# Univerzita Karlova v Praze
# 2. lékařská fakulta

Studijní program:
Fyziologie a patofyziologie člověka

**MUDr. Katarína Beránková**

Morfologické a funkční změny v bronchiální sliznici u dětí s časným bronchiálním astmatem.

Morphological and functional changes in the bronchial mucosa in young children with early bronchial asthma.

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Prof. MUDr. Petr Pohunek, CSc.
Konzultant: MUDr. Jiří Uhlík, PhD

Praha, 2015

**PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala 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, 09.04.2015

Katarína Beránková

**IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM**

BERÁNKOVÁ, Katarína. *Morfologické a funkční změny v bronchiální sliznici u dětí s časným bronchiálním astmatem. [Morphological and functional changes in the bronchial mucosa in young children with early bronchial asthma.].* Praha, 2015. Počet stran 71, počet příloh 2. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. Lékařská fakulta, Pediatrická klinika 2. LF UK a FNM. Vedoucí závěrečné práce Pohunek, Petr.

**PODĚKOVÁNÍ**

V první řadě chci poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Petru Pohunkovi, CSc. za jeho odborné vedení při práci na studii.

Tato práce by nebyla možná zejména bez vydatné pomoci MUDr, Jiřího Uhlíka, PhD z Ústavu histologie a embryologie 2. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, jenž svými odbornými znalostmi významnou měrou přispěl k rozvoji metodických postupů použitých ve studii. Jeho dlouholeté zkušenosti s histopatologií tkáně dýchacích cest jsem velmi ocenila i při mikroskopickém hodnocení bioptických vzorků.

Ráda bych také poděkovala milým kolegyním z Pediatrické kliniky 2.LF UK a FNM, MUDr. Tereze Kučerové a MUDr. Tamaře Svobodové, CSc., které prováděly vyšetření flexibilní bronchoskopií s odběrem bioptických vzorků u dětí zařazených do studie, za jejich laskavou spolupráci a trpělivost při získávání materiálu ke studii.

Velké poděkování patří také MUDr. Lence Hoňkové z Pediatrické kliniky 2.LF UK za participaci na studii a zejména spolupráci při laboratorním zpracování získaných vzorků. Dále chci poděkovat MUDr. Jakubovi Hoňkovi za neocenitelnou pomoc při statistickém zpracování výsledků.

V neposlední řadě děkuji také laborantkám Ústavu histologie a embryologie 2.LF UK, paní Katrin Čtvrtníkové a paní Karolíně Vráblové za jejich nesmírnou ochotu a vysokou preciznost při technicky i časově náročných postupech laboratorního zpracování získaných vzorků.

Závěrem chci také poděkovat všem pacientům a jejich rodičům za souhlas se zařazením do studie a také své rodině za trpělivost a podporu.

**OBSAH:**

1. ÚVOD ..... 10

2. TEORETICKÉ POZADÍ ..... 11

2.1 Epidemiologie a klinické projevy průduškového astmatu v dětském věku ..... 11

2.2 Rizikové faktory pro rozvoj průduškového astmatu ..... 13

2.3 Fenotypy astmatu ..... 15

2.4 Prediktivní index astmatu ..... 17

2.5 Remodelace průduškové stěny ..... 19

2.5.1. Ztluštění bazální membrány, strukturální glykoproteiny ..... 21

2.5.2 Chronický zánět ve stěně průdušek pacientů s astmatem ..... 23

2.5.3 Remodelace v hlubších vrstvách průduškové stěny ..... 24

3. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE ..... 26

3.1 Studie 1: Histologická analýza strukturálních změn v průduškové sliznici nejmenších dětí s vyšším rizikem rozvoje astmatu ..... 26

3.2 Studie 2: Porovnání fenotypových projevů průduškového astmatu u nejmladších dětí s opakovanými obstrukcemi průdušek v anamnéze ..... 28

4. METODIKA ..... 29

4.1 Studie 1: Histologická analýza strukturálních změn v průduškové sliznici nejmenších dětí s vyšším rizikem rozvoje astmatu ..... 29

4.1.1 Zařazení pacientů do studie, rozdělení podle rizika mAPI ..... 29

4.1.2 Bronchoskopické vyšetření, endobronchiální biopsie ..... 31

4.1.3 Zpracování bioptických vzorků pro vyšetření světelnou mikroskopií ..... 32

4.1.4 Imunohistochemická vyšetření ..... 33

4.1.4.1 Příprava vzorků k imunohistochemické analýze ..... 33
4.1.4.2 Značení strukturálních proteinů BM a buněčných elementů v subepiteliální tkáni ..... 34
4.1.5 Funkční vyšetření plic ..... 36
4.2 Studie 2: Porovnání fenotypových projevů průduškového astmatu u nejmladších dětí s opakovanými obstrukcemi průdušek v anamnéze ..... 36
4.2.1 Zařazení pacientů do studie, rozdělení podle rizika mAPI ..... 36
4.2.2 Laboratorní vyšetření pacientů ..... 37
4.3 Statistické zpracování výsledků ..... 38
5. VÝSLEDKY ..... 40
5.1 Výsledky Studie 1 ..... 40
5.1.1 Výsledky histologických analýz ..... 40
5.1.2 Výsledky funkčního vyšetření plic ..... 47
5.2 Výsledky Studie 2 ..... 48
6. DISKUSE ..... 51
6.1 Studie 1: Histologická analýza strukturálních změn v průduškové sliznici nejmenších dětí s vyšším rizikem rozvoje astmatu ..... 51
6.1.1 Komentář k výsledkům studie ..... 51
6.1.2 Limitace studie ..... 54
6.2 Studie 2: Porovnání fenotypových projevů průduškového astmatu u nejmladších dětí s opakovanými obstrukcemi průdušek v anamnéze ..... 57
7. ZÁVĚR ..... 59
8. SOUHRN ..... 61
9. SUMMARY ..... 62
10. REFERENCE ..... 63

11. SEZNAM PUBLIKACÍ ..... 69
11.1 Publikace s IF vztahující se k tématu disertace ..... 69
11.2 Publikace bez vztahu k tématu disertace ..... 69
11.3 Kapitoly v monografiích ..... 70
11.4 Abstrakta ..... 70
12. PŘÍLOHY ..... 71

**POUŽITÉ ZKRATKY:**

| | |
|---|---|
| AB | asthma bronchiale / průduškové astma |
| API | Asthma Predictive Index / prediktivní index astmatu |
| BM | bazální membrána |
| CT | cizí těleso |
| DAB | Diaminobenzidine |
| DDC | dolní dýchací cesty |
| DKO | diferenciální krevní obraz |
| ECP | Eosinophilic Cationic Protein/eozinofilní kationický protein |
| EGF | Epithelial Growth Factor / epitelový růstový faktor |
| EGFR | Epithelial Growth Factor Receptor / receptor pro epitelový růstový faktor |
| FEV1 | jednosekundová vitální kapacita |
| GER | gastroesofageální reflux |
| HDC | horní dýchací cesty |
| HE | hematoxylin-eosin |
| CHOPN | chronická obstrukční plicní nemoc |
| IFN-γ | Interferon-gama |
| IgE | Imunoglobulin třídy E |
| IgG | imunoglobulin třídy G |
| IL-10 | interleukin 10 |
| IL-4 | interleukin 4 |
| mAPI | modified Asthma Predictive Index / modifikovaný prediktivní index astmatu |
| n.h. | náležitá hodnota |
| PMR | psychomotorická retardace |
| RF | rizikový faktor |

| | |
|---|---|
| St. p. | status post |
| TE | Tracheoezofageální |
| TGF-beta | Transforming Growth Factor-beta / transformující růstový faktor beta |
| Th1 | T-helper 1 / pomocné T-lymfocyty 1. typu |
| Th2 | T-helper 2 / pomocné T-lymfocyty 2. typu |

# 1. ÚVOD

Průduškové astma patří celosvětově k nejčastějším chronickým nemocem dospělého i dětského věku a zaujímá tak přední příčky v oblastech zájmu nejenom pneumologů, ale také alergologů a imunologů a v neposlední řadě i praktických lékařů, již se s problematikou této nemoci potýkají takřka denně ve svých ordinacích. Díky neustále se zlepšujícím možnostem léčby významně poklesla závažná morbidita i mortalita v důsledku tohoto onemocnění, avšak jeho prevalence v průmyslových zemích v posledních desetiletích pozvolna rostla. V současné době známe řadu rizikových faktorů od dědičné dispozice až po nejrůznější environmentální vlivy, které se spolupodílejí na jeho vzniku a výsledném klinickém obrazu. Taktéž je známo, že u velké většiny pacientů nemoc začíná v dětském věku, často již v prvních pěti letech života. Astma je provázeno zánětem a řadou strukturálních změn v dýchacích cestách, jež v dospělosti korelují s tíží nemoci. Ačkoliv jsou tyto změny ve stěně dýchacích cest studovány již několik desítek let, doposud nikdo nedal jasnou odpověď na otázku, kdy a jak tyto změny vznikají a zda je možné jejich rozvoji předejít nebo je ovlivnit cílenou terapií.

Z tohoto důvodu jsem se zaměřila na studium těchto změn u skupiny nejmladších dětí, u nichž ještě klinické známky nemoci nebyly rozvinuty. Cílem mé práce bylo přispět k poznání etiopatogeneze průduškového astmatu v časném dětském věku a posunout tak dál dosavadní znalosti. Věřím, že získáním nových poznatků s využitím invazivních vyšetřovacích technik, jak je předkládáno v této práci, lze přispět ke zjednodušení diagnostiky a optimalizaci léčby u rizikových dětských pacientů v klinické praxi.

# 2. TEORETICKÉ POZADÍ

## 2.1 Epidemiologie a klinické projevy průduškového astmatu v dětském věku

Průduškové astma zaujímá dlouhodobě první příčku mezi chronickými respiračními onemocněními v dětském věku. Jeho prevalence v dětské populaci zejména industrializovaných zemí v posledních dekádách významně vzrostla (Asher *et al.*, 2006), což, mimo jiné negativní aspekty chronického onemocnění, vede také k nemalému navýšení nákladů na zdravotní péči v dětském věku. Akutní exacerbace astmatu v dětském věku patří stále k předním příčinám návštěv pohotovostních ambulancí i akutních hospitalizací, nezřídka na pediatrických jednotkách intenzivní péče. V současnosti se odhaduje, že prevalence dětského astmatu v české populaci dosahuje přibližně 10-12 %, což je údaj srovnatelný s dalšími vyspělými zeměmi Evropy a Severní Ameriky (Asher *et al.*, 2006; Kratěnová, 2008; Pohunek, 2012).

V časném dětském věku (u kojenců a batolat) bývají prvním projevem průduškového astmatu nejčastěji pískoty při výdechu. Tyto fenomény bývají zpravidla projevem probíhajícího interkurentního akutního zánětu v dýchacích cestách, kdy se v klinice často užívá pojmu „obstrukční bronchitída“. Mohou se však objevovat i při zvýšené fyzické námaze, změnách počasí nebo také při emocích, ve spánku, při hře či jiných činnostech. Dalšími klinickými příznaky průduškové obstrukce pak bývají prodloužené exspírium, dráždivý (většinou neproduktivní) kašel a ponámahová nebo i klidová dušnost.

Nejvyšší prevalence pískotů v dětské populaci je právě u kojenců a batolat, což je dáno zejména velmi malým průsvitem dýchacích cest v časném dětském věku. I při malém podráždění tak může dojít k signifikantnímu zúžení průdušek, jež vyústí do typického klinického projevu. Vysoká prevalence akuních exacerbací pískotů v časném dětském věku je dána zejména vysokou četností výskytu akutních respiračních onemocnění především virové etiologie, jež jsou vůbec nejčastějším důvodem návštěvy v ordinacích praktických pediatrů i pohotovostních ambulancí. Několik longitudinálních studií již potvrdilo, že do nástupu školní docházky zažije alespoň jednu epizodu exspiračních pískotů více než polovina všech dětí (Martinez *et al.*, 1995; Morgan *et al*., 2005). Mnohé z těchto dětí navíc tyto potíže zažívají opakovaně. Klinický obraz těchto akutních průduškových obstrukcí bývá velmi variabilní, od dráždivého kašle s diskrétními exspiračními pískoty až po dramatický obraz velmi těžké obstrukce průdušek s dušností a tachypnoí, v nejzávažnějších případech i s významným poklesem saturace hemoglobinu kyslíkem a nutností oxygenoterapie. Také účinnost terapeutických opatření je poměrně proměnlivá, mnoho akutních obstrukčních epizod lze řešit ambulantně podáním inhalačních $beta_2$-agonistů s rychlým nástupem účinku a zřetelnou úlevou od symptomů častokrát již po prvním podání. V závažnějších případech bývá nezbytná hospitalizace s razantní inhalační léčbou a nezřídka s nutností systémového podání kortikosteroidů.

Pravděpodobnost rozvoje průduškového astmatu jako chronického celoživotního onemocnění nicméně nelze v tak nízkém věku spolehlivě odhadnout ani podle četnosti nebo závažnosti akutních epizod průduškových obstrukcí, ani na základě jejich dobré nebo špatné odpovědi na standardní terapii. Kojenec s několika

epizodami pískotů v prvním roce života může být v dalších věkových obdobích již zcela prost respiračních obtíží. Naopak první epizoda pískotů u téměř tříletého batolete může být zároveň první exacerbací průduškového astmatu, jež bez další terapie povede k opakovaným akutním atakám častokrát s progresivním průběhem.

### 2.2 Rizikové faktory pro rozvoj průduškového astmatu

Genetická dispozice k onemocnění průduškovým astmatem je pouze jedním z mnoha rizikových faktorů, jež se spolupodílejí na výsledném projevu nemoci (Ober a Hoffjan S, 2006). Tato vrozená predispozice může být ovlivněna jak pozitivně tak i negativně zejména vlivy prostředí a vzájemná interakce těchto vlivů pak určuje, jestli a kdy se nemoc nakonec projeví.

Za spolehlivě zdokumentované environmentální rizikové faktory jsou považovány expozice tabákovému kouři a dalším dráždivým a škodlivým látkám ve vnitřním i zevním životním prostředí, jež vedou k přímému poškozování povrchu sliznice dýchacích cest a indukci bronchiální hyperreaktivity (Martinez *et al.*, 1995; Hirsch *et al.*, 1999; D'Amato *et al.*, 2005). Expozice tabákovému kouři již v prenatálním období může navíc vést k poškození vývoje plic plodu s časnými klinickými projevy již v prvních měsících života (Moshammer *et al.*, 2006). V průběhu života pak pasivní a posléze i aktivní kouření přispívá k perzistenci onemocnění a také zhoršuje odpověď průdušek na standardní terapii (Moshammer *et al.*, 2006; Chalmers *et al.*, 2002). Z dalších rizikových faktorů se tradičně zmiňuje úloha výživy v časném věku, zejména pak protektivní vliv kojení na rozvoj atopie. To je však doposud předmětem diskusí v odborné veřejnosti, jelikož dosavadní práce přinesly zatím nejednoznačné výsledky (Siltanen *et al.*, 2003; van Odijk *et al.*, 2003). Rovněž ochranný účinek kojení bránící

rozvoji průduškového astmatu nebyl doposud zřetelně prokázán (Nagel *et al*., 2009). Z hlediska výživy v časném i pozdějším dětském věku je za významný nepříznivý rizikový faktor pro rozvoj astmatu považována obezita (Flaherman a Rutherford, 2006).

Úloha expozice alergenům prostředí bývá opakovaně diskutována na mezinárodních fórech o problematice dětského astmatu, výsledky doposud provedených studií jsou však zatím rozporuplné. Někteří autoři uvádějí zvýšené riziko časné alergické senzitizace při expozici alergenům domácího prachu v kojeneckém věku, na druhé straně existují studie prokazující protektivní vliv přítomnosti domácích zvířat (a jejich alergenů) v prostředí, ve kterém dítě vyrůstá, ačkoliv i zde výsledky jednotlivých prací nejsou ve svých závěrech jednotné (Wahn *et al.*, 1997; Woodcock *et al.*, 2004; Lodge *et al.*, 2012; Collin *et al.*, 2015).

Situaci při diagnostice průduškového astmatu v raném dětství také komplikuje vzájemná interakce resp. potenciace některých rizikových faktorů s pozdějším rozvojem astmatu. Příkladem můžou být zejména časné infekce dolních dýchacích cest lidským rhinovirem nebo respiračním syncytiálním virem, které, zejména vyskytnou-li se opakovaně, jsou mnohými odborníky považovány za samostatný rizikový faktor přispívající k predispozici rozvoje průduškového astmatu v pozdějším věku (Lemanske *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2008). Klinický obraz těchto infekcí přitom velmi často probíhá pod obrazem „obstrukční bronchitidy“, připomínající akutní exacerbaci astmatu. Působení těchto virů se zpravidla vysvětluje jejich destruktivními účinky na epitelové buňky dýchacích cest s následnou indukcí rozvoje zánětlivých změn v průduškové sliznici. Regenerující epitelie a přítomnost zánětlivých elementů

ve sliznici vedou pak k imunitně podmíněným reakcím s produkcí prozánětlivých cytokinů rezultujícím ve zvýšenou bronchiální reaktivitu a tedy i zvýšenou náchylnost k průduškovým obstrukcím i po jiných než infekčních podnětech. Práce profesora Papadopoulose z roku 2002 navíc ukázala, že pacienti s alergickým astmatem mají tendenci reagovat na infekci lidským rhinovirem imunitní reakcí 2. typu zahrnující zvýšenou produkci IL-10 a IL-4 s potenciací alergického typu zánětu, na rozdíl od zdravých jedinců, kteří na stejnou virovou infekci reagují zejména produkcí IFN-γ (Papadopoulos *et al.*, 2002). Na druhé straně existují také práce o protektivním vlivu některých infekcí v časném dětském věku chránících před rozvojem průduškového astmatu v pozdějších letech (Matricardi *et al.*, 2002). Opakované závažné respirační infekce v prvních třech letech života se nicméně jeví být významným rizikovým faktorem pro perzistenci pískotů v pozdějším (školním) věku (Illi *et al.*, 2001).

