

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program v biomedicíně



MUDr. Libor Fila

**Význam stanovení markerů oxidačního stresu v kondenzátu
vydechovaného vzduchu pro hodnocení progresu plicního onemocnění u
pacientů s cystickou fibrózou**

**The importance of determination of oxidative stress markers in exhaled
breath condensate for the assessment of lung disease progression in patients
with cystic fibrosis**

Disertační práce

Školitel: Prof. PaedDr. Pavel Kolář, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 28.3.2013

LIBOR FILA

.....

Identifikační záznam:

FILA, Libor. *Význam stanovení markerů oxidačního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu pro hodnocení progresu plicního onemocnění u pacientů s cystickou fibrózou. [The importance of determination of oxidative stress markers in exhaled breath condensate for the assessment of lung disease progression in patients with cystic fibrosis]*. Praha, 2013. 116 s., 2 přílohy. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Pneumologická klinika. Školitel Prof. PaedDr. Pavel Kolář, Ph.D.

Poděkování

Upřímně děkuji zejména

prof. Pavlu Kolářovi, doc. Jaromíru Musilovi a prof. Martinu Vízkovi za odborné vedení celým postgraduálním studiem,

doc. Jaroslavu Chládkovi a paní Janě Prokopové za pomoc při laboratorním vyšetření,

dr. Marku Malému za pomoc při statistickém zpracování,

dr. Alžbětě Grandcourtové za pomoc s překlady do angličtiny,

doc. Pavlu Dřevínkovi a dr. Oto Melterovi za cenné rady,

prof. Miloslavu Marelovi za vstřícný postoj k mému postgraduálnímu studiu,

pacientům s cystickou fibrózou, bez nichž by tato práce nemohla vzniknout

a mé rodině za trvalou podporu.

Chtěl bych rovněž poděkovat za finanční podporu ze strany Ministerstva zdravotnictví ČR (grant IGA NR8304) a firmě Astra za podporu formou sponzorského daru (poskytnutí potřebného počtu vzorků preparátu Pulmicort® k provedení intervenční studie).

Obsah

Prohlášení.....	2
Identifikační záznam.....	3
Poděkování.....	4
Obsah.....	5
Seznam zkratk.....	7
1. Úvod.....	9
1.1. Cystická fibróza.....	9
1.2. Oxidační stres.....	9
1.3. Kondenzát vydechovaného vzduchu.....	10
1.4. Markery oxidačního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu.....	11
1.4.1. Peroxid vodíku.....	12
1.4.2. Metabolity oxidu dusnatého.....	13
1.4.2.1. Nitrity a nitráty.....	14
1.4.2.2. Nitrotyrosin.....	15
1.4.3. Metabolity kyseliny arachidonové.....	16
1.4.3.1. 8-isoprostan.....	16
1.5. Příčiny oxidačního stresu u cystické fibrózy.....	17
1.6. Důsledky oxidačního stresu u cystické fibrózy.....	19
1.7. Možnosti ovlivnění oxidačního stresu u cystické fibrózy.....	23
2. Cíle práce a hypotézy.....	26
3. Metodika.....	28
3.1. Design studie.....	28
3.2. Výchozí studie.....	28
3.3. Dlouhodobá studie.....	28
3.4. Intervenční studie.....	29
3.5. Soubor pacientů.....	29
3.6. Odběr a vyšetření kondenzátu vydechovaného vzduchu.....	30
3.7. Vyšetření dalších klinických a laboratorních parametrů.....	31
3.8. Statistické vyhodnocení.....	32
4. Výsledky.....	33
4.1. Přehled počtu účastníků jednotlivých studií projektu.....	33
4.2. Výchozí studie.....	33

4.3. Dlouhodobá studie.....	41
4.4. Intervenční studie.....	52
5. Diskuze.....	56
6. Závěr a zhodnocení hypotéz.....	65
7. Souhrn a klíčová slova.....	67
8. Seznam citované literatury.....	71
9. Seznam publikací, které jsou součástí této práce.....	82
10. Seznam příloh.....	84

Seznam zkratk

4-HN	4-hydroxynonenal
8-IP	8-isoprostan
ARA	kyselina arachidonová
Arg	arginin
ASL	airway surface liquid
ATS	American Thoracic Society
BALF	tekutina získaná bronchoalveolární laváží
BCC	komplex <i>Burkholderia cepacia</i>
BMI	body mass index
CF	cystická fibróza
CFRD	diabetes mellitus vázaný na cystickou fibrózu
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CRP	C-reaktivní protein
ČR	Česká republika
DC	dýchací cesty
DNA	kyselina deoxyribonukleová
eCO	obsah CO ve vydechovaném vzduchu
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ENaC	epiteliální natriový kanál
eNO	obsah NO ve vydechovaném vzduchu
ERS	European Respiratory Society
FEV ₁	usilovně vydechnutý objem za první sekundu
FN	fakultní nemocnice
HO-1	hemoxygenáza 1
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
IGA	Interní grantová agentura
IKS	inhalační kortikosteroidy
IQR	mezikvartilové rozpětí
KAT	kataláza
KVV	kondenzát vydechovaného vzduchu
LF	lékařská fakulta

MDA	malondialdehyd
MPO	myeloperoxidáza
MZd	Ministerstvo zdravotnictví
NF- κ B	nukleárního faktoru κ B
NOS	NO syntetáza
n.s.	není signifikantní
OS	oxidační stres
PCR	polymerázová řetězová reakce
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
Px	peroxidáza
RNS	reaktivní metabolity dusíku
ROS	reaktivní metabolity kyslíku
SOD	superoxiddismutáza
Tyr	tyrosin
UK	Univerzita Karlova

1. Úvod

Oxidační stres se podílí na patogenezi řady chorob. Rovněž u cystické fibrózy (CF) hraje důležitou roli. Jeho ovlivnění tak má potenciál zpomalit progresi této choroby. K hodnocení stupně oxidačního stresu a jeho ovlivnění terapeutickými zásahy jsou třeba spolehlivé markery. Odběr biologického materiálu pro jejich stanovení se liší invazivitou, v případě kondenzátu vydechaného vzduchu (KVV) jde o plně neinvazivní metodu.

1.1. Cystická fibróza

CF je vrozené onemocnění vyvolané mutacemi genu pro transmembránový regulátor vodivosti (CFTR). Onemocnění vede k dysfunkci žláz se zevní sekrecí s vysokou koncentrací chloridů v potu a tvorbou abnormálně viskózního hlenu v dýchacím, trávicím a rozmnožovacím ústrojí. Výskyt CF v České republice činí asi 1:2700 až 1:4000 živě narozených. Klinicky se projevuje především chronickým sinopulmonálním onemocněním, insuficiencí zevní sekrece pankreatu, poruchami střevní pasáže a stavu výživy, syndromem ztráty solí a mužskou neplodností. Významnou komplikací je u části nemocných v dětském věku hepatopatie a v dospělosti diabetes mellitus (CFRD) a metabolická kostní nemoc.

V diagnostice je k průkazu dysfunkce CFTR proteinu využíván potní test a vyšetření mutací *CFTR* genu. Důležitým pokrokem bylo zavedení novorozeneckého screeningu (v České republice od října 2009).

V léčbě se uplatňuje především respirační fyzioterapie s inhalacemi mukolytik, agresivní antibiotická léčba a vysokokalorická strava spolu s adekvátní substitucí pankreatickými enzymy. Pro nemocné s CFRD je důležitá včasné zahájená insulinová léčba, vybrané pacienty s pokročilým plicním onemocněním zařazujeme na čekací listinu transplantace plic. Zcela zásadní je prevence kolonizace dýchacích cest patogeny typickými pro CF, především *Pseudomonas aeruginosa*. S využitím moderních léčebných metod se podařilo významně zlepšit prognózu nemocných tak, že v současnosti narozené děti s CF mají předpokládané přežití 40-50 let (Fila L., 2011).

1.2. Oxidační stres

Organizmy žijící v kyslíkové atmosféře disponují řadou mechanismů, kterými brání poškození reaktivními metabolity kyslíku (reactive oxygen species, ROS), resp. dusíku (reactive

nitrogen species, RNS). V případě převahy oxidantů nad antioxidanty, resp. při nedostatečné reparaci škod vzniklých oxidačními procesy mluvíme o oxidačním stresu. Oxidační stres vede k modifikacím proteinů, lipidů a DNA s poruchou buněčné signalizace, metabolismu a genové exprese s možností změny antigenních vlastností, apoptózy až nekrózy či podílu na nádorové transformaci buňky. Hraje tak roli při stárnutí organismu a u řady onemocnění (kancerogeneze, chronické záněty a degenerativní onemocnění, reperfuční poškození, diabetes mellitus, syndrom akutní respirační tísně a další). Podrobná znalost kaskád oxidačních reakcí včetně definování markerů vhodných k detekci oxidačního stresu je důležitá pro diagnostiku i léčebné ovlivnění uvedených stavů (Adly A.A., 2010).

1.3. Kondenzát vydechovaného vzduchu

Vyšetření vydechovaného vzduchu a KVV je neinvazivním, dobře tolerovaným a snadno opakovatelným postupem. Lze jej využít experimentálně i klinicky, a to ke studiu fyziologie a patofyziologie, v diagnostice a ke sledování efektu léčby. První „State of the art“ článek věnovaný biomarkerům ve vydechovaném vzduchu a v KVV byl publikován před již více než deseti lety (Kharitonov S.A., Barnes P.J., 2001). Klinicky využitelné a komerčně dostupné jsou v současnosti přístroje k vyšetření oxidu dusnatého a oxidu uhelnatého ve vydechovaném vzduchu a peroxidu vodíku v KVV.

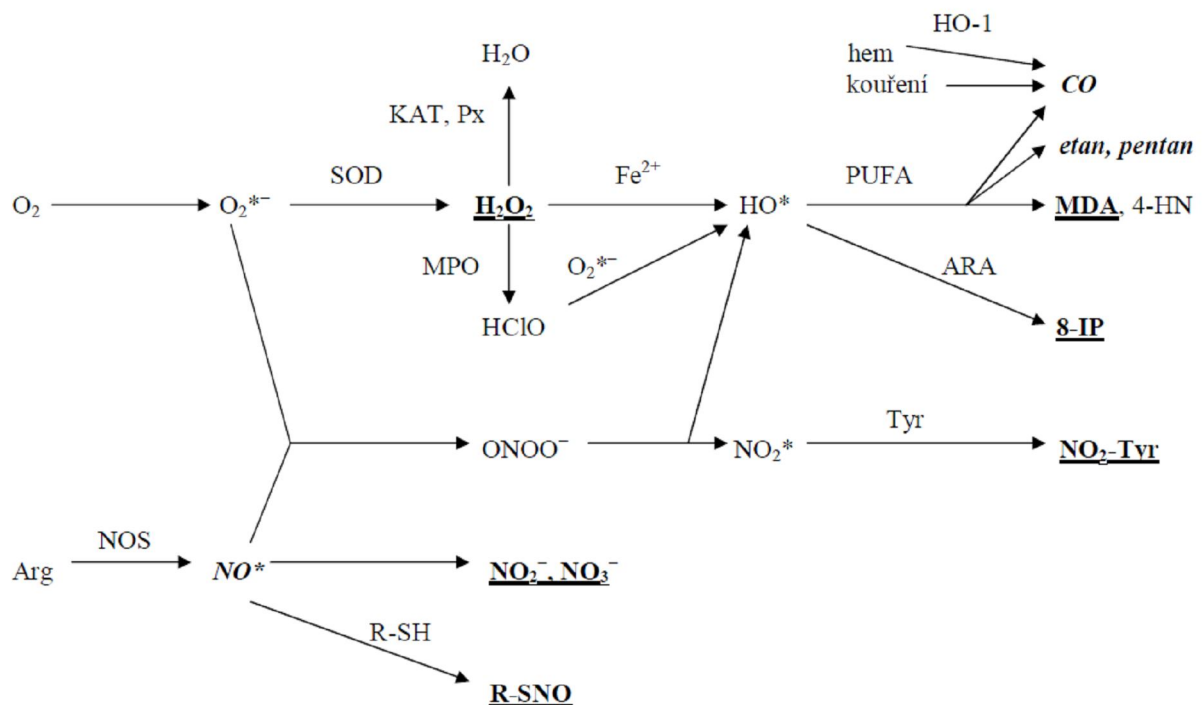
Předpokládá se, že složení KVV odráží složení periciliární tekutiny. K odběru KVV se využívají přístroje, které ochlazují vydechovaný vzduch a vzniklou kapalinu zachycují v nádobce. Takto získaný KVV lze vyšetřit ihned (např. měření pH nebo koncentrace H_2O_2) a nebo zamrazit k uskladnění a vyšetření s odstupem. Doporučení pro standardizaci odběru KVV bylo publikováno experty American Thoracic Society a European Respiratory Society v roce 2005 (Horváth I. *et al.*, 2005).

V KVV byla studována řada markerů, nejčastěji markery zánětu a oxidačního stresu. Dále např. markery tkáňového poškození a bakteriální kolonizace a rovněž nádorové markery. Vzhledem k nízkým koncentracím těchto látek v KVV je nezbytné používat vysoce citlivé metody detekce, jako je kapalinová chromatografie, ELISA, PCR, hmotnostní spektrometrie či elektrochemická detekce. Mezi nemoci nejvíce studované v souvislosti s KVV patří bronchiální astma, chronická obstrukční plicní nemoc a CF. Přehledný článek věnovaný vyšetření KVV u CF byl recentně publikován i v českém jazyce (Fila L., Musil J., 2010).

1.4. Markery oxidačního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu

Ve vydechovaném vzduchu i v KVV lze detekovat řadu markerů oxidačního stresu. Jde jednak o vlastní ROS/RNS, jednak o jimi modifikované molekuly. Vzhledem k tomu, že k oxidačnímu poškození jsou nejcitlivější lipidy, patří řada těchto látek mezi produkty lipoperoxidace. Přehled markerů oxidačního stresu vyšetřovaných u CF je uveden na obr. 1.

Obrázek 1.1. Markery oxidačního stresu vyšetřované ve vydechovaném vzduchu a v kondenzátu vydechovaného vzduchu u cystické fibrózy (volně podle Braga P.C., 2006)



Markery vyšetřované ve vydechovaném vzduchu jsou vyznačeny tučně kurzívou (*CO*, *etan*, *pentan*, NO^*) a v kondenzátu vydechovaného vzduchu tučně podtržené (H_2O_2 , MDA , $8-IP$, NO_2-Tyr , NO_2^- , NO_3^- , $R-SNO$). * jsou označeny volné radikály.

Použité zkratky (chemické látky): 4-HN...4-hydroxynonenal, 8-IP...8-isoprostan, ARA...kyselina arachidonová, Arg...arginin, CO...oxid uhelnatý, HO^* ...hydroxylový radikál, HO-1...hemoxigenáza 1, KAT...kataláza, MDA...malondialdehyd, MPO...myeloperoxidáza, NOS...NO syntetáza, NO^* ...oxid dusnatý, NO_2^* ...oxid dusičitý, NO_2-Tyr ...3-nitrotyrosin, O_2^{*-} ...superoxid, $ONOO^-$...peroxynitrit, PUFA...polynenasyčené mastné kyseliny, Px...peroxidázy, R-SH...tioly, R-SNO...nitrosotioly, SOD...superoxiddismutáza, Tyr...tyrosin.

Z ROS je v KVV detekovatelný peroxid vodíku, o kterém bude blíže pojednáno v kapitole 1.4.1. RNS a jejich metabolity lze detekovat ve vydechovaném vzduchu (oxid dusnatý) i v KVV (nitrity, nitráty, 3-nitrotyrosin a nitrosotiooly). Těm je věnována kapitola 1.4.2. Dále jde o produkty oxidačního metabolismu mastných kyselin. Z nich je ve vydechovaném vzduchu detekovatelný oxid uhelnatý, etan a pentan; v KVV pak 8-isoprostan (blíže v kapitole 1.4.3) a malondialdehyd.

Malondialdehyd (MDA) poškozují především bílkoviny a nukleové kyseliny. U CF bylo vyšetření MDA v KVV dosud věnováno ve srovnání s dalšími chronickými plicními chorobami málo pozornosti. Např. v malé studii dospělých nemocných CF byly zjištěny vyšší koncentrace MDA v KVV u žen oproti mužům (25,9 vs. 3,7 nmol/l; $p < 0,05$) (Fila L. *et al.*, 2005).

Etan a pentan byla ve vydechovaném vzduchu u CF studovány spolu s dalšími těkavými organickými látkami. Obsah etanu i pentanu ve vydechovaném vzduchu byl u CF vyšší oproti kontrolám, u etanu nesignifikantně (0,39 vs. 0,10 ppb), u pentanu pak rozdíl dosáhl statistické významnosti (0,36 vs. 0,21 ppb; $p < 0,05$). Obsah pentanu ve vydechovaném vzduchu byl u nemocných CF navíc vyšší v případě plicní exacerbace, horšího stavu plicních funkcí a stavu výživy a rovněž u kolonizace dýchacích cest *P. aeruginosa* (Barker M. *et al.*, 2006).

Obsah CO ve vydechovaném vzduchu (eCO) závisí na řadě faktorů. Kromě lipoperoxidace je důležitým zdrojem metabolismus hemu, především enzymem hemoxigenázou (HO). HO-1 je inducibilní izoformou tohoto enzymu, jejíž aktivita se zvyšuje rovněž vlivem oxidačního stresu. Na eCO se podílí i exogenní zdroje, především kouření cigaret (Dolinay T. *et al.*, 2010). U CF byly zjištěny vyšší hodnoty eCO oproti kontrolám (2,7 vs. 2,0 ppm; $p < 0,001$), další zvýšení bylo pozorováno v případě plicní exacerbace (Antuni J.D. *et al.*, 2000).

1.4.1. Peroxid vodíku

Peroxid vodíku (H_2O_2) patří mezi neradikálové ROS. V organismu vzniká dismutací superoxidu (spontánní nebo katalyzovaná superoxiddismutázou) a činností některých enzymů (xantinoxidáza, monoaminoxidáza). H_2O_2 je málo reaktivní a je metabolizován glutationperoxidázou nebo katalázou na vodu. Nebezpečná je však jeho reakce s redukovanými přechodnými kovy (Fe^{2+} , Cu^+) za vzniku vysoce reaktivního a toxického hydroxylového radikálu (Fentonova reakce), který oxidačně poškozují biomolekuly

v blízkosti svého vzniku. Dále je H_2O_2 metabolizován ve fagocytech na vysoce reaktivní kyselinu chlornou enzymem myeloperoxidázou (Pláteník J., 2005).

Obecně je H_2O_2 považován na vhodný marker oxidačního stresu v dýchacím ústrojí, např. u syndromu akutní respirační tísně (acute respiratory distress syndrome, ARDS) (Kietzmann D. *et al.*, 1993). Pro tyto nemocné je v současnosti dostupné on-line monitorování koncentrace H_2O_2 v KVV pomocí přístroje ECoCheck[®] (Gerritsen W.B. *et al.*, 2005).

Rovněž u CF byla problematika H_2O_2 v KVV studována. U nemocných s plicní exacerbací byl prokázán pokles koncentrace H_2O_2 v KVV po antibiotické léčbě (0,12 vs. 0,28 $\mu\text{mol/l}$; $p = 0,002$) (Jöbssis Q. *et al.*, 2000). Ve stabilní fázi plicního onemocnění však rozdíly oproti kontrolám zjištěné nebyly (0,97 vs. 1,11 $\mu\text{mol/l}$; $p = 0,427$) (Worlitzsch D., 1998). Jako možné vysvětlení je uváděn dostatek redukováných tiolů a glutationperoxidázy v respiračních sekretech nemocných CF (Dauletbaev N., 2005). Koncentrace H_2O_2 v KVV rovněž nebyla vhodným prediktivním markerem jak tíže plicního onemocnění, tak plicních exacerbací u CF (Robroeks C.M. *et al.*, 2008). Na základě těchto dat není koncentrace H_2O_2 v KVV považována za vhodný marker zánětlivého poškození dýchacích cest u CF (Loukides S. *et al.*, 2010).

1.4.2. Metabolity oxidu dusnatého

Oxid dusnatý (NO) má v dýchacím ústrojí řadu úloh. Jde především o ovlivnění tonu hladkých svalů cév a průdušek, regulaci frekvence kmitů cílií řasinkových buněk a o antimikrobiální působení. Jeho produkci zajišťují především NO syntetázy (NOS) z argininu, menší část je tvořena z nitritů (enzymaticky i neenzymaticky, např. v kyselém prostředí) (Barnes P.J. *et al.*, 2010, Weitzberg E. *et al.*, 2010).

Obsah NO ve vydechaném vzduchu (eNO) u nemocných CF byl opakovaně studován. Ve srovnání s kontrolami byly zjišťovány obvykle nižší hodnoty eNO (de Winter-de Groot K.M., van der Ent C.K., 2005) Novější práce svědčí však pro skutečnost, že se liší nálezy u dětí s minimálním bronchopulmonálním poškozením od dospělých s pokročilým plicním onemocněním. U dětí s CF je alveolární koncentrace NO oproti kontrolám vyšší (2,2 vs. 1,5 ppb; $p = 0,029$), zatímco bronchiální složka produkce NO se od kontrol signifikantně neliší (0,45 vs. 0,51 nl/s), stejně jako hodnota eNO (9,4 vs. 10,4 ppb) (Suri R. *et al.*, 2007). U dospělých s CF je alveolární koncentrace obdobná jako u kontrol (1,7 vs. 1,2 ppb), kdežto bronchiální složka produkce NO je ve srovnání s kontrolami snižena (0,31 vs. 0,70 nl/s; $p < 0,001$) (Hofer M. *et al.*, 2009). Hodnoty eNO u nemocných CF jsou tedy zpočátku obdobné

jako u zdravých osob a teprve s progresí plicního onemocnění klesají (Franklin P.J. *et al.*, 2006). Příčin snížení eNO s progredujícím plicním postižením je celá řada. S narůstající úrovní neutrofilního zánětu klesá exprese NOS v alveolárních makrofázích a v respiračních epitelích (Wooldridge J.L. *et al.*, 2004), dále klesá dostupnost argininu pro NOS vlivem stoupající aktivity arginázy v respiračních sekretech (Grasemann H. *et al.*, 2005) a stupňuje se oxidační metabolismus NO vlivem jeho retence v respiračních sekretech (Grasemann H. *et al.*, 2004, Jones K.L. *et al.*, 1998).

Oxidativním metabolismem NO vznikají nitrity a nitráty detekovatelné v KVV (viz kapitola 1.4.2.1.), reakcí NO se superoxidem pak vysoce reaktivní peroxyinitrit. Peroxyinitrit vede k oxidačním (cestou hydroxylového radikálu) a nitračním (pravděpodobně cestou nitroniového kationu, NO_2^+) reakcím, jejichž markerem je stabilní 3-nitrotyrosin (viz kapitola 1.4.2.2.) (Štípek S., 2000a).

NO se rovněž reverzibilně váže na tiolové skupiny aminokyselin za vzniku nitrosotiolů (R-SNO), které mají význam v regulaci funkce proteinů a lze je rovněž považovat za zásobní formu NO v organismu (Gaston B. *et al.*, 2006). U nemocných CF byly studovány koncentrace R-SNO v tekutině získané bronchoalveolární laváží (BAL) a v KVV. Výsledky jsou však rozporné. Zatímco v BAL byly oproti kontrolám zjištěné nižší koncentrace (0 vs 80 nmol/l) (Grasemann H. *et al.*, 1999), v KVV byly koncentrace u nemocných CF zvýšené (0,35 vs 0,11 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,01$) (Corradi M. *et al.*, 2001). Nicméně, v souladu s názorem že u CF jde o deficit NO, je zvažováno terapeutické využití donorů NO u CF, např. N-nitrosoglutationu (Zaman K. *et al.*, 2006).

1.4.2.1. Nitrity a nitráty

Nitrity a nitráty jsou oxidačními metabolity NO. Jejich koncentrace, stejně jako součet jejich koncentrací (NO_x^-) v KVV byly u nemocných s CF opakovaně studovány. Koncentrace nitritů v KVV u CF byly ve srovnání s kontrolami zvýšené (1,93 vs. 0,33 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,05$, resp. 2,02 vs. 0,41 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,05$) (Formanek W. *et al.*, 2002, Ho L.P. *et al.*, 1998) nebo obdobné (3,9 vs. 3,2 $\mu\text{mol/l}$) (Balint B. *et al.*, 2001). Taktéž v případě NO_x^- byly u CF zjištěny hodnoty vyšší (29,9 vs. 11,4 $\mu\text{mol/l}$; $p = 0,002$) (Ojoo J.C. *et al.*, 2005) či shodné (25,4 vs. 21,9 $\mu\text{mol/l}$) (Balint B. *et al.*, 2001). Odlišná však byla situace u nitrátů, jejichž koncentrace v KVV byly u nemocných CF oproti kontrolám sniženy (4,2 vs. 16,0 $\mu\text{mol/l}$) (Griese M. *et al.*, 2003) nebo obdobné (7,8 vs. 8,2 $\mu\text{mol/l}$) (Zetterquist W. *et al.*, 2009).

Na koncentrace nitritů a nitrátů v KVV má kromě již uvedené retence v respiračních sekretech vliv řada faktorů, především bakteriální metabolismus v dutině ústní a alimentární zdroje. Retence NO a jeho metabolitů v respiračních sekretech favorizuje spíše produkci nitritů na úkor nitrátů v přítomnosti bakteriální kolonizace (např. nitrátoreduktázy *P. aeruginosa*) (Palmer K.L. *et al.*, 2007). Je rovněž prokázáno, že po antibiotické léčbě plicní exacerbace koncentrace nitrátů ve sputu nemocných CF stoupá (259 vs. 184 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,02$) (Grasemann H. *et al.*, 1998).

K obdobné situaci dochází i v dutině ústní vlivem fyziologicky přítomné bakteriální flóry, kdy nitráty secernované do slin jsou redukovány na nitrity (a po spolykání dále redukovány na NO v kyselém žaludečním prostředí). Studie ukazují, že příspěvek nitritů z dutiny ústní do KVV je významný a po dezinfekci dutiny ústní koncentrace nitritů v KVV signifikantně klesá. Naproti tomu koncentrace nitrátů v KVV není dezinfekcí dutiny ústní ovlivněna (Zetterquist W. *et al.*, 2009).

Diskutován je i podíl alimentárního přívodu nitrátů, především v zelenině. Je známo, že po příjmu nitrátů v potravě stoupá eNO (Olin A.C. *et al.*, 2001) a rovněž koncentrace nitrátů v KVV u zdravých osob (Martens H. *et al.*, 2005). U CF však uvedené závislosti studovány nebyly. Navíc je tato problematika u nemocných CF modifikována nezbytnou vysokokalorickou stravou (tedy především potravinami živočišného původu bohatými na tuky), která je na zeleninu chudá.

1.4.2.2. Nitrotyrosin

3-nitrotyrosin ($\text{NO}_2\text{-Tyr}$) vzniká nitrací tyrosinových zbytků v proteinech vlivem peroxynitritu a je považován za užitečný marker oxidačního, resp. nitračního stresu. Ve studiích byla koncentrace $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ v KVV u dospělých s CF oproti kontrolám signifikantně zvýšená (25,3 vs. 6,3 $\mu\text{g/l}$; $p < 0,0001$) (Balint B. *et al.*, 2001), kdežto u dětí CF zvýšení nedosáhlo statistické významnosti (1,97 vs. 1,46 nmol/l) (Celio S. *et al.*, 2006).

U nemocných CF byla rovněž zjištěna zvýšená koncentrace $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ ve sputu (26,2 mg/ml) oproti kontrolám (nedetekovatelný, resp. $< 0,5 \text{ mg/ml}$) (Jones K.L. *et al.*, 2000). Zvýšený obsah $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ byl prokázán i v plicní tkáni nemocných CF (Morrissey B.M. *et al.*, 2002).

1.4.3. Metabolity kyseliny arachidonové

Metabolity kyseliny arachidonové (ARA) neboli eikosanoidy hrají významnou roli v regulačních procesech živých organismů, především v regulaci zánětu (tonus hladkých svalů, propustnost cévní stěny, srážení krve, signalizace bolesti a další). Mezi klasické eikosanoidy řadíme prostanoidy (prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany) a leukotrieny. Dále existuje řada tzv. nových eikosanoidů, mezi něž patří např. isoprostany, lipoxiny, resolvin, endogenní kanabinoidy a další látky (Funk C.D., 2001).

F₂-isoprostany vznikají neenzymatickou oxidací ARA. Jde o stabilní látky detekovatelné v různých biologických materiálech (sérum, moč, bioptické vzorky) včetně KVV. Běžně je stanovován 8-iso-prostaglandin F_{2α}, označovaný rovněž jako 8-isoprostan (8-IP). Jeho zvýšené koncentrace lze jako marker oxidačního stresu (resp. peroxidace lipidů) detektovat např. v moči zdravých osob vystavených cigaretovému kouři (Yan W. *et al.*, 2007).

1.4.3.1. 8-isoprostan

Koncentrace 8-isoprostanu u nemocných s CF byly studovány v krevní plazmě a v KVV, nikoli však ve sputu. V krevní plazmě byly ve srovnání s kontrolami zjištěny zvýšené hodnoty 8-isoprostanu (319,6 vs. 145,0 ng/l; p = 0,005) (Collins C.E. *et al.*, 1999). Montuschi *et al.* prokázali zvýšené koncentrace 8-isoprostanu v KVV u nemocných CF oproti kontrolám (42,7 vs. 15,2 ng/l; p <0,005). Koncentrace 8-isoprostanu v KVV navíc korelovaly s hodnotami eCO (r = 0,66; p <0,002) (Montuschi P. *et al.*, 2000). Lucidiová *et al.* rovněž prokázali u pacientů s CF zvýšené koncentrace 8-isoprostanu v KVV ve stabilní fázi plicního onemocnění oproti kontrolám (30,5 vs. 15,5 ng/l; p <0,001). V období plicní exacerbace tyto koncentrace dále stoupaly (47,5 vs. 30,5 ng/l; p <0,001) (Lucidi V. *et al.*, 2008).

Uvedená data opravňují k názoru, že 8-isoprostan je vhodným markerem oxidačního stresu u CF, ale podobně jako u dalších onemocnění dýchacího ústrojí jde především o experimentální metodu. Klinickému využití zatím brání standardizace vyšetřovacích postupů (Montuschi P., 2010) Přehled markerů oxidačního stresu u CF je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1.1. Přehled studovaných markerů oxidačního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu u cystické fibrózy

Marker	Stabilní fáze	Plicní exacerbace	Korelace s FEV ₁	Léčba IKS	Citace
H ₂ O ₂	=	↑	ne		Ho L.P. <i>et al.</i> , 1998 Jöbbsis Q. <i>et al.</i> , 2000, Worlitzsch D. <i>et al.</i> , 1998
nitrity	=/↑		ne	↑	Balint B. <i>et al.</i> , 2001, Ho L.P. <i>et al.</i> , 1998, Horak F. Jr. <i>et al.</i> , 2007
nitráty	=/↓		pozit.		Fila L. <i>et al.</i> 2006 Griese M. <i>et al.</i> , 2003, Zetterquist W. <i>et al.</i> , 2009
3-nitrotyrosin	=/↑		pozit.	=	Balint B. <i>et al.</i> , 2001, Celio S. <i>et al.</i> , 2006
8-isoprostan	↑	↑↑↑	negat.		Lucidi V. <i>et al.</i> , 2008, Montuschi P. <i>et al.</i> , 2000

=...obdobné hodnoty; ↑...zvýšení; ↓...snížení; zkratky viz Seznam zkratek

1.5. Příčiny oxidačního stresu u cystické fibrózy

Důvodů, proč u CF dochází k oxidačnímu stresu, je celá řada. Rozdělit je lze zhruba do tří skupin: problematika základního genetického defektu, problematika nutriční a energetického metabolismu a konečně problematika neutrofilního zánětu.

Kromě bronchopulmonálního onemocnění se u CF setkáváme s gastrointestinální manifestací této choroby, kde u 85 % nemocných zjišťujeme insuficienci exokrinního pankreatu s různě těžkou malabsorpcí a malnutricí. Malabsorpce se týká především tuků a vitaminů rozpustných v tucích. Mezi nimi, vitamin E a β-karoten jsou důležité antioxidanty. K malabsorpci dalšího důležitého antioxidantu, vitamínu C sice nedochází, ale v důsledku složení stravy (vysokokalorická strava: živočišné tuky, nedostatek zeleniny) může docházet k jeho relativnímu nedostatku. Z hlediska energetického metabolismu je u CF zjišťován vyšší kalorický výdej (120-150 % normy), který musí být kompenzován uvedenou

vysokokalorickou stravou. Vyšší energetický výdej má vztah jednak k chronickému bronchopulmonálnímu zánětu (korelace s koncentrací tumor nekrotizujícího faktora α v plazmě), jednak k větší dechové práci při ventilační poruše, a je provázen větší mitochondriální produkcí ATP, se kterou souvisí i vyšší produkce ROS v dýchacím řetězci (Nohl H., Hegner D., 1978, Sinaasappel M. *et al.*, 2002).

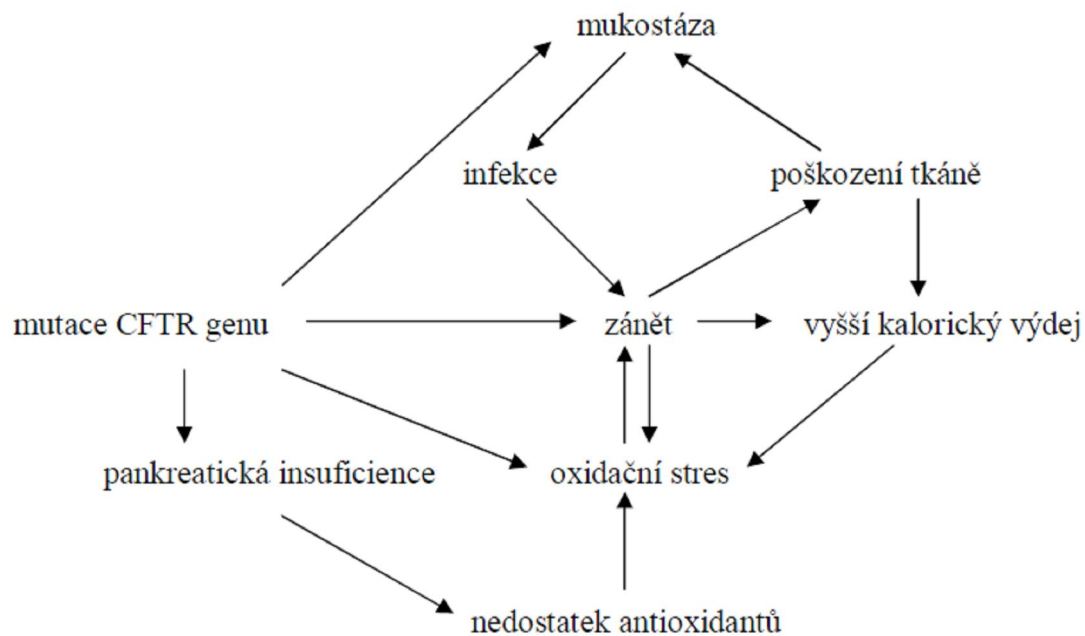
Tento aspekt má souvislost i s další uváděnou problematikou, a tou je základní genetický defekt, tedy mutace CFTR genu. Dysfunkce CFTR proteinu je spojena s hyperfunkcí epiteliálního natriového kanálu (ENaC) a hyperabsorpce Na^+ z tekutiny na povrchu dýchacích cest (airway surface liquid; ASL) do buněk respiračního epitelu. Tyto buňky se dále zbavují Na^+ pomocí $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPázy}$, což je rovněž proces závislý na produkci ATP (se současnou produkcí ROS) v mitochondriích. Uvedená hyperabsorpce Na^+ má za následek redukcí množství ASL a tedy dehydrataci povrchu dýchacích cest s nakoncentrováním ROS/RNS při současném nedostatku redukovaného glutationu (glutathion je substrátem CFTR proteinu) (Hybiske K. *et al.*, 2007, Machen T.E., 2006, Rottner M. *et al.*, 2009).

