofilii) a produkce IL-13, ale tvorba IL-4 (vede k tvorbě IgE), je malá. ILC buňky byly zjištěny ve větší míře v respirační sliznici astmatiků s nosními polypy. (Krčmová, Novosad, Sedlák - 2018 - Biomarkery a biologická léčba, n.d.) (Teřl, 2018)

### ***Klíčové buňky patofyziologie astmatu***

#### **Eozinofily**

Eozinofily řadíme mezi granulocyty a jsou důležitou součástí vrozeného imunitního systému. První publikace o jejich spojitosti s nosními polypy a alergickou rýmou jsou známy již přes 100 let. Objeveny byly Paulem Ehrlichem v r. 1879. (Amin et al., 2016)

Hlavním cytokinem regulujícím vyplavování eozinofilů i jejich funkci je IL-5. Přežití eozinofilů v tkáních je dále prodlužováno prostřednictvím GM-CSF a IL-3. Eozinofily obsahují specifické granulační proteiny (ECP-eosinofilní kationtový protein, hlavní bazický protein MBP, eosinofilní peroxidázu) a tvoří cytokiny (IL-4 a IL-13), které mají imunomodulační funkce v rámci Th-2 imunitní odpovědi. Obsahují také lipidové mediátory, kyslíkové radikály a řadu zánětlivých cytokinů. Mohou být uvolněny po stimulaci různými mechanismy. K poškození dochází jak přímo, tak nepřímo aktivací dalších buněk. (Kolek et al., n.d.)

Do nedávna byly považovány pouze za důležité obránce během parazitárních onemocnění a hlavní buňky účastníci se zánětlivých onemocnění souvisejících s alergií jako je astma. Eozinofily jsou přitahovány do místa zánětu, uvolňují cytotoxické proteiny ze svých granul, cytokiny a lipidové mediátory a přispívají k destrukci parazitů, ale také k exacerbací zánětu a poškození tkání. Nové studie však našly novou homeostatickou funkci eozinofilů. (Amin et al., 2016). Za klidových podmínek eozinofily velice rychle opustí krevní oběh a přestupují do tkání zejména do gastrointestinálního traktu, do plic, tukové tkáně, mateřského mléka, dělohy a mléčných žláz, kde mají řadu důležitých biologických funkcí, jako je imunoregulace, kontrola glukózové homeostázy, ochranu proti obezitě, regulace vývoje mléčné žlázy a příprava dělohy pro těhotenství. (Marichal et al., 2017)

#### **Eozinofily a astma**

Vlastní role eozinofilů v patofyziologii astmatu není zcela ujasněna. Tradiční domněnka, že způsobují hyperreaktivitu dýchacích cest, není potvrzována novými studiemi efektu anti-IL-5 terapie, která redukuje počet eozinofilů ve sputu a krvi, avšak bronchiální hyperreaktivita není redukována. (Flood-Page et al., 2007) (Leckie et al., 2000) Dále bylo zjištěno, že pacienti s eosinofilní bronchitidou, u nichž je přítomen výrazný eosinofilní zánět a subepiteliální fibróza, nevykazují žádnou hyperreaktivitu, která je typická pro astma. Předpokládána je role eozinofilů při exacerbacích zánětu a na vzniku fibrózy. Přítomnost eozinofilů je rovněž dobrým markerem dobré odpovědi na kortikosteroidy. (Barnes, 2008)

**Mastocyty** (žírné buňky) jsou tkáňové buňky lokalizované v těsné blízkosti sliznice dýchacích cest. Mají zásadní roli v patofyziologii astmatu, uvolňují brochokostrikční substance jako histamin, který je skladován v granulích a lipidové mediátory: leukotrieny C4, D4, E4 a prostaglandin D2, které vznikají metabolizací kyseliny arachidonové po aktivaci mastocytů. Tyto mediátory jsou odpovědné za projevy rychlé variabilní obstrukce i pomalejších zánětlivých procesů u astmatiků. K aktivaci mastocytů dochází jednak po

specifické antigenní stimulaci (přemostění IgE), jednak po nespecifické stimulaci různými triggerly (některé léky, viry, zvýšenou osmolaritou plasmy při zvýšené ventilaci po cvičení aj). Na povrch dýchacích cest jsou slizniční mastocyty rekrutovány díky SCF (kmenové buňky stimulující faktor neboli KIT ligandem) uvolňovanému z epitelových buněk. Žírné buňky uvolňují také řadu cytokinů, které se účastní vzniku alergického zánětu (IL-4, IL-5, IL-13). Aktivované mastocyty v buňkách hladké svaloviny dýchacích cest způsobují její hyperreaktivitu. (Barnes, 2008) (Barnes, 2004)

**Bazofily** (bazofilní granulocyty) jsou cirkulující buňky s řadou funkčních vlastností mastocytů, jejich role v patofyziologii zánětu není zcela ujasněna. Jsou schopny regulovat některé funkce eozinofilů. Do zánětlivého ložiska migrují až v pozdějších fázích alergické reakce. (Kolek et al., n.d.)

**Dendritické buňky** hrají poměrně zásadní roli v patofyziologii astmatu jako tzv. APC – antigen prezentující buňky a regulátory Th2 buněk, především v rámci specifické imunity. Zpracovávají fragmenty bílkovin z inhalovaných alergenů a následně je předkládají Th2 buňkám. Účastní se také chronické zánětlivé odpovědi v plicích a jsou určitým spojovacím můstkem mezi expozicí alergenům a rozvojem alergického zánětu. TSLP (cytokinový thymický stromální lymfopoetin), který je ve velkém množství vylučován epiteliálními buňkami a žírnými buňkami astmatických pacientů, má zřejmě důležitou úlohu při zrání myeloidních dendritických buněk a náboru Th2 buněk do dýchacích cest. Kouření vede k nárůstu počtu dendritických buněk v dýchacích cestách a alveolech, ale role dendritických buněk u CHOPN zůstává nejasná, nejspíše nemají žádnou klíčovou roli. (Barnes, 2008)

**Buňky epitelu DC.** V rámci nespecifické imunity fungují jako APC buňky a produkují cytokiny (tzv. alarminy), viz schéma č. 1.

### ***Nejdůležitější cytokiny Type-2 high fenotypové cesty***

Cytokiny jsou prostředníky, signálními molekulami imunitního systému, někdy také označovány jako „tkáňové hormony“. Jsou produkovány různými typy imunitních buněk a působí prostřednictvím receptorů na další buňky imunitního systému i mimo něj. Jejich nomenklatura není z historických důvodů jednotná. Ve snaze o systematickost se většina z nich označuje jako interleukiny, kterým je přiřazeno číslo, ale není tomu tak u všech cytokinů (vedle interleukinů chemokiny, interferony a transformující růstové faktory atp.). (Základy imunologie - 6., Triton, n.d.)

**Interleukin 4 a IL 13** jsou hlavními „switch cytokiny“ zajišťující přesmyk B-lymfocytů k tvorbě imunoglobulinů E (IgE), viz schéma č.1. Receptory IL-4 a IL-13 mají společnou  $\alpha$  podjednotku, proto se v řadě funkcí překrývají.

**IL-4** je produkován především Th2 lymfocyty, je rovněž růstovým faktorem pro žírné buňky, inhibuje sekreci prozánětlivých cytokinů (TNF a IL1 $\beta$ ) produkováných makrofágy. IL-4 vede k exprimaci adhezivní molekuly VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) a tím podporuje migraci eozinofilů přes endotel cév do místa zánětu, podporuje rovněž sekreci hlenu. (Breviř 2017 – 2019 - Medical Tribune - Lékařské knihkupectví ::::, 2017)

**IL-13** je produkován lymfocyty účastnícími se Th2-high imunitní odpovědi, jak v rámci získané specifické imunity (Th<sub>2</sub>), tak v rámci přirozené nespecifické imunity, viz dále. IL-13 hraje důležitou roli při vzniku eozinofilního zánětu v dýchacích cestách. Aktivuje NO syntetázu, což vede ke zvýšení frakce vydechovaného oxidu dusnatého (FENO). Epitelové buňky dýchacích cest po stimulaci IL-13 začnou produkovat periostin, který ovlivňuje funkci epitelových buněk i fibroblastů, což vede k přestavbě dýchacích cest. Produkce IL-13 je inhibována kortikosteroidy. Vzhledem k tomu, že je velmi těžké měřit přímo hladinu IL-13, ukazuje se, že sérový periostin by mohl být potencionálním biomarkerem pro predikci odpovědi na léčbu protilátkou IL-13 (lebrikizumab). Viz kap. 3 a vlastní práce kap. 4.

**IL-5** je produkován jak Th2 lymfocyty, tak naivními lymfocyty typu 2 (ILC2), a proto je součástí alergické (specifické) i nealergické (nespecifické) cesty k eozinofilnímu zánětu. IL-5 je klíčovým cytokinem, který odpovídá za diferenciaci, zrání, migraci a aktivaci eozinofilů. Účinky IL-5 jsou spouštěny vazbou na jeho receptor, exprimovaný na povrchu eozinofilů, v menší míře i bazofilů. Receptor pro IL-5 je heterodimer skládající se ze dvou polypeptidových řetězců alfa a beta, podjednotka  $\alpha$  je specifická pro IL-5,  $\beta$  podjednotka je nespecifická a je součástí i jiných receptorů. (Stephenson, 2017) (Teřl, 2018)

**IL-9** přitahuje žírné buňky a řídí jejich diferenciaci.

**CCL1** (CC chemokine ligand 1 neboli eotaxin-1) eosinofilní chemotaktický faktor, produkováný epitelovými buňkami, patří mezi nejdůležitější chemotaktické faktory astmatického zánětu.

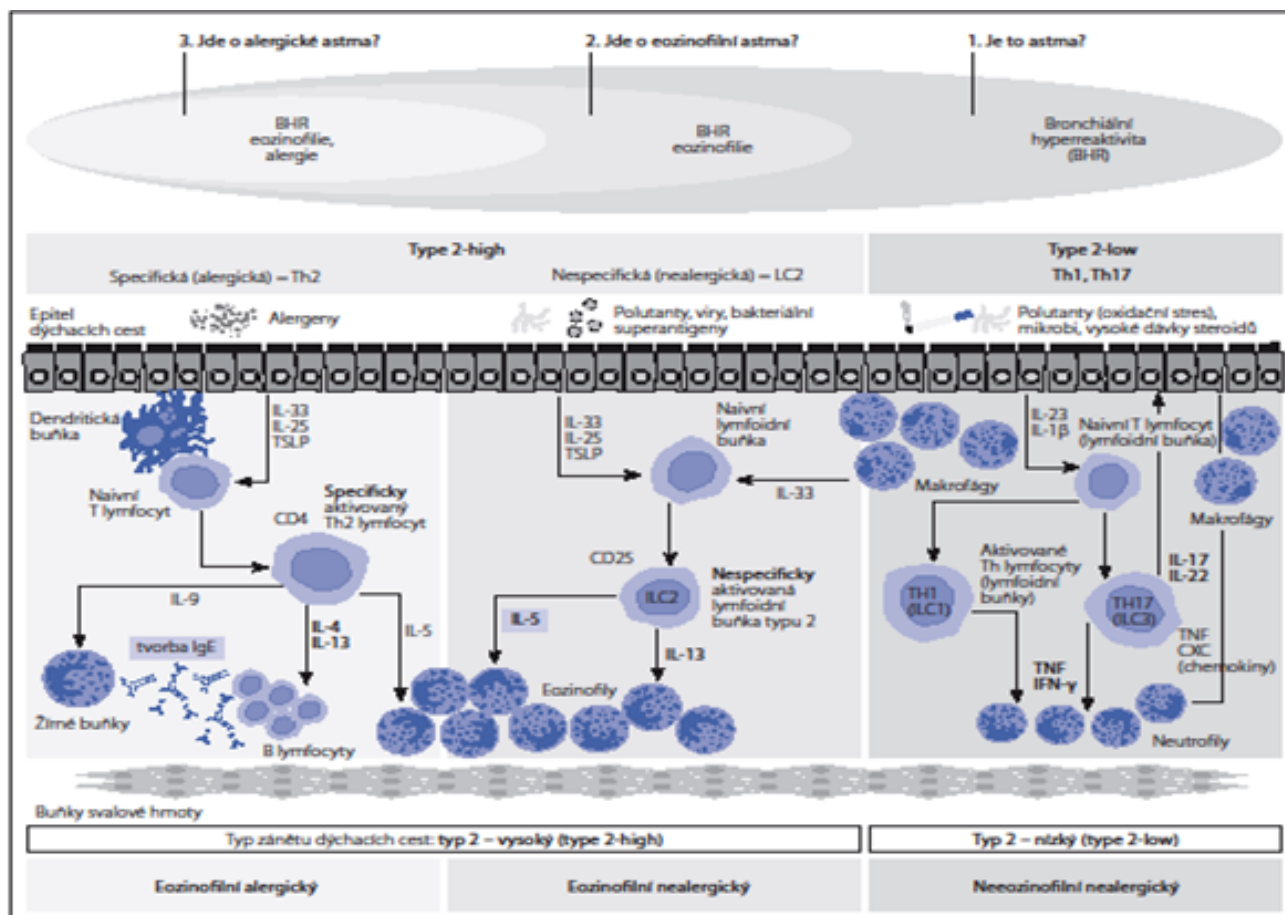
### **Traskripční faktor GATA**

(GATA-vazebný protein 3) je rozhodující pro diferenciaci naivních T buněk směrem k Th2 lymfocytům a reguluje také sekreci cytokinů TH2 typu. Po současné ligaci T-buněčného receptoru (TCR) a koreceptoru CD28 antigen-prezentujícími buňkami je T-buněčný GATA3 fosforylován a aktivován mitogenem aktivovanou proteinkinázou (MAPK) p38. Aktivovaná GATA3 se pak přesune z cytoplazmy do jádra, kde aktivuje genovou transkripci. Exprese GATA3 v T buňkách je regulována transkripčním faktorem STAT6 (signální transduktor a aktivátor transkripce 6), který je naopak regulován aktivací receptoru pro IL-4. (Barnes, 2008)

Pokud jde o účinnost léčby, významným rysem těžkého astmatu je necitlivost vůči kortikosteroidům. Podle studií zaměřených na alveolární makrofágy může být aktivace p38 MAPK důležitým indikátorem rezistence vůči kortikosteroidům a zároveň důležitou drahou tvořící součást patofyziologického mechanismu. (Chung - 2012 - Zánětlivé biomarkery u těžkého astmatu, n.d.) Transkriptomové studie, v nichž byly porovnávány mononukleární buňky periferní krve získané od pacientů s astmatem citlivým na glukokortikoidy a od pacientů s astmatem rezistentním vůči glukokortikoidům, prokázaly odlišné vzorce exprese 11 genů včetně genů pro MAPK, podjednotku nukleárního faktoru  $\kappa$ B vázající DNA, receptoru pro IL4 a STAT4, na jejichž základě bylo možno s 84% přesností předpovědět odpověď na kortikosteroidey u osob trpících astmatem. (Hakonarson et al., 2005) (Chung, 2011)

Schématické shrnutí patofyziologie astmatu na imunologické molekulárně-celulární bázi viz Schéma č. 1

**Schéma č. 1** Základní mechanismy astmatického zánětu (dle Teřla, *Biologická léčba Breviř* 2017-19)



## Klasifikace astmatu

Klasifikujeme-li astma, pak především určujeme tzv. stupeň kontroly. Nelze však pouze hodnotit, zda je astma pod dobrou, částečnou nebo nedostatečnou kontrolou. Je nutné zároveň posoudit i tíži nemoci, která je odvozena od stupně užití farmakoterapie. Získáme tak celkový pohled na závažnost nemoci. Stupeň kontroly i tíže nemoci se může v čase vlivem různých okolností měnit a je potřeba určit i základní fenotypizaci (Růžičková Kirchnerová and Teřl, 2013). Komplexní pohled viz multifunkční kombinovaná fenotypická klasifikace podle Kašáka a Teřla 2009 (Milan Teřl et al., n.d.), tabulka a podrobnější popis viz *kap. 3 Biomarkery*.

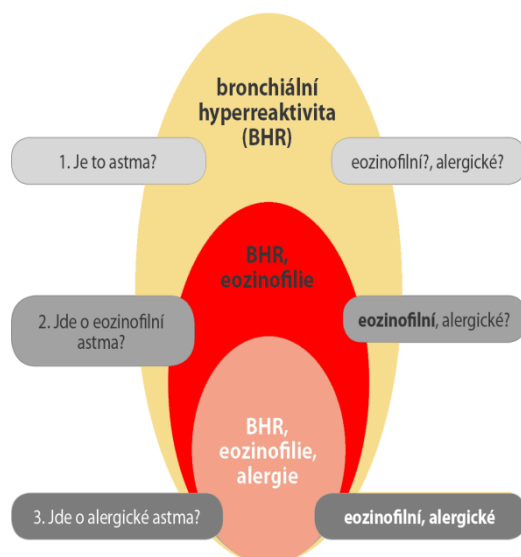
## Fenotyp

Fenotyp je soubor všech pozorovatelných vlastností a znaků živého organismu. Je výsledkem společného působení genotypu (různé míry exprese genetických dispozic) a působení vlivů vnějšího prostředí. Příkladem jsou jednovaječná dvojčata, kdy stejné genetické dispozice pod vlivem odlišných vlivů prostředí mohou vést ke vzniku rozdílných fenotypů. Astma je komplexní a heterogenní nemocí, neboť pacienti mohou mít různé klinické symptomy, různé patofyziologické mechanismy a morfologické nálezy dýchacích cest a tím i různou odpověď na léčbu. A proto je fenotypizace a endotypizace astmatu důležitou součástí diagnostiky, která velmi pomáhá v individualizaci léčby a dosáhneme tak často lepší léčebné odpovědi. (*podrobněji viz úvod a kapitola 3 a 4, vlastní řešení studie*) (Sedlák, V Koblížek, 2009)

## Diagnostika astmatu

Zahrnuje tři logicky svázané kroky, viz - **Schéma č. 2.** Schéma tříkrokové diagnostiky astmatu (Terl et al., 2017)

Krok 1. vede k diagnóze. Jde o vlastní průkaz nemoci, tedy vyšetření přítomnosti variabilní



a reverzibilní bronchiální obstrukce, resp. bronchiální hyperreaktivitu, zatímco kroky 2 a 3 tj. určení přítomnosti klinicky významné eozinofilie a alergie směřují přímo k určení fenotypu a endotypu.

### Anamnéza a fyzikální vyšetření

Anamnéza a fyzikální vyšetření mají stále zásadní význam. Cílená anamnéza dokáže významně navést nejen k diagnóze nemoci (krok 1), ale i určení fenotypu (krok 2 a 3). Pro bližší specifikaci nemoci si všímáme denní variability (BHR), znaků atopie, alergie, intolerance léků (NSAID). Přítomnost atopického ekzému, potravinové alergie, rinokonjunktivitida, přítomnost chronické rinosinusitidy a nosní polypózy (viz vlastní řešení studie). Fyzikální vyšetření s typickým nálezem pískotů a vrzotů, které však nemusí být přítomno vždy. Důležitý je poslech pacienta při klidném dýchání a usilovném výdechu, známky hyperinflace (oslabené dýchání, menší dechové exkurze, pocit nedostatečného nádechu pacienta. (Kolek et al., n.d.)

### Funkční vyšetření plic

Základem diagnostiky astmatu je průkaz přítomnosti obstrukční ventilační poruchy, její tíže, reverzibility a variability. Provádíme spirometrické vyšetření metodou křivky průtok/objem s bronchodilatačním testem. Základními sledovanými parametry jsou FEV1 (usilovně vydechnutý objem za 1 vteřinu) a poměr FEV1/VC max (vyšší z obou způsobů měření VC (tj. FVC usilovná vitální kapacita a SVC klidová vitální kapacita), tzv. Tiffeneauův index. Bronchodilatační test (nejčastěji se salbutamolem) při podezření na astma provádíme vždy, i tam, kde jsou vstupní spirometrické hodnoty normální. Pro potvrzení diagnózy astmatu je všeobecně přijímáno kritérium zlepšení FEV1 o 12 % a více a současně nejméně o 200ml, vztaženo k výchozí, tj. prebronchodilatační hodnotě. Trvá-li podezření na astma a bronchodilatační test je negativní, je doporučeno provedení bronchokonstrikčního testu. Test je prováděn nejčastěji s metacholinem (přímá stimulace), který je vysoce senzitivní a ev. lze provést pozátěžový test (nepřímá stimulace) a další testy. (Kolek et al., n.d.) (Milan Teř et al., n.d.)

### Měření koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého (FENO)

Jedná se o neinvazivní metodu měření eosinofilního zánětu průdušek. Objemová frakce NO ve vydechovaném vzduchu závisí na výdechové rychlosti, nejčastěji se provádí technikou jednoho výdechu při kontrolované rychlosti 50 ml/s. Udává se v jednotkách ppb (parts per

billion). Výhodou je okamžitý výsledek a možnost měření již od 4-5 let věku. (Milan Teřl et al., n.d.) Hodnota FENO souvisí s probíhající eosinofilní aktivací pod vlivem IL-4 a IL-13, který zvyšuje indukci epitelální nitric oxid syntetázy (eNOS), se zvýšenou produkcí NO. (Krčmová, Novosad, Sedlák - 2018 - Biomarkery a biologická léčba, n.d.) FENO je doprovodný ukazatel eosinofilního zánětu, signalizuje alergenem spouštěné Th2-řízené protizánětlivé mechanismy v bronchiální sliznici, je vhodným ukazatelem steroidní odpovědi a má především negativní prediktivní hodnotu. (doc. MUDr. Petr Čáp, 2018) Negativní výsledek bronchokonstrikčního testu a současně hodnota FENO téměř vylučuje astma. U osob starších 12 let je rozmezí hodnot FENO 5-25 ppb fyziologické, 25-35 je tzv. šedá zóna, 35-50 ppb svědčí pro eosinofilní zánět v průduškách, který odpovídá >3 % eosinofilů v indukovaném sputu. FENO je zkresleno kouřením, které snižuje jeho hodnotu o několik desítek. (Milan Teřl et al., n.d.) *Podrobněji viz kapitola 3.*

Vyšetření nasální NO je součástí diagnostiky primární ciliární dyskineze u pacientů s PCD (primární ciliární dyskinezou) jsou hodnoty nízké. (Lucas et al., 2017)

**Průkaz alergie a eosinofilního zánětu dýchacích cest – podrobněji viz kapitola 3.2. Biomarkery.**

### **Průkaz alergie**

Alergologické vyšetření je doporučováno provést u každého astmatika vždy při prvním stanovení diagnózy a v případě, že nad astmatem z nejasných příčin ztrácíme kontrolu. Důležitý je průkaz alergie i její klinické významnosti viz český doporučený postup diagnostiky a léčby bronchiálního astmatu. (Milan Teřl et al., n.d.) Běžně se stanovuje hladina celkového IgE (norma do 100 IU/l), její informační hodnota je omezená, neboť normální hladina ještě nevylučuje přítomnost klinicky významné alergie, a naopak vysoké hodnoty ještě nemusí znamenat přítomnost alergie. Potíže nám mohou někdy nastat při posuzování pacientů s těžkým refrakterním astmatem před zahájením specifické biologické terapie. Specifické alergeny můžeme vyšetřovat pomocí kožních testů nebo vyšetřením specifických protilátek. Průkaz alergie na plísň, především rodu *Alternaria* a *Aspergillus*, poukazuje na riziko rozvoje těžké formy nemoci jako je alergická bronchopulmonální aspergilóza. (Teřl et al., 2017) (Teřl, 2009) (Panzner et al., 2015) *Viz vlastní práce kap. 4.*

### **Průkaz eosinofilního zánětu dýchacích cest.**

Zjištění a průkaz eosinofilního zánětu dýchacích cest je v rámci diagnostiky astmatu zcela zásadní. Pomáhá nám při stanovení diagnózy a dále při určování vlastního fenotypu. Zánětlivé buňky, mediátory zánětu a známky projevů zánětu lze stanovit v séru, indukovaném sputu, ve vydechovaném vzduchu či jeho kondenzátu, v bronchoalveolární tekutině a v biotických vzorcích získaných z transbronchiálních biopsií, plicních resekcí či nosních biopsií.

U lehčích forem zánětu nemusí být systémové známky zánětu přítomny. Přítomnost eosinofilního typu zánětu predikuje dobrou odpověď na kortikosteroidy. V běžné praxi využíváme vyšetření eozinofilů v diferenciálním rozpočtu krevního obrazu (pozitivní hodnota je  $\geq 4$  % ( $400/\text{mm}^3$ ), pozitivní hodnoty mohou být však způsobeny parazitární infekcí či atopickým ekzémem. (Little et al., 2000) (Kolek et al., n.d.)

Dále je možno vyšetřit tzv. eozinofilní kationický protein (ECP). Tato bílkovina je obsažena v sekundárních granulích eozinofilů a uvolňuje se při jejich aktivaci a je tedy markerem eosinofilního zánětu. (Teřl, 2009) *Podrobněji viz kap. 3 biomarkery.*

V současné době je nejčastěji používáno stanovení koncentrace oxidu dusnatého ve vydechovaném vzduchu – FENO. Jak již bylo řečeno, jde o neinvazivní, cílené měření eosinofilního zánětu v dýchacích cestách. U astmatiků koreluje s aktivitou eosinofilního zánětu, toto neplatí u kuřáků (FENO sníženo) a může být pozitivní i u alergické rýmy bez astmatu a eosinofilní bronchitidy. Objemová frakce vydechovaného NO závisí na výdechové

rychlosti. K detekci eosinofilního zánětu v distálních oblastech plic (SAD – small airway disease) je doporučeno vyšetření FENO při vyšších výdechových rychlostech. (Szeffler et al., 2012a) (Berry et al., 2005) *další podrobnosti viz.kap.3*

Vyšetření indukovaného sputa pomáhá stanovit buněčný fenotyp astmatu. Je to vyšetření relativně náročné na čas, nemělo by být prováděno u pacientů s FEV<sub>1</sub> nižší než 1000 ml. Podle počtu jednotlivých buněk rozlišujeme eosinofilní fenotyp > 3% eozinofilů, neutrofilní fenotyp > 61% neutrofilů, paucigranulocytární fenotyp má současně < 3% eozinofilů a < 61% neutrofilů a smíšený fenotyp má > 61% a současně > 3% eozinofilů. (Weiszhar and Horvath, 2013) Přítomnost eozinofilů ve sputu společně s vyšší hodnotou FENO predikuje lepší odpověď na systémové kortikoidy a celkový počet eozinofilů v IS klesá 2 až 7krát po léčbě kortikosteroidy. Počet neutrofilů narůstá s věkem, vlivem kouření a znečištěného ovzduší. (Smith et al., 2005) *Podrobněji viz kapitola 3 a vlastní řešení studie.*

Bronchoskopické vyšetření s bronchoalveolární laváží (BAL) s možností odběru biopsie bronchiální sliznice a transbronchiální biopsie. Tyto metody využíváme spíše v rámci vyšetření pacientů s těžkým refrakterním astmatem, odběr TBB je rovněž součástí ošetření průdušek bronchiální termoplastikou. (Balzar et al., 2002) (Thomson et al., 2012) V našem souboru pacientů jsme rovněž srovnávali korelaci vyšetření nosní biopsie na přítomnost eozinofilů s ostatními metodami včetně metod bronchoskopických. (Ruzickova-Kirchnerova O et al., n.d.)

Vyšetření kondenzátu vydechaného vzduchu je zatím experimentální metoda.

Jde o zcela neinvazivní metodu, která umožňuje měřit široké spektrum látek vznikajících při oxidativním stresu a zánětu dýchacích cest. Předpokládá se, že KVV je složen z kondenzované vodní páry, ve které jsou rozpuštěny látky obsažené v tekutině na povrchu epitelu dýchacích cest. (Sedlák,V Koblížek, 2009) *Podrobněji viz kapitola 3.*

**Průkaz komplikujících nemocí,** které v různé míře ovlivňují průběh a tíži astmatu, je důležitou součástí vyšetřovacího algoritmu a léčby. Mezi nejčastější komplikující faktory patří rinosinusitida, obezita, gastroezofageální reflux, obstrukční spánková apnoe, dysfunkce hlasových vazů, CHOPN a nikotinismus, kolonizace dýchacích cest plísněmi, intolerance kyseliny acetylsalicylové. (Růžicková Kirchnerová and Teřl, 2013)

## **Léčba**

Astma patří povětšinou mezi dobře léčitelná onemocnění. Jen malé procento astmatiků trpí problematickým těžkým astmatem. Cílem léčby je odstranit symptomy, minimalizovat zánět, bronchiální hyperreaktivitu a zabránit vzniku exacerbací a ireverzibilních změn s minimem farmakoterapie, která ještě pacientovi přináší prospěch. (Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2018 update), n.d.)

### **Nefarmakologické postupy**

- **Režimová opatření** se zamezením expozice spouštěčům astmatu, vyhýbat se tabákovému kouři, některým lékům (NSAID), aj.
- **Bronchiální termoplastika**

Metoda, kdy do průdušek během tří bronchoskopických sezení v intervalu 3 týdnů jsou pomocí tenké sondy aplikovány pulzy radiofrekvenční energie, které postupně zahřejí všechny průdušky až do kalibru 3 mm na teplotu kolem 60°C. V důsledku toho dochází k selektivní a dlouhotrvající redukci hladké svaloviny bronchů. (dále vlastní řešení studie) (Ruzickova-Kirchnerova et al., 2014) (Thomson et al., 2012)

### **Farmakologická léčba**

V dnešní době máme k dispozici bohatou škálu inhalačních léků určených k terapii astmatu, a je vhodné při výběru léku pro konkrétního pacienta zohlednit jeho možnosti, schopnosti a preference.

Antiastmatika dělíme na kontrolující a úlevová a zvláštní postavení má biologická léčba.

- Mezi **úlevová antiastmatika** řadíme  $\beta_2$ -agonisty ( $\beta_2$ -mimetika) s rychlým nástupem účinku a  $\beta_2$ -agonisty s krátkodobým účinkem (SABA) – fenoterol, salbutamol, terbutalin. Dále inhalační krátkodobě působící anticholinergika – SAMA (ipratropium) a jejich kombinace (SABA/SAMA – fenoterol/ipratropium). Rovněž sem řadíme teofyliny s krátkodobým účinkem a systémové kortikosteroidy.
- **Kontrolující antiastmatika**

Základem léčby astmatu jsou **inhalační kortikosteroidy**. U většiny astmatiků tato léčba postačuje a jejich včasné nasazení zabraňuje rozvoji remodelačních změn. Pokud ke kontrole astmatu nestačí nízké a středně vysoké dávky IKS, pak je preferována fixní kombinovaná terapie, dlouhodobé podávání středních dávek je spojeno s možným, vysokých dávek velmi pravděpodobným výskytem nejen lokálních, ale i systémových nežádoucích účinků. LABA má synergický efekt s IKS. K IKS můžeme přidat LABA ( $\beta_2$  agonistu s dlouhodobým účinkem) nebo U-LABA (s ultradlouhým účinkem). LABA mají v kombinaci steroid-šetřící efekt, ideální je aplikace v jednom inhalátoru. V dnešní době máme k dispozici velkou škálu IKS s různou biologickou dostupností a celou škálu kombinovaných preparátů v různých lékových formách. Schéma stupňovité léčby viz Tab. č. 1. Pouze maximálně 5 % astmatiků má své onemocnění tak těžké, že k jeho kontrole je zapotřebí podávání systémové kortikoterapie a někdy ani ta ke kontrole nemoci nestačí (TRA, na terapii rezistentní astma). (Milan Teřl et al., n.d.)

Nežádoucí účinky kortikosteroidů jsou uváděny především ve spojitosti se systémovými léky u těžkých astmatiků. Nicméně i inhalační preparáty mohou být při narůstající dávce potencionálně škodlivé. U nízkého dávkování se systémových účinků nemusíme obávat, jsou minimální, narůstá převážně léčebný účinek (roste terapeutický index), ale v pásmu středního a vysokého dávkování tento terapeutický index klesá, a tím roste i riziko systémových účinků. Záleží nejen na konkrétní dávce, ale i lékové formě a inhalátoru. Důležité jsou farmakokinetika, dynamika, biologická dostupnost léku, koncentrace v tkáních a působení na receptory. Část inhalovaného léku (10-40 %) proniká do periferie DC a plicního parenchymu, část se vstřebává do kapilární krve plic a následně proniká do systémové cirkulace ve vazbě na krevní bílkoviny a část končí ve sliznici orofaryngu, žaludku a posléze je vstřebána a metabolicky eliminována (redukována a konjugována) již při prvním průchodu jícnu a vyloučena močí. Nejlepší z pohledu farmakokinetiky se jeví ciklesonid, následně budesonid, beclometason dipropionát a nejméně příznivý pak flutikason propionate. (MUDr. Jiří Novák, 2011)

Mezi nejčastější lokální nežádoucí účinky patří dysfonie, orofaryngeální kandidóza, kašel a dráždění jazyka, hrdla a hltanu, vzácněji reakce opožděné kožní přecitlivělosti obličeje, rtů a očí. (Tashkin et al., 2004) K systémovým účinkům může také docházet ve stejné škále jakou u perorálních kortikoidů, jejich projevy jsou však slabší. Vznikají působením IKS na kostní dřen a na tkáň bronchů po přívodu IKS krevní cestou. Nejčastěji se uvádějí mírná redukce růstu (dětí), osteoporóza u dospělých, riziko pneumonií (studie TORCH) (Crim et al., 2009) (Singanayagam et al., 2010), raritně pak steroidní myopatie, glaukom, katarakta, snížení nadledvinové tvorby glukokortikoidů a psychické projevy jako jsou změny nálad, poruchy paměti aj. (Barnes, 2012) (Barnes, 2006) (MUDr. Jiří Novák, 2011)

**Antileukotrieny.** Do této skupiny patří antagonisté receptoru pro cysteinové leukotrieny (CysLT1-montelukast, pranlukast, zafirlukast), které blokují tento receptor (CYSLT1)

hladkých svalů dýchacích cest a ostatních buněk, a tím inhibují účinky cysteinových leukotrienů uvolňovaných z mastocytů a eozinofilů. Výsledkem je malý bronchodilatační účinek, redukce bronchokonstrikce indukované alergenem, námahou, oxidem siřičitým. Mají i určitý protizánětlivý efekt. (Marek, Josef, 2010) Ovlivňují zánětlivé procesy a jsou nejvíce doporučovány u aspirin-senzitivního astmatu (Gohil et al., 2010) ev. sdruženého s nosní polypózou, u výrazné ponámahové bronchokonstrikce (EIA – exercise induced asthma), u pacientů s rýmou a atopickým ekzémem. Přidání antileukotrienů k terapii perzistujícího astmatu snižuje počet exacerbací. (Ducharme et al., n.d.) Patří k nim i skupina inhibitorů 5-lipoxygenázy (zileuton), které blokují syntézu všech leukotrienů.

**Inhalační anticholinergika** s dlouhodobým a ultradlouhým účinkem (LAMA, U-LAMA). Tyto léky byly primárně určeny pro CHOPN (thiotropium, glykopyrronium bromid, aclidinium bromid). Používají se u pacientů s překryvem s CHOPN. V září r. 2014 byl v ČR tiotropium bromid (ve formě jemné mlžiny) zaregistrován a doporučen i u pacientů s těžkým astmatem bez překryvu s CHOPN, jako přídatná bronchodilatační terapie. Byl prokázán jeho příznivý efekt na bronchiální hyperreaktivitu, zlepšení plicních funkcí, snížení exacerbací a zlepšení kvality života. (Gosens et al., 2005) (Rodrigo, 2018) (GINA 2014)

U pacientů s ponámahovou bronchokonstrikcí a dráždivým kašlem lze zvážit přidání **kromonů** (kromoglykát sodný a nedokromil sodný, inhalační podání). Dokáží inhibovat na dávce závislým způsobem uvolnění mediátorů zprostředkované IgE z lidských mastocytů a mají buněčně selektivní a mediátorové supresivní účinky na ostatní buňky zánětu (makrofágy, eosinofily, monocyty), inhibují chloridové kanály cílových buněk. Kromony jsou schopny inhibovat časnou a pozdní fázi alergenem indukované bronchokonstrikce a akutní bronchokonstrikci po expozici fyzické námaze, chladnému a suchému vzduchu a oxidu siřičitému. Kromoglykát sodný snižuje četnost příznaků a frekvenci exacerbací, ale studie neprokázaly pravidelný příznivý účinek na nespecifickou bronchiální hyperreaktivitu. (Marek, Josef, 2010) V ČR není v současné době dostupný.

**Teofyliny** v nižších dávkách mají protizánětlivý efekt (ve vyšších dávkách bronchodilatační efekt), díky nespecifické inhibici PDE (fosfodiesterázy). Doporučují se jako přídatná terapie, zvláště u kuřáků, kde mohou zmírnit kouření navozenou kortikorezistenci. Ve vyšších dávkách jsou pro astmatiky rizikové pro jejich vliv na zhoršování GERD díky relaxaci dolního jícnového svěrače. (Rodrigo, 2018) (Blasi, n.d.) (Marek, Josef, 2010)

Nejproblematictější skupinu protizánětlivých léků představují **systémové kortikosteroidy**. Podávají se nejčastěji u pacientů s akutní exacerbací, když odpověď na RABA není dostačující. Parenterální podání vede ke zlepšení nemocných, efekt nastupuje většinou do hodiny. Doporučené dávkování a délka léčby se odvíjí dle tíže exacerbace. Za problematické je považováno dlouhodobé podávání systémových kortikosteroidů pro jejich celou škálu nežádoucích účinků. Problematická je také kortikorezistence primární (naštěstí vzácná) a sekundární (např. při podávání IKS, při nadměrném užívání  $\beta_2$  mimetik, nebo krátkodobě při zmnožení neutrofilů při exacerbaci astmatu u virových infekcí, předmenstruačního astmatu). Mezi nežádoucí účinky systémových kortikoidů patří osteoporóza, diabetes, glaukom, katarakta, obezita, poruchy kůže a její větší fragilita, strie, svalová slabost, poruchy imunity, potlačení osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny. Z perorálních preparátů jsou preferovány léky s minimem mineralokortikoidních účinků, krátkým poločasem a menšími účinky na příčně pruhovanou svalovinu (prednison, prednisolon, metylprednison). (Marek, Josef, 2010)

Existuje skupina cca 5 % astmatiků s těžkým refrakterním astmatem, kde dosažení kontroly nad astmatem vyžaduje častější či dlouhodobější podávání systémových kortikosteroidů. S postupem nové biologické terapie se tyto počty pacientů naštěstí snižují. Všichni tito pacienti by měli být přešetřeni v centrech pro těžké astma. *Dále viz vlastní řešení studie.* (Ruzickova-Kirchnerova O et al., n.d.) (Milan Teřl et al., n.d.) (GINA 2016).

**Tab. č. 1** Stupňovitá léčba astmatu dle (Milan Teřl et al., n.d.)

| Doporučené schéma stupňovitého vedení léčby astmatu na základě kontroly<br>(modifikováno podle GINA 2014)                                                                                         |                                          |                                                                      |                                                                   |                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Dle stupně kontroly                                                                                                                                                                               |                                          |                                                                      |                                                                   |                                                    |
| Redukce léčby<br>= krok směrem dolů                                                                                                                                                               |                                          |                                                                      | Zesílení léčby<br>= krok směrem nahoru                            |                                                    |
| Stupeň 1<br>intermitentní<br>astma                                                                                                                                                                | Stupeň 2<br>lehké astma                  | Stupeň 3<br>středně těžké<br>astma                                   | Stupeň 4<br>těžké astma                                           | Stupeň 5<br>těžké refrakterní<br>astma             |
| <b>Inhalační úlevová antiastmatika</b><br><i>vždy jen podle potřeby</i><br>1. volba: RABA<br><i>Alternativy: SAMA, kombinace RABA/SAMA, ev. od stupně 3 nízká dávka IKS (BUD, BDP)/formoterol</i> |                                          |                                                                      |                                                                   |                                                    |
| <b>Kontrolující antiastmatika</b>                                                                                                                                                                 |                                          |                                                                      |                                                                   |                                                    |
| <b>bez nutnosti<br/>kontrolujícího<br/>antiastmatika</b><br><br>(ev. nízká dávka<br>IKS)                                                                                                          | <i>vyber jedno</i>                       | <i>vyber jednu<br/>variantu</i>                                      | <i>léčba na stupni 3<br/>+ vyber jedno<br/>nebo více</i>          | <i>léčba na stupni 4<br/>+ další modality</i>      |
|                                                                                                                                                                                                   | IKS – nízká<br>dávka                     | IKS – nízká<br>dávka plus<br>(U)-LABA**                              | IKS – střední až<br>vysoká dávka<br>plus (U)-LABA                 | perorální<br>kortikosteroid<br>(nejnižší dávka)    |
|                                                                                                                                                                                                   | antileukotrien                           | IKS – střední až<br>vysoká dávka                                     | IKS – střední až<br>vysoká dávka<br>plus (U)-LABA<br>plus U-LAMA* | anti-IgE<br>(v případě<br>alergického<br>fenotypu) |
|                                                                                                                                                                                                   | (kromon)                                 | IKS – nízká<br>dávka plus<br>antileukotrien                          | antileukotrien                                                    | (antimykotika)<br>(v případě SAPS,<br>resp. ABPA)  |
|                                                                                                                                                                                                   | (teofyliny<br>s prodlouženým<br>účinkem) | IKS – nízká<br>dávka plus teofy-<br>liny s prodlouže-<br>ným účinkem | teofyliny<br>s prodlouženým<br>účinkem                            | (bronchiální<br>termoplastika)                     |
| <b>Zvážení alergénové imunoterapie (AIT)</b>                                                                                                                                                      |                                          |                                                                      |                                                                   |                                                    |
| <b>Léčení/odstranění komorbidit a komplikujících stavů</b>                                                                                                                                        |                                          |                                                                      |                                                                   |                                                    |
| <b>Režimová opatření</b>                                                                                                                                                                          |                                          |                                                                      |                                                                   |                                                    |

**Legenda:**

RABA – inhalační  $\beta_2$ -agonisté s rychlým nástupem účinku, IKS – inhalační kortikosteroidy, LABA – inhalační  $\beta_2$ -agonisté s dlouhodobým účinkem, U-LABA – inhalační  $\beta_2$ -agonisté s ultradlouhodobým účinkem, SAMA – inhalační anticholinergika s krátkodobým účinkem, LAMA – inhalační anticholinergika s dlouhodobým účinkem, U-LAMA – inhalační anticholinergika s ultra-dlouhodobým účinkem.

\* Pouze tiotropium v inhalačním systému SMI (soft mist inhaler, tj. systém Respimat) má v SPC léčbu astmatu.

Tabulka neřeší léčbu ACOŠ.

\*\* LABA nebo U-LABA

## Ostatní léky

Zvláštní skupinou léků užívaných v terapii astmatu jsou **antimykotika**. Jsou doporučována u pacientů s exacerbací bronchopulmonální aspergilózy/mykózy v kombinaci se systémovými kortikoidy. Alergická bronchopulmonální aspergilóza (ABPA) je zvláštní formou alergické formy astmatu s rysy infekční i alergické nemoci. V léčbě ABPA se podává razantní kortikoidní léčba, protože v etiopatogenezi nemoci je významnější patologická forma imunitní odpovědi než vlastní infekce, která sama o sobě u jinak imunitně nekompromitovaného pacienta není schopna přejít v invazivní nemoc. Při časně intervenci lze u části pacientů při kombinaci razantní systémové kortikoterapie spolu s antimykotickou léčbou (preferenčně itraconazolem) dosáhnout dekolonizace. Následná důsledná léčba astmatu pak pomáhá předcházet recidivě kolonizace a vzniku komplikací (bronchiektázie). Hlavními cíli léčebné

strategie jsou: limitovat exacerbace nemoci, dekolonizovat *A. fumigatus* v bronších a pečlivá kontrola astmatu s rehabilitací, dobrý efekt přináší i antilgE terapie. (Agarwal, 2011) (O. Růžičková Kirchnerová, M. Teřl, H. Mírka, J. Baxa, 2010)

Patofyziologie nemoci: dochází při ní k povrchové kolonizaci dolních dýchacích cest aspergily, které u disponovaného jedince vyvolávají permanentní IgE mediovanou alergickou reakci, manifestující se astmatem. Prevalence ABPA v populaci běžných astmatiků je 1-2 %, ale 10-14 % u kortikodependentních astmatiků a u pacientů s cystickou fibrózou se uvádí 8-10%. Spory plísně jsou pohlcovány alveolárními makrofágy a větší hyfy jsou ničeny neutrofilními granulocyty. Onemocnění vzniká jen u některých senzibilizovaných jedinců, hlavní buněčné linie CD4+T buněk jsou u pacientů s ABPA Th2 fenotypu. T buněčné linie stimulují s purifikovanou frakcí *Aspergilla* vysokou produkci IL-4 a nízkou produkci INF gama. *Aspergillus fumigatus* vytváří z antigenního hlediska mnohočetné imunoreaktivní komponenty, vůči nimž bylo k dnešku identifikováno okolo 35 druhů protilátek, z nichž 8-10 ukazuje IgE reaktivitu. Rozvoj ABPA zřejmě závisí na množství a kvalitě specifických imunoglobulinů tvořených lymfocyty po stimulaci s různými epitopy těchto antigenů. Astma bývá špatně kontrolováno, s tendencí k progresi do těžkého perzistujícího až obtížně léčitelného astmatu, často vyžadující stále častější kúry perorálními steroidy. (O. Růžičková Kirchnerová, M. Teřl, H. Mírka, J. Baxa, 2010)

### **Cílená biologická terapie astmatu**

Dosud používané léčebné strategie pro léčbu těžkého astmatu nebyly dostatečně úspěšné. Z klinické praxe víme, že kortikosteroidy působí do určité míry u všech nemocných (mají tzv. pleiotropní efekt), ale tato léčba je provázena řadou nežádoucích a devastujících systémových účinků (viz výše) a nedokáže dostatečně zabránit progresivní ztrátě plicních funkcí u refrakterního astmatu. V posledních několika desetiletích byly vyvinuty nové biologické léky, která zasahují přímo do patogeneze nemoci na molekulárně-buněčné úrovni a tato léčba tak přinesla zásadní obrat v terapii těžkého astmatu. K vyhledávání těchto nemocných využíváme řady biomarkerů. *Viz dále.* (Caruso et al., 2018)

Výběr pacientů pro biologickou cílenou léčbu by měl probíhat v centrech pro těžké astma, kde jsou nemocní řádně přešetřeni s cílem určit konkrétní fenotyp na podkladě řady biomarkerů.

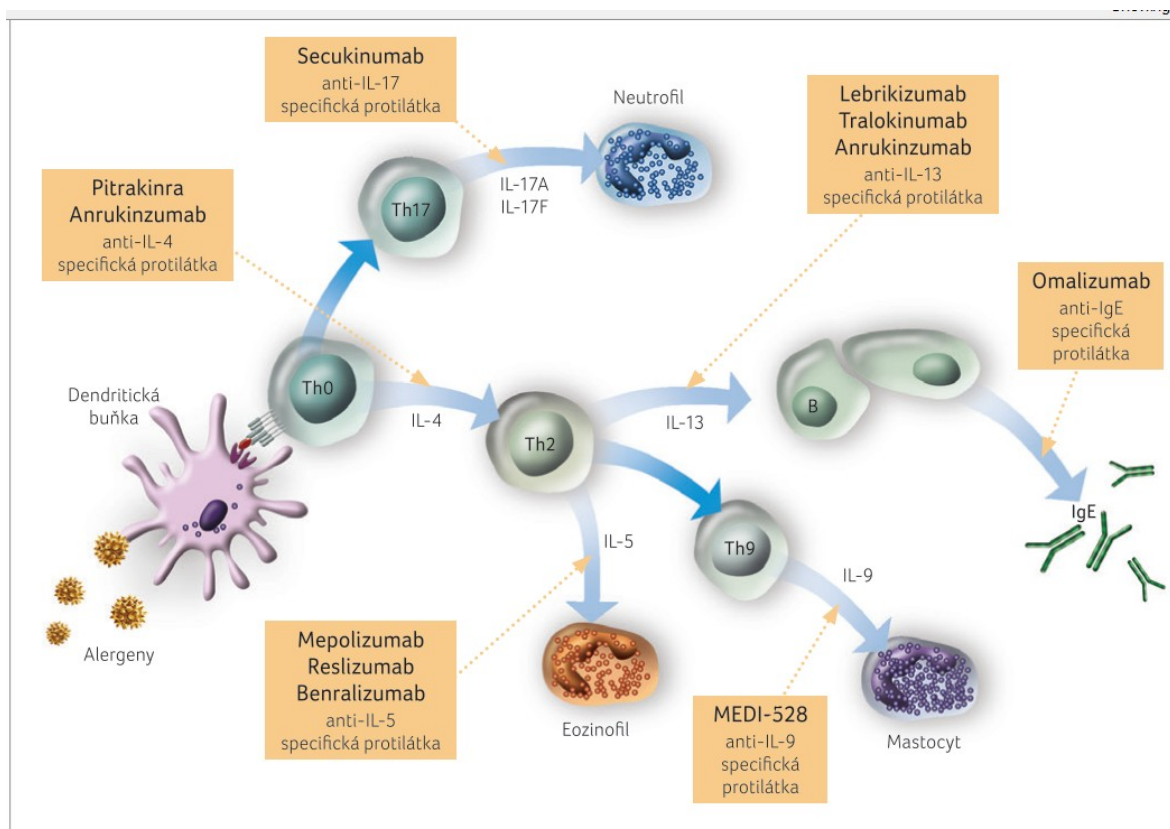
Biologickou terapii těžkého astmatu lze rozdělit do 4 podskupin: (Breviř 2017 – 2019 - Medical Tribune - Lékařské knihkupectví ::::, 2017)

Léčba cílená na alergii

Léčba cílená na především na eosinofilii

Léčba cílená současně na alergii i eosinofilii

Léčba cílená u neeosinofilního astmatu



**Obr.č. 1** Uvažovaný mechanismus účinku monoklonálních protilátek. IL – interleukin; IgE– imunoglobulin E; Th – T pomocné (helper) lymfocyty převzato z (Krčmová, Novosad, Sedlák - 2018 - Biomarkery a biologická léčba, n.d.)

### Léčba cílená na alergii

Nejdéle používanou a první zavedenou biologickou léčbou v astmatologii je **omalizumab**, v současné době máme více než desetileté zkušenosti a je léčeno přes 200 pacientů v centrech po celé ČR. (Růžicková-Kirchnerová et al., 2018)

Jedná se o anti-IgE protilátku, která vyvazuje volné, cirkulující molekuly IgE, které se pak nemohou uplatnit ve spuštění alergické reakce vazbou na mastocyty a bazofily. Je tedy určena pro skupinu pacientů s těžkým refrakterním eosinofilním IgE fenotypem astmatu, u nichž celoroční alergie hraje významnou roli. Léčba je podávána v subkutánních injekcích 1-2x měsíčně dle výše celkového IgE a váhy pacienta. Při správné indikaci tento lék dokáže zásadně změnit život těchto nemocných. Dochází k poklesu počtu exacerbací, snížení dávky až vysazení systémových kortikosteroidů, zlepšení plicních funkcí a celkové kvality života nemocných. Léčba je bezpečná, závažné nežádoucí účinky nebyly zaznamenány, což můžeme potvrdit i z naší praxe viz vlastní řešení studie. (Růžicková-Kirchnerová et al., 2018) (Thomson and Chaudhuri, 2011)

### Léčba cílená především na eosinofilii

Pro skupinu nemocných s těžkým refrakterním eosinofilním astmatem non IgE fenotypu neexistovala žádná jiná alternativa než systémová kortikoterapie. Později u nemocných s výrazně pozitivním BD testem a FEV1 nad 50 % bylo možné ev. indikovat bronchiální termoplastiku (Ruzickova-Kirchnerova et al., 2014) a až v posledních několika letech přichází možnost zahájení cílené biologické terapie zaměřené proti eosinofilnímu zánětu. Mezi hlavní léky zaměřené proti eosinofilii řadíme léky zasahující dráhu interleukinu-5. Pro všechny tyto monoklonální protilátky platí, že s intenzitou eosinofilie (detekované pomocí indukovaného sputa, ev. FENO, periferní krve) stoupá pravděpodobnost dobré klinické odpovědi. Za hranici

dobré odpovědi je považován absolutní počet eozinofilů v periferní krvi více než 300-400 buněk/ $\mu$ l, nebo více než 3 % ve sputu. Problematická je indikace u pacientů na dlouhodobé systémové kortikoterapii, která bronchiální a periferní eozinofilii potlačuje. Z našich zkušeností je spolehlivou známkou eozinoflie průdušek přítomnost nosních polypů. (Ruzickova-Kirchnerova O et al., n.d.) (Brevíř 2017 – 2019 - Medical Tribune - Lékařské knihkupectví, 2017)

#### Mepolizumab

Jedná se o humanizovanou monoklonální protilátku IgG1K, která se váže na IL-5, čímž blokuje možnost vazby tohoto interleukinu na jeho receptor (alfa podjednotku) IL-5R na povrchu eozinofilů. V konečném důsledku pak potlačuje eozinofilní zánět. Inhibuje růst, zrání a diferenciaci, aktivaci a přežití eozinofilů. Léčba anti-IL 5 protilátkou vede ke snížení periferní eozinofilie a eosinofilii ve sputu (výrazněji v periferní krvi než ve sputu, zřejmě proto, že anti-IL-5 není schopen dostatečně blokovat produkci IL-5 lokálními přirozenými lymfoidními buňkami-ILC). FENO nesnižuje, neboť FENO je primárně zvyšováno IL-13 a IL-4, které aktivují NO syntetázu. (Katial et al., 2017) U pacientů dochází k poklesu exacerbací, redukci kortikoterapie a zlepšení plicních funkcí, především FEV1 (Bel et al., 2014)

Je podáván v subkutánní dávce 100 mg každé 4 týdny bez ohledu na hmotnost pacienta. Tento preparát je dle dosavadních zkušeností dobře snášen, vzácně se mohou objevit alergické až autoimunitní nežádoucí reakce, herpes zoster, udává se vyšší riziko helmintóz. (Teřl, 2018) Rovněž je nutné snižovat velmi pomalu systémovou kortikoterapii pro riziko detrakčního syndromu. (Teřl, 2018) (Flood-Page et al., 2007) Od roku 2017 je v dokumentu GINA (Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2018 update), n.d.) doporučován jako přídatná léčba těžkých forem eozinofilního astmatu nekontrolovanou jejich standardní léčbou a je jednoznačně preferován nad systémovými kortikoidy. Indikační kritéria (nekuřáctví, dokumentovaná eozinofilie nad 300 eozinofilů/ $\mu$ l periferní krve, dokumentované minimálně 4 těžké exacerbace v průběhu 12 měsíců před zahájením léčby navzdory vysokým dávkám inhalační kortikoterapie a přídatné léčby nebo užívají perorální kortikosteroidy v dávce minimálně 5 mg prednisonu denně po dobu alespoň 6 měsíců před zahájením léčby). (Brusselle et al., 2013) (Teřl and Klinika, 2018)

Léčba je také indikována u pacientů s eosinofilním fenotypem astmatu po selhání předchozí terapie anti-IgE. (Magnan et al., 2016) (H. Ortega et al., 2014)

#### Reslizumab

Je humanizovaná monoklonální protilátka s vazbou na IL-5 (zabraňuje vazbě IL-5 na alfa podjednotku receptoru pro IL-5 na povrchu eosinofilů), jde o protilátku IgG4K. Klinické účinky jsou obdobné jako u mepolizumabu. Dle některých klinických studií (Castro et al., 2015) byl prokázán dobrý efekt na snížení počtu exacerbací a zlepšení FEV1. Dochází ke snížení eozinofilů v krvi a ve sputu. Lék je podáván intravenózně a dávka je vypočtena dle hmotnosti pacienta (3 mg/kg), podává se v intervalu 4 týdnů. (Low and Bardin, 2017) Dávkování dle váhy pacienta vidíme jako výhodné pro pacienty nadváhou, často způsobenou letitou kortikoterapií.