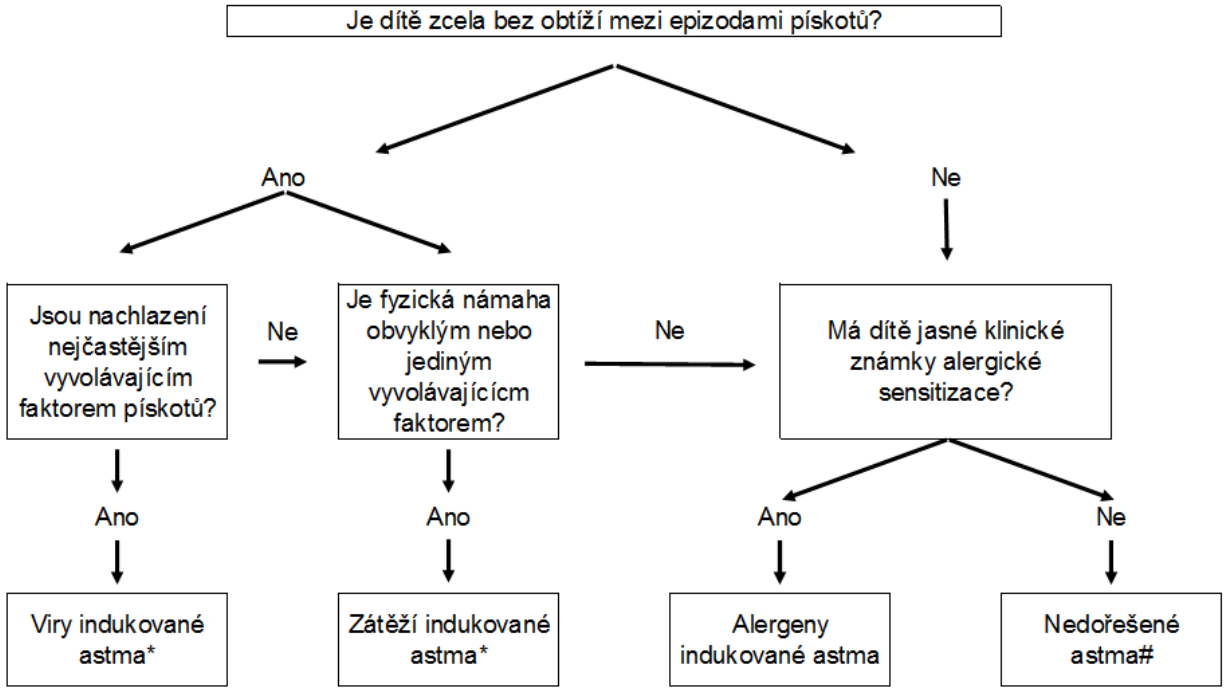
### 2.3 Fenotypy astmatu

Z výše uvedeného je patrné, že etiopatogeneze průduškového astmatu je záležitostí nesmírně komplexní zahrnující nespočet pozitivních i negativních proměnných. Predikce rozvoje onemocnění tak není v časném dětském věku vůbec jednoduchá. V posledních letech bylo provedeno několik prospektivních studií sledujících přirozený průběh onemocnění od narození až do školního věku nebo až do dosažení dospělosti. Výsledkem těchto prací je tzv. „fenotypizace“ průduškového astmatu v dětském věku, kde různí autoři uvádějí různé druhy fenotypů astmatu (Obr. 1 a 2), a to jednak podle počátku jejich prvních projevů a dalšího trvání a průběhu, případně podle nejčastější příčiny akutních exacerbací pískotů. Setkáváme se zde s pojmy jako „časné přechodné pískoty“, „pozdní přechodné pískoty“, „pískoty indukované viry“ a další (Bacharier *et al.*, 2008; Henderson *et al.*, 2008; Papadopoulos *et al.*,

2012). Vzhledem ke skutečnosti, že jsou tyto fenotypy výsledkem dlouhodobých pozorování, lze klinický fenotyp u konkrétního pacienta bohužel spolehlivě hodnotit pouze při retrospektivním pohledu. Navíc se jednotlivé fenotypy mohou u téhož pacienta částečně překrývat nebo dokonce v čase i měnit (Papadopoulos *et al.*, 2012).

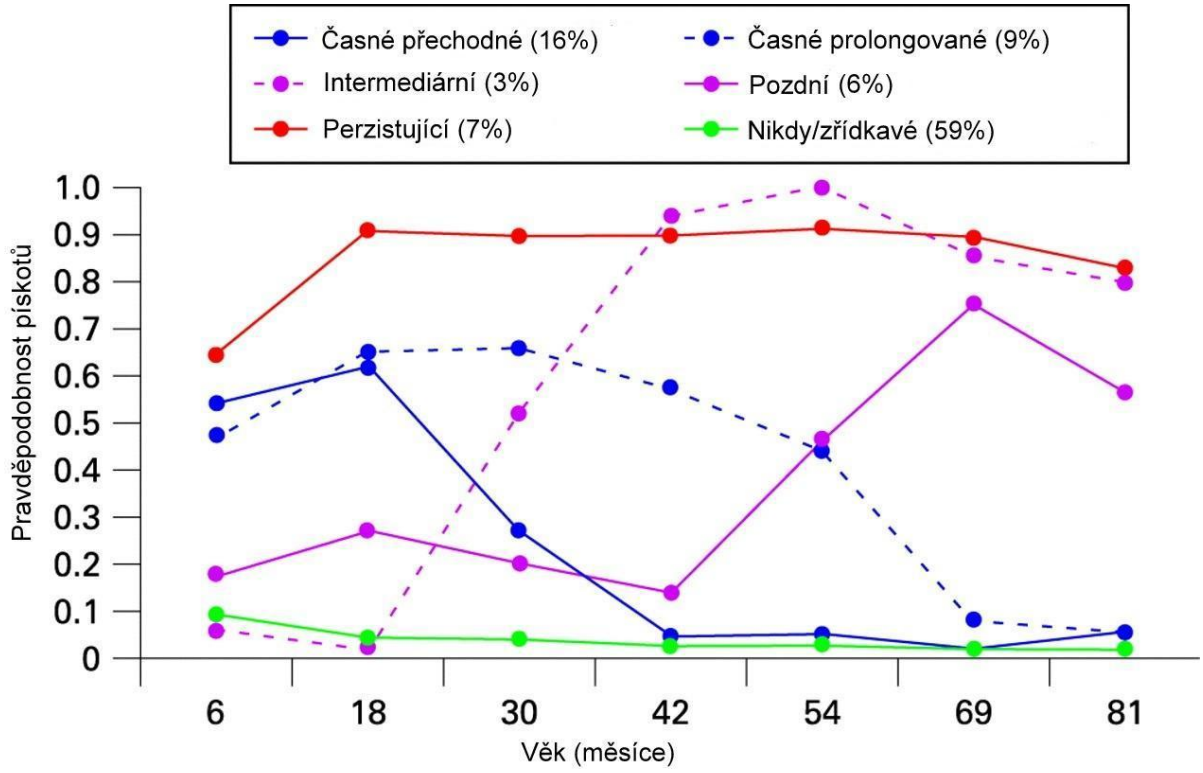
Koncept fenotypizace dětského astmatu tudíž není zatím prakticky využitelný při klinickém posuzování a rozhodování o dalším osudu jednotlivých pacientů přicházejících do ordinace s první nebo opakovanou epizodou průduškové obstrukce.

*Obr. 1: Fenotypy astmatu u dětí starších dvou let podle konsensu Practall. Adaptováno podle Bacharier et al., Allergy. 2008;63 (1):5-34*




*Děti mohou být současně atopické
# Zde mohou být zahrnuty různé příčiny včetně expozice dráždivým látkám a také neobjasněné alergie

*Obr. 2: Fenotypy astmatu u dětí do 6 let věku podle Hendersona et al.. Adaptováno podle Henderson J. et al. Thorax. 2008;63(11):974-80.*

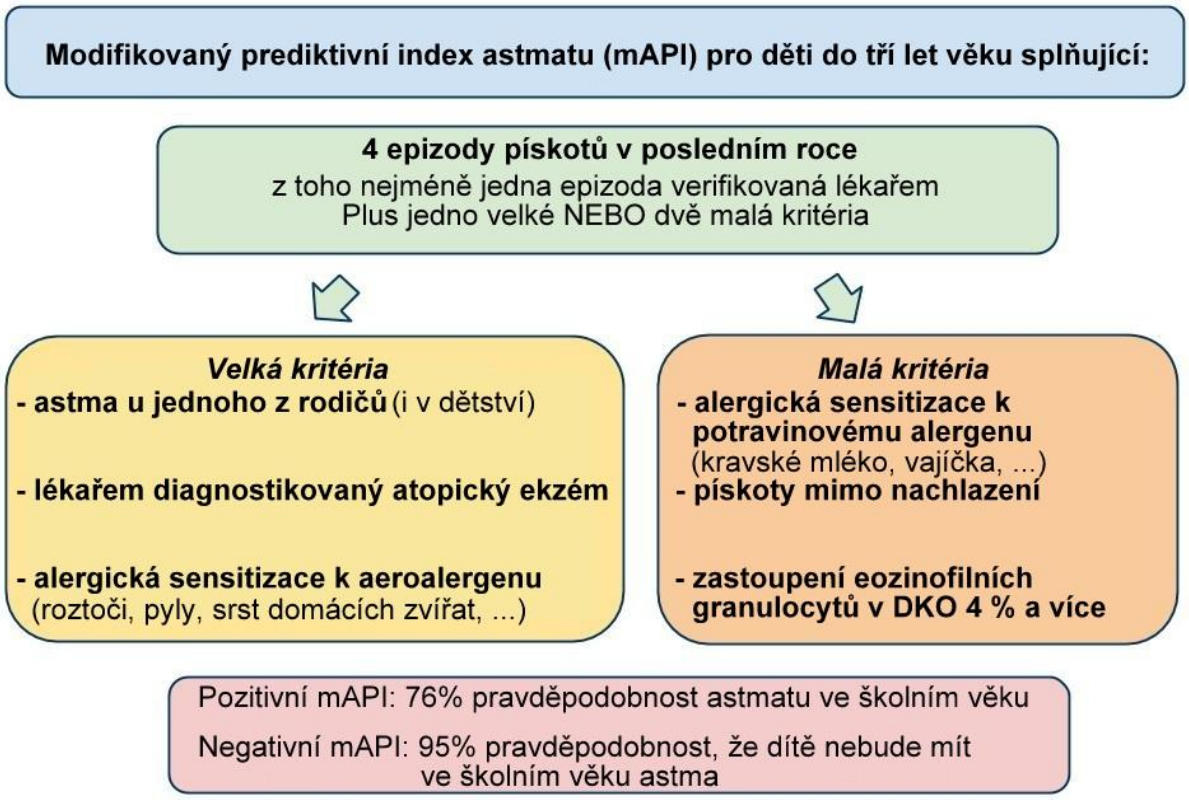



## 2.4 Prediktivní index astmatu

Z výsledků prospektivních studií se v klinické praxi zatím nejlépe osvědčil Prediktivní index astmatu (API) publikovaný Castro-Rodriguezem v roce 2000 s následnou modifikací podle Guilbertové (mAPI) z roku 2004 (Castro-Rodriguez *et al.*, 2000; Guilbert *et al.*, 2004), jehož kritéria jsou přehledně shrnuta na Obr. 3. Tento index obsahuje souhrn několika anamnestických, klinických a laboratorních údajů, jež lze celkem snadno získat i u pacientů nejnižších věkových skupin, proto je v pediatrických ordinacích v celém světě stále více využíván. Jeho použití při rozhodování o osudu pacienta s podezřením na průduškové astma je také

doporučeno mezinárodním konsenzem Globální iniciativy pro astma pro nejnižší věkové skupiny (Global Initiative for Asthma < 5 - GINA<5). I když je při pozitivním API jeho prediktivní hodnota nevelká (Brand, 2011), jeho význam je především v negativní prediktivní hodnotě (Castro-Rodriguez *et al.*, 2011).

*Obr. 3: Modifikovaný prediktivní index astmatu podle Guilbertové et al.. Adaptováno podle AllergyGoAway.com, JACI 2010: 126(2):212-6, doplněno 2014*




V populaci dětí rizikových pro rozvoj astmatu se však pozitivní kritéria mAPI v prvních třech letech života jeví být užitečným nástrojem predikce rozvoje astmatu v pozdějším věku (Chang *et al.*, 2013). Naopak při negativitě API se dá do určité míry předpokládat, že spouštěčem průduškových obstrukcí jsou převážně virové infekce a

že dítě z těchto pískotů „vyroste“. V tomto případě lze i navzdory opakovaným akutním obtížím vyčkat se zahájením dlouhodobé preventivní terapie.

### 2.5 Remodelace průduškové stěny

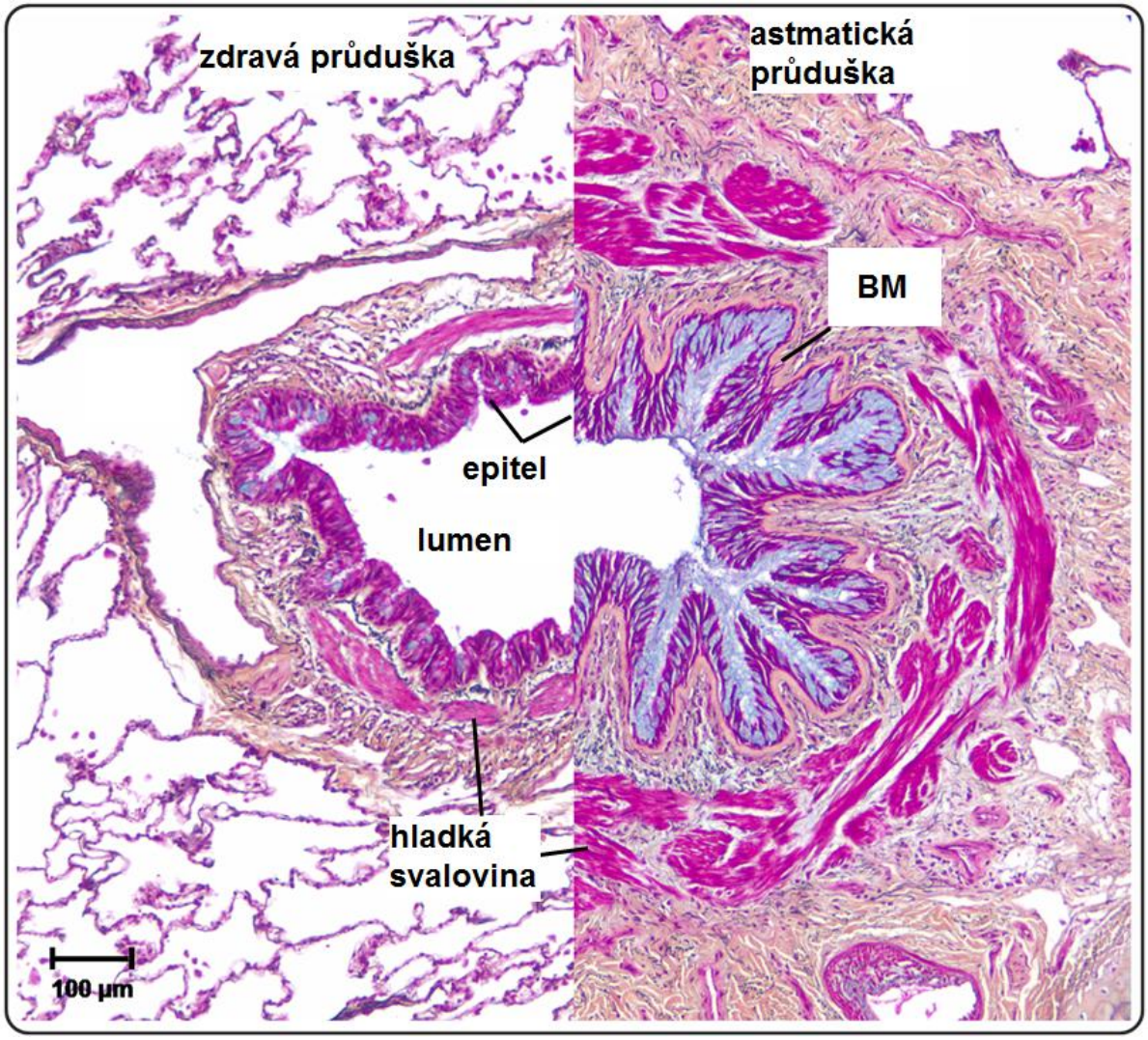
Navzdory zmiňovanému nárůstu prevalence průduškového astmatu v dětských populacích téměř všech vyspělých států světa a znalosti širokého spektra faktorů zvyšujících pravděpodobnost jeho vzniku jsou naše dosavadní znalosti o jeho primární etiopatogenezi velmi limitované. Zejména je doposud jenom velmi málo známo o iniciálních procesech probíhajících v dýchacích cestách na mikroskopické úrovni v počátcích nemoci nebo dokonce ještě před jejími prvními klinickými projevy. Přitom lze ale předpokládat, že právě tyto děje jsou určujícími faktory pro počátek, rozvoj a následný průběh onemocnění, stejně jako zřejmě určují i jeho klinický fenotyp.

U dospělých pacientů s astmatem lze ve stěně dolních dýchacích cest nalézt řadu změn ve srovnání s dýchacími cestami zdravého člověka. Tyto strukturální změny jsou společně označovány pojmem remodelace a dlouhodobě byly považovány za patognomické pro diagnózu bronchiálního astmatu. Remodelace postihuje průduškovou stěnu v celém jejím rozsahu.

Komplex remodelačních změn tak zahrnuje zvýšenou vulnerabilitu a dysfunci epitelových buněk se současným zmnožením pohárkových buněk, ztluštění bazální membrány pod epitelem, subepiteliální fibrózu s abnormálním zastoupením některých proteinů a proteoglykanů extracelulární matrix, hypertrofii a hyperplázii hladké svaloviny, přítomnost myofibroblastů a zvýšenou vaskularitu subepiteliálního

vaziva (Jeffery, 2001; Bai a Knight, 2005). Porovnání zdravé průdušky s průduškou postiženou remodelací znázorňuje Obr. 4.

*Obr. 4 Remodelace průduškové stěny – vlevo zdravá průduška, vpravo průduška postižena remodelací. Adaptováno podle Wadsworth et al. 2012; www.intechopen.com*




Protože míra remodelace značně koresponduje s tíží onemocnění dospělých astmatiků (Bai a Knight, 2005), byly tyto změny dlouho považovány za pouhý důsledek chronických zánětlivých procesů ve stěně průdušek, jež se rozvíjely v průběhu onemocnění. Avšak na rozdíl od intenzity zánětu, jenž může být udržován

pod kontrolou při užití vhodné medikace, rozvinuté remodelační změny v průduškové stěně jsou medikamentózně ovlivnitelné pouze částečně, do jisté míry se tedy jedná o děj nevratný (Kumar *et al.*, 2004). Rozvinuté remodelační změny navíc vedou k vyšší náchylnosti průdušek reagovat na nejrůznější podněty, takže nástup akutní průduškové obstrukce je v případě takto změněných dýchacích cest mnohem razantnější a klinický obraz bývá dramatičtější. Remodelací je rovněž ovlivněna odpověď na terapii, jejíž efekt bývá častokrát nedostačující (Bergeron *et al.*, 2010).