Dalším důsledkem hyperabsorpce Na^+ z ASL je zahuštění hlenu a dysfunkce řasinek respiračních epitelů, z čehož rezultuje mukostáza se zvýšeným rizikem infekce. Infekce u CF je vyvolána relativně úzkým spektrem patogenů, mezi nimiž dominuje *P. aeruginosa*. Odpovědí na infekci je neutrofilní zánět s dalším zvýšením produkce ROS/RNS. Produkce ROS se zpětně podílí na augmentaci zánětu cestou nukleárního faktoru κB (NF- κB). Produkce NF- κB je u CF pravděpodobně navíc stimulována vyšší intracelulární koncentrací Ca^{2+} vlivem alterovaného membránového potenciálu při dysfunkci CFTR a vlivem stresu endoplazmatického retikula z retence alterovaného CFTR proteinu. Tyto faktory tedy augmentují zánětlivou odpověď na infekci dýchacích cest a sekundárně i oxidační stres navozený neutrofilním zánětem. Bludný kruh se navíc uzavírá další akcentací mukostázy z důvodu přítomnosti filamentózních makromolekul (DNA, aktin) z rozpadlých bakterií, neutrofilů a epitelů (Elizur A., 2008, Jacquod J. *et al.*, 2008, Rottner M. *et al.*, 2009).

Dosud stále diskutovanou a nedořešenou otázkou u CF je i přítomnost zánětu bez prokazatelné infekce dýchacích cest, např. již u CF fětů (Verhaeghe C. *et al.*, 2007). Zde by byl oxidační stres vzhledem k výše uvedeným aspektům důležitým faktorem, ikdyž diskutované jsou i jiné možnosti, např. porucha metabolismu lipidů (PUFA, ceramid), které jsou u CF rovněž prokazovány (Guilbault C. *et al.*, 2009).

Schéma příčin oxidačního stresu s ohledem na patogenezu plicního onemocnění u CF je uvedeno na obr. 2.

Obrázek 1.2. Schéma příčin oxidačního stresu s ohledem na patogenezi plicního onemocnění u cystické fibrózy (volně podle Boucher R.C., 2007, Rottner M. *et al.*, 2009, Sinaasappel M. *et al.*, 2002)



Zkratky viz Seznam zkratk; podrobnosti viz text

1.6. Důsledky oxidačního stresu u cystické fibrózy

Oxidační stres je lze u CF prokazovat jednak v materiálech z dýchacího ústrojí, jednak systémově (krev, moč). U nemocných CF bylo zjištěno vyšší oxidační poškození DNA, když koncentrace 8-hydroxydeoxyguanosinu v moči byly vyšší než u kontrol (2,78 vs. 1,51 nmol/mmol kreatininu; $p < 0,05$); tato koncentrace korelovala s koncentrací α -tokoferolu v plazmě ($r = 0,947$; $p = 0,0001$) (Brown R.K. *et al.*, 1995). Ve studii Browna *et al.* byly u nemocných CF v plazmě zjištěny zvýšené koncentrace lipoperoxidů, MDA a proteinových karbonylů; koncentrace α -tokoferolu, kyseliny askorbové, kyseliny močové a redukovaných tiolů byly v pásmu normálních hodnot. Hodnoty FEV₁ korelovaly s koncentracemi MDA ($r = -0,43$; $p < 0,05$), α -tokoferolu ($r = 0,63$; $p < 0,001$) a redukovaných tiolů ($r = 0,52$; $p < 0,005$) (Brown R.K. *et al.*, 1996). Collins *et al.* prokázali zvýšené koncentrace 8-IP v plazmě nemocných CF (319,6 vs. 145,0 ng/m; $p = 0,005$); v této studii měli nemocní s CF nižší

koncentrace antioxidantů (vitamin E a β -karoten) v plazmě (Colins C.E. *et al.*, 1999). Zvýšené koncentrace 8-IP v plazmě nemocných CF prokázali rovněž Woodová *et al.* Koncentrace 8-IP korelovaly s počtem neutrofilů ($r = 0,308$; $p = 0,047$) a monocytů ($r = 0,367$; $p = 0,017$) v krvi a rovněž s koncentracemi vitamínu C ($r = -0,434$; $p = 0,005$), vitamínu E ($r = -0,37$; $p = 0,016$) a β -karotenu ($r = -0,421$; $p = 0,006$) v plazmě. Koncentrace antioxidantů v plazmě byly u nemocných CF nižší než u kontrol: vitamin C 41,9 vs. 65,5 $\mu\text{mol/l}$ ($p = 0,004$), vitamin E 10,4 vs. 16,7 $\mu\text{mol/l}$ ($p < 0,001$) a β -karoten 0,1 vs. 0,3 $\mu\text{mol/l}$ ($p = 0,001$) (Wood L.G. *et al.*, 2001). Na základně těchto dat je patrná přítomnost systémových projevů oxidačního stresu u CF, včetně jeho vztahu k deficitu antioxidantů, k systémovým projevům zánětu a k plicním funkcím.

V dýchacím ústrojí je možné dokumentovat oxidační stres v různých materiálech, jejichž odběr se liší invazivitou. Odběr vydechovaných vzduchu nebo KVV je zcela neinvazivní, odběr indukovaného sputa a bronchoalveolární laváž patří mezi seminvasivní metody a biopsie plic je již postupem invazivním.

Ve vydechovaném vzduchu byla zjištěna korelace eCO se změnou FEV₁ během jednoho roku ($r = -0,46$; $p < 0,01$), kdy vyšší hodnoty eCO korelovaly s více negativní změnou (tedy poklesem) FEV₁; hodnota eCO tedy měla prognostický význam (Antuni J.D. *et al.*, 2000).

V KVV byly prokázány korelace s plicními funkcemi u nitrátů, NO₂-Tyr a 8-IP. Naproti tomu koncentrace nitrátů a H₂O₂ v KVV s plicními funkcemi nekorelovaly (Ho L.P. *et al.*, 1999, Horak F. Jr. *et al.*, 2007).

Fila *et al.* prokázali korelaci koncentrace nitrátů v KVV s hodnotou FEV₁ ($r = 0,33$; $p = 0,025$), s hodnotou rentgenového Northern skóre ($r = -0,36$; $p = 0,015$) a rovněž s koncentrací sérového C-reaktivního proteinu ($r = -0,40$; $p = 0,05$) a albuminu ($r = 0,35$; $p = 0,16$). Pokročilejší plicní postižení (nižší hodnota FEV₁, vyšší hodnota Northern skóre) je provázeno nižší hodnotou nitrátů, což odráží především nižší produkci NO. Za pozornost stojí i korelace koncentrace nitrátů v KVV se systémovými parametry, a to zánětu (C-reaktivní protein) a stavu výživy (albumin). Nejde však o překvapivé nálezy, neboť pokročilejší plicní onemocnění je provázeno horším stavem výživy (pozitivní korelace s albuminem) a výraznější systémovou zánětlivou odezvou (negativní korelace s C-reaktivním proteinem) (Fila L. *et al.*, 2006).

Balint *et al.* studovali obdobnou problematiku v případě koncentrace NO₂-Tyr v KVV. Opět byla prokázána korelace s hodnotou FEV₁ ($r = 0,70$; $p < 0,0001$); pozitivní korelace i zde odráží především sníženou produkci NO. Nebyly prokázány korelace s koncentrací nitritů

v KVV ani počtem leukocytů v periferní krvi a na koncentraci NO₂-Tyr v KVV neměla vliv léčba kortikosteroidy ani kolonizace *P. aeruginosa* (Balint B. *et al.*, 2001).

Odlíšná situace byla zjištěna v případě korelací plicních funkcí a koncentrace 8-IP v KVV. Jak studie Montuschiho *et al.* (Montuschi P. *et al.*, 2000), tak Lucidiové *et al.* (Lucidi V. *et al.*, 2008) prokázaly negativní korelace s hodnotami FEV₁ ($r = -0,61$; $p < 0,005$, resp. $r = -0,67$; $p < 0,0001$). Zde je tedy prokázán vztah vyšší míry oxidačního stresu a pokročilejšího bronchopulmonálního onemocnění. Koncentrace 8-IP v KVV navíc korelovaly s hodnotami eCO ($r = 0,66$; $p < 0,002$) (Montuschi P. *et al.*, 2000) a rovněž Shwachmanova klinického skóre ($r = -0,43$; $p = 0,012$) a Crispin-Normanova rentgenového skóre ($r = 0,51$; $p < 0,002$) (Lucidi V. *et al.*, 2008). V případě uvedeného klinického a rentgenového skóre měli opět vyšší koncentrace 8-IP v KVV vztah k těžším stavům podobně jako u plicních funkcí.

Ve sputu nemocných s CF byly studovány nitrity, nitráty, NO₂-Tyr, 8-IP a další markery. Koncentrace nitritů a nitrátů ve sputu nemocných CF studovali Grasmann *et al.* Součet jejich koncentrací, NO_x⁻ byl u CF vyšší oproti hodnotám v tracheálním aspirátu u kontrolní skupiny (346 vs. 144 μmol/l; $p < 0,01$) a pozitivně koreloval s hodnotou FEV₁ ($r = 0,58$; $p < 0,02$) (Grasmann H. *et al.*, 1998). Dále studovali koncentrace nitritů, nitrátů a NO₂-Tyr ve sputu nemocných CF Jonesová *et al.* V koncentraci nitritů rozdíly oproti kontrolám zjištěny nebyly, koncentrace nitrátů byly signifikantně vyšší ($p = 0,011$). NO₂-Tyr byl detekovatelný pouze ve sputu nemocných CF a jeho koncentrace korelovala s obsahem myeloperoxidázy (MPO) ($r = 0,87$; $p < 0,05$). Obsah MPO byl ve sputu nemocných CF signifikantně vyšší oproti kontrolám (64,2 vs. 0,73 U/ml; $p < 0,001$) (Jones K.L. *et al.*, 2000). Oxidační stres ve vztahu k neutrofilnímu zánětu dále studovali van der Vliet *et al.* I zde byl prokázán vyšší obsah MPO a příbuzných peroxidáz ve sputu nemocných CF oproti kontrolám (9,9 vs. 0,24 U/mg; $p < 0,005$). Kromě NO₂-Tyr byl sledován rovněž 3,3-dityrosin (marker oxidace) a 3-chlorotyrosin (marker chlorace prostřednictvím kyseliny chlorné, tedy produktu MPO). Všechny tyto markery byly oproti kontrolám u CF zvýšené, v případě NO₂-Tyr to bylo 175 vs. 19,9 pmol/ml, $p < 0,05$. Studována byla i cytotoxicita H₂O₂ na tracheobronchiální epitelální buňky. Tato byla výrazně potencionována v přítomnosti MPO a následně redukována přidáním inhibitoru MPO (van der Vliet A. *et al.*, 2000). Konečně studiem 8-IP ve sputu nemocných CF se zabývali Reid *et al.* Byly zjištěny vyšší koncentrace 8-IP ve sputu nemocných CF v období plicní exacerbace oproti kontrolám i oproti stabilní fázi nemoci ($p < 0,001$). U nemocných CF rovněž negativně korelovala koncentrace 8-IP ve sputu s hodnotou FEV₁ ($r = -0,58$; $p < 0,001$) (Reid D.W. *et al.*, 2007).

Další práce hodnotily parametry oxidačního stresu v tekutině získané bronchoalveolární laváží (BALF) u CF. Studovány byly nitrity, lipoperoxidy, proteinové karbonyly a další markery. Nitrity v BALF hodnotili Cetin *et al.*, u nemocných CF byly zjištěny vyšší koncentrace oproti kontrolám (207,2 vs. 37,5 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,05$) a jejich korelace s koncentrací interleukinu 8 ($r = 0,53$; $p = 0,015$) (Cetin I. *et al.*, 2004). Hull *et al.* prokázali vyšší koncentrace lipoperoxidů v BALF u nemocných CF se známkami plicního zánětu (podskupina se zvýšeným zastoupením neutrofilů a zvýšenou koncentrací interleukinu 8 v BALF) oproti kontrolám (97,7 vs. 18,5 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,05$) (Hull J. *et al.*, 1997). Kettle *et al.* zjistili v BALF u nemocných CF vyšší zastoupení neutrofilů (22,2 vs. 5,6 %; $p = 0,02$), obsah MPO (3,6 vs 0,3 $\mu\text{g/g}$ proteinu; $p = 0,002$), 3-chlorotyrosinu (222,5 vs. 49,0 $\mu\text{mol/mol}$ tyrozinu; $p = 0,003$) a proteinových karbonylů (0,98 vs. 0,40 $\mu\text{mol/g}$ proteinu; $p < 0,0012$) oproti kontrolám. Koncentrace 3-chlorotyrosinu korelovala s obsahem MPO a zastoupením neutrofilů, u proteinových karbonylů tyto vztahy prokázány nebyly (Kettle A.J. *et al.*, 2004). Starosta *et al.* prokázali v BALF nemocných CF vyšší koncentrace proteinových karbonylů oproti kontrolám, a to jak v podskupině nemocných s normální hodnotou (> 80 % nál. hod.) FEV_1 (612 vs. 0 nmol/l ; $p < 0,01$), tak v případě snížených plicních funkcí (3.033 vs. 0 nmol/l $p < 0,001$); signifikantní rozdíl byl i mezi oběma podskupinami nemocných CF ($p < 0,01$). Koncentrace proteinových karbonylů korelovala pozitivně se zastoupením neutrofilů v BALF ($r = 0,6$; $p < 0,0001$) a negativně s hodnotou FEV_1 ($r = -0,62$; $p < 0,0001$) (Starosta V. *et al.*, 2006).

Údaje o oxidačním stresu v bioptickém vzorku plicní tkáně nemocných CF (materiál získán od nemocných CF podstupujících transplantaci plic; kontrolní soubor tvořili bývalí kuřáci s plicní resekci pro bronchogenní karcinom) jsou dostupné z práce Morriseyho *et al.* Procento plochy pozitivní pro imunohistochemický průkaz $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ bylo signifikantně vyšší u nemocných CF oproti kontrolám (21,8 vs. 7,9 %; $p < 0,04$) (Morrisey B.M. *et al.*, 2002).

Existují rovněž doklady pro vliv oxidačního stresu na bakteriální flóru v dýchacích cestách u nemocných CF. Ciofu *et al.* prokázali přítomnost hypermutabilních izolátů *P. aeruginosa* ve sputu nemocných CF. Tyto izoláty byly zachyceny u 54,4 % studovaných nemocných CF, jejich výskyt stoupal s délkou trvání chronické plicní infekce a byla u nich přítomná nižší citlivost na antibiotika. Vztah k oxidačnímu stresu byl u hypermutabilních izolátů prokázán vyšším zastoupením 8-oxo-2'-deoxyguanosinu ($p = 0,02$) (Ciofu O. *et al.*, 2005). Dřevínek *et al.* prokázali změny genové exprese u referenčního kmene J2315 *Burkholderia cenocepacia* vlivem oxidačního stresu a dalších faktorů v modelu založeném na vlastnostech sputa

nemocných CF. Předpokládá se význam těchto změn pro schopnost kolonizace dýchacích cest a invazivitu tohoto pro CF důležitého patogenu (Drevinec P. *et al.*, 2008).

Přes významnou roli ROS/RNS v řadě fyziologických dějů v organismu (antimikrobiální obrana, signální molekuly a další) je jejich nadbytek spojený s oxidačním stresem pro organismus škodlivý (Štípek S., 2000b). U CF je oxidační stres prokazatelný jak systémově, tak v dýchacím ústrojí, tedy v orgánu nejvíce postižením touto nemocí. Za nejdůležitější zdroj oxidačního stresu lze považovat vystupňovaný neutrofilní zánět při chronické bronchopulmonální infekci. Citované práce prokazují podíl oxidačního stresu na patogenezi CF včetně jeho vztahů k plicním funkcím, radiologickým nálezům na plicích i ke klinickému skóre.

1.7. Možnosti ovlivnění oxidačního stresu u cystické fibrózy

Zcela obecně lze oxidační stres ovlivnit na třech úrovních: snížení množství ROS/RNS, zvýšení inaktivace vzniklých ROS/RNS (antioxidační obrana) a zvýšení reparace škod vzniklých vlivem ROS/RNS.

U CF je nedůležitějším zdrojem ROS/RNS neutrofilní zánět dýchacích cest. Proto všechna opatření, která mají potenciál redukovat tento zánět, vedou rovněž k nižší produkci ROS/RNS. Kauzální léčba CF, tedy genová terapie, není v současnosti dostupná. Vyvíjeny jsou však specifické léky pro jednotlivé mutace, resp. třídy mutací genu *CFTR*. První z nich, ivakaftor (potenciátor *CFTR* proteinu u mutace G551D), již prošel klinickými studiemi a v roce 2012 byl schválen ke klinickému použití (Ramsay B.W. *et al.*, 2011). Dále je třeba uvést adekvátní mukolytickou léčbu a respirační fyzioterapii, hygienický režim k prevenci bakteriální kolonizace dýchacích cest a agresivní antibiotickou léčbu bronchopulmonální infekce. Např. Range *et al.* prokázali pokles koncentrace lipoperoxidů v plazmě po antibiotické léčbě plicní exacerbace u CF (53 vs. 17 nmol/l); koncentrace proteinových karbonylů a MDA však ovlivněna nebyla (Range S.P. *et al.*, 1999). Z protizánětlivých léků byly studovány především kortikosteroidy, ibuprofen a azitromycin. Současná doporučení považují inhalační kortikosteroidy pro kontrolu zánětu za nedostatečně účinné a systémové kortikoidy za léky s neakceptovatelnými vedlejšími účinky. Nicméně, např. Paredi *et al.* prokázali nižší hodnoty eCO u nemocných CF léčených inhalačními kortikosteroidy oproti neléčeným (5,1 vs. 8,4 ppm; $p < 0,01$) (Paredi P. *et al.*, 1999). Naproti tomu, jako protizánětlivé léky jsou u CF doporučeny jednak vysokodávkovaný ibuprofen (u dětí za

kontrol sérových hladin léku), jednak dlouhodobě podávaný azitromycin (u nemocných s chronickou infekcí *P. aeruginosa*) (Flume P.A. *et al.*, 2007). Tolik stručně k léčebných postupům u CF, které mají potenciál snížit produkci ROS.

Co se týče antioxidační ochrany, je CF nemocí s významnou nutriční problematikou se vztahem k oxidačnímu stresu. Tato problematika byla již zmíněna v kapitole 3. V plazmě je antioxidační ochrana zajišťována především albuminem, kyselinou močovou, bilirubinem, kyselinou askorbovou a α -tokoferolem. Z toho albumin se podílí ze 43 % a kyselina močová z 33 % na antioxidační kapacitě plazmy (Racek J., 2003). U dětí s CF korelovala antioxidační kapacita séra jak se stavem výživy vyjádřeným pomocí body mass indexu (BMI) ($r = 0,47$; $p < 0,01$), tak s plicními funkcemi, tedy hodnotou FEV₁ ($r = 0,43$; $p < 0,02$) (Lands L.C. *et al.*, 2000). Z důvodu pankreatické insuficience hrozí u CF deficit vitaminů rozpustných v tucích a je nutná jejich substituce podle sérových hladin. Lagrange-Puget *et al.* prokázali u nemocných CF oproti kontrolám nižší plazmatické koncentrace vitamínu A (1,33 vs. 1,77 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,001$), vitamínu E (21,1 vs. 24,4 $\mu\text{mol/l}$; $p = 0,003$) i β -karotenu (0,15 vs. 0,48 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,001$). Tyto koncentrace se snižovaly při plicní exacerbaci a opět stoupali po antibiotické léčbě. Rovněž byly prokázány korelace s plicními funkcemi, tedy hodnotou FEV₁ u vitamínu A ($p = 0,03$), vitamínu E ($p = 0,02$) i β -karotenu ($p = 0,004$) a se stavem výživy vyjádřeným hodnotou BMI u vitamínu A ($p = 0,02$) a β -karotenu ($p = 0,009$) (Lagrange-Puget M. *et al.*, 2004). S antioxidační ochranou souvisí i příjem stopových prvků jako je měď, zinek a selen, neboť jde o kofaktory enzymů uplatňujících se v metabolismu ROS (SOD a glutathion-Px). Oproti kontrolám měli nemocní CF v erythrocytech vyšší obsah zinku (40,8 vs. 30,4 $\mu\text{g/g}$ hemoglobinu) a mědi (3,56 vs. 2,73 $\mu\text{g/g}$ hemoglobinu), naopak obsah selenu byl signifikantně snížen (329 vs. 404 $\mu\text{g/g}$ hemoglobinu) (Neve J. *et al.*, 1983). Substituce těchto stopových prvků u CF však rutinně doporučována není, u adekvátní substituce pankreatickými enzymy se nepředpokládá jejich deficit.

Velká pozornost je u CF věnována glutathionu. Glutathion je důležitým antioxidantem, především intracelulárně. Účastní se jak enzymatické (substrát glutathion-Px), tak neenzymatické inaktivace ROS (Racek J., 2003). Glutathion je rovněž substrátem CFTR proteinu. Dysfunkce CFTR proteinu vede k nedostatku glutathionu v extracelulárním prostředí s poklesem hodnoty poměru redukované a oxidované formy glutathionu. Vzhledem k tomu, že glutathion působí jako antioxidant, mukolytikum, modulátor zánětu, imunitní odpovědi a viability buněk, je zvažována jeho role v patogenezi CF (Hudson V.M., 2000). Z tohoto důvodu byla u CF studována jeho suplementace. Perorálně byl podáván syrovátkový protein bohatý na tiolové skupiny po dobu jednoho měsíce. U studovaného souboru se zlepšil stav

výživy a klesly zánětlivé parametry; k ovlivnění koncentrace glutationu v plné krvi však nedošlo (Lands L.C. *et al.*, 2010). Podávání vysokých dávek N-acetylcysteinu (prekurzor glutationu) po dobu čtyř týdnů vedlo u nemocných CF k vzestupu obsahu glutationu v neutrofilech periferní krve ($p = 0,025$) a k poklesu počtu neutrofilů ($p = 0,0031$) a obsahu elastázy ($p = 0,006$) ve sputu (Tirouvanziam R. *et al.*, 2006). Inhalační podání glutationu po dobu 14 dnů vedlo k signifikantnímu zvýšení jeho koncentrace v BALF a ke zlepšení hodnoty FEV₁; pokles koncentrací lipoperoxidů a proteinových karbonylů v BALF však statistické významnosti nedosáhl (Griese M. *et al.*, 2004). Glutacion i N-acetylcystein v *ex vivo* studiích rovněž inhibovaly aktivitu MPO ve sputu (Vasu V.T. *et al.*, 2011).

Antioxidantům je tedy u CF věnována značná pozornost. Vcelku je u nemocných CF doporučena suplementace vitamínu A a vitamínu E dle sérových hladin, dále podávání kyseliny askorbové, zinku a selenu v množství odpovídajícím doporučeným denním dávkám (ke zhodnocení podávání glutationu je zapotřebí další výzkum – studie 2. fáze klinického hodnocení léčiv s perorálním N-acetylcysteinem a s inhalačním glutationem u CF již proběhly). Nemocní s CF by se měli vyhýbat exogenní expozici znečištěnému ovzduší a cigaretovému kouři, jež mohou zvyšovat oxidační stres. Samozřejmostí je adherence k doporučeným postupům léčby bronchopulmonálního onemocnění (Cantin A.M. *et al.*, 2007).

2. Cíle práce a stanovení hypotéz

Stanovení biomarkerů ve vydechaném vzduchu a v KVV je perspektivní metodou vyšetření onemocnění dýchacího ústrojí s možným využitím v diagnostice, při monitorování odpovědi na léčebné zásahy a při hodnocení prognózy onemocnění. Problémem je však dosud nedostatečná standardizace metod, chybění normálních hodnot vyšetření a časový odstup od vyšetření k získání výsledků.

Obecně lze roli biomarkerů rozdělit do čtyřech oblastí vzhledem k etiopatogeneze onemocnění. Může se jednat o biomarker etiologického agens, o biomarker patofyziologického mechanismu onemocnění (bez vztahu k etiologickému agens), dále o biomarker aktivity onemocnění (např. vedlejší produkt patofyziologických procesů) a konečně nemusí být mezi biomarkerem a onemocněním žádný vztah.

Oxidační stres (OS) je u CF považován za důležitý patofyziologický mechanismus, a to především ve vztahu k progresi bronchopulmonálního onemocnění. Studium biomarkerů OS u CF má tak potenciál zlepšit odhad prognózy onemocnění, která je u CF značně variabilní, a také lépe cílit terapeutická opatření, jako např. protizánětlivou léčbu či suplementaci antioxidantů.

Předkládaná práce si klade za cíl zhodnotit vztah markerů OS v KVV k aktuální tíži onemocnění, ke krátkodobému a střednědobému vývoji základních klinických parametrů a rovněž jejich využitelnost pro posuzování odpovědi na terapeutická opatření.

K hodnocení uvedených vztahů byly využity oxidační metabolity oxidu dusnatého (nitrity a nitráty) a kyseliny arachidonové (8-isoprostan). Jde o markery studované již jinými autory. Limitace předchozích prací se však týkaly např. velikosti souboru nemocných, vhodnosti odběrových zařízení (často „home-made“ přístroje), citlivosti laboratorních metod a šíře hodnocených klinických a laboratorních parametrů. Prospektivní sledování pro zhodnocení vztahu markerů OS k prognóze onemocnění nebylo dosud prováděno. Předkládaná práce byla proto prováděna na dostatečně velkém souboru nemocných s využitím komerčně dostupného kondenzátoru vydechaného vzduchu a validovaných analytických metod ke stanovení koncentrací markerů OS v KVV. Hodnocené klinické a laboratorní parametry zahrnují nejen vztah k tíži plicního onemocnění, ale i ke stavu výživy a řadě systémových antioxidantů a markerů zánětu. Hodnocení progresu onemocnění v krátkodobém a střednědobém horizontu se týká vývoje základních ukazatelů stavu plicních funkcí a stavu výživy, hodnocení odpovědi na léčbu pak kontroverzní oblasti podávání inhalačních kortikosteroidů.

V předkládané práci jsou ověřovány následující hypotézy:

Hypotéza 1: Markery OS v KVV korelují s aktuálním klinickým stavem u nemocných s CF.

Hypotéza 2: Markery OS v KVV korelují s vývojem klinického stavu u nemocných s CF.

Hypotéza 3: Hodnoty markerů OS v KVV u nemocných s CF lze ovlivnit léčbou inhalačními kortikosteroidy.

3. Metodika

3.1. Desing studie

Vztah markerů OS v KVV a plicního onemocnění u CF byl studován na třech úrovních. V prvním roce byla provedena výchozí studie, kdy byly hodnoceny korelace mezi markery OS v KVV a běžně sledovanými klinickými a laboratorními parametry. Vývoj plicních funkcí s stavu výživy ve vztahu k markerům OS v KVV byl studován v rámci dlouhodobé studie, a to s odstupem jednoho, tří a pěti let. V druhém roce projektu rovněž proběhla intervenční studie zabývající se vlivem léčby inhalačními kortikosteroidy na markery OS v KVV. Projekt byl podpořena grantem IGA MZd ČR NR8304 a schválen Etickou komisí UK 2. LF.

3.2. Výchozí studie

Výchozí studie se zabývala vztahem markerů OS v KVV a běžně sledovaných klinických a laboratorních parametrů u nemocných s CF. Současně bylo provedeno srovnání hodnot markerů OS v KVV u nemocných s CF s kontrolním souborem.

U nemocných s CF byla z markerů OS v KVV vyšetřena koncentrace nitritů, nitrátů a 8-isoprostanu. Z klinických parametrů šlo o pohlaví, věk, léčbu inhalačními kortikosteroidy a hodnotu body mass indexu. Laboratorní parametry zahrnovaly hodnotu FEV₁, rentgenového Northern skore, dominantní patogen kolonizace dýchacích cest, počet neutrofilů v periferní krvi a koncentrace C-reaktivního proteinu, imunoglobulinu G, albuminu, vitamínu E a β-karotenu v séru.

U členů kontrolního souboru šlo o tyto sledované parametry: pohlaví, věk a koncentrace nitritů, nitrátů a 8-isoprostanu v KVV.

3.3. Dlouhodobá studie

Dlouhodobá studie se týkala pouze nemocných s CF a sloužila ke zhodnocení vztahu markerů OS v KVV a vývoje základních ukazatelů stavu plicních funkcí a stavu výživy v odstupech jednoho, tří a pěti let od výchozí studie, a to hodnoty FEV₁ a body mass indexu. Druhý přístup se týkal srovnání podskupiny žijících nemocných s poskupinou nemocných, kteří v průběhu studie zemřeli nebo prodělali transplantaci plic.

Hodnocen byl vliv markerů OS v KVV (nitrity, nitráty a 8-isoprostan) získaných ve výchozí studii a rovněž vliv dalších běžně sledovaných klinických a laboratorních parametrů (pohlaví, věk, dominantní patogen kolonizace dýchacích cest a hodnoty FEV₁ a body mass indexu), a to jak izolovaně, tak skupinově.

V případě hodnocení druhým přístupem byl použit jak model obsahující výchozí hodnoty FEV₁ a BMI, tak i model pracující s jejich rozdílovými hodnotami.

3.4. *Intervenční studie*

Intervenční studie proběhla v druhém roce projektu a týkala se vlivu léčby inhalačními kortikosteroidy na markery OS v KVV. Vzhledem k předpokládanému protizánětlivému účinku léčby inhalačními kortikosteroidy byly vyšetřeny i markery zánětu v KVV.

Nemocným byl podáván po dobu tří měsíců budesonid v dávce 800 µg dvakrát denně v inhalačním systému Turbuhaler (potřebné množství léku Pulmicort Turbuhaler 400 µg bylo laskavostí společnosti AstraZeneca poskytnuto jako sponzorský dar) dle pokynů výrobce.

U nemocných s CF bez terapie inhalačními kortikosteroidy byly na začátku studie hodnoceny následující parametry. Z markerů OS v KVV byla vyšetřena koncentrace nitritů a nitrátů a jako marker zánětlivé acidifikace dýchacích cest pH KVV. Z klinických parametrů šlo o pohlaví, věk a hodnotu body mass indexu. Laboratorní parametry zahrnovaly hodnotu FEV₁, dominantní patogen kolonizace dýchacích cest, počet neutrofilů v periferní krvi a koncentrace C-reaktivního proteinu v séru. Na konci studie byla vyšetřena hodnota body mass indexu, pH KVV, koncentrace nitritů a nitrátů v KVV, hodnota FEV₁, počet neutrofilů v periferní krvi a koncentrace C-reaktivního proteinu v séru.

U členů kontrolního souboru nebyla léčba inhalačními kortikosteroidy podávána a bylo provedeno vyšetření pouze na začátku studie, kdy šlo o tyto parametry: pohlaví, věk, hodnota pH a koncentrace nitritů a nitrátů v KVV.

3.5. *Soubor pacientů*

Do studie byli zařazeni dospělí nemocní s CF v péči Pneumologické kliniky UK 2. LF a FN Motol ve stabilní fázi nemoci. Diagnóza CF byla ve všech případech stanovena na základě odpovídajícího klinického obrazu a potvrzena opakovaným vyšetřením koncentrace chloridů v potu spolu s analýzou mutací genu *CFTR* podle platných mezinárodních doporučení (Rosenstein B.J., Cutting G.R., 1998). Hlavní vylučovací kritéria zahrnovala nikotinismus a

přítomnost dalšího plicního onemocnění jiného než CF. Podmínkou účasti v projektu byl podpis informovaného souhlasu.

U nemocných s CF byla zaznamenána tato demografická data: pohlaví, věk k 1.1.2005 (resp. 1.1.2006 v případě intervenční studie), dominantní patogen bakteriální kolonizace dýchacích cest a léčba inhalačními kortikosteroidy. Klinické vyšetření včetně zhodnocení stability onemocnění a kalkulace BMI bylo následováno odběrem KVV, funkčním a zobrazovacím vyšetřením plic a odběrem krve na rutinní laboratorní testy.

Kontrolní soubor tvořili nekuřáci bez anamnézy chronického plicního onemocnění, a to zaměstnanci FN Motol a jejich rodinní příslušníci a dále studenti UK 2. LF. Z demografických dat bylo zaznamenáno pohlaví a věk v roce studie a následně byl odebrán KVV.

Uvedená vyšetření byla provedena vždy v průběhu jednoho dne v období duben–červen v letech 2005, 2006, 2008 a 2010. V případě intervenční studie proběhla druhá návštěva s odstupem tří měsíců od první (obvyklé schéma bylo červen a září 2006 vzhledem k dovoleným a prázdninám).

3.6. Odběr a vyšetření kondenzátu vydechaného vzduchu

Odběr KVV probíhal v dopoledních hodinách, u nemocných s CF po ranním cyklu respirační fyzioterapie a po podání ranních léků včetně léků inhalačních ve standardním pořadí s využitím komerčně dostupného přístroje ECoScreen (Jaeger, Spolková republika Německo). Odběr byl proveden dle doporučených postupů ATS/ERS u sedícího nemocného opatřeného nosním klipem za klidového dýchání po dobu 15 minut s vyloučením kontaminace slinami (Horváth I. *et al.*, 2005). Po odběru byl KVV rozpipetován do sterilních zkumavek a zamražen při teplotě -80°C do doby vyšetření. V případě intervenční studie byla část vzorku ihned použita ke změření pH KVV.

Stanovení koncentrace nitritů v KVV bylo provedeno pomocí kapalinové chromatografie po derivatizaci s diaminonaftalenem jako naftotriazol, detekční limit činil $0,05\ \mu\text{mol/l}$. Nitráty byly před analýzou nejprve enzymaticky redukovány na nitrity. Každý vzorek KVV byl analyzován dvakrát, a to s a bez enzymatické redukce; koncentrace nitrátů pak odpovídala rozdílu výsledků. Detekční limit pro nitráty byl $0,4\ \mu\text{mol/l}$. Validace této metody byla publikována v odborném tisku (Chládková J. *et al.*, 2006). Stanovení koncentrace 8-isoprostanu bylo provedeno metodou kompetitivní enzymoimunoanalýzy (Cayman Chemical, Spojené státy americké). Rovněž tato metoda byla popsána v odborném tisku (Montuschi P. *et*

al., 2000). Kalibrační standardy byly připraveny pro rozsah měření 2-250 pg/ml. Vyšetření koncentrací nitritů, nitrátů a 8-isoprostanu bylo provedeno v Ústavu farmakologie UK LF v Hradci Králové.

Vyšetření pH KVV bylo provedeno ihned po odběru pomocí přístroje Titan s tranzistorovou sondou Isfet ve standardním provedení Cupfet (Sentron, Nizozemí) dle pokynů výrobce. Přesnost měření činila $\pm 0,01$ pH při dvoubodové kalibraci pufrů Sentron (pH 4,00 a 7,00) při pokojové teplotě. Deaerace vzorku KVV nebyla prováděna.

3.7. Vyšetření dalších klinických a laboratorních parametrů

Klinické vyšetření zahrnovalo zhodnocení stability plicního onemocnění podle obvyklých kritérií (Fusch H.J. *et al.*, 1994), zaznamenáno bylo pohlaví a věk nemocného a léčba inhalačními kortikoidy. Dále byla standardním způsobem změřena tělesná výška s přesností na 1,0 cm a tělesná hmotnost s přesností na 0,2 kg a byl vypočítán body mass index podle vzorce $BMI = \text{tělesná hmotnost v kg} / (\text{tělesná výška v m})^2$.

Funkční vyšetření plic bylo provedeno na přístroji MasterLab (Jaeger, Spolková republika Německo) dle doporučení ATS/ERS (Miller M.R. *et al.*, 2005) s využitím bronchodilatačního testu s 0,4 mg salbutamolu podaného z dózovaného aerosolu (preparát Ventolin Inhaler, GlaxoSmithKline, Velká Británie) inhalačním nástavcem s náústkem (AeroChamber Plus, Boehringer Ingelheim, Spolková republika Německo). Zaznamenána byla lepší z hodnot FEV_1 v % náležitých hodnot před a po podání bronchodilatancia.

