

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program

Vnitřní nemoci

Sledování zánětu dýchacích cest u pacientů s různými formami bronchiální obstrukce

Sledování ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu
u pacientů s těžkým refrakterním astmatem.

**Monitoring of airway inflammation in patients with various types of bronchial
obstruction**

Monitoring of oxidative stress biomarkers in exhaled breath condensate
of patients with severe refractory asthma.

MUDr. Vratislav Sedlák

Školitel: Doc.MUDr. František Salajka, CSc.

Hradec Králové, 2013

Obhajoba dne:

(doplň studijní odd.)

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně, a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 2013

Poděkování

Upřímně děkuji za cenné připomínky, vedení a podporu svému školiteli Doc. MUDr. Františku Salajkovi, CSc. Dále svým spolupracovníkům Doc. MUDr. Petru Čápovi, PhD. a Doc. Ing. Petru, Kačerovi, PhD. za možnost provést analýzy vydechovaného vzduchu u našich pacientů. Za pomoc při statistickém zpracování děkuji RNDr. Marku Malému, CSc a RNDr. Evě Čermákové. Velmi děkuji své manželce za stálou podporu a trpělivost při mém postgraduálním studiu.

Použité zkratky

AEC	- absolutní počet eozinofilů periferní krve		
AKT	- astma kontrol test skóre	MBP	- hlavní bazický protein
AKTØ	- průměrná hodnota skóre astma kontrol testu	MDA	- malondialdehyd
ATS	- Americká hrudní společnost	MHC	- hlavní histokompatibilní komplex
BAL	- bronchoalveolární laváž	MPO	- myeloperoxidáza
BHR	- bronchiální hyperreaktivita	NADPH	- nikotin-adenin-dinukleotid-fosfát
BM	- bazální membrána	NAC	- N-acetyl-cystein
CysLT	- cysteinylové leukotrieny	NANC	- non-adrenergní, non-cholinergní nervová vlákna
DC	- dendritické buňky	NEA	- non-eozinofilní fenotyp astmatu
DEP	- diesel exhaust particles - zplodiny spalin z dieslových motorů	NF-κB	- nukleární faktor-kappa-B
DNA	- deoxyribonukleová kyselina	NO	- oxid dusnatý
EA	- eozinofilní fenotyp astmatu		
EC%	- % eozinofilů v diferencálním rozpočtu periferní krve	Nrf2	- nuclear-erythroid-2 transkripční faktor
ECP	- eosinofilní kationický protein	OLA	- obtížně léčitelné astma
EGF	- epiteliální růstový faktor	SKS	- perorální systémová kortikoterapie
ELF	- epithelial-lining fluid – tekutina na povrchu respiračního epitelu	PAF	- faktor aktivující destičky
EPO	- eosinofilní peroxidáza	PG	- prostaglandin
ETMU	- epiteliálně-mesenchymální trofická jednotka	PUFA	- nenasycené mastné kyseliny
FcεRI	- vysokoafinní receptor pro IgE	ROS	- reaktivní kyslíkové radikály
FBO	- fixovaná bronchiální obstrukce	RNS	- reaktivní dusíkaté radikály
FeNO	- koncentrace oxidu dusnatého ve vydechaném vzduchu rychlostí 50ml/sec	RV	- reziduální objem plic
FeNOØ	- průměrná hodnota FeNO z posledních tří návštěv v ambulanci	SABA	- krátkodobě působící beta-2-agonista
FEV1	- usilovná jednovteřinová výdechová rychlost	SARP	- Severe Asthma Research Project
GINA	- Global Initiative for Asthma	SBMØ	- průměrná šířka subepiteliální bazální membrány epitelu bronchiální stěny
GERD	- gastroezofageální refluxní nemoc	SOD	- superoxid-dismutáza
GM-CSF	- granulocyte-makrophage colony stimulating factor	STAT	- signal-transducer and activator of transcription
GSH	- glutathion	TBC	- tuberkulóza
GSTM1	- glutathion-S-transferáza Mu1	TGF-β	- transdermální růstový faktor – beta
GSTP1	- glutathion-S-transferáza P 1	TLC	- celková plicní kapacita
HDAC2	- histon-deacetyláza-2	TLCO	- transfer faktor pro oxid uhelnatý
HNE	- 4-hydroxy-trans-nonenal	TLR	- toll-like receptor
HHE	- 4-hydroxy-trans-hexanal	TNF-α	- tumor-necrosis-faktor – alfa
CHOPN	- chronická obstrukční plicní nemoc	TRA	- těžké refrakterní astma
ICAM	- intercelulární adhezivní molekuly	VCAM	- vaskulární adhezivní molekuly
IKS	- inhalační kortikosteroidy	VCD	- vocal cord dysfunction – dyskineza hlasových vazů
IgE	- imunoglobulin E	VEGF	- vaskulární endoteliální
IgG	- imunoglobulin G	C₆	- hexanal
IL	- interleukin	C₇	- heptenal
iNOS	- inducibilní NO-syntetáza	C₈	- octanal
IS	- indukované sputum	C₉	- noneal
KS	- kortikosteroidy	C₁₀	- dekanal
KVV	- kondenzát vydechaného vzduchu	C₁₁	- undekanal
LT	- cysteinylový leukotrien	C₁₂	- dodekanal
MAPK	- mitogen-activated protein-kinase	8-iso	- 8-isoprotaglandinF _{2α} (isoprostan)
		5-HOMeU	- 5-hydroxymethyl-uracyl
		8-OHdG	- 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosin
		8-OHG	- 8-hydroxyguanosin
		o-Tyr	- o-tyrosin
		NO-Tyr	- 3-nitro-tyrosine
		Cl-Tyr	- 3-chlor-tyrosin

Obsah

POUŽITÉ ZKRATKY	5
OBSAH	6
1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	8
1.1. Současná definice astmatu a těžkých forem astmatu.....	8
1.1.1. Kontrola astmatu dle GINA	8
1.1.2. Heterogenita astmatu a léčebné odpovědi na antiastmatika, fenotypy	9
1.1.3. Těžké bronchiální astma – česká terminologie	9
1.1.4. Péče o pacienty s těžkými formami astmatu (OLA, TRA).....	11
1.1.5. Charakteristika těžkého astmatu v multicentrických studiích	14
1.1.6. Klinický průběh těžkého astmatu a fenotypizace astmatu	15
1.1.7. Klastrová analýza těžkého refrakterního astmatu	18
1.1.7. Specifické mechanismy těžkého refrakterního astmatu (TRA)	20
1.1.8. Možnosti léčby těžkých forem astmatu.....	22
1.2. Patofyziologie zánětu dýchacích cest u astmatu	24
1.2.1. Genetika atopie a bronchiální hyperreaktivity.....	25
1.2.2. Principy alergického zánětu u astmatu	26
1.2.3. Časná fáze alergické reakce	26
1.2.4. Pozdní fáze alergické reakce	27
1.2.5. Buňky a jejich působky v průběhu alergického zánětu.....	27
1.2.6. Bronchiální hyperreaktivita a její vztah k zánětu dýchacích cest	29
1.2.7. Specifické rysy zánětu dýchacích cest u těžkého refrakterního astmatu	30
1.2.8. Histopatologické změny v bronchiální stěně u astmatu	31
1.3. Patofyziologie oxidativního stresu u astmatu.....	32
1.3.1. Endogenní zdroje oxidativního stresu	32
1.3.2. Exogenní zdroje oxidativního stresu.....	33
1.3.3. Udržování rovnováhy mezi oxidativním stresem a antioxidačními faktory.....	34
1.3.4. Mechanismy antioxidační obrany organismu	35
1.3.5. Genetická vnímavost k poškození respiračního systému oxidativním stresem	37
1.3.6. Farmakologie oxidativního stresu u astmatu.....	38
1.4. Metody sledování zánětu a oxidativního stresu.....	38
1.4.1. Neinvazivní metody sledování zánětu a oxidativního stresu u astmatu.....	39
1.4.2. On-line měření koncentrace oxidu dusnatého ve vydechovaném vzduchu	39
1.4.3. Vyšetření indukovaného sputa (IS).....	41
1.4.4. Analýza kondenzátu vydechovaného vzduchu.....	41
1.4.5. Vyšetření eozinofilie periferní krve (PK)	44
1.4.6. Vyšetření moči na koncentraci cysteinylových leukotrienů.....	45
1.4.7. Invazivní metody diagnostiky zánětu stěny dýchacích cest.....	45
2. CÍL PRÁCE	47
3. SOUBOR NEMOCNÝCH, STATISTICKÉ ANALÝZY	48
3.1. Sledované klinické parametry z období před vstupem do studie	48
3.2. Vyšetření pacientů ve studii.....	49
3.3. Vyšetření kondenzátu vydechovaného vzduchu (KVV)	50
3.3.1. Spektrum sledovaných látek v kondenzátu vydechovaného vzduchu	50
3.3.2. Biochemická analýza kondenzátu vydechovaného vzduchu	52
3.4. Statistické analýzy	54
4. VLASTNÍ VÝSLEDKY	55
4.1. Charakteristika kontrolní skupiny (KS)	55
4.2. Charakteristika skupiny těžkého refrakterního astmatu (TRA).....	56
4.3. Asociace mezi sledovanými klinickými faktory ve skupině TRA.....	60
4.3.1. Vztah spirometrických hodnot k ostatním parametrům	61
4.3.2. Vztah kvality života k ostatním parametrům	62

4.3.3. Vztah zánětlivých ukazatelů k ostatním parametrům	63
4.3.4. Vliv komorbidit na průběh těžkého refrakterního astmatu	65
4.3.5. Vztah fenotypu astmatu k ostatním sledovaným parametrům	67
4.3.6. Rozdělení souboru TRA dle eozinofilie periferní krve (EC%>4%)	68
4.3.6. Vztah zánětlivého fenotypu dle ec% k dalším klinickým parametrům	69
4.3.7. Rozdělení souboru dle perzistující eozinofilie metodou FeNO	71
4.3.8. Rozdělení souboru dle dalších klinických faktorů	72
4.4. Rozdíly ve složení KVV u pacientů s TRA a u zdravých dobrovolníků	73
4.4.1. Markery lipoperoxidace buněčných membrán (MDA, HNE, HHE)	73
4.4.2. Markery lipoperoxidace buněčných membrán (C6-C12)	74
4.4.2. Markery lipoperoxidace buněčných membrán (8-iso, LTB4)	75
4.4.3. Cysteinylvé leukotrieny LTC4, LTD4, LTE4	76
4.4.4. Poškození nukleových kyselin oxidativním stresem (5-HOMeU, 8-OHG, 8-OHdG)	77
4.4.5. Markery poškození aminokyselin oxidativním stresem (o-Tyr, NO-TYR, Cl-Tyr)	78
4.5. Rozdíly ve složení KVV u fenotypů TRA dle eozinofilie periferní krve	79
4.6. Rozdíly ve složení KVV u fenotypů TRA dle FeNO>30 ppb	84
4.7. Rozdíly ve složení KVV ve skupině TRA dle kortikoterapie	85
4.8. Rozdíly ve složení KVV u TRA dle dalších faktorů	85
4.9. Variabilita naměřených výsledků v KVV	86
5. DISKUSE	88
Hypotéza 1	92
Hypotéza 2	93
Hypotéza 3	94
Hypotéza 4	96
Hypotéza 5	96
Budoucnost vyšetřování vydechovaného vzduchu	99
6. ZÁVĚRY	101
7. POUŽITÁ LITERATURA	103

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Průduškové astma patří mezi onemocnění s rostoucí incidencí v rozvinutých zemích. Léčba astmatu spotřebovává významnou část finančních a lidských zdrojů ve zdravotnictví. Celosvětově v současnosti trpí astmatem asi 300 milionů lidí, v roce 2025 to však pravděpodobně bude již 400 milionů nemocných. Prevalence astmatu v České republice je 8%, těžké perzistující astma představuje přibližně 9% ze všech pacientů s astmatem. Díky zavedení nových účinných protizánětlivých a úlevových léků a propracované strategii péče o astmatiky klesá v rozvinutých zemích v posledních letech mortalita a morbidita spojená s astmatem. Ročně umře na astma v celé ČR méně než 100 lidí [1, 2]. Tato práce se věnuje pacientům trpícím těžkým refrakterním astmatem, kteří představují specifickou podskupinu z hlediska intenzity příznaků a náročnosti léčby.

1.1. SOUČASNÁ DEFINICE ASTMATU A TĚŽKÝCH FOREM ASTMATU

Astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, na němž se účastní mnoho buněčných populací a buněčných produktů. Chronický zánět je spojen s opakovanými stavy hvízdavého dýchání, kašlem, dušností a svíráním na hrudi, které se objevují zejména v noci nebo časně ráno. Tyto stavy jsou obvykle provázeny rozsáhlou, ale proměnlivou bronchiální obstrukcí, která je často reverzibilní spontánně nebo po léčbě. Vznik a vývoj astmatu jsou výsledkem interakce individuálních primárně genetických faktorů s řadou faktorů prostředí, které modulují expresi a rozvoj klinického fenotypu tohoto onemocnění [2].

1.1.1. KONTROLA ASTMATU DLE DOPORUČENÍ SVĚTOVÉ INICIATIVY PRO ASTMA (GINA)

Dosažení kontroly nemoci je univerzálním léčebným cílem u pacientů s chronickým onemocněním, které nelze vyléčit. Výbor organizace Global Initiative for Asthma (GINA), který je mezinárodní autoritou vydávající globální doporučení léčby astmatu, v roce 2006 zavedl koncepci sledování úrovně kontroly nemoci jako základní princip léčby astmatiků [1].

Přestože jsou v léčbě astmatu k dispozici moderní inhalační kortikosteroidy a dlouhodobě působící bronchodilatancia i biologická léčba (omalizumab - anti-IgE protilátka), není plná kontrola astmatu dosažitelná u všech astmatiků. Studie GOAL a další práce prokázaly, že až u 30 % pacientů nelze dosáhnout plné kontroly nemoci, ačkoliv je léčba upravována podle doporučeného postupu včetně vysokých dávek inhalačních kortikosteroidů [3]. Příčiny neúplné kontroly astmatu jsou vysvětlovány různě (non-compliance, non-eozinofilní zánět, polymorfismy receptorů pro beta-2-mimetika, komorbidita). Část těchto pacientů trpí tzv. těžkým refrakterním astmatem, které má odlišný průběh a odpověď na léčbu.

1.1.2. HETEROGENITA ASTMATU A LÉČEBNÉ ODPOVĚDI NA ANTI-ASTMATIKA, FENOTYPY

Průduškové astma je onemocnění spojené s variabilním klinickým průběhem a různou odpovědí na doporučovanou protizánětlivou léčbu. Příčiny heterogenní léčebné odpovědi lze vysvětlit různě.

Hlavní vliv hraje různá míra exprese genotypu pacienta vlivem působení různých faktorů vnějšího prostředí. Dosud bylo identifikováno množství genů podílejících se na vzniku astmatu v celé jeho komplexnosti. Tomu odpovídá i široké spektrum klinických projevů astmatu, patofyziologických a zánětlivých mechanismů v závislosti na interakci nemocného s vnějším prostředím [4]. Interakce genotypu a vnějšího prostředí vytváří specifický fenotyp nemoci, který může být různě vnímavý k protizánětlivé léčbě inhalačními a systémovými kortikosteroidy.

Možným vysvětlením různorodé odpovědi pacientů k protizánětlivé léčbě jsou například genové polymorfismy glukokortikoidních receptorů či receptorů pro SABA [5]. Také existuje rozpor mezi výsledky farmakologických studií a klinickou praxí. Farmakologické studie léků proti astmatu mají obvykle přísná vstupní kritéria, většinou sledují pouze nemocné s typickým eozinofilním alergickým astmatem, bez komorbidit do 65 let věku. Klinická realita se však od podmínek ve farmakologických studiích značně liší (senioři, komorbidit, non-eozinofilní fenotyp astmatu) a léčebný efekt v běžné klinické praxi nemusí splnit očekávání pacienta ani lékaře [6].

Heterogenita fenotypů astmatu zapříčinila nesplnění primárních cílů studií sledujících efekt nových nadějných biologických léčiv cílených proti konkrétním cytokinům patogeneze zánětu dýchacích cest [7]. Teprve subanalýzy dat prokázaly efektivitu jen na specifických subpopulacích nemocných s vybranými morfologickými, funkčními a zánětlivými vlastnostmi [8-11].

1.1.3. TĚŽKÉ BRONCHIÁLNÍ ASTMA – ČESKÁ TERMINOLOGIE

Podle platné definice GINA je těžké astma označováno jako stav, kdy je k dosažení kontroly astmatu nutné podávat vysoké dávky protizánětlivých léků (GINA stupeň léčby 4), nebo astma není i přes takto náročnou léčbu pod kontrolou [2]. Těžké astma představuje sice pouze přibližně 9% všech nemocných, jejich léčba je však nejvíce nákladná a spotřebovává asi 25-30% veškerých finančních a lidských zdrojů v boji proti astmatu.

V terminologii těžkého astmatu přetrvával v zahraniční i české odborné literatuře dlouhou dobu značný nesoulad. Teprve v posledních 20 letech se postupně objevovaly důkazy o odlišné patofyziologii, morfologii a prognóze těchto nemocných, které vedly k formulaci specifických doporučených postupů odborných společností. Evropská respirační společnost poprvé v roce 1999 vymezila pojem tzv. *obtížně léčitelné astma* pro nemocné s nekontrolovaným průběhem nemoci, perzistujícími symptomy a/nebo opakovanými exacerbacemi i přes léčbu vysokými dávkami inhalačních kortikosteroidů nebo i systémových kortikosteroidů [12].

Americká hrudní společnost (ATS) ve stejné době publikovala oficiální stanovisko s vlastní definicí obtížně léčitelného astmatu, která definovala tyto nemocné podle náročnosti léčby a spotřeby zdravotní péče. Za *obtížně léčitelné astma* bylo možné označit pacienty, kteří splnili dvě ze sedmi klinických a funkčních kritérií (hlavní kritéria: nekontrované astma i přes trvalou nebo téměř trvalou léčbu kortikosteroidy v posledním roce a/nebo nutnost léčby vysokými dávkami inhalačních kortikosteroidů a další aditivní léčby astmatu, vedlejší kritéria: např. perzistující bronchiální obstrukce, každodenní potřeba úlevové léčby, rychlé zhoršení PEF po ukončení nárazu kortikoidů, jedno nebo více akutních ošetření pro astma za rok) [13].

V České republice (ČR) jsou základní principy diagnostiky a léčby těžkých forem astmatu shrnuty v doporučeném postupu České pneumologické a ftizeologické společnosti a České společnosti klinické imunologie a alergologie [14]. Diagnostická kritéria pro obtížně léčitelné astma v ČR vycházejí z kritérií ATS, jsou však přísnější a odpovídají v současnosti nejvíce uznávané definici tzv. *těžkého refrakterního astmatu* (viz níže). Nová terminologie nejtěžších forem astmatu je komentována v posledním překladu doporučeného postupu GINA v souladu s aktuální terminologií používanou ve světové literatuře a Světovou zdravotnickou organizací (WHO) [2, 15]. Tato definice rozeznává dvě formy těžkého astmatu nereagujícího na léčbu:

Obtížně léčitelné astma (OLA) je nově definováno jako stav, kdy nelze dosáhnout kontroly nemoci z důvodu přítomnosti komplikujících onemocnění a komorbidit (špatná compliance pacienta, dyskineza hlasových vazů, deprese, trvající expozice spouštěčům astmatu, neléčitelné nebo neléčené komorbidity).

Těžké refrakterní astma (TRA) je charakterizováno jako nemožnost dosažení a udržení kontroly nad astmatem při dodržování režimových opatření a řádné, minimálně šest měsíců trvající komplexní léčbě, jejíž součástí je celé spektrum antiastmatické terapie včetně vysokých dávek inhalačních kortikosteroidů a je splněna podmínka, že pacient je sledován specialistou (tabulka 1). Pro splnění definice TRA je vyžadován jednoznačný průkaz správné diagnózy astmatu, vyšetření a léčení komplikujících faktorů a komorbidit astmatu a dobrou spolupráci pacienta při léčbě [14].

Tabulka 1 Diagnostická kritéria pro těžké refrakterní astma dle ČPFS/ČSAKI 2011

HLAVNÍ KRITÉRIA TĚŽKÉHO REFRAKTERNÍHO ASTMATU
<ul style="list-style-type: none">• Správně stanovená diagnóza bronchiálního astmatu dle kritérií GINA• Jsou vyloučeny nebo léčeny onemocnění komplikující průběh astmatu (refluxní nemoc jícnu, rinosinusitida, psychosociální faktory, ...)• Astma pod nedostatečnou kontrolou (viz. vedlejší kritéria) i přes správně užívanou léčbu vysokými denními dávkami inhalačních kortikosteroidů (beklometason >1250 ug, budesonid >1200 ug, flutikason 1000ug) a aditivní léčbu (teofylliny, antileukotrieny, dlouhodobě-působícími beta-2-mimetiky (LABA))
VEDLEJŠÍ KRITÉRIA TĚŽKÉHO REFRAKTERNÍHO ASTMATU*
<ul style="list-style-type: none">• Každodenní nebo téměř každodenní užívání záchranné léčby inhalačními beta2-agonisty s rychlým nástupem účinku (RABA)• Trvající obstrukce dýchacích cest (FEV1 <80% normy a/nebo diurnální variabilita PEF > 20%)• Jedno nebo více akutních ošetření lékařem pro zhoršení astmatu za rok• Více než 2 nárazy** systémovými kortikosteroidy pro exacerbaci astmatu za rok• Rychlé zhoršení stavu po snížení dávky systémových či inhalačních kortikosteroidů o 25% denní dávky• Epizoda téměř fatálního astmatu v anamnéze v posledních 5-ti letech• Trvalá nebo téměř trvalá léčba systémovými kortikosteroidy pro astma
<p>* Pro splnění definice těžkého refrakterního astmatu musí platit všechna tři hlavní kritéria a současně alespoň dvě vedlejší kritéria</p> <p>** Náraz = kúra tj. podávání systémových kortikosteroidů ≥ 3 dny</p>

Nemocní s podezřením na TRA by měli být vyšetřeni ve specializovaném centru pro léčbu těžkého astmatu [14]. V případě potvrzení této diagnózy je obecnou snahou lékaře dosažení tzv. *kompromisní kontroly nad astmatem*, kterou definuje i doporučení GINA [1]. Jde o takový stupeň kontroly, který co nejméně narušuje denní aktivity nemocného a vede k co nejmenšímu výskytu příznaků. Hlavním cílem je minimalizovat počet exacerbací, redukovat léčebnou polypragmázii, minimalizovat nutnost lékařských intervencí, případně nežádoucí účinky léčby a najít nejnižší úroveň náročnosti léčby, která ještě přináší pacientovi prospěch [2].

U nemocných s OLA je nutná spolupráce se specialisty jiných odborností (ORL, gastroenterolog, psychiatr, psycholog, foniatr) a opakované sledování compliance a trpělivá edukace pacienta. I pro OLA platí doporučení dosažení kompromisní kontroly nad astmatem, je nutné se vyvarovat zbytečné polypragmázii [14].

1.1.4. PÉČE O PACIENTY S TĚŽKÝMI FORMAMI ASTMATU (OLA, TRA)

Pacienti s těžkými formami astmatu by měli být dispenzarizováni ve specializovaných centrech s dostupností náročnějších vyšetřovacích metod a zkušenostmi s neinvazivním i invazivním sledováním aktivity zánětu dýchacích cest. Vždy je nutné pro tyto pacienty zajistit individuální přístup a dostupnost kvalitní multidisciplinární spolupráce. Lékař primární péče by

měl nemocného k vyšetření do specializovaného centra odeslat vždy, když se nedaří dostat astma pod uspokojivou kontrolu v posledních 6 měsících, i přestože pacient dobře spolupracuje, dodržuje režimová opatření a je správně léčen podle současných doporučení včetně vysokých dávek inhalačních kortikosteroidů. Jednoznačně by zde měli být vyšetřeni všichni pacienti, u kterých je zvažována trvalá léčba systémovými kortikosteroidy nebo kde si tíže astmatu vynutila téměř trvalou léčbu systémově podávanými kortikosteroidy v posledních 6 měsících.

V centru pro těžké astma je důležité nejprve provést standardizovaný diagnostický postup (tabulka 2) dle platných doporučených postupů [14-16].

Tabulka 2 Přístup k těžkému refrakternímu astmatu a obtížně léčitelnému astmatu [16]

- potvrzení diagnózy astmatu
- edukace režimových opatření a kontrola inhalační techniky
- zhodnocení spolupráce pacienta a zlepšení compliance k léčbě
- posouzení environmentální či profesní expozice spouštěčům astmatu
- zhodnocení rezerv v léčbě dle GINA doporučení
- vyloučení/potvrzení komorbidit a komplikujících faktorů astmatu
- individualizace léčby podle fenotypu
- monitorace aktivity astmatu a klinické stability nemoci

Nejdůležitější je kriticky zhodnotit správnost diagnózy astmatu, protože některá onemocnění mohou svým průběhem těžké astma napodobovat (tabulka 3).

Dále je nutné posoudit rezervy v léčbě astmatu, správnost inhalační techniky a compliance nemocného k doporučené léčbě a režimovým opatřením. Především je důležité vyvarovat se kontaktu se spouštěči astmatu (alergeny, profesní noxy).

Další součástí komplexního přešetření pacienta s těžkým astmatem je sledování přítomnosti komorbidit asociovaných s astmatem. Komorbidity mohou pacienty obtěžovat

Tabulka 3 Patologické stavy imitující těžké astma

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Cystická fibróza • Bronchiektázie • Aspirace cizího tělesa • Tracheobronchomalacie • Opakované aspirace • Chronická obstrukční plicní nemoc | <ul style="list-style-type: none"> • Městnavé srdeční selhání • Tumory nebo útlaky centrálních dýchacích cest • Obstruktivní bronchiolitida • Dyskineza hlasových vazů • Bronchiální amyloidóza • Dyskineza hlasových vazů |
|--|--|

vlastní symptomatologii nebo se podílet na potenciaci zánětu dýchacích cest a mohou tedy být příčinou špatné odpovědi na antiastmatickou léčbu. Častou komorbiditou je perzistující rinosinitida s nosními polypy, která předznamenává špatnou prognózu astmatu a vyskytuje se u 50% pacientů s těžkým astmatem. Nejúpornější nosní polypózy provázejí eozinofilní nealergické astma vzniklé v dospělosti. V souvislosti s nosními polypy je nutné myslet u pacientů s astmatem na aspirinovou hypersenzitivitu, kterou lze nalézt u 36-96% astmatiků s nosními polypy. Důsledná léčba rinosinitidy obvykle vede k významnému zlepšení kontroly astmatu.

Velmi důležité u aspirin-senzitivních pacientů je vyloučení užívání nesteroidních antirevmatik [17].

Další častou komorbiditou je extraesofageální refluxní nemoc (GERD), kterou lze nalézt u 38-80% pacientů s astmatem. U třetiny pacientů s astmatem nemusí být projevy GERD vyjádřeny a přesto může zhoršovat průběh astmatu [18]. Na GERD je nutné myslet v případě zhoršování symptomů astmatu v případě kašle vázaného na změnu polohy těla, zhoršování symptomů v souvislosti s jídlem, ve spánku a při dyspepsiích. Byl prokázán vliv refluxu žaludečních šťáv na zhoršení symptomů astmatu, buď nepřímo prostřednictvím esofago-bronchiálního reflexu nebo přímo chemickým působením obsahu mikroaspirací na sliznici dýchacích cest. Reflux může vzniknout na podkladě oslabení tonu dolního jícnového svěrače při anatomické predispozici (hiátová hernie), vlivem léčby beta-2-mimetiky a teofylliny, oploštěním bránice při air-trappingu nebo zvýšením nitrobřišního tlaku. Diagnostickou metodou volby je 24-hodinová jícnová pH-impedance nebo dvoukanálová pH-metrie, kterou doporučujeme u všech pacientů s podezřením na těžké astma nereagující na léčbu, event. lze provést gastrokopii s odběry biopsií nad a pod Z linií. V léčbě se užívají režimová opatření, prokinetika, inhibitory protonové pumpy a režimová opatření. Léčebné výsledky studií s těmito léky u nemocných s astmatem a symptomatickým GERD však nedopadly příznivě, nebylo jednoznačně prokázáno zlepšení symptomů astmatu, kvality života ani plicních funkcí [19].

Průběh astmatu i odpověď na léčbu zhoršují psychosociální komorbidity a nespolupráce pacienta v léčbě. Pacienti s těžkými formami astmatu mají vyšší riziko nedodržení léčebného režimu z mnoha důvodů. Potřebují větší množství léků ke kontrole astmatu a mají častější komorbidity. TRA často vede k depresím a anxiositě až u třetiny nemocných (panické ataky, sociální fobie). V důsledku těchto vlivů pak pacienti nedodrží předepsané schéma inhalační léčby, mnohdy si nevyzvedávají předepsané léky. Je proto nutné ověřovat skutečnost reálně spotřebované léčby, vést záznamy o předpisech léků a počítání spotřebovaných dávek. Psychosociální komorbidity zhoršují léčebné výsledky astmatu. Je třeba na ně v klinické praxi myslet a ve spolupráci s psychologem a psychiatrem adekvátně léčit [20].

Astma mohou komplikovat i vzácnější komorbidity jako je syndrom Churg-Straussové, alergická broncho-pulmonální aspergilóza. Častým problémem je u obézních pacientů syndrom spánkové apnoe. Astma může být zhoršováno vedlejšími účinky jiné léčby – ACE inhibitory, aspirin, nesteroidní antirevmatika, β -blokátory [21].

Dyskineza hlasových vazů (VCD) může astma napodobovat nebo s astmatem koexistovat a zhoršovat astmatické symptomy. VCD je popisný termín pro patologickou neadekvátní addukci hlasových vazů během dýchání, které vede k pískotům při dýchání a pocitům dušnosti. Etiologie VCD není dosud objasněna, předpokládá se psychologická abnormalita (konverzní porucha,

anxiozita, histrionská poruchy osobnosti, psychosomatické onemocnění, deprese). Výskyt VCD u astmatu může být relativně častý 10-30% [22].

V případě potvrzení obtížně léčitelného astmatu, kde komorbidity a nespolupráce pacienta zhoršují kontrolu nemoci je vhodné opakovaně nemocného edukovat o režimových opatřeních, sledovat compliance pacienta, spolupracovat s lékaři jiných specializací při diagnostice a léčbě komplikujících faktorů a komorbidit astmatu.

U pacientů, kde extenzivní vyšetřovací a maximální léčebné úsilí v průběhu 6 měsíců nevede k dosažení kontroly nad astmatem, je třeba nemocného klasifikovat jako *těžké refrakterní astma*. V těchto případech se snažíme o dosažení kompromisní kontroly astmatu, tak aby pacient zbytečně nebyl exponován vedlejšími účinkům léčby a vyšetřovacích metod. Současně je důležité detailně poznat fenotyp astmatu a nabídnout nemocnému fenotypově specifickou léčbu (např. omalizumab, mepolizumab, makrolidy) [11, 23].

1.1.5. CHARAKTERISTIKA TĚŽKÉHO ASTMATU V MULTICENTRICKÝCH STUDIÍCH

Nejednoznačné definice těžkých forem astmatu z počátku 90. let minulého století ovlivnily design observačních a farmakologických studií u těchto pacientů v dalších letech. Výsledkem provedených studií bylo zjištění výrazné klinické heterogenity těžkých forem astmatu. V posledních letech po sjednocení definice TRA je věnována velká pozornost rozpoznání klinických a zánětlivých charakteristik této varianty astmatu s cílem určit budoucí léčebné strategie. Nejvýznamnějšími projekty jsou multicentrické studie U-BIOPRED a SARP, které se snaží identifikovat nové biomarkery a klinické fenotypy TRA pomocí analýzy observačních, genomických, proteomických a metabolomických metod [24, 25]. U-BIOPRED (Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcome) je projekt iniciovaný společností Evropské inovativní medicíny, která je podporovaná grantovým rozvojovým projektem Evropské unie. Nejzkušenější pracoviště v problematice těžkých forem astmatu v Evropě provádí v tomto projektu prospektivní studii na pacientech s nejtěžšími formami astmatu. Cílem U-BIOPRED je provést u nemocných komplexní a maximálně objektivní funkční genomickou analýzu, aby bylo možné popsat jejich fenotypy. U-BIOPRED usiluje o nalezení nových diagnostických biomarkerů specifických pro konkrétní fenotypy těžkých forem astmatu a také se snaží najít nové buněčné a molekulární cíle patofyziologických procesů pro možné budoucí terapeutické intervence [25].

Severe Asthma Research Project (SARP) sledoval 3 skupiny pacientů s různou tíží astmatu. Cílovou skupinou bylo zjeměna 204 pacientů s těžkým refrakterním astmatem v 10 centrech v USA a Velké Británii. Projekt SARP porovnával jejich data se 70 pacienty se středně těžkým perzistujícím astmatem a 164 lehkými astmatiky. SARP prokázal u TRA pacientů delší trvání astmatu, výraznější symptomy, častější potřebu urgentní lékařské pomoci, méně atopie a

výraznější bronchiální obstrukci a její menší reverzibilitu. U TRA byla častější aspirinová senzitivita, refluxní nemoc a rinosinusitida. SARP identifikoval rizikové faktory pro vznik těžkého refrakterního astmatu: pokles FEV1 o 5% za rok, anamnéza pneumonie, nízký počet bazofilů periferní krve, symptomy astmatu již při běžné denní zátěži, nižší výskyt atopie. Významnou roli hraje věk v době vzniku astmatu. Nemocní s astmatem vzniklým po 12 roku věku měli horší plicní funkce, přestože jejich astma trvalo kratší dobu a měli méně výraznou bronchiální hyperreaktivitu. Naopak astma vzniklé v dětství (před 12 rokem věku) bylo spojeno s častějším alergickými projevy a výraznější bronchiální hyperreaktivitou [26].

Kromě těchto běžících projektů jsou k dispozici již známé výsledky starších multicentrických studií sledujících těžké astmatiky, které již přinesly poznání specifické vlastnosti těžkých forem astmatu a byly tak zjištěny nové potenciální cíle pro fenotypově specifickou léčbu astmatu. Původní definice těžkého refrakterního astmatu (viz kapitola 1.1.4.) byly víceméně popisné a hlavním kritériem této diagnózy byla špatná léčebná odpověď na kortikoterapii. Z těchto důvodů studie popisující klinické funkční a morfologické fenotypy astmatu vykazovaly výraznou heterogenitu v klinickém průběhu i ve spektru biomarkerů zánětu dýchacích cest.

Nejstarší takovou prací mezinárodního významu byla studie ENFUMOSA sledující systematickým protokolem ve 13 státech Evropské unie 163 nemocných s těžkým astmatem a současně 158 astmatiků plně kontrolovaných léčbou střední dávkou inhalačních kortikosteroidů (IKS). ENFUMOSA prokázala asociaci těžkého astmatu s obezitou, častěji u žen středního věku, s celoročními příznaky, exacerbacemi v podzimním období a fixovanou bronchiální obstrukcí. Těžké astma mělo menší asociaci s atopií a nižší hodnotou celkového IgE a vyšší podíl neutrofilů v indukovaném sputu a současně zvýšenou hodnotou vydechovaného oxidu dusnatého. Užívání aspirinu bylo rizikovým faktorem pro těžký průběh astmatu [27].

K poznání fenotypů těžkého astmatu přispělo také pracoviště v Leidenu v Nizozemí. Prokázali častější asociaci těžkého refrakterního astmatu s častými respiračními infekcemi, rinosinusitidou, psychosociálními komorbiditami, refluxní nemocí jícnu, syndromem spánkové apnoe a častými exacerbacemi [28].

1.1.6. KLINICKÝ PRŮBĚH TĚŽKÉHO ASTMATU A FENOTYPIZACE ASTMATU

U těžkých forem astmatu se v klinické praxi setkáváme s výraznou heterogenitou klinického průběhu nemoci - s různými fenotypy. Určení klinického a zánětlivého fenotypu těžkého astmatu je důležité zejména při zjevné rezistenci k protizánětlivé léčbě kortikosteroidy. V těchto případech lze nemocným nabídnout jiný protizánětlivý lék či postup specifický pro konkrétní fenotyp astmatu. Dosud nebyl přijat univerzální pohled na fenotypy těžkého astmatu.

V literatuře byla publikováno několik koncepcí fenotypového rozdělení astmatu, které vznikly dlouholetým sledováním těžkých astmatiků ve specializovaných centrech.

Podle dlouholetého pozorování klinického průběhu svých pacientů s těžkými formami astmatu byly popsány např. nizozemskými autory tyto fenotypy: *aspirin-senzitivní astma*, *astma s fixovanou bronchiální obstrukcí*, *profesní astma*, *eosinofilní a non-eosinofilní astma* a dále *téměř smrtelné astma*, *astma s fixovanou bronchiální obstrukcí*, *astma rezistentní vůči kortikosteroidům* [28].

Podrobnější rozpracování fenotypů astmatu popsali autoři z centra pro těžké astma v Denveru v USA. Fenotypy rozdělili do tří skupiny (tabulka 4) a překryv některých fenotypů vyjádřili ve formě komplikovaných Vennových diagramů [29].

Tabulka 4 Fenotypové kategorie těžkého refrakterního astmatu [29]		
Klinický fenotyp	Fenotyp dle spouštěče	Zánětlivý fenotyp
<ul style="list-style-type: none"> tíže astmatu dle GINA s četnými exacerbacemi s fixovanou obstrukcí rezistentní na léčbu dle věku vzniku astmatu 	<ul style="list-style-type: none"> aspirin a NSAID environment. alergenů profesní spouštěče menstruace námaha 	<ul style="list-style-type: none"> eosinofilní neutrofilní pauci-granulocytární

1.1.6.1. Fenotyp TRA dle klinického průběhu

Podle této koncepce se u těžkého astmatu setkáváme nejčastěji s fenotypem častých exacerbací a s fenotypem fixované bronchiální obstrukce.

a) *Fenotyp častých exacerbací* se vyskytuje např. až u 40% pacientů v SARP projektu [26]. Rizikovými faktory pro tento fenotyp astmatu jsou přítomnost atopie, nízké plicní funkce, astma vzniklé v dětství, aspirinová senzitivita, perimenstruální astma a deprese vedoucí k non-compliance pacienta. Astmatici s fenotypem častých exacerbací mívají často abnormální vnímání intenzity symptomů počínajícího zhoršení obstrukce dýchacích cest a větší množství eosinofilů ve sliznici dýchacích cest.

b) *Fenotyp fixované bronchiální obstrukce* je typický nízkým výskytem exacerbací, avšak trvalými obtížemi, zejména námahovou dušností. Rizikovými faktory pro tento průběh těžkého astmatu jsou mužské pohlaví a méně častý výskyt alergie. Genetické studie zjistily výraznou asociaci s jednonukleotidovým polymorfismem genů ADAM 33, IL-4, IL4-R a TGF- β ₁. Polymorfismus genu pro IL-4 je asociován s rizikem výskytu téměř smrtelných exacerbací astmatu [29].

1.1.6.2. Fenotyp TRA dle spouštěče

Klinicky dobře diferencovatelný fenotyp představují pacienti se *senzitivitou k aspirinu*, který nalzáme u 10-25% TRA. Nejčastěji se vyskytuje u žen s astmatem vzniklým v dospělosti,

s nižším výskytem atopie, s vyšším počtem eosinofilů v periferní krvi a dýchacích cestách, zvýšenou koncentrací leukotrienů v dýchacích cestách. Typicky toto astma vzniká ve třetím až čtvrtém decenniu rozvojem těžké rinosinusitidy s nosními polypy a následně těžkým průběhem astmatu. Tito nemocní často špatně odpovídají na kortikosteroidy, až v 50 % je nutná systémová kortikoterapie; léčbou volby jsou antileukotrieny [23].

1.1.6.3. Fenotyp TRA dle typu zánětu bronchiální stěny

Typ převládající buněčné populace v bronchiální stěně předurčuje klinický průběh astmatu a odezvu na protizánětlivou léčbu. První morfologické studie nalézaly převážně eozinofilní a lymfocytární infiltraci dýchacích cest. Při léčbě se výskyt eosinofilů v dýchacích cestách snižoval současně se zlepšením kontroly nemoci a plicních funkcí. Dnes víme, že astma může probíhat pod typickým klinickým obrazem i bez přítomnosti eosinofilů v bronchiální submukóze. Na základě převládající buněčné populace dýchacích cest vyšetřené biopticky nebo analýzou indukovaného sputa rozdělujeme astma do tří zánětlivých fenotypů, které mají odlišné klinické a patofyziologické charakteristiky – eosinofilní, neutrofilní a paucigranulocytární [30]. Sledování buněčného fenotypu astmatu je důležité, protože může ovlivnit léčebné postupy. Léčba astmatu je podle počtu eosinofilů ve sputu účinnější než konvenční postup zahrnující sledování symptomů a úlevovou léčbu [31].

a) *Eosinofilní astma* je nejlépe prostudovaný buněčný fenotyp astmatu, který je přítomen až u 50 % všech astmatiků. U léčených pacientů s lehkým a středně těžkým astmatem se s nálezem eosinofilů můžeme setkat při vyšetření biopsie dýchacích cest nebo indukovaného sputa vzácněji, protože inhalační kortikosteroidy účinně kontrolují eosinofilní zánět u těchto nemocných. U těžkého astmatu je trvalý eosinofilní zánět dýchacích cest asociován s astmatem vzniklým v dospělosti, aspirinovou senzitivitou a kortikorezistencí. Tito nemocní mají často výrazné symptomy, vyšší riziko exacerbací a zhoršení plicních funkcí. Jednoduchým biomarkerem eosinofilního zánětu dýchacích cest je vyšetření koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého, který koreluje s počtem eosinofilů v indukovaném sputu, eosinofilii periferní krve nebo eozinofilii v histologii endobronchiální biopsie [32]. Protizánětlivá léčba astmatu cílená podle eosinofilie indukovaného sputa vede k lepšímu snížení počtu exacerbací než je léčba dle symptomů a doporučení GINA [33].

b) *neutrofilní astma* se vyskytuje také až u poloviny pacientů s TRA. Příčina neutrofilního zánětu není jasná, předpokládá se vliv zevních faktorů (kouření, opakované infekce, expozice dráždivým látkám) na vnímavého jedince. Neutrofilní astma je asociováno s vyšší produkcí IL-8 a matrix-metaloproteázy-9. Aktivace těchto enzymů může vést k remodelaci bronchiální stěny a častěji vede ke vzniku fixované obstrukci dýchacích cest. Odpověď na kortikosteroidy je u neutrofilního astmatu malá, jsou důkazy o pozitivním efektu makrolidů [10, 34].

c) *paucigranulocytární astma* je v literatuře zmiňováno jen v několika zdrojích jako fenotyp chudý na granulocyty. Tito nemocní mají rezistenci ke kortikosteroidům, typické klinické charakteristiky však nebyly popsány [30].