V několika posledních letech se objevují studie dokládající přítomnost remodelačních změn i u dětí školního a dokonce předškolního věku (Pohunek *et al.*, 2005; Saglani *et al.*, 2007). Tato zjištění nekorelují s výše uváděnou hypotézou o vzniku remodelace jako důsledku chronického zánětu. Protože se v minulosti předpokládalo, že trvá řadu let, než se remodelace v průduškách rozvine, přítomnost některých znaků charakteru remodelace již u dětí předškolního věku tak byla poměrně překvapivým nálezem.

Zde tedy vyvstává otázka, zda tyto změny skutečně souvisejí pouze s rozvojem zánětlivých změn v průduškové sliznici v průběhu onemocnění bronchiálním astmatem, anebo jestli se mohou rozvíjet paralelně se vznikem a časným rozvojem onemocnění nebo dokonce ještě před jeho prvními klinickými projevy.

### 2.5.1 Ztluštění bazální membrány, strukturální glykoproteiny

I když v průduškové sliznici pacientů s astmatem nemusejí být všechny známky remodelace plně vyjádřeny, ztluštění bazální membrány bývá jejím konstantním

znakem. Lze předpokládat, že se jedná o jeden z prvních příznaků postupně se rozvíjející remodelace. Domníváme se, že epitelové buňky sliznice dýchacích cest hrají stěžejní roli v rozvoji budoucích remodelačních změn. Epitelie představují první linii bariéry v kontaktu s látkami přicházejícími do dýchacích cest ze zevního prostředí. Epitelové buňky vystavené dráždivým podnětům mohou iniciovat indukci proliferativních procesů v hlubších vrstvách průduškové sliznice, a to i bez současné přítomnosti zánětu (Fedorov *et al.*, 2005). Jednou z prvních pozorovatelných a objektivně hodnotitelných změn pak může být právě ztluštění bazální membrány pod epitelem jako důsledek nadprodukce některých strukturálních proteinů.

Základním strukturálním glykoproteinem bazální membrány ve sliznici dýchacích cest je laminin, přítomný ve všech bazálních membránách pod epitelem kdekoliv v lidském organismu. Je produkován zejména epitelovými buňkami a typicky proto tvoří zevní vrstvu bazální membrány označovanou jako lamina lucida (Durbeej, 2010; Aumailley a Smyth, 1998). Pokud budeme předpokládat, že iniciace remodelačních změn nemusí vycházet z chronického zánětu, ale naopak že je indukována dysfunkcí epitelových buněk, lze očekávat, že případné ztluštění bazální membrány jakožto první známka počínající remodelace půjde právě na vrub zbytnění vrstvy lamininu pod epitelem. Mohlo by se tak jednat o jeden z prvních obranných mechanismů průduškové sliznice proti nepříznivým vlivům zevního prostředí. U dospělých pacientů s astmatem bylo zmnožení lamininu v zevní vrstvě bazální membrány opakovaně popsáno jako jedna ze základních známek remodelace (Christie *et al.*, 2004; Liesker *et al.*, 2009).

Dalším glykoproteinem bazální membrány je kolagen typu IV. Vyskytuje se především v lamina densa tvořící spolu s již zmíněnou lamina lucida bazální laminu. Jeho přítomnost je nezbytná pro udržení stability a správné funkce bazální laminy (Leblond a Inoue, 1989; Amenta *et al.*, 1988). Zvýšená exprese kolagenu typu IV byla popsána v práci zkoumající buněčné kultury z dýchacích cest dospělých pacientů s astmatem (Kuo *et al.*, 2011). Existuje však také práce popisující inverzní vztah exprese lamininu a kolagenu IV ve sliznici astmatických pacientů (Liesker *et al.*, 2009).

V dospělém věku se u pacientů s astmatem také popisuje zvýšená exprese glykoproteinu tenascinu. Tento protein má nezastupitelnou úlohu v regeneračních a reparativních procesech při poškození tkáně, jeho zmnožení bývá pozorováno v chronickém zánětlivém terénu v různých tkáních organismu (Jones a Jones, 2000). V průduškové sliznici pacientů s astmatem lze zvýšenou expresi tenascinu přímo pozorovat krátce po expozici alergenu (Phipps *et al.*, 2004). Jeho zvýšená produkce může u dospělých pacientů s astmatem také přispívat ke ztluštění bazální membrány, nicméně byla popsána také u jiných chronických zánětlivých onemocnění dýchacích cest jako je např. CHOPN (Karjalainen *et al.*, 2003; Laitinen *et al.*, 1997; Liesker *et al.*, 2009).

### 2.5.2 Chronický zánět ve stěně průdušek pacientů s astmatem

Zánět v průduškové sliznici je považován za základní rys této nemoci. Předpokládá se, že chronický a systémový zánět je u pacienta s astmatem přítomen i v klidových obdobích prostých klinických symptomů a jeho aktivita je v přímé souvislosti s mírou

bronchiální hyperreaktivity (Bacharier *et al.*, 2008). V dětském věku je situace navíc komplikována nezralostí některých složek imunitního systému, která pak může vést preferenčně k „atopickému“ typu imunitní odpovědi zprostředkovanému subpopulací Th2 lymfocytů (Martinez, 1999; Meiler *et al.*, 2006). Typ převažujících zánětlivých buněk je dán věkem a spouštěcími faktory a může se mezi jednotlivými fenotypy lišit. Zatímco převážně „neutrofilní“ typ zánětu je spojován s opakovanými virovými infekcemi a vyšším stupněm závažnosti nemoci, „eozinofilní“ zánět často souvisí s atopií a také s tendencí k perzistenci příznaků (Marguet *et al.*, 1999; de Blic *et al.*, 2004). Doposud není známo, jestli a do jaké míry se zánětlivé buňky podílejí na etiopatogenezi astmatu v nejnižších věkových skupinách a také jestli konkrétním fenotypům astmatu odpovídá určitý typ zánětlivé odpovědi.

## 2.6 Remodelace v hlubších vrstvách průduškové stěny

Kromě ztluštění bazální membrány epitelu probíhají v dýchacích cestách pacientů s astmatem další děje vedoucí k celkové přestavbě průduškové stěny. V důsledku aktivace fibroblastů (a posléze také myofibroblastů) dochází k nadprodukci a současně sníženému odbourávání extracelulární matrix, což vede k obrazu subepiteliální fibrózy (Elias *et al.*, 1999). Nadprodukce hlenu v dýchacích cestách pacientů s astmatem je dána zmnožením pohárkových buněk a také hyperplázií submukózních žlázek (Carrol *et al.*, 1993; Aikawa *et al.*, 1992). Hypertrofie a hyperplázie hladkých svalových buněk spolu se zvýšenou vaskularizací průduškové tkáně pak značnou měrou přispívají k bronchiální hyperreaktivitě a k rychlé obstrukci průdušek po podráždění alergenem nebo jiným podnětem (Carrol *et al.*, 1993; Li a Wilson, 1997).

Některé z těchto změn již byly popsány i u dětských pacientů s průduškovým astmatem, i když jejich intenzita nebyla natolik výrazná jako u dospělých pacientů (Pohunek *et al.*, 2005; Barbato *et al.*, 2003). O jejich přítomnosti v kojeneckém a batolecím věku zatím nemáme dostatek informací.

# 3. HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

## 3.1 Studie 1: Histologická analýza strukturálních změn v průduškové sliznici nejmenších dětí s vyšším rizikem rozvoje astmatu

Určité známky remodelace byly již popsány v průduškové sliznici školních a předškolních dětí. Tyto změny nebyly doposud hlouběji studovány u dětí nejmladšího věku, u kterých je diagnostika průduškového astmatu obtížná vzhledem k vysoké prevalenci pískotů virové etiologie a pouze omezeným možnostem funkčního vyšetření plic či detekce zánětu v dýchacích cestách u těchto dětí. Tradiční představa, že průduškové astma lze diagnostikovat až na základě podrobného funkčního vyšetření plic u spolupracujícího dítěte, způsobuje, že je s dlouhodobou preventivní terapií často zbytečně otáleno i v případech, kdy dítě v kojeneckém nebo batolecím věku zažívá opakované stavy dušnosti s průduškovou obstrukcí, a to i několikrát ročně. V posledních letech se přitom stále častěji objevují názory, že remodelační změny v průduškách mohou vznikat paralelně s rozvojem nemoci, anebo dokonce ještě před jejími prvními příznaky.

**Hypotézy:**

1. U dětí predisponovaných k rozvoji bronchiálního astmatu se iniciální strukturální změny v průduškové sliznici mohou objevit ve velmi časném věku, a to dokonce i před prvními klinickými projevy nemoci, dříve, než je stanovena diagnóza astmatu. Tyto změny začínají od povrchových vrstev sliznice v důsledku dysfunkce epitelu.

2. Zánětlivé změny v hlubších vrstvách sliznice nejsou v tomto věku ještě plně vyjádřeny. Přítomnost časných remodelačních změn pod epitelem není v korelaci s množstvím zánětlivých buněk v subepiteliálním vazivu.

3. Iniciální strukturální změny v časném dětském věku předznamenávají poruchu funkce plic zjistitelnou již v předškolním věku.

**Cíle práce:**

1. Měření tloušťky bazální membrány a kvantitativní hodnocení exprese jejích strukturálních glykoproteinů v bioptických vzorcích pacientů kojeneckého a batolecího věku. Srovnání výsledků pacientů s vyšším rizikem rozvoje astmatu s kontrolní skupinou.

2. Analýza počtu neutrofilních a eozinofilních granulocytů v subepiteliálním vazivu. Korelace přítomnosti těchto elementů s tloušťkou bazální membrány a expresí strukturálních glykoproteinů bazální membrány.

3. Následné funkční vyšetření plic v předškolním věku a určení míry korelace funkčních parametrů s histologickými nálezy vyšetřených dětí.

## 3.2 Studie 2: Porovnání fenotypových projevů průduškového astmatu u nejmladších dětí s opakovanými obstrukcemi průdušek v anamnéze

Klinické projevy průduškového astmatu v raném dětství mohou vznikat v důsledku působení celé řady faktorů, velmi častým spouštěčem jsou zejména virové infekce dolních dýchacích cest. Akutní exacerbace průduškových obstrukcí při virové infekci jsou zřejmě stejně časté u dětí s rizikem rozvoje astmatu i u dětí nerizikových. Prozatím nemáme k dispozici jednoznačné vodítko, jak v nejnižším dětském věku včas odhalit prvotní projevy průduškového astmatu jakožto chronické celoživotní nemoci od opakovaných a nezřídka poměrně závažných exacerbací převážně virové etiologie, ze kterých dítě časem vyroste.

**Hypotéza:**

Fenotypové projevy průduškového astmatu se v časném dětském věku významně neliší u dětí s vyšším rizikem rozvoje astmatu ve srovnání s nerizikovou populací.

**Cíl práce:**

Ambulantní vyšetření dětí do 4 let věku s opakovanými obstrukcemi průdušek v anamnéze, vyhodnocení rizika podle mAPI a porovnání klinických a vybraných laboratorních projevů u dětí těchto dvou skupin.

# 4. METODIKA

## 4.1 Studie 1: Histologická analýza strukturálních změn v průduškové sliznici nejmenších dětí s vyšším rizikem rozvoje astmatu

### 4.1.1 Zařazení pacientů do studie, rozdělení podle rizika mAPI

Do studie byli zařazeni dětští pacienti do 4 let věku podstupující z různých klinických důvodů vyšetření flexibilní bronchoskopií na Pediatrické klinice 2.LF UK a FN Motol. Podmínkou zařazení do studie bylo podepsání informovaného souhlasu zákonným zástupcem pacienta. Znění informovaného souhlasu bylo schváleno etickou komisí FN v Motole. Žádný z pacientů nebyl indikován k vyšetření flexibilní bronchoskopií pouze pro účely studie, indikace k bronchoskopickému vyšetření jednotlivých pacientů jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Z bronchoskopických vyšetření jsme obdrželi celkem 30 reprezentativních bioptických vzorků od pacientů ve věku 3 až 44 měsíců (průměrný věk 18,4 měsíce, medián 13,5 měsíce). Žádný z vyšetřených pacientů neměl v době bronchoskopického vyšetření stanovenou diagnózu alergického onemocnění ani průduškového astmatu. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin podle vybraných hlavních kritérií mAPI. Vedlejší kritéria mAPI jsme při klasifikaci pacientů nebrali v úvahu, jelikož žádný z pacientů nesplňoval současně dvě vedlejší kritéria, aby tak mohl být považován za „pozitivního“ z hlediska mAPI. Do skupiny s vyšším rizikem tak byli zařazeni pacienti s pozitivní anamnézou atopického ekzému nebo s jedním rodičem s diagnózou bronchiálního astmatu. Do rizikové skupiny bylo zařazeno

celkem 14 pacientů ve věku od 4 do 44 měsíců (průměrný věk 21,6 měsíců, medián 19,5 měsíce). Šestnáct pacientů ve věku 3 až 38 měsíců (průměrný věk 15,6 měsíce, medián 11 měsíců) nesplňujících uvedená kritéria pak bylo zařazeno do kontrolní skupiny. Základní charakteristika pacientů obou skupin je uvedena v tabulkách 1 a 2. Při hodnocení rizikovosti pacientů pro rozvoj astmatu jsme nebrali v úvahu základní kritérium mAPI, a sice počet předchozích epizod pískotů v osobní anamnéze. Při nízkém věku vyšetřovaných dětí více než polovina z nich nezažila žádnou epizodu pískotů před provedením bronchoskopického vyšetření.

Studie probíhala dvojitě zaslepeně, pacienti a jejich bioptické vzorky byly číselně zakódováni nezávislým výzkumníkem.

*Tab. 1: Riziková skupina – základní charakteristika pacientů a indikace k bronchoskopickému vyšetření*

| **RIZIKOVÁ SKUPINA** | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **PACIENT** | **POHLAVÍ** | **VĚK (MĚS.)** | **RF PRO ASTMA** | **INDIKACE K BRONCHOSKOPII** |
| 1 | M | 11 | atopický ekzém | Opakované respirační infekce |
| 2 | M | 12 | atopický ekzém | Suspektní aspirace CT |
| 3 | M | 13 | atopický ekzém | St. p. opakovaných bronchitídách |
| 4 | M | 31 | atopický ekzém | St. p. bilaterální bronchopneumonii |
| 5 | F | 40 | atopický ekzém | St. p. opakovaných bronchopneumoniích |
| 6 | M | 4 | AB u matky | PMR, centrální hypotonický syndrom, st. p. akutním respiračním selhání při pneumonii |
| 7 | M | 44 | AB u matky | St. p. opakovaných respiračních infekcích HDC a DDC |
| 8 | M | 35 | atopický ekzém | St. p. opakovaných bronchitídách |
| 9 | M | 17 | AB u otce | Suspektní aspirace CT |
| 10 | F | 20 | atopický ekzém | St. p. těžké bilaterální pneumonii |
| 11 | M | 19 | atopický ekzém | Suspektní opakované aspirace při GER |
| 12 | M | 6 | atopický ekzém | Tracheobronchomalácie |
| 13 | M | 17 | atopický ekzém | Opakované respirační infekce |
| 14 | M | 34 | AB u matky | Opakované respirační infekce |

*Tab. 2: Kontrolní skupina – základní charakteristika pacientů a indikace k bronchoskopickému vyšetření*

| **KONTROLNÍ SKUPINA** | | | |
|---|---|---|---|
| **PACIENT** | **POHLAVÍ** | **VĚK (MĚS.)** | **INDIKACE K BRONCHOSKOPII** |
| 1 | M | 35 | St. p. resekci stenózy trachey a pravého hlavního bronchu, tracheomalácie |
| 2 | M | 9 | Recidivující bronchitídy |
| 3 | M | 38 | Recidivující bronchitídy, mírný kyselý GER |
| 4 | F | 14 | St. p. atrézii jícnu s TE píštělí, st. p. fundoplikaci pro masivní GER |
| 5 | F | 29 | St. p. opakovaných bronchopneumoniích vpravo, deficit IgA |
| 6 | M | 29 | Chronický suchý kašel, časté rýmy |
| 7 | M | 6 | Protrahované bronchitídy |
| 8 | F | 10 | Opakované respirační infekce |
| 9 | M | 11 | Protrahovaný tracheolaryngeální kašel po infekcích |
| 10 | M | 11 | St. p. opak. respiračních infekcích, st. p. těžké pneumokokové pneumonii |
| 11 | F | 7 | St. p. opakovaných bronchitídách a bronchopneumoniích |
| 12 | M | 4 | Kongenitální laryngeální stridor |
| 13 | M | 4 | PMR, centrální hypotonický syndrom, opakované destaurace ve spánku |
| 14 | F | 3 | Suspektní opakované apirace při GER |
| 15 | M | 9 | Arthrogryposis congenita, inspirační stridor |
| 16 | M | 30 | Tracheomalácie |

### 4.1.2 Bronchoskopické vyšetření, endobronchiální biopsie

Při bronchoskopických vyšetřeních byly použity flexibilní bronchoskopy Olympus o zevním průměru 2,8 nebo 3,6 mm podle stáří pacienta (Olympus BF XP40, Olympus BF XP60 nebo Olympus BF 3C160; Olympus, Tokyo, Japonsko). Všechna vyšetření byla provedena v klidné celkové anestézii použitím kombinace intravenózního propofolu a inhalačního sevofluranu se zachováním spontánní ventilace pacienta. Bioptický vzorek byl odebrán ke konci vyšetření po vizuálním bronchoskopickém zhodnocení a bronchoalveolární laváži (pokud byla provedena). K odebrání vzorků

byly použity flexibilní kleště (Olympus CDD 3). Od každého pacienta byly odebrány 2-4 vzorky z některé kariny na úrovni segmentárního větvení průdušek.

### 4.1.3 Zpracování bioptických vzorků pro vyšetření světelnou mikroskopií

Odebrané bioptické vzorky byly ihned fixovány po dobu 4 hodin v čerstvém 4% roztoku paraformaldehydu pufrovaném PBS (pH 7,4). Následně byly vzorky přemístěny do samotného pufrovacího roztoku a uchovány přes noc při teplotě 4°C. V dalším kroku byly vzorky odvodněny vzestupnou řadou alkoholů, projasněny chloroformem a zality do parafinu. Poté byly bločky nakrájeny na řezy o tloušťce 5 μm a obarveny hematoxylinem-eozinem.