#### Benralizumab

Je humanizovaná monoklonální protilátka IgG1, která se neváže na IL-5, ale přímo na podjednotku (alfa) jeho receptoru na eozinofilech a bazofilech. Zablokováním této podjednotky dojde k apoptóze eozinofilů a bazofilů. Jedná se o protilátkovou buňkami zprostředkovanou cytotoxicitu způsobující depleci eozinofilů v krvi, dýchacích cestách-sputa a bronchiálních biopsiích, kostní dřeni. Deplece basofilů v krvi. Podává se subkutánně, zpočátku každé 4 týdny, dále pak každých 8 týdnů. Klinicky dochází k redukci exacerbací, zlepšení FEV1 a kontroly astmatu. (Low and Bardin, 2017)

#### Léčba cílená současně na alergii i eosinofilii

Do této skupiny řadíme biologické léky, které ovlivňují signální dráhy IL-4 a IL-13. Zasahují tak do procesů, které vedou k tvorbě IgE (navozují přesmyk B-lymfocytů) především IL-4 a zároveň potencují eosinofilní zánět (cestou IL-13). IL-4 a IL-13 jsou úzce funkčně spojeny, protože heterodimerní receptory pro oba cytokiny sdílejí společnou molekulu IL-4Rα/IL13Rα1. Blokování IL-4Rα proto inhibuje účinky obou cytokinů. IL-13 – způsobuje hyperplazii pohárkových buněk se zvýšenou produkcí hlenu, hyperreaktivitu dýchacích cest a může zprostředkovat změnu izotypového přepnutí aktivovaných B-lymfocytů k produkci IgE. IL-4 se podílí na diferenciaci Th0 lymfocytů k Th2 buňkám a indukcí tvorby IgE v B lymfocytech.

#### Lebrikizumab

Jde o IgG4 humanizovanou monoklonální protilátku, která znemožňuje vazbu IL-13 na receptor IL-4Rα a tím blokuje jeho aktivitu. První studie, nebyly v neselektovaných souborech úspěšné, v dalších fázích pak bylo zjištěno, že dobrým biomarkerem předpovídajícím účinnost lebrikizumabu je kromě FENO i zvýšená hodnota sérového periostinu. Jde o matricelulární protein, jehož tvorbu v buňkách epitelu dýchacích cest vyvolává IL-13. Viz dále kap. 3. Studie fáze III (LAVOLTA I, II) prokázaly, že u astmatiků s vysokou hodnotou periostinu nebo eozinofilii došlo k signifikantnímu snížení exacerbací. (Parulekar et al., 2018)

#### Dupilumab

Je humánní monoklonální protilátka proti α podjednotce receptoru pro IL-4 a zároveň tím inhibuje i IL-13 signální dráhu. Jako dobrý prediktor léčebného efektu se opět jeví kromě eozinofilie v krvi a sputu i koncentrace sérového periostinu. Při léčbě dochází k snížení hodnoty FENO, sérového IgE bez ohledu na výši periferní eozinofilie. Dle některých studií Dupilumab zlepšuje FEV1 a snižuje exacerbace, může ale vést k nárůstu hodnot eozinofilů v krvi díky snížení migrace eozinofilů z krve do plic. Eozinofilie nám tedy pomáhá identifikovat správné respondéry na anti interleukinovou terapii, ale nemůže být správným biomarkerem pro monitorování léčebné odpovědi a řízení dlouhodobé léčby. Dále je známo, že periostin je produkován i osteoblasty při kostní patologii (metastáza, osteoporóza, zlomeniny) a interpretace jeho hodnot mohou být někdy obtížné. (Novosad et al., n.d.)

#### Pitrakinra

Jde o rekombinantní fúzní protein, humánní varianta IL-4, který kompetitivně inhibuje komplex receptoru IL-4Rα a tím narušuje signální dráhu jak pro IL-4 tak pro IL-13. Podání je možné subkutánně i inhalačně. Její účinek je významně závislý na genetických polymorfismech receptoru pro IL-4. (Hambly and Nair, 2014) (Kuna et al., n.d.)

#### Talokinumab

Je monoklonální protilátka vůči IL-13, která neutralizuje IL-13 bez účinku na aktivitu IL-4. Ve studiích byl prokázán efekt na vzestup FEV1. Jako potencionální biomarker se jeví dipeptidylpeptidáza -4 (DPP-4) jako produkt genu, který je indukován IL-13 v epiteliálních buňkách dýchacích cest. Dle dosavadních studií u pacientů s vysokou vstupní hodnotou DPP-4 nebo periostinu vykazuje efekt na redukci exacerbací a zlepšení FEV1. (Staton et al., 2016)

Léky blokující IL-4 and IL-13 zlepšují nejen astma ale i jiné alergické choroby jako je atopická dermatitida a nosní polypóza. (Casale, 2017)

#### Tazepelumab (anti-TSLP)

TSLP je tymický stromální lymfopoetin, jde o prozánětlivý cytokin produkováný epiteliálními buňkami, po stimulaci spouštěči – viry, polutanty, alergeny. Zapojuje se do regulace aktivity Th2-lymfocytů cestou dendritických buněk, působí při lokální remodelaci. Jde o významný cytokin, který se zapojuje v rámci alergického pochodu od atopické dermatitidy

k bronchiálnímu astmatu, jeho hladiny korelují se závažností onemocnění. Nyní probíhají studie fáze III. Tezepelumab (anti-TSLP) AMG 157 má významné účinky na IL-4, IL-5 i IL-13. (Staton et al., 2016)

#### CRTH2 blokátory

CRTH2 receptory jsou exprimovány na buňkách Th2 a eozinofilech a zprostředkovávají chemotaktickou odpověď na prostaglandin D2. Nyní probíhají studie fáze II.

Prostaglandin D2 blokátory (Fevipritant, Timapritant).

Prostaglandin (PG) D2 je klíčový mediátor účastnící se řady zánětlivých onemocněních, včetně alergie a astmatu. Je produkován aktivovanými žírnými buňkami po expozici alergenu a následně přitahuje zánětlivé buňky do tkáně.

Receptor pro PGD2 je exprimován na povrchu Th2 buněk, eozinofilů a bazofilů. Probíhají studie fáze III. s těmito novými léky, které se podávají perorálně. Podle jedné britské studie tato léčba vedla k redukci eosinofilů ve sputu u léčených pacientů ve srovnání s placebem, dále ke zlepšení FEV1 a kvality života. Jiná studie toto však nepotvrdila, ale bylo zjištěno, že podskupina s výraznější bronchiální obstrukcí profitovala více z této léčby. (Gonem et al., 2016) (Viswanathan and Busse, 2018) (Schuligoi et al., 2010)

#### Léčba cílená u neeosinofilního astmatu

Pro Th2 low astma je typická neutrofilní a paucigranulární infiltrace. Typicky se vyznačuje neutrofilii, fixovanou obstrukcí a kortikorezistencí. Proces zánětu zahrnuje subpopulaci Th1 a Th17 lymfocytů. Th17 lymfocyty jsou CD4+lymfocyty, které produkují řadu cytokinů a stimulují buňky dýchacích cest k vylučování chemoreaktantů jako je IL-8, ty pak zprostředkují neutrofilní infiltrace se zvýšením zánětu dýchacích cest. Th1 lymfocyty také produkují TNFα, který vyvolává aktivaci makrofágů a jde o významný mediátor těžkého astmatu. IL-5 a IL-13 jsou exprimovány na nízké úrovni. (Krčmová, Novosad, Sedlák - 2018 - Biomarkery a biologická léčba, n.d.)

Brodalumab – humánní monoklonární anti-IL 17RA protilátka třídy IgG2, která se váže na receptor pro IL-17. Studie nepotvrdila efekt této terapie, zdá se, že subpopulace s výraznější bronchodilatační reverzibilitou by mohla vykazovat dobrý efekt, je ale potřeba další studií k upřesnění efektu této léčby. (Busse et al., n.d.)

Secukinumab je monoklonární protilátka proti cytokinu IL-17α. Byl prokázán dobrý efekt u jiných TH-17 onemocnění jako psoriáza a revmatoidní artritida. (Kortekaas Krohn et al., 2017)

Blokátory pro receptory TNFα jako jsou etanercept a golimumab neměly dle studií na průběh astmatu dobrý efekt. Docházelo k zvýšení rizika závažných infekcí a malignit. (Samitas et al., 2017)

**Makrolidy** – dle některých studií (AZISAST, AMAZES) terapie azitromycinem vedla k redukci těžkých exacerbací u astmatiků s hodnotou eosinofilů <200buněk/μl, ve srovnání s placebem. V první studii užívali pacienti s těžkým perzistujícím astmatem 250 mg AZT 3x týdně po dobu 26 týdnů (109 pacientů) a efekt byl prokázán v podskupině non-eosinofilních astmatiků, v druhé studii užívali pacienti 500 mg AZT 3x týdně po dobu 48 týdnů a došlo k celkovému snížení exacerbací. Je zde určité riziko nárůstu rezistence, z nežádoucích účinků se objevil nejčastěji pouze průjem a je nutné při výběru této léčby vyřadit nemocné s prodlouženým QT intervalem. (Gibson et al., 2017) (Breviř 2017 – 2019 - Medical Tribune - Lékařské knihkupectví, 2017) (Krčmová, Novosad, Sedlák - 2018 - Biomarkery a biologická léčba, n.d.)

## CHRONICKÁ OBSTRUKČNÍ PLICNÍ NEMOC – CHOPN

Kapitola je pojednána především z pohledu patofyziologie, fenotypizace a cílené léčby.

Definice dle GOLD: „Jde o časté, preventabilní a léčitelné onemocnění, jež je charakterizované především respiračními symptomy a omezením průtoku vzduchu v průduškách (bronchiální obstrukcí), které jsou důsledkem bronchiálních a/nebo alveolárních abnormalit, jež jsou obvykle způsobeny významnou expozicí škodlivým částicím nebo plynům. K obvyklým respiračním příznakům patří dušnost, kašel a/nebo produkce sputa (vykašlávání).“ (GOLD 2017)

Hlavními rizikovými faktory pro CHOPN je kouření tabáku a expozice zplodinám při spalování biomasy, znečištěné ovzduší. Roli mohou hrát i genetické predispozice, abnormální vývoj plic. CHOPN je také spojena s řadou komorbidit, které zhoršují morbiditu a mortalitu. CHOPN je jednou z hlavních příčin světové i české mortality a morbidity.

### **Etiologie a patogeneze**

Na vzniku CHOPN se podílí dědičné faktory a negativní vliv vnějšího prostředí.

#### **Vnější faktory:**

Nejčastějším rizikovým faktorem je kouření cigaret, na druhém místě se uvádí expozice škodlivým látkám v pracovním prostředí a znečištění vzduchu. Dále pak ovlivnění růstu plic během gestace a v raném věku (nízká porodní hmotnost, respirační infekce), špatný socioekonomický status, pohlaví, věk, výživa a komorbidity. (Kolek et al., n.d.)

#### **Dědičné faktory:**

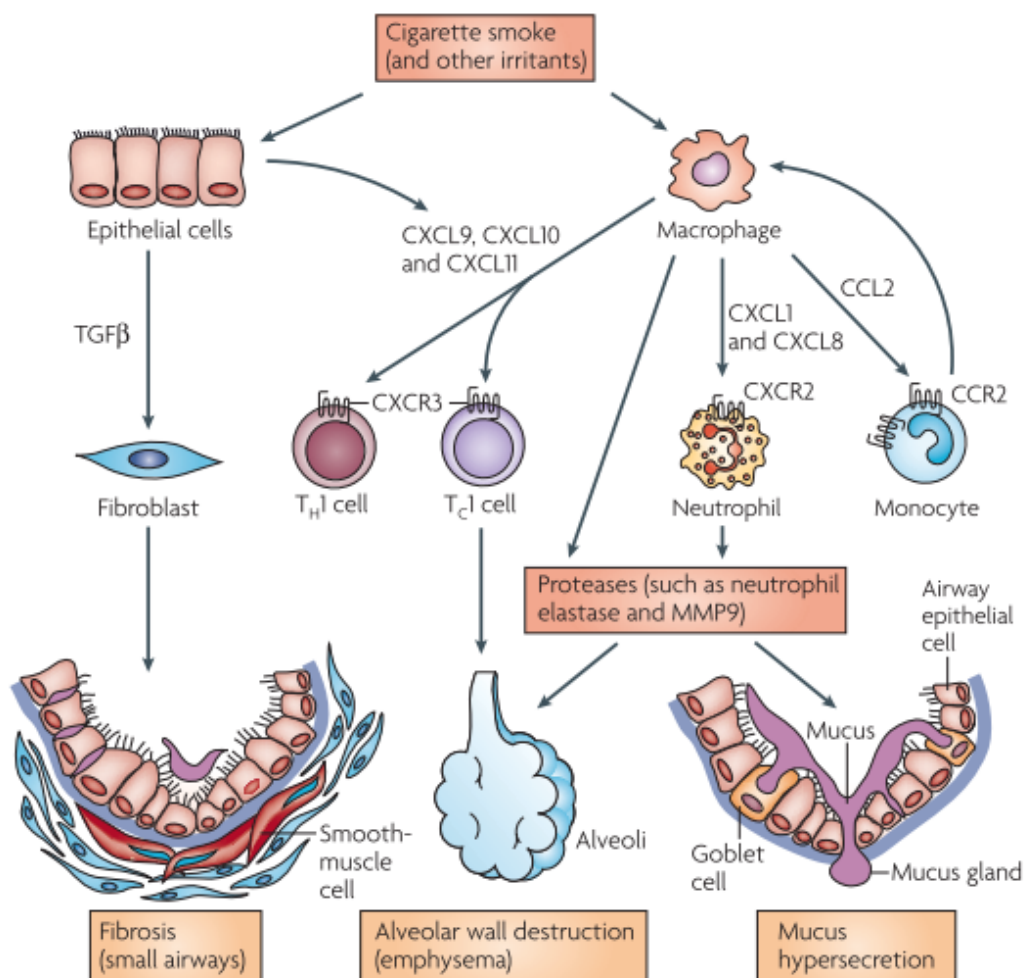
Nejznámější vrozené onemocnění zodpovědné za časný rozvoj CHOPN je deficit  $\alpha$ 1-antitrypsinu. AAT patří mezi inhibitory sérových proteáz, kódován je genem *Serpina1* (dříve *Ppi-gen* inhibitoru proteáz). Je známo více než 100 polymorfismů tohoto genu, a tedy i různé výsledné enzymy. Nejčastější je divoká alela s normální funkcí enzymu – M, známé abnormální formy jsou Z a S. Kombinace jednotlivých alel pak dává výsledný fenotyp a korespondují se sérovou hladinou ATT v plasmě a s riziky orgánových komplikací. Nejčastější variantou těžkého deficitu je PiZZ. (Chlumský, 2018)

AAT je tvořen převážně v jaterních buňkách. Funkce ATT v plicích je inhibice proteolytických enzymů, zejména elastázy neutrofilních leukocytů (uvolní se po stimulaci iritačními nebo infekčními podněty). V případě deficitu ATT není u daného pacienta dosažena potřebná koncentrace enzymu v plicním intersticiu a dochází k destrukci plicní tkáně. V jádrech defektní ATT vytváří v endoplasmatickém retikulu hepatocytů polymery, které se zde pak akumulují a vedou k apoptóze jaterních buněk. Důsledkem je poškození funkce a struktury jater, často rozvoj cirhózy. Klinicky se deficit AAT projevuje nejčastěji plicním emfyzémem, který se manifestuje časněji, typicky s bazální predilekcí. Nicméně ke vzniku nemoci je zapotřebí dalších faktorů, nejen těch genetických. Tím hlavním zevním faktorem bývá kouření cigaret. Specifická terapie u pacientů s CHOPN s deficitem AAT je svým způsobem fenotypicky a endotypicky (genotypově) cílená a hlavním úkolem je zvýšit plasmatickou koncentraci AAT nad protektivní úroveň (hodnota nad 0,5g/l). Tato léčba se podává doživotně v pravidelných intervalech a je velice nákladná. Indikační kritéria jsou – průkaz deficitu AAT a jeho hladina pod hodnotou 0,5g/l, pacient nesmí kouřit aspoň 6 měsíců a přítomnost poškození plic s hodnotou FEV1 pod 60 % náležitých hodnot. (Kolek et al., n.d.) (Chlumský, 2018) (Miravittles et al., 2017)

### **Patofyziologie**

Změny postihují proximální dýchací cesty, periferní průdušky, tj. pod 2 mm průměru (obstrukční bronchiolitida), plicní parenchym (emfyzém) a plicní cévy (plicní hypertenze), kde probíhá chronický zánět a strukturální změny, které jsou důsledkem opakovaného

poškození a reparace. Plicní zánět je udržován a zesilován oxidačním stresem a dysbalancí proteázo-antiproteázového systému v plicích. Pro CHOPN je charakteristický neutrofilní typ zánětu, na kterém se spolupodílejí i další buňky a jejich mediátory. Patofyziologickým korelátem patologických změn je hypersekrece hlenu, bronchiální obstrukce, hyperinflace, vývoj plicní hypertenze v plicnici a plicního srdce a vývoj chronické respirační insuficience.(Barnes, 2008)



**Obr. č. 2** Zánětlivé a imunitní buňky zapojené do patofyziologie CHOPN dle P.Barnese (Barnes, 2008)

#### Klíčové odlišnosti v etiopatogenezi astmatu a CHOPN

Astma a CHOPN patří mezi chronická zánětlivá onemocnění průdušek, resp. plic, jejichž vnější klinické projevy se zčásti podobají. Jedná se však o odlišná onemocnění s odlišnou etiopatogenezí, bližšími klinickými projevy, terapeutickými možnostmi a prognózou. Jsou shrnována do skupiny nemocí spojených s bronchiální obstrukcí. Charakteristiky zánětu jsou u obou nemocí odlišné v dominujících typech zánětlivých buněk a mediátorů. Rozdíly se pak stírají u pacientů s těžkým astmatem, u astmatiků kuřáků a při akutních exacerbacích. Tyto odlišnosti pak musíme zohlednit i při výběru terapie. Pro obě tyto choroby je typická bronchiální obstrukce, která je variabilní a reverzibilní u astmatiků a progresivní a do značné míry ireverzibilní u pacientů s CHOPN. Obě nemoci provází epizody exacerbací. Přes řadu podobností existují i výrazné odlišnosti v typu zánětu s různými zánětlivými buňkami a mediátory, jsou zde odlišné důsledky tohoto zánětu a s tím související i odlišná reakce na terapii. (Barnes, 2008) (Kolek et al., n.d.)

U astmatiků probíhá zánět převážně ve větších dýchacích cestách, malé dýchací cesty jsou více postiženy u těžších forem astmatu, ale plicní parenchym ovlivněn není. CHOPN postihuje především malé dýchací cesty a plicní intersticiu. Tyto rozdíly jsou zřejmě dány typem inhalovaných agens a jejich distribucí (alergeny, kouř). Důležitou roli v etiopatogenezi obou nemocí hrají především T lymfocyty (Th2-astma, Th1, Th17 u CHOPN), B lymfocyty (především u patofyziologie astmatu).

Z histopatologického hlediska v bronchiálních biopsiích astmatiků nalezneme především eozinofily, aktivované slizniční žírné buňky (mastocyty) a T lymfocyty. Patrná je depozice kolagenu subepiteliálně, někdy také nazývána ztlustění bazální membrány, hypertrofie hladkých svalů dýchacích cest v důsledku hyperplazie a hypertrofie (především u těžkých astmatiků), dochází také k remodelaci cév, angiogenezi (při zvýšeném VEGF), zvýšené produkci hlenu díky většímu počtu pohárkových buněk v epitelu dýchacích cest a zvětšením submukózních žlázek. (Barnes, 2008)

Mastocyty nebyly ve větším procentuálním zastoupení v bioptických vzorcích pacientů s CHOPN nalezeny (což by vysvětlovalo nepřítomnost variabilní obstrukce u CHOPN). Typická je infiltrace T-buňkami a neutrofily v lumen dýchacích cest. Není přítomna subepiteliální fibróza, ale typická je fibróza v okolí malých dýchacích cest, což je považováno za hlavní faktor vedoucí k zúžení dýchacích cest, která je pro CHOPN charakteristická. Hladká svalovina ani bazální membrána nebývá hypertrofována, epiteliální buňky bývají poškozeny, mohou být tzv. pseudostratifikovány v důsledku chronické iritace cigaretovým kouřem a ostatními iritanty a zvýšenou produkcí EGFR (epitelial-cell growth-factor). Stejně jako u astmatiků je zvýšená produkce hlenu a exprese genu mucinu.

Odlišující a typická pro pacienty s CHOPN je destrukce alveolárních stěn (emfyzém), jako důsledek degradace elementů pojivové tkáně (zejména elastinu) zprostředkované proteázami, dále apoptóza pneumocytů typu I a pravděpodobně endotelových buněk. U pacientů s CHOPN je patrná zvýšená produkce elastolytických enzymů, jako je neutrofilní elastáza, a zvláště několika matrixových metaloproteináz (MMP) a zřejmě snížení hladiny antiproteáz jako je  $\alpha_1$ -antitrypsin. (Barnes, 2008)

Neutrofily – jejich počet je zvýšený ve sputu u CHOPN pacientů což koreluje s tíží nemoci. Jejich zvýšení pak vede ke zvýšené produkci CXC chemokinů (CXCL 1 a CXCL8), který působí na CXCR2, který je exprimován především neutrofily. (Barnes, 2008)

Makrofágy – jejich počet je zvýšený u pacientů s CHOPN a astmatem, ale daleko výrazněji u CHOPN pacientů. Tyto makrofágy jsou odvozeny z cirkulujících monocytů, které migrují do plic v reakci na chemoreaktanty jako je CCL2 (neboli MCP1) působící na CCR2 a CXCL1 působící na CXCR2. Existuje stále více důkazů o tom, že makrofágy řídí zánětlivé změny u CHOPN prostřednictvím uvolňování chemokinů, které přitahují neutrofily, monocyty a T buňky a uvolňují proteázy, především MMP9.

CD8+T buňky dominují nad CD4+T buňkami v dýchacích cestách a parenchymu pacientů s CHOPN.

Cytotoxické T lymfocyty typu 1 – Tc1 buňky, které produkují INF $\gamma$  a exprimují CXCR3, tyto CXCR3 ligandy potlačují signalizaci pomocí CCR3, což je receptor pro CCL11, což naznačuje, že mohou potlačit eosinofilní zánět. Ve sputu CHOPN pacientů je nalézána zvýšená produkce CCL5 (známé jako RANTES), ten přitahuje CD4+ a CD8+ T buňky. Tc-1 buňky uvolňují granzyme B a perforiny, které mohou vyvolat apoptózu pneumocytů I. typu a rozvoj emfyzému. INF $\gamma$  stimuluje uvolňování ligandů CXCR3, ty pak přitahující více Th1 a Tc1 buněk do plic a situace se neustále opakuje.

Někteří pacienti s těžkým astmatem se typem zánětu blíží pacientům s CHOPN (vyšší počet neutrofilů ve sputu, CXCL8 a TNF, zvýšený oxidativní stres a horší odpověď na kortikoterapii). V bioptických vzorcích nalezneme jak Th1, tak Th2 buňky. Neutrofilní typ zánětu nalezneme také u astmatiků, kteří kouří. Rovněž u akutních exacerbací se rozdíly

stírají. V případě akutní exacerbace dochází u obou nemocí k nárůstu buněk a mediátorů zánětu, ale byly pozorovány i některé další změny u astmatiků s akutní exacerbací, kdy triggerem byla virová infekce, můžeme nalézt kromě vyššího počtu eosinofilů i neutrofilní typ zánětu, a naopak u virovým infektem spuštěné exacerbace CHOPN, může být přítomen eosinofilní zánět. (Barnes, 2004)

**Vyšetření znaků zánětu u CHOPN, fenotypy CHOPN a potencionální biomarkery – viz kap. 3.2.2. Biomarkery u nemocí s bronchiální obstrukcí a fibrotizujících nemocí plic**

**Léčba CHOPN** – stručné shrnutí

- 1) Eliminace rizik – nekouřit, vyhýbat se rizikovým faktorům
- 2) Standardní terapie (U)-LAMA + (U)-LABA, pravidelná každodenní aerobní aktivita (chůze), plicní rehabilitace, vakcinace, trénink a kontrola správné inhalační techniky
- 3) Fenotypová léčba-IKS/LABA/(U)-LABA, roflumilast, BLVR, A1AT, ATB, mukolytika, nutriční podpora
- 4) Terapie respiračního selhávání a terminální CHOPN – DDOT, NIVP, transplantace plic, paliativní péče.

### 3.1.2 Fibrotizující plicní nemoci

Kapitola je zpracována především z pohledu patofyziologie, fenotypizace a cílené léčby. (*Intersticiální plicní procesy - Martina Vašáková, Jaroslav Polák, Radoslav Matěj - Maxdorf - Lékařské knihkupectví ::::, n.d.*)

Plicní intersticium je ohraničeno endoteliálními buňkami plicních kapilár a alveolárním epitelem, perilymfatickými a perivaskulárními interseptálními prostory a dále sem patří centrálně uložené, pribronchiolární a pribronchiální prostory. Často bývají postiženy i alveolární struktury. Obsahuje především struktury pojivové tkáně (kolagen, fibrily retikulinu, elastická vlákna,) a matrix složenou s glykosaminoglykanů, polysacharidů a nekolagenních proteinů (fibronectin, laminin). Buněčná složka je minimální (malé množství makrofágů, mastocytů, plasmatické buňky, fibroblasty a myofibroblasty). (*Intersticiální plicní procesy - Martina Vašáková, Jaroslav Polák, Radoslav Matěj - Maxdorf - Lékařské knihkupectví ::::, n.d.*)

Plicní fibróza je charakterizována chronickou tvorbou jizev a depozice extracelulární matrix (dochází k akumulaci proteinů ECM v intersticiálním a alveolárním prostoru plic), což má za následek zhoršení plicních funkcí a respirační selhání. (Loomis-King et al., 2013)

INTERSTICIÁLNÍ (FIBROTIZUJÍCÍ) PLICNÍ PROCESY (IPP)

Jedná se o velmi početnou skupinu nemocí se společnými znaky, difuzní postižení plicní tkáně a do jisté míry i podobný klinický, radiologický a funkční obraz, s odlišnou etiopatogenezí. Léčba a prognóza těchto nemocí se liší dle toho, do jaké míry je zastoupena reverzibilní zánětlivá složka (akutní i chronický zánětlivý proces) a do jaké ta ireverzibilní, tedy fibróza intersticia a alveolárních prostorů a remodelace plicní tkáně. (*Intersticiální plicní procesy - Martina Vašáková, Jaroslav Polák, Radoslav Matěj - Maxdorf - Lékařské knihkupectví ::::, n.d.*)

Některé formy IPP mohou být způsobeny expozicemi životního prostředí (např. azbestem, anorganickými prachy, organickými částicemi, léková toxicita nebo ozařováním), k některým může docházet v souvislosti se systémovým onemocněním pojiva (kolagenózy). Většina závažných případů patří do obrazu Idiopatické plicní fibrózy. Patogeneze tohoto onemocnění není zcela jasná, onemocnění je progresivní a často vede k respirační insuficienci během 3–5 let po diagnóze. (Loomis-King et al., 2013)

**Dělení intersticiálních plicních procesů:** (Intersticiální plicní procesy - Martina Vašáková, Jaroslav Polák, Radoslav Matěj - Maxdorf - Lékařské knihkupectví ::::, n.d.)

- IPP ze známých příčin
- Idiopatické intersticiální pneumonie:
  - IPF-UIP (idiopatická plicní fibróza)
  - Non IPF IIP (non IPF idiopatická intersticiální pneumonie):
    - DIP (deskvamativní IP)
    - AIP (akutní IP), NSIP (nespecifická)
    - RB-ILD (respirační bronchiolitida s intersticiálním plicním postižením)
    - COP (kryptogenní organizující se pneumonie)
    - LIP (lymfocytární IP)
- Granulomatózní IPP (sarkoidóza, ...)
- Ostatní IPP

**Etiologie a patogeneze IPP procesů:**

Závažnost IPP procesů je určena imunopatologickým procesem, který může vést k zhojení ad integrum nebo naopak vyúsťuje postupně v úplnou destrukci plicní architektiky fibrotizujícím procesem.

Za normálních podmínek při poranění plicních sklípků a plicního intersticia dochází k akumulaci leukocytů (do 24-48 hodin od poranění) a v místě alveolárního poškození se množí regenerující pneumocyty II. typu a fibroblasty, které indukují zmnožení extracelulární matrix. Poté dochází k vzestupu smíšené zánětlivé celulizace s převahou monocytů a makrofágů. V případě procesů hojících se ad integrum mizí rychle neutrofilní granulocyty a v místě poranění zůstávají pouze makrofágy.

U fibrotizujících procesů přetrvávají neutrofily, objevují se i lymfocyty (T i B), plasmatické buňky a ty pak spouštějí kaskádu cytokinů a chemokinů, které pak vyvolají patologickou fibroprodukcí. U chorob intersticia charakterizovaných výplní alveolů dochází k patologickému hromadění buněk nebo nebuněčného materiálu v plicních sklípcích (např. proteinů u alveolární proteinózy, granulomů u sarkoidózy, hladkých svalových vláken u LAM). Proces fibrózy může být iniciován i bez předchozího zánětu, jako tomu je u idiopatické plicní fibrózy. (Vašáková, n.d.)

Hlavní dvě patognomické cesty rozvoje IPP procesu jsou:

a) Zánětlivá

Při opakované poranění plicního epitelu dojde k uvolnění řady cytokinů a chemokinů, ty pak stimulují migraci leukocytů do plic a expresi adhezivních molekul na povrchu vaskulárních endoteliálních buněk. Tyto exprimované adhezivní molekuly pak přitahují leukocyty (prostřednictvím receptorů), které se hromadí v místě poraněné tkáně. Chemokiny se také podílí na indukci a udržení zánětu, angiogenezi a přesmyknutí k profibrotickému typu Th2 imunitní odpovědi, náboru prekursorů fibroblastů z cirkulujících buněk z kostní dřeně. (Vašáková, n.d.)

b) Epiteliální

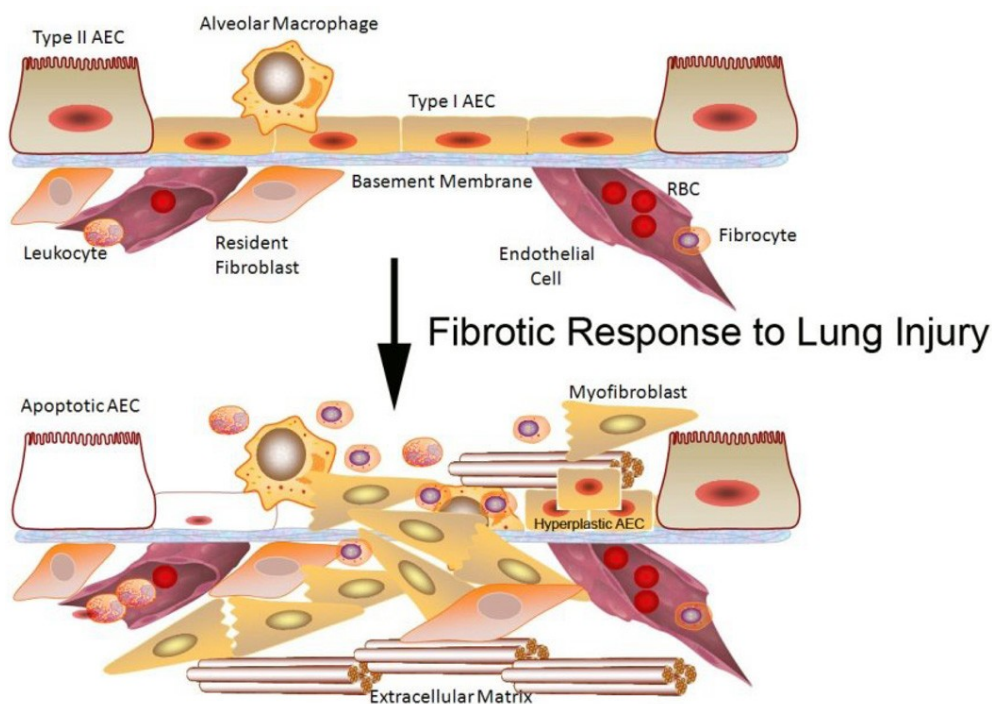
Jedná se o změnu počtu epiteliálních buněk, porušení integrity alveolárního epitelu a změnu fenotypu epiteliálních buněk, která je typická pro patogenetický proces IPF. (Vašáková, n.d.)

Předpokládá se, že IPF je výsledkem abnormálního procesu hojení ran. Počáteční opakované poranění nastává v plicním epitelu, pravděpodobně v buňkách alveolárního epitelu I. typu (AEC I, pneumocyty typu I), které lemují většinu alveolárního povrchu. Za normálních podmínek se předpokládá, že tyto buňky jsou udržovány strukturálními mezenchymovými buňkami prostřednictvím různých mediátorů. (Loomis-King et al., 2013)

U IPF existuje několik fenotypů epiteliálních buněk: hyperplastický typ pneumocytů II. typu, reaktivní obrovské a prodloužené epitelové buňky, ploché a ztenčené epitelie obklopující fibroblastické fokusy, epitelové buňky bronchiálního typu (bronchiální metaplasie) vystylající oblasti voštinovitě změněné plicce a dlaždicové buňky (skvamocelulární metaplasie). U IPF jsou epiteliální buňky zdrojem řady mediátorů, které indukují migraci fibroblastů, jejich proliferaci a aktivaci a akumulaci extracelulární matrix. (Vašáková, n.d.)

Když jsou alveolární epitelové buňky (pneumocyty) AEC I. typu poraněny nebo ztraceny, má se za to, že pneumocyty (AEC) typu II podléhají hyperplastické proliferaci, aby pokryly exponované bazální membrány. Pokud je tento proces neefektivní, alveoly se mohou zhroutit a zkonsolidovat. Při normální opravě se hyperplastická AEC (pneumocyt) typu II podrobí regulované apoptóze. Zbývající buňky se rozšíří a podstoupí proces diferenciacce, aby se staly AEC typu I. Za patologických podmínek a vlivem transformujícího růstového faktoru (TGF) se akumulují fibroblasty v těchto oblastech poškození a diferencují se na myofibroblasty, které exprimují  $\alpha$ -hladké svalové aktiny (SMA), které vylučují kolagen a další ECM proteiny. Histologické vyšetření tkáně UIP odhaluje diagnostické léze známé jako fibroblastická ložiska (husté sbírky myofibroblastů a jizevní tkáně). AEC přilehlé k těmto fibroblastickým ložiskům často zůstávají hyperplastické a abnormální, než aby podstoupily odpovídající opravu. (Loomis-King et al., 2013)

**Schéma č. 3** Patogenetický proces IPF převzato z (Loomis-King et al., 2013)



Fibrogenezi ovlivňují tyto mediátory:  $\text{TNF}\alpha$  – tumor nekrotizující faktor alfa, PDGF-destičkami tvořený růstový faktor,  $\text{TGF}\beta$  transformující růstový faktor beta, endotelin-1, růstový faktor pojivové tkáně CTGF a osteopontin. Tyto potencionální biomarkery jsou předmětem řady studií při hledání vhodné antifibrotické terapie. (van den Blink et al., 2010)

Alveolární epitelové buňky také produkují angiostatické faktory. U IPF zřejmě dochází k akumulaci fibrinu v plicních sklípcích, kdy alveolární epitelové buňky produkují tkáňový faktor, který aktivuje kaskádu koagulačních proteáz a uvolňuje inhibitor aktivátoru plasminogenu-1 (PAI-1). Matrix v alveolech a plicním intersticiu, která je tvořena fibrinem

a fibronektinem se pak může organizovat a žít. Může dojít k ovlivnění sekrece surfaktantu v alveolech a způsobit jeho dysfunkci (vede ke vzniku mikroatektáz). Alveolární epitel může rovněž zapříčinit zvrát imunopatologické reakce v plicích k tzv. Th2 typu. (Vašáková, n.d.)

Charakteristické znaky poškození epiteliálních buněk mají potenciál sloužit jako diagnostické a prognostické biomarkery pro IPF. Viz dále kapitola 3.2.2. *Biomarkery u nemoci s bronchiální obstrukcí a fibrotizujícími nemocí plic*

### **Cílená léčba fibrotizujících plicních procesů**

Léčba a prognóza jednotlivých IPP se liší. Základem terapie u zánětlivých IPP jsou kortikosteroidy a imunosupresiva, u IPF antifibrotika, v konečných stádiích nemoci DDOT a u vhodných kandidátů transplantace plic.

Léčba IPF se v posledních několika letech výrazně změnila. Na základě studie PANTER, která prokázala nulový a naopak škodlivý efekt kombinované imunosupresivní terapie spolu se systémovými kortikoidy u pacientů s IPF. (Šterclová, 2018) Dle ATS guidelines tedy není monoterapie kortikosteroidy pro léčbu IPF doporučena. Většina pacientů s IPF by neměla být léčena kombinací kortikosteroidů, azathioprinu a acetylcysteinu, ale tato léčba může být rozumnou volbou u minoritních skupin. (Raghu et al., 2015)

Antifibrotika lze nabídnout pacientům s FVC mezi 90-50 % očekávaných hodnot a transfer faktorem nad 30 % očekávaných hodnot. Tato léčba zpomaluje pokles plicních funkcí a prodlužuje přežití u pacientů s IPF.

Pirferidon má efekt na snížení poklesu plicních funkcí a mortalitu. Dle studií Pirfenidon ve srovnání s placebem snížil progresi onemocnění, což se odráží ve snížení poklesu plicních funkcí, toleranci zátěže a přežití bez progresu u pacientů s IPF. Léčba byla spojena s přijatelným profilem vedlejších účinků a méně úmrtími. (King et al., 2014)

Nintedanib je indikován při intoleranci či selhání Pirferidonu.

U pacientů s idiopatickou plicní fibrózou nintedanib snížil pokles FVC, což je v souladu se zpomalením progresu onemocnění; nintedanib byl často spojován s průjmem, což vedlo k přerušení léčby u méně než 5 % pacientů. (Richeldi et al., 2014)

Zatím ve fázi výzkumu:

Rapamycin v kombinaci s pirferidonom. Dle některých studií vykazovala kombinace těchto léků dobrý efekt (in vitro), došlo k rozšíření rozsahu inhibice fibrogenních markerů a zabránění migraci fibroblastů. (Molina-Molina et al., 2018)

Léky, které dle studií nepřinesly efekt, jsou např. tralokinumab (protilátka proti IL-13), protilátka proti IL-4/IL-13, voxelotor (lék modifikující hemoglobin a vazbu kyslíku na hemoglobin), carluman (protilátka proti chemokinu CCL-2). Probíhají další studie s protilátkou proti růstovému faktoru pojivových tkání aj. (Šterclová, 2018)

## 3.2 Biomarkery

### 3.2.1 Základní charakteristika a rozdělení biomarkerů

#### Biomarker

Definice: Jedná se o klinické příznaky nebo laboratorní aj. parametry, které slouží jako indikátory základní patofyziologie a mohou být využívány k diagnostice, monitoraci, výběru efektivní terapie nebo určení budoucích rizik. Optimální biomarker by měl být dostatečně senzitivní a specifický, snadno zjistitelný, spolehlivý, pevný, praktický, reprodukovatelný, levný a rychle dostupný. (Katial et al., 2017) (Krčmová, Novosad, Sedlák - 2018 - Biomarkery a biologická léčba, n.d.)

#### Rozdělení biomarkerů:

Pojem biomarker můžeme chápat z různých úhlů pohledu, viz dále. Podrobně se biomarkery zabývají obory jako jsou genomika, proteomika a metabolomika, které se zkoumají biomarkery dle biologických parametrů (struktura, funkce a dynamika organismů). V určení biomarkerů pomáhají i zobrazovací metody (hyperpolarizovaná magnetická rezonance, PET-CT), spirometrie, měření FENO nebo kondenzátu vydechaného vzduchu.

**Klinické biomarkery.** Jsou typické pro určitý endo/fenotyp dané choroby (např. nosní polypóza a intolerance NSAID u eosinofilního, non IgE fenotypu astmatu, paličkovité prsty a krepitus u IPF).

**Laboratorní a histologické biomarkery** získané z krve, sputa, BALTE, moči, biotických vzorků. Např. periferní eozinofilie u astmatu, deficit A1AT u CHOPN, SACE u sarkoidózy aj.

**Funkční a zobrazovací biomarkery** Např. míra bronchiální obstrukce, resp. její reverzibilita nepřímo vypovídá o hypertrofii hladké svaloviny bronchů, hodnota FENO o přítomnosti eosinofilního zánětu, emfyzém na CT spoludetekuje emfyzematický fenotyp CHOPN, subpleurální predominance postižení a voštinovitá přestavba je typická pro UIP.

#### Biomarkery pro klinickou praxi můžeme rozdělit také na:

**Diagnostické** – vhodné pro stanovení správné diagnózy a pomohou při určení specifické terapie např. specifické IgE u eosinofilního astmatu a indikace terapie omalizumabem, HRCT u emfyzematického fenotypu a indikace volumredukční operace atd.

**Prognostické** – dokáží predikovat odpověď na podávanou terapii, např. periostin-odpověď na anti-IL13/anti-IL4, u IPF možný marker predikce klinické progresse. Některé biomarkery mají obě tyto funkce (např. IgE, ECP, eosinofily, periostin a další...)

#### Dále na invazivní a neinvazivní

Pozn. biomarkery získané z krve v této práci zařazují mezi neinvazivní biomarkery s přihlédnutím k jednoduchosti metody a minimálním zásahu do integrity jedince.

### 3.2.2 Biomarkery u nemocí s bronchiální obstrukcí a fibrotizujícími nemocí plic

#### BIOMARKERY U CHOPN

Vedle řady klinických biomarkerů (viz dále), podobně jako u astmatických pacientů lze biomarkery zánětu vyšetřovat v krvi/séru, indukovaném sputu, vydechovaném vzduchu, jeho kondenzátu, v bronchoalveolární laváži a plicních biopsiích.

#### Vyšetření biomarkerů zánětu v krvi

**CRP** (C-reaktivní protein), hladina bývá u těžších forem CHOPN zvýšená (provází bakteriální infekce a exacerpace). Zvýšení hladiny CRP a současný pokles FEV1 znamená riziko kardiovaskulární komoridity u pacientů s CHOPN, což souvisí s vyšší produkcí IL-6. (Georgiev and Georgieva, 2015)

**TNF $\alpha$**  je hlavní cytokin detekující i časnou fázi zánětu u CHOPN, hladina se zvyšuje s tíží nemoci a při exacerbacích. Zvyšování koncentrace TNF $\alpha$  koresponduje s úbytkem váhy a snížením BMI při apoptóze buněk kosterního svalstva. Jeho zvýšenou koncentraci nalezneme v dýchacích cestách u pacientů s těžkým astmatem a CHOPN, zesiluje neutrofilní zánět a aktivuje makrofágy. Dosavadní studie s anti TNF terapií nebyly u pacientů s CHOPN a těžkým astmatem úspěšné.

**Interferon  $\gamma$**  je produkován epitelovými buňkami, jeho hladina se zvyšuje při virových infekcích. Stimuluje makrofágy k produkci TNF $\alpha$ . (Kolek et al., n.d.)

**Neutrofilní granulocyty** – jejich zvýšení není pro CHOPN tak specifické, jako elevace eozinofilů u astmatiků. (Kolek et al., n.d.). Vedle analýzy diferenciálního rozpočtu krevního obrazu lze k identifikaci neutrofilního typu zánětu, resp. jeho aktivity sledovat tyto mediátory:

NE (neutrofilní elastázy), MPO (myeloperoxidázy), MMP9 (matrixmetaloproteinázy), LTA4H (leukotrienA4 hydrolázy), IL-8, PE (prolyl endopeptidázy), PGP (proline-glycerin-proline) v séru a sputu. Zatím v rámci studií. (Russell et al., 2016)

V patofyziologii neutrofilního zánětu hraje roli:

1) Inhalace cigaretového kouře, která způsobuje uvolnění několika mediátorů (prolyl endopeptidázy (PE), IL-8, leukotrienové A4 hydrolázy (LTA4H) a matrixové metaloproteinasy (MMP 8/9) tkáňovými buňkami, makrofágy a epitelálními bb.

2) Neutrofilní chemokin IL-8 přitahuje neutrofile z kapiláry vazbou na CXCR1 / 2.

3) Neutrofile následně uvolňují MMP a PE, které štěpí kolagen z extracelulární matrix, čímž uvolní tripeptid a neutrofilní chemoreaktant PGP. LTA4H může štěpit a deaktivovat PGP.

Avšak složky cigaretového kouře, jako je akrolein, inhibují LTA4H a mohou acetylovat PGP za vzniku silnější acetylované formy PGP (N-a-PGP). Navíc N-a-PGP nelze štěpit pomocí LTA4H. PGP-generující enzymy mohou být pak uvolněny neutrofilemi po náboru a aktivaci PGP samovolným neutrofilním zánětem. Čím déle pacient kouří, tím se zánět více zesiluje. (Russell et al., 2016)

**Eosinofily** v periferní krvi – (více než 2, resp. 4 %), stanovení je vhodné při fenotypizaci CHOPN, určení překryvného syndromu s astmatem a léčby.

**Hladina surfaktantového proteinu D (SP-D)** což je protein vytvářený zánětem v plicích, ke zvýšení jeho koncentrace dochází u kuřáků. Jeho hodnota odpovídá s odpovědí na léčbu IKS. (Kolek et al., n.d.) Je dobrým indikátorem přítomnosti fibrotických lézí v plicích pacientů s CPFE (syndrom kombinované fibrózy a emfyzému). (Chiba et al., 2012)

## **Cytokiny a chemokiny**

### Prozánětlivé cytokiny:

IL-8, IL-6 jsou uvolňovány epiteliálními buňkami a makrofágy.

IL-8 je hlavní cytokin pro neutrofile, zvyšuje se při bakteriálních infekcích.

IL-6 stimuluje kostní dřeň k produkci krevních destiček a hepatocyty k produkci koagulačních faktorů a proteinů akutní fáze zánětu, jako CRP. Zvyšuje se rovněž při virových infekcích. IL-6 je pleiotropní cytokin, který zesiluje zánět a podporuje Th2 buňkami a Th17 buňkami zprostředkovanou imunitu. Hladiny exprese IL-6 jsou zvýšeny u těžkého astmatu a CHOPN ve sputu a plasmě a mohou zprostředkovat některé z viditelných systémových účinků u CHOPN a zhoršují komorbiditu. Blokování IL-6 s humanizovanou protilátkou (tocilizumab) na jeho receptor, IL-6R, je účinný při léčbě revmatoidní artritidy, ale dosud nebyla studována při těžkém astmatu nebo CHOPN. (Yao et al., 2014) (Kolek et al., n.d.)

IL-17, resp. IL-17 A IL-17 F jsou vysoce exprimovány u pacientů s těžkým astmatem a jsou spojovány s přítomností neutrofilního zánětu a častými exacerbacemi. Rovněž je IL-17 ve zvýšené míře přítomen i v dýchacích cestách pacientů s CHOPN. Mohlo by se jednat o dobrý terapeutický cíl pro pacienty s těžkým neutrofilním fenotypem astmatu a CHOPN, kteří jsou kortikorezistentní. Zatím je vyzkoušen v terapii chronických střečních zánětů a psoriázy, výzkumy u astmatu a CHOPN jsou na začátku (viz Brodalumab). (Kolek et al., n.d.)

### Prozánětlivé chemokiny:

CXCR2.

Makrofágy, T buněk, epitelové buňky a neutrofile produkují CXCL8, který chemotakticky přitahuje neutrofile díky pevné vazbě na CXCR2 (CXCR2). Tento receptor je exprimován především na neutrofilech a makrofázích. Je také aktivován i dalšími chemokiny jako CXCL1 a5, které jsou přítomny ve zvýšené míře ve sputu a BALTe u pacientů s CHOPN a zvyšují se dále při exacerbacích. Jako možná terapie CHOPN a těžkého astmatu (neutrofilního) se zkouší CXCR2 antagonisté (navarixin), podávání pacientům s CHOPN po dobu 6 měsíců perorální formou vedlo k redukci neutrofilů ve sputu a mírnému zlepšení FEV1, nevedl však k snížení počtu exacerbací. (Barnes, 2018)

### **Vyšetření buněk zánětu v indukovaném sputu**

U pacientů s CHOPN je zvýšený počet lymfocytů, makrofágů a neutrofilů, při exacerbacích se pak zvyšuje počet zánětlivých buněk, dále zvýšení leukotrienu B4 (LTB4), LTA4, cytokinů, TNFα, IL-8 a IL-6, i počet eozinofilů a tzv. RANTES (CCL5, což je chemoreaktant pro eozinofily, ale i T buněk, basofily a pomáhá rekrutovat leukocyty do místa zánětu). Viz výše (neutrofilní zánět). (Kolek et al., n.d.)

### **Vyšetření buněk zánětu v bronchoalveolární laváži**

Zastoupení buněk je podobné jako při vyšetření indikovaného sputa. Lze stanovovat a měřit i neutrofilní elastázu, myeloperoxidázu a většinu výše uvedených interleukinů a cytokinů.

### **Vyšetření malých dýchacích cest u pacientů s CHOPN**

#### **FENO**

Tabákový kouř snižuje produkci endoteliální NO-syntetázy (eNOS) a obsah argininu v buňkách endotelu. Pacienti se stabilizovanou CHOPN mají tedy hodnotu FENO sníženou ve srovnání s kuřáky astmatiky i nekuřáky astmatiky. Nicméně při vystupňovaném zánětu u těžké CHOPN může dojít ke zvýšení indukibilní NO-syntetázy (iNOS) a tím i ke zvýšení FENO. Při exacerbacích CHOPN díky nerovnováze oxidázového/antioxidázového systému se zvyšuje neutrofilní zánět a FENO může být zvýšeno. (Kolek et al., n.d.)

NO je odvozen endogenně z aminokyseliny L-argininu třemi izoformami enzymu NO syntázy (NOS); dvě konstitutivní syntázy NO (cNOS) se podílejí na fyziologické regulaci funkce dýchacích cest a indukovaná forma enzymu (iNOS) se podílí na zánětlivých onemocněních dýchacích cest a na obraně hostitele proti infekcím. Tumor necrosis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ), prozánětlivý cytokin, o kterém je známo, že zvyšuje expresi iNOS v epitelálních buňkách dýchacích cest, je u pacientů s CHOPN ve srovnání s normálními kuřáky zvýšen, což naznačuje, že iNOS může přispívat k progresi onemocnění. (MAZIAK et al., 1998)

Metoda MEFT-multiple exhalation flow technik dokáže odlišit exhalovaný NO z velkých a malých dýchacích cest. Lze tak monitorovat zánět v periferních dýchacích cestách a alveolech. (Kolek et al., n.d.)

