

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



**Sledování zánětu dýchacích cest u pacientů s různými formami
bronchiální obstrukce**

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

Vratislav Sedlák

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program vnitřní nemoci

Hradec Králové

2013

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu vnitřní nemoci na Katedře interních oborů Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Vratislav Sedlák
Plicní klinika Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: doc. MUDr. František Salajka, CSc.
Plicní klinika Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Oponenti: Prof. MUDr. Jana Skříčková, CSc.
Klinika tuberkulózy a respiračních nemocí
Masarykovy University v Brně a Fakultní nemocnice Brno

doc. MUDr. Petr Panzner, CSc.
Ústav imunologie a alergologie
Lékařské fakulty UK v Plzni a Fakultní nemocnice Plzeň

Obhajoba disertační práce se bude konat před komisí pro obhajoby doktorského studijního programu Vnitřní nemoci dne 23. 9. 2013 od 11 hodin v učebně č. 3.212 (3. podlaží), budova č. 23 (OKH), Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. MUDr. Jan Bureš, CSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu vnitřní nemoci

Obsah

1. Souhrn v českém jazyce.....	4
2. Summary in English	5
3. Seznam zkratk	6
4. Úvod do problematiky	6
5. Cíle práce	9
6. Soubor pacientů a metodika	10
7. Výsledky.....	12
7.1. Sledování vybraných klinických, funkčních a zánětlivých ukazatelů u TRA.....	13
7.2. Složení kondenzátu vydech. vzduchu u pacientů s TRA a u kontrolní skupiny.....	17
7.3. Rozdíly ve složení KVV u fenotypů TRA dle eozinofilie periferní krve.....	18
7.4. Rozdíly ve složení KVV u fenotypů TRA dle FeNO>30 ppb	19
7.5. Rozdíly ve složení KVV u fenotypů TRA dle dalších parametrů.....	19
8. Diskuse	19
9. Závěry	23
10. Použitá literatura.....	24
11. Přehled publikační činnosti autora.....	27
11.1. Monografie.....	27
11.2. Kapitoly v monografiích.....	27
11.3. Původní články	27
11.4. Přehledové články	28
11.5. Statě ve sbornících	29
11.6. Přednášky na odborných setkáních	29

1. Souhrn v českém jazyce

Úvod: Průduškové astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest s bronchiální hyperraktivitou, na jehož patogenezi se podílí mnoho buněčných populací a jejich působků. V patogenezi astmatu hraje důležitou roli oxidativní stres, který je důsledkem působením volných reaktivních radikálů kyslíku (ROS) a dusíku (NOS) vzniklých při zánětu dýchacích cest a expozicí environmentálním škodlivinám (ozón, kouř cigaret). Produkty oxidativního stresu vedou k poškození buněčných struktur na úrovni biomembrán, proteinů a nukleových kyselin. Tíže astmatu dle literárních zdrojů koreluje s intenzitou oxidativního stresu.

Cíl práce: Cílem práce bylo prokázat rozdíly v koncentracích ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechaného vzduchu (KVV) mezi pacienty s těžkým refrakterním astmatem (TRA) a zdravou kontrolní skupinou. Dále jsme sledovali vztah eozinofilie periferní krve (EC), koncentrace vydechaného oxidu dusnatého (FeNO) k intenzitě oxidativního stresu.

Metodika: U 40 pacientů s TRA byl proveden odběr KVV (Jaeger EcoScreen), který byl následně zpracován metodou kapalinové/plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Sledovali jsme koncentrace markerů oxidativního stresu na úrovni poškození lipidů: malondialdehyd (MDA), 4-hydroxy-trans-nonenal (HNE), 4-hydroxy-trans-hexenal (HHE), cysteinylových leukotrienů, 8-isoprostanu, dále markerů poškození proteinů: nitro-tyrosin, orto-tyrosin, chloro-tyrosin a markerů poškození nukleových kyselin: 5-hydroxymethyl uracil, 8-hydroxyguanosin a 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin. Výsledky byly porovnávány v kontextu s markery eozinofilního zánětu (koncentrace vydechaného oxidu dusnatého, eozinofilie periferní krve) a dalšími klinickými ukazateli. Za průkaz eozinofilního zánětu bylo považován $EC > 4\%$ a $FeNO \geq 30$ ppb. Kontrolní skupinu (KS) tvořilo 19 zdravých dobrovolníků.

Výsledky: Prokázali jsme statisticky výrazně vyšší hodnoty všech sledovaných markerů oxidativního stresu u TRA oproti KS (vše $p < 0.001$). U pacientů bez perzistující EC byla zjištěna vyšší koncentrace HNE oproti pacientům s $EC \leq 4\%$ (48.5 vs 41.1 ng/ml, $p = 0.034$) a vyšší koncentrace HHE oproti pacientům s $EC \leq 4\%$ (52.6 vs. 48.9 ng/ml, $p = 0.006$). ROC analýza HNE prokázala při hodnotě 31,97 ng/ml 94,7% senzitivitu a 95% specificitu pro rozpoznání těžkého refrakterního astmatu (AUC 0.9895, $p < 0.0001$). V ostatních sledovaných parametrech oxidačního stresu nebyly zaznamenány statisticky významné změny ve vztahu k EC. Koncentrace markerů v KVV neměly vztah k hodnotě FeNO ani k užívání systémové kortikoterapie, věku a BMI.