Obarvené vzorky byly pozorovány pod světelným mikroskopem Axioskop (Zeiss, Oberkochen, Německo) nebo BX53 (Olympus, Tokyo, Japonsko) vybavených CCD kamerami DS-U1 (Nikon, Tokyo, Japonsko) nebo ProgRes C5 (Jenoptik, Jena, Německo). K další analýze byly vybrány pouze reprezentativní vzorky (s délkou BM nejméně 300 μm).

V přehledném barvení hematoxylinem-eozinem byla měřena tloušťka BM pod objektivem se 40-násobným zvětšením a za použití počítačové analýzy obrazu NIS Elements (Laboratory Imaging, Praha, Česká republika). Tloušťka BM byla měřena desetkrát v různých oblastech každého vzorku s minimálním rozestupem jednotlivých měření 20 μm. Z deseti měření pak byla vypočtena průměrná tloušťka BM.

### 4.1.4 Imunohistochemická vyšetření

K analýze strukturálních proteinů BM a buněčných elementů v subepiteliálním vazivu byly použity metody nepřímé imunohistochemie. Pokud není uvedeno jinak, při imunohistochemických značeních jsme používali protilátky a speciální chemikálie společnosti Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA).

#### 4.1.4.1 Příprava vzorků k imunohistochemické analýze

U všech vzorků byla před vlastním imunohistochemickým vyšetřením provedena revitalizace antigenních determinant zkoumaných proteinů poškozených předchozím zpracováním vzorků. Revitalizace byla provedena zahřátím v citrátovém pufru o pH 6,0 při teplotě 96°C po dobu 5 minut (značení neutrofilních granulocytů) nebo inkubací s proteázou Bacillus licheniformis při teplotě 37°C po dobu 10-20 minut (všechna ostatní značení). Následné blokování endogenních peroxidáz bylo provedeno pomocí vodného roztoku peroxidu vodíku a metanolu po dobu 30 minut nebo roztokem Dako Dual Block po dobu 10 minut, s nímž jsme rovněž blokovali aktivitu endogenní alkalické fosfatázy (nutné při značení lamininu). K vysycení nespecifických vazebných míst pro protilátky bylo použito 10-minutové inkubace s fetálním telecím sérem.

#### 4.1.4.2 Značení strukturálních proteinů BM a buněčných elementů v subepiteliální tkáni

Ke značení lamininu byla použita primární polyklonální králičí protilátka proti lidskému lamininu (Sigma L9393 v ředění 1:50), inkubace histologických řezů s protilátkou probíhala při teplotě 4°C přes noc. Druhý den byly řezy inkubovány se sekundární polyklonální kozí protilátkou proti králičímu IgG konjugovanou s alkalickou fosfatázou (Sigma A3687 v ředění 1:100). Inkubace se sekundární protilátkou trvala 10 minut při pokojové teplotě. Řezy byly poté opláchnuty a vizualizovány pomocí roztoku Fast-Red. Posledním krokem bylo krátké dobarvení jader (bezalkoholovým) Mayerovým hematoxylinem.

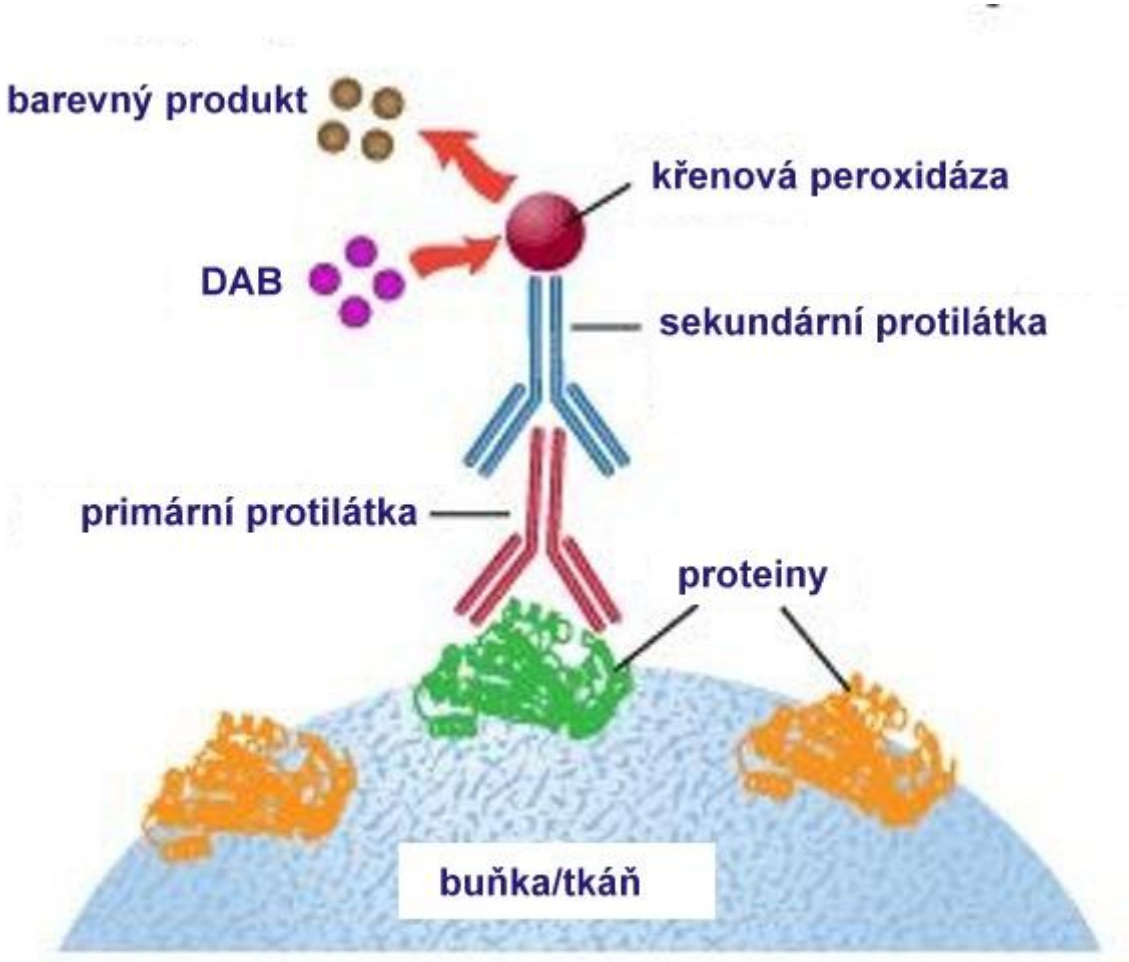
Pro značení kolagenu typu IV a všech isoforem tenascinu jsme použili myší monoklonální protilátky proti těmto proteinům (Sigma C1926 v ředění 1:500 a Sigma T2551 v ředění 1:1000), inkubace s primární protilátkou probíhala při teplotě 4°C přes noc. Následující den byly řezy inkubovány se sekundární polyklonální králičí protilátkou proti myšímu IgG konjugovanou s křenovou peroxidázou (Sigma A9044 v ředění 1:500) a nakonec vizualizovány pomocí diaminobenzidinu (DAB). Jádra buněk byla krátce dobarvena hematoxylinem.

Ke značení eozinofilních granulocytů byla použita monoklonální myší protilátka proti hlavnímu bazickému proteinu eozinofilních granulocytů (ab77842, Abcam, Cambridge, Velká Británie v ředění 1:25), ke značení neutrofilních granulocytů monoklonální myší protilátka proti elastáze neutrofilních granulocytů (20-272-193399, GenWay, San Diego, CA, USA v ředění 1:100). Inkubace s primární protilátkou

probíhala při teplotě 4°C přes noc, následující den byly řezy inkubovány se stejnou sekundární protilátkou jako při detekci kolagenu typu IV nebo tenascinu a vizualizovány pomocí DAB. Jádra buněk byla krátce dobarvena hematoxylinem.

Metoda nepřímé imunohistochemie je schematicky znázorněna na Obr 5.

*Obr. 5: Schematické znázornění metody nepřímé imunohistochemie s použitím sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou a vizualizací DAB. Adaptováno podle http://www.tissue-array.com/*




K imunohistochemické analýze bylo celkem získáno 9 reprezentativních vzorků pro hodnocení exprese lamininu (5 vzorků rizikových pacientů a 4 vzorky z kontrolní skupiny), 11 vzorků pro hodnocení exprese tenascinu (5 vzorků rizikových pacientů a 6 vzorků z kontrolní skupiny) a 9 reprezentativních vzorků pro hodnocení přítomnosti

kolagenu typu IV (3 vzorky od rizikových pacientů a 6 vzorků od kontrol). Dále jsme získali celkem 15 reprezentativních vzorků pro hodnocení přítomnosti neutrofilních granulocytů (8 pacientů z rizikové skupiny a 7 kontrol) a 8 vzorků pro hodnocení zastoupení eozinofilních granulocytů (po čtyřech z každé skupiny).

### 4.1.5 Funkční vyšetření plic

K hodnocení závislosti funkce plic na histologicky zjištěných projevech remodelace jsme u vyšetřených dětí provedli funkční vyšetření plic v předškolním věku. Celkem se podařilo získat validní výsledky funkčního vyšetření od 14 dětí, z toho bylo 8 z rizikové skupiny a 6 z kontrolní skupiny. Průměrný věk při funkčním vyšetření byl 45,9 měsíce (medián 45 měsíců). Ke korelaci s mírou remodelace jsme použili parametr jednosekundové vitální kapacity při usilovném výdechu (FEV1) vyjádřené v procentech náležité hodnoty pro daný věk, výšku a hmotnost.

## 4.2 Studie 2: Porovnání fenotypových projevů průduškového astmatu u nejmladších dětí s opakovanými obstrukcemi průdušek v anamnéze

### 4.2.1 Zařazení pacientů do studie, rozdělení podle rizika mAPI

Do studie byli zařazeni pacienti do 4 let věku s anamnézou opakovaných obstrukcí dýchacích cest hospitalizovaní na Pediatrické klinice 2.LF UK a FNM z důvodu akutní exacerbace průduškové obstrukce. S odstupem 3-6 týdnů po této hospitalizaci byli pacienti pozváni do pneumologické ambulance Pediatrické kliniky 2.LF UK a FNM. Celkem bylo ambulantně vyšetřeno 55 dětí ve věku od 7 do 47 měsíců (průměrný

věk 22,2 měsíce, medián 22 měsíců). Kritéria mAPI splňovalo 35 dětí (z toho 27 chlapců) ve věku od 7 do 47 měsíců (průměrný věk 23,14 měsíce, medián 23 měsíců), u 20 dětí (z toho 12 chlapců) ve věku od 7 do 34 měsíců (průměrný věk 20,55 měsíce, medián 18,5 měsíce) pak byl mAPI vyhodnocen jako negativní. Při vyšetření v pneumologické ambulanci byla detailně probrána osobní, rodinná a sociální anamnéza pacienta, dále bylo provedeno kompletní klinické vyšetření a stanoveno riziko rozvoje astmatu podle indexu mAPI. Při hodnocení rizika podle indexu mAPI jsme nebrali v úvahu počet předchozích obstrukčních epizod podobně jako u pacientů zařazených do studie 1. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin: rizikové pro rozvoj astmatu (mAPI+) a nerizikové (mAPI-).

### 4.2.2 Laboratorní vyšetření pacientů

V indikovaných případech byl odebrán vzorek krve k laboratornímu vyšetření krevního obrazu a imunologickému vyšetření k odhalení možné alergické etiologie obtíží. Panel prováděných laboratorních vyšetření při ambulantní návštěvě znázorňuje Tab. 3. Podle výsledku ambulantního vyšetření bylo následně doporučeno další sledování ve specializované ambulanci event. zahájení dlouhodobé preventivní terapie. Výsledky ambulantního vyšetření byly využity k porovnání fenotypových projevů průduškových obstrukcí obou skupin pacientů.

*Tab. 3: Panel laboratorních vyšetření při ambulantní kontrole v pneumologické ambulanci*

| |
|---|
| **1. krevní obraz včetně diferenciálního rozpočtu leukocytů** |
| **2. imunologické vyšetření:** |
| sérová koncentrace celkových IgE (v IU/ml)<br>sérová koncentrace ECP (v ng/ml)<br>specifické IgE proti vybraným alergenům (v kU/l): |
| *bílkovina kravského mléka*<br>*vaječný bílek*<br>*pyly trav*<br>*pyly bylin*<br>*pyly stromů*<br>*roztoči*<br>*plísně*<br>*srst kočky*<br>*srst psa* |
| **3. vyšetření specifických IgE proti konkrétnímu podezřelému alergenu tam, kde to bylo indikováno (podle anamnézy)** |

### 4.3 Statistické zpracování výsledků

Tloušťka BM (v μm) byla vypočtena jako průměrná hodnota z deseti měření tloušťky BM v různých oblastech řezu bioptického vzorku. Expresi strukturálních glykoproteinů v BM jsme měřili jako tloušťku pozitivně značené vrstvy BM (v μm) a následně spočítali relativní hodnotu vydělením celkovou tloušťkou BM změřenou v přehledném barvení HE. Všechny hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka.

Při analýze přítomnosti buněčných elementů jsme pomocí programu počítačové analýzy obrazu spočítali počet značených buněk v řezu bioptického vzorku a změřili celkovou plochu řezu. Počet buněk jsme pak vydělili plochou řezu, zastoupení studovaných buněk je vyjádřeno jako jejich počet na jednotku plochy (počet buněk/$mm^2$).

Pro porovnání obou skupin pacientů ze studie 1 i 2 jsme použili Mann-Whitneyův test pro neparametrická data a pro vzájemnou korelaci výsledků jednotlivých měření Spearman rank correlation test.

Za signifikantní rozdíl byly považovány hodnoty lišící se na hladině významnosti $p < 0,05$.

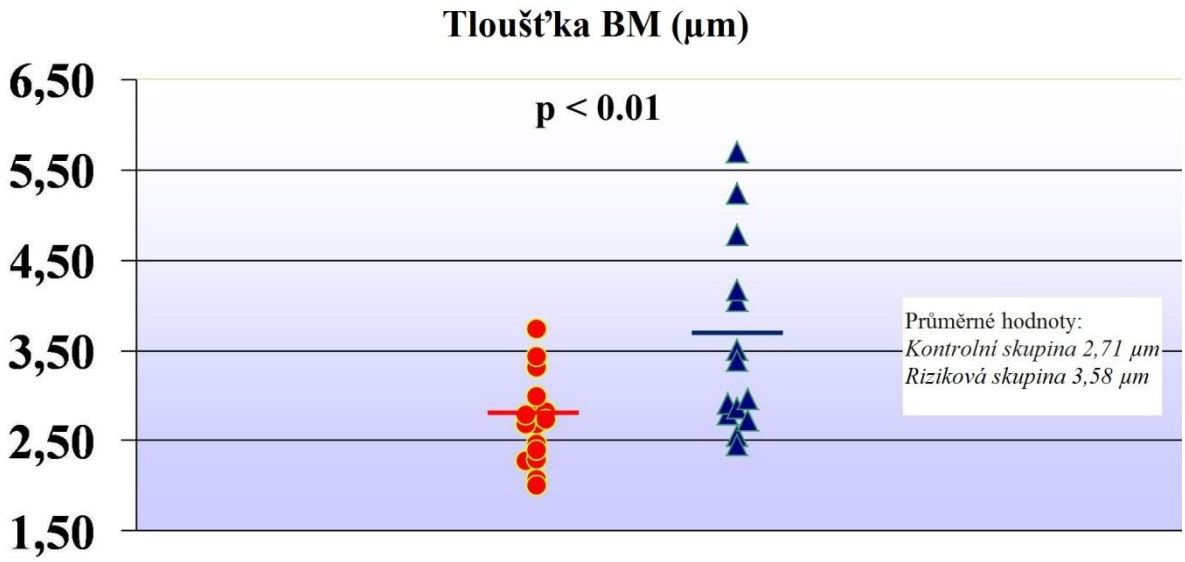
# 5. VÝSLEDKY

## 5.1 Výsledky Studie 1

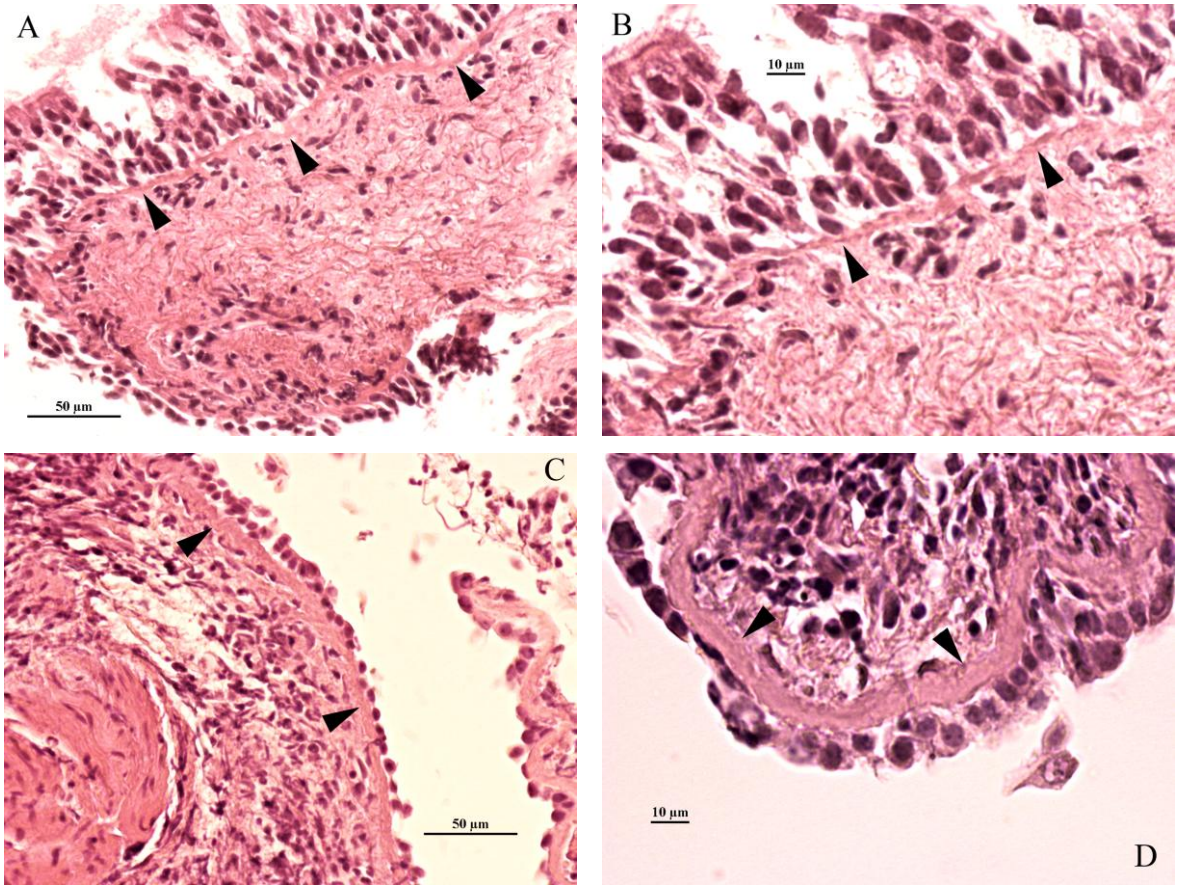
### 5.1.1 Výsledky histologických analýz

V přehledném barvení (Obr. 6) byla tloušťka BM signifikantně větší u dětí s rizikem ve srovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,01$). Průměrná hodnota tloušťky BM u rizikové skupiny byla 3,58 ± 1,05 µm, zatímco u kontrol jsme naměřili průměrnou tloušťku BM 2,71 ± 0,48 µm (Graf 1).

