

**Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



**Akutní a chronická onemocnění plic a dýchacích cest u dětí:
nové bioindikátory a molekulární cíle pro farmakoterapii**

**Acute and chronic airways disease in children:
new bioindicators and molecular targets for therapy**

Marian Šenkeřík

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program pediatrie

Hradec Králové

2017

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu pediatrie na Dětské klinice Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Marian Šenkeřík,
Nemocnice Pardubického kraje
Dětské oddělení Pardubické nemocnice

Školitel: Doc. MUDr. Jiřina Chládková, Ph.D.
Dětská klinika Fakultní nemocnice Hradec Králové

Oponenti:
1.prof. MUDr. Hana Hrstková, CSc.
Lékařská fakulta Masarykovy univerzity
Pediatrická klinika FN
Černopolní 212/9
662 63 Brno

2.doc. MUDr. Vít Petrů, CSc. adresa:
Alergologie a klinická imunologie Synlab Czech s.r.o.
Stroupežnického 18
150 00 Praha 5 - Smíchov

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR dne
v od hod.
(bude doplněno po vyhlášení termínu, místa a času)

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Doc. MUDr. Sylva Skálová, Ph.D.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
V doktorském studijním programu pediatrie
Garant studijního programu

Obsah:

1. Obsah	3
2. Souhrn	4
3. Summary	5
4. Úvod do problematiky	6
3.1. Inflammometrické metody	6
3.2. NO v dýchacích cestách a jeho analýza	6
3.3. Matematický model dýchacích cest	9
3.4. Metody výpočtu parametrů přestupu NO do vydechovaného vzduchu vycházející z dvoukompartmentového modelu	10
3.5. Přínos vyšetřování bronchiálního a alveolárního NO	11
4. Cíle disertační práce	11
5. Materiál a metodika	12
5.1. Studie č.1: Analýza závislosti FENO na výdechové rychlosti	12
5.2. Studie č. 2: Odhad všech parametrů dvoukompartmentového modelu kombinací metod podle Tsoukiase (metoda T) a Högmanové	20
6. Závěry k vytyčeným cílům disertační práce	24
7. Diskuze k získaným výsledkům	25
8. Použitá literatura	30
9. Přehled publikační činnosti autora	32

1. Souhrn

Cílem předkládané dizertační práce bylo přispět ke standardizaci a validaci vyšetření na výdechové rychlosti nezávislých parametrů NO, zejména alveolární koncentrace ($C_{A}NO$) a bronchiálního toku NO ($J_{aw}NO$), u dětí a dospívajících s alergickými onemocněními dýchacích cest. Práce vznikla v období akcentovaného zájmu odborné veřejnosti o neinvazivní vyšetřovací metody a cílené terapeutické ovlivnění zánětu v malých dýchacích cestách u astmatiků. Po standardizaci a ověření klinického přínosu získalo vyšetření koncentrace oxidu dusnatého (FENO) ve vzduchu vydechaném ústy rychlostí 50 ml/s status validovaného bioindikátoru eozinofilního zánětu v dýchacích cestách nemocných s astmatem a prosadilo se v klinické praxi. V současnosti probíhá výzkum zaměřený na novou metodu na měření FENO při několika výdechových rychlostech, která využívá fyziologické modely přestupu NO do vydechaného vzduchu a dovoluje nepřímou cestou kvantifikovat množství NO a neinvazivně monitorovat intenzitu zánětlivých procesů v distálních a proximálních dýchacích cestách.

Ve skupinách dětí a mladistvých s alergickou rýmou a/nebo průduškovým astmatem a jejich zdravých vrstevníků (věk 6-19 let) byla koncentrace FENO vyšetřena on-line na chemiluminiscenčním analyzátoru NO při výdechu konstantní rychlostí v rozmezí 50-250 ml/s. Byly aplikovány dvě matematické metody lineární regresní analýzy podle autorů Pietropaoliho et al (metoda P) a Tsoukiase et al (metoda T), vycházející z dvoukompartimentového modelu. Výsledky práce potvrdily, že metody P a T poskytují srovnatelné hodnoty $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ pouze za podmínky měření a výpočtu v rozmezí splňujícím podmínku linearitu závislostí sledovaných veličin na výdechové rychlosti. V našem souboru to bylo rozmezí 100 až 250 ml/s. Měření při příliš nízkých výdechových rychlostech má za následek 1/ nadhodnocení $C_{A}NO$ a podhodnocení $J_{aw}NO$ a 2/ vznik systematických rozdílů mezi výsledky metod podle Tsoukiase a Pietropaoliho, které jsou větší při odhadu $C_{A}NO$ ve srovnání s $J_{aw}NO$. Vliv nelinearity byl v naší studii vyšší u dětí s průduškovým astmatem než u dětí s alergickou rýmou. Výsledky srovnání parametrů $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ mezi skupinami nemocných mohou tak být při nedodržení podmínky linearitu zavádějící. Z tohoto důvodu jsme navrhli iterační metodu na ověření linearitu a výběr individuálně vhodného rozsahu výdechových rychlostí.

Hodnoty na výdechové rychlosti nezávislých parametrů $J_{aw}NO$ a $C_{aw}NO$ (koncentrace NO ve stěně bronchu) vypočtené algoritmem podle Högmanové et al (výdechové rychlosti 30, 100 a 250 ml/s) závisely na úrovni kontroly nad astmatem a byly významně vyšší u nemocných s nedostatečnou kontrolou než u nemocných s dobrou kontrolou, zatímco koncentrace $C_{A}NO$ byla srovnatelná. Podle výsledků ROC analýzy je senzitivita a specifická parametry $J_{aw}NO$ a $C_{aw}NO$ při diagnóze nedostatečné úrovně kontroly nad astmatem srovnatelná jako u koncentrace FENO. Velikost plochy pod křivkou AUC blízka 0,70 odpovídá diagnostické hodnotě na hranici klinické použitelnosti testu. Na výdechové rychlosti nezávislé parametry přestupu NO do vydechaného vzduchu nepřinesly v naší studii lepší informaci než vyšetření FENO standardizovanou metodou při výdechu rychlostí 50 ml/s.

2. Summary

Acute and chronic airways disease in children: new bioindicators and molecular targets for therapy

The aim of this thesis was to contribute to the standardization and validation of expiratory flow parameters independent of NO testing, particularly alveolar concentration (CANO) and bronchial NO flux ($J_{aw}NO$) in children and adolescents with allergic respiratory diseases. The thesis was created in the time of increased interest of medicine professionals in non-invasive examination methods and targeted therapeutic influence of inflammation in small airways in asthmatics.

After the standardization and validation of clinical benefits, the measurement of concentrations of nitric oxide (FENO) in the air exhaled through the mouth with the speed of 50 ml/s was validated for the evaluation of eosinophilic airway inflammation in patients with asthma and started to be widely used in clinical practice. Currently, there is an ongoing research focused on a new method for FENO measurement at several flow rates, which uses physiological models of NO transfer in exhaled air, allowing to quantify the amount of NO in an indirect way and to monitor the intensity of the inflammatory processes in distal and proximal airways non-invasively.

In groups of children and adolescents with allergic rhinitis and / or bronchial asthma and their healthy peers (aged 6 -19 years), the concentration of FENO was examined using online chemiluminescence NO analyzer during exhalation at a constant speed in the range of 50-250 ml/s. Then, two mathematical methods of linear regression analysis were applied, the authors Pietropaoli et al (the P method) and Tsoukias et al (the T method), which are based on a two-compartment model.

The results confirmed that the P and T methods give comparable values of CANO and $J_{aw}NO$ only under the condition that measurement and calculation are within a range allowing for the linearity dependence of the monitored values on the expiratory flow. In our sample, it represented the range between 100 ml to 250 ml /s. Measuring at very low flow rates results in 1 / CANO overestimation and $J_{aw}NO$ underestimation and 2 / the rise of systematic differences between the results obtained by the Tsoukias and Pietropaoli methods which are larger in estimating CANO as compared to $J_{aw}NO$. The effect of non-linearity in our study was higher in children with bronchial asthma than in children with allergic rhinitis.

Thus, the results of comparing parameters $C_{aw}NO$ and $J_{aw}NO$ between groups of patients may be misleading if the condition of linearity is not respected. For this reason, we have proposed an iterative method to verify linearity and a selection of individually appropriate range of flow rates. The values of expiratory flow independent parameters $J_{aw}NO$ and $C_{aw}NO$ (concentration of NO in the wall of the bronchus) calculated using the Högman algorithm (expiratory flow rates of 30, 100 and 250 ml /s) depended on the level of asthma control and were significantly higher in patients with poor asthma control over patients with good asthma control, while CANO concentration was similar. According to the results of ROC analysis, the sensitivity and specificity of $J_{aw}NO$ and $C_{aw}NO$ parameters for the detection of poor asthma control is comparable to FENO measurement. The area under the AUC curve close to 0.70 corresponds to the diagnostic value bordering on the clinical applicability level of this test. Expiratory flow independent parameters for transfer of NO in exhaled air in our study did not produce better information than FENO testing using a standardized method during exhalation rate of 50 ml / s.

3. Úvod do problematiky

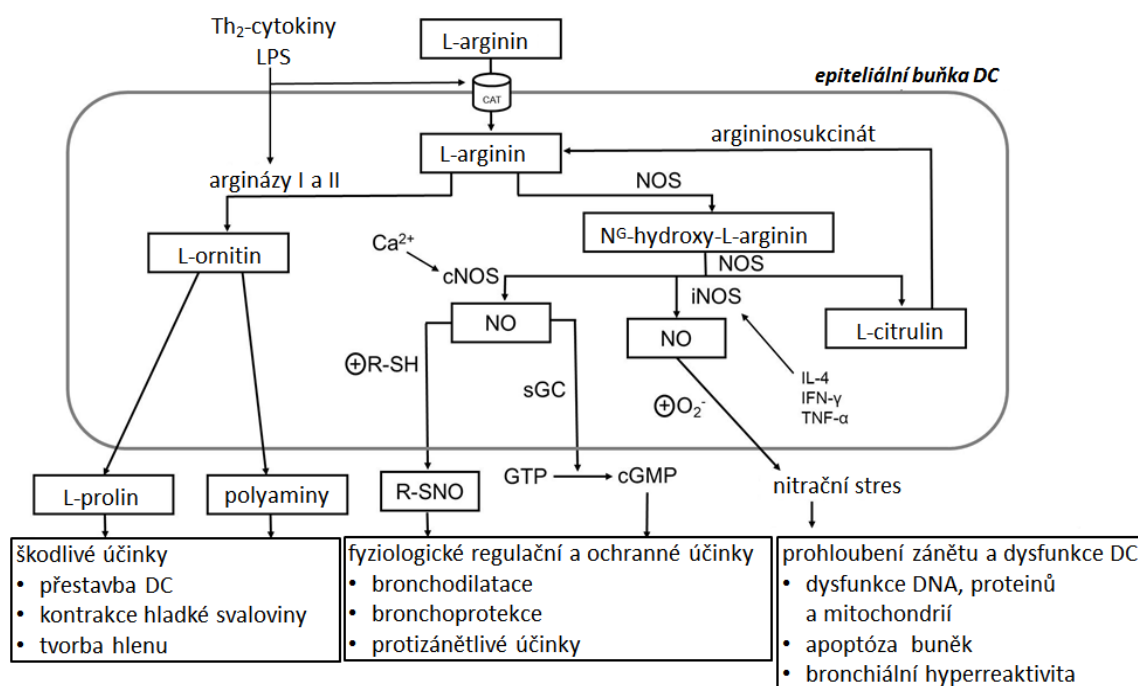
Průduškové astma je heterogenní onemocnění charakterizované chronickým zánětem a remodelací průdušek. Chronický zánět vede k průduškové hyperreaktivitě a variabilní, obvykle reverzibilní, obstrukci průdušek. Incidence astmatu se v posledních letech významně zvýšila celosvětově, Českou republiku nevyjímaje. Naopak příznivý je pokles úmrtnosti na astma [1], který je připisován přesnější diagnostice, účinné farmakoterapii včetně propracované stupňové strategii léčby.