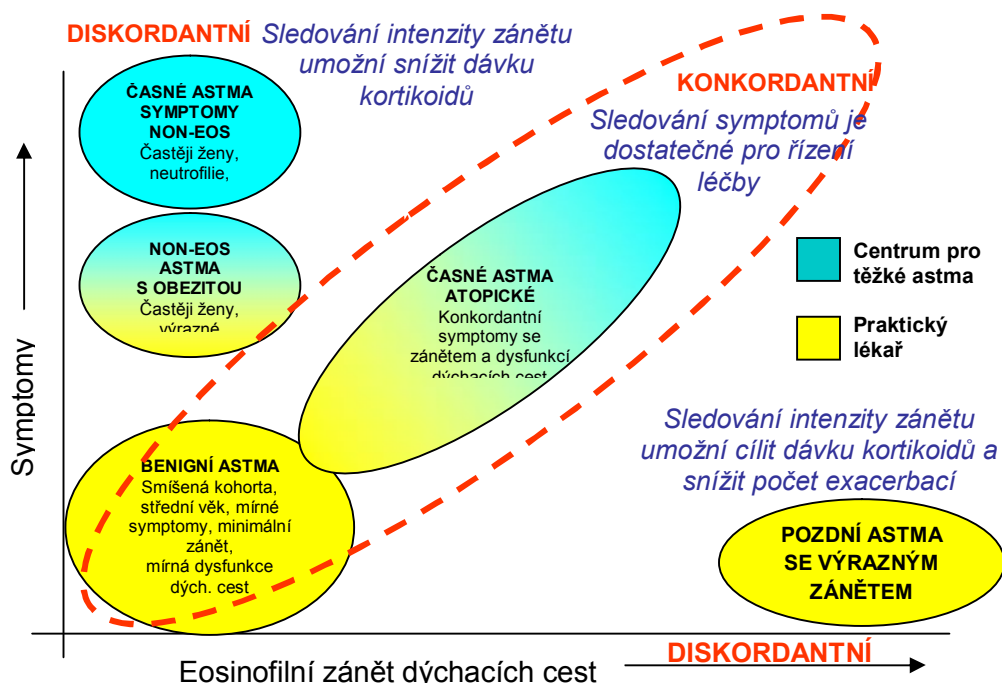
1.1.7. KLASTROVÁ ANALÝZA TĚŽKÉHO REFRAKTERNÍHO ASTMATU

Systematický pohled na problematiku fenotypů astmatu přinesla práce centra pro těžké astma v Leicesteru ve Velké Británii [35]. V této studii byla použita statistická metoda klastrové analýzy ke sledování vztahů a společných charakteristik heterogenní skupiny 187 nemocných s těžkým astmatem dle kritérií ATS sledovaných ve specializovaném centru a 184 lehkých astmatiků. Popsané fenotypy v době publikace této práce zavedly systematický přístup do klasifikace fenotypů astmatu podmíněně mnohdy subjektivním hodnocením, navíc byly poprvé navrženy fenotypově specifické léčebné postupy. V průběhu dvou let byli nemocní sledováni na přítomnost vybraných klinických charakteristik – přítomnost nosních polypů, aspirinová senzitivita, adherence kléčbě, frekvence exacerbací během dvou let, u části souboru bylo vyšetřováno indukované sputum. Za validní bylo možné považovat data 68 pacientů z obou skupin k provedení klastrové analýzy. Do konečné analýzy byly vybrány parametry, které byly považovány za důležité pro určení fenotypu astmatu. Klastrová analýza identifikovala jen několik fenotypů astmatu v obou skupinách (tabulka 5).

Tabulka 5 Fenotypy astmatu v primární péči a v centru pro těžké astma [35]	
Skupina A - lehké astma (péče praktických lékařů)	Skupina B - těžké refrakterní astma (péče specializovaného centra)
Časně vzniklé atopické astma	Časně vzniklé atopické astma
Non-eosinofilní astma asociované s obezitou	Non-eosinofilní astma asociované s obezitou
Benigní astma	Časně vzniklé non-eosinofilní astma s výraznými symptomy
	Pozdně vzniklé eosinofilní astma s převládajícím zánětem

Obě skupiny nemocných sdílí dva stejné fenotypy – *časně vzniklé atopické astma* a *non-eosinofilní astma asociované s obezitou*. Rozdíl mezi těmito fenotypy ve skupině A a B spočíval v rozdílu absolutních hodnot jednotlivých parametrů. Ve skupině B (těžké astma) byly dysfunkce dýchacích cest, symptomy i intenzita eosinofilního zánětu závažnější a byla nutná léčba vyššími dávkami inhalačních kortikosteroidů. Autoři nově popsali diskordantní variantu astmatu, kdy intenzita eosinofilního zánětu neodpovídá symptomům astmatu (obrázek 1).

Obr. 1 Klastrová analýza fenotypů astmatu (Haldar et al) (3)



Specifickou skupinou s největším počtem nemocných v primární péči bylo tzv. *benigní astma*. Tito pacienti měli minimální symptomy, dobrou kontrolu nemoci. Parametry zánětu a spirometrické hodnoty byly u většiny těchto astmatiků normální a u 58 % z nich nebyla zjištěna výrazná bronchiální hyperreaktivita bronchoprovokačním testem s metacholinem. Výskyt exacerbací a hospitalizací pro astma byl v tomto klastru velmi malý. Symptomy těchto pacientů odpovídaly eozinofilii dýchacích cest a tyto nemocné lze tedy léčit na základě současných doporučení GINA dle symptomů a spirometrie.

Specifickými skupinami pro těžké refrakterní astma byly fenotyp *časně vzniklého non-eozinofilního astmatu s výraznými symptomy*, kde převládaly ženy s astmatem vzniklým v dětství, nízkou koncentrací vydechaného oxidu dusnatého, neutrofilii dýchacích cest. Tito nemocní intenzivně vnímají symptomy astmatu, přestože nemají eozinofilii dýchacích cest. Jsou proto ohrožení nežádoucími účinky neadekvátně vysokých dávek kortikoterapie. Péče o tuto skupinu astmatiků by měla spočívat v dosažení kompromisní kontroly astmatu při nízké dávce inhalačních kortikosteroidů a redukci polypragmazií. Druhým specifickým fenotypem pro těžké refrakterní astma je *pozdě vzniklé eozinofilní astma s převládajícím zánětem*, které častěji postihuje muže, kteří mají i přes léčbu IKS perzistující eozinofilii dýchacích cest. Sledování cytologie indukovaného sputa a vydechaného NO může být účinným postupem řízení intenzity protizánětlivé léčby u této skupiny pacientů. Jsou více ohroženi rozvojem nevratných remodelačních změn dýchacích cest v důsledku „podléčení“ nedostatečnými dávkami protizánětlivé léčby.

U non-eosinofilních pacientů s predominantními symptomy je etiologie dechových obtíží spíše multifaktoriální a není úzce spjata s eosinofilním zánětem, proto jsou ohroženi předávkováním kortikosteroidy. Použití sledování cytologie indukovaného sputa nebo analýza vydechovaného FeNO umožní snížit dávku steroidů na kompromisní úroveň, tak aby nebyl pacient poškozován zbytečně vysokými dávkami léku. Naopak skupina astmatiků s predominantním zánětem je ohrožena podáváním nedostatečných dávek kortikosteroidů, protože nemají výrazné symptomy. Nekontrolovaný výrazný eosinofilní zánět dýchacích cest je pak spojen s vyšší pravděpodobností poklesu plicních funkcí v čase a častějším výskytem exacerbací. Sledování intenzity zánětu vedlo u této skupiny pacientů k desetinasobně nižšímu výskytu exacerbací. Autoři v závěru této práce předpokládají, že sledování klinických fenotypů astmatu může již dnes přinést pacientům významný prospěch. Zároveň jde o dobrý základ pro provádění fenotypově specifických farmakologických studií a molekulárních a genetických studií, které by objasnily příčiny vedoucí k vývoji příslušného klinického fenotypu.

Často pozorovanou komorbiditou těžkého astmatu je v těchto fenotypových studiích obezita. Dosud nebyl objasněn vztah a kauzalita obezity a astmatu. Popisné práce prokazují asi 4,7 x vyšší riziko vzniku astmatu u pacientů, kteří přiberou od 18 let věku více než 50kg hmotnosti oproti pacientům bez váhového přírůstku. Naopak cílený váhový úbytek zlepšuje plicní funkce a subjektivní vnímání dušnosti. U obézních astmatiků byla zjištěna zvýšená produkce prozánětlivých adipokinů v tukové tkáni, zejména leptinu, který se váže na bronchiální epitel a podílí se na vzniku bronchiální hyperreaktivity [36]. Obezita je rizikovým faktorem pro další komorbidity ovlivňující kontrolu astmatu jako je GERD nebo syndrom spánkové apnoe. Obézní mají sníženou funkční reziduální kapacitu díky deflačnímu postavení hrudníku, což vede ke zúžení malých dýchacích cest a zvýšení bronchiální hyperreaktivity. Přestože dosud kauzalita obezity a těžkého astmatu není jednoznačná, je u těžkého astmatu doporučována redukce nadváhy [37].

1.1.7. SPECIFICKÉ MECHANISMY TĚŽKÉHO REFRAKTERNÍHO ASTMATU

U TRA je často přítomná špatná odezva na léčbu kortikosteroidy (KS). Tyto léky působí přímým inhibičním vlivem na makrofágy, T-lymfocyty, eosinofily, mastocyty a buňky epitelu a hladké svaloviny dýchacích cest. Blokují v plicní tkáni funkci aktivátorů transkripce (NF- κ B, AP-1, STAT) a tím snižují tvorbu zánětlivých cytokinů a chemokinů (IL-1- α , IL-4, IL-5, IL-8, GM-CSF, TNF- α) a naopak stimulují produkci protizánětlivého cytokinu IL-10 v alveolárních makrofázích.

U astmatu kortikosteroidy snižují počty zánětlivých buněk v bronchiální stěně a inhibují její remodelační změny. Těžké refrakterní astma může být způsobeno kortiko-rezistencí nebo může být spojeno s kortiko-dependencí.

Kortikorezistence je klinicky definována jako chybějící zlepšení FEV1 o více než 15% po 5-10-ti denní léčbě prednisolonem 40mg denně, přestože po podání beta-2-mimetika se FEV1 zlepší o více než 30%.

Kortikodependence je stav, kdy kortikoidy mají částečný klinický efekt a jejich vysazení není možné pro rapidní klinické i funkční zhoršení stavu astmatika. Přesný mechanismus kortikorezistence u astmatu není znám. Příčiny nestandardní odpovědi na KS nejsou způsobeny malabsorbci, odchylkami ve farmakokinetice ani ve vazbě na cytoplasmatický receptor. Předpokládá se nadměrná aktivace p38 MAPK kinázy s následnou nadměrnou transkripcí prozánětlivých mediátorů, nedostatek aktivního vitamínu D, který je důležitý pro tvorbu protizánětlivého IL-10. Nejčastěji je kortikorezistence vysvětlována abnormální expresí rozdělené mRNA receptoru pro KS, takže dojde k transkripci dvou isoformů cytoplasmatického receptoru GCR- α a GCR- β [38]. Právě GCR- β je častěji zvýšen u těžkého refrakterního astmatu. GCR- β je invalidní receptor, který neumožňuje vazbu KS a nevytvoří komplex KS s receptorem, tedy ani translokace tohoto komplexu do jádřerka buňky není možná. Vznik kortikorezistence je vysvětlován také působením exogenního i endogenního oxidativního stresu, který vede k poškození struktur buňky. Jedním z enzymů, který může být oxidativním stresem poškozen je například histon-deacetyláza (HDAC-2), která je důležitá pro funkční GCR- α transrepresi prozánětlivých genů [5, 39].

Dalším specifickým rysem některých pacientů s těžkým refrakterním astmatem je fixovaná bronchiální obstrukce (FBO). U astmatu lze výskyt FBO pozorovat i u lehkého a středně těžkého astmatu v 16% resp. v 23%, u těžkých forem astmatu je FBO přítomno u téměř 50% pacientů [40]. FBO nemá standardizovanou definici, v klinických studiích je používáno kritérium nezlepšení plicních funkcí k normálním hodnotám i přes adekvátně vysokou dávku IKS po dobu 4 týdnů.

Byla prokázána genetická vazba FBO na gen pro metaloproteinázu 33 (ADAM 33). Patologickým podkladem FBO je pokročilá remodelace stěny bronchů trvajícím zánětem, které mění mechanické vlastnosti dýchacích cest. Předpokládán je i možný spolupodíl rozvolnění elastického napětí (elastic recoil) malých bronchů, které kolabují [40].

Rizikovými faktory FBO dle observačních studií jsou astma vzniklé v dětství, kouření cigaret, ženské pohlaví a fenotyp non-eozinofilního astmatu vzniklého v dospělosti, dále profesní škodliviny a alergická přecitlivělost vůči plísním rodu aspergillus [41]. Nejčastěji uváděnou příčinou poklesu plicních funkcí u astmatu je perzistující nekontrolovaný eozinofilní zánět stěny bronchů, který vede k jejich intenzivní remodelaci [42]. Studie TENOR prokázala vztah trvalé eozinofilie dýchacích cest (dle FeNO) k rozvoji FBO [43]. Perzistující eozinofilie v prvních 25 letech života astmatiku predikuje trvalou FBO v dospělosti. Dalším rizikovým faktorem FBO je trvalá bronchiální hyperreaktivita a časté exacerbace astmatu. Vliv na rozvoj FBO má

pochopitelně i non-compliance pacienta k léčbě a kouření. Astmatici s FBO mají horší prognózu a kvalitu života, mají každodenní námahovou dušnost a omezenou toleranci zátěže kvůli dynamické hyperinflaci. Na rozdíl od CHOPN je u pacientů s astmatem a FBO stále přítomná bronchiální hyperreaktivita a po podání systémové kortikoterapie dojde ke zlepšení plicních funkcí [44]. Prevencí rozvoje FBO u astmatu je řádná léčba adekvátními dávkami inhalačních kortikosteroidů (IKS). Perspektivní metodou může být bronchiální termoplastika (viz. níže)[45].

1.1.8. MOŽNOSTI LÉČBY TĚŽKÝCH FOREM ASTMATU

Léčba astmatu je definována v platném doporučení GINA. Obecnými zásadami úspěchu léčby nejen u těžkých pacientů je compliance pacienta, kvalitní technika použití inhalačních forem léků a individuálně zvolené terapeutické schéma [1]. V současnosti navrhuje doporučení GINA pro nemocné s těžkým refrakterním astmatem dosažení tzv. *kompromisní kontroly astmatu*. Pokud není možné dosáhnout plné kontroly astmatu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem vysokými dávkami protizánětlivých a úlevových léků včetně systémově podávané kortikoterapie, pak je doporučováno snížit dávky léků tak, aby pacient měl prospěch z jejich účinku a netrpěl polypragmázií a následky vedlejších efektů různých léků a lékových interakcí.

U části pacientů s perzistujícím eozinofilním fenotypem je možné tolerovat i vyšší dávky inhalačních kortikosteroidů (nad 2000 µg), lze zvážit podávání systémové pulzní léčby kortikosteroidy nebo podání depotního kortikosteroidu. Je důležité věnovat pozornost známým vedlejším účinkům kortikoterapie a bojovat proti jejich manifestaci (prevence a léčba osteoporózy, sledování mineralogramu, gastroprotektce) [2].

Farmakologický výzkum se v minulých desetiletích soustředil především na potlačení Th-2 zánětlivé odpovědi a eozinofilního zánětu u astmatu, který dobře odpovídá na kortikosteroidy. Nové potentní IKS jsou k dispozici ve formě velmi malých částic v sofistikovaných inhalátorech, jejich depozice v periferních dýchacích cestách stoupá. Kombinace IKS s dlouhodobě působícími β_2 -sympatomimetiky (LABA), antileukotrieny a nově i biologická léčba ve formě anti-IgE protilátky jsou účinnými nástroji v kontrole alergického eozinofilního astmatu.

U pacientů s těžkými formami astmatu je situace komplikovanější. U obtížně léčitelného astmatu je dominující příčinou špatných léčebných výsledků nespolupráce pacienta (trvajících expozice spouštěčům astmatu, nedodržování předepsané léčby, špatná technika inhalace), nebo může být astma komplikováno komorbiditami, které samy potencují zánět dýchacích cest či obtěžují pacienta dalšími specifickými příznaky.

U těžkého refrakterního astmatu je rezistence k léčbě podmíněna vyšší intenzitou eozinofilního zánětu nebo non-eozinofilním zánětem dýchacích cest. Tito nemocní obvykle nedosahují uspokojivé kontroly astmatu v doporučení GINA uváděnou protizánětlivou a bronchodilatační léčbou. U eozinofilního těžkého refrakterního astmatu je perzistující eozinofilie

dýchacích cest i přes léčbu vysokými dávkami IKS či systémovou kortikoterapii (SKS) způsobena mechanismy kortikorezistence. Tento fenotyp TRA je vhodný k biologické léčbě anti-eozinofilními preparáty (např. anti-IL-5 - mepolizumab, reslizumab) [39]. U non-eozinofilního těžkého refrakterního astmatu je účinnost kortikosteroidů problematická a jiné léčebné možnosti jsou dosti omezené, lze zvážit makrolidy [10, 34]. Obecně je u těžkého refrakterního astmatu nutné poznat zánětlivý a klinický fenotyp nemoci a najít fenotypově specifickou léčbu, pokud existuje.

Dosud byla publikována již celá řada farmakologických studií testující efekt léčiv proti specifickému zánětlivému fenotypu astmatu. Některé z těchto léků byly původně použity u neselektované populace astmatiků, efekt se však projevil jen u konkrétního fenotypu nemoci při následných sub-analýzách. Například studie s podáním mepolizumabu (anti-IL-5) u fenotypově selektované populace těžkých astmatiků s perzistující eozinofilí v indukovaném sputu prokázala oproti placebo po 12 měsících léčby nižší výskyt exacerbací, zlepšení kvality života a snížení počtu eosinofilů ve sputu i v periferní krvi. Symptomy, bronchiální hyperreaktivita ani plicní funkce nebyly léčbou ovlivněny [8]. Za fenotypově specifickou léčbu je možné považovat např. podání makrolidů u neutrofilního astmatu nebo podání antileukotrienů u pacientů s prokázanou aspirinovou senzitivitou [10, 34, 46]. Pro fenotyp astmatiků s eozinofilním alergickým astmatem zprostředkovaným IgE je indikována biologická léčba omalizumabem (anti-IgE protilátka), která zlepšuje kvalitu života, zmírňuje symptomy při možnosti snížení dávek inhalačních steroidů [9]. Probíhající farmakologické fenotypově specifické studie u přísně vybraných skupin astmatiků sledují efekt nových biologických látek proti IL-5 (mepolizumab, reslizumab), IL-13 (lebrikizumab) nebo s inhibitory prozánětlivých kináz (NF- κ B, p38 MAPK) a prokazují určité pozitivní výsledky i u pacientů s TRA. [8-11, 39]. Tyto léky se však v klinické praxi objeví v horizontu několika let.

U těžkého astmatu je přítomna vysoká intenzita oxidativního a nitračního stresu produkovaného endogenními zánětlivými mechanismy. Oxidativní stres redukuje aktivitu histon-deacetylázy-2 (HDAC-2). Tento enzym se podílí na acylaci glukokortikoidního receptoru a tím brání transkripci NF- κ B stimulovaných zánětlivých mediátorů. Snížení aktivity HDAC-2 snižuje efektivitu působení kortikosteroidů [47]. Byla prokázána zvýšená exprese HDAC-2 v alveolárních makrofázích u CHOPN a těžkého astmatu. Jednoduše dostupným lékem potencujícím aktivitu HDAC-2 jsou teofylliny, které v nízkých dávkách u TRA zvyšují kortikosenzitivitu a zlepšují kontrolu astmatu [39]. Dalším aktivátorem HDAC-2 je tricyklické antidepresivum nortriptylin, avšak studie u astmatu dosud nebyly publikovány.

Některé studie potvrdily příznivý účinek inhibitorů receptorů CysLT1 na průběh astmatu, včetně těžkých forem. Podávání antileukotrienů umožnilo u těchto nemocných snížit dávku systémových KS, aniž by došlo ke zhoršení kontroly onemocnění. Rovněž je prokázán

jejich příznivý efekt u aspirin senzitivního astmatu, resp. u pacientů s rinosinuitidou a nosní polypózou [46, 48].

Klinické zkušenosti s alternativní terapií těžkého refrakterního astmatu nejsou povzbudivé. V literatuře lze nalézt zkušenosti s léčbou astmatu různými cytotoxickými a imunomodulačními léky jako např. vysoké dávky intravenózních imunoglobulinů, troleandomycin, aurothioterapie, antimalarika, metothrexát, cyklosporin A, azathioprin a další. Podání těchto léků většinou nesplnilo očekávání lékařů ani pacientů, nevykazovalo přesvědčivé výsledky a neprokázalo jednoznačnou efektivitu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem. Výskyt nežádoucích vedlejších účinků převyšoval benefit pro pacienta. Poslední doporučení GINA mění náhled na tyto léčebné postupy a vrací se zpět k systémové léčbě kortikosteroidy, které mají sice řadu nežádoucích účinků, přesto doposud představují multipotentní protizánětlivý lék a jeho nežádoucím účinkům lze předcházet a pečlivě je sledovat [49].

Pro pacienty s těžkým astmatem a s výraznou bronchiální hyperreaktivitou a hyperplazií hladké svaloviny je možné použití bronchiální termoplastiky. Jde o metodu, kdy je snížena kontraktibilita hladké svaloviny segmentárních bronchů aplikací radiofrekvenční tepelné energie. Na zvířecím modelu astmatu byla prokázána redukce hladké svaloviny bronchů. Bronchiální termoplastika je prováděna bronchoskopem ve 3 sezeních. Ve studii kontrolovaných falešnou bronchoskopickou procedurou byla prokázána redukce exacerbací astmatu a zlepšení kvality života a zvýšení počtu dnů bez symptomů astmatu s možností pobytu v zaměstnání nebo ve škole. Dosud jsou klinické zkušenosti u pacientů s mírnou bronchiální obstrukcí, data těžších pacientů s astmatem do této doby nebyla publikována [45].

1.2. PATOFYZIOLOGIE ZÁNĚTU DÝCHACÍCH CEST U ASTMATU

Průduškové astma je spojeno s nadměrnou bronchiální reaktivitou a s přítomností zánětu ve stěně bronchu, na kterém se podílí řada buněk a buněčných produktů. Poznání úlohy jednotlivých buněčných populací a jejich produktů (prozánětlivé mediátory a cytokiny) v iniciaci a perzistenci zánětu dýchacích cest u astmatu je důležité pro správnou interpretaci výsledků metod sledujících aktivitu zánětu dýchacích cest. Nejčastěji se v klinické praxi setkáváme s alergickým eozinofilním fenotypem astmatu, proto mu odborní literatura věnuje největší pozornost. Pečlivé sledování geneticky modifikovaných myších modelů astmatu přineslo poznání alergického zánětu dýchacích cest do nejmenších detailů na molekulární a genetické úrovni a poskytlo vysvětlení dobře známé asociace Th-2 zánětu s atopií, poznání úlohy eosinofilů i dalších buněk v zánětu stěny bronchu a popisu remodelace stěny bronchu zánětem.

Astma je komplexní onemocnění, kde se genetické faktory projevují v součinnosti s vlivem zevního prostředí. Alergický zánět se nejvíce projevuje v bariérových orgánech jako je sliznice dýchacích cest, oční spojivka, kůže a střevní sliznice [50]. Pro astma je typická bronchiální hyperreaktivita, kdy jsou bronchy nadměrně citlivé k bronchospasmu při kontaktu

s iritačními stimuly. Intenzita zánětu dýchacích cest koreluje se stupněm bronchiální hyperreaktivity (BHR) [51], která může být podmíněna i nealergickými stimuly (toxické noxy, virové infekce). V oblasti bronchiální stěny vede zánět k bronchokonstrikci podmíněné spasmem hladké svaloviny a retencí vazkého sekretu bronchiálních žlázek a pohárkových buněk. Malé dýchací cesty mohou být hlenem zcela obturovány a může tak dojít k nepoměru mezi ventilací a perfuzí [2, 52].

Alergen (antigen) se u senzibilizovaného atopického jedince po průniku povrchovými obrannými bariérami do podslizničního prostoru naváže na specifické protilátky třídy IgE a spouští alergickou reakci I. typu – IgE zprostředkovanou. Lokální akutní alergický zánět vzniká vazbou antigenu na imunoglobuliny třídy IgE na povrchu žírných buněk. Současně vznikají nové prozánětlivé mediátory aktivitou membránové fosfolipázy A2 z fosfolipidů buněčné membrány (prostaglandiny, leukotrieny, destičky aktivující faktor aj.). Th-2 lymfocyty svými cytokiny indukují zvýšenou expresi adhezivních molekul (VCAM, ICAM-1) na povrchu buněk endotelu cév v submukóze bronchiální stěny. Cirkulující eozinofily v periferní krvi se svými ligandy (VLA4) vážou na tyto adhezivní molekuly a prostupují z cév do tkání do místa alergického zánětu [1].

1.2.1. GENETIKA ATOPIE A BRONCHIÁLNÍ HYPERREAKTIVITY

Atopie představuje rizikový faktor pro vznik astmatu. Lze ji definovat jako vrozenou perzistující IgE mediovanou reaktivitu vůči běžným alergenům. Atopie je podmíněna polygenní dědičností, dnes je známých nejméně 25 kandidátních genů podmiňujících vnímavost k alergenům a vznik bronchiální hyperreaktivity [52]. Na 11q chromozomu byl lokalizován gen kódující β -podjednotku vysokoafinního IgE receptoru (Fc ϵ RI). Tato β -podjednotka mnohonásobně navyšuje odpověď tohoto receptoru na aktivaci a stabilizuje jeho expresi na povrchu mastocytů. Polymorfismy v β -podjednotce jsou spojovány s astmatem, alergií, atopickým ekzémem a bronchiální hyperreaktivitou. Na 6 chromozomu byla identifikována skupina genů, které determinují MHC (hlavní histokompatibilní komplex) a transkripci řady transmembránových proteinů a receptorů. Tyto látky se uplatňují v prezentaci antigenů receptorům na T-lymfocytech. Variabilita genové sekvence v oblasti 6 chromozomu kódující MHC může předurčovat jaké antigeny je daný jedinec schopen prezentovat T-lymfocytům. Byla prokázána asociace mezi sekvencí 6p21.3-23 a astmatem. Na 6 chromozomu je také gen pro beta-2-receptor, jehož polymorfismus je spojen s různým stupněm bronchiální hyperreaktivity a odpovědi na bronchodilatační léčbu. Gen ADAM 33 objevený v roce 2002 kóduje membránovou metaloproteinázu 33. Tento enzym má pravděpodobný vliv na vznik bronchiální hyperreaktivity, remodelaci a následnou fixovanou obstrukci bronchů [2, 53].

1.2.2. PRINCIPY ALERGICKÉHO ZÁNĚTU U ASTMATU

Atopie vede v případě opakovaného kontaktu jedince s větším množstvím alergenu k rozvoji alergické senzibilizace. Alergen předkládají Th0-lymfocytům antigen-prezentující buňky, zejména dendritické buňky, které přenesou alergeny z povrchu průdušek do tkáně a regionálních lymfatických uzlin. Th0-lymfocyty rozpoznají antigen a produkcí cytokinů řídí zánětlivou reakci. Za určitých okolností se specifická subpopulace CD4+ T pomocných lymfocytů nadměrně diferencuje v Th-2 pomocné T-lymfocyty. Existuje řada hypotéz vysvětlujících převahu Th-2 imunitní odpovědi u astmatu. Předpokládá se vliv abnormální funkce regulačních T-lymfocytů a vliv oxidativního stresu u alergického zánětu, kdy je snížena hladina glutathionu (GSH) po reakci GSH s volnými radikály. Snížení GSH vede k inhibici Th-1 buněčné odpovědi a následné relativní převaze Th-2 buněčné odpovědi [54, 55]. Další z hypotéz vzniku nerovnováhy mezi Th-1 a Th-2 lymfocytární diferenciací považuje Th-2 převahu za důsledek nedostatečné expozice jedince k mikrobiálním infekcím (např. TBC) a/nebo důsledek nadměrného vystavení vakcínám, antibiotikům a hygienickým návykům v dětském věku (tzv. hygienická hypotéza) [56]. Th-2 lymfocyty jsou zodpovědné za nadměrnou sekreci cytokinů IL-4 a IL-13, které stimulují B-lymfocyty k produkci IgE protilátek místo IgG protilátek a vzniká senzibilizace nemocného na alergen. Při dalším kontaktu i s malým množstvím alergenu dojde ke vzniku klinické manifestace atopie – rozvoji alergické reakce (imunopatologická reakce I. typu dle Coombse a Gella). Tato imunopatologická reakce se manifestuje časnou fází (za 10–30 minut) a pozdní fází (za 4–8 hodin).

1.2.3. ČASNÁ FÁZE ALERGICKÉ REAKCE

Časná fáze alergické reakce se projevuje na kůži zarudnutím, kopřivkou, v dýchacích cestách otokem sliznice, bronchokonstrikcí a nadprodukcí hlenové sekrece z pohárkových buněk epitelu dýchacích cest. Hlavními mediátory této fáze jsou histamin a leukotrieny (LTC₄, LTD₄ a LTE₄), které chemotaxí přivedou do místa alergické reakce neutrofilů a eozinofilů. Výkonnými buňkami časně fáze alergické reakce jsou mastocyty (žírné buňky). U alergického pacienta mají mastocyty větší počet vysokoafinních receptorů pro IgE (FcεRI). I minimální množství alergenu tak vede snadno k přemostění dvou sousedních IgE molekul navázaných na FcεRI a spuštění degranulace cytoplazmatických granul a vylití jejich obsahu – mediátorů akutní alergické reakce (histamin, serotonin, tryptáza, chymáza, cysteinylóvé leukotrieny LTC₄, LTD₄, LTE₄, prostaglandin D₂ a faktor aktivující destičky (PAF)). Tyto mediátory jsou zodpovědné za bezprostřední bronchokonstrikční odpověď, která se objeví do několika minut po kontaktu s alergenem a odezní do 1-2 hodin. Podobný proces nastává i v případě vazby sousedních IgE molekul na FcεRI receptory bazofilů, navíc jsou bazofily schopny samy produkovat imunoregulační cytokiny IL-4 a IL-13.

1.2.4. POZDNÍ FÁZE ALERGICKÉ REAKCE

Pozdní fáze alergické reakce se objevuje u asi 50-60% nemocných se zpožděním 4-12 hodin od expozice alergenu. Jde o systémovou reakci, při které se z Th-2 lymfocytů uvolňují další biologicky aktivní látky (IL-3, IL-5, GM-CSF), které stimulují diferenciaci a dozrávání eozinofilů v kostní dřeni, odkud se dostávají do systémové cirkulace. Do tkání se eozinofily i další buňky pozdní fáze alergické reakce (lymfocyty, neutrofilů) dostávají migrací přes stěnu cév. Ta je umožněna zvýšenou expresí selektinů a adhezivních molekul ICAM-1 a VCAM-2 na povrchu endotelových buněk a zvýšenou permeabilitou a vasodilatací kapilár podmíněnou předchozí cytokinovou stimulací při rozvoji alergické reakce. V cílovém místě alergické reakce, např. v oblasti bronchiální stěny, pak dochází k degranulaci eozinofilů. Jejich cytotoxicky účinné látky (MBP – hlavní bazický protein, ECP – eozinofilní kationický protein) poškozují respirační epitel. Perzistence eozinofilního zánětu je způsobena IL-3 a IL-5 a leukotrieny, které potlačují apoptózu eozinofilů. Dalšími buňkami vstupujícími do míst alergického zánětu jsou bazofily, které jsou hlavním zdrojem histaminu [2, 52].

Kromě imunologických mechanismů se na zánětlivé reakci u astmatu podílí i autonomní nervový systém. Non-adrenergní non-cholinergní (NANC) nervová vlákna uvolňují bronchoaktivní tachykininy (substance P, neurokinin A), které se podílí na neurogenním zánětu stěny dýchacích cest. Receptory neurokininu jsou na buňkách hladké svaloviny (receptory NK1) a na buňkách submukózních žlázek (NK2). Aktivace těchto receptorů se podílí na regulaci tonu hladké svaloviny bronchů a cév a sekreci bronchiálních žlázek [52, 53].

1.2.5. BUŇKY A JEJICH PŮSOBKY V PRŮBĚHU ALERGICKÉHO ZÁNĚTU

Na alergickém zánětu participuje celá řada buněk imunitního systému. Klíčovou regulační roli hrají Th-2 lymfocyty, které se při dalším kontaktu senzibilizovaného jedince s alergenem akumulují v okolí dýchacích cest a produkují nejen IL-4 a IL-13, ale i další cytokiny jako je IL-5, který stimuluje proliferaci, diferenciaci a prodloužení životnosti eozinofilů.

1.2.5.1. Eozinofily a jejich role v astmatu

Eozinofily jsou klíčovými výkonnými buňkami pozdní fáze alergické reakce a jsou zodpovědné za vznik alergického zánětu. Eozinofily lze ve zvýšeném množství detekovat v periferní krvi, indukovaném sputu, bronchoalveolární laváži (BAL) astmatiků. Množství eozinofilů u eozinofilního astmatu koreluje s tíží astmatu. Granula eozinofilů obsahují látky (MBP – hlavní bazický protein, ECP – eozinofilní kationický protein, EPO – eozinofilní peroxidázu) zodpovědné za vznik bronchiální hyperreakivity, bronchokonstrikci, vasodilataci a poškozování epitelu dýchacích cest. Eozinofily jsou schopny sekrecí eotaxinu, RANTES a IL-5 potence udržovat svoje setrvávání ve tkáních (autochemoatrakce) [52].

1.2.5.2. Mastocyty

Mastocyty jsou hlavními výkonnými buňkami časně fáze alergické reakce a zdrojem histaminu. Produkují celou řadu dalších prozánětlivě působících látek včetně cysteinylových leukotrienů (LTC₄, LTD₄), prostaglandinů (PGD₄), a faktoru aktivujícího destičky (PAF), dále cytokiny IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 a TNF- α . Mastocyty se tak podílí i na přechodu časně fáze alergické reakce do pozdní zánětlivé odpovědi a udržování chronického zánětu [2]. U astmatu mastocyty infiltrují oblast submukózních žlázek, respiračního epitelu a zejména hladkou svalovinu bronchu [57]. Přítomnost a sekreční aktivita mastocytů v hladké svalovině bronchu vede k bronchiální hyperreaktivitě a je typickou známkou astmatu. Hladká svalovina je ovlivňována histaminem, PGD₂ a LTC₄, které se uvolňují právě z mastocytů.

1.2.5.3. Neutrofilý

Dosud ne zcela jasná je pozice neutrofilů, které se častěji vyskytují ve stěně bronchů u pacientů s těžkým astmatem nebo během exacerbací astmatu podmíněných virovými infekcemi nebo expozicí škodlivinám z ovzduší. Asi u 20 % astmatiků můžeme nalézt zvýšené množství neutrofilů ve sputu a bronchiální stěně [58]. Neutrofilní zánět byl nalezen u pacientů s fatálním astmatem. Neutrofilý mimo jiné produkují matrix-metaloproteinázy (MMP-9), neutrofilní elastázu a reaktivní kyslíkové radikály. Tyto látky se pravděpodobně podílejí na poškození epitelu dýchacích cest a pozánětlivé remodelaci stěny bronchu s následným rozvojem fixované bronchiální obstrukce [50].

1.2.5.4. Respirační epitel

Respirační epitel plní nejen bariérovou funkci, ale podílí se i na zánětlivé odpovědi u astmatu. Aktivované epitelové buňky uvolňují celou řadu zánětlivých působků (histamin, prostaglandiny, chemokiny). Tyto látky se podílejí na udržení eozinofilního zánětu.

Poškození epitelu působky eozinofilního zánětu u astmatu vede k abnormálnímu reparačnímu procesu, tzv. remodelaci dýchacích cest. Při těchto procesech dochází k nadměrné transkripci celé řady prozánětlivých transkripčních faktorů (STAT-1, AP-1, NF- κ B) a následné produkci zánětlivých cytokinů a růstových faktorů (EGF, TGF- β). Tyto růstové faktory komunikují s mesenchymálními buňkami v submukóze. Některé mesenchymální buňky se mění v myofibroblasty, které syntetizují extracelulární matrix, mitogeny hladké svaloviny. Tato interakce mezi epitelem a mesenchymálními buňkami je nazývána epiteliálně-mesenchymální trofická jednotka (ETMU) a podílí se na vzniku remodelace dýchacích cest. Epiteliální buňky jsou významným producentem oxidu dusnatého, který je produkován nadměrnou expresí indukibilní NO-syntetázy stimulované cytokiny eozinofilního zánětu [59, 60].

1.2.5.5. Buňky hladké svaloviny

Hladká svalovina bronchů reaguje kontrakcí na stimulaci různými bronchokonstrikčními mediátory a neurotransmitery. U astmatu je tato reakce nadměrná a je současně reverzibilní podáním bronchodilatačních látek. Hladká svalovina bronchiální stěny je u astmatu

hypertrofická a hyperplastická. Tyto změny jsou způsobeny prozánětlivými mediátory (leukotrieny, endothelin-1, TGF- β a Th-2 cytokiny – IL-4, IL-5, IL-13). Tyto látky způsobují chemoatrakci myofibroblastů (prekurzorových buněk hladké svaloviny) do stěny bronchu [61]. Kontrakce hypertrofické a hyperplastické hladké svaloviny bronchů jsou nadměrné a nekoordinované. Buňky hladkého svalů mají kromě své bronchomotorické funkce i vlastní sekreční aktivitu (např. GM-CSF) a mohou měnit svůj fenotyp ze sekrečního na motorický. Na aktivaci hladké svaloviny a stimulaci bronchiální hyperreaktivity se podílí mastocyty, které hladkou svalovinu u astmatu infiltrují a cytokiny mastocytů (prostaglandin PG₂, a leukotrien C₄) vyvolávají bronchokonstrikci [57].

1.2.5.6. Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC) patří mezi nejdůležitější buňky předkládající antigen T-lymfocytům. V imunitním systému hrají roli v antimikrobiální obraně (myeloidní linie DC) a v antivirové obraně (plasmocytoidní DC). Jsou uloženy v oblasti epitelu i hlubších strukturách stěny bronchu. Nezralé formy DC mají schopnost fagocytózy antigenu a jeho předložení T-lymfocytům v regionální lymfatické tkáni. Pokud je rozpoznán cizorodý antigen, je spuštěna imunitní reakce. DC tedy rozhodují o senzibilizaci či toleranci k antigenu a u geneticky predisponovaného jedince mohou za určitých okolností indukovat vznik alergického zánětu [62]. Některé alergeny (Der p1, aspergilly, pyly břízy a ambrózie) mají vlastní enzymatickou aktivitu. Po jejich inhalaci může docházet k enzymatickému rozvolnění těsných mezibuněčných spojů a aktivaci toll-like receptorů (TLR) na povrchu epiteliálních buněk a tvorbě cytokinů, které atrahují DC do epiteliální vrstvy, kde dojde k jejich aktivaci po navázání antigenu - alergenu. Aktivovaná dendritická buňka s navázaným antigenem – alergenem polarizuje imunitní reakce ve směru Th-2 diferenciaci [60].

1.2.5.7. Další buňky

V patogenezi zánětu dýchacích cest hrají roli i další buňky. Makrofágy mohou být alergeny přes nízkofinitní IgE receptory stimulovány k uvolňování prozánětlivých mediátorů a cytokinů a potencují zánětlivou odpověď [1].

1.2.6. BRONCHIÁLNÍ HYPERREAKTIVITA A JEJÍ VZTAH K ZÁNĚTU DÝCHACÍCH CEST

Přítomnost nadměrné bronchiální reaktivity (BHR) při kontaktu pacienta s alergenem nebo jiným spouštěčem astmatu je jedním z diagnostických kritérií bronchiálního astmatu. Klinicky se BHR projevuje zvýšenou variabilitou průsvitu dýchacích cest jak v průběhu dne, tak mezi jednotlivými dny. Tíže astmatu koreluje s tíží BHR. V průběhu trvání astmatu je BHR zhoršována různými inzulty (virové infekce, expozice alergenům, apod.) a naopak zmírněna protizánětlivou léčbou kortikosteroidy.

BHR je spjata se zánětem dýchacích cest a je částečně reverzibilní při protizánětlivé léčbě. Patofyziologicky je podmíněna perzistujícími a variabilními faktory [63]. Perzistující

faktory BHR jsou způsobeny anatomickými změnami při remodelaci a ztluštění stěny dýchacích cest s edémem. Velkou roli v rozvoji BHR hraje zejména přítomnost hyperplazie a hypertrofie hladké svaloviny.

Variabilní faktory jsou představovány floridním zánětem dýchacích cest a infiltrací hladkých svalových vláken mastocyty, jejichž mediátory jsou zodpovědné za nadměrnou vnímavost k bronchokonstrikčním podnětům (LTC₄, PDG₂, IL-4, IL-13, tryptáza). Roli hraje i nadměrná senzibilizace nervových zakončení floridním zánětem stěny bronchu a poškození epitelu dýchacích cest [1]. BHR můžeme testovat bronchomotorickými testy, kdy vystavíme pacienta vlivu přímých (histamin, metacholin) nebo nepřímých bronchokonstrikčních podnětů (fyzická zátěž, manitol), nebo můžeme provést bronchodilatační test podáním bronchodilatační inhalační látky. Reverzibilita bronchiální obstrukce při léčbě a variabilita bronchiální obstrukce je typickým rysem astmatu.

1.2.7. SPECIFICKÉ RYSY ZÁNĚTU DÝCHACÍCH CEST U TĚŽKÉHO REFRAKTERNÍHO ASTMATU

Bronchoskopicky provedené bioptické studie u nemocných s těžkým refrakterním astmatem prokázaly odlišnosti v zánětu a strukturálních změnách dýchacích cest [58]. Pacienti s TRA mají nadměrnou aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B, který je asociován s perzistujícím zánětem. NF- κ B je aktivátorem transkripce celé řady významných prozánětlivých cytokinů. TRA je spojeno s častějším výskytem převládajícího neutrofilního zánětu dýchacích cest, s více periferní lokalizací zánětu a abnormalitami reparačních procesů chronického zánětu.