Závěr: Zjistili jsme významně vyšší koncentrace markerů oxidativního stresu u TRA oproti zdravým v KS. U non-eozinofilních TRA byla zjištěna vyšší koncentrace HNE a HHE v KVV než u eozinofilních TRA. HNE a HHE jsou markery lipoperoxidace ω -6 resp. ω -3 nenasycených mastných kyselin buněčných membrán a mohou hrát roli v patogenezi non-eozinofilního TRA. Ostatní měřené parametry oxidačního stresu v KVV neměly specifický vztah k žádné z metod zjištění typu zánětu (FeNO, EC%).

2. Summary in English

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.

Background: Asthma is chronic inflammatory disease associated with bronchial hyperreactivity. Various cells and cellular products are involved in asthma pathogenesis. Oxidative stress plays also a significant role in mechanisms of asthma via action of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (NOS) species. These free radicals develop from inflammatory airway reaction and from exogenous exposure of air-pollution (ozone, cigarette smoke). ROS and NOS and its products cause damage of bio-membranes, proteins and nucleic acid. Several studies showed correlation of asthma severity to intensity of oxidative stress.

Aim of the study: The main goal of the study was to describe differences in concentrations of various markers of oxidative stress in exhaled breath condensate of severe refractory asthma (SRA) patients and healthy controls (HC). Secondary aim was to show correlation of oxidative stress intensity to severity of eosinophilic inflammation described by peripheral blood eosinophilia or exhaled nitric oxide concentration.

Methodology: We harvested exhaled breath condensate in 40 SRA patients and 19 HC according to recommended technique (Jaeger EcoScreen). Samples were studied by liquid/gas chromatography and mass spectrometry. We studied markers of oxidative damage of lipids: malondialdehyd (MDA), 4-hydroxy-trans-nonenal (HNE), 4-hydroxy-trans-hexenal (HHE), cysteinyl leukotriens, 8-isoprostane and markers of protein damage: nitro-tyrosine, orto-tyrosine, chloro-tyrosine and markers of nucleic acid damage: 5-hydroxymethyl uracil, 8-hydroxyguanosin a 8-hydroxy-2'deoxyguanosin. All results were correlated to currently used methods eosinophilic inflammation assesement (eosinophils in peripheral differential blood count (EC), exhaled nitric oxide (FeNO). Eosinophilic inflammation was considered as EC>4% and FeNO≥30 ppb.

Results: We have shown statistically significantly higher concentrations of all tested oxidative stress markers in SRA vs. HC (all $p < 0.001$). Higher concentration of HNE was found in non-eosinophilic SRA (EC<4%) versus eosinophilic SRA (48.5 vs 41.1 ng/ml, $p = 0.034$) and similar results of HHE versus eosinophilic SRA (52.6 vs. 48.9 ng/ml, $p = 0.006$). ROC analysis of HNE showed limit of 31,97 ng/ml as 94,7% sensitivity a 95% specificity for differentiation of SRA vs HC (AUC 0.9895, $p < 0.0001$). Other tested markers of oxidative stress were correlated neither to EC, nor to FeNO and systemic steroid therapy, age, body-mass-index.

Conclusion: We have proved significantly higher concentrations of oxidative stress markers in SRA than in HC. Non-eosinophilic SRA was associated with higher concentration of HHE and HNE, which could indicate increased lipoperoxidation of ω -6 resp. ω -3 unsaturated fatty acids. Increased lipoperoxidation could play a role in pathogenesis of noneosinophilic asthma phenotype. Other tested markers of oxidative stress were correlated neither to EC, nor to FeNO.

3. Seznam zkratek

AEC	- absolutní počet eozinofilů periferní krve	NO	- oxid dusnatý
AKT	- astma kontrol test skóre	OLA	- obtížně léčitelné astma
BAL	- bronchoalveolární laváž	PUFA	- nenasycené mastné kyseliny
CysLT	- cysteinylové leukotrieny	SKS	- perorální systémová kortikoterapie
DNA	- deoxyribonukleová kyselina	PUFA	- nenasycené mastné kyseliny
EA	- eozinofilní fenotyp astmatu	ROS	- reaktivní kyslíkové radikály
EC%	- % eozinofilů v diferenciál. rozpočtu periferní krve	RNS	- reaktivní dusíkaté radikály
FeNO	- koncentrace NO ve vydech. vzduchu rychlostí 50ml/sec	RV	- reziduální objem plic
FEV1	- usilovná jednovteřinová výdechová rychlost	C6	- hexanal
GINA	- Global Initiative for Asthma	C7	- heptenal
HNE	- 4-hydroxy-trans-nonenal	C8	- octanal
HHE	- 4-hydroxy-trans-hexanal	C9	- nonenal
IKS	- inhalační kortikosteroidy	C10	- dekanal
IgE	- imunoglobulin E	C11	- undekanal
KS	- kortikosteroidy	C12	- dodekanal
KVV	- kondenzát vydechovaného vzduchu	8-iso	- 8-isoprotaglandinF2 α (8-isoprostan)
MDA	- malondialdehyd	5-HOMeU	- 5-hydroxymethyl-uracyl
MPO	- myeloperoxidáza	8-OHdG	- 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosin
NAC	- N-acetyl-cystein	8-OHG	- 8-hydroxyguanosin
NEA	- non-eozinofilní fenotyp	o-Tyr	- o-tyrosin
		NO-Tyr	- 3-nitro-tyrosine
		Cl-Tyr	- 3-chlor-tyrosin