3.1. Inflammometrické metody

V současné době je důraz kladen na nalezení objektivních ukazatelů intenzity zánětu jako známky kontroly nemoci na úrovni tkání a buněk, přítomných v dýchacích cestách. Zánětlivý proces u astmatiků postihuje dýchací cesty v celém jejich průběhu – od centrálních dýchacích cest, až po nejmenší bronchy s průměrem pod 2 mm. Tuto periferní část bronchiálního stromu nazýváme malými (periferními) dýchacími cestami. V posledních letech se objevují nové poznatky o vlivu těchto malých dýchacích cest na klinický průběh i jejich úlohu v patogenezi astmatu. Byly již vyvinuty technologie umožňující farmakoterapeuticky zasáhnout v anatomicky nejmenších dýchacích cestách. Díky tomuto pokroku je nyní diskutována možnost přínosu této léčby pro pacienty s obtížně farmakologicky kontrolovatelným astmatem, nebo pro nemocné vyžadující vysoké dávky IKS. Nové metody léčby a nový pohled na malé dýchací cesty vedly k oživení zájmu o možnost jejich zobrazení, či hodnocení pomocí nepřímých ukazatelů. Badatelské úsilí je zaměřeno na vyšetřování materiálu získaného z dýchacích cest neinvazivními postupy. Zatím jedinou neinvazivní metodou vyšetření zánětu v dýchacích cestách, již využívanou v praxi, je stanovení koncentrace oxidu dusnatého (NO) ve vydechovaném vzduchu (FENO) při rychlosti 50ml/s [2, 3, 4, 5]. Využitím metodiky vyšetření koncentrace NO při více výdechových rychlostech je možné odhadnout frakci NO pocházející z periferních dýchacích cest. Aktuálně je tímto směrem zaměřen výzkum s cílem ověření metodiky vyšetření, matematických modelů odhadu původu NO i komparace výsledků s klinickými projevy astmatu.

3.2. NO v dýchacích cestách a jeho analýza

Alving v roce 1993 poprvé pozoroval zvýšenou koncentraci NO ve vydechovaném vzduchu u astmatiků [6]. V současnosti je obecně přijímáno, že NO má v dýchacích cestách účinky jak prospěšné (např. bronchodilatace, bronchoprotekce, zvýšení plicní cirkulace a distribuce krve do ventilovaných oblastí plic, ochrana před patogenními mikroorganismy), tak i škodlivé (např. nitrační stres, prohloubení zánětu a přestavby DC). Schematicky viz obr. 1.



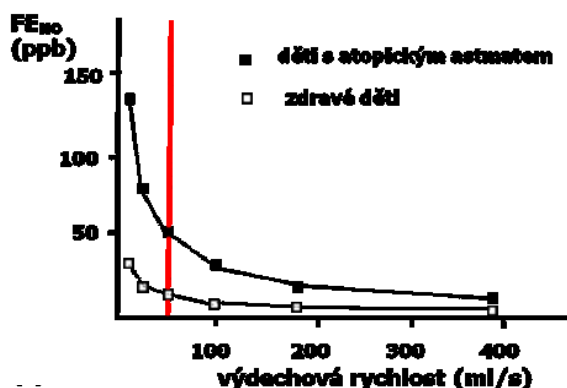
Obr. 1. Stručný přehled metabolismu a účinků NO v dýchacích cestách (podle Kim HB et al. Allergy Asthma Immunol Res. 2016) *Legenda: L-arginin je transportován do buňky membránovými přenašeči pro kationické aminokyseliny (CAT). Syntázy NO (NOS) jej přeměňují na L-citrulin a NO. Po vzestupu koncentrace Ca²⁺ v buňce se aktivují konstitutivní isoformy cNOS. Vzniklý NO rychle reaguje s nízkomolekulárními i vysokomolekulárními thioley (R-SH) za vzniku biologicky aktivních S-nitrosothiolů (R-SNO), které jsou schopny NO zase uvolnit. NO se váže na cytosolickou formu guanylát cyklasy (sGC) a enzym aktivuje. Důsledkem je zvýšená přeměna guanosintrifosfátu (GTP) na cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), důležitý mediátor zapojený do mnoha intracelulárních dějů (tzv. druhý posel). Prozánětlivé cytokiny IL-4, interferon-γ (IFN-γ) a tumory nekrotizující faktor alfa (TNF-α) aktivují transkripční faktory a zvyšují syntézu indukovatelné formy NOS (iNOS). Vysoké koncentrace NO tvořené iNOS působí dlouhou dobu a reagují např. se superoxidovými radikály (O₂⁻) a ionty přechodných kovů. Peroxodusitan a další reaktivní sloučeniny dusíku vytvářejí nitrační stres a poškozují biomolekuly nitrací. O společný substrát L-arginin kompetují s NOS arginázy I a II, které katalyzují vznik L-ornithinu, dále metabolizovaného na polyaminy a L-prolin, tj. molekuly podporující tvorbu kolagenu a tím fibrogenezi. [7].*

Tvorba a uvolňování NO nejsou ve všech anatomických oblastech dýchacích cest stejné. U astmatiků je diagnosticky přínosné vyšetření koncentrace NO z dolních dýchacích cest ve vzduchu vydechovaném ústy (FENO). V praxi již delší dobu používaná metoda měření FENO při výdechové rychlosti 50 ml/s kvantifikuje především NO vytvořený v bronchiální stěně a uvolněný do lumen bronchu [8]. Celková koncentrace FENO ve vydechovaném vzduchu z dolních dýchacích cest je ale součtem alveolární koncentrace NO a koncentrace určené bronchiálním zdrojem NO. První je nezávislá na výdechové rychlosti, zatímco druhá s rostoucí výdechovou

rychlostí klesá. Stěna bronchů, především epitel bronchiálního stromu, obsahuje vysoké koncentrace NO (C_{awNO}). Jde řádově o stovky ppb (parts per bilion). NO difunduje radiálně mezi stěnou a lumen bronchu a převažující směr pohybu je ve směru koncentračního gradientu, tj. ze stěny do lumen. Alveolární koncentrace NO (C_{ANO}) je nízká z důvodu: 1/nízké rychlosti tvorby NO v alveolech, 2/ rychlého prostupu NO alveolokapilární membránou a 3/ jeho následné degradace metabolickými ději v krvi.

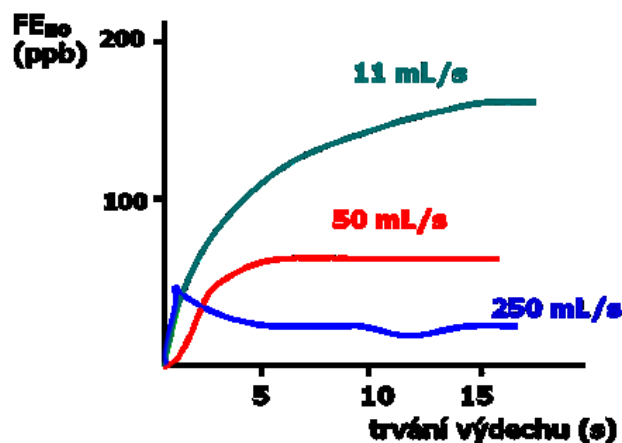
Měřením FENO při více výdechových rychlostech se poměr NO z velkých a malých dýchacích cest mění. S klesající výdechovou rychlostí se více uplatňují průdušky jako zdroj NO. Naopak při stoupající výdechové rychlosti klesá relativní podíl bronchiálního příspěvku na vydechovaném množství NO a FENO se více blíží nízké koncentraci v alveolech (obrázek 2 a 3). Rozsah běžně užívaných výdechových rychlostí se pohybuje mezi 30-300ml/s [9].

křivka FE_{NO} -výdechová rychlost



Obrázek 2: Exponenciální závislost - křivka koncentrace FENO na výdechové rychlosti. Děti s atopickým astmatem vydechují vyšší koncentrace FENO než zdravé děti. Červená linie ukazuje výsledky při výdechové rychlosti 50 ml/s.

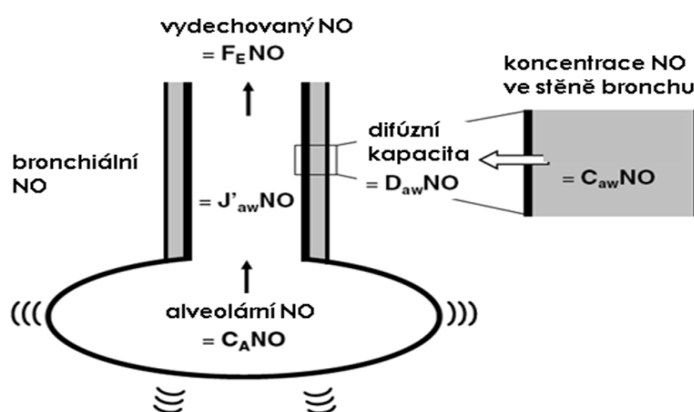
křivka FE_{NO} -čas



Obrázek 3: Závislost koncentrace FENO na čase po zahájení výdechu konstantní rychlostí. Ustálení koncentrace FENO vyžaduje při klesající výdechové rychlosti stále delší časový interval.

3.3. Matematický model dýchacích cest

Nejjednodušší model, který kvantitativně vystihuje přestup NO do vydechaného vzduchu je dvoukompartmentový model, který plicce a dolní dýchací cesty pojímá jako dva prostory, tzv. kompartmenty, ve kterých dochází k pohybu NO prouděním a difúzí (obrázek 4) [3]. Tento model je dnes akceptován jako přijatelné zjednodušení složitých procesů v dolních dýchacích cestách.



Obrázek 4: Dvoukompartmentový model zdrojů NO v dýchacích cestách a přestupu NO do vydechaného vzduchu. Vysvětlení symbolů v textu.

Z dvoukompartmentového modelu vyplývá, že závislost ustálené koncentrace NO ve vydechaném vzduchu při výdechu konstantní rychlostí na hodnotě výdechové rychlosti je exponenciální a vystupují v ní 3 na výdechové rychlosti nezávislé parametry:

$$FENO = C_{aw}NO + (C_A NO - C_{aw}NO) \times e^{-\left(\frac{D_{aw}NO}{V_E \cdot \dot{V}_E}\right)} \quad (1)$$

kde e je základ přirozeného logaritmu, $D_{aw}NO$ difúzní kapacita bronchiální stěny pro radiální difúzi NO, $C_A NO$ alveolární koncentrace NO a $C_{aw}NO$ koncentrace NO ve stěně bronchů.

Koncentrace $C_A NO$ a $C_{aw}NO$ a difúzní kapacita bronchiální stěny $D_{aw}NO$ jsou na výdechové rychlosti nezávislé veličiny, které ve vztahu vystupují jako na výdechové rychlosti nezávislé parametry dvoukompartmetového modelu, určující výslednou koncentraci FENO při každé z výdechových rychlostí. Alternativně lze ve vztahu (1) použít veličinu maximální bronchiální tok NO:

$$J'_{aw}NO = C_{aw}NO \times D_{aw}NO$$

$$FENO = J'_{awNO} / D_{awNO} + (C_{ANO} - J'_{awNO} / D_{awNO}) \times e^{-(D_{awNO} / \dot{V}_E)}$$

3.4. Metody výpočtu parametrů přestupu NO do vydechaného vzduchu vycházející z dvoukompartimentového modelu

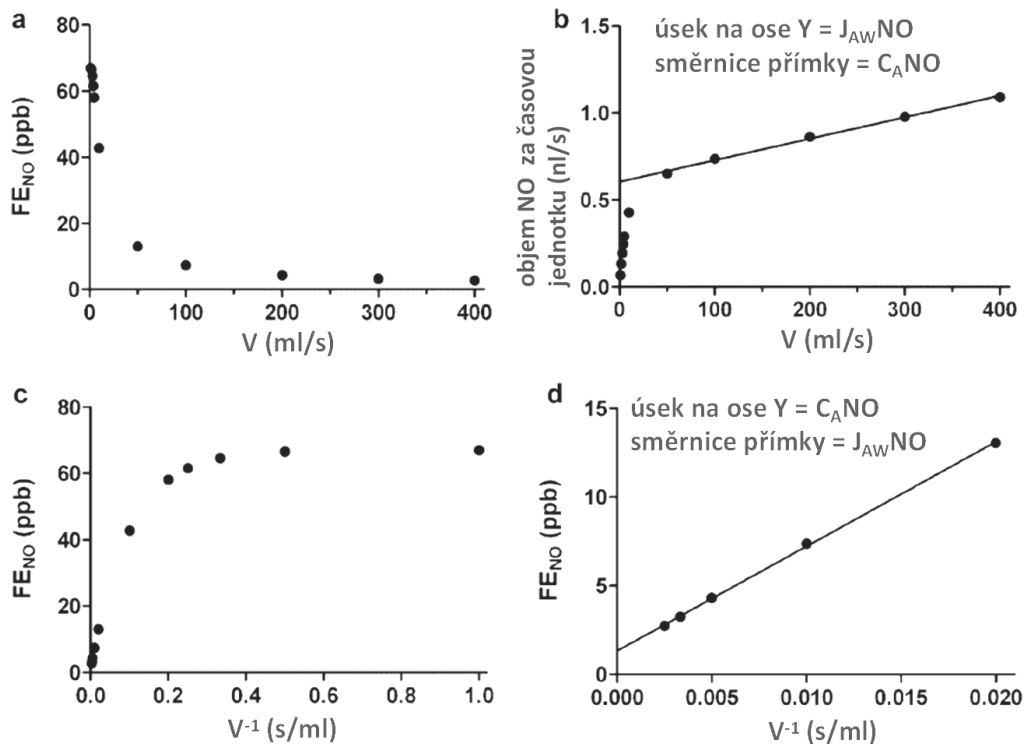
Z rovnice (1) a experimentálně získaných závislostí FENO-výdechová rychlost dovolují metody matematické analýzy vypočítat na výdechové rychlosti nezávislé parametry dvoukompartimentového modelu. Jedná se o tzv. fitování parametrů modelu, tj. hledání takových jejich hodnot, aby závislost (1) co nejlépe vystihovala naměřené koncentrace FENO při všech použitých výdechových rychlostech. Jinými slovy, aby byla dosažena co nejlepší shoda mezi naměřenými koncentracemi FENO a koncentracemi vypočítanými z rovnice (1) po dosazení odhadnutých parametrů.