S těžkým astmatem je spojeno až 14x větší snížení lipoxinů (např. lipoxin A₄), které jsou důležitými protizánětlivými lipidovými mediátory a vznikají působením lipooxygenázy na kyselinu arachidonovou [46, 59]. Lipoxiny jsou důležitými mediátory reparačních procesů po proběhlém zánětu, jejich tvorba zastavuje probíhající zánět (inhibice VEGF, EGFR, tvorbu kysíkových radikálů v polymorfonukleárech apod.) [64].

Klíčovými buňkami zánětu u těžkého astmatu jsou eozinofily a neutrofilie. Eozinofily jsou hlavními efektorovými buňkami zánětu u těžkého astmatu a eozinofilní zánět u této skupiny pacientů pozorujeme relativně nejčastěji. Počet eozinofilů v bronchiální stěně koreluje se závažností bronchiální obstrukce a bronchiální hyperreaktivitou. Měření podílu eozinofilů v buněčné fázi indukovaného sputa je základním nástrojem určování fenotypu astmatu. Zpracování indukovaného sputa je však náročné, proto je v klinické praxi častěji využíváno vyšetření periferní krve na přítomnost eozinofilů a/nebo vyšetření koncentrace vydechaného oxidu dusnatého. Obě tyto modalitty korelují dobře s intenzitou eozinofilního zánětu v indukovaném sputu [31, 35].

Dalším častým zánětlivým fenotypem u TRA je převládající neutrofilní zánět bronchiální stěny, někdy je přítomen současně i s eozinofilní infiltrací [29, 30]. Neutrofilie dýchacích cest byla v observačních studiích TRA asociována s výraznější fixovanou bronchiální obstrukcí,

chybějící atopií a výraznější symptomatologií se špatnou kvalitou života [27]. Dosud není zcela jasný původ neutrofilie u TRA, někteří autoři prezentují její vznik jako následek kortikoterapie, která brání apoptóze neutrofilů a neutrofilie může být polékově navozený stav. U pacientů s TRA a neutrofilii byly nalezeny zvýšené koncentrace neutrofilních atraktantů (leukotrien B₄, interleukin-8, TNF-α). Etiologie neutrofilie je pravděpodobně multifaktoriální [30, 65].

Přítomnost převládající vyhraněné buněčné populace je stálá jen u eozinofilního fenotypu TRA, počty neutrofilů ve stěně bronchu se mohou výrazně měnit. Stejně tak je i u TRA kromě těchto vyhraněných zánětlivých fenotypů část nemocných, kde nelze najít dominující typ zánětu [66].

1.2.8. HISTOPATOLOGICKÉ ZMĚNY V BRONCHIÁLNÍ STĚNĚ U ASTMATU

Zánět dýchacích cest u astmatu vede ke vzniku specifických strukturálních změn ve stěně bronchu, který je označován jako remodelace. Změny struktury stěny bronchu ovlivňují průsvit bronchu a jeho reaktivitu při kontaktu s alergenem nebo jiným spouštěčem astmatu. K remodelaci dochází již velmi časně v průběhu astmatu a není tedy spjat pouze s dlouhotrvajícím zánětem stěny bronchu.

Patologické změny u astmatu postihují centrální i periferní dýchací cesty. Příčina remodelace je dnes vysvětlována nesouladem v komunikaci mezi epitelem a subepitelovými fibroblasty [59, 67]. Tyto buňky vzájemně tvoří epiteliálně-mesenchymální trofickou jednotku, která se uplatňuje zejména v období embryogeneze, kdy reguluje růst a větvení bronchů. Dysharmonie v komunikaci a regulaci vztahů mezi epitelem a subepiteliálními mesenchymálními buňkami vede k remodelaci stěny bronchu. Permanentní Th-2 mediovaný zánět stěny bronchu při astmatu vede k jejímu strukturálnímu poškození. Následné reparační hojivé procesy vedené fibroblasty a myofibroblasty probíhají abnormálně.

Nejvíce patologických změn lze nalézt v subepiteliální části bazální membrány v lamina reticularis, kde epitelové buňky a myofibroblasty ukládají intersticiální kolagen typu I, III a V. Homogenní ztlustění bazální membrány je pro bronchiální astma specifickým histologickým znakem. Ztlustění laminy reticularis bazální membrány lze pozorovat dříve, než dojde ke vzniku klinických příznaků astmatu. Ve většině studií nebyla prokázána korelace mezi tloušťkou bazální membrány a tíží astmatu ani s délkou trvání nemoci [51, 68-70].

V epitelové vrstvě je častá hyperplazie pohárkových buněk, hypertrofie mucinózních žlázek stěny bronchu a ztlustění bazální subepiteliální membrány. Dále je typická přítomnost hyperplazie a hypertrofie hladké svaloviny [71]. Histologicky lze nalézt i výraznější vaskularizaci submukózy bronchu s následnou hyperémií. Jde o důsledek novotvorby cév podmíněné oxidativním stresem indukujícím tvorbu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) [72]. Remodelace stěny bronchu vede k jejímu ztlustění a zúžení bronchiálního lumen, ke kterému přispívá i retence sekretu bronchiálních žlázek.

1.3. PATOFYZIOLOGIE OXIDATIVNÍHO STRESU U ASTMATU

Charakteristickým klinickým rysem astmatu je chronický zánět dýchacích cest s bronchiální hyperreaktivitou a reversibilní bronchiální obstrukcí. Zánět bronchu u astmatu vede k epiteliální deskvamaci, nadprodukcí hlenu a remodelaci dýchacích cest.

V patogenezi astmatu hraje důležitou roli oxidativní stres. Oxidativní stres může být vyvolán exogenně expozicí environmentálními zdroji reaktivních kyslíkových (ROS) a dusíkových (NOS) radikálů [55]. Endogenním zdrojem oxidativního stresu u astmatu jsou ROS a NOS vznikající v průběhu zánětu dýchacích cest.

V lidském těle je kyslík dopravován do tkání ve vazbě na hemoglobin v erythrocytech, jeho uvolňování do tkání je přísně regulováno. V plicní tkáni je vlhký slizniční epiteliální povrch přímo masivně exponován vdechovanému kyslíku a inhalovaným dalším látkám v okolním vzduchu, které se rozpouštějí v sekretu na povrchu respiračního epitelu. Proto je plicní tkáň více náchylná k environmentálnímu oxidativnímu poškození.

Oxidativní poškození v plicní tkáni může vznikat následkem endogenní produkce volných kyslíkových radikálů při buněčné obraně proti vdechovaným mikroorganismům, při které se tvoří vysoké koncentrace ROS a NOS. Dalším zdrojem volných radikálů je respirační řetězec buňky v mitochondriích. Současně jsou plíce jediným vnitřním orgánem, který je v trvalém bezprostředním kontaktu se škodlivinami vnějšího prostředí (zplodiny spalín z dieslových motorů (DEP), ozón, cigaretový kouř), které jsou největším zdrojem oxidativního stresu plic [73].

Jsou k dispozici i práce prokazující významný vliv inhalace zevních škodlivin a následného poškození plicní tkáně oxidativním stresem na vznik senzibilizace jedince k běžným environmentálním alergenům. Byla zjištěna indukce tvorby ROS v makrofázích a dendritických buňkách dýchacích cest po inhalaci chinonů a polyaromatických uhlovodíků, které jsou součástí zplodin dieslových motorů DEP [74]. Současná inhalace těchto škodlivých látek s alergenem může způsobit nově vznik alergické senzibilizace k alergenu [75]. Excesivní produkce ROS koreluje se stupněm bronchiální hyperreaktivní měřené bronchoprovokačním testem s metacholinem [54]. Exogenní environmentální zdroje oxidativního stresu tedy mohou nejenom zhoršovat probíhající zánět dýchacích cest a bronchiální hyperreaktivitu a způsobovat exacerbace astmatu, ale také se aktivně podílí na vzniku senzibilizace k alergenem. Tíže astmatu také koreluje s intenzitou oxidativního stresu, například koncentrace malondialdehydu, markeru lipoperoxidace buněčných membrán, byla vyšší u pacientů s těžším astmatem [76, 77].

1.3.1. ENDOGENNÍ ZDROJE OXIDATIVNÍHO STRESU

V lidském těle dochází i za normálních fyziologických okolností k neustálé tvorbě malého množství endogenních volných kyslíkových radikálů (např. o superoxid-anion O_2^- , peroxid

vodíku H_2O_2 , a hydroxylové radikály $\text{OH}\cdot$). Zdrojem endogenních reaktivních sloučenin kyslíku jsou zánětlivé buňky (aktivované eosinofily, neutrofile, monocyty a makrofágy).

Superoxidový anion O_2^- je tvořen zejména při mitochondriálním elektronovém transportu v respiračním řetězci, dále v enzymatickém komplexu nikotin-adenin-dinukleotid-fosfát (NAPDH) oxidázy v neutrofilech, monocitech a makrofázích při mechanismech buněčné obrany proti některým bakteriím. O_2^- může vznikat i během metabolických přeměn kyseliny arachidonové. Superoxidový anion O_2^- je velmi nestabilní, špatně prochází buněčnou membránou, reaguje s aminokyselinami a proteiny, jejichž oxidací může dojít ke ztrátě jejich fyziologické funkce v organismu [55]. O_2^- spontánně nebo enzymaticky za katalyzace superoxid-dismutázou (SOD) tvoří peroxid vodíku (H_2O_2). Peroxid vodíku i superoxidový anion reagují s molekulami železa a dalších kovů a stimulují tvorbu hydroxylových radikálů $\text{OH}\cdot$. Hydroxylové radikály jsou mnohonásobně více reaktivní než O_2^- a H_2O_2 a ihned po svém vzniku reagují s biomolekulami. Oxidativní potenciál H_2O_2 zvyšují eosinofily a neutrofile svými enzymy – peroxidázami. Peroxidázy katalyzují interakce mezi H_2O_2 a halogenidy s následnou tvorbou hypohalogenidů (např. myeloperoxidáza (MPO) katalyzuje tvorbu HOCl a eosinofilní peroxidáza (EPO) tvorbu HOBr). Neutrofile a eosinofily se tak podílí na oxidativním stresu po migraci do sliznice bronchu svými enzymy MPO a EPO. EPO je jediným lidským enzymem, který tvoří reaktivní bromidové sloučeniny (HOBr), které tak můžeme považovat za markery oxidativního stresu při eosinofilním zánětu. Podobně chloridové reaktivní sloučeniny (HOCl) jsou markery oxidativního stresu při neutrofilním zánětu [73].

Dalšími zdroji volných radikálů jsou dusíkaté reaktivní sloučeniny (RNS), zejména oxid dusnatý (NO), který je tvořen epitelem dýchacích cest po zvýšení exprese indukibilní NO-syntetázy (iNOS) při probíhající alergickém zánětu. iNOS konvertuje L-arginin na NO a L-citrulin. Za fyziologických okolností se NO podílí na správné funkci mukociliární kinetiky a předpokládá se vliv NO na sterilizaci povrchu sliznice. NO reaguje s kyslíkovými radikály (superoxidový anion O_2^-) a tvoří peroxyinitrit ($\text{ONOO}\cdot$), který je velmi potentní oxidativní látkou. Peroxyinitrit je zdrojem nitrace tyrosinových zbytků řady důležitých strukturálních a funkčních proteinů, včetně enzymů. Jejich poškození nitrací vede k poškození či oslabení biologické role těchto důležitých bílkovin v organismu [54].

1.3.2. EXOGENNÍ ZDROJE OXIDATIVNÍHO STRESU

Plocha plicních sklípků představuje rozsáhlý prostor, který je v kontaktu s vnějším prostředím. Pro plicní parenchym je inhalace škodlivin z ovzduší zdrojem oxidativního stresu. Například ultrajemné částice s průměrem pod $0,1\ \mu\text{m}$ mohou po inhalaci způsobit přímé mitochondriální poškození a představují významný zdroj oxidativního stresu, se kterým se antioxidační systémy nedokážou dobře vyrovnat. Typickým častým zdrojem oxidativního stresu

je inhalace cigaretového kouře, který může způsobit exacerbaci astmatu. Cigaretový kouř obsahuje více než 4000 chemických sloučenin, mimo jiné také velké množství superoxidových aniontů (O_2^-) a oxidu dusnatého a peroxidu vodíku a hydroxylových radikálů (H_2O_2 , OH^-) [78].

Dalším významným zdrojem oxidativního stresu je ozón, který vzniká fotochemickým znečištěním ovzduší. Za normálních okolností je koncentrace ozónu v ovzduší 20-40 ppb (parts per billion), hodnoty nad 70 ppb jsou již pro zdraví škodlivé. Sloučeniny ozónu vznikají nejčastěji fotochemickou reakcí při znečištění ovzduší z oxidů dusíků, uhlovodíků, halogenizovaných organických sloučenin působením slunečního záření. Ozón je schopen přímé reakce s nenasycenými mastnými kyselinami a buněčnými membránami za tvorby ozonačních produktů, které jsou malé a relativně stabilní. Velikost těchto částic ovlivňuje jejich depozici a následky v plicní tkáni. Inhalace ozónu stimuluje eozinofilii dýchacích cest a zvyšuje senzitivitu dýchacích cest k expozici alergenu.

Významným zdrojem znečištění ovzduší jsou zplodiny spalování dieslových motorů (DEP), které jsou silnými induktory oxidativního stresu a působí na dendritické buňky. Tento vliv na antigen-prezentující buňky suprimuje Th-1 buněčnou odpověď a naopak favorizuje Th-2 lymfocytární diferenciaci.

1.3.3. UDRŽOVÁNÍ ROVNOVÁHY MEZI OXIDATIVNÍM STRESEM A ANTIOXIDAČNÍMI FAKTORY

Oxidativní stres hraje v organismu i určitou fyziologickou roli v nespecifické imunitě. Hierarchický model oxidativního stresu předpokládá přítomnost neustálé rovnováhy mezi faktory vedoucí k oxidativnímu stresu a přirozenými antioxidačními mechanismy, které dokáží mírnou úroveň oxidativního stresu dostatečně kontrolovat, např. zvýšenou syntézou glutathionu. Antioxidační enzymy a faktory jsou hlavními nástroji buňky in-vivo a in-situ k udržení homeostázy a neutralizaci ROS a RNS. Non-enzymatické antioxidy jsou např. vitamín C, glutathion, albumin, vitamín E, β -karoten.

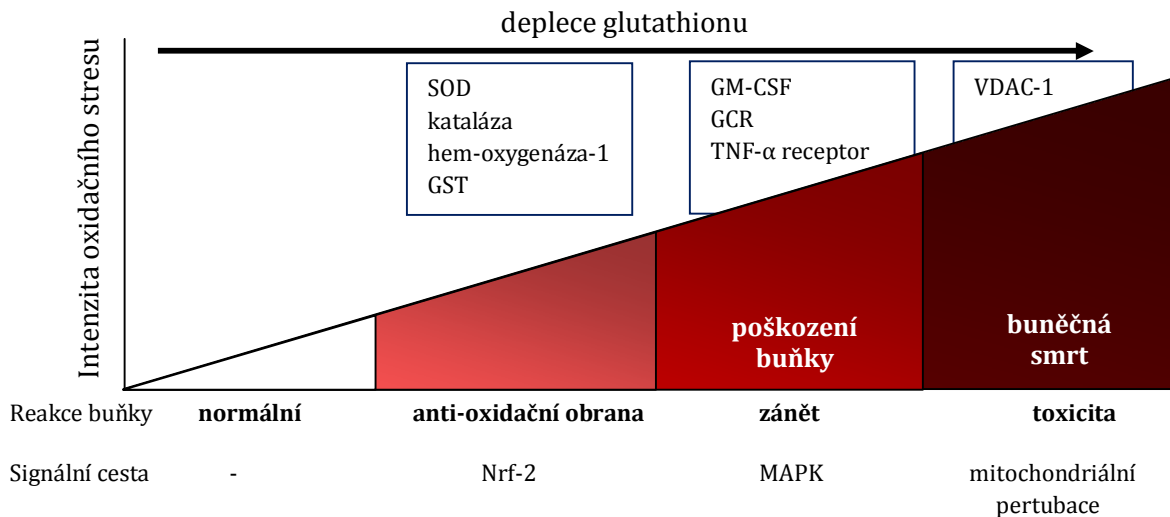
Hlavní enzymatické antioxidy v plicním parenchymu jsou superoxid-dismutáza (SOD), kataláza, glutathion-peroxidáza, hem-oxygenáza-1, thioredoxiny, peroxiredoxiny a glutaredoxiny.

Nízká úroveň oxidativního stresu (např. krátká expozice nízkým koncentracím DEP), vyvolá aktivaci transkripčního faktoru Nrf2 (nuclear-erythroid-2 p45 related factor 2). Tento transkripční faktor aktivuje více než 200 genů, které kódují celou řadu antioxidantů, protizánětlivých a cytoprotektivních látek, například katalázu, superoxid-dismutázu (SOD), hem-oxygenázu-1, glutathion-S-transferázu, glutathion-peroxidázu, glutathion a další. Při nízké úrovni oxidativního stresu jsou tyto látky a faktory schopny opět redukovat volné radikály a obnovit homeostázu mezi oxidativními a antioxidačními vlivy [55] viz obrázek č. 1.

V případě, že úroveň produkce ROS a RNS přesáhne možnosti endogenní antioxidační obrany a/nebo je kapacita antioxidační obrany snížena deplecí antioxidantů, dojde k aktivaci

jiných intracelulárních signálních kaskádových reakcí, které vedou k uplatnění jiných aktivátorů transkripce jako je MAPK a NF- κ B. Tyto transkripční faktory kódují jiné skupiny genů, které vedou k transkripci prozánětlivých cytokinů jako (IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, TNF- α), chemokinů a adhezních molekul (ICAM-1, VCAM) [73]. Řada těchto látek hraje významnou roli v patogenezi zánětu dýchacích cest u astmatu.

Obr. 1 Hierarchický model oxidativního stresu dle [73]



Převažující oxidativní stres vede k přímému strukturálnímu poškození buněčných struktur volnými radikály (ROS, RNS) na úrovni proteinů, lipidů a DNA [55]. Reakce ROS s proteiny tvoří karbonyly, reakce RNS s tyrosinem tvoří nitrotyrosin. Zvýšená nitrace tyrosinu byla nalezena po expozici alergenu u senzitizedovaných astmatiků. Reakcí ROS s lipidy se uvolňuje 8-isoprostan a ethan. 8-isoprostan je biomarkerem lipoperoxidace buněčných membrán a lze jej nalézt ve zvýšených koncentracích v kondenzátu vydechaného vzduchu u pacientů s astmatem [79].

Výrazná další eskalace úrovně oxidativního stresu definitivně spustí cytotoxickou odpověď v mitochondriích, která vede cestou tzv. mitochondriální pertubace k apoptóze a nekróze buňky, vztah takto intenzivního oxidativního stresu k patogenezi astmatu dosud nebyl objasněn [54].

1.3.4. MECHANISMY ANTIOXIDAČNÍ OBRANY ORGANISMU

Oxidativní stres u astmatu může být způsoben i snížením antioxidační obrany. U dětských astmatiků byla zjištěna snížená koncentrace aminokyselin glycinu a glutaminu potřebných pro syntézu glutathionu, také byly popsány snížené koncentrace dalších

antioxidačních enzymů (SOD) i non-enzymatických antioxidačně působících látek (glutathion, β -karoten, vitamin C a E) [80].

Glutathion a glutathion-peroxidázy jsou velmi důležitým antioxidačním nástrojem buňky, podílí se především na redukci H_2O_2 a dalších peroxidů vzniklých například lipoperoxidací buněčných membrán a nenasycených mastných kyselin. Glutathion-peroxidázy se vyskytují ve více isoformách, všechny obsahují selen, jako důležitý kofaktor a jsou ve vysoké koncentraci v sekretu na povrchu epitelu dýchacích cest. Extracelulární isoforma glutathion-peroxidázy je u astmatu přítomna v plicní tkáni ve vyšších koncentracích než u zdravých osob. Při exacerbaci astmatu lze sledovat pokles tohoto enzymu, po léčbě kortikosteroidy opět jeho koncentrace roste. Expozice alergenům rychle mění množství glutathionu v plicní tkáni, tak jak je spotřebováván při antioxidačních procesech. Nedostatek glutathionu v organismu vede ke stimulaci Th-2 imunitní odpovědi [77].

Superoxid-dismutáza je jeden z hlavních antioxidačních obranných nástrojů buňky. V epitelu bronchiálního stromu a sekretu bronchiálních žlázek astmatiků je aktivita SOD výrazně snížena ve srovnání se zdravými. Nedostatečná aktivita SOD odráží intenzitu oxidativního stresu u astmatu a koreluje s tíží bronchiální hyperreakivity. Snížení SOD aktivity je částečně podmíněno zvýšeným oxidačním a nitračním stresem v bronchiální stěně astmatiků, kdy dochází k jeho zvýšené spotřebě [54], byl popsán i genový polymorfismus pro SOD vedoucí k nedostatečné antioxidačové aktivitě [77]. Oxidativní a nitrační stres dále ovlivňuje aktivitu i dalšího antioxidačního enzymu – katalázy, která je hlavním inaktivátorem peroxidu vodíku. U astmatiků byla v BALu oproti zdravým nalezena snížená aktivita katalázy. V průběhu exacerbací astmatu dochází ke snížení glutathionu v kondenzátu vydechovaného vzduchu, léčbou SKS dojde k jeho zvýšení. Nedostatek glutathionu se podílí na inhibici sekrece cytokinů Th-1 lymfocytů a favorizuje Th-2 lymfocytární zánětlivou reakci [73]. U pacientů s těžkým astmatem bylo zjištěno snížení aktivity Nrf-2 transkripčního faktoru stimujícího expresi protioxidační obrany oproti pacientům s lehkým a středně těžkým astmatem [78].

Oxidativní stres také ovlivňuje novotvorbu cév v submukóze bronchu. Superoxidový anion i peroxid vodíku potencují expresi VEGF (vaskulární endoteliální faktor) [55].

Na aktivaci prozánětlivých pochodů po inhalaci škodlivin z ovzduší se podílí i přirozená slizniční imunita cestou aktivace toll-like receptorů na povrchu epiteliálních buněk. Aktivace TLR receptorů TLR-2 a TLR-4 se podílí na tvorbě cytokinů a chemoatraktantů v epiteliálních buňkách. Expozice astmatiků ozónu zvyšuje expresi TLR-4 receptorů na makrofázích a aktivaci NF- κ B s následnou produkcí prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-8, IL-1- β) a prostaglandinu E_2 a leukotrienu C_4 v sekretu na povrchu epitelu dýchacích cest, které působí chemotakticky na další zánětlivé buňky. TLR-4 receptory jsou schopny rozpoznat specifické poškození epiteliálních buněk infekčním patogenem nebo inhalovanou noxou a aktivovat makrofágy v sekretu na

povrchu respiračního epitelu. Inhalovanou noxou poškozené buňky uvolňují různé molekulárními signály (heat-shock proteiny, oxidací změněné lipidy, fibrinogen a nízkomolekulární hyaluronan), které se váží na TLR-4 receptory. Tato vazba pak zahájí zánětlivý proces produkci prozánětlivých mediátorů (IL-1- β , TNF- α , IL-6 a prostaglandinu E₂) přes aktivátor transkripce NF- κ B [73].

Zajímavou roli v regulaci oxidativního stresu hraje hyaluronová kyselina (HA) a její vysokomolekulární složka, která je hlavní komponentou extracelulární matrix epitelu dýchacích cest. Za fyziologických okolností pokrývá HA povrch respiračního epitelu. Při oxidativním stresu reaktivní kyslíkové radikály (ROS) a enzym hyaluronidáza štěpí HA na hyaluronany (nízkomolekulární fragmenty HA), které mají výrazně prozánětlivý vliv a jsou schopny vazby na TLR-4 receptory a způsobit jejich aktivaci s následným rozvojem zánětlivé reakce. Zvýšené množství nízkomolekulárních fragmentů hyaluronové kyseliny bylo nalezeno v BALu astmatiků po inhalaci ozónu. Hyaluronová kyselina se zřejmě podílí na ochraně epitelu a její zvýšené množství chrání respirační epitel před aktivací TLR-4 receptoru působením oxidativního stresu po inhalaci environmentálních škodlivin. Poškození této ochrany oxidativním stresem pak vede k poruše bariérové funkce respiračního epitelu. Zvýšená koncentrace hyaluronové kyseliny byla naopak zjištěna v BALu u zdravých jedinců [81].

1.3.5. GENETICKÁ VNÍMAVOST K POŠKOZENÍ RESPIRAČNÍHO SYSTÉMU OXIDATIVNÍM STRESEM

Fyziologicky reaguje organismus na expozici mírné intenzity oxidativního stresu zvýšenou expresí protioxidačních enzymů, které jsou regulovány aktivátorem transkripce Nrf-2. Jde například o NADPH dehydrogenázu, glutathion-S-transferázu Mu1 (GSTM1) a glutathion-S-transferázu P1 (GSTP1). Tyto antioxidantové systémy vyváží produkty oxidativního stresu a obnoví homeostázu organismu.

Správná transkripce protioxidačních enzymů je důležitá pro zvládnutí oxidativního stresu. Jednou z příčin špatné odpovědi organismu na oxidativní stres může být genový polymorfismus v oblastech DNA, kde je kódována transkripce protioxidačních enzymů a látek. Tato situace byla u astmatu popsána, genetický polymorfismus genů pro antioxidantní enzymy je tedy považován za rizikový faktor pro rozvoj astmatu [73]. Například polymorfismus genů pro GSTM1 (nulový genotyp) a GSTP1 Val/Val je asociován se sníženou obranou proti oxidativnímu stresu a zvýšenou zánětlivou odpovědí na alergické podněty a zvýšenou tvorbou IgE a histaminu. Pacienti s polymorfismem GSTP1 Val/Val měli vyšší koncentraci malondialdehydu a nižší koncentraci glutathionu v systémové cirkulaci. Tento polymorfismus je nezávisle asociován s tíží astmatu. Genetické polymorfismy glutathion-S-transferáz se vyskytují až u 40-50% populace, která je více vnímavá k oxidativnímu stresu a riziku vzniku astmatu [78].

1.3.6. FARMAKOLOGIE OXIDATIVNÍHO STRESU U ASTMATU

Zvyšující se úroveň poznání mechanismů vzniku a působení oxidativního stresu a antioxidační obrany organismu umožnily identifikaci potenciálně efektivních látek účinných proti oxidativnímu stresu u astmatu. Lze předpokládat, že účinnou redukcí oxidativního stresu lze zlepšit léčebné výsledky u pacientů s astmatem. Podání antioxidantů by mohlo také snížit riziko vzniku astmatu u lidí exponovaných zdrojům exogenního oxidativního stresu [73].

Nejvíce zkušeností je s podáním antioxidantů ze skupiny vitamínů. Například podání vitamínu C a E snížilo poklesy plicních funkcí po inhalaci ozónu u astmatiků, avšak influx zánětlivých buněk do bronchiální stěny nebyl ovlivněn. Klinické studie u dětí se zjištěnými sníženými hladinami těchto antioxidantů však neprokázaly efekt na zlepšení kontroly astmatu.

Populárními antioxidanty jsou thiolové sloučeniny, které jsou metabolicky přeměňovány na prekurzory glutathionu, často užívaným je N-acetylcystein (NAC). NAC na zvířecích modelech snižuje zánět dýchacích cest a bronchiální reaktivitu a produkci ROS v eosinofilech periferní krve. Humánní studie však neprokázaly benefit na snížení počtu exacerbací ani symptomů astmatu [54].

Sulforafan je látka obsažená v brokolici, která zvyšuje expresi NRF-2 regulovaných antioxidačních enzymů (GSTP1, GSTM1 a dalších). Podání této látky vede ke snížení exprese prozánětlivých cytokinů po expozici oxidativnímu stresu (DEP) v epitelálních buňkách dýchacích cest a v současnosti probíhají klinické zkoušky této látky.

Ve farmakologickém výzkumu je několik dalších látek s antioxidačním potenciálem (quercetin, isoflavon, stimulatory SOD, resveratol, nano-částice fulleren) s nadějnými výsledky na animálních modelech oxidativního stresu, použití těchto látek dosud nebylo v humánní aplikaci publikováno [55, 73].

1.4. METODY SLEDOVÁNÍ ZÁNĚTU A OXIDATIVNÍHO STRESU U ASTMATU

V běžné klinické praxi používáme při vyšetřování a léčbě pacientů s astmatem jen velmi jednoduché nástroje. Sledujeme anamnézu a kvalitu života pomocí dotazníku, dále provádíme fyzikální vyšetření, spirometrii, ve specifických případech monitorujeme změny vrcholové výdechové rychlosti v čase a provádíme nepřímé a přímé bronchoprovokační testy. Těmito nástroji jsme schopni posoudit stupeň kontroly nad astmatem a zjistit přítomnost bronchiální obstrukce a/nebo nadměrné bronchiální reaktivity. Žádné z těchto vyšetření však neposkytuje přímou informaci o typu a intenzitě zánětu dýchacích cest a úrovni oxidativního stresu. Do běžné klinické praxe pronikla zatím pouze metoda měření koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého. Další metody měření oxidativního stresu a typu zánětu u astmatu jsou prozatím předmětem výzkumu (tabulka 6).

Tabulka 6 Metody vyšetření zánětu dýchacích cest a oxidativního stresu u astmatu

<ul style="list-style-type: none">• Měření koncentrace FeNO• Vyšetření cytologie indukovaného sputa• Analýza kondenzátu vydechaného vzduchu• Vyšetření eozinofilie periferní krve• Měření cys-LT v moči	<ul style="list-style-type: none">• endobronchiální biopsie• bronchoalveolární laváž
---	---

1.4.1. NEINVAZIVNÍ METODY SLEDOVÁNÍ ZÁNĚTU A OXIDATIVNÍHO STRESU U ASTMATU

Zvýšený oxidativní stres a abnormality antioxidantních mechanismů u astmatu vedou ke zvýšení koncentrací biochemicky stabilních výsledných produktů oxidativního stresu v organismu astmatika. Pro astma je typická přítomnost produktů lipoperoxidace, brominace proteinů a zvýšená produkce oxidu dusnatého [54].

1.4.2. ON-LINE MĚŘENÍ KONCENTRACE OXIDU DUSNATÉHO VE VYDECHOVANÉM VZDUCHU

Sledování koncentrace vydechaného oxidu dusnatého je klinicky nejvýznamnější metodou sledující oxidativní stres a eosinofilní zánět dýchacích cest. Rozvoj této metody nastal v 90. letech minulého století, kdy byl v odborné literatuře poprvé popsán postup odběru a analýzy indukovaného sputa u astmatiků [82, 83]. Ve stejné době poprvé prof. Alving publikoval práci prokazující zvýšení oxidu dusnatého (FeNO) ve vydechaném vzduchu astmatiků [84]. V průběhu dalších 20 let bylo publikováno mnoho prací sledujících použití obou metod v diagnostice astmatu, ve sledování odpovědi na protizánětlivou léčbu i ve sledování compliance pacientů k léčbě.

Do každodenní klinické praxe se rozšířila monitorace oxidu dusnatého ve vydechaném vzduchu (FeNO) na základě průkazu tvorby NO respiračním epitelem v důsledku zvýšené aktivity indukibilní NO-syntetázy (iNOS) při eosinofilním zánětu bronchiální stěny [84]. V posledních 20 letech byla publikovány práce sledující přínos FeNO v diagnostice astmatu a vedení protizánětlivé léčby [85]. Pokroky v technologii a standardizaci vedly k vývoji jednoduchých analyzátorů s okamžitým zobrazením naměřené hodnoty FeNO. Tato metoda si rychle našla cestu k širokému použití v běžné klinické praxi, kde doplňuje běžné tradiční metody monitorace chronických onemocnění dýchacích cest jako je spirometrie, peakflowmetrie, sledování symptomů a fyzikálního nálezu.

1.4.2.1. Měření koncentrace oxidu dusnatého (NO) ve vydechaném vzduchu

NO se podílí na mechanismech vasodilatace, bronchodilatace a je mediátorem zánětu [86]. Je produkován různými buňkami - epitelem dýchacích cest, neutrofilů, mastocytů, nervovými zakončeními v dýchacích cestách a v endotelu kapilár. Hraje klíčovou roli v patofyziologii plicních onemocnění a zejména v patofyziologii astmatu.

Americká hrudní společnost i Evropská respirační společnost považuje analýzu NO za

reproducibilní, neinvazivní, bezpečnou metodu, která má svůj přínos zejména v diagnostice eozinofilního zánětu dýchacích cest [87, 88].

1.4.2.2. *Produkce NO v respiračním systému*

Produkce NO je závislá na aktivitě enzymů, které se podílí na tvorbě NO, dále na úrovni oxidativního stresu a aktivitě antioxidantních mechanismů (hemoglobin, glutathion a další antioxidantní systémy). NO je tvořen oxidací L-argininu v oblasti N-terminálního guanidinu. Tato reakce je katalyzována enzymem NO-syntetázou, která se vyskytuje ve třech isoformách – konstitutivní NO-syntetáza (nNOS), inducibilní NO-syntetáza (iNOS) a endoteliální NO-syntetáza (eNOS). Tyto isoformy jsou kódovány různými geny na různých chromozomech a jejich exprese je ve tkáních různá [86]. Produkce oxidu dusnatého podmíněná působením enzymů nNOS a eNOS je řádově nižší a mimo oblast respiračního epitelu a je tedy zanedbatelná, ve srovnání s produkcí NO podmíněnou inducibilní NO-syntetázou [89]. Cytokiny IL-4 a IL-13 produkované Th-2 lymfocyty při alergickém eozinofilním zánětu jsou schopné aktivovat expresi inducibilní NO-syntetázy v epitelu dýchacích cest (viz níže). Převážná část vydechaného NO je tedy podmíněná iNOS v respiračním epitelu a dlaždicobuněčném epitelu orofaryngu a dutiny ústní. Zvýšená exprese iNOS je přítomna také v makrofázích, neutrofilech, hepatocytech a epiteliálních, mesangiálních, endoteliálních buňkách a v hladkém svalstvu cév. Výrazně vyšší exprese iNOS je ve sliznici nosní dutiny, kde je řádově vyšší koncentrace NO než v bronchiálním stromu. Mediátory zánětu produkované makrofágy (TNF- α , IL-1- β) a zejména INF- γ tvořený Th-1 lymfocyty indukují zvýšení exprese iNOS a udržují dlouhodobě vyšší hodnotu NO. Oxid dusnatý produkovaný epitelem dýchacích cest a makrofágy a Th1-lymfocyty hraje důležitou roli v amplifikaci a perzistenci Th-2 buněčné zánětlivé odpovědi [87].

Oxid dusnatý je vysoce reaktivní molekula s oxidačními vlastnostmi buď přímou cestou nebo přes reaktivní dusíkaté radikály (např. peroxynitrit). Fyziologicky se NO uplatňuje v antimikrobiální imunitě a cytotoxických reakcích proti nádorovým buňkám. V oblasti respiračního traktu je role NO komplexní. Patofyziologicky může působit jako prozánětlivý mediátor a ovlivňuje rozvoj bronchiální hyperreakivity. Fyziologicky se podílí jako slabý mediátor relaxace hladké svaloviny bronchu [84].

Současný aktuální pohled na přínos této metody pro běžnou praxi shrnuje doporučení Americké hrudní společnosti [87]. Měření koncentrace NO ve vydechaném vzduchu se stalo první metodou tzv. inflamometrie, tj. přímé vyšetření typu a intenzity eozinofilního zánětu dýchacích cest. Výsledky rozsáhlých studií na širokých populacích dětských i dospělých pacientů různých ras však přinesly dosud nejednoznačné závěry. Původní předpoklad použití FeNO jako unikátní metody pro řízení protizánětlivé léčby u astmatu nebyl jednoznačně naplněn. Poslední doporučení ATS omezuje přínos metody FeNO pouze v posouzení přítomnosti eozinofilního zánětu a odhadu příznivé odpovědi na protizánětlivou léčbu kortikosteroidy. Je proto důležité

hledat další neinvazivní jednoduše měřitelné biomarkery, které by dokázaly věrně podávat informace o typu a intenzitě zánětu dýchacích cest. Význam metody FeNO v problematice OLA a TRA je dosud nejasný. Vysoká hodnota FeNO může být také indikátorem non-compliance pacienta kléčbě inhalačními kortikosteroidy u OLA pacientů. U pacientů s TRA léčených systémovými kortikosteroidy byla zjištěna korelace perzistující eozinofilie dýchacích cest s hodnotou FeNO. Vyšší hodnotu FeNO lze u TRA považovat za ukazatel určité kortikorezistence [32]. Projekt SARP (Severe Asthma Research Project) prokázal vztah perzistující vysoké hodnoty FeNO s těžkou bronchiální obstrukcí a plicní hyperinflací a největší spotřebou zdravotní péče [42].

1.4.3. VYŠETŘENÍ INDUKOVANÉHO SPUTA (IS)

Indukce sputa je relativně neinvazivní metoda umožňující analýzu cytologie a také vyšetření koncentrace různých mediátorů v supernatantu. Tato metoda je časově i technicky náročnější zejména při preanalytickém zpracování vzorku, vyžaduje zkušený personál a proto je spíše používána v klinickém výzkumu. Eozinofilie indukovaného sputa dobře koreluje s eozinofilií bronchiální sliznice. Nález eozinofilie pozitivně koreluje s odpovědí na kortikosteroidy. Existují práce, které použily tento parametr k řízení léčby astmatu a prokázaly snížení exacerbací oproti vedení léčby astmatu dle symptomů [33]. Dosud nejsou jasné důkazy o korelaci intenzity eozinofilie v IS s tíží astmatu [90]. Perzistující eozinofilie IS u pacientů s TRA i přes intenzivní protizánětlivou léčbu je známkou kortikorezistence. Neutrofilie v IS svědčí pro neutrofilní fenotyp astmatu. V jedné studii byla dle IS úspěšně podávána léčba makrolidy u non-eozinofilního astmatu [10]. Supernatant IS lze vyšetřit na koncentrace mediátorů a cytokinů, existuje však jen málo prací a přínos těchto analýz není jasný [90].

1.4.4. ANALÝZA KONDENZÁTU VYDECHOVANÉHO VZDUCHU

Další neinvazivní metodou sledující charakteristiky zánětu ve vydechovaném vzduchu je analýza kondenzátu vydechovaného vzduchu (KVV). Vydechovaný vzduch se skládá z plynné fáze, která obsahuje volatilní plynné složky (např. NO, CO) a z kapalně fáze, která je tvořena vodními parami s aerosolizovanými částicemi. Tyto částice rozpuštěné ve vodní páře lze zkondenzovat ochlazením vydechovaného vzduchu a následně stanovovat jejich koncentrace. Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu je zcela neinvazivní metoda, která umožňuje měřit široké spektrum látek vznikajících při oxidativním stresu a zánětu dýchacích cest. Předpokládá se, že KVV je složen z kondenzované vodní páry, ve které jsou rozpuštěny látky obsažené v tekutině na povrchu epitelu dýchacích cest (ELF - epithelial lining fluid).

1.4.4.1. Problematika odběrového systému a standardizace vzorků

Odběr KVV je zcela neinvazivní, jednoduchý a nezpůsobuje zánět dýchacích cest ani dyskomfort pro pacienta. Hlavními problémy v interpretaci výsledků KVV jsou riziko

kontaminace slinami, variabilní naředění vzorku a interindividuální variabilita měřených parametrů, která je částečně závislá na senzitivitě biochemické analýzy vzorku. Naředění vzorku lze korigovat vztahem výsledků ke koncentraci urey nebo elektrolytů. Kontaminaci slinami lze vyřešit konstrukcí sběrného systému, měření amylázy v KVV stanoví míru kontaminace vzorku. Nadměrná kontaminace slinami může zkreslit výsledné koncentrace leukotrienů, které jsou ve slinách přítomny v 7x vyšší koncentraci než v EBC.

Sběr KVV není náročný, jsou k dispozici i systémy pro domácí odběr vzorků. V naší práci jsme použili nejvíce doporučovanou techniku odběru pomocí elektrického kondenzátoru (viz metodika odběru KVV). Vydechovaný vzduch vstupuje jednocestným ventilem do nádoby ochlazené na -10 st. °C, takže na její stěně dochází ke kondenzaci vydechovaných vodních par. Odběrový systém by měl být vybaven lapačem slin a při odběru by měla být používána svorka uzavírající nos. Obvykle je možné během 15 minut sesbírat 1-2,5 ml kondenzátu v závislosti na minutové ventilaci a dechovém objemu. Složení KVV je ovlivněno smíšením vydechovaných vodních par s tekutinou na povrchu respiračního epitelu (epithelial lining fluid), v KVV jsou však obsaženy látky i z horních cest dýchacích a dutiny ústní.

Reproducibilita naměřených výsledků v KVV je při užití výše uvedených senzitivních metod dostatečná jen pro adenosin, aldehydy (MDA, HNE, HHE), glutathion a pH vzorku. I u zdravých osob je přítomna velká variabilita výsledků. Příčiny této variability dosud nejsou jasné, předpokládá se vliv různě senzitivních analytických metod, možný je i vliv bezprostřední expozice zdravých osob exogenním zdroji oxidačního stresu před odběrem KVV, roli mohou hrát i odlišné techniky sběru kondenzátu v různých laboratořích a studiích [91]. Na rozdíl od měření koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého KVV nepřináší okamžité výsledky.

Metoda odběru KVV proto dosud zůstává výzkumnou metodou. Širšímu využití technologie KVV v klinické praxi brání zatím technická náročnost laboratorního zpracování a chybějící výsledky normálních hodnot a patologických hodnot pro jednotlivé měřené parametry resp. pro potvrzení přítomnosti respirační patologie. Koncentrace různých mediátorů jsou v KVV velmi nízké (pg/ml až ng/ml). Proto je třeba použít velmi senzitivní metody analýzy jako je vysoce senzitivní kapalinová nebo plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie [91-93]. Předpokládá se, že různá plicní onemocnění mají specifické složení kondenzátu vydechovaného vzduchu a různé vědecké týmy se snaží prokázat přínos KVV v diferenciální diagnostice.