4. Úvod do problematiky

Průduškové astma je chronické zánětlivé onemocnění bronchů, jehož incidence v rozvinutých zemích narůstá. Celosvětově v současnosti trpí astmatem asi 300 milionů lidí, v roce 2025 to však pravděpodobně bude již 400 milionů nemocných. V České republice je prevalence astmatu odhadována na 8%, z těchto nemocných trpí asi 9% těžkým nekontrolovaným astmatem. Zavedení nových účinných protizánětlivých a úlevových léků a propracovaná strategie péče o astma v rozvinutých zemích snížila mortalitu a morbiditu spojenou s astmatem. Tato práce se věnuje skupině nemocných trpících těžkým refrakterním astmatem (TRA) se specifickým průběhem nemoci a odpovědí na léčbu [1].

Astma je definováno jako chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, na němž se účastní mnoho buněčných populací a buněčných produktů. Chronický zánět je spojen s opakovanými stavy dušnosti, kašle a pískání při dýchání, které se objevují zejména v noci nebo 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. 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 [2].

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. Přibližně u 5% nemocných probíhá astma pod obrazem nemoci refrakterní k protizánětlivé a bronchodilatační léčbě. Pro tuto skupinu nemocných vytvořila Světová zdravotnická organizace (WHO) novou terminologii, kterou převzal i doporučený postup diagnostiky a léčby těžkých forem astmatu České pneumologické a ftizeologické společnosti (ČPFS) a České společnosti klinické imunologie a alergologie [3, 4]. Podle těchto dokumentů existují 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

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
<small>*Pro splnění definice těžkého refrakterního astmatu musí platit všechna tři hlavní kritéria a současně alespoň dvě vedlejší kritéria, ** Náraz = kúra tj. podávání systémových kortikosteroidů ≥ 3 dny</small>

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 (refluxní nemoc jícnu, rinosinusitida, syndrom dyskinezy hlasových vazů, psychosociální komorbidity) a dobrou spolupráci pacienta při léčbě. Nemocní s podezřením

na TRA by měli být vyšetřeni ve specializovaném centru pro léčbu těžkého astmatu [3]. V případě potvrzení této diagnózy je obecnou snahou lékaře dosažení tzv. *kompromisní kontroly nad astmatem*, kterou definuje i doporučení GINA [2]. 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 polypragmazií, minimalizovat nutnost lékařských intervencí, případné nežádoucí účinky léčby a najít nejnižší úroveň náročnosti léčby, která ještě přináší pacientovi prospěch [1]. Současně je důležité detailně poznat fenotyp astmatu a nabídnout nemocnému fenotypově specifickou léčbu (např. omalizumab, mepolizumab, makrolidy) [5-7]. Zásadní je posouzení přítomnosti eozinofilního fenotypu (perzistující eozinofilie v dýchacích cestách) či non-eozinofilního fenotypu astmatu.

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 polypragmazií [3].

Charakteristickým klinickým rysem astmatu je chronický zánět dýchacích cest s bronchiální hyperreaktivitou a reverzibilní bronchiální obstrukcí. Zánět bronchu u astmatu vede k epitelální deskvamaci, nadprodukcí hlenu a remodelaci dýchacích cest. V patogenezi astmatu hraje důležitou roli oxidativní stres. Oxidativní stres může být vyvolán exogenně expozicí environmentálním zdrojům reaktivních kyslíkových (ROS) a dusíkových (NOS) radikálů [8]. Endogenním zdrojem oxidativního stresu u astmatu jsou ROS a NOS vznikající v průběhu zánětu dýchacích cest.

Oxidativní stres může být vyvolán exogenně expozicí environmentálním zdrojům reaktivních kyslíkových (ROS) a dusíkových (NOS) radikálů [8]. Endogenním zdrojem oxidativního stresu u astmatu jsou ROS a NOS vznikající v průběhu zánětu dýchacích cest. V plicní tkáni je vlhký slizniční epitelální 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. Částečným zdrojem oxidativního stresu může být produkce volných kyslíkových radikálů při respiračním řetězci buňky v mitochondriích nebo při buněčné obraně proti vdechovaným mikroorganismům. Neutrofilů a eosinofilů migrují do sliznice bronchu a na oxidativním stresu u astmatu se podílí také svými enzymy myeloperoxidázou a eozinofilní peroxidázou tvorbou halogenidů.

Mnohem významnějším zdrojem je expozice vdechovaným škodlivinám z vnějšího prostředí (zplodiny spalin z dieslových motorů, ozón, cigaretový kouř) [9]. Excesivní produkce ROS koreluje se stupněm bronchiální hyperreaktivitu měřené bronchoprovokačním testem s metacholinem [10]. 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 alergenu. Tíže astmatu také koreluje s intenzitou oxidativního stresu, například koncentrace malondialdehydu, markeru lipoperoxidace buněčných membrán, byla vyšší u pacientů s těžším astmatem [11, 12]. Produkty oxidativního stresu vedou

k poškození buňky na úrovni biomembrány, nukleových kyselin a proteinů. Vazba volných radikálů mění vlastnosti a chování těchto struktur a jejich biologická role v organismu je poškozena [10].