Oblíbené matematické metody podle Pietropaoliho (metoda P) a metoda podle Tsoukias (metoda T) využívají lineární regresní analýzu [10, 11]. O princip lineární závislosti FENO na reciproké hodnotě výdechové rychlosti se opírá Pietropaoliho metoda. (metoda P, obrázek 5c, d):

$$FENO = C_{ANO} + J'_{awNO} \times (1/\dot{V}_E). \quad (3)$$

Tsoukias se svými kolegy využili vztah mezi množstvím NO vydechnutým za časovou jednotku a výdechovou rychlostí (metoda T, obrázek 5a, b):

$$FENO \times \dot{V}_E = C_{ANO} \times \dot{V}_E + J'_{awNO} \quad (4)$$



Obrázek 5. Nelineární vztah mezi FENO a výdechovou rychlostí V (a), a mezi FENO a převrácenou hodnotou výdechové rychlosti (c) Odhad bronchiálního toku NO ($J_{aw}NO$) a alveolární koncentrace $C_{A}NO$ pomocí lineární regresní analýzy v lineárních oblastech závislosti metodami podle Tsoukiase (b) a Pietropaolliho (d). *Data byla simulována s využitím rovnic dvoukompartmentového modelu a hodnot $C_{A}NO$ 1,1ppb, $J_{aw}NO$ 67ppb a $D_{aw}NO$ 10 pl/s/ppb.*

Högmanová et al navrhli robustní metodu odhadu na výdechové rychlosti nezávislých parametrů přestupu NO do vydechovaného vzduchu s využitím vyšetření FENO při třech rychlostech (10, 100 a 300 ml/s) a iteračního algoritmu s kontrolou kvality výsledků měření FENO [12]. Tato metoda je součástí softwarového vybavení chemiluminiscenčního analyzátoru CLD88sp (Ecomedics, Duernten, Švýcarsko). Parametry $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ jsou nejdříve získány metodou T. Následně jsou použity jako počáteční odhady v dalším výpočetním kroku spočívajícím na iteračním algoritmu, který exponenciální člen ve vztahu (1) nahrazuje polynomem 3. řádu. Metoda dovoluje kromě $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ vypočítat další parametry dvoukompartmentového modelu - koncentraci NO ve stěně bronchů ($C_{aw}NO$) a difuzní kapacitu bronchiální stěny pro NO ($D_{aw}NO$).

3.5. Možný přínos vyšetřování bronchiálního a alveolárního NO

Měření FENO při více výdechových rychlostech je v současné době v centru zájmu výzkumu v oblasti vztahu NO a zánětu v dýchacích cestách. Určení dominantního místa zánětu (centrální vs. periferní dýchací cesty) by mohlo hrát důležitou roli v cílené protizánětlivé terapii i predikci stavu nemocného.

4. Cíle disertační práce

1. A/ ve vzorku populace školních dětí a dospívajících porovnat výsledky vyšetření alveolární koncentrace NO ($C_{A}NO$) a bronchiálního toku NO ($J_{aw}NO$), získané analýzou závislosti FENO na výdechové rychlosti s použitím dvoukompartmentového modelu lineární regresní analýzou metodami podle Pietropaolliho (metoda P) a Tsoukiase (metoda T),
B/ zjistit, jak rozmezí výdechových rychlostí, použitých při měření FENO, ovlivňuje hodnoty $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$,
C/ vybrat z výdechových rychlostí 50, 100, 150, 200 až 250 ml/s, které nabízí analyzátor CLD88sp (Ecomedics, Švýcarsko), pro analýzu lineární regrese nejvyšší

možný počet rychlostí a jejich vhodnou kombinaci zaručující přijatelnou přesnost výsledku,

2. zjistit, zda optimální rozmezí výdechových rychlostí pro odhad C_{ANO} a J_{awNO} je stejné nebo jiné u nemocných s alergickým astmatem (AA) a alergickou rýmou (AR). Posoudit, jaký má vliv rozmezí výdechových rychlostí na rozdíly v hodnotách C_{ANO} a J_{awNO} mezi skupinami nemocných s AA a AR
3. ověřit, zda v rozmezí výdechových rychlostí dostupných na analyzátoru NO (30 až 250 ml/s) je ve vyšetřovaném souboru možné získat přesný odhad parametrů NO nelineární regresní analýzou
4. algoritmem podle Högmanové et al [23] vypočítat koncentraci NO ve stěně bronchu (C_{awNO}) a difúzní kapacitu bronchiální stěny pro NO (D_{awNO}) a porovnat výsledky mezi skupinami nemocných s průduškových astmatem (v závislosti na kontrole nad onemocněním), alergickou rýmou a zdravých dětí a mladistvých.

5. Materiál a metodika

5.1. Studie č.1: Analýza závislosti FENO na výdechové rychlosti

Soubor a metodika: 59 nemocných ve věku 8-18 let, skupina nemocných s lehkým až středně těžkým alergickým astmatem (AA) pod dobrou kontrolou podle kritérií GINA a/nebo o nemocné s alergickou rýmou (AR). AR byla přítomna u 79% nemocných ve skupině AA. 20 nemocných mělo pouze diagnózu AR. Tito nemocní astma neměli vůbec (n=14), nebo bylo astma v remisi, bez medikace (n=6). Charakteristika souboru viz tabulka 1.

Tabulka 1: Charakteristiky účastníků studie

charakteristika		
počet	n	78
věk, průměr (rozsah)	[roky]	13,2 (8,0-17,8)
pohlaví (mužské/ženské)	n/n	42/36
tělesná výška, průměr (SD)	[cm]	156 (15)
tělesná hmotnost, průměr (SD)	[kg]	51,3 (16,8)
atopie	n (%)	59 (75,6 %)
astma	n (%)	53 (67,9 %)
alergická rýma	n (%)	52 (65,8 %)
sezónní		36 (46,2 %)
celoroční		25 (32,1 %)
FEV ₁ , průměr (SD)	[% náležité hodnoty]	103 (15,3)
inhalační kortikosteroidy ^a	n (%)	39 (50,0 %)
nazální kortikosteroidy	n (%)	30 (38,5 %)
H ₁ -antihistaminika p.o.	n (%)	39 (50,0 %)

^a...IKS bylo léčeno 74% astmatiků (39 z 53), u 26% se jednalo o remisi onemocnění

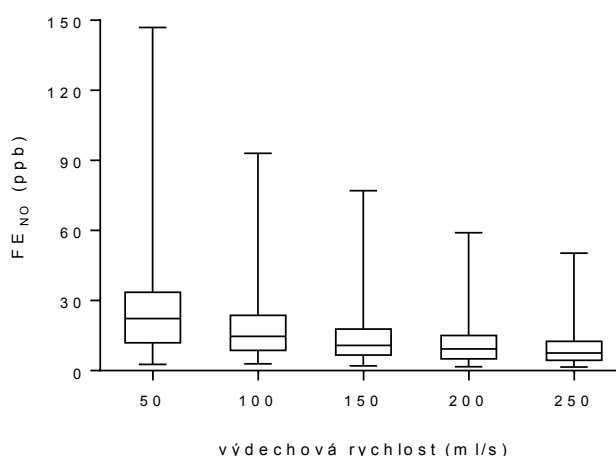
Studie byla schválena Etickou komisí Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Informovaný souhlas byl získán od všech rodičů a navíc od dětí starších 12 let. Jednalo se o nemocné s atopií, lehkým až středně těžkým průduškovým a/nebo o nemocné s alergickou rýmou. Před provedením studijního měření byli všichni nemocní lékařem dotázáni na symptomy astmatu, alergické potíže a dodržování předepsané medikace od poslední návštěvy. Všechny subjekty podstoupily měření při více výdechových rychlostech. Pro každou výdechovou rychlost byla provedena dvě samostatná měření. V odstupe minimálně 15 minut od měření FENO byla provedena spirometrie a kožní prick testy.

K vyšetření FENO byl použit chemiluminiscenční analyzátor CLD88sp (Ecomedics, Duernten, Švýcarsko). Vyšetřované osoby podstoupily dvě měření při každé z pěti výdechových rychlostí (50, 100, 150, 200 a 250 ml/s). Byla provedena 2 měření pro každou rychlost, v případě rozdílu hodnot nad 15% bylo provedeno 3. měření. Odhad $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ byl proveden výpočtem metodami P a T popsanými výše. Atopie byla hodnocena reakcí na 12 běžných inhalovaných alergenů, vyšetření bylo provedeno soupravou Alyostal (Stallergènes, Paris, France). Spirometrie byla provedena podle standardů Americké hrudní společnosti spirometrem Masterscreen (Jaeger, Hochberg, Gemany). Děti s astmatem vyplnily standardizovaný dotazník „Test kontroly nad astmatem“ (ATC, škála 0-25) s následným vyhodnocením podle kritérií GINA [13].

Výsledky:

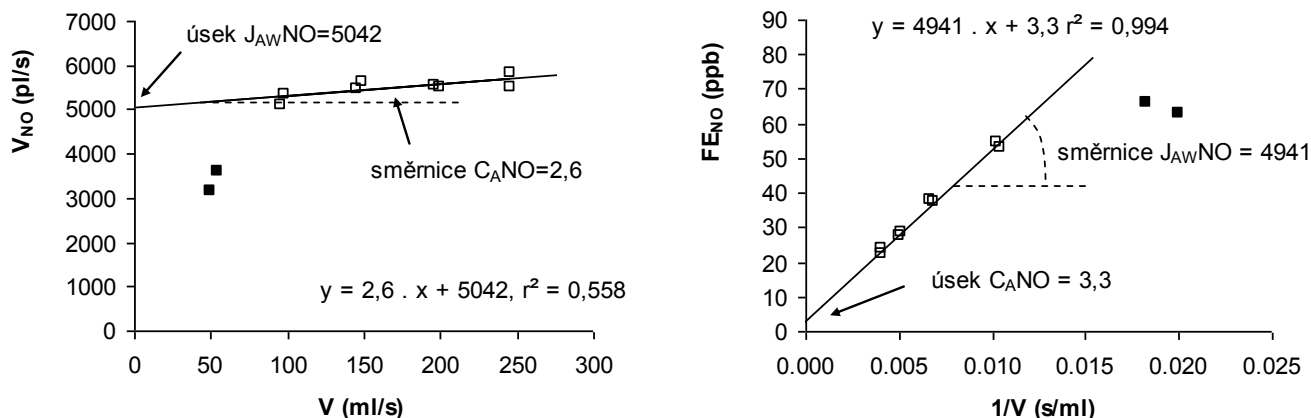
1. Porovnání vyšetření alveolární koncentrace NO ($C_{A}NO$) a bronchiálního toku NO ($J_{aw}NO$) metodami podle Pietropaoliho (metoda P) a Tsoukiase (metoda T), určení optimálního rozmezí výdechových koncentrací a jejich minimálního potřebného počtu.

Vliv výdechové rychlosti na hodnoty FENO technikou jednoho výdechu při výdechových rychlostech 50, 100, 150, 200 a 250 ml/s jsou demonstruje obrázek 6.