*Graf 1: Rozdíly v tloušťce BM mezi kontrolní (červená kolečka) a rizikovou (modré trojúhelníky) skupinou. Průměrné hodnoty jsou vyznačeny linkou.*

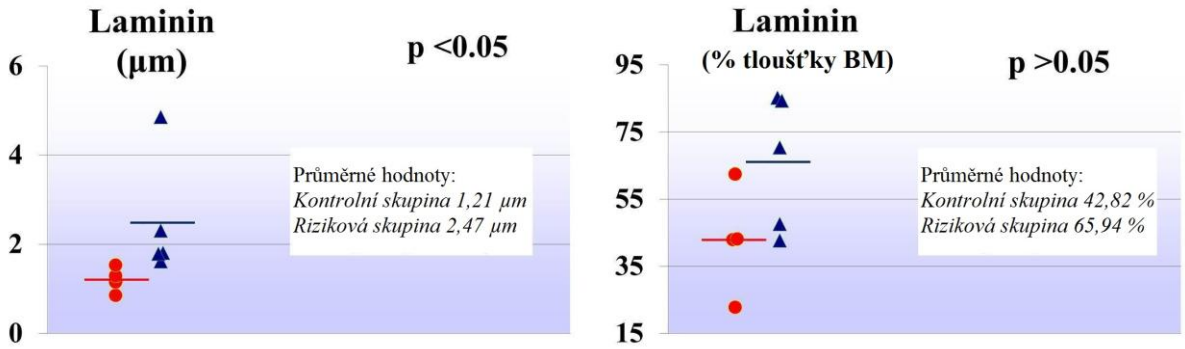


*Obr. 6: Sliznice průdušek v přehledném barvení HE. A a B – vzorek průduškové sliznice od pacientky č. 11 z kontrolní skupiny, věk 11 měsíců, zvětšení objektivu 20x (A) a 40x (B). C a D – vzorek průduškové sliznice od pacientky č 5. z rizikové skupiny, věk 40 měsíců, zvětšení objektivu 20x (C) a 40x (D). Bazální membrána je zřetelně patrná růžová linie pod epitelem (šipky).*

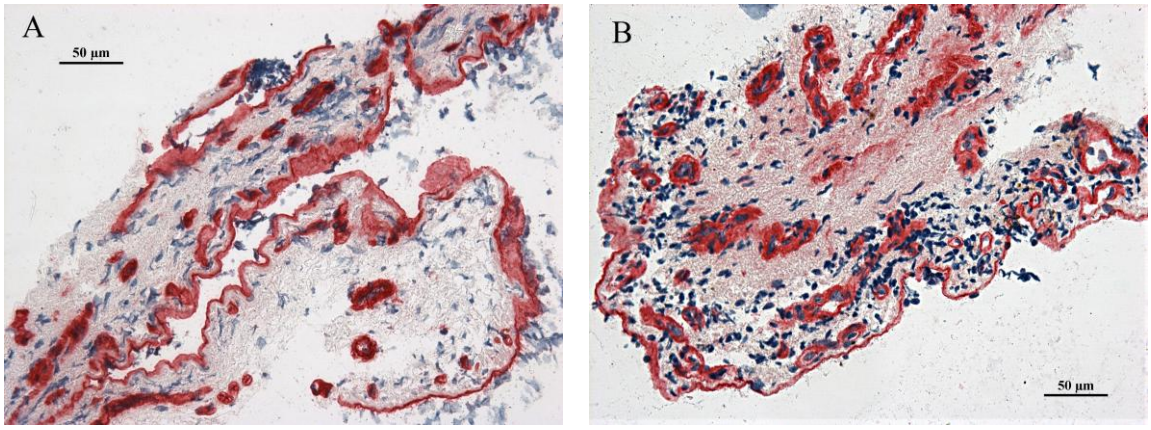



Absolutní tloušťka laminin-pozitivní vrstvy v BM byla taktéž signifikantně vyšší u dětí z rizikové skupiny oproti kontrolní skupině (2,47 ± 1,36 µm ve srovnání s 1,21 ± 0,28 µm, $p < 0,05$; Graf 2). Porovnáním relativního zastoupení lamininu ve struktuře BM rizikové a kontrolní skupiny bylo zjištěno vyšší relativní zastoupení lamininu u rizikových dětí, tento výsledek ale nevykazoval statistickou významnost (65,84 ± 20,04 % tloušťky BM vs. 42,82 ± 16,19 % tloušťky BM; Graf 2). Vrstva obsahující laminin byla dobře zřetelná jako jasně červená linie na zevní straně BM (Obr. 7).

*Graf 2: Rozdíly v absolutní a relativní tloušťce vrstvy lamininu v BM mezi kontrolní (červená kolečka) a rizikovou (modré trojúhelníky) skupinou. Průměrné hodnoty jsou vyznačeny linkou.*

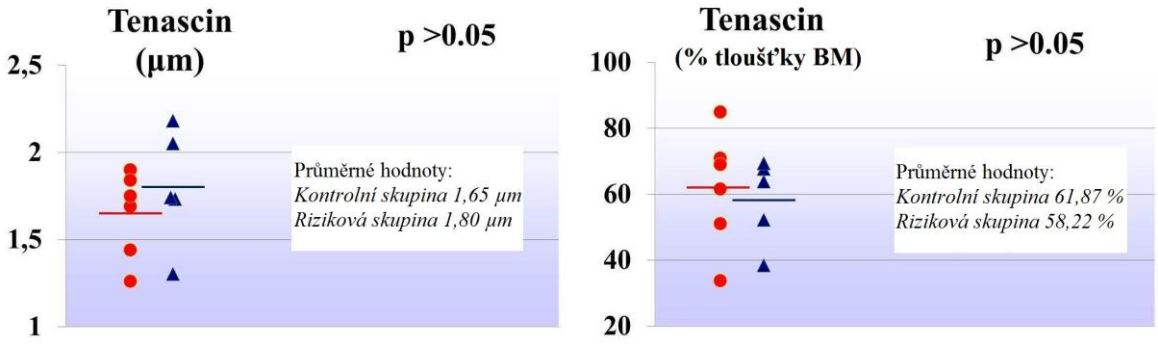



*Obr. 7: Imunohistochemické značení lamininu (vzorek průduškové sliznice od pacienta č. 10 z kontrolní skupiny, věk 11 měsíců (A) ve srovnání se vzorkem průduškové sliznice od pacienta č. 7 z rizikové skupiny, věk 44 měsíců (B); laminin-pozitivní vrstva se znázorňuje jako zřetelná červená linie (vizualizace Fast Red), zvětšení objektivu 40x.*

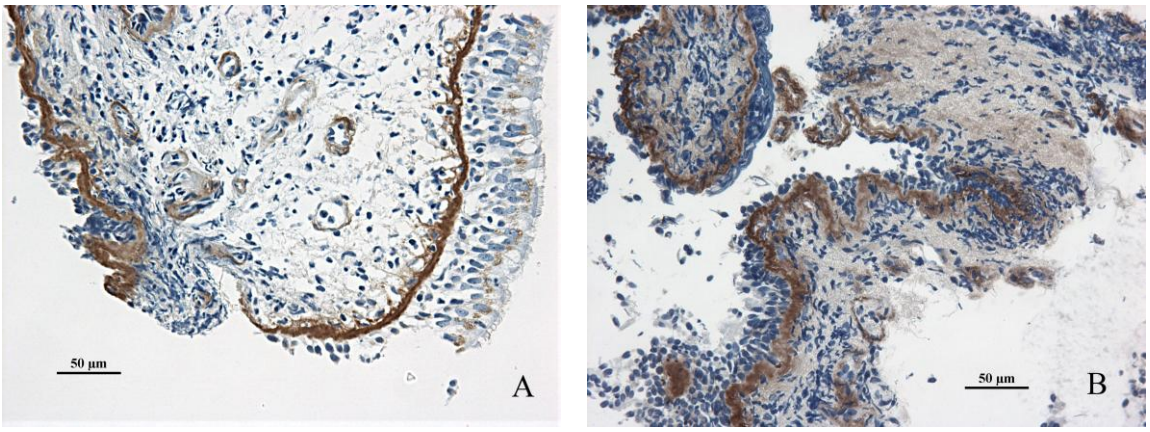



Při hodnocení exprese tenascinu jsme nenalezli signifikantní rozdíly v jeho absolutním ani relativním zastoupení mezi oběma skupinami, jeho exprese byla v obou skupinách srovnatelná (1,80 ± 0,34 µm/58,22 ± 12,96 % tloušťky BM v rizikové skupině a 1,65 ± 0,24 µm/61,87 ± 17,72 % tloušťky BM v kontrolní skupině; Graf 3). Lehká pozitivita tenascinu byla patrná v celé tloušťce BM, ale silně pozitivní tmavě-hnědá tenascin-pozitivní vrstvička byla markantní převážně subepiteliálně u obou skupin pacientů (Obr. 8).

*Graf 3: Rozdíly v absolutní a relativní tloušťce vrstvy tenascinu v BM mezi kontrolní (červená kolečka) a rizikovou (modré trojúhelníky) skupinou. Průměrné hodnoty jsou vyznačeny linkou.*

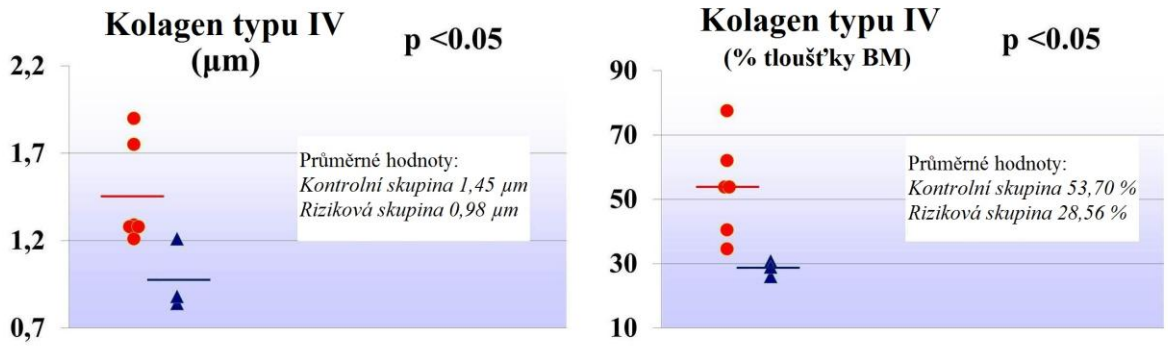



*Obr. 8: Imunohistochemické značení tenascinu (vzorek průduškové sliznice od pacienta č. 10 z kontrolní skupiny, věk 11 měsíců (A) ve srovnání se vzorkem průduškové sliznice od pacienta č. 7 z rizikové skupiny, věk 44 měsíců (B); tenascin-pozitivní vrstva se znázorňuje jako zřetelná tmavě hnědá linie (vizualizace DAB), zvětšení objektivu 40x.*

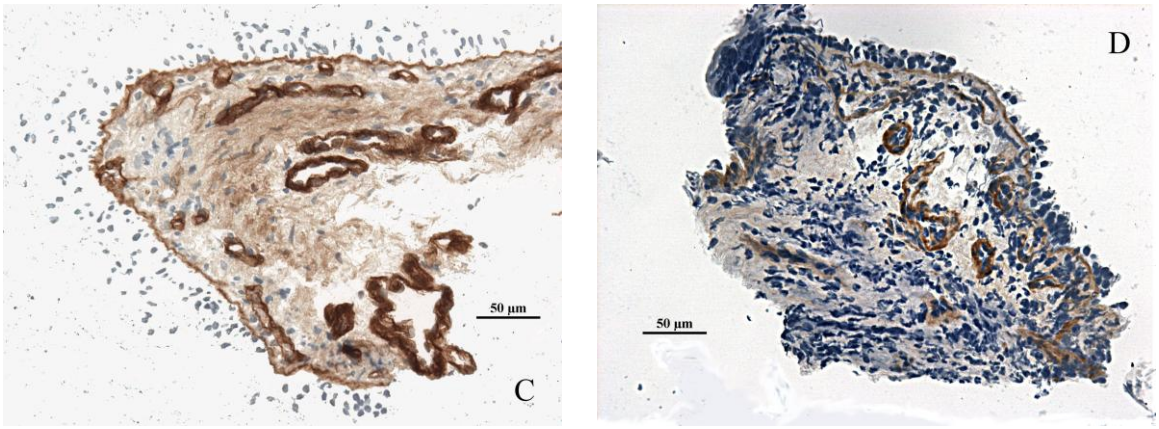



Při analýze kolagenu typu IV jsme zaznamenali jeho nižší expresi u pacientů z rizikové skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou, a to jak v jeho absolutním tak i relativním zastoupení (0,98 ± 0,20 µm/28,56 ± 2,43 % BM u pacientů s rizikem vs. 1,45 ± 0,29 µm/53,70 ± 15,36 % tloušťky BM v kontrolní skupině, $p < 0,05$; Graf 4). Kolagen typu IV byl pozitivně značen v zevní a prostřední vrstvě BM (Obr. 9).

*Graf 4: Rozdíly v absolutní a relativní tloušťce vrstvy kolagenu typu IV v BM mezi kontrolní (červená kolečka) a rizikovou (modré trojúhelníky) skupinou. Průměrné hodnoty jsou vyznačeny linkou.*

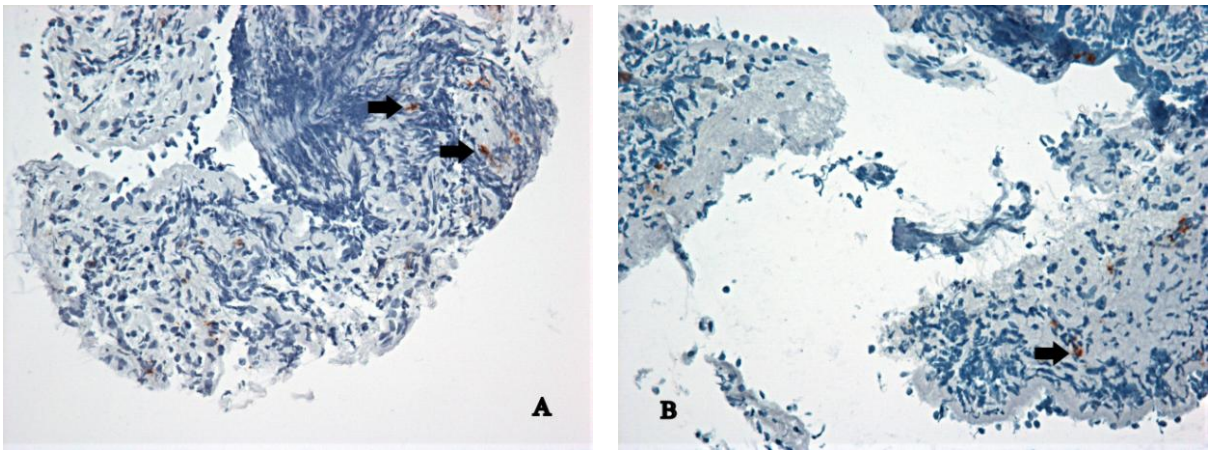



*Obr. 9: Imunohistochemické značení kolagenu typu IV (vzorek průduškové sliznice od pacienta č. 13 z kontrolní skupiny, věk 4 měsíce (A) ve srovnání se vzorkem průduškové sliznice od pacienta č. 14 z rizikové skupiny, věk 34 měsíců (B); kolagen IV pozitivní vrstva se znázorňuje jako zřetelná tmavě hnědá linie (vizualizace DAB), zvětšení objektivu 40x.*

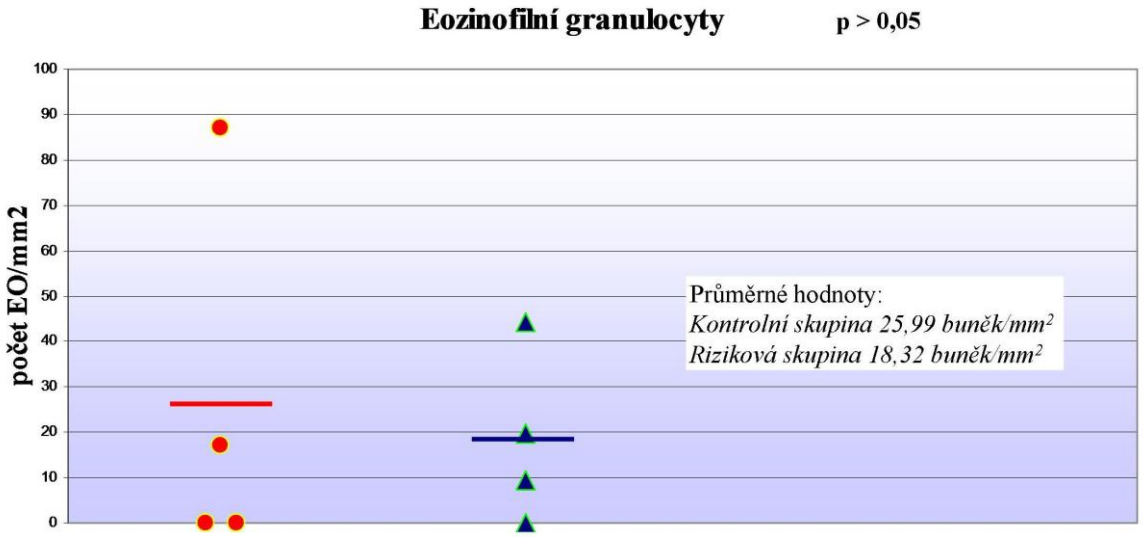



Při značení buněčných elementů v subepiteliálním vazivu jsme nenalezli rozdíly v zastoupení neutrofilních ani eozinofilních granulocytů mezi oběma skupinami pacientů. Průměrný počet eozinofilních granulocytů u pacientů s rizikem pro rozvoj astmatu byl dokonce nižší než u kontrolní skupiny (18,32 buněk/mm$^2$ vs. 25,99 buněk/mm$^2$; Obr. 10, Graf 5). Zastoupení neutrofilních granulocytů bylo sice u rizikových pacientů vyšší, nicméně rozdíl mezi oběma skupinami nebyl statisticky významný (43,81 buněk/mm$^2$ ve srovnání s 15,79 buněk/mm$^2$; Obr. 11, Graf 6).