Zadopřední skiagram hrudníku byl zhotoven za standardních podmínek na detašovaném pracovišti Kliniky zobrazovacích metod UK 2. LF a FN Motol na Pneumologické klinice UK 2. LF a FN Motol a bylo kalkulováno rentgenové Northern skóre (Conway S.P. *et al.*, 1994).

Kolonizace dýchacích cest byla hodnocena za nejméně posledních 12 měsíců sledování. Mikrobiologická vyšetření sputa byla provedena v Ústavu lékařské mikrobiologie UK 2. LF a FN Motol s využitím standardních technik. Verifikace komplexu *Burkholderia cepacia* byla provedena pomocí vyšetření polymorfizmu *recA* genu v PCR laboratoři Pediatrické kliniky UK 2. LF a FN Motol (McDowell A. *et al.*, 2001). Dominance patogenů byla hodnocena dle klinického dopadu v tomto pořadí: komplex *Burkholderia cepacia* > *Pseudomonas aeruginosa* > *Staphylococcus aureus* (Hart C.A., Winstanley C., 2002).

Odběr periferní krve na rutinní hematologická, biochemická a imunologická vyšetření byl proveden venepunkcí za standardních podmínek a stanovení počtu neutrofilů v periferní krvi a koncentrací C-reaktivního proteinu, imunoglobulinu G, albuminu, vitamínu E a β -karotenu

v séru bylo provedeno s využitím standardních postupů na Oddělení klinické hematologie FN Motol, v Ústavu klinické biochemie a patobiochemie UK 2. LF a FN Motol a v Ústavu imunologie UK 2. LF a FN Motol.

3.8. Statistické vyhodnocení

Statistické zpracování bylo provedeno ve spolupráci s Oddělením biostatistiky a informatiky Státního zdravotního ústavu v Praze. K vyhodnocení byl použit statistický software Statistica 8 Cz (StatSoft CR, Česká republika). Pro testování normality dat byl použit Shapiro-Wilksův test a Lillieforsova modifikace Kolmogorov-Smirnovova testu. Pro hodnocení homogenity souboru byl použit Fisherův test. Pro porovnání mezi skupinami Mann-Whitneyův test a dvouvýběrový t-test. Pro hodnocení závislosti proměnných byl použit Spearmanův korelační koeficient a regresní analýza metodou krokové regrese, resp. logistické regrese. Za statisticky významnou byla považována hodnota $p < 0,05$, za hraniční hodnota $0,05 < p < 0,10$, resp. v případě regresních analýz $0,05 < p < 0,20$.

4. Výsledky

4.1. Přehled počtu účastníků jednotlivých studií projektu

Shrnutí počtu nemocných s CF a počtu členů kontrolních souborů účastnících se výchozí, dlouhodobé a intervenční studie je uveden v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1. Přehled počtu účastníků projektu

Studie projektu	Nemocní s CF	Kontrolní soubor
<i>Výchozí studie</i> (rok 2005)	46	21
<i>Dlouhodobá studie</i>		
- rok 2006	44	
- rok 2008	42	
- rok 2010	36	
<i>Intervenční studie</i> (rok 2006)	10	12

4.2. Výchozí studie

Demografická data souboru nemocných s CF a kontrolního souboru jsou uvedena v tabulce 4.2. Soubory se statisticky významně nelišily ve složení podle pohlaví (Fisherův test; $p = 0,61$) a věku (Mann-Whitneyův test; $p = 0,25$).

Tabulka 4.2. Demografická data účastníků výchozí studie

Parametr	Nemocní s CF	Kontrolní soubor
<i>Věk</i> (roky)*	23,9 (19,5 - 32,9)	26,0 (15,0 - 38,0)
<i>Pohlaví</i> (ženy / muži)	23 / 23	12 / 9
<i>Léčba IKS</i> (ano / ne)	23 / 23	n.a.
<i>Kolonizace dýchacích cest</i>		n.a.
- nekolonizovaní	1	
- <i>Staph. aureus</i>	5	
- <i>P. aeruginosa</i>	12	
- komplex <i>B. cepacia</i>	28	

* medián (rozpětí) hodnot; zkratky viz Seznam zkratk

Koncentrace markerů OS v KVV u souboru nemocných s CF a u kontrolního souboru jsou uvedeny v tabulce 4.3. Uvedeny jsou rovněž hodnoty pro podsoubory nemocných s CF s ohledem na pohlaví, léčbu IKS a kolonizaci dýchacích cest.

Tabulka 4.3. Koncentrace markerů oxidačního stresu v kondenzátu vydechaného vzduchu

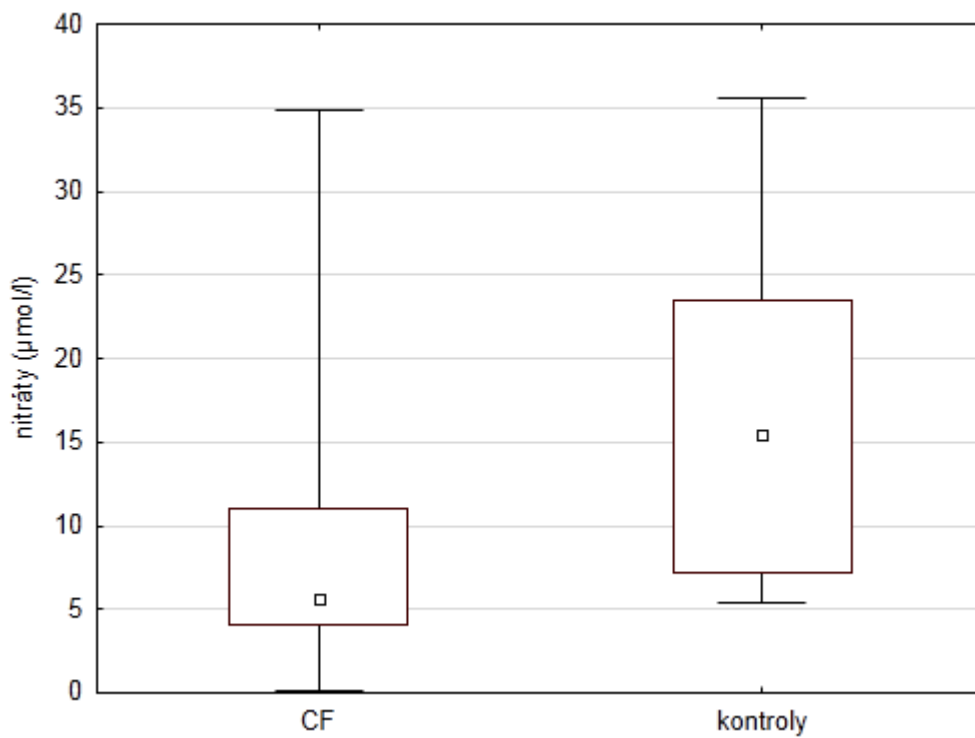
Soubor	Nitrity ($\mu\text{mol/l}$) [†]	Nitráty ($\mu\text{mol/l}$) [†]	8-isoprostan* (pg/ml) [†]
<i>Kontrolní soubor</i>	4,48 (2,34 - 6,97)	15,45 (5,45 - 35,62)	4,10 (2,20 - 10,00)
<i>Nemocní s CF</i>	5,07 (1,00 - 16,44)	5,66 (0,09 - 34,90)	8,50 (2,70 - 27,62)
<i>- podsoubor dle pohlaví</i>			
- ženy	4,29 (1,0 - 14,99)	6,29 (0,09 - 21,13)	7,50 (2,70 - 27,62)
- muži	5,34 (1,26 - 16,44)	5,48 (0,56 - 34,90)	9,00 (3,57 - 25,19)
<i>- podsoubor dle léčby IKS</i>			
- s léčbou IKS	5,07 (1,33 - 16,44)	5,14 (0,09 - 21,13)	8,70 (3,40 - 25,19)
- bez léčby IKS	4,46 (1,0 - 14,99)	6,29 (1,63 - 34,90)	8,19 (2,70 - 27,62)
<i>- podsoubor dle kolonizace DC</i>			
- s kolonizací BCC	4,29 (1,33 - 16,44)	5,48 (0,09 - 34,9)	9,40 (2,70 - 27,62)
- bez kolonizace BCC	6,19 (1,00 - 14,99)	7,35 (1,83 - 21,13)	7,30 (3,40 - 25,40)

* 8-IP byl detekovatelný v KVV u 40 nemocných s CF a u 10 členů kontrolního

souboru; [†]medián (rozpětí) hodnot; zkratky viz Seznam zkratek

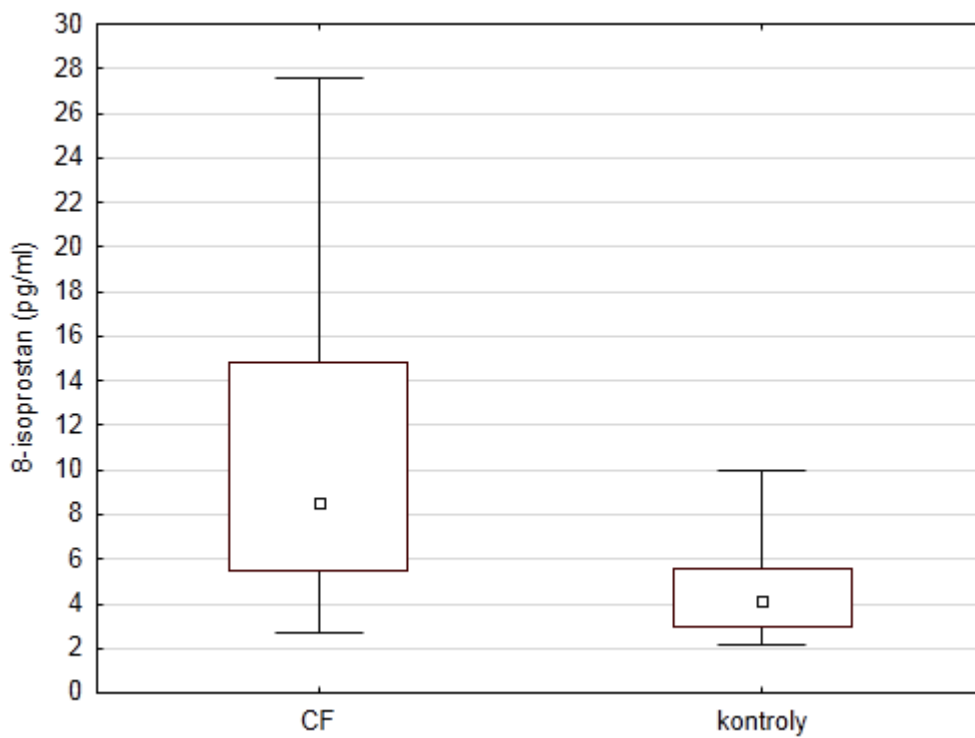
Statisticky významně se lišily hodnoty koncentrací v KVV mezi souborem nemocných s CF a kontrolním souborem v případě nitrátů (Mann-Whitneyův test; $p < 0,001$) a 8-IP (Mann-Whitneyův test; $p = 0,0014$), viz grafy 4.1. a 4.2. V jednotlivých podsouborech nemocných s CF statisticky významné rozdíly nebyly zjištěny.

Graf 4.1. Koncentrace nitrátů v kondenzátu vydechaného vzduchu



data jsou vyjádřena jako medián, mezikvartilové rozpětí a rozpětí

Graf 4.2. Koncentrace 8-IP v kondenzátu vydechaného vzduchu



data jsou vyjádřena jako medián, mezikvartilové rozpětí a rozpětí

Další klinické a laboratorní parametry souboru jsou uvedeny v tabulce 4.4.

Tabulka 4.4. Hodnoty klinických a laboratorních parametrů

Parametr	Hodnota (medián a rozpětí)
Markery plicního onemocnění	
- FEV ₁ (% nál. hodn.)	58,1 (23,6 - 100,8)
- Northern skóre	8,5 (2,0 - 13,0)
Markery stavu výživy	
- body mass index (kg/m ²)	20,9 (16,7 - 27,2)
- albumin-S* (g/l)	42,4 (35,6 - 48,0)
Markery zánětu	
- K-neutrofily (x 10 ⁹ /l)	8,2 (3,7 - 12,8)
- S-C-reaktivní protein (mg/l)	9,5 (0,5 - 43,5)
- S-imunoglobulin G (g/l)	18,0 (8,1 - 32,8)
Systémové antioxidanty	
- S-vitamin E (μmol/l)	21,0 (5,0 - 38,5)
- S-β-karoten (μmol/l)	1,00 (0,02 - 6,72)

S...sérum; K...periferní krev; * albumin je rovněž hlavním sérovým antioxidantem; zkratky viz Seznam zkratek

V jednotlivých podsouborech nemocných s CF byly zjištěny statisticky významné rozdíly (Mann-Whitneyův test) v těchto parametrech (medián a rozpětí hodnot):

Podsoubory dle pohlaví:

- vyšší koncentrace albuminu v séru u mužů oproti ženám s CF, 43,9 (37,0 - 48,0) vs. 41,1 (35,6 - 44,4) g/l, p = 0,0074.

Podsoubory dle léčby IKS:

- nižší hodnoty FEV₁ u léčených IKS oproti nemocným bez léčby IKS, 46,5 (23,6 - 83,8) vs. 69,5 (35,9 - 100,8) % nál. hodn., p <0,001;

- vyšší hodnoty Northern skóre u léčených IKS oproti nemocným bez léčby IKS, 10,0 (2,0 - 13,0) vs. 7,0 (2,0 - 11,0), p <0,001;

- vyšší koncentrace imunoglobulinu G v séru u léčených IKS oproti nemocným bez léčby IKS, 18,8 (10,5 - 26,5) vs. 15,9 (8,1 - 32,8) g/l, p = 0,024;

- vyšší počty neutrofilů v periferní krvi u léčených IKS oproti nemocným bez léčby IKS, 8,5 (4,2 - 12,8) vs. 6,2 (3,7 - 11,8) x 10⁹/l, p = 0,013.

V podsouborech dle kolonizace dýchacích cest statisticky významné rozdíly nebyly ve sledovaných parametrech zjištěny.

Korelace (Spearmanův korelační koeficient) markerů OS v KVV s klinickými a laboratorními parametry jsou uvedeny v tabulce 4.5.

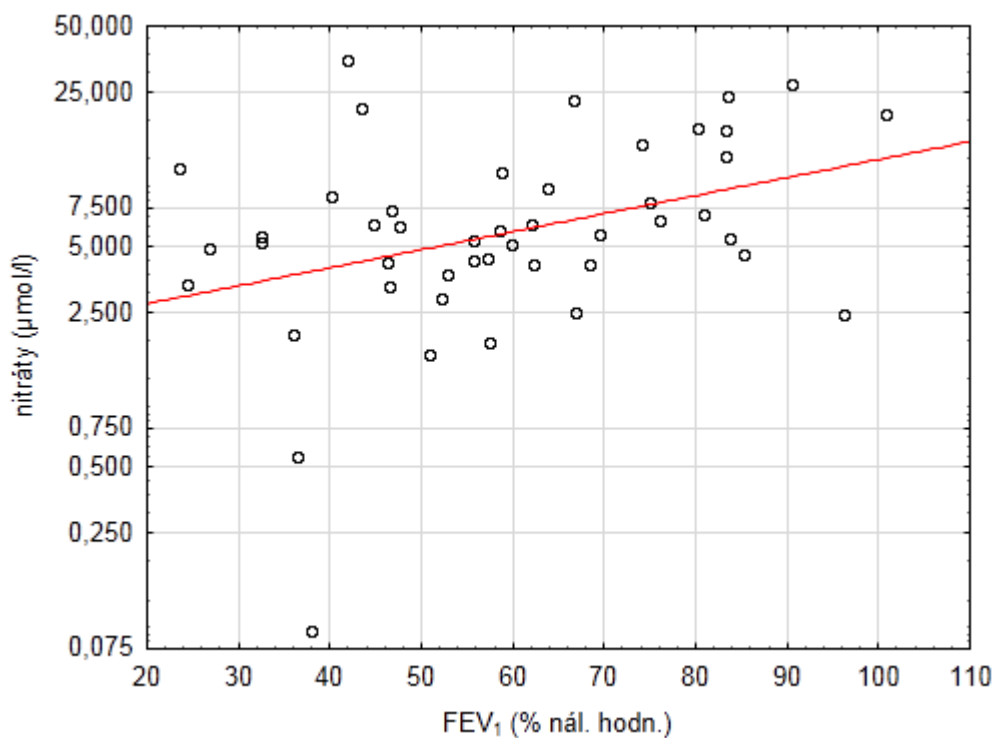
Tabulka 4.5. Korelace markerů oxidačního stresu v kondenzátu vydechaného vzduchu s klinickými a laboratorními parametry

Parametr	Nitrity-KVV		Nitráty-KVV		8-isoprostan-KVV	
	r _s	p-hodnota	r _s	p-hodnota	r _s	p-hodnota
Věk	-0,050	ns	0,206	ns	0,042	ns
FEV ₁	0,147	ns	0,331	0,025	0,029	ns
Northern skóre	-0,094	ns	-0,358	0,015	-0,142	ns
Body mass index	0,051	ns	0,272	0,068	0,207	ns
S-albumin*	0,121	ns	0,353	0,016	0,164	ns
K-neutrofilý	-0,023	ns	-0,273	0,066	0,095	ns
S-C-reaktivní protein	-0,094	ns	-0,404	0,005	-0,029	ns
S-imunoglobulin G	-0,198	ns	-0,214	0,089	-0,208	ns
S-vitamin E	-0,105	ns	0,020	ns	0,184	ns
S-β-karoten	0,204	ns	0,078	ns	0,120	ns

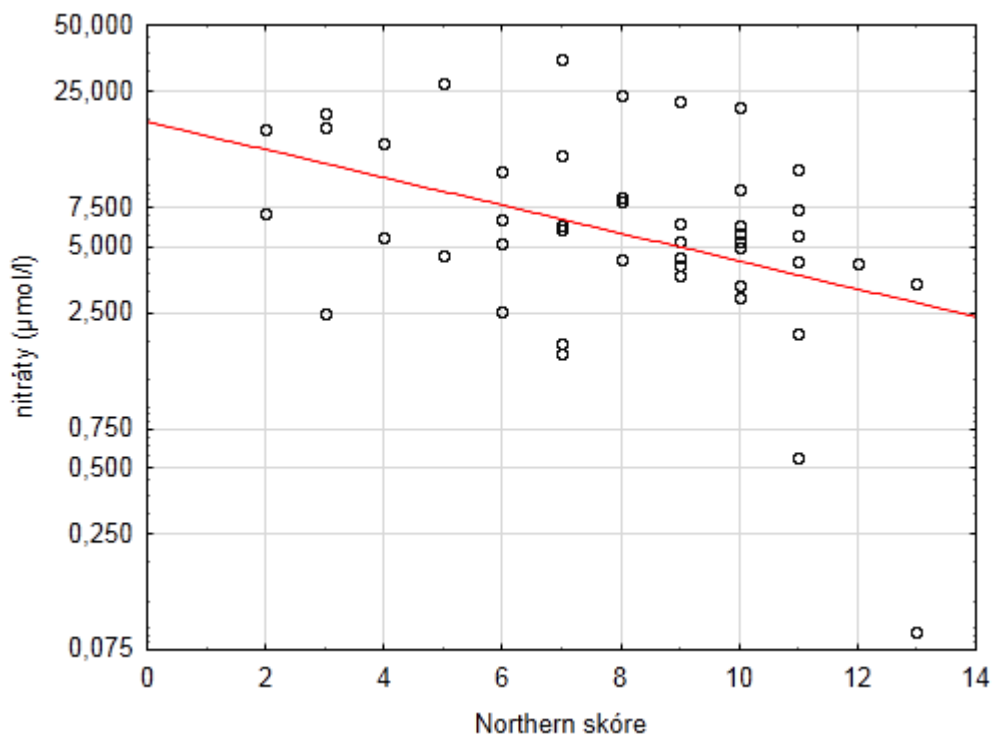
S...sérum; K...periferní krev; * albumin je rovněž hlavním sérovým antioxidantem; zkratky viz Seznam zkratek

Byly prokázány statisticky významné korelace koncentrace nitrátů v KVV s parametry plicního onemocnění (hodnoty FEV₁ a Northern skóre), stavu výživy (koncentrace albuminu v séru) a markery zánětu (koncentrace C-reaktivního proteinu v séru). Tyto vztahy jsou znázorněny v grafech 4.3. až 4.6. Dále byla zjištěna tendence ke korelaci koncentrace nitrátů v KVV s hodnotou body mass indexu, s počtem neutrofilů v periferní krvi a koncentrací imunoglobulinu G v séru. U koncentrace nitritů a isoprostanu v KVV nebyly prokázány signifikantní korelace se žádným ze sledovaných parametrů.

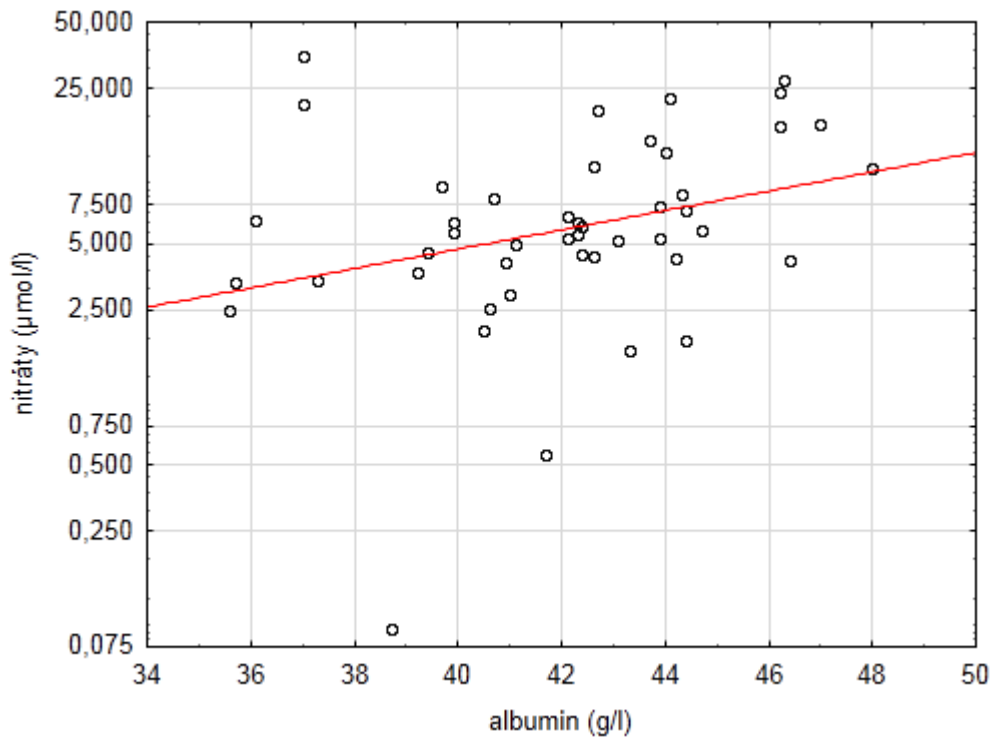
Graf 4.3. Korelace koncentrace nitrátů v kondenzátu vydechaného vzduchu s hodnotou FEV₁



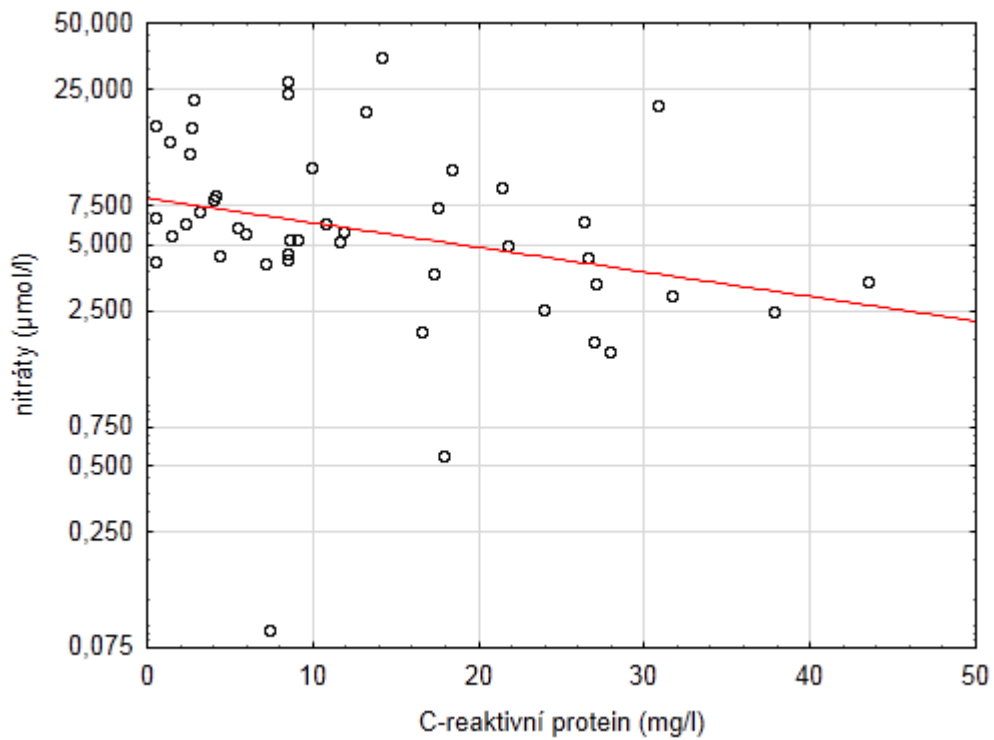
Graf 4.4. Korelace koncentrace nitrátů v kondenzátu vydechaného vzduchu s hodnotou Northern skóre



Graf 4.5. Korelace koncentrace nitrátů v kondenzátu vydechaného vzduchu s koncentrací albuminu v séru



Graf 4.6. Korelace koncentrace nitrátů v kondenzátu vydechaného vzduchu s koncentrací C-reaktivního proteinu v séru



Hodnocení závislostí markerů OS v KVV a kontinuálních i kategoriálních klinických a laboratorních parametrů bylo provedeno regresní analýzou pomocí metody krokových regresí. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.6., zaznamenány jsou pouze p-hodnoty <0,20.

Tabulka 4.6. Regresní analýza závislostí markerů OS v KVV a klinických a laboratorních parametrů

Parametr	Nitrity-KVV		Nitráty-KVV		8-IP-KVV	
	F	p-hodnota	F	p-hodnota	F	p-hodnota
Pohlaví + IKS	2,18	0,15	3,41	0,073		
BCC + IKS			3,18	0,083		
Pohlaví + BCC + IKS			2,25	0,14		
Northern skóre			5,77	0,021		

IKS...léčba IKS; BCC...kolonizace BCC; zkratky viz Seznam zkratk

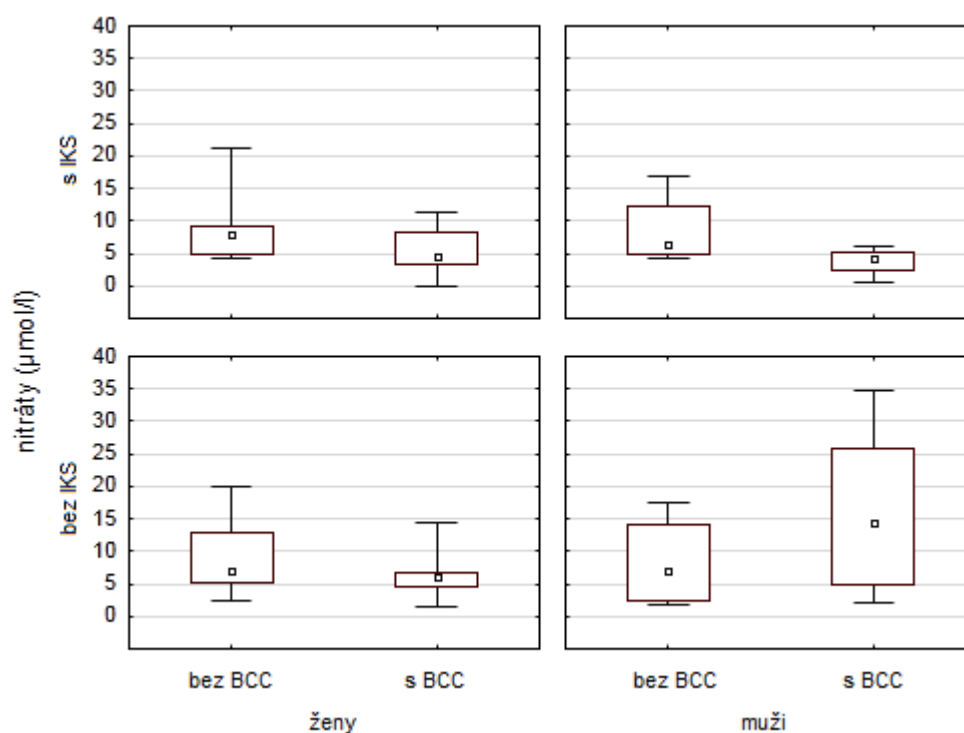
Z kontinuálních parametrů dosáhl statistické významnosti pouze vztah koncentrace nitrátů v KVV a rentgenového Northern skóre (viz rovněž výše graf 4.4.). V ostatních případech jde o pouze slabé závislosti ($0,05 < p < 0,20$) koncentrace nitritů a nitrátů v KVV s kombinacemi kategoriálních faktorů (pohlaví, kolonizace komplexem *B. cepacia* a léčby inhalačními kortikosteroidy). Vztah koncentrace nitrátů v KVV a uvedených kategoriálních faktorů se znázorněn v grafu 4.7.

Koncentrace 8-isoprostanu v KVV nedosáhla stejně jako v případě hodnocení jednotlivých kontinuálních parametrů pomocí Spearmanových korelačních koeficientů ani nyní signifikantních závislostí se sledovanými klinickými a laboratorními parametry.

Shrneme-li výsledky výchozí studie, pak nemocní s CF mají v KVV oproti kontrolnímu souboru nižší koncentrace nitrátů a vyšší koncentrace 8-isoprostanu. Koncentrace nitritů v KVV se od kontrol významně nelišila. Koncentrace nitrátů v KVV u nemocných s CF korelovala s parametry plicního onemocnění (hodnota FEV₁ a Northern skóre), stavu výživy (hodnota body mass indexu a koncentrace albuminu v séru), systémové zánětlivé odezvy (koncentrace C-reaktivního proteinu v séru) a se systémovými antioxidanty (koncentrace albuminu v séru). Regresní analýzou byla prokázána závislost koncentrace nitrátů v KVV na hodnotě Northern skóre.

U koncentrace nitritů a 8-isoprostanu v KVV korelace ani regresní analýza žádné signifikantní vztahy s klinickými a laboratorními parametry neprokázaly.

Graf 4.7. Vztah koncentrace nitrátů v kondenzátu vydechovaného vzduchu a kategoriálních faktorů (pohlaví, kolonizace komplexem *B. cepacia* a léčba inhalačními kortikosteroidy)



data jsou vyjádřena jako medián, mezikvartilové rozpětí a rozpětí; zkratky viz Seznam zkratk

Výsledky výchozí studie týkající se vztahů koncentrací nitritů a nitrátů v KVV a sledovaných klinických a laboratorních parametrů byly přijaty k publikaci v časopise **Bratislava Medical Journal (2011 impakt faktor 0,403)**. Materiál *in extenso* včetně potvrzení o přijetí viz příloha 10.1.

4.3. Dlouhodobá studie

Dlouhodobá studie se potýkala s úbytkem nemocných s CF. V období 2005-2006 zemřeli dva nemocní (jeden muž a jedna žena), v období 2006 - 2008 zemřeli dva muži a v období 2008-2010 zemřeli dva nemocní (jeden muž a jedna žena) a čtyři nemocní prodělali transplantaci plic (jeden muž a tři ženy). Ohledně kolonizace dýchacích cest se u uvedených nemocných ve

čtyřech případech jednalo o *P. aeruginosa* (jeden zemřelý a tři transplantovaní nemocní) a v šesti případech o komplex *B. cepacia* (pět zemřelých a jeden transplantovaný nemocný).

V celém souboru pak nedošlo k změnám kolonizace dýchacích cest, které by ovlivnily hodnocení s ohledem na výchozí studii (tj. rozdělení na nemocné s a bez kolonizace komplexem *B. cepacia*): u třech nemocných s kolonizací *Staph. aureus* byla ve sputu nově intermitentně zjišťována *P. aeruginosa* a u jednoho nemocného s kolonizací *P. aeruginosa* byla v roce 2009 nově zachycena *B. multivorans*, a to krátce před transplantací plic.

Vývoj parametrů FEV₁ a body mass indexu ve sledovaném období je znázorněn v absolutních i relativních (rozdílové hodnoty oproti roku 2005) hodnotách v grafech 4.8. až 4.11. Mediány rozdílů hodnot v letech 2006, 2008 a 2010 oproti roku 2005 činily -4,6, -11,4 a -10,5 % nál. hodn. v případě FEV₁ a 0,0, -0,2 a 0,15 kg/m² v případě body mass indexu. Tabulka 4.7. ukazuje korelace (Spearmanovy korelační koeficienty) parametrů FEV₁ a body mass indexu ve sledovaném období, opět v absolutních i relativních číslech

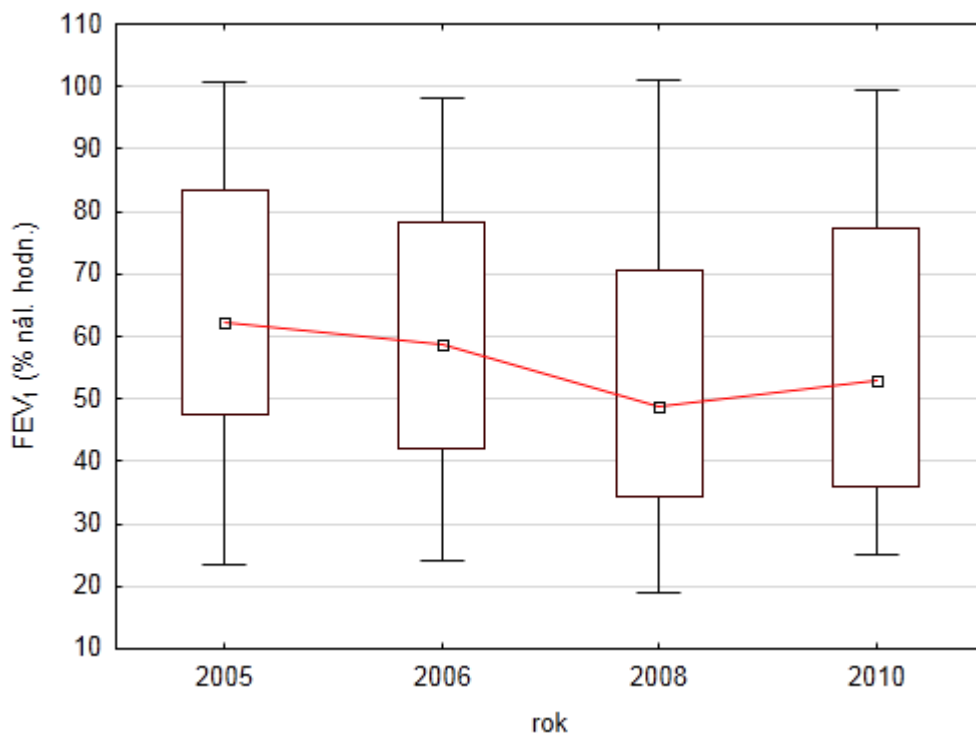
Tabulka 4.7. Korelace hodnot FEV₁ a body mass indexu ve sledovaném období

Období	r _s	p-hodnota
<i>Absolutní hodnoty</i>		
- 2005	0,312	0,035
- 2006	0,423	0,0034
- 2008	0,405	0,0064
- 2010	0,311	0,065
<i>Relativní hodnoty</i>		
- rozdíl 2006-2005	0,300	0,047
- rozdíl 2008-2005	-0,065	n.s.
- rozdíl 2010-2005	0,137	n.s.

Absolutní hodnoty FEV₁ a body mass indexu signifikantně korelovaly s výjimkou roku 2010 (v roce 2010 je korelace pouze hraniční při poklesu počtu pacientů).