Obrázek 6: Koncentrace FENO vyšetřené při výdechových rychlostech 50, 100, 150, 200 a 250 ml/s. Krabicové grafy ukazují mediány, 25. až 75. percentily a rozsahy hodnot FENO. *Vliv výdechové rychlosti byl statisticky velmi významný ($P < 0,0001$, Friedmanův test).*

Dvě ustálené hodnoty FENO získané měřením při každé z pěti výdechových rychlostí (50, 100, 150, 200 a 250 ml/s) byly vyneseny do grafu proti hodnotě výdechové rychlosti. Byla provedena kalkulace jednoduché lineární regrese. Rychlost průtoku byla postupně zvyšována 50-100-150-200-250 ml/s a opakována kalkulace. Srovnávané metody odhadu parametrů $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ lineární regresní analýzou ukazuje obrázek 7. U obou metod (P i T) byla nalezena závislost výsledku vyšetření $C_{A}NO$ na rozmezí výdechových rychlostí. Vyšším hodnotám výdechových rychlostí odpovídala nižší koncentrace $C_{A}NO$ (obrázek 7). Jedná se o důsledek nelinearity závislosti FENO na $1/V$ (metoda P) a FE na výdechové rychlosti (metoda T). Silnou závislost $C_{A}NO$ na rozmezí výdechových rychlostí potvrzuje také skutečnost, že medián $C_{A}NO$ byl třikrát vyšší při použití rychlostí v rozmezí 50 až 100 ml/s než v rozmezí 150 až 250 ml/s ($P < 0,001$, Wilcoxonův test). Také posun spodní hranice z hodnoty 50 ml/s až na hodnotu 150 ml/s při zachování horní hranice 250 ml/s vedl ke statisticky významnému poklesu mediánu $C_{A}NO$ ($P < 0,0001$, Friedmanův test). Při analýze výsledků měření při rychlostech 150, 200 a 250 ml/s se hodnoty $C_{A}NO$ získané metodami P a T nelišily, ale shodně je charakterizovala nepřijatelně vysoká standardní chyba odhadu ($> 40\%$). Za nejlepší lze považovat čtyři rychlosti v intervalu 100-250 ml/s, i když nepřesnost odhadu zůstává nadále vysoká (medián standardní chyby odhadu $C_{A}NO$ pod 27%). V tomto rozmezí výdechových rychlostí poskytla metoda P o 15% vyšší koncentrace $C_{A}NO$ než metoda T ($P < 0,0001$, Wilcoxonův test).



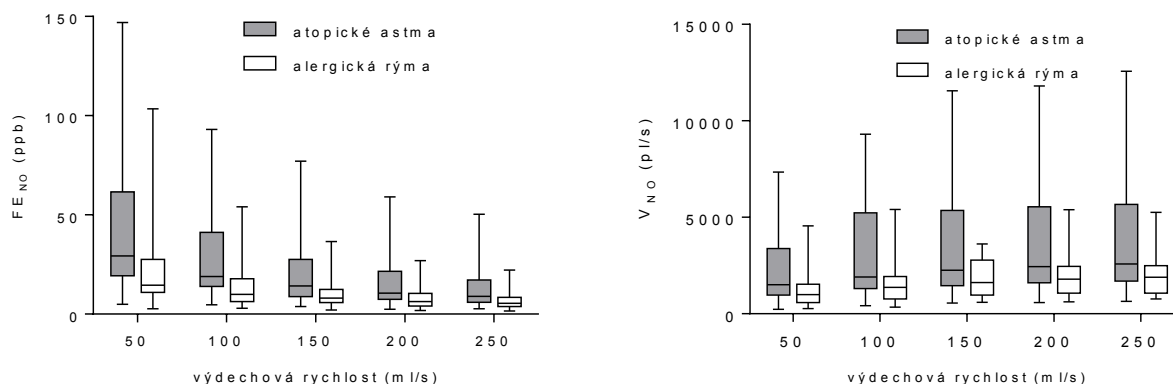
Obrázek 7: Ukázkové výsledky odhadu parametrů přestupu NO do vydechovaného C_{ANO} a J_{AWNO} lineární regresní analýzou metodami podle Pietropaoliho (metoda P) a Tsoukiase (metoda T). Prázdné čtverečky znázorňují hodnoty spadající do lineární oblasti výdechových rychlostí. Hodnoty získané při rychlosti 50 ml/s (plné čtverečky) jsou mimo lineární oblast.

Ve srovnání s parametrem C_{ANO} byla nepřesnost odhadu J_{awNO} výrazně nižší (10%). I u tohoto parametru byl ale pozorován podobný nárůst mediánu při vyšetření provedeném ve vyšším rozmezí výdechových rychlostí. Při použití 4 rychlostí v rozmezí 100 až 250 ml/s poskytla metoda P o 9% nižší výsledky než metoda T ($P < 0,0001$, Wilcoxonův test). Také v případě parametru J_{awNO} je možné na základě výsledků studie doporučit zjednodušení vyšetření na dvě opakovaná měření při každé ze dvou výdechových rychlostí 100 a 250 ml/s. Metody P a T poskytují při zjednodušeném postupu stejné hodnoty J_{awNO} , ale nepřesnost odhadu je nižší u metody P (7,6%) než u metody T (9,3%).

2. Porovnání optimálních rozmezí výdechových rychlostí pro vyšetření C_{ANO} a J_{awNO} u nemocných s alergickým atmatem (AA) a alergickou rýmou (AR).

Všichni astmatici užívali nízké až střední dávky IKS v monoterapii ($n = 17$), nebo ve fixní kombinaci s dlouhodobě působícím β_2 agonistou ($n=25$). Průměr \pm SE denní dávky IKS byl 251 ± 122 μ g budesonidu, nebo ekvivalentní dávka jiného steroidu. V době vyšetření bylo astma pod dobrou kontrolou u všech nemocných, kromě tří pacientů, kteří vyžadovali vyšší dávku IKS. Průměrná hodnota FEV_1 byla lehce snižena ($p = 0,070$) a $FENO_{50}$ bylo vyšší ($P = 0,075$) u astmatiků ve srovnání s pacienty s AR.

Podle výsledků analýzy rozptylu pro opakovaná měření, provedené po logaritmické transformaci, byly hodnoty FENO i V_{NO} vysoce závislé na výdechové rychlosti ($P < 0,0001$). Při žádné výdechové rychlosti nebyl nalezen významný rozdíl v hodnotě FENO nebo V_{NO} mezi skupinami nemocných s AA a AR (obrázek 8).



Obrázek 8: Vliv výdechové rychlosti na frakci oxidu dusnatého ve vydechaném vzduchu FENO (nahore) a na množství vydechnutého NO za časovou jednotku (V_{NO}) (dole) u dětí s atopickým astmatem a alergickou rýmou.

Posun spodní hranice rozmezí pro výdechové rychlosti směrem k vyšším rychlostem (tj. 50 → 100 → 150 ml/min) se projevilo postupným snižováním C_{ANO} a zvyšováním J_{awNO} (tabulka 2). Vliv změny rozmezí výdechových rychlostí byl vyšší u astmatiků než u pacientů s AR. Medián C_{ANO} ve skupině AA, zjištěný při třech nejvyšších výdechových rychlostech, byl o 67% nižší (metoda P) a o 60% nižší (metoda T) ve srovnání s mediánem C_{ANO} vypočítaným při použití všech pěti výdechových rychlostí. Ve skupině AR činil rozdíl 40% (metoda P) a 28% (metoda T). Naopak měření při 3 nejvyšších rychlostech výdechu poskytlo (shodně pro metody P a T) medián J_{awNO} o 50% vyšší ve skupině AA a pouze o 17% ve skupině AR ve srovnání s výsledky měření v rozsahu 50-250 ml/s. Shodně pro metodu P i T byla nejistota odhadu vyšší pro C_{ANO} než J_{awNO} .

Postupné zvyšování spodní hranice výdechových rychlostí vedlo k paralelnímu zvýšení standardní chyby odhadu. Tento jev byl nápadnější u C_{ANO} (2,9-násobné zvýšení) než v případě J_{awNO} (1,7-násobné zvýšení) (tabulka 3).

Tabulka 2: Vliv rozmezí výdechových rychlostí a jejich počtu na výsledky odhadu alveolární koncentrace NO ($C_{A}NO$) a bronchiálního toku ($J_{aw}NO$) NO u dětí s atopickým astma a alergickou rýmou. Aplikace lineární regrese metodami P a T.

metoda	výdechové rychlosti		atopické astma (n=42)		alergická rýma (n=20)	
	rozmezí (ml/s)	n	$C_{A}NO$ (ppb)	$J_{aw}NO$ (pL/s)	$C_{A}NO$ (ppb)	$J_{aw}NO$ (pL/s)
P1	50-250	5	5.5 (2.9-11)	1170 (655-2260)	4.0 (2.7-5.5)	1000 (600-1270)
P2	100-250	4	3.2 (1.9-5.5) ^{P1}	1610 (990-3260) ^{P1}	3.0 (2.2-4.4)	1022 (681-1570)
P3	150-250	3	1.8 (0.8-4.3) ^{P1, P2}	1800 (962-3380) ^{P1, P2}	2.4 (0.8-3.9) ^{P1}	1175 (825-1962) ^{P1}
$P^{\#}$			< 0.0001	< 0.0001	< 0.005	< 0.01
T1	50-250	5	4.3 (2.2-8.3)	1310 (758-2590)	3.2 (2.6-4.3)	1010 (551-1390)
T2	100-250	4	2.7 (1.6-5.1) ^{T1}	1580 (998-3340) ^{T1}	3.0 (2.1-3.9)	1070 (604-1620)
T3	150-250	3	1.7 (0.9-3.9) ^{T1, T2}	1800 (950-3560) ^{T1, T2}	2.3 (0.8-3.7) ^{T1}	1180 (639-1950) ^{T1}
$P^{\#}$			< 0.0001	< 0.0001	< 0.01	< 0.01

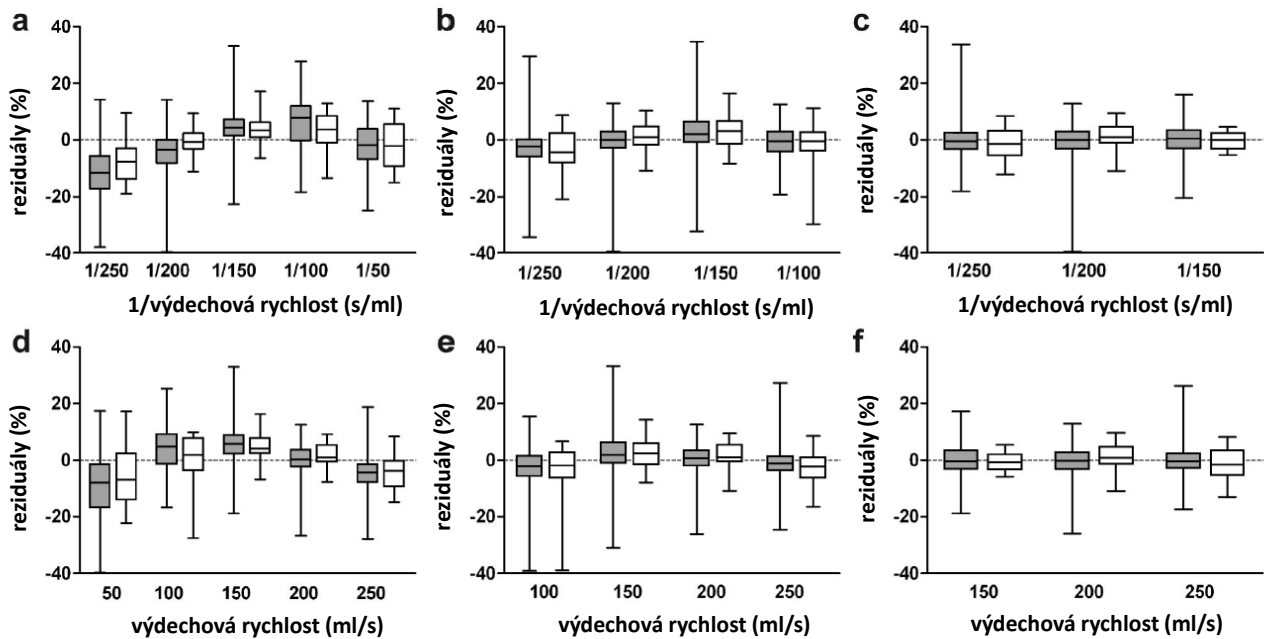
Data jsou uvedena jako medián (interkvartilové rozpětí), n: počet výdechových rychlostí, ^{P1}, ^{P2}, ^{T1}, ^{T2}: označení skupin, výsledky kterých se významně lišily ($p < 0,05$, testem dle Dunnové), [#]P: hodnota Friedmanova testu hodnotícího vliv výdechové rychlosti.