Malé dýchací cesty hrají klíčovou roli u chronických nemocí s bronchiální obstrukcí (především CHOPN a astmatu), může být způsobena celou řadou mechanismů jako je hlen, zmenšení průměru lumen bronchů díky zánětlivým změnám, hypertrofií hladkého svalstva, zeslabením stěn. Navíc narušení konstrukčních vazeb dýchacích cest zvyšuje riziko kolapsu. Dochází tak k redukci průtoku vzduchu, zvýšení rezistence, trappingu a nehomogennímu rozložení ventilace. K měření můžeme využít i další metody (**spirometrie** – FEF 25-75, FEV1/FVC, FEV1/SVC, RV, RV/TLC, rezistence, **impulsní oscilometrii**, single breath nitrogen washout (**SBNW**) a multiple breath nitrogen washout (**MBNW**), **HRCT**, **hyperpolarizované MR**, **scintigrafie**, **SPECT**, **PET**). (McNulty and Usmani, 2014)

#### **KVV-kondenzát vydechovaného vzduchu**

Vzorky získané od pacientů vydechováním přes jednocestný ventil do ochlazeného kondenzátoru. Lze stanovovat pH kondenzátu (u pacientů s CHOPN a s GERD je snížená acidopnoe). Dále lze stanovovat koncentrace peroxidu vodíku (informace o oxidačním stresu), leukotrien B4 (chemoreaktant pro neutrofily) a 8isoprostan, který vzniká působením volných radikálů. U pacientů s CHOPN způsobují isoprostany bronchokonstrikci, zvýšení plasmatické propustnosti a sekrece hlenu. IL-6, nitrity a nitráty (oxidační stres) a další. (Horváth et al., 2005) (Kolek et al., n.d.).

#### **Vyšetření bioptických vzorků průdušek a plic**

V plicních biopsiích pacientů s CHOPN je patrný větší počet makrofágů (CD68+), leukocytů (CD45+), cytotoxických T lymfocytů (CD8+) a regulačních T lymfocytů (CD4+). Makrofágy a CD8 lymfocyty jsou lokalizovány převážně subepiteliálně, kde bývá u CHOPN pacientů, kuřáků i větší počet žírných buněk. (Zhu et al., 2007) Hodnota FEV1 u CHOPN pacientů koreluje s tíží nemoci a množstvím CD8+lymfocytů. Větší zastoupení T a B lymfocytů ve stěně alveolů koresponduje s plicním emfyzémem patrným na provedeném CT a ukazuje na autoimunitní komponentu nemoci (Kolek et al., n.d.). U stabilizované CHOPN nebývá ve slizničních vzorcích bronchiálních biopsií patrné zvýšení neutrofilů a eozinofilů, dochází k němu až při exacerbacích. Bronchiální hyperreaktivita u pacientů s CHOPN, kuřáků bývá zvýšená a s tím souvisí i vyšší zastoupení žírných buněk. (Zhu et al., 2007) V plicních cévách nalezneme zvýšený počet zánětlivých buněk (makrofágy, T lymfocyty) a strukturální změny (ztluštění intimy, dysfunkce endoteliálních buněk, zvýšení počtu buněk hladké svaloviny), což souvisí s postupným rozvojem plicní hypertenze. (Kolek et al., n.d.) (Soltani et al., n.d.)

#### **Základní fenotypy CHOPN a fenotypicky cílená terapie ve vztahu ke klinickým a zánětlivým biomarkerům:** (Kobližek et al., n.d.)

Národní fenotypická klasifikace CHOPN upravena se zaměřením a rozvahou nad možnými biomarkery, blíže viz **Tab.č. 2**.

V rámci jednoho pacienta se uvedené fenotypy mohou prolínat. Fenotypy a endotypy CHOPN jsou předmětem recentních studií, na jejich další výsledky je potřeba vyčkat.

- **Bronchitický**

**Klinické biomarkery (BM):** přítomnost produktivního kašle >3 měsíce za rok v posledních nejméně 2 letech, výrazná produkce sputa, častější exacerbace, progresse nemoci.

**Funkční a zobrazovací BM:** CT změny průdušek – zvýšený poměr bronchiální stěny ku stěně cévní.

**Imunologické BM:** CXCR2, makrofágy, neutrofilie ve sputu, 8isoprostan v KVV, acidopnoe sputa (KVV)

možné endotypy

- endotyp vysokého systémového zánětu: CRP, fibrinogen, TNF $\alpha$
- endotyp neutrofilního zánětu: sputum-neutrofilie a aktivita zánětu: NE, MMP9, LTA4H, MPO, IL-8, PGP (proline-glycerin-proline v séru a sputu) nepatří mezi praktické rutinní metody

**Cílená léčba:** mukolytika, expektorans, ATB\*, roflumilast\* (PDE4i), imunomodulační, expektorační výdechové pomůcky. (Russell et al., 2016)

\*u roflumilastu a azitromycinu byl potvrzen efekt na snížení exacerbací

\*Azitromycin: pacienti léčení AZT měli nižší hladinu PGP ve sputu

\*Roflumilast působí také cestou PGP –přerušením mechanismu předávání neutrofilního zánětu řízeného cestou PGP (viz výše) a při terapii dochází k jeho snížení ve sputu. (Wells et al., 2015)

Roflumilast, který je součástí běžné terapie CHOPN a jde svým způsobem fenotypicky cílenou terapií. Jde o inhibitor fosfodiesterázy-4, Inhibice PDE4 vede ke zvýšení intracelulárních hladin cAMP. PDE4 je hlavní izoenzym, který metabolizuje cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), ve strukturálních i imunitních buňkách významných pro patogenezi CHOPN experimentálních modelech zmírňuje poruchu funkce leukocytů, buněk vaskulárních hladkých svalů v dýchacích cestách a plicích, endoteliálních buněk a epiteliálních buněk v dýchacích cestách a fibroblastů, souvisejících s CHOPN. Po in vitro stimulaci lidských neutrofilů, monocytů, makrofágů či lymfocytů roflumilast a roflumilast N-oxid brání uvolňování zánětlivých mediátorů, např. leukotrienu B4, reaktivních druhů kyslíku, TNF $\alpha$ , interferonu  $\gamma$  a granzymu B. (DAXAS 500MCG Potahovaná tableta — Databáze léčiv, n.d.) (Rabe, 2011). Lék má především protizánětlivý efekt nežli bronchodilatační, i když byl potvrzen i efekt na postbronchodilatační hodnotu FEV1, snížení rizika exacerbací, snížení počtu neutrofilů a eozinofilů, prevence rozvoje emfyzému u kuřáků. U astmatiků snižuje reakce časné a pozdní fáze při setkání s alergenem, snížení bronchiální hyperreakivity, zlepšení FEV1 a peak-flow, symptomů. Zjišťuje se jeho možný pozitivní efekt na CHOPN komorbiditu, především kardiální. Hlavním nežádoucím účinkem je GIT intolerance (průjem, nauzea), dává se zpočátku pozvolně. (Boswell-Smith et al., 2006)

- **Emfyzematický**

**Klinické BM:** nepřítomnost produktivního sputa

**Funkční a zobrazovací BM:** pokles TLCO, FEV1, HRCT-emfyzém, CT denzitometrie

Radiologické endotypy:

- s predilekcí v horních lalocích – indikace cílené terapie LVRS s lepším přežitím
- u deficitu A1AT je predilekce v dolních lalocích (ale může se lišit na základě působení více faktorů-kouření, věk), bývá spojen i s bronchiektáziemi
- u čistě emfyzematického fenotypu je snížený poměr tloušťky bronchiální a arteriální stěny (BW:AW)

Subendotyp neutrofilního zánětu s rozvojem emfyzému

**Imunologické BM:** deficit A1AT stanovený v séru (jediný jednoznačný endotyp resp. spíše genotyp CHOPN) (Russell et al., 2016)

**Cílená léčba:** LVRS/bulektomie, BLVR, transplantace, substituce A1AT, teofylin (Miravittles et al., 2017) (Kočová et al., 2016)

- **Bronchiektatický**

**Klinické BM:** každodenní zvýšená expektorace, mladší věk, často nekuřáci, prolongované a rekurentní infekce DCD a plic, hemoptýzy.

**Funkční a zobrazovací BM:** HRCT známky bronchiektázií

**Imunologické biomarkery:** obdobně jako u bronchitického fenotypu: neutrofilie v IS, častější známky zánětu, bakteriální kolonizace sputa

I tomuto fenotypu můžeme řadit i endotypy:

- endotyp vysokého systémového zánětu: CRP, fibrinogen, TNF $\alpha$
- endotyp neutrofilního zánětu: sputum-aktivita MMP9, LTA4H, MPO, IL-8 (není rutinní)

**Cílená léčba:** mukolytika, ATB, důraz na expektoraci – plicní rehabilitace a expektorační pomůcky

- **Frekventní exacerpace**

**Klinické BM:** přítomnost četných exacerbací léčených systémovými kortikosteroidy anebo antibiotiky  $\geq 2$  exacerbace /rok.

**Funkční a zobrazovací BM:** deklinace plicních funkcí, FENO (marker odpovědi na léčbu)

**Imunologické BM:** eosinofilie a neutrofilie ve sputu, periostin (marker odpovědi na léčbu), IL-4, 13, chemokiny jako CXCL1 a5 (jsou přítomny ve zvýšené míře ve sputu a BALTe u pacientů s CHOPN a zvyšují se dále při exacerbacích-význam pro praxi?)

**Cílená léčba:** roflumilast u pacientů s FEV1 pod 50%, ATB-azitromycin, vakcinace, IKS/LABA/LAMA. (Brusselle et al., 2018)

Za frekventní exacerpace nemusí být zodpovědná pouze eozinofilie a není proto vhodná automatická IKS léčba a za recidivujícími exacerbacemi mohou být bakteriální a virové infekty (vzhledem k imunodefektům, BE, aj.). (Švarc, Koblížek, Blažek - 2017 - Eozinofilie a možnosti predikce odpovědi na inhalační kortikosteroidy (IKS) u chronické obs, n.d.) (Siva et al., 2007)

- **Plicní kachexie**

**Klinické BM:** FFM, BMI-FFM (index tuku prosté tkáně-fat free mass)  $< 16$  kg/m<sup>2</sup> u mužů a FFM  $< 15$  kg/m<sup>2</sup> u žen nebo BMI  $< 21$  kg/m<sup>2</sup> pro obě pohlaví. Bez jiné zjevné příčiny.

**Funkční a zobrazovací BM:** vyšetření svalové síly

**Imunologické BM:** měření výživových parametrů, svalových enzymů? Zvýšená hladina TNF $\alpha$ \*

**Cílená léčba:** nutriční podpora – přímo pomáhá zlepšovat funkce respiračních a periferních kosterních svalů a výkon při speciální rehabilitaci, sleduje se efekt anabolik. (Schols, 2002)

\*pozn. hladiny TNF $\alpha$  se zvyšují u pacientů s CHOPN a to může souviset s kachexií a ztrátou kostních svalů, ale malá studie infliximabu u pacientů s kachexií a COPD neprokázala žádný klinický přínos v plicích nebo svalech, jednalo se o malý soubor pacientů. (Barnes, 2018) (Dentener et al., 2008)

- **Překryv CHOPN s astmatem**

- Hlavní kritéria-výrazně pozitivní BDT (vzestup FEV1 >15% + > 400ml), zvýšení počtu eosinofilů ve sputu/periferní krvi, FENO ≥ 45-50 ppb, astma v anamnéze.
- Vedlejší kritéria – pozitivní BDT (vzestup FEV1 > 12% + > 200ml), zvýšení celkového IgE, atopická anamnéza.

**Klinické BM:** mohou mít známky atopie, inklinovat k větší produkci hlenu a exacerbacím

**Funkční a zobrazovací BM:** pozitivní BDT, FENO (marker odpovědi na léčbu)

**Imunologické BM:** zvýšení počtu eosinofilů ve sputu/periferní krvi, FENO ≥ 45-50 ppb, zvýšení celkového IgE, ztlustění bazální membrány v bioptických vzorcích. (Brusselle et al., 2018) (Barnes et al., 2016)

**Cílená léčba:** IKS/LABA, IKS/LABA/LAMA, anti-LT. (Brusselle et al., 2018) (Barnes et al., 2016)

Tab. č. 2 Potencionální biomarkery u CHOPN

| Fenotypy CHOPN        | BIOMARKERY                                                                                                                                                                                                                                             |                                                         |                                                                                                                                                                          | Možné endotypy                                                                                                                                                    | TERAPIE (cílená)                                                                            | REFERENCE                                                                                       |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                       | Klinické                                                                                                                                                                                                                                               | Funkční a zobrazovací                                   | Imunologické                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                   |                                                                                             |                                                                                                 |
| Bronchitický          | Produktivní kašel<br>Častější exacerbace<br>Progrese nemoci                                                                                                                                                                                            | CT změny průdušek<br>↑ poměr BW/AW                      | CXCR2,<br>makrofágy,<br>neutrofily ve<br>sputu,<br>8isoprostan<br>z KVV, acidophoe<br>sputa                                                                              | <b>VYSOKÉHO SYSTÉMOVÉHO ZÁNĚTU</b><br><br>CRP, fibrinogen, TNFα<br><br><b>NEUTROFILNÍHO ZÁNĚTU</b><br>NE, MMP9, LTA4H,<br>MPO, IL-8, PGP                          | ATB<br>roflumilast<br>RHC                                                                   | (Wells et al., 2015)<br>(Rabe, 2011)<br>(Boswell-Smith et al., 2006)<br>(Koblížek et al., n.d.) |
| Emfyzematický         | nepřítomnost<br>produktivního sputa                                                                                                                                                                                                                    | pokles TLCO, FEV1,<br>HRCT-emfyzém, CT<br>denzitometrie | deficit alfa1-AT<br>stanovení v séru                                                                                                                                     | <b>Radiologické endotypy</b><br>-s predilekcí v horních<br>lalocích<br>- predilekce v dolních<br>lalocích u deficit A1AT<br>-čistě emfyzematický<br>↓ poměr BW/AW | LVRS/bulekto-<br>mie, BLVR,<br>transplantace,<br>substituce<br>alfa1-AT,<br>teofylin<br>RHC | (Miravitlles et al., 2017)(Kočová et al., 2016)<br>(Russell et al., 2016))                      |
| Bronchiectatický      | zvýšená expektorace<br>mladší věk<br>často nekuřáci<br>prolongované a<br>rekurentní infekce<br>DDC, hemoptýza                                                                                                                                          | HRCT známky<br>bronchiectázií                           | neutrofily v IS,<br>častější známky<br>zánětu,<br>bakteriální<br>kolonizace sputa                                                                                        | <b>VYSOKÉHO SYSTÉMOVÉHO ZÁNĚTU</b><br>CRP, fibrinogen, TNFα<br><br><b>NEUTROFILNÍHO ZÁNĚTU</b><br>aktivita MMP9, LTA4H,<br>MPO, IL-8                              | mukolytika,<br>ATB, důraz na<br>expektoraci<br>RHC                                          | (Koblížek et al., n.d.)                                                                         |
| Frekventní exacerbace | přítomnost četných<br>exacerbací                                                                                                                                                                                                                       | deklínace plicních<br>funkcí, ↑FENO                     | eosinofilie a<br>neutrofilie ve<br>sputu, periostin<br>(IL-4, 13,<br>chemokiny CXCL 1<br>a 5 ↑ ve sputu a<br>BALTe u pacientů<br>s CHOPN a ↑ se<br>při exacerbacích      |                                                                                                                                                                   | roflumilast u<br>pacientů<br>s FEV1 pod 50<br>ATB-AZM<br>vakcinace<br>IKS/LABA/LA<br>MA     | Švarc, Koblížek,<br>Blažek - 2017<br>(Siva et al., 2007)                                        |
| Plicní kachexie       | FFM <16 kg/m <sup>2</sup> u mužů a<br>FFM <15 kg/m <sup>2</sup> u žen<br>nebo BMI <21 kg/m <sup>2</sup> pro<br>obě pohlaví. Bez jiné<br>zjevné příčiny.                                                                                                | vyšetření svalové síly                                  | měření<br>výživových<br>parametrů,<br>svalových<br>enzymů, zvýšená<br>hladina TNFα                                                                                       |                                                                                                                                                                   | nutriční<br>podpora<br>anabolika                                                            | (Schols, 2002),<br>(Barnes, 2018)(Dentener et al., 2008)                                        |
| Překryv CHOPN/astma   | <u>Hlavní kritéria:</u><br>++ BDT (FEV1 >15 %<br>>400ml)<br>eos ve sputu/periferní<br>krvi, FENO ≥ 45-50 ppb,<br>astma v anamnéze<br><u>Vedlejší kritéria</u><br>+BDT (vzestup FEV1 >12<br>% + >200ml), zvýšení<br>celkového IgE, atopická<br>anamnéza | pozitivní BDT, FENO<br>(marker odpovědi na<br>léčbu)    | zvýšení počtu<br>eosinofilů ve<br>sputu/periferní<br>krvi, FENO ≥ 45-<br>50 ppb, zvýšení<br>celkového IgE,<br>ztluštění bazální<br>membrány<br>v bioptických<br>vzorcích |                                                                                                                                                                   | IKS/LABA,<br>IKS/LABA/LA<br>MA, anti-LT                                                     | (Koblížek et al., n.d.)<br>(Brusselle et al., 2018)<br>(Barnes et al., 2016)                    |

## BIOMARKERY U FIBROTIZUJÍCÍCH PLICNÍCH NEMOCÍ

### Potencionální biomarkery:

Toto téma je zmíněno pouze okrajově, neboť přímo nesouvisí s vlastním řešením studie.

Řada klinických biomarkerů (např. charakter a distribuce rentgenologických/CT změn) napomáhá bližší klasifikaci IPP. Zánětlivé biomarkery zkoumané u idiopatických fibrotizujících plicních onemocnění odrážejí procesy, které jsou základem zjizvení plic. Výzkum patogeneze IPF v posledních letech značně pokročil a posunul své zaměření od procesů, které řídí chronický zánět s fibrózou, jako konečný výsledek, k dysfunkci alveolárního epitelu a poranění s aberantním hojením ran a poruchou fibroproliferace.

Řada molekul podílejících se na níže uvedených procesech, byly popsány jako potenciální sérové, BAL a tkáňové biomarkery. (van den Blink et al., 2010)

- 1) poškození a opravy epitelu (např. surfaktantové proteiny SP-A a SP-D, Krebs von den Lungen (KL) -6, Clara buněčný sekreční protein (CC) -16
- 2) zánět (CD28, MCP-1, MIP1a, CXCL-11, TNF, LDH, sIL-2R, CCL-18)
- 3) akumulace myofibroblastů a depozice matrice (cirkulující fibrocyty, protein 47 tepelného šoku (HSP47), matrixové metaloproteinázy (MMP), TGFβ
- 4) angiogeneze (vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), IL-8
- 5) koagulace a oxidační stres

Surfaktantové proteiny SP-A a SP-D, jsou produkovány v plicích primárně alveolárními epitelovými buňkami typu II a jsou důležitými složkami vrozené imunity plic. Sérové hladiny SP-A a SP-D jsou zvýšeny u IPF, ale i jiných plicních onemocnění, pravděpodobně v důsledku hyperplazie pneumocytů typu II anebo rozpadu epiteliální bariéry. Surfaktantní proteiny mohou hrát roli v samotné patogenezi IPF. Aberantní zpracování povrchově aktivního proteinu endoplazmatickým retikulem bylo zapojeno do patogeneze IPF a genetické defekty v SP-A2 byly spojeny s familiárním IPF. (Kuroki et al., 1998) (Wang et al., 2009)

CD 28 je ko-stimulační molekula exprimovaná na povrchu téměř všech CD4+ T buněk zdravých jedinců, která je downregulována po opakovaných cyklech proliferace T buněk řízené antigenem. U pacientů s IPF s neobvykle velkým podílem periferních CD4+ T buněk s downregulovaným CD28 bylo zjištěno, že mají vyšší pravděpodobnost, že budou vyžadovat transplantaci plic v průběhu roku. (Gilani et al., 2010)

Zmnožení fibroblastů v plicích je zřejmě klíčový faktor patologického hojení alveolárních lézí u IPF a je předstupněm definitivní remodelace plicní tkáně. Myofibroblasty v plicích nejspíše vznikají diferenciací z rezidentních buněk nebo migrací z mimoplicních lokalizací. Myofibroblasty sekrecí matrixových metaloproteináz (MMP) mohou přímo poškozovat bazální membránu. Především jsou zkoumány matrixové metaloproteinázy MMP 1 a 7. (Huh et al., 2008) (SUGA et al., 2000)

Fibrotizující plicní procesy mají i významnou angiogenní a angiostatickou složku. Buňky alveolárního epiteliálního typu II v blízkosti cév produkují silné angiogenní faktory VEGF a IL-8. (Simler et al., 2004)

Oxidační stres může hrát roli v epiteliální dysfunkci, která je základem plicní fibrózy; předpokládá se, že zvýšená produkce oxidantů se podílí na apoptóze epiteliálních buněk a dysregulované reparaci. V kondenzátu vydechaného vzduchu u pacientů s IPF byly zjištěny vyšší hladiny H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 8isoprostanu. (Psathakis et al., 2006)

U EAA a sarkoidózy alveolární epitelie exprimují IL-4 a INFγ ale u IPF je detekována pouze exprese IL-4.

## Role periostinu u IPF (O'Dwyer and Moore, 2017)

Periostin je vysoce exprimován v plicích a nachází se u zvýšených hladin v oběhu pacientů s IPF. K expresi periostinu dochází především v oblastech aktivní fibrózy, včetně oblastí fibrotických ložisek, které jsou považovány za charakteristické histopatologické znaky diagnostické při IPF. Nachází se také v subepiteliálních a subendoteliálních oblastech. Některé další studie potvrdily, že zvýšené hladiny periostinu v séru nebo plazmě mohou předpovědět pokles plicní funkce během 6 měsíců. Periostin může být významným biomarkerem aktivity onemocnění starších pacientů, protože nový výzkum naznačuje, že u zdravých jedinců, jsou hladiny periostinu stabilní u jedinců ve věku 30-32 a po 70. roce. (Walsh et al., 2017). Toto zvýšení periostinu v průběhu onemocnění IPF není až tak překvapivé, protože dva důležité profibrotické mediátory (TGF- $\beta$  a IL-13) jsou rovněž vysoce exprimované ve fibrotické tkáni a pravděpodobně zprostředkovávají nárůst periostinu pozorovaný u IPF. Předpokládá se, že periostin může hrát důležitou roli při napomáhání zpevnění ECM (extracelulární matrix) plic. Například zesílení mezi kolagenovými fibrily je katalyzováno lysyl oxidázami. Periostin umí aktivovat kostní morfogenetický protein-1 ke štěpení lysyl oxidazy, která pak zpětně aktivuje lisyloxidasu, která je lokalizována na ECM, což vede k zasíťování kolagenových vláken a zvýšení tuhosti ECM. Zdá se, že toto zvýšení tuhosti ECM podporuje pokračující aktivaci fibroblastů a fibróza progreduje. (Okamoto et al., n.d.) (Komiya et al., 2017)

Vzhledem k rostoucímu přesvědčení, že bakteriální infekce nebo změny v mikrobiómu mohou podporovat plicní fibrózu. Zkouší se antibiotická terapie jako možná terapeutická modalita u pacientů s IPF. Studie ukázala, že klaritromycin byl schopen zmírnit expresi periostinu dokonce i přes stimulaci IL-13. Antibiotika by tedy mohla působit na plicní fibrózu prostřednictvím inhibice periostinu. (Komiya et al., 2017)

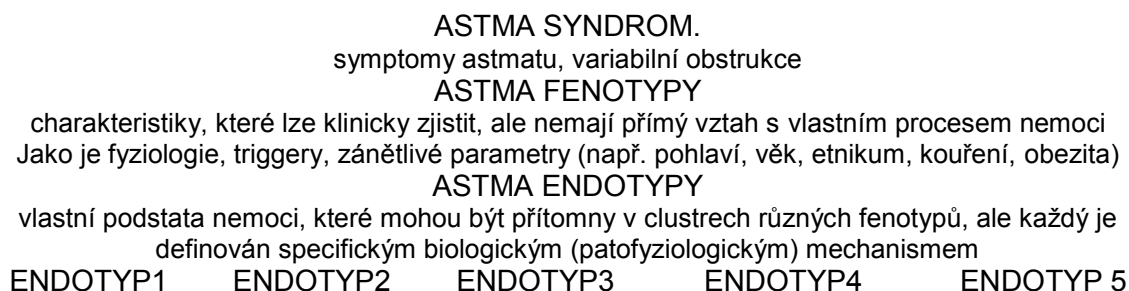
Periostin hraje tedy v patofyziologii IPF významnou roli, včetně diferenciací myofibroblastů, produkce kolagenu typu 1 a zasíťování vláken v plicní matrix. Je také biomarkerem klinické progresu nemoci. (Komiya et al., 2017) (O'Dwyer and Moore, 2017)

## BIOMARKERY U BRONCHIÁLNÍHO ASTMATU

Astma je chronické velice heterogenní onemocnění charakterizované zánětem dýchacích cest, typickými symptomy a variabilní obstrukcí dýchacích cest. Rozlišujeme řadu endotypů (které jsou určeny patofyziologickými změnami) a fenotypy, které jsou dány charakteristickými rysy daného jedince, určenými jak genotypem, tak faktory prostředí.

Jeden endotyp může obsahovat více fenotypů, a naopak jeden endotyp může být spojen s řadou fenotypů, viz níže. (Lötvall et al.)

**Schéma č.4** Vztah endotypu a fenotypu. (Lötvall et al., 2011), poupraveno dle (Katial et al., 2017)



### KLINICKÉ BIOMARKERY A KLASIFIKACE/FENOTYPIZACE ASTMATU

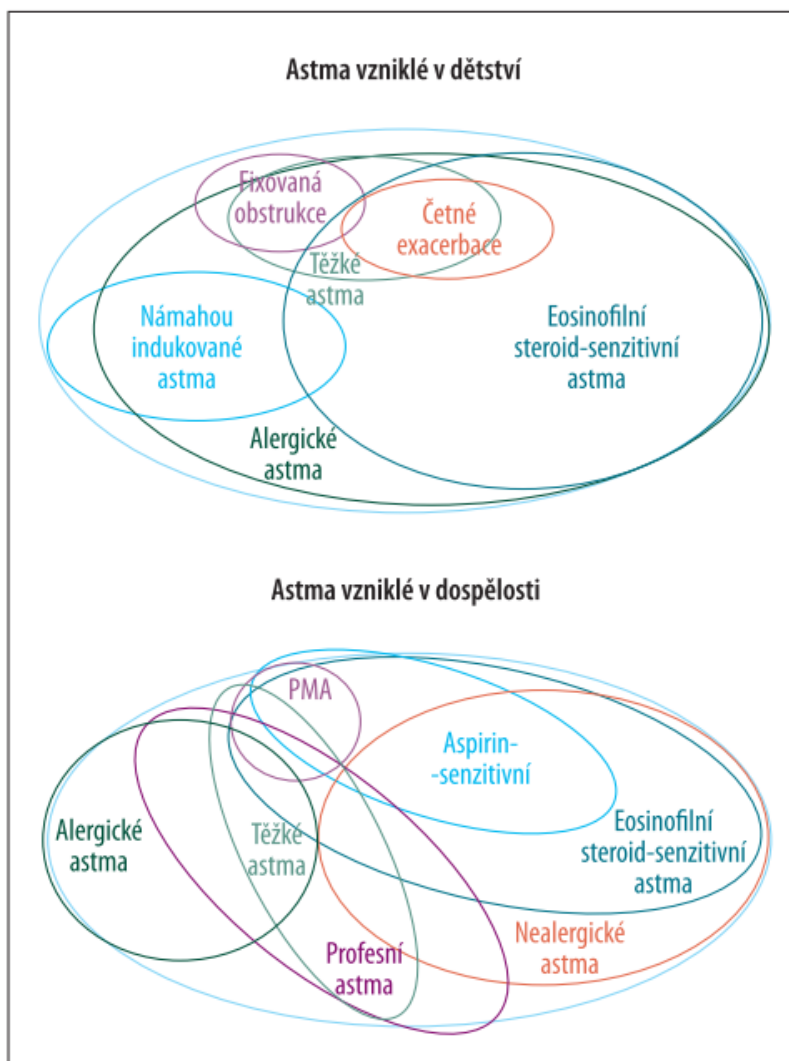
Klasifikací astmatu pomocí biomarkerů se v poslední době věnuje celá řada publikovaných prací s různým úhlem pohledu. V dalším je pro ilustraci uvedeno několik různých pohledů na dělení fenotypů a endotypů, kde dominujícím kritériem jsou klinické charakteristiky/biomarkery typické pro daný fenotyp.

#### Fenotypy / Endotypy (Lötvall et al., 2011)

- Eosinofilní astma: alergické astma dospělých, AIA-aspirinem indukované astma, těžké hypereosinofilní astma s pozdním začátkem, alergická bronchopulmonální mykóza (ABPM)
- Astma náchylné k exacerbacím: alergické astma dospělých, aspirinem indukované astma, těžké hypereosinofilní astma s pozdním začátkem, astma s prediktivními indiciemi v dětském věku (API), alergická bronchopulmonální mykóza, viry indukované astma, premenstruační astma
- Astma související s obezitou: obstrukce dýchacích cest způsobená obezitou, kortikodependentní astma, těžké hypereosinofilní astma s pozdním začátkem
- Námahou indikované astma (EIA): astma běžců na lyžích, astma ostatních vrcholových sportovců, astma s prediktivními indiciemi v dětském věku (API)
- Astma začínající v dospělém věku: aspirinem indukované astma (AIA), infekcí indukované astma (IIA), těžké hypereosinofilní astma s pozdním začátkem
- Astma s ireverzibilní obstrukcí dýchacích cest: neeosinofilní (neutrofilní astma)
- Astma se špatnou odpovědí na léčbu kortikosteroidy: neeosinofilní (neutrofilní) astma, eozinofilní astma necitlivé na léčbu kortikosteroidy, obstrukce dýchacích cest způsobená obezitou

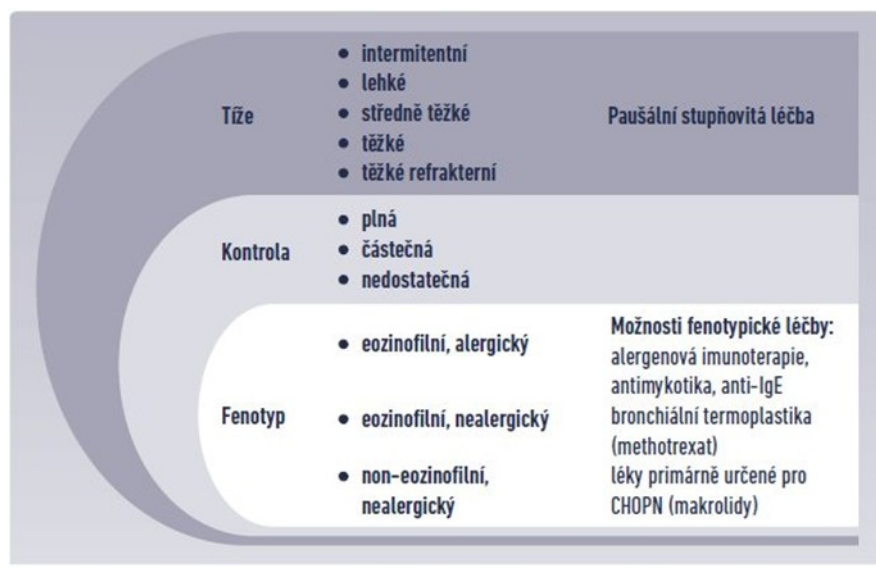
### Další pohled na fenotypicko-endotypové dělení astmatu dle Sally Wenzel

**Schéma č. 5** Dle Sally Wenzel: Vennovy diagramy rodění fenotypů astmatu vzniklého v dětství a v dospělosti (Wenzel, 2012) použito v (Sedlák, V Koblížek, 2009)



Česká republika se stala první zemí, kde vzniklo v r. 2015 národní doporučení, fenotypizující astma na základě spojitosti klinických projevů a bližších charakteristik zánětu, konkrétně přítomnosti eozinofilie a alergie, vyúsťující ve tři základní fenotypy: 1. eozinofilní alergické, 2. eozinofilní nealergické a 3. non-eozinofilní, nealergické astma.

**Tab č. 3** Multifunkční kombinovaná fenotypická klasifikace podle Kašáka a Teřla 2009 (Milan Teřl et al., n.d.)



**Alergický eozinofilní fenotyp** je výsledkem získané, specifické imunity a je imunologicky označován jako T helper-2 (Th2) zprostředkovaná nemoc. Hlavní roli zde hraje interleukin 4 (IL-4) a imunoglobulin E (IgE), dále IL-13 a ev. IL-5. Z klinického hlediska se jedná o nejčastější a zároveň většinou nejlépe léčitelný fenotyp astmatu. Nejtěžší formy se vyskytují zvláště při senzibilizaci na plísňe a/nebo významné senzibilizaci na jiné ubiquiterní alergeny a jsou charakterizovány vysokými hladinami celkového i specifických IgE a někdy i významnou nejen průduškovou, ale i periferní eozinofilií. (Terl et al., 2017)

**Nealergický eozinofilní fenotyp** je výsledkem vrozené, nespecifické imunity a je imunologicky označován jako typ 2 innate lymphoid cells (ILC) zprostředkovaná nemoc.

Podstatným z pohledu možností biologické léčby je zde IL-5, dále pak ev. IL-13. Z klinického hlediska se jedná o astma propukající většinou až ve středním věku, často doprovázené či předcházené nosní polypózou; pokud je přítomna i intolerance nesteroidních antirevmatik, mluvíme o Samterově trias. Nejtěžší formy jsou pravidelně provázeny významnou periferní, resp. systémovou eozinofilií. (Terl et al., 2017)

**Non-eozinofilní fenotyp** je výsledkem (type2-low) imunitní cesty, která je nejméně prozkoumána a téměř jistě budou charakterizovány její subtypy. Z pohledu biologické léčby neexistují k dnešku konkrétní terče, v úvahu přicházejí cytokinové dráhy směřující k neutrofilií, ev. makrofágům: TNF, IL-17 a IL-23, chemokiny (CXCR2) aj. Z klinického hlediska se většinou jedná o starší obézní nemocné, častěji ženy, ev. pacienty s chronickou infekcí průdušek, ev. o kuřáky, kombinující astma s CHOPN. Ani u nejtěžších forem tohoto fenotypu se neseťkáváme s přítomností průduškové nebo systémové eozinofilie. (Terl et al., 2017)

### 3.2.3 Imunologické markery u chronických zánětlivých a fibrotizujících plicních nemocí se zaměřením na astma

#### Krev

- Celkové a specifické IgE
- Eosinofily
- ECP
- Periostin
- Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4)
- Kortizol

#### Indukované sputum

- Eosinofily, neutrofily, makrofágy
- IL-13
- ECP, MPO, MBP
- YLK-40

#### Bronchoalveolární lavážní tekutina (BALTE)

- Eozinofily/neutrofily/makrofágy/monocyty
- ECP, MPO, MBP a další

#### Moč

- Urinary LTE4 (močový leukotrien E4)
- Urinary BrTyr (močový bromotyrosin)
- Kortizol

#### Plicní biopsie

- Eozinofily, neutrofily, makrofágy, monocyty, T buňky
- Epitelové buňky (ev. EGFR), pohárkové buňky a submukózní žlázy, hladká svalovina a bazální membrána
- Angiogeneze (VEGF)
- YKL-40
- Stanovení genové exprese z brush epitelu-POSTN, CLCA1, serpinB2

#### Nosní biopsie

- Eozinofily
- PAS barvení k vyloučení plísňové infekce

#### OSTATNÍ FUNKČNÍ A ZOBRAZOVACÍ BIOMARKERY ASTMATU

- Měření plicních funkcí – spirometrie (měření bronchiální hyperreakivity)
- FENO
- Kondenzát vydechaného vzduchu
- HRCT – měření strukturálních změn průdušek

#### Podrobněji k jednotlivým biomarkerům a metodám jejich stanovení:

- **Celkové a specifické IgE**

Biomarker atopického astmatu

Metoda stanovení: NEINVAZIVNÍ

Serologický mutiialergenový screenig: Phadiatop (test pro potvrzení atopiků, v jednom stanovení je zjištěna přítomnost spec. IgE protilátek proti směsi nejčastějších alergenů).

Celk.IgE: FDA-cleared immunoassay: EIA, Phadia, ImmunoCAP aj.

Spec.IgE: serum immunoassay

– výsledky jsou spolehlivé a reprodukovatelné (koeficient variability 15 %)

Skin prick testy – jsou často nejednoznačné, mohou být ovlivněny užíváním některých léků (nejsou vhodné pro výzkumné účely). (Szeffler et al., 2012a)

Pozn. koncentrace celkového IgE (norma většinou do 100 IU/l) má omezenou informační hodnotu, neboť jeho normální hodnota ještě nevylučuje přítomnost klinicky významné alergie a naopak, ani vysoké hodnoty nemusí znamenat přítomnost alergie.

Negativní výsledek alergologického vyšetření ještě alergii nevylučuje (omezená citlivost testů, senzibilizace na vedlejší a vzácné komponenty atd.). (Milan Teřl et al., n.d.)

Kortikosteroidy indukují IgE syntézu, ale také snižují sérové IgE (např. jako u ABPA). V případě léčby omalizumabem dochází k zvýšení celkového IgE, ale je snížena hladina volného (free-IgE), nelze jej využít k monitoraci této léčby. (Jabara et al., 1991) (Medrek et al., 2017)

- **Eosinofily v periferní krvi (Eos)**

Biomarker eosinofilního zánětu, monitorace systémového efektu protizánětlivé terapie, aktivita nemoci

Metoda stanovení: NEINVAZIVNÍ

Stanovení diferenciálního rozpočtu krve pomocí automatického analyzátoru, vyjádřeno v absolutní hodnotě (eozinofily  $\times 10^9$  /L), rozsah mezi 0,015-0,65  $\times 10^9$  /l

Pozn: hladina zvýšena u pacientů s astmatem, výše koreluje se symptomy nemoci, mírou hyperreakivity a diurnální variabilitou peak flow, je nepřímo úměrná hodnotě FEV1 a hladině kortizolu (denní variabilita eozinofilů nejnižší ráno a nejvyšší večer opačně pak kortizol). Cvičení a kouření může zvýšit hladinu Eos. (Szeffler et al., 2012a)

Účastní se remodelace dýchacích cest a imunoregulačních dějů (roli IL-4, IL-13, IL-5), hodnota klesá po zahájení terapie anti-IL5, anti-IgE, anti-ILT. Společně s FENO hodnotou jsou hodnoty zvýšeny u těžkých astmatiků s přetrvávající bronchiální obstrukcí. (Szeffler et al., 2012a)

Aktivace eozinofilů viz močový bromotyrosin.

Stanovení proteinů specifických granul eozinofilů:

- **ECP** (eozinofilní kationický protein)

Biomarker eosinofilního zánětu-prediktivní

Metoda stanovení: NEINVAZIVNÍ

enzymatická imunoanalýza (ELISA, chemiluminiscence), normální hladiny se pohybují v rozmezí 0–24  $\mu\text{g/l}$  (Liška, n.d.)

Pozn: bílkovina obsažená v sekundárních granulích eozinofilů.

U dospělých pacientů hladina sérového ECP přímo koreluje s počtem aktivovaných eozinofilů ve sliznici průdušek a u dětí je markerem závažnosti astmatu a exacerbací.

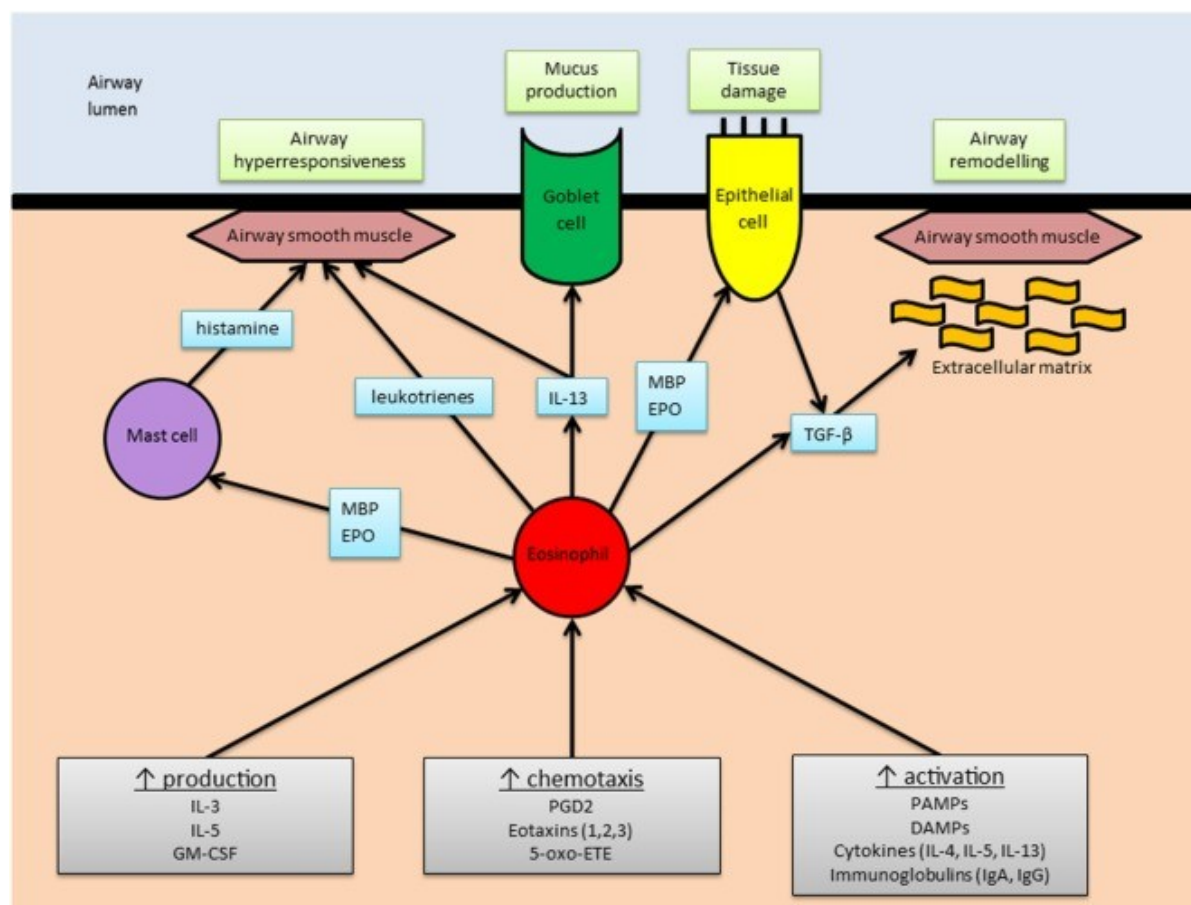
Pomáhá při diagnostice a monitoraci léčby alergického astmatu.

Ne zcela specifický pro astma-hladina může být zvýšena i u atopického ekzému.

**Schéma č. 6** Role eosinofilů v patofyziologii astmatu převzato z (McBrien and Menzies-Gow, 2017)

**Eosinofily**

Pro EOS je charakteristická přítomnost velkých specifických granulí (sekundární granule), odlišuje eosinofily od jiných granulocytů (neutrofilů a bazofilů). Specifické granule se skládají z hustého krystalického jádra a matrice, obklopené membránou. Obsahují velký počet mediátorů schopných indukovat zánět anebo poškození tkání, včetně základních proteinů, cytokinů, chemokinů, růstových faktorů a enzymů. Převládajícími látkami jsou proteiny: hlavní základní protein (MBP) se nachází v jádře, zatímco matrice obsahuje eosinofilní kationtový protein (ECP), eosinofilní peroxidázu (EPO) a neurotoxin odvozený od eosinofilů (EDN).



Zkratky: MBP, hlavní bazický protein; EPO, eosinofilní peroxidáza; IL, interleukin; TGF- $\beta$ , transformující růstový faktor- $\beta$ ; GM-CSF, faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů; PGD2, prostaglandin-D2; 5-oxo-EETE, 5-oxo, 6, 8, 11, 14-eikosatetraenová kyselina; PAMP, molekulární vzory spojené s patogenem; DAMP, poškození molekulárních vzorců; Ig, imunoglobulin.

- **MPO** myeloperoxidáza

Biomarker neutrofilního zánětu (eosinofilní – EPO)

Metoda stanovení: NEINVAZIVNÍ v krvi, KVV a INVAZIVNÍ v IS a BAL

enzymatická imunoanalýza (ELISA, chemiluminiscence)

Enzym lokalizovaný v primárních granulech granulocytů, sekundárních (specifických) granulech eosinofilních granulocytů a v azurofilních granulech monocytů. Bazofily jsou negativní. Charakter MPO eosinofilů je geneticky, biochemicky i imunologicky od ostatních buněk odlišný a rezistence na kyanid se využívá při jejím průkazu. (Acharya and Ackerman, 2014)

Funkce MPO: při aktivaci neutrofilních granulocytů ve spojitosti s fagocytózou jsou v neutrofilech vytvářeny volné radikály a další reaktivní formy kyslíku, které jsou nakonec za katalytického působení

MPO přeměňovány na kyselinu chlornou, která je až padesátkrát účinnější v zabíjení mikrobů než peroxid vodíku. Hereditární deficit MPO není asi v polovině případů doprovázen žádnými příznaky, ostatní pacienti obvykle nemají problém se zabíjením bakterií, jsou však ohroženi mykotickou infekcí, zejména při oslabení organismu jinou závažnou chorobou. Význam má nález zvýšené koncentrace MPO v plazmě jako slibný ukazatel nestabilního plátu a má i prognostický význam s ohledem na vznik další koronární příhody a celkové přežití nemocných. (Racek, 2008)

- **MBP** (hlavní bazický protein)

Nachází se v jádře specifických granulí eozinofilů

Biomarker: protein aktivace eozinofilů, účastní se boje proti parazitům spolu s EPO (O'Connell et al., 2011)

Metody stanovení: INVAZVNÍ v IS, BALTE, NEINVAZIVNÍ v krvi

- **Eosinofily ve sputu:**

Biomarker eosinofilního/neeosinofilního typu zánětu (fenotypu)

Metody stanovení: NEINVAZIVNÍ

Indukované sputum (whole expectorate), výsledky se uvádějí v procentech Eos/ml sputa.

Jde o přesnější metodu. Po podání 4 vdechů salbutamolu a inhalaci 3% roztoku NaCl 12 minut, pacient po 2 minutových intervalech odplivává sliny do nádoby a odkašlává sputum do druhé, monitoruje se peak flow/nebo FEV1 každé 2 minuty. Indukované sputum je pak smícháno se stejným množstvím 10% dithiothreitolu a homogenizováno v třepající se vodní lázni 15 minut a v mezidobí jsou odebírány malé vzorky aspirační pipetou. Část vzorku tohoto sputa je cytocentrifugována, aby se vytvořila cytologická sklíčka, ty jsou pak barvena k identifikaci leukocytů. Homogenizované sputum může být také odstředěno a supernatant využit pro měření zánětlivých proteinů v tekuté fázi. Stanoven je diferenciální rozpočet jako procentuální zastoupení eozinofilů.

Sputum plug metoda, výsledky jsou uváděny jako celkový počet eozinofilů v  $\mu$ l sputa.

Méně přesná metoda (po inhalaci 4 vdechů salbutamolu, poté inhalace 0,9%, 3%, 5% a 7% roztoku soli v 5-10minutových intervalech, sputum je odkašláváno do nádoby a hlen je odstraněn pomocí buničiny, poté je vzorek procesován s dithiothreitem obdobně jako u metody indukovaného sputa). Stanovuje se celková hodnota eozinofilů/mililitr sputa, ale tato metoda je zatížena větší chybou pro možný diluční efekt příměsí slin ve vzorcích (změna koncentrace vzorku).

Pozn: metoda má prediktivní význam pro volbu správné terapie, Th2 typ mediovaného zánětu s dobrou odpovědí na kortikosteroidy. Je biomarkerem eosinofilie dýchacích cest. Výsledky korelují s obstrukcí dýchacích cest a hyperreaktivitou. Cut off hodnota dle předchozích referencí je posunuta na 2%. (SPANEVERELLO et al., 2000) Spolehlivost metody je uváděna 0,82 (95% CI 0,72-0,88), metoda je poměrně pracná, nebývá prováděna rutinně.

Hodnota EOS ve sputu při léčbě kortikoidy klesá (Claman et al., 1994), antagonisté leukotrienových receptorů (anti-LT) snižují eozinofily ve sputu, ale ne zcela konzistentně a daleko méně výrazně při porovnání s terapií kortikosteroidy nebo omalizumabem.

Indukované sputum, je metodou strategické léčby astmatu (úprava IKS terapie) dle hodnot EOS ve sputu. (Chlumský et al., 2006)

Rovněž byly popsány vztahy mezi FEV<sub>1</sub> a BKT s metacholinem a eozinofily ve sputu (nepřímá úměra), ale interpretace není přesná, působí zde více faktorů. Vztah mezi eozinofily v periferní krvi a ve sputu nebyl zatím dobře popsán.

Během testu může dojít k bronchokonstrikci, ale díky premedikaci se salbutamolem k tomu nedochází často. (Pizzichini et al., 1998) (Pizzichini, 2002) (Pizzichini et al., 1999) (Petry et al., 2012).

- **Neutrofilý ve sputu**

Biomarker neutrofilního astmatu

Metoda stanovení: NEINVAZIVNÍ indukované sputum viz výše, hodnota mezi 40-65 %

Vyšší zastoupení u pacientů s těžkým, refrakterním astmatem, kortikodependentním astmatem, ale se špatnou odpovědí na terapii, špatné plicní funkce. Přítomno i u řady jiných chorob.

- **Periostin**

Biomarker diagnostický

eozinofilního zánětu dýchacích cest (Th2 high) a subepiteliální fibrózy

Biomarker prognostický

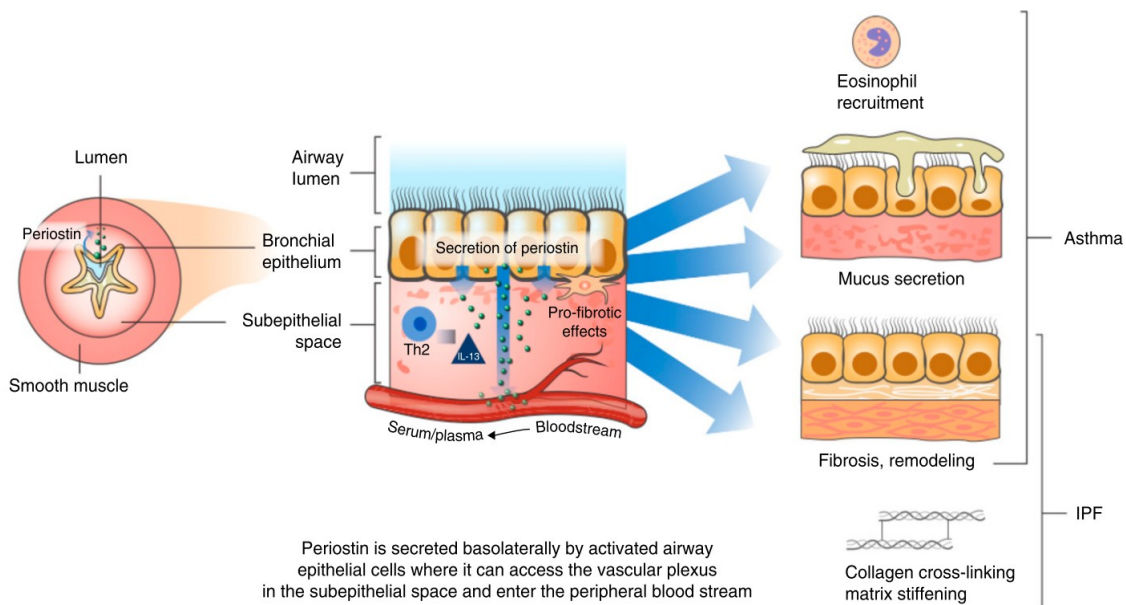
potencionálně možný biomarker odpovědi na anti-IL-13/anti-IL-4, anti-IgE terapii, možný prognostický biomarker zvýšeného rizika exacerbací a progresivního zhoršování plicních funkcí. U IPF možný marker predikce klinické progresy.

Metoda stanovení: NEINVAZIVNÍ z periferní krve – sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, jednotky ng/ml, z KVV -Elisa. (Wardzyńska et al., 2017)

Pozn: Matricelulární protein produkovaný epiteliálními buňkami dýchacích cest (ale také osteoklasty při kostní patologii), v bronchiálních epiteliích regulovaný částečně IL-13 a anti-IL-4, TGFβ. (Novosad et al., n.d.)

Pacienti na anti IL-13 terapii s vyšší hodnotou periostinu vykazují signifikantní zlepšení FEV1 a snížení rizika exacerbací. Studie III. fáze neprokázaly konzistentní snížení exacerbací – jeho role ještě není zcela jasná. (Izuhara et al., 2016)

Periostin se zřejmě významně účastní patofyziologických změn astmatiků včetně subepiteliální fibrózy, hyperreakivity dýchacích cest, recruitmentu (náboru) eosinofilů a produkci hlenu, a tak může být modulátorem progresy onemocnění.