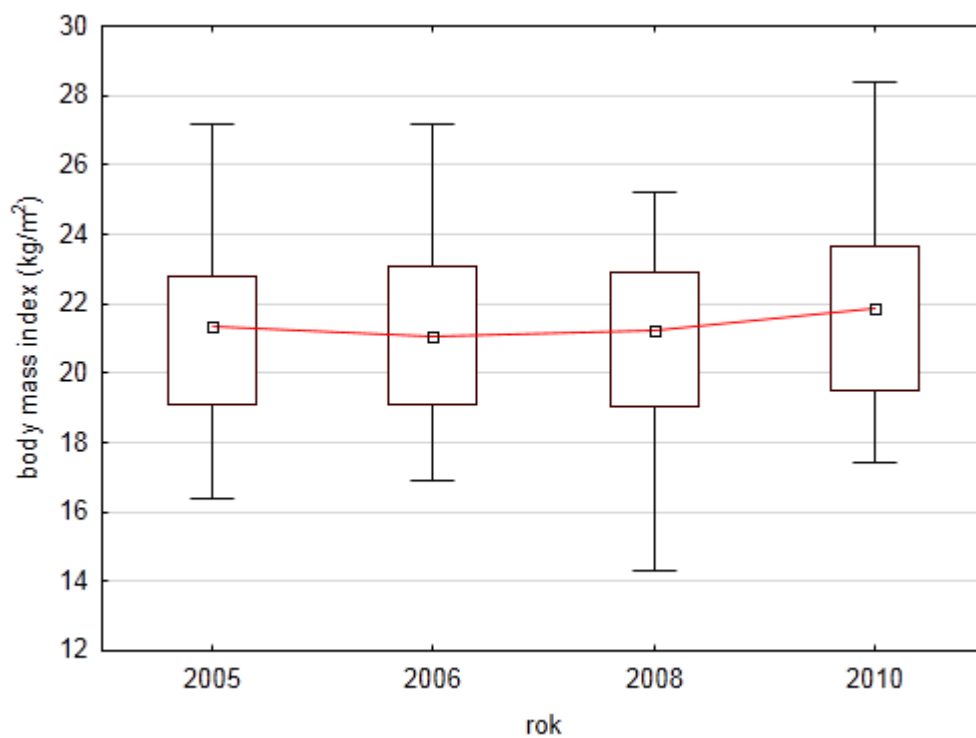
Rozdílové hodnoty uvedených parametrů korelovaly pouze v období 2006-2005, tento vztah je znázorněn v grafu 4.12.

Graf 4.8. Vývoj hodnot FEV₁ v období 2005-2010



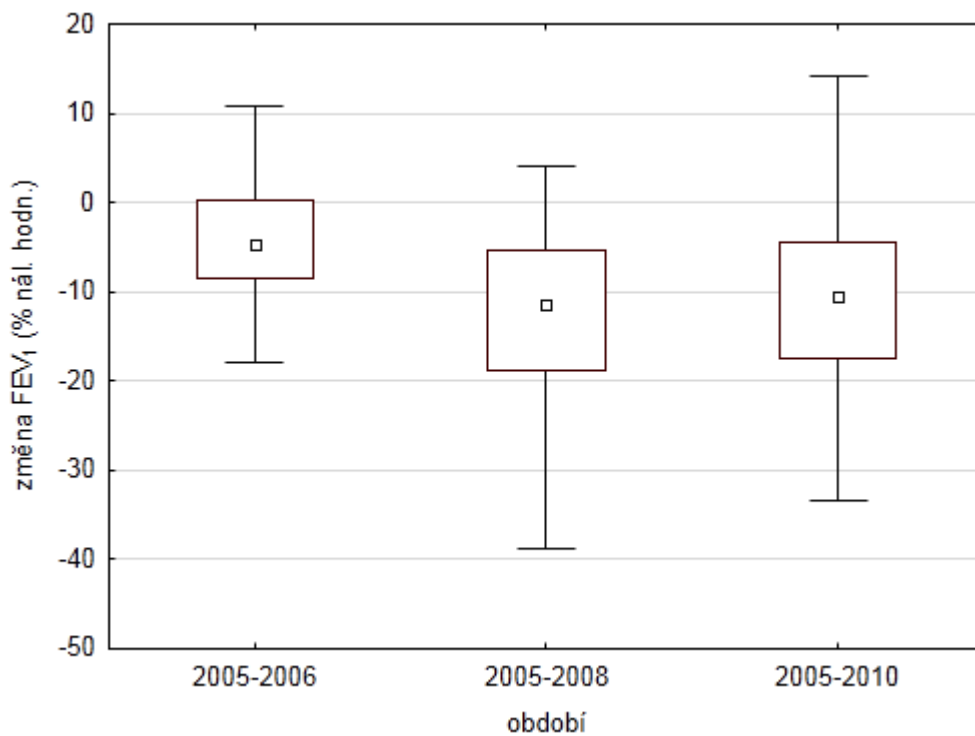
data jsou vyjádřena jako medián, mezikvartilové rozpětí a rozpětí

Graf 4.9. Vývoj hodnot body mass indexu v období 2005-2010



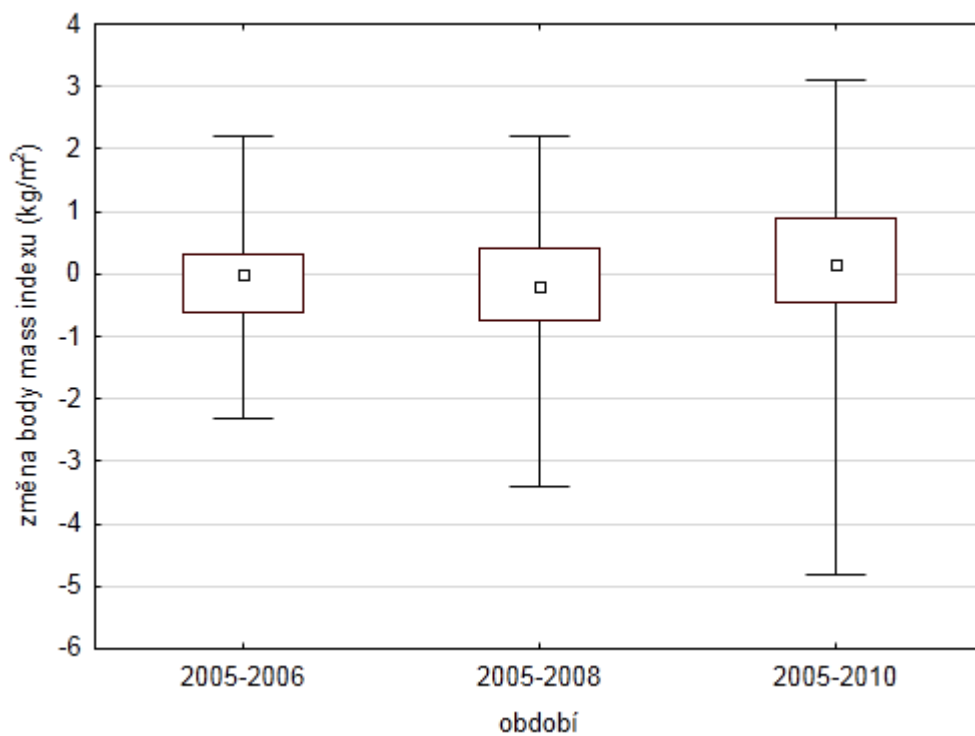
data jsou vyjádřena jako medián, mezikvartilové rozpětí a rozpětí

Graf 4.10. Rozdíly hodnot FEV₁ v období 2005-2010



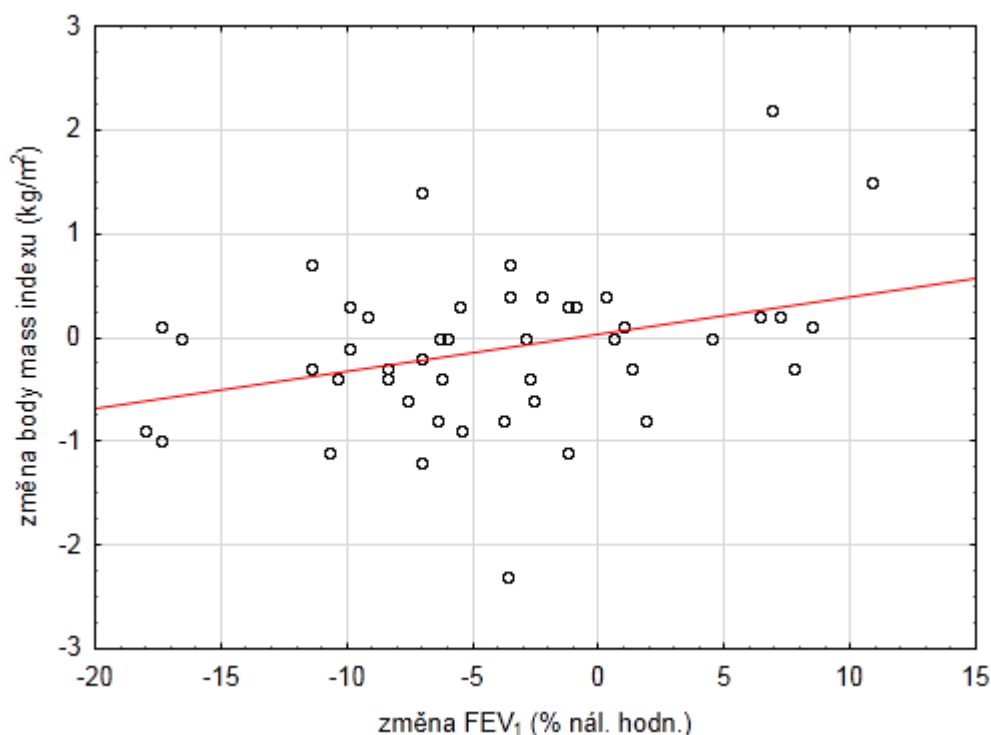
data jsou vyjádřena jako medián, mezikvartilové rozpětí a rozpětí

Graf 4.11. Rozdíly hodnot body mass indexu v období 2005-2010



data jsou vyjádřena jako medián, mezikvartilové rozpětí a rozpětí

Graf 4.12. Korelace změn hodnot FEV₁ a body mass indexu v období 2005-2006



Korelace (Spearmanův korelační koeficient) mezi hodnotami jednotlivých markerů OS v KVV v roce 2005 a vývojem hodnot FEV₁ a body mass indexu v období 2005-2010 ukazuje tabulka 4.8.

Tabulka 4.8. Korelace hodnot markerů oxidačního stresu a vývoje parametrů plicních funkcí a stavu výživy

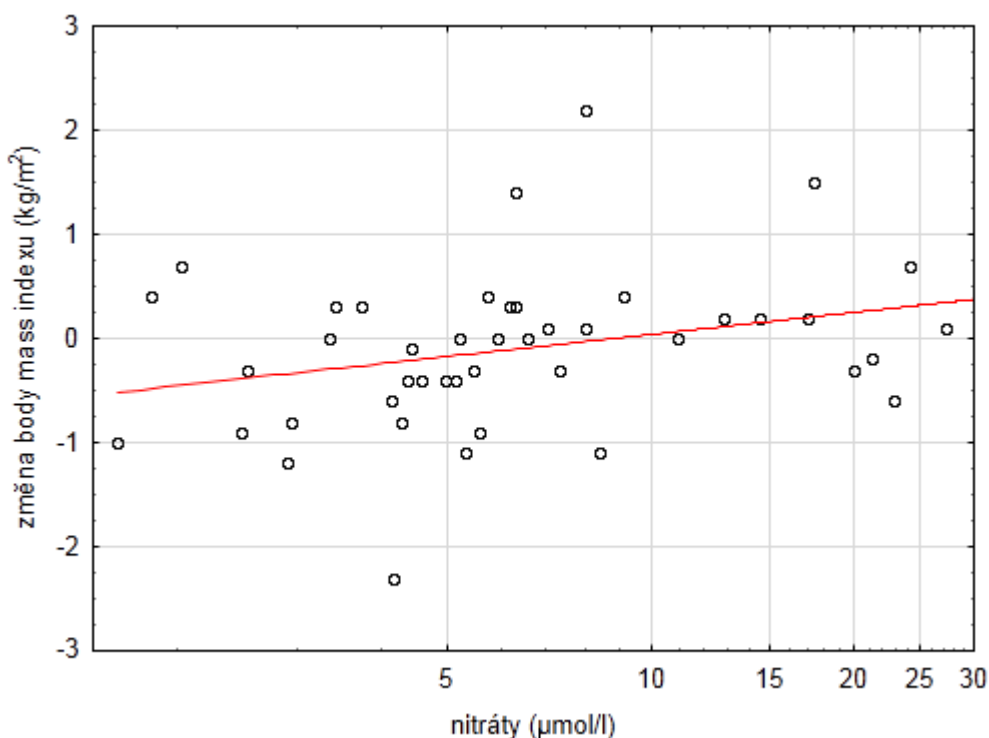
Parametr	Nitrity-KVV		Nitráty-KVV		8-isoprostan-KVV	
	r _s	p-hodnota	r _s	p-hodnota	r _s	p-hodnota
Změna FEV₁						
- 2005 - 2006	0,167	n.s.	0,041	n.s.	-0,337	0,033
- 2005 - 2008	0,288	0,065	0,110	n.s.	-0,106	n.s.
- 2005 - 2010	0,141	n.s.	0,348	0,038	-0,306	0,094
Změna BMI						
- 2005 - 2006	-0,191	n.s.	0,332	0,028	-0,055	n.s.
- 2005 - 2008	0,001	n.s.	0,192	n.s.	-0,045	n.s.
- 2005 - 2010	-0,057	n.s.	0,108	n.s.	-0,114	n.s.

zkratky viz Seznam zkratek

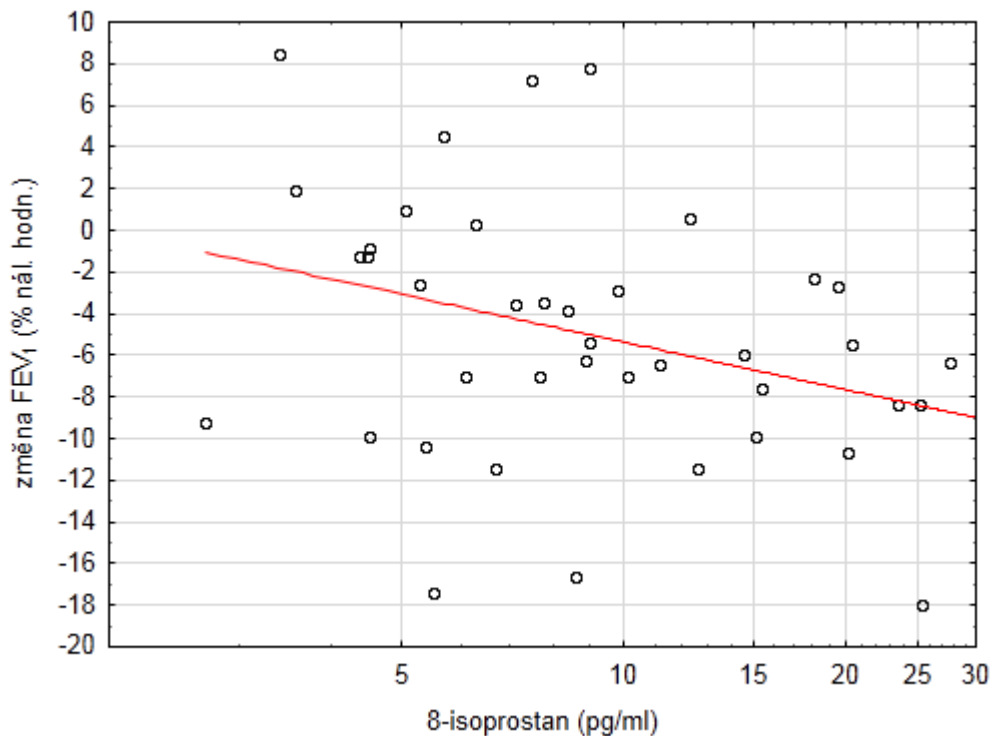
Ze 46 nemocných s CF zařazených do studie v roce 2005 pokračovalo v letech 2006, 2008 a 2010 celkem 44, 42 a 36 nemocných. Z nich byly dostupné hodnoty koncentrací nitritů a nitrátů v KVV ve všech případech, hodnoty koncentrace 8-isoprostanu v KVV byly v roce 2005 k dispozici u 40 nemocných, z nich pak v letech 2006, 2008 a 2010 pokračovalo ve studii 40, 39 a 33 nemocných.

Předpokládaný pokles hodnot korelačních koeficientů s prodlužující se dobou od výchozí studie nebyl s výjimkou koncentrace nitrátů v KVV a vývoje hodnoty body mass indexu prokázán. I zde však korelace dosáhla statistické významnosti jen v prvním roce dlouhodobé studie, viz rovněž graf 4.13. Překvapivý je nárůst hodnoty korelačního koeficientu v případě koncentrace nitrátů v KVV a vývoje hodnoty FEV₁, kdy v posledním roce sledování dokonce dosáhl statistické významnosti. Koncentrace nitritů v KVV nekorelovala s vývojem sledovaných parametrů, pouze v třetím roce se korelace blížila statistické významnosti v případě parametru FEV₁. Koncentrace 8-isoprostanu v KVV pak korelovala s vývojem hodnoty FEV₁ v prvním roce dlouhodobé studie (viz graf 4.14.) a blížila se statistické významnosti v roce pátém.

Graf 4.13. Korelace koncentrace nitrátů v kondenzátu vydechaného vzduchu a vývoje hodnoty body mass indexu v období 2005-2006



Graf 4.14. Korelace koncentrace 8-isoprostanu v kondenzátu vydechaného vzduchu a vývoje hodnoty FEV₁ v období 2005-2006

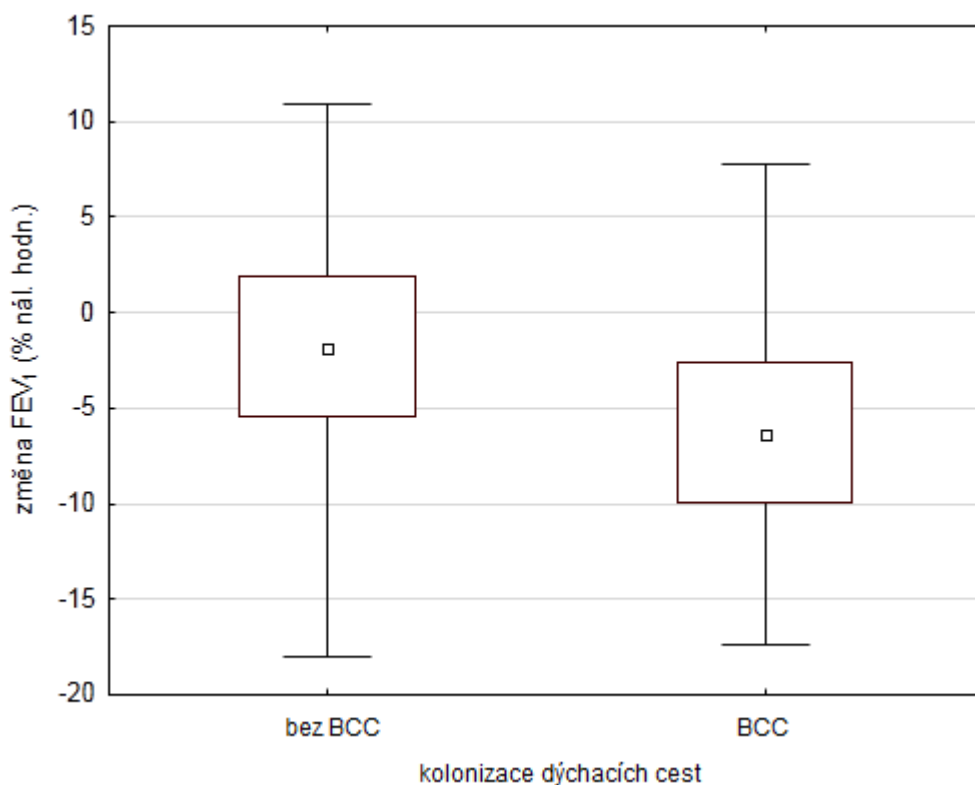


Vývoj plicních funkcí a stavu výživy byl dále hodnocen ve vztahu k pohlaví, věku, komonizaci komplexem *B. cepacia* a výchozím hodnotám FEV₁ a body mass indexu. Kategoriální faktory (pohlaví a kolonizace komplexem *B. cepacia*) byly hodnoceny pomocí Mann-Whitneyova testu, kontinuální proměnné (věk a výchozí hodnoty FEV₁ a body mass indexu) pomocí Spearmanova korelačního koeficientu.

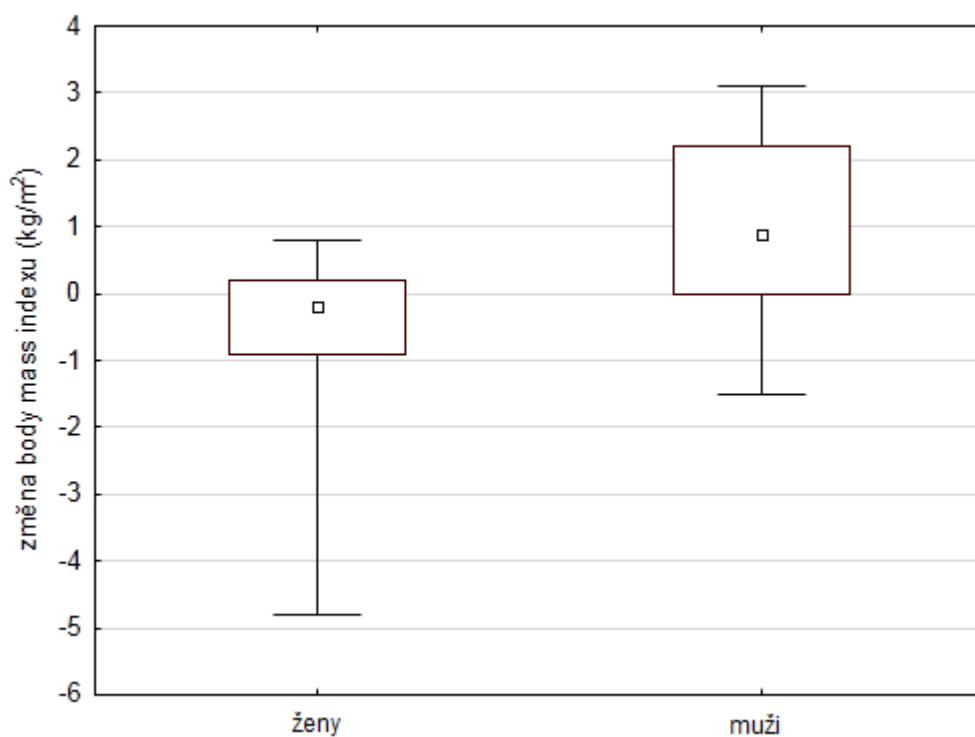
Změna FEV₁ v období 2005-2006 se významně lišila s ohledem na kolonizaci komplexem *B. cepacia*, kdy medián změny FEV₁ u nekolonizovaných činil -1,9 % nál. hodn., kdežto u kolonizovaných byl -6,4 % nál. hodn. ($p = 0,024$), viz graf 4.15. Změna body mass indexu v období 2005-2008 a 2005-2010 se lišila s ohledem na pohlaví, kdy medián změny body mass indexu u žen činil -0,5, resp. -0,2 kg/m², kdežto u mužů byl 0,3, resp. 0,9 kg/m² ($p = 0,003$, resp. 0,0024), viz graf 4.16. (období 2005-2010). Další signifikantní závislosti nebyly prokázány.

Současný vliv kategoriálních i kontinuálních proměnných byl hodnocen regresní analýzou pomocí metody krokových regresí. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.9., kde jsou zaznamenány hodnoty $p < 0,20$.

Graf 4.15. Změna hodnoty FEV₁ v období 2005-2006 v závislosti na kolonizaci komplexem *Burkholderia cepacia*



Graf 4.16. Změna hodnoty body mass indexu v období 2005-2010 v závislosti na pohlaví



data v grafech 4.15. a 4.16. jsou vyjádřena jako medián, mezikvartilové rozpětí a rozpětí

Tabulka 4.9. Regresní analýza závislostí změn hodnot FEV₁ a body mass indexu a klinických a laboratorních parametrů

Parametr	Změna FEV ₁		Změna body mass indexu	
	F	p-hodnota	F	p-hodnota
Pohlaví			7,281	0,011[†]
			13,50	<0,001[‡]
Kolonizace BCC			1,825	0,18*
Pohlaví + kolonizace BCC	2,371	0,14 [‡]		
Nitrity			2,684	0,11 [‡]
Nitráty			2,523	0,12*
8-isoprostan	4,980	0,032*		
	3,215	0,085 [‡]		

* období 2005-2006; [†] období 2005-2008; [‡] období 2005-2010; zkratky viz Seznam zkratk; ostatní proměnné (věk a výchozí hodnoty FEV₁ a body mass indexu) nedosáhly ani hraniční významnosti

Kromě signifikantních vztahů popsaných již výše (viz grafy 4.14. a 4.16.) představují ostatní výsledky uvedené v tabulce 4.9. pouze slabé závislosti, a to vztah kombinace kategoriálních faktorů (pohlaví a kolonizace komplexem *B. cepacia*) a vývoje hodnoty FEV₁, a dále vztah koncentrací nitritů a nitrátů v KVV a vývoje hodnoty body mass indexu.

Další analýzy se týkaly srovnání podskupiny žijících nemocných s poskupinou nemocných, kteří v průběhu dlouhodobé studie zemřeli nebo prodělali transplantaci plic. Analýza byla prováděna jednak za celou studii s využitím parametrů výchozí studie (2005), jednak s využitím rozdílových hodnot plicních funkcí a stavu výživy, a to ke zhodnocení výsledků nemocných v období 2008-2010 (rozdílové hodnoty v období 2005-2006), resp. 2010 (rozdílové hodnoty v období 2005-2008).

Hodnocení vlivu kategoriálních faktorů bylo provedeno pomocí Fisherova testu, hodnocení vlivu kontinuálních proměnných pomocí Mann-Whitneyova testu a hodnocení společného vlivu kategoriálních i kontinuálních parametrů pomocí regresní analýzy s využitím metody logistické regrese. Výsledky uvedených analýz jsou shrnuty v tabulce 4.10.

Tabulka 4.10. Vliv markerů oxidačního stresu v kondenzátu vydechaného vzduchu a dalších klinických a laboratorních parametrů na výsledky přežívání nemocných

Parametr	Fisherův test (p-hodnota)	Mann-Whitneyův test (p-hodnota)	Logistická regrese (p-hodnota)
Pohlaví	n.s.		n.s.
Kolonizace BCC	n.s.		0,16*
Pohlaví + kolonizace BCC			n.s.
Věk		n.s.	n.s.
Nitrity-KVV		n.s.	n.s.
Nitráty-KVV		n.s.	n.s.
8-isoprostan-KVV		n.s.	n.s.
FEV ₁ (2005)		<0,001	0,056
BMI (2005)		0,027	n.s.
Změna FEV ₁ (2005-2006)		n.s.	0,11
Změna BMI (2005-2006)		n.s.	n.s.
Změna FEV ₁ (2005-2008)		n.s.	0,19
Změna BMI (2005-2008)		n.s.	n.s.

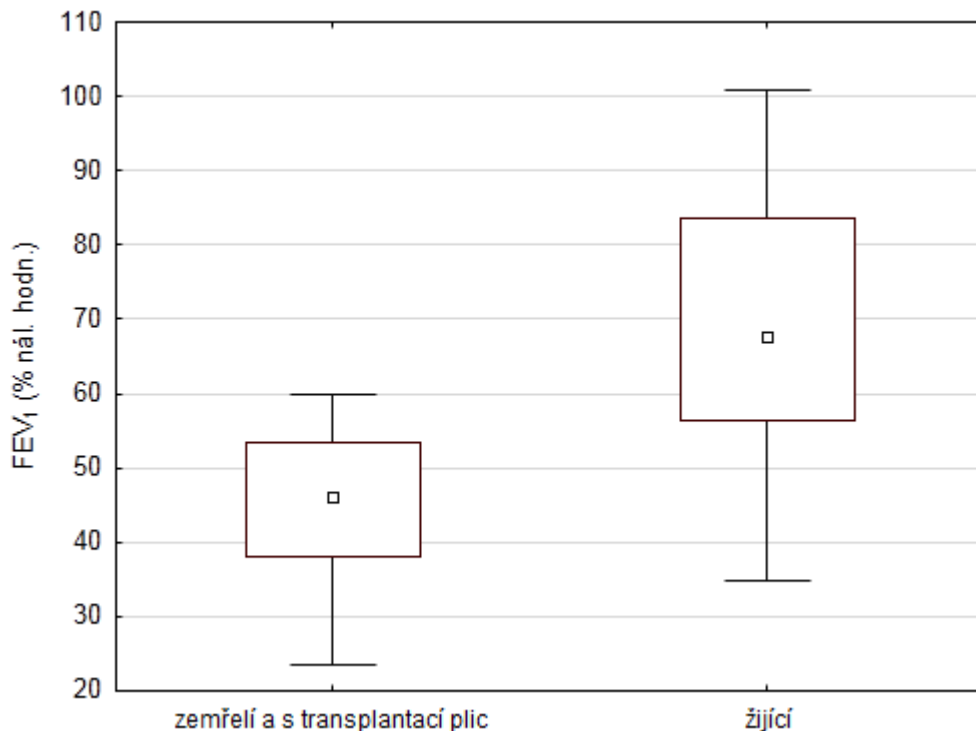
* v modelu s rozdíly hodnot 2005-2006 a výsledky v letech 2008-2010; zkratky viz Seznam zkratek

V modelu s hodnotami z výchozími studie se jako nejvýznamnější prediktor jeví hodnota FEV₁, (viz graf 4.17.), která je hraničně významná i regresní analýze. Izolovaně byla významná i hodnota body mass indexu.

V modelech s rozdílovými hodnotami plicních funkcí a stavu výživy se jako parametry s hraničním vlivem prezentovaly rozdílové hodnoty FEV₁, a to v obou případech. V modelu s hodnotami z let 2005-2006 měla hraniční vliv i kolonizace komplexem *B. cepacia*.

Naproti tomu markery OS v KVV neměly prognostický význam pro predikci úmrtí nebo nutnosti transplantace plic, a to ve všech modelech, jak při hodnocení jednotlivých faktorů, tak v regresní analýze.

Graf 4.17. Srovnání hodnot FEV₁ v roce 2005 u žijících nemocných a u nemocných zemřelých a s trasplantací plic během 2006-2010



data jsou vyjádřena jako medián, mezikvartilové rozpětí a rozpětí

Dlouhodobá studie prokázala korelace markerů OS v KVV a změn sledovaných klinických parametrů v prvním roce studie, kdy změna body mass indexu korelovala s koncentrací nitrátů v KVV a změna FEV₁ s koncentrací 8-isoprostanu v KVV. Dále oproti očekávání korelovala koncentrace nitrátů v KVV se změnou FEV₁ v pátém roce studie. Jiné signifikantní výsledky prokázány nebyly, hraničních p-hodnot nabyly korelace změny FEV₁ a koncentrace 8-isoprostanu v KVV v pátém roce studie a koncentrace nitritů v KVV ve třetím roce studie.

Regresní analýza potvrdila zjištěnou korelaci změny FEV₁ s koncentrací 8-isoprostanu v KVV v prvním roce studie. Korelace změny body mass indexu s koncentrací nitrátů v KVV v prvním roce se pouze blížila statisticky významné úrovni, stejně tak tomu bylo v případě závislosti změny FEV₁ na koncentrací 8-isoprostanu v KVV a změny body mass indexu na koncentraci nitritů v KVV v pátém roce projektu.

Významnější vliv na vývoj parametrů plicních funkcí a stavu výživy měly další sledované faktory, a to zejména kolonizace komplexem *B. cepacia* na změnu FEV₁ v prvním roce studie a vliv pohlaví na změnu body mass indexu ve třetím a pátém roce studie. Regresní analýza potvrdila dominantní vliv pohlaví na vývoj hodnot body mass indexu, vliv kolonizace komplexem *B. cepacia* na změnu FEV₁ v prvním roce studie potvrzen nebyl.

V analýzách vlivu markerů OS v KVV na predikci úmrtí nebo nutnosti provedení transplantace plic nebyly zjištěny signifikantní vlivy. Z dalších klinických a laboratorních faktorů měla dominantní vliv hodnota FEV₁, a to především její výchozí hodnota.

Výsledky dlouhodobé studie týkající se vztahu koncentrace 8-isoprostanu v KVV a poklesu hodnot FEV₁ u nemocných s kolonizací kmenem ST-32 *B. cenocepacia* byly přijaty k publikaci v časopise **Folia Microbiologica (2011 impakt faktor 0,677)**. Materiál *in extenso* včetně potvrzení o přijetí viz příloha 10.2.

4.4. Intervenční studie

Demografická data souboru nemocných s CF a kontrolního souboru jsou uvedena v tabulce 4.11. Soubory se statisticky významně nelišily ve složení podle pohlaví (Fisherův test; $p = 0,67$), věk kontrolního souboru byl signifikantně vyšší (t-test; $p = 0,012$).

Tabulka 4.11. Demografická data účastníků intervenční studie

Parametr	Nemocní s CF	Kontrolní soubor
Věk (roky)*	23,4 ± 3,8	27,2 ± 2,7
Pohlaví (ženy / muži)	5 / 5	8 / 4
Kolonizace dýchacích cest		n.a.
- <i>Staph. aureus</i>	2	
- <i>P. aeruginosa</i>	2	
- komplex <i>B. cepacia</i>	6	

* průměr ± směrodatná odchylka; zkratky viz Seznam zkratk

Hodnoty markerů OS a zánětu v KVV u nemocných s CF (před a po léčbě inhalačními kortikosteroidy) a u členů kontrolního souboru jsou uvedeny v tabulce 4.12.

Signifikantní rozdíly (t-test) byly zjištěny v těchto parametrech: koncentrace nitrátů v KVV u nemocných s CF před a po léčbě inhalačními kortikosteroidy ($p = 0,003$), hodnota pH KVV u nemocných s CF před a po léčbě inhalačními kortikosteroidy ($p = 0,005$), koncentrace nitrátů v KVV u nemocných s CF oproti kontrolnímu souboru, a to před léčbou ($p < 0,001$) i po léčbě ($p = 0,046$) inhalačními kortikosteroidy a hodnota pH KVV u nemocných s CF před léčbou inhalačními kortikosteroidy oproti kontrolnímu souboru ($p = 0,01$).

Tabulka 4.12. Hodnoty markerů oxidačního stresu a zánětu v kondenzátu vydechaného vzduchu u nemocných s cystickou fibrózou a u kontrolního souboru

Parametr	Nemocní s CF		Kontrolní soubor
	<i>Před léčbou IKS</i>	<i>Po léčbě IKS</i>	
pH-KVV*	5,49 ± 0,68	6,17 ± 0,31	6,11 ± 0,31
Nitrity-KVV (μmol/l)*	2,7 ± 1,6	3,6 ± 1,5	2,9 ± 1,5
Nitráty-KVV (μmol/l)*	7,3 ± 1,8	20,9 ± 10,0	39,5 ± 24,8

* průměr ± směrodatná odchylka hodnot; zkratky viz Seznam zkratek

Další sledované klinické a laboratorní parametry před a po léčbě inhalačními kortikosteroidy nevykazovaly statisticky významné rozdíly (hodnota FEV₁ a body mass indexu, koncentrace C-reaktivního proteinu v séru a počet neutrofilů v periferní krvi). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.13.