Tabulka 3: Vliv rozmezí výdechových rychlostí a jejich počtu na standardní chybu (SE) odhadu alveolární koncentrace NO ($C_{A}NO$) a) a bronchiálního toku ($J_{aw}NO$) u dětí s atopickým astmatem a alergickou rýmou.

metoda	výdechové rychlosti		atopické astma (n=42)		
	rozmezí (ml/s)	n	r	$C_{A}NO$ SE (%)	$J_{aw}NO$ SE (%)
P1	50-250	5	0.98 (0.95-0.99)	18 (13-26)	7.8 (4.7-12)
P2	100-250	4	0.98 (0.96-0.99)	27 (17-39) ^{P1}	7.2 (5.3-13)
P3	150-250	3	0.97 (0.94-0.99)	52 (30-112) ^{P1, P2}	13 (7.4-19) ^{P1, P2}
$P^{\#}$			< 0.01	< 0.0001	< 0.0001
T1	50-250	5	0.91 (0.86-0.94)	19 (14-28)	9.7 (7.4-13)
T2	100-250	4	0.89 (0.84-0.93)	26 (18-56) ^{T1}	7.7 (6.0-16)
T3	150-250	3	0.84 (0.80-0.91)	52 (31-100) ^{T1, T2}	13 (7.5-24) ^{T1, T2}
$P^{\#}$			< 0.0001	< 0.0001	< 0.001

metoda	výdechové rychlosti		alergická rýma (n=20)		
	rozmezí (ml/s)	n	r	$C_{alv}NO$ SE (%)	$J_{aw}NO$ SE (%)
P1	50-250	5	0.98 (0.97-0.99)	18 (11-24)	6.9 (5.0-8.1)
P2	100-250	4	0.98 (0.96-0.99)	17 (14-42)	8.2 (5.1-12) ^{P1}
P3	150-250	3	0.97 (0.92-0.99)	33 (26-55) ^{P1, P2}	12 (7.5-26) ^{P1}
$P^{\#}$			0.06	< 0.0001	< 0.001
T1	50-250	5	0.94 (0.89-0.96)	14 (11-25)	9.0 (6.4-12)
T2	100-250	4	0.91 (0.89-0.95)	20 (14-39) ^{T1}	12 (5.6-16)
T3	150-250	3	0.88 (0.83-0.92)	35 (26-63) ^{T1, T2}	14 (7.8-30) ^{P1}
$P^{\#}$			< 0.005	< 0.0001	< 0.005

Data jsou uvedena jako medián (interkvartilové rozpětí). n : počet výdechových rychlostí; r : Pearsonův korelační koeficient; SE : směrodatná odchylka odhadu. P^1, P^2, T^1, T^2 : označení skupin, výsledky kterých se významně lišily ($p < 0,05$, testem dle Dunnové), $^{\#}P$: hodnota Friedmanova testu hodnotícího vliv výdechové rychlosti.

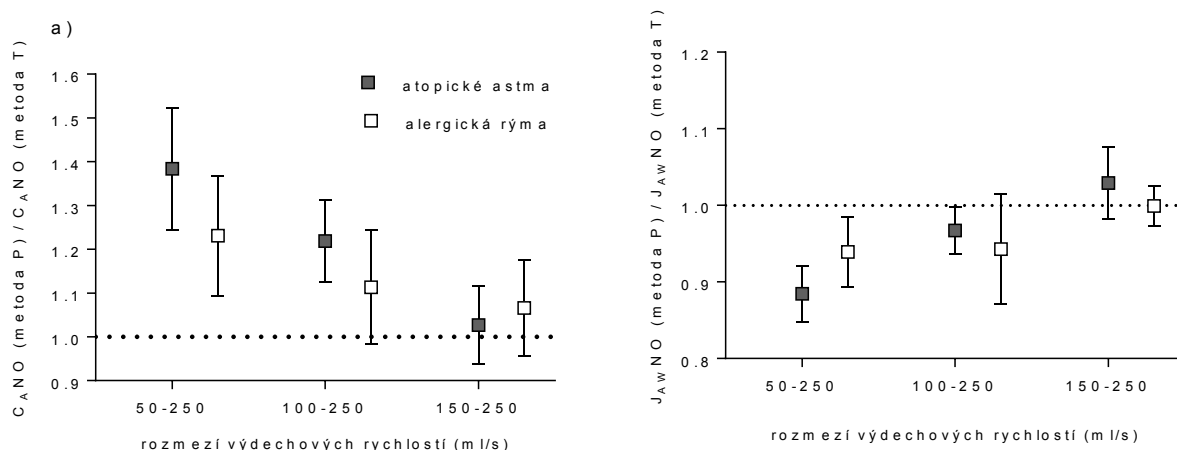


Obrázek 9: Srovnání procentuálních rozdílů mezi naměřenými hodnotami FENO(a-c) a hodnotami predikovanými podle lineárního regresního modelu P (d-f), a mezi naměřenými hodnotami \dot{V}_E a predikovanými hodnotami podle modelu T ve třech různých výdechových rychlostech. V grafech (a - e) jsou zobrazeny procentuální rozdíly v závislosti na rychlosti výdechu vykazující šikmé rozložení, v souladu s výsledky Friedmanova testu, hodnoty rozděleně pro pacienty s atopickým astma (tmavé čtverce, $P \leq 0,0001$) a alergickou rýmou (prázdné čtverce, $P \leq 0,002$). Při zvýšení nejnižší výdechové rychlosti na 150 ml/s (c, f) se difference mezi procentuálními rozdíly staly nevýznamné jak u astmatiků ($P 0,85$), tak i u AR ($P 0,12$).

Pro účely srovnání obou metod byly vypočteny poměry (P/T) hodnot C_{ANO} a J_{awNO} získaných metodami P a T pro použitá rozmezí výdechových rychlostí (obrázek 9). Stejně jako rozdíly hodnot odhadů (P-T) i poměry hodnot (P/T) vykazovaly normální, nebo téměř normální rozdělení bez vztahu k absolutním hodnotám proměnných. V rozmezí od 50 do 250 ml/s, průměr poměrů hodnot P/T pro C_{ANO} byl signifikantně vyšší než jedna, což naznačuje, že metoda P poskytovala vyšší odhady C_{ANO} o 38% u astmatiků ($P < 0,001$) a o 23% u pacientů s AR ($p < 0,005$). Tento rozdíl však vymizel po zvýšení nejnižší výdechové rychlosti na 150 ml/s, a to jak

ve skupině AA, tak i u pacientů ve skupině AR. V intervalu výdechových rychlostí 150 až 250 ml/s byly odhady C_{ANO} získané metodami P a T srovnatelné (obrázek 9). Poměry (P/T) hodnot C_{ANO} v tomto rozmezí výdechových rychlostí se blížily jedné: 1,03 (0,49-1,56) u astmatiků a 1,07 (0,55 - 1,59) u pacientů s AR.

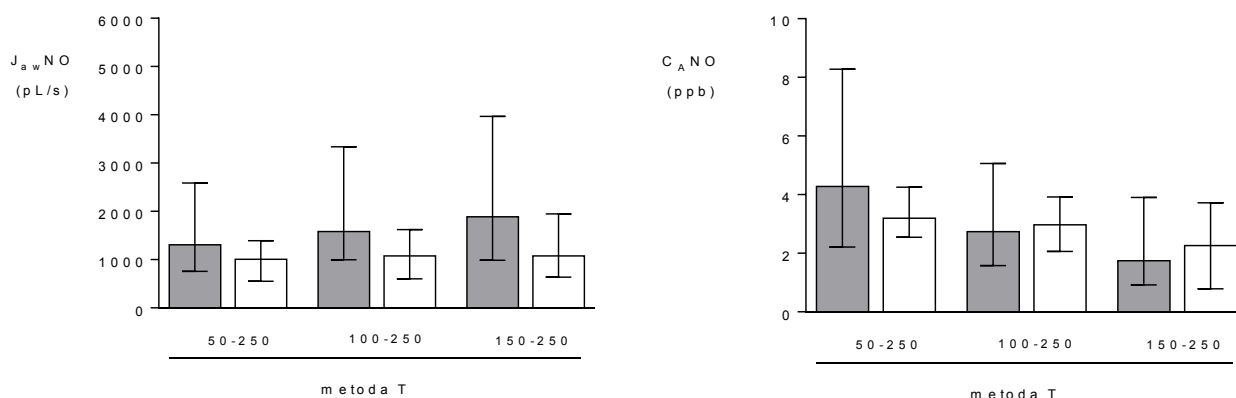
Při použití výdechových rychlostí od 50 do 250 ml/s byl poměr (P/T) hodnot J_{awNO} ve skupině astmatiků podstatně nižší než ve skupině AR (obrázek 16). V průměru byly odhady J_{awNO} metodou P o 12% nižší než odhady metodou T ($p < 0,001$), zatímco u nemocných s AR činil rozdíl mezi metodami jen 6%. Při vyšších výdechových rychlostech (rozmezí 150-250 ml/s) poskytly metody P a T srovnatelné hodnoty J_{awNO} (obrázek 10). Rozdíl hodnot J_{awNO} získaných metodami P a T u pacientů s AR v rozsahu 50-250 ml/min byl nižší než u astmatiků a posun spodní hranice rozmezí z 50 na 150 ml/s se projevil jen malým zlepšením srovnatelnosti výsledků. V intervalu nejvyšších výdechových rychlostí (150-250 ml/s) dosáhl poměr (P/T) hodnot J_{awNO} u astmatiků 1,03 (průměr, 95% interval spolehlivosti: 0,73 - 1,33). Ve skupině AR činil průměrný poměr 0,99 (95% interval spolehlivosti 0,90 - 1,10).



Obrázek 10: Aritmetické průměry a 95% interval spolehlivosti poměrů (P/T) odhadovaných hodnot (a) C_{ANO} a (b) J_{awNO} zjištěných metodami P a T ve třech intervalech výdechových rychlostí. *Analýza variability ukazuje významný vliv rozsahu výdechových rychlostí na poměry hodnot C_{ANO} astmatiků ($P < 0,001$) a pacienti alergické rinitidy ($P < 0,05$) a na poměr hodnot J_{awNO} u astmatiků ($p < 0,001$). U pacientů s alergickou rýmou, zúžení rozsahu výdechových rychlostí nemělo významný vliv na rozptyl poměrů hodnot J_{awNO} ($p = 0,19$).*

Bez ohledu na rozsah výdechových rychlostí při měření a zvolenou metodu odhadu C_{ANO} a J_{awNO} nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v hodnotách těchto ukazatelů mezi pacienty s astmatem a AR. Ve srovnávaných skupinách měl nicméně výběr rozsahu výdechových

rychlostí značný vliv na procentuální rozdíly v hodnotě mediánu sledovaných hodnot. Hodnota mediánu C_{ANO} ve skupině astmatiků zjištěná metodou P při pěti výdechových rychlostech (50-250 ml/s) byla vyšší o 34% ve srovnání se skupinou AR pacientů, zatímco hodnota mediánu C_{ANO} získaná ze třech nejvyšších výdechových rychlostí (150-200-250 ml/sec), se lišila o 26%. Rozdíl v hodnotě mediánu J_{awNO} , mezi skupinami AA a AR dosáhl 17% při pěti výdechových rychlostech, a dále se zvýšil na 53%, v případě odhadu hodnoty z třech výdechových rychlostí (150-200-250 ml/sec). Volba rozsahu výdechových rychlostí měla stejný vliv na rozdíly mezi sledovanými skupinami v hodnotě mediánu pro odhad C_{ANO} a hodnotu mediánu J_{awNO} získané metodou T (obrázek 11).



Obrázek 11: Vliv rozmezí výdechových rychlostí na výsledek srovnání hodnot J_{awNO} u nemocných s alergickým astmatem (tmavé sloupce) a alergickou rýmou (prázdné sloupce).

5.2. Studie č. 2: Odhad všech parametrů dvoukompartimentového modelu kombinací metod podle Tsoukiase (metoda T) a Högmanové

Soubor a metody: Vyšetřeny byly zdravé děti s atopií a bez atopie, děti s alergickou rýmou a děti s lehkým až středně těžkým průduškovým astmatem (tabulka 4). Při výdechových rychlostech 30, 50, 100, a 250 ml/s byly provedeny dva výdechy do přístroje. Parametry dvoukompartimentového modelu C_{ANO} a J_{awNO} byly získány lineární regresní metodou podle Tsoukiase (metoda T) s využitím duplicitního měření při rychlostech 100 ml/s a 250 ml/s. Hodnoty C_{awNO} a D_{awNO} vypočítal software chemiluminiscenčního analyzátoru metodou podle Högmanové et al [12]. Naše modifikace metody podle Högmanové spočívala v nahrazení nejnižší výdechové rychlosti 10 ml/s rychlostí 30 ml/s. Úprava byla motivována záměrem zkrátit trvání výdechu, protože ustálení koncentrace FENO je při nízkých výdechových rychlostech mnohem pomalejší. Vyžaduje v mnoha případech až 20-30 s, a to je zejména pro malé děti příliš dlouhý interval.