V klinické praxi dosud nejsou používány standardizované metody sledování intenzity oxidativního stresu u astmatu. Intenzitu eozinofilního zánětu u astmatu lze měřit pomocí sledování koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého (NO), který má oxidační vlastnosti přímo nebo cestou svých dalších sloučenin (peroxynitrit). Koncentrace různých markerů oxidativního a nitračního stresu lze sledovat v kondenzátu vydechovaného vzduchu (KVV). Jde o neinvazivní metodu, při které je vydechovaný vzduch ochlazován a kondenzuje na stěně sběrné nádoby. Následná analýzy pomocí kapalinové/plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií dokáže stanovit piko- až nano-molární koncentrace látek, které jsou obsaženy ve směsi vydechovaného vzduchu a odráží tak informaci o složení tekutiny na povrchu epitelu dýchacích cest (ELF - epithelial lining fluid).

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. 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 [13, 14]. V KVV lze stanovit koncentrace markerů lipoperoxidace buněčných membrán, jako jsou 8-isoprostan-PGF α 2(8-iso), který byl nalezen ve zvýšených koncentracích u astmatu, CHOPN, cystické fibrózy. Zvýšené koncentrace cysteinylových leukotrienů v KVV byly nalezeny u u dětí při exacerbaci astmatu [15, 16]. Oxidační poškození lipidů lze sledovat v KVV stanovením koncentrací malondialdehydu (MDA), 4-hydroxy-trans-nonenalu (HNE), 4-hydroxy-trans-hexenal (HHE) [11]. HNE a HHE odpovídají poškození ω -6, resp. ω -3 nenasycených mastných kyselin fosfolipidových membrán a v organismu dále reagují s různými proteiny a poškozují jejich fyziologickou funkci v organismu [17]. Poškození proteinů lze v KVV detekovat stanovením koncentrací nitrace tyrosinových zbytků bílkovin, např. nitro-tyrosin (NO-Tyr), který byl prokázán u astmatu ve zvýšeném množství, bromo-tyrosin je specifický pro eozinofilní zánět [18]. Oxidační poškození nukleových kyselin lze stanovit v KVV stanovením koncentrací 5-hydroxymethyl-uracyl (5-HOMEU), 8-hydroxy-guanosin (8-OHG), 8-hydroxy-2-deoxyguanosin (8-OHdG).

Možnost detekce konkrétního specifického poškození oxidativním a nitračním stresem u astmatu v KVV může být specifické pro konkrétní zánětlivý fenotyp astmatu a může vést ke konkrétní fenotypově specifické léčbě.

5. Cíle práce

Tato práce sledovala několik cílů u kohorty pacientů s těžkým refrakterním astmatem. Sledovali jsme specifické klinické, funkční a zánětlivé charakteristiky pacientů s těžkým refrakterním astmatem. Pomocí analýzy KVV jsme u těžkého refrakterního astmatu hledali oproti zdravým dobrovolníkům rozdíly v koncentracích vybraných markerů oxidativního a nitračního poškození lipidů (malondialdehyd, 4-hydroxy-trans-nonenal, 4-hydroxy-trans-hexenal, nasycené aldehydy, 8-isoprostan, cysteinylové leukotrieny LT B_4 ,

LTC₄, LTD₄, LTE₄), bílkovin (orto-tyrosin, 3-nitro-tyrosin, chloro-tyrosin) a nukleových kyselin (5-hydroxy-methyl-uracyl, 8-hydroxy-guanosin, 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosin). Výsledky byly porovnávány s běžně klinicky užívanými metodami monitorace zánětu a bronchiální obstrukce u těžkého refrakterního astmatu. Předpokládali jsme možnost nalezení nových markerů specifického poškození oxidativním stresem pro různé fenotypy těžkého refrakterního astmatu. Naším cílem bylo zjistit, zda existují rozdíly v koncentracích ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu mezi pacienty s těžkým refrakterním astmatem a zdravou kontrolní skupinou. Dále jsme sledovali koncentrace ukazatelů oxidativního stresu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem ve vztahu k eozinofilii periferní krve a poté ve vztahu ke koncentraci vydechovaného oxidu dusnatého. Zajímali nás také vliv užívání trvalé systémové kortikoterapie a vliv dalších vybraných klinických faktorů na koncentrace ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem.

6. Soubor pacientů a metodika

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 ČPFS pro těžké refrakterní astma [3]. 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.

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, HRCT plic).

Tíže bronchiální obstrukce, její reverzibilita a dynamika změn v čase byla měřena spirometricky (FEV₁ – usilovný jednovteřinový výdech), přítomnost a intenzita eozinofilního zánětu byla sledována průběžným měřením koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého (FeNO). U části nemocných byla provedena bronchoskopie s provedením bronchoalveolární laváže (BAL) a biopsií karin segmentárních bronchů k posouzení remodelace bronchiální stěny (šíře bazální membrány). 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 [3, 4, 19]. 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 rinosinusitidy jako komplikujícího faktoru.