Dosud není ustanovena standardizace odběrových technik a analytických metod pro jednotlivé látky v KVV. Tuto situaci se snaží částečně řešit doporučení Evropské respirační společnosti, řada otázek však dosud zůstává nevyřešena, mimo jiné proto, že většina prací obsahuje jen několik desítek vyšetřených pacientů a rozsáhlejší studie dosud chybí [91, 92]. Přes tyto problémy stále narůstá počet prací přinášejících důkazy o potenciálním budoucím přínosu

této metody v hodnocení aktivity zánětu a oxidativního stresu nejen u respiračních onemocnění [94, 95].

1.4.4.2. Biomarkery lipoperoxidace v kondenzátu vydechovaného vzduchu

Buněčná membrána obsahuje fosfolipidy. Působením různých extracelulárních i intracelulárních procesů je z fosfolipidů odštěpována arachidonová kyselina a podobné nenasycené mastné kyseliny, které jsou substrátem pro enzymatické i neenzymatické reakce. Výsledkem těchto pochodů je tvorba různých biologicky aktivních lipidových mediátorů, které jsou významnými faktory v patogenezi zánětu dýchacích cest u astmatu. Ve většině případů jsou velmi rychle metabolizovány v játrech, plicní tkáni a ledvinách, proto aktivitu markerů lipoperoxidace monitorujeme podle konečného produktu jejich metabolických drah [64].

Enzymatickou cestou dochází k tvorbě leukotrienů působením enzymu 5-lipoxygenázy, tvorbě prostaglandinů a prostacyklinu působením cyklooxygenázy. Neenzymaticky, zejména vlivem oxidativního stresu, dochází k tvorbě isoprostanů např. 8-isoprostan-PGF_{α2}(8-iso). 8-iso je považován za citlivý marker oxidativního stresu a oxidační aktivity. Byl nalezen ve zvýšených koncentracích u astmatu, CHOPN, cystické fibrózy, ARDS a také u zdravých jedinců po inhalaci ozónu. Zvýšená koncentrace 8-isoprostanu korelovala s tíží astmatu [79, 96]. Efekt inhalačních steroidů na 8-iso byl patrný jen u pacientů s aspirinovou senzitivitou, antileukotrieny však koncentraci 8-iso neměnily [79].

Cysteinylové leukotrieny (cys-LT) vznikají při zánětu dýchacích cest aktivitou neutrofilů a eozinofilů. Stimulátorem produkce těchto látek jsou různé procesy, např. podání aspirinu u aspirin-senzitivních osob, fyzická zátěž, chladný vzduch, inhalace škodlivin. Cys-LTC₄, cys-LTD₄, cys-LTE₄ jsou produkty mastocytů a eozinofilů. Zvýšené koncentrace těchto leukotrienů byly pozorovány u dětí při exacerbaci astmatu. Zvýšená koncentrace cys-LT byla pozorována u pacientů s neléčeným aspirin-senzitivním astmatem, u léčených steroidy byla koncentracen cys-LT nižší. U aspirin-tolerantních astmatiků léčba steroidy neměnila koncentrace cys-LT v KVV [79]. Cys-LTB₄ je tvořen z arachidonové kyseliny cestou enzymatické hydrolýzy Cys-LTA₄ a je silným chemoatraktantem pro neutrofilů. LTB₄ byl ve zvýšených koncentracích nalezen v KVV u CHOPN a cystické fibrózy.

1.4.4.3. Další markery oxidativního poškození lipidů

V KVV lze měřit koncentrace dalších látek, které jsou produkty peroxidace lipidů resp. mastných kyselin. Jde například o malondialdehyd (MDA), 4-hydroxy-trans-nonenal (HNE), 4-hydroxy-trans-hexenal (HHE) a n-alifatické uhlovodíky (hexenal, heptenal, octanal, nonenal, dekanal, undekanal, dodekanal) [76]. Malondialdehyd dobře koreluje s exogenní expozicí oxidativnímu stresu [97].

HNE je aldehyd vzniklý oxidativním poškozením ω -6 nenasycených mastných kyselin fosfolipidových membrán. Jde o vysoce reaktivní konečný produkt lipoperoxidace, který velmi snadno difunduje do buněk a tkání i ve značné vzdálenosti od místa svého vzniku. HNE hraje důležitou roli v buněčné apoptóze následkem expozice oxidativnímu stresu. HHE je aldehyd vzniklý oxidativním poškozením ω -3 nenasycených mastných kyselin fosfolipidových membrán [98]. HNE i HHE v organismu dále reagují s různými proteiny a poškozují jejich fyziologickou funkci v organismu.

1.4.4.4. Biomarkery poškození proteinů v kondenzátu vydechovaného vzduchu

Reakce oxidu dusnatého se superoxidovým radikálem vede k tvorbě peroxynitritu (viz výše), který je vysoce oxidačně reaktivní sloučeninou. Peroxynitrit reaguje s tyrosinovými reziduy proteinů, se kterými tvoří stabilní produkt nitrotyrosin (NO-Tyr). Nitrotyrosin byl prokázán ve zvýšené koncentraci v KVV u astmatiků oproti zdravým a zvyšuje se při exacerbaci astmatu. Zvýšení NO-tyr bylo popsáno i u cystické fibrózy. Dalšími markery nitračního stresu proteinů jsou například orto-tyrosin (o-Tyr), chloro-tyrosin (Cl-Tyr) a bromo-tyrosin (Br-Tyr). Bromo-tyrosin je specifický pro eozinofilní zánět [91].

1.4.4.4. Další markery oxidativního stresu v KVV

V KVV lze měřit také koncentrace látek vzniklých poškozením nukleových kyselin exogenním oxidačním stresem jako je 5-hydroxymethyl-uracyl (5-HOMEU), 8-hydroxy-guanosin (8-OHG), 8-hydroxy-2-deoxyguanosin (8-OHdG).

Hodnota pH je v KVV dobře reprodučibilní a jednoduše stanovitelný parametr. KVV je výrazně kyselější u pacientů s astmatem oproti zdravým, pH se normalizuje se po léčbě steroidy. Kyselost KVV je ovlivněna i refluxní nemocí jícnu, normalizuje se po léčbě inhibitory protonové pumpy. Peroxid vodíku je dalším parametrem, který vypovídá o intenzitě oxidačního stresu. Jde o málo stabilní molekulu, zvýšená koncentrace peroxidu vodíku byla nalezena u CHOPN, ale i u pacientů s nekontrolovaným astmatem.

1.4.5. VYŠETŘENÍ EOZINOFÍLIE PERIFERNÍ KRVE (PK)

Eozinofilie periferní krve byla u astmatu popsána záhy po objevu této buňky. Byla zjištěna pozitivní korelace mezi eozinofilií PK a symptomy a negativní korelace k parametru FEV1 [8, 99]. U dospělých eozinofilie PK koreluje s bronchiální hyperreaktivitou a variabilitou PEF [100]. Problematické je určení normálních hodnot, které se v různých literárních pramenech liší. U dospělých se považuje za normální rozmezí absolutního počtu eozinofilů (AEC) rozmezí $0,015-0,65 \times 10^9/l$, za signifikantní eozinofilii považují někteří autoři i hodnoty nad $0,22 \times 10^9/l$ [34]. Uznávanou hranicí eozinofilie (EC%) v diferenciálním rozpočtu je hodnota nad 4%. Je třeba brát v úvahu také diurnální variabilitu AEC (až 40%), která je ovlivněna

diurnální sekrecí kortizolu. Eozinofilie periferní krve je užitečný marker ve sledování léčebné odpovědi na anti-eozinofilní léčbu (anti-IL-5, anti-IL-13), její hodnota klesá i u biologické léčby omalizumabem [8]. Perzistující eozinofilie periferní krve u OLA může svědčit o non-compliance pacienta k léčbě steroidy. U těžkého refrakterního astmatu svědčí perzistující eozinofilie periferní krve při léčbě steroidy o kortikorezistenci a/nebo floridní rinosinusitidě [99-101].

1.4.6. VYŠETŘENÍ MOČI NA KONCENTRACI CYSTEINYLOVÝCH LEUKOTRIENŮ

Koncentrace cysteinylových leukotrienů v moči je považována za prediktor léčebné odpovědi astmatiků na antileukotrieny, zejména u pacientů s aspirinovou senzitivitou. Rutinní používání v klinické praxi však tato metoda nedosáhla, analýza je technicky náročná. V klinické praxi je toto vyšetření nahrazeno terapeutickým testem s podáním antileukotrienu.

1.4.7. INVAZIVNÍ METODY DIAGNOSTIKY ZÁNĚTU STĚNY DÝCHACÍCH CEST

Mezi invazivní vyšetření s potenciálním rizikem zhoršení astmatu a vzniku dalších komplikací patří bronchoskopie. Přesto její provedení nutně patří do algoritmu péče o pacienty s těžkým refrakterním astmatem i obtížně léčitelným astmatem. Bylo prokázáno, že je tato metoda bezpečná i u pacientů s těžkým astmatem, její provedení nezvyšuje významně výskyt exacerbací astmatu ani poklesu plicních funkcí [102].

Bronchoskopie má svoje místo zejména u pacientů s podezřením na obtížně léčitelné astma v důsledku nepoznané komorbidity. Bronchoskopicky lze odhalit patologické stavy, které napodobují nebo komplikují průběh astmatu jako je syndrom dyskinezy hlasových vazů a tracheobronchomalacie.

Bronchoalveolární laváž (BAL) umožňuje zjistit cytologii a imunofenotypizaci leukocytů v periférii plicního parenchymu. Poskytuje tedy informaci o nejdálší části bronchiálního stromu a oblasti alveolů. Pro astma svědčí predominance eozinofilů v BALu (>3%), u pacientů s TRA a kortikorezistencí dominují v BALu neutrofilové. Analýza mediátorů v BALu nepřinesla korelaci s klinickým průběhem astmatu a nemá pro klinickou praxi přínos.

Bronchoskopie umožňuje provést biopsii sliznice bronchu, bronchoalveolární laváž a v indikovaných případech i transbronchiální biopsii periferie plicního parenchymu. Morfologické charakteristiky stěny bronchu mohou posoudit intenzitu remodelace bronchiální stěny. Hodnocení biopsie bronchu je stále považováno za zlatý standard v hodnocení zánětu dýchacích cest [68, 93]. Typickým nálezem u astmatu je v bronchiální biopsii odloučení respiračního epitelu, hyperplazie pohárkových buněk, ztlustělá lamina reticularis bazální membrány a infiltrace submukózy eozinofily a lymfocyty. Proliferace myofibroblastů a depozice kolagenu v lamina reticularis jsou hlavními rysy remodelace stěny dýchacích cest [59, 71].

Neinvazivní metody sledování zánětu dýchacích cest se snaží dosáhnout vysoké korelace s eozinofilním zánětem v biopsii bronchiální stěny. Z vyšetřovacích metod nejlépe koreluje

cytologie indukovaného sputa ($\geq 2\%$ eozinofilů), méně spolehlivě koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého FeNO (≥ 30 ppb) v závislosti na použitém limitu positivity a malou korelaci má eozinofilie periferní krve ($\geq 0,22 \times 10^9/l$)[103]. Limity pro převládající eozinofilní a non-eozinofilní zánět se podle různých autorů různí, například autoři studie s azitromycinem u astmatu prokázali vysokou korelaci eozinofilie indukovaného sputa s hodnotou FeNO ($R=0.54$, $p<0.0001$), limit 42 ppb rozlišil eozinofilní zánět se senzitivitou 63% a specificitou 80% ($p<0.0001$) [34]. Některé práce prokázaly odlišnost typu zánětu u těžkého astmatu oproti lehkému stádiu nemoci [67, 104]. Dosud však nebyla jednoznačně stanovena histo-patologická definice těžkého refrakterního astmatu, protože jde o velmi heterogenní onemocnění s heterogenními patologickými obrazy.

2. CÍL PRÁCE

Cílem práce je:

1. Sledování specifických klinických, funkčních a zánětlivých charakteristik u pacientů s těžkým refrakterním astmatem
2. Zhodnocení vztahu vybraných ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu (malondialdehyd, 4-hydroxy-*trans*-nonenal, 4-hydroxy-*trans*-hexenal, nasycené aldehydy, 8-isoprostan, cysteinylové leukotrieny LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄, *orto*-tyrosin, 3-nitro-tyrosin, chloro-tyrosin, 5-hydroxy-methyl-uracyl, 8-hydroxy-guanosin, 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosin) k běžně klinicky užívaným metodám monitorace zánětu a bronchiální obstrukce u těžkého refrakterního astmatu.
3. Nalezení nových markerů specifického poškození oxidativním stresem pro různé fenotypy astmatu

Hypotézy:

1. **Existují rozdíly v koncentracích ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu mezi pacienty s těžkým refrakterním astmatem a zdravou kontrolní skupinou.**
2. **Koncentrace ukazatelů oxidativního stresu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem se liší v závislosti na eozinofilii periferní krve**
3. **Koncentrace ukazatelů oxidativního stresu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem se liší v závislosti na koncentraci vydechovaného oxidu dusnatého**
4. **Systémová kortikoterapie ovlivňuje koncentrace ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem.**
5. **Vybrané klinické faktory mohou ovlivnit koncentrace ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem.**

3. SOUBOR NEMOCNÝCH, STATISTICKÉ ANALÝZY

Sledovali jsme 40 pacientů s těžkým refrakterním astmatem léčených ve specializované poradně na Plicní klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové. Všichni pacienti zahrnutí v této práci splnili diagnostická kritéria České pneumologické a ftizeologické společnosti pro těžké refrakterní astma [14]. Kontrolní skupina byla složena z 19 zdravých dobrovolníků, nekuřáků, bez anamnézy alergie či astmatu. Před vstupem do sledování podepsali všichni účastníci informovaný souhlas. Práce byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

3.1. SLEDOVANÉ KLINICKÉ PARAMETRY Z OBDOBÍ PŘED VSTUPEM DO STUDIE

Ve skupině astmatiků byla zahrnuta data z klinického sledování v poradně pro těžké astma od roku 2006. V průběhu tohoto období pacienti podstoupili standardní vyšetřovací program dle platného doporučeného postupu. U všech nemocných byla ověřena diagnóza astmatu (analýza dokumentace, alergologické vyšetření, bronchomotorické testy, vyšetření koncentrace oxidu dusnatého ve vydechovaném vzduchu, vyloučení jiných stavů imitujících astma).

Tíže bronchiální obstrukce, její reverzibilita a dynamika změn v čase byla měřena spirometricky, přítomnost a intenzita eozinofilního zánětu byla sledována průběžným měřením koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého (FeNO). U pacientů s přítomnou bronchiální obstrukcí byla provedena bodypletysmografie a vyšetření plicní difuze. U většiny pacientů bylo provedeno HRCT plic k posouzení ztlustění bronchiální stěny a vyloučení jiných patologií plicního parenchymu, které by mohly imitovat astma, nebo průběh astmatu komplikovat.

U části nemocných byla provedena bronchoskopie s provedením bronchoalveolární laváže a biopsií karin segmentárních bronchů k posouzení remodelace bronchiální stěny. BAL byl zpracován cytologicky a imunofenotypizačně s cílem vyloučit eosinofilní plicní syndrom či jinou patologii parenchymu plic než je astma.

Průběžně bylo prováděno vyšetřování nejčastějších komorbidit astmatu, které jsou popisovány v literatuře a doporučených postupech [14, 15, 26]. Refluxní nemoc jícnu byla vyšetřována 24-hodinovým monitorováním pH metrie jícnu, u části nemocných byla diagnóza stanovena již před převzetím do poradny pro těžké astma a nemocní užívali antisekretorickou léčbu inhibitory protonové pumpy. U všech pacientů bylo provedeno vyšetření otorinolaryngologem s rinoendoskopií k vyloučení nosní polypózy a prokázání rinosinuitidy jako komplikujícího faktoru. Z komplikujících faktorů astmatu byla zjišťována historie kouření cigaret, nikdo ze sledovaných pacientů nebyl aktivní kuřák. Osteoporóza byla sledována denzitometrií skeletu u pacientů na trvalé kortikoterapii a u nemocných léčených více než ekvivalentem 1600ug budesonidu denně.

Sledovali jsme řadu dalších klinických parametrů, které charakterizují fenotyp a tíži astmatu: počet exacerbací astmatu v posledních 12 měsících před vyšetřením ve studii, spotřebu úlevové bronchodilatační léčby v posledním měsíci, dávku a celkovou délku systémové kortikoterapie, dávku inhalační kortikoterapie, přítomnost prokázané alergie na roztoče a plísň, přítomnost ekzému, aspirinové senzitivity, hodnotu celkového IgE, kvalitu života v posledních 6 letech dotazníkem „Test kontroly astmatu“ (AKT) [105]. U nemocných, kde byla provedena bronchoskopická biopsie bronchiální stěny, jsme sledovali průměrnou a maximální šířku bazální membrány respiračního epitelu a převládající buněčnou populaci v submukóze bronchu.

3.2. VYŠETŘENÍ PACIENTŮ VE STUDII

Po podpisu informovaného souhlasu byli pacienti pozváni na vyšetření do poradny pro těžké astma na Plicní klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové. Podmínkou zařazení do studie bylo dosažení dlouhodobě kompromisní úrovně kontroly astmatu bez nárazu systémové kortikoterapie v posledních 4 týdnech a beze změny dávky chronické systémové kortikoterapie v posledních 4 týdnech u kortikodependentních pacientů. U kontrolní skupiny zdravých osob bylo podmínkou zařazení do studie absence příznaků respiračního infektu v posledních 4 týdnech, nebyli zařazeni žádní současní ani bývalí kuřáci cigaret.

Pacienti i členové kontrolní skupiny podstoupili stejný vyšetřovací protokol. Nejprve absolvovali odběr anamnézy, fyzikální vyšetření lékařem. Poté vyplnili test kontroly astmatu, byl proveden odběr periferní žilní krve na vyšetření krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu leukocytů v hematologické laboratoři IV. interní hematologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Po odběru krve byl u všech sledovaných subjektů proveden odběr kondenzátu vydechaného vzduchu na kondenzátoru Jaeger EcoScreen (Erich Jaeger GmbH, Hoechberg, Německo) podle literárně doporučené metodiky [91, 92]. Kondenzátor EcoScreen umožňuje ochlazení vydechaného vzduchu, který je veden výdechovou hadicí od pacienta do lamelárního kondenzátoru se sběrnou nádobou. Tato nádoba je ochlazována na -10°C elektrickým mrazícím aparátem. Pacienti i kontrolní skupina klidným dýcháním dýchali do kondenzátoru přes ventil, který bránil míchání inspiračního a expiračního proudu vzduchu a vniknutí slin, dýchání nosem bylo zamezeno klipem. Odběry byly prováděny mezi 8 a 13 hodinou. Kondenzátor byl napojen na průtokoměr, odběr byl ukončen po dosažení objemu 120 L vydechaného vzduchu. Průměrná doba exhalace byla 10,8 minuty, průměrná minutová ventilace 12,1 litrů a průměrná dechová frekvence 17 dechů za minutu. Odběr KVV byl podobně, jak uvádí odborná literatura dobře tolerován, bez vedlejších nežádoucích účinků či přerušení v průběhu odběru žádným z vyšetřovaných subjektů [60]. Přípravu kondenzátorů a odběr

vzorků prováděly specializované laborantky vyškolené v metodice odběru ze spolupracujícího pracoviště Kliniky pracovního lékařství Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, přednostka kliniky prof. MUDr. Daniela Pelclová, CSc. Vzorky KVV byly ihned po odběru zamrazeny do suchého ledu na teplotu -80st.C. Chemické analýzy KVV byly provedeny v Ústavu organické technologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze doc. Ing. Petrem Kačerem, PhD.

Po odběru kondenzátu pacient seděl v klidu v čekárně po dobu 10 minut a poté bylo provedeno on-line měření koncentrace oxidu dusnatého ve vydechovaném vzduchu (analyzátor HypairFeNO, Medisoft, Belgie, elektrochemická metoda měření). Měření proběhlo při výdechové rychlosti 50 ml/sec dle platného doporučeného standardu [88].

Na závěr protokolu všichni sledovaní účastníci studie absolvovali spirometrické vyšetření (přístroj ZAN 100 Better Flow, MR-Diagnostic, Česká republika) dle platného doporučení Americké hrudní společnosti. U astmatiků byla retrospektivně zaznamenávána data ze spirometrií provedených na stejném přístroji v roce z posledních tří měsíců roků 2011, 2009 a 2006 k posouzení deklinace plicních funkcí v čase.

3.3. VYŠETŘENÍ KONDENZÁTU VYDECHOVANÉHO VZDUCHU (KVV)

Vzorky kondenzátu vydechovaného vzduchu byly zpracovány v Ústavu organické technologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. Byly použity metody kombinující kapalinovou a/nebo plynovou chromatografii a hmotnostní spektrometrii, jak je doporučováno v odborné literatuře [79, 91, 92]. Tyto metody jsou schopné určit i velmi nízké koncentrace látek na úrovni piko- až femtomolů, což jsou koncentrace, ve kterých se biologicky aktivní látky v KVV vyskytují. Vzorky byly testovány na kontaminaci slinami zjištěním aktivity α -amylázy.

Cílem práce bylo sledovat markery oxidativního stresu v KVV, které odpovídají poškození různých struktur.

3.3.1. SPEKTRUM SLEDOVANÝCH LÁTEK V KONDENZÁTU VYDECHOVANÉHO VZDUCHU

Prováděli jsme analýzu KVV metodou kapalinové/plynové chromatografie s hmotnostní spektrofotometrií s cílem změřit koncentraci těchto látek:

Malondialdehyd (MDA), *4-hydroxy-trans-nonenal* (HNE), *4-hydroxy-trans-hexanal* (HHE) a *aldehydy C₆-C₁₂* – patří do skupiny aldehydů, které vznikají peroxidací lipidů buněčných membrán. Malondialdehyd je tvořen oxidací z kyseliny arachidonové, HNE je produktem lipoperoxidace ω -6 mastných kyselin (arachidonová, linoleová kyselina), HHE vzniká lipoperoxidací ω -3 mastných kyselin (oleová kyselina). Satureované aldehydy C₆-C₁₂ vznikají dalšími oxidačními procesy kyselin linoleové, arachidonové, palmitoleové a oleové. Variační koeficienty koncentrací aldehydů se v KVV pohybují kolem 12-20% [91]. Aldehydy byly

prokázány v KVV u astmatu, po expozici astmatiků ozónu došlo k nárůstu MDA [97]. U pacientů s CHOPN koncentrace MDA negativně koreluje s hodnotou FEV1 [76]. Aldehydy byly prokázány ve zvýšené koncentraci v KVV u dětí s exacerbací astmatu, po léčbě steroidy došlo poklesu koncentrací aldehydů [106].

8-isoprostaglandin-F2 α (8-isoprostan, 8-iso) - vzniká non-enzymatickou reakcí reaktivních kyslíkových radikálů s kyselinou arachidonovou. 8-iso je považován za důležitý marker oxidativního stresu u plicních onemocnění. Má silné vasokonstriční účinky, stimuluje mitogenezi a zvyšuje adhezi monocytů na povrch endotelů a indukuje buněčnou apoptózu. Vysoké koncentrace 8-iso byly nalezeny u revmatoidní artritidy, psoriatické artritidy a systémové sklerózy. V pneumologii byl nalezen vztah 8-iso k expozici cigaretovému kouři a je zvýšen v KVV u chronické obstrukční plicní nemoci. Vyšší koncentrace 8-iso byly nalezeny ve zvýšených koncentracích u steroid-naivních aspirin senzitivních astmatiků, po léčbě steroidy koncentrace 8-iso klesly [64]. 8-iso může být i markerem kortikorezistence. Většina studií používala k detekci 8-iso EIA (enzymatickou immunoassay) s detekčním limitem 3,8 pg/ml, u zdravých dobrovolníků je hodnota 8-iso mezi 0-40 pg/ml, data o variabilitě této metody se v různých studiích významně liší [79, 96].

Leukotrien B $_4$ - je cysteinylový leukotrien, který se podílí na mechanismech zánětu u astmatu, zejména během exacerbací a u těžkého refrakterního astmatu. LTB $_4$ je silný chemoatraktant neutrofilů. Ve zvýšeném množství je přítomen např. v supernatantu indukovaného sputa pacientů s CHOPN, kde hraje neutrofilní zánět hlavní roli. V literatuře je u zdravých dospělých udávána normální hodnota 29,4 \pm 7,8 pg/mL [79]. V našem souboru zdravých pacientů byla naměřena průměrná hodnota 29,8 \pm 6,5 pg/mL. Intra-individuální variabilita se udává kolem 2% [91].

Cysteinylové leukotrieny (LTC $_4$, LTD $_4$ a LTE $_4$) - patří do skupiny cysteinylových leukotrienů, které se podílí na mechanismech zánětu u astmatu. LTC $_4$, LTD $_4$ i LTE $_4$ byly nalezeny v KVV u dospělých s astmatem, léčba steroidy neměla efekt na koncentrace těchto látek. U nemocných s aspirin-senzitivním astmatem však léčba steroidy a montelukastem snižovala koncentraci cysteinylleukotrienů. Tyto studie nebyly zaslepené, přesto jde o perspektivní marker kontroly efektu léčby aspirin-indukovaného astmatu a vyhledání vhodných pacientů k léčbě antileukotrieny, dosud však přesvědčivé práce ani normální hladiny těchto látek publikovány nebyly [79, 107].

3-nitro-tyrosin (NO-tyr) - vzniká reakcí peroxynitritu s tyrosinovými zbytky proteinů. Tyto oxidační změny mohou změnit biologické vlastnosti a funkční schopnosti proteinů (ztráta funkce enzymů, transportních bílkovin). NO-tyr byl ve zvýšeném množství nalezen u pacientů bez předchozí léčby IKS, jeho hodnota korelovala s parametrem FEV1. Léčba steroidy v některých

studiích snižovala koncentraci NO-tyr [91]. Množství prací sledujících NO-tyr u astmatu je malé a data normálních hodnot se liší, uvádí se hodnoty až řádově vyšší než jsme naměřili v našem souboru ($16,1 \pm 5,1$) v závislosti na senzitivitě použité analytické metody [107]. *Chloro-tyrosin* a *orto-tyrosin* jsou také ukazatelé nitračního poškození tyrosinových zbytků proteinů, u astmatu nebyly podle dostupné literatury dosud popsány zvýšené koncentrace v KVV.

5-hydroxymethyl uracil, *8-hydroxyguanosin* a *8-hydroxy-2'-deoxyguanosin* – jsou látky vznikající reakcí kyslíkových radikálů s nukleovými kyselinami. V odborné literatuře dosud nebyla popsána detekce v KVV, jsou publikovány práce stanovující detekci těchto látek v moči.

3.3.2. BIOCHEMICKÁ ANALÝZA KONDENZÁTU VYDECHOVANÉHO VZDUCHU

Biomarkery obsahující ve své struktuře amino skupinu (o-Tyr, NO-Tyr, Cl-Tyr, 8-OHG, 8-OHdG) byly derivatizovány dle následujícího postupu: k 500 μ l roztoku KVV obsahující vnitřní standardy (8-hydroxy-2'-deoxyguanosin-15N5 a tyr-d4) bylo přidáno 350 μ l borátového pufru (pH směsi 8,5–9) a 50 μ l roztoku derivatizačního činidla 3-aminopyridyl-N-hydroxysukcinimidyl karbamátu (= APDS) (roztok APDS v acetonitrilu o koncentraci 1mg/1ml, APDS činidlo bylo připraveno reakcí N,N'-dihydroxysukcinimidyl karbonátu (1,28 g, 5 mmol) s 3-aminopyridinem (470 mg, 5 mmol) v acetonitrilu (25 ml) při laboratorní teplotě, doba reakce 8 hodin). Derivatizovaný vzorek byl míchán 10 minut při laboratorní teplotě a poté 10 minut při teplotě 55 °C (rozložení nezreagovaného APDS činidla). Následně byl vzorek analyzován kapalinovou chromatografií s elektrosprejovou ionizací a hmotnostní spektrometrií (LC-ESI-MS).

Derivatizace aldehydů (n-alifatické aldehydy – (C6-C13), MDA, 4-HNE a 4-HHE) a karboxylových kyselin (8-iso PGF2 α a leukotrieny B4, C4, D4 a E4) byly derivatizovány s využitím Girardova činidla T (GirT) v kyselém prostředí (1% kyseliny octová) a v přítomnosti EDC činidla (derivatizace karboxylových kyselin). Derivatizační reakce probíhala při teplotě 60 °C po dobu 2 hodin. Po uplynutí reakční doby byla provedena LC-ESI-MS analýza.

Analýza látek byla realizována na LC-MS systému skládajícího se z degaséru, kvartérní pumpy a autosampleru Accela (Thermo Fisher Scientific, USA) a hmotnostního spektrometru s analyzátozem typu trojitý kvadrupol - TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific, USA) s elektrosprejovou ionizací (HESI).

K chromatografické separaci látek derivatizovaných APDS činidlem bylo použito mobilní fáze o isokratickém složení acetonitril:voda (70:30 v/v) s pH upraveným na hodnotu 5,4 (octanem amonným) se stacionární fází tvořenou porézním grafitovým uhlíkem Hypercarb (Hypercarb Thermo, rozměry kolony - 2,1 x 100 mm, zrnitost stacionární fáze - 5 μ m, Thermo Electron Corporation, USA). Průtok mobilní fáze činil 150 μ l/min. Chromatografická kolona byla temperována na teplotu 30 °C. Na kolonu byl nastříkovan objem vzorku - 10 μ l. Při chromatografické separaci látek derivatizovaných GirT bylo použito isokratickém eluce se

složením mobilních fází metanol:voda s pH upraveným na hodnotou 9 (roztokem hydroxidu amonného) (40:60 – v/v) a identické kolony Hypercarb.

Při hmotnostně-spektrometrické analýze bylo použito pozitivní elektrosprejové ionizace (ESI+) pro látky derivatizované GirT a negativní elektrosprejové ionizace (ESI-) pro látky derivatizované APDS činidlem. Scanování látek (v obou případech) probíhalo v módu neutrální ztráty (NL) s kolizně indukovanou disociací (CID). Pro derivatizační činidlo APDS bylo použito rozsahu hmot 303-475 Da (Q1) a 181-353 Da (Q3) a pro derivatizační činidlo GirT bylo použito intervalů 150 -350 Da (Q1) a 91-291 Da (Q3). Parametry hmotnostního spektrometru byly optimalizovány na následující hodnoty: napětí na kapiláře 3000 V (ESI+)/-2500V (ESI-), teplota na vstupní kapiláře 300 °C, teplota HESI výparníku 300°C, sheat gas (dusík) tlak 45 psi, pomocný plyn (dusík) 10 ArbU.

Pro jednotlivé biomarkery oxidativního stresu byla provedena validace metody. Při validaci byly stanoveny limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) a hodnoty přesnosti (vyjádřeno relativní směrodatnou odchylkou – RSD) a správnosti (vyjádřeno výtěžností). Validace byla provedena pro tři matrice – KVV, moč a krevní plasmu. Hodnoty validačních parametrů pro KVV jsou uvedeny v Tabulce 7

Tabulka 7 Validace metod pro matrici kondenzátu vydechaného vzduchu				
Analyt	LOD (pg/ml)	LOQ (pg/ml)	Přesnost RSD (%)	Výtěžnost (%)
MDA	12	15	9,7	90,5
4-HHE	14	17	8,6	89,3
4-HNE	16	22	9,4	88,8
Hexanal	11	14	10,5	90,0
Heptanal	14	18	12,5	89,2
Oktanal	10	21	13,6	87,3
Nonanal	16	22	14,4	88,2
Dekanal	18	22	14,8	87,6
Undekanal	19	25	15,1	86,1
Dodekanal	20	26	15,2	84,4
Tridekanal	18	24	14,9	85,3
LTB ₄	5	7	8,7	92,1
LTC ₄	8	10	10,5	86,7
LTD ₄	6	8	9,2	98,4
LTE ₄	5	7	8,9	91,0
o-Tyr	6	7	7,6	92,4
Cl-Tyr	7	8	7,1	93,0
NO-Tyr	5	6	6,5	94,6
8-OHG	4	5	6,6	94,5
8-OHdG	5	6	6,3	94,3

3.4. STATISTICKÉ ANALÝZY

Ve sledovaném souboru byly nejprve porovnávány rozdíly mezi astmatiky a kontrolní skupinou, poté byly sledovány rozdíly mezi vybranými ukazateli v rámci skupiny těžkého refrakterního astmatu. U spojitých veličin byla posouzena normalita rozdělení D'Agostinovým testem. Veličiny s normálním rozdělením byly charakterizovány průměrem a směrodatnou odchylkou a k porovnání průměrů mezi sledovanými skupinami byl použit dvouvýběrový t-test a v případě více skupin analýza rozptylu jednoduchého třídění. U veličin s asymetrickým, nenormálním rozdělením byl počítán medián a mezikvartilové rozpětí, k porovnání skupin byl použit Mann-Whitneyův test, případně Kruskal-Wallisův test.

V tabulkách jsou u veličin s normálním rozdělením uváděny průměry a směrodatné odchylky, u veličin s asymetrickým rozdělením je uveden medián a mezikvartilové rozpětí.

Vztahy mezi hodnotami naměřených spojitých veličin ve vydechovaném vzduchu byly hodnoceny na základě Spearmanových korelačních koeficientů. Asociace mezi dichotomickou proměnnou a potenciálními prediktory byla analyzována logistickou regresí. Pro porovnání procentuálního zastoupení kategoriálních veličin mezi skupinami byl použit Fisherův exaktní test a χ^2 -test. Všechny testy byly prováděny jako oboustranné na hladině významnosti 0,05.

4. VLASTNÍ VÝSLEDKY

Hlavním tématem této práce je sledování specifických charakteristik zánětu a oxidativního stresu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem (TRA). Sledovali jsme také vybrané klinické a funkční charakteristiky, které mohou být odrazem těžkého průběhu astmatu nebo být příčinou špatné odpovědi na léčbu. Porovnání výsledků základních diagnostických metod mezi kontrolní skupinou a skupinou těžkého refrakterního astmatu je uvedeno v tabulce č. 8.

Tabulka 8 Porovnání dat mezi skupinami TRA a KS (průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)			
Parametr	Kontrolní skupina (KS)	Těžké refrakterní astma (TRA)	p
Počet žen	13 (68,4%)	24 (60%)	p=0.060
Průměrný věk (roky)	50,1 (± 12,3)	46,5 (±9,6)	p=0.330
BMI (kg/m²)	24,2 (± 3,71)	29,7 (± 5,21)	p<0.001
FEV1 (l/s)	3,14 (± 0,75)	1,68 (± 0,84)	p<0.001
FeNO₅₀ (ppb)	14,9 (± 5,7)	23 (13-46)	p=0.020
AEC (x10 ⁹ /l)	0,16 (± 0,15)	0,23 (0,05-0,33)	p=0,380
EC (%)	2,0 (± 1,26)	2,9 (0,8-4,1)	p=0,410

4.1. CHARAKTERISTIKA KONTROLNÍ SKUPINY (KS)

Výsledky

Demografická data

Kontrolní skupina (KS) byla tvořena 19 zdravými dobrovolníky (6 muži a 13 ženami). Průměrný věk skupiny TRA byl 50,1 (±12,3) let.

Spirometrie

Spirometrické hodnoty byly u všech členů kontrolní skupiny zcela normální, průměrná hodnota FEV1 byla 3,14 (±0,75) litru resp. 102 (±9,9)% náležitých hodnot, průměrná hodnota poměru FEV1/VCmax byla 81,7(±6,0)%.

Eozinofilní záněť

Koncentrace NO ve vydechaném vzduchu byla také zcela v normě, průměrná hodnota 14,9 (±5,7) ppb. V periferní krvi byl počet eozinofilů (AEC) v průměru 0,16 (±0,15)x10⁹/l, procentuální podíl (EC%) 2,0 (±1,26)% z leukocytů periferní krve.

4.2. CHARAKTERISTIKA SKUPINY TĚŽKÉHO REFRAKTERNÍHO ASTMATU (TRA)

Výsledky

Demografická data

Skupinu těžkého refrakterního astmatu (TRA) tvořilo 40 pacientů - 16 mužů a 24 (60%) žen. Průměrný věk TRA skupiny byl 50,1 ($\pm 12,3$) let. Pacienti s TRA měli nadváhu (průměrné BMI 29,8 ($\pm 5,2$) kg. Hodnoty BMI nad 25 kg/m² mělo 33 pacientů (82,5%). Převažovali nemocní s astmatem vzniklým v dospělosti tj. po 12. roce věku (34 tj. 85% případů).

Spirometrie

Spirometrie byla provedena po podání chronické ranní dávky dlouhodobě působících beta-2-agonistů, jde o postbronchodilatační hodnoty. U 28 (70%) pacientů byla přítomna obstrukční ventilační porucha i v době stabilizovaného stavu a kompromisní kontroly astmatu - průměrná hodnota FEV1 dosáhla 1,68 ($\pm 0,84$) litru resp. 54,7($\pm 22,4$)% normálních hodnot, maximální vitální kapacita (VCmax) 2,77($\pm 1,1$) litru resp. 74,2($\pm 24,5$)% normálních hodnot. Poměr FEV1/VCmax dosáhl 60,9 ($\pm 14,26$)%. Průběžným sledováním vývoje spirometrických hodnot byla postbronchodilatačně zjištěna přítomnost fixované bronchiální obstrukce u 35 pacientů (87,5%). Bodypletysmografie byla provedena u 35 pacientů, plicní hyperinflace měřená hodnotou reziduálního plicního objemu (RV) byla přítomna u 26 (74,3%) astmatiků. Průměrná hodnota RV% byla 165,9($\pm 44,7$)%, poměr RV/TLC dosáhl 51,7($\pm 17,5$)%. Pacienti s TRA měli také výrazně zvýšené centrální odpory dýchacích cest, medián hodnot 0,42 (0,32-0,54) kPa.s/l. Vyšetření plicní difuze prokázalo mírné snížení hodnoty transfer faktoru pro oxid uhelnatý (TLCO), medián hodnot 71,5 (43-80)%.

Tíže symptomů dle dotazníku kvality života „Test kontroly astmatu“AKT

Pacienti s TRA měli snížené skóre dotazníku kvality života AKT, průměrné skóre 13,6 ($\pm 5,0$) bodů. Ve skupině TRA pacienti prodělali průměrně 4,08 ($\pm 3,8$) exacerbací v posledních 12 měsících před vstupem do studie. U 15 (37,5%) nemocných bylo astma výrazně symptomatické, takže potřebovali více než 4 vdechy úlevové léčby SABA denně. Medián denní spotřeby SABA byl 2,5 (1-6) dávky.

Eozinofilní zánět

Intenzita eozinofilního zánětu dýchacích cest byla měřena pomocí koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého při výdechové rychlosti 50 ml/sec (FeNO). U 14 (35%) pacientů trvala i přes vysokou dávku IKS a SKS hodnota FeNO vyšší než 30 ppb. Medián hodnoty FeNO v souboru byl 23 (13-46) ppb. Průměrná hodnota FeNO ze tří posledních návštěv v poradně pro těžké astma se výrazně nelišila od poslední hodnoty FeNO - medián průměrné hodnoty FeNO byl 24 (14-50,0) ppb. K posouzení zánětlivého fenotypu astmatu jsme provedli z periferní krve vyšetření krevního obrazu se stanovením absolutního počtu eozinofilů (AEC) a a % eozinofilů v diferenciálním rozpočtu leukocytů (EC%) [31]. Medián zjištěné hodnoty

eozinofilů periferní krve odebrané v den odběru KVV byl 0,23 (0,05-0,33) x 10⁹/l, procentuálně byl medián hodnot 2,9% (0,8-4,1). Za signifikantní eozinofilii periferní krve je považována hodnota nad 4%, kterou v našem souboru převýšilo celkem 13 (32%) pacientů.

Protizánětlivá léčba

Přehled spektra podávaných protizánětlivých léků je uveden v Tabulce č. 9. Systémovou kortikoterapií nutnou pro udržení kompromisní kontroly astmatu trvale dostávalo 21 (50%) pacientů, medián dávky 10(10-20)mg ekvivalentu prednisonu, průměrná celková doba léčby SKS byla 13,0 let. Průměrná denní dávka inhalačního kortikosteroidu (μg ekvivalentu budesonidu) se nelišila mezi pacienty léčenými pouze inhalačními kortikosteroidy 3432(±1233) a pacienty léčenými trvalou kortikoterapií 3359 (±1943) μg (p=0,88, NS). U všech nemocných byla dávka IKS i SKS vytitrována dlouhodobým sledováním kontroly astmatu a byla považována za optimální, při pokusech o snížení dávek protizánětlivé léčby došlo ke ztrátě kontroly astmatu.

Tabulka 9 Přehled podávaných léků mimo IKS a LABA ve skupině TRA		
Název léku	Počet pacientů	% podíl
Systémová kortikoterapie	21	52,5%
Antileukotrieny	21	50,0%
Teofylliny	16	40,0%
Tiotropium	11	27,5%
Omalizumab (anti-IgE protilátka)	8	20,0%
Makrolidy	5	12,5%

Celkem 8 pacientů (20%) bylo léčeno biologickou léčbou anti-IgE protilátkou pro těžké alergické IgE-mediované astma s častými exacerbacemi, léčba antileukotrieny byla podávána u 21 (50%) pacientů, léčba retardovanými teofylliny u 16 (40%). Imunomodulační léčba makrolidy u non-eozinofilního fenotypu astmatu s častými respiračními infekcemi a následnými exacerbacemi astmatu byla podávána 5 (12,5%) astmatikům, v 11 (27,5%) případech byla nemocným s těžkou plicní hyperinflací podáváno dlouhodobě působící anticholinergikum tiotropium.

Atopie

Výskyt atopie byl zjišťován vyšetřením u alergologa, kde byly provedeny prick-testy a/nebo testování specifických IgE protilátek. Za atopii byla považována situace alespoň jednoho pozitivního specifického IgE nebo prick testu na alespoň jeden aeroalergen (kočka, pes, roztoči, travní nebo stromové pyly a směs plísňí). Ve skupině TRA byla prokázána atopie u 30 astmatiků (75%). Cíleně jsme sledovali výskyt alergie na roztoče (*Dermatophagoides farinae* a *Dermatophagoides pteronyssinus*), která byla zjištěna u 15 astmatiků tj. 37,5% , dále alergie na

plísň u 7 tj, 17,5% pacientů. U 12 (30%) nemocných byla prokázána senzitivita k aspirinu (klinické pozorování, anamnestický údaj, nasální provokační test s lysin-aspirinem). Atopický ekzém se ve skupině TRA vyskytoval u 12 (30%) nemocných. Medián hodnoty celkového IgE dosáhl 108 IU/ml (mezikvartilové rozpětí 51-346). Přehled projevů atopie a komorbidit ve skupině TRA uvádí tabulka č. 10.