Tabulka 4: Charakteristiky souboru a údaje o farmakoterapii

	zdravé osoby		alergická rýma	atopické průduškové astma	
	bez atopie	s atopií		pod kontrolou	nedostatečná kontrola
N	16	11	46	63	28
pohlaví (m/ž)	7/9	5/6	28/18	42/21	16/12
věk (roky)	14,1 (8,8-18,1)	13,2 (9,4-17,9)	12,4 (6,6-18,2)	13,7 (8,5-18,8)	12,9 (5,7-18,7)
výška (cm)	157 (132-185)	159 (138-169)	152 (122-185)	157 (116-187)	158 (120-184)
hmotnost (kg)	51 (31-76)	64 (43-101)	46 (25-107)	53 (21-110)	53 (21-90)
FEV ₁ (% n.h.)	103 (85-121)	104 (85-121)	105 (83-128)	105 (82-137)	98 (57-132)
SPT (%)	0	100	100	100	100
ACT	-	-	-	23,9 (19-25)	19,7 (15-24)
IKS (%)	0	0	0	90,5	72,4
nKS (%)	0	0	37	54,0	72,4
H1AH (%)	0	0	83	71,4	75,9
SLIT (%)	0	0	22	6,3	3,4

ACT...test kontroly nad astmatem, SPT...kožní prick test, SLIT...sublinguální alergenová imunoterapie, IKS...inhalační kortikosteroidy, nKS...nosní kortikosteroidy. H1AH...H₁-antihistaminika per os

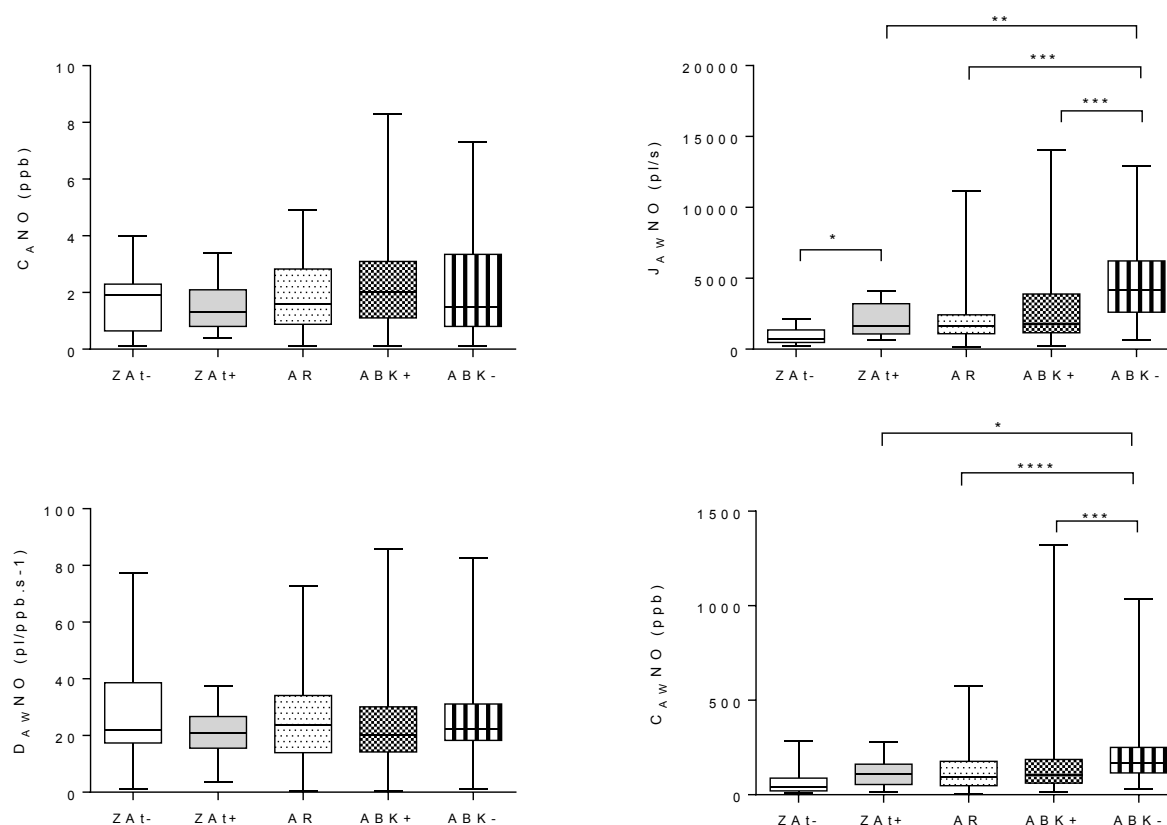
Výsledky:

1. U dětí s astmatem pod nedostatečnou kontrolou byly zjištěny vyšší hodnoty koncentrace FENO a parametrů J_{aw}NO a C_{aw}NO než ve skupinách nemocných s astmatem pod kontrolou, s alergickou rýmou a v kontrolním souboru zdravých dětí s atopií. Hodnoty parametrů C_ANO a D_{aw}NO byly ve všech skupinách srovnatelné. Statistický souhrn a porovnání hodnot FENO (50 ml/s), C_ANO, J_{aw}NO, D_{aw}NO a C_{aw}NO podrobně uvádí tabulka 5 a obrázek 12.

Tabulka 5: Výsledky vyšetření frakce NO ve vydechaném vzduchu (FENO₅₀) a parametrů dvoukompartimentového modelu u nemocných s AR a AA.

	zdravé osoby		alergická rýma	atopické průduškové astma		P [#]
	bez atopie	s atopií		pod kontrolou	nedostatečná kontrola	
N	16	11	46	63	28	
FENO ₅₀ (ppb)	11,3 (9,2-20,3)	24,3 (16,8-35,0)	22,5 (16,2-38)	32,7 (19,3-64,4)	66,5 (37,4-95,8)	< 0,001
J _{aw} NO (pl.s ⁻¹)	738 (467-2140)	1640 (1080-3210)	1620 (1090-2410)	1810 (1160-3890)	4170 (2610-6220)	< 0,001
C _A NO (ppb)	1,9 (0,65-2,3)	1,3 (0,80-2,1)	1,6 (0,88-2,8)	2,0 (1,1-3,1)	2,5 (0,80-3,4)	0,28
D _{aw} NO (pl/ppb.s ⁻¹)	21,8 (17,4-38,6)	20,9 (15,5-26,7)	23,9 (13,9-34,1)	20,3 (14,2-30,2)	22,4 (0,65-2,3)	0,95
C _{aw} NO (ppb)	40,5 (20,5-87,9)	110 (54,3-161)	93,2 (48,2-177)	107 (61,3-187)	166 (116-250)	< 0,001

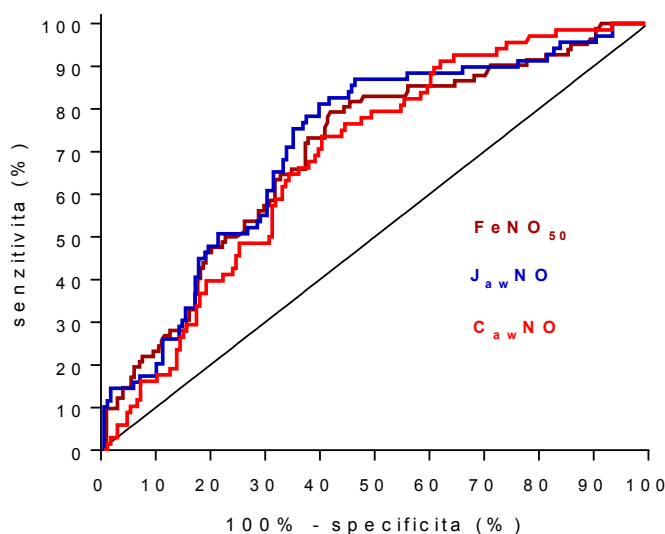
Tabulka uvádí mediány a rozmezí mezi 25. a 75. percentilem. Výsledky testování vlivu faktoru skupina analýzou rozptylu provedenou po logaritmické transformaci proměnných. P[#] ukazuje, mezi kterými skupinami byly nalezeny statisticky významné rozdíly Tukeyovým testem (p<0,05).



Obrázek 12: Srovnání parametrů přestupu NO do vydechovaného vzduchu u zdravých dětí a mladistvých bez atopie a s atopií a jejich vrstevníků s alergickými onemocněními dýchacích cest. *Symbols:* ZAt-...zdravé osoby bez atopie, ZAt+...zdravé osoby s atopií, AR...alergická rýma bez astmatu, ABK+...alergické astma bronchiální pod dobrou kontrolou, ABK-...alergické astma bronchiální pod nedostatečnou kontrolou, J_{aw}NO...bronchiální tok NO, C_ANO...alveolární koncentrace NO, D_{aw}NO...difúzní kapacita bronchiální stěny pro NO, C_{aw}NO koncentrace NO ve stěně bronchů Srovnání skupin: 1/ ZAt- vs. ZAt+ a 2/ všechny skupiny s atopií mezi sebou (ZAt+, AR, ABK, ABK-).

2. Diagnostický přínos FENO a parametrů přestupu NO do vydechovaného vzduchu pro odlišení dobré a nedostatečné kontroly nad astmatem

Hodnoty parametrů $J_{aw}NO$ a $C_{aw}NO$ se významně lišily ve skupinách astmatiků s dobrou a nedostatečnou kontrolou nad astmatem (obrázek 12). Schopnost studovaných veličin plnit úlohu diagnostického testu pro hodnocení úrovně kontroly nad astmatem, tj. odlišit nemocné s dobrou a nedostatečnou kontrolou nad astmatem) byla dále zhodnocena ROC analýzou. Plochy ROC byly u parametrů $FENO_{50}$, $J_{aw}NO$ a $C_{aw}NO$ srovnatelné a jejich hodnoty, blíží se 0,70, je možné označit za hraniční pro klinickou použitelnost testu (obrázek 13, tabulka 6). Senzitivitu, specificitu a relativní pravděpodobnost pro vybrané hraniční hodnoty parametrů uvádí tabulka 1



Obrázek 13: ROC křivky pro parametry $FENO_{50}$, $J_{aw}NO$, $C_{aw}NO$

Tabulka 6: Plochy pod ROC křivkou pro parametry $FENO_{50}$, $J_{aw}NO$, $C_{aw}NO$.

	AUC	standardní chyba	95% interval spolehlivosti	P-hodnota ^a
$FENO_{50}$	0,698	0,0340	0,631-0,764	<0,0001
$J_{aw}NO$	0,713	0,0362	0,642-0,784	<0,0001
$C_{aw}NO$	0,682	0,0359	0,612-0,753	<0,0001

a...výsledek testování nulové hypotézy, že skutečná hodnota AUC je 0,5, tj., že skutečná diagnostická hodnota testu je stejná jako házení mincí.

Tabulka 7: Diagnostický přínos parametrů FENO₅₀, J_{aw}NO, C_{aw}NO pro odlišení nemocných s nedostatečnou a dobrou kontrolou nad astmatem

	hranice	senzitivita (%)	specifická (%)	poměr pravděpodobností
FENO ₅₀	35 ppb	79,3	56,6	1,83
J _{aw} NO	2500 pL/s	78,3	64,9	2,15
C _{aw} NO	117 ppb	75,0	56	1,71

6. Závěry k vytyčeným cílům disertační práce

Cíl 1A/ Dvě základní metody výpočtu na výdechové rychlosti nezávislých parametrů přestupu NO do vydechovaného vzduchu- alveolární koncentrace NO (C_ANO) a bronchiálního toku NO (J_{aw}NO) - podle Tsoukiase a Pietropaoliho vycházejí z dvoukompartmentového modelu dýchacích cest a opírají se o lineární regresní analýzu. Metody poskytují správné a srovnatelné výsledky pouze při splnění podmínky, že je vyšetření provedeno v rozmezí výdechových rychlostí, ve kterém jsou vztahy mezi sledovanými veličinami skutečně lineární.

Cíl 1B/ K porušení podmínky linearit dochází při použití příliš nízkých výdechových rychlostí a důsledkem je:

- a/ nadhodnocení alveolárního zdroje NO (hodnoty C_ANO) a podhodnocení bronchiálního zdroje NO (hodnoty J_{aw}NO) a
- b/ systematické rozdíly mezi výsledky metod podle Tsoukiase a Pietropaoliho, které jsou větší při odhadu C_ANO ve srovnání s J_{aw}NO.

Cíl 1C/ V našem studijním souboru dětí a mladistvých s alergickými onemocněními dýchacích cest a jejich zdravých vrstevníků bylo pro odhad C_ANO a J_{aw}NO metodami podle Tsoukiase a Pietropaoliho optimální rozmezí výdechových rychlostí 100-250 ml/s, ve kterém jsou rozdíly mezi oběma metodami velmi malé (medián C_ANO vypočítaný Pietropaoliho metodou je o 15 % vyšší a medián J_{aw}NO o 9 % nižší). Přesnost výpočtu studovaných parametrů je ovlivněna dodržením podmínky linearit, rozsahem výdechových rychlostí a počtem měření (tj. počtem jednotlivých výdechových rychlostí). Kombinaci výdechových rychlostí 100, 150, 200 a 250 ml/s charakterizuje přijatelná nepřesnost výpočtu (standardní chyba odhadu) parametrů, která je vyšší v případě C_ANO 26 % než J_{aw}NO 10 %. Doporučujeme pro výpočet C_ANO používat metodu podle Tsoukiase, protože přesnost odhadu je mírně vyšší než poskytuje druhá metoda.