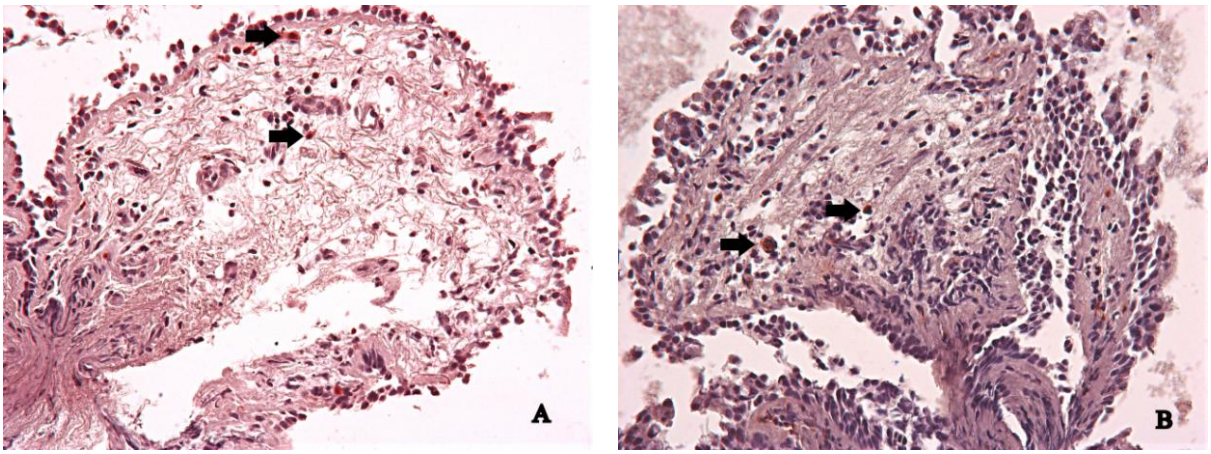
*Obr. 10: Imunohistochemické značení eozinofilních granulocytů (vzorek průduškové sliznice od pacienta č. 16 z kontrolní skupiny, věk 30 měsíců (A) ve srovnání se vzorkem průduškové sliznice od pacienta č. 7 z rizikové skupiny, věk 44 měsíců (B); eozinofilní granulocyty jsou vyznačeny šipkami (vizualizace DAB), zvětšení objektivu 40x.*



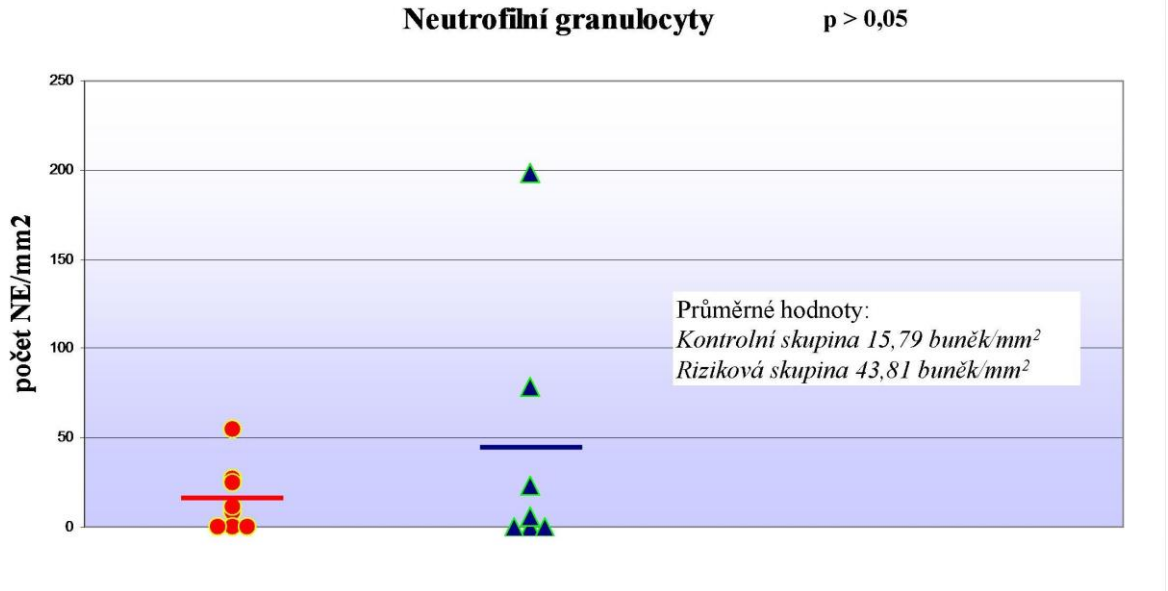

*Graf 5: Počet eozinofilních granulocytů/mm$^2$ v kontrolní (červená kolečka) a rizikové (modré trojúhelníky) skupině. Průměrné hodnoty jsou vyznačeny linkou.*



*Obr. 11: Imunohistochemické značení neutrofilních granulocytů (vzorek průduškové sliznice od pacienta č. 10 z kontrolní skupiny, věk 11 měsíců (A) ve srovnání se vzorkem průduškové sliznice od pacienta č. 1 z rizikové skupiny, věk 11 měsíců (B); neutrofilní granulocyty jsou vyznačeny šipkami (vizualizace DAB), zvětšení objektivu 40x.*




*Graf 6: Počet neutrofilních granulocytů/mm$^2$ v kontrolní (červená kolečka) a rizikové (modré trojúhelníky) skupině. Průměrné hodnoty jsou vyznačeny linkou.*



V souladu s očekáváním jsme nenalezli pozitivní korelaci mezi počty eozinofilních a neutrofilních granulocytů a tloušťkou BM. Korelační koeficienty závislosti exprese studovaných buněk a tloušťky BM jsou uvedeny v Tabulce 4.

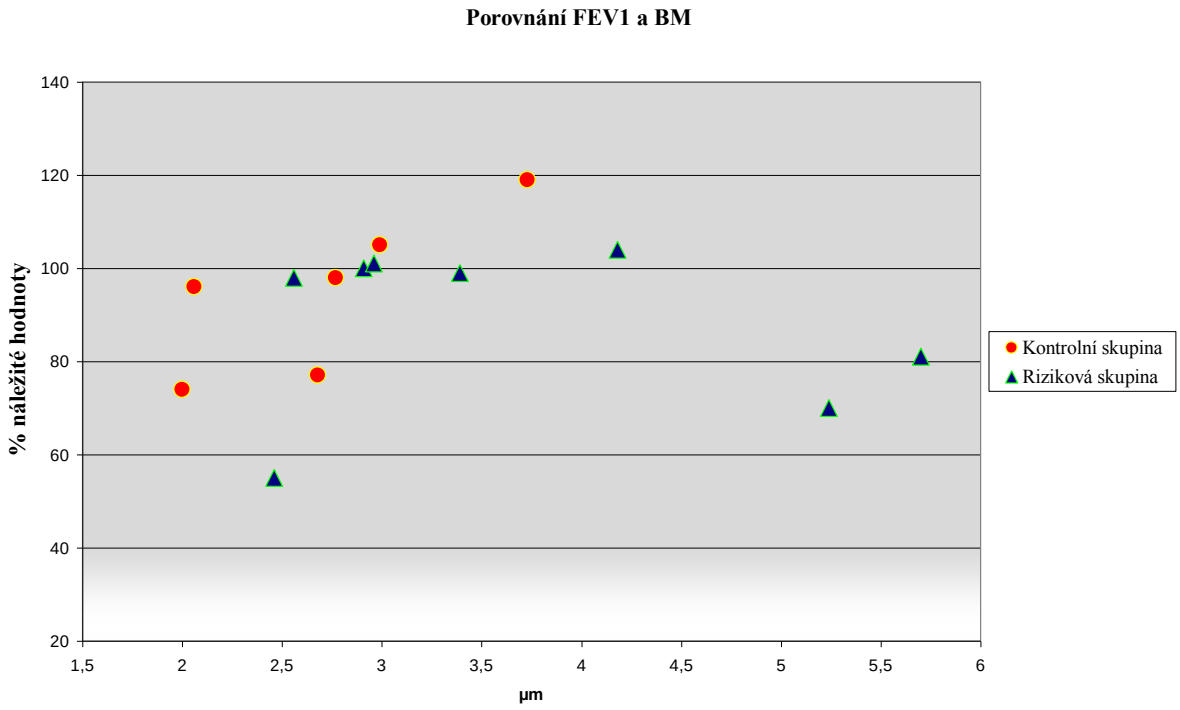
*Tab. 4: Korelační koeficienty závislosti exprese prozánětlivých buněk a tloušťky BM.*

| | |
|---|---|
| **Neutrofilní granulocyty** | $r^2$ = 0,17, p = 0,36 (kontrolní skupina) |
| | $r^2$ = 0,07, p = 0,62 (riziková skupina) |
| **Eozinofilní granulocyty** | $r^2$ = 0,98, p = 0,08 (kontrolní skupina) |
| | $r^2$ = 0,68, p = 0,18 (riziková skupina) |

### 5.1.2 Výsledky funkčního vyšetření plic

Při funkčním vyšetření plic v předškolním věku jsme nenalezli statisticky významnou míru korelace mezi tloušťkou BM a hodnotou FEV1 u jednotlivých pacientů ($r^2$ = 0,37, p = 0,19; Graf 7). Průměrná hodnota FEV1 byla mírně nižší u rizikové skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou (88,5% n.h. vs. 94,83% n.h.), tento skupinový rozdíl však nevykazoval statistickou významnost.

*Graf 7: Srovnání FEV1 v předškolním věku a tloušťky BM.*




## 5.2 Výsledky studie 2

Při porovnání obou skupin pacientů z klinické části studie nebyly v souladu s hypotézou nalezeny významné rozdíly ve fenotypových projevech astmatu mezi oběma skupinami. Průměrný věk při první epizodě průduškové obstrukce byl u mAPI+ skupiny lehce vyšší [17,03 měsíce (medián 15 měsíců) vs. 14,27 měsíce (medián 12 měsíců)], rozdíl mezi skupinami však nebyl statisticky signifikantní (p = 0,31). Průměrný počet obstrukčních epizod do jednoho roku věku byl mírně vyšší u mAPI- skupiny, zatímco při hodnocení téhož parametru do věku tří let se tento rozdíl otočil ve prospěch mAPI+ skupiny, tyto rozdíly nicméně nevykazovaly statistickou významnost. Z laboratorních ukazatelů jsme nezjistili statisticky signifikantní rozdíl v zastoupení eozinofilních granulocytů v diferenciálním krevním obraze v době akutních obtíží ani v klidovém období. Zajímavým nálezem bylo zjištění, že v době

akutních obtíží byl u velké většiny dětí z obou skupin výskyt eozinofilních granulocytů v DKO v mezích normy (tj. < 4 %), zatímco při ambulantním vyšetření v klidovém období došlo k signifikantnímu nárůstu ($p < 0,01$) počtu eozinofilních granulocytů v obou skupinách. Statisticky významný rozdíl byl podle očekávání zjištěn při vyšetření celkové sérové koncentrace IgE s vyšší hladinou u mAPI+ skupiny (223,82 IU/ml (medián 59,9) vs. 61,53 IU/ml (medián 10,7), $p < 0,01$). Zřejmě v souladu s podobností obou skupin stran DKO nebyl nalezen ani významný rozdíl v sérové koncentraci ECP. Také nebyla nalezena korelace mezi věkem nástupu prvních obtíží nebo počtem obstrukčních epizod do jednoho resp. tří let věku a vyšetřovanými laboratorními parametry (eozinofilní granulocyty v DKO, celková sérová koncentrace IgE, resp. ECP). Obě skupiny se však významně lišily ve výskytu epizod průduškových obstrukcí mimo období akutních infekcí, kdy u mAPI- skupiny se tyto epizody vyskytovaly pouze u dvou pacientů, zatímco u mAPI+ skupiny jich uvedlo až 17 pacientů, skupinový rozdíl byl statisticky signifikantní na hladině významnosti $p < 0,05$.

Alarmujícím zjištěním byl vysoký podíl kuřáctví cigaret u rodičů pacientů obou skupin, kdy u mAPI- skupiny uvedlo kouření jednoho z rodičů celkem 6 rodičů (30 %) a u mAPI+ skupiny dokonce až 16 rodičů (45,7 %), z nichž mnozí se sami léčí s průduškovým astmatem. Ve studovaném souboru nicméně nebyl nalezen signifikantní rozdíl v počtu obstrukčních epizod či věku při nástupu obtíží mezi dětmi kuřáků a nekuřáků ani v jedné ze skupin. Výsledky srovnání obou skupin přehledně shrnují Tab. 5 a 6.

*Tab. 5: Porovnání sledovaných parametrů u mAPI+ a mAPI- skupiny*

| | ***mAPI+*** | ***mAPI-*** | **hladina významnosti** |
|---|---|---|---|
| Průměrný věk při nástupu obtíží (v měsících) | 17,03 | 14,27 | p = 0,31 |
| Průměrný počet obstrukčních epizod do 1 roku věku | 1 | 1,19 | p = 0,64 |
| Průměrný počet obstrukčních epizod do 3 let věku | 3,58 | 3 | p = 0,72 |
| Eozinofilní granulocyty v DKO při exacerbaci obstrukce (v %) | 1,97 | 1,22 | p = 0,31 |
| Eozinofilní granulocyty v DKO mimo období obtíží (v %) | 5,7 | 6,2 | p = 0,95 |
| Průměrná sérová koncentrace IgE (v IU/ml) | 223,82 | 61,53 | **p < 0,01** |
| Průměrná sérová koncentrace ECP (v ng/ml) | 32,82 | 30,4 | p = 0,10 |
| Výskyt obstrukčních epizod mezi akutními infekcemi (počet pacientů ze skupiny) | 17 | 2 | **p < 0,05** |

*Tab. 6: Porovnání dětí kuřáků cigaret s dětmi nekuřáků v obou skupinách*

| | **kuřáci** | **nekuřáci** | **hladina významnosti** |
|---|---|---|---|
| | | ***mAPI+*** | |
| Průměrný věk při nástupu obtíží (v měsících) | 16,67 | 16,14 | p = 0,85 |
| Průměrný počet epizod průduškových obstrukcí do 1 roku věku | 0,88 | 1,21 | p = 0,80 |
| Průměrný počet epizod průduškových obstrukcí do 3 let věku | 3,8 | 3,72 | p = 0,72 |
| | | ***mAPI-*** | |
| Průměrný věk při nástupu obtíží (v měsících) | 17,4 | 11,38 | p = 0,22 |
| Průměrný počet epizod průduškových obstrukcí do 1 roku věku | 0,6 | 1,5 | p = 0,44 |
| Průměrný počet epizod průduškových obstrukcí do 3 let věku | 3 | 3,5 | p = 0,72 |

# 6. DISKUSE

## 6.1 Studie 1: Histologická analýza strukturálních změn v průduškové sliznici nejmenších dětí s vyšším rizikem rozvoje astmatu

### 6.1.1 Komentář k výsledkům studie

Vedle dosavadního tradičního pojetí remodelačních změn v průduškové stěně jako důsledku chronické zánětlivé aktivity v dýchacích cestách pacientů s rozvinutým průduškovým astmatem se v posledních letech stále častěji objevuje názor, že tyto změny se mohou objevovat ruku v ruce již s prvními projevy tohoto onemocnění. Při absenci studií zaměřených na tuto problematiku však zůstávaly podobné názory pouze v rovině hypotéz.

Nejdůležitějším a průlomovým výsledkem této práce je nález signifikantních rozdílů v tloušťce BM mezi oběma studovanými skupinami pacientů. Tento výsledek potvrzuje naši hypotézu o přítomnosti iniciálních známek průduškové remodelace ve skupině nejmladších dětí, a to i před stanovením diagnózy astmatu nebo dokonce před klinickými projevy pískotů. Ve skupině pacientů s objektivními rizikovými znaky pro rozvoj astmatu může ztluštění BM indikovat iniciální poškození průduškové sliznice, jež pak může vést k rozvoji dalších změn v jejích hlubších vrstvách.

Výsledky imunohistochemické analýzy ukázaly, že toto ztluštění jde zejména na vrub zvýšené depozice lamininu. Tento výsledek koresponduje s výsledky několika předchozích studií u dospělých pacientů a na zvířecím modelu (Christie *et al.*, 2004;

Liesker *et al.*, 2009). Zvýšené zastoupení lamininu je popisováno jako typická součást remodelace u pacientů s astmatem. Laminin-pozitivní vrstva se zobrazuje jako zevní část BM přilehlá k bazím epitelových buněk, jež jsou považovány za hlavní zdroj lamininu. Myslíme si, že jeho zvýšená exprese u pacientů s rizikem pro rozvoj astmatu může být důsledkem dysfunkce epitelových buněk a je tak iniciální reakcí na iritaci nebo poškození průduškové sliznice těchto pacientů činiteli zevního prostředí. Studie provedené na dospělých pacientech s astmatem prokázaly zvýšenou expresi některých cytokinů v epitelu dýchacích cest (např. EGF, TGF-beta nebo periostinu) ve srovnání se zdravou populací (Lambrecht a Hammad, 2012; Lopes-Guisa *et al.*, 2012). Rovněž byla doložena zvýšená exprese receptorů pro tyto faktory (EGFR) v bronchiální sliznici při experimentu na myším modelu (Le Cras *et al.*, 2011). Stimulace epitelií prozánětlivými cytokiny k produkci extracelulárních proteinů může následně vést k indukci dalších dějů podílejících se na konečném histologickém obrazu remodelace. Myslíme si, že zvýšená aktivita epitelových buněk projevující se zvýšenou produkcí proteinů extracelulární matrix u dětí s vyšším rizikem pro rozvoj astmatu by mohla být důsledkem vyšší fragility a vulnerability epitelů při jejich expozici negativním vlivům z prostředí (jako jsou virové infekce nebo expozice alergenům). Tato epiteliální dysfunkce by mohla být vysvětlena určitým „atopickým“ naprogramováním imunitních dějů u těchto dětí (Swindle *et al.*, 2009). Zvýšená produkce lamininu může být jedním z prvních projevů aktivace těchto buněk v důsledku jejich poškození (Crosby a Waters, 2010).