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 plísně, přítomnost ekzému, aspirinové senzitivity, hodnotu celkového IgE, kvalitu života v posledních 6 letech dotazníkem „Test kontroly astmatu“ (AKT) [20]. 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.

Po podpisu informovaného souhlasu pacienti v den vyšetření použili svoje ranní inhalační léky včetně inhalačních kortikosteroidů a dlouhodobě působících bronchodilancií. Poté bylo proveden odběr periferní žilní krve na vyšetření krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu leukocytů, následně byl proveden sběr kondenzátu vydechovaného vzduchu na kondenzátoru Jaeger EcoScreen (Erich Jaeger GmbH, Hoechberg, Německo) podle literárně doporučené metodiky [18, 21]. Kondenzátor EcoScreen umožňuje ochlazení vydechovaného 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 vydechovaného vzduchu. Po 10 minutách od odběru kondenzátu bylo provedeno 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 [22]. 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. 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 -80°C . Vzorky byly následně zpracovány v Ústavu organické technologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze doc. Ing. Petrem Kačerem, PhD metodou kapalinové/plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií přístroji Accela a TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific, USA) s elektrosprejovou ionizací. Tyto metody jsou schopné určit i velmi nízké koncentrace látek v řádu nano- a piko- gramů v 1 ml kondenzátu vydechovaného vzduchu [15].

Ve statistickém zhodnocení 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.

7. 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.

Ve skupině TRA byl častá kortikoterapie (u 21 tj. 52.5% pacient), další protizánětlivou léčba byly antileukotrieny (21 tj. 50%), teofylliny (16 tj. 40%) a tiotropium (11 tj. 27.5%). Fenotypově specifickou léčbu anti-IgE protilátkou (omalizumab) užívalo 8 tj. 20% pacientů, makrolidy pro neutrofilní astma užívalo 5 tj. 12.5% pacientů

Tabulka 2 Porovnání dat mezi skupinami TRA a KS (průměrné hodnoty \pm 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 (\pm 12,3)	46,5 (\pm 9,6)	p=0.330
BMI (kg/m²)	24,2 (\pm 3,71)	29,7 (\pm 5,21)	p<0.001
FEV1 (l/s)	3,14 (\pm 0,75)	1,68 (\pm 0,84)	p<0.001
FeNO₅₀ (ppb)	14,9 (\pm 5,7)	23 (13-46)	p=0.020
AEC ($\times 10^9/l$)	0,16 (\pm 0,15)	0,23 (0,05-0,33)	p=0,380
EC (%)	2,0 (\pm 1,26)	2,9 (0,8-4,1)	p=0,410

Porovnání výsledků základních diagnostických metod mezi kontrolní skupinou (KS) a skupinou těžkého refrakterního astmatu je uvedeno v tabulce č. 2. Ve skupině TRA bylo vyšší BMI, výraznější eozinofilní zánět dýchacích cest (FeNO₅₀) a bronchiální obstrukce (FEV1). Nebyly rozdíly v eozinofilii periferní krve (AEC – absolutní hodnota $\times 10^9/l$, resp. EC% - % eozinofilů v diferenciálním rozpočtu). U 35 TRA pacientů byla bodyplety smograficky zjištěná plicní hyperinflace měřená hodnotou reziduálního plicního objemu (RV) u 26 (74,3%) astmatiků. Průměrná hodnota RV% byla 165,9(\pm 44,7)%.

Vyšetření plicní difuze prokázalo u TRA mírné snížení hodnoty transfer faktoru pro oxid uhelnatý (TLCO), medián hodnot 71,5 (43-80)%.

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 plísní). 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 plísně u 7 tj, 17,5% pacientů. U 12 (30%) nemocných byla prokázán 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). 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 bylo 12 bývalých kuřáků, 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.

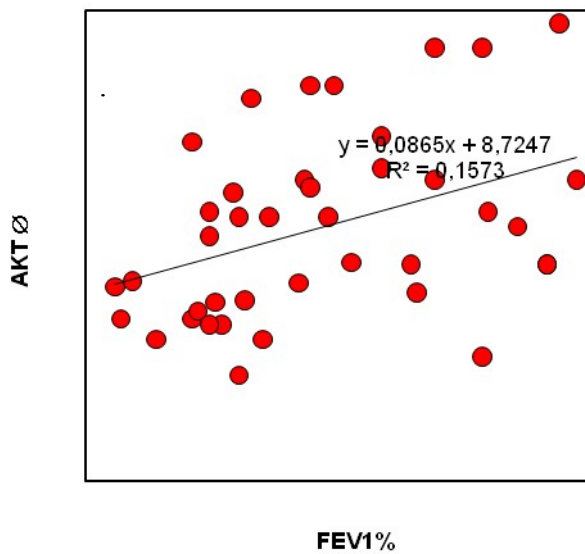
V našem souboru byla bronchoskopie provedena v průběhu předchozího vyšetřovacího programu pto TRA provedena u 23 (57,5%) astmatiků, ve 21 případěch s odběrem BAL. Medián procentuálního zastoupení eozinofilů dosáhl 1 (0-10,5)%. Zastoupení eozinofilů nesplnilo kritéria pro statistické normální rozdělení hodnot, přesto také uvádíme průměrnou hodnotu eozinofilů v BALu 6,9 (±10,3). V imunofenotypizačním vyšetření BAL jsme sledovali zastoupení CD4+ T-lymfocytů, které bylo průměrně 36,1 (±20,4)% a medián imunoregulačního poměru CD4+/CD8+ T-lymfocytů dosáhl hodnoty 1,46 (0,56-1,46). U 18 bronchoskopovaných byla provedena biopsie bronchu se změřením šířky bazální membrány - medián 3,14 (1,06-16,8μm).