Tabulka 4.13. Vývoj parametrů plicních funkcí, stavu výživy a systémových zánětlivých markerů u nemocných s cystickou fibrózou před a po léčbě inhalačními kortikosteroidy

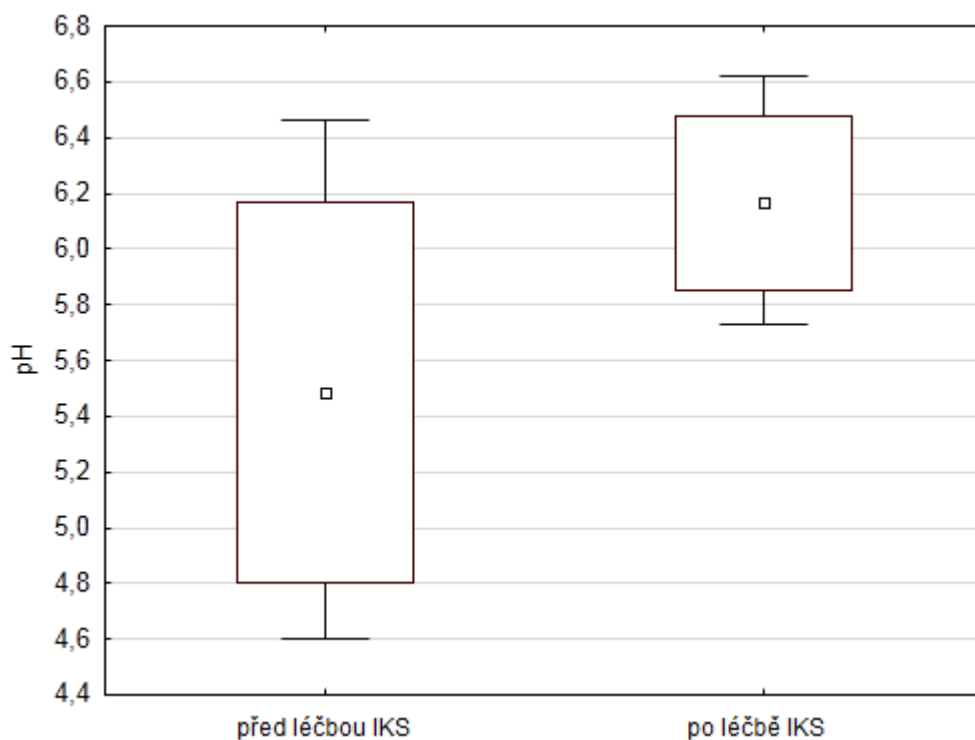
Parametr	Nemocní s CF		p-hodnota
	<i>Před léčbou IKS</i>	<i>Po léčbě IKS</i>	
FEV1 (% nál. hodn.)*	73,7 ± 16,2	74,1 ± 16,3	n.s.
Body mass index (kg/m ²)*	21,3 ± 1,8	21,2 ± 1,6	n.s.
C-reaktivní protein-S (mg/l)*	6,3 ± 2,1	6,6 ± 2,7	n.s.
Počet neutrofilů-K (x 10 ⁹ /l)*	6,2 ± 4,7	8,3 ± 7,8	n.s.

* průměr ± směrodatná odchylka hodnot; S...sérum; K...periferní krev; zkratky viz Seznam zkratek

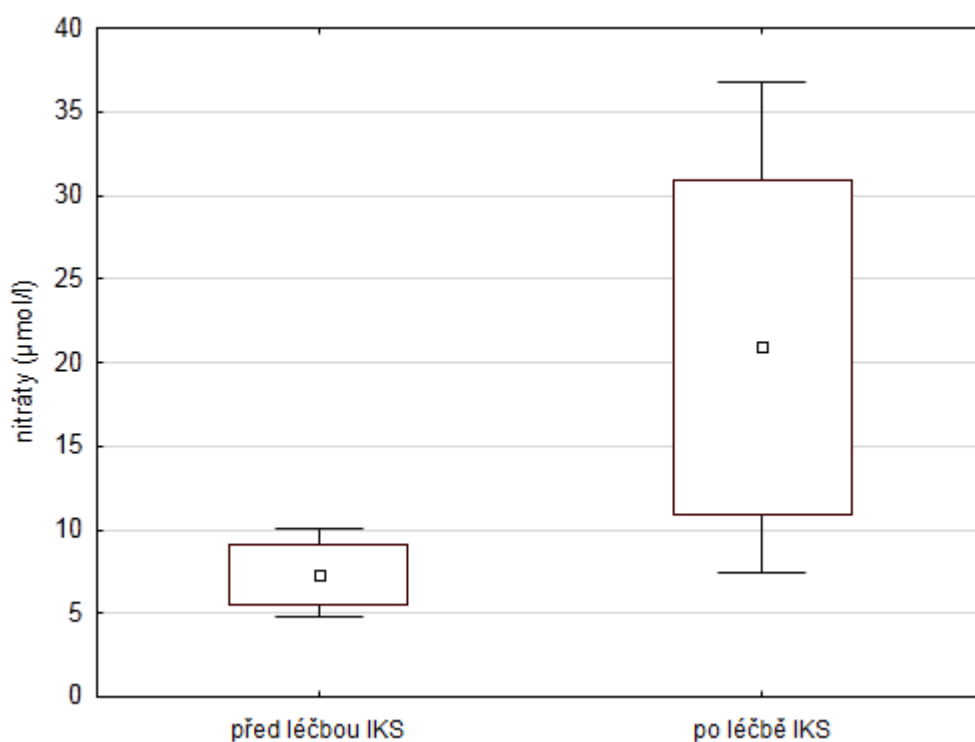
Vývoj hodnot pH KVV a koncentrace nitrátů v KVV u nemocných s CF před a po léčbě inhalačními kortikosteroidy je vyznačen v grafech 4.18. a 4.19.

Intervenční studie provedená v roce 2006 potvrdila výsledky z roku 2005 ohledně rozdílu koncentrací nitritů a nitrátů v KVV mezi nemocnými s CF a kontrolním souborem. Prokázala rovněž nižší pH KVV u nemocných s CF oproti kontrolám jako známku zánětlivé acidifikace dýchacích cest.

Graf 4.18. Vývoj hodnot pH kondenzátu vydechaného vzduchu u nemocných s cystickou fibrózou před a po léčbě inhalačními kortikosteroidy



Graf 4.19. Vývoj hodnot koncentrací nitrátů v kondenzátu vydechaného vzduchu u nemocných s cystickou fibrózou před a po léčbě inhalačními kortikosteroidy



data v grafech 4.18. a 4.19. jsou vyjádřena jako průměr, směrodatná odchylka a rozpětí; zkratky viz Seznam zkratek

Po tříměsíční léčbě inhalačními kortikosteroidy (budesonid 800 µg 2x denně) se u nemocných s CF signifikantně změnila hodnota pH KVV a koncentrace nitrátů v KVV, koncentrace nitritů v KVV nebyla statisticky významně ovlivněna.

V srovnání s kontrolním souborem se po léčbě inhalačními kortikosteroidy hodnota pH KVV již významně nelišila, naproti tomu koncentrace nitrátů v KVV zůstávala signifikantně nižší.

Výsledky intervenční studie byly v roce 2008 publikovány v recenzovaném časopise *Studia Pneumologica et Phthiseologica* (Fila L. *et al.*, 2008).

Diskuze

K odběru KVV byl v tomto projektu použit kondenzátor ECoScreen (Jaeger, Spolková republika Německo). V době zahájení výzkumu (rok 2005) byly k dispozici kromě přístrojů domácí výroby pouze dva komerčně dostupné kondenzátory; kromě námi zvoleného aparátu šlo ještě o přístroj RTube (Respiratory Research, Spojené státy americké). Srovnání těchto dvou komerčně dostupných přístrojů bylo publikováno v roce 2006, kdy přístroj ECoScreen umožňoval odběr větších objemů KVV a citlivější detekci lipidových a proteinových mediátorů (Soyer O.U. *et al.*, 2006). V současnosti je uznáváno, že technické parametry kondenzátoru a vlastnosti různých druhů odběrových nádobek (sklo, plast) mohou podstatným způsobem ovlivit záchyt i koncentrace biomarkerů KVV (Dompeling E. *et al.*, 2010).

Zvolené biomarkery OS v KVV v tomto projektu zahrnovaly nitrity a nitráty jako oxidační produkty oxidu dusnatého a 8-isoprostan jako produkt neenzymatické oxidace kyseliny arachidonové. Jejich problematika je diskutována již v kapitolách 1.4.2.1. a 1.4.3.1. Jako další markery OS byly v KVV u CF studovány peroxid vodíku a 3-nitrotyrosin. Rovněž problematika těchto biomarkerů je podrobněji zmíněna v předchozích kapitolách (1.4.1. a 1.4.2.2.). Koncentrace peroxidu vodíku v KVV je v stabilizované fázi plicního onemocnění u CF obdobná jako u kontrol, nekoreluje s hodnotami plicních funkcí a stoupá v období plicních exacerbací (Jöbsis Q. *et al.*, 2000, Worlitzsch D. *et al.*, 2001). Peroxid vodíku tedy není optimálním markerem OS u CF a pro tento projekt nebyl použit. Naproti tomu, 3-nitrotyrosin je ve stabilní fázi plicního onemocnění u dospělých CF v KVV oproti kontrolám zvýšen a koreluje s hodnotou FEV₁ (Balint B. *et al.*, 2001). Pozitivní korelace s hodnotou FEV₁ je obdobná našim výsledkům v případě nitrátů v KVV a bude diskutována níže. Do tohoto projektu nebylo hodnocení 3-nitrotyrosinu zařazeno pro jeho nízkou detekabilitu (<50 % případů) v KVV v našich podmínkách (Musil J. *et al.*, 2008). Nízký záchyt biomarkerů v KVV jsme zaznamenali rovněž u nitrosotiolů, glutationu, interleukinu 6, interleukinu 8 a neutrofilní elastázy (Musil J. *et al.*, 2008, Fila L. *et al.*, 2008). Velmi dobrý záchyt jsme naopak zjistili u dalších markerů zánětu, a to leukotrienu B4 a u prostaglandinu E2 (Musil J. *et al.*, 2008, Fila L. *et al.*, 2009). S problémem nízkého záchyty cytokinů v KVV se lze setkat i v dalších pracech, a to bez ohledu na použitý typ kondenzátoru (Rosias P.P. *et al.*, 2004, Roebroeks C.M. *et al.*, 2008). V případě 8-isoprostanu byl dále popsán lepší záchyt při použití skleněného (borosilikátové sklo) nebo silikonového povrchu kondenzátoru oproti ostatním typům včetně kondenzátoru ECoScreen, který využívá modifikovaný teflon (Rosias P.P. *et al.*, 2006).

Výchozí studie hodnotila vztahy markerů oxidačního stresu v KVV s aktuálními klinickými a laboratorními parametry. Plicní postižení bylo hodnoceno pomocí funkčního vyšetření, kdy sledovaným parametrem byla hodnota FEV₁ v % náležitých hodnot, což je v klinických studiích i registrech nemocných nejčastěji hodnocený parametr z důvodu nízké variability a dobré reprodukovatelnosti (Cochrane G.M. *et al.*, 1977), a dále pomocí zobrazovacích metod a to Northern skóre kalkulovaného ze zadopředního skiagramu hrudníku. Toto skóre má oproti dalším skórovacím systémům výhodu v nižší radiační zátěži (postačuje skiagram v zadopřední projekci) a dobře koreluje se spirometrickými parametry (Terheggen-Lagro S. *et al.*, 2003). Stav výživy byl hodnocen pomocí BMI a koncentrace sérového albuminu. V obou případech jde o běžně sledované parametry u dospělých nemocných s CF (Sinaasappel M. *et al.*, 2002). U nemocných s CF jsou stav plicních funkcí a stav výživy „spojené nádoby“ a vzájemně spolu korelují, což bylo dokumentováno v dětském i dospělém věku (Milla C.E. 2004, Fila L. *et al.*, 2009). Albumin je rovněž hlavním sérovým antioxidantem (Racek J. 2003) a v případě malnutrice se jeho sérové koncentrace snižují. Vztah dalších sérových antioxidantů, a to vitamínu E a β -karotenu, k markerům OS v KVV jsme studovali proto, že tyto antioxidanty jsou u CF rovněž potenciálně snižené při malabsorpci tuků při pankreatické insuficienci (Sinaasappel M. *et al.*, 2002). Další studované parametry ve vztahu k markerům OS v KVV zahrnovaly markery systémové zánětlivé odezvy na bronchopulmonální infekci, kdy doprovodný neutrofilní zánět je hlavním zdrojem oxidačního stresu. Studovány byly sérový CRP a imunoglobulinu G a počet neutrofilů v periferní krvi. Tyto markery u nemocných CF korelují s hodnotou FEV₁ (Levy H. *et al.*, 2007), sérová koncentrace imunoglobulinu G pak s hodnotou Northern skóre (Terheggen-Lagro S. *et al.*, 2003) a rovněž s rizikem úmrtí v průběhu dvou let (Hodson M.E. *et al.*, 1988).

Dlouhodobá studie hodnotila vývoj dvou klinických parametrů, a to stavu plicních funkcí (hodnota FEV₁) a stavu výživy (hodnota BMI) v krátkodobé a střednědobém horizontu. Uvedené parametry jsou nejdůležitější sledované veličiny a jsou zveřejňovány v registrech nemocných s CF. U BMI jsou navíc stanoveny cílové hodnoty (dolní hranice), o jejichž dosažení je třeba při péči o nemocné usilovat (CFF Patients Registry, 2011). Spolu s vývojem stavu plicních funkcí jsme hodnotili i riziko úmrtí a/nebo transplantace plic v průběhu studie. Obě tyto situace jsou v úzkém vztahu s bronchopulmonálním onemocněním u CF, které je zodpovědné za 85 % případů mortality těchto nemocných (Flume P.A. *et al.*, 2007). Studie hodnotící rizikové faktory jak poklesu plicních funkcí, tak mortality u nemocných s CF byly opakovaně publikovány (Kerem E. *et al.*, 1992, Liou T.G. *et al.*, 2001, Mayer-Hamblett N. *et al.*, 2002, Konstan M.W. *et al.*, 2007, Konstan M.W. *et al.*, 2012). Uvedené práce se však liší

množstvím analyzovaných proměnných. V naší studii jsme k hodnocení využili vedle markerů oxidačního stresu a výchozích/rozdílových hodnot FEV₁ a BMI i další běžně sledované klinické parametry: pohlaví, věk a dominantní patogen kolonizace dýchacích cest. Zahrnutí většího počtu proměnných do regresních analýz by bylo vzhledem k velikosti našeho souboru problematické. Rozsah souboru s ohledem na počet proměnných může být u regresních analýz obtížné stanovit. Nicméně, situace v naší studii je obdobná jako v již publikovaných pracech, např. Papaioannou *et al.* (Papaioannou A.I. *et al.*, 2009) analyzovali sedm proměnných v souboru čtyřiceti osob.

Intervenční studie hodnotila vliv léčby IKS na koncentraci nitritů a nitrátů v KVV. Podávání těchto léků je u CF předmětem kontroverzních názorů. Jde léčbu často podávanou, ale stejně často kritizovanou jako neúčinnou. Některé práce prokazují přínos podávání IKS, jiné nikoli (Balfour-Lynn I.M. *et al.*, 1997, Nikolaizik W.H., Schöni M.H. 1996, Wojtczak H.A. *et al.*, 2001). Vcelku se připouští přínos u pacientů se suspekci na současné astma bronchiale („CF-astma“), kde je doporučován terapeutický pokus s IKS ve vysoké dávce (Balfour-Lynn I.M. 2003). Další indikací podání IKS u CF je alergická bronchopulmonální aspergilóza (vyskytuje se u asi 10 % nemocných s CF), kde jsou podávány s cílem umožnit snížení dávky systémových kortikosteroidů (Stevens D.A. *et al.*, 2003).

Role IKS v léčbě nemocí s eosinofilním zánětem je obecně známá. IKS snižují expresi NOS a hodnotu vydechaného NO u nemocných s bronchiálním astmatem. U alergického astmatu je hodnota vydechaného NO užitečným markerem aktivity onemocnění (Turner S. 2008). Avšak u CF jde o neutrofilní zánět a hodnota vydechaného NO je oproti zdravým osobám u dospělých pacientů snížena (Hofer M. *et al.*, 2009). Mají tedy IKS místo v léčbě plicního onemocnění u CF s ohledem na povahu zánětu a skutečnost, že deficeence NO je pravděpodobným patogenetickým mechanismem (viz kapitola 1.4.2.) ? Přispět k odpovědi na tuto otázku jsme se pokusili pomocí intervenční studie, kde byla kromě koncentrace nitritů a nitrátů studována i hodnota pH KVV před a po léčbě IKS. pH metr byl na našem pracovišti dostupný od roku 2006 a umožňoval tak měření pH EBC bezprostředně po odběru. Nebylo tak nutno provádět deaeraci vzorků probubláváním inertním plynem (obvykle argonem se zbavením vzorku volatilních molekul jako je CO₂ a NH₃). Tato procedura umožňuje delší skladování zamražených vzorků KVV před vyšetřením pH, které zůstává stabilní (Bikov A. *et al.* 2010). Dle našeho názoru však tento postup vede ke ztrátě části informací o složení vzorků a okamžité vyšetření pH bez deaerace realističtěji odráží složení periciliární tekutiny. V naší studii sloužilo pH KVV jako marker zánětlivé acidifikace dýchacích cest (Tate S. *et al.* 2002).

Zjištěné koncentrace nitritů a nitrátů v KVV v naší studii byly obdobné hodnotám uváděným jinými autory (Balint B. *et al.*, 2001, Csoma Z. *et al.*, 2003) při použití stejné metodiky vyšetření. Naproti tomu jsme zaznamenali nižší koncentrace i nižší záchyt 8-isoprostanu v KVV u nemocných s CF i u kontrolního souboru oproti literárním údajům (Montuschi P. *et al.*, 2000, Lucidi V. *et al.*, 2008). V uvedených pracech byl však použit skleněný kondenzátor. Rovněž Roebroeksová *et al.* (Roebroeks C.M. *et al.*, 2008) použili skleněný kondenzátor a navíc modifikovali dolní detekční limit pro stanovení 8-isoprostanu, a to na 0,5 pg/ml (v naší studii byly kalibrační křivky konstruovány pro dolní detekční limit 2,0 pg/ml). Tito autoři dosáhli 100% detekovatelnost 8-isoprostanu v KVV u nemocných s CF i u kontrol. Jeho koncentrace však byly nižší než v našem souboru.

Ve srovnání s kontrolním souborem byly u nemocných s CF v KVV v naší studii zjištěny obdobné koncentrace nitritů, nižší koncentrace nitrátů a zvýšené koncentrace 8-isoprostanu. Tyto výsledky jsou v souladu s pracemi jiných autorů (viz tabulka 1.1.). Nebyly zjištěny rozdíly v hodnotách markerů OS v KVV s ohledem na pohlaví, kolonizaci dýchacích cest a léčbu IKS u nemocných s CF. Z ostatních sledovaných parametrů je třeba zdůraznit nižší koncentraci albuminu v séru u žen a pokročilejší plicní onemocnění (nižší hodnota FEV₁ a vyšší hodnota Northern skóre) spolu s výraznější systémovou zánětlivou odezvou (vyšší koncentrace IgG v séru a počet neutrofilů v krvi) v podskupině nemocných léčených IKS. Tyto rozdíly se však na koncentracích markerů OS v KVV v této studii neprojeví. Sami jsme však zachytili v malém souboru vyšší koncentrace malondialdehydu v KVV u žen s CF oproti mužům (Fila L. *et al.*, 2005). Lze spekulovat, že tato skutečnost má vztah k nižším koncentracím albuminu jako hlavního antioxidantu v séru u žen s CF. Problematika léčby IKS bude podrobněji diskutována níže (oddíl věnovaný intervenční studii).

Výchozí studie hodnotila vztah markerů OS v KVV k parametrům stavu plicního onemocnění a stavu výživy a dále k systémovým antioxidantům a parametrům zánětu. Koncentrace nitritů a 8-isoprostanu v KVV s uvedenými klinickými parametry nekorelovaly. U nitritů jde o nález zjištěný i dalšími autory. Naopak, v případě 8-isoprostanu další autoři korelace s plicními funkcemi i rentgenovým skóre zachytili (viz kapitola 1.6.).

Korelace koncentrace nitrátů v KVV s klinickými parametry dosud studována nebyla. Prokázali jsme nižší koncentrace v případě pokročilejšího plicního onemocnění, a to jak v případě plicních funkcí, tak v případě rentgenového skóre. Rentgenové Northern skóre navíc jako jediný faktor signifikantně korelovalo s koncentrací nitrátů v KVV při regresní

analýze zahrnující rovněž vliv pohlaví, kolonizace dýchacích cest a léčbu IKS. Naše výsledky jsou v souladu s prací Balinta *et al.* (Balint B. *et al.*, 2001), kdy bylo pokročilejší plicní onemocnění provázeno nižšími koncentracemi NO₂-Tyr v KVV. To také odpovídá klesajícím hodnotám eNO při progresi plicního postižení. Zjednodušeně řečeno, vzniknout může jen takové množství nitrátů, kolik NO se vyprodukuje (a je oxidováno). Z toho pohledu lze u CF považovat 8-isoprostan za vhodnější marker OS než metabolity NO.

V případě nitrátů je situace navíc komplikována nutričními a dalšími vlivy. Alimentární zdroje a bakteriální metabolismus již byly zmíněny v kapitole 1.4.2.1. V experimentu na krysím modelu bylo dále prokázáno, že proteinová malnutrice snižuje aktivitu NO syntetáz (Wu G. *et al.*, 1999). U *CFTR* deficientní myši navíc vedla proteino-kalorická malnutrice k nižší produkci nitritů v plicích (Yu H. *et al.*, 2000). Námi zjištěná korelace koncentrace nitrátů v KVV s parametry stavu výživy je tedy v souladu s uvedenými pozorováními. Pozitivní korelace byla zachycena v případě sérového albuminu a hraniční závislost ($p = 0,068$) také v případě body mass indexu. Stejně jako v případě pokročilosti plicního onemocnění však tyto korelace svědčí spíše pro vztah k úrovni produkce NO než ke stupni oxidačního stresu.

Kromě albuminu jako hlavního sérového antioxidantu byly studovány ještě vztahy koncentrací vitamínu E a β -karotenu v séru a markerů OS v KVV. Vitamin E a β -karoten jsou antioxidanty rozpustné v tucích a jejich hladiny mohou být u nemocných s CF z důvodu malabsorpce snižené. Jejich korelace s koncentracemi markerů OS v KVV jsme však neprokázali. A to ani v případě 8-isoprostanu, přestože se vitamin E i β -karoten uplatňují především při antioxidační ochraně lipidových komponent buněčných membrám (Štípek S. 2000).

Oproti systémovým antioxidantům byly korelace koncentrace nitrátů v KVV se markery systémového zánětu prokázány, a to negativní. Signifikantní byla korelace s koncentrací sérového C-reaktivního proteinu; hraniční byly korelace s koncentrací imunoglobulinu G ($p = 0,089$) a s počtem neutrofilů ($p = 0,066$). Hodnoty systémových zánětlivých parametrů v našem souboru by se nicméně mohly zdát příliš vysoké na klidovou fázi onemocnění a být tak považovány za závažnou limitaci studie. Je však třeba vzít v úvahu skutečnost, že 87 % pacientů v souboru bylo kolonizováno *P. aeruginosa* nebo komplexem *B. cepacia*, obvykle se známkami chronické infekce dýchacích cest. Takto vysoké zastoupení rezistentních gramnegativních bakteriálních agens je u dospělých nemocných s CF běžné (CFF Patients Registry, 2011) a rovněž v pracích jiných autorů se lze setkat se zvýšenými koncentracemi C-reaktivního proteinu v séru i v klidové fázi onemocnění. Např. ve známé „azitromycinové

studii“ (Wolter J. *et al.*, 2002) byl medián koncentrace C-reaktivního proteinu v séru (10,0 mg/l) u nemocných s chronickou kolonizací *P. aeruginosa* obdobný našim hodnotám (9,5 mg/l). Rovněž v práci Hendryho *et al.* (Hendry J. *et al.*, 2000) byly u dospělých nemocných s kolonizací komplexem *B. cepacia* koncentrace C- reaktivního proteinu (medián 10,4 mg/l) obdobné jako v naší studii. Data ohledně korelací markerů OS v KVV a systémových markerů zánětu z publikací jiných autorů jsou dostupná jen řídko. Např. Ho *et al.* (Ho L.P. *et al.*, 1998) prokázali pozitivní korelaci koncentrace nitritů v KVV s počtem neutrofilů v periferní krvi. Uvedenou korelaci však naše studie nepotvrdila.

Dlouhodobá studie hodnotila vývoj plicních funkcí a stavu výživy a rovněž riziko úmrtí či nutnosti transplantace plic u nemocných s CF v závislosti na výchozích hodnotách markerů OS v KVV a na dalších klinických parametrech. Jak již bylo zmíněno výše, plicní funkce a stav výživy jsou u nemocných s CF v těsném vztahu. V našem souboru jsme tuto závislost rovněž potvrdili, a to v letech 2005, 2006 a 2008. V roce 2010 při úbytku počtu nemocných z důvodu úmrtí či transplantace plic byla korelace pouze hraniční ($p = 0,065$). Korelace rozdílových hodnot oproti roku 2005 dosáhla statistické významnosti pouze v jednoročním odstupu. V tří- a pětiletém odstupu korelace změn plicních funkcí a stavu výživy statisticky významná nebyla, a to pro relativně zachovalý stav výživy nemocných i přes pokles plicních funkcí. V roce 2010 došlo ve srovnání s rokem 2005 dokonce ke zlepšení mediánu hodnot body mass indexu ($+0,15 \text{ kg/m}^2$), přestože medián hodnoty FEV_1 se zhoršil o 10,5 % náhl. hodn. Za tuto situaci je zodpovědná jednak skutečnost, že nemocní s nejtěžšími formami onemocnění v průběhu sledování zemřeli, a jednak to, že v subpopulaci mužů došlo ke zlepšení stavu výživy u 75 % případů. V regresní analýze bylo také pohlaví jediným signifikantním prediktorem vývoje stavu výživy. Vysvětlení pro tyto nálezy není jednoduché. Literární data o vývoji stavu výživy u dospělých nemocných s CF v závislosti na pohlaví nejsou dostupná. Může se však jednat o určité „české specifikum“, neboť podobně neočekávané výsledky zjistili Musil *et al.* (Musil J. *et al.*, 1997) u další chronické nemoci dýchacího ústrojí spojené s nutričními abnormalitami, a to chronické obstrukční plicní nemoci (CHOPN). I zde lze očekávat zhoršující se stav výživy s progresí obstrukce dýchacích cest. V uvedené práci převažovali muži (35 mužů oproti 15 ženám) a i v případě těžších ventilačních poruch ($FEV_1 < 50 \%$ náhl. hodn.) se hodnoty body mass indexu pohybovaly v pásmu nadváhy až obezity (body mass index $> 25,0 \text{ kg/m}^2$) u 46,2 % případů, kdežto nízký stav výživy (body mass index $< 20,0 \text{ kg/m}^2$) byl přítomen u pouze 19,2 % nemocných. Literární údaje při tom uvádějí vyšší výskyt malnutrice u nemocných s CHOPN, a to 25-40 % v případě $FEV_1 < 50 \%$ náhl. hodn. (Anker S.D. *et al.*, 2006). Roli zde mohou hrát české

stravovací zvyklosti či sedavější způsob života mužů v Česku oproti vyspělým západním demokraciím.

Prediktivní faktory poklesu plicních funkcí a mortality u nemocných s CF byly opakovaně studovány. Již v roce 1992 publikovali Kerem *et al.* (Kerem E. *et al.*, 1992) zásadní práci, kde ukázali, že nemocní s $FEV_1 < 30\%$ nál. hodn. mají 50% riziko úmrtí v průběhu dvou let. Toto kritérium je dodnes používáno při indikaci transplantace plic u pacientů s CF. Následující práce používali mnohem komplikovanější modely predikce, ale např. Mayerová-Hamblettová *et al.* (Mayer-Hamblett N. *et al.*, 2002) nedocílili lepší predikce dvouleté mortality než pomocí uvedeného jednoduchého „ FEV_1 -kritéria“. Liou *et al.* (Liou T.G. *et al.*, 2001) vyvinuli a validovali model pětiletého přežití u nemocných s CF zahrnující věk, pohlaví, hodnotu FEV_1 , stav výživy, pankreatickou suficienci, diabetes mellitus, infekci *Staph. aureus* a komplexem *B. cepacia* a počet plicních exacerbací za rok. V tomto modelu měla na přežití největší vliv infekce komplexem *B. cepacia*.

Predikci vývoje hodnot FEV_1 studovali na rozsáhlém souboru nemocných v registru americké CF Foundation v dětské i dospělé populaci Konstan *et al.* U dětí a adolescentů ve věku 6-17 let činil roční pokles FEV_1 1,12 % až 2,39 % nál. hodn. v závislosti na věkové skupině. Ve všech věkových skupinách byl rychlejší pokles FEV_1 spojen s vyšší výchozí hodnotou FEV_1 a s perzistujícím poslechovým plicním nálezem chrůpků. V některých věkových skupinách se jako rizikové faktory rychlejšího poklesu FEV_1 uplatnily i pohlaví (strmější pokles u dívek), infekce *P. aeruginosa*, stav výživy, expektorace sputa, poslechový plicní nález pískotů, sinusitidy, plicní exacerbace léčené nitrožilními antibiotiky, vyšší jaterní testy a pankreatická insuficience (Konstan M.W. *et al.*, 2007). U dospělých ve věku 18-24 let činil roční pokles FEV_1 1,92 % nál. hodn. Rychlejší pokles měli ženy a jedinci s pankreatickou insuficiencí, infekcí komplexem *B. cepacia* a/nebo multirezistentní či mukoidní *P. aeruginosa* a s chronickým kašlem. Ve věkové skupině 25 a více let činil roční pokles FEV_1 1,45 % nál. hodn. Zde byl rychlejší pokles FEV_1 asociován pouze s pankreatickou insuficiencí. V obou věkových skupinách dospělých s CF byl pomalejší pokles zjištěn v případě nízké výchozí hodnoty FEV_1 a u jedinců se sinusitidami (Konstan M.W. *et al.*, 2012).

Naše studie hodnotila vývoj plicních funkcí a stavu výživy ve vztahu k markerům OS v KVV a k běžným klinickým parametrům. Jednoroční pokles FEV_1 v univariabilní analýze závisel na infekci komplexem *B. cepacia* a negativně koreloval s koncentrací 8-isoprostanu v KVV. Naproti tomu, jednoroční pokles body mass indexu pozitivně koreloval s koncentrací nitrátů v KVV. Statistické významnosti překvapivě dosáhla i pozitivní korelace pětiletého poklesu FEV_1 a koncentrace nitrátů v KVV. V multivariabilní analýze pak byl potvrzen vztah mezi

jednoročním poklesem FEV₁ a koncentrací 8-isoprostanu v KVV. Závislost pohlaví a tří- a pětileté změny stavu výživy již byla zmíněna výše. Zemřelí a transplantovaní nemocní měli signifikantně horší výchozí hodnoty FEV₁ a body mass indexu, v regresní analýze se významnosti blížila výchozí hodnota FEV₁ ($p = 0,056$). Naše výsledky jsou tedy alespoň z části (vzhledem k velikosti souboru byl volen menší počet proměnných) potvrzují vliv pohlaví, výchozí hodnoty plicních funkcí a infekce komplexem *B. cepacia* jako determinant vývoje klinického stavu nemocných s CF. Navíc jsme zaznamenali i potenciální roli oxidačního stresu, a to zejména vztah koncentrace 8-isoprostanu v KVV a jednoroční změny plicních funkcí. Tato korelace je v souladu s výsledky studie Antuniho *et al.* (Antuni J.D. *et al.* 2000), kde jednoroční změna FEV₁ negativně korelovala s hodnotou eCO, neboť byla současně prokázána pozitivní korelace eCO s koncentrací 8-isoprostanu v KVV (Montuschi P. *et al.* 2000). Další prospektivní studie týkající se vývoje klinického stavu nemocných s CF v závislosti na markerech oxidačního stresu ve vydechovaném vzduchu a jeho kondenzátu nejsou dostupné.

Intervenční studie s hodnocením vlivu IKS na markery OS v KVV a na pH KVV provedená v roce 2006 potvrdila výsledky z výchozí studie v roce 2005 ohledně koncentrací nitritů a nitrátů v KVV u nemocných s CF a u kontrolního souboru. Nemocní s CF měli rovněž signifikantně nižší pH KVV. Tříměsíční léčba inhalačním budesonidem v dávce 800 μg dvakrát denně vedla k signifikantnímu vzestupu pH i koncentrace nitrátů v KVV; koncentrace nitritů v KVV léčbou IKS ovlivněna nebyla. Hodnota pH KVV byla po léčbě IKS obdobná jako u kontrolního souboru, kdežto koncentrace nitrátů v KVV zůstala signifikantně nižší. Tyto výsledky jsou podporovány i nálezy z výchozí studie, kdy nemocní léčení IKS měli signifikantně horší hodnotu FEV₁ i rentgenové Northern skóre včetně vyšších hodnot sérového imunoglobulinu G a počtu neutrofilů v periferní krvi, ale neměli signifikantně nižší koncentrace nitritů a nitrátů v KVV. Podobné výsledky zaznamenali i Balint *et al.* (Balint B. *et al.* 2001), kdy nemocní s CF léčení IKS měli obdobné hodnoty koncentrace NO₂-Tyr v KVV ($24,2 \pm 2,5$ vs. $25,5 \pm 1,9$ % ng/ml) jako nemocní bez léčby IKS, přestože měli nižší hodnoty plicních funkcí (FEV₁ $51,9 \pm 4,9$ vs. $67,5 \pm 6,5$ % nál. hodn.).

Jak však interpretovat tyto výsledky za situace, kdy IKS snižují aktivitu NO syntázy a hodnoty eNO (tj. prekursoru nitrátů) a současně se u nich nepředpokládá výraznější ovlivnění neutrofilního zánětu? U nemocných s CF je oproti pacientům s bronchiálním astmatem hodnota aktivita NO syntázy (i hodnota eNO) nízká (viz kapitola 1.4.2.). Lze tedy spekulovat, že k dalšímu potlačení aktivity NO syntázy vlivem IKS již nejspíše nedochází. Budeme-li současně považovat pokles acidity KVV za známku zmírnění zánětu dýchacích

cest, pak lze předpokládat i snížení aktivity arginázy, tedy enzymu, který kompetuje s NO syntázou o substrát – arginin (Grasemann H. *et al.* 2005). Vyšší dostupnost argininu by tak znamenala vyšší produkci NO a po jeho oxidaci i nitrátů. Vliv léčby IKS na další marker OS v dýchacích cestách u CF ve vydechovaném vzduchu studovali Paredi *et al.* (Paredi P. *et al.* 1999). Nemocní s CF léčení IKS měli při obdobných plicních funkcích (FEV_1 39 ± 7 vs. 42 ± 6 % nál. hodn.). nižší hodnoty eCO ($5,1 \pm 0,5$ vs. $8,4 \pm 1,0$ ppm; $p < 0,01$).

Zmínit je možno rovněž léčbu IKS u dalšího onemocnění dýchacích cest s převahou neutrofilního zánětu, a to CHOPN. Zde jsou IKS indikovány u nemocných s těžší obstrukcí ($FEV_1 < 50$ % nál. hodn.) při častých exacerbacích (Russell R. *et al.* 2011), kde zmírňují symptomy, zlepšují plicní funkce a kvalitu života a snižují počet exacerbací (Spencer S. *et al.* 2004). Obdobná doporučení u CF neexistují a navíc bylo prokázáno, že u většiny nemocných s CF lze léčbu IKS bezpečně ukončit (Balfour-Lynn I.M. *et al.* 2006). Osobní zkušenosti u individuálních nemocných a rovněž výsledky naší intervenční studie však mohou určitý benefit podávání IKS u CF naznačovat.