**Obr. č. 3** Sekrece periostinu v dýchacích cestách po stimulaci IL-13 a jeho role v patofyziologii astmatu a IPF, převzato z (Izuhara et al., 2016)

Zánětlivé buňky (lymfocyty, neutrofilý, makrofágy) uvolňují cytokiny jako je IL-4 a IL-13, které pak stimulují eosinofily k produkci periostinu. Následná vazba periostinu na integriny αMb2 a α4b1 na eosinofilech vede k přemístění eosinofilů, adhezi a náboru do dýchacích cest. Po zánětlivém

podnětu má periostin uvolněný z buněk epitelálních dýchacích cest autokrinní účinky, které zahrnují aktivaci TGFβ a zvýšenou regulaci kolagenu typu I a parakrinní účinky, které zahrnují zvýšení tvorby kolagenu typu I ve fibroblastech zprostředkované TGFβ. Navíc periostin může zvýšit pružnost gelů tvořených kolagenem typu 1, což by mohlo změnit biomechanické vlastnosti dýchacích cest. Periostin působí na fibroblasty, aktivaci nukleárního faktoru-kB společně se zánětlivými cytokiny, jako je tumor necrosis factor-α (TNFα) nebo IL-1α, následovaný indukci zánětlivých chemokinů. Periostin indukuje diferenciaci fibroblastů na myofibroblasty a zvyšuje fibrózu vazbou na jiné ECM (extracelulární matrix) proteiny, jako je kolagen I, fibronectin a tenascin-C a indukci kolagenové fibrilogeneze a síťování. Dále může ovlivňovat epitelálně-mezenchymální transformaci. Tyto změny mohou pak vést ke vzniku fibrózy. Zkoumá se jeho role především v patofyziologii astmatu a IPF viz výše. (Izuhara et al., 2016) (Novosad et al., n.d.)

Podrobněji ke stanovení periostinu viz vlastní řešení studie kap.4.

Periostin, získal svůj název díky vysoké expresi v periostu. Jeho úloha se projevuje jak v průběhu embrya a organogeneze, tak u dospělého jedince, a to zejména v rámci procesů spojených se změnami v extracelulární matrix. (Novosad et al., n.d.) Je součástí řady patologických procesů v DC je to astma, dále atopická dermatitida, eosinofilní zánět středního ucha, alergická rinitida a chronická rinosinusitida, chronická rinosinusitida s nosními polypy, eosinofilní esofagitida, IPF, poléková fibróza, sklerodermie a některé malignity (nadměrná exprese ve stromálních buňkách), hrají také důležitou roli v kardiovaskulárním systému, (remodelace po poškození myokardu). Zkoumá se jeho role při vývoji plicní tkáně. (Izuhara et al., 2014)

- **Dipeptidyl peptidasa-4 (DPP-4)**

Metoda stanovení: NEINVAZIVNÍ ze séra

DPP-4, podobný periostinu, který je regulován IL-13.

Sérové hladiny DPP-4 a periostinu byly zvýšeny u podskupiny pacientů s těžkým astmatem.

V multicentrickém klinickém hodnocení fáze 2b bylo zahrnuto 451 dospělých s těžkým astmatem (Brightling et al., 2015), u kterých byly zaznamenány 2 až 6 exacerbací v posledním roce, poté přidělena léčba tralokinumabem nebo placebem. Tralokinumab zlepšil FEV1 u pacientů se zvýšeným periostinem nebo zvýšeným DPP-4, ale ne u pacientů s normálními hladinami periostinu nebo DPP-4. (Katial et al., 2017)

- **YKL-40 (chitinase-like protein)**

Biomarker tkáňového zánětu (u více chorob), možný prediktivní biomarker tíže choroby a rizika exacerbací astmatiků, potencionálně možný biomarker pro léčebný zásah jako je bronchiální termoplastika (pokles plicních funkcí).

Metoda stanovení: z krve NEINVAZIVNÍ, tkání INVAZIVNÍ

Kohortové studie ukázaly, že geneticky zatížení pacienti s vyšší hodnotou YKL-40 trpí rychlejším poklesem plicních funkcí. V dětské populaci vyšší hodnoty YKL-40 měly střední korelaci s vyššími hodnotami FENO a remodelací dýchacích cest. (Krčmová, Novosad, Sedlák - 2018 - Biomarkery a biologická léčba, n.d.)

- **Močový leukotrien E4**

Biomarker cysteinyl leukotrien aktivity (Szeffler et al., 2012b)

Metoda stanovení: NEINVAZIVNÍ

Vzorek moči s použitím spektroskopie, normální hodnoty ≤50 pg/mg (picograms per micrograms) kreatininu.

Cysteinové leukotrieny jsou produkovány řadou buněk, které se účastní alergického zánětu: eozinofily, žírné buňky, basofily. LTE4 je konečným metabolitem, měřitelným v běžném vzorku moči. Jde o nepřímý marker plicní cysteinylkové leukotrienové aktivity.

Hodnota je zvýšena u exacerbací, při styku s alergenem, aspirinem. Léky blokující cysteinyl leukotrien syntézu (5-LO inhibitory) pak významně snižují hladinu LTE<sub>4</sub>, ne však kortikoidy. Studie Szefflera a kol. předpokládala, že by tato hladina mohla predikovat dobrou odpověď na antileukotrienovou terapii, ale další studie to zatím nepotvrdily. (Szeffler et al., 2005)

Zvýšené hodnoty jsou spojeny s astmatem s přecitlivělostí na ASA, dále s astmatem s nástupem v pozdějším věku a periferní eosinofilií a zhoršením plicních funkcí.

- **Močový BrTyr (bromotyrosine)**

Biomarker odpovědi na kortikosteroidy

Metoda stanovení: NEINVAZIVNÍ: hmotnostní spektrometrie

Vzorek moči, jednotky-hladiny BrTyru se udávají v nanogramech na miligram kreatininu (rozdíly v ředění moči jsou upraveny na základě koncentrace kreatininu v moči).

Princip: během aktivace eozinofilů dochází k uvolňování vysoké hladiny reaktivních kyslíkových sloučenin, 13 eikosanoidů, faktorů aktivujících krevní destičky a cytokinů. Eozinofilní peroxidáza je jedinečná ve své schopnosti převádět peroxid vodíku vytvořený v dýchacích cestách na hypobromní kyselinu a reaktivní bromičný oxidant, který modifikuje proteinové tyrosinové zbytky tvořící brómtyrosin v moči (BrTyr). Takže BrTyr je „biochemickým otiskem prstu“ aktivace eozinofilů a tento vysoce stabilní produkt může být detekován v krvi a moči.

Jeho hladina se snižuje při terapii ICS. (Cowan et al., 2015)

- **Kortizol v moči/v séru nebo plasmě**

Měření jeho deplece: biomarker systémového efektu kortikoidů na hypotalamo-hypofyzární systém.

Metoda stanovení: NEINVAZIVNÍ v krvi – ranní, za 24hod (chromatograficky), v moči /24hod

Stupeň deplece odpovídá dávce a typu užívaného kortikosteroidu a typu inhalačního systému.

Je potřeba podrobnějších studií k ujasnění dlouhodobějších vedlejších účinků IKS jako je růst, osteoporóza, katarakta.

U dětských astmatiků v rámci studií je měřen kortizol ve slinách jako méně invazivní metoda pro děti. (Szeffler et al., 2012a)

- **Bronchoalveolární lavážní tekutina (BALTE)**

Metoda měření: INVAZIVNÍ, bronchoskopický odběr dle standardů ([www.pneumologie.cz](http://www.pneumologie.cz)) (Skříčková, Kolaříková: Standardní postup při provádění BAL(2), n.d.) odpovídají ATS guidelines (Meyer et al., 2012)

Využití: Stanovení typu zánětu zvláště u těžkých astmatiků, predikce odpovědi na léčbu (kortikosteroidy)

Možnosti stanovení: průtoková imunocytometrie, diferenciální rozpočet buněk, imunohistochemie

Stanovení: buněčného zastoupení (eozinofily, neutrofilie, makrofágy, monocyty, T buňky), cytokinů, ECP, MPO, YKL-40 a další.

- **Transbronchiální biopsie (TBB)**

Metoda měření: INVAZIVNÍ-odběr vzorku tkáně – (brush) biopsie bronchiální sliznice, transbronchiální biopsie

Využití: odběr kontrolních vzorků je součástí terapie bronchiální termoplastikou (k posouzení

hladké svaloviny a efektu terapie)

Stanovení: buněčné zastoupení (eozinofily, neutrofilie, makrofágy, monocyty, T buňky), cytokinů, epitelové buňky (ev. EGFR), pohárkové buňky a submukózní žlázy, hladká svalovina a bazální membrána, angiogeneze (VEGF), YKL-40, Stanovení genové exprese z brush epitelu-POSTN, CLCA1, serpinB2

Provedené genové analýzy - (ULS microarray analýza, PCR): hlavní geny POSTN, CLCA1 a serpin B2. Tyto geny se nejčastěji vyskytují v epitelu dýchacích cest astmatiků, mohou být využity k rozlišení pacientů s Th2-high a low typem astmatu. (Woodruff et al., 2007a)

- **Nosní biopsie**

Vyšetření eosinofilního zánětu a nosní polypózy – biomarker Th2 high zánětlivé infiltrace, efektu léčby (diagnostický i prognostický)

Metoda stanovení: INVAZIVNÍ, ale dobře dostupná, odběr malého vzorku tkáně po předchozí lokální anestezii (LA).

Brush metoda (méně invazivní), bioptický odběr klíšťkami (více reprezentativní), otisk na sklíčko nebo laváž, následně vyhodnocení pod mikroskopem. Recentně byla popsána metoda nasální absorpce (NEINVAZIVNÍ) a její korelace s indukovaným sputem u astmatiků, při měření hladiny IL-5. (Melo Jr. et al., 2018) (Pipkorn and Karlsson, 1988) Podrobněji viz naše měření. (Ruzickova-Kirchnerova O et al., n.d.) Standardně je brush biopsie nosní sliznice využívána především v rámci vyšetření ciliární dyskineze (vyšetření ultrastruktury cilií transmisním elektronovým mikroskopem). (Lucas et al., 2017)

## OSTATNÍ FUNKČNÍ A ZOBRAZOVACÍ BIOMARKERY ASTMATU

- **FENO**-vydechovaný oxid dusnatý

Biomarker eosinofilního typu zánětu (nepřímý)

Metoda měření: NEINVAZIVNÍ

dle ATS/ERS guidelines pro rychlosti 50 l/s (existují offline a online metody, v praxi se užívá přímá online metoda), jednotky ppb (parts per billion). Měřený při konstantní výdechové rychlosti, jednoduchý, snadný, spolehlivý, především negativní prediktivní hodnota, (koeficient variability u zdravých 10% 4 ppb, u astmatiků 20-40%). U dětí jsou hodnoty FENO nižší a muži mívají vyšší hodnoty než ženy. (Szeffler et al., 2012a)

Pozn. U nekuřáků a pacientů bez kortikoterapie hodnota <25ppb jsou normální a hodnoty > 50 ppb jsou průkazem eosinofilního typu zánětu a predikují dobrou odpověď na kortikosteroidy. Při zahájení léčby dojde k poklesu hodnoty FENO, u stabilních astmatiků se pohybuje mezi 22-44 ppb. (Dweik et al., 2011) Vyšší hodnoty FENO mohou být zjištěny i u atopiků bez astmatu a i dobře kontrolovaný astmatik s pozitivním kožním skin prick testem, může mít zvýšené FENO. Dle předchozích studií (i naší studie (Malkusová I., Ružicková O., Teřl M., Vlas T., 2009)) (Crespo et al., 2016) byla zjištěna korelace mezi FENO hodnotou a počtem EOS v BAL, bronchiální biopsii a indukovaném sputu. Nicméně není tomu tak u pacientů léčených některými léky, které vedou ke snížení počtu eozinofilů (např. anti-IL-5 terapie, anti-IgE). (Haldar et al., 2009) (Szeffler et al., 2012b) FENO je využitelné pro strategii léčby astmatu, především k prevenci exacerbací. (Petsky et al., 2016)

- **KKV (koncentrát vydechovaného vzduchu, exhaled breath concetrate-EBC)**

Biomarker: stanovení typu zánětu, míry oxidačního stresu

Metoda stanovení: kondenzátor vydechovaného vzduchu NEINVAZIVNÍ

Vzorky mohou být získány opakovaně, po krátké pauze. Zařízení je přenosné (např. na JIP jednotkách vzorky získány u ventilovaných pacientů). (Walsh et al., 2006)

Princip měření: vydechovaný vzduch se skládá z plynné fáze a z kapalné fáze (ta je tvořena vodními parami s aerosolizovanými částicemi). Částice rozpuštěné ve vodní páře lze zkondenzovat ochlazením vydechovaného vzduchu a následně stanovovat jejich koncentrace.

Předpokládáme, že KVV měřených pacientů, je složen z kondenzované vodní páry, ve které jsou rozpuštěny látky obsažené v tekutině na povrchu epitelu dýchacích cest.

Zatím nejpřesněji se stanovuje pH jako biochemický marker přítomný obecně u zánětlivých onemocnění, v budoucnu by se mohlo jednat o možný terapeutický biomarker?

Stanovení GERD

Stanovení oxidačního stresu DC: oxidy dusíku, peroxid vodíku, glutation, aldehydy, isoprostany

Stanovení parametrů zánětu: cytokinů, leukotrienů, prostaglandinů

Shrnutí celé metody viz (Horváth et al., 2005).

U astmatiků: lze vyšetřit např. 8isoprostane (bylo publikováno, že jeho zvýšená koncentrace souvisí s tíží astmatu, rovněž bývá u pacientů s exacerbací CHOPN a jeho hodnota klesá po podané léčbě). Kromě astmatu a CHOPN byla jeho zvýšená koncentrace zjištěna např. u pacientů s IPP, sarkoidózou, a spánkovou apnoí. (HUNT et al., 2000)

Naše centrum pro těžké astma se podílelo na získání vzorků kondenzátu vydechovaného vzduchu od pacientů s těžkým astmatem pro projekt vedený dr. Sedlákem, PhD., doc. MUDr. Petrem Čápem, PhD. a doc. Ing. Petrem, Kačerem, PhD.

- **HRCT**

#### Biomarker zobrazovací

Metody měření: NEINVAZIVNÍ. HRCT je vhodné provádět na stejném pracovišti se stejnými scanovacími parametry ke zvýšení spolehlivosti a přesnosti opakování

Měření lumen průdušek (průměru, plochy), průduškové stěny (tloušťky, plochy), denzity a objemu plic. Zúžení průdušek, tloušťka stěny, air trapping, nehomogenita ventilace v porovnání se zdravou skupinou. Dále lze srovnávat výsledky z HRCT s funkčními parametry a tíží astmatu. Např. zvýšená transparence plicního parenchymu je popisována při těžkých exacerbacích astmatu.

Z praktického a klinicky použitelného hlediska (na podkladě předchozích dat) jsme se pokusili vytvořit toto rozdělení:

#### **1) Rozdělení biomarkerů dle imuno-patofyziologické cesty**

##### **Type 2 high fenotyp**

Hlavní biomarkery (nejčastěji používané):

- Periferní eozinofilie ( $\geq 4$  % resp  $\geq 300$ - $400/\text{mm}^3$ )
- Eosinofily ve sputu
- Celk. a specifické IgE
- ECP ( $\geq 20 \mu\text{g}$ )
- FENO ( $\geq 50$  ppb)
- Klinicky: dobrý efekt systémové kortikoterapie, přítomnost nosních polypů a aspirinová senzitivita
- Spirometrie: pozitivní bronchomotorické testy, průkaz výrazné bronchiální hyperreakivity

Vedlejší (zatím spíše v rámci studií):

- Periostin v séru, KVV
- Močový LTE4 a močový bromotyrosin
- Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) v séru
- Eozinofily v BAL, TBB, nosní biopsii

**Cílená terapie:** anti-IgE, anti IL5 mepolizumab, reslizumab, benralizumab, IL-4 and IL-13 (lebrikizumab, tralokinumab, dupilumab), GSK679586, AMG 317, CRT2, PGD2

##### **Type 2 low fenotyp**

Hlavní biomarkery:

- Eosinofily v krvi (nízké zastoupení)
- Indukované sputum (paucigranulární a neutrofilní převaha, minimum eozinofilů)
- Klinicky: kortikorezistence
- Spirometrie: fixovaná obstrukce

Vedlejší (v rámci studií):

- Subpopulace Th1 a Th17 lymfocytů (CD4lymfocytů)
- vyšetření chemoreaktantů-IL-8 (kondenzát vydechovaného vzduchu, v krvi)
- TNF $\alpha$  produkovaný Th1 lymfocyty
- C-X-C chemokine receptor 2 (CXCR2)

**Cílená terapie:** brodalumab, anti-IL-17; golilumab, anti-TNF $\alpha$ , makrolidy, CXCR2 antagonisté, 5lipoxygenase-activating protein (FLAP) inhibitors, prostaglandin E3/E4 inhibitory

| Tab. č. 4. Charakteristiky hlavních biomarkerů astmatu Teřl, Růžičková-Kirchnerová |                                                                                                                                                             |                                                                                         |                                                                                       |                                                                                         |                                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Biomarker                                                                          | Základní charakteristika                                                                                                                                    | Hraniční (resp. cut-off) hodnota, ev. rozpětí                                           | Pozitiva (+) jednotlivých metod                                                       | Predikce A) fenotypu                                                                    | Publikace                                                                                                                                                                                     |
|                                                                                    |                                                                                                                                                             |                                                                                         | negativa (-)                                                                          | B) léčby                                                                                |                                                                                                                                                                                               |
| Eozinofily v periferní krvi                                                        | Základní biomarker eozinofilie, dobře koreluje s analýzou sputa                                                                                             | 150 bb/μL aktuálně nebo 300 bb/μL historicky (za posledních 12 měsíců)                  | P+ levná, dostupná                                                                    | EOS alergický + EOS nealergický +++                                                     | (Katia et al., 2017) (Szefer et al., 2012b) (Medrek et al., 2017) (Flood-Page et al., 2007) (H. G. Ortega et al., 2014) (Zhang et al., 2014) (Bel et al., 2014) (Viswanathan and Busse, 2018) |
|                                                                                    |                                                                                                                                                             |                                                                                         | N-zvýšení z jiných příčin, fluktuace hodnot, ovlivnění SKS                            | anti IgE + anti IL-5 +++ anti IL-4,13 ++ DP2(Fevipritand) antitykotika+SKS CRTH2 antag. |                                                                                                                                                                                               |
| Koncentrace celkového IgE                                                          | Není spolehlivým markerem alergie; nízké hodnoty nevylučují klinicky významnou alergii                                                                      | > 100 IU/ml z rozmezí hodnot 30-700/1500 IU/ml se odvíjí stanovení dávky anti-IgE léčby | P+ levná, dostupná                                                                    | EOS alergický + až ++                                                                   | (Katia et al., 2017) (Szefer et al., 2012b) (Medrek et al., 2017) (Růžičková Kirchnerová et al., 2018) (Agarwal, 2011)                                                                        |
|                                                                                    |                                                                                                                                                             |                                                                                         | N-hodnoty nepredikují odpověď na anti-IgE léčbu Predikují odpověď u terapie ABPA/SAFS | anti-IgE (+) anti IL-5 (+) anti IL-4,13 (+) antitykotika+SKS                            |                                                                                                                                                                                               |
| Koncentrace specifických IgE, ev. prick testace                                    | Základní biomarker alergie                                                                                                                                  | Pozitivní hodnoty většinou nad 0,35 - 1,0 IU/ml dle laboratoře                          | P+ relativně levná                                                                    | EOS alergický +++                                                                       | (Katia et al., 2017) (Szefer et al., 2012b)                                                                                                                                                   |
|                                                                                    |                                                                                                                                                             |                                                                                         | N-horší dostupnost některých alergenů (plísň, profesní noxy)                          | anti-IgE +++ anti IL-5 (+) anti IL-4,13 + /++ antitykotika+SKS                          |                                                                                                                                                                                               |
| FeNO                                                                               | Ideální biomarker přítomnosti eozinofilie v průduškách, zvláště v období před nasazením IKS, poté rychle klesá... vysoké hodnoty indikují riziko exacerbace | ≤ 25 (ppb) negativní 25-50 šedá zóna > 50, resp.80 pozitivní (vysoce pozitivní)         | P+ neinvazivní, výsledek ihned k dispozici, koreluje s eo ve sputu                    | EOS alergický ++ EOS nealergický +++                                                    | (Katia et al., 2017) (Szefer et al., 2012b) (Crespo et al., 2016) (Haldar et al., 2009) (Dweik et al., 2011) (Petry et al., 2016)                                                             |
|                                                                                    |                                                                                                                                                             |                                                                                         | N-dražší, hůře dostupná, četné možnosti ovlivnění, nekoreluje s eo v krvi             | anti IgE + anti IL-5 (+) anti IL-4 a IL-13 ++                                           |                                                                                                                                                                                               |
| Eozinofily ve sputu                                                                | "Zlatý standard" detekující eozinofilní zánět v průduškách                                                                                                  | > 3 % buněk                                                                             | P+ exaktní, přímo vyšetřující metoda                                                  | EOS alergický ++ EOS nealergický +++                                                    | (Katia et al., 2017) (Szefer et al., 2012b) (SPANEVELLO et al., 2000) (Pizzichini, 2002) (Claman et al., 1994) (Petry et al., 2012) (Chlumský et al., 2006)                                   |
|                                                                                    |                                                                                                                                                             |                                                                                         | N-špatně dostupná, zatěžující náročná na čas                                          | Strategie léčby IKS anti IgE + anti IL-5 +++ anti IL-4,13 ++                            |                                                                                                                                                                                               |
| ECP v krvi (Ize i IS, BAL)                                                         | biomarker aktivace eosinofilů                                                                                                                               | rozmezí 0–24 μg/l                                                                       | P+ běžně dostupný                                                                     | EOS alergický ++ EOS nealergický +++                                                    | (Szefer et al., 2012b) (Milan Teřl et al., n.d.)                                                                                                                                              |
|                                                                                    |                                                                                                                                                             |                                                                                         | N-                                                                                    |                                                                                         |                                                                                                                                                                                               |

| <i>Biomarker</i>                                           | <i>Základní charakteristika</i>                                                                                                                  | <i>Hraniční (resp. cut-off) hodnota, ev. rozpětí</i>                                           | <i>Pozitiva (+) jednotlivých metod<br/>Negativa (-)</i>                                                                         | <i>Predikce<br/>A) fenotypu<br/>B) léčby</i>                                                                               | <i>Publikace</i>                                                                                                                                       |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Periostin v séru</b>                                    | nově zaváděný <b>marker obou T-high fenotypů</b> , produkován epitelem dých. cest, nejužší vztah k IL-13                                         | ≥ 50 ng/ml, (cave na možnost falešného zvýšení – i produkce mimo dýchací cesty-kosti kůže aj.) | P+ stabilita sérových koncentrací v čase<br><br>N-špatně dostupná, cut-off není jednotná... není rutíní                         | EOS alergický ++ až +++<br>EOS nealergický ++ až +++<br><br>anti IgE + až ++<br>anti IL-5 + až ++<br>anti IL-4 a IL-13 +++ | (Katial et al., 2017)<br>(Szeffler et al., 2012b)<br>(Izuhara et al., 2014)<br>(Rabe et al., 2018)<br>(Castro et al., 2011a)<br>(Novosad et al., n.d.) |
| <b>EPO, MBP v IS BAL</b>                                   | biomarker aktivace <b>eozinofilů</b>                                                                                                             |                                                                                                | P+dobře dostupný<br>N-málo specifická                                                                                           | EOS alergický ++<br>EOs nealergický +++                                                                                    | (O'Connell et al., 2011)                                                                                                                               |
| <b>MPO</b>                                                 | Biomarker aktivace <b>neutrofilů</b>                                                                                                             |                                                                                                | P+dobře dostupný<br>N-málo specifická                                                                                           | NEU ++                                                                                                                     | (Acharya 2014)<br>(Racek, 2008)                                                                                                                        |
| <b>Neutrofily v IS</b>                                     | biomarker <b>neutrofilního zánětu</b>                                                                                                            | hodnota mezi 40-65%                                                                            | P+ exaktní, přímo vyšetřující metoda<br><br>N-náročná na čas nespecifická (i u jiných chorob, kouření, věk, znečištěné ovzduší) | NON EOS těžké, kortikodependentní astma<br><br>Makrolidy<br>Brodalumab<br>anti-IL17<br>anti-CXCR2                          | (Katial et al., 2017)<br>(Szeffler et al., 2012b)<br>(Moore et al., 2014)<br>(Gibson et al., 2017)<br>(Simpson et al., 2008)                           |
| <b>Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4)</b><br>V séru a tkáních  | jako periostin <b>marker obou T-high fenotypů</b> , produkován epitelem DC, nejužší vztah k IL-13                                                |                                                                                                | P+ exaktní, přímo vyšetřující metoda<br><br>N-špatně dostupná není rutíní                                                       | EOS alergický ++ až +++<br>EOS nealergický ++ až +++<br><br>anti IL-13 +++                                                 | (Katial et al., 2017)<br>(Szeffler et al., 2012b)<br>(Brightling et al., 2015)                                                                         |
| <b>močový leukotrien E4 LTE4</b>                           | <b>biomarker cysteinyl leukotrien aktivity</b>                                                                                                   | normalní hodnoty ≤50 pg/mg                                                                     | P+dobře dostupný<br><br>N-léky (5LO inhibitory) významně snižují hladinu LTE4, ne však kortikoidy                               | EOS alergický ++<br>EOS nealergický +++<br><br>odpověď na anti-IL terapii (nebylo jasně potvrzeno)                         | (Katial et al., 2017)<br>(Szeffler et al., 2012b)                                                                                                      |
| <b>močový BrTyr(bromotyrosine)</b>                         | biochemický <b>biomarker aktivace eozinofilů</b><br>Lze stanovit i v krvi.                                                                       | ng/mg/kreat                                                                                    | P+jednoduchý odběr vzorku<br>N-komplikované stanovení<br><br>N-hladina se snižuje při terapii KS                                | EOS alergický ++<br>EOS nealergický ++<br><br>odpovědi na KS ++                                                            | (Cowan et al., 2015)                                                                                                                                   |
| <b>YKL-40</b> (chitinase-like protein)<br>v séru a tkáních | <b>biomarker tkáňového zánětu</b> obecně prediktivní biomarker <b>tíže choroby a rizika exacerbací</b> astmatiků, <b>poklesu plicních funkcí</b> |                                                                                                | P+<br><br>N-zatím není rutíně vyšetřován                                                                                        | biomarker tkáňového zánětu obecně, tíže choroby, poklesu plicních funkcí<br><br>Bronchiální termoplastika?                 | (Katial et al., 2017)<br>(Szeffler et al., 2012b)                                                                                                      |
| <b>Eos v nosní biopsii, nosní polypóza</b>                 | Biomarker eosinofilního zánětu                                                                                                                   | Cytologie/biopsie<br>Metoda nasosorbce c x                                                     | P+snadno dostupná, relativně levná<br>N-metoda nasosorbce je nově popsána, není                                                 | EOS alergický ++<br>EOS i nealergický +++<br>NON EOS ++                                                                    | (Ruzickova O et al., n.d.)<br>(Melo Jr. et al., 2018)<br>(Pipkorn and Karlsson, 1988)                                                                  |

|  |  |  |         |                               |  |
|--|--|--|---------|-------------------------------|--|
|  |  |  | rutinní | Efekt terapie KS<br>anti-IL-5 |  |
|--|--|--|---------|-------------------------------|--|

## 4. ŘEŠENÍ VLASTNÍ STUDIE

Souborem řešení jsou dvě na sebe navazující části, skládající se celkem ze 7 dílčích prací.

### 4.1 Hodnocení klinické použitelnosti jednotlivých invazivních a neinvazivních imunologických biomarkerů u pacientů s těžkým refrakterním astmatem

V této první části naší práce jsme skupinu pacientů s těžkým refrakterním astmatem podrobili detailnější diagnostice ve snaze o nalezení nejvhodnějších vyšetřovacích metod a optimálního spektra klíčových biomarkerů, klinicky dobře použitelných k bližší fenotypizaci astmatu. Jednotlivé metody jsme vzájemně kriticky porovnávali, včetně jejich ovlivnění systémovou kortikoterapií.

#### 4.1.1 Vliv systémové kortikoterapie u pacientů s těžkým refrakterním astmatem na změny invazivních a neinvazivních markerů sledovaných z krve, sputa, bronchoalveolární laváže, nosních biopsií a jejich klinické využití

*(Ruzickova-Kirchnerova O et al., n.d.)*

V této práci jsme se zaměřili na vliv inhalačních a systémových kortikosteroidů na charakter a intenzitu zánětlivých změn u pacientů s těžkým refrakterním astmatem a praktické možnosti jejich detekce pomocí imunologických biomarkerů. Výraznější efekt systémových kortikosteroidů je předpokládán u pacientů s eosinofilním typem zánětu.

**Cíl práce:** V úvodní práci (4.1.1.1) jsme se pokusili zjistit, zda flowcytometrická analýza (FC) indukovaného sputa a BALTE může být využita k spolehlivému vyšetření buněčného profilu a zda výsledky našich měření korelují se standardním (DCC) a imunocytochemickým barvením (ICC) na sklíčku. Další navazující práce (4.1.1.2) se zabývala možnou souvislostí mezi typem zánětu v horních a dolních cestách dýchacích. Položili jsme si otázku, zda a do jaké míry jsou vyšetření indukovaného sputa (IS), bronchoalveolární laváže (BALTE) a nosní biopsie (NB) spolehlivými metodami pro stanovení buněčného profilu (typu zánětu). V obou případech jsme porovnávali jednotlivé metody mezi sebou a zjišťovali, jaký efekt má systémová kortikoterapie na zánětlivé změny, resp. biomarkery v horních i dolních cestách dýchacích. Pokusili jsme se tedy stanovit biomarkery použitelné pro běžnou klinickou praxi.

#### Design studie

Prospektivní studie v letech 2006-2008 zahrnovala pacienty s těžkým refrakterním astmatem pod nedostatečnou kontrolou, léčené vysokými dávkami inhalačních kortikosteroidů v kombinaci s dlouhodobě působícími  $\beta_2$  agonisty (IKS+LABA). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s touto studií. Na Ústavu imunologie a alergologie jim bylo provedeno vyšetření indukovaného sputa (IS), spirometrie a FENO a následně byli přijati ke krátké hospitalizaci na naší plicní kliniku. V rámci hospitalizace byla odebrána důkladná anamnéza a provedeno fyzikální vyšetření a spirometrie včetně bodypletysmografie. Byly provedeny laboratorní odběry, viz níže. Následující den nemocní podstoupili bronchoskopické vyšetření s provedením bronchoalveolární laváže. Vzorky BALTE byly odeslány na Ústav imunologie a alergologie k dalšímu zpracování. Pacienti rovněž podstoupili odběr nosní biopsie na ORL klinice FN Plzeň, vzorek byl mikroskopicky analyzován na Šiklově ústavu patologie. Poté byla u pacientů k stávající chronické medikaci přidána léčba vysokými dávkami systémových kortikoidů (40 mg prednisonu/na den) po dobu 1 měsíce. Po měsíci terapie byla veškerá vyšetření zopakována.

## Soubor pacientů

Náš soubor zahrnoval celkem 30 pacientů, nekuřáků s těžkým refrakterním astmatem s mediánem věku 43,8 let (rozmezí mezi 21-75 let). 13 mužů (43,3%), 17 žen (56,6%). Jednalo se o astmatiky, kteří byli v péči naší ambulance pro těžké astma. Všichni tito pacienti byli léčeni vysokými dávkami kombinovaných preparátů IKS+LABA, ev. v kombinaci s dalšími antiastmatiky (antileukotrieny, theofyliny).

## Metody

Vzorky krve jsme odeslali na vyšetření základních biochemických parametrů včetně parametrů zánětu CRP, a především krevní obraz s diferenciálním rozpočtem, stanovení ECP, celkového a specifických IgE.

Vyšetření funkce plic a FENO: Zaznamenávali jsme základní spirometrické parametry: usilovná vitální kapacita (FVC, SVC), usilovně vydechnutý objem za první sekundu (FEV1), poměry FEV1/SVC, kompletní bodypletysmografii, hodnoty FENO v ppb.

### Vyšetření indukovaného sputa

Indukované sputum bylo získáno inhalací roztoku NaCl o koncentraci 3%, 4% a 5% po dobu 7 minut a bylo ihned předáno ke zpracování do laboratoře. Příprava suspenze buněk: ke 4 ml DTT (dithyotritolu) a 4 ml PBS (protiein-bovinní serum) bylo přidáno veškeré získané sputum. V tomto kroku dochází k rozpouštění disulfidických můstků působením DTT. Po 15minutové inkubaci v třepačce byla získaná suspenze buněk promyta do PBS a naředěna na koncentraci  $1 \cdot 10^6$  bb/ml. Takto získaný materiál byl dále zpracováván viz níže. Počet buněk (buněčnost) v suspenzi a jejich životnost byla změřena pomocí trypanové modři hodnocením v Burkerově komůrce.

### *Buněčné složky*

*Skříčkové metody:* Klasické barvení (DCC). Diferenciální rozpočet byl stanoven pomocí cytopsinu, kde byly připraveny nátěry buněčné suspenze, které byly obarveny metodou Giemsa-Romanowsky. Preparáty byly připravovány z buněčné suspenze o koncentraci buněk  $1 \cdot 10^6$  bb/ml ředěné 1:1 a 1:100. Zaznamenávali jsme počet neutrofilů, monocytů, eozinofilů a lymfocytů. K imunocytochemickému barvení (ICC) byly použity protilátky vůči elastáze (neutrofily), CD 68 (makrofágy) a MBP (eozinofily).

Pro *cytometrické stanovení* (FC) byla použita buněčná suspenze o koncentraci buněk  $1 \cdot 10^6$  bb/ml. Průtokovým cytometrem byly v první části práce stanoveny znaky CD45, CD16, CD14. Vhodnou kombinací těchto znaků lze stanovit většinu populací v indukovaném sputu. Neutrofilní granulocyty byly stanoveny jako CD14 negativní, CD16 pozitivní populace. Monocyty byly stanoveny jako CD14 pozitivní, CD16 pozitivní populace. Eozinofilní granulocyty byly stanoveny jako CD14 negativní, CD16 negativní populace. Makrofágy lze detekovat jako CD14 pozitivní, CD16 negativní populaci buněk. Lymfocyty jsou stanoveny ve vlastním gate SS/CD45

### *Humorální složky*

Imunochemicky byl stanoven ECP (eosinofilní kationický protein) a MPO (myeloperoxidáza).

### Bronchoskopické vyšetření, odběr a analýza BALTE

Vyšetření bylo provedeno flexibilním bronchoskopem dle standardů americké hrudní společnosti. Monitorace saturace kyslíku, EKG a krevního tlaku probíhala během celého výkonu. Lokální anestezie byla standardně provedena a byl použit flexibilní bronchoskop (Olympus BF p40, BF 1T40), bronchoalveolární laváž byla získána z pravého dolního lobárního bronchu, 3x50 ml fyziologického roztoku (FR) bylo instalováno a následně opětovně nasáto a předáno k okamžitému zpracování. V BAL byla stanovena buněčnost, životnost a provedeno klasické barvení (DCC), imunochemické barvení (ICC) a flow-

cytometrická analýza (FC) analogicky jako v indukovaném sputu, stejně jako vyšetření humorálních složek.

#### Odběr nosní biopsie (NB):

Vzorky nosní sliznice, jako možného markeru eosinofile v horních cestách dýchacích, byly odebrány vždy 2 (po předchozím minimálně 2měsíčním vysazení nosních kortikosteroidů a systémových kortikosteroidů, antileukotrieny byly vysazeny 1 měsíc a antihistaminika 4 dny před vyšetřením). Pacient byl bez antikoagulační terapie. ORL lékař vyšetřil dutinu nosní, poté provedl lokální anestezii (na 10 min umístil malý tampónek s 0,5 % tetracainem a epinefrinem pod obě střední skořepy) a odebral pomocí ostrých klíčtek 2 vzorky s obou nosních skořep. Vzorky byly následně vyhodnoceny patoložkou, 5 $\mu$  vzorky byly nabarveny pomocí HE (Hematoxylin-Eosinu) a PAS (Periodic Acid Schiff) a hodnoceny mikroskopicky – zvětšení 10x, 20x a 40x. Hodnocena byla struktura respiračního epitelu, metaplasie a chronické zánětlivé změny včetně přítomnosti eozinofilů semikvantitativně (stupně 0-žádná přítomnost, 1-přítomny v menším množství a 2-bohatě prostoupena eosinifily). Barvení PAS bylo použito k vyloučení mykotické infekce.

Statistická analýza: Rozdíly spojitých parametrů mezi zkoumanými skupinami byly hodnoceny neparametrickou metodou ANOVA, především Kruskal-Wallisovým testem. Vztahy mezi proměnnými jsme hodnotili pomocí pořadové korelace – Spearmanovým korelačním koeficientem, výsledky s hodnotou pod  $p < 0,05$  byly považovány za statisticky významné. Dále pro hodnocení vzorků před a po terapii systémovými kortikoidy byl použit párový znaménkový test.

#### **Výsledky a závěry:**

Výsledky jsme prezentovali ve 2 samostatných pracích, které byly prezentovány na Evropském imunoalergologickém kongresu v r. 2009 a na Evropském respiračním kongresu v r. 2010. Práce (viz dále) na sebe logicky navazují.

#### **4.1.1.1. Imunologické markery z indukovaného sputa a BALTE**

Téma bylo zpracováno v práci **"Porovnání využitelnosti flowcytometrie, rutinních a imunocytochemických metod při stanovení buněčného profilu v indukovaném sputu a bronchoalveolární laváži u pacientů s těžkým refrakterním astmatem."** (Malkusová I., Ružičková O., Teřl M., Vlas T., 2009)

K vyšetřování buněčného profilu indukovaného sputa (IS), ev. bronchoalveolární lavážní tekutiny (BALTE) jsou obvykle používány *metody nátěrů na sklíčko*, které jsou následně různými způsoby vizualizovány.

Nejklasičtější jsou rutinní metody barvení dle Giemsy nebo Hemacolor (DCC). Přesnější jsou metody imunocytochemické (ICC), využívající podobně jako průtoková cytometrie monoklonální protilátky, zde nejčastěji cílené vůči specifickým bílkovinám uvnitř jednotlivých druhů leukocytů. K označení neutrofilů se používají protilátky proti neutrofilní elastáze, k označení eozinofilů protilátky proti hlavnímu bazickému proteinu (MBP). Následuje barvení pomocí další protilátky, namířené vůči prvé protilátce a zároveň svázané nejčastěji s enzymem, který aktivuje barevný substrát. Vyhodnocení sklíčkových metod, ať již DCC nebo ICC, provádí laboratorní pracovník.

Oproti tomu *průtoková/flow cytometrie* (FC) využívá monoklonální protilátky nejčastěji proti specifickým antigenním strukturám na povrchu buněk (CD znaky, viz dále) a vyhodnocování provádí přístroj. Průtoková cytometrie je používána především při analýzách krve, tj. vzorků s velkým počtem buněk.

**Cílem** naší práce bylo zjistit, zda lze při vyšetřování buněčného profilu IS a BALTE pracnější metody sklíčkové nahradit vyšetřováním na průtokovém cytometru.

### **Výsledky:**

K výslednému porovnání bylo získáno 62% vzorků IS a 79% vzorků BALTE od vyšetřených pacientů. Porovnávali jsme výsledky vyšetření obou sklíčkových metod (DCC a ICC) a průtokové cytometrie (FC) před a po nasazení systémové kortikoterapie (40mg prednisonu/den po dobu 1 měsíce).

#### Indukované sputum (IS):

DCC vs FC: neutrofily  $r=0.264$ ,  $0.287$ , p values  $0.15$ ,  $0.21$ , makrofágy  $r=0.216$ ,  $0.404$ , p values  $0.24$ ,  $0.07$  lymfocyty  $r=0.165$ ,  $0.123$ , p values  $0.37$ ,  $0.36$ .

ICC vs FC: neutrofily  $r=0.41$ ,  $0.29$ , p values  $0.02$ ,  $0.21$  a makrofágy  $r=0.29$ ,  $0.36$ , p values  $0.12$ ,  $0.11$ , resp.

#### Bronchoalveolární lavážní tekutina (BALTE):

DCC vs FC: neutrofily  $r=0.56$ ,  $0.02$ , p values  $0.01$ ,  $0.8$  makrofágy  $r=0.56$ ,  $0.13$ , p values  $0.01$ ,  $0.5$  lymfocyty  $r=0.34$ ,  $0.22$  resp, p values  $0.05$ ,  $0.28$ , resp.

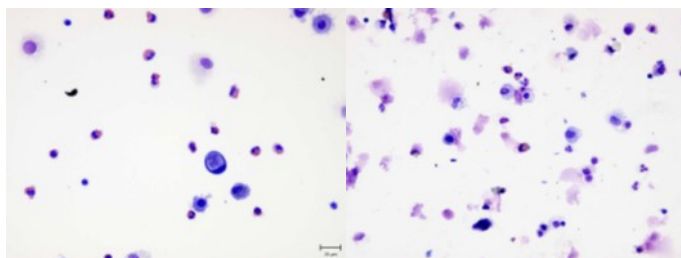
ICC vs FC: neutrofily  $r=0.14$ ,  $0.16$ , makrofágy  $0.37$ ,  $0.27$  resp., p values  $0.46$ ,  $0.41$ , a  $0.04$ ,  $0.15$ , resp.

### **Závěry:**

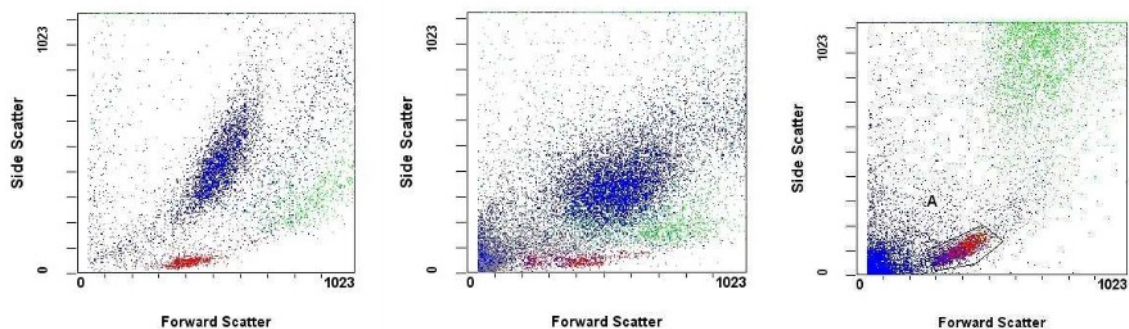
V případě indukovaného sputa byla nalezena statisticky významná korelace mezi výsledky průtokové cytometrie a DCC pouze při stanovení makrofágů, mezi výsledky průtokové cytometrie a ICC pouze při stanovení neutrofilů a v obou případech pouze před nasazením systémové kortikoterapie.

V případě vyšetření BALTE byla nalezena statisticky významná korelace mezi výsledky průtokové cytometrie a DCC u všech typů buněk, rovněž však pouze před zahájením kortikoterapie.

Analýza vzorků indukovaného sputa a bronchoalveolární laváže pomocí průtokové cytometrie je nespolehlivá, zvláště v případech pacientů po systémové kortikoterapii. Výsledky analýz průtokové cytometrie jsou ovlivněny nízkou buněčností vzorků indukovaného sputa a velkým rozptylem hodnot v případě BALTE (nejednotnost „ředění“). Vyšetření diferenciálního rozpočtu buněk pomocí barvení (Hematocolor, Giemsa ev. imunocytochemie) zůstává zlatým standardem stanovení buněčného profilu sputa a BALTE. Nevhodnost flowcytometrické metody k zpracování našich vzorků byla potvrzena i v následující práci.



**Obr. č. 4** Diferenciální rozpočet buněk stanovený pomocí cytopsinu a barvení Hematocolem u IS a BALTE (DCC)



**Obr. č. 5** Flowcytometrická analýza (FC): dotplots forward/side scatter (FSC/SSC): IS a BALTE

#### 4.1.1.2. Nosní biopsie v korelaci s ostatními markery

Téma bylo zpracováno v práci **"Vyšetření indukovaného sputa, bronchoalveolární laváže, FENO a biopsií nosní sliznice u pacientů s těžkým astmatem"** (Ruzickova-Kirchnerova O et al., n.d.)

#### Výsledky:

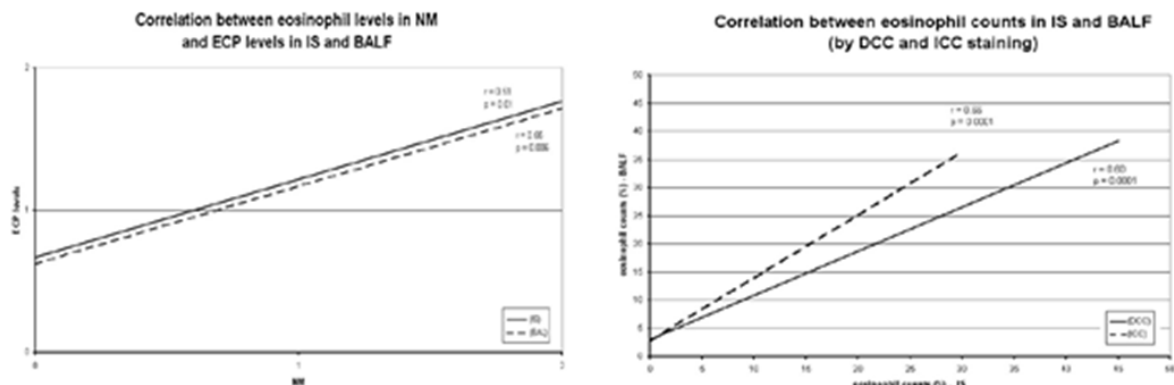
Statisticky významnou korelaci jsme zjistili při porovnání počtu eozinofilů ve vzorcích nosní biopsie (NB) a hladinami ECP ve vzorcích indukovaného sputa IS ( $p=0.01$ ) a BALTE ( $p=0.006$ ) **graf č. 1**, dále mezi počtem eozinofilů ve vzorcích nosní biopsie (NM) a IS stanoveným metodou DCC ( $p = 0.0005$ ) a ICC ( $p = 0.01$ ), **graf č. 2**.

Nenalezli jsme žádnou statisticky významnou korelaci mezi počtem eozinofilů ve vzorcích nosní biopsie (NM) a BALTE ( $p = 0.06$ ,  $p = 0.26$  resp.) při použití DCC a ICC metod stanovení **graf č. 3**.

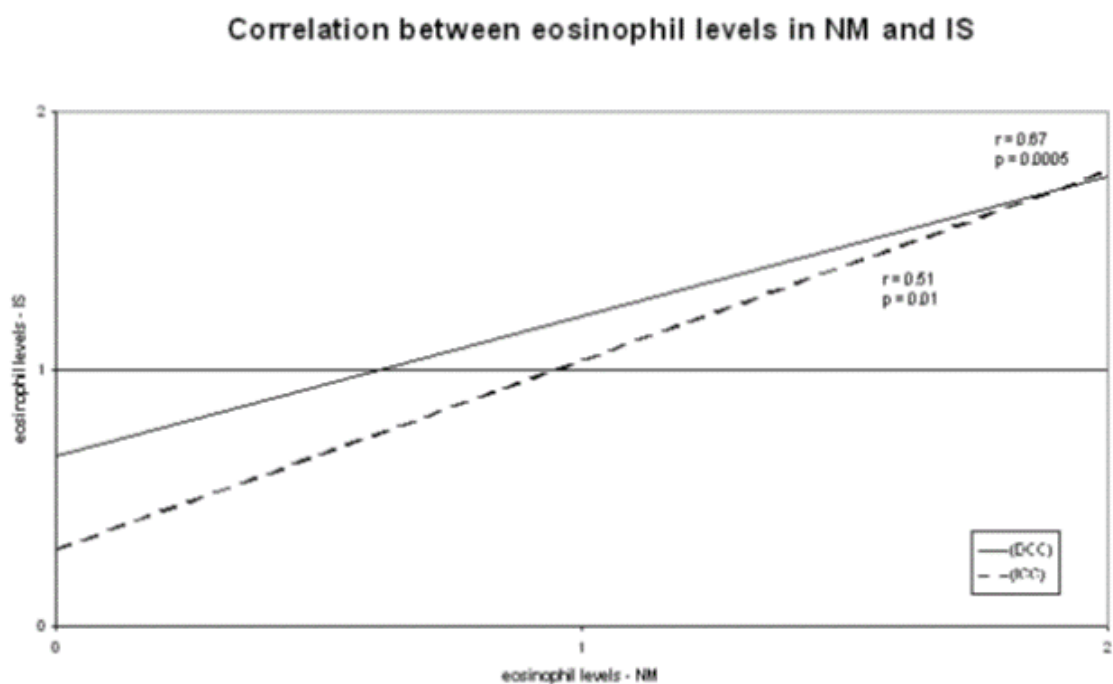
Po 4 týdnech terapie systémovými kortikoidy byl zaznamenán pokles eozinofilů ve vzorcích indukovaného sputa (IS) **graf č. 4 + 5** (metoda DCC a ICC) a BALTE **graf č. 7 + 8** (metoda DCC a ICC) ( $p < 0.0003$ ,  $p < 0.0002$ ) a pokles hladiny ECP v IS **graf č. 6** a BALTE **graf č. 9** ( $p < 0.0003$ ,  $p < 0.007$ ) a FENO ( $p < 0.0054$ ) **graf č. 10 a + b**.

Vyšetření IS a BALTE metodou průtokové flowcytometrie (FC) při porovnání s ostatními metodami stanovení nepřineslo žádné statisticky významné výsledky. Nebyla nalezena žádná korelace mezi počtem eozinofilů v nosní biopsii a hodnotou FENO před podáním systémové kortikoterapie.