7.1. Sledování vybraných klinických, funkčních a zánětlivých ukazatelů u TRA

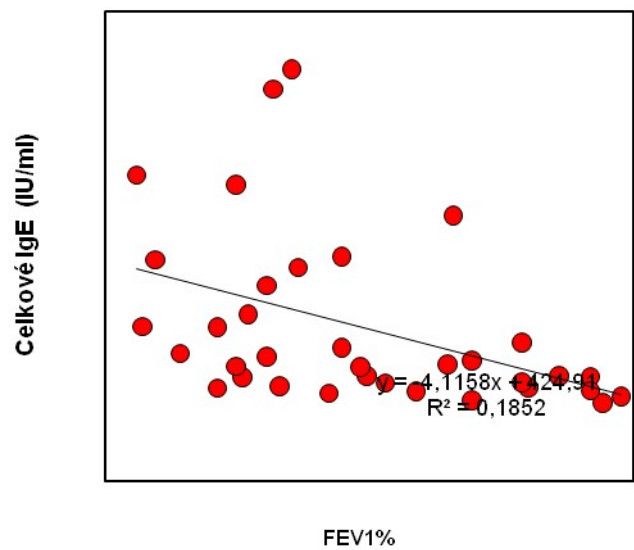
Ve skupině TRA jsme se snažili porovnat vybrané klinické, funkční a zánětlivé charakteristiky s literárně popsány vztahy mezi těmito parametry v observačních studiích těžkého astmatu [19, 23-25].

Ve skupině TRA jsme zjistili vztah parametru FEV1 ve významném vztahu k průměrné hodnotě skóre dotazníku kvality života (AKT) v posledních třech návštěvách (AKT \emptyset) $R_s=0.43$, $p=0.00$, 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

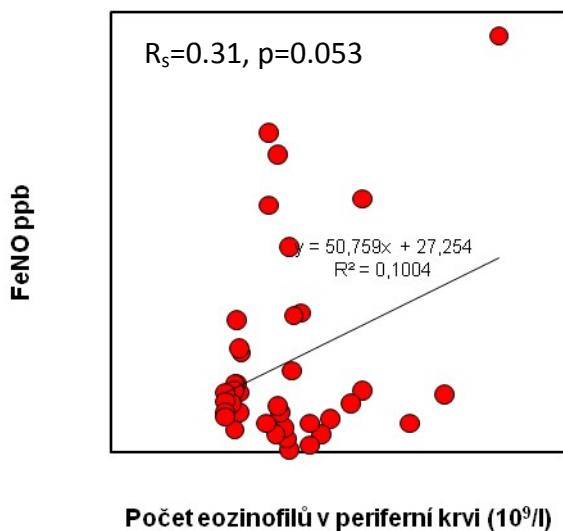


Graf 2

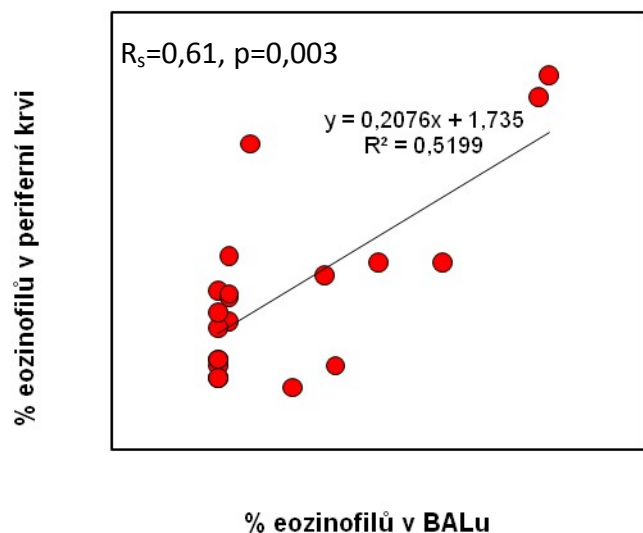


Parametr AKT (skóre testu kontroly astmatu) negativně koreloval s denní spotřebou úlevové léčby krátkodobě působícími beta-2-mimetiky ($R_s = -0,55$, $p = 0,0003$). Zjistili jsme pokles hodnoty FeNO v závislosti na věku pacienta ($R_s = -0,49$, $p = 0,001$) a pokles FeNO v závislosti na rostoucím BMI (kg/m^2) $R_s = -0,42$, $p = 0,009$. Nebyly zjištěny korelace mezi hodnotou eozinofílie periferní krve a parametrem FEV1% ($R_s = 0,13$, $p = 0,42$). Vztah eozinofílie periferní krve k hodnotě FeNO byl na hranici statistické významnosti ($R_s = 0,31$, $p = 0,053$, viz graf 3).