Při hodnocení množství tenascinu jsme nenalezli rozdíly v jeho produkci mezi oběma skupinami pacientů. Tenascin je považován za jeden z klíčových glykoproteinů účastnících se reparačních procesů při poškození tkání. Jeho zvýšená depozice bývá

popisována ve tkáních po poškozujícím inzultu nebo při probíhajícím zánětlivém procesu. Zvýšená exprese tenascinu v BM byla ve studiích s dospělými pacienty popsána jako jedna z charakteristických známek remodelace (Karjalainen *et al.*, 2003; Laitinen *et al.*, 1997; Liesker *et al.*, 2009). Myslíme si, že zvýšení jeho tvorby je součástí chronických zánětlivých procesů probíhajících po řadu měsíců až let jako výsledku působení celé plejády prozánětlivých cytokinů. Proto nepovažujeme za překvapivý výsledek naší práce, jež jeho zvýšenou expresi u pacientů nejmladších věkových skupin nepotvrzuje.

V rizikové skupině pacientů jsme rovněž nenalezli zvýšené množství kolagenu typu IV, imunohistochemická analýza naopak prokázala jeho signifikantně vyšší množství v BM u kontrolní skupiny, a to jak v absolutních hodnotách, tak v relativním zastoupení v BM. Nabízí se zde spekulace o tom, že tento rozdíl je dán relativním snížením jeho tloušťky na úkor zmnožení lamininu v BM u dětí z rizikové skupiny. Obrácený poměr exprese lamininu a kolagenu typu IV byl již dokumentován v jedné studii s dospělými pacienty (Liesker *et al.*, 2009). Bude však potřeba dalších prací v této oblasti k potvrzení tohoto nálezu.

Při analýze buněk provázejících zánět v subepiteliálním vazivu jsme nenalezli signifikantní rozdíly v zastoupení neutrofilních a eozinofilních granulocytů mezi oběma studovanými skupinami. Tento nález koresponduje s úvodní hypotézou, a sice že se u dětí s rizikem pro rozvoj astmatu nejedná primárně o zánětlivě změněný terén sliznice dýchacích cest, na podkladě kterého pak dochází ke vzniku procesů vedoucích k remodelaci. Toto tvrzení podporuje také skutečnost, že nebyla zjištěna pozitivní korelace mezi počty studovaných populací leukocytů a tloušťkou BM.

Domníváme se, že zánětlivé a remodelační procesy v hlubších vrstvách sliznice se objevují až s odstupem času po iniciálním inzultu, kterým je podráždění až poškození epitelových buněk s jejich následnou aktivací. Prvním projevem této aktivace by mohly být právě změny v BM průduškové sliznice.

Při následném funkčním vyšetření dětí v předškolním věku se nepotvrdila naše hypotéza o možném vlivu iniciálních strukturálních změn ve stěně průdušek na poruchu funkce plic. Lze se domnívat, že tyto iniciální změny v povrchové vrstvě průduškové sliznice, navíc bez zjištěného zánětlivého korelátu v hlubších vrstvách průduškové stěny, zřejmě v počátečních fázích významněji funkci plic neovlivňují. Nicméně, výše zmiňovaná dysfunkce epitelových buněk by mohla vést k indukci postupného rozvoje zánětlivých a proliferačních procesů v hlubších vrstvách průduškové stěny s následným funkčním korelátem v podobě průduškového astmatu v pozdějším věku.

### 6.1.2 Limitace studie

Studie na dětských pacientech vyžadující invazivní vyšetřování a navíc s celkovou anestezií byly, jsou a vždy budou považovány za poněkud kontroverzní. Na rozdíl od studií na zvířecích modelech a s dospělými pacienty je v dětské populaci eticky zcela nepřípustné provádět invazivní vyšetřování pouze z výzkumných účelů. Z tohoto důvodu nelze do takovéto studie zařadit zcela zdravé jedince jako srovnávací kontrolní skupinu. Počet vzorků získaných k vyšetření je tedy zejména limitován celkovým počtem pacientů indikovaných k vyšetření flexibilní bronchoskopií. Navíc ne všichni pacienti k tomuto vyšetření indikovaní jsou zároveň vhodnými kandidáty

k zařazení do studie. Primárně jsme ze studie vyřadili pacienty s těžkými chronickými zánětlivými onemocněními, u kterých by mohlo být riziko ovlivnění výsledků kvůli přítomnosti rozvinutých zánětlivých změn při základním onemocnění.

Pacienty vybrané do studie jsme rozdělili do dvou skupin podle vybraných hlavních kritérií mAPI bez ohledu na základní indikaci k bronchoskopickému vyšetření, jak bylo uvedeno v kapitole 3.1. Bylo by možné diskutovat o vhodnosti rozdělení pacientů na skupinu s opakovanými pískoty v anamnéze jakožto možným ekvivalentem průduškového astmatu v takto nízkém věku a na kontrolní skupinu. Tento princip rozdělení pacientů byl uplatněn v některých podobně zaměřených studiích (Saglani *et al.*, 2007). Nicméně, jak již bylo uvedeno v úvodu, spolehlivá diagnostika astmatu je v tomto věku velmi obtížná a navíc se u mnoha budoucích astmatiků nemusejí první projevy v takto časném věku ještě plně manifestovat. Proto jsme při začlenění pacientů do rizikové skupiny vycházeli z vybraných kritérií mAPI, jež zohledňují spíše dlouhodobější rizikové aspekty možného rozvoje astmatu.

Etické důvody však nebyly zdaleka jediným limitujícím faktorem této studie, kvůli němuž byl počet vyšetřených vzorků omezen. Velikost a množství získaných bioptických vzorků při endobronchiální biopsii jsou dány zejména velikostí použitých bioptických kleští. Vzhledem k nízkému věku vyšetřovaných dětí bylo nutné použít bronchoskop s pracovním kanálem o průměru pouhých 1,2 mm. Do tohoto kanálu lze pak použít pouze nejmenší dostupné kleště určené k provádění endobronchiálních biopsií. Vzorky získané z těchto kleští jsou velmi malé, pouhým okem sotva viditelné. Zpracování takto subtilních vzorků je poměrně komplikované a vyžaduje velmi zručný a vyškolený personál v histologické laboratoři. Navzdory extrémní opatrnosti při

zacházení se vzorky jich přibližně 40 % bylo poškozeno nebo zcela znehodnoceno již během základního zpracování k přehlednému barvení. Při imunohistochemické analýze je pak dalším významně limitujícím faktorem potřeba dalšího náročného zpracování vzorků, jež zahrnuje zejména velmi devastující proces revitalizace antigenů ve vzorku, aby došlo k dostatečnému obnažení epitopů pro navázání primární protilátky. Zejména inkubace s bakteriální proteázou vedla častokrát k takovému narušení struktury vzorku, že jej pak nebylo možné využít k další analýze. Všechny tyto faktory pak významnou měrou ovlivnily výsledný počet reprezentativních vzorků vhodných ke konečnému hodnocení. Přesto se domníváme, že vzhledem k unikátnímu souboru pacientů z nejnižší věkové kategorie je tento počet dostačující a je srovnatelný s jinými studiemi podobného zaměření, a to nejenom u dětských, ale taktéž u dospělých pacientů (Lopes-Guisa *et al.*, 2012; Saglani *et al.*, 2007; Liesker *et al.*, 2009).

Limitujícím faktorem funkčního vyšetření plic byl zejména nízký věk dětí zařazených do studie. U poloviny z nich se nepodařilo získat dostatečně validní a spolehlivě interpretovatelný výsledek funkčního vyšetření plic. Vzhledem k časové limitaci této studie nebylo možné získat funkční data od vyšetřovaných dětí v pozdějším věku.

Dalším z úskalí předkládané práce by se mohl jevit fakt, že se jedná o velmi heterogenní skupinu pacientů častokrát s nejasnou diagnózou v době vyšetření, a to jak ve skupině se zvýšeným rizikem pro rozvoj astmatu tak i v kontrolní skupině. Vzhledem k výše zmiňované velké náročnosti získávání reprezentativních bioptických vzorků od takto malých dětí by však snaha o další selekci pacientů podle vybraných diagnóz několikanásobně prodloužila práci na studii, než by byl získán

dostatečný počet vzorků. Pro nemožnost zařazení zdravých jedinců do studie jsme proto základní indikace pacientů k bronchoskopii při jejich výběru nezohledňovali. Vyřazeni byli pouze pacienti s těžkým chronickým zánětlivým onemocněním, jak bylo uvedeno výše.

Studie na velmi malých bioptických vzorcích taktéž neumožnila důkladnější hodnocení i dalších potenciálních změn ve struktuře průduškové stěny jako jsou hyperplazie a hypertrofie hladké svaloviny nebo zvýšená vaskularizace subepiteliálního vaziva. Toto nebylo limitováno pouze malou velikostí studovaných bioptických vzorků, kdy došlo k jejich „spotřebování" na výše uvedená vyšetření, ale také tím, že ve většině vzorků nebyl odběr dostatečně hluboký, aby byly zachyceny i další vrstvy stěny, což je opět dáno malou velikostí použitých bioptických kleští. Vzhledem k věku dětských pacientů ve studii si však myslíme, že studium těchto struktur by nejspíše nepřineslo zásadnější informaci o probíhající remodelaci, protože se domníváme, že se tyto děje rozvíjejí v pozdějších fázích nemoci, kdy je již zřetelná zánětlivá infiltrace sliznice a u pacienta dochází ke klinickým projevům. Tuto skutečnost podporují i nálezy jiných studií na dospělých pacientech, které popsaly pozitivní korelaci výskytu a intenzity těchto změn s tíží průduškového astmatu (Chetta *et al.*, 1997; Benayoun *et al.*, 2003; Chakir *et al.*, 2003).

## 6.2 Studie 2: Porovnání fenotypových projevů průduškového astmatu u nejmladších dětí s opakovanými obstrukcemi průdušek v anamnéze

V klinické části projektu se potvrdila hypotéza o podobnosti fenotypových projevů průduškových obstrukcí u dětí v riziku rozvoje astmatu a dětí nerizikových v časném

věku. V nerizikové skupině dětí jsme dokonce zaznamenali nižší průměrný věk při prvních obstrukčních projevech a také průměrně více epizod obstrukcí do 1 roku věku, ačkoliv tyto rozdíly nevykazovaly statistickou signifikanci. Na druhé straně ale významně vyšší hladina celkových IgE u rizikové skupiny by mohla předznamenat také vyšší pravděpodobnost podílu alergické reakce na etiologii obstrukčních obtíží.

Zajímavým zjištěním je nález normálního zastoupení eozinofilních granulocytů v DKO u velké většiny vyšetřených pacientů z obou skupin v době akutní ataky průduškové obstrukce a jeho významný nárůst při ambulantním vyšetření v klidovém období. Z tohoto nálezu by se dalo soudit, že parametr zastoupení eozinofilních granulocytů v DKO jako jedno z malých kritérií mAPI může být velmi často falešně negativní, pokud by dítě bylo laboratorně vyšetřováno převážně v obdobích akutních exacerbací průduškové obstrukce.

Naproti tomu další z malých kritérií mAPI, a sice výskyt epizod průduškové obstrukce v obdobích mimo akutní infekce, se v našem souboru jeví být významným rozlišovacím znakem mezi oběma skupinami pacientů.

I když v našem souboru pacientů nebyl prokázán významný rozdíl v počtu obstrukčních epizod mezi dětmi kuřáků a nekuřáků v takto nízkém věku, je nepochybné, že pasivní kouření má jednoznačně negativní dopad na další vývoj a funkci plic a zcela jistě může přispět k progresi a perzistenci dechových obtíží v dalších letech, což potvrdila řada předchozích studií (Moshammer *et al.*, 2006; Chalmers *et al.*, 2002).

## 7. ZÁVĚR

Výsledky předložené práce ukazují, že již u dětí nejmladších věkových skupin lze očekávat diskrétní, ale přitom zřetelné změny ve sliznici dýchacích cest při splnění několika klinických podmínek, jež tyto děti předurčují ke zvýšenému riziku pro rozvoj astmatu. Tato zjištění svědčí o tom, že rozvoj morfologických i funkčních změn může být iniciován i dříve, než dojde ke klinickým projevům onemocnění. Je také zřejmé, že počínající remodelace je iniciována z povrchových vrstev sliznice průdušek. Chybějící korelát v podobě slizničního zánětu v hlubších vrstvách průduškové stěny tento nález podporuje. Další práce s podobným zaměřením by jistě přispěly k lepšímu pochopení iniciální etiopatogeneze průduškového astmatu.

Důkaz přítomnosti počátků remodelačních změn u takto malých dětí jistě opravňuje lékaře v klinické praxi k časnému zahájení adekvátní profylaktické protiastmatické léčby u pacientů s pozitivním prediktivním indexem astmatu, a to i bez ohledu na nemožnost provedení kvalitního funkčního vyšetření plic v nejmladších věkových skupinách. Zbytečné oddalování zahájení preventivní terapie vede k opakovaným akutním exacerbacím, nezřídka se zhoršujícím se průběhem. Časté exacerbace s pravidelnými návštěvami pohotovostních ambulancí dítě významně limitují v běžných činnostech a ovlivňují tak velmi negativně kvalitu jeho života. Přitom je prokázáno, že adekvátní a dobře vedená léčba je nejúčinnějším prostředkem k prevenci těchto akutních epizod.

Doposud bohužel není známo, nakolik je možné remodelační změny ovlivnit pomocí současných terapeutických možností. Studie u dospělých pacientů s astmatem jsou

v tomto směru spíše skeptické, avšak v raném věku nelze ani tuto možnost zcela vyloučit vzhledem k významné plasticitě a adaptabilitě tkání dětského organizmu. Bude však potřeba dalších prací k objasnění této otázky.

Výsledky klinické části studie potvrdily náš předpoklad, že v nejnižším dětském věku nelze na základě počátku a četnosti klinických projevů jednoznačně odlišit budoucí astmatiky od dětí s přechodnými pískoty, protože se děti s vyšším rizikem rozvoje astmatu od dětí nerizikových v těchto klinických projevech významněji neliší. I z tohoto důvodu se domníváme, že právě detailní studium iniciálních histopatologických změn v dýchacích cestách může významně přispět k rozvoji poznání o etiopatogenezi a patofyziologii průduškového astmatu v dětském věku.

## 8. SOUHRN

V časném dětském věku je spolehlivá diagnostika průduškového astmatu velmi obtížná. Z důvodu vysoké prevalence exacerbací průduškových obstrukcí u nejmenších dětí se často otálí se zahájením preventivní protizánětlivé léčby. Cílem práce bylo prokázat, že lze u rizikových dětí již v raném věku nalézt určité strukturální odchylky ve sliznici průdušek, předznamenávající rozvoj průduškové remodelace s dalšími patofyziologickými a klinickými důsledky.

V přehledném histologickém barvení byla analyzována tloušťka bazální membrány ve vzorcích z průduškové stěny 14 dětí do 4 let věku splňujících kritéria zvýšeného rizika rozvoje astmatu a porovnána s kontrolní skupinou 16 dětí. Pomocí imunohistochemických metod pak byla detailně zkoumána exprese strukturálních glykoproteinů bazální membrány a množství zánětlivých buněk v subepiteliálním vazivu. U spolupracujících dětí bylo následně doplněno funkční vyšetření plic v předškolním věku.

U rizikové skupiny byl prokázán výskyt iniciálních remodelačních změn na úrovni bazální membrány ve smyslu jejího signifikantního ztluštění při zvýšené depozici lamininu ve vrstvě přiléhající k epitelu dýchacích cest. Toto ztluštění nebylo v korelaci s výskytem prozánětlivých buněk v subepiteliálním vazivu. Nebyl také nalezen funkční korelát ve smyslu zhoršení funkce plic v předškolním věku u těchto dětí.

Při studiu souboru pacientů v klinické části studie nebyl prokázán významný rozdíl ve fenotypových projevech průduškových obstrukcí mezi dětmi s rizikem pro rozvoj astmatu a nerizikovou populací ve věku do 4 let.

Nález počínajících remodelačních změn u rizikové skupiny opravňuje lékaře k časnému zahájení protiastmatické léčby i přes negativní výsledky funkčního vyšetření.

## 9. SUMMARY

It is very difficult to diagnose bronchial asthma in early childhood. Starting of preventative anti-inflammatory treatment is often delayed due to the high prevalence of acute episodes of bronchial obstructions in very early age. The aims of this thesis were to demonstrate that in children who are at higher risk for developing asthma we can find some structural changes in the bronchial mucosa that might predict future bronchial remodelling with all its patophysiological and clinical consequences.

Using light microscopy we analyzed 14 bioptic samples from bronchial mucosa stained with haematoxylin-eosin from children less than 4 years of age in risk for developing asthma and we compared them with the samples from the control group of 16 children. Using indirect immunohistochemistry we studied the expression of structural glycoproteins of the basement membrane and the presence of inflammatory cells in the subepithelial tissue. In cooperating children we also performed lung function testing in preschool age.

In risk children we found initial remodelling changes concerning the basement membrane thickening due to increased deposition of laminin in the outer part of the basement membrane. This thickening was not in correlation with the presence of inflammatory cells in the subepithelial tissue. Also, we did not find correlation between the lung fuction in preschool age and the rate of remodelling.

In the clinical part of the study we did not find significant differences in asthma phenotypes between the children at risk for developing asthma and the control group. The finding of incipient remodeling changes in the risk group can encourage the clinicians to early onset of an adequate antiasthmatic therapy in spite of the negative results of the functional tests.

## 10. REFERENCE


1. Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, Williams H; ISAAC Phase Three Study Group. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry crosssectional surveys. Lancet 2006: 368:733–743.