Jako u každé práce, i zde je třeba se zamyslet nad limitacemi. Spatřovat je lze především u dlouhodobé studie, a to ve smyslu nezařazení počtu plicních exacerbací jako další potenciální proměnné ovlivňující pokles hodnot FEV_1 . Úloha plicních exacerbací nebyla u CF v době, kdy byla tato studie plánována (2003-2004) tak zřejmá jako např. u CHOPN a teprve recentně byla korelace počtu plicních exacerbací s dlouhodobým poklesem plicních funkcí u CF publikována (Waters V. *et al.* 2012). Navíc je třeba uvést, že neexistuje obecně uznávaná definice plicní exacerbace u CF (Goss C.H. *et al.* 2007) a různí autoři používají různé metodiky při analýze rizikových faktorů poklesu plicních funkcí či mortality u CF. Kerem *et al.* (Kerem E. *et al.* 1992) ani Konstan *et al.* (Konstan M.W. *et al.* 2007, Konstan M.W. *et al.* 2012) vliv počtu plicních exacerbací nehodnotí vůbec. Naproti tomu, Liou *et al.* (Liou T.G. *et al.* 2001) bere v úvahu všechny plicní exacerbace, kdežto Waters *et al.* a Mayerová-Hamblettová *et al.* (Waters V. *et al.* 2012, Mayer-Hamblett N. *et al.* 2002) kalkulují pouze s plicními exacerbacemi vyžadujícími hospitalizaci.

6. Závěr a zhodnocení hypotéz

Ve výchozí studii byly porovnávány koncentrace markerů OS v KVV u nemocných s CF s hodnotami u kontrolního souboru a analyzovány jejich korelace s parametry plicního onemocnění, stavu výživy a systémovými antioxidanty a markery zánětu. Koncentrace nitritů a nitrátů v KVV byly měřitelné u všech nemocných s CF i všech členů kontrolního souboru, zatímco koncentrace 8-isoprostanu v KVV byly měřitelné u 87,0 % nemocných s CF a u pouze 47,6 % členů kontrolního souboru. Oproti kontrolnímu souboru měli nemocní s CF v KVV signifikantně vyšší koncentrace 8-isoprostanu a nižší koncentrace nitrátů, zatímco koncentrace nitritů se významně nelišily. U nemocných s CF se koncentrace markerů OS v KVV signifikantně nelišily v podsouborech podle pohlaví, léčby inhalačními kortikosteroidy a kolonizace dýchacích cest. Koncentrace nitrátů v KVV u nemocných s CF signifikantně korelovaly s parametry plicního onemocnění (hodnota FEV₁ a Northern skóre), stavem výživy a systémovými antioxidanty (koncentrace albuminu v séru) a rovněž systémovými markery zánětu (koncentrace C-reaktivního proteinu); regresní analýza svědčila pro signifikantní korelaci s hodnotou rentgenového Northern skóre. Koncentrace nitritů a 8-isoprostanu v KVV nekorelovaly se žádným ze sledovaných klinických a laboratorních parametrů.

Dlouhodobá studie se zabývala závislostmi mezi markery OS v KVV a vývojem klinického stavu, resp. plicních funkcí a stavu výživy vyjádřených hodnotami FEV₁ a body mass indexu v odstupu jednoho, tří a pěti let a rovněž vztahem hodnot markerů OS v KVV k riziku úmrtí či nutnosti provedení transplantace plic u nemocných s CF. V období 2005-2010 zemřelo šest nemocných s CF a transplantaci plic prodělali čtyři nemocní s CF. Změna hodnoty FEV₁ v období 2005-2006 signifikantně korelovala s koncentrací 8-isoprostanu v KVV a v období 2005-2010 s koncentrací nitrátů v KVV. Změna hodnoty body mass indexu v období 2005-2006 korelovala s koncentrací nitrátů v KVV. Regresní analýza pak potvrdila závislost změny hodnoty FEV₁ v období 2005-2006 na koncentraci 8-isoprostanu v KVV. Vztah hodnot markerů OS v KVV a rizika úmrtí či nutnosti provedení transplantace plic u nemocných s CF prokázán nebyl.

Intervenční studie hodnotila vliv léčby inhalačními kortikosteroidy na markery OS (nitrity a nitráty) a rovněž na marker zánětu (pH jako ukazatel zánětlivé acidifikace) v KVV. Intervenční studie potvrdila výsledky výchozí studie ohledně rozdílů koncentracích nitritů a nitrátů v KVV u nemocných s CF a u kontrolního souboru; nemocní s CF měli oproti

kontrolnímu souboru nižší pH KVV, Tříměsíční léčba budesonidem v dávce 2x800 µg denně v inhalačním systému Turbuhaler vedla ke statisticky významnému vzestupu hodnot pH a koncentrací nitrátů v KVV; koncentrace nitritů signifikantně ovlivněny nebyly. Po léčbě inhalačními kortikosteroidy se u nemocných s CF hodnoty pH KVV od kontrolního souboru již významně nelišily, zatímco koncentrace nitrátů v KVV zůstaly signifikantně snižené.

Zhodnocení hypotéz:

Platnost hypotézy 1 ověřovala výchozí studie. Hypotéza 1 byla potvrzena pro koncentraci nitrátů v KVV, nikoli však pro koncentraci nitritů a 8-isoprostanu v KVV. Koncentrace nitrátů v KVV korelovala s aktuálním stavem plicních funkcí a některými parametry stavu výživy a systémových antioxidantů a markerů zánětu. Dominantní vztah ke stavu plicního postižení byl potvrzen regresní analýzou pro rentgenové Northern skóre.

Dlouhodobá studie ověřovala platnost hypotézy 2. Tato hypotéza byla zčásti potvrzena pro koncentraci nitrátů a 8-isoprostanu v KVV, a to ve vztahu k vývoji plicních funkcí a stavu výživy. Regresní analýzou byl potvrzen vztah koncentrace 8-isoprostanu v KVV a krátkodobé (jednoroční) změny plicních funkcí. Hypotéza 2 nebyla potvrzena pro koncentraci nitritů v KVV a rovněž pro vztah markerů OS v KVV a rizika úmrtí či nutnosti provedení transplantace plic u nemocných s CF v krátko- a střednědobém horizontu.

Platnost hypotézy 3 byla ověřována v intervenční studii. Bylo potvrzeno ovlivnění koncentrace nitrátů v KVV tříměsíční léčbou inhalačními kortikosteroidy. Hypotéza 3 však nebyla potvrzena ve smyslu ovlivnění koncentrace nitritů v KVV.

7. Souhrn

Cíle: Cílem práce bylo zhodnocení vztahu markerů oxidačního stresu (OS) v kondenzátu vydechovaného vzduchu (KVV) u dospělých nemocných s cystickou fibrozou (CF) k tíži plicního onemocnění, stavu výživy a systémovým antioxidantům a markerům zánětu, dále ke krátkodobému a střednědobému vývoji plicních funkcí a stavu výživy a konečně k posouzení odpovědi na léčbu inhalačními kortikosteroidy (IKS).

Metodika: Nemocní s CF byli vyšetřeni ve stabilizované fázi onemocnění během rutinných ambulantních kontrol. KVV byl odebrán u pacientů s CF a členů kontrolního souboru pomocí přístroje ECoScreen (Jaeger). Z markerů OS v KVV byly vyšetřeny nitrity a nitráty pomocí kapalinové chromatografie a 8-isoprostan metodou kompetitivní enzymoimunoanalýzy. U nemocných s CF byly zaznamenána demografická data včetně dominantního patogenu kolonizace dýchacích cest a léčby IKS. Dále bylo provedeno vyšetření plicních funkcí, skiagramu hrudníku, stavu vyživy a systémových antioxidantů a markerů zánětu pomocí standardních metod. Hodnoty markerů OS v KVV u nemocných s CF byly srovnány s kontrolním souborem a korelovány s klinickými parametry. Ke stanovení vztahu markerů OS v KVV k vývoji plicních funkcí a stavu výživy byli pacienti s CF vyšetřeni s odstupem jednoho, tří a pěti let. Rozdílové hodnoty usilovně vydechnutého objemu za první sekundu (FEV_1) a body mass indexu (BMI) byly korelovány s markery OS v KVV a dalšími klinickými parametry. Ve druhém roce projektu byl studován vliv léčby IKS (budesonid 2x800 μ g denně po dobu třech měsíců) na pH a koncentrace nitritů a nitrátů v KVV a dále na hodnoty FEV_1 , BMI a systémových zánětlivých parametrů u nemocných s CF. pH KVV bylo vyšetřeno pomocí přístroje Titan (Sentron).

Výsledky: 46 nemocných s CF (23 žen) s mediánem (rozpětím) věku 23,9 (19,5–32,9) roku a 21 členů kontrolního souboru bylo zařazeno do projektu. Nemocní s CF měli oproti kontrolám v KVV nižší koncentrace nitrátů: 5,66 (0,09–34,90) vs. 15,45 (5,45–35,62) μ mol/l ($p < 0,001$) a vyšší koncentrace 8-isoprostanu: 8,50 (2,70–27,62) vs. 4,10 (2,20–10,00) pg/ml ($p = 0,0014$). Koncentrace nitrátů v KVV korelovaly s hodnotou FEV_1 ($r_s = 0,331$, $p = 0,025$) a Northern skóre ($r_s = -0,358$, $p = 0,015$) a koncentracemi albuminu ($r_s = 0,353$; $p = 0,016$) a C-reaktivního proteinu ($r_s = -0,404$; $p = 0,005$) v séru. Koncentrace nitritů v KVV byla obdobná jako u kontrol a podobně jako koncentrace 8-isoprostanu v KVV nekorelovala s klinickými parametry. S koncentrací nitrátů v KVV korelovala jednorozměrná změna hodnoty

BMI ($r_s = 0,332$, $p = 0,028$) a pětiletá změna hodnoty FEV_1 ($r_s = 0,348$, $p = 0,038$). S koncentrací 8-isoprostanu v KVV korelovala jednorocní změna hodnoty FEV_1 ($r_s = -0,337$; $p = 0,033$). Koncentrace nitritů v KVV se změnami hodnot FEV_1 a BMI nekorelovala. Nebyl rovněž prokázán vztah koncentrací markerů OS v KVV a rizika úmrtí či provedení transplantace plic v průběhu pětiletého sledování. Do intervenční studie s podáváním IKS bylo zařazeno 10 nemocných s CF (5 žen) s průměrným (\pm SD) věkem $23,4 \pm 3,8$ roku a 12 členů kontrolního souboru. Nemocní s CF měli před léčbou IKS oproti kontrolnímu souboru signifikantně nižší koncentraci nitrátů ($7,3 \pm 1,8$ vs. $39,5 \pm 24,8$ $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,001$) a pH ($5,49 \pm 0,68$ vs. $6,11 \pm 0,31$; $p = 0,01$) KVV. Po léčbě IKS se signifikantně zvýšila koncentrace nitrátů ($7,3 \pm 1,8$ vs. $20,9 \pm 10,0$ $\mu\text{mol/l}$; $p = 0,003$) a pH ($5,49 \pm 0,68$ vs. $6,17 \pm 0,31$; $p = 0,005$) KVV. Klinické parametry léčbou IKS ovlivněny nebyly.

Závěr: Dospělí nemocní s CF měli v KVV oproti kontrolám vyšší koncentrace 8-isoprostanu a nižší koncentrace nitrátů. Koncentrace nitrátů v KVV korelovala s aktuálními klinickými parametry. S vývojem plicních funkcí a stavu výživy korelovala koncentrace 8-isoprostanu a nitrátů v KVV. Koncentrace markerů OS v KVV nebyla ve vztahu s rizikem úmrtí či provedení transplantace plic během pětiletého sledování. Třimesíční podávání IKS vedlo k ovlivnění pH a koncentrace nitrátů v KVV.

Klíčová slova: cystická fibróza – oxidační stres – kondenzát vydechovaného vzduchu

Summary

Aims: The aim of this study was to evaluate the relationship of oxidative stress (OS) markers in exhaled breath condensate (EBC) in adult patients with cystic fibrosis (CF) to the severity of lung disease, nutritional status and systemic antioxidants and inflammatory markers, as well as to short- and medium-term development of pulmonary function and nutritional status, and finally to assess the response to treatment with inhaled corticosteroids (ICS).

Methods: CF patients were examined in a stable phase of the disease during routine outpatient controls. EBC was collected using ECoScreen device (Jaeger) in CF patients and in control group members. Nitrites and nitrates and 8-isoprostane were examined using liquid chromatography and competitive enzyme immunoanalysis, respectively, in EBC as OS markers. Demographic data including the dominant pathogen of airway colonization and ICS treatment were recorded in CF patients. Lung function tests, chest X-rays, nutritional statuses and systemic antioxidants and inflammatory markers were also examined using standard methods. The values of OS markers in EBC in patients with CF were compared with the control group and correlated to clinical parameters. Lung function tests and nutritional statuses in CF patients were examined in one, three and five years intervals to determine the relationship of OS markers in EBC to the changes of these parameters. Differential values of forced expiratory volume in the first second (FEV_1) and body mass index (BMI) were correlated to OS markers in EBC and other clinical parameters. In the second year of the project, the effect of treatment with ICS (budesonide 800 μg twice daily for three months) on the pH and the concentration of nitrite and nitrate in EBC and the values of FEV_1 , BMI and systemic inflammatory parameters in patients with CF was studied. EBC pH was examined using the pH meter Titan (Sentron).

Results:

46 patients with CF (23 females) with a median (range) age of 23.9 (19.5–32.9) and 21 members of the control group were included in the project. Patients with CF had lower nitrate concentrations: 5.66 (0.09–34.90) vs. 15.45 (5.45–35.62) $\mu\text{mol/l}$ ($p < 0.001$) and higher 8-isoprostane concentrations 8.50 (2.70–27.62) vs. 4.10 (2.20–10.00) pg/ml ($p = 0.0014$) in EBC compared to controls. Nitrate concentration in EBC correlated with values of FEV_1 ($r_s = 0.331$, $p = 0.025$) and Northern score ($r_s = -0.358$, $p = 0.015$) and to serum concentrations of C-reactive protein ($r_s = -0.404$, $p = 0.005$) and albumin ($r_s = 0.353$,

p = 0.016). The concentration of nitrite in EBC was similar as in controls and similarly to concentration of 8-isoprostane in EBC did not correlate with clinical parameters. The concentration of nitrate in EBC correlated with one-year change of BMI value ($r_s = 0.332$, $p = 0.028$) and five-year change of FEV₁ ($r_s = 0.348$, $p = 0.038$). The concentration of 8-isoprostane in EBC correlated with one-year change of FEV₁ value ($r_s = -0.337$, $p = 0.033$). The concentration of nitrite in EBC did not correlate with changes of FEV₁ and BMI values. Relationship between OS markers in EBC and the risk of death or lung transplantation during five-year follow-up was also not demonstrated. 10 patients with CF (5 women) with a mean (\pm SD) age 23.4 \pm 3.8 years and 12 members of the control group were enrolled in intervention study with ICS. Patients with CF had significantly lower EBC nitrates concentration (7,3 \pm 1,8 vs. 39,5 \pm 24,8 μ mol/l; $p < 0,001$) and pH (5.49 \pm 0.68 vs. 6.11 \pm 0.31, $p = 0.01$) before treatment with ICS compared to controls. After treatment with ICS increased EBC nitrates concentration (7.3 \pm 1.8 vs. 20.9 \pm 10.0 μ mol/l, $p = 0.003$) and pH (5.49 \pm 0.68 vs. 6.17 \pm 0.31, $p = 0.005$). Clinical parameters were not affected by ICS treatment.

Conclusions: Adult patients with CF had in EBC higher concentrations of 8-isoprostane and lower levels of nitrates compared to controls. Nitrate concentrations in EBC correlated with actual clinical parameters. Concentrations of 8-isoprostane and nitrates in EBC correlated with changes of lung function and nutritional status. Concentrations of OS markers in EBC was not related to risk of death or lung transplantation during the five-year follow-up. Three-month administration of ICS influenced the EBC pH and concentrations of nitrates.

Keywords: cystic fibrosis – oxidative stress – exhaled breath condensate

8. Seznam citované literatury

1. Adly AA. **Oxidative stress and disease: An updated review.** Res J Immunol. 2010; 3(2): 129-145.
2. Anker SD, John M, Pedersen PU et al. **ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Cardiology and pulmonology.** Clin Nutr. 2006; 25(2): 311-318.
3. Antuni JD, Kharitonov SA, Hughes D, Hodson ME, Barnes PJ. **Increase in exhaled carbon monoxide during exacerbations of cystic fibrosis.** Thorax. 2000; 55(2): 138-142.
4. Balfour-Lynn IM, Klein NJ, Dinwiddie R. **Randomised controlled trial of inhaled corticosteroids (fluticasone propionate) in cystic fibrosis.** Arch Dis Child. 1997; 77(2): 124-130.
5. Balfour-Lynn IM. **Asthma in cystic fibrosis.** J R Soc Med. 2003; 96 Suppl 43: 30-34.
Balfour-Lynn IM, Lees B, Hall P et al. **Multicenter randomized controlled trial of withdrawal of inhaled corticosteroids in cystic fibrosis.** Am J Respir Crit Care Med. 2006; 173(12): 1356-1362.
6. Balint B, Kharitonov SA, Hanazawa T et al. **Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in cystic fibrosis.** Eur Respir J. 2001; 17(6): 1201-1207.
7. Barker M, Hengst M, Schmid J et al. **Volatile organic compounds in the exhaled breath of young patients with cystic fibrosis.** Eur Respir J. 2006; 27(5): 929-936.
8. Barnes PJ, Dweik RA, Gelb AF et al. **Exhaled nitric oxide in pulmonary diseases: a comprehensive review.** Chest. 2010; 138(3): 682-692.
9. Bikov A, Antus B, Losonzy G, Horvath I. **Exhaled breath condensate pH.** Eur Respir Mon 2010; 49: 173-182.
10. Braga PC. **Oxidative stress: Respiratory diseases and thiol compounds.** Pacini Editore SpA, Pisa, Italy 2006, pp. 12-26.
11. Boucher RC. **Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration.** Trends Mol Med. 2007; 13(6): 231-240.
12. Brown RK, McBurney A, Lunec J, Kelly FJ. **Oxidative damage to DNA in patients with cystic fibrosis.** Free Radic Biol Med. 1995; 18(4): 801-806.
13. Brown RK, Wyatt H, Price JF, Kelly FJ. **Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress.** Eur Respir J. 1996; 9(2): 334-339.
14. Cantin AM, White TB, Cross CE, Forman HJ, Sokol RJ, Borowitz D. **Antioxidants in cystic fibrosis. Conclusions from the CF antioxidant workshop, Bethesda, Maryland, November 11-12, 2003.** Free Radic Biol Med. 2007(1); 42: 15-31.

15. Celio S, Troxler H, Durka SS et al. **Free 3-nitrotyrosine in exhaled breath condensates of children fails as a marker for oxidative stress in stable cystic fibrosis and asthma.** Nitric Oxide. 2006; 15(3): 226-232.
16. Cetin I, Ozcelik U, Goçmen A, Kiper N, Doğru D, Yalçin E. **BALF nitrite as an indicator of inflammation in children with cystic fibrosis.** Respiration 2004; 71(6): 625-629.
17. Ciofu O, Riis B, Pressler T, Poulsen HE, Hoiby N. **Occurrence of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation.** Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(6): 2276-2282.
18. Cochrane GM, Prieto F, Clark TJ. **Intrasubject variability of maximal expiratory flow volume curve.** Thorax. 1977; 32(2): 171-176.
19. Collins CE, Quaggiotto P, Wood L, O'Loughlin EV, Henry RL, Garg ML. **Elevated plasma levels of F2 alpha isoprostane in cystic fibrosis.** Lipids. 1999; 34(6): 551-556.
20. Conway SP, Pond MN, Bowler I et al. **The chest radiograph in cystic fibrosis: a new scoring system compared with the Chrispin-Norman and Brasfield scores.** Thorax 1994; 49(9): 860-862.
21. Corradi M, Montuschi P, Donnelly LE, Pesci A, Kharitonov SA, Barnes PJ. **Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases.** Am J Respir Crit Care Med. 2001; 163(4): 854-858.
22. Csoma Z, Bush A, Wilson NM et al. **Nitric oxide metabolites are not reduced in exhaled breath condensate of patients with primary ciliary dyskinesia.** Chest. 2003; 124(2): 633-638.
23. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. 2011 Annual Data Report. Bethesda, Maryland. <http://www.cff.org/research/ClinicalResearch/PatientRegistryReport/>.
24. Daultbaev N, Rickmann J, Viel K, et al. **Antioxidant properties of cystic fibrosis sputum.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005; 288(5): L903-L909.
25. de Winter-de Groot KM, van der Ent CK. **Nitric oxide in cystic fibrosis.** J Cyst Fibros 2005; 4 (Suppl 2): 25-29.
26. Dolinay T, Choi AMK, Ryter SW. **Exhaled carbon monoxide: mechanisms and clinical applications.** Eur Respir Mon 2010; 49: 82-95.
27. Dompeling E, Rosias PP, Jöbsis Q. **Exhaled breath condensate sample collection: standards and open issues.** Eur Respir Mon 2010; 49: 152-161.

28. Drevinek P, Holden MT, Ge Z et al. **Gene expression changes linked to antimicrobial resistance, oxidative stress, iron depletion and retained motility are observed when *Burkholderia cenocepacia* grows in cystic fibrosis sputum.** BMC Infect Dis. 2008; 8: 121.
29. Elizur A, Cannon CL, Ferkol TW. **Airway inflammation in cystic fibrosis.** Chest. 2008; 133(2): 489-495.
30. Fila L, Musil J, Chladek J. **Parameters of oxidative stress in exhaled breath condensate are more pronounced in females than in males with cystic fibrosis.** 15th ERS Annual Congress, Copenhagen, Denmark, September 17-21, 2005. Eur Respir J 2005; 26 (S49): 728s.
31. Fila L, Musil J, Chladek J. **NO metabolites in exhaled breath condensate in cystic fibrosis patients: correlation with pulmonary function, nutritional status and systemic inflammation.** 16th ERS Annual Congress, Munich, Germany, September 2-6, 2006. Eur Respir J 2006; 28 (S50): 715s.
32. Fila L, Musil J, Valentová Bartáková L, Chládek J. **Vliv terapie inhalačními kortikosteroidy na složení kondenzátu vydechovaného vzduchu u nemocných s cystickou fibrózou.** Stud Pneumol Phthiseol 2008; 68 (1): 6-9.
33. Fila L, Musil J, Prucha M. **Neutrophil elastase in exhaled breath condensate in cystic fibrosis patients.** 31st European Cystic Fibrosis Conference, Prague, Czech Republic, 11-14 June 2008. J Cyst Fibros 2008; 7: S57. Abstract 226.
34. Fila L, Musil J, Prucha M. **Prostaglandin E2 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis.** 32nd European Cystic Fibrosis Conference, Brest, France, 10-13 June 2009, J Cyst Fibros 2009; 8, S52. Abstract 208.
35. Fila L, Sedlák V, Binková I, Jakubec P, Bittenglová R, Musil J. Dvacet let péče o dospělé s cystickou fibrózou v České republice. Vnitř Lek. 2009; 55(6): 542-548.
36. Fila L, Musil J. **Vyšetření kondenzátu vydechovaného vzduchu u cystické fibrózy.** Čas Lék Česk. 2010; 149(4): 173-177.
37. Fila L. **Cystická fibróza.** In: Kolek V, Kašák V, Vašáková M a kol. Pneumologie. Maxdorf, Praha 2011, s. 386-390.
38. Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA et al. **Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health.** Am J Respir Crit Care Med. 2007; 176(10): 957-969.
39. Formanek W, Inci D, Lauener RP, Wildhaber JH, Frey U, Hall GL. **Elevated nitrite in breath condensates of children with respiratory disease.** Eur Respir J. 2002; 19(3): 487-491.

40. Franklin PJ, Hall GL, Moeller A, Horak F Jr, Brennan S, Stick SM. **Exhaled nitric oxide is not reduced in infants with cystic fibrosis.** Eur Respir J 2006; 27(2): 350-353.
41. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH et al. **Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis.** The Pulmozyme Study Group. N Engl J Med. 1994; 331 (10): 637-642.
42. Funk CD. **Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology.** Science. 2001; 294(5548): 1871-1875.
43. Gaston B, Singel D, Doctor A, Stamler JS. **S-nitrosothiol signaling in respiratory biology.** Am J Respir Crit Care Med. 2006; 173(11): 1186-1193.
44. Gerritsen WB, Zanen P, Bauwens AA, van den Bosch JM, Haas FJ. **Validation of a new method to measure hydrogen peroxide in exhaled breath condensate.** Respir Med. 2005; 99(9): 1132-1137.
45. Goss CH, Burns JL. **Exacerbations in cystic fibrosis. 1: Epidemiology and pathogenesis.** Thorax. 2007; 62(4): 360-367.
46. Grasemann H, Ioannidis I, Tomkiewicz RP, de Groot H, Rubin BK, Ratjen F. **Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease.** Arch Dis Child. 1998; 78(1): 49-53.
47. Grasemann H, Gaston B, Fang K, Paul K, Ratjen F. **Decreased levels of nitrosothiols in the lower airways of patients with cystic fibrosis and normal pulmonary function.** J Pediatr. 1999; 135(6): 770-772.
48. Grasemann H, Lax H, Treseler JW, Colin AA. **Dornase alpha and exhaled NO in cystic fibrosis.** Pediatr Pulmonol 2004; 38(5): 379-385.
49. Grasemann H, Schwiertz R, Matthiesen S, Racke K, Ratjen F. **Increased arginase activity in cystic fibrosis airways.** Am J Respir Crit Care Med 2005; 172(12): 1523-1528.
50. Griese M, Noss J, Schramel P. **Elemental and ion composition of exhaled air condensate in cystic fibrosis.** J Cyst Fibros. 2003; 2(3): 136-142.
51. Griese M, Ramakers J, Krasselt A et al. **Improvement of alveolar glutathione and lung function but not oxidative state in cystic fibrosis.** Am J Respir Crit Care Med. 2004; 169(7): 822-828.
52. Guilbault C, Wojewodka G, Saeed Z et al. **Cystic fibrosis fatty acid imbalance is linked to ceramide deficiency and corrected by fenretinide.** Am J Respir Cell Mol Biol. 2009; 41(1): 100-106.
53. Hart CA, Winstanley C. **Persistent and aggressive bacteria in the lungs of cystic fibrosis children.** Br Med Bull. 2002; 61 (1): 81-96.

54. Hendry J, Nixon L, Dodd M, et al. **Pulmonary function, serum markers of inflammation, and IgG antibodies to core lipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* in adults with cystic fibrosis, following colonization with *Burkholderia cepacia*.** *Pediatr Pulmonol.* 2000; 29(1): 8-10.
55. Ho LP, Innes JA, Greening AP. **Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide.** *Thorax.* 1998; 53(3): 680-684.
56. Ho LP, Faccenda J, Innes JA, Greening AP. **Expired hydrogen peroxide in breath condensate of cystic fibrosis patients.** *Eur Respir J.* 1999; 13(1): 103-106.
57. Hodson ME, Morris L, Batten JC. **Serum immunoglobulins and immunoglobulin G subclasses in cystic fibrosis related to the clinical state of the patient.** *Eur Respir J.* 1988; 1(8): 701-705.
58. Hofer M, Mueller L, Rechsteiner T, Benden C, Boehler A. **Extended nitric oxide measurements in exhaled air of cystic fibrosis and healthy adults.** *Lung* 2009; 187(5): 307-313.
59. Horak F Jr, Moeller A, Singer F et al. **Longitudinal monitoring of pediatric cystic fibrosis lung disease using nitrite in exhaled breath condensate.** *Pediatr Pulmonol* 2007; 42(12): 1198-1206.
60. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ et al. **Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions.** *Eur Respir J.* 2005; 26(3): 523-248.
61. Hudson VM. **Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation.** *Free Radic Biol Med.* 2001; 30(12): 1440-1461.
62. Hull J, Vervaart P, Grimwood K, Phelan P. **Pulmonary oxidative stress response in young children with cystic fibrosis.** *Thorax.* 1997; 52(6): 557-560.
63. Hybiske K, Fu Z, Schwarzer C et al. **Effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and DeltaF508CFTR on inflammatory response, ER stress, and Ca²⁺ of airway epithelia.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007; 293(5): L1250-L1260.
64. Chládková J, Krčmová I, Chládek J, Čáp P, Mičuda S, Hanzálková Y. **Validation of nitrite and nitrate measurements in exhaled breath condensate.** *Respiration* 2006; 73 (2): 173-179.
65. Jacquot J, Tabary O, Clement A. **Hyperinflammation in airways of cystic fibrosis patients: what's new?** *Expert Rev Mol Diagn.* 2008; 8(4): 359-563.

66. Jöbsis Q, Raatgeep HC, Schellekens SL, et al. **Hydrogen peroxide and nitric oxide in exhaled air of children with cystic fibrosis during antibiotic treatment.** *Eur Respir J.* 2000; 16(1): 95-100.
67. Jones KL, Bryan TW, Jinkins PA et al. **Superoxide released from neutrophils causes a reduction in nitric oxide gas.** *Am J Physiol.* 1998; 275(6): L1120-6.
68. Jones KL, Hegab AH, Hillman BC et al. **Elevation of nitrotyrosine and nitrate concentrations in cystic fibrosis sputum.** *Pediatr Pulmonol.* 2000; 30(2): 79-85.
69. Kerem E, Reisman J, Corey M, Canny GJ, Levison H. **Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis.** *N Engl J Med.* 1992; 326(18): 1187-1191.
70. Kettle AJ, Chan T, Osberg I et al. **Myeloperoxidase and protein oxidation in the airways of young children with cystic fibrosis.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170(12): 1317-1323.
71. Kharitonov SA, Barnes PJ. **Exhaled markers of pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163(7): 1693-722.
72. Kietzmann D, Kahl R, Müller M, Burchardi H, Kettler D. **Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS.** *Intensive Care Med.* 1993; 19(2): 78-81.
73. Konstan MW, Morgan WJ, Butler SM et al. **Risk factors for rate of decline in forced expiratory volume in one second in children and adolescents with cystic fibrosis.** *J Pediatr.* 2007; 151(2): 134-139.
74. Konstan MW, Wagener JS, Vandevanter DR et al. **Risk factors for rate of decline in FEV1 in adults with cystic fibrosis.** *J Cyst Fibros.* 2012; 11(5): 405-411.
75. Lagrange-Puget M, Durieu I, Ecochard R et al. **Longitudinal study of oxidative status in 312 cystic fibrosis patients in stable state and during bronchial exacerbation.** *Pediatr Pulmonol.* 2004; 38(1): 43-49.
76. Lands LC, Grey VL, Grenier C. **Total plasma antioxidant capacity in cystic fibrosis.** *Pediatr Pulmonol.* 2000; 29(2): 81-87.
77. Lands LC, Iskandar M, Beaudoin N, Meehan B, Dauletbaev N, Berthiaume Y. **Dietary supplementation with pressurized whey in patients with cystic fibrosis.** *J Med Food.* 2010; 13(1): 77-82.
78. Levy H, Kalish LA, Huntington I et al. **Inflammatory markers of lung disease in adult patients with cystic fibrosis.** *Pediatr Pulmonol.* 2007; 42(3): 256-262.
79. Liou TG, Adler FR, Fitzsimmons SC, Cahill BC, Hibbs JR, Marshall BC. **Predictive 5-year survivorship model of cystic fibrosis.** *Am J Epidemiol* 2001; 153(4): 345-352.

80. Loukides S, Bakakos P, Kostikas K. **Exhaled breath condensate: hydrogen peroxide.** Eur Respir Mon 2010; 49: 162–172.
81. Lucidi V, Ciabattoni G, Bella S, et al. **Exhaled 8-isoprostane and prostaglandin E(2) in patients with stable and unstable cystic fibrosis.** Free Radic Biol Med. 2008; 45(6): 913-919.
82. Machen TE. **Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory?** Am J Physiol Cell Physiol. 2006; 291(2): C218-C230.
83. Marteus H, Tornberg DC, Weitzberg E, Schedin U, Alving K. **Origin of nitrite and nitrate in nasal and exhaled breath condensate and relation to nitric oxide formation.** Thorax 2005; 60(3): 219-225.
84. Mayer-Hamblett N, Rosenfeld M, Emerson J, Goss CH, Aitken ML. **Developing cystic fibrosis lung transplant referral criteria using predictors of 2-year mortality.** Am J Respir Crit Care Med. 2002; 166(12 Pt 1): 1550-1555.
85. McDowell A, Mahenthiralingam E, Moore JE et al. **PCR-based detection and identification of Burkholderia cepacia complex pathogens in sputum from cystic fibrosis patients.** J Clin Microbiol. 2001; 39 (12): 4247-4255.
86. Milla CE. **Association of nutritional status and pulmonary function in children with cystic fibrosis.** Curr Opin Pulm Med. 2004; 10(6): 505-509.
87. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V et al. ATS/ERS Task Force. **Standardisation of spirometry.** Eur Respir J 2005; 26 (2): 319-338.
88. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G, et al. **Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis.** Thorax. 2000; 55(3): 205-209.
89. Montuschi P. **Exhaled breath condensate: 8-isoprostane and eicosanoids.** Eur Respir Mon 2010; 49: 196–206.
90. Morrissey BM, Schilling K, Weil JV, Silkoff PE, Rodman DM. **Nitric oxide and protein nitration in the cystic fibrosis airway.** Arch Biochem Biophys. 2002; 406(1): 33-39.
91. Musil J, Musilová S, Kvapil M. **Stav nutriční u nemocných s chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN).** Vnitr Lek. 1997; 43(4): 201-203.
92. Musil J, Chládek J, Fila L, Průcha M. **Význam stanovení markerů zánětu a oxidačního stresu v kondenzátu vydechaného vzduchu pro progresi cystické fibrózy (CF) a možnosti jejího ovlivnění.** Závěrečná zpráva o řešení grantu IGA MZ ČR NR8304. Praha, 2008. 66 s.
93. Neve J, Van Geffel R, Hanocq M, Molle L. **Plasma and erythrocyte zinc, copper and selenium in cystic fibrosis.** Acta Paediatr Scand. 1983; 72(3): 437-440.

94. Nikolaizik WH, Schöni MH. **Pilot study to assess the effect of inhaled corticosteroids on lung function in patients with cystic fibrosis.** J Pediatr. 1996; 128(2): 271-274.
95. Nohl H, Hegner D. **Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo?** Eur J Biochem. 1978; 82(2): 563-567.
96. Ojoo JC, Mulrennan SA, Kastelik JA, Morice AH, Redington AE. **Exhaled breath condensate pH and exhaled nitric oxide in allergic asthma and in cystic fibrosis.** Thorax. 2005; 60(1): 22-26.
97. Olin AC, Aldenbratt A, Ekman A et al. **Increased nitric oxide in exhaled air after intake of a nitrate-rich meal.** Respir Med. 2001; 95(2): 153-158.
98. Palmer KL, Brown SA, Whiteley M. **Membrane-bound nitrate reductase is required for anaerobic growth in cystic fibrosis sputum.** J Bacteriol 2007(12); 189: 4449-4455.
99. Papaioannou AI, Zakyntinos E, Kostikas K et al. **Serum VEGF levels are related to the presence of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis.** BMC Pulm Med. 2009; 9: 18.
100. Paredi P, Shah PL, Montuschi P et al. **Increased carbon monoxide in exhaled air of patients with cystic fibrosis.** Thorax. 1999; 54(10): 917-920.
101. Pláteník J. **Patobiochemie volných radikálů.** In: Kalousová M. a kol. Patobiochemie ve schématech. Grada Publishing, a.s., Praha 2006, s. 9-21.
102. Racek J. **Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění.** Galén, Praha 2003, s. 31-69.
103. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG et al. **A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation.** N Engl J Med. 2011; 365(18): 1663-1672.
104. Range SP, Dunster C, Knox AJ, Kelly FJ. **Treatment of pulmonary exacerbations of cystic fibrosis leads to improved antioxidant status.** Eur Respir J. 1999; 13(3): 560-564.
105. Reid DW, Misso N, Aggarwal S, Thompson PJ, Walters EH. **Oxidative stress and lipid-derived inflammatory mediators during acute exacerbations of cystic fibrosis.** Respirology. 2007; 12(1): 63-69.
106. Robroeks CM, Rosias PP, van Vliet D, et al. **Biomarkers in exhaled breath condensate indicate presence and severity of cystic fibrosis in children.** Pediatr Allergy Immunol. 2008; 19(7): 652-659.
107. Rosenstein BJ, Cutting GR. **The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement.** Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. J Pediatr. 1998; 132 (4): 589-595.
108. Rosias PP, Dompeling E, Dentener MA et al. **Childhood asthma: exhaled markers of airway inflammation, asthma control score, and lung function tests.** Pediatr Pulmonol. 2004; 38(2): 107-114.