Tabulka 10 Přehled komplikujících faktorů a komorbidit ve skupině TRA		
Komplikující faktory a komorbidity TRA	Počet pacientů	% podíl
Atopie	30	75,0%
Alergie na roztoče	15	37,5%
Alergie na plísň	7	17,5%
Aspirinová senzitivita	12	30,0%
Atopický ekzém	12	30,0%
Rinosinusitida	28	70,0%
Nosní polypy	15	37,5%
Refluxní nemoc jícnu	20	50,0%
Deprese	16	40,0%
Osteoporóza	15	37,5%

Komorbidity

Nejčastější komorbiditou TRA byla rinosinusitida, která byla potvrzena vyšetřením u otorinolaryngologa u 28 (70%) pacientů, nosní polypy byly přítomné u 15 (37,5%) těchto případů (rinoendoskopicky a/nebo CT vyšetřením vedlejších nosních dutin).

Druhou nejčastější komorbiditou byla refluxní nemoc jícnu (GERD) zjištěná u 20 (50%) astmatiků. GERD byla prokázána 24-hodinovou pH metrií jícnu (14 případů tj. 70%), v ostatních případech byl k dispozici závěr z gastroscopie nebo byla diagnóza refluxní nemoci jícnu převzata z dokumentace odesílajícího lékaře. V 6 případech byl zjištěn převážně alkalický typ refluxu, v 8 případech kyselý reflux.

V našem souboru, podobně jako v reálné klinické praxi, bylo vyšetřeno i 12 nemocných, kteří v minulosti kouřili cigarety, průměrná expozice 5,3(±3,2) balíčko-roků, nikdo z pacientů nebyl v posledních 5 letech aktivní kuřák. Nejčastější psychosociální komorbiditou byla deprese, celkem 16 (40%) pacientů trvale užívalo antidepressiva, medián skóre sebehodnocení tíže depresivní nálady dle Beckova dotazníku bylo 5(4-8) bodů. Osteoporóza jako následek kortikoidní léčby byla přítomna u 15 (37,5%) astmatiků.

HRCT plic

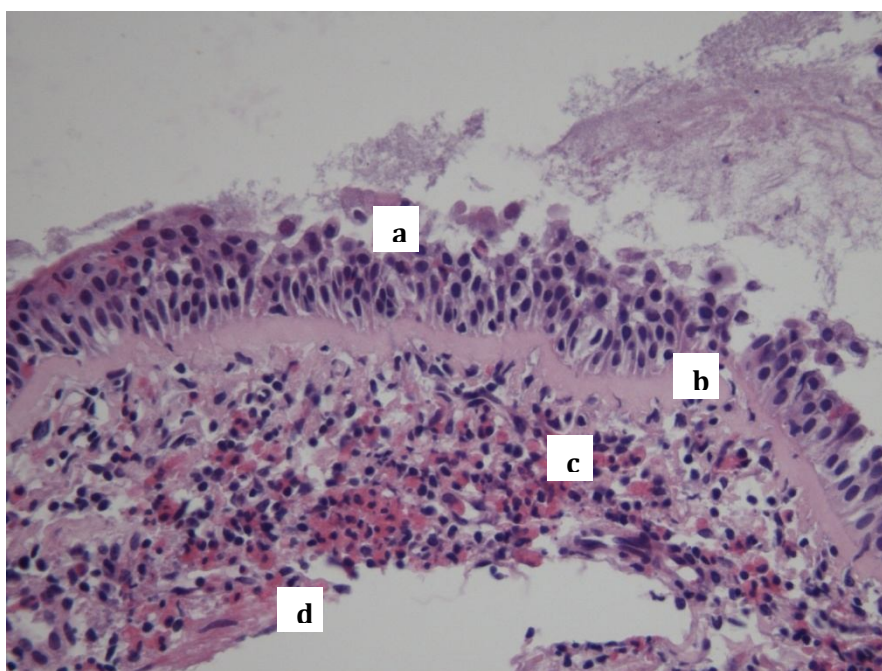
Vyšetření HRCT plic bylo provedeno s cílem odhalit komorbidity astmatu jako např. bronchiektázie, alergickou bronchopulmonální aspergilózu, případně vyloučit choroby, které mohou těžké astma napodobovat (plicní emfyzém, tracheobronchomalacie, postižení plicního intersticia). HRCT bylo provedeno u 26 pacientů a bylo zhodnoceno radiologem zkušeným v popisu plicních patologií. Korelát air-trappingu na HRCT plic byl zastižen u 14 (53,8%) pacientů, ve 4 (15,4%) případech byly nalezeny suché bronchiektázie. Spolupodíl centrilobulárního plicního emfyzému byl nalezen u 5 (19,2%) pacientů.

V oblasti ventrálního segmentu pravého horního laloku bylo provedeno orientační měření denzity plicního parenchymu na kruhové ploše 2cm², medián hodnot dosáhl 883(839,1-911,75) Hounsfieldových jednotek (HU).

Bronchoskopie, BAL, histologie bronchiální stěny

Bronchoskopie je doporučována v diagnostice komorbidity imitující astma (tracheobronchomalacie, dyskineza hlasových vazů, intersticiální plicní postižení) a zjištění zánětlivého fenotypu těžkého refrakterního astmatu v současných doporučených postupech [14, 68, 102]. V našem souboru byla bronchoskopie provedena u 23 (57,5%) astmatiků. V ostatních případech pacienti nesouhlasili s provedením bronchoskopie a/nebo nekontrolované astma znemožňovalo bezpečné provedení výkonu. U 21 bronchoskopovaných pacientů bylo možné současně provést bronchoalveolární laváž (BAL) a v 18 případech odebrat klíšťovou endobronchiální biopsii karin segmentárních bronchů (viz obrázek 2).

Obrázek 1 Endobronchiální biopsie karinky segmentárních bronchů (zvětšení 100x)



a – deskvamace epitelu, **b** – ztlustělá bazální membrána, **c** – eozinofilní infiltrace v submukoze, **d** – hladká svalovina bronchiální stěny (100 x zvětšeno – fotografie bronchiální biopsie jednoho z pacientů v našem souboru - poskytla MUDr.Helena Hornychová, PhD., Fingerlandův ústav Patologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové).

V bronchoalveolární laváži jsme sledovali cytologický rozbor a zejména výskyt eozinofilie. Medián procentuálního zastoupení eozinofilů dosáhl 1 (0-10,5)%. Zastoupení eozinofilů nesplnilo kritéria pro statistické normální rozdělení hodnot, přesto také uvádíme průměrnou hodnotu eozinofilů v BALu 6,9 ($\pm 10,3$). V imunofenotypizačním vyšetření BAL jsme sledovali zastoupení CD4+ T-lymfocytů, které bylo průměrně 36,1 ($\pm 20,4$)% a medián imunoregulačního poměru CD4+/CD8+ T-lymfocytů dosáhl hodnoty 1,46 (0,56-1,46).

Histologie endobronchiální biopsie byla u 18 pacientů posuzována patologem zkušeným v hodnocení patologií bronchiální stěny podle doporučené metodiky [69]. V biopsii byly sledovány změny v oblasti epitelu, které byly v 8 případech hodnoceny jako mukocelulární hyperplazie, v 6 případech dlaždicobuněčná metaplazie a ve 4 případech byl epitel hodnocen jako fyziologický. Dále byla hodnocena přítomnost hyperplazie hladké svaloviny bronchiální stěny, která byla v 10 případech hodnocena jako výrazná a v 8 případech jako mírná.

Šířka bazální membrány (BM) byla měřena v pěti nejvhodnějších místech v nejlepším řezu, tak aby v místě odečtu byla BM celistvá, s respiračním epitelem a kolmým řezem k epitelu. Snímání vzorků bylo prováděno při zvětšení 400x, mikroskopem Olympus BX40 s digitální kamerou Nikon DS-Fi1. Hodnocení šířky BM bylo prováděno metodou opakovaných point-to-point měření v programu NIS-Elements AR 3.0. Medián hodnot šířky bazální membrány byl 3,14 (2,16-5,84) μm . Maximální šířka bazální membrány ve sledovaném vzorku byla 16,8 μm , minimální 1,06 μm . Zánětlivá infiltrace v submukóze bronchiální stěny byla nejčastěji paucigranulocytární (8 případů), neutrofilní ve 3 případech, převážně eozinofilní zánět (22 eosinofilů na mm² preparátu) byl přítomen u jediného pacienta [69]. U ostatních šesti pacientů byla buněčná populace smíšená z neutrofilů, lymfocytů a eozinofilů.

4.3. ASOCIACE MEZI SLEDOVANÝMI KLINICKÝMI FAKTORY VE SKUPINĚ TRA

Ve skupině TRA jsme se snažili porovnat vybrané klinické, funkční a zánětlivé charakteristiky s literárně popsány vztahy mezi těmito parametry v observačních studiích těžkého astmatu [24-27]. K posouzení těchto asociací jsme použili výpočet Spearmanových korelačních koeficientů k nalezení vzájemných korelací mezi všemi dvojicemi sledovaných klinických a základních laboratorních parametrů.

S ohledem na větší počet sledovaných parametrů jsme za hladinu významnosti při posuzování korelace mezi jednotlivými faktory považovali hodnotu $p \leq 0.01$, hodnotu korelačního koeficientu R nad ± 0.40 . V Tabulce č. 11 je uveden přehled vztahů mezi nejčastěji používanými klinickými parametry u bronchiálního astmatu vyjádřený Spearmanovými korelačními koeficienty a příslušnými hladinami významnosti.

Tabulka 11

Spearmanova korelační analýza - asociace mezi laboratorními a kvantitativními klinickými charakteristikami v TRA

R_s p	Věk	BMI	EC%	IgE	FeNO	počet AE	FEV1 %	RV	AKT	AKT Ø	EC% BAL
BMI	0.28 0.08	-									
EC%	0.01 0.92	-0.33 0.03	-								
IgE	-0.34 0.04	-0.01 0.95	0.19 0.26	-							
FeNO	-0.49 0.002	-0.42 0.009	0.31 0.05	0.21 0.22	-						
Počet AE	-0.17 0.27	-0.37 0.02	0.28 0.08	0.31 0.06	0.39 0.01	-					
FEV1 %	0.20 0.20	0.19 0.23	0.06 0.68	-0.53 0.001	-0.24 0.13	-0.27 0.09	-				
RV	0.18 0.36	-0.50 0.008	0.31 0.10	0.07 0.70	0.37 0.06	0.35 0.06	-0.35 0.07	-			
AKT	0.01 0.92	0.16 0.31	0.11 0.49	-0.29 0.08	-0.04 0.79	-0.33 0.04	0.31 0.05	-0.18 0.34	-		
AKT Ø	-0.01 0.95	0.21 0.19	0.15 0.35	-0.34 0.03	-0.03 0.85	-0.36 0.02	0.43 0.006	-0.23 0.23	-	-	
EC% BAL	0.06 0.77	-0.45 0.04	0.61 0.003	-0.08 0.72	0.27 0.24	0.14 0.54	0.12 0.59	0.51 0.05	0.17 0.46	0.29 0.19	-
SBM Ø	-0.03 0.91	0.19 0.47	0.20 0.45	0.24 0.35	0.13 0.61	0.13 0.62	-0.01 0.96	0.19 0.54	0.17 0.49	0.06 0.82	-0.09 0.73

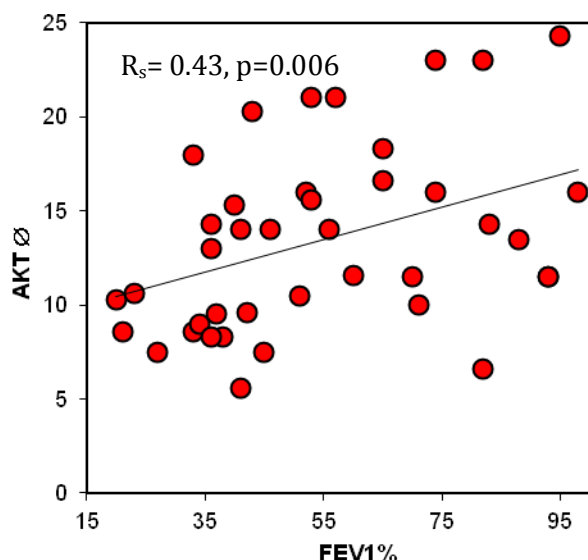
Legenda:

AEC% - % eosinofilů v periferní krvi, AKT - astma kontrol test, AKT Ø - průměr skóre AKT za poslední tři návštěvy, EC% BAL - % eozinofilů v BALu, FeNO - koncentrace vydechovaného NO, FEV1% - % náležitých hodnot FEV1, IgE - hodnota celkového IgE, Počet AE - počet exacerbací s nutností systémové kortikoterapie za posledních 12 měsíců, RV - reziduální objem SBMØ - průměrná hodnota tloušťky bazální membrány z biopsie bronchu

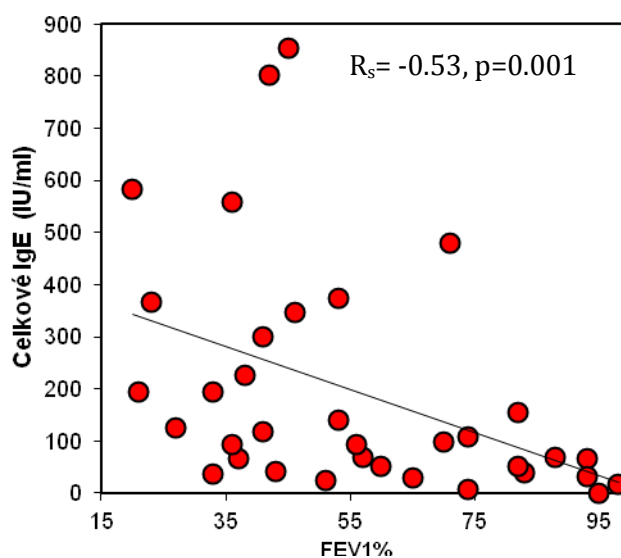
4.3.1. VZTAH SPIROMETRICKÝCH HODNOT K OSTATNÍM PARAMETRŮM

Ve skupině TRA byl parametru FEV1 ve významném vztahu jen k průměrné hodnotě skóre dotazníku kvality života „Test kontroly astmatu“ v posledních třech návštěvách (AKTØ) $R_s=0.43$, $p=0.006$. S tíží bronchiální obstrukce klesala kvalita života viz graf 1. Další významnou negativní korelací byl vztah FEV1% k hodnotě celkového IgE ($R_s = -0.53$, $p=0.001$), kdy s rostoucí hodnotou IgE klesal parametr FEV1%, viz graf 2.

Graf 1 Vztah AKTØ k tíži FEV1%

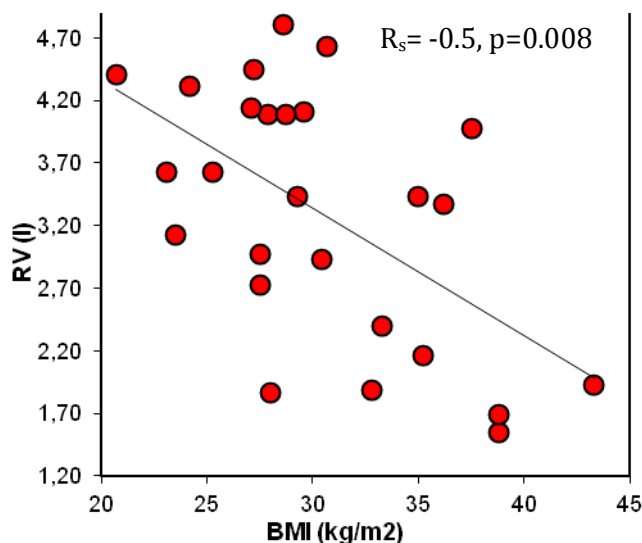


Graf 2 Vztah celkového IgE k tíži FEV1%



Bodypletyzsmograficky změřený reziduální objem (RV) klesal s rostoucím BMI ($R_s = -0.5$, $p = 0.008$), viz graf 3.

Graf 3 Vztah RV k BMI

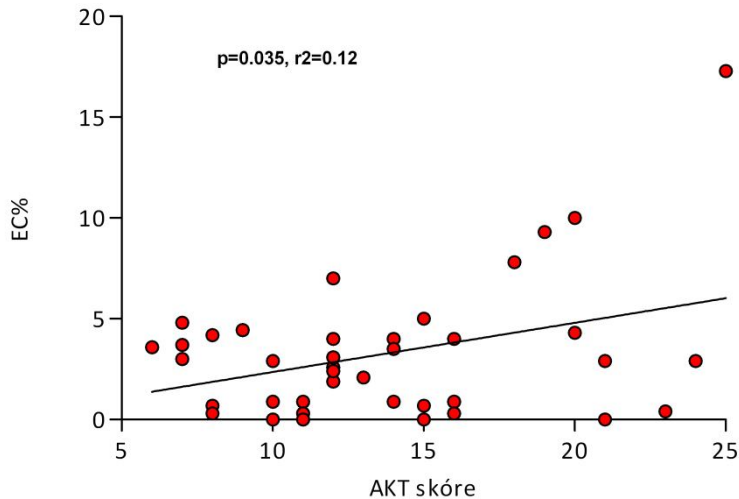


4.3.2. VZTAH TÍŽE SYMPTOMŮ DLE TESTU KONTROLY ASTMATU K OSTATNÍM PARAMETRŮM

V naší práci jsme k hodnocení kvality života používali dotazník „Test kontroly astmatu“ (AKT). Kromě poslední aktuální hodnoty skóre AKT v době odběru kondenzátu vydechaného vzduchu jsme zaznamenali i průměr ze skóre tohoto dotazníku v posledních třech návštěvách pacienta v poradně pro astma (AKTØ). Pochopitelný vztah bronchiální obstrukce ke kvalitě života zobrazuje graf 1. Jiné významné vztahy kvality života k objektivně měřitelným parametrům zjištěny nebyly.

Parametr AKT (skóre testu kontroly astmatu) negativně koreloval s denní spotřebou úlevové léčby krátkodobě působícími beta-2-mimetiky ($R_s = -0.55$, $p=0.0003$). Metoda lineární regrese dále prokázala pozitivní vztah EC% ke skóre AKT (slope 0.53 (95%CI 0.07 to 0.99), $r^2=0.12$, $p=0.035$) graf č. 4).

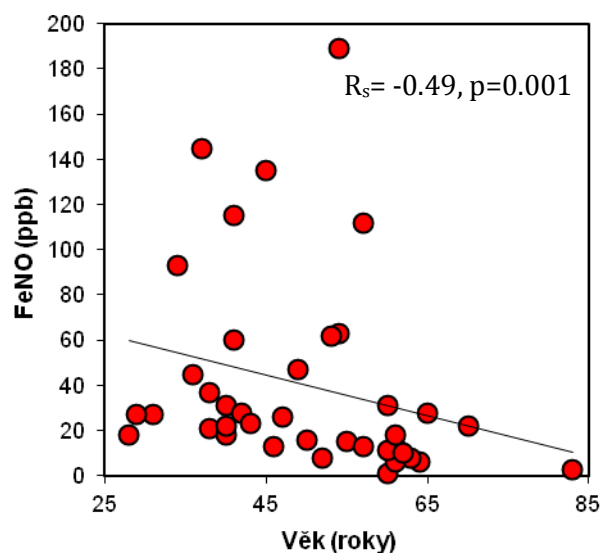
Graf č. 4 Lineární regrese vztahu EC% ke skóre dotazníku kvality života



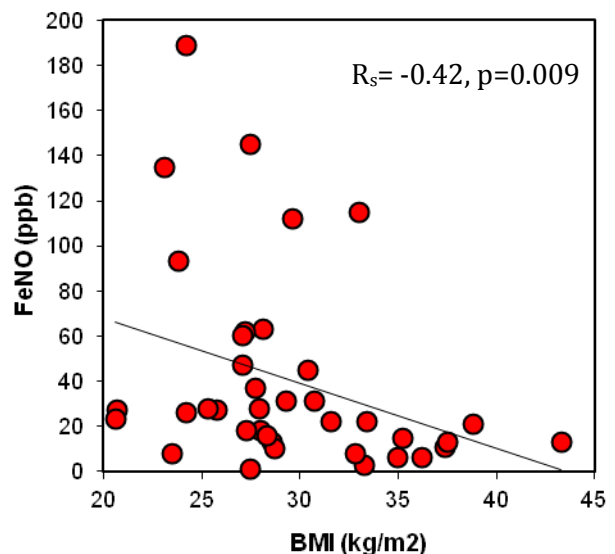
4.3.3. VZTAH ZÁNĚTLIVÝCH UKAZATELŮ K OSTATNÍM PARAMETRŮM

Ve skupině TRA jsme hledali vztahy eozinofilie dýchacích cest měřené koncentrací vydechaného NO k ostatním parametrům. Zjistili jsme pokles hodnoty FeNO v závislosti na věku pacienta ($R_s = -0.49$, $p=0.001$), viz graf 5 a pokles FeNO v závislosti na BMI (kg/m^2) $R_s = -0.42$, $p=0.009$, viz. graf 6.

Graf 5 Pokles FeNO s věkem



Graf 6 Pokles FeNO s rostoucím BMI

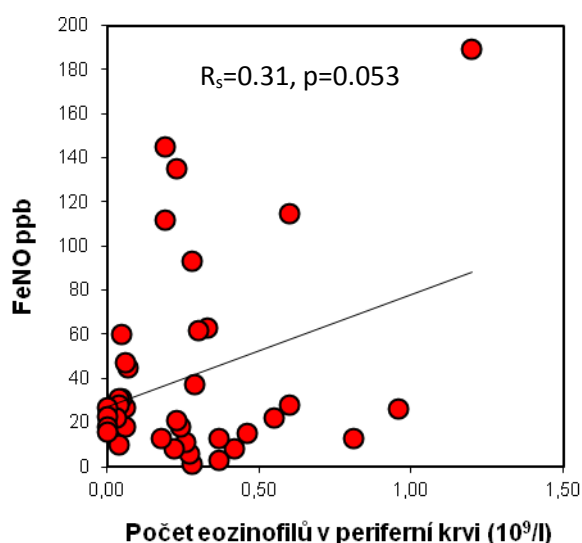
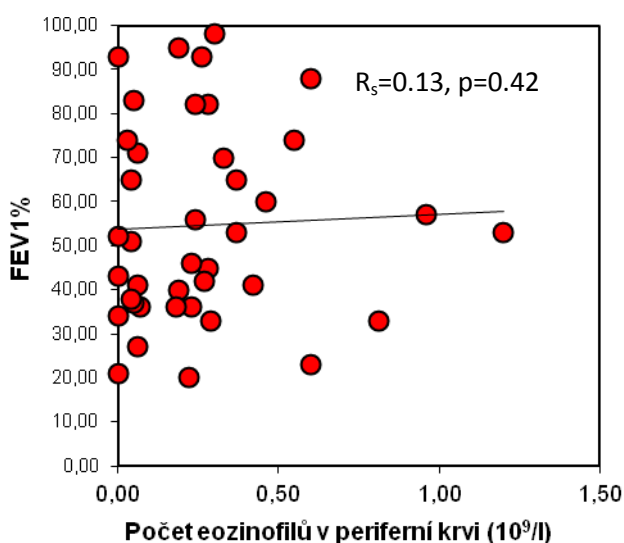


Obezita je důležitý faktor ovlivňující fenotyp astmatu a ve fenotypových popisných studiích je obezita spojena s non-eozinofilním fenotypem. V naší práci měli TRA obézní pacienti

méně exacerbací v předchozím roce ($R_s = -0.37$, $p=0.02$), také % eozinofilů v periferní krvi (EC%) bylo u obézních pacientů nižší ($R_s = -0.33$, $p=0.03$), oba vztahy jsou však na hranici statistické významnosti.

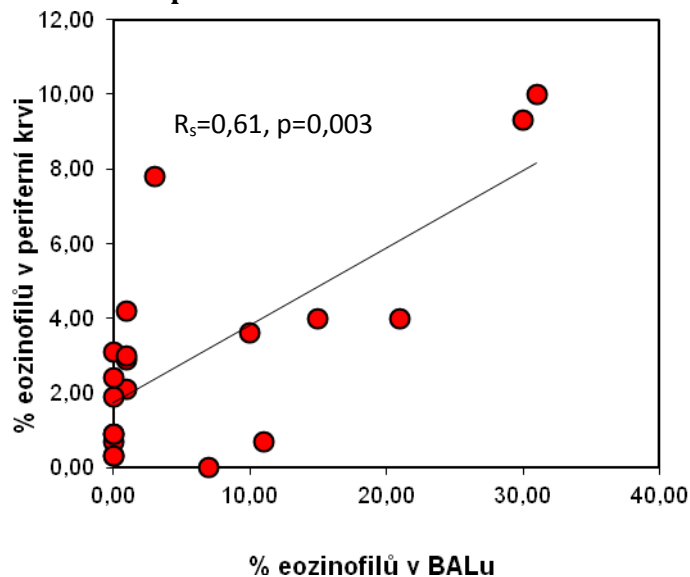
Dále jsme sledovali vztah eozinofilie periferní krve k funkčním a klinickým ukazatelům. Nebyly zjištěny korelace mezi hodnotou eozinofilie periferní krve a parametrem FEV1% ($R_s=0,13$, $p=0,42$, viz. graf 7), nebyla zjištěna významná korelace eozinofilie periferní krve s FeNO ($R_s=0,31$, $p=0,053$, viz graf 8).

Graf 7 Vztah počtu eozinofilů v krvi k FEV1% **Graf 8 Vztah počtu eozinofilů v krvi k FeNO**



Prokázali jsme pozitivní korelaci % eozinofilie periferní krve k % eozinofilů v bronchoalveolární laváži. Tento vztah je dle Spearmanovy korelační analýzy silný ($R_s = 0.61$, $p=0.003$, viz graf 9). Ve dvou případech dosahovala hodnota % eozinofilů v BAL nad 25%, obě tyto pacientky nesplňovaly kritéria pro eozinofilní plicní syndrom, ani pro hypereozinofilní syndrom či pro Churg-Straussové syndrom.

Graf 9 Vztah eozinofilie periferní krve k eozinofilii BALu

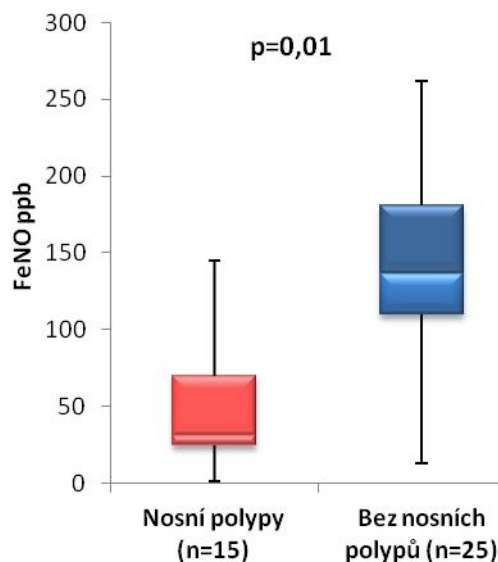


4.3.4. VLIV KOMORBIDIT NA PRŮBĚH TĚŽKÉHO REFRAKTERNÍHO ASTMATU

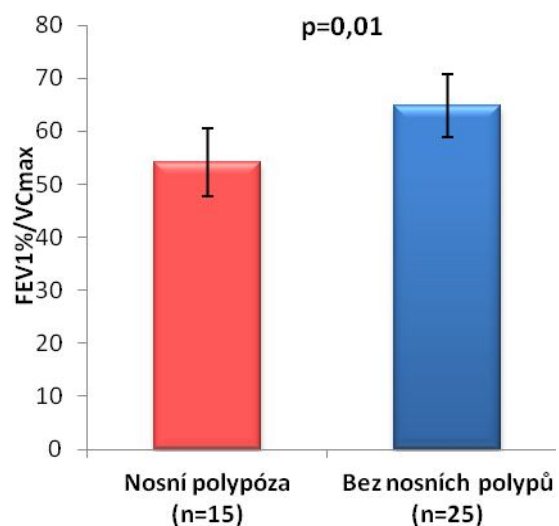
Sledovali jsme vliv komorbidit na pokles plicních funkcí a přítomnost fixované bronchiální obstrukce. Nebyla zjištěna asociace poklesu plicních funkcí v čase měřená v přítomnosti rinosinuitidy bez ohledu na přítomnost nosní polypózy. Stejně tak nebyla zjištěna asociace poklesu plicních funkcí v čase u pacientů s refluxní nemocí jícnu ani u přítomnosti depresí či osteoporózy. Výsledek na hranici statistické významnosti ukázal dle Fischerova přesného testu ($p=0,052$) u přítomnosti alergie na plísň i aspergilla.

Pacienti s rinosinuitidou a nosními polypy měli vyšší hodnotu FeNO než bez pacientů bez nosních polypů (medián 31 ppb vs. 18 ppb, $p=0,01$) viz graf 10, současně měli nemocní s nosní polypózou také horší obstrukční ventilační poruchu oproti pacientům bez nosních polypů (FEV1%/VCmax průměr $54,1(\pm 11,6)$ vs. $64,9(\pm 14,3)$, $p=0,01$) viz graf 11.

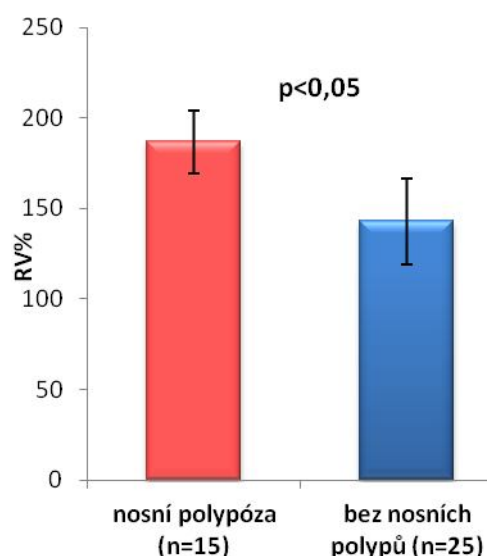
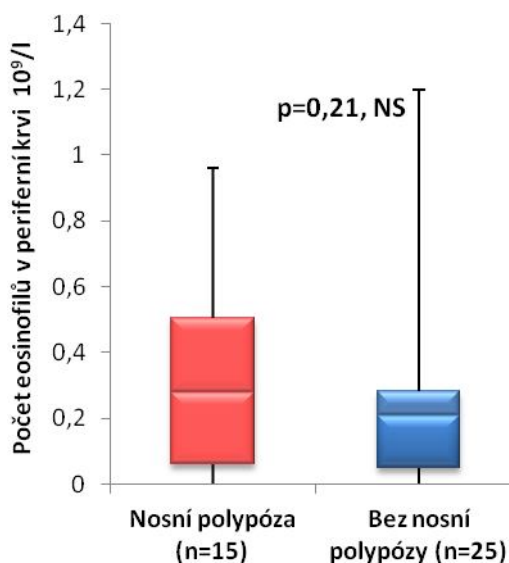
Graf 10 Nosní polypóza a FeNO



Graf 11 FEV1%/VCmax a nosní polypóza



Pacienti s rinosinuitidou a nosní polypózou měli výraznější stupeň plicní hyperinflace oproti pacientům s rinosinuitidou bez nosních polypů (RV% $186,7\pm 30,5$ vs $152,1\pm 47,8$, $p<0,05$, viz graf 12), v průměrných absolutních hodnotách byl rozdíl $3,73\pm 0,62$ litru u astmatu s nosní polypózou vs. $2,90\pm 1,11$ litru u astmatu bez nosních polypů, $p=0,02$.

Graf 12 RV% a nosní polypóza**Graf 13 Eozinofilie periferní krve a nosní polypóza**

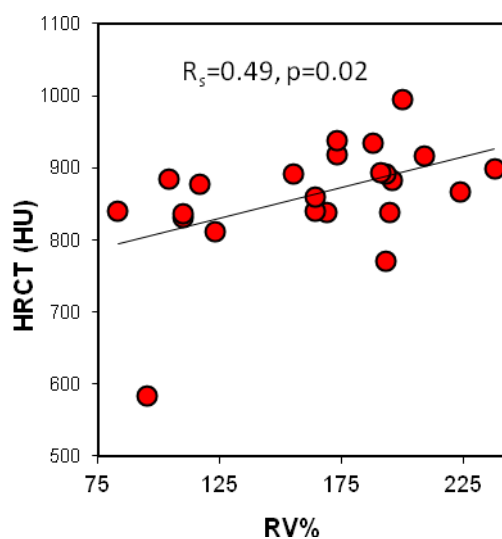
Absolutní počet eozinofilů v periferní krvi byl mírně vyšší u pacientů s nosní polypózou, avšak tento rozdíl nedosáhl statistické významnosti ($0,34 (\pm 0,30) \times 10^9/l$ vs. $0,21 (\pm 0,26) \times 10^9/l$, $p=0,22$, viz graf č. 13), podobný výsledek byl nalezen i u EC%, který se také neodlišoval u pacientů s nosními polypy a bez nosních polypů. Pacienti s nosními polypy měli nižší BMI ($27,6 \pm 3,9$ vs $31,1 \pm 5,5$, $p < 0,05$).

U 20 pacientů s prokázanou refluxní nemocí jícnu byla atopie přítomna ve 12 (60%) případech, u pacientů bez refluxní nemoci jícnu byla atopie výrazně častější (18 případů tj. 90%), rozdíl je statisticky významný $p < 0,001$. Vztah refluxní nemoci jícnu k ostatním klinickým či laboratorním ukazatelům nebyl nalezen. Další sledované komorbidity (deprese, nikotinismus) ani pohlaví nebyly specificky spojeny s odlišnostmi ve funkčních a zánětlivých parametrech.

U 26 pacientů s dostupným HRCT vyšetřením bylo provedeno orientační měření denzity plicního parenchymu na HRCT 1mm řezu ve ventrálním segmentu horního laloku vpravo na ploše kruhu o obsahu 2cm². Výsledná denzita plicního parenchymu byla v pozitivní korelaci ke stupni hyperinflace ($R_s = 0,49$, $p = 0,02$), viz graf č. 14. Nebyl zjištěn statisticky významný vztah takto zjištěné orientační denzity plicního parenchymu k parametrům TLCO, FEV1% a eozinofilii periferní krve.

V 18 případech jsme měli možnost provést měření bazální membrány. Spearmanova korelační analýza neprokázala statisticky signifikantní vztah šířky bazální membrány k žádnému ze sledovaných klinických a zánětlivých parametrů (tabulka 11).

Graf č. 14 Vztah plicní denzity na HRCT k reziduálnímu objemu



4.3.5. VZTAH FENOTYPU ASTMATU K OSTATNÍM SLEDOVANÝM PARAMETRŮM

V odborné literatuře je popsána řada modelů určování fenotypů obtížně léčitelného astmatu [28, 29, 35, 65]. Ještě v nedávné době bylo astma považováno za onemocnění spjaté typicky s atopií a eozinofilním zánětem dýchacích cest. Většina protizánětlivých anti-astmatik je primárně cílena právě proti eozinofilnímu zánětu. Řada prací v posledních letech však prokázala, že astma je značně heterogenní onemocnění nejen svým klinickým průběhem, ale i typem zánětu a následnou senzitivitou k protizánětlivé léčbě. Nejméně polovina pacientů s perzistujícím astmatem má non-eozinofilní zánět bronchiální stěny [103, 108].

Eozinofilní zánět bronchiální stěny u astmatu lze posuzovat neinvazivními i invazivními metodami. Invazivní vyšetření zánětlivého fenotypu je možné bronchoskopicky odběrem biopsie bronchiální stěny, to bylo provedeno jen u 18 pacientů v našem souboru. Z těchto 18 vzorků byl typický perzistující eozinofilní zánět histologicky nalezen v jediném případě. Svoji roli zřejmě hraje léčba vysokými dávkami inhalačních kortikosteroidů nebo i systémové kortikoterapie v době odběru biopsií. Indukované sputum je suverénní metoda k hodnocení typu a intenzity zánětu bronchů u astmatu [33, 83]. Jde o metodu, která vyžaduje poměrně náročné preanalytické zpracování a na našem pracovišti není rutinně prováděna, nejde o běžně používanou metodu v klinické praxi právě pro svoji náročnost. V naší práci jsme se tedy rozhodli využít literárních důkazů o vztahu eozinofilie periferní krve a koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého k eozinofilii bronchiální stěny [33, 99, 100, 109]. Eozinofilní zánět jsme posuzovali pomocí koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého a eozinofilie periferní krve.

Zjistili jsme pozitivní korelaci eozinofilie periferní krve k eozinofilii BALu ($R_s = 0.61$, $p=0.003$) viz graf 9. Hranice systémového eozinofilního zánětu, kdy probíhající alergický zánět vede k migraci eozinofilů z kostní dřeně do systémové cirkulace, je v odborné literatuře uváděna různě. Např. autoři analýzy studií ACRN (Asthma Clinical Research Network) sledujících

zánětlivý fenotyp astmatu považovali za systémovou eozinofilii periferní krve hodnotu nad $0,22 \times 10^9/L$, při senzitivitě 72% a specificitě 69% [8]. Ve farmakologické studii s anti-IL-5 monoklonální protilátkou (mepolizumab) byla za hranici signifikantního eozinofilního zánětu považována hodnota $0,3 \times 10^9/L$ [100]. V naší práci jsme považovali za významnou eozinofilii periferní krve (EC%) limit $>4\%$ eozinofilů v diferenciálním rozpočtu. U pacientů s $EC\% > 4\%$ byla zjištěna průměrná absolutní hodnota eozinofilů periferní krve TRA $0.52 (\pm 0.31) \times 10^9/L$.

Eozinofilní zánět bronchiální stěny je možné neinvazivně vyšetřit analýzou koncentrace FeNO, která dobře koreluje s eozinofilii měřenou metodou cytologie indukovaného sputa [32, 87]. Za pozitivní průkaz eozinofilního zánětu bronchiálního stromu u astmatu je v různých literárních zdrojích nejčastěji považována hodnota nad 30 ppb, toto kritérium jsme zvolili také v naší práci [26, 87, 110].

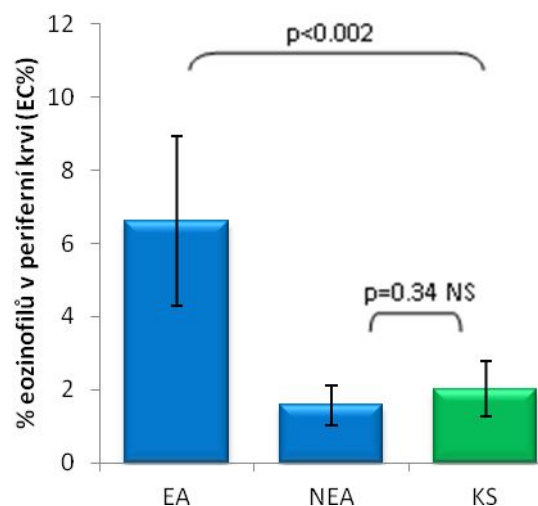
4.3.6. ROZDĚLENÍ SOUBORU TRA DLE EOZINOFILIE PERIFERNÍ KRVE ($EC\% > 4\%$)

V klinické praxi je eozinofilní fenotyp astmatu definován více modalitami. Za eozinofilní fenotyp astmatu považujeme pacienty s opakovaně dokumentovanou eozinofilii periferní krve, opakovanými vysokými hodnotami FeNO a případně průkazem eozinofilie v BALu či biopsii bronchiální sliznice [30, 58, 99, 110].

Eozinofilní zánět jsme v naší práci posuzovali nejprve dle eozinofilie periferní krve. Na základě hodnoty eozinofilie periferní krve odebrané před sběrem KVV jsme rozdělili soubor na dvě skupiny – eozinofilní zánětlivý fenotyp (EA) u 13 pacientů ($EC\% \geq 4$) a non-eozinofilní zánětlivý fenotyp (NEA) u 26 pacientů ($EC\% < 4\%$). Jedna pacientka byla z analýzy vyřazena, protože se jí nepodařilo provést odběr periferní krve při špatném stavu periferních žil, klinicky byla vedena jako eozinofilní atopický fenotyp těžkého refrakterního astmatu.

Graf 15 uvádí rozdíly v hodnotách eozinofilů mezi EA, NEA a kontrolní skupinou (KS), kde byla průměrná hodnota $EC\% 2.0 (\pm 1.26)$. Přehled rozdílů v základních sledovaných parametrech mezi EA a NEA uvádí tabulka č. 12.

Graf 15 Rozdíly v hodnotách $EC\%$ mezi sledovanými skupinami (ANOVA, $p < 0.0001$).



Tabulka 12 Porovnání dat ve skupině TRA rozdělené dle EC% > 4% (průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)			
Parametr	EC≥4% (EA) Eozinofilní astma n=13	EC<4% (NEA) Non-eozinofilní astma n=26	p
% eosinofilů periferní krve	0,9 (0,3-2,9)	4,8 (4,1-8,6)	p<0.001
absolutní počet eosinofilů perif. krve	0.46 (0,27-0,71) x 10 ⁹ /l	0.06 (0,04-0,70) x 10 ⁹ /l	p<0.0001
Počet žen	9 (69,2%)	14 (53,8%)	p=0.491
Průměrný věk (roky)	48,3 (± 10,7)	51,5(±13,4)	p=0.513
BMI (kg/m²)	26,6 (± 3,6)	31,6 (± 5,1)	p=0.003
FEV1 (l/s)	1,65 (± 0,60)	1,72 (1,09-2,04)	p=0.834
FeNO₅₀ (ppb)	54,5 (25,5-97,8)	18,0 (11,5-30,2)	p=0.012
AEC (x10⁹/l)	0,52 (± 0,31)	0,13 (± 0,13)	p<0.001
EC (%)	4,80 (4,2 - 7,8)	1,57 (± 1,32)	p<0.001
RV (l)	3.84 (±0,67)	3.02 (±1.03)	p=0.049
Počet pacientů na trvalé léčbě SKS	3 (23,1%)	17 (65,4%)	p=0.023

Z tabulky č. 12 dále vyplývá, že se EA a NEA skupiny lišily v hodnotě BMI, která byla vyšší u non-eozinofilního astmatu. Další rozdíl byl v hodnotě naměřené koncentrace vydechovaného NO, který byl u eozinofilního astmatu vyšší (p=0.01). Rozdíl byl podobný i při hodnocení průměru z naměřených hodnot FeNO v posledních třech návštěvách pacienta v poradně pro těžké astma, kde pacienti v EA skupině měli FeNO 59,2 ppb vs. 30,2 ppb v NEA skupině (**p=0.009**). Z dalších funkčních parametrů jsme zjistili rozdíl v hodnotě reziduálního objemu (RV), který je ukazatelem plicní hyperinlace a byl vyšší ve skupině eozinofilního astmatu, výsledek je na hranici statistické významnosti (p=0.049).