2. Kratěnová J. Nová epidemiologická data o alergii, astmatu a alergické rýmě. Alergie 2008: 1(Suppl. 1):16–18.

3. Pohunek, P. Výskyt astmatu a dalších respiračních onemocnění u školních dětí v Ostravě. Alergie 2012:3:169–178.

4. Morgan WJ, Stern DA, Sherrill DL, Guerra S, Holberg CJ, Guilbert TW, Taussig LM, Wright AL, Martinez FD. Outcome of asthma and wheezing in the first 6 years of life: follow-up through adolescence. Am J Respir Crit Care Med 2005;172:1253–1258.

5. Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ. Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. N Engl J Med 1995;332:133–138.

6. Ober C, Hoffjan S. Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. Genes Immun 2006;7:95–100.

7. Hirsch T, Weiland SK, von Mutius E, Safeca AF, Gräfe H, Csaplovics E, Duhme H, Keil U, Leupold W. Inner city air pollution and respiratory health and atopy in children. Eur Respir J 1999;14:669–677.

8. D'Amato G, Liccardi G, D_Amato M, Holgate S. Environmental risk factors and allergic bronchial asthma. Clin Exp Allergy 2005;35:1113–1124.

9. Moshammer H, Hoek G, Luttmann-Gibson H, Neuberger MA, Antova T, Gehring U et al. Parental smoking and lung function in children: an international study. Am J Respir Crit Care Med 2006;173:1255–1263.

10. Chalmers GW, Macleod KJ, Little SA, Thomson LJ, McSharry CP, Thomson NC. Influence of cigarette smoking on inhaled corticosteroid treatment in mild asthma. Thorax 2002;57:226–230.

11. Siltanen M., Kajosaari M., Poussa T., Saarinen K.M., Savilahti E. A dual long-term effect of breastfeeding on atopy in relation to heredity in children at 4 years of age. Allergy. 2003;58(6):524-30.

12. van Odijk J., Kull I., Borres M.P., Brandtzaeg P., Edberg U., Hanson L.A., Høst A., Kuitunen M., Olsen S.F., Skerfving S., Sundell J., Wille S. Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966–2001) on the mode

of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. Allergy. 2003;58(9):833-43.

13. Nagel G, Büchele G, Weinmayr G, Björkstén B, Chen YZ, Wang H, Nystad W, Saraclar Y, Bråbäck L, Batlles-Garrido J, Garcia-Hernandez G, Weiland SK; ISAAC Phase II Study Group. Effect of breastfeeding on asthma, lung function and bronchial hyperreactivity in ISAAC Phase II. Eur Respir J. 2009;33(5):993-1002.

14. Flaherman V, Rutherford GW. A meta-analysis of the effect of high weight on asthma. Arch Dis Child 2006;91:334–339.

15. Wahn U, Lau S, Bergmann R, Kulig M, Forster J, Bergmann K, Bauer CP, Guggenmoos-Holzmann I. Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. J Allergy Clin Immunol 1997;1(Pt 1):763–769.

16. Woodcock A, Lowe LA, Murray CS, Simpson BM, Pipis SD, Kissen P, Simpson A, Custovic A; NAC Manchester Asthma and Allergy Study Group. Early life environmental control: effect on symptoms, sensitization, and lung function at age 3 years. Am J Respir Crit Care Med 2004;170:433–439.

17. Collin SM, Granell R, Westgarth C, Murray J, Paul E, Sterne JA, Henderson J. Pet ownership is associated with increased risk of non-atopic asthma and reduced risk of atopy in childhood: findings from a UK birth cohort. Clin Exp Allergy. 2015;45(1):200-210.

18. Lodge CJ, Allen KJ, Lowe AJ, Hill DJ, Hosking CS, Abramson MJ, Dharmage SC. Perinatal cat and dog exposure and the risk of asthma and allergy in the urban environment: a systematic review of longitudinal studies. Clin Dev Immunol. 2012;2012:176484.

19. Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Roberg KA, Anderson EL, Pappas TE, Printz MC, Lee WM, Shult PA, Reisdorf E, Carlson-Dakes KT, Salazar LP, DaSilva DF, Tisler CJ, Gern JE, Lemanske RF Jr. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. Am J Respir Crit Care Med. 2008;1;178(7):667-672.

20. Lemanske RF Jr, Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, Shult PA, Kirk CJ, Reisdorf E, Roberg KA, Anderson EL, Carlson-Dakes KT, Adler KJ, Gilbertson-White S, Pappas TE, Dasilva DF, Tisler CJ, Gern JE. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. J Allergy Clin Immunol. 2005;116(3):571-577.

21. Illi S, von Mutius E, Lau S, Bergmann R, Niggemann B, Sommerfeld C, Wahn U; MAS Group. Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. BMJ 2001;322:390–395.

22. Papadopoulos NG, Stanciu LA, Papi A, Holgate ST, Johnston SL. A defective type 1 response to rhinovirus in atopic asthma. Thorax. 2002;57(4):328-332.

23. Matricardi PM, Rosmini F, Panetta V, Ferrigno L, Bonini S. Hay fever and asthma in relation to markers of infection in the United States. J Allergy Clin Immunol. 2002;110(3):381-7.

24. Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH, Eigenmann PA, Frischer T, Götz M, Helms PJ, Hunt J, Liu A, Papadopoulos N, Platts-Mills T, Pohunek P, Simons FE, Valovirta E, Wahn U, Wildhaber J; European Pediatric Asthma Group. Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. Allergy. 2008;63(1):5-34.

25. Henderson J, Granell R, Heron J, Sherriff A, Simpson A, Woodcock A, Strachan DP, Shaheen SO, Sterne JA. Associations of wheezing phenotypes in the first 6 years of life with atopy, lung function and airway responsiveness in mid-childhood. Thorax. 2008;63(11):974-80.

26. Papadopoulos NG, Arakawa H, Carlsen KH, Custovic A, Gern J, Lemanske R, Le Souef P, Mäkelä M, Roberts G, Wong G, Zar H, Akdis CA, Bacharier LB, Baraldi E, van Bever HP, de Blic J, Boner A, Burks W, Casale TB, Castro-Rodriguez JA, Chen YZ, El-Gamal YM, Everard ML, Frischer T, Geller M, Gereda J, Goh DY, Guilbert TW, Hedlin G, Heymann PW, Hong SJ, Hossny EM, Huang JL, Jackson DJ, de Jongste JC, Kalayci O, Aït-Khaled N, Kling S, Kuna P, Lau S, Ledford DK, Lee SI, Liu AH, Lockey RF, Lødrup-Carlsen K, Lötvall J, Morikawa A, Nieto A, Paramesh H, Pawankar R, Pohunek P, Pongracic J, Price D, Robertson C, Rosario N, Rossenwasser LJ, Sly PD, Stein R, Stick S, Szefler S, Taussig LM, Valovirta E, Vichyanond P, Wallace D, Weinberg E, Wennergren G, Wildhaber J, Zeiger RS. International consensus on (ICON) pediatric asthma. Allergy. 2012;67(8):976-97.

27. Castro-Rodríguez JA, Holberg CJ, Wright AL, Martinez FD. A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. Am J Respir Crit Care Med. 2000;162(4 Pt 1):1403-6.

28. Guilbert TW, Morgan WJ, Krawiec M, Lemanske RF Jr, Sorkness C, Szefler SJ, Larsen G, Spahn JD, Zeiger RS, Heldt G, Strunk RC, Bacharier LB, Bloomberg GR, Chinchilli VM, Boehmer SJ, Mauger EA, Mauger DT, Taussig LM, Martinez FD; Prevention of Early Asthma in Kids Study, Childhood Asthma Research and Education Network. The Prevention of Early Asthma in Kids study: design, rationale and methods for the Childhood Asthma Research and Education network. Control Clin Trials. 2004;25(3):286-310.

29. Brand PL. The Asthma Predictive Index: not a useful tool in clinical practice. J Allergy Clin Immunol 2011;127:293–294.

30. Castro-Rodriguez, J. A., Cifuentes, L., & Rodríguez-Martínez, C. E. The asthma predictive index remains a useful tool to predict asthma in young children with recurrent wheeze in clinical practice. *The Journal of Allergy and Clinical* Immunology 2011:*127*(4):1082–3.

31. Chang TS, Lemanske RF Jr, Guilbert TW, Gern JE, Coen MH, Evans MD, Gangnon RE, David Page C, Jackson DJ. Evaluation of the modified asthma

predictive index in high-risk preschool children. J Allergy Clin Immunol Pract. 2013;1(2):152-6.

32. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. Am J Respir Crit Care Med 2001: 164:S28–S38.

33. Bai TR, Knight DA. Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences. Clin Sci 2005: 108:463–477.

34. Samuel J. Wadsworth, S. Jasemine Yang and Delbert R. Dorscheid (2012). IL-13, Asthma and Glycosylation in Airway Epithelial Repair, Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology, Prof. Chuan-Fa Chang (Ed.), ISBN: 978-953-51-0864-1, InTech, DOI: 10.5772/51970. Available from: http://www.intechopen.com/books/carbohydrates-comprehensive-studies-on-glycobiology-and-glycotechnology/il-13-asthma-and-glycosylation-in-airway-epithelial-repair

35. Kumar RK, Herbert C, Kasper M. Reversibility of airway inflammation and remodelling following cessation of antigenic challenge in a model of chronic asthma. Clin Exp Allergy. 2004;34(11):1796-1802.

36. Bergeron C, Tulic MK, Hamid Q. Airway remodelling in asthma: from benchside to clinical practice. Can Respir J 2010:17:e85–e93.

37. Pohunek P, Warner JO, Turzikova J, Kudrmann J, Roche WR. Markers of eosinophilic inflammation and tissue remodelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. Pediatr Allergy Immunol 2005:16:43–51.

38. Saglani S, Payne DN, Zhu J, Wang Z, Nicholson AG, Bush A, Jeffery PK. Early detection of airway wall remodeling and eosinophilic inflammation in preschool wheezers. Am J Respir Crit Care Med 2007:176:858–864.

39. Fedorov IA, Wilson SJ, Davies DE, Holgate ST. Epithelial stress and structural remodelling in childhood asthma. Thorax. 2005;60(5):389-94.

40. Durbeej M. Laminins. Cell Tissue Res 2010:339:259–268.

41. Aumailley M, Smyth N. The role of laminins in basement membrane function. J Anat 1998:193:1–21.

42. Christie PE, Jonas M, Tsai CH, Chi EY, Henderson WR Jr. Increase in laminin expression in allergic airway remodelling and decrease by dexamethasone. Eur Respir J 2004:24:107–115.

43. Liesker JJ, Ten Hacken NH, Zeinstra-Smith M, Rutgers SR, Postma DS, Timens W. Reticular basement membrane in asthma and COPD: similar thickness, yet different composition. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2009:4:127–135.

44. Leblond CP, Inoue S. Structure, composition, and assembly of basement membrane. Am J Anat 1989:185:367–390.

45. Amenta PS, Gil J, Martinez-Hernandez A. Connective tissue of rat lung. II: ultrastructural localization of collagen types III, IV, and VI. J Histochem Cytochem 1988:36:1167–1173.

46. Kuo C, Lim S, King NJ, Johnston SL, Burgess JK, Black JL, Oliver BG. Rhinovirus infection induces extracellular matrix protein deposition in asthmatic and nonasthmatic airway smooth muscle cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011;300(6):L951-7.

47. Jones FS, Jones PL. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. Dev Dyn. 2000;218(2):235-59.

48. Phipps S, Benyahia F, Ou TT, Barkans J, Robinson DS, Kay AB. Acute allergen induced airway remodeling in atopic asthma. Am J Respir Cell Mol Biol 2004:31:626–632.

49. Karjalainen EM, Lindqvist A, Laitinen LA, Kava T, Altraja A, Halme M, Laitinen A. Airway inflammation and basement membrane tenascin in newly diagnosed atopic and nonatopic asthma. Respir Med 2003:97:1045–1051.

50. Laitinen A, Altraja A, K€ampe M, Linden M, Virtanen I, Laitinen LA. Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid. Am J Respir Crit Care Med 1997:156:951–958.

51. Martinez FD. Maturation of immune responses at the beginning of asthma. J Allergy Clin Immunol 1999;103:355–361.

52. Meiler F, Zimmermann M, Blaser K, Akdis CA, Akdis M. T-cell subsets in the pathogenesis of human asthma. Curr Allergy Asthma Rep. 2006;6(2):91-6.

53. Marguet C, Jouen-Boedes F, Dean TP, Warner JO. Bronchoalveolar cell profiles in children with asthma, infantile wheeze, chronic cough, or cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1999;159:1533–1540.

54. de Blic J, Tillie-Leblond I, Tonnel AB, Jaubert F, Scheinmann P, Gosset P. Difficult asthma in children: an analysis of airway inflammation. J Allergy Clin Immunol 2004;113:94–100.

55. Elias J.A., Zhou Z., Chupp G., Homer R.J. Airway remodeling in asthma. J Clin Invest. 1999;104(8):1001-1006.

56. Carroll N, Elliot J, Morton A, James A. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. Am Rev Respir Dis. 1993;147:405–10.

57. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. Chest. 1992;101:916–21.

58. Li X, Wilson JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. Am J Respir Crit Care Med. 1997;156(1):229-33.

59. Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Tura M, Zuin R, Beghe B, Maestrelli P, Fabbri LM, Saetta M. Airway inflammation in childhood asthma. Am J Respir Crit Care Med 2003;168:798–803.

60. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. Nat Med 2012:18:684–692.

61. Lopes-Guisa JM, Powers C, File D, Cochrane E, Jimenez N, Debley JS. Airway epithelial cells from asthmatic children differentially express proremodeling factors. J Allergy Clin Immunol 2012:129:990–997.

62. Le Cras TD, Acciani TH, Mushaben IM, Kramer EL, Pastura PA, Hardie WD, Korfhagen TR, Sivaprasad U, Ericksen M, Gibson AM, Holtzman MJ, Whitsett JA, Hershey GK. Epithelial EGF receptor signaling mediates airway hyperreactivity and remodeling in a mouse model of chronic asthma. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2011:300:L414–L421.

63. Swindle EJ, Collins JE, Davies DE. Breakdown in epithelial barrier function in patients with asthma: identification of novel therapeutic approaches. J Allergy Clin Immunol 2009:124:23–34.

64. Crosby LM, Waters CM. Epithelial repair mechanisms in the lung. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2010:298:L715–L731.

65. Chetta A, Foresi A, Del Donno M, Bertorelli G, Pesci A, Olivieri D. Airways remodeling is a distinctive feature of asthma and is related to severity of disease. Chest. 1997;111:852–7.

66. Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, Aubier M, Pretolani M. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2003;167:1360–8.

67. Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, Boulet LP, Hamid Q. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: Effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. J Allergy Clin Immunol. 2003;111:1293–8.

## 11. SEZNAM PUBLIKACÍ

### 11.1 Publikace s IF vztahující se k tématu disertace (*in extenso*)

1. Berankova K, Uhlik J, Honkova L, Pohunek P. Structural changes in the bronchial mucosa of young children at risk of developing asthma. Pediatr Allergy Immunol. 2014;25(2):136-42. *(IF 3,859)*

2. Hoňková L, Uhlík J, Beránková K, Svobodová T, Pohunek P. Epithelial basement membrane thickening is related to TGF-Beta 1 expression in children with chronic respiratory diseases. Pediatr Allergy Immunol. 2014;25(6):593-9. *(IF 3,859)*

### 11.2 Publikace nevztahující se k tématu disertace (*in extenso*)

1. Pohunek P, Svobodová T, Urbanová K: Diagnostika a léčba astmatu v časném dětském věku. Současné aspekty péče o děti s obstrukčními potížemi. Postgraduální medicína 02/2009.

2. Urbanová K, Pohunek P: Diagnostika a léčba bronchiálního astmatu u dětí - Současná strategie péče o dětské astma podle dokumentu iniciativy PRACTALL. Medicína po promoci 02/2009.

3. Urbanová K, Pohunek P: Každý dětský astmatik je zvláštní případ. Medical Tribune 28/2009.

4. Urbanová K: Strategie péče o astma u dětí ve věku do pěti let. Medical Tribune 28/2009.

5. Urbanová K: Současné postavení kortikosteroidů v léčbě dětského astmatu, Remedia 01/2010.

6. Beránková K: Aktuální pohled na léčbu astmatu u dětí nejnižších věkových skupin. Pediatr. praxi, 2011; 12(5): 306-308.

7. Janda A., Król L., Kalina T., Král V., Pohořská J., Mejstříková E., Hrušák O., Keslová P., Formánková R., Schneiderová H., Litzman J., Freiberger T., Poloučková A., Šedivá A., Skalická V., Beránková K., Zemková D., Jílek D.,Sedláček P., Starý J.: X-vázaný hyper-IgM syndrom. Pacienti v České republice a přehled literatury. Alergie, 2012; 1, 31-40.

10. Beránková K., Hoňková L., Pohunek P.: Nejnovější pohled na diagnostiku a léčbu průduškového astmatu v dětském věku – od PRACTALL k ICON. Alergie, 2012; 2 Supplement1; 26-31.

11. Hoňková L., Beránková K., Pohunek P.: ICON – souhrn nejnovějších doporučení v managementu průduškového astmatu u dětí, Čes-slov Pediat, 2014; 69 (1); 21-28

### 11.3 Kapitoly v monografiích

Lebl J., Bronský J., Pohunek P., Seeman T. et al. Diferenciální diagnostika v pediatrii. Druhé, doplněné vydání. Galén (2014). ISBN 978-80-7492-148-3

### 11.4 Abstrakta

Urbanova K, Pohunek P, Uhlik J, Svobodova T: Structural changes in the bronchial wall in young children with high risk for developing astma. Paediatr Respir Rev. 2010;11;S1. *(IF 2,676)*

Pohunek P, Urbanová K, Svobodová T, Uhlík J, Hornofová L. How, where and when to perform a bronchial biopsy? Clinical applications. Paediatr Respir Rev. 2011;12;S48-S49. *(IF 2,197)*

Hoňková L, Beránková K, Uhlík J, Pohunek P. Bronchial basement membrane thickening and increased laminin deposition in children with chronic obstructive respiratory diseases. Paediatr Respir Rev. 2013; Vol. 14, S56. *(IF 2,217)*

## 12. PŘÍLOHY

1. Berankova K, Uhlik J, Honkova L, Pohunek P. Structural changes in the bronchial mucosa of young children at risk of developing asthma. Pediatr Allergy Immunol. 2014;25(2):136-42.

2. Hoňková L, Uhlík J, Beránková K, Svobodová T, Pohunek P. Epithelial basement membrane thickening is related to TGF-Beta 1 expression in children with chronic respiratory diseases. Pediatr Allergy Immunol. 2014;25(6):593-9.