109. Rosias PP, Robroeks CM, Niemarkt HJ et al. **Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate.** Eur Respir J. 2006; 28(5): 1036-1041.
110. Rottner M, Freyssinet JM, Martínez MC. **Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis.** Respir Res. 2009; 10: 23.
111. Russell R, Anzueto A, Weisman I. **Optimizing management of chronic obstructive pulmonary disease in the upcoming decade.** Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2011; 6: 47-61.
112. Sinaasappel M, Stern M, Littlewood J et al. **Nutrition in patients with cystic fibrosis: a European Consensus.** J Cyst Fibros. 2002; 1(2): 51-75.
113. Soyer OU, Dizdar EA, Keskin O, Lilly C, Kalayci O. **Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection.** Allergy. 2006; 61(8): 1016-1018.
114. Spencer S, Calverley PM, Burge PS, Jones PW. **Impact of preventing exacerbations on deterioration of health status in COPD.** Eur Respir J. 2004; 23(5): 698-702.
115. Starosta V, Rietschel E, Paul K, Baumann U, Griese M. **Oxidative changes of bronchoalveolar proteins in cystic fibrosis.** Chest. 2006; 129(2): 431-437.
116. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP et al. **Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference.** Clin Infect Dis. 2003; 37 Suppl 3: S225-264.
117. Suri R, Paraskakis E, Bush A. **Alveolar, but not bronchial nitric oxide production is elevated in cystic fibrosis.** Pediatr Pulmonol. 2007; 42(12): 1215-1221.
118. Štípek S. **Reaktivní formy dusíku.** In: Štípek S a kol. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci, Grada Publishing, spol. s r.o., Praha 2000, s. 27-30.
119. Štípek S. **Volné radikály – dobří sluhové a zlí páni.** In: Štípek S a kol. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci, Grada Publishing, spol. s r.o., Praha 2000, s. 41-108.
120. Tate S, MacGregor G, Davis M, Innes JA, Greening AP. **Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate.** Thorax. 2002; 57(11): 926-929.
121. Terheggen-Lagro S, Truijens N, Van Poppel N, Gulmans V, Van Der Laag J, Van Der Ent C. **Correlation of six different cystic fibrosis chest radiograph scoring systems with clinical parameters.** Pediatr Pulmonol. 2003; 35(6): 441-445.
122. Tirouvanziam R, Conrad CK, Bottiglieri T, Herzenberg LA, Moss RB, Herzenberg LA. **High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(12): 4628-4633.

123. Turner S. **Exhaled nitric oxide in the diagnosis and management of asthma.** *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008; 8(1): 70-76.
124. van der Vliet A, Nguyen MN, Shigenaga MK, Eiserich JP, Marelich GP, Cross CE. **Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279(3): L537-L546.
125. Vasu VT, de Cruz SJ, Houghton JS et al. **Evaluation of thiol-based antioxidant therapeutics in cystic fibrosis sputum: Focus on myeloperoxidase.** *Free Radic Res.* 2011; 45(2): 165-176.
126. Verhaeghe C, Delbecq K, de Leval L, Oury C, Bours V. **Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus.** *J Cyst Fibros.* 2007; 6(4): 304-308.
127. Waters V, Stanojevic S, Atenafu EG et al. **Effect of pulmonary exacerbations on long-term lung function decline in cystic fibrosis.** *Eur Respir J.* 2012; 40(1): 61-66.
128. Weitzberg E, Hezel M, Lundberg JO. **Nitrate-nitrite-nitric oxide pathway: implications for anesthesiology and intensive care.** *Anesthesiology.* 2010; 113(6): 1460-1475.
129. Wojtczak HA, Kerby GS, Wagener JS et al. **Beclomethasone dipropionate reduced airway inflammation without adrenal suppression in young children with cystic fibrosis: a pilot study.** *Pediatr Pulmonol.* 2001; 32(4): 293-302.
130. Wolter J, Seeney S, Bell S, Bowler S, Masel P, McCormack J. **Effect of long term treatment with azithromycin on disease parameters in cystic fibrosis: a randomised trial.** *Thorax.* 2002; 57(3): 212-216.
131. Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Collins CE, Garg ML. **Oxidative stress in cystic fibrosis: dietary and metabolic factors.** *J Am Coll Nutr.* 2001; 20(2 Suppl): 157-165.
132. Wooldridge JL, Deutsch GH, Sontag MK et al. **NO pathway in CF and non-CF children.** *Pediatr Pulmonol* 2004; 37(4): 338-350.
133. Worlitzsch D, Herberth G, Ulrich M, et al. **Catalase, myeloperoxidase and hydrogen peroxide in cystic fibrosis.** *Eur Respir J.* 1998; 11(2): 377-383.
134. Wu G, Flynn NE, Flynn SP, Jolly CA, Davis PK. **Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats.** *J Nutr.* 1999; 129(7): 1347-1354.
135. Yan W, Byrd GD, Ogden MW. **Quantitation of isoprostane isomers in human urine from smokers and nonsmokers by LC-MS/MS.** *J Lipid Res.* 2007; 48(7): 1607-1617.

136. Yu H, Nasr SZ, Deretic V. **Innate lung defenses and compromised *Pseudomonas aeruginosa* clearance in the malnourished mouse model of respiratory infections in cystic fibrosis.** *Infect Immun.* 2000; 68(4): 2142-2147.
137. Zaman K, Carraro S, Doherty J et al. **S-nitrosylating agents: a novel class of compounds that increase cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and maturation in epithelial cells.** *Mol Pharmacol.* 2006; 70(4): 1435-1442.
138. Zetterquist W, Marteus H, Kalm-Stephens P et al. **Oral bacteria--the missing link to ambiguous findings of exhaled nitrogen oxides in cystic fibrosis.** *Respir Med.* 2009; 103(2): 187-193.

9. Seznam publikací, které jsou součástí této práce

Původní práce v časopisech s impakt faktorem:

Fila L, Chládek J, Malý M, Musil J. **Nitrites and nitrates in exhaled breath condensate in cystic fibrosis: relation to clinical parameters.** Bratisl Med J; accepted for publication. **IF 0,403** (2011).

Fila L, Grandcourtovej A, Chládek J, Musil J. **Oxidative stress in cystic fibrosis patients with Burkholderia cenocepacia airways colonization: relation of 8-isoprostane concentration in exhaled breath condensate to lung function decline.** Folia Microbiol (Praha); accepted for publication. **IF 0,667** (2011).

Původní práce v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru:

Fila L, Musil J. **Vyšetření kondenzátu vydechaného vzduchu u cystické fibrózy.** Čas Lék Čes 2010; 149 (4): 173-177.

Fila L, Musil J, Valentová Bartáková L, Chládek J. **Vliv terapie inhalačními kortikosteroidy na složení kondenzátu vydechaného vzduchu u nemocných s cystickou fibrózou.** Stud Pneumol Phthiseol 2008; 68 (1): 6-9.

Abstrakta ve sbornících vědeckých konferencí:

Fila L, Musil J, Chladek J, Maly M. **Markers of oxidative stress in exhaled breath condensate: prediction of one-year development of pulmonary function and nutritional status in cystic fibrosis.** 33rd European Cystic Fibrosis Conference, Valencia, Spain, 16-19 June 2010, J Cyst Fibros 2010; 9, S60. Abstract 232.

Fila L, Musil J, Chladek J. **NO metabolites in exhaled breath condensate in cystic fibrosis patients: correlation with pulmonary function, nutritional status and systemic inflammation.** Thematic poster session 364. From genes to outcome: a long distance. Abstracts, 16th ERS Annual Congress, Munich, Germany, September 2-6, 2006. Eur Respir J 2006; 28 (S50): P4110.

Fila L, Musil J, Chladek J. **Parameters of oxidative stress in exhaled breath condensate are more pronounced in females than in males with cystic fibrosis.** Poster discussion session 429. Cystic fibrosis lung disease: let's make things better. Abstracts, 15th ERS Annual Congress, Copenhagen, Denmark, September 17-21, 2005. Eur Respir J 2005; 26 (S49): 728s.

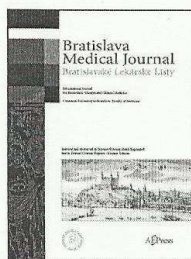
10. Seznam příloh

10.1. Fila L, Chládek J, Malý M, Musil J. **Nitrites and nitrates in exhaled breath condensate in cystic fibrosis: relation to clinical parameters.** Bratisl Med J; accepted for publication. **IF 0,403** (2011). Přiloženo *in extenso* včetně potvrzení o přijetí k publikaci.

10.2. Fila L, Grandcourtová A, Chládek J, Musil J. **Oxidative stress in cystic fibrosis patients with Burkholderia cenocepacia airways colonization: relation of 8-isoprostane concentration in exhaled breath condensate to lung function decline.** Folia Microbiol (Praha); accepted for publication. **IF 0,667** (2011). Přiloženo *in extenso* včetně potvrzení o přijetí k publikaci.

Příloha 10.1.

Fila L, Chládek J, Malý M, Musil J. **Nitrites and nitrates in exhaled breath condensate in cystic fibrosis: relation to clinical parameters.** Bratisl Med J; accepted for publication.



Bratislava Medical Journal
Bratislavské lekárske listy

Špitálska 24
SK-813 72 Bratislava 1
SLOVAKIA

Bratislava 5. november 2012

Vážený pán kolega!

Dovoľujeme si Vám oznámiť, že po preštudovaní Vášho rukopisu

No. 327/2011

Nitrites and nitrates in exhaled breath condensate in cystic fibrosis: relation to clinical parameters

Fila L, Chladek J, Maly M, Musil J

a po zhodnotení jeho významu je zaradený medzi akceptované rukopisy a bude uverejnený v našom časopise.

S pozdravom

ivan Hulín

(šéfredaktor)

BRATISLAVA MEDICAL JOURNAL
BRATISLAVSKÉ LEKÁRSKE LISTY
Redakcia / Editorial Office
Špitálska 24, 813 72 Bratislava
Slovakia
2.


Vybavuje PhDr. Helena Bernadíčová

Assistant Editor:
helena.bernadicova@fmed.uniba.sk
bll@fmed.uniba.sk

Phone/Fax: +421.2.52965400
www.elis.sk www.bmj.sk

Nitrites and nitrates in exhaled breath condensate in cystic fibrosis: relation to clinical parameters

Fila L.¹, Chládek J.², Malý M.³, Musil J.⁴

¹Pulmonary Department, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

²Department of Pharmacology, Charles University, Faculty of Medicine, Hradec Králové, Czech Republic

³Department of Scientific Information and Biostatistics, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

⁴Pulmonary Department, Hospital Mělník, Mělník, Czech Republic

Address for correspondence:

Libor Fila, MD, Pulmonary Department, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, and University Hospital Motol, V Úvalu 84, CZ-150 06 Prague, Czech Republic

Phone: +420-224436601

e-mail: libor_fila@seznam.cz

Introduction

Bronchopulmonary disease in cystic fibrosis (CF) is characterized by impaired mucociliary clearance, chronic bacterial infection and neutrophilic inflammation [1]. Beside dysfunction of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), impaired metabolism of nitric oxide (NO) plays a role in pathogenesis of CF [2]. Values of exhaled NO (eNO) in CF adults are lower when compared with healthy subjects and are positively correlated with pulmonary function [3,4,5].

Nitrites (NO_2^-) and nitrates (NO_3^-) are products of oxidative metabolism of NO. Studies measuring NO_2^- and NO_3^- in sputum or bronchoalveolar lavage fluid have found either unchanged or increased concentrations of these metabolites in patients with CF compared to healthy subjects [6,7,8,9]. Concentrations of NO_2^- and NO_3^- in sputum correlated positively with pulmonary function [6].

Exhaled breath condensate (EBC) is collected by cooling of the expired gas during tidal breathing. This is non-invasive and easy-to-perform method to sample secretions from the

airways [10]. Concentrations of NO_2^- in EBC in CF patients were similar or higher when compared with healthy controls and did not correlate with pulmonary function [11,12]. On the other hand, concentrations of NO_3^- in EBC were similar or lower in CF patients than in controls [13,14,15].

In the present study, relationships between concentrations of NO metabolites and clinical characteristics of CF patients were analysed by using commercial device for EBC collection and thoroughly validated analytical method for measurement of EBC concentrations of NO_2^- and NO_3^- in a large study population.

Methods

Patients with CF were consecutively recruited into the study at the Pulmonary Department of Charles University, 2nd Faculty of Medicine, and University Hospital Motol in Prague, Czech Republic. The diagnosis of CF had been confirmed in all patients by repeated sweat test with chloride concentration exceeding 60 mmol/l and by mutation analysis of the *CFTR* gene. Respiratory disorder other than CF and smoking history were the main exclusion criteria.

The examinations were performed during routine out-patient visits in stable phase of the disease. Demographic parameters (sex and age) and sputum microbiology (predominant bacteria) were collected from patients' records. Written informed consent was obtained from all subjects. The study was approved by Ethical Committee of Charles University, 2nd Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic. Control healthy subjects were staff members or students with no history of smoking or any chronic lung disease.

EBC collection was performed according to ERS/ATS guidelines using ECoScreen device (Jaeger, Germany) [10]. Obtained EBC was frozen immediately and stored at -80°C until examined. EBC NO_2^- and NO_3^- concentrations were assayed by liquid chromatography after derivatization with diaminonaphthalene, as described previously [16]. EBC collection was carried out in antemeridian hours and was preceded by chest physiotherapy early in the morning with nebulized dornase alpha. Lung function tests were completed after collection of EBC.

Lung function tests were performed using Jaeger MasterLab device (Jaeger, Germany) according to ERS/ATS guidelines with reversibility testing (with 400 μg of salbutamol) [17]. Better results from pre-/postbronchodilatory values of forced expiratory volume in the first second (FEV_1) were reported. Chest radiographs were done and scored using the Northern score [18]. Body weight and body height were measured under standard conditions and body

mass indexes (BMI) were calculated. Blood for routine biochemical analyses was sampled by venepuncture under standard conditions. Routine biochemical analyses, i.e. serum C-reactive protein (CRP), immunoglobulin G (IgG) and albumin were performed using standard techniques.

Data were expressed as arithmetic or geometric means (for normally or log-normally distributed data, respectively) and 95% confidence intervals (CI) for means. Comparisons between groups were made using Fisher's exact test and two-sample t-test. The values were log-transformed when the distribution of original variables was highly skewed (CRP, NO_2^- and NO_3^-). Evaluation of correlations between variables was made using Spearman's rank correlation coefficient (r_s). A p-value <0.05 was considered statistically significant. Statistical software Stata, release 9 (Stata-Corp LP, College Station, TX) was used for analysis.

Results

Forty-six patients with CF and 21 healthy subjects were enrolled in the study. No differences were found in the demographic data between these two groups. Gram-negative bacteria, i.e. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex, predominated in sputum cultures in 40 patients (Table 1).

Clinical characteristics of CF patients and results of laboratory tests are presented for the whole group and, separately, for females and males. No sex-related differences were found except for lower serum albumin values in females (Table 2).

Concentrations of NO_3^- were lower in CF patients than in healthy subjects, while the levels of NO_2^- did not differ between these groups. Sex did not influence the EBC NO metabolites concentrations in CF patients (Table 3).

No significant correlation was found between EBC NO_2^- concentration and any of clinical parameters in CF patients. The NO_3^- values were correlated with several clinical characteristics. The NO_3^- concentration correlated positively with FEV₁ value and serum albumin concentration. Negative correlation was observed between NO_3^- concentration and Northern score and also with serum CRP concentration (Table 4). Significant correlations are depicted in Figure 1.

Discussion

CF is generally considered to be a disease with decreased eNO. Recent publications report eNO in CF similar [19,20] or lower [21,22,23] than in controls. Positive correlation with FEV₁ value [3,5,24] or disease severity (Shwachman-Kulczycki score) [8] is also reported.

Issues regarding eNO levels in CF seem to be different in children with early lung disease than in adults with advanced bronchopulmonary involvement. The eNO value in children is initially normal and decreases subsequently [19]. Moreover, children with CF have higher alveolar NO concentration together with normal bronchial NO flux [20]. This is confirmable with higher macrophages count in alveoli in CF fetuses before infection [25] and with increased expression of inducible NO synthase (iNOS) in inflammatory cells [26]. Expression of iNOS in airway epithelial cells is normal [9] or decreased [23].

On the other hand, alveolar NO concentration is normal and bronchial NO flux is decreased in CF adults with advanced lung disease [4]. Expression of iNOS in both alveolar macrophages and airway epithelial cells decreases as inflammation progresses and is inversely related to neutrophils count in bronchoalveolar lavage fluid [9].

Beside iNOS, levels of eNO are influenced by arginase activity. Arginase reduces availability of arginine for NO synthase. Arginase activity is in CF higher and negatively correlated to FEV₁. Antibiotic therapy reduces arginase activity in CF [3]. Studies with oral L-arginine supplementation in CF patients were conducted. However, they showed diverse results with regard to eNO levels [27,28].

Further factor that takes part in lowered eNO in CF is retention of NO in respiratory secretions. It was found, that eNO changes similarly to FEV₁ after dornase alpha treatment [29]. In such condition, NO is subject of oxidative metabolism which is increased in CF airways [30].

We should take into consideration bacterial metabolism of NO in CF airways as well. In chronic *P. aeruginosa* infection, NO is reduced to ammonia [31].

Influence of alimentary NO₂⁻ and NO₃⁻ on eNO in CF is subject of conjecture. In healthy persons, diet rich on NO₃⁻ lead to increase of eNO [32]. Since 80% of alimentary NO₃⁻ originates in vegetables [33], we can not exclude influence of food on low eNO in CF. The reason is that high-calorie, high-fat diet in CF patients may contain low amount of vegetables. However, CF patients have higher serum concentrations of NO₂⁻ and NO₃⁻ than controls [26]. Issues regarding NO₂⁻ and NO₃⁻ concentrations in EBC are also complex. They include production of NO₂⁻ and NO₃⁻ by oxidative metabolism of NO in airways together with secretion of alimentary NO₃⁻ in saliva and their reduction to NO₂⁻ by oropharyngeal bacteria

[34]. Swallowed NO_2^- may be further reduced in acid juice in stomach to NO. NO_3^- rich diet leads to higher eNO in healthy people, in whom both alveolar NO concentration and bronchial NO flux increase. Chlorhexidine mouthwash leads to decrease of alveolar NO concentration at baseline and after dietary NO_3^- load [35]. In CF patients and in healthy controls, chlorhexidine mouthwash leads to decrease of eNO and EBC concentration of NO_2^- . EBC concentration of NO_2^- positively correlates with salivary NO_2^- concentration. Furthermore, decrease of NO_2^- concentration in saliva after chlorhexidine mouthwash is coupled with increase of NO_3^- concentration. However, EBC concentration of NO_3^- is not affected by oropharyngeal disinfection [15]. In accordance with these findings, EBC concentration of NO_2^- in CF patients is not correlated to pulmonary function (FEV_1), chest radiograph (Crispin-Norman score) and clinical status (modified Shwachman-Kulczycki score) and also do not predict pulmonary exacerbation [36]. In our study, we obtained similar results.

There is lack of data dealing with relation of EBC NO_3^- concentration and clinical and laboratory parameters in CF. In our study, we found significant correlation of EBC concentration of NO_3^- with pulmonary function, chest radiograph score and serum concentrations of albumin and CRP. On the basis of these results, measurement of EBC concentration of NO_3^- seems to give in CF patients more valuable information than examination of EBC NO_2^- concentration. However, bacterial metabolism of NO_3^- to NO_2^- in lower airways (similarly to oropharyngeal tract) could contribute to decrease of NO_3^- concentration in EBC. It was shown that presence of the membrane-bound nitrate reductase is critical for *P. aeruginosa* growth in CF respiratory secretions [37] and that sputum concentration of NO_3^- increases after antibiotic treatment of pulmonary exacerbation in CF [7].

Correlations of EBC concentration of NO_3^- and serum albumin and CRP may be considered surprising. Serum albumin is one of nutritional markers and also important antioxidant. Relation of nutritional status and NO synthase activity was studied in rats. In malnourished rats, NO synthase activity was decreased [38]. Similarly, in malnourished *CFTR* $-/-$ mice was decreased amount of NO_2^- in lung tissue [39]. Positive correlation of EBC concentration of NO_3^- with serum albumin concentration could reflect higher NO production in persons with better nutritional status. However, we found no correlation of EBC NO_3^- concentration with BMI.

Serum CRP concentration in our CF population may be considered too high for stable phase of disease. Nevertheless, our values correspond to data in CF adults in other studies [40,41]. Moreover, airway colonization with *P. aeruginosa* and/or *B. cepacia* complex was present in

our study group in 87% subjects and measurements in such groups of CF adults by others give similar data [42,43]. Information about relations of EBC concentration of both NO_2^- and NO_3^- with systemic inflammatory markers are sparse. For example, Ho and coworkers found positive correlation of EBC NO_2^- concentration and circulating plasma leukocytes and neutrophils [44]. In our study, negative correlation of EBC NO_3^- concentration and serum CRP concentration probably reflects systemic inflammatory response to severity of bronchopulmonary involvement or above mentioned airway colonization with typical gramnegatives [45,46].

EBC concentrations of NO_2^- and NO_3^- in healthy subjects observed in our study were in excellent agreement with results of other investigators obtained using same collection device and analytical method [47,48].

In summary, EBC NO_3^- concentrations correlate with disease severity in CF patients and are lower than in healthy subjects.

Acknowledgement

This work was funded by grant of Ministry of Health of Czech Republic (IGA MZCR NR/8304-3).

The authors wish to thank Ms. V. Lopotova for help with collection of EBC and preparation of samples for analyses, Ms. V. Flegrova for lung function tests, Ms. J. Prokopova for help with EBC analyses, and Department of Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry of Charles University, 2nd Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic, for analyses of inflammatory markers.

References

1. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 2004; 23 (1): 146-158.
2. de Winter-de Groot KM, van der Ent CK. Nitric oxide in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005; 4 (Suppl 2): 25-29
3. Grasemann H, Schwiertz R, Matthiesen S, Racke K, Ratjen F. Increased arginase activity in cystic fibrosis airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172 (12): 1523-1528.

4. Hofer M, Mueller L, Rechsteiner T, Benden C, Boehler A. Extended nitric oxide measurements in exhaled air of cystic fibrosis and healthy adults. *Lung* 2009; 187 (5): 307-313.
5. Ojoo JC, Mulrennan SA, Kastelik JA, Morice AH, Redington AE. Exhaled breath condensate pH and exhaled nitric oxide in allergic asthma and in cystic fibrosis. *Thorax* 2005; 60 (1): 22-26.
6. Cetin I, Ozcelik U, Gocmen A, Kiper N, Dogru D, Yalcin E. BALF nitrite as an indicator of inflammation in children with cystic fibrosis. *Respiration* 2004; 71 (6): 625-629.
7. Grasemann H, Ioannidis I, Tomkiewicz RP, de Groot H, Rubin BK, Ratjen F. Nitric oxide metabolites in cystic fibrosis lung disease. *Arch Dis Child* 1998; 78 (1): 49-53.
8. Robroeks CM, Rosias PP, van Vliet D et al. Biomarkers in exhaled breath condensate indicate presence and severity of cystic fibrosis in children. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19 (7): 652-659.
9. Wooldridge JL, Deutsch GH, Sontag MK et al. NO pathway in CF and non-CF children. *Pediatr Pulmonol* 2004; 37 (4): 338-350.
10. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ et al. ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26 (3): 523-548.
11. Balint B, Kharitonov SA, Hanazawa T et al. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2001; 17 (6): 1201-1207.
12. Corradi M, Montuschi P, Donnelly LE, Pesci A, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163 (4): 854-858.
13. Fila L, Musil J, Valentová Bartáková L, Chládek J. The impact of inhaled corticosteroids treatment on exhaled breath condensate in cystic fibrosis patients. *Stud Pneumol Phthiseol* 2008; 68 (1): 6-9.
14. Griese M, Noss J, Schramel P. Elemental and ion composition of exhaled air condensate in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2003; 2 (3): 136-142.
15. Zetterquist W, Marteus H, Kalm-Stephens P et al. Oral bacteria--the missing link to ambiguous findings of exhaled nitrogen oxides in cystic fibrosis. *Respir Med* 2009; 103 (2): 187-193.

16. Chládková J, Krčmová I, Chládek J, Čáp P, Mičuda S, Hanzálková Y. Validation of nitrite and nitrate measurements in exhaled breath condensate. *Respiration* 2006; 73 (2): 173-179.
17. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V et al. ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26 (2): 319-338.
18. Conway SP, Pond MN, Bowler I et al. The chest radiograph in cystic fibrosis: a new scoring system compared with the Chrispin-Norman and Brasfield scores. *Thorax* 1994; 49 (9): 860-862.
19. Franklin PJ, Hall GL, Moeller A, Horak F Jr, Brennan S, Stick SM. Exhaled nitric oxide is not reduced in infants with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2006; 27 (2): 350-353.
20. Suri R, Paraskakis E, Bush A. Alveolar, but not bronchial nitric oxide production is elevated in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42 (12): 1215-1221.
21. Gabriele C, Nieuwhof EM, Van Der Wiel EC et al. Exhaled nitric oxide differentiates airway diseases in the first two years of life. *Pediatr Res* 2006; 60 (4): 461-465.
22. Keen C, Olin AC, Edentoft A, Gronowitz E, Strandvik B. Airway nitric oxide in patients with cystic fibrosis is associated with pancreatic function, *Pseudomonas* infection, and polyunsaturated fatty acids. *Chest* 2007; 131 (6): 1857-1864.
23. Moeller A, Horak F Jr, Lane C et al. Inducible NO synthase expression is low in airway epithelium from young children with cystic fibrosis. *Thorax* 2006; 61 (6): 514-520.
24. Hubert D, Aubourg F, Fauroux B et al. Exhaled nitric oxide in cystic fibrosis: relationships with airway and lung vascular impairments. *Eur Respir J* 2009; 34 (1): 117-124.
25. Hubeau C, Puchelle E, Gaillard D. Distinct pattern of immune cell population in the lung of human fetuses with cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108 (4): 524-529.
26. Morrissey BM, Schilling K, Weil JV, Silkoff PE, Rodman DM. Nitric oxide and protein nitration in the cystic fibrosis airway. *Arch Biochem Biophys* 2002; 406 (1): 33-39.
27. Everard ML, Donnelly D. A pilot study of oral L-arginine in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005; 4 (1): 67-69.
28. Grasemann H, Grasemann C, Kurtz F, Tietze-Schillings G, Vester U, Ratjen F. Oral L-arginine supplementation in cystic fibrosis patients: a placebo-controlled study. *Eur Respir J* 2005; 25 (1): 62-68.

29. Grasemann H, Lax H, Treseler JW, Colin AA. Dornase alpha and exhaled NO in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2004; 38 (5): 379-385.
30. Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Analysis of expired air for oxidation products. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166 (12): S31-S37.
31. Gaston B, Ratjen F, Vaughan JW et al. Nitrogen redox balance in the cystic fibrosis airway: effects of antipseudomonal therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165 (3): 387-390.
32. Vints AM, Oostveen E, Eeckhaut G, Smolders M, De Backer WA. Time-dependent effect of nitrate-rich meals on exhaled nitric oxide in healthy subjects. *Chest* 2005; 128 (4): 2465-2470.
33. Hord NG, Tang Y, Bryan NS. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *Am J Clin Nutr* 2009; 90 (1): 1-10.
34. Marteus H, Tornberg DC, Weitzberg E, Schedin U, Alving K. Origin of nitrite and nitrate in nasal and exhaled breath condensate and relation to nitric oxide formation. *Thorax* 2005; 60 (3): 219-225.
35. Malinowski A, Janson C, Holm L, Nordvall L, Alving K. Basal and induced NO formation in the pharyngo-oral tract influences estimates of alveolar NO levels. *J Appl Physiol* 2009; 106 (2): 513-519.
36. Horak F Jr, Moeller A, Singer F et al. Longitudinal monitoring of pediatric cystic fibrosis lung disease using nitrite in exhaled breath condensate. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42 (12): 1198-1206.
37. Palmer KL, Brown SA, Whiteley M. Membrane-bound nitrate reductase is required for anaerobic growth in cystic fibrosis sputum. *J Bacteriol* 2007; 189 (12): 4449-4455.
38. Wu G, Flynn NE, Flynn SP, Jolly CA, Davis PK. Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. *J Nutr* 1999; 129 (7): 1347-1354.
39. Yu H, Nasr SZ, Deretic V. Innate lung defenses and compromised *Pseudomonas aeruginosa* clearance in the malnourished mouse model of respiratory infections in cystic fibrosis. *Infect Immun* 2000; 68 (4): 2142-2147.
40. Dufresne V, Knoop C, Van Muylem A et al. Effect of systemic inflammation on inspiratory and limb muscle strength and bulk in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180 (2): 153-158.

41. Fischer R, Simmerlein R, Huber RM, Schiffel H, Lang SM. Lung disease severity, chronic inflammation, iron deficiency, and erythropoietin response in adults with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42 (12): 1193-1197.
42. Hendry J, Nixon L, Dodd M et al. Pulmonary function, serum markers of inflammation, and IgG antibodies to core lipopolysaccharide of *Burkholderia cepacia* in adults with cystic fibrosis, following colonization with *Burkholderia cepacia*. *Pediatr Pulmonol* 2000; 29 (1): 8-10.
43. Jones AM, Martin L, Bright-Thomas RJ et al. Inflammatory markers in cystic fibrosis patients with transmissible *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur Respir J* 2003; 22 (3): 503-506.
44. Ho LP, Innes JA, Greening AP. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 1998; 53 (8): 680-684.
45. Levy H, Kalish LA, Huntington I et al. Inflammatory markers of lung disease in adult patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42 (3): 256-262.
46. Wolter J, Seeney S, Bell S, Bowler S, Masel P, McCormack J. Effect of long term treatment with azithromycin on disease parameters in cystic fibrosis: a randomised trial. *Thorax* 2002; 57 (3): 212-216.
47. Balint B, Donnelly LE, Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. *Thorax* 2001; 56 (6): 456-461.
48. Csoma Z, Bush A, Wilson NM et al. Nitric oxide metabolites are not reduced in exhaled breath condensate of patients with primary ciliary dyskinesia. *Chest* 2003; 124 (2): 633-638.

List of abbreviations

BMI	body mass index
CF	cystic fibrosis
CRP	C-reactive protein
EBC	exhaled breath condensate
eNO	exhaled nitric oxide
FEV ₁	forced expiratory volume in first second
IgG	immunoglobulin G
iNOS	inducible nitric oxide synthase

Table 1. Demographic data in CF patients and in healthy controls

Parameter	CF patients (n=46)	Healthy controls (n=21)	p-value
Age (years)	24.6 (19.5-32.9)	26.0 (15.0-38.0)	0.246*
Sex (M / F)	23 / 23	12 / 9	0.61 [§]
Sputum microbiology			
-no bacteria	1 (2.1%)		
- <i>Staph. aureus</i>	5 (10.9%)		
- <i>P. aeruginosa</i>	12 (26.1%)		
- <i>B. cepacia</i> complex	28 (60.9%)		

Age is expressed as arithmetic mean and 95% CI; * two-sample t-test; [§] Fisher's exact test

Table 2. Clinical characteristics in CF patients

Parameter	CF patients (n=46)	Sex-specific characteristics in CF patients		p-value*
		Males (n=23)	Females (n=23)	
FEV ₁ (% pred.)	59.1 (53.2-65.0)	58.4 (50.8-66.0)	59.8 (50.3-69.4)	0.81
Northern score	8.0 (7.1-8.8)	8. (6.9-9.3)	7.9 (6.6-9.2)	0.80
BMI (kg/m ²)	20.8 (20.1-21.6)	20.7 (19.7-21.8)	20.9 (19.8-22.0)	0.78
Albumin (g/l)	42.0 (41.4-42.9)	43.3 (42.1-44.5)	40.7 (39.5-41.9)	0.003
CRP (mg/l)	8.3 (5.9-11.7)	8.4 (5.0-13.9)	8.2 (5.0-13.6)	0.96
IgG (g/l)	18.0 (16.6-19.5)	17.2 (15.0-19.4)	19.8 (16.9-20.9)	0.25

Values are expressed as arithmetic means (FEV₁, Northern score, BMI, albumin and IgG) or geometric means (CRP) and 95% CI; * two-sample t-test

Table 3. EBC concentrations of nitrites and nitrates in CF patients and in healthy controls

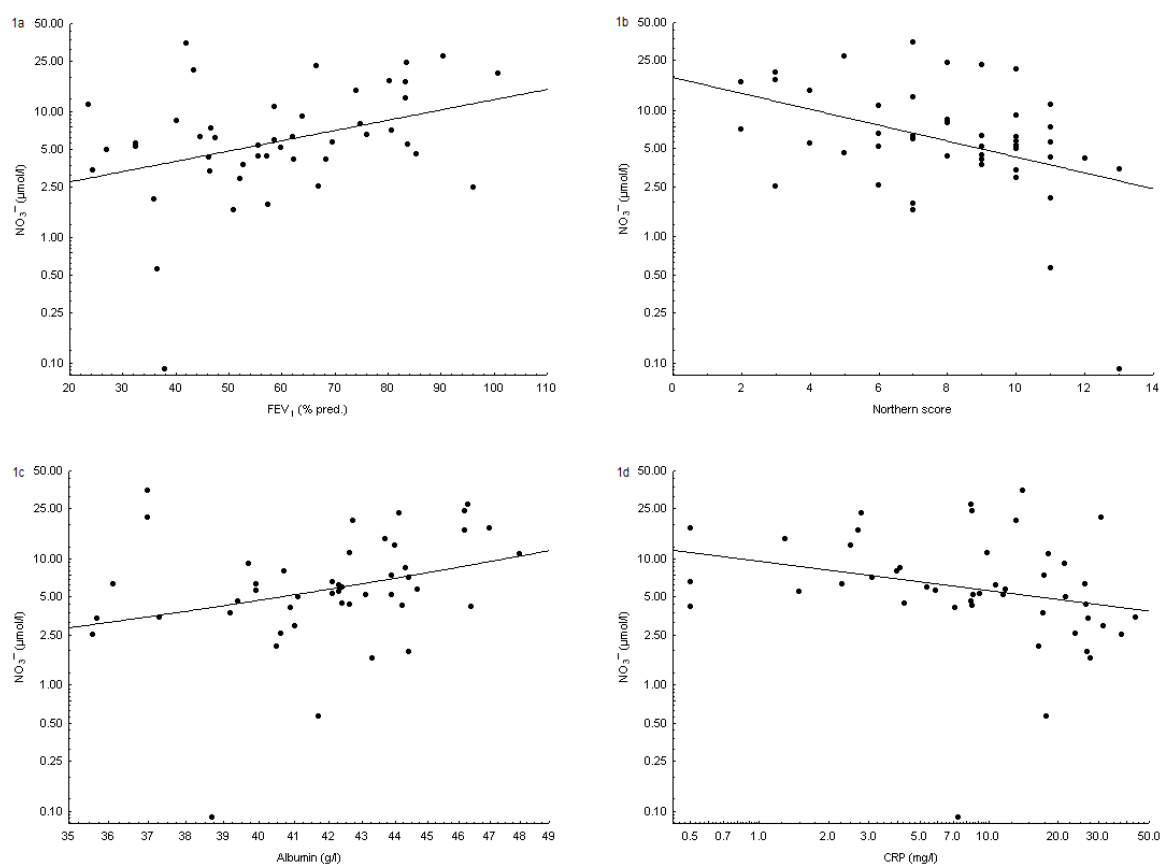
Parameter	Healthy controls (n=21)	CF patients (n=46)	p-value*	Sex-specific characteristics in CF patients		
				Males (n=23)	Females (n=23)	p-value*
Nitrites (µmol/l)	4.3 (3.7-4.9)	4.4 (3.5-5.5)	0.85	5. (3.9-5.8)	3.8 (2.7-5.3)	0.16
Nitrates (µmol/l)	14.3 (10.7-19.3)	5.8 (4.2-7.8)	<0.001	6.2 (4.0-9.5)	5.3 (3.3-8.6)	0.63

Values are expressed as geometric means and 95% CI; * two-sample t-test

Table 4. Spearman's correlations (r_s) between clinical characteristics of CF patients and EBC concentrations of nitrites and nitrates

Parameter	Nitrites ($\mu\text{mol/l}$)		Nitrates ($\mu\text{mol/l}$)	
	r_s	p-value	r_s	p-value
FEV ₁ (% pred.)	0.14	0.33	0.33	0.025
Northern score	-0.09	0.57	-0.36	0.015
BMI (kg/m^2)	0.05	0.74	0.27	0.068
Albumin (g/l)	0.12	0.42	0.35	0.016
CRP (mg/l)	-0.09	0.53	-0.40	0.005
IgG (g/l)	-0.20	0.19	-0.21	0.089

Figure 1. Correlations between EBC NO_3^- concentration and clinical parameters in CF patients



Significant correlations were found between exhaled breath condensate NO_3^- concentration and FEV₁ (1a), Northern score (1b) and serum albumin (1c) and C-reactive protein (1d) concentration

Abstract

Objectives. To evaluate correlation of exhaled breath condensate (EBC) nitrite and nitrate concentrations with disease severity in cystic fibrosis (CF) patients.