4.3.6. VZTAH ZÁNĚTLIVÉHO FENOTYPU DLE EC% K DALŠÍM KLINICKÝM PARAMETRŮM

Ve skupině NEA byl vyšší výskyt chronické kortikoterapie (17 vs. 3, tj. 65,3% vs. 23,1%), **p=0.019**, tím může být částečně vysvětlen vyšší BMI v NEA skupině, kdy obezita může být částečně způsobena vedlejšími účinky systémové kortikoterapie.

Předpokládali jsme vyšší výskyt v minulosti prokázané atopie u pacientů s eozinofilním astmatem, tento předpoklad se však nenaplnil. V EA skupině bylo 9 atopiků (69,2%), v NEA

skupině 20 atopiků (76,9%), $p=0.70$, stejně tak výskyt alergie na plísně a alergie na roztoče byl v obou skupinách podobný ($p=0.66$ resp. $p=1.0$).

Ve skupině EA byl vyšší výskyt atopického ekzému, který postihoval 7 (53,8%) pacientů oproti 4 (15,4%) pacientům v NEA skupině, $p=0.02$. Aspirinová senzitivita byla přítomna podobně v obou skupinách EA 3 (23,1%) a NEA 6 (23,1%), $p=1$.

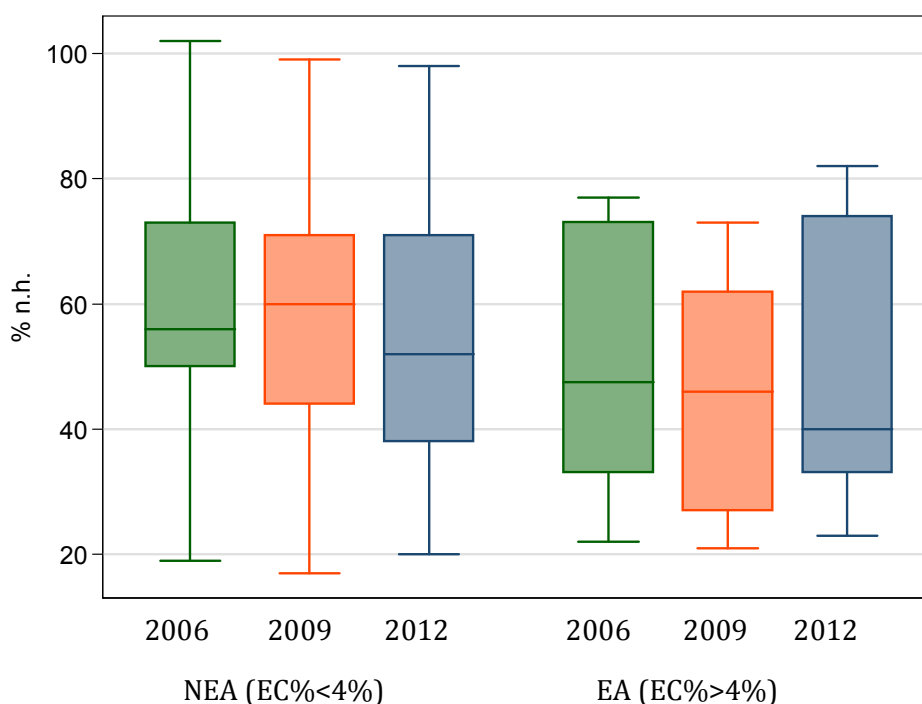
Předpokládali jsme vyšší výskyt exacerbací v předchozích 12 měsících u pacientů s EA. Tento předpoklad byl prokázán. V EA skupině bylo průměrně 6,3 exacerbací, ve skupině NEA 2,9 exacerbací, $p=0.005$, výsledek potvrdila i metoda Poissonovy regrese, $p<0.001$.

Výskyt fixované bronchiální obstrukce se mezi oběma skupinami EA a NEA nelišil ($p=0.64$). Nadměrná spotřeba úlevových beta-2-mimetik nad 8 vdechů/den byla v obou skupinách podobně často přítomná (EA 2 vs. NEA 7 pacientů, $p=0.68$).

Potvrdil se předpoklad asociace eozinofilního fenotypu astmatu s rinosinuitidou, která byla zjištěna u 16 pacientů s EA (57,7%) a 27 pacientů s NEA (69,2%), rozdíl byl statisticky významný, $p=0.03$. Výskyt refluxní nemoci jícnu se mezi oběma fenotypy nelišil mezi EA $n=7$ (53,8%) a NEA $n=13$ (50%), $p=0.71$. Nebyly zjištěny rozdíly v anamnéze nikotinismu ($p=0.48$), deprese ($p=0.47$) a osteoporózy.

Dále jsme předpokládali výraznější pokles plicních funkcí v čase u pacientů s EA fenotypem astmatu. Hodnotili jsme spirometrické křivky provedené ve stejném čtvrtletí roku 2006, 2009 a 2012 a rozdíly sledovali pomocí analýzy rozptylu. V parametrech FEV1 a FEV1% nebyly rozdíly statisticky významné ($p=0.85$ resp. $p=0.75$), viz graf 16.

Graf č. 16 Rozdíly v poklesu parametru FEV1% v měsících září-prosinec a letech 2006-12



4.3.7. ROZDĚLENÍ SOUBORU DLE PERZISTUJÍCÍ EOZINOFILIE METODOU FeNO

Perzistující vysoká hodnota koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého dobře koreluje s eozinofilií dýchacích cest měřené metodou indukovaného sputa. U pacientů léčených vysokými dávkami inhalačních nebo i systémových kortikosteroidů je trvalá vysoká hodnota FeNO příznakem nekontrolovaného eozinofilního zánětu. Důvody mohou být různé, může jít o non-compliance k léčbě steroidy a/nebo špatnou inhalační techniku a/nebo kortikorezistenci.

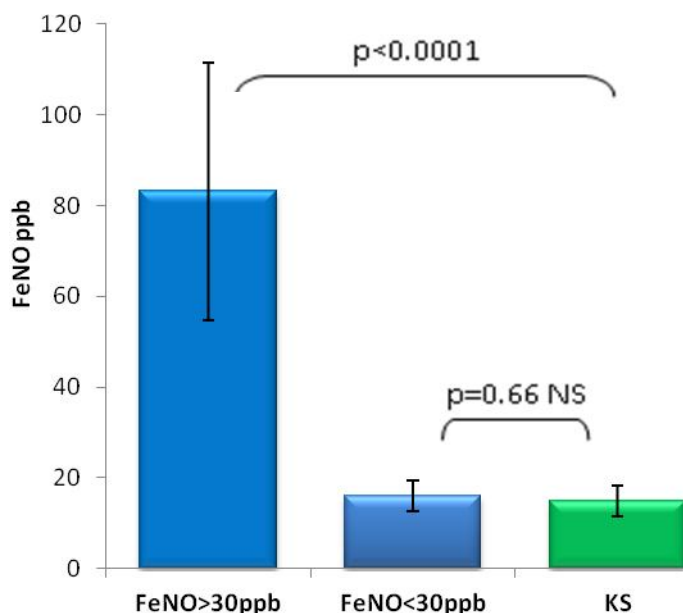
Dle pozorování ve studii SARP jsou tyto pacienti ohroženi progresivním zhoršováním plicních funkcí a častějšími exacerbacemi [32]. Za pozitivní průkaz eozinofilního zánětu bronchiálního stromu u astmatu je v různých literárních zdrojích nejčastěji považována hodnota nad 30 ppb, toto kritérium jsme zvolili i v naší práci [26, 87, 110]. Při rozdělení souboru na dvě skupiny nad a pod hranici FeNO 30 ppb jsme dospěli k následujícím výsledkům. U 15 pacientů dosáhla hodnota FeNO >30ppb, průměrná hodnota FeNO v této podskupině byla 83,2 (±49,1) ppb. U ostatních 25 pacientů byla hodnota FeNO <30 ppb, průměrná hodnota FeNO 16,0 (±8,16) ppb. Přehled dalších nalezených rozdílů v měřených parametrech uvádí tabulka č. 13.

Tabulka 13 Porovnání dat ve skupině TRA rozdělené dle FeNO >30 ppb (průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)			
Parametr	FeNO > 30 ppb n=15	FeNO<30 ppb n=25	P
FeNO ₅₀	83,2 (±49,1)	16,0 (±8,16)	-
Počet žen	7 (46,6%)	17 (68%)	p=0.021
Průměrný věk (roky)	46,5 (± 8,9)	52,3(±13,7)	p=0.142
BMI (kg/m ²)	28,1 (± 2,9)	30,8 (± 6,0)	p=0.114
FEV1 (l/s)	1,49 (1,01-1,78)	1,64 (±0,07)	p=0.833
FEV1/VCmax%	54,2 (±11,7)	64,8 (±14,4)	p=0.022
AEC (x10⁹/l)	0,40 (± 0,33)	0,18 (0,05-0,27)	p=0.044
EC (%)	4,3 (4,2-7,8)	2,0 (0,63-3,53)	p=0.023
RV (l)	3,82 (±0,68)	2,99 (±1,03)	p=0.049
Počet pacientů na trvalé léčbě SKS	7 (46,7%)	13 (58,3%)	p=1.000

Pacienti s TRA, kteří měli perzistující vysokou hodnotu FeNO (>30 ppb), měli v našem souboru menší BMI, výraznější bronchiální obstrukci dle FEV1/VCmax%, výraznější eozinofilie periferní krve a plicní hyperinflaci (viz. tabulka 13). Pacienti s hodnotou FeNO>30 měli vyšší počet exacerbací v předchozích 12 měsících – 5,5 (±3,56) vs 3,2 (±3,71), p=0.03. Jiné statisticky

významné asociace nalezeny nebyly, výskyt atopie byl ve skupině s vysokým i nízkým FeNO podobný ($p=0.14$). Graf č. 17 uvádí rozdíly v hodnotách FeNO mezi sledovanými skupinami.

Graf č. 17 Rozdíly v hodnotách FeNO ve sledovaných skupinách



4.3.8. ROZDĚLENÍ SOUBORU DLE DALŠÍCH KLINICKÝCH FAKTORŮ

Při rozdělení souboru dle věku, pohlaví, BMI jsme další statisticky významné vztahy mezi

Tabulka 14 Porovnání dat ve skupině TRA dle léčby SKS nebo IKS (průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)			
Parametr	SKS n=21	IKS n=19	p
IKS dávka (BDP)	3359 (\pm 1943)	3432 (\pm 1233)	$p=0,893$
Počet žen	12 (57,1%)	12 (63,2%)	$p=0.443$
Průměrný věk (roky)	30,8 (\pm 5,3)	28,7 (\pm 4,7)	$p=0.212$
BMI (kg/m ²)	28,1 (\pm 2,9)	30,8 (\pm 6,0)	$p=0.112$
FEV1 (l/s)	1,51 (0,97-1,65)	1,60 (1,37-2,02)	$p=0.203$
FEV1/VCmax%	60,8 (\pm 15,6)	61,0 (\pm 12,2)	$p=0.961$
AEC (x10⁹/l)	0,17 (0,04-0,28)	0,38 (0,19-0,45)	p=0.022
EC (%)	1,85 (0,30-0,95)	4,74 (2,75-4,55)	p=0.006
FeNO (ppb)	21 (11-45)	27 (16-62)	$p=0.441$
RV (l)	3.13 (\pm 0,98)	3,41 (\pm 0,95)	$p=0.474$

sledovanými klinickými parametry nezjistili. Statisticky významné rozdíly jsme našli u rozdělení souboru TRA dle systémové kortikoterapie. Pacienti na SKS měli, menší eozinofilii periferní krve a nižší FeNO než nemocní léčení pouze IKS a než kontrolní skupina (viz tabulka 14). Nebyly nalezeny rozdíly mezi SKS a IKS v hodnotě BMI indexu, plicních funkcích, kvalitě života, hodnotě celkového IgE, plicní hyperinflaci, počtu exacerbací astmatu v předchozích 12 měsících ani tloušťkou bazální membrány epitelu dýchacích cest.

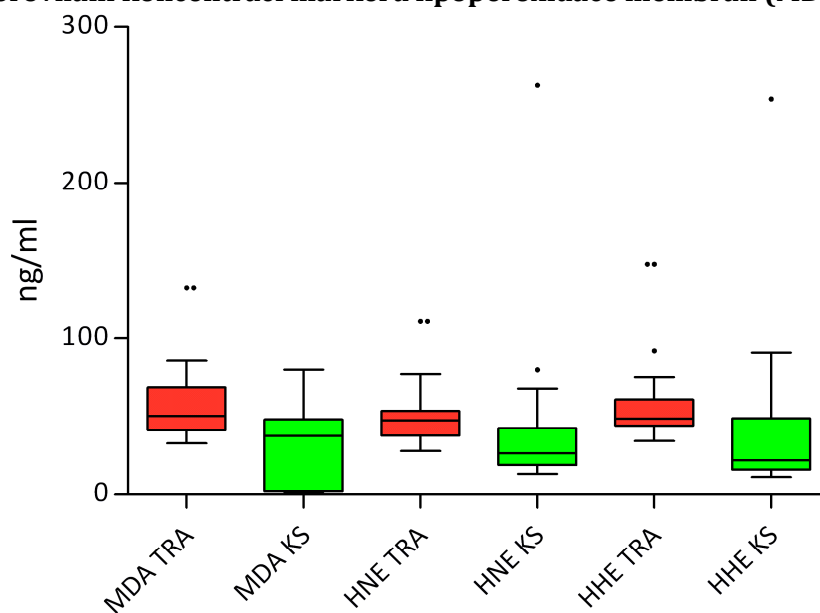
4.4. ROZDÍLY VE SLOŽENÍ KVV U PACIENTŮ S TRA A U ZDRAVÝCH DOBROVOLNÍKŮ

Jedním z cílů této práce bylo zjistit, zda jsou ve vydechovaném vzduchu pacientů s TRA vyšší koncentrace látek odpovídajících poškození lipidů, proteinů a nukleových kyselin oxidativním stresem oproti zdravé kontrolní skupině.

4.4.1. MARKERY LIPOPEROXIDACE BUNĚČNÝCH MEMBRÁN (MDA, HNE, HHE)

Ve skupině TRA byly naměřeny v KVV statisticky významně vyšší koncentrace malondialdehydu, 4-hydroxy-trans-nonenalu, 4-hydroxy-trans-hexanalů oproti kontrolní skupině (viz tabulka 15 a graf 18).

Graf č. 18 Porovnání koncentrací markerů lipoperoxidace membrán (MDA, HNE, HHE)

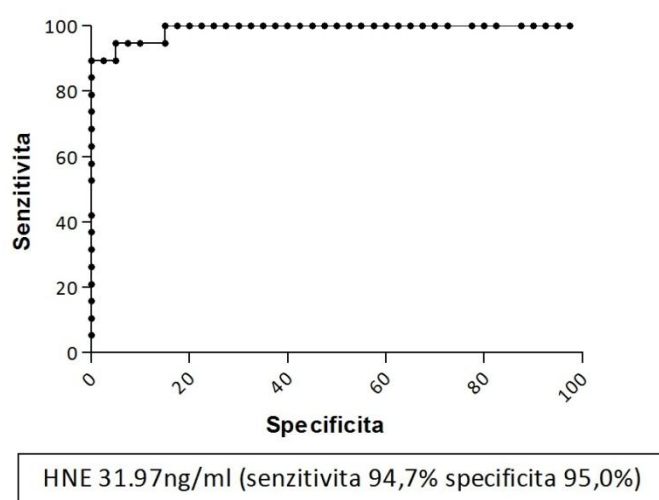


Tabulka 15
Porovnání koncentrací markerů lipoperoxidace mezi TRA a KS (MDA, HNE, HHE)
v kondenzátu vydechaného vzduchu
 (průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)

Parametr	TRA n=40	KS n=19	p
MDA (ng/ml) malondialdehyd	50,6 (41,7-68,7)	22,8 (±6,4)	p<0.001
HNE (ng/ml) 4-hydroxy—trans- nonenal	48,0 (38,5-53,0)	21,4 (±5,7)	p<0.001
HHE (ng/ml) 4-hydroxy-trans- hexenal	48,2 (84,6-109,8)	18,0 (±4,2)	p<0.001

ROC analýza prokázala při hodnotě HNE nad 31,97 ng/ml vysokou senzitivitu 94,7% a specifitu 95,0% pro rozpoznání těžkého refrakterního astmatu (AUC 0.9895, p<0.0001) (viz graf 19).

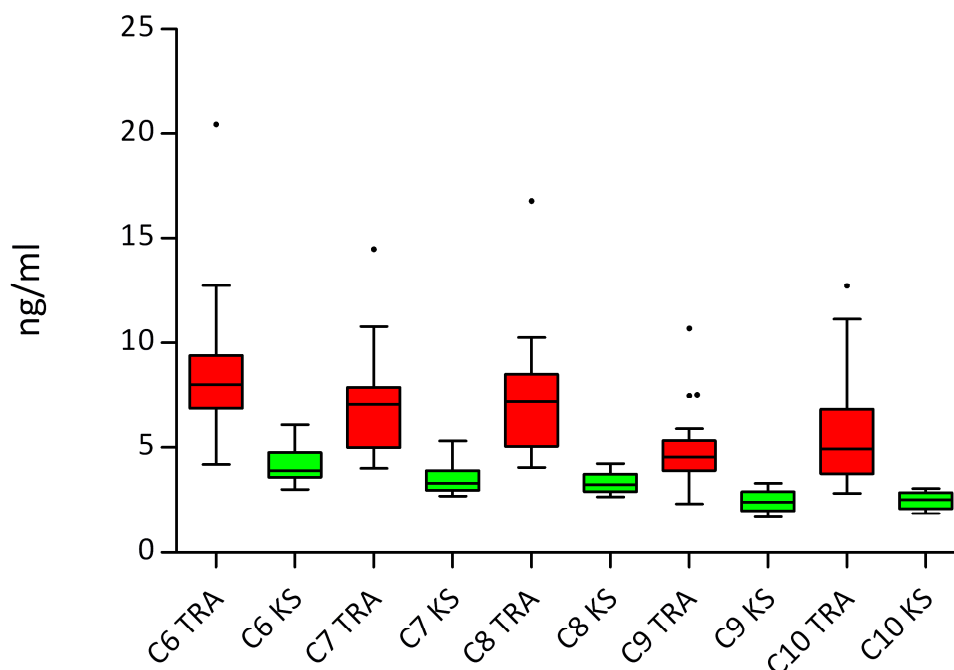
Graf 19 ROC analýza HNE u skupiny těžkého refrakterního astmatu a kontrolní skupiny



4.4.2. MARKERY LIPOPEROXIDACE BUNĚČNÝCH MEMBRÁN (C6-C12)

Ve skupině TRA byly naměřeny v KVV statisticky významně vyšší koncentrace hexenalu (C6), heptenalu (C7), octanalu (C8), nonenalu (C9), dekanalu (C10), undekanalu (C11) a dodekanalu (C12) oproti kontrolní skupině (viz tabulka 16 a graf 20). Jde o chemicky velmi podobné látky, proto jsou i rozdíly v koncentracích mezi TRA a KS téměř stejné.

Graf č. 20 Porovnání koncentrací markerů lipoperoxidace membrán (C6-C12)



Tabulka 16

Porovnání koncentrací markerů lipoperoxidace mezi TRA a KS (C6-C12) v kondenzátu vydechovaného vzduchu

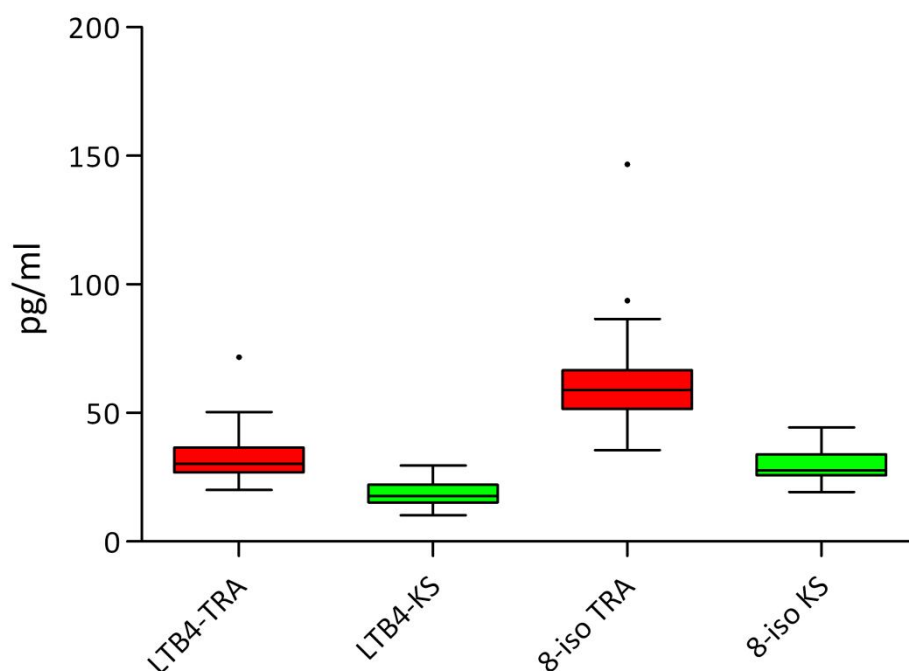
(průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)

Parametr	TRA n=40	KS n=19	p
C6 (ng/ml) hexenal	8,0 (7,1-9,3)	4,2 (±0,8)	p<0.001
C7 (ng/ml) heptenal	7,0 (5,0-7,9)	3,5 (±0,7)	
C8 (ng/ml) octenal	7,2 (5,1-8,3)	3,3 (±0,5)	
C9 (ng/ml) nonenal	4,6 (3,9-5,3)	2,5 (±0,5)	
C10 (ng/ml) dekanal	4,9 (3,8-6,8)	2,5 (±0,4)	
C11 (ng/ml) undekanal	0,07 (0,05-0,08)	0,03 (0,03-0,04)	
C12 (ng/ml) dodekanal	0,26 (0,22-0,29)	0,11 (0,10-0,13)	

4.4.2. MARKERY LIPOPEROXIDACE BUNĚČNÝCH MEMBRÁN (8-ISO, LTB₄)

Ve skupině TRA byly naměřeny v KVV statisticky významně vyšší koncentrace 8-isoprostanu a leukotrienu B₄ oproti kontrolní skupině (viz tabulka 17 a graf 21).

Graf č. 21 Porovnání koncentrací markerů lipoperoxidace membrán (8-iso, LTB4)



Tabulka 17 Porovnání koncentrací markerů lipoperoxidace mezi TRA a KS (8-iso, LTB4) v kondenzátu vydechaného vzduchu

(průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)

Parametr	TRA n=40	KS n=19	p
8-iso (pg/ml) 8-isoprostan	59,0 (52,0-66,9)	29,8 (±6,5)	P<0.001
LTB4 (ng/ml) leukotrien B4	30,3 (27,0-35,8)	18,4 (±4,9)	p<0.001

4.4.3. CYSTEINYLOVÉ LEUKOTRIENY LTC4, LTD4, LTE4

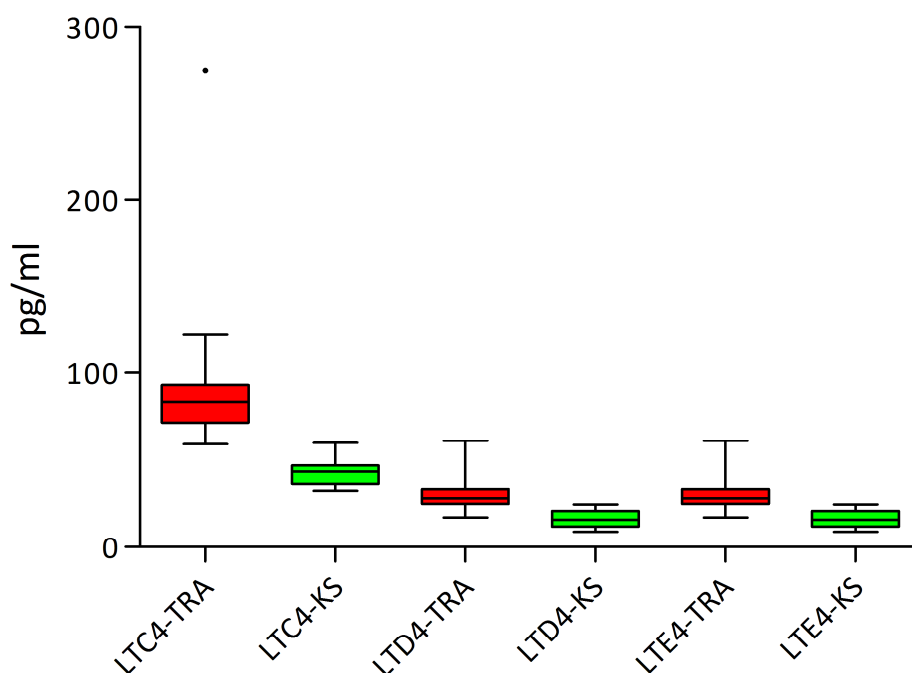
Ve skupině TRA byly naměřeny v KVV statisticky významně vyšší koncentrace leukotrienu C4, leukotrienu D4 a leukotrienu E4 oproti kontrolní skupině (viz tabulka. 18 a graf 22).

Tabulka 18 Porovnání koncentrací cysteinylových leukotrienů mezi TRA a KS (LTC4, LTD4, LTE4) v kondenzátu vydechaného vzduchu

(průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)

Parametr	TRA n=40	KS n=19	p
LTC4 (pg/ml) leukotrien C4	83,4 (72,4-92,8)	43,0 (±7,4)	P<0.001
LTD4 (pg/ml) leukotrien D4	28,0 (25,0-32,4)	16,1 (±5,1)	p<0.001
LTE4 (pg/ml) leukotrien E4	61,0 (52,0-72,0)	30,9 (±5,3)	p<0.001

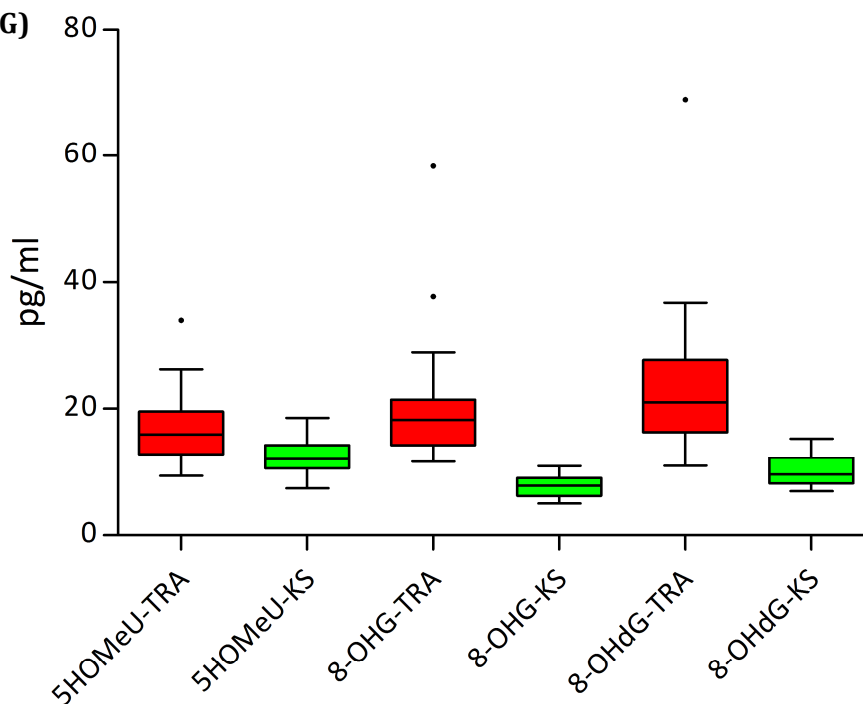
Graf č. 22 Porovnání koncentrací cysteinylových leukotrienů (LTC₄, LTD₄, LTE₄)



4.4.4. MARKERY POŠKOZENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN OXIDATIVNÍM STRESEM (5-HOMEU, 8-OHG, 8-OHdG)

Ve skupině TRA byly naměřeny v KVV statisticky významně vyšší koncentrace 5-hydroxymethyl uracilu, 8-hydroxyguanosinu a 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu oproti kontrolní skupině (viz tabulka 19 a graf 23).

Graf č. 23 Porovnání koncentrací markerů poškození nukleových kyselin (5-HOMEU, 8-OHG, 8-OHdG)



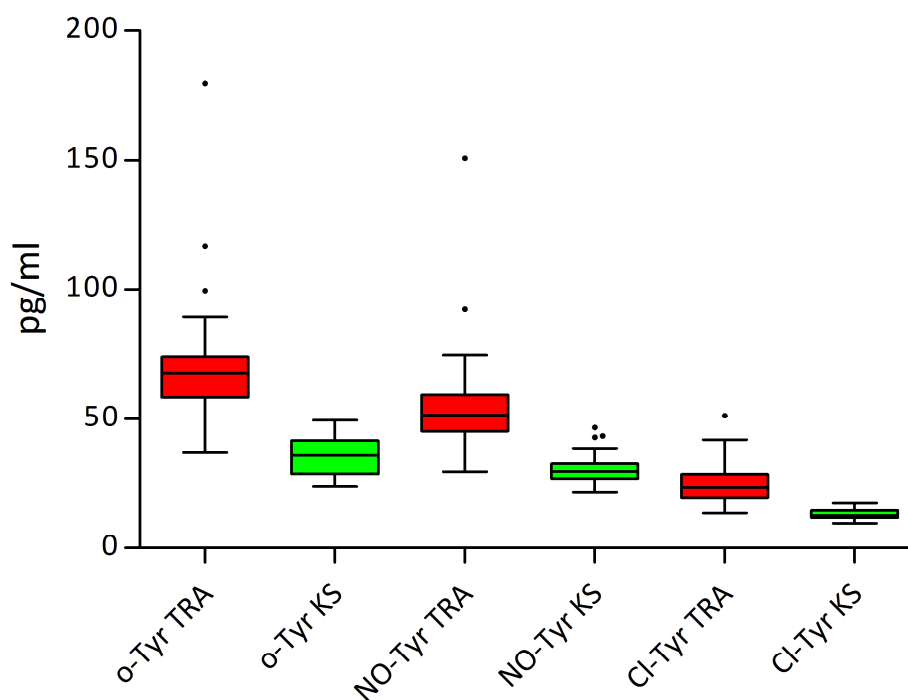
Tabulka 19 Porovnání koncentrací markerů poškození nukleových kyselin (5-HOMeU, 8-OHG, 8-OHdG) v kondenzátu vydechaného vzduchu
(průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)

Parametr	TRA n=40	KS N=19	p
5-HOMeU (pg/ml) 5-hydroxymethyl uracil	15,9 (13,26-19,6)	12,3 (±2,9)	p<0.001
8-OHG (pg/ml) 8-hydroxy guanosine	18,3 (14,8-21,1)	7,8 (±1,7)	p<0.001
8-OHdG (pg/ml) 8-hydroxy2'deoxy guanosine	21,0 (16,5-26,9)	10,3 (±2,4)	p<0.001

4.4.5. MARKERY POŠKOZENÍ AMINOKYSELIN OXIDATIVNÍM STRESEM (o-TYR, NO-TYR, CL-TYR)

Ve skupině TRA byly naměřeny v KVV statisticky významně vyšší koncentrace o-tyrosinu, 3-nitro-tyrosinu, 3-chlorotyrosinu (viz tabulka 20 a graf 24).

Graf č. 24 Porovnání koncentrací markerů poškození aminokyselin (o-Tyr, NO-Tyr, Cl-tyr)



Tabulka 20 Porovnání koncentrací markerů poškození aminokyselin (5-HOMEU, 8-OHG, 8-OHdG) v kondenzátu vydechaného vzduchu (průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)

Parametr	TRA n=40	KS n=19	P
o-Tyr (pg/ml) o-tyrosine	67,7 (59,0-73,5)	35,7 (±7,4)	p<0.001
NO-Tyr (pg/ml) 3-nitro-tyrosine	51,6 (45,5-59,1)	31,2 (±7,2)	p<0.001
Cl-Tyr (pg/ml) 3-chlor-tyrosine	23,5 (19,8-28,0)	13,5 (±2,2)	p<0.001

4.5. ROZDÍLY VE SLOŽENÍ KVV U FENOTYPŮ TRA DLE EOZINOFILIE PERIFERNÍ KRVE

Dalším cílem této práce bylo zjistit, zda je složení kondenzátu vydechaného vzduchu odlišné mezi jednotlivými zánětlivými fenotypy těžkého refrakterního astmatu. Předpokládali jsme rozdíly ve složení KVV u pacientů s eozinofilním a non-eozinofilním fenotypem astmatu.

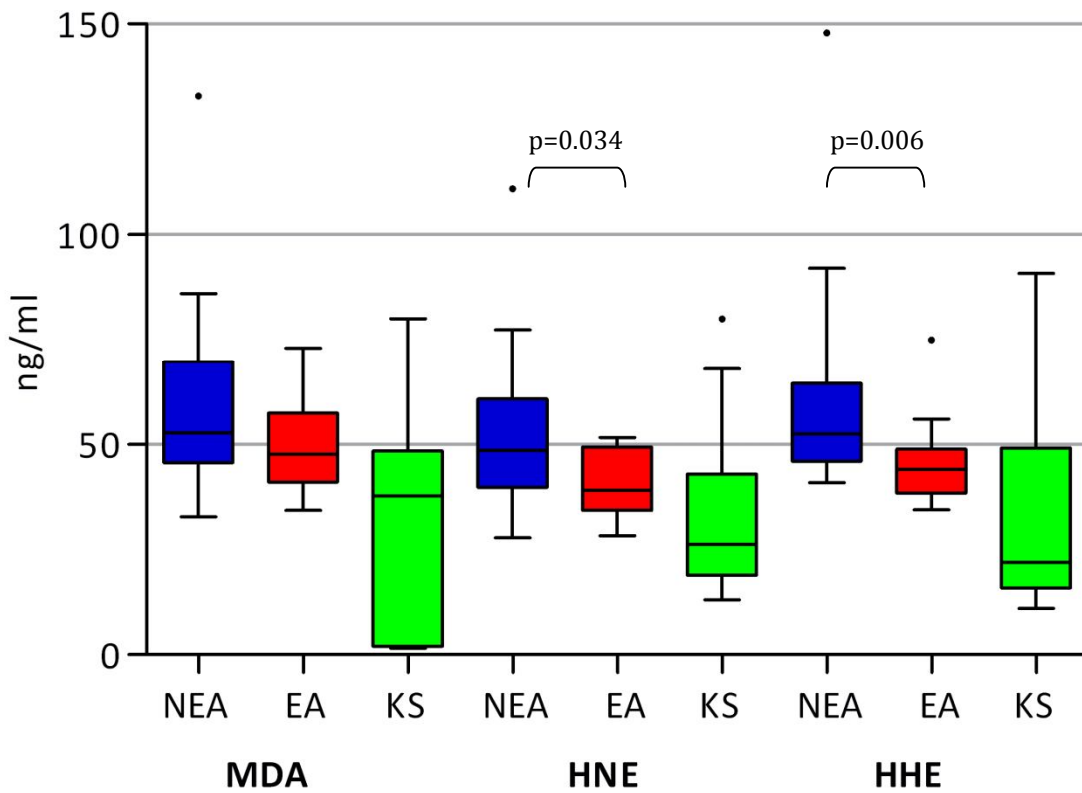
Nejprve jsme skupinu TRA rozdělili dle eozinoflie periferní krve (EC%) odebrané bezprostředně před sběrem kondenzátu vydechaného vzduchu. Pacienty s EC%≥4% jsme považovali za eozinofilní astma (EA), hodnoty s EC%<4% za non-eozinofilní astma (viz. kapitola 4.3.5). Porovnávali jsme koncentrace jednotlivých ukazatelů oxidativního stresu mezi skupinami EA a NEA. Předpokládali jsme jinou intenzitu oxidativního stresu a odlišné specifické poškození lipidů, aminokyselin a nukleových kyselin oxidativním stresem u EA a NEA.

Statisticky významné rozdíly mezi těmito zánětlivě odlišnými skupinami jsme našli u 4-hydroxy-*trans*-nonenal a 4-hydroxy-*trans*-hexenal ve skupině pacientů bez eozinoflie periferní krve (NEA) – viz tabulka 21 a graf 25

Tabulka 21 Porovnání koncentrací markerů lipoperoxidace mezi EA a NEA dle EC% (MDA, HNE, HHE) v kondenzátu vydechaného vzduchu (průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)

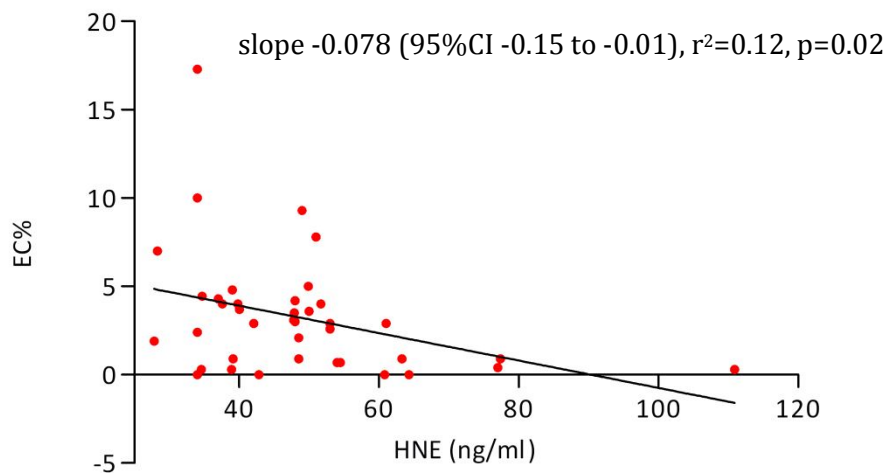
Parametr	NEA n=26	EA n=13	p
MDA (ng/ml) malondialdehyd	52,9 (45,7-69,8)	46,7 (±11,8)	p=0.142
HNE (ng/ml) 4-hydroxy- <i>trans</i> - noneal	48,5 (39,8-60,9)	41,1 (±7,8)	p=0.034
HHE (ng/ml) 4-hydroxy- <i>trans</i> - hexenal	52,6 (46,0-109,8)	48,9 (44-75)	p=0.006

Graf 25 Porovnání koncentrací MDA, HNE, HHE v kondenzátu vydechaného vzduchu u pacientů s EA a NEA a u kontrolní skupiny.



Vztah mezi HNE a EC% potvrdila i metoda lineární regrese (slope -0.078 (95%CI -0.15 to -0.01), $r^2=0.12$) $p=0.02$, viz. graf 26.

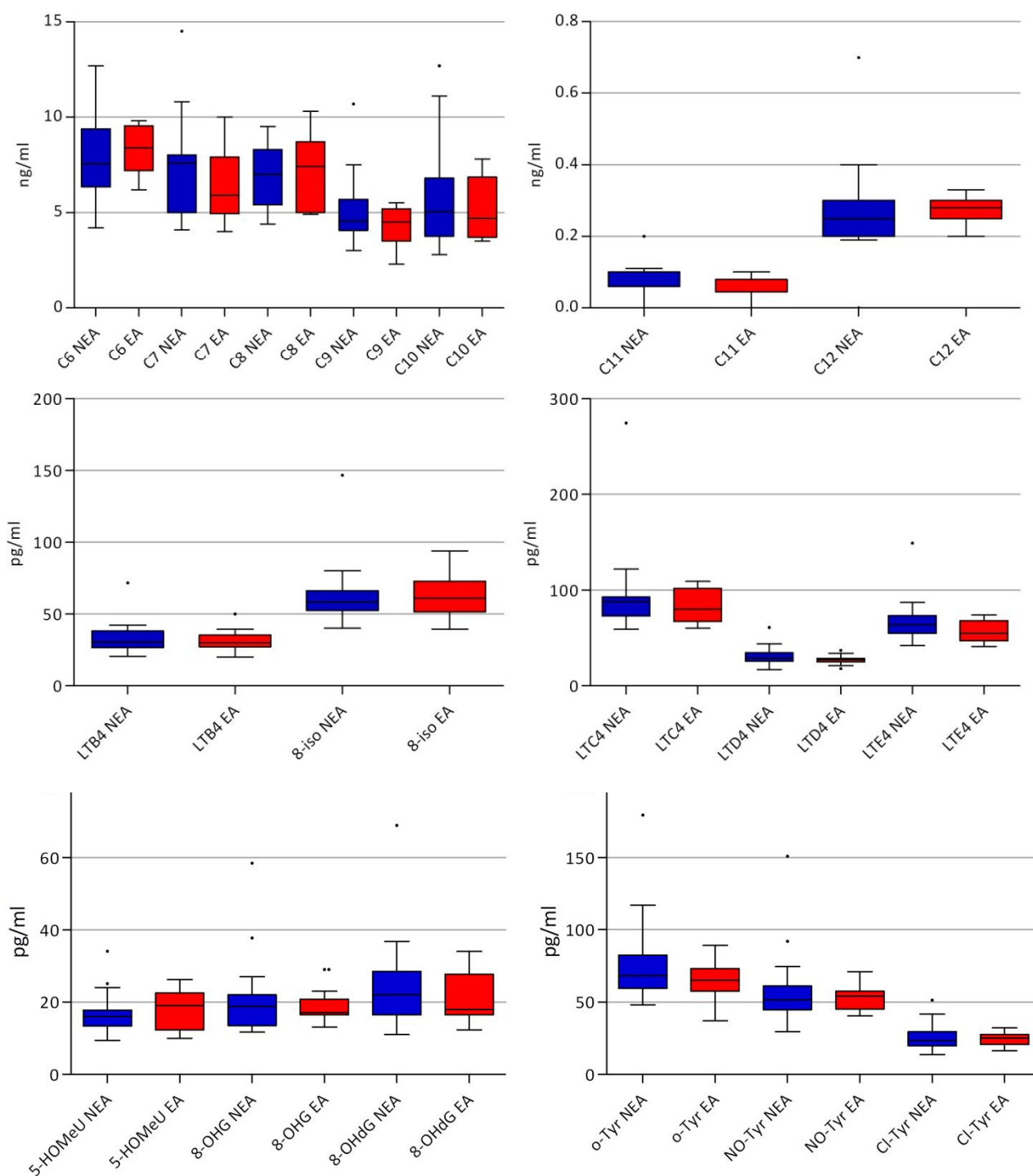
Graf 26 Lineární regrese vztahu mezi HNE a EC%



V ostatních sledovaných parametrech oxidačního stresu nebyly zaznamenány statisticky významné změny mezi skupinou EA a NEA. Rozdíly hodnot jsou uvedeny v Tabulce č. 22 a souhrnném grafu č. 27.