Graf 3



Graf 4



Prokázali jsme pozitivní korelaci % eozinofílie periferní krve k % eozinofilů v bronchoalveolární laváži. Tento vztah je dle Spearmanovy korelační analýzy silný ($R_s = 0,61$, $p = 0,003$, viz graf 4). 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.

Pacienti s rinosinuitidou a nosními polypy měli vyšší hodnotu FeNO než bez pacientů bez nosních polypů (medián 31 ppb vs. 18 ppb, $p=0,01$), 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($\pm 14,3$), $p=0,01$). Vztah refluxní nemoci jícnu ke sledovaným klinickým či laboratorním ukazatelům nebyl nalezen. Další sledované komorbidity (deprese, nikotinismus) ani pohlaví nebyly specificky spojeny s odlišnostmi ve funkčních a zánětlivých parametrech. 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 3 Porovnání dat ve skupině TRA rozdělené dle EC% > 4% (průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)			
Parametr	EC\geq4% (EA) n=13	EC<4% (NEA) 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) x10 ⁹ /l	p<0.0001
Počet žen	9 (69,2%)	14 (53,8%)	p=0.491
Průměrný věk (roky)	48,3 (\pm 10,7)	51,5(\pm 13,4)	p=0.513
BMI (kg/m²)	26,6 (\pm 3,6)	31,6 (\pm 5,1)	p=0.003
FEV1 (l/s)	1,65 (\pm 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
RV (l)	3.84 (\pm0,67)	3.02 (\pm1.03)	p=0.049
Počet pacientů na trvalé léčbě SKS	3 (23,1%)	17 (65,4%)	p=0.023

Dále jsme sledovali vztahy mezi klinickými a funkčními parametry u TRA dle zánětlivého fenotypu astmatu – přítomnosti či chybění eozinofilie periferní krve a dýchacích cest. V naší práci jsme považovali za významnou eozinofilii periferní krve (EC%) limit >4% eozinofilů v diferenciálním rozpočtu. Eozinofilní zánět bronchiální stěny je možné neinvazivně vyšetřit analýzou koncentrace FeNO, která dobře koreluje s eozinofilii měřenou metodou cytologie indukovaného sputa [26]. 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 [19, 27, 28].

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%).

Z tabulky č. 3 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 vydechaného NO, který byl u eozinofilního astmatu vyšší ($p=0.01$). Z dalších funkčních parametrů jsme zjistili rozdíl v hodnotě reziduálního objemu (RV), který je ukazatelem

plicní hyperinflace a byl vyšší ve skupině eozinofilního astmatu, výsledek je na hranici statistické významnosti ($p=0.049$). 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. Předpoklad vyššího výskytu atopie v EA skupině nebyl potvrzen, v EA skupině bylo 9 atopiků (69,2%), v NEA skupině 20 atopiků (76,9%), $p=0.70$. V EA skupině bylo průměrně 6,3 exacerbací, ve skupině NEA 2,9 exacerbací, $p=0.005$, výsledek potvrdila i metoda Poissonovy regrese, $p<0.001$. Potvrdil se předpoklad asociace eozinofilního fenotypu astmatu s rinosinusitidou, která byla zjištěna u 16 pacientů s EA (57,7%) a 27 pacientů s NEA (69,2%), rozdíl byl statisticky významný, $p=0.03$.

Na základě hodnoty koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého jsme rozdělili soubor na dvě skupiny – eozinofilní zánětlivý fenotyp (EA) u 15 pacientů ($FeNO \geq 30$ ppb) a non-eozinofilní zánětlivý fenotyp (NEA) u 25 pacientů ($FeNO < 25$ ppb). 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 č. 4). Pacienti s hodnotou $FeNO > 30$ měli vyšší počet exacerbací v předchozích 12 měsících – 5,5 ($\pm 3,56$) vs 3,2 ($\pm 3,71$), $p=0.03$. Jiné statisticky významné asociace nalezeny nebyly.

Tabulka 4 Porovnání dat ve skupině TRA rozdělené dle $FeNO > 30$ ppb (průměrné hodnoty \pm směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)			
Parametr	$FeNO > 30$ ppb n=15	$FeNO < 30$ ppb n=25	P
$FeNO_{50}$	83,2 ($\pm 49,1$)	16,0 ($\pm 8,16$)	-
Počet žen	7 (46,6%)	17 (68%)	p=0.021
BMI (kg/m ²)	28,1 ($\pm 2,9$)	30,8 ($\pm 6,0$)	p=0.114
FEV1 (l/s)	1,49 (1,01-1,78)	1,64 ($\pm 0,07$)	p=0.833
FEV1/VCmax%	54,2 ($\pm 11,7$)	64,8 ($\pm 14,4$)	p=0.022
AEC ($\times 10^9/l$)	0,40 ($\pm 0,33$)	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 ($\pm 0,68$)	2,99 ($\pm 1,03$)	p=0.049
Počet pacientů na trvalé léčbě SKS	7 (46,7%)	13 (58,3%)	p=1.000

Dále jsme sledovali vliv kortikoterapie na další klinické a funkční ukazatele. Pacienti na SKS měli, menší eozinofilii periferní krve a nižší $FeNO$ než nemocní léčení pouze IKS a než kontrolní skupina. 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 šířce bazální membrány epitelu dýchacích cest.