Cíl 2/ Vliv nelinearity na výsledek odhadu parametrů přestupu NO do vydechovaného vzduchu byl v naší studii vyšší u dětí s průduškovým astmatem než u dětí s alergickou rýmou. Tato

skutečnost se promítla do vzájemného srovnání C_{ANO} i J_{awNO} mezi oběma skupinami nemocných. Výsledky srovnání mohou být při nedodržení podmínky linearity zavádějící. Z tohoto důvodu jsme v práci navrhli metodu na ověření linearity a výběr individuálně vhodného rozsahu výdechových rychlostí, která by měla být automaticky aplikována při každém vyšetření C_{ANO} a J_{awNO} .

Cíl 3/ Výpočet na výdechové rychlosti nezávislých parametrů přestupu NO nelineární regresní analýzou vyžaduje zařazení velmi nízkých výdechových rychlostí (10 ml/s), při kterých trvá ustálení koncentrace FENO při výdechu dlouhou dobu. Vzhledem k obtížnosti dechového manévru jsou nároky na spolupráci vyšetřované osoby vysoké a vyšetření obtížně realizovatelné u dětí mladšího školního věku.

Cíl 4/ Vyšetřením FENO při výdechových rychlostech 30, 100 a 250 ml/s a odhadem pomocí algoritmu podle Högmanové et al byly získány hodnoty J_{awNO} a C_{awNO} , které se významně lišily ve skupinách astmatiků s dobrou a nedostatečnou kontrolou nad astmatem, zatímco koncentrace C_{ANO} byla srovnatelná. Podle výsledků ROC analýzy (AUC blízke 0,70 tj. na hranici klinické použitelnosti testu) je senzitivita a specificita parametrů J_{awNO} a C_{awNO} při diagnóze nedostatečné úrovně kontroly nad astmatem přibližně srovnatelná jako u koncentrace FENO₅₀. Náročnější vyšetření FENO při více výdechových rychlostech a odhad na výdechové rychlosti nezávislých parametrů přestupu NO do vydechovaného vzduchu nepřinesl v našich studiích lepší informaci než vyšetření standardizovanou metodou při výdechu rychlostí 50 ml/s.

Interpretace výsledků projektu a formulované závěry mají svá omezení. Hlavní limitaci představuje studovaný soubor, který odráží skladbu nemocných ošetřovaných v Alergologické ambulanci Dětské kliniky FN Hradec Králové. Jednalo se převážně o nemocné s lehkým až středně těžkým průduškovým astmatem a počet osob vyšetřených před zahájením farmakoterapie inhalačními kortikosteroidy mezi nemocnými byl malý. Proto nemohlo být provedeno samostatné vyhodnocení výsledků v této skupině.

7. Diskuse k získaným výsledkům

Ověření přínosu nové vyšetřovací metody musí předcházet standardizace postupu vyšetření a studium technických faktorů, které mohou negativně ovlivnit přesnost a správnost výsledku. Cílem značné části dizertační práce bylo ověřit, který z postupů vyšetření bronchiálního a alveolárního NO má dobrou přesnost a správnost a zároveň je přijatelný z pohledu nároků na spolupráci vyšetřované osoby i na časovou a pracovní zátěž personálu provádějícího vyšetření.

Hlavním cílem první části práce bylo porovnání výsledků vyšetření na výdechové rychlosti nezávislých parametrů $J_{aw}NO$ a $C_{A}NO$, charakterizujících bronchiální a alveolární zdroje NO v dýchacích cestách, získaných aplikací dvou metod linearizace rovnice, popisující závislost FENO na výdechové rychlosti podle dvoukompartimentového modelu. Metody jsou podle autorů nazývány metodami Tsoukiase a Pietropaoliho. Jak dokládají výsledky práce, je z důvodu přesnosti a správnosti výsledku vyšetření a porovnatelnosti obou metod nutné věnovat pozornost splnění podmínky linearity. V případě metody podle Tsoukiase jde o linearitu závislosti vydechnutého množství NO za jednotku času na výdechové rychlosti a v případě Pietropaoliho metody o linearitu závislosti koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu na reciproké hodnotě výdechové rychlosti.

Podmínkou aplikace lineární regresní analýzy na upravenou a zjednodušenou rovnici dvoukompartimentového modelu je, aby výdechová rychlost byla číselně alespoň 10krát větší než hodnota faktoru $D_{aw}NO$, vystupujícího v rovnici. Aby mohla být použita rychlost 50 ml/s, hodnota $D_{aw}NO$ by měla optimálně být nižší než 5 pl/s.ppb^{-1} . Pokud je $D_{aw}NO$ vyšší, měla by být nejnižší výdechová rychlost při měření adekvátně vyšší. V opačném případě je poměr hodnot nižší než 10:1 [14]. Nedodržení podmínky se projeví jako nelinearita závislostí, která negativně ovlivňuje správnost a přesnost odhadu parametrů $J_{aw}NO$ a $C_{A}NO$.

Komentář ke zjištěním z první studie:

1/ V rozmezí výdechových rychlostí 50 až 250 ml/s se v souboru dětí a mladistvých s alergickými onemocněními dýchacích cest projevuje nelinearita závislostí FENO na reciproké hodnotě výdechové rychlosti (metoda Pietropaoli) a V_{NO} na výdechové rychlosti (metoda Tsoukias), v jejímž důsledku jsou hodnoty $C_{A}NO$ vyšší a $J_{aw}NO$ nižší než v lineární oblasti závislostí, tj. při použití adekvátně vysokých výdechových rychlostí. Při odhadu parametrů z měření, zahrnujících nejnižší výdechovou rychlost 50 ml/s, dochází k nadhodnocení alveolárního zdroje (hodnoty $C_{A}NO$) a podhodnocení bronchiálního zdroje (hodnoty $J_{aw}NO$) vydechovaného NO.

2/ Jako optimální pro odhad $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ z lineární oblasti rovnice popisující dvoukompartimentový model je možné v našem studijním souboru dětí a mladistvých označit rozmezí 100-250 ml/s a počet výdechových rychlostí =4 (100, 150, 200 a 250). Naše zkušenosti i literární údaje ukazují, že většina pacientů je schopna vydechnout rychlostí 250 - 300 ml/s po dobu nutnou k ustálení hodnoty FENO [15, 16]. Je předností naší práce, že byl použit tak vysoký počet výdechových rychlostí, spadajících do lineární oblasti. To je v publikovaných pracích zaměřených na stejnou problematiku málo časté. Např. rozsáhlá prospektivní studie s 1507

účastníky, která srovnala různé metody výpočtu C_{ANO} a J_{awNO} , zpracovala výsledky měření FENO pro lineární regresi pouze při rychlostech 50, 100 a 300 ml/s [14]. Při optimální kombinaci výdechových rychlostí (100, 150, 200 a 250), definované v naší práci, jsou rozdíly mezi metodami P a T pravděpodobně klinicky nevýznamné: medián C_{ANO} vypočítaný Pietropaolliho metodou je o 15 % vyšší a medián J_{awNO} o 9 % nižší ve srovnání s postupem podle Tsoukiase. Oba postupy charakterizuje srovnatelná nepřesnost odhadu, která je vyšší u C_{ANO} (standardní chyba 26 %) než u J_{awNO} (10 %).

3/ Z pohledu splnění podmínky linearity závislosti byla ještě lepší kombinace rychlostí 150, 200 a 250 ml/s. Hodnoty C_{ANO} a J_{awNO} získané metodami P a T se při vyšetření v tomto rozmezí výdechových rychlostí nelišily. Přesto hodnotíme tyto výdechové rychlosti jako neoptimální z důvodu nepříjemně vysoké standardní chyby odhadu C_{ANO} (> 40%), která shodně charakterizovala jak metodu P tak i T. Jedná se o důsledek příliš úzkých rozmezí pro veličiny vynášené na osách X a Y s negativním dopadem na přesnost odhadu parametrů lineární regrese přímky.

4/ Výpočet s použitím pouze dvou výdechových rychlostí vylučuje ověření linearity a nelze jej obecně doporučit. Zkrácení postupu a snížení zátěže pro vyšetřovanou osobu by byly z praktického pohledu naopak výhodné. Vyšetření FENO při rychlostech 100 ml/s a 250 ml/s jsme proto zkombinovali s odhadem C_{ANO} metodou T a J_{awNO} metodou P. Použili jsme obě metody současně, protože přesnost odhadu C_{ANO} metodou T je mírně vyšší a naopak, metoda P přesněji odhaduje J_{awNO} . Důvod mírně odlišné přesnosti odhadu souvisí s tím, že při lineární regresi analýze je obecně vyšší přesnost (= menší standardní chyba) odhadu směrnice přímky než úseku na ose Y. V našem souboru malého rozsahu zjednodušená technika zvýšila standardní chybu odhadu C_{ANO} jen mírně (z 26% na 30%).

5/ Parametr J_{awNO} těsně koreloval s koncentrací FENO₅₀ vyšetřenou při výdechu rychlostí 50 ml/s ($r_s=0.96$). Existence těsné korelace potvrzuje obecně přijímaný názor, že při této výdechové rychlosti se NO uvolněné v bronších podílí na celkově vydechnutém množství NO z více než 80%. Nabízí se otázka, zda složitější vyšetření J_{awNO} přináší navíc nějakou upřesňující informaci o množství NO uvolňovaném v bronších oproti vyšetření FENO₅₀. Naopak korelace mezi C_{ANO} a koncentrací FENO₂₅₀ byla mnohem méně těsná ($r_s=0.66$).

I výsledky druhé studie podporují závěr, že metody P a T vyžadují analýzu závislosti vydechovaného NO na větším počtu výdechových rychlostí ≥ 100 ml/s, aby bylo možno odhadnout C_{ANO} a J_{awNO} s dostatečnou přesností a správností. V úvahu připadá i doplnění měření o nižší výdechové rychlosti, ale výhradně za podmínky pečlivého posouzení linearity závislosti u

každého pacienta. Vliv nelinearity na výsledek odhadu $C_{A}NO$ byl v naší studii vyšší u dětí s průduškovým astmatem než u dětí s alergickou rýmou. Tato skutečnost se promítla do výsledku vzájemného srovnání $C_{A}NO$ mezi skupinami. Podobný závěr platí i pro parametr $J_{aw}NO$. Pro obě skupiny nemocných byla linearita závislostí potvrzena až v rozmezí rychlostí 150-250 ml/s. V uvedeném rozmezí nebyly zjištěny rozdíly mezi výsledky odhadu $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ metodami P a T. Nicméně snížení rozsahu a počtu výdechových rychlostí se opět projevilo zvýšenou chybou odhadu parametrů, zejména $C_{A}NO$.

Výsledky dizertační práce jednoznačně potvrzují nutnost měření koncentrace vydechovaného NO v rozmezí výdechových rychlostí vyhovujících podmínce linearity upravených rovnic dvoukompartmentového modelu. V obou sledovaných skupinách nemocných byly rozdíly výsledků spadající na vrub nedodržení podmínky linearity natolik významné, že je není možné ignorovat.

Z tohoto důvodu jsme v práci navrhli metodu k eliminaci nelinearity spočívající ve dvou krocích. V prvním kroku jsou vyneseny do grafu všechny zjištěné hodnoty V_{NO} proti výdechové rychlosti (metoda T) nebo hodnoty FENO proti inverzní hodnotě výdechové rychlosti (metoda P). Opticky je posouzena linearita závislostí. V druhém kroku je provedena lineární regresní analýza ze všech měření a poté je analýza opakována po vyloučení nejnížší výdechové rychlosti. Tento postup dává možnost zhodnotit vliv nejnížší výdechové rychlosti na $C_{A}NO$ způsobený nelinearitou a posoudit, o kolik se sníží $C_{A}NO$ po vyloučení měření při nejnížší výdechové rychlosti. Je-li zaznamenán velký rozdíl vlivem nelinearity, pak by nejnížší výdechová rychlost měla být vyloučena a celý postup opakován od prvního kroku. Určitý toleranční limit pro pokles $C_{A}NO$ je vhodné přijmout, protože přesnost odhadu je lepší, pokud jak počet i rozsah výdechových rychlostí jsou vyšší. Navrhujeme tolerovat pokles o 20%, což je procento odpovídající běžné dosahované chybě odhadu $C_{A}NO$.

Závěry z druhé části práce:

1/ Děti s astmatem měly vyšší hodnoty FENO₅₀ a $C_{aw}NO$ než ostatní děti. Rozdíly byly způsobeny vyššími hodnotami pozorovanými u astmatiků se špatnou kontrolou astmatu.