Tabulka 22 Porovnání koncentrací markerů oxidačního stresu mezi EA a NEA v kondenzátu vydechaného vzduchu (průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)			
Parametr	NEA n=26	EA n=13	p
C6 (ng/ml) hexenal	9,4 (7,6-9,4)	8,3 (±1,2)	p=0,543
C7 (ng/ml) heptenal	7,6 (5,0-8,0)	6,38 (±1,8)	p=0,344
C8 (ng/ml) octenal	7,0 (5,4-8,3)	7,1 (±1,8)	p=0,891
C9 (ng/ml) nonenal	4,5 (4,1-5,7)	4,2 (±1,1)	p=0,182
C10 (ng/ml) dekanal	5,1 (3,8-6,8)	5,1 (±1,5)	p=0,772
C11 (ng/ml) undekanal	0,08 (±0,04)	0,08 (±0,06)	p=0,452
C12 (ng/ml) dodekanal	0,25 (0,20-0,30)	0,27 (±0,03)	p=0,452
8-iso (pg/ml) 8-isoprostan	58,4 (52,6-66,2)	63,4 (±15,1)	p=0,592
LTB4 (ng/ml) leukotrien B4	30,5 (26,6-38,2)	31,7 (±7,5)	p=0,892
LTC4 (pg/ml) leukotrien C4	87,6 (73,0-92,8)	82,5 (±16,8)	p=0,562
LTD4 (pg/ml) leukotrien D4	29,1 (26,0-34,7)	27,2 (±4,9)	p=0,182
LTE4 (pg/ml) leukotrien E4	64,0 (55,0-73,3)	56,7 (±11,6)	p=0,101
5-HOMeU (pg/ml) 5-hydroxymethyl uracil	16,0 (13,4-17,8)	17,8 (±5,3)	p=0,372
8-OHG (pg/ml) 8-hydroxy guanosine	18,9 (13,5-22,0)	19,0 (±5,0)	p=0,944
8-OHdG (pg/ml) 8-hydroxy2'deoxy guanosine	22,1 (16,5-28,5)	21,4 (±6,9)	p=0,513
o-Tyr (pg/ml) o-tyrosine	68,3 (59,5-82,6)	63,7 (±13,5)	p=0,313
NO-Tyr (pg/ml) 3-nitro-tyrosine	51,7 (44,8-61,0)	52,1 (±8,6)	p=0,973
Cl-Tyr (pg/ml) 3-chlor-tyrosine	23,2 (19,7-29,5)	24,1 (±4,7)	p=0,782

Graf č. 27 Přehled rozdílů koncentrací markerů oxidativního stresu mezi NEA a EA.



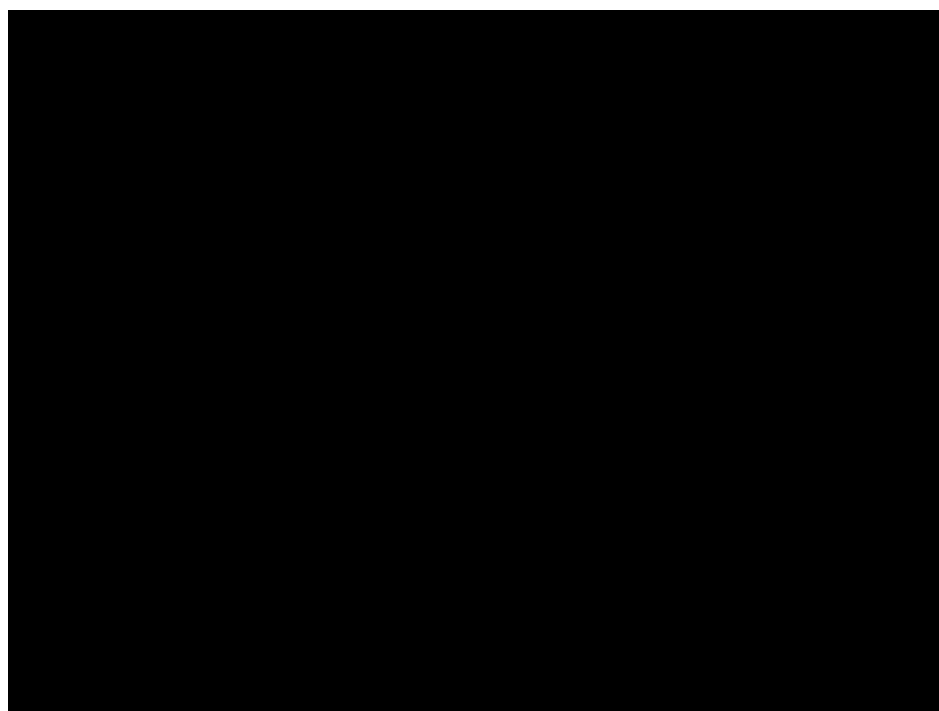
Ve skupině astmatu s eozinofilií periferní krve (EA) jsme hledali vztah HNE k dalším atributům eozinofilního zánětu. Nebyla však nalezena žádná statisticky významná korelace hodnoty HNE k eozinofilii v BALu ($R_s = -0.61$, $p = 0.19$), ani k hodnotě FeNO ($R_s = -0.07$, $p = 0.82$) a k

počtu exacerbací astmatu v předchozím roce ($R_s = -0.10$, $p = 0.73$).

Ve skupině astmatu bez eozinofilie periferní krve (NEA) nebyly nalezeny žádné významné korelace parametru HNE s FEV_1 ($R_s = -0.09$, $p = 0.65$), s eozinofilii BALu ($R_s = 0.10$, $p = 0.72$) ani s hodnotou FeNO ($R_s = 0.38$, $p = 0.16$) a počtem exacerbací astmatu v předchozím roce ($R_s = -0.08$, $p = 0.66$). Také u parametru HHE (4-hydroxy-*trans*-hexenal) nebyly nalezeny významné korelace k parametrům FEV_1 ($R_s = 0.18$, $p = 0.38$), eozinofilii BALu ($R_s = -0.01$, $p = 0.95$) a FeNO ($R_s = -0.06$, $p = 0.75$) a počtu exacerbací astmatu v předchozím roce ($R_s = -0.31$, $p = 0.12$).

Pomocí ROC analýzy jsme hledali koncentraci HNE v KVV, která by predikovala eozinofilní fenotyp astmatu (definovaný hodnotou eozinofilie periferní krve $>4\%$). Hodnota HNE nad 48,25 ng/ml odpovídá non-eozinofilnímu astmatu (senzitivita 69,2%, specificita 57,7%, AUC 0.712, $p = 0.03$), viz graf 28. Přínos HNE pro diskriminaci mezi eozinofilním a non-eozinofilním fenotypem astmatu je tedy nedostatečný.

Graf 28 ROC analýza parametru HNE u pacientů s EA a NEA



Parametr HHE (4-hydroxy-*trans*-hexenal) ve skupině EA nekoreloval s hodnotou FeNO ($R_s = 0.39$, $p = 0.20$), nebyla zjištěna korelace HHE s parametrem FEV_1 ($R_s = -0.19$, $r = 0.51$), eozinofilii BALu ($R_s = -0.03$, $p = 0.94$) ani s aktuální hodnotou FeNO ($R_s = 0.39$, $p = 0.20$) a počtem exacerbací astmatu v předchozím roce ($R_s = -0.23$, $p = 0.43$).

Pomocí logistické regrese jsme hledali vztah přítomnosti eozinofilie periferní krve k parametrům $FEV_1\%$, FeNO a HNE (tabulka 23). Eozinofilie periferní krve u TRA byla v signifikantní pozitivní závislosti k hodnotě FeNO a negativní závislosti k hodnotě HNE.

Tabulka 23
Logistická regrese vztahu parametrů FeNO, FEV1% a HNE k eozinofilii periferní krve nad 4%

Parametr	odds ratio	stand. err.	95% CI	p
FeNO	1.032	0.145	1.004-1.061	0.024
FEV1%	1.028	0.023	0.983-1.074	0.222
HNE (ng/ml)	0.881	0.049	0.790-0.983	0.024

4.6. ROZDÍLY VE SLOŽENÍ KVV U FENOTYPŮ TRA DLE FeNO>30 PPB

Vyšetření koncentrace FeNO je důležitým markerem, který koreluje s eozinofilii v cytologii indukovaného sputa a je uznávaným ukazatelem eozinofilního zánětu bronchiální stěny [87, 111]. Soubor TRA jsme rozdělili podle hodnoty FeNO naměřené ve stejný den jako odběr kondenzátu vydechaného sputa na eozinofilní zánět (EA) s FeNO \geq 30ppb a non-eozinofilní zánět (NEA) s FeNO<30 ppb. Předpokládali jsme rozdíly ve složení KVV u pacientů s eozinofilním a non-eozinofilním zánětem dle FeNO a rozdíly mezi intenzitou oxidativního stresu u pacientů na systémových steroidech oproti astmatikům bez systémové kortikoterapie.

Rozdíl byl přítomen pouze v absolutním množství HNE a HHE v naměřením kondenzátu, koncentrace vztažené na ml kondenzátu se však statisticky významně nelišily (viz tabulka 24). Nepotvrdili jsme tedy závěr zjištěný při rozdělení souboru podle eozinofilie periferní krve, kde rozdíly v koncentracích HNE a HHE byly statisticky významně vyšší u pacientů bez eozinofilie periferní krve.

Tabulka 24 Porovnání koncentrací markerů lipoperoxidace mezi EA a NEA dle FeNO (MDA, HNE, HHE) v kondenzátu vydechaného vzduchu
(průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)

Parametr	NEA n=26	EA n=13	p
MDA (ng/ml) malondialdehyd	59,2 (\pm 17,3)	49,4 (36,9-62,0)	p=0.302
HNE (ng/ml) 4-hydroxy—trans- noneal	45,1 (\pm 10,2)	48,1 (38,8-53,0)	p=0.682
HHE (ng/ml) 4-hydroxy-trans- hexenal	47,8 (43,1-57,2)	49,0 (44,7-58,5)	p=0,821

V ostatních sledovaných parametrech v KVV také nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi pacienty s EA a NEA dle hodnoty FeNO.

4.7. ROZDÍLY VE SLOŽENÍ KVV VE SKUPINĚ TRA DLE KORTIKOTERAPIE

Další hypotézou byl předpoklad supresivního vlivu systémové kortikoterapie na intenzitu oxidativního stresu a na specifické poškození lipidů, proteinů a nukleových kyselin oxidativním stresem. Proto jsme provedli porovnání koncentrací jednotlivých ukazatelů oxidativního stresu u pacientů s TRA již na systémové kortikoterapii (SKS, n=21) oproti nemocným, kde bylo dosaženo kompromisní kontroly astmatu inhalační kortikoterapií (IKS, n=19).

Z hlediska klinických parametrů se skupiny SKS a IKS se lišily pouze v eozinofilii periferní krve (viz tabulka 12), leukocytózou (10,5 vs 7,0, $p=0.004$) a spotřebou denní úlevové léčby SABA (4 vs 2 vdechy, $p=0.01$), dávkou teofyllinů (200,0 mg vs 63,2 mg, $p=0.03$) a častější diagnózou osteoporózy (11 vs 4, $p=0.02$). Nebyly nalezeny jiné statisticky významné rozdíly mezi SKS a IKS v ostatních funkčních, klinických a laboratorních parametrech. Vyšetření kondenzátu vydechaného vzduchu neprokázalo v žádném ze sledovaných markerů oxidativního stresu statisticky signifikantní rozdíly v koncentracích mezi skupinami SKS a IKS. Koncentrace aldehydů v KVV nebyly kortikoterapií ovlivněny (viz tabulka 25).

Tabulka 25 Porovnání koncentrací markerů lipoperoxidace (MDA, HNE, HHE) mezi SKS a IKS v kondenzátu vydechaného vzduchu
(průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)

Parametr	SKS n=21	IKS n=19	p
MDA (ng/ml) malondialdehyd	51,6 (36,6-68,7)	56,3 (\pm 16,0)	$p=0.691$
HNE (ng/ml) 4-hydroxy—trans- noneal	42,8 (34,7-54,5)	46,8 (39,4-51,5)	$p=0.722$
HHE (ng/ml) 4-hydroxy-trans- hexenal	47,8 (41,8-58,4)	48,6 (45,3-57,2)	$p=0,812$

Z dalších měřených ukazatelů v KVV nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi oběma skupinami. K statistické významnosti se přiblížila pouze hodnota octenalů (C8), která v SKS skupině dosáhla hodnoty 5,9 (5,0-7,5) ng/ml vs hodnota 7.5 (\pm 1,8) ng/ml u IKS skupiny ($p=0.09$).

4.8. ROZDÍLY VE SLOŽENÍ KVV U TRA DLE DALŠÍCH FAKTORŮ

Sledovali jsme vliv dalších běžně sledovaných klinických parametrů při vedení léčby astmatu na složení kondenzátu vydechaného vzduchu. Pomocí Spearmanovy korelační analýzy a metody lineární regrese jsme sledovali vztah $FEV_1\%$, FeNO a AKT k hodnotám měřeným v KVV. Dále jsme hledali vztah některých typických klinických známek s literárně dokumentovanou asociací k těžkému astmatu a jeho konkrétnímu fenotypu (BMI, astma vzniklé

v dětství či dospělosti, počet exacerbací v předchozím roce, přítomnost atopie).

Parametr FEV1% nemá statisticky významný vztah k žádnému ze sledovaných parametrů v kondenzátu vydechaného vzduchu, nalezen byl izolovaně pouze slabý vztah mezi FEV1 a C8 ($R_s=0.37$, $p=0.02$). Vztah astma kontrol testu, BMI, ani přítomnosti atopie ke složení kondenzátu vydechaného vzduchu nebyl zjištěn.

Žádný vztah skóre astma kontrol testu k parametrům KVV nebyl nalezen.

Věk pacientů ovlivnil složení KVV jen minimálně, prokázána byla Spearmanovou korelační analýzou jen pozitivní korelace s hodnotou C10 (dekanal) ($R_s=0.44$, $p=0.004$), tento výsledek byl potvrzen i metodou lineární regrese ($p=0.02$).

Hodnota BMI prokázala pozitivní korelaci také s hodnotou C10 (dekanal) ($R_s=0.37$, $p=0.017$), ale vztah je na hranici významnosti a nebyl potvrzen metodou lineární regrese ($p=0.12$).

Celkový počet exacerbací v předchozích 12 měsících (AE) koreloval negativně s hodnotou C8 (octenal) ($R_s=-0.51$, $p=0.0007$), jiné vztahy korelační analýza nenalezla. Metoda lineární regrese tento vztah AE a C8 potvrdila (slope -0.21 (95%CI -0.40 to -0.02), $r^2=0.12$, $p=0.03$). Jiné významné vztahy počtu AE k měřeným parametrům v KVV již nalezeny nebyly.

Věk vzniku astmatu (v dětství tj. před 12 rokem, nebo v dospělosti tj. po 12 roku věku) neměl dle korelační analýzy vztah k žádnému ze sledovaných parametrů v KVV.

Aspirin-senzitivní astma jako zvláštní fenotyp astmatu byl zjištěn u 9 (22,5%) pacientů. Nebyl prokázán žádný vztah tohoto fenotypu ke složení KVV, ani k hodnotám cysteinylových leukotrienů.

4.9. VARIABILITA NAMĚŘENÝCH VÝSLEDKŮ V KVV

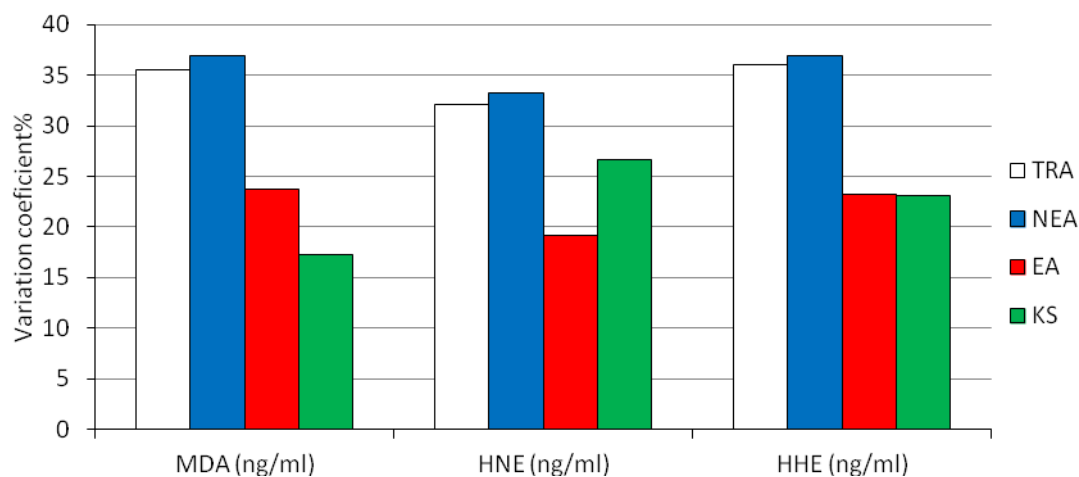
Metody odběru KVV jsou známé již více než 20 let a výrazně pokročila biochemická diagnostika, která umožňuje detekci pikogramových množství různých látek v KVV. Přesto dosud nejsou určena rozmezí normálních hodnot pro jednotlivé sledované biomarkery v KVV.

Důvodů této situace je více. V KVV můžeme detekovat markery různého biochemického složení, které mají značně rozdílné biochemické a fyzikální vlastnosti (stabilita, rozpustnost ve vodní páře, molekulární hmotnost), proto musí být stanovovány odlišnými metodami. Některé z těchto metod mají při nízkých koncentracích látek v KVV horší spolehlivost a proto jsou výsledky variabilní. Z těchto důvodů dosud nebyly analytické metody a referenční limity hodnot pro jednotlivé markery v KVV validizovány. V naší práci jsme použili metodu kapalinové a/nebo plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie garantující přesnost i při pikogramových koncentracích látek v KVV [79, 91, 92]. Dobré reproducibility lze s těmito metodami dosáhnout u vyšetření koncentrací 8-isoprostanu a aldehydů (MDA, HNE, HHE). V naší práci jsme variabilitu výsledků jednotlivých mediátorů posuzovali výpočtem variačního koeficientu (tabulka 26 a graf

29). Z Tabulky i grafu je zřejmé, že variabilita je nižší u kontrolní skupiny a eozinofilního astmatu ($p < 0.01$).

Tabulka 26 Přehled variačních koeficientů jednotlivých markerů ve sledovaných skupinách astmatiků a KS				
Variation coefficient %	TRA	NEA	EA	KS
MDA (ng/ml)	35,56	36,97	23,74	17,29
HNE (ng/ml)	32,14	33,21	19,1	26,69
HHE (ng/ml)	35,98	36,98	23,21	23,15
C6 (ng/ml)	31	37,3	14,99	19,35
C7 (ng/ml)	31,93	32,36	28,09	20,49
C8 (ng/ml)	32,56	34,81	26,12	14,65
C9 (ng/ml)	31,65	32,61	25,85	20,02
C10 (ng/ml)	38,41	41,94	29,02	17,35
C11 (ng/ml)	49,85	51,26	44,95	172,43
C12 (ng/ml)	36,32	44,49	12,22	131,73
LTB4 (pg/ml)	28,95	31,53	23,51	27,02
8-Iso (pg/ml)	29,67	31,67	23,85	21,58
LTC4 (pg/ml)	38,45	43,86	20,38	17,21
LTD4 (pg/ml)	27,5	29,22	17,87	32,01
LTE4 (pg/ml)	29,75	31,5	20,48	17,74
5-HOMeU (pg/ml)	30,43	31,17	29,83	24,11
8-OHG (pg/ml)	42,4	47,13	32,32	23,04
8-OHdG (pg/ml)	44,22	36,36	21,23	20,58
o-Tyr (pg/ml)	33,9	39,98	16,51	23,14
NO-Tyr (pg/ml)	34,54	32,57	19,63	16,75
Cl-Tyr (pg/ml)	28,96	32,57	19,63	16,75

Graf č. 28 Přehled variability výsledků u mediátorů MDA, HNE a HHE



5. DISKUSE

Tato práce se věnuje pacientům s těžkým refrakterním astmatem. Sledovali jsme asociace mezi vybranými klinickými, funkčními a laboratorními faktory, které určují fenotyp astmatu. Pomocí analýzy kondenzátu vydechovaného vzduchu jsme hledali rozdíly v intenzitě oxidativního stresu v dýchacích cestách u těžkého refrakterního astmatu oproti zdravým. Těžké refrakterní astma je heterogenní onemocnění, proto jsme hledali také rozdíly v markerech oxidačního a nitračního stresu i mezi eozinofilním a non-eozinofilním fenotypem astmatu.

Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu je neinvazivní metoda umožňující monitoraci zánětlivých a oxidativních změn v oblasti povrchu respiračního epitelu. Předpokládali jsme nalezení biomarkeru ve vydechovaném vzduchu, který by predikoval konkrétní zánětlivý fenotyp astmatu a současně vypovídal o intenzitě a typu poškození respiračního systému oxidativním stresem. V budoucnu by bylo možné využívat neinvazivní odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu a sledování vybraných biomarkerů při klinickém rozhodování o fenotypu astmatu, fenotypově specifické a antioxidační léčbě.

Prvním cílem naší práce bylo sledovat specifické klinické, funkční a zánětlivé charakteristiky našeho souboru pacientů s těžkým refrakterním astmatem.

Součástí některých modelů určení klinického fenotypu TRA je hodnocení typu zánětu bronchiální stěny. Astma bylo dlouho považováno za alergické onemocnění zprostředkované Th-2 zánětlivou reakcí s následným eozinofilním zánětem bronchiální stěny a dobrou odpovědí na léčbu inhalačními kortikosteroidy. V posledních letech však narůstá množství důkazů o značné patofyziologické heterogenitě astmatu. Pouze u poloviny pacientů s lehkým a středně těžkým astmatem jsou přítomny známky Th-2 zánětu [103]. Eozinofilie v indukovaném sputu je přítomna jen u necelé poloviny pacientů s astmatem, které není léčeno inhalačními kortikosteroidy a zánětlivý fenotyp zůstává konstantní v čase [30]. U těžkého refrakterního astmatu nalézáme pacienty s perzistujícím eozinofilním zánětem i přes protizánětlivou léčbu kortikosteroidy a také pacienty non-eozinofilním zánětem bronchiální stěny [10, 30, 58, 108]. Poznání typu převládajícího zánětu bronchiální stěny u TRA je důležité pro rozhodnutí o léčebné intervenci.

Nemocní s perzistující eozinofilií jsou ohroženi častějšími exacerbacemi a poklesem plicních funkcí v čase [42]. Mohou mít potenciální benefit z léčby novými anti-eozinofilními léky (mepolizumab, reslizumab), protože mají různě vyjádřenou kortikorezistenci a pravděpodobně nadprodukcí IL-5, hlavního chemokinu eozinofilního zánětu [8, 9, 110].

U nemocných s non-eozinofilním fenotypem astmatu nejčastěji nacházíme převažující neutrofile v cytologii indukovaného sputa. Není dosud jasné, zda je tento nález způsoben

suprimujícím efektem kortikoterapie na eozinofily a současně tlumením apoptózy neutrofilů nebo jde o samostatný buněčný fenotyp jedné nemoci. U non-eozinofilního fenotypu těžkého refrakterního astmatu je vhodné uvažovat o deeskalaci kortikoterapie a přidat jinou antineutrofilní léčbu např. makrolidy [10, 34].

Zlatým standardem určení zánětlivého fenotypu astmatu je bronchoskopicky provedená biopsie bronchiální stěny. Invazivita bronchoskopie však nedovoluje provádění této metody v běžné klinické praxi, navíc je interpretace nálezu ovlivněna současnou protizánětlivou léčbou kortikosteroidy. Bronchoskopicky provedená biopsie bronchů má spíše význam v hodnocení přítomnosti remodelačních změn specifických pro bronchiální astma [68].

Zjištění typu zánětu je ve výzkumu a klinické praxi prováděno neinvazivními metodami jako je cytologie indukovaného sputa a měření koncentrace vydechaného oxidu dusnatého. Literární údaje o korelaci těchto metod s biopsickými nálezy jsou rozporuplné, zřejmě každá z těchto metod přináší informace o zánětu v jiném kompartmentu respiračního systému [90]. Máme však k dispozici dobře provedené studie vedení léčby astmatu podle eozinofilie indukovaného sputa i podle měření vydechaného FeNO [33, 87]. Řízení protizánětlivé léčby podle eozinofilie indukovaného sputa je efektivní postup vedoucí ke snížení počtu exacerbací astmatu. U FeNO tohoto výsledku dle recentních literárních metaanalýz nebylo zcela dosaženo. U dospělých řízení protizánětlivé léčby dle FeNO vede ke snížení celkové dávky inhalačních steroidů, u dětí však tento postup celkovou dávkou inhalačních kortikosteroidů zvyšuje [85]. Proto je v současnosti doporučováno FeNO používat v diagnostice astmatu, kortikosenzitivity, odhalení non-compliance s léčbou steroidy, nebo při identifikaci pacientů s perzistující eozinofilií dýchacích cest i přes řádně užívanou protizánětlivou léčbu [32, 87, 112].

Nevýhodou indukovaného sputa je náročnost preanalytické přípravy vzorku a proto je tato metoda užívána spíše vyjímečně a převážně jen z výzkumných důvodů. Za hodnotu svědčící pro eozinofilní zánět je považován nález více než 3% eozinofilů [111, 113]. Průkaz eozinofilie indukovaného sputa znamená také dobrou léčebnou odpověď na kortikosteroidy [83]. U těžkého refrakterního astmatu však perzistující eozinofilie může odpovídat určité míře kortikorezistence a rizikovému fenotypu častých exacerbací astmatu a rychlejšímu poklesu plicních funkcí [5, 32, 42, 114].

Ve skupině těžkého refrakterního astmatu (TRA) jsme sledovali výskyt vybraných klinických, funkčních a zánětlivých vlastností, které jsou důležité pro určení fenotypu astmatu. Výběr pacientů do našeho sledování byl založen na splnění kritérií pro těžké refrakterní astma dle platné definice odborných společností [14].

Všichni nemocní s TRA v našem souboru užívali pro nekontrolované astma vysokou dávku inhalačních kortikosteroidů (přes 3000ug ekvivalentu budesonidu). U poloviny pacientů byla nutná k dosažení alespoň kompromisní kontroly astmatu trvalá léčba systémovými

kortikoidy. Pacienti s TRA v našem souboru měli nízkou kvalitu života, středně těžkou bronchiální obstrukci, mírnou plicní hyperinflaci a zvýšené odpory centrálních dýchacích cest, převažoval pozitivní průkaz atopie v anamnéze, nejčastějším alergenem byli roztoči. Pozorovali jsme častý výskyt typických komorbidit – refluxní nemoci jícnu a rinosinuitidy.

V běžné praxi jsou k posouzení tíže astmatu a stupně kontroly nad astmatem užívány jednoduché metody (FEV₁, FeNO, astma kontrol test skóre). Sledovali jsme vztah těchto parametrů ke klinickým nálezům u TRA.

Prokázali jsme negativní korelaci eozinofilie sliznice dýchacích cest měřené metodou FeNO s věkem. Pokles intenzity eozinofilního zánětu byl již v literatuře publikován ve studii s astmatiky staršími 65 let [115].

Parametr FeNO byl ve skupině EA s eozinofilii periferní krve výrazně vyšší, stejně tak byla vyšší plicní hyperinflace. Častá byla přítomnost EA s rinosinuitidou a atopickým ekzémem. Dalším statistickým rozdílem byl vyšší výskyt obezity u pacientů bez eozinofilie, zde je nutné připustit vliv časté perorální kortikoterapie u 2/3 nemocných. Parametr FEV₁ se ve skupinách rozdělených dle EC% na EA a NEA významně nelišil. Náš předpoklad vyššího výskytu atopie u pacientů s EA nebyl splněn, atopie byla v obou skupinách podobně zastoupená.

Hodnoty FeNO korelovaly se symptomy, spotřebou SABA a trvajícím eozinofilním zánětem v histologii bronchiální stěny u těžkého refrakterního astmatu [32]. Počet pacientů léčených trvalou kortikoterapií se u skupin s nízkým a vysokým FeNO nelišil. FeNO tedy může vypovídat o kortikorezistenci části našich pacientů. Potvrdili jsme závěry studie SARP, která také popisuje u nemocných s perzistující eozinofilii dle FeNO plicní hyperinflaci a výraznější bronchiální obstrukci [42, 65].

Vysoká hodnota FeNO >30ppb byla u našich TRA pacientů spojena s větším počtem exacerbací astmatu v předchozích 12 měsících. Potvrdili jsme tedy známou asociaci perzistujícího eozinofilního zánětu s vyšším výskytem exacerbací, které je dokumentováno ve studiích s cytologií indukovaného sputa u těžkého refrakterního astmatu a u populace lehkých astmatiků s vyšší hodnotou FeNO při léčbě inhalačními steroidy [33, 114].

Literárně dokumentovaný vztah vyšší hodnoty FeNO k přítomnosti atopie jsme v našem souboru nepotvrdili [87]. Perzistující eozinofilní bronchiální zánět spojený s nadprodukcí FeNO je u TRA spojen s rychlejším poklesem plicních funkcí [112]. V práci centra pro TRA v Leidenu zjistili u 98 TRA pacientů s FeNO >20 ppb téměř dvojnásobně vyšší riziko zrychlení poklesu plicních funkcí v čase, průměrný roční pokles FEV₁ u této skupiny dosáhl 40 ml/rok. V našem souboru 40 pacientů s TRA mělo zvýšení FeNO >30 ppb téměř 1/3 pacientů. U této skupiny jsme retrospektivním hodnocením spirometrií provedených v posledním čtvrtletí roků 2006, 2009 a 2011 nenalezli signifikantní pokles ani vzestup plicních funkcí v čase.

FeNO lze i dle zjištění z naší práce považovat u skupiny těžkého refrakterního astmatu za

užitečný biomarker, který identifikuje pacienty s nejtěžší bronchiální obstrukcí, plicní hyperinflací a vyšším rizikem exacerbací astmatu, který souvisí s perzistujícím eozinofilním zánětem [42]. Vysoká hodnota FeNO i přes užívanou protizánětlivou léčbu může nalézt pacienty s rizikem častějších exacerbací a rizikem rychlého poklesu plicních funkcí [42]. Korelace FeNO k eozinofilii periferní krve byla v našem souboru na hranici statistické významnosti, přesnější logistická regrese však vztah těchto parametrů prokázala (OR 1.03, 95% CI 1.00-1.06, p=0.02)

Dále jsme prokázali významný negativní vliv tíže bronchiální obstrukce na kvalitu života. Hodnota celkového IgE negativně korelovala s tíží bronchiální obstrukce. Potvrdili jsme vliv počtu exacerbací na zhoršení kvality života, ačkoliv byl vztah na hranici významnosti [116].

Dosud publikované koncepty fenotypů používají matematické statistické metody, které mají svoje limity a jejich závěry nemusí zcela odpovídat realitě. Také není jednoznačně určen výčet charakteristik, které jsou nutné k určení fenotypu astmatu. Pacienti jednoho fenotypu by měli sdílet nejméně tři společné charakteristiky astmatu (genetika, fyziologie, klinický průběh, odpověď na léčbu, přítomnost specifických biomarkerů). Největší dosud publikované klastrové analýzy (Leicester [35], Severe Asthma Research Project (SARP) [65]) neuvádějí stejná vstupní data, např. SARP nesledoval eozinofilii indukovaného sputa. Přes tyto rozdíly v obou analýzách byl silný nezávislý faktor pro určení fenotypu astmatu zjištěn věk vzniku astmatu (před nebo po 12 roku věku). Poslední monografie Evropské respirační společnosti věnovaná těžkému astmatu tedy shrnuje dosavadní koncepty fenotypu do tří skupin [117].

Fenotyp těžkého alergického astmatu vzniklého v dětství představuje asi polovinu všech nemocných s TRA. Tito nemocní mají vysokou hodnotu celkového IgE a jsou kandidáty biologické léčby omalizumabem (anti-IgE).

Fenotyp astmatu vzniklého v dospělosti spojený s nadměrnou eozinofilií a méně vyjádřenou atopií je přítomen asi u 25% všech pacientů s TRA. Je často asociován s rinosinuitidou a nosními polypy, častá je aspirinová senzitivita, eozinofilie v indukovaném sputu i BALu i přes léčbu inhalačními kortikosteroidy. Tito nemocní mohou mít benefit z léčby antileukotrieny a z anti-eozinofilní léčby (mepolizumab, reslizumab).

Fenotyp astmatu vzniklého v dospělosti spojený s výraznou dominancí symptomů je častý u obézních žen středního věku, převládající typ zánětu dýchacích cest dosud nebyl určen. Tito pacienti mívají časté exacerbace astmatu a častou léčbu systémovými kortikosteroidy.

V našem souboru jsme při celkovém počtu 40 pacientů s TRA neměli možnost provést validní klastrovou analýzu, která by umožnila vlastní identifikaci fenotypů TRA, proto můžeme jen porovnat naše nemocné s výše uvedenými fenotypy. Celkem 20 pacientů v našem souboru odpovídá fenotypu pozdně vzniklého astmatu s převládajícím eozinofilním zánětem. U 14 pacientů lze fenotyp popsat jako non-eozinofilní astma s obezitou a převážně ženským pohlavím.

Pouze 6 pacientů mělo astma vzniklé před 12 rokem věku, kteří by splnili podmínky kategorie časně vzniklého alergického astmatu s výraznými symptomy.

Druhým cílem naší práce bylo zhodnotit vztah vybraných ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu k běžně klinicky užívaným metodám monitorace zánětu a bronchiální obstrukce u těžkého refrakterního astmatu. Předpokládali jsme tyto hypotézy

HYPOTÉZA 1

Existují rozdíly v koncentracích ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu mezi pacienty s těžkým refrakterním astmatem a zdravou kontrolní skupinou.

V naší práci jsme k analýze koncentrací látek v KVV použili vysoce senzitivní metody kombinující kapalinovou a/nebo plynovou chromatografii a hmotnostní spektrometrii (LC-MS, /GC-MS), jak je doporučováno v odborné literatuře [79, 91, 92]. Tyto metody jsou schopné určit i velmi nízké koncentrace látek v řádu nano- a piko- gramů v 1 ml kondenzátu vydechovaného vzduchu.

Pro zhodnocení intenzity oxidativního stresu jsme vybrali spektrum látek, které jsou považovány za markery oxidačního poškození fosfolipidů v biomembránách (aldehydy – MDA, HNE, HHE, C₆-C₁₂), markery poškození DNA a RNA oxidačním stresem (5-HOMEU, 8-OHG, 8-OHdG), markery nitračního stresu tyrosinových částí bílkovin (NO-tyr, Cl-tyr, o-Tyr) a sledovali jsme koncentrace 8-isoprostanu a vybraných cysteinylových leukotrienů (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄). Ověřovali jsme hypotézu, že je možné odlišit pomocí LC-MS analýzy KVV pacienty s těžkým refrakterním astmatem od zdravé kontrolní skupiny.

Rozdíly byly ve všech parametrech statisticky výrazně vyšší u astmatiků. V naší práci jsme neměli možnost vyšetřit pacienty s astmatem, které dobře odpovídá na protizánětlivou léčbu inhalačními kortikosteroidy. Výsledky MDA u TRA dosáhly hodnoty 50,6 ng/ml, v kontrolní skupině 22,8 ng/ml. V literatuře můžeme nalézt práce, které prokazují stejné hodnoty MDA u TRA i u lehkého astmatu (78 ng/ml vs 78,3 ng/ml) [76]. Ve studii sledující MDA u exacerbací astmatu u dětí byly nalezeny hodnoty 90.6 ng/ml, po léčbě steroidy došlo k poklesu na úroveň zdravé kontroly 55.6 ng/ml [106]. Práce sledující zvýšení MDA po expozici ozónu u 107 astmatiků našla bazální hodnoty MDA 56.6 ng/ml [97]. LTB₄ se v KVV u zdravých uvádí v hodnotách kolem 29,4±7,8 pg/ml, v našem souboru jsme naměřili průměrnou hodnotu 18,4±4,9 pg/ml. 8-isoprostan v KVV u zdravých 6,7±3,8 pg/ml, v našem souboru 29,8±6,5 ml. Koncentraci LTE₄ měli zdraví 29±11 pg/ml, v našem souboru 16,1±5,1 pg/ml [79]. Variabilitu těchto výsledků lze vysvětlit různými počty účastníků v kontrolních skupinách, zpravidla šlo o soubory několika desítek zdravých pacientů. Dosud také nebyl určen jednotný standard

hodnocení diluce vzorků kondenzátu a proto mohou být koncentrace látek v KVV rozdílné. Monografie Evropské respirační společnosti i její doporučený postup považuje vysokou variabilitu výsledků koncentrací markerů v KVV z různých laboratoří za důsledek chybějící jednotné standardizace analytických a odběrových metod a standardu hodnocení diluce jednotlivých látek [92].

Naše výsledky prokázaly schopnost analýzy oxidačních a nitračních produktů v KVV metodou LC/GS-MS odlišit astma od zdravých v kontrolní skupině. U jednoho z parametrů (4-hydroxy-*trans*-nonenal, HNE) jsme provedli ROC analýzu, která prokázala při hodnotě 31,97ng/ml v KVV 94,7% senzitivitu a 95% specificitu pro diskriminaci astmatu od zdravých v kontrolní skupině.

Hypotéza 1 byla splněna, prokázali jsme rozdíly v koncentracích ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechaného vzduchu mezi pacienty s těžkým refrakterním astmatem a zdravou kontrolní skupinou.

HYPOTÉZA 2

Koncentrace ukazatelů oxidativního stresu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem se liší v závislosti na eozinofilii periferní krve.

Těžké refrakterní astma je značně heterogenní onemocnění svým klinickým průběhem i typem zánětu v bronchiální stěně [24]. V literatuře dosud nebyl popsán rozdíl v biomarkerech v KVV u pacientů s různými zánětlivými fenotypy astmatu. Předpokládali jsme, že se bude průběh oxidačního a nitračního stresu lišit u pacientů s eozinofilním a non-eozinofilním zánětem bronchiální stěny. V naší práci jsme porovnávali koncentrace vybraných markerů ROS a NOS v KVV mezi pacienty s eozinofilním (EA) a non-eozinofilním zánětem (NEA).

Jednou z možností hodnocení přítomnosti eozinofilního zánětu v dýchacích cestách je sledování počtu eozinofilů periferní krve. Přínos tohoto parametru je některými autory zpochybňován, protože může mít až 40% variabilitu v závislosti na době odběru resp. diurnální sekreci kortisolu. Výhoda této metody je v dostupnosti a jednoduchém laboratorním zpracování s doručením výsledku v krátké době. Literárně je popsána korelace mezi hodnotou eozinofilie periferní krve a symptomy astmatu a negativní korelace k plicním funkcím, u dospělých byla zjištěna korelace k bronchiální hyperreaktivitě [101]. Hodnota eozinofilie periferní krve odráží krevní a tkáňové koncentrace cytokinů eozinofilního zánětu (např. IL-5). Léčba biologickými protilátkami proti těmto molekulám vede ke snížení eozinofilů v periferní krvi a jde tedy o užitečný jednoduchý marker sledující efektivity této léčby [100]. Perzistující vysoká hodnota eozinofilů v periferní krvi naopak může u TRA svědčit o určité kortikorezistenci.

Při rozdělení souboru těžkého refrakterního astmatu dle eozinofilie periferní krve (EC%) jsme zjistili statisticky významně vyšší koncentraci nenasycených aldehydů 4-hydroxy-*trans*-

nonealu a 4-hydro-*trans*-hexanalu u non-eozinofilních pacientů (EC% < 4%). Metoda lineární regrese prokázala závislost hodnoty HNE na eozinofilii periferní krve, s klesajícím počtem eozinofilů hodnota HNE rostla (viz graf 26).

Dále jsme hledali korelace parametru HNE s dalšími atributy eozinofilního zánětu v obou podskupinách dle EC%, avšak nebyly prokázány další korelace HNE s eozinofilíí BALu, FeNO ani počtu exacerbací astmatu v předchozím roce. ROC analýza potvrdila hodnotu HNE 48,25ng/ml jako rozhodující pro non-eozinofilní systémový zánět, avšak senzitivita a specificita tohoto parametru je nízká a přínos pro diskriminaci zánětlivého fenotypu má tento parametr nepříliš významný.

HHE (4-hydroxy-*trans*-hexenal) je také důležitým markerem lipoperoxidace ω -3 mastných kyselin. Prokázali jsme také asociaci non-eozinofilního zánětu (EC%<4%) s koncentrací HHE v kondenzátu vydechovaného vzduchu u TRA. Korelace HHE nebyla prokázána k aktuální hodnotě FeNO ani k eozinofilii BALu či počtu exacerbací astmatu.

Na rozdíl od rozdělení pacientů na EA a NEA dle FeNO, kde byl stejný počet léčených trvalou kortikoterapií, při rozdělení pacientů do skupin podle EC% jsme zjistili rozdíl v počtu nemocných na trvalé kortikoterapii, který byl v NEA skupině dle EC% vyšší. Terapie systémovými kortikoidy parametr EC% ovlivňuje pravděpodobně více než FeNO. I přes tento metodologický problém jsme provedli další hodnocení souboru dle EC%, protože obě skupiny byly léčeny vysokou dávkou inhalačních steroidů. Perzistující eozinofilii periferní krve > 4% jsme v našem souboru také považovali za marker určité rezistence ke kortikoterapii, protože tito nemocní měli v našem souboru 2x častější exacerbace astmatu, přestože byli i v EA skupině léčeni vysokými dávkami inhalačních steroidů. Význam rozdělení na EA či NEA dle EC% jsme podpořili zjištěnou vysokou korelací eozinofilie periferní krve s eozinofilíí v bronchoalveolární laváži, ačkoliv toto vyšetření nebylo provedeno ve stejný den jako odběr periferní krve.

Hypotéza 2 byla splněna, prokázali jsme rozdílné koncentrace ukazatelů oxidativního stresu v parametrech lipoperoxidace mastných kyselin u pacientů s těžkým refrakterním astmatem v závislosti na eozinofilii periferní krve.