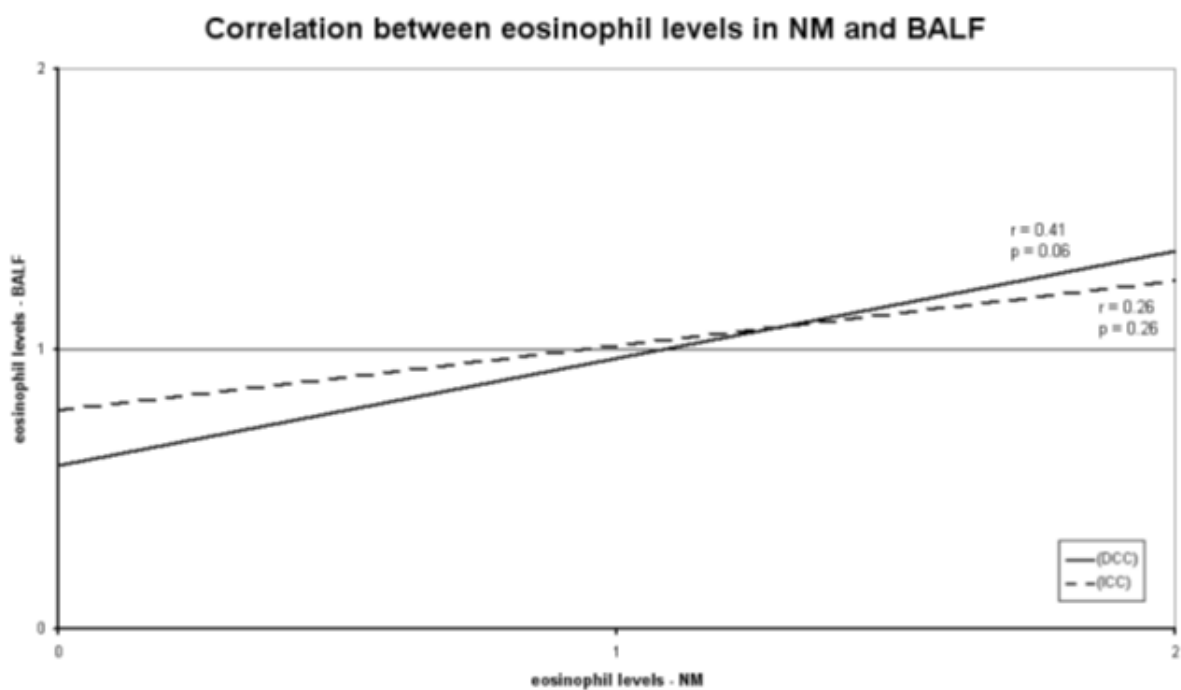
**Graf č. 1** Porovnání počtu eozinofilů ve vzorcích nosní biopsie (NM) a hladinami ECP ve vzorcích indukovaného sputa IS ( $p = 0.01$ ) a BALTE



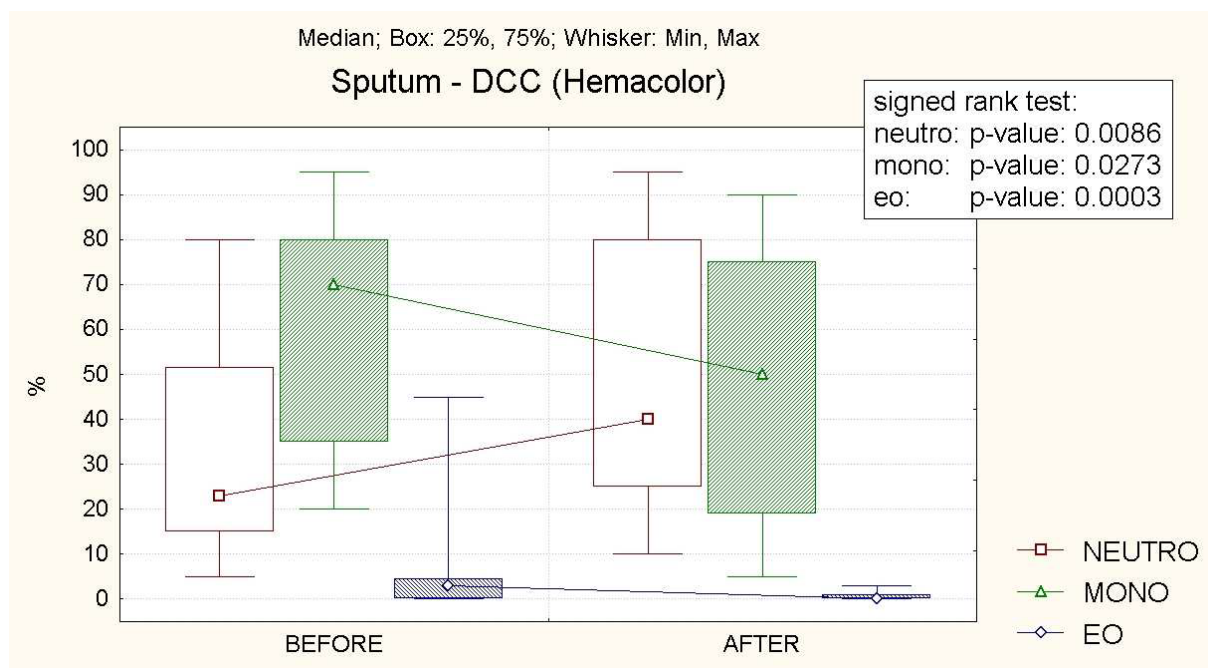
**Graf č. 2** Počet eozinofilů ve vzorcích nosní biopsie (NM) a IS stanoveným metodou DCC a ICC



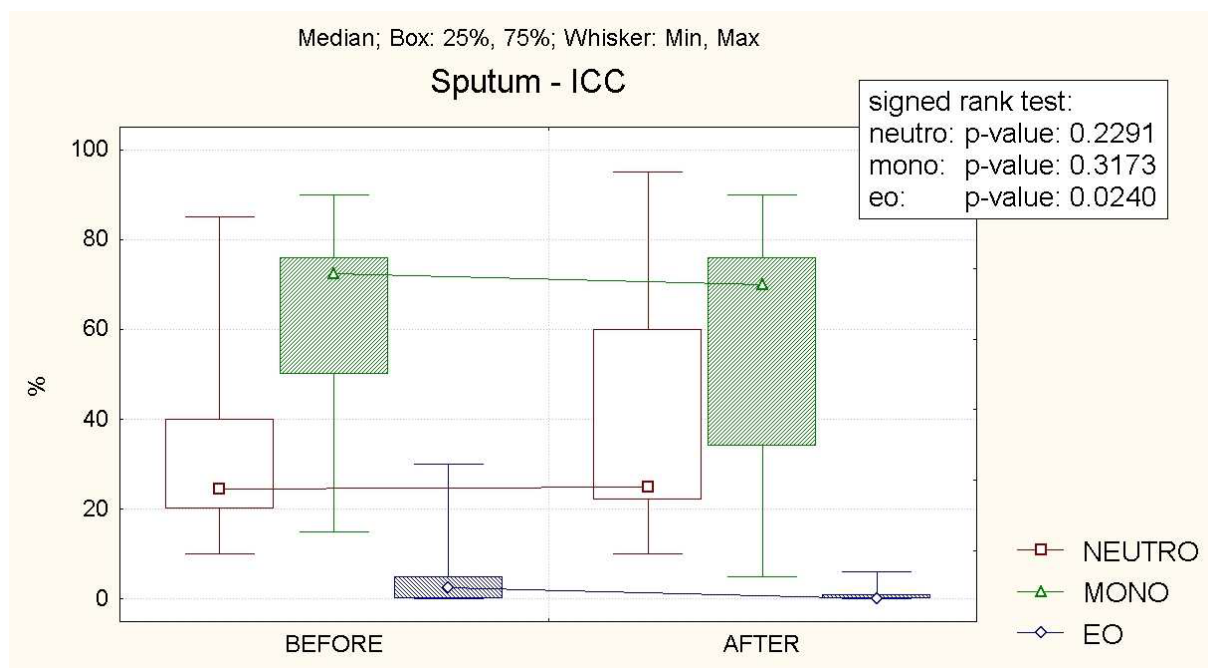
**Graf č. 3** Počet eozinofilů ve vzorcích nosní biopsie (NM) a BALTE (p = 0.06, p = 0.26 resp.) při použití DCC a ICC metod stanovení



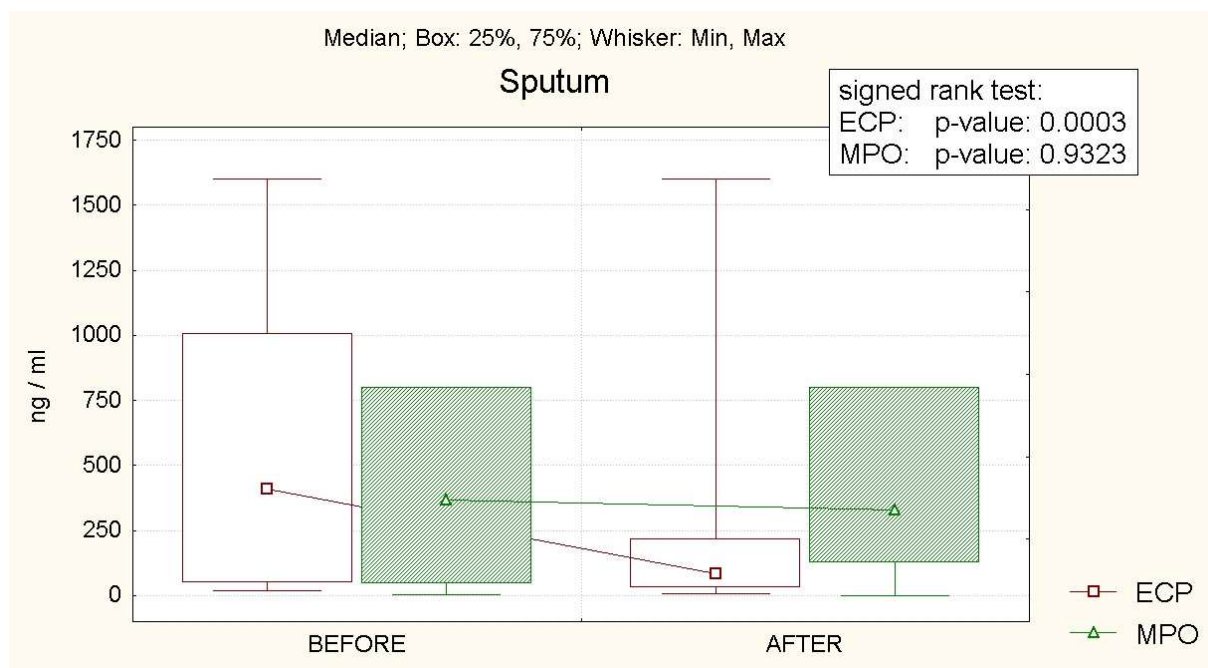
**Graf č. 4** Počty neutrofilů, monocytů a eozinofilů ve vzorcích indukovaného sputa před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie stanovené metodou DCC



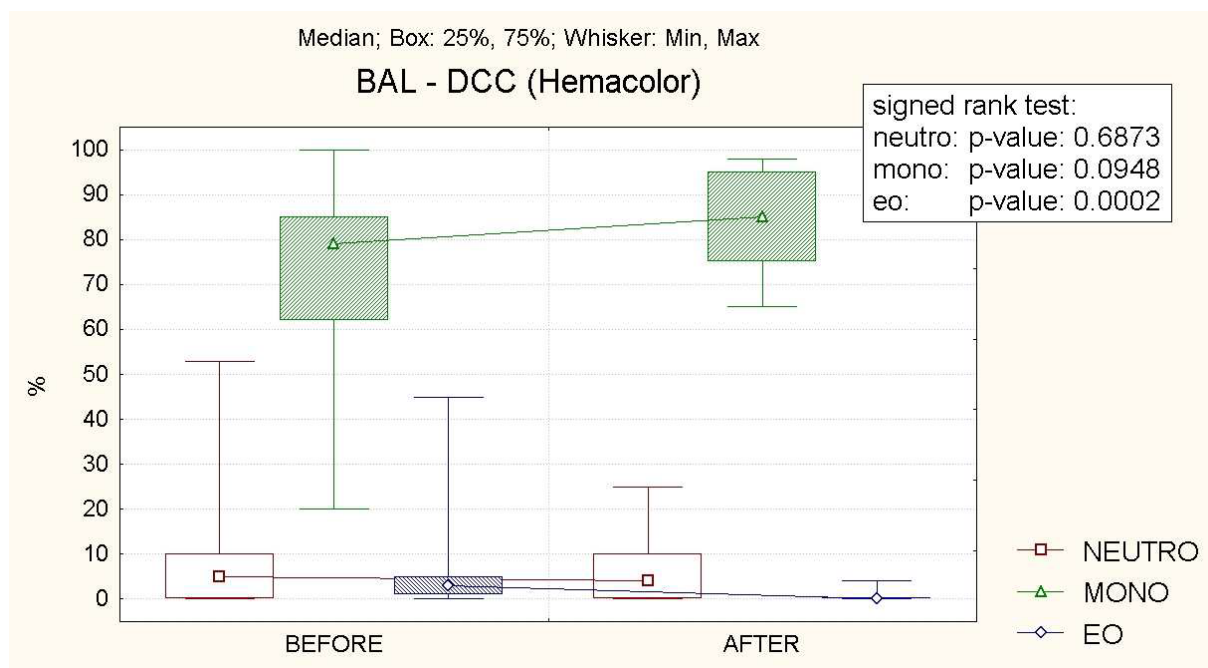
**Graf č. 5** Počty neutrofilů, monocytů a eozinofilů ve vzorcích indukovaného sputa před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie stanovené metodou ICC



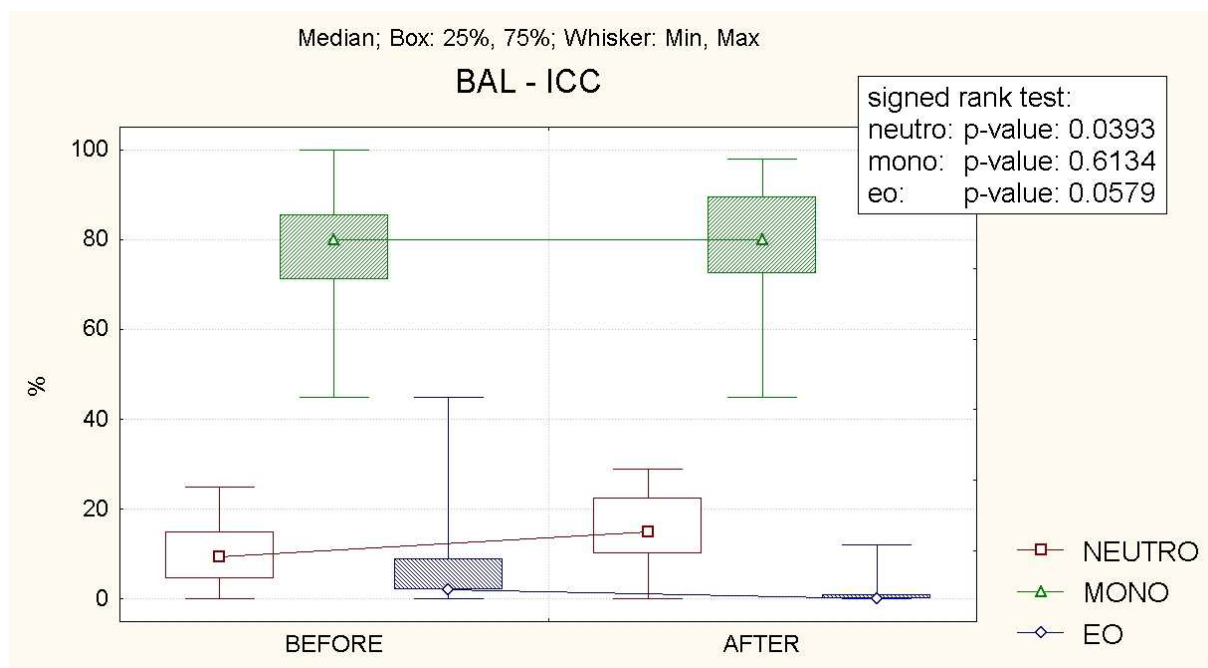
**Graf č. 6** Hodnota ECP a MPO ve vzorcích indukovaného sputa před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie



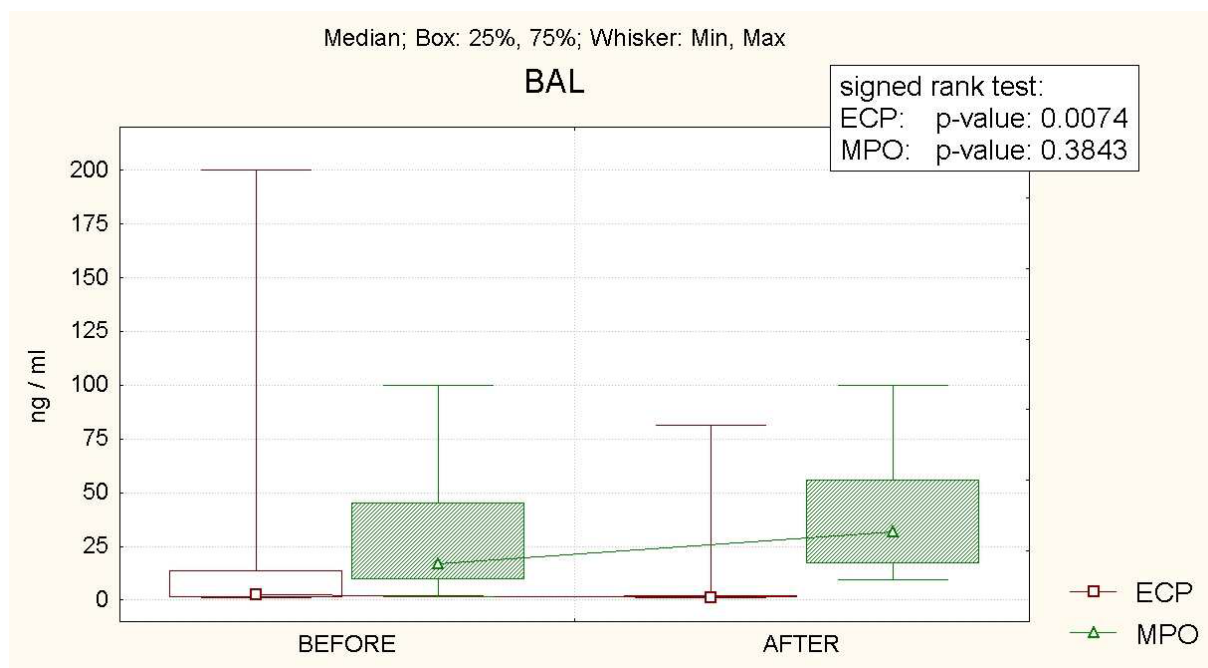
**Graf č. 7** Počty neutrofilů, monocytů a eozinofilů ve vzorcích BALTE před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie stanovené metodou DCC



**Graf č. 8** Počty neutrofilů, monocytů a eozinofilů ve vzorcích BALTE před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie stanovené metodou ICC



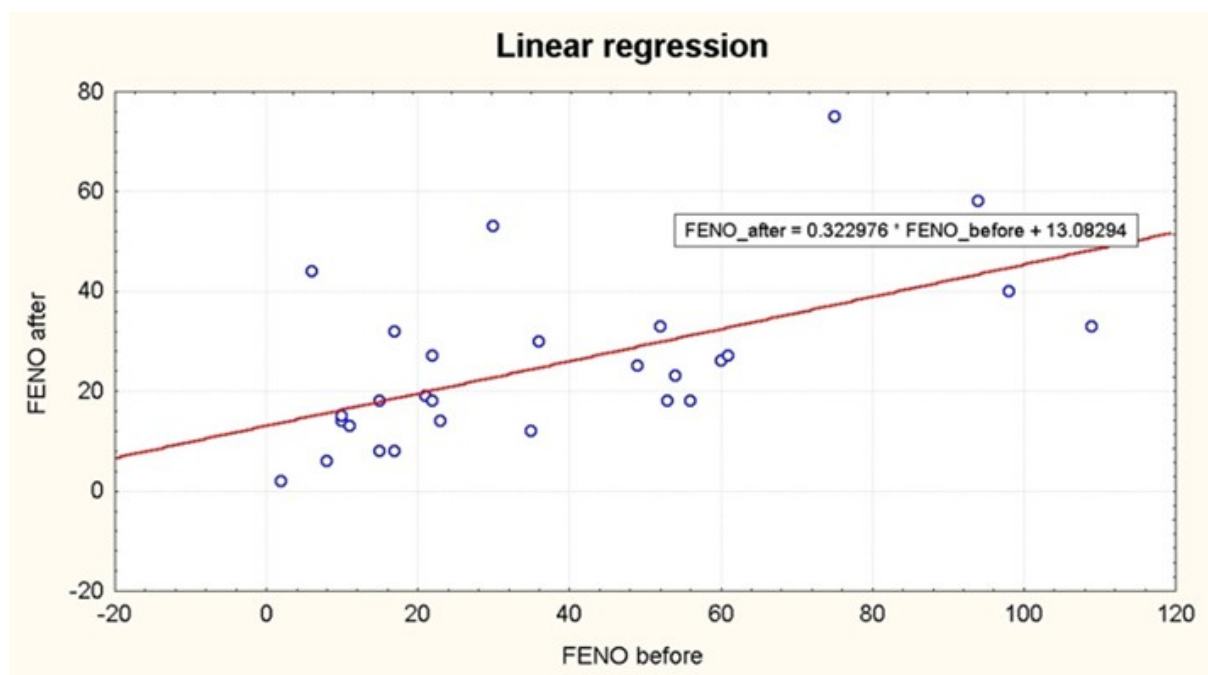
**Graf č. 9** Hodnota ECP a MPO ve vzorcích BALTE před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie



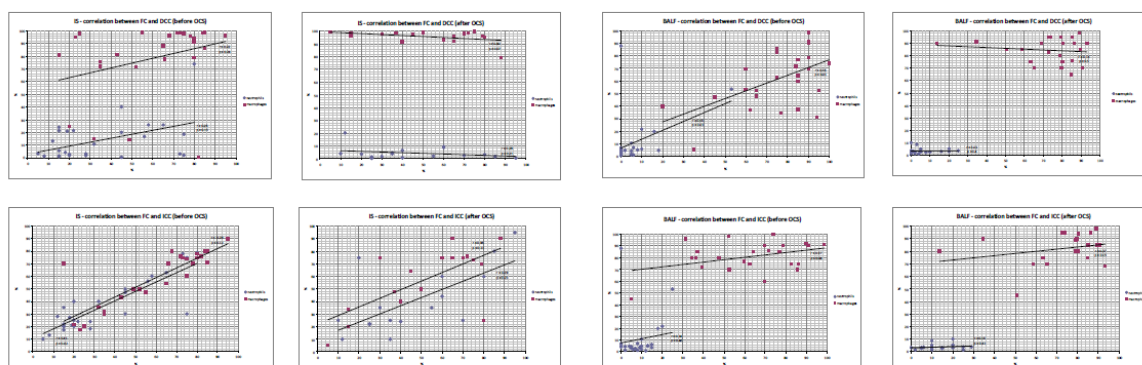
**Graf č. 10 a** Hodnota FENO před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie



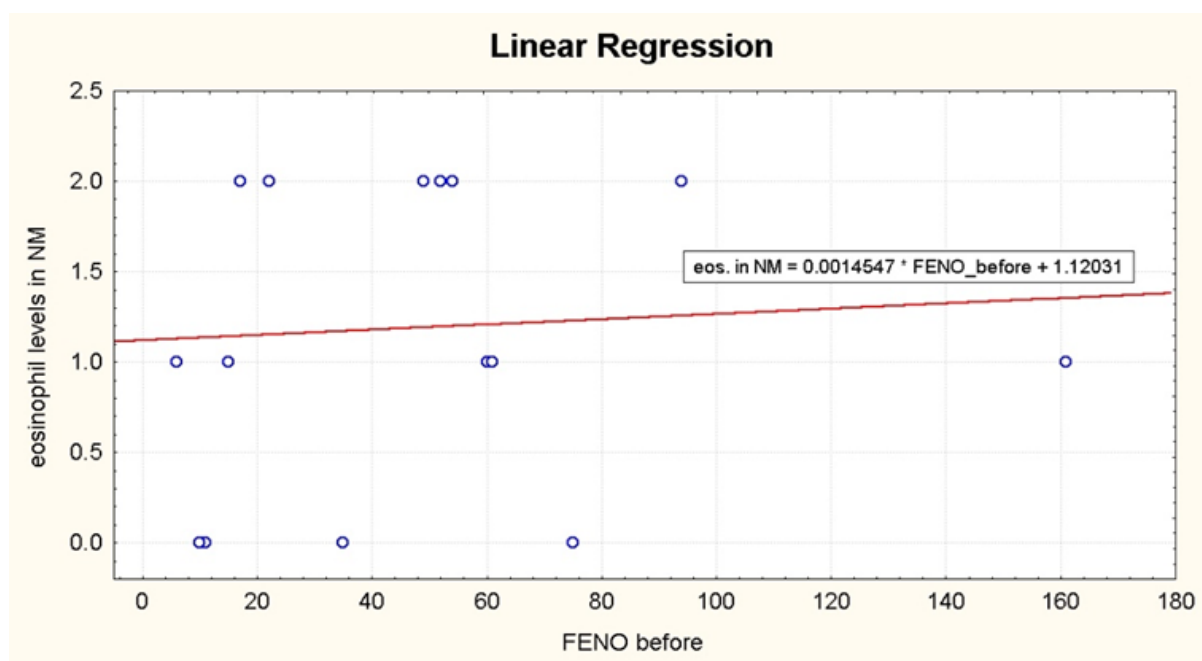
**Graf č. 10 b** Hodnota FENO před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie



**Graf č. 11** Vyšetření vzorků IS a BALTE pomocí průtokové cytometrie FC



**Graf č. 12** Počet eozinofilů v nosní biopsii (NM) a hodnota FENO před a po nasazení systémové kortikoterapie



### Závěry:

Tato práce potvrdila úzkou provázanost mezi eosinofilním zánětem v horních cestách dýchacích (nosní biopsie) a dolními cestami dýchacími (IS, BALTE). Zjištění nosní eosinofilie může být pomocným kritériem při rozhodování o zahájení systémové kortikoterapie u pacientů s těžkým astmatem. Kombinace vyšetření nosní biopsie, indukovaného sputa a bronchoalveolární laváže nám přináší důležité a přesnější informace o zánětlivých změnách u těžkých astmatiků. Vyšetření pomocí průtokové cytometrie není dle našich zjištění vhodnou metodou pro stanovení buněčného profilu v dýchacích cestách (IS, BALTE). Diskuze v závěru kapitoly 4.1.

### **4.1.2 ORL nálezy a jejich využití při fenotypizaci pacientů s astmatem**

Nosní polypy jsou velice častou komorbiditou u pacientů s astmatem, prevalence se pohybuje mezi 6,7-13 %, na druhé straně prevalence astmatu u pacientů s nosní polypózou se pohybuje okolo 45 %. Astma a rinosinusitida (s či bez přítomnosti nosních polypů) spolu úzce souvisejí a předpokládá se, že představují spektrum jedné nemoci (tzv. hypotéza jednotných dýchacích cest). Tím, jak roste tlak na přesnější fenotypizaci astmatu, jako předpokladu racionální indikace cílené léčby, nabízí se otázka, zda a v jaké míře k ní mohou ORL nálezy přispět.

Dle našich předchozích zjištění (4.1.1, 4.1.2) byla zjištěna poměrně silná korelace mezi eosinofilním zánětem horních a dolních cest dýchacích (vyšetřením IS, BALTE a nosní biopsie).

**Cílem** této práce bylo zjistit, zda existují rozdíly, resp. korelace mezi intenzitou bronchiální eozinofilie a přítomností nosních polypů u rozdílných fenotypů astmatu a jejich praktický přínos.

#### **Soubor pacientů a metody stanovení:**

Provedli jsme retrospektivní hodnocení 128 pacientů s astmatem s různou tíží nemoci mezi lety 2004-2011. Základní charakteristiky skupiny uvádí tab. č. 6. Do studie nebyli zařazeni pacienti s cystickou fibrózou, imunodeficitem, vrozenou poruchou mukociliární clearance, invazivními plísňovými onemocněními a nádory. Na základě přímých a nepřímých známek eozinofilie a alergie jsme pacienty rozdělili do 3 základních skupin (fenotypů): I. Eosinofilní a alergické, II. Eosinofilní a nealergické a III. Neeosinofilní astma, blíže viz tab. č. 5. Alergologické vyšetření zahrnovalo i cílenou detekci alergie na plísně, cílená anamnéza zjišťovala intoleranci nesteroidních antiflogestik (NSAID). Tíže astmatu byla hodnocena dle GINA kritérií (lehké, středně těžké a těžké perzistující astma).

**Tab č. 5** Fenotypická klasifikace astmatiků použita ve studii 2004-2011

Eos – eosinophils, ICS – inhaled corticosteroid treatment, CRS-chronic rhinosinusitis, NP-nasal polyps, BHR – bronchial hyperresponsiveness, ABPA – allergic bronchopulmonary aspergillosis, LABA – long acting beta2 agonists, ALT – antileukotriens, SCS – systemic corticosteroids, IL-interleukin, IFN – interferon, TNF – tumor necrosis factor.

\*Comorbidities such as gastroesophageal reflux, vocal cord dysfunction, tracheobronchial dyskinesia, systemic diseases (vasculitis), obesity, cardiac dysfunction, sleep apnoea syndrome.

|                    | Eosinophilic and allergic (type I.)        | Eosinophilic but non-allergic (type II.)               | Non Eosinophilic (type III.)               |
|--------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Eosinophilia       | + to ++                                    | ++ to +++                                              | 0                                          |
| Allergy            | Always                                     | Mostly no                                              | Mostly no                                  |
| Inflammatory cells | Mast cells, eos                            | Eos                                                    | Another                                    |
| Evidence of asthma | Mostly from childhood                      | In adult                                               | Mostly in adult                            |
| Asthma severity    | Mostly mild or moderate                    | Mostly severe                                          | All degrees                                |
| ICS response       | Very good +++                              | Partial ++                                             | Little +                                   |
| Standard treatment | ICS + LABA + (ALT)                         | ICS + LABA, ALT, SCS, event. immunosuppression         | ICS+ LABA, ALT Treatment of comorbidities* |
| Special treatment  | Anti – IgE antibody<br>Antimycotic therapy | (Anti – IL 4, 5 antibodies),<br>bronchial thermoplasty | (IFN, anti-TNF)                            |

**Tab č. 6** Základní charakteristiky 128 vybraných pacientů

Characteristics

No. (%)

|                     |                                 |                                                               |
|---------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Age                 | Mean 46,01<br>Range 13-79       | Male 42,03<br>Female 48,82                                    |
| Gender              | Male                            | 53 (41,4)                                                     |
|                     | Female                          | 75 (58,6)                                                     |
| Race                | Caucasian                       | 100                                                           |
| Asthma severity     | Mild and moderate<br>Severe     | 42 (32,8)<br>86 (67,2)                                        |
| CRS                 | Yes<br>No<br>+ NP<br>Without NP | 99 (77,3)<br>29 (22,6)<br>57 (57,5)<br>42 (42,5)              |
| ACP intolerance     | Yes<br><br>No                   | 22 (17,5)<br>Male 10 (45,4)<br>Female 12 (54,5)<br>106 (82,8) |
| Mould allergy       | Yes<br><br>No                   | 32 (25)<br>Male 12 (37,5)<br>Female 20 (62,5)<br>96 (75)      |
| Dust mites allergy  | Yes<br>No<br>Unknown            | 41 (33,1)<br>83 (66,9)<br>4                                   |
| Pets allergy        | Yes<br>No<br>Unknown            | 24 (19,4)<br>100 (80,6)<br>4                                  |
| Nasal mucosa biopsy | done<br><br>not done            | 91<br><br>37                                                  |

K posouzení přítomnosti alergie a eozinofilie DCD (průdušek) byly u pacientů provedeny:

1. Kožní testy na běžné alergenů (dle standardů s použitím Alyostal Prick Test, Stallergens).
2. Měření hladin specifických IgE (pomocí Immulite analyzáru  $\geq 0.7$  IU/ml).
3. Měření vydechovaného oxidu dusnatého (FENO), systémem Niox Mino set.
4. Stanovení ECP (eosinofilní kationický protein) jako marker aktivity eosinofilů v séru, sputu a BALTE za použití chemiluminiscenční imunometrické assay (Immulite, DPC), výsledky byly upraveny dle dilučního faktoru. Prahová hodnota detekce byla 0.2 mg/ml.
5. Stanovení počtu eosinofilů v krvi.
6. Stanovení počtu eosinofilů v indukovaném sputu, vyšetření indukovaného sputa proběhlo standardní metodou (dle Pizzichini). Diferenciální buněčný rozpočet byl stanoven pomocí klasického a imunocytochemického barvení, (viz předchozí studie).
7. Stanovení počtu eosinofilů v BALTE. 32 pacientů s těžkým astmatem podstoupilo bronchoskopii dle ATS guidelines (viz předchozí práce). Diferenciální rozpočet byl stanoven stejnou metodikou jako u vyšetření indukovaného sputa.

K posouzení intenzity eozinofilie HCD a přítomnosti nosní polypózy byly využity tyto metody:

1. Anamnestická data předchozích ORL operací.
2. Přímá rinoskopie.
3. CT scany (axiální a koronární).
4. Histologická vyšetření vzorků nosní sliznice.

Použili jsme modifikovaný endoskopický stagingový systém pro hodnocení stádia nosní polypózy s rozšířením o CT scany. Stadium 0 – bez nosních polypů, I-polypy dosahují maximálně ke střednímu meatu a dle CT scanů jsou nízkého stupně, II-polypy přesahují střední meatus a kompletně vyplňují dutinu nosní a dle CT scanů jsou přítomny ve vysokém stupni.

Vzorky nosní sliznice jako možného markeru eozinofilie v horních cestách dýchacích, byly odebrány vždy dva (postup viz předchozí studie 4.1.1.1).

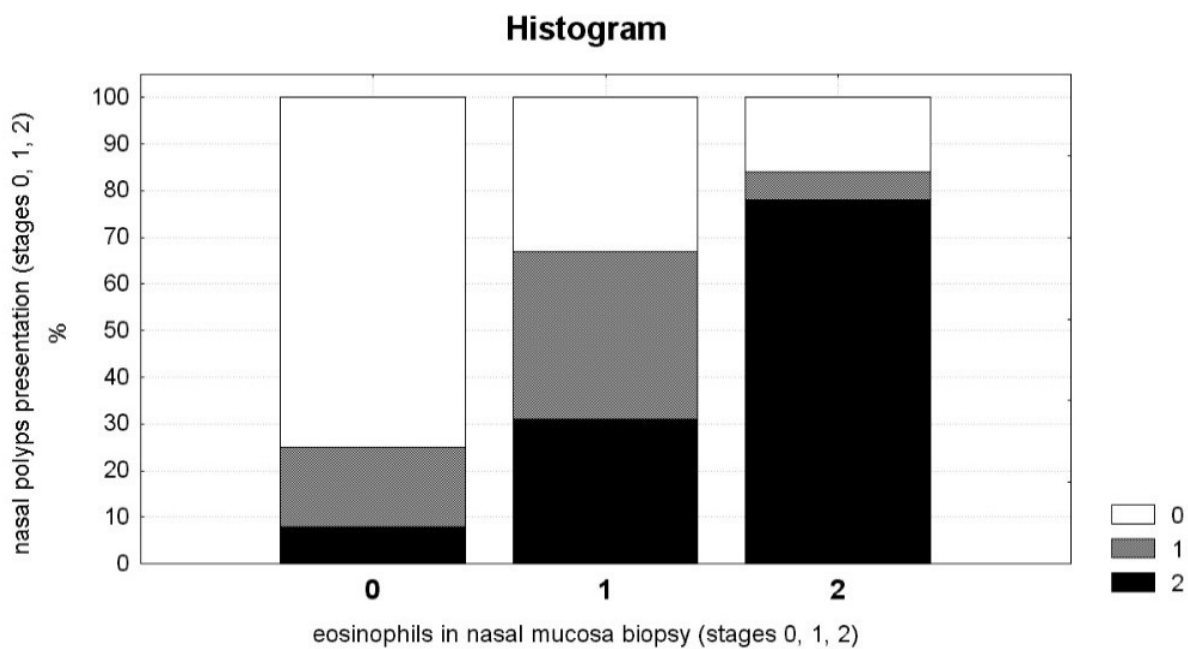
Statistické výpočty byly provedeny s použitím Chi-square testu a Spermanova korelačního koeficientu. Hodnota  $p < 0.05$  byla hodnocena jako statisticky významná.

### Výsledky:

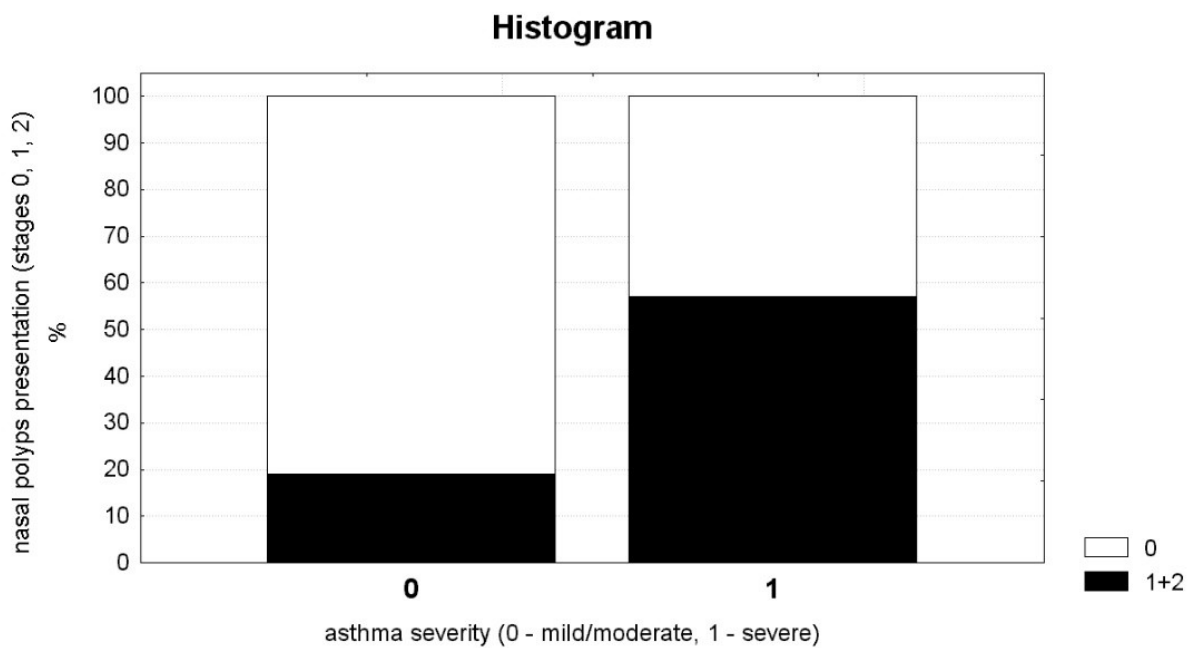
Statistická významnost byla zjištěna při porovnání přítomnosti eosinofilního typu zánětu ve vzorcích nosních biopsií (NB) s přítomností nosních polypů ( $p = .0001$ , coeff. 0.55) a rovněž i stadium nosních polypů (I, II, III) odpovídalo intenzitě eozinofilie ve vzorcích nosní biopsie (st. I, II, III) ( $p = .0001$ , coeff. 0.44). **Graf č. 13.** Dále byla potvrzena korelace mezi přítomností nosních polypů a tíží nemoci, těžkým astmatem ( $p = .0001$ , coeff. 0.358). **Graf č. 14.** Přítomnost nosních polypů se sdružovala s eosinofilním a nealergickým typem zánětu ( $p = .0001$ ). **Graf č. 15.** NSAID intolerance nejčastěji provázela eosinofilní a nealergický typ zánětu ( $p < 0.001$ )

**Graf č. 16.** U pacientů s eosinofilním a alergickým fenotypem astmatu, přítomnost nosních polypů korelovala s přítomností alergie na plísň (p = .0004, coeff. 0.39) **graf č. 17.** Alergie na plísň (p = .0031, coeff. 0.259) a intolerance NSAID (p = .0090, koef 0.230) nejčastěji provázely těžké perzistující astma. **Graf č. 18 a, b.**

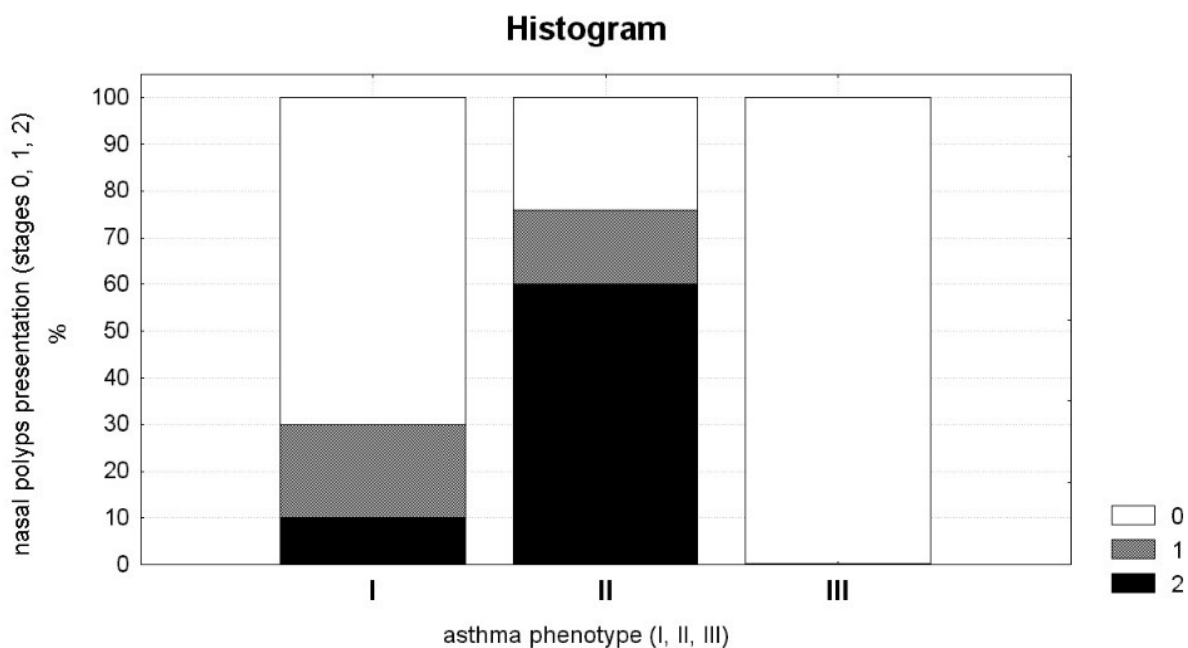
**Graf č. 13** Porovnání přítomnosti eosinofilního typu zánětu (dle intenzity 0-2) v nosní biopsii a přítomnost nosních polypů dle stádií (I-III).



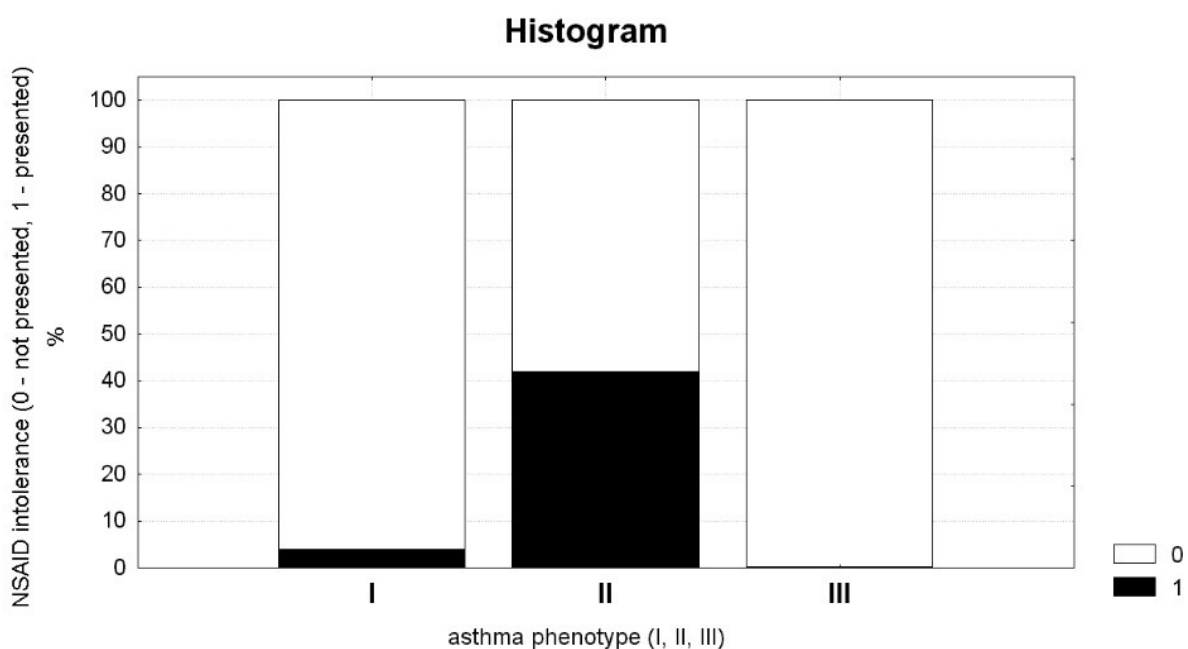
**Graf.č. 14.** Přítomnost nosních polypů a tíže nemoci (lehké, středně těžké a těžké astma)



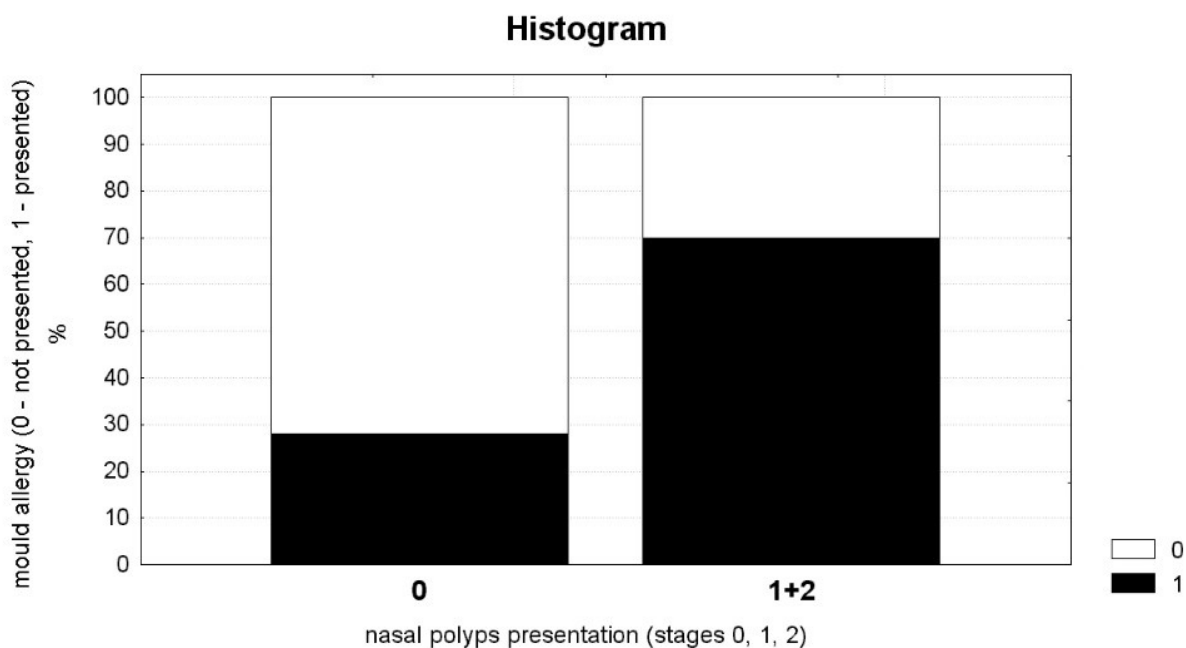
**Graf.č. 15** Přítomnost nosních polypů u jednotlivých fenotypů astmatu (I-eozinofilní+alergický, II.-eozinofilní nealergický, III-neeozinofilní)



**Graf.č. 16.** Přítomnost intolerance NSAID a astma fenotypy (I-eozinofilní+alergický, II.-eozinofilní nealergický, III-neeozinofilní)

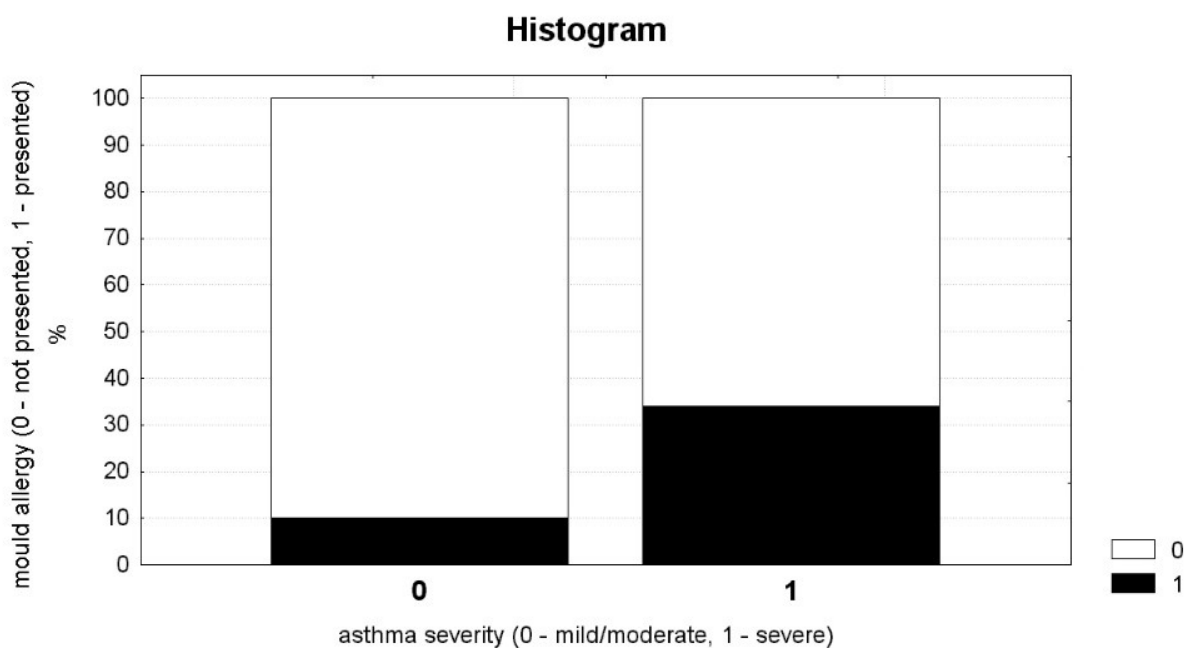


**Graf.č. 17** Soubor pacientů s eosinofilním alergickým (I.) fenotypem astmatu – sledování přítomnosti nosní polypózy u pacientů s alergií na plísně

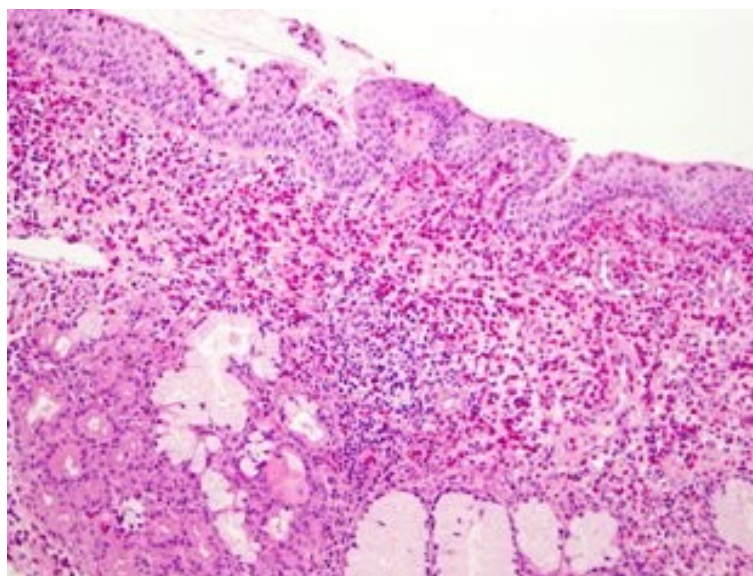
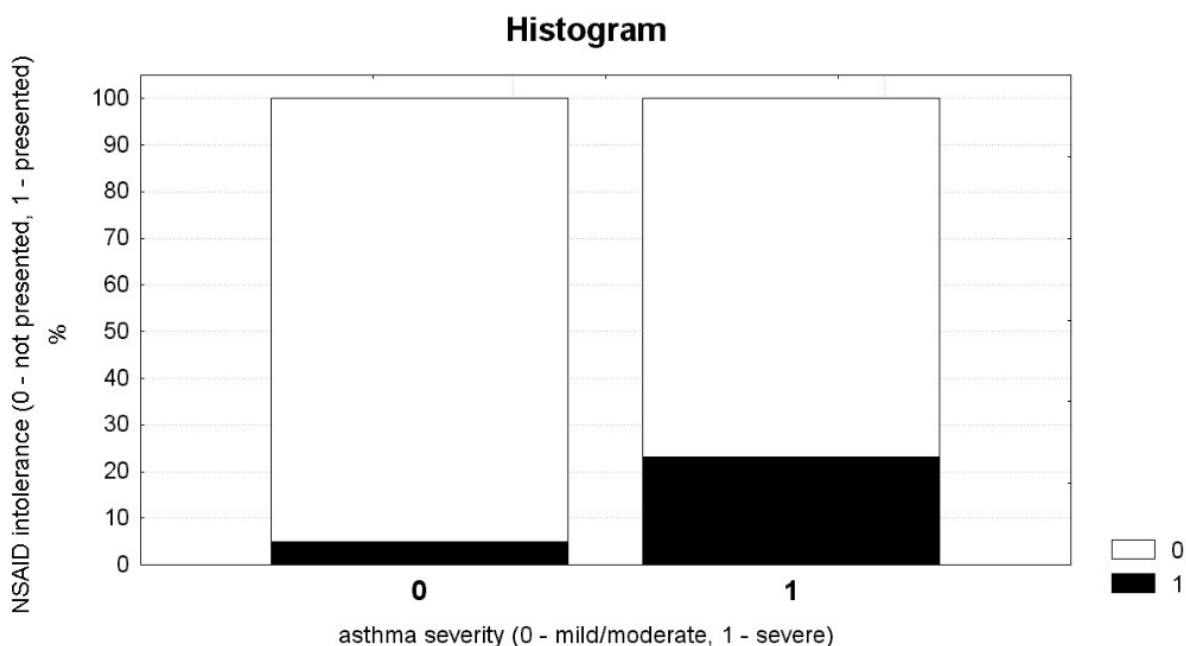


**Graf.č. 18 a, b** Alergie na plísně a NSAID intolerance vs tíže astmatu

a)



b)



**Obr.č. 6** Vzorek nosní sliznice z pohledu patologa, patrné výrazné prostoupení eozinofilů (červená), zdroj Ústav patologie FN Plzeň

#### Diskuze ke kapitole 4.1

Astma je dnes díky množství léčebných možností dobře léčitelné onemocnění, za předpokladu správné diagnózy, která zahrnuje určení jeho fenotypu, tíže a kontroly, od nichž se odvíjejí léčebné strategie. Je proto velice zásadní provést podrobnější vyšetření nemocného (fenotypizaci), a to především máme-li před sebou nového, dosud neléčeného pacienta, a dále u nemocných, jejichž nemoc se z nejasných důvodů zhoršuje. V naší retrospektivní studii jsme použili multifunkční klasifikaci astmatu (dle Teřla a Kašáka) – spojující tíži, kontrolu a fenotyp astmatu. Tato klasifikace umožňuje lépe zacílit terapii (IKS, antileukotrieny, omalizumab, anti-IL-5, antimykotika, bronchiální termoplastika).

Alergologická vyšetření jsou poměrně snadno a rychle proveditelná. Naproti tomu sledování a vyšetření eosinofilního zánětu v dolních dýchacích cestách, zvláště u těžkých astmatiků, může představovat problém. Jedná se o terén ovlivněný letitou léčbou vysokými dávkami inhalačních a ev. i systémových steroidů, které mohou zkreslovat vyšetřované zánětlivé změny v DCD.