2/ Hodnoty parametru $J_{aw}NO$ nedovolily odlišit děti s astmatem od dětí s alergickou rýmou a atopických zdravých dětí. Při analýze s přihlédnutím k dosažené kontrole astmatu však byly hodnoty $J_{aw}NO$ u nemocných s nekontrolovaným astmatem výrazně vyšší než v ostatních skupinách.

3/ Hodnoty parametrů $C_{A}NO$ a $D_{aw}NO$ byly ve všech skupinách srovnatelné.

4/ Diagnostická schopnost odlišit nemocné s dobrou a špatnou kontrolou astmatu byla u parametrů FENO₅₀, J_{aw}NO a C_{aw}NO srovnatelná. Hodnota AUC pod křivkou ROC rovná 0,70 je na hranici klinické použitelnosti testu.

Cílem předložené práce bylo přispět k problematice vyšetřování koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu metodou více výdechových rychlostí. Vzdor dnes již poměrně rozsáhlé celosvětové literatuře zaměřené na toto úzké téma zůstává řada nejasností metodologických, ale i určitá nejistota v interpretaci zjištěných výsledků. Ve srovnání s vyšetřením FENO při výdechu konstantní rychlostí 50ml/s, které se již jako vyšetřovací metoda prosadilo v péči o nemocné astmatem v několika zemích včetně České republiky, zbývá vykonat mnoho výzkumné práce zaměřené na biologické faktory ovlivňující C_ANO a ověření možné úlohy C_ANO jako bioindikátoru využitelného v péči o nemocné s astmatem.

8. Použitá literatura

1. Teřl, M, Pohunek, P. Strategie diagnostiky, prevence a léčby astmatu. Uvedení globální strategie do praxe v ČR. 1. vyd. Praha: Česká iniciativa pro astma, o.p.s., 2012. ISBN 978-80-86396-67-5
2. Dweik, RA, Boggs, PB, Erzurum, SC, Irvin, CG, Leigh, MW, Lundberg, JO, Olin, AC, Plummer, AL, Taylor, DR. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FeNO) for Clinical Applications. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011, 184(5), 602–615
3. Chládková, J, Chládek, J. Přínos měření oxidu dusnatého ve vydechovaném vzduchu pro farmakoterapii průduškového astmatu u dětí. *Alergie.* 2007, 9:177-181
4. Chládková, J, Havlínová, Z, Krčmová, I, Chyba, T, Chládek, J. Metodická hlediska vyšetření vydechovaného oxidu dusnatého u dětí. *Alergie.* 2008, 10, 262-268
5. American Thoracic Society/European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005, vol. 171, 912-930
6. Alwing, K, Weitzberg, E, Lundberg, JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J.* 1993, vol. 6, 1368-1370
7. Kim, HB, Eckel, SP, Kim, JH, Gilliland, FD. Exhaled NO: Determinants and Clinical Application in Children With Allergic Airway Disease. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2016, Jan 8(1), 12-21
8. Dweik, RA, Comhair, SA, Gaston, B, Thunnissen, FB, Farver, C, Thomassen, MJ, Kavuru, M, Hammel, J, Abu-Soud, HM, Erzurum, SC. NO chemical events in the human airway during the immediate and late antigen-induced asthmatic response. *Proc Natl Acad Sci.* 2001, 98, 2622–2627
9. Mahut, B, Delacourt, C, Zerah-Lancner, F, De Blic, J, Harf, A, Delclaux, C. Increase in alveolar nitric oxide in the presence of symptoms in childhood asthma. *Chest.* 2004, 125, 1012–1018
10. Pietropaoli, AP, Perillo, IB, Torres, A, Perkins, PT, Frasier, LM, Utell, MJ, et al. Simultaneous measurement of nitric oxide production by conducting and alveolar airways of humans. *J Appl Physiol.* 1999, 87, 1532–1542
11. Tsoukias, NM, George, SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J. Appl. Physiol.* 1998, 85, 653–66
12. Hogman, M, Merilainen, P. Extended NO analysis in asthma. *J Breath Res.* 2007, 1.

Dostupné z: doi:10.1088/1752-7155/1/2/024001

13. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2014. Dostupné z: <http://ginasthma.org>
14. Eckel PS, Linn, WS, Berhane, K, Rappaport, EB, Salam, MT, Zhang, Y, Gilliland FD. Estimation of Parameters in the Two-Compartment Model for Exhaled Nitric Oxide. PLoS ONE 2014, Jan 17, 9(1), e85471. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0085471
15. Paraskakis, E, Brindicci, C, Fleming, L, Krol, R, Kharitonov, SA, Wilson, NM, Barnes, PJ, Bush, A. Measurement of bronchial and alveolar nitric oxide production in normal children and children with asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2006, 174, 260–267
16. Puckett, JL, Taylor, RW, Leu, SY, Guijon, OL, Aledia, AS, Galant, SP, George, SC. Clinical patterns in asthma based on proximal and distal airway nitric oxide categories. Respir Res. 2010, 11-47

9. Přehled publikační činnosti autora:

9.1. Původní vědecké publikace

- Studena, S, Martinkova, J, Slizova, D, Krs, O, Senkerik, M, Springer, D, Chladek, J. A rat model of early sepsis: relationships between gentamicin pharmacokinetics and systemic and renal effects of bacterial lipopolysaccharide combined with interleukin-2. *Biol Pharm Bull.* 2012; 35, 1703-10. (IF 1,849)
- Chladkova, J, Senkerik, M, Havlinová, Z, Krcmova, I, Chladek, J. Alveolar concentration and bronchial flux of nitric oxide: two linear modeling methods evaluated in children and adolescents with allergic rhinitis and atopic asthma. *Pediatr Pulmonol.* 2012 Nov 47(11), 1070-9. doi: 10.1002/ppul.22550. (IF 2,375)

9.2. Ostatní publikace v časopisech s impact faktorem (včetně publikovaných abstrakt z kongresových sdělení)

- Dostal, P, Senkerik, M, Cerny, V, Parizkova, R, Suchankova, J, Kodejskova, S, Bares, D, Zivny, P, Zivna, H. Moderate hypothermia attenuates changes in respiratory system mechanics and cytokine production during low volume ventilation in rats. *Critical Care*, 2007, vol. 11, suppl. 2, 15. ISSN 1466-609X. (IF 3,116)
- Dostal, P, Cerny, V, Senkerik, M, Parizkova, R, Zivna, H, Zivny, P. Different tidal volumes induce similar elevation of lung injury markers in animals sensitized to injury by previous anesthesia nad surgery. *Critical Care*, 2008, vol. 12, suppl. 2, 15. ISSN 1466-609X. (IF 3,116)
- Dostal, P, Senkerik, M, Parizkova, R, Bares, D, Zivny P, Zivna, H, Cerny, V. Mild hypothermia attenuates changes in respiratory system mechanics and modifies cytokine concentration in bronchoalveolar lavage fluid during low lung volume ventilation. *Physiol. research*, 2010 Jun 9 (IF 1,43)

9.3. Původní vědecké práce v časopisech bez impact faktoru

- Šenkeřík, M., Chládková, J., Krčmová, I.: Neinvazivní monitorování zánětu dýchacích cest u dětí s alergickou rýmou a průduškovým astmatem: ověření dvou metod vyšetření alveolární koncentrace a bronchiálního toku oxidu dusnatého. *Alergie* 13, 2011, 13, 25-30
- Šenkeřík, M, Černý, V. Helium a jeho význam v současné medicíně. *Anesteziologie a intenzivní medicína*, 2007, 18, 175-180. ISSN 1214-2158
- Rybníkář, T, Šenkeřík, M, Chládek, J, Chládková J. Vyšetření nazálního oxidu dusnatého u dětí s adenoidními vegetacemi. *Alergie*, 2015, 1, 49-54
- Chládková, J, Škopková, O, Šenkeřík, M. Deset let anafylaxe u dětí na Královéhradecku a Ostravsku. *Alergie*, 2013, 1, 58-63
- Chládková, J, Škopková, O, Šenkeřík, M. Anafylaxe v dětském věku. *Alergie*, 2013, 1, 64-68
- Šenkeřík, M, Chyba, T, Lukeš, A, Voříšek, V. Náhodná intoxikace letální dávkou kodeinu u kojenče. *Čes.-slov. Pediat., Suppl.*, 55, 2000, 18. ISSN: 0069-2328

- Slanina M, Zizka J, Klzo L, Senkerik, M. Osmotic demyelination syndrome - MRI diagnosis: a case report. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. 2007, 70, Issue: 3, 322-327
- Šenkeřík, M, Kohout, P. Střevní propustnost u popálených. *Lék. Zpr. Lék. Fak. Univ. Karlovy Hr. Králové*, 1997, 42, 183-185
- Kohout, P, Šenkeřík, M, Novotný, A, Koželuhová, J, Pospíšil, V, Repák, R, Musil, D, Brátová, M, Hyšpler, R, Brodská, H, Zadák, Z, Lukáš, M, Bureš, J. Střevní propustnost u pacientů s nespecifickými střevními záněty - multicentrická studie. *Čes. slov. Gastroent. a Hepatol.*, 56, 2002, 2, 53-60.
- Kohout, P, Brátová, M, Šenkeřík, M. Test střevní propustnosti jako prediktor relapsu u pacientů s Crohnovou chorobou. *Čes. slov. Gastroent. a Hepatol., Suppl.*, 55, 2001, 1, 65-66. ISSN: 1213-323X
- Fialová, D, Fiala, Z, Hlúbik, P, Zetocha, J, Pelcák, S, Šenkeřík, M. Účinek kombinované terapie na osoby se zvýšenou tělesnou hmotností. *Med. sport. bohem. slov.*, 9, 2000, 3, 103-104. ISSN: 1210-5481
- Fiala, Z, Fialová, D, Hlúbik, P, Martiník, K, Zetocha, J, Pastera, J, Šenkeřík, M, Šulcová, V. The effects of combined therapy on persons with increased body weight. *Acta med.*, 43, 2000, 2, 38. ISSN: 1211-4286
- Fialová, D, Fiala, Z, Hlúbik, P, Zetocha, J, Pelcák, S, Šenkeřík, M. Controlled physical activity in the therapy for persons with increased body weight. *Acta med.*, 42, 1999, 2, 42. ISSN: 1211-4286
- Vaníček, H, Brátová, M, Pozler, O, Kohout, P, Šenkeřík, M. Střevní permeabilita u pacientů s cystickou fibrózou. *Čes.-slov. Pediat., Suppl.*, 53, 1998, 1, 92. ISSN: 0069-2328
- Kohout, P, Hošková, I, Šenkeřík, M, Zadák, Z: The usefulness of gut permeability test in gastroenterology. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(3), 2001, 137-142
- Kohout, P, Šenkeřík, M, Brátová, M. Small bowel permeability in patients with inflammatory bowel diseases - part II - prediction of relapse in patients with Croh's disease. *Gut*, 2001(49), Suppl. 3, 2179-2179

9.4. Kapitoly v monografiích:

- Kohout, P. Možnosti neinvazivního vyšetřování střeva. 1. vydání, Galén, ISBN 8072621416 (spoluautor kapitoly Vyšetřovací metody v pediatrii)
- Bayer, M. Repetitorium v pediatrii. 1. vydání, Triton, 2011, ISBN 978-80-7387-388-2 (autorství/spoluautorství kapitol: Metabolická acidóza, Metabolická alkalóza, Respirační acidóza, Respirační alkalóza, Oběhové selhání, Arteriální hypertenze, Nitrolební hypertenze, Seps)

9.5. Přednášky:

- Šenkeřík, M, Pozler, O, Kohout, P. Intestinal permeability in cystic fibrosis – Vídeň, Rakousko, 1998 Meeting of Central European Countries of Pediatric Research

- Šenkeřík, M, Lukeš A, Chyba, T. Infekce ventrikuloperitoneálního shuntu – Martin, Slovensko, 2000
- Šenkeřík, M, Lukeš, A. Použití směsi Heliox u obtížně ventilovatelného pacienta – Podbanské, Slovensko, 2002
- Senkerik, M, Dostal, P, Cerny, V, Parizkova, R. Effect of hyperoxia on respiratory system mechanics and cytokine production during high volume lung ventilation in rats. Lisabon, Portugalsko, 2008
- Šenkeřík, M, Lukeš, A, Řeháček, V. TRALI. Setkání pediatrických intenzivistů, Tetřeví boudy 2010
- Šenkeřík, M. Akutní poškození ledvin. 31. pracovní dny dětské nefrologie 2010, Hradec Králové
- Šenkeřík, M. Akutní poškození ledvin. Setkání pediatrických intenzivistů, Tetřeví boudy 2011
- Šenkeřík, M, Kovařík, J. Pacienti z renální dysfunkcí na dětském oddělení PKN. 36. pracovní dny dětské nefrologie 2015, Ústí nad Labem
- Šenkeřík, M. Láska je láska. 12. kongres českých pediatrů a sester. 2016, Hradec Králové