HYPOTÉZA 3

Koncentrace ukazatelů oxidativního stresu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem se liší v závislosti na koncentraci vydechovaného oxidu dusnatého.

Korelace FeNO k cytologii indukovaného sputa je v literatuře dobře popsána u astmatiků bez systémové kortikoterapie [87]. Výhodou metody FeNO oproti cytologii indukovaného sputa je jednoduchost provedení, nízká variabilita a okamžitý výsledek. Limity FeNO pro eozinofilní zánět se liší s věkem a za pozitivní hodnoty jsou podle různých autorů považovány u steroid naivních pacientů hodnoty nad 25 ppb. Hodnoty FeNO nad 50ppb mají 75% pozitivní prediktivní

hodnotu pro eozinofilii indukovaného sputa, naopak FeNO<25ppb má 79% negativní prediktivní hodnotu pro eozinofilii indukovaného sputa [87]. Podle některých autorů je vhodnější použít limit 42 ppb, který rozliší eozinofilní a non-eozinofilní astma se senzitivitou 63% a specificitou 80% ($p<0.0001$)[111]. V našem souboru TRA jsme eozinofilní fenotyp astmatu dle perzistující vysoké hodnoty FeNO>30ppb našli u 15 pacientů. Tito pacienti měli výraznější bronchiální obstrukci, výraznější eozinofilii periferní krve a výraznější plicní hyperinflaci, nezjistili jsme rozdíly ve spotřebě úlevové léčby a změny v intenzitě symptomů měřené dotazníkem kvality života (astma kontrol test). Léčba systémovou kortikoterapií byla v obou podskupinách stejně zastoupená.

Porovnání koncentrací markerů oxidativního stresu ve vydechovaném vzduchu u pacientů s eozinofilním a non-eozinofilním zánětem dle měření FeNO neprokázal statisticky významné rozdíly v žádném ze sledovaných parametrů. Předpoklad vztahu non-eozinofilního zánětu k nadměrné koncentraci aldehydů 4-hydroxy-trans-nonenal, 4-hydroxy-trans-hexenal nebyl potvrzen při rozdělení souboru dle metody FeNO.

Zvýšení koncentrace 4-hydroxy-trans-nonenalu bylo tedy potvrzeno pouze ve vztahu k chybějící eozinofilii periferní krve, stejný výsledek byl prokázán i u 4-hydroxy-trans-hexanal. Z těchto výsledků tedy můžeme předpokládat, že nadměrná produkce HNE a HHE je důsledkem non-eozinofilního zánětu bronchiální stěny, který vede k větší lipoperoxidaci ω -3 a ω -6 mastných kyselin, než je tomu u eozinofilního zánětu.

Neprokázali jsme vztah ostatních měřených parametrů oxidačního a nitračního stresu k žádné z metod zjištění typu zánětu (FeNO, EC%). Důvodů nalezení statisticky významného vztahu k pouze dvěma příbuzným markerům lipoperoxidace je více. Velkou roli hraje relativně malý počet vyšetřených pacientů, ačkoliv velká část prací analyzujících KVV má podobný počet subjektů. Dále jsme zjistili významné korelace mezi chemicky příbuznými markery (aldehydy, leukotrieny, nitrotyrosin). Neměli jsme možnost porovnat složení KVV s komparativní skupinou kontrolovaného lehkého astmatu inhalační kortikoterapií.

Obě metody hodnocení floridního eozinofilního zánětu dýchacích cest EC% i FeNO v naší práci prokázaly svoji diagnostickou hodnotu. Vzájemně se výsledky těchto metod doplňují a mohou přinést lékaři důležitou informaci o nedostatečné kontrole eozinofilního zánětu u refrakterního těžkého astmatu. Výhodou použití EC% i FeNO v diagnostice eozinofilního zánětu u astmatu je oproti cytologii indukovaného sputa snadné provedení a rychlá dostupnost výsledku. Nemocní s těžkým refrakterním astmatem a zvýšením EC% i FeNO si zasluhují větší pozornost, protože jsou ohroženi rychlejším poklesem plicních funkcí a častějšími exacerbacemi [32, 112]. V těchto případech lze uvažovat o navýšení protizánětlivé léčby buď o systémové kortikoidy nebo o jiný antieozinofilní lék (mepolizumab, reslizumab). Je třeba také ověřit spolupráci pacienta s léčbou a dodržování režimových opatření, zejména vyvarování se kontaktu

s relevantními alergeny. Naše práce prokázala, že eozinofilie periferní krve může být důležitým markerem nedostatečně kontrolovaného systémového eozinofilního zánětu a kortikorezistence. **Hypotéza 3 nebyla splněna, koncentrace ukazatelů oxidativního stresu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem se v závislosti na koncentraci vydechovaného oxidu dusnatého významně neliší.**

HYPOTÉZA 4

Systémová kortikoterapie ovlivňuje koncentrace ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem.

Ve skupině bez eozinofilie periferní krve bylo více pacientů na systémové kortikoterapii. Abychom vyloučili vliv kortikoterapie na zánětlivý fenotyp astmatu a na chemické složení EBC, rozdělili jsme skupinu TRA na pacienty trvale léčené kortikoidy (SKS) a bez systémové kortikoterapie (IKS) bez ohledu na přítomnost eozinofilie periferní krve či nadprodukce FeNO. Toto rozdělení neprokázalo vliv systémové kortikoterapie na koncentrace sledovaných markerů oxidačního a nitračního stresu. Žádný ze sledovaných parametrů nebyl statisticky významně odlišný. Přepokládáme tedy, že perzistující eozinofilie periferní krve je ukazatelem kortikorezistence a systémově podávané kortikosteroidy neovlivňují průběh oxidativního stresu u těžkého refrakterního astmatu.

Hypotéza 4 nebyla splněna, systémová kortikoterapie v našem souboru neovlivňovala koncentrace ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem.

HYPOTÉZA 5

Vybrané klinické faktory mohou ovlivnit koncentrace ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem.

Sledovali jsme vliv vybraných klinických faktorů (věk, BMI, pohlaví, atopie, aspirinová-senzitivita, refluxní nemoc jícnu, rinosinitida, astma kontrol test) na složení kondenzátu vydechovaného vzduchu. Nenašli jsme statisticky významné vztahy mezi výše uvedenými klinickými faktory a koncentracemi markerů oxidačního a nitračního stresu v KVV.

Věk vzniku astmatu je v klinických fenotypových modelech považován za velmi důležitý faktor určující klinický průběh astmatu [117]. Ani tento faktor však neovlivňoval parametry oxidačního ani nitračního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu u těžkého refrakterního astmatu.

Neprokázali jsme literárně dokumentovaný vztah aspirin-senzitivního astmatu ke koncentracím cysteinylových leukotrienů v kondenzátu vydechovaného vzduchu [48, 79]. Přítomnost atopie negativně korelovala s leukotrienem B₄, který je typický marker neutrofilního

zánětu [118]. Jiné asociace leukotrienu B₄ s atributy non-eozinofilního zánětu však nalezeny nebyly.

Hypotéza 5 nebyla splněna, vybrané klinické faktory jen nevýznamně ovlivnily koncentrace ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem.

Třetím cílem naší práce bylo nalezení nových markerů specifického poškození oxidativním stresem pro různé fenotypy astmatu

Zjistili jsme zvýšené koncentrace 4-hydroxy-*trans*-nonealu (HNE) a 4-hydroxy-*trans*-hexanal (HHE) v kondenzátu vydechovaného vzduchu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem bez eozinofilie periferní krve. Tento závěr může svědčit pro zvýšenou lipoperoxidaci nenasycených mastných kyselin u non-eozinofilního astmatu. Tyto závěry naší práce mají limitace především v celkovém počtem vyšetřených osob a získané poznatky je třeba ověřit na větším souboru vyšetřených subjektů.

Nenasycené mastné kyseliny mají v organismu mnoho důležitých rolí. Jsou součástí buněčných membrán, regulují genovou expresi a podílí se na mezibuněčné komunikaci. Mohou být i zdrojem energie. Nenasycené mastné kyseliny jsou esenciální komponentou buněčných membrán, kde zajišťují jejich fluiditu, flexibilitu a selektivní permeabilitu. Lipidy, které obsahují nenasycené mastné kyseliny (PUFA) jsou náchylné k oxidaci volnými kyslíkovými radikály. Poškození oxidativním stresem vede k přímým strukturálním změnám buněčné membrány, ale také k sekundární tvorbě další pro-oxidativních látek.

Samotná lipoperoxidace je třístupňový proces, který se skládá z iniciace, propagace a terminace. Při iniciaci dochází k reakci hydroxylového zbytku s PUFA za vzniku lipidového radikálu, ten záhy reaguje s kyslíkem a vzniká peroxy-lipidový radikál a následně příjmem atomu H ze sousední PUFA vzniká lipidový hydroperoxid a druhý lipidový radikál. Peroxylové radikály akcelerují lipidovou peroxidací přijímáním atomů H ze sousedních PUFA. Lipidové hydroperoxy se dále rozpadají na hydroxy-alkany HNE a HHE [98].

HNE vzniká lipoperoxidací ω -6 nenasycených mastných kyselin (kyselina linoleová, kyselina arachidonová). Lipoperoxidací ω -3 mastných kyselin (kyselina α -linolenová, docosahexa-enová) vzniká HHE. HNE i HHE jsou relativně stabilní látky. Mohou v organismu difundovat mimo buňku do mezibuněčného prostoru a způsobit poškození proteinů, DNA i fosfolipidů a působit cytotoxicky i ve vzdálených místech od místa svého vzniku. Reagují lysinem, cysteinem a histidinem s následnou změnou funkce proteinů obsahujících tyto aminokyseliny. Proteiny poškozené HNE byly nalezeny v intimě cév poškozených aterosklerózou. HNE je potentní alkylační látka, která reaguje s řadou nukleofilních míst v DNA. Prekurzor HNE lipidový

hydroperoxid je přímým aktivátorem aktivátoru proteinu-1 (AP-1), který se podílí na expresi mnoha pro-zánětlivých cytokinů [119].

HNE a HHE poškozují mezibuněčnou komunikaci v gap-junctions, stimuluje fosfolipázu C. Existují důkazy o stimulaci migraci neutrofilů do místa oxidativního stresu [119]. I v nízkých koncentracích HNE i HHE mohou ovlivnit a regulovat řadu buněčných funkcí, např.: stimuluje buněčnou proliferaci. HNE a HHE modulují expresi řady genů např. prokolagenu typ I, aldoláz-reduktázy, transforming-growth factor β -1. Intracelulární akumulace HNE vede k buněčné apoptóze.

K peroxidaci lipidů dochází zejména v membránových fosfolipidech, které jsou důležitou složkou buněčných membrán. Oxidativním stresem změněné fosfolipidy mění permeabilitu a fluiditu buněčné membrány. Dochází k alteraci transportu iontů a k inhibici metabolických procesů buňky a dysfunkci membránových proteinů, inaktivaci enzymů a toxickému účinku na mechanismy dělení buňky. Velmi zranitelným orgánem při oxidativním stresu je centrální nervový systém, kde je vysoká spotřeba kyslíku i bohatý obsah PUFA v buněčných membránách. HNE je považován za jednu z hlavních signálních molekul u neurodegenerativních onemocnění.

Zjištěné zvýšené hodnoty HNE a HHE u non-eozinofilního astmatu vznikají následkem lipoperoxidace fosfolipidů buněčných membrán. Tyto produkty samotné i jejich metabolity jsou významnými aktivátory prozánětlivých a cytotoxických procesů. Na základě literárních údajů můžeme předpokládat jejich vliv na chemoatrakci neutrofilů do bronchiálního stromu a stimulaci aktivátoru transkripce typických pro patogenezi bronchiálního astmatu (AP-1, NF- κ B). Vliv HNE a HHE na stimulaci proliferace hladké svaloviny cév byl prokázán na animálním modelu. Je možné, že se tyto látky mohou spolupodílet i na vzniku hyperplazie bronchiální svaloviny.

Intracelulární antioxidační systém odbourává 4-hydroxy-trans-nonenal (HNE) konjugací s glutathion-S-transferázou za tvorby konjugátů s HNE (glutathionyl-4-hydroxy-nonenal). Tím dochází ke značné konzumaci anti-oxidázové buněčné kapacity a pokračující antioxidační stres může výrazněji poškozovat buněčné struktury. Navíc jsou HNE i konjugáty HNE s glutathionem snadno dostupnými substráty pro enzym aldoso-reduktázu, který asi 50% konjugátů glutathion-HNE mění na toxický glutathion-lipid-ester (glutathionyl-1,4-dihydroxynonen (GS-DHN)). Tato látka stimuluje aktivátory transkripce NF- κ B a AP-1 s následnou transkripcí mnoha prozánětlivých a cytotoxických látek. GS-DHN také stimuluje proliferaci buněk hladké svaloviny cévní stěny [120].

Farmakologický výzkum proto vyvíjí inhibitory aldoso-reduktáz s cílem zablokovat tvorbu glutathion-lipid-alkoholů a následné prozánětlivé reakce. Animální studie na myším modelu astmatu se sorbinilem (aldoso-reduktáza) prokázala u astmatických myší oproti kontrolní skupině výrazně nižší podíl eozinofilů v BALu. Také peribronchiální a perivaskulární akumulace

eozinofilů byla u aldoso-reduktázou ošetřených myší výrazně nižší oproti kontrolní skupině. Podání aldoso-reduktázy také snížilo bronchiální hyperreaktivitu. Humánní studie dosud publikovány nebyly [121].

BUDOUCNOST VYŠETŘOVÁNÍ VYDECHOVANÉHO VZDUCHU

Odběr kondenzátu vydechaného vzduchu je neinvazivní, snadno proveditelné vyšetření, které může v budoucnu přispět v diagnostice a léčbě respirační chorob i dalších onemocnění [94]. Od prvních praxí s použitím KVV v diagnostice a léčbě respiračních onemocnění uplynulo více než 20 let. Počáteční zkušenosti s aplikací této metody byly velmi slibné, přesto nebylo dosud dosaženo použití analýzy kondenzátu vydechaného vzduchu v klinické praxi z více důvodů.

Dosud nebylo dosaženo standardizace odběrové techniky ani laboratorních analytických metod. Výsledky naměřené v různých laboratořích je možné srovnat jen velmi obtížně. Analýzy látek v KVV jsou v nanogramových i menších množstvích, mediátory v tekutině na povrchu epitelu dýchacích cest jsou výrazně naředěny vodními parami vydechaného vzduchu. Proto jsou nároky na kvalitní detekční metodu vysoké. Dosud nebyl určen jednotný standard měření diluce KVV, ačkoliv je možné měřit koncentrace iontů nebo ury. Některé diagnostické metody jsou na dolní hranici svých možností, kde klesá jejich přesnost a spolehlivost. Výsledkem je výrazná variabilita naměřených hodnot u zdravých i nemocných [92]. Dobré reproducibility je možné dosáhnout u měření např. pH, 8-isoprostranu a leukotrienu B₄.

Většina publikovaných prací popisuje zkušenosti na velmi malých souborech pacientů i zdravých osob v řádu několika desítek subjektů, rozsáhlejší prospektivní klinické studie s použitím KVV dosud chybí. KVV postrádá výhodu okamžité dostupnosti výsledku s výjimkou stanovení pH. Klinická hodnota tohoto parametru však dosud není zcela jasná. Měření koncentrací látek v kondenzátu vydechaného vzduchu je nadále nutné považovat pouze za výzkumnou metodu, která zatím díky chybějící standardizaci zatím nenašla uplatnění v běžné klinické praxi.

I přes tato úskalí pokračují snahy o rozvoj standardizace odběrové techniky a analytických metod. Naše práce se snaží přispět k poznání přínosu KVV pro klinickou medicínu použitím této metody u pacientů s těžkým refrakterním astmatem, kde je intenzita zánětu dýchacích cest největší.

Budoucnost analýzy vydechaného vzduchu je závislá na technologickém pokroku. Několik týmů pracuje na sestavení analytické metody, která by umožnila okamžitou analýzu koncentrace látky ve vydechaném vzduchu, například s využitím on-line laserové direktní hmotnostní spektrometrické metody.

Ve vývoji jsou přístroje schopné detekce desítek látek ve vydechaném vzduchu s následným sestavením profilu vydechaných molekul, tzv. „breathomika“. Tyto analyzáto

využívají nukleární magnetickou spektroskopii schopné detekce všech metabolitů obsahujících atom vodíku. Tato technologie nevyžaduje úpravu vzorků vydechovaného vzduchu a je rychlá. Získané informace o koncentracích desítek až stovek příbuzných látek jsou analyzovány statistickou metodou (principal component analysis) k odhalení specifických skupin mediátorů pro konkrétní onemocnění. Nadějná může být technologie použití geneticky upravené buněčné linie ledvin se specifickými čichovými receptory, jejichž stimulace vyvolá detekovatelný elektrický impuls [91, 92].

6. ZÁVĚRY

V naší práci jsme potvrdili potenciální přínos použití neinvazivní metody analýzy kondenzátu vydechaného vzduchu v detekci non-eozinofilního astmatu pomocí stanovení koncentrace 4-hydroxy-trans-nonenalu a 4-hydroxy-trans-hexanalů. Zvýšení těchto markerů u pacientů s non-eozinofilním těžkým refrakterním astmatem svědčí pro nadměrnou lipoperoxidaci nenasycených mastných kyselin.

Doktorand byl v této práci ošetřujícím lékařem všech pacientů, prováděl jejich průběžné vyšetřování s cílem určit klinický a zánětlivý fenotyp léčby, stanovil hypotézy a interpretoval závěry provedených vyšetření. Naše práce je původní zejména výběrem cílové skupiny nejtěžších pacientů s astmatem, výběrem spektra markerů oxidativního stresu v kondenzátu vydechaného vzduchu a použitím senzitivní analytické metody.

Závěry naší práce jsou následující:

- 1. Potvrdili jsme i na menším souboru pacientů s těžkým refrakterním astmatem význam sledování koncentrace vydechaného oxidu dusnatého (FeNO). Jde o užitečný ukazatel, který při hodnotě > 30 ppb identifikuje pacienty s perzistujícím eozinofilním zánětem i přes podávanou protizánětlivou terapii. Tito nemocní měli v naší práci nejtěžší bronchiální obstrukci, plicní hyperinflaci a častější exacerbace astmatu.**
- 2. Prokázali jsme, že eozinofilie periferní krve může být důležitým markerem nedostatečně kontrolovaného systémového eozinofilního zánětu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem. Hodnota eozinofilie periferní krve >4% dokázala odhalit pacienty s vyšším výskytem exacerbací astmatu, vyšší hyperinflaci a výraznějším eozinofilním zánětem měřeným metodou FeNO. Eozinofilie periferní krve korelovala s eozinofilii v bronchoalveolární laváži a s hodnotou FeNO.**
- 3. Vzájemně se výsledky měření FeNO a eozinofilie periferní krve doplňují a mohou přinést lékaři důležitou informaci o nedostatečné kontrole eozinofilního zánětu u refrakterního těžkého astmatu. Tito nemocní mají benefit z navýšení protizánětlivé léčby buď o systémové kortikoidy nebo o biologickou anti-eozinofilní léčbu. Je třeba u pacientů se zvýšením obou parametrů také ověřit spolupráci pacienta s léčbou a dodržování režimových opatření, zejména vyvarování se kontaktu s relevantními alergeny.**

4. Naše výsledky prokázaly schopnost analýzy oxidačních a nitračních produktů v kondenzátu vydechaného vzduchu metodou LC/GS-MS odlišit astma od zdravých v kontrolní skupině. Zjistili jsme v kondenzátu vydechaného vzduchu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem statisticky signifikantně výrazně vyšší koncentrace produktů oxidačního a nitračního poškození lipidů, proteinů a nukleových kyselin.
5. Eozinofilie periferní krve u těžkého refrakterního astmatu byla spojena s nízkou koncentrací 4-hydroxy-*trans*-nonenalu a 4-hydroxy-*trans*-hexanal. Tento výsledek nebyl ovlivněn systémovou kortikoterapií. Non-eozinofilní těžké refrakterní astma může být spojeno s nadměrnou lipoperoxidací ω -3 a ω -6 mastných kyselin buněčných membrán.
6. Běžně užívané parametry sledování astmatu (FEV₁, astma kontrol test) a sledování intenzity eozinofilního zánětu bronchů (FeNO) neovlivňovaly koncentrace markerů oxidačního a nitračního stresu v kondenzátu vydechaného vzduchu.
7. Věk vzniku astmatu je v klinických fenotypových modelech považován za velmi důležitý faktor určující klinický průběh astmatu. Tento faktor neovlivňoval parametry oxidačního ani nitračního stresu v kondenzátu vydechaného vzduchu u těžkého refrakterního astmatu.
8. Z klinických faktorů jsme nezjistili vztah aspirin-senzitivního astmatu ke koncentracím cysteinylových leukotrienů v kondenzátu vydechaného vzduchu. Přítomnost atopie negativně korelovala s leukotriem B₄, který je typický marker neutrofilního zánětu. Jiné asociace leukotrienu B₄ s atributy non-eozinofilního zánětu však nalezeny nebyly.
9. Koncentrace měřených markerů oxidativního a nitračního stresu v kondenzátu vydechaného vzduchu vykazovaly výraznou inter-individuální variabilitu, která byla nižší v kontrolní skupině a u eozinofilního astmatu.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention, G.I.N.A.* [online]. c 2013, poslední revize 13.2.2013 [cit. 2013-04-24]. Dostupné z: <http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2012Feb13>.
2. 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. 90 s. ISBN 978-80-86396-67-5.
3. BATEMAN, E.D., CLARK, T.J., FRITH, L. et al. Rate of response of individual asthma control measures varies and may overestimate asthma control: an analysis of the GOAL study. *J Asthma*, 2007, vol. 44, p. 667-673.
4. SEDLÁK, V., KOBLÍŽEK, V. Určování fenotypu astmatu ve výzkumu a klinické praxi. *Medicína pro promoci*, 2009, speciální vydání, s. 1-12, ISSN 1212-9445.
5. CHUNG, K.F., GIBBON, D., DURHAM, A., et al. Corticosteroids: use and insensitivity in severe asthma. *Eur Respir Mon*, 2011, vol. 51, p. 236-252.
6. ANDERSON, G.P. Endotyping asthma: new insight into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *Lancet*, 2008, vol. 372, p. 1107-1119.
7. MORJARIA, J.B., PROITI, M., POLOSA, R. Stratified medicine in selecting biologics for the treatment of severe asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2011, vol. 11, p. 58-63.
8. HALDAR, P., BRIGHTLING, C.E., HARDAGON, B. et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med*, 2009, vol. 360, p. 973-984.
9. HUMBERT, M., BEASLEY, R., AYRES, J., et al. Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE. *Allergy*, 2005, vol. 60, no.3, p. 309-316.
10. SIMPSON, J.L., POWELL, H., BOYLE, M.J., et al. Clarithromycin targets neutrophilic inflammation in refractory asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, vol. 2008, p. 148-155.
11. SEDLÁK, V., KOBLÍŽEK, V. Budoucí léčba astma bronchiale. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2010, roč. 24, č. 2, s. 71-74.
12. CHUNG, K.F., GODARD, P., ADELROTH, E., et al. Difficult/therapy-resistant asthma: the need for an integrated approach to define clinical phenotypes, evaluate risk factors, understand pathophysiology and find novel therapies. ERS Task Force on Difficult/Therapy-Resistant Asthma. European Respiratory Society. *Eur Respir J*, 1999, vol. 13, p. 478-483.
13. Proceedings of the ATS Workshop on Refractory Asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, vol. 162, p. 2341-2351.
14. SEDLÁK, V., CHLUMSKÝ, J., TEŘL, M., et al. Doporučený postup pro diagnostiku a léčbu obtížně léčitelného astmatu v České republice. *Studia pneumologica et phthiseologica*, 2011, roč. 71, č. 2, s. 65-75.
15. BOUSQUET, J., MANTZOURANIS, E., CRUZ, A.A., et al. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, vol. 126, p. 926-938.
16. TING, A., MURRAY, C.S. Treatment-resistant asthma: options and decision making. *Pediatric Health*, 2010, vol. 4, no.4, p. 433-446.
17. BACHERT, C., ZHANG, N. The upper airways in severe asthma. *Eur Respir Mon*, 2011, vol. 51, p. 189-190.
18. PARSONS, J.P., MASTRONARDE, J.G. Gastroesophageal reflux disease and asthma. *Curr Opin Pulm Med*, 2010, vol. 16, p. 60-63.
19. MASTRONARDE, J.G., ANTHONISEN, N.R., CASTRO, M., et al. Efficacy of esomeprazole for treatment of poorly controlled asthma. *N Engl J Med*, 2009, vol. 360, p. 1487-1499.

20. FOSTER, J.M., LAVOIE, K.L., BOULET, L.P. Treatment adherence and psychosocial factors in severe asthma. *Eur Respir Mon*, 2011, vol. 51, p. 28-49.
21. CHANEZ, P., WENZEL, S.E., ANDERSON, G.P. Severe asthma in adults: what are the important questions. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, vol. 119, no.6, p. 973-984.
22. LOW, K., LAU, K.K., HOLMES, P., et al. Abnormal vocal cord function in difficult-to-treat asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, vol. 184, p. 50-56.
23. MENZIES-GOW, A., GIBEON, D., HUI, C., et al. Management of difficult-to-treat severe asthma. *Eur Respir Mon*, 2011, vol. 51, p. 282-296.
24. HASTIE, A.T., MOORE, W.C., MEYERS, D.A., ET AL. National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program Analyses of asthma severity phenotypes and inflammatory proteins in subjects stratified by sputum granulocytes. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, vol. 125, p. 1028-1036.
25. BEL, E.H., SOUSA, A., FLEMMING, L., et al. on behalf of the members of the Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcome (U-BIOPRED) Consortium, Consensus Generation. Diagnosis and definition of severe refractory asthma: an international consensus statement from the Innovative Medicine Initiative (IMI). *Thorax*, 2011, vol. 66, p. 910-917.
26. MOORE, W.C., BLEECKER, E.R., CURRAN-EVERETT, D., ET AL. Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institutes Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, vol. 119, p. 405-413.
27. The ENFUMOSA cross-sectional European multicentre study of the clinical phenotype of chronic severe asthma. European Network for Understanding Mechanisms of Severe Asthma. *Eur Respir J*, 2003, vol. 22, p. 470-477.
28. BEL, E.H. Clinical phenotypes of asthma. *Curr Opin Pulm Med*, 2004, vol. 10, p. 44-50.
29. WENZEL, S. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet*, 2006, vol. 368, p. 804-813.
30. GIBSON, P.G., SIMPSON, J.L., SALTOS, N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma: evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 2001, vol. 119, p. 1329-1339.
31. BERRY, M., MORGAN, A., SHAW, D., et al. Pathological features and inhaled corticosteroid response of eosinophilic and non-eosinophilic asthma. *Thorax*, 2007, vol. 62, p. 1043-1049.
32. SILKOFF, P.E., LENT, A.M, BUSACKER, A.A., et al. Exhaled nitric oxide identifies the persistent eosinophilic phenotype in severe refractory asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, vol. 116, p. 1249-1255.
33. GREEN, R.H., BRIGHTLING, C.E., MCKENNA, S., et al. Asthma exacerbations and sputum eosinophil count: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002, vol. 360, p. 1715-1721.
34. BRUSSELE, G.B., VANDERSTICHELE, CH., JORDENS, P., et al. Azithromycin for prevention of exacerbations in severe asthma (AZISAST) a multicentre randomised double-blind placebo-controlled trial. *Thorax*, 2013, vol. 68, p. 322-329.
35. HALDAR, P., PAVORD, I.D., SHAW, D. Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, vol. 178, p. 218-224.
36. SIDELEVA, O., SURATT, B.T., BLACK, S.E. Obesity and asthma. An inflammatory disease of adipose tissue not the airway. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, vol. 186, no.7, p. 598-605.
37. SHORE, S. Obesity and Asthma: implications for treatment. *Curr Opin Pulm Med*, 2007, vol. 13, no. 1, p. 56-62.
38. LEUNG, D.M.Y., HAMID, Q., VOTTERO, A., et al. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor β . *J Exp Medicine*, 1997, vol. 186, no.9, p. 1567-1574.
39. BARNES, P.J. Severe asthma: Advances in current management and future therapy. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, vol. 129, p. 48-59.
40. BOULET, L.P.B. Irreversible Airway Obstruction in Asthma. *Curr Allergy Asthma Reports*, 2009, vol. 9, p. 168-173.

41. BEL, E.H., TEN BRINKE, A., SORKNESS, R.L. Fixed airway obstruction in severe asthma. *Eur Respir Mon*, 2011, vol. 51, p. 147-159.
42. DWEIK, R.A., SORKNESS, R.L., WENZEL, S., et al. Use of exhaled nitric oxide measurements to identify a reactive, at-risk phenotype among patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, vol. 181, p. 1033-1041.
43. LEE, J.H., HASELKORN, T., BORISH, L., et al. Risk factors associated with persistent airflow limitation in severe or difficult-to-treat asthma: insights from the TENOR study. *Chest*, 2007, vol. 132, p. 1882-1889.
44. TEN BRINKE, A., ZWINDERMAN, A.H., STERK, P.J., et al. Factors associated with persistent airflow limitation in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, vol. 164, p. 744-748.
45. CASTRO, M., RUBIN, A.S., LAVIOLETTE, M., et al. Effectiveness and safety of bronchial thermoplasty in the treatment of severe asthma: a multicenter, randomized, double-blind, sham-controlled clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, vol. 181, p. 116-124.
46. SZCZEKLIK, A., PICADO, C. Aspirin-induced asthma. *Eur Respir Mon*, 2003, vol. 23, p. 239-248.
47. ITO, K., CHARRON, C.E., ADCOCK, I.M. Impact of protein acetylation in inflammatory lung diseases. *Pharm Thera*, 2007, vol. 116, p. 249-265.
48. ROBINSON, D.S., CAMPBELL, D.A., BARNES, P.J. Addition of an anti-leukotriene to therapy in chronic severe asthma in a clinic setting: a double-blind, randomised, placebo-controlled study. *Lancet*, 2001, vol. 357, p. 2007-2011.
49. SEDLÁK, V., KRÁL, B., SALAJKA, F. Alternativní léčba obtížně léčitelného astmatu. *Farmakoterapie*, 2006, č. 1, s. 61-67.
50. KAŠÁK, V. *Asthma bronchiale*, 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2005. 148 s. ISBN 80-7345-062-3.
51. JEFFERY, P.K., WARDLAW, A.J., NELSON, F.C., et al. Bronchial biopsies in asthma. An ultrastructural, quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis*, 1989, vol. 140, p. 1745-1753.
52. ALBERT, R.K., SPIRO, S.G., JETT, J.R. *Clinical Respiratory Medicine*, 3rd edition, Philadelphia, USA: Mosby Elsevier, 2008, 1010 pages, ISBN 978-0-323-04825-5.
53. TEŘL, M., RYBNÍČEK, O. *Asthma bronchiale v příčinách a klinických obrazech*, 2. vyd. Cheb: GEUM, 2008. 311 s. ISBN 978-80-86256-59-7.
54. SAHINER, M.U., BIRBEN, E., ERZURUM, S., et al. Oxidative stress in asthma. *World Allergy Organization Journal*, 2011, vol. 4, p. 151-158.
55. COMHAIR, S.A.A., ERZURUM, S.C. Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal*, 2010, vol. 12, p. 93-124.
56. SCHAUB, B., LAUENER, R., MUTIUS, E. The many faces of the hygiene hypothesis. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, vol. 117, p. 969-977.
57. BRADDING, P. Mast cell regulation of airway smooth muscle function in asthma. *Eur Respir J*, 2007, vol. 29, p. 827-830.
58. WENZEL, S.E., SCHWARTZ, L.B., LANGMACK, E.L., et al. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, vol. 160, p. 1001-1008.
59. MAUAD, T., POON, A.H., HAMID, Q. Pathology, inflammation and cytokines of severe asthma. *Eur Respir Mon*, 2011, vol. 51, p. 97-106.
60. ČÁP, P., BREZINA, M. *Neinvazivní vyšetřování zánětu u astmatu*, 1. vyd. Praha: Mladá Fronta, 2009. 149 s. ISBN 978-80-204-2092-3.
61. AN, S.S., BAI, T.R., BATES, J.L., et al. Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma. *Eur Respir J*, 2007, vol. 29, p. 834-860.
62. UPHAM, J.W., STICK, S.M. Interactions between airway epithelial cells and dendritic cells: implications for the regulation of airway inflammation. *Curr Drug Targets*, 2006, vol. 7, p. 541-545.
63. BUSSE, W.W. The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation: airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest*, 2010, vol. 138, p. 4S-10S.

64. KUPCZYK, M., LUNDSTROM, S., DAHLÉN, B, et al. Lipid mediators in severe asthma. *Eur Respir Mon*, 2011, vol. 51, p. 218-235.
65. MOORE, C.W., MEYERS, D.A., WENZEL, S.E., et al. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, vol. 181, p. 315-323.
66. CHUNG, K.F., BEL, E.H., WENZEL, S.E. Severe asthma: the way forward. *Eur Respir Mon*, 2011, vol. 51, p. 297-308.
67. PEPE, C., FOLEY, S., SHANNON, J., et al. Differences in airway remodelling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, vol. 116, no.3, p. 544-549.
68. GOOD, T.J.J., KOLAKOWSKI, CH.A., GROSHONG, S.D., et al. Refractory Asthma: Importance of bronchoscopy to identify phenotypes and direct therapy. *Chest*, 2012, vol. 141, p. 599-606.
69. JEFFREY, P., HOLGATE, S., WENZEL, S. Methods for assesment of endobronchial biopsies in clinical research: application to studies of pathogenesis and the effects of treatment. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, vol. 168, p. S1-S17.
70. BARRIOS, R., KHERANDMAND, F., LAKEISHA, B., et al. Asthma patology. *Arch Pathol Lab Med* 2006, vol. 130, p. 447-451
71. JEFFREY, P., TURRATO, G., SAETTA, M. Pathology of asthma. *Eur Respir Mon*, 2003, vol. 23, p. 114-125.
72. HOSHINO, M., TAKAHASHI, M, AOIKE, N., et al. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, vol. 107, p. 295-301.
73. RIEDL, M.A., NEL, A.E. Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2008, vol. 8, p. 49-56.
74. CHAN, R., WANG, M., LI, N., et al. Pro-oxidative diesel exhaust particle chemicals inhibit LPS-induced dendritic cells responses involved in T-helper differentiation. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, vol. 118, p. 455-465.
75. DIAZ-SANCHEZ, D., GARCIA, M.P., WANG, M., et al. Nasal challenge with diesel exhaust aprticles can induce senzitization to neoallergen in the human mucosa. *J Allergy Clin Immunol*, 1999, vol. 104, p. 1183-1188.
76. BARTOLI, M.L., NOVELLI, F., COSTA, F., et. al. Malondialdehyde in exhaled breath condensate as a marker of oxidative stress in different pulmonary diseases. *Mediators Inflamm*, 2011, p. 1-7, DOI: 10.1155/2011/891752.
77. ERCAN, H., BIRBEN, E., DIZDAR, E.A., et al. Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, vol. 118, p. 1097-1104.
78. AUERBACH, A., HERNANDEZ, M.L. The effect of environmental oxidative stress on airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2012, vol. 12, p. 133-139.
79. MONTUSCHI, P. Exhaled breath condensate: 8-isoprostane and eicosanoids. *Eur Respir Mon*, 2010, vol. 49, p. 196-206.
80. SACKESSEN, C., ECAN, H., DIZDAR, E., et al. A comprehensive evaluation of the enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, vol. 122, no. 1, p. 78-85.
81. GARANTZOITIS, S., LI, Z., POTT, S.N., et al. TLR4 is necessary for hyaluronan-mediated airway hyperresponsiveness after ozone inhalation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, vol. 181, p. 666-675.
82. PIN, I., GIBSON, P.G., KOLENDOWICZ, R., et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax*, 1992, vol. 47, p. 25-29.
83. PAVORD, I.D., PIZZICHINI, M.M, PIZZICHINI, E., et.al. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. *Thorax*, 1997, vol. 52, p. 498-501.
84. ALVING, K., WEITZBERG, E., LUNDBEG, J.M. Incerased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J*, 1993, vol. 6, p. 1368-1370.

85. PETSKY, H.L., CATES, C.J., LASSERSON, A.M., et al. Tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils). *Thorax*, 2012, vol. 67, no.3, p. 199-208.
86. RICCIARDOLO, F.L. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*, 2003, vol. 58, p. 175-182.
87. DWEIK, R.A., BOGGS, P.B., SERPIL, C.E., et. al. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FENO) for Clinical Applications. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, vol. 184, p. 602-615.
88. 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, p. 912-930.
89. ALVING, K., MALINOVSKI, A. Basic aspects in exhaled nitric oxide. *Eur Respir Mon*, 2010, vol. 49, p. 1-31.
90. CHUNG, K.F. Inflammatory biomarkers in severe asthma. *Curr Opin Pulm Med*, 2012, vol. 18, p. 35-41.
91. HORVÁTH, I., HUNT, J., BARNES, P.J., et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J*, 2005, vol. 26, no.3, p. 523-548.
92. DOMPELING, E., ROSIAS, P.P.R., JOBSIS, Q. Exhaled breath condensate sample collection: standards and open issues. *Eur Respir Mon*, 2010, vol. 49, p. 152-161.
93. MURUGAN, A., PICARD-PRYS, C., CALHOUN, J.W. Biomarkers in asthma. *Curr Opin Pulm Med*, 2009, vol. 15, p. 12-18.
94. MARCONDES-BRAGA, F.G., GUTZ, I.G.R., BATISTA, G.L., ET AL. Exhaled Acetone as a New Biomarker of Heart Failure Severity. *Chest*, 2012, vol. 142, no.2, p. 457-466.
95. CARPENTER, C.T., PRICE, P.V., CHRISTMAN, B.W. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS. *Chest*, 1998, vol. 1998, no.114, p. 1653-1659.
96. SYSLOVÁ, K., KACER, P., KUZMA, M., et al. Determination of 8-isoprostaglandin F2 α in exhaled breath condensate using combination of immunoseparation and LC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B*, 2008, vol. 867, p. 8-14.
97. ROMIEU, I. Exhaled breath malondialdehyde as a marker of effect of exposure to air pollution in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, vol. 121, no.4, p. 903-906.
98. CATALA, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2009, vol. 157, p. 1-11.
99. GREULICH, T., HALDAR, P., AGBETILE, J., et al. FeNO and blood eosinophil count as a surrogate markers of eosinophilic airway inflammation in patients with severe asthma. *Eur Respir J*, 2012, vol. 36, p. 1005s.
100. PAVORD, I.D., KORN, S., HOWARTH, P., et al. Mepolizumab for severe eosinophilic asthma (DREAM): a multicentre, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2012, vol. 380, p. 651-659.
101. SZEFLER, J.S., WENZEL, S.E., BROWN, R., et al. Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, vol. 129, no.(3 Suppl), p. S9-23.
102. MOORE, C.W., EVANS, D.E., BLEECKER, E.R., et al. Safety of investigative bronchoscopy in the Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol*, 2011, vol. 128, p. 328-336.
103. MCGRATH, K.W., ICITOVIC, N., BOUSHEY, H.A., et al. A large subgroup of mild-to-moderate asthma is persistently noneosinophilic. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, vol. 185, no. 6, p. 612-619.
104. WENZEL, S.S., L.B., LANGMACK, E.L., et al. Evidence that severe asthma can be divided into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, vol. 160, no.3, p. 1001-1008.
105. Test kontroly astmatu. c 2012, poslední revize 20.4.2012 [cit. 2013-04-24]. Dostupné z: <<http://www.astmatest.cz/test.php>>.

106. CORRADI, M., FOLESANI, G., ANDREOLI, R, et al. Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, vol. 167, p. 395-399.
107. DONNELLY, I.E. Exhaled breath condensate: nitric oxide related compounds. *Eur Respir Mon*, 2010, vol. 49, p. 207-216.
108. MONTESEIRÍN, J. Neutrophils and Asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2009, vol. 19, no.5, p. 340-354.
109. JIA, G., ERICKSON, R.W., CHOY, D.F., et al. Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*, 2012, vol. 130, no.3, p. 647-654.
110. GIBSON, P.G., WANG, F., HE, X.Y., et al. Noninvasive assessment of inflammation in severe asthma. *Eur Respir Mon*, 2011, vol. 51, p. 208-217.
111. SCHLEICH, F.N., SEIDEL, L., SELE, J., et al. Exhaled nitric oxide threshold associated with a sputum eosinophil count $\geq 3\%$ in a cohort of unselected patients with asthma. *Thorax*, 2010, vol. 65, p. 1039-1044.
112. VAN VEEN, I.H., TEN BRINKE, A., STERK, P.J., et al. Exhaled nitric oxide predicts lung function decline in difficult-to-treat asthma. *Eur Respir J*, 2008, vol. 32, p. 344-349.
113. SIMPSON, J.L., SCOTT, R., BOYLE, M.J., et al. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology*, 2006, vol. 11, p. 54-61.
114. HARKINS, M.S., FIATO, K.L., IWAMOTO, G.K. Exhaled nitric oxide predicts asthma exacerbation. *Journal of Asthma*, 2004, vol. 41, no.4, p. 471-476.
115. COLUMBO, M., WONG, B., PANETTIERI, R.A., et al. Asthma in the elderly: The role of exhaled nitric oxide measurements. *Respir Med*, 2013, vol., p.
116. REDDEL, H.K., TALYOR, R.D., BATEMAN, E.D., et al. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardising endpoints for clinical asthma trials and clinical practice. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, vol. 180, p. 59-99.
117. WENZEL, S.E. Characteristics, definition and phenotypes of severe asthma. *Eur Respir Mon*, 2011, vol. 51, p. 50-58.
118. PERONI, D.G., et al. Markers of oxidative stress are increased in exhaled breath condensates of children with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, vol. 166, no.4, p. 839-43.
119. UCHIDA, K., SHIRASHI, M., NAITO, Y., et al. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. *J Biol Chem*, 1999, vol. 274, no.4, p. 2234-2242
120. RAMANA, K.V., BHATNAGAR, A., SRISTAVA, S., et al. Mitogenic responses of vascular smooth muscle cells to lipid peroxidation-derived aldehyde 4-hydroxy-trans-2-nonenal. *J Biol Chem*, 2006, vol. 281, no.26, p. 17562-17660.
121. SRISTAVA, S.K., YADAV, U.C.S., REDDY, A.B.M., et al. Aldose reductase inhibition suppresses oxidative stress-induced inflammatory disorder. *Chem Biol Interact*, 2011, vol. 191, no.1-3, p. 330-33.