Pokusili jsme se tedy zjistit, která vyšetření, resp. které biomarkery eosinofile jsou dostatečně specifické a senzitivní, aby dokázaly spolehlivě detekovat eosinofilní zánět v DCD. Dle našich iniciálních předchozích studií se jako vhodný biomarker jevila přítomnost eosinofilie a ECP v BALTE a indukovaném sputu. V klinické praxi jsou ale tyto metody spojeny s vyššími riziky a nároky (bronchoskopie-bronchospasmus, exacerbace astmatu, časová i finanční náročnost). Proto se naše navazující práce zaměřila na vyšetření horních cest dýchacích a jejich možnou provázanost s dolními dýchacími cestami pomocí ORL nálezů včetně vyšetření nosních biopsií.

Vzorky nosní sliznice byly častěji odebírány u pacientů s těžkým astmatem, u nichž docházelo častěji k zhoršování nemoci a rovněž se potíže s horními cestami dýchacími vyskytovaly mnohem častěji. V našem souboru nemocných bylo daleko vyšší procentuální zastoupení těžších astmatiků, než je tomu v běžné populaci. Je to dáno především tím, že naše klinické pracoviště je zároveň centrem pro těžké astma pro širokou oblast jihozápadních Čech. Přesto procentuální zastoupení pacientů s lehkým a středně těžkým astmatem bylo dostačující pro statistické vyhodnocení celé skupiny. Zjistili jsme statisticky významnou korelaci mezi intenzitou eosinofilie v nosní biopsii a markery eosinofilie v dolních cestách dýchacích (hladiny ECP v IS a BALTE a eosinofile v IS).

Vzorky nosní sliznice byly standardně semikvantitativně hodnoceny stejnou patoložkou ve snaze minimalizovat interpretační rozdíly. Během odběru nosního vzorku nedošlo k žádné významné komplikaci, řešili jsme pouze mírnou epistaxi. Naproti tomu odběr vzorku endobronchiálně, transbronchiálně či odběr bronchoalveolární laváže představuje výrazně vyšší riziko pro pacienta(astmatika).

Otázkou zůstává, zda existuje ještě jiná jednodušší cesta, jak spolehlivě potvrdit eosinofilii v horních, a tedy i dolních dýchacích cestách. V naší retrospektivní studii jsme se pokusili tento biomarker najít, a to pomocí pečlivého sběru dat (operační ORL anamnéza, CT scany, rinoskopické vyš., nosní sliznice) a jejich korelací s výsledky z dolních dýchacích cest.

Zjištěné výsledky ukazují, že přítomnost a stupeň nosní polypózy dobře koreluje s ostatními biomarkery bronchiální eozinofilie a úzce souvisí nejen s intenzitou eozinofilie ve vzorcích nosní biopsie, ale i v průduškách. Průkaz nosní polypózy by tedy mohl být jednoduchým biomarkerem k potvrzení eosinofilního typu astmatu.

Klinický význam detekce nosní polypózy, byť třeba jen anamnestické, prudce stoupá především tam, kde díky intenzivní protizánětlivé léčbě mizí projevy/biomarkery lokální (FENO, cytologie sputa) i systémové eozinofilie (ECP, diff. KO). Zvláště hodnoty FENO klesají po zavedení protizánětlivé léčby velmi rychle, v řádu několika málo dní. Později (týdny až měsíce-v závislosti na intenzitě původní eozinofilie a léčby, ev. vlivem kouření) ustupuje i eozinofilie indukovaného sputa. V těchto případech reziduální eozinofilní zánět dokáže prokázat pouze bronchiální biopsie a někdy ani ta již nezjistí přítomnost původní eozinofilie.

Zaměříme-li se na skupinu těžkých astmatiků (u alergického fenotypu je to především podskupina s přecitlivělostí na plísň, u nealergického fenotypu je to podskupina s intolerancí NSAID) je přítomnost nosní polypózy indikátorem problematického typu nemoci. U pacienta s těžkým refrakterním alergickým fenotypem astmatu s prokázanou alergií na plísň musíme pomýšlet na riziko rozvoje bronchopulmonální mykózy (ABPA, SAFS) (Agarwal, 2011). U nealergického eosinofilního fenotypu pomýšlíme vždy na možnost Samterovy triády (astma s chronickou rinosinusitidou a intolerancí NSAID). Rovněž bychom měli být obezřetní a pomýšlet i na riziko autoimunitních nemocí jako je syndrom Churg-

Straussové a jiné vaskulitidy. Výsledky tedy potvrzují, že přítomnost nosních polypů je spolehlivým a pragmatickým biomarkerem přítomnosti eosinofilního typu zánětu u astmatických pacientů. Jedná se o jednoduché, nenákladné a ve srovnání s bronchologickými metodami pro astmatiky méně zatěžující vyšetření s benefitem pro lékaře i pacienta.

## **4.2 Hodnocení klinických výsledků využití biomarkerů při fenotypicky cílené léčbě pacientů s těžkým refrakterním astmatem**

### **4.2.1 Biomarkery eozinofilie a alergie z krve**

Přestože terapie astmatu se za posledních několik let posunula významně dopředu, zůstává astma celosvětovým problémem s narůstající prevalencí. Problematickou zůstává především ta část pacientů, kterou se nám přes veškerou snahu nedaří dostat pod kontrolu, jsou ohroženi častými exacerbacemi a rizikem ireverzibilní deklinace plicních funkcí.

Podstata nemoci je stejná – chronický zánět, remodelace a hyperreaktivita, ale dílčí charakteristiky zánětu se u jednotlivců liší, jak charakterem a intenzitou, tak vlastní etiopatogenezí. Proto jsou neustále hledány cesty k přesnější klasifikaci s důrazem na fenotyp a fenotypicky cílenou léčbu. K učení fenotypicky cílené léčby potřebujeme určité specifické biomarkery, které nám pomohou určit, zda je nemocný pro tuto léčbu vhodným kandidátem.

V této části práce jsme se snažili sledovat konkrétní skupiny těžkých astmatiků, kteří byli vybráni na základě specifických biomarkerů a fenotypu k biologicky cílené léčbě, jejíž efekt jsme následně vyhodnocovali.

#### **4.2.1.1 Vyhodnocení efektu a bezpečnosti cílené biologické terapie omalizumabem v ČR**

(Kirchnerová et al., 2018)

Omalizumab je humanizovaná anti-imunoglobulin E (IgE) monoklonální protilátka, která byla schválena v EU pro pacienty s těžkým perzistujícím alergickým astmatem starších 6 let, jejichž astma, navzdory maximální terapii, není pod dostatečnou kontrolou. Výsledky řady klinických studií dospěly k závěru, že omalizumab zlepšuje dlouhodobou kontrolu astmatu, plicní funkce, snižuje užívání systémových kortikosteroidů, úlevové medikace a počet exacerbací. (Bousquet et al., 2011) (Humbert et al., 2014). Pro podporu těchto výsledků byl proveden 2-letý, globální, postmarketingový registr (eXperience), vyhodnocující pacienty léčené omalizumabem. (Braunstahl et al., 2013)

**Cíl práce:** Tato práce vyhodnocuje efekt přídatné léčby omalizumabem u pacientů v ČR, kteří byli zařazeni do registru eXperience

**Metody:** Registr eXperience byl 2letý, mezinárodní, postmarketingový, neintervenční, multicentrický (14 zemí Evropy, Ameriky a Asie), otevřený, jednoramenný observační registr, který shromažďil údaje o bezpečnosti a účinnosti léčby omalizumabem u pacientů s těžkým perzistujícím alergickým (IgE) astmatem. Dávka omalizumabu byla stanovena na základě evropského souhrnu údajů o léčivých přípravcích. Do studie byli zařazeni ti pacienti, kteří podepsali informovaný souhlas a splnili všechny podmínky pro podání omalizumabu. Nebyli zařazeni pacienti, kteří se účastnili jiné klinické studie nebo ti, kteří užívali omalizumab v posledních 18 měsících. Návrh registru byl přezkoumán nezávislými etickými výbory nebo kontrolními komisemi v každém středisku a samotný registr byl veden v souladu s Helsinskou deklarací. Současná studie byla post-hoc analýzou globálního registru eXperience.

**Vyhodnocení:** Po vstupu do registru byla z předchozích záznamů získána základní data (anamnéza, tíže astmatu a jeho kontrola, léčba v posledních 12 měsících). Pacienti byli sledováni v následujících dvou letech od zahájení terapie omalizumabem, a to v 16. týdnu a v 8., 12., 18. a 24. měsíci, kdy byl proveden sběr dat. Hodnocen byl efekt terapie dle GETE (physician's global evaluation of treatment effectiveness). Dotazník hodnotí pacienty na škále 1-5 (1 - výborný, kompletní kontrola, 2 - dobrý, viditelné zlepšení, 3 - střední, viditelné, ale limitované zlepšení kontroly, 4 - špatné, žádná viditelná změna, 5 - zhoršení).

Hodnotili jsme plicní funkce (FEV1 % predikované hodnoty), PEF (peak expiratory flow), klinické symptomy (noční a denní), četnost užití úlevové medikace, potřebu orálních a inhalačních kortikosteroidů. Dále počet a tíži exacerbací, astma kontrol test, mini-AQLQ dotazník (test kvality života), potřebu zdravotní péče (akutní ošetření, hospitalizací, neplánovaných návštěv), počet zameškaných školních a pracovních dnů, vážné nežádoucí účinky a smrt.

### Statistické metody

Proměnné hodnotící efekt léčby byly analyzovány u všech pacientů z České republiky, kteří byli zařazeni do registru a obdrželi minimálně jednu dávku omalizumabu a zároveň dospěli alespoň k jednomu hodnocení efektu (populace intent-to-treat, ITT). Pro analýzy jednotlivých časových intervalů byla použita data pacientů, která byla v daném intervalu k dispozici. Bezpečnostní data byla analyzována u všech pacientů z ČR, kteří byli zařazeni do registru, obdrželi alespoň jednu dávku omalizumabu a zároveň absolvovali alespoň jedno hodnocení efektu. Tato populace byla použita zároveň pro výpočty demografických a vstupních charakteristik.

Deskriptivní (popisné) statistiky jsou vyjádřeny jako průměry a směrodatné odchylky (SD) respektive jako frekvence (četnosti) u kategoriálních dat. Opakovaná měření byla hodnocena s využitím obecného lineárního modelu (GLM-RM) nebo Friedmanovy ANOVY v případě, že data nesplňovala podmínky normálního rozdělení. Četnostní data byla hodnocena pomocí testu  $X^2$  (Chí kvadrát). Analýza přežití byla provedena s využitím Kaplanova-Meierova algoritmu (s vyčíslením střední doby přežití) nebo Coxovy regrese (vyčíslovací poměr rizik „HR“ a 95% interval spolehlivosti). Pro všechny analýzy byla označena jako statisticky významná hodnota  $p < 0.05$ . Všechny analýzy byly provedeny pomocí analytického programu IBM SPSS Statistics, verze 22.0 (Windows), Armonk, NY: IBM Corp. Jedná se o post-hoc analýzu dat globálního registru eXpeRience.

**Tab č. 7** Základní charakteristiky souboru pacientů vyhodnocující efekt přídatné léčby omalizumabem u pacientů v ČR (Růžicková Kirchnerová et al., 2018)

**Table 1.** Baseline demographics and clinical characteristics (safety population) (*N* = 112)

| Variable                                                                | Results      |
|-------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Age group, <i>n</i> (%) [years]:                                        |              |
| < 12                                                                    | 1 (0.9)      |
| 12–17                                                                   | 3 (2.7)      |
| 18–64                                                                   | 102 (91.1)   |
| ≥ 65                                                                    | 6 (5.4)      |
| Age, mean ± SD [years]                                                  | 44.0 ±13.0   |
| Female, <i>n</i> (%)                                                    | 68 (60.7)    |
| Race, <i>n</i> (%):                                                     |              |
| Caucasian                                                               | 112 (100.0)  |
| Other                                                                   | 0 (0)        |
| Body weight, , mean ± SD [kg]                                           | 77.3 ± 15.9  |
| Baseline IgE level, mean ± SD [IU/ml]                                   | 290.3 ±262.5 |
| Duration of allergic asthma, mean ± SD [years]                          | 18.5 ±12.4   |
| FEV <sub>1</sub> % predicted, mean ± SD                                 | 61.0 ±16.3   |
| Positive skin-prick test/RAST for perennial aeroallergens, <i>n</i> (%) | 105 (93.8)   |
| Specification, <i>n</i> (%) <sup>a</sup> :                              |              |
| Dust mites                                                              | 81 (72.3)    |
| Cat dander                                                              | 47 (42.0)    |
| Dog dander                                                              | 50 (44.6)    |
| Cockroaches                                                             | 3 (2.7)      |
| Others                                                                  | 19 (17.0)    |
| History of allergy to seasonal aeroallergens, <i>n</i> (%)              | 93 (83.0)    |
| Smoking history, <i>n</i> (%):                                          |              |
| Never smoked                                                            | 85 (75.9)    |
| Ex-smoker                                                               | 26 (23.2)    |
| Current smoker                                                          | 1 (0.9)      |
| Asthma clinical symptoms, <i>n</i> (%):                                 |              |
| Daytime asthma symptoms                                                 | 109 (97.3)   |
| Limitations of activities                                               | 110 (98.2)   |
| Nocturnal symptoms/awakenings                                           | 96 (85.7)    |
| Asthma control, <i>n</i> (%) <sup>b</sup> :                             |              |
| Partly controlled                                                       | 27 (24.1)    |
| Uncontrolled                                                            | 85 (75.9)    |

<sup>a</sup>Multiple entries possible, <sup>b</sup>Investigator's assessment, IgE – immunoglobulin E, RAST – radio-allergo-sorbent test, SD – standard deviation.

**Výsledky:** Z celkového počtu 943 pacientů zařazených do registru eXperience, 114 pocházelo z České republiky. ITT a bezpečnostní populace zahrnovala 112 pacientů. Základní data pacientů obsahuje **Tab č. 7**. Téměř 15% (14,9%) pacientů bylo vyřazeno z registru, důvodem byla ztráta pacienta ze sledování (n = 5), přerušení léčby (n = 3), úmrtí (n = 1), ostatní důvody (n = 8), 7 pacientů z ČR mělo nekompletní záznamy, resp. nedořešené dotazy ze strany registru. Po 24 měsících, tedy na konci registru, byla kompletní data přístupná pro zpracování u 81 pacientů z ČR.

GETE (physician's global evaluation of treatment effectiveness)

Vyhodnocení pomocí GETE dotazníku po 16 týdnech terapie bylo provedeno u 90 pacientů, 88,9% z nich byli (n = 80) respondéři (excelentní a dobrá odpověď na terapii v 7,8% (n = 7) a 81,1% (n = 73) pacientů), 11,1% (n = 10) pacientů na terapii nereagovalo (non-respondéři), viz **Graf č. 19**. V případě vyhodnocení GETE dotazníku v kterémkoli časovém bodě po dobu registru, 85,7 % (n = 96) byli respondéři a 14,3% (n = 16) non respondéři).

**Graf č. 19** GETE hodnotící dotazník léčebného efektu po 16 týdnech terapie omalizumabem

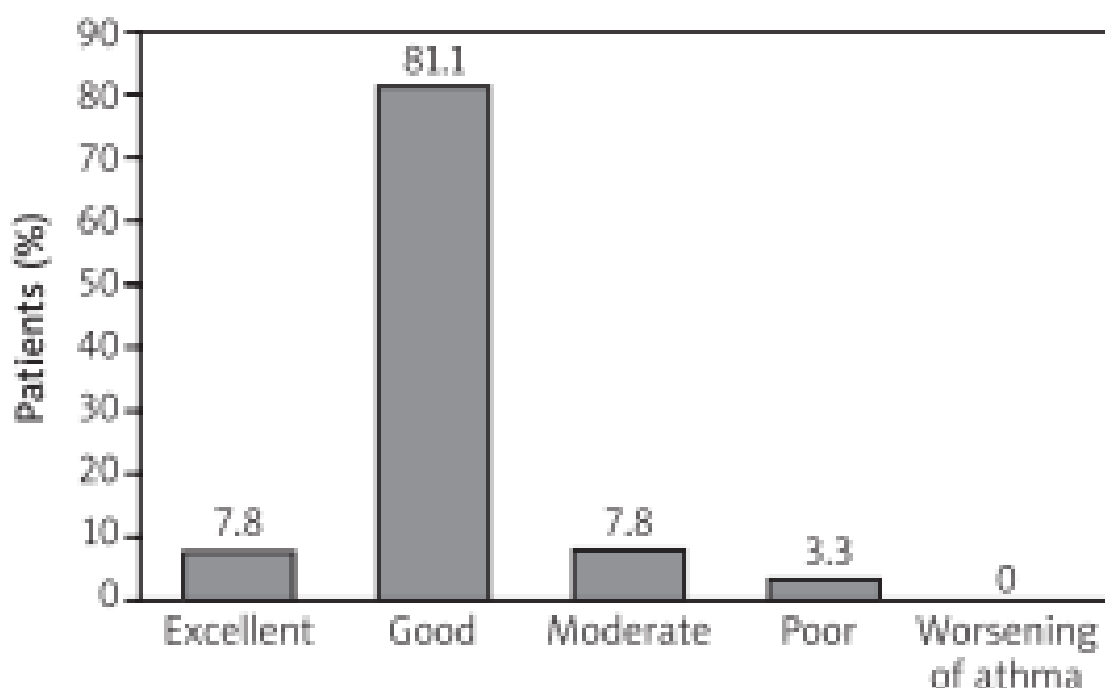


**Figure 1.** Physician's global evaluation of treatment effectiveness (GETE) at week 16 ± 1 weeks (n = 90)

#### Plicní funkce

Terapie omalizumabem vedla k zlepšení FEV1 se střední změnou oproti výchozím hodnotám (ml) 205 (n=105), 215 (n=88), 273 (n=87), 200 (n=85) a 137(n=80) v 16. týdnu, 8.,12.,18. a 24. měsíci terapie. Došlo ke zlepšení PEF se střední změnou oproti výchozí hodnotě (l/min) 11,01 (n=82), 18,38 (n=66), 32,82 (n=65), 25,18 (n=63) a 21,85 (n=60) v 16. týdnu, 8.,12.,18. a 24. měsíci terapie.

## Astma symptomy a užití úlevové medikace

Omalizumab snižuje denní i noční příznaky, probouzení v noci, omezení denní aktivity a potřebu úlevové medikace v týdnu před 12 a 24 měsíci oproti výchozím hodnotám. Týden před zahájením terapie (baseline visit) 108 (96,4%) pacientů užívalo pravidelně záchranou medikaci, tato potřeba byla snížena na 61 (75,3%) pacientů po 24 měsících terapie. Průměrná změna (SD) úlevové medikace (krátkodobě působící  $\beta_2$  agonisté) se snížila z 5,2 dní/týdnu na 2,9 dní/týdnu po 24 měsících terapie, viz. **Tab č. 8**.

**Tab č. 8.** Efekt omalizumabu na klinické příznaky astmatu, potřebu úlevové medikace a užití kortikoidů.

**Table 2.** Effect of omalizumab on asthma symptoms, rescue medication and corticosteroid use

| Parameter                                                                               | Czech Republic        |                      |                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
|                                                                                         | Baseline<br>(n = 112) | Month 12<br>(n = 89) | Month 24<br>(n = 81) |
| Daytime symptoms*:                                                                      |                       |                      |                      |
| Number of days:                                                                         |                       |                      |                      |
| Mean (SD)                                                                               | 5.5 (2.2)             | 2.6 (2.4)            | 2.6 (2.5)            |
| N (%)                                                                                   | 109 (97.3)            | 72 (80.9)            | 63 (77.8)            |
| Change in number of days                                                                |                       |                      |                      |
| Mean (SD)                                                                               | –                     | –2.7 (2.5)           | –2.7 (2.6)           |
| N                                                                                       |                       | 88                   | 81                   |
| Nocturnal symptoms/awakening*:                                                          |                       |                      |                      |
| Number of days:                                                                         |                       |                      |                      |
| Mean (SD)                                                                               | 3.2 (2.4)             | 1.1 (1.5)            | 0.9 (1.5)            |
| N (%)                                                                                   | 96 (85.7)             | 44 (49.4)            | 34 (42.0)            |
| Change in number of days:                                                               |                       |                      |                      |
| Mean (SD)                                                                               | –                     | –2.0 (2.4)           | –2.3 (2.1)           |
| N                                                                                       |                       | 89                   | 81                   |
| Limitations of activities*:                                                             |                       |                      |                      |
| Number of days:                                                                         |                       |                      |                      |
| Mean (SD)                                                                               | 5.0 (2.1)             | 2.2 (2.0)            | 2.2 (2.2)            |
| N (%)                                                                                   | 110 (98.2)            | 72 (80.9)            | 57 (70.4)            |
| Change in number of days:                                                               |                       |                      |                      |
| Mean (SD)                                                                               | –                     | –2.8 (2.3)           | –2.9 (2.4)           |
| N                                                                                       |                       | 87                   | 80                   |
| Rescue medication use*:                                                                 |                       |                      |                      |
| Number of days:                                                                         |                       |                      |                      |
| Mean (SD)                                                                               | 5.2 (2.4)             | 3.0 (2.8)            | 2.9 (2.8)            |
| N (%)                                                                                   | 108 (96.4)            | 70 (78.7)            | 61 (75.3)            |
| Change in number of days:                                                               |                       |                      |                      |
| Mean (SD)                                                                               | –                     | –2.1 (2.6)           | –2.1 (2.7)           |
| N                                                                                       |                       | 89                   | 80                   |
| ICS usage:                                                                              |                       |                      |                      |
| Patients on ICS, n (%)                                                                  | 111 (99.1)            | 87 (97.8)            | 78 (96.3)            |
| Total ICS daily dose (beclomethasone dipropionate equivalent $\mu\text{g}$ ), mean (SD) | 2196.4 (1162.9)       | 1947.2 (876.1)       | 1886.4 (945.4)       |
| Number of patients with reduced ICS dose, n (%)                                         | –                     | 21 (23.6)            | 21 (25.9)            |

\*Data are presented for the presence of these outcomes in the week before baseline, month 12, and month 24. ICS – inhaled corticosteroids, SD – standard deviation.

## Užití systémových kortikosteroidů

Pravidelně systémovými kortikosteroidy bylo léčeno 38 pacientů (33,9 %) s průměrnou denní dávkou 11,6mg (ekvivalentu prednisolonu). Procento pacientů užívajících systémové kortikoidy při porovnání se zahájením terapie kleslo o 50 % (n=19) a 52,6 % (n=18) po 12 a 24 měsících léčby a průměrná denní dávka systémové kortikoterapie (ekvivalent prednisolonu) klesla v populaci pacientů trvale užívajících kortikoidy při zahájení léčby na 6,4mg po 12 a 24měs (**Graf č. 20**).

**Graf č. 20** Efekt omalizumabu na potřebu systémových kortikoidů, kontrolu astmatu a exacerpace u pacientů na dlouhodobé terapii systémovými kortikosteroidy

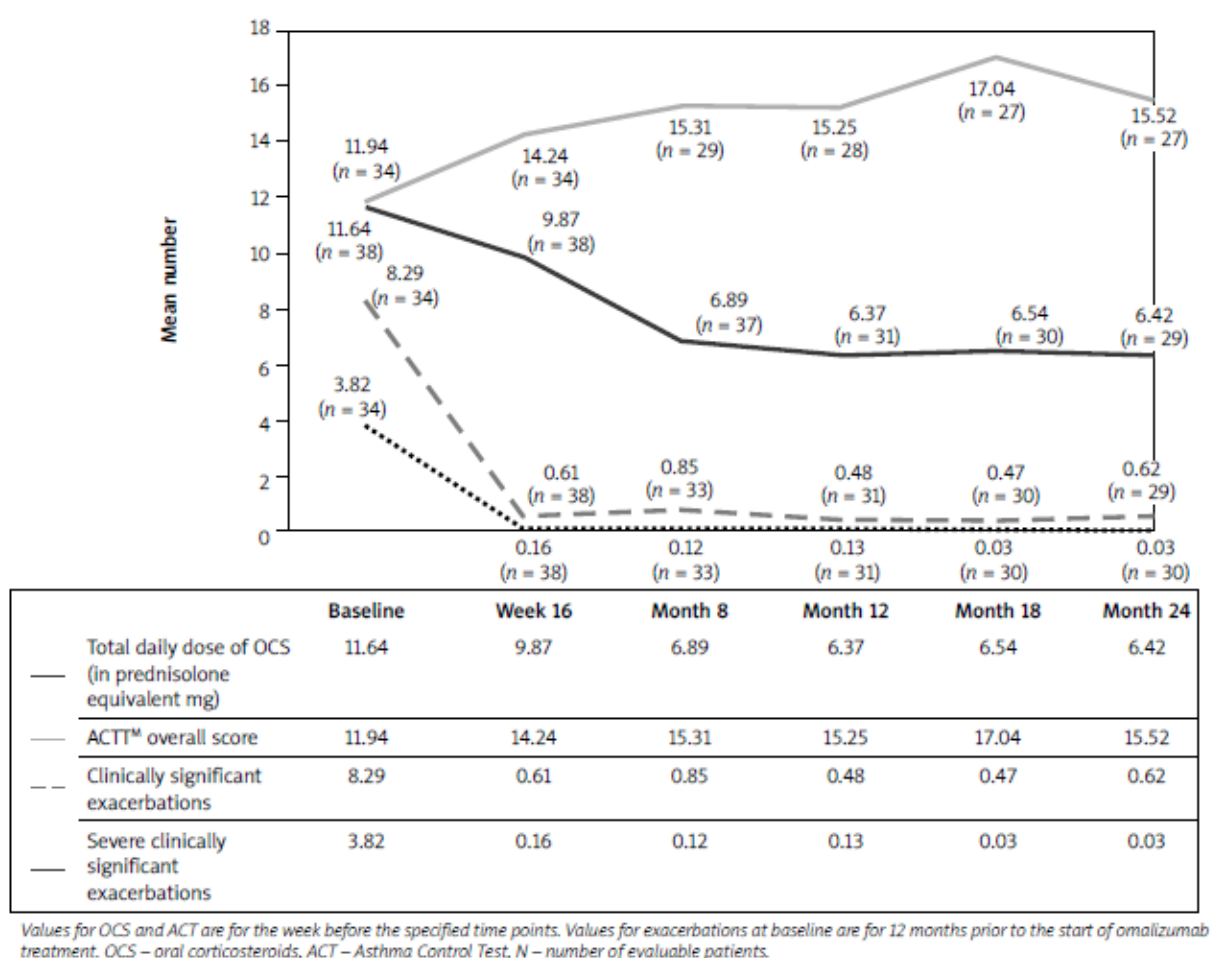


**Figure 2.** Effect of omalizumab on corticosteroid therapy, asthma control and exacerbations in OCS maintenance therapy population (n = 38)

## Počet exacerbací

Průměrný počet klinicky významných exacerbací poklesl při terapii omalizumabem z 5,7 (n=104) výchozích na 1,1 (n = 89) a 0,7 (n = 80) a těžké exacerpace klesly z 2,2 (n = 105) výchozích na 0,2 (n = 89) a 0,1 (n = 81) po 12 a 24 měsících terapie (**Graf č. 20**). Navíc podíl pacientů bez klinicky významných/závažných exacerbací se výrazně zvýšil při terapii omalizumabem na 56,2% (n = 50) / 89,9% (n = 80) a 63,0% (n = 51) / 95,1% (n = 77) po 12 a 24 měsících terapie. **Graf č. 20**.

**Tab č. 9.** Efekt omalizumabu na kontrolu astmatu, kvalitu života, exacerbace a potřebu zdravotní péče při terapii OMA.

**Table 3.** Asthma control, quality of life, exacerbations and asthma related medical healthcare use after omalizumab treatment

| Parameter                                                                                | Czech Republic |               |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------|------------|
|                                                                                          | Baseline       | Month 12      | Month 24   |
| Total number of clinically significant asthma exacerbations:                             |                |               |            |
| <i>N</i>                                                                                 | 104            | 89            | 80         |
| Mean (SD)*                                                                               | 5.7 (7.4)      | 1.1 (1.8)     | 0.7 (1.2)  |
| Number of severe clinically significant asthma exacerbations:                            |                |               |            |
| <i>N</i>                                                                                 | 105            | 89            | 81         |
| Mean (SD)*                                                                               | 2.2 (3.3)      | 0.2 (0.7)     | 0.1 (0.3)  |
| Patient's level of asthma control <sup>†</sup> :                                         |                |               |            |
| <i>n</i> = 112                                                                           | <i>n</i> = 89  | <i>n</i> = 81 |            |
| Controlled, <i>n</i> (%)                                                                 | 0 (0.0)        | 22 (24.7)     | 20 (24.7)  |
| Partly controlled, <i>n</i> (%)                                                          | 27 (24.1)      | 60 (67.4)     | 51 (63.0)  |
| Uncontrolled, <i>n</i> (%)                                                               | 85 (75.9)      | 7 (7.9)       | 10 (12.3)  |
| ACT overall score:                                                                       |                |               |            |
| <i>N</i>                                                                                 | 103            | 84            | 75         |
| Mean (SD)                                                                                | 12.4 (4.1)     | 17.3 (5.0)    | 17.3 (5.4) |
| Change from baseline in ACT score:                                                       |                |               |            |
| <i>N</i>                                                                                 | –              | 81            | 73         |
| Mean (SD)                                                                                |                | 4.3 (4.0)     | 4.3 (3.8)  |
| Mini-AQLQ overall score:                                                                 |                |               |            |
| <i>N</i>                                                                                 | 46             | 45            | 41         |
| Mean (SD)                                                                                | 3.62 (1.0)     | 4.56 (1.4)    | 4.67 (1.4) |
| Change from baseline in mini-AQLQ overall score:                                         |                |               |            |
| <i>N</i>                                                                                 | –              | 38            | 32         |
| Mean (SD)                                                                                |                | 0.80 (1.0)    | 0.94 (0.8) |
| ≥ 0.5 improvement, <i>n</i> (%)                                                          |                | 23 (60.5)     | 21 (65.6)  |
| Total number of days of asthma related medical healthcare use per patient <sup>‡</sup> : |                |               |            |
| <i>N</i>                                                                                 | 99             | 88            | 80         |
| Mean (SD)                                                                                | 6.8 (10.0)     | 0.8 (2.1)     | 0.4 (1.2)  |
| Number of days missed work due to asthma:                                                |                |               |            |
| <i>N</i>                                                                                 | 43             | 43            | 38         |
| Mean (SD)                                                                                | 24.3 (27.4)    | 2.4 (6.4)     | 1.7 (5.1)  |
| Number of asthma related hospitalisations:                                               |                |               |            |
| <i>N</i>                                                                                 | 105            | 89            | 81         |
| Mean (SD)                                                                                | 0.5 (1.2)      | 0.0 (0.0)     | 0.0 (0.2)  |
| Patients without asthma related hospitalizations, <i>n</i> (%)                           | 77 (68.8)      | 89 (100.0)    | 80 (98.8)  |
| Total number of days stayed in hospital due to asthma:                                   |                |               |            |
| <i>N</i>                                                                                 | 100            | 89            | 81         |
| Mean (SD)                                                                                | 3.3 (9.8)      | 0.0 (0.0)     | 0.2 (2.2)  |

\*Baseline data includes the data during last 1 year before the start of the therapy; <sup>†</sup>as per investigators' assessment; <sup>‡</sup>includes hospitalizations, and emergency room/unscheduled doctor visits. ACT – Asthma Control Test, AQLQ – Asthma Quality of Life Questionnaire, SD – standard deviation.

## Kontrola astmatu a kvalita života

Po 12 a 24 měsících terapie 92,1% (n = 82) a 87,7% (n = 7) pacientů hodnotilo své astma pod dobrou či částečně dobrou kontrolou, což je významně lepší výsledek v porovnání se vstupními hodnotami (24,1%, n = 27). (**Tab 9**).

Skóre ACT (astma control test) se zlepšilo z 12,4 (n = 103) na 17,3 (n = 84) a 17,3 (n = 75) po 12 a 24 měsících terapie. Klinicky významné zlepšení oproti výchozím hodnotám ACT skóre bylo pozorováno při terapii omalizumabem po 12 (průměrná změna 4,3 bodů, n = 81) i 24 měsících (průměrná změna 4,3 bodů, n = 73). U pacientů na dlouhodobé terapii systémovými kortikoidy došlo k průměrné změně v ACT skóre v porovnání s výchozí hodnotou o 27,7 % a 29,9 % po 12 a 24 měsících léčby omalizumabem. K podobnému zlepšení došli při posuzování kvality života související se zdravím hodnocené pomocí dotazníků mini AQLQ. Průměrné změny 0,8 a 0,94 bodů u mini AQLQ po 12 měsících (n = 38) a 24 (n = 32). Celkově 60,5 % (n = 23) a 65,6 % (n = 21) pacientů dosáhlo klinicky významného zlepšení v mini AQLQ skóre oproti výchozím hodnotám (**Tab č. 9**).

**Graf č. 21** Vyhodnocení potřeby zdravotní péče pomocí evaluačního dotazníku GETE

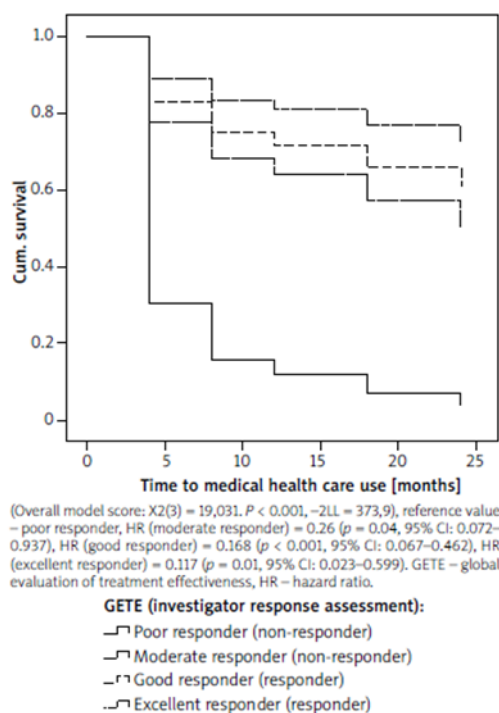


**Figure 3.** Effect of physician's global evaluation of treatment effectiveness (GETE) on medical healthcare use risk calculated by Cox regression (n = 112)

Využití zdravotní péče v souvislosti s astmatem (hospitalizace, akutní ošetření, neplánované návštěvy lékaře) na pacienta a zmeškané pracovní dny v důsledku zhoršení astmatu se významně snížily po 12 a 24 měsících terapie omalizumabem ve srovnání s výchozí hodnotou (**Graf č. 21**). Průměrný počet dní (SD±) využití zdravotní péče na pacienta klesl z 6,8±10 během 12 měsíců před zahájením terapie (n = 99) na 0,8 (±2,1) a 0,4 (±1,2) ve 12 (n = 88) a 24 (n = 80) při léčbě omalizumabem. Využití zdravotní péče bylo sníženo oproti výchozím hodnotám o 88,2% a 94,1% po 12 a 24 měsících léčby.

Vliv GETE na riziko zdravotní péče byl vypočítán pomocí Cox regrese (celkové hodnocení modelu  $p < 0,001$ ). Referenční hodnota byla definována jako slabá odpověď. Výpočet poměru rizik (HR) u průměrných respondentů byl 0,26 ( $p = 0,04$ , 95% CI: 0.072–0.937), HR (dobrý respondér) = 0,168 ( $p < 0,001$ , 95 % CI: (vynikající respondér) = 0,117 ( $p = 0,01$ , 95% CI: 0.023–0.599). V průběhu studie jsme nezaznamenali žádný případ zhoršování astmatu (**Graf č.21**). Na rozdíl od špatných respondentů měli vynikající, dobří a průměrní respondenti snížené riziko užívání zdravotní péče o 88,3%, respektive 83,2% a 74%.

Průměrná hodnota ± SD počet dní zmeškaných prací v důsledku zhoršení astmatu z 24,3 ± 27,4 při výchozím stavu (n = 43) na 2,4 ± 6,4 a 1,7 ± 5,1 v měsících 12 (n = 43) a 24 (n = 38). Průměrný počet dnů zameškané práce v důsledku astmatu se po měsících 12 a 24 snížil o 90,1% a 93,0%. Průměrný počet SD hospitalizací souvisejících s astmatem se snížil z 0,5 ± 1,2 v 12 měsících před terapií (n = 105) až 0,0 ± 0,0 po 12 měsících (n = 89) a 0,0 ± 0,2 po 24 měsících (n = 81). Průměrný počet dnů SD v nemocnici v důsledku astmatu poklesl z 3,3 ± 9,8 v 12měsíčním období před léčbou (n = 100) na 0,3 ± 2,0 po 12 měsících (n = 89) a na 0,2 ± 2,2 po 24měsících (n = 81). Celkově bylo 100% a 98,8% pacientů bez nutnosti hospitalizací spojených s astmatem po 12(n = 89) a 24 (n = 80) měsících léčby.

### Vážné nežádoucí účinky léčby (SAE)

Celkově bylo hlášeno 11 závažných nežádoucích účinků (SAE) ze všech sledovaných 112 pacientů z bezpečnostní populace. Z toho 4 nemocní pocházeli z ČR. Tyto SAE (selhání jater, pravostranná pneumonie, plicní embolie, divertikulitida sigmoidu) nebyly dávány do souvislosti se studijní medikací. Jeden pacient zaznamenal kumulativní nežádoucí účinky – bolesti hlavy, závratě, návaly horka, hyperhidrózu, třes a sucho v ústech; tyto nežádoucí účinky byly považovány za vážné (SAE), byly podezřelé ze souvislosti se studijním lékem a vedly k ukončení léčby a vyřazení pacienta. Jedno úmrtí se vyskytlo v této studijní skupině během dvouletého období pozorování (náhlá smrt, v důsledku virové endokarditidy), která byla hlášena jako nesouvisející s léčbou.

**Diskuze** – viz závěr navazující práce 4.2.1.2

### **Závěry:**

Výsledky analýzy podskupiny pacientů z České republiky podporují dosavadní nálezy, že aditivní terapie omalizumabem zlepšuje plicní funkce a kontrolu astmatu a snižuje užívání OCS, exacerbace, využití zdravotní péče a zameškaných pracovních dnů u pacientů s nekontrolovaným perzistujícím těžkým alergickým astmatem. (Braunstaal et al., 2011). Hodnocení GETE je účinným nástrojem hodnocení dlouhodobé odpovědi na léčbu omalizumabem v České republice. Uvedená zjištění jsou významná i pro průkaz pozitivního vlivu omalizumabu na přímé a nepřímé náklady na zdravotní péči a na snížení sociálně-ekonomického zatížení péče o nekontrolované alergické astma v České republice. Posuzování pacientů vhodných pro léčbu a vedení terapie je prováděno v síti národních center pro těžké astma (NCTA).

### 4.2.1.2 Vyhodnocení efektu biologické terapie omalizumabem po 10 letech v NCTA Plzeň

(Růžičková-Kirchnerová et al., 2018)

Omalizumab je humanizovaná anti-IgE protilátka, která byla doporučena a schválena jako lék volby pro pacienty s těžkým alergickým astmatem, které není pod dostatečnou kontrolou navzdory maximální standardní terapii. Její účinnost byla prokázána v řadě studií, mj. viz výše.

Nicméně zůstává ještě řada ne zcela zodpovězených otázek – efektivita léčby při dlouhodobém užívání, efekt léčby u pacientů s ABPA/SAFS, efekt léčby u nemocných s různou hladinou celkového IgE a dále efektivita léčby u pacientů s vysokou hladinou IgE, ale neprokázaným specifickým alergenem.

**Metody:** Retrospektivně jsme vyhodnotili data z našeho registru pacientů léčených omalizumabem v letech 2007-2017 (55 pacientů). Zaměřili jsme se kromě základních klinických parametrů (spirometrie, FENO, ACT, počet exacerbací, hospitalizací) i na hodnotu celkového IgE, intenzitu a spektrum senzibilizace dle specifických IgE a dále jsme sledovali efekt omalizumabu u pacientů v podskupině pacientů s alergickou bronchopulmonální aspergilózou a těžkým astmatem s přecitlivělostí na plísň ABPA/SAFS (11 pacientů). Rovněž jsme zaznamenali délku terapie a důvody jejího ukončení u jednotlivých pacientů.

**Výsledky:** Terapie omalizumabem je velice efektivní léčba pro pacienty s alergickým eosinofilním typem astmatu, efekt je poměrně konstantní v průběhu let. U pacientů došlo ke zlepšení kontroly astmatu, kvality života, plicních funkcí a významně se snížil počet exacerbací, hospitalizací a potřeba užití úlevové medikace. V podskupině pacientů s ABPA/SAFS jsme zaznamenali velice dobré výsledky, především došlo k redukci počtu a tíže exacerbací a nutnosti kombinované dlouhodobé terapie antitymickým + systémovým kortikosteroidem.

Dále jsme shledali pozitivní efekt i u těch nemocných, kteří měli vyšší hladinu celkového IgE, ale nebyl prokázán žádný konkrétní specifický alergen.

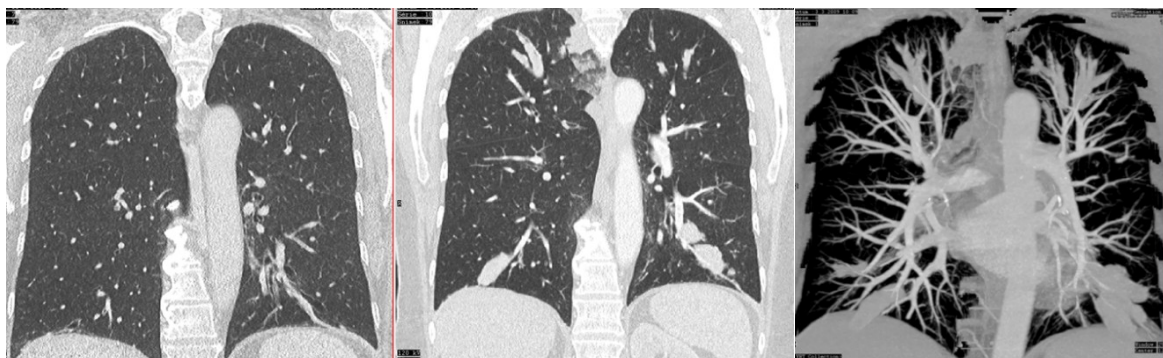
15 pacientů terapii ukončilo, 4 z důvodu nedostatečného efektu, 2 pro mírné nežádoucí účinky, 2 pacienti zemřeli bez souvislosti s podávanou terapií, 1 nemocná ukončila léčbu pro těhotenství, 1 nemocný na vlastní žádost, 4 na doporučení lékaře, 1 pacient přestoupil do jiného centra.

**Závěry:** Dosud se nám nepodařilo určit optimální délku podávání terapie anti-IgE protilátkou. V našem centru se snažíme podávat terapii tak dlouho, pokud přináší pacientovi dostatečný efekt.

Do budoucna by bylo vhodné určit další přídatné biomarkery (kromě hodnot celkového IgE), které by nám pomohly tuto skupinu pacientů lépe stratifikovat, tak abychom jim mohli s různou mírou pravděpodobného efektu nabídnout tuto biologickou terapii. Jde především o markery eozinofilie (FENO, periostin, periferní/systémová eozinofilie) typ a stupeň přecitlivělosti na jednotlivé alergeny, ideálně neovlivněn dlouhodobou léčbou systémovými kortikosteroidy, která pak jednotlivé výsledky zkresluje. Data z našeho registru potvrdila a obohatila závěry jiných publikací (Kanu and Patel, 2008) (van der Ent et al., 2007), že omalizumab vykazuje dobrý efekt u pacientů s bronchopulmonální aspergilózou, respektive těžkých astmatiků s přecitlivělostí na plísň (ABPA/SAFS).

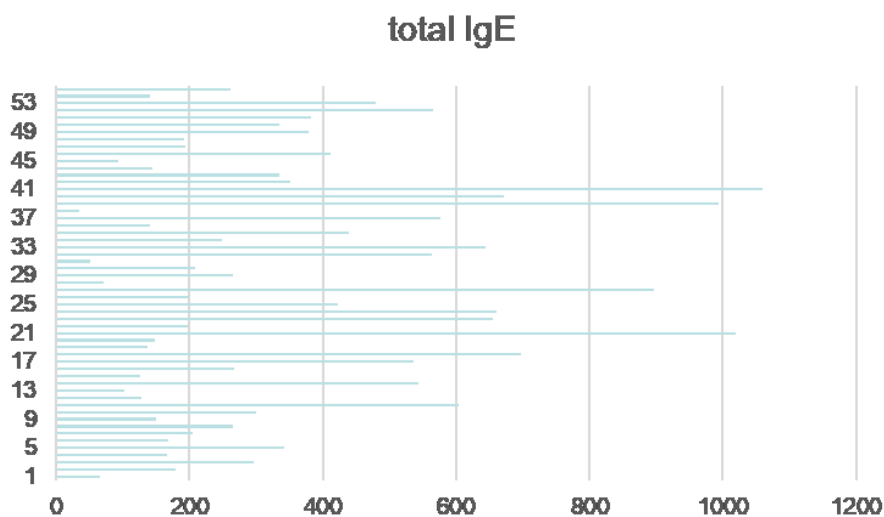


**Obr.č. 7.** Pacient P.K, 43 let, těžké astma s bronchiektáziemi, CT scany před (vpravo) a po 1. roce terapie Omalizumabem (vlevo-patrná významná regrese nálezů). Zdroj: Klinika zobrazovacích metod FN Plzeň

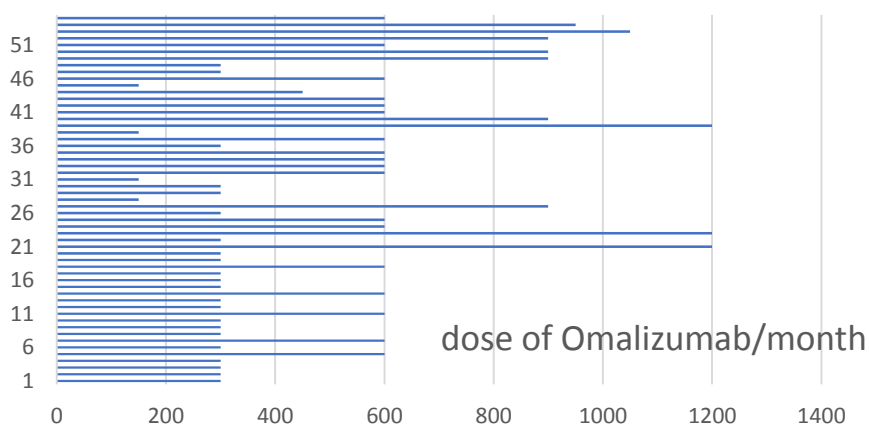


**Obr.č. 8** Příklad pacientky s ABPA s významným zlepšením a vyprázdněním bronchiektázií, regresí změn po zahájení terapie omalizumabem (CT scan krajní vlevo), před zahájením terapie – (2 CT scany vpravo). Zdroj KZM Klinika FN Plzeň

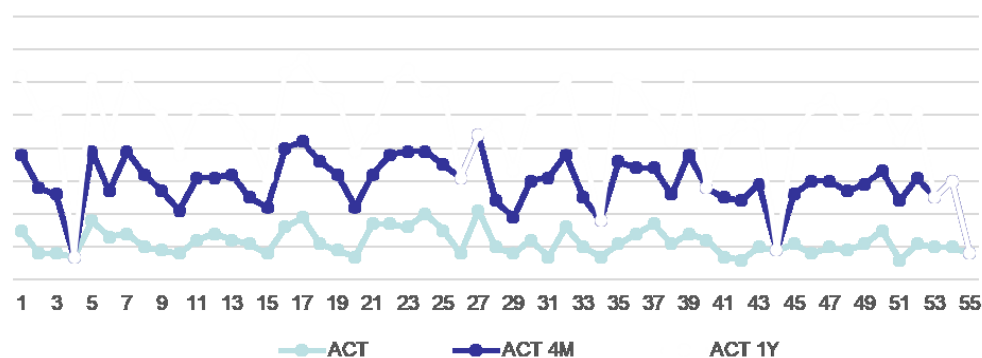
**Graf č. 22** Hladina celkového IgE u jednotlivých pacientů NCTA Plzeň



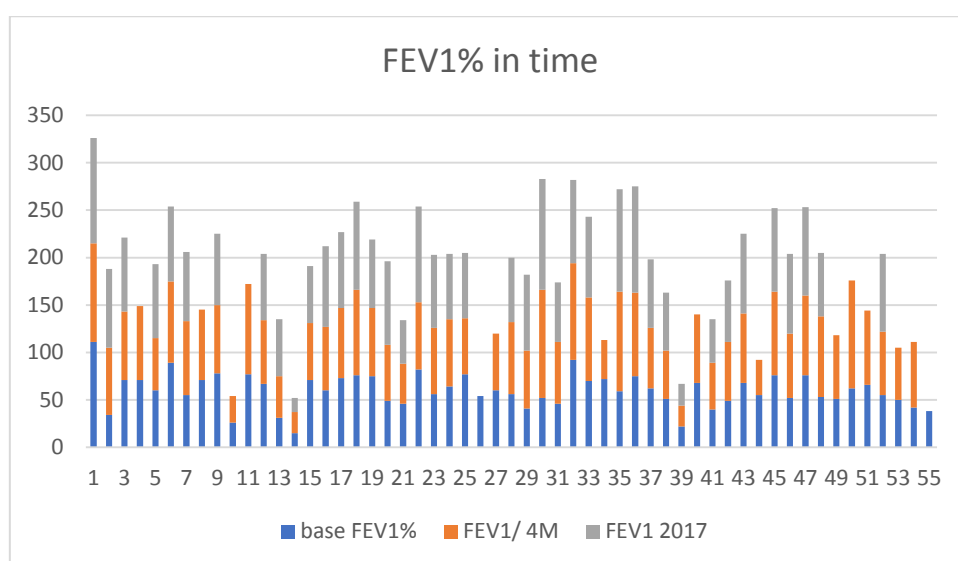
**Graf č. 23** Dávka Omalizumabu na měsíc u jednotlivých pacientů NCTA Plzeň



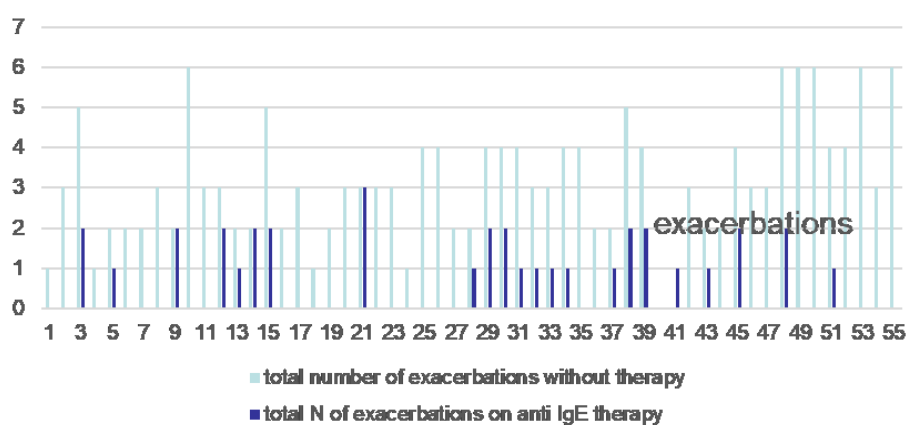
**Graf č. 24** Hodnota testu kontroly astmatu (ACT) před zahájením léčby, po 4 měsících a roce terapie OMA



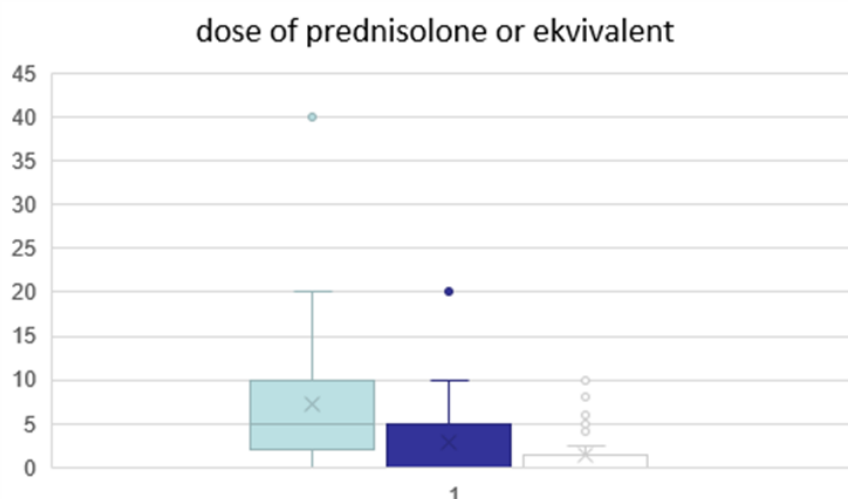
**Graf č. 25** Hodnota FEV<sub>1</sub> (%) v průběhu terapie OMA (vstupní, po 4 měsících a 10 letech)



**Graf č. 26** Počet exacerbací rok před zahájením terapie OM a v průběhu 10leté terapie OM



**Graf č. 27** Dávka systémové kortikoterapie na začátku terapie OMA, po roce a po 10 letech



#### Diskuze k části 4.2.1.1 a 4.2.1.2

Registr eXperience byl sestaven tak, aby shromáždil data o reálné celosvětové efektivitě a bezpečnosti omalizumabu u pacientů s těžkým perzistujícím špatně kontrolovaným alergickým astmatem. (Braunstahl et al., 2011). Výsledky tohoto mezinárodního registru poskytují údaje o demografii pacientů a základních charakteristikách, účinnosti léčby a bezpečnosti po 24 měsících léčby omalizumabem. (Braunstahl et al., 2013) (Braunstahl et al., 2011). Výchozí demografické a klinické charakteristiky subpopulace České republiky byly srovnatelné s celkovou populací pacientů registru eXperience. Účinnost léčby u pacientů z České republiky byla prokázána použitím GETE evaluačního dotazníku v  $16 \pm 1$  týdnu. Vyšetřovatelé hodnotili většinu pacientů jako respondenty léčby omalizumabem (výborný/dobrá, 88,9 %), což bylo o 27,2 % vyšší než u celkové populace (69,9 %). (Braunstahl et al., 2013)

V České republice jsou pacienti, kteří nejsou schopni dosáhnout úplné kontroly ani při léčbě dle GINA krok 4, doporučení na jedno ze specializovaných pracovišť Národního centra pro léčbu těžkou astmatu (NCTA). (Milan Teřl et al., n.d.) Každý pacient je v těchto centrech revidován (diagnóza astmatu, komorbidita a komplikující faktory). Biologická terapie může být indikována v každém centru (alergologie nebo pneumologie), mimo tato centra nejsou v ČR (na rozdíl od situace např. na Slovensku) indikace povoleny.