Background. Nitrites and nitrates are products of oxidative metabolism of nitric oxide. Impaired metabolism of nitric oxide plays a role in pathogenesis of CF.

Methods. EBC was collected from 46 stable CF patients and from 21 healthy controls. EBC concentrations of nitrites and nitrates were correlated with parameters of lung disease and nutritional status and with systemic inflammatory markers.

Results. EBC nitrates concentrations in CF patients were lower than in healthy subjects (5.8 vs. 14.3 $\mu\text{mol/l}$, $p < 0.001$). They correlated positively with FEV_1 ($p = 0.025$) and serum albumin values ($p = 0.016$) and negatively with chest radiograph Northern score ($p = 0.015$) and serum C-reactive protein values ($p = 0.005$). EBC nitrites concentrations in CF patients did not differ from that in healthy subjects and were not correlated to any studied parameter.

Conclusions. EBC nitrates concentrations correlate with disease severity in CF patients and are lower than in healthy subjects.

Key words

Cystic fibrosis – disease severity – exhaled breath condensate – nitrites – nitrates

Condensed abstract

Exhaled breath condensate (EBC) nitrates concentrations correlate with disease severity in cystic fibrosis (CF) patients and are lower than in healthy subjects. EBC nitrites concentrations did not differ from that in healthy subjects and were not correlated to disease severity in CF.

Příloha 10.2.

Fila L, Grandcourtová A, Chládek J, Musil J. **Oxidative stress in cystic fibrosis patients with *Burkholderia cenocepacia* airways colonization: relation of 8-isoprostane concentration in exhaled breath condensate to lung function decline.** Folia Microbiol (Praha); accepted for publication.

FOLIA MICROBIOLOGICA

International Journal for Basic, Environmental and Applied Microbiology, and Immunology

<http://www.biomed.cas.cz/mbu/fovia/>



Videňská 1083
142 20 Prague 4
CZECH REPUBLIC



fovia@biomed.cas.cz

Dr. Libor Fila
Department of Pneumology, Second Faculty of Medicine,
and University Hospital Motol
Charles University in Prague
Prague
Czech Republic
libor_fila@seznam.cz

27 March 2013

Certificate

This is to certify that the paper

LIBOR FILA, ALŽBĚTA GRANDCOURTOVÁ, JAROSLAV CHLÁDEK, JAROMÍR MUSIL

**OXIDATIVE STRESS IN CYSTIC FIBROSIS PATIENTS WITH *Burkholderia cenocepacia*
AIRWAYS COLONIZATION: RELATION OF 8-ISOPROSTANE CONCENTRATION
IN EXHALED BREATH CONDENSATE TO LUNG FUNCTION DECLINE**

had been accepted for publication in *Folia Microbiologica*.

For Editorial Office
of *Folia Microbiologica*

Dr. Jiří Matějů,
Editor-in-Chief

Oxidative stress in cystic fibrosis patients with *Burkholderia cenocepacia* airways colonization: relation of 8-isoprostane concentration in exhaled breath condensate to lung function decline

Libor Fila, Alžběta Grandcourtová, Jaroslav Chládek, Jaromír Musil

L. Fila (✉)

Department of Pneumology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, and University Hospital Motol

V Úvalu 84

150 06 Prague, Czech Republic

phone: +420-224436601, fax: +420-224436620

e-mail: libor_fila@seznam.cz

Alžběta Grandcourtová

Department of Pneumology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, and University Hospital Motol

V Úvalu 84

150 06 Prague, Czech Republic

J. Chládek

Department of Pharmacology, Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Králové

Šimkova 870

500 38 Hradec Kralové, Czech Republic

J. Musil

Pulmonary Department, Hospital Mělník

Pražská 528

276 01 Mělník, Czech Republic

Abstract

The association between oxidative stress and neutrophilic inflammation in cystic fibrosis (CF) lung disease is well recognized. 8-isoprostane is a product of non-enzymatic oxidation of arachidonic acid. The aim of the present study was to examine the relationship between lung function decline and 8-isoprostane concentrations in exhaled breath condensate (EBC) in CF patients with *Burkholderia cenocepacia* airway colonization. Concentrations of 8-isoprostane in EBC were measured in 24 stable CF patients with *B. cenocepacia* airway colonization. The median (interquartile range) age of the cohort was 23.9 (22.0; 26.6) years. All patients underwent clinical examinations and pulmonary function tests at the time of EBC collection and in one-, three- and five-year intervals. 8-isoprostane concentrations in EBC correlated to one- and three-year decline of forced expiratory volume in one second (FEV₁) with r_s values -0.511 ($p = 0.0011$) and -0.495 ($p = 0.016$), respectively. In multiple regression analysis, 8-isoprostane concentrations in EBC were the only independent predictor for one-year FEV₁ decline ($p = 0.01$). When median value of 8-isoprostane concentration in EBC (10.0 pg/mL) was used as a cut-off, subgroups of patients with lower and higher level of oxidative stress had significantly different median (interquartile range) FEV₁ decline in one-year interval, -2.4 (-5.3; 0.8) and -7.3 (-10.3; -5.8) % predicted ($p = 0.009$). In conclusion, 8-isoprostane concentrations in EBC correlated to short-term lung function decline in CF patients with *B. cenocepacia* airway colonization. This correlation reflects the role of oxidative stress in CF lung pathogenesis and contributes to prediction of prognosis in these patients.

Keywords

Cystic fibrosis, *Burkholderia cepacia* complex, oxidative stress, lung function decline

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive genetic disorder that has, in particular, a severe affect on the lungs. It is characterized by the abnormal transport of chloride and sodium across the epithelium, leading to thick, viscous secretions (Yankaskas et al. 2004). Mutations in the CF transmembrane conductance regulator gene dysregulate a variety of compounds of the innate immune system in the airways, e.g. mucociliary clearance system, cationic antimicrobial peptides, inflammatory cells and inflammatory signal transduction pathways (Döring and Gulbins 2009). The airways of CF patients are infected with a narrow-spectrum of bacterial pathogens, e.g. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Chronic bronchopulmonary infection is accompanied by neutrophilic inflammation with increased oxidative stress and proteases-antiproteases imbalance which are a major causes of bronchiectasis formation and progressive obstructive ventilatory disorder (Ratjen 2009; Starosta et al. 2006). Lung disease accounts for nearly 85% of CF mortality (Flume et al. 2007).

Bacterial species included into the *Burkholderia cepacia* complex are other typical pathogens affecting CF airways. The complex consists of at least 17 genetically closely related bacterial species including *B. cenocepacia* and *B. multivorans* that dominate in CF (Drevinek and Mahenthiralingam 2010). Epidemic strains of *B. cepacia* complex bacteria may rapidly spread in the CF population, so infection surveillance programs are necessary to prevent outbreaks (Dedeckova et al. 2012). Infection with *B. cepacia* complex may lead to a simple colonization or to a chronic infection with more rapid clinical deterioration and also to cepacia syndrome, usually fatal necrotizing pneumonia and septicemia (Isles et al. 1984). The factors influencing the course of CF bronchopulmonary disease in *B. cepacia* complex infected people are not completely understood and prognosis of those individuals is poorly predictable (Lynch 2009). Oxidative stress is defined as the presence of reactive oxygen species (ROS) in excess of the available antioxidant capacity. ROS can damage proteins, lipids and DNA altering an organism's structure and function (Adly 2010). Oxidative stress in CF lungs may be evaluated by different means. Examination of exhaled breath condensate (EBC) is a well established noninvasive experimental tool for assessing markers of oxidative stress, e.g. hydrogen peroxide and 8-isoprostane, in many respiratory disease including CF (Fila and Musil 2010). The aim of the present study was to examine the relationship between lung function decline and 8-isoprostane concentrations in EBC in CF patients with *B. cenocepacia* ST-32 airway colonization.

Material and methods

Patients

Patients with CF were consecutively recruited into the study at the Pulmonary Department of Charles University, 2nd Faculty of Medicine, and University Hospital Motol in Prague, Czech Republic. The diagnosis of CF had been confirmed in all patients by repeated sweat test with chloride concentration exceeding 60 mmol/L and by mutation analysis of the *CFTR* gene. Respiratory disorder other than CF and a history of smoking were the main exclusion criteria. None of the enrolled patients had anti-inflammatory therapy with corticosteroids, azithromycin or ibuprofen. The examinations were performed during routine out-patient visits in the stable phase of the disease (minimal interval from the last pulmonary exacerbation was four weeks). Demographic parameters (gender and age), concurrent *P. aeruginosa* airway colonization, pancreatic enzyme use and duration of *B. cenocepacia* ST-32 colonization of the airways were received from patient records. The presence of *B. cenocepacia* ST-32 epidemic strain in respiratory secretions was confirmed in all patients by multilocus sequence typing (Baldwin et al. 2005). Written informed consent was obtained from all subjects. The study was approved by Ethical Committee of Charles University, 2nd Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic.

Exhaled breath condensate collection

EBC collection was carried out in ante meridian hours and was preceded by chest physiotherapy with nebulized dornase alpha early in the morning. EBC collection was performed according to ERS/ATS guidelines using ECoScreen device (Jaeger, Wuerzburg, Germany) (Horvath et al. 2005). No measures to modify ambient conditions were used. Patients were at rest and maintained tidal breathing during EBC collection. They used a nasal clip and were instructed to swallow regularly to prevent salivary contamination. The condenser maintained a temperature of -10 °C during the 15 min collection period. The obtained EBC samples were frozen immediately and stored at -80 °C until the time of examination.

Pulmonary function tests

Lung function tests were performed using a Jaeger MasterLab device (Jaeger, Wuerzburg, Germany) according to ERS/ATS guidelines (Miller et al. 2005). Baseline lung function tests were completed shortly after collection of EBC.

8-isoprostane measurement

8-isoprostane concentrations in EBC were measured using a commercially available competitive enzyme immunoassay (8-Isoprostane EIA Kit, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) as described previously (Montuschi et al. 2000). Calibration standards were prepared in the range of 2-250 pg/mL 8-isoprostane. According to the manufacturer's data, the intra-assay and inter-assay coefficients of variation are less than 20% at the concentration of 2 pg/mL.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statistica 8 Cz (StatSoft, Czech Republic) statistical software. Data are presented as the median and interquartile range (IQR) because the variables were not normally distributed (Lilliefors and Shapiro-Wilk's tests for normality were used). Data were analysed using Spearman's correlation coefficient and general regression model for univariate and multivariate analysis, respectively. Mann-Whitney test was used for comparison between groups. Logarithmically transformed data were used where appropriate. A p-value <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Study group

Twenty-four subjects were included in the study. Four deaths occurred during the study and one-, three- and five-year changes in FEV₁ were analyzed in 24, 23 and 20 subjects, respectively. Baseline demographic data together with clinical and functional parameters of the study subjects are summarized in Table 1. Changes of FEV₁ values in one-, three- and five-year intervals are shown in Figure 1. Medians of one-, three- and five-year changes in FEV₁ were -5.8, -11.2 and -13.1% predicted, respectively, giving annual rates of decline in FEV₁ - 5.8, -3.7 and -2.6% predicted, respectively.

8-isoprostane concentrations in EBC

8-isoprostane was detected in EBC in all subjects with a median (IQR) concentration 10.0 (5.9-15.3) pg/mL. In univariate analyses, 8-isoprostane concentrations in EBC did not correlate with baseline FEV₁ and body mass index values, age or duration of *B. cenocepacia* colonization (p-values >0.18 for all, data not shown).

Correlations of 8-isoprostane concentrations in EBC with FEV₁ decline

There were significant correlations between 8-isoprostane concentrations in EBC and one- ($r_s = -0.511$, $p = 0.011$) and three-year ($r_s = -0.495$, $p = 0.016$) changes in FEV₁ values (Figures 2 and 3). The five-year FEV₁ decline did not correlate significantly with 8-isoprostane concentrations in EBC ($r_s = -0.374$, $p = 0.1$).

Multivariate analysis for determinants of FEV₁ decline

In the general regression model, FEV₁ decline was used as a dependent variable whereas gender, age, duration of *B. cenocepacia* colonization, baseline FEV₁ values and 8-isoprostane concentrations in EBC were used as independent variables (Table 2). The only independent determinant of one-year change in FEV₁ was 8-isoprostane concentration in EBC. In analyses with three- and five-year FEV₁ declines, no statistically significant results were found (data not shown).

Predictive value of 8-isoprostane concentrations in EBC

The patients were stratified into two subgroups using the median concentration of 8-isoprostane at study entry (10.0 pg/mL) as a cut-off value. In the subgroup with the 8-isoprostane concentration below the median, one-year change in FEV₁ was significantly less (median: -2.4 % predicted) when compared to that in the subgroup with the higher 8-isoprostane concentration (median: -7.3 % predicted; $p = 0.009$; Mann-Whitney test) (Figure 4).

Discussion

Progressive lung disease is a major determinant of CF mortality. Analysis of risk factors for the rate of decline in FEV₁ in adults with CF was recently published (Konstan et al. 2012). Among thirty risk factors, *B. cepacia* complex, pancreatic enzyme use, multidrug-resistant and mucoid *P. aeruginosa*, daily cough and female sex predicted a greater decline in FEV₁ whereas a low baseline FEV₁ and sinusitis were associated with a lower decline in a large group of 18-24 years old adults with CF during the follow-up period of 3.0-5.5 years.

Prediction of survival in CF individuals is difficult because of variable disease course. Nevertheless, it is very important for the timing of inclusion to the lung transplantation waiting list, especially for patients with worse lung function. Seminal paper of Kerem et al. written twenty years ago stated that patients with FEV₁ <30% predicted have a 50% chance of dying within two years (Kerem et al. 1992). Subsequent studies used more complicated models with other variables in addition to FEV₁. Mayer-Hamblet et al. (2002) developed a model of predictors of 2-year mortality. Surprisingly, this model provided no better diagnostic accuracy than did a simple FEV₁-based criterion. Liou et al. (2001) developed and validated a 5-year survivorship model including age, FEV₁ value, gender, nutritional status, pancreatic sufficiency, diabetes mellitus, *Staph. aureus* and *B. cepacia* complex infection, and the annual number of pulmonary exacerbations. In this model, *B. cepacia* complex infection had the largest effect for predicting the 5-year survivorship. Reduced pulmonary function and shortened survival in CF individuals with *B. cepacia* complex infection we have also demonstrated in a large group of Czech CF adults (Fila et al 2009).

In our study, a microbiologically homogenous group of CF adults was analyzed. The decline in FEV₁ was not related to gender, age, duration of *B. cenocepacia* infection or baseline FEV₁ value. Other factors, namely pancreatic enzyme use and concurrent *P. aeruginosa* infection, were not included into the analysis because of their presence in the majority (22 out of 24) and the minority (2 out of 24) of patients, respectively.

Oxidative stress markers were studied in CF patients in the samples from the respiratory tract and also in plasma and urine. Both systemic and local levels of oxidative stress markers were higher in CF patients compared to healthy controls (Brown et al. 1995; Colins et al. 1999; Morrissey et al. 2002). Their correlations with CF lung disease severity were demonstrated. Brown et al. (1996) revealed a negative correlation of plasma malondialdehyde with FEV₁. Lucidi et al. (2008) showed a positive correlation of more severe lung disease (FEV₁ and Crispin-Norman chest X-ray score values) with 8-isoprostane concentrations in EBC. Sputum 8-isoprostane concentrations were also correlated to FEV₁ (Reid et al. 2007). Finally, Starosta

et al. (2006) found a negative correlation between the concentration of protein carbonyls in bronchoalveolar lavage fluid with FEV₁. In contrast, hydrogen peroxide concentrations in EBC of CF patients and healthy controls were comparable and no correlation of this oxidative stress marker with pulmonary function was observed (Worlitzsch et al. 1998; Ho et al. 1999). In the present study, we failed to detect a correlation between baseline EBC 8-isoprostane and FEV₁. Similarly, no correlation of baseline EBC 8-isoprostane with any other clinical and functional parameter could be demonstrated.

Studies examining whether or not the decline in FEV₁ of CF patients is related to the levels of oxidative stress markers are sparse. Exhaled carbon monoxide, i.e. another marker of oxidative stress, was higher in CF individuals than in healthy controls and correlated with one-year FEV₁ deterioration (Antuni et al. 2000). The present study is the first one showing the value of 8-isoprostane concentrations in EBC for prediction of the FEV₁ decline in CF patients. Notably, a positive correlation of this marker with exhaled carbon monoxide was observed in CF by others (Montuschi et al. 2000). Neutrophilic inflammation is a major source of oxidative stress in CF airways. The recent paper of Sagel et al. (2012) demonstrated the predictive value of sputum inflammatory biomarkers, particularly neutrophilic elastase, for subsequent lung function decline in CF.

The CF patients recruited for this study were infected with *B. cenocepacia* epidemic strain ST-32. This strain is frequent in Czech CF adults and was found also in other European and North American CF centres (Drevinek and Mahenthiralingam 2010). Beside the relationship between neutrophilic inflammation, oxidative stress and deterioration of lung function, Drevinek et al. (2010) have demonstrated that oxidative stress can lead to genomic rearrangements in the mentioned CF pathogen due to insertion sequence movement. This process may participate in the wide variation of clinical outcomes associated with microbial infection in CF. Thus, in addition to the prevention and the antibiotic treatment of chronic airway infection and to anti-inflammatory therapy to alleviate sources of oxidative stress, proper antioxidant therapy is vital for CF patients. Supplementation of vitamins is a routine measure in CF treatment. Other antioxidant therapies, e.g. glutathione treatment, are currently under evaluation in clinical studies (Galli et al. 2012).

One possible limitation of the present study is that the pulmonary exacerbation rate was not included in multivariate analysis for determinants of FEV₁ decline. This variable was examined as a predictor of mortality or lung function decline in some (e.g. Mayer-Hamblet et al. 2002 and Liou et al. 2001) but not all studies (e.g. Kerem et al. 1992). In a recent paper of Konstan et al. (2012), pulmonary exacerbation rate was not included among thirty analyzed

risk factors. Notably, Waters et al. (2012) recently demonstrated the effect of pulmonary exacerbation rate on the long-term decline in lung function of CF patients.

Conclusion

In conclusion, EBC 8-isoprostane concentrations correlate with changes of FEV₁ values in *B. cenocepacia* colonized CF adults during one- and three-year follow-up. These findings suggest that EBC 8-isoprostane concentrations may be used as a predictor of short-term lung function decline.

Abbreviations

ATS: American Thoracic Society; CF: cystic fibrosis; EBC: exhaled breath condensate, ERS: European Respiratory Society; FEV₁: forced expiratory volume in one second; IQR: interquartile range; ROS: reactive oxygen species.

Acknowledgements

Supported by the project (Ministry of Health of the Czech Republic) for conceptual development of research organization 00064203 (University Hospital Motol, Prague, Czech Republic) and by grants from Ministry of Health of the Czech Republic NS10543-3 and NT12405-5. The authors wish to thank Ms. Věra Lopotová for help with collection of EBC and preparation of samples for analyses, Ms. Venuše Flegrová for help with lung function tests and Ms. Jana Prokopová for help with EBC analyses.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LF and JM were involved in study conception. LF performed patients' selection. LF and AG were involved in patients' examination, lung function tests and collection of EBC. JC performed EBC 8-isoprostane measurement. LF performed the data acquisition and the

statistical analysis. LF and AG prepared the manuscript. JC and JM were involved in revising the manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

References

- Adly AA (2010) Oxidative stress and disease: An updated review. *Res J Immunol* 3:129-145.
- Antuni JD, Kharitonov SA, Hughes D, Hodson ME, Barnes PJ (2000) Increase in exhaled carbon monoxide during exacerbations of cystic fibrosis. *Thorax* 55:138-142.
- Baldwin A, Mahenthiralingam E, Thickett KM et al (2005) Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* 43:4665-4673.
- Brown RK, McBurney A, Lunec J, Kelly FJ (1995) Oxidative damage to DNA in patients with cystic fibrosis. *Free Radic Biol Med* 18:801-806.
- Brown RK, Wyatt H, Price JF, Kelly FJ (1996) Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress. *Eur Respir J* 9:334-339.
- Collins CE, Quaggiotto P, Wood L, O'Loughlin EV, Henry RL, Garg ML (1999) Elevated plasma levels of F2 alpha isoprostane in cystic fibrosis. *Lipids* 34:551-556.
- Dedekova K, Fila L, Skalicka V et al (2012) PCR detection of *Burkholderia cepacia* complex as one of key factors to handle a long-term outbreak. *J Cyst Fibros* 11:440-445.
- Döring G, Gulbins E (2009) Cystic fibrosis and innate immunity: how chloride channel mutations provoke lung disease. *Cell Microbiol* 11:208-216.
- Drevinek P, Mahenthiralingam E (2010) *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. *Clin Microbiol Infect* 16: 821-830.
- Drevinek P, Baldwin A, Lindenburg L et al (2010) Oxidative stress of *Burkholderia cenocepacia* induces insertion sequence-mediated genomic rearrangements that interfere with macrorestriction-based genotyping. *J Clin Microbiol* 48:34-40.
- Fila L, Sedlak V, Binkova I, Jakubec P, Bittenglova R, Musil J (2009) Twenty years of care for cystic fibrosis adults in Czech Republic. *Vnitr Lek* 55:542-548.
- Fila L, Musil J (2010) Examination of exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Cas Lek Cesk* 149:173-177.
- Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA et al (2007) Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med* 176:957-969.

Galli F, Battistoni A, Gambari R et al (2012) Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 1822:690-713.

Ho LP, Faccenda J, Innes JA, Greening AP (1999) Expired hydrogen peroxide in breath condensate of cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 13:103-106.

Horvath I, Hunt J, Barnes PJ et al (2005) TS/ERS task force on exhaled breath condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 26:523-548.

Isles A, Maclusky I, Corey M et al (1984) *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *J Pediatr* 104:206-210.

Kerem E, Reisman J, Corey M, Canny GJ, Levison H (1992) Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 326:1187-1191.

Konstan MW, Wagener JS, Vandevanter DR (2012) Risk factors for rate of decline in FEV1 in adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 11:405-411.

Liou TG, Adler FR, Fitzsimmons SC, Cahill BC, Hibbs JR, Marshall BC (2001) Predictive 5-year survivorship model of cystic fibrosis. *Am J Epidemiol* 153:345-352.

Lucidi V, Ciabattoni G, Bella S, Barnes PJ, Montuschi P (2008) Exhaled 8-isoprostane and prostaglandin E(2) in patients with stable and unstable cystic fibrosis. *Free Radic Biol Med* 45:913-919.

Lynch JP 3rd (2009) *Burkholderia cepacia* complex: impact on the cystic fibrosis lung lesion. *Semin Respir Crit Care Med* 30:596-610.

Mayer-Hamblett N, Rosenfeld M, Emerson J, Goss CH, Aitken ML (2002) Developing cystic fibrosis lung transplant referral criteria using predictors of 2-year mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 166:1550-1555.

Miller MR, Hankinson J, Brusasco V et al (2005) ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 26:319-338.

Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G et al (2000) Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 55:205-209.

Morrissey BM, Schilling K, Weil JV, Silkoff PE, Rodman DM (2002) Nitric oxide and protein nitration in the cystic fibrosis airway. *Arch Biochem Biophys* 406:33-39.

Ratjen FA (2009) Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. *Respir Care* 54:595-605.

Reid DW, Misso N, Aggarwal S, Thompson PJ, Walters EH (2007) Oxidative stress and lipid-derived inflammatory mediators during acute exacerbations of cystic fibrosis. *Respirology* 12:63-69.

Sagel SD, Wagner BD, Anthony MM, Emmett P, Zemanick ET (2012) Sputum biomarkers of inflammation and lung function decline in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care* 186:857-865.

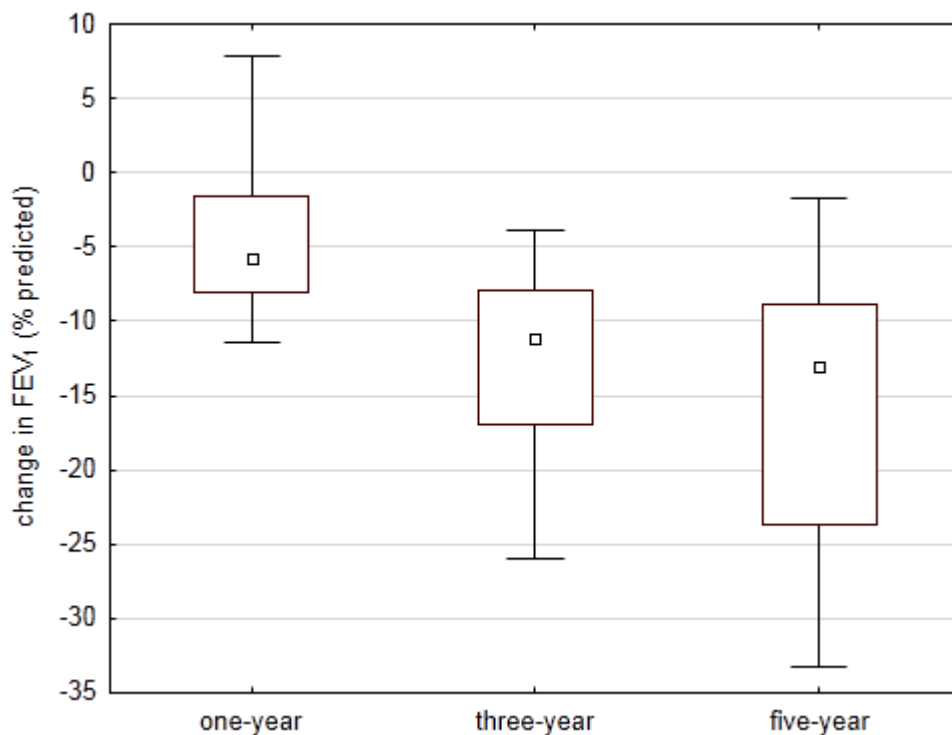
Starosta V, Rietschel E, Paul K, Baumann U, Griesse M (2006) Oxidative changes of bronchoalveolar proteins in cystic fibrosis. *Chest* 129:431-417.

Waters V, Stanojevic S, Atenafu EG et al (2012) Effect of pulmonary exacerbations on long-term lung function decline in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 40:61-66.

Worlitzsch D, Herberth G, Ulrich M, Döring G (1998) Catalase, myeloperoxidase and hydrogen peroxide in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 11:377-383.

Yankaskas JR, Marshall BC, Sufian B, Simon RH, Rodman D (2004) Cystic fibrosis adult care: consensus conference report. *Chest* 125:1S-39S.

Figure 1. Changes of FEV₁ values in one-, three- and five-year intervals



Data are expressed as medians (middle points), IQRs (boxes) and ranges (whiskers).

Figure 2. Correlation between 8-isoprostane concentrations in EBC and one-year change in FEV₁

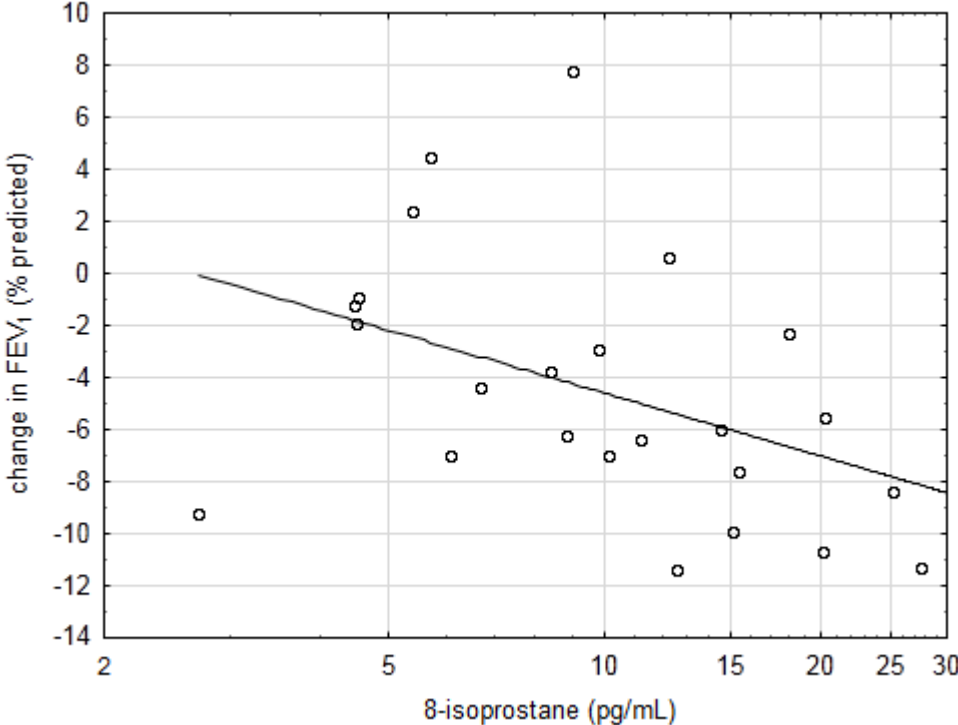


Figure 3. Correlation between 8-isoprostane concentrations in EBC and three-year change in FEV₁

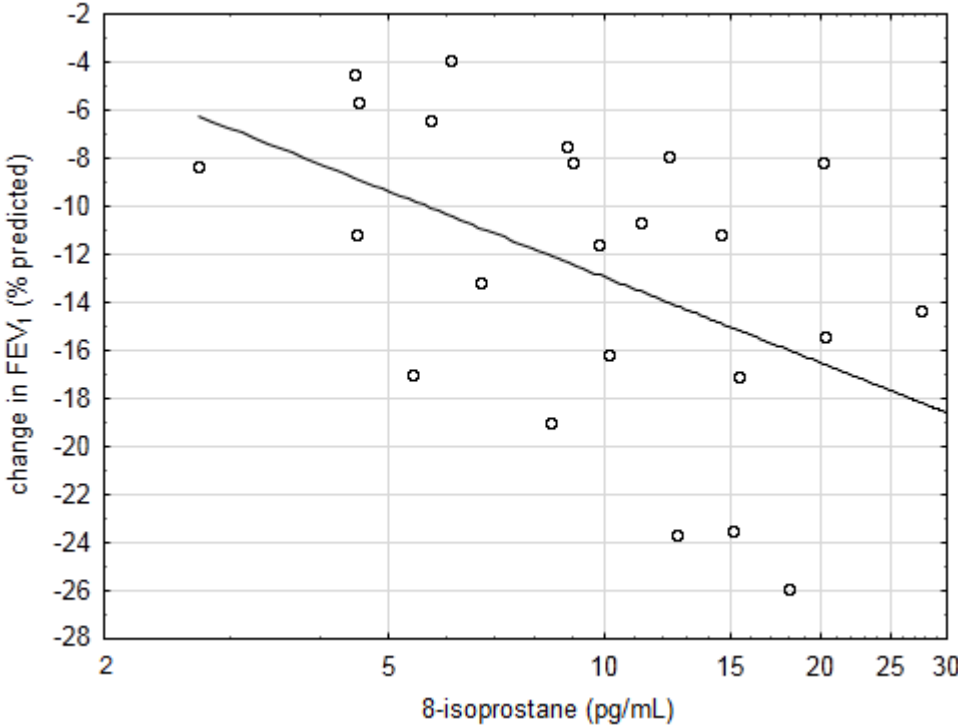
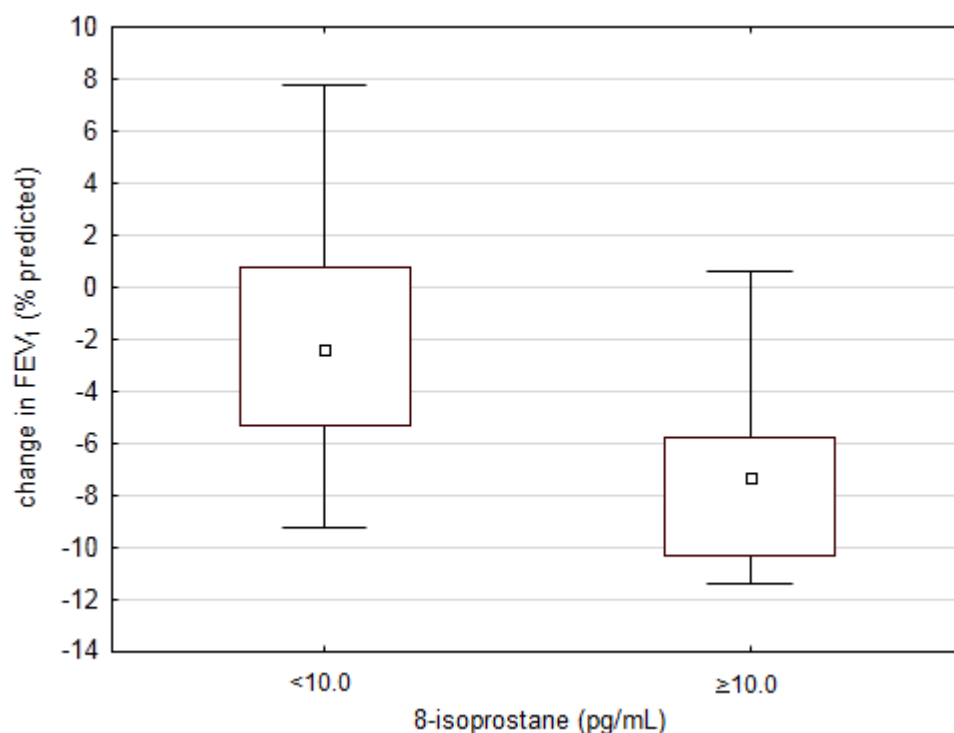


Figure 4. One-year FEV₁ decline in two subgroups of patients with the exhaled breath condensate concentration of 8-isoprostane at study entry lower and higher than the median value (10 pg/mL)



Data are expressed as medians (middle points), IQRs (boxes) and ranges (whiskers).

Table 1. Baseline demographic characteristics, clinical and functional parameters of the study participants

Variables	Values*
Study participants	24
Females/Males	12/12
Pancreatic enzyme use (yes/no)	22/2
Concurrent <i>P. aeruginosa</i> colonization (yes/no)	2/22
Age (years)	23.9 (22.0; 26.6)
Duration of <i>B. cenocepacia</i> colonization (years)	8.3 (6.3; 10.7)
Body mass index (kg/m ²)	21.2 (18.8; 22.7)
FEV ₁ (% predicted)	58.6 (45.5; 71.8)

* Values are given as number or median (IQR).

Table 2. Multivariate analysis for determinants of one-year FEV₁ decline

Variable	B*	95% CI for B	β[†]	p-value
Gender	-1.555	-4.304; 1.194	-0.318	0.25
Age	0.039	-0.777; 0.856	0.029	0.92
Duration of BC colonization	-0.076	-1.011; 0.859	-0.037	0.87
FEV ₁	-0.055	-0.185; 0.074	-0.201	0.38
EBC 8-isoprostane	-0.433	-0.746; -0.119	-0.586	0.01

*Unstandardised coefficient; †standardised coefficient; CI: confidence interval; BC:

B. cenocepacia