Po 16 týdnech, 8, 12, a 24 měsících terapie omalizumabem došlo k zlepšení plicních funkcí pacientů, průměrné zlepšení oproti výchozí hodnotě FEV1 o 205 ml, 215 ml, 273 ml, 200 ml a 137 ml. Účinek přidání omalizumabu k vysokým dávkám ICS/LABA na FEV1 je srovnatelný s efektem udávaným u přídavného účinku tiotropia u pacientů se špatně kontrolovaným astmatem. (Kerstjens et al., 2012)

Doplňková léčba omalizumabem u subpopulace v České republice vedla k výraznému snížení denních a nočních příznaků, omezení aktivit a užití záchranné medikace, což bylo srovnatelné s výsledky pozorovanými v celkové populaci registru eXperience a dalších reálných studií. (Korn et al., 2009) (Barnes et al., 2013) (Braunstahl et al., 2013) (Schumann et al., 2012) (Brusselle et al., 2009) (Cazzola et al., 2010) (Menzella et al., 2017a) (Kupryś-Lipińska et al., 2016)

Došlo také k významnému snížení počtu pacientů na dlouhodobé systémové kortikoterapii OCS (n=38) po 24 měsících léčby (n=18) a snížení celkové denní dávky systémového kortikoidu o 44,8 % z výchozí hodnoty 11,6 mg (ekvivalentu prednisolonu) na 6,4 mg po 24 měsících léčby. Účinek na udržovací dávku OCS byl spojen se značným zvýšením skóre

ACT. V tomto ohledu je třeba poznamenat, že přídatek omalizumabu se doporučuje dle GINA (Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2018 update, n.d.) jako preferovaná volba oproti OCS v kroku 5. Pacienti s těžkým astmatem vyžadují dlouhodobou léčbu a ukončení terapie omalizumabem může způsobit ztrátu kontroly astmatu a zvýšit exacerbace a udržovací dávky OCS. (Ledford et al., 2016) (Kupryś-Lipińska and Kuna, 2014)

Z výsledků prezentovaných v naší studii je zřejmé, že doplňková léčba omalizumabem snížila počet klinicky významných exacerbací ročně z 5,7 před zahájením na 0,7 po 24 měsících léčby v subpopulaci ČR. Tyto výsledky byly podobné těm pozorovaným v globálním registru (4,9 až 0,6), českém registru anti-IgE (CAR) a dalším údajům z reálné praxe s více než 9letým sledováním. (Deschildre et al., 2013) (Braunstahl et al., 2013) (Menzella et al., 2017b) (Kupryś-Lipińska et al., 2016) (Hutyrova et al., 2017) (Novelli et al., 2015). Navíc bylo pozorováno klinicky významné zlepšení v testu kontroly astmatu (ACT), průměrná změna oproti výchozím hodnotám o 4,3 jednotek a kvalitě života pacientů (mini-AQLQ), průměrná změna oproti výchozím hodnotám 0,94 jednotek. Tyto výsledky jsou opět podpořeny výsledky z různých dalších studií (zlepšení ACT o 5,01 a zlepšení AQLQ o 0,91 oproti výchozí hodnotě) (Humbert et al., 2005) (Bardelas et al., 2012). Dle vyhodnocení pacientů v ČR, mělo více pacientů kontrolované nebo částečně kontrolované astma ve 12. měsíci oproti výchozím hodnotám (92,1 % vs 24,1 %) při léčbě omalizumabem. Tyto výsledky byly lepší než výsledky pozorované u celkové populace registru eXperience a příznaky zůstaly pod kontrolou i po 24. měsíci. U české subpopulace došlo také k snížení využívání zdravotní péče a zameškaných pracovních dnů pro astmatické potíže. Byla analyzována spolehlivost hodnocení GETE ve výši  $16 \pm 1$  týdnů jako prediktoru rizika užívání zdravotní péče. K významnému snížení rizika došlo u vynikajících respondentů (88,3 %), dobrých (83,2 %) a mírných respondentů (74,0 %). Tyto výsledky ukazují jak klinický přínos, tak i celkový ekonomický přínos (přímé úspory nákladů na zdravotní péči při využívání zdravotní péče a zlepšení produktivity práce. (Braunstahl et al., 2014)

Pouze u jednoho pacienta byly hlášeny nežádoucí účinky (SAE), které souvisely se studijní léčbou.

Četnost SAE hlášená u populace podskupiny ČR (5,4 %) byla podobná frekvenci hlášené v globálním registru eXperience (6,9 %) a různých klinických studií (3 až 6 %). (Schumann et al., 2012) (Corren et al., 2009) (Chipps et al., 2017) Uvedené jediné úmrtí nesouviselo s omalizumabem.

Limitujícím faktorem naší analýzy dat ze subpopulace ČR je nízký počet pacientů a spolu s dalšími limitujícími faktory uvedenými pro celkový registr eXperience. (Braunstahl et al., 2013) Navíc mohou demografické a klinické faktory jiné, než je léčebný záměr, přispívat k pozorovaným účinkům v observačních studiích. Určitá předpojatost lékaře při výběru pacienta a pokračování léčby omalizumabem po uplynutí 16 týdnů mohlo mít vliv na výsledky (například lékaři nebyli zaslepeni). Dalším omezujícím faktorem mohl být poměrně řídký sběr dat. Navzdory těmto možným překážkám jsou současné poznatky v souladu s výsledky z randomizovaných kontrolovaných studií a statistická síla byla dále zvýšena návrhem opakovaných opatření. Ke zlepšení klinických výsledků došlo velmi pravděpodobně právě díky terapii omalizumabem. Vzhledem k tomu, že tato studie využívá observační registr, neexistovala placebo. Je možné, že některá zlepšení, která se projevila při léčbě omalizumabem, mohla částečně souviset s účinkem placebo a / nebo častým a důkladným sledováním pacientů zařazených do registru. Určitým omezením je jistě i fakt, že základní údaje pacientů byly shromážděny retrospektivně z jejich lékařských záznamů. Nicméně základní charakteristiky byly podobné těm v globálním registru. (Braunstahl et al., 2013)

Data z našeho NCTA centra potvrdila, že omalizumab vykazuje dobrý efekt u pacientů s bronchopulmonální aspergilózou, respektive těžkých astmatiků s přecitlivělostí na plísň (ABPA/SAFS), což bylo potvrzeno i u pacientů s cystickou fibrózou a ABPA (Kanu and Patel, 2008) a u těžkých astmatiků jsme publikovali na ERS v r. 2012 (Ruzickova Kirchnerova et al., 2012), v souladu s publikovaným doporučením Agarwala (Agarwal, 2011). U těchto

nemocných bývá spíše problém s vyšší hladinou celkového IgE, která často vylučuje možnost indikace OMA. U většiny těchto nemocných byla léčba zahájena bezprostředně po doléčení exacerbace (kombinace OCS+antimykotika), což pomohlo snížit celkovou hladinu IgE, v průběhu terapie pak došlo k významné redukci exacerbací a potřebě antimykotické a systémové kortikoterapie. Také jsme zaznamenali (ve shodě s jinými předchozími publikacemi) úspěch u pacientů s vysokou hodnotou celkového IgE bez prokázaného konkrétního celoročního alergenů. (van den Berge et al., 2011). U některých pacientů s dlouhodobou kortikoterapií před zahájením léčby OMA jsme zaznamenali pozdější nástup efektu léčby v souladu i s daty z jiných registrů, tzv. late responders (Menzella et al., 2009). U pacientů, u nichž nedošlo ke zlepšení nebo došlo pouze k částečnému zlepšení kontroly astmatu při terapii OMA, ale přetrvává potřeba dlouhodobé systémové kortikoterapie, máme nyní možnost indikace anti-IL5 terapie, tedy provést tzv. switch terapie dle současných doporučení. (Zervas et al., 2018)

Jednou z nejvíce diskutovaných otázek zůstává, kdy terapii OMA ukončit? V našem souboru pacientů jsme zaznamenali většinou zhoršení symptomů do 12 měsíců od vysazení, některé pacienty se nám již nepodařilo po vysazení léků dostatečně sledovat, jednalo se většinou o pacientky, které léčbu ukončily z důvodu těhotenství a dále o pacienty, kteří léčbu ukončili na vlastní žádost. Práce Del Carmen Vennera na menším souboru pacientů (49) popisuje relaps u 12 pacientů z 49 v prvním roce sledování a 7 během 13 a 48 měsíců. Tyto výsledky naznačují, že účinky 6leté terapie omalizumabem mohou přetrvávat i po přerušení léčby u 60 % pacientů po dobu nejméně 4 let. (Del Carmen Vennera et al., 2018) Také ve francouzské studii Molimarda přerušení léčby omalizumabem nebylo spojeno s žádným rebound efektem nebo exacerbací onemocnění a kontrola byla udržována po dobu nejméně 6 měsíců u téměř poloviny všech pacientů, včetně všech těch, kteří byli léčeni OMA 3,5 roku nebo více. Po znovuzavedení omalizumabu 4 z 20 pacientů již znovu na terapii nezareagovali. (Molimard et al., 2014).

#### 4.2.1.3 Význam měření periostinu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem

Toto téma je zpracováno v práci: Sérové hladiny periostinu u astmatických pacientů ve vztahu k terapii omalizumabem a přítomnosti chronické rinosinuitidy s nosními polypy.

Této práci jsme se účastnili jako spoluautoři, hlavním autorem je MUDr. Jakub Novosad, Ph.D. z FN Hradec Králové, jehož práce bude v letošním roce publikována. (Novosad J, Krcmova I, Bartos V, Drahosova M, Vanik P, Ruzickova O, Terl M, Krejssek J. *Effect of omalizumab therapy and chronic rhinosinusitis presence on serum periostin levels in asthma patients, a pilot study. Clinical & Experimental Allergy, CEA-2018-0252. Přijato k publikaci 2019.*)

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, sérový periostin je slibným biomarkerem type-2 high zánětlivé cesty bronchiálního astmatu. Bylo prokázáno, že hladiny periostinu klesají v reakci na systémovou a inhalační terapii kortikosteroidy (ICS), nicméně máme jen omezené znalosti o změnách hladin sérového periostinu, které by odrážely léčbu omalizumabem (OMA) a další proměnné, jako je chronická rinosinuitida s nosními polypy (CRSwNP).

**Cílem** této práce bylo kriticky zhodnotit klinicky významné parametry ovlivňující hladiny periostinu u pacientů s astmatem.

#### **Metody** stanovení

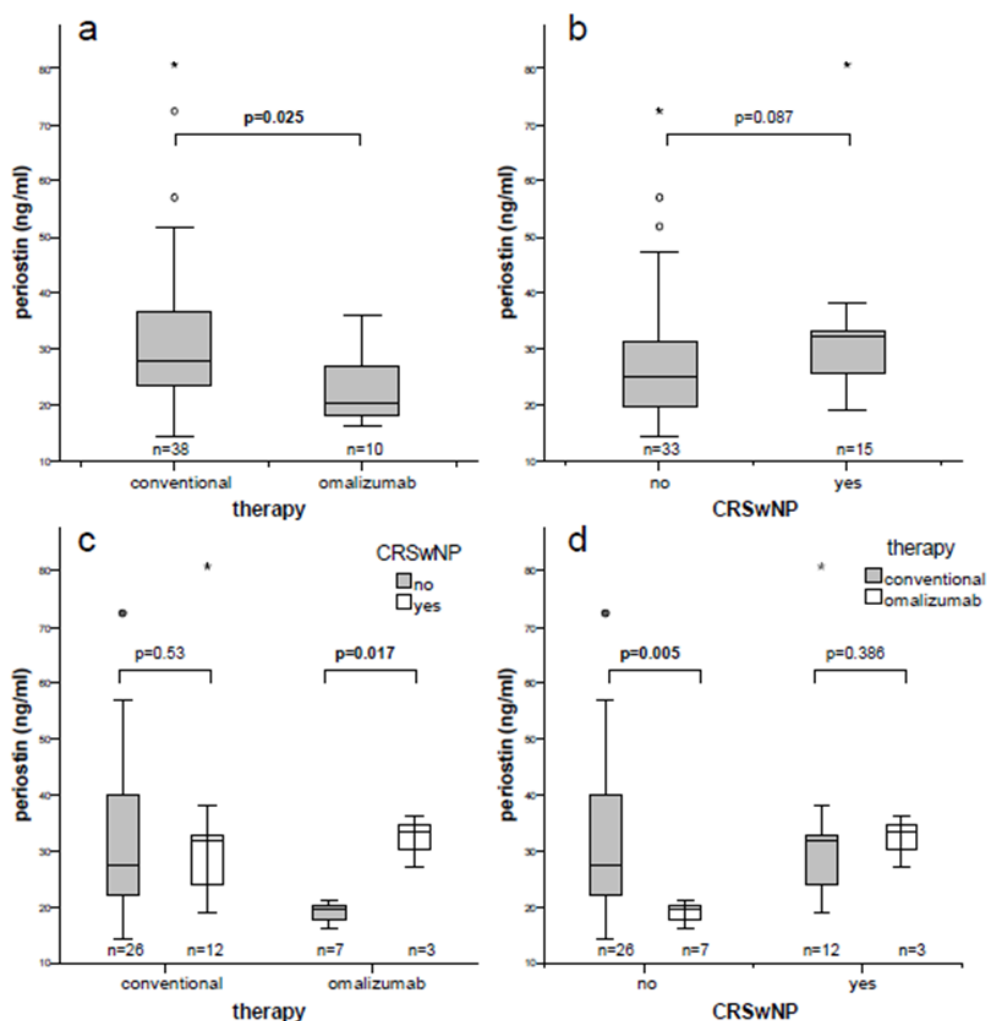
Pilotní, průřezová observační studie k posouzení hladin periostinu v séru u 48 pacientů s astmatem (38 léčených konvenční terapií zahrnující ICS a 10 léčených ICS a OMA jako přídatná terapie) s ohledem na klinické znaky astmatu, komorbiditu a jiné biomarkery Th2 high fenotypu astmatu [celkový počet IgE, absolutní a relativní počet eozinofilů, eozinofilní kationtový protein (ECP) a FENO]. Hladina sérového periostinu byla stanovena pomocí Elisa metody. Vzhledem k tomu, že OMA vytváří malé, biologicky neaktivní komplexy s

molekulami IgE, hladiny celkového IgE během léčby OMA jsou zkreslené. (Hamilton et al., 2005) Proto byla u skupiny pacientů léčených omalizumabem analyzována počáteční úroveň celkových IgE (údaje shromážděné retrospektivně z měření před zahájením léčby přípravkem OMA), nikoliv průběžné hodnoty IgE v době vyšetření periostinu (na rozdíl od měření všech ostatních biomarkerů).

**Výsledky:** Sérový periostin v séru koreluje s celkovými hladinami IgE (Spearman rho = 0,364,  $p = ,025$ ) u podskupiny konvenčně léčených pacientů a s počtem eozinofilů (Spearman rho = 0,401,  $p = ,021$ ) v podskupině pacientů se souběžnou rinosinuitidou s nosními polypy (CRSwNP). Hladiny periostinu v séru byly u pacientů léčených omalizumabem sníženy ve srovnání s běžně léčenými pacienty ( $p = ,025$ ). Tento účinek byl zřejmý pouze tehdy, pokud pacienti neměli současně chronickou rinosinuitidu s nosními polypy (CRSwNP) ( $p = ,005$ ). Naopak zvýšené hladiny periostinu byly naměřeny u pacientů léčených OMA, u nichž byla zároveň přítomna chronická rinosinuitida s nosními polypy CRSwNP ( $p = ,017$ ).

**Závěry:** Produkce sérového periostinu je významně spojena s modalitou léčby (omalizumab vs. konvenční) a přítomností chronické rinosinuitidy s nosními polypy (CRSwNP). Tyto proměnné je třeba brát v úvahu při interpretaci vyšetření hladin periostinu.

**Graf č. 28** Změny v produkci sérového periostinu v závislosti na terapii a přítomnosti chronické rinosinuitidy s nosními polypy



## Diskuze:

Periostin byl objeven v r.1993 (Takeshita et al., 1993), poté byl objevena jeho role při vzniku subepiteliální fibrózy (Takayama et al., 2006) a asociace s Th2 typem zánětu u astmatu. (Woodruff et al., 2009). Na rozdíl od jiných biomarkerů type-2-high zánětu může produkce periostinu pravděpodobně obsahovat přídavné informace, které se týkají fibrózy plicní tkáně a remodelace (Uchida et al., 2012), která mimo jiné pravděpodobně může vést k fixované obstrukci dýchacích cest. (Takahashi et al., 2018) (Kanemitsu et al., 2013) Vyšetření produkce periostinu tak pravděpodobně odpovídá na poněkud odlišné klinické otázky s ohledem na patogenezi astmatu. Měření sérové hladiny periostinu bylo uvedeno do širší praxe v r. 2011 Correnem a kol. (Corren et al., 2011), v jehož práci pacienti s vysokou hladinou periostinu lépe odpovídali na léčbu Lebrikizumabem. Navzdory velmi slibnému potenciálu tohoto měření u pacientů s astmatem, postrádá tento test stále standardizaci a výsledky z různých studií, které používají různé metody pro měření periostinu s různými účinky, proto nejsou výsledky snadno porovnatelné a nelze je jednoduše generalizovat. (Arron and Izuhara, 2015)

Abychom mohli správně interpretovat hladiny periostinu, je potřeba rozpoznat většinu klinicky významných faktorů a jejich vzájemné interference, které mohou ovlivňovat či ovlivňují jeho expresi. V případě pacientů s bronchiálním astmatem je to zejména účinek léčby a účinek komorbidit. V tomto ohledu byl periostin intenzivně studován, k průkazu souvislosti s léčbou kortikosteroidy. Bylo prokázáno, že produkce periostinu může být ovlivněna kortikosteroidy na buněčné úrovni. (Shoda et al., 2013)

Snížení produkce periostinu odrážející léčbu inhalačními kortikosteroidy u pacientů s astmatem může také odrážet snížení zánětu dýchacích cest. (Hoshino et al., 2016) Naopak, přetrvávající zvýšení periostinu v séru i při vysokých dávkách inhalačních kortikosteroidů může poukazovat na riziko trvalé bronchiální obstrukce při steroidní rezistenci. (Kanemitsu et al., 2013) Rovněž byla prokázána interference sérových hladin periostinu s biologickou léčbou. Vysoké počáteční hladiny sérového periostinu mohou předpovědět lepší léčebnou odezvu na lebrikizumab (Corren et al., 2011) a přinejmenším částečně na omalizumab. (Hanania et al., 2013) (Tajiri et al., 2016) Na rozdíl od kortikosteroidů však máme pouze malé důkazy o snížení sérových hladin periostinu, které by odrážely léčbu omalizumabem. (Caminati et al., 2017)

Kromě léčby mají některé komorbidity významný vliv na hladiny periostinu. Bylo prokázáno, že periostin může být rozpoznán jako biomarker chronické rinosinusitidy u pacientů trpících těžkým astmatem (Asano et al., 2017) a hraje důležitou roli při atopické dermatitidě. (Kou et al., 2014) (Shiraishi et al., 2012) Navíc produkce periostinu může poukazat i na pacienty s astmatem trpící precitlivělostí na NSAID (Kim et al., 2016) a odhaluje slabou, avšak významně negativní korelaci s BMI. (Kimura et al., 2018)

Tato práce je zaměřena na vyšetřování nejdůležitějších kofaktorů, které je třeba vzít v úvahu pro přesnější interpretaci sérového měření periostinu u pacientů s astmatem. Zaměřili jsme se především na vzájemnou interakci mezi modalitou léčby (konvenční nebo biologickou léčbou) a komorbiditami. Periostin v séru vykazuje pouze slabou vzájemnou korelaci s jinými biomarkery type-2 high zánětu. (Fingleton et al., 2016) V této studii byla pozorována izolovaná pozitivní korelace mezi periostinem a celkovými hladinami IgE v skupině konvenční léčby a mezi periostinem a absolutním počtem eozinofilů nebo eos v % u pacientů bez nosní polypózy. Možným vysvětlením tohoto výsledku může být pouze omezená statistická kolinearita mezi těmito biomarkery, která podněcuje potřebu jejich komplexního hodnocení. Měřili jsme významně nižší hladiny periostinu u pacientů léčených biologickou terapií na rozdíl od těch léčených konvenčně. Tento výsledek je v souladu se závěry Caminati et al. (Caminati et al., 2017)

Přestože jsme neprováděli opakovaná měření, předpokládáme, že tento výsledek odráží biologický potenciál omalizumabu snížit produkci periostinu v plicní tkáni, neboť jsme

nezaznamenali žádný jiný významný rozdíl mezi těmito dvěma skupinami z hlediska přítomnosti dalších komorbidit, antropometrie nebo jiných charakteristik. Navíc sérový periostin byl jediný biomarker typu 2, který se liší mezi těmito dvěma studijními skupinami, čímž potvrdil svou odlišnou výpovědní hodnotu. Pokusili jsme se prokázat význam dalších komorbidit na expresi periostinu v séru. V tomto ohledu jsme potvrdili v souladu s Asanoem et al. (Asano et al., 2017) významně vyšší hladiny periostinu u pacientů trpících chronickou rinosinuitidou s nosními polypy, ale nikoliv u těch bez nosní polypózy. Tento účinek byl však pozorovatelný pouze u podskupiny pacientů léčených omalizumabem.

Naopak, omalizumab uplatnil svůj potenciál snížení produkce periostinu pouze v podskupině pacientů bez CRSwNP (viz obr. č. 1). Pravděpodobné vysvětlení tohoto zjištění může být, že alergičtí pacienti, kteří trpí CRSwNP představují patogeneticky mírně odlišnou formu nemoci (pravděpodobně náchylnější k ILC2-mediovanému, ILC2-high zánětlivému fenotypu navzdory alergické anamnéze). V této podskupině pacientů může být produkce periostinu více závislá na signalizačních drahách, které se liší od konvenční atopické cesty (například IL-5 nebo TGFβ). Tyto cesty jsou pravděpodobně méně ovlivněny léčbou OMA. Nicméně tato skupina pacientů stále odhaluje klinický přínos léčby OMA (Gevaert et al., 2013). Žádný jiný biomarker eozinofilního zánětu se nezdá být schopen odhalit tuto konkrétní subpopulaci. Plně přiznáváme nedostatky naší studie, zejména pokud jde o její průřezový design a malý soubor pacientů, což vede k nízké statistické síle testů nulových hypotéz. Tato skutečnost však na druhou stranu může odhalit pouze klinicky významné výsledky.

## **4.2.2 Ostatní biomarkery**

### **4.2.2.1 Význam reverzibility bronchiální obstrukce při výběru pacientů pro ošetření bronchiální termoplastikou a sledování efektu této léčby na našem souboru pacientů**

#### **Bronchiální termoplastika v léčbě těžkého astmatu**

Konečná indikace a léčba pacientů s těžkým refrakterním astmatem (TRA) náleží výhradně do center pro těžké astma. V těchto centrech je na základě možnosti komplexního vyšetření prováděna diagnostika a následně jsou citlivě zvažovány veškeré léčebné možnosti. Dříve byly tyto možnosti velmi omezené, většina nemocných byla léčena dlouhodobě systémovými kortikosteroidy s veškerými důsledky jejich vedlejších účinků. Dnes již máme možnost biologické léčby astmatu, jejíž prvou modalitu představuje anti-IgE protilátka (omalizumab), u nás zavedena v r. 2006. Tato léčba je však určena pouze pro pacienty s těžkým refrakterním astmatem s prokázanou a klinicky významnou celoroční alergií. Velkou část těchto astmatiků představují ale nemocní s eozinofilním, nealergickým astmatem. Pro tyto nemocné byla v době vyhodnocování této práce (rok 2013-2014), možnost cílené biologické, pouze v rámci studií (anti-IL-5 léčba). Pro tyto nemocné se naskytla možnost terapie pomocí bronchiální termoplastiky, jako první léčebné modality, která je schopna ovlivnit medikamentózně ireverzibilní remodelační změny průdušek.

Bronchiální termoplastika (BT), představuje zajímavou, alternativní nefarmakologickou léčebnou modalitu pro pacienty s těžkým astmatem, kteří jsou symptomatictí navzdory maximální terapii včetně systémových kortikosteroidů s dominující bronchiální hyperreaktivitou. Metoda, která byla schválena v r. 2010 FDA na základě řady předcházejících studií z let 2006-10. (Wechsler et al., 2013) (Castro et al., 2010) (Thomson et al., 2012) (Pavord et al., 2007)

V ČR je tato metoda prováděna (v rámci výzkumného grantu) od r. 2012. Jedná se o bronchoskopickou metodu (system Alair), kdy je pomocí speciálního katetru do oblastí segmentálních bronchů (od lobárních bronchů do bronchů s průměrem kolem 3 mm) aplikována termická energie pomocí radiofrekvenčních pulsů, jimiž jsou postupně krátkodobě zahřáty téměř všechny průdušky až do kalibru 3 mm na teplotu kolem 60°C, což vede k

redukci hladké svaloviny a jejího bronchokonstrikčního potenciálu. (Jesudason, 2009) Řada symptomů, které astma provází, je způsobena bronchiální obstrukcí, resp. bronchiální hyperreaktivitou (kontrakcí hladké svaloviny bronchů), jejímž významným morfologickým podkladem je hypertrofie a hyperplazie hladké svaloviny. Po ošetření BT dojde ke zlepšení projevů nemoci, snížení počtu těžkých exacerbací a zlepšení a udržení kontroly nad astmatem. (Pavord et al., 2007)

Bronchiální termoplastika je indikována u pacientů s těžkým refrakterním astmatem a přítomnou výraznou bronchiální hyperreaktivitou, která signalizuje přítomnost remodelační hypertrofie/hyperplazie hladké svaloviny průdušek. (Janssen, 2012)

Výkony jsou t.č. prováděny v Centru plicní endoskopie I. Kliniky tuberkulózy a respiračních nemocí VFN Praha. Výkon se provádí ve většině případů v celkové anestezii ve 3 bronchoskopických sezeních a ošetřeny jsou postupně: v prvním sezení pravý dolní, ve druhém levý dolní a ve třetím oba horní laloky, střední bronchus není ošetřován (teoretické riziko vzniku syndromu středního laloku). Jeden zákrok trvá přibližně 40-60 minut, přičemž bronchoskopista postupuje po krátkých cca půlcentimetrových úsecích. (Mayse et al., 2007)

Pacienti jsou v období provádění bronchiální termoplastiky (3 výkony v intervalu 3 týdnů  $\pm$  3 dny) a v následujícím období sledování dle jednotného protokolu v indikujícím Centru pro těžké astma (sledování plicních funkcí, kvality života a počtu exacerbací astmatu). V období před a těsně po výkonu jsou zajištěni systémovými kortikoidy (50mg Prednisonu po dobu 5 dnů).

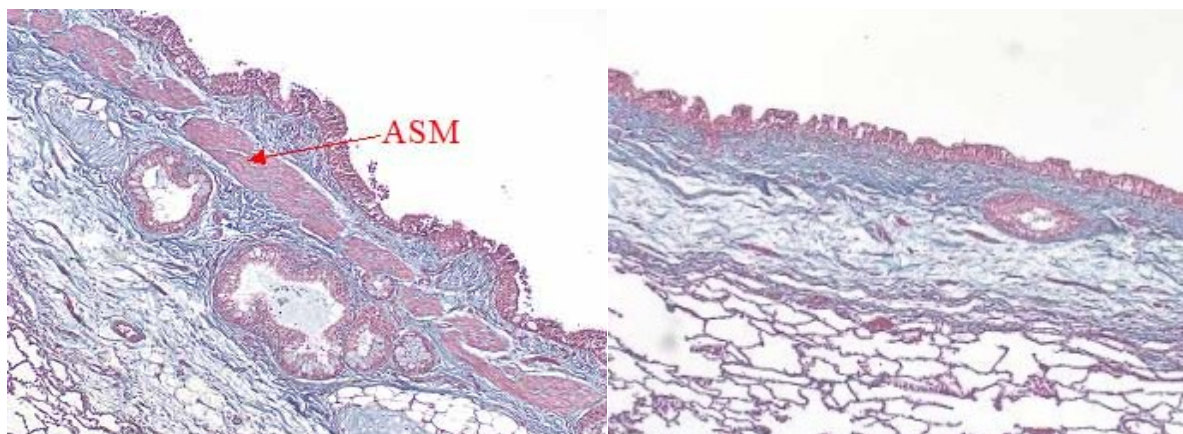
Indikační kritéria ([www.tezke-astma.cz](http://www.tezke-astma.cz)) (Mayse et al., 2007)

U nemocného musí být prokázáno:

- těžké refrakterní astma (<http://www.pneumologie.cz/guidelines/>)
- post-bronchodilatační hodnota FEV<sub>1</sub> větší nebo rovno 50 % n.h.
- trvalý výrazná bronchiální hyperreaktivita v období posledních 12 měsíců před BT (pozitivní bronchodilatační test o více než 15 % a současně 400ml, nebo pozitivní bronchoprovokační test s metacholinem při současné léčbě)

další podmínky léčby:

- věk nad 18 let
- nekouření déle než 12 měsíců a anamnéza kouření cigaret maximálně 10 balíčků-roků
- dávka systémové kortikoterapie do maximálně 20mg ekvivalentu prednisonu denně
- nejsou přítomny závažné komorbidity zvyšující riziko provedení bronchoskopie v celkové anestezii (epilepsie, závažná kardiovaskulární onemocnění, těžké formy OSAS apod.) nebo BT (implantovaná elektronika, koagulopatie)



**Obr. č. 9** Danek et al, J Appl Physiol 2004,97 1946-53. Bronchiální sliznice (se zaměřením na hladkou svalovinu) před a po ošetření bronchiální termoplastikou.

**Cíl práce:** Vybrat cílovou skupinu pro léčbu bronchiální termoplastikou a sledovat její efektivitu v následujících letech.

**Metodika:** Prospektivní hodnocení 6 pacientů léčených BT se zaměřením na výchozí fenotyp a funkční vyšetření s testy bronchiální reaktivity. Sledování efektu léčby a nežádoucích účinků (pomocí evaluačních dotazníků a klinických vyšetření) po 3, 6 a 12 (ev. 18 až 24) měsících od výkonu. Zaznamenávali jsme i počet radiofrekvenčních pulsů, který byl během výkonu použit.

**Výsledky:** Po ošetření BT došlo u většiny nemocných ke zřetelnému klinickému zlepšení zahrnujícímu nejen redukci symptomů, exacerbací a spotřeby léků, ale (na rozdíl od dosavadních literárních údajů), rovněž zlepšení funkčních parametrů, především FEV1. Nejlepších efektů bylo dosaženo u nemocných s výrazně pozitivním bronchodilatačním testem (BDT) před zahájením léčby a s použitím vyššího počtu radiofrekvenčních pulsů.

Fenotypicky se jednalo častěji o nemocné s eozinofilním, ale nealergickým typem astmatu. Zárok neměl vliv na hodnoty FENO. Bezprostřední nežádoucí účinky (tj. do měsíce po výkonu) byly časté (10/12), závažné ani dlouhodobé nebyly u této malé skupiny pacientů zaznamenány.

**Závěry:** Ošetření pomocí bronchiální termoplastiky vede k redukci masy hladké svaloviny s příznivými dlouhodobými efekty na funkce plic, potíže nemocných (včetně redukce exacerbací) a množství potřebné medikace a užití systémových kortikoidů. Dle našich dosavadních zkušeností je nejlepších výsledků dosahováno u pacientů s výraznou pozitivitou BDT, což nepřímo vypovídá o přítomnosti významné hypertrofie/hyperplazie hladké svaloviny průdušek. V současné době jsou ideálními kandidáty pacienti s těžkým astmatem a s výraznou hyperaktivitou, kteří nesplňují indikační kritéria biologické léčby (Anti-IgE/anti-IL5). Definitivní indikace nemocných je žádoucí provádět na pracovištích center pro těžké astma.

**Tab č. 10** Vliv ošetření bronchiální termoplastikou na FEV1, bronchiální hyperreaktivitu, FENO a kontrolu astmatu, počet exacerbací během prvního roku od posledního ošetření

| P | fenotype | c.date    | FVC   | dif.FVC % | FEV1  | dif.FEV1 % | BRT + in % | FENO | ACQ | RF pulses | exacrb. |
|---|----------|-----------|-------|-----------|-------|------------|------------|------|-----|-----------|---------|
| 1 | non IgE  | before BT | 3,99x |           | 2,17x |            | 9          | 28   | 86  | 46+34+3   | 7       |
|   |          | 3M        | 4,67  | 17        | 3,2   | 47x        |            | 20   |     | 116       | 0       |
|   |          | 6M        | 4,44  | 11,2      | 3,1   | 42,8x      |            | 48   |     |           | 1       |
|   |          | 12M       | 4,82  | 20,8      | 3,38  | 55,7x      |            | 28   | 25  |           | 1       |
| 2 | non IgE  | before BT | 2,76x |           | 1,99x |            | 21         | 33   | 156 | 35+35+3   | 3       |
|   |          | 3M        | 3,26  | 18        | 2,27  | 14         | 12         | 25   | 25  | 114       | 0       |
|   |          | 6M        | 2,95  | 6,8       | 2,05  | 3          | 19         | 17   | 25  |           | 0       |
|   |          | 12M       | 3,44  | 24        | 2,39  | 20         | 8          | 26   | 25  |           | 0       |
| 3 | non IgE  | before BT | 4,68x |           | 2,41x |            | 11         | 27   | 140 | 32+32+5   | 3       |
|   |          | 3M        | 5,21  | 11,3      | 2,73  | 13,2       | 0          |      |     | 153       | 1       |
|   |          | 6M        | 4,46  | -4,7      | 2,28  | -5,3       | 7          | 58   | 15  |           | 1       |
|   |          | 12M       | 4,14  | -11,5     | 1,77  | -26,5      | 21         | 54   | 11  |           | 1       |
| 4 | IgE      | before BT | 3,95x |           | 2,71x |            | 22         | 31   | 133 | 33+57+6   | 3       |
|   |          | 3M        | 4,23  | 7         | 2,81  | 3,7x       |            | 18   | 23  | 153       | 0       |
|   |          | 6M        | 4,31  | 9         | 2,96  | 9x         |            | 26   | 22  |           | 0       |
|   |          | 12M       | 4,46  | 13        | 3,01  | 11         | 19         | 17   | 21  |           | 1       |
| 5 | nonIgE   | before BT | 2,13x |           | 1,73x |            | 18         | 22   | 4   | 36+39+6   | 3       |
|   | +IgE     | 3M        | 2,31  | 8,5       | 1,82  | 5          | 7          | 37   | 25  | 139       | 0       |
|   |          | 6M        |       |           |       |            |            |      |     |           |         |
|   |          | 12M       |       |           |       |            |            |      |     |           |         |
| 6 | non IgE  | before BT | 4,17x |           | 2,86x |            | 11         | 21   | 172 | 57+50+7   | 2       |
|   |          | 3M        | 4,22  | 1         | 3,15  | 10         | 7          | 12   | 24  | 179       | 0       |
|   |          | 6M        |       |           |       |            |            |      |     |           |         |
|   |          | 12M       |       |           |       |            |            |      |     |           |         |

**Diskuze:** Bronchiální termoplastika je zajímavou alternativní možností terapie pacientů s těžkým refrakterním astmatem, kteří jsou symptomatictí navzdory maximální terapii včetně systémových kortikoidů s dominující bronchiální hyperreaktivitou. K zajištění dostatečné bezpečnosti výkonu je nutné, aby nemocní měli vstupní hodnoty FEV1 nad 50 % normy.

V souladu s dříve publikovanými studiemi jsme i u našeho malého souboru pacientů prokázali dobrý efekt terapie na funkční parametry (FVC, FEV1) a nezaznamenali jsme změny v bronchiální hyperreaktivitě. (Pavord et al., 2007) Z hlediska nežádoucích účinků se jako nejproblematictější jeví období bezprostředně po zákroku, nejčastěji jsme zaznamenali exacerbaci astmatu s nutností podávání systémové kortikoterapie, závažné nežádoucí účinky nebyly u našich pacientů zaznamenány. Během následujícího roku od posledního bronchoskopického sezení došlo k postupnému zlepšení symptomů, měřeno pomocí astma kontrol testu – snížení potřeby úlevové medikace, exacerbací, zlepšení astma kontroly, akutních ošetření, tak jako bylo prokázáno jinými autory. (Wechsler et al., 2013) (Thomson et al., 2012) (Castro et al., 2011b)

Významným nedostatkem této práce je malý soubor pacientů a krátká doba sledování po ošetření. Přestože naše centrum pro léčbu pacientů s těžkým refrakterním astmatem, patří mezi jedno z největších v ČR, pacientů k této léčebné modalitě jsme dosud vybrali relativně málo. Je to dáno několika faktory: za prvé pacienti s těžkým refrakterním astmatem mají často velmi špatné plicní funkce a nesplňují tak indikační kritéria, dále mohou mít vlivem tíže nemoci již fixovanou obstrukci a malou bronchiální hyperreaktivitu anebo jsou na vysokých dávkách systémových kortikoidů. Řada pacientů navrhovanou terapii z důvodu vlastní procedury (3 bronchoskopie v celkové narkóze) odmítají a v neposlední řadě je to

nárůst možností biologické léčby těžkého astmatu cílená na eosinofilní alergické i nealergické astma, která je zahajována přednostně. Zbývá nám skupina noneosinofilních astmatiků, ale v této skupině opět bývá řada nemocných bez dostatečné bronchiální hyperaktivity. (Zervas et al., 2018) Studie D.Doeing popisuje efekt BT u pacientů (8) s velmi těžkou fixovanou bronchiální obstrukcí na vysokých dávkách systémové kortikoterapie, kteří by nesplnili indikační kritéria, přesto BT podstoupili s dobrým efektem. (Doeing et al., 2013). Dle další publikované práce ošetření BT pomáhá v redukci air trappingu těžkých astmatiků (snížení RV/TLC poměru). (Langton et al., 2018) Je tedy otázkou, jestli se indikační kritéria pro BT v budoucnu nezmění.

Tato práce vyhodnocovala pacienty mezi lety 2013-2014, jednalo se tedy pouze o roční sledování. V další fázi naší práce plánujeme soubor rozšířit a vyhodnotit efekt terapie v delším časovém intervalu 5-6 let. Jako další zajímavá skupina pacientů, kteří by mohli z terapie BT profitovat a na jejichž výsledky je třeba si počkat, jsou dle našeho pohledu pacienti s těžkým astmatem a refrakterním kašlem nereagujícím na dostupnou terapii.

## 5. ZÁVĚR

V naší práci jsme se snažili vyhledat biomarkery, které by byly dostatečně spolehlivé, praktické, snadno dostupné, reprodukovatelné v klinické praxi, a které by nám pomohly zefektivnit a zacílit terapii zejména u pacientů s těžkým, refrakterním astmatem. Jednotlivé biomarkery jsme porovnávali ve smyslu jejich významnosti, použitelnosti a vzájemné zastupitelnosti.

Potvrdili jsme, že klíčovými a praktickými biomarkery pro bližší fenotypizaci pacientů s těžkým refrakterním astmatem jsou celkové a specifické IgE, ECP v krvi, eozinofilie periferní krve, sputa a nosní biopsie, dále přítomnost a stupeň nosní polypózy a reverzibilita bronchiální obstrukce.

Došli jsme k závěru, že při stanovení buněčného profilu vzorků indukovaného sputa a bronchoalveolární laváže se jako zlatý standard jeví sklíčkové metody cytologické a imunocytochemické. Metoda flowcytometrické analýzy nepřinesla validní výsledky. Odběry BALTE a IS jsou však poměrně časově náročné a pro nemocného (zvláště pak BALTE) nejvíce zatěžující. Pro běžnou klinickou praxi jsou nepraktické, mají však své místo při diagnostických rozpacích při určování fenotypu.

Potvrdili jsme význam nosní polypózy jako markeru eozinofilie v dolních cestách dýchacích a její korelaci s tíží nemoci a určitými konkrétními fenotypy. Jedná se o jednoduché, nenákladné a méně invazivní vyšetření.

Naše práce potvrdily výbornou efektivitu terapie, která byla vybrána zcela cíleně, na podkladě biomarkerů určujících konkrétní fenotypické a endotypické podskupiny.

Pacienti s těžkým refrakterním IgE mediováným alergickým fenotypem astmatu profitují z cílené terapie omalizumabem. U těchto nemocných došlo ke zlepšení plicních funkcí, kontroly astmatu a snížení až vysazení systémové kortikoterapie, redukcí exacerbací a využití zdravotní péče a zameškaných pracovních dnů. Tento příznivý efekt se potvrdil i v podskupině pacientů s bronchopulmonální aspergilózou. Bohužel se nám nepodařilo odpovědět na otázku, kdy a za jakých podmínek terapii omalizumabem ukončit, a jaké to bude mít důsledky pro pacienta. Neměli jsme dostatečně velký soubor pacientů s ukončenou léčbou, který bychom mohli prospektivně sledovat, a někteří pacienti se ztratili ze sledování.

Pomocným biomarkerem Type-2 high fenotypové cesty astmatu a chronické rinosinuitidy s nosními polypy se jeví sérový periostin. Jeho stanovení však nebylo zatím zařazeno do běžné praxe. Jeho zvýšené hladiny mohou provázet i jiná onemocnění, jeho hladina je ovlivněna kortikoterapií i anti IgE léčbou.

Cenným neinvazivním funkčním biomarkerem je reverzibilita bronchiální obstrukce. Pacienti s významnou bronchiální hyperreaktivitou profitovali z nefarmakologické terapie astmatu pomocí bronchiální termoplastiky. Došlo ke zlepšení plicních funkcí a poklesu exacerbací. Nicméně se jednalo o pilotní studii s pouhým ročním sledováním na malém souboru pacientů, výsledek bude nutné potvrdit dalšími studiemi s delším prospektivním sledováním.

## 6. SEZNAM LITERATURY

Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem* 2014;289:17406–15. doi:10.1074/jbc.R113.546218.

Agarwal R. Severe asthma with fungal sensitization. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011. doi:10.1007/s11882-011-0217-4.

Amin K, Janson C, Bystrom J. Role of Eosinophil Granulocytes in Allergic Airway Inflammation Endotypes. *Scand J Immunol* 2016. doi:10.1111/sji.12448.

Arron JR, Izuhara K. Asthma biomarkers: What constitutes a “gold standard”? *Thorax* 2015. doi:10.1136/thoraxjnl-2014-206069.

Asano T, Kanemitsu Y, Takemura M, Yokota M, Fukumitsu K, Takeda N, et al. Serum Periostin as a Biomarker for Comorbid Chronic Rhinosinusitis in Patients with Asthma. *Ann Am Thorac Soc* 2017;14:667–75. doi:10.1513/AnnalsATS.201609-720OC.

Balzar S, Wenzel SE, Chu HW. Transbronchial biopsy as a tool to evaluate small airways in asthma. *Eur Respir J* 2002;20:254–9. doi:10.1183/09031936.02.00261102.

Bardelas J, Figliomeni M, Kianifard F, Meng X. A 26-Week, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Study to Evaluate the Effect of Omalizumab on Asthma Control in Patients with Persistent Allergic Asthma. *J Asthma* 2012;49:144–52. doi:10.3109/02770903.2011.648296.

Barnes N, Menzies-Gow A, Mansur AH, Spencer D, Percival F, Radwan A, et al. Effectiveness of omalizumab in severe allergic asthma: A retrospective UK real-world study. *J Asthma* 2013. doi:10.3109/02770903.2013.790419.

Barnes NC, Sharma R, Lettis S, Calverley PMA. Blood eosinophils as a marker of response to inhaled corticosteroids in COPD. *Eur Respir J* 2016;47:1374–82. doi:10.1183/13993003.01370-2015.

Barnes PJ. Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 2018. doi:10.1038/s41577-018-0006-6.

Barnes PJ. Severe asthma: advances in current management and future therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:48–59. doi:10.1016/j.jaci.2011.11.006.

Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 2008. doi:10.1038/nri2254.

Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol* 2006;148:245–54. doi:10.1038/sj.bjp.0706736.

Barnes PJ. Alveolar Macrophages as Orchestrators of COPD. *COPD J Chronic Obstr Pulm Dis* 2004;1:59–70. doi:10.1081/COPD-120028701.

Bel EH, Wenzel SE, Thompson PJ, Prazma CM, Keene ON, Yancey SW, et al. Oral Glucocorticoid-Sparing Effect of Mepolizumab in Eosinophilic Asthma. *NEJM Org N Engl J Med* 2014;13:1189–97. doi:10.1056/NEJMoa1403291.

van den Berge M, Pauw RG, de Monchy JGR, van Minnen CA, Postma DS, Kerstjens HAM. Beneficial Effects of Treatment With Anti-IgE Antibodies (Omalizumab) in a Patient With Severe Asthma and Negative Skin-Prick Test Results. *Chest* 2011;139:190–3. doi:10.1378/chest.10-0128.

Berry M, Hargadon B, Morgan A, Shelley M, Richter J, Shaw D, et al. Alveolar nitric oxide in adults with asthma: Evidence of distal lung inflammation in refractory asthma. *Eur Respir J*

2005. doi:10.1183/09031936.05.00132404.

Blasi F. Year in review: Adult Asthma n.d. doi:10.1056/NEJMoa1304048.

van den Blink B, Wijsenbeek MS, Hoogsteden HC. Serum biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther* 2010. doi:10.1016/j.pupt.2010.08.001.

Boswell-Smith V, Cazzola M, Page CP. Are phosphodiesterase 4 inhibitors just more theophylline? *J Allergy Clin Immunol* 2006. doi:10.1016/j.jaci.2006.02.045.

Bousquet J, Siergiejko Z, Świebocka E, Humbert M, Rabe KF, Smith N, et al. Persistency of response to omalizumab therapy in severe allergic (IgE-mediated) asthma. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2011. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02522.x.

Braunstahl G-J, Canvin J, Peachey G, Chen C-W, Georgiou P. Healthcare Resource Utilization in Patients Receiving Omalizumab for Allergic Asthma in a Real-World Setting. *Biol Ther* 2014;4:57–67. doi:10.1007/s13554-014-0019-z.

Braunstahl G-J, Leo J, Thirlwell J, Peachey G, Maykut R. Uncontrolled persistent allergic asthma in practice: eXpeRience registry baseline characteristics. *Curr Med Res Opin* 2011;27:761–7. doi:10.1185/03007995.2011.557717.

Braunstahl GJ, Chen CW, Maykut R, Georgiou P, Peachey G, Bruce J. The eXpeRience registry: The “real-world” effectiveness of omalizumab in allergic asthma. *Respir Med* 2013. doi:10.1016/j.rmed.2013.04.017.

Breviř 2017 – 2019 - Medical Tribune - Lékařské knihkupectví :... Praha: 2017.

Brightling CE, Chanez P, Leigh R, O’Byrne PM, Korn S, She D, et al. Efficacy and safety of tralokinumab in patients with severe uncontrolled asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med* 2015;3:692–701. doi:10.1016/S2213-2600(15)00197-6.

Brusselle G, Michils A, Louis R, Dupont L, Van de Maele B, Delobbe A, et al. “Real-life” effectiveness of omalizumab in patients with severe persistent allergic asthma: The PERSIST study. *Respir Med* 2009. doi:10.1016/j.rmed.2009.06.014.

Brusselle G, Pavord ID, Landis S, Pascoe S, Lettis S, Morjaria N, et al. Blood eosinophil levels as a biomarker in COPD. *Respir Med* 2018;138:21–31. doi:10.1016/J.RMED.2018.03.016.

Brusselle GG, Maes T, Bracke KR. Eosinophils in the Spotlight: Eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. *Nat Med* 2013. doi:10.1038/nm.3300.

Busse WW, Holgate S, Kerwin E, Chon Y, Feng J, Lin J, et al. Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Study of Brodalumab, a Human Anti-IL-17 Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate to Severe Asthma n.d. doi:10.1164/rccm.201212-2318OC.

Caminati M, Gatti D, Dama A, Lorenzetti L, Senna G. Serum periostin during omalizumab therapy in asthma: A tool for patient selection and treatment evaluation. *Ann Allergy, Asthma Immunol* 2017. doi:10.1016/j.anai.2017.08.004.

Del Carmen Vennera M, Sabadell C, Picado C. Duration of the efficacy of omalizumab after treatment discontinuation in “real life” severe asthma. *Thorax* 2018. doi:10.1136/thoraxjnl-2017-210017.

Caruso M, Morjaria J, Emma R, Amaradio MD, Polosa R. Biologic agents for severe asthma patients: clinical perspectives and implications. *Intern Emerg Med* 2018. doi:10.1007/s11739-017-1773-y.

Casale TB. Biologics and biomarkers for asthma, urticaria, and nasal polyposis. *J Allergy*

Clin Immunol 2017. doi:10.1016/j.jaci.2017.03.006.

Castro M, Mathur S, Hargreave F, Boulet LP, Xie F, Young J, et al. Reslizumab for poorly controlled, eosinophilic asthma: A randomized, placebo-controlled study. *Am J Respir Crit Care Med* 2011a. doi:10.1164/rccm.201103-0396OC.

Castro M, Rubin A, Laviolette M, Hanania NA, Armstrong B, Cox G. Persistence of effectiveness of bronchial thermoplasty in patients with severe asthma. *Ann Allergy, Asthma Immunol* 2011b;107:65–70. doi:10.1016/j.anai.2011.03.005.

Castro M, Rubin AS, Laviolette M, Fiterman J, De Andrade Lima M, Shah PL, et al. Effectiveness and safety of bronchial thermoplasty in the treatment of severe asthma: a multicenter, randomized, double-blind, sham-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:116–24. doi:10.1164/rccm.200903-0354OC.

Castro M, Zangrilli J, Wechsler ME, Bateman ED, Brusselle GG, Bardin P, et al. Reslizumab for inadequately controlled asthma with elevated blood eosinophil counts: Results from two multicentre, parallel, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trials. *Lancet Respir Med* 2015;3. doi:10.1016/S2213-2600(15)00042-9.

Cazzola M, Camiciottoli G, Bonavia M, Gulotta C, Ravazzi A, Alessandrini A, et al. Italian real-life experience of omalizumab. *Respir Med* 2010;104:1410–6. doi:10.1016/j.rmed.2010.04.013.

Chiba S, Ohta H, Abe K, Hisata S, Ohkouchi S, Hoshikawa Y, et al. The diagnostic value of the interstitial biomarkers kl-6 and sp-d for the degree of fibrosis in combined pulmonary fibrosis and emphysema. *Pulm Med* 2012. doi:10.1155/2012/492960.

Chipps BE, Lanier B, Milgrom H, Deschildre A, Hedlin G, Szeffler SJ, et al. Omalizumab in children with uncontrolled allergic asthma: Review of clinical trial and real-world experience. *J Allergy Clin Immunol* 2017. doi:10.1016/j.jaci.2017.03.002.

Chlumský J. Deficit  $\alpha 1$  -antitrypsinu. *Acta Med* 2018;92. <http://www.actamedicinae.cz/obsah.htm> (accessed January 28, 2019).

Chlumský J, Striz I, Terl M, Vondracek J. Strategy Aimed at Reduction of Sputum Eosinophils Decreases Exacerbation Rate in Patients with Asthma. *J Int Med Res* 2006;34:129–39. doi:10.1177/147323000603400202.

Chung - 2012 - Zánětlivé biomarkery u těžkého astmatu. n.d.

Chung KF. p38 mitogen-activated protein kinase pathways in asthma and COPD. *Chest* 2011;139:1470–9. doi:10.1378/chest.10-1914.

Claman DM, Boushey HA, Liu J, Wong H, Fahy J V, Francisco S. Analysis of induced sputum to examine the effects of prednisone on airway inflammation in asthmatic subjects. 1994.

Corren J, Casale TB, Lanier B, Buhl R, Holgate S, Jimenez P. Safety and tolerability of omalizumab. *Clin Exp Allergy* 2009;39:788–97. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03214.x.

Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey M V., Arron JR, et al. Lebrikizumab Treatment in Adults with Asthma. *N Engl J Med* 2011. doi:10.1056/NEJMoa1106469.

Cowan DC, Taylor DR, Peterson LE, Cowan JO, Palmay R, Williamson A, et al. Biomarker-based asthma phenotypes of corticosteroid response. *J Allergy Clin Immunol* 2015. doi:10.1016/j.jaci.2014.10.026.

Crespo A, Giner J, Torrejón M, Belda A, Mateus E, Granel C, et al. Clinical and inflammatory features of asthma with dissociation between fractional exhaled nitric oxide and eosinophils

in induced sputum. *J Asthma* 2016. doi:10.3109/02770903.2015.1116086.

Crim C, Calverley PMA, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, et al. Pneumonia risk in COPD patients receiving inhaled corticosteroids alone or in combination: TORCH study results. *Eur Respir J* 2009;34:641–7. doi:10.1183/09031936.00193908.

DAXAS 500MCG Potahovaná tableta — Databáze léčiv. n.d.  
<https://mediately.co/cz/drugs/3avivxmlzMNRZntZoqwUJfwnxkm/daxas-500mcg-potahovana-tableta#overdose> (accessed February 2, 2019).

Dentener MA, Creutzberg EC, Pennings H-J, Rijkers GT, Mercken E, Wouters EFM. Effect of Infliximab on Local and Systemic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Pilot Study. *Respiration* 2008;76:275–82. doi:10.1159/000117386.

Deschildre A, Marguet C, Salleron J, Pin I, Rittié JL, Derelle J, et al. Add-on omalizumab in children with severe allergic asthma: A 1-year real life survey. *Eur Respir J* 2013. doi:10.1183/09031936.00149812.

doc. MUDr. Petr Čáp PD. Současný pohled na diagnostický význam vydechovaného oxidu dusnatého. *Acta Med* 2018;7:92.

Doeing DC, Mahajan AK, White SR, Naureckas ET, Krishnan JA, Hogarth DK. Safety and feasibility of bronchial thermoplasty in asthma patients with very severe fixed airflow obstruction: a case series. *J Asthma* 2013;50:215–8. doi:10.3109/02770903.2012.751997.

Ducharme F, John Rees P, Thomas S. Review: Adding antileukotrienes to inhaled corticosteroids reduces exacerbations in symptomatic chronic asthma. n.d.

Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, 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. doi:10.1164/rccm.9120-11ST.

van der Ent CK, Hoekstra H, Rijkers GT. Successful treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis with recombinant anti-IgE antibody. *Thorax* 2007;62:276–7. doi:10.1136/thx.2004.035519.

Fingleton J, Braithwaite I, Travers J, Bowles D, Strik R, Siebers R, et al. Serum periostin in obstructive airways Disease. *Eur Respir J* 2016. doi:10.1183/13993003.01384-2015.

Flood-Page P, Swenson C, Faierman I, Matthews J, Williams M, Brannick L, et al. A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007. doi:10.1164/rccm.200701-085OC.

Georgiev K, Georgieva M. 02+ MILLION TOP 1% MOST CITED SCIENTIST 12.2% Pharmacological Properties of Monoclonal Antibodies Directed Against Interleukins 2015. doi:10.5772/61774.

Gevaert P, Calus L, Van Zele T, Blomme K, De Ruyck N, Bauters W, et al. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2013. doi:10.1016/j.jaci.2012.07.047.

Gibson PG, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, et al. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2017. doi:10.1016/S0140-6736(17)31281-3.

Gilani SR, Vuga LJ, Lindell KO, Gibson KF, Xue J, Kaminski N, et al. CD28 Down-Regulation on Circulating CD4 T-Cells Is Associated with Poor Prognoses of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS One* 2010;5:e8959. doi:10.1371/journal.pone.0008959.

Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2018 update). n.d.

- Gohil U, Modan A, Gohil P. Aspirin induced asthma - A review. *Glob J Pharmacol* 2010.
- Gonem S, Berair R, Singapuri A, Hartley R, Laurencin MFM, Bacher G, et al. Fevipiprant, a prostaglandin D2 receptor 2 antagonist, in patients with persistent eosinophilic asthma: a single-centre, randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled trial. *Lancet Respir Med* 2016;4:699–707. doi:10.1016/S2213-2600(16)30179-5.
- Gosens R, Bos IST, Zaagsma J, Meurs H. Protective effects of tiotropium bromide in the progression of airway smooth muscle remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2005. doi:10.1164/rccm.200409-1249OC.
- Hakonarson H, Bjornsdottir US, Halapi E, Bradfield J, Zink F, Mouy M, et al. Profiling of genes expressed in peripheral blood mononuclear cells predicts glucocorticoid sensitivity in asthma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:14789–94. doi:10.1073/pnas.0409904102.
- Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and Exacerbations of Refractory Eosinophilic Asthma. *N Engl J Med* 2009. doi:10.1056/NEJMoa0808991.
- Hambly N, Nair P. Monoclonal antibodies for the treatment of refractory asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2014. doi:10.1097/MCP.0000000000000007.
- Hamilton RG, Marcotte G V., Saini SS. Immunological methods for quantifying free and total serum IgE levels in allergy patients receiving Omalizumab (Xolair) therapy. *J Immunol Methods* 2005;303:81–91. doi:10.1016/J.JIM.2005.06.008.
- Hanania NA, Wenzel S, Roseñ K, Hsieh HJ, Mosesova S, Choy DF, et al. Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: An analysis of biomarkers in the EXTRA study. *Am J Respir Crit Care Med* 2013. doi:10.1164/rccm.201208-1414OC.
- Horváth I, Hunt J, Barnes PJ. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005;26:523–48. doi:10.1183/09031936.05.00029705.
- Hoshino M, Ohtawa J, Akitsu K. Effect of treatment with inhaled corticosteroid on serum periostin levels in asthma. *Respirology* 2016. doi:10.1111/resp.12687.
- Huh JW, Kim DS, Oh Y-M, Shim TS, Lim CM, Lee S Do, et al. Is Metalloproteinase-7 Specific for Idiopathic Pulmonary Fibrosis? *Chest* 2008;133:1101–6. doi:10.1378/chest.07-2116.
- Humbert M, Beasley R, Ayres J, Slavin R, Hébert J, Bousquet J, et al. Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2005. doi:10.1111/j.1398-9995.2004.00772.x.
- Humbert M, Busse W, Hanania NA, Lowe PJ, Canvin J, Erpenbeck VJ, et al. Omalizumab in Asthma: An Update on Recent Developments. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2014. doi:10.1016/j.jaip.2014.03.010.
- HUNT JF, FANG K, MALIK R, SNYDER A, MALHOTRA N, PLATTS-MILLS TAE, et al. Endogenous Airway Acidification. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:694–9. doi:10.1164/ajrccm.161.3.9911005.
- Hutyrova B, Bystron J, Chlumsky J, Kindlova D, Klosova J, Krcmova I, et al. Effect of omalizumab treatment on allergic comorbidities in patients with severe allergic asthma – real life experience from Czech Anti-IgE Registry. *Allergy Immunol.*, vol. 50, European Respiratory Society; 2017, p. PA3541. doi:10.1183/1393003.congress-2017.PA3541.

Intersticiální plicní procesy - Martina Vašáková, Jaroslav Polák, Radoslav Matěj - Maxdorf - Lékařské knihkupectví :... n.d. <https://www.lekarskeknihy.cz/produkt/102978-intersticialni-plicni-procesy/> (accessed January 28, 2019).

Izuhara K, Arima K, Ohta S, Suzuki S, Inamitsu M, Yamamoto K. Periostin in Allergic Inflammation. *Allergol Int* 2014. doi:10.2332/allergolint.13-RAI-0663.

Izuhara K, Conway SJ, Moore BB, Matsumoto H, Holweg CTJ, Matthews JG, et al. Roles of periostin in respiratory disorders. *Am J Respir Crit Care Med* 2016. doi:10.1164/rccm.201510-2032PP.

Jabara HH, Ahern DJ, Vercelli D, Geha RS. Hydrocortisone and IL-4 induce IgE isotype switching in human B cells. *J Immunol* 1991;147:1557–60.

Janssen LJ. Airway smooth muscle as a target in asthma and the beneficial effects of bronchial thermoplasty. *J Allergy* 2012;2012:593784. doi:10.1155/2012/593784.

Jesudason EC. Airway smooth muscle: an architect of the lung? *Thorax* 2009;64:541–5. doi:10.1136/thx.2008.107094.

Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, et al. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2013. doi:10.1016/j.jaci.2013.04.050.

Kanu A, Patel K. Treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in CF with anti-IgE antibody (omalizumab). *Pediatr Pulmonol* 2008;43:1249–51. doi:10.1002/ppul.20907.

Katial RK, Bensch GW, Busse WW, Chipps BE, Denson JL, Gerber AN, et al. Changing Paradigms in the Treatment of Severe Asthma: The Role of Biologic Therapies. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2017. doi:10.1016/j.jaip.2016.11.029.

Kerstjens HAM, Engel M, Dahl R, Paggiaro P, Beck E, Vandewalker M, et al. Tiotropium in Asthma Poorly Controlled with Standard Combination Therapy. *N Engl J Med* 2012. doi:10.1056/NEJMoa1208606.

Kim MA, Yoon MK, Lee YS, Izuhara K, Ohta S, Ono J, et al. Clinical implication of the serum periostin level for differentiating phenotypes of NSAID hypersensitivity. *Allergol Int* 2016. doi:10.1016/j.alit.2016.04.013.

Kimura Hirokazu, Konno S, Makita H, Taniguchi N, Kimura Hiroki, Goudarzi H, et al. Serum periostin is associated with body mass index and allergic rhinitis in healthy and asthmatic subjects. *Allergol Int* 2018. doi:10.1016/j.alit.2017.11.006.

King TE, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, et al. A Phase 3 Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med* 2014;370:2083–92. doi:10.1056/NEJMoa1402582.

Kirchnerová OR, Valena T, Novosad J, Teřl M. Real-world effectiveness and safety of omalizumab in patients with uncontrolled severe allergic asthma from the Czech Republic. *Adv Dermatol Allergol* 2018;1–10. doi:<https://doi.org/10.5114/ada.2018.76606>.

Koblížek V, Chlumský J, Zindr V, Neumannová K, Zatloukal Jakub, Kociánová J, et al. Doporučený postup ČPFS pro diagnostiku a léčbu stabilní CHOPN Krátká definitivní verze. n.d.

Kočová E, Koblížek V, Ruta J, Eliáš P. Výpočetní tomografie plic u pacientů se zavedenými endobronchiálními chlopněmi computed tomography of the lung after endobronchial Valve implantation původní práce. vol. 70. 2016.

Kolek V, Kašák V, Vašáková M. *Pneumologie*. n.d.

- Komiya K, Ohta S, Arima K, Ogawa M, Suzuki S, Mitamura Y, et al. Clarithromycin attenuates IL-13-induced periostin production in human lung fibroblasts. *Respir Res* 2017. doi:10.1186/s12931-017-0519-8.
- Korn S, Thielen A, Seyfried S, Taube C, Kornmann O, Buhl R. Omalizumab in patients with severe persistent allergic asthma in a real-life setting in Germany. *Respir Med* 2009;103:1725–31. doi:10.1016/j.rmed.2009.05.002.
- Kortekaas Krohn I, Shikhagaie MM, Golebski K, Bernink JH, Breynaert C, Creyns B, et al. Emerging roles of innate lymphoid cells in inflammatory diseases: Clinical implications. *Allergy* 2017. doi:10.1111/all.13340.
- Kou K, Okawa T, Yamaguchi Y, Ono J, Inoue Y, Kohno M, et al. Periostin levels correlate with disease severity and chronicity in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2014;171:283–91. doi:10.1111/bjd.12943.
- Krčmová, Novosad, Sedlák - 2018 - Biomarkery a biologická léčba. n.d.
- Kuna P, Wenzel SE, Ind PW, Otulana BA, Bleecker ER, Ping Yen Y. Inhaled pitrakinra, an IL-4/IL-13 antagonist, reduced exacerbations in patients with eosinophilic asthma 371. Treatment options for asthma P3980 Inhaled pitrakinra, an IL-4/IL-13 antagonist, reduced exacerbations in patients with eosinophilic asthma. n.d.
- Kupryś-Lipińska I, Kuna P. Loss of asthma control after cessation of omalizumab treatment: real life data. *Postępy Dermatologii i Alergologii* 2014;31:1–5. doi:10.5114/pdia.2014.40553.
- Kupryś-Lipińska I, Majak P, Molinska J, Kuna P. Effectiveness of the Polish program for the treatment of severe allergic asthma with omalizumab: a single-center experience 2016. doi:10.1186/s12890-016-0224-2.
- Kuroki Y, Takahashi H, Chiba H, Akino T. Surfactant proteins A and D: disease markers. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1998;1408:334–45. doi:10.1016/S0925-4439(98)00079-9.
- Langton D, Ing A, Bennetts K, Wang W, Farah C, Peters M, et al. Bronchial thermoplasty reduces gas trapping in severe asthma. *BMC Pulm Med* 2018;18:155. doi:10.1186/s12890-018-0721-6.
- Leckie MJ, Brinke A, Khan J, Diamant Z, Connor BJO, Walls CM, et al. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000;356.
- Ledford D, Busse W, Trzaskoma B, Omachi TA, Rosén K, Chipps BE, et al. A Randomized, Multicenter Study Evaluating Xolair® Persistency Of Response After Long-Term Therapy (XPORT). *J Allergy Clin Immunol* 2016. doi:10.1016/j.jaci.2016.08.054.
- Liška M. Vyšetřovací metody v alergologii - Zdraví.Euro.cz n.d. <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/vysetrovaci-metody-v-alergologii-463461> (accessed January 26, 2019).
- Little SA, Chalmers GW, Thomson NC, MacLeod KJ, McSharry C. Non-invasive markers of airway inflammation as predictors of oral steroid responsiveness in asthma. *Thorax* 2000;55:232–4. doi:10.1136/thorax.55.3.232.
- Loomis-King H, Flaherty KR, Moore BB. Pathogenesis, current treatments and future directions for idiopathic pulmonary fibrosis. *Curr Opin Pharmacol* 2013;13:377–85. doi:10.1016/j.coph.2013.03.015.
- Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Björner L, Casale TB, Custovic A, et al. Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome.

J Allergy Clin Immunol 2011. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.037.

Low K, Bardin PG. Targeted Therapy for Severe Asthma: Identifying the Right Patients. *Mol Diagnosis Ther* 2017;21:235–47. doi:10.1007/s40291-016-0252-x.

Lucas JS, Barbato A, Collins SA, Goutaki M, Behan L, Caudri D, et al. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J* 2017. doi:10.1183/13993003.01090-2016.

Magnan A, Bourdin A, Prazma CM, Albers FC, Price RG, Yancey SW, et al. Treatment response with mepolizumab in severe eosinophilic asthma patients with previous omalizumab treatment. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2016. doi:10.1111/all.12914.

Malkusová I., Ružicková O., Teřl M., Vlas T. PP. Flow cytometric analysis compared with routine and immunocytochemistry staining of cell profile in induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid in patients with bronchial asthma. *Allergy*, vol. 64, XXVIII ELACI Congress, Polsko, Varšava, 6.-10.6.2009. : 2009, p. 99-178 suppl. 90, 269. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02075.x.

Marek, Josef P. Farmakoterapie vnitřních nemocí - 3. zcela přepracované a doplněné vydání - Marek Josef a kolektiv - Knihy Google. 3rd ed. Praha: Grada; 2010.

Marichal T, Mesnil C, Bureau F. Homeostatic Eosinophils: Characteristics and Functions. *Front Med* 2017;4:101. doi:10.3389/fmed.2017.00101.

Mayse ML, Laviolette M, Rubin AS, Lampron N, Simoff M, Duhamel D, et al. Clinical pearls for bronchial thermoplasty. *J Bronchol* 2007;14:115–23. doi:10.1097/LBR.0b013e318054dbed.

MAZIAK W, LOUKIDES S, CULPITT S, SULLIVAN P, KHARITONOV SA, BARNES PJ. Exhaled Nitric Oxide in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:998–1002. doi:10.1164/ajrccm.157.3.97-05009.

McBrien CN, Menzies-Gow A. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Front Med* 2017;4:93. doi:10.3389/fmed.2017.00093.

McNulty W, Usmani OS. Techniques of assessing small airways dysfunction. *Eur Clin Respir J* 2014. doi:10.3402/ecrj.v1.25898.

Medrek SK, Parulekar AD, Hanania NA. Predictive Biomarkers for Asthma Therapy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2017. doi:10.1007/s11882-017-0739-5.

Melo Jr. JT, Tunstall T, Pizzichini MMM, Maurici R, Rocha CC, Dal-Pizzol F, et al. IL-5 Levels in Nasosorption and Sputosorption Correlate with Sputum Eosinophilia in Allergic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;199:rccm.201807-1279LE. doi:10.1164/rccm.201807-1279LE.

Menzella F, Facciolo N, Castagnetti C, Simonazzi A, Zucchi L. Omalizumab: when the non-responder is a late-responder. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2009;41:155–9.

Menzella F, Galeone C, Formisano D, Castagnetti C, Ruggiero P, Simonazzi A, et al. Real-life Efficacy of Omalizumab After 9 Years of Follow-up. *Allergy Asthma Immunol Res* 2017a;9:368–72. doi:10.4168/aa.2017.9.4.368.

Menzella F, Galeone C, Formisano D, Castagnetti C, Ruggiero P, Simonazzi A, et al. Real-life efficacy of omalizumab after 9 years of follow-up. *Allergy, Asthma Immunol Res* 2017b. doi:10.4168/aa.2017.9.4.368.

Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, et al. An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline: The Clinical Utility of Bronchoalveolar Lavage Cellular Analysis in Interstitial Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med*

2012;185:1004–14. doi:10.1164/rccm.201202-0320ST.

Milan Teřl A, Čáp P, Dvořáková R, Kašák V, Kočí T, Novotná B, et al. Doporučený postup diagnostiky a léčby bronchiálního astmatu. n.d.

Miravittles M, Dirksen A, Ferrarotti I, Koblizek V, Lange P, Mahadeva R, et al. European Respiratory Society statement: diagnosis and treatment of pulmonary disease in  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J* 2017;50:1700610. doi:10.1183/13993003.00610-2017.

Molimard M, Mala L, Bourdeix I, Le Gros V. Observational study in severe asthmatic patients after discontinuation of omalizumab for good asthma control. *Respir Med* 2014. doi:10.1016/j.rmed.2014.02.003.

Molina-Molina M, Machahua-Huamani C, Vicens-Zygmunt V, Llatjós R, Escobar I, Sala-Llinas E, et al. Anti-fibrotic effects of pirfenidone and rapamycin in primary IPF fibroblasts and human alveolar epithelial cells. *BMC Pulm Med* 2018. doi:10.1186/s12890-018-0626-4.

Moore WC, Hastie AT, Li X, Li H, Busse WW, Jarjour NN, et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2014. doi:10.1016/j.jaci.2013.10.011.

MUDr. Jiří Novák. Léčba astmatu inhalačními kortikosteroidy – 2011. *Medicina pro Praxi* 2011;8:112–8.

Novelli F, Latorre M, Vergura L, Caiaffa MF, Camiciottoli G, Guarnieri G, et al. Asthma control in severe asthmatics under treatment with omalizumab: A cross-sectional observational study in Italy. *Pulm Pharmacol Ther* 2015;31:123–9. doi:10.1016/J.PUPT.2014.09.007.

Novosad J, Bartoš V, Drahošová M, Sedlák V, Krejsek J, Krčmová I. Periostin – nový slibný biologický znak bronchiálního astmatu a idiopatické plicní fibrózy Periostin-a novel promising biomarker of bronchial asthma and idiopathic pulmonary fibrosis. n.d.

O. Růžicková Kirchnerová, M. Teřl, H. Mírka, J. Baxa VH. Alergická a bronchopulmonální aspergilóza (ABPA) a možnosti její léčby - kazuistika. *Stud Pneumol Phtiseol* 2010;2010, roč. 70, č. 4, s. 149-154. doi:ISSN: 1213-810X.

O'Connell AE, Hess JA, Santiago GA, Nolan TJ, Lok JB, Lee JJ, et al. Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infect Immun* 2011;79:2770–8. doi:10.1128/IAI.00931-10.

O'Dwyer DN, Moore BB. The role of periostin in lung fibrosis and airway remodeling. *Cell Mol Life Sci* 2017. doi:10.1007/s00018-017-2649-z.

Okamoto M, Hoshino T, Kitasato Y, Sakazaki Y, Kawayama T, Fujimoto K, et al. Periostin, a matrix protein, is a novel biomarker for idiopathic interstitial pneumonias n.d. doi:10.1183/09031936.00059810.

Ortega H, Chupp G, Bardin P, Bourdin A, Garcia G, Hartley B, et al. The role of mepolizumab in atopic and nonatopic severe asthma with persistent eosinophilia. *Eur Respir J* 2014. doi:10.1183/09031936.00220413.

Ortega HG, Liu MC, Pavord ID, Brusselle GG, FitzGerald JM, Chetta A, et al. Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *N Engl J Med* 2014. doi:10.1056/NEJMoa1403290.

Oxford Handbook of Respiratory Medicine PDF 2nd Edition Free Download. n.d. <https://www.allthingsmedicine.com/oxford-handbook-of-respiratory-medicine-pdf-2nd-edition/> (accessed January 26, 2019).

- Panzner P, Malkusová I, Vachová M, Liška M, Brodská P, Růžicková O, et al. Bronchial inflammation in seasonal allergic rhinitis with or without asthma in relation to natural exposure to pollen allergens. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2015;43:3–9. doi:10.1016/j.aller.2013.06.009.
- Parulekar AD, Kao CC, Dlamant Z, Hanania NA. Targeting the interleukin-4 and interleukin-13 pathways in severe asthma: Current knowledge and future needs. *Curr Opin Pulm Med* 2018. doi:10.1097/MCP.0000000000000436.
- Pavord ID, Cox G, Thomson NC, Rubin AS, Corris PA, Niven RM, et al. Safety and Efficacy of Bronchial Thermoplasty in Symptomatic, Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:1185–91. doi:10.1164/rccm.200704-571OC.
- Petsky HL, Cates CJ, Lasserson TJ, Li AM, Turner C, Kynaston JA, et al. A systematic review and meta-analysis: tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils). *Thorax* 2012;67:199–208. doi:10.1136/thx.2010.135574.
- Petsky HL, Kew KM, Turner C, Chang AB. Exhaled nitric oxide levels to guide treatment for adults with asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2016. doi:10.1002/14651858.CD011440.pub2.
- Pipkorn U, Karlsson G. Methods for obtaining specimens from the nasal mucosa for morphological and biochemical analysis. vol. 1. 1988.
- Pizzichini E, Leff JA, Reiss TF, Hendeles L, Boulet LP, Wei LX, et al. Montelukast reduces airway eosinophilic inflammation in asthma: a randomized, controlled trial. *Eur Respir J* 1999;14:12–8.
- Pizzichini E, Pizzichini MMM, Gibson P, Parameswaran K, Gleich GJ, Berman L, et al. Sputum eosinophilia predicts benefit from prednisone in smokers with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998. doi:10.1164/ajrccm.158.5.9804028.
- Pizzichini MMM. Is sputum eosinophils a good or poor predictor of benefit from inhaled corticosteroid therapy in asthma? *Eur Respir J* 2002. doi:10.1183/09031936.02.00068102.
- Psathakis K, Mermigkis D, Papatheodorou G, Loukides S, Panagou P, Polychronopoulos V, et al. Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur J Clin Invest* 2006;36:362–7. doi:10.1111/j.1365-2362.2006.01636.x.
- Rabe KF. Update on roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease Keywords Anti-inflammatory; chronic obstructive pulmonary disease; phosphodiesterase 4 inhibitor; roflumilast LINKED ARTICLES 2011. doi:10.1111/bph.2011.163.issue-1.
- Rabe KF, Nair P, Brusselle G, Maspero JF, Castro M, Sher L, et al. Efficacy and Safety of Dupilumab in Glucocorticoid-Dependent Severe Asthma. *N Engl J Med* 2018. doi:10.1056/NEJMoa1804093.
- Racek M. Struktura a vznik MPO. *Klin Biochem Metab* 2008;16:222–7.
- Raghu G, Rochwerg B, Zhang Y, Garcia CAC, Azuma A, Behr J, 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* 2015. doi:10.1164/rccm.201506-1063ST.
- Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, et al. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med* 2014;370:2071–82. doi:10.1056/NEJMoa1402584.
- Rodrigo GJ. Anticholinergics for asthma: A long history. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*

2018. doi:10.1097/ACI.0000000000000408.

Russell DW, Wells JM, Blalock JE. Disease phenotyping in chronic obstructive pulmonary disease: The neutrophilic endotype. *Curr Opin Pulm Med* 2016. doi:10.1097/MCP.0000000000000238.

Ruzickova-Kirchnerova O, Malkusova I, Terl M, Panzner P, Kunschrova J. Nasal mucosa biopsy in severe asthma patients as a tool for the prediction of the inflammatory changes in lower airways. n.d.

Růžicková-Kirchnerová O, Moláčková P, Teřl M, Vaník P, Panzner P. 10 Year evaluation of patients with severe uncontrolled allergic asthma treated with Omalizumab. *Clin. Probl.*, vol. 52, European Respiratory Society; 2018, p. PA658. doi:10.1183/13993003.congress-2018.PA658.

Ruzickova-Kirchnerova O, Terl M, Votruba J. *European respiratory journal. Eur Respir J* 2014;44:P3735.

Růžicková Kirchnerová O, Teřl M. Diagnostika a léčba plicních nemocí v těhotenství. *Geum*; 2013.

Ruzickova Kirchnerova O, Terl M, Mirka H, Baxa J, Hrabe V. Complex treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in asthmatic patient including anti-IgE therapy - A case report. *Eur Respir J* 2012;40.

Růžicková Kirchnerová O, Valena T, Novosad J, Teřl M, *Dermatol Allergol A*. Real-world effectiveness and safety of omalizumab in patients with uncontrolled severe allergic asthma from the Czech Republic. *Adv Dermatology Allergol* 2018;3. doi:10.5114/ada.2018.76606.

Samitas K, Zervas E, Gaga M. T2-low asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2017. doi:10.1097/MCP.0000000000000342.

Schols AMWJ. Pulmonary cachexia. *Int J Cardiol* 2002;85:101–10. doi:10.1016/S0167-5273(02)00238-3.

Schuligoi R, Sturm E, Luschnig P, Konya V, Philipose S, Sedej M, et al. CRTH2 and D-Type Prostanoid Receptor Antagonists as Novel Therapeutic Agents for Inflammatory Diseases. *Pharmacology* 2010;85:372–82. doi:10.1159/000313836.

Schumann C, Kropf C, Wibmer T, Rüdiger S, Stoiber KM, Thielen A, et al. Omalizumab in patients with severe asthma: the XCLUSIVE study. *Clin Respir J* 2012;6:215–27. doi:10.1111/j.1752-699X.2011.00263.x.

Sedlák, V Koblížek V. *Časopis postgraduálního vzdělávání lékařů*. 2009.

Shiraishi H, Masuoka M, Ohta S, Suzuki S, Arima K, Taniguchi K, et al. Periostin Contributes to the Pathogenesis of Atopic Dermatitis by Inducing TSLP Production from Keratinocytes. *Allergol Int* 2012. doi:10.2332/allergolint.10-OA-0297.

Shoda T, Futamura K, Kobayashi F, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Cell type-dependent effects of corticosteroid on periostin production by primary human tissue cells. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2013. doi:10.1111/all.12240.

Simler NR, Brenchley PE, Horrocks AW, Greaves SM, Hasleton PSJJ, Egan JJ. Angiogenic cytokines in patients with idiopathic interstitial pneumonia. *Thorax* 2004;59:581–5. doi:10.1136/thx.2003.009860.

Simpson JL, Powell H, Boyle MJ, Scott RJ, Gibson PG. Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008. doi:10.1164/rccm.200707-1134OC.

Singanayagam A, Chalmers JD, Hill AT. Inhaled corticosteroids and risk of pneumonia: evidence for and against the proposed association. *QJM* 2010;103:379–85. doi:10.1093/qjmed/hcq023.

Siva R, Green RH, Brightling CE, Shelley M, Hargadon B, McKenna S, et al. Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD: a randomised controlled trial. *Eur Respir J* 2007;29:906–13. doi:10.1183/09031936.00146306.

Skříčková, Kolaříková - Unknown - Standardní postup při provádění BAL(2). n.d.

Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Filsell S, McLachlan C, Monti-Sheehan G, et al. Exhaled nitric oxide: A predictor of steroid response. *Am J Respir Crit Care Med* 2005. doi:10.1164/rccm.200411-1498OC.

Soltani A, Sohal SS, Reid D, Wood Baker R, Haydn Walters E, Walters EH. Airway Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), a Review. n.d.

SPANEVELLO A, CONFALONIERI M, SULOTTO F, ROMANO F, BALZANO G, MIGLIORI GB, et al. Induced Sputum Cellularity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1172–4. doi:10.1164/ajrccm.162.3.9908057.

Staton TL, Choy DF, Arron JR. Biomarkers in the clinical development of asthma therapies. *Biomark Med* 2016. doi:10.2217/bmm.15.116.

Stephenson L. Monoclonal Antibody Therapy for Asthma. *Clin Pulm Med* 2017;24:250–7. doi:10.1097/CPM.0000000000000234.

Šterclová MP. (Ne)novinky v léčbě idiopatické plicní fibrózy. *ACTA Med* 2018;7:92. doi:10.1056/NEJMoa1311107.

SUGA M, IYONAGA K, OKAMOTO T, GUSHIMA Y, MIYAKAWA H, AKAIKE T, et al. Characteristic Elevation of Matrix Metalloproteinase Activity in Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1949–56. doi:10.1164/ajrccm.162.5.9906096.

Švarc, Koblížek, Blažek - 2017 - Eozinofilie a možnosti predikce odpovědi na inhalační kortikosteroidy (IKS) u chronické obs. n.d.

Szeffler SJ, Phillips BR, Martinez FD, Chinchilli VM, Lemanske RF, Strunk RC, et al. Characterization of within-subject responses to fluticasone and montelukast in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:233–42. doi:10.1016/j.jaci.2004.11.014.

Szeffler SJ, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fahy J V., Hamilton RG, et al. Asthma outcomes: Biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 2012a. doi:10.1016/j.jaci.2011.12.979.

Szeffler SJ, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fahy J V., Hamilton RG, et al. Asthma outcomes: Biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 2012b;129:S9–23. doi:10.1016/j.jaci.2011.12.979.

Tajiri T, Matsumoto H, Gon Y, Ito R, Hashimoto S, Izuhara K, et al. Utility of serum periostin and free IgE levels in evaluating responsiveness to omalizumab in patients with severe asthma. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2016. doi:10.1111/all.12922.

Takahashi K, Meguro K, Kawashima H, Kashiwakuma D, Kagami S ichiro, Ohta S, et al. Serum periostin levels serve as a biomarker for both eosinophilic airway inflammation and fixed airflow limitation in well-controlled asthmatics. *J Asthma* 2018. doi:10.1080/02770903.2018.1455855.

Takayama G, Arima K, Kanaji T, Toda S, Tanaka H, Shoji S, et al. Periostin: A novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol* 2006. doi:10.1016/j.jaci.2006.02.046.

- Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J* 1993. doi:10.1042/bj2940271.
- Tashkin DP, Murray HE, Skeans M, Murray RP. Skin Manifestations of Inhaled Corticosteroids in COPD Patients. *Chest* 2004;126:1123–33. doi:10.1016/S0012-3692(15)31287-3.
- Teřl M. Pohled na astma prizmatem eozinofilie a alergie : návrh diagnostické klasifikace. *Alergie* 2009;11:247–55.
- Teřl M, Klinika PD. Mepolizumab v léčbě astmatu 2018;5:80–4.
- Teřl M, Rybníček O. Asthma bronchiale v příčinách a klinických obrazech. *Geum*; 2008.
- Terl M, Sedlák V, Cap P, Dvořáková R, Kašák V, Kočí T, et al. Asthma management: A new phenotype-based approach using presence of eosinophilia and allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2017. doi:10.1111/all.13165.
- Teřl MP. Mepolizumab v léčbě astmatu. *ACTA Med* 2018;7:80–4.
- Thomson NC, Bicknell S, Chaudhuri R. Bronchial thermoplasty for severe asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012. doi:10.1097/ACI.0b013e32835335ca.
- Thomson NC, Chaudhuri R. Omalizumab: Clinical use for the management of asthma. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med* 2011. doi:10.4137/CCRPM.S7793.
- Uchida M, Shiraishi H, Ohta S, Arima K, Taniguchi K, Suzuki S, et al. Periostin, a matricellular protein, plays a role in the induction of chemokines in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012. doi:10.1165/rcmb.2011-0115OC.
- Vašáková M. Idiopatická plicní fibróza-novinky. *Genetika. Pneumologická klinika 1. LF UK Thomayerova nemocnice Praha*. n.d.
- Viswanathan R, Busse W. Biologic Therapy and Asthma. *Semin Respir Crit Care Med* 2018. doi:10.1055/s-0037-1606218.
- Walsh BK, Mackey DJ, Pajewski T, Yu Y, Gaston BM, Hunt JF. Exhaled-breath condensate pH can be safely and continuously monitored in mechanically ventilated patients. *Respir Care* 2006;51:1125–31.
- Walsh JS, Gossiel F, Scott JR, Paggiosi MA, Eastell R. Effect of age and gender on serum periostin: Relationship to cortical measures, bone turnover and hormones. *Bone* 2017;99:8–13. doi:10.1016/J.BONE.2017.03.041.
- Wang Y, Kuan PJ, Xing C, Cronkhite JT, Torres F, Rosenblatt RL, et al. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet* 2009;84:52–9. doi:10.1016/j.ajhg.2008.11.010.
- Wardzyńska A, Makowska JS, Pawełczyk M, Piechota-Polańczyk A, Kurowski M, Kowalski ML. Periostin in Exhaled Breath Condensate and in Serum of Asthmatic Patients: Relationship to Upper and Lower Airway Disease. *Allergy Asthma Immunol Res* 2017. doi:10.4168/aair.2017.9.2.126.
- Wechsler ME, Laviolette M, Rubin AS, Fiterman J, Lapa e Silva JR, Shah PL, et al. Bronchial thermoplasty: Long-term safety and effectiveness in patients with severe persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:1295–302. doi:10.1016/j.jaci.2013.08.009.
- Weiszhar Z, Horvath I. Induced sputum analysis: Step by step. *Breathe* 2013;9:301–6. doi:10.1183/20734735.042912.

Wells JM, Jackson PL, Viera L, Bhatt SP, Gautney J, Handley G, et al. A Randomized, Placebo-controlled Trial of Roflumilast. Effect on Proline-Glycine-Proline and Neutrophilic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;192:934–42. doi:10.1164/rccm.201503-0543OC.

Wenzel SE. Asthma phenotypes: The evolution from clinical to molecular approaches. *Nat Med* 2012. doi:10.1038/nm.2678.

Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, Barker CS, Hwa Yang Y, Donnelly S, et al. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. 2007a.

Woodruff PG, Boushey HA, Dolganov GM, Barker CS, Yang YH, Donnelly S, et al. Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci* 2007b;104:15858–63. doi:10.1073/pnas.0707413104.

Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009. doi:10.1164/rccm.200903-0392OC.

Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther* 2014;141:125–39. doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2013.09.004.

Základy imunologie - 6., aktualizované vydání | Nové členění | Triton. n.d. <http://www.tridistri.cz/zakladyimunologie-6.aktualizovanevydani?ItemIdx=2> (accessed January 26, 2019).

Zervas E, Samitas K, Papaioannou AI, Bakakos P, Loukides S, Gaga M. An algorithmic approach for the treatment of severe uncontrolled asthma. *ERJ Open Res* 2018. doi:10.1183/23120541.00125-2017.

Zhang X-Y, Simpson JL, Powell H, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, et al. Full blood count parameters for the detection of asthma inflammatory phenotypes. *Clin Exp Allergy* 2014;44:1137–45. doi:10.1111/cea.12345.

Zhu J, Qiu Y, Valobra M, Qiu S, Majumdar S, Martin D, et al. Plasma Cells and IL-4 in Chronic Bronchitis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:1125–33. doi:10.1164/rccm.200602-161OC.

## 7. SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A SCHÉMAT

### Obrazy:

- číslo 1** Uvažovaný mechanismus účinku monoklonálních protilátek, převzato z (Krčmová, Novosad, Sedlák - 2018 - Biomarkery a biologická léčba, n.d.)
- číslo 2** Zánětlivé a imunitní buňky zapojené do patofyziologie CHOPN dle P.Barnese
- číslo 3** Sekrece periostinu v dýchacích cestách po stimulaci IL-13 a jeho role v patofyziologii astmatu a IPF, převzato z (Izuhara et al., 2016)
- číslo 4** Diferenciální rozpočet buněk stanovený pomocí cytospinu a barvení Hematocolem u IS a BALTE (DCC)
- číslo 5** Flowcytometrická analýza (FC): dotplots (FSC/SSC): IS a BALTe
- číslo 6** Vzorek nosní sliznice z pohledu patologa, patrné výrazné prostoupení eosinofily (červená), zdroj vlastní archiv Ústav Patologie FN Plzeň.
- číslo 7** Pacient P.K, 43 let, těžké astma s bronchiektáziemi, CT scany před (vpravo) a po 1 roce terapie omalizumabem (vlevo-patrná významná regrese nálezů), zdroj vlastní archiv KZM FN Plzeň.
- číslo 8** Příklad pacientky s ABPA s významným zlepšením a vyprázdněním bronchiektázií, regresí změn po zahájení terapie Omalizumabem (CT scan krajní vlevo), před zahájením terapie – 2 CT scany vpravo, zdroj vlastní archiv KZM FN Plzeň.
- číslo 9** Danek et al, J Appl Physiol 2004,97 1946-53. Bronchiální sliznice (se zaměřením na hladkou svalovinu) před a po ošetření bronchiální termoplastikou.

### Tabulky:

- číslo 1** Stupňovitá léčba astmatu dle (Milan Teřl et al., n.d.)
- číslo 2** Potencionální biomarkery u CHOPN
- číslo 3** Multifunkční kombinovaná fenotypická klasifikace podle Kašáka a Teřla 2009 (Milan Teřl et al., n.d.)
- číslo 4** Charakteristiky hlavních biomarkerů astmatu Teřl, Růžicková-Kirchnerová
- číslo 5** Fenotypická klasifikace astmatiků použita ve studii 2004-2011.
- číslo 6** Základní charakteristiky 128 vybraných pacientů v rámci práce – využití ORL nálezů v diagnostice astmatu
- číslo 7** Základní charakteristiky souboru pacientů vyhodnocující efekt přídatné léčby omalizumabem u pacientů v ČR
- číslo 8** Efekt omalizumabu na klinické příznaky astmatu, potřebu úlevové medikace a užití kortikoidů.
- číslo 9** Efekt omalizumabu na kontrolu astmatu, kvalitu života, exacerbace a potřebu zdravotní péče při terapii OMA.
- číslo 10** Vliv ošetření bronchiální termoplastikou na FEV1, bronchiální hyperreaktivitu, FENO a kontrolu astmatu, počet exacerbací během prvního roku od posledního ošetření

### Schémata:

- číslo 1** Základní mechanismy astmatického zánětu (dle Teřla, *Biologická léčba Brevíř 2017-19*)
- číslo 2** Schéma tříkrokové diagnostiky astmatu (Terl et al., 2017)
- číslo 3** Patogenetický proces IPF převzato z (Loomis-King et al., 2013)
- číslo 4** Vztahu endotypu a fenotypu. (Lötvall et al., 2011), upraveno dle (Katial et al., 2017)
- číslo 5** Dle Sally Wenzel: Vennovy diagramy rozdělení fenotypů astmatu vzniklého v dětství a v dospělosti. (Wenzel, 2012), použito v (Sedlák, V Koblížek, 2009)
- číslo 6** Role Eozinofilů v patofyziologii astmatu převzato z (McBrien and Menzies-Gow, 2017)

### Grafy:

- číslo 1** Porovnání počtu eozinofilů ve vzorcích nosní biopsie (NM) a hladinami ECP ve vzorcích indukovaného sputa IS ( $p=0,01$ ) a BALTE
- číslo 2** Počet eozinofilů ve vzorcích nosní biopsie (NM) a IS stanoveným metodou DCC a ICC
- číslo 3** Počet eozinofilů ve vzorcích nosní biopsie (NM) a BALTE ( $p=0,06$ ,  $p=0,26$  resp.) při použití DCC a ICC metod stanovení
- číslo 4** Počty neutrofilů, monocytů a eozinofilů ve vzorcích indukovaného sputa před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie stanovené metodou DCC.
- číslo 5** Počty neutrofilů, monocytů a eozinofilů ve vzorcích indukovaného sputa před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie stanovené metodou ICC.
- číslo 6** Hodnota ECP a MPO ve vzorcích indukovaného sputa před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie.
- číslo 7** Počty neutrofilů, monocytů a eozinofilů ve vzorcích BALTE před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie stanovené metodou DCC.
- číslo 8** Počty neutrofilů, monocytů a eozinofilů ve vzorcích BALTE před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie stanovené metodou ICC.
- číslo 9** Hodnota ECP a MPO ve vzorcích BALTE před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie.
- číslo 10a+b** Hodnota FENO před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie.
- číslo 11** Vyšetření vzorků IS a BALTE pomocí průtokové cytometrie FC
- číslo 12** Počet eozinofilů v nosní biopsii (NM) a hodnota FENO před a po nasazení systémové kortikoterapie.
- číslo 13** Porovnání přítomnosti eosinofilního typu zánětu (dle intenzity 1-3) v nosní biopsii a přítomnost nosních polypů dle stádií (I-III).
- číslo 14** Přítomnost nosních polypů a tíže nemoci (lehké, středně těžké a těžké astma)
- číslo 15** Přítomnost nosních polypů u jednotlivých fenotypů astmatu (I-eosinofilní+alergický, II-eosinofilní nealergický, III-neeosinofilní).
- číslo 16** Přítomnost intolerance NSAID a astma fenotypy (I-eosinofilní+alergický, II-eosinofilní nealergický, III-neeosinofilní).
- číslo 17** Soubor pacientů s eosinofilním alergickým (I.) fenotypem astmatu – sledování přítomnosti nosní polypózy u pacientů s alergií na plísň.

- číslo 18a+b** Alergie na plísňe a NSAID intolerance vs tíže astmatu
- číslo 19** GETE hodnotící dotazník léčebného efektu po 16 týdnech terapie OMA
- číslo 20** Efekt Omalizumabu na potřebu systémových kortikoidů, kontrolu astmatu a exacerbace u pacientů na dlouhodobé terapii systémovými kortikoidy
- číslo 21** Vyhodnocení potřeby zdravotní péče pomocí evaluačního dotazníku GETE
- číslo 22** Hladina celkového IgE u jednotlivých pacientů NCTA Plzeň
- číslo 23** Dávka Omalizumabu na měsíc u jednotlivých pacientů NCTA Plzeň
- číslo 24** Hodnota testu kontroly astmatu (ACT) před zahájením léčby, po 4 měsících a roce terapie OMA
- číslo 25** Hodnota FEV<sub>1</sub> (%) v průběhu terapie OMA (vstupní, po 4 měsících a 10 letech)
- číslo 26** Počet exacerbací rok před zahájením terapie OM a v průběhu 10leté terapie OM
- číslo 27** Dávka systémové kortikoterapie na začátku terapie OM, po roce a po 10 letech
- číslo 28** Změny v produkci sérového periostinu v závislosti na terapii a přítomnosti chronické rhinosinuitidy s nosními polypy.

## 8. PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA

### KNIHY

#### hlavní autor

- 1) Růžičková Kirchnerová O, Teřl M. Diagnostika a léčba plicních nemocí v těhotenství. Geum; 2013.

#### spoluautor

- 1) Pešek M. Pneumoonkologie v kazuistikách. 1.vydání. Praha: Maxdorf; 2018

### Subkapitoly:

#### Hlavní autor

Olga Růžičková-Kirchnerová, Václava Dubová, Jana Baxa, Komplikace terapie uroteliálního papilokarcinomu močového měchýře, [Pneumoonkologie v kazuistikách](#). Praha: Maxdorf, [2018]. 2018, s. 99-102. 978-80-7345-588-0.

#### Spoluautor

Blanka Syková, Olga Růžičková-Kirchnerová, Petr Mukenšnabl, Vladimír Špidlen, Precizní morfologická diagnóza či radikální chirurgické řešení? Jak rozetnout gordický uzel? / [Pneumoonkologie v kazuistikách](#). Praha: Maxdorf, [2018]. 2018, s. 25-26. 978-80-7345-588-0.

Miloš Pešek, Jiří Polívka, Tomáš Vaněček, Olga Růžičková-Kirchnerová, Petr Mukenšnabl, [NUT středočárové karcinomy mezihrudí](#), [Pneumoonkologie v kazuistikách](#). Praha: Maxdorf, [2018]. 2018, s. 44-50. 978-80-7345-588-0

Jiří Blažek, Olga Růžičková-Kirchnerová, David Havel, Martin Dvořák, Petr Mukenšnabl, Miloš Pešek. Granulomatóza (anca vaskulitida), [Pneumoonkologie v kazuistikách](#). Praha: Maxdorf, [2018]. 2018, s. 17-20. 978-80-7345-588-0.

### ČLÁNKY

### Impaktované

#### Hlavní autor

- 1) Růžičková Kirchnerová O, Valena T, Novosad J, Teřl M, Dermatol Allergol A. Real-world effectiveness and safety of omalizumab in patients with uncontrolled severe allergic asthma from the Czech Republic. Adv Dermatology Allergol 2018;3. doi:10.5114/ada.2018.76606

#### Spoluautor

- 1) Baxa, J., Vondráková, A., Matoušková, T. et al. Dual-phase dual-energy CT in patients with lung cancer: assessment of the additional value of iodine quantification in lymph node therapy response Eur Radiol (2014) 24: 1981. <https://doi.org/10.1007/s00330-014-3223-9>
- 2) Panzner P, Malkusová I, Vachová M, Liška M, Brodská P, Růžičková O, et al. Bronchial inflammation in seasonal allergic rhinitis with or without asthma in relation to natural exposure to pollen allergens. Allergol Immunopathol (Madr) 2015;43:3–9. doi:10.1016/j.aller.2013.06.009.

- 3) Novosad J, Krcmova I, Bartos V, Drahosova M, Vanik, P, Ruzickova O, Terl M, Krejsek J, Effect of omalizumab therapy and chronic rhinosinusitis presence on serum periostin levels in asthma patients, a pilot study. Clinical & Experimental Allergy, CEA-2018-0252. Přijato k publikaci 2019.
- 4) Hutyrova B, Bystron J, Chlumsky J, Kindlova D, Klosova J, Krcmova I, et al. Effect of omalizumab treatment on allergic comorbidities in patients with severe allergic asthma – real life experience from Czech Anti-IgE Registry. Allergy Immunol., vol. 50, European Respiratory Society; 2017, p. PA3541. doi:10.1183/13930003.congress-2017.PA3541.

#### Recenzované

##### Hlavní autor

- 1) O. Růžicková Kirchnerová, M. Teřl, H. Mírka, J. Baxa VH. Alergická a bronchopulmonální aspergilóza (ABPA) a možnosti její léčby - kazuistika. Stud Pneumol Phtiseol 2010:2010, roč. 70, č. 4, s. 149–154. doi:ISSN: 1213-810X.
- 2) O. Růžicková Kirchnerová. Bronchiální termoplastika v léčbě těžkého astmatu. [Postgraduální medicína](#). 2015, roč. 17, Příloha 1 (Pneumologie), s. 38-39. ISSN: 1212-4184.

##### Spoluautor

- 1) Mepolizumab v léčbě těžkého astmatu. Vratislav Sedlák, Milan Teřl, Olga Růžicková-Kirchnerová, Vladimír Koblížek, Ondřej Kudela, Martin Blažek. [Acta medicae](#). 2016, roč. 5, č. 5, s. 27-30. ISSN: 1805-398X
- 2) Milan Teřl, Olga Růžicková-Kirchnerová, Petr Vaník, Tatiana Ferková, Marie Nováková, Kamil Kleňha. Těžké astma s mykotickou senzibilizací a systémová enzymoterapie, [Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL](#). 2018, roč. 15, č. 1, s. 15-20. ISSN: 1802-0518.
- 3) Rosolová, H., Růžicková-Kirchnerová, O., Teřl, M., Sakař, R., Malkusová, I., Mukenšnábl, P. Sedlovitý nos – co může být příčinou? [Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL](#). 2012, roč. 9, č. 4, s. 3-8. ISSN: 1802-0518
- 4) Jarmil Šafránek, Olga Růžicková Kirchnerová, Atypická tuberkulóza (Mycobacterium kansasii). [Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL](#). 2017, roč. 14, č. 1, s. 14-15. ISSN: 1802-0518

#### Postery -zahraniční

##### Hlavní autor

- 1) Ruzickova-Kirchnerova O, Malkusova I, Terl M, Panzner P, Kunschrova J. Nasal mucosa biopsy in severe asthma patients as a tool for the prediction of the inflammatory changes in lower airways. n.d. <https://www.ers-education.org/events/international-congress/barcelona-2010.aspx?idParent=80718> (accessed February 9, 2019).
- 2) Ruzickova Kirchnerova O, Terl M, Mírka H, Baxa J, Hrabe V. Complex treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in asthmatic patient including anti-IgE therapy - A case report. European Respiratory Journal 2012 40: P1957; DOI:
- 3) Olga Ruzickova Kirchnerova, Milan Terl, Jiri Votruba. Bronchial thermoplasty as an option for severe asthma patients-our experiences and retrospective evaluation. European Respiratory Journal 2014 44: P3735; DOI:

- 4) RuzickovaKirchnerova, Vladan Hrabe, Ivana Malkusova, Milan Terl, Petr Panzner, Jana Kuntscherova. Rhinology findings and their clinical usefulness for closer asthma fenotyping. *European Respiratory Journal* 2011 38: p4073; DOI:
- 5) Růžicková-Kirchnerová O, Moláčková P, Teřl M, Vaník P, Panzner P. 10 Year evaluation of patients with severe uncontrolled allergic asthma treated with Omalizumab. *Clin. Probl.*, vol. 52, European Respiratory Society; 2018, p. PA658. doi:10.1183/13993003.congress-2018.PA658.

#### Spoluautor

- 1) Beata Huttyrova, Jaromir Bystron, Jan Chlumsky, Dagmar Kindlova, Jana Klosova, Irena Krcmova, Bronislava Novotna, Petr Panzner, Petr Pohunek, Olga RuzickovaKirchnerova, Vratislav Sedlak, Milan Terl, Petr Vanik, Martina Vasakova, Eva Vernerova, Jaromir Zatloukal. Effect of omalizumab treatment on allergic comorbidities in patients with severe allergic asthma – real life experience from Czech Anti-IgE Registry. *European Respiratory Journal* 2017 50: PA3541; DOI: 10.1183/1393003.congress2017.PA3541
- 2) Malkusova I., Teřl M., Růžicková O., Filarová Z., Panzner P.: Monitoring of inflammatory changes in patients with bronchial asthma before and after oral corticosteroid treatment. 18th ERS Annual Congress, SRN, Berlin, 4-8.10.2008. *Eur Respir J.*, 32, 2008, suppl.52, p. 642-643.
- 3) Malkusova I., Růžicková O., Teřl M., Hraško V., Filarová Z., Panzner P.: Invasive and non-invasive monitoring of inflammatory changes in patients with bronchial asthma before and after oral corticosteroid treatment. XXVII EAACI Congress, Spain, Barcelona, 7-11.6.2008. *Allergy*, 63, 2008, suppl. 88, p. 286.
- 4) Malkusova I., Růžicková O., Hrabě V., Teřl M., Panzner P.: Induced sputum, bronchoalveolar lavage fluid and nasal mucosa biopsy in patients with severe bronchial asthma. XXI. World allergy congress, Argentina, Buenos Aires, 6.-10.12.2009. Abstract CD (poster).
- 5) Malkusova I., Růžicková O., Teřl M., Vlas T., Panzner P.: Flowcytometric analysis compared with routine and immunocytochemistry staining of cell profile in induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid in patients with bronchial asthma, XXVIII ELACI Congress, Polsko, Varšava, 6.-10.6.2009. *Allergy*, 64, 2009, suppl. 90, p. 269.
- 6) Malkusova I., Růžicková O., Hrabě V., Teřl M., Panzner P.: Allergy to aeroallergens, induced sputum, bronchoalveolar lavage and nasal mucosa biopsy in patients with severe bronchial asthma. XXIX EAACI Congress, Velká Británie, Londýn, 5-9.6.2010. *Allergy*, 65, 2010, suppl. 92, p. 550-551. (poster).
- 7) Malkusova I., Růžicková O., Hrabě V., Panzner P., Teřl M., Kuntscherova J: Nasal mucosal biopsies compared to induced sputum and bronchoalveolar lavage in patients with severe bronchial asthma. XXX. EAACI Congress, Turecko, Istanbul, 11-15.6.2011. *Allergy*, 66, 2011, suppl.94, p.363. (poster).