7.2. Složení kondenzátu vydechovaného vzduchu u pacientů s TRA a u kontrolní skupiny

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. Ve skupině TRA byly naměřeny v KVV statisticky významně vyšší koncentrace markerů lipoperoxidace – malondialdehydu (MDA), 4-hydroxy-trans-nonenalu (HNE), 4-hydroxy-trans-hexanal (HHE), 8-isoprostanu (8-iso), leukotrienu B4 (LTB4) a ostatních leukotrienů C4, D4 a E3 (LTC4, LTD4, LTE4) oproti kontrolní skupině (tabulka 5).

Tabulka 5 Koncentrace markerů lipoperoxidace mezi TRA a KS v KVV (průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)			
Parametr	TRA (n=40)	KS (n=19)	p
MDA (ng/ml)	50,6 (41,7-68,7)	22,8 (±6,4)	p<0.001
HNE (ng/ml)	48,0 (38,5-53,0)	21,4 (±5,7)	p<0.001
HHE (ng/ml)	48,2 (84,6-109,8)	18,0 (±4,2)	p<0.001
8-iso (pg/ml)	59,0 (52,0-66,9)	29,8 (±6,5)	p<0.001
LTB4 (ng/ml)	30,3 (27,0-35,8)	18,4 (±4,9)	p<0.001
LTC4 (pg/ml)	83,4 (72,4-92,8)	43,0 (±7,4)	p<0.001
LTD4 (pg/ml)	28,0 (25,0-32,4)	16,1 (±5,1)	p<0.001
LTE4 (pg/ml)	61,0 (52,0-72,0)	30,9 (±5,3)	p<0.001

ROC analýza prokázala při hodnotě HNE nad 31,97 ng/ml vysokou senzitivitu 94,7% a specificitu 95,0% pro rozpoznání těžkého refrakterního astmatu (AUC 0.9895, p<0.0001). Další sledované markery lipoperoxidace byly u pacientů s TRA statisticky významně vyšší v případě hexenal (C6), heptenal (C7), octanal (C8), nonenal (C9), dekanal (C10), undekanal (C11) a dodekanal (C12) oproti kontrolní skupině (ve všech případech p<0.001).

V tabulce č. 6 jsou uvedeny naměřené koncentrace markerů oxidativního poškození nukleových kyselin - 5-hydroxymethyl uracil (5-HOMeU), 8-hydroxyguanosin (8-OHG), a 8-hydroxy-2'-deoxyguanosin (8-OHdG) v našem souboru. Ve všech případech byly tyto ukazatele statisticky významně vyšší u pacientů s TRA oproti kontrolní skupině.

Tabulka 6 Koncentrace markerů oxid. poškození DNA/RNA mezi TRA a KS v KVV (průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)			
Parametr	TRA (n=40)	KS (n=19)	p
5-HOMeU (pg/ml)	15,9 (13,26-19,6)	12,3 (±2,9)	p<0.001
8-OHG (pg/ml)	18,3 (14,8-21,1)	7,8 (±1,7)	p<0.001
8-OHdG (pg/ml)	21,0 (16,5-26,9)	10,3 (±2,4)	p<0.001

Dále jsme měřili míru oxidativního poškození proteinů resp. aminokyselin vyšetřením koncentrací o-tyrosinu (o-tyr), 3-nitro-tyrosinu (NO-tyr), 3-chlorotyrosinu (Cl-tyr) v KVV u TRA i KS, ve všech případech byla koncentrace těchto markerů vyšší u TRA oproti kontrolní skupině (tabulka 7).

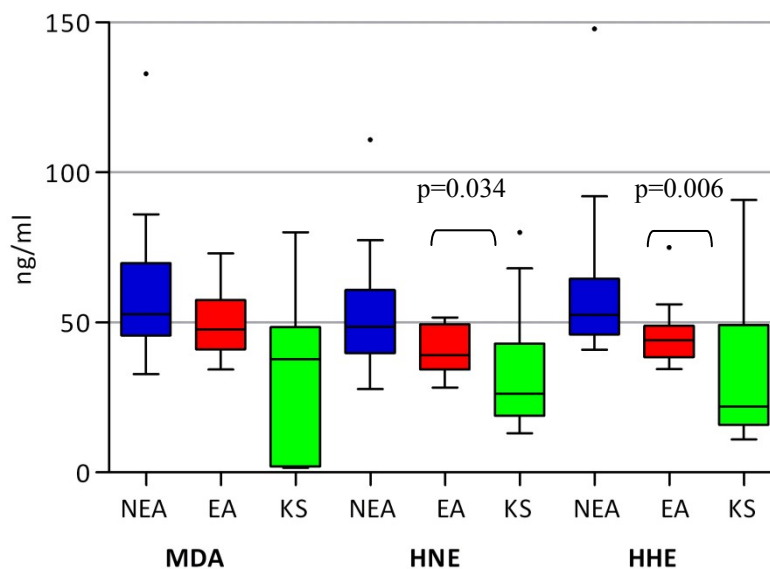
Tabulka 7 Koncentrace markerů oxid. poškození aminokyselin mezi TRA a KS v KVV (průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)			
Parametr	TRA (n=40)	KS (n=19)	p
o-Tyr (pg/ml)	67,7 (59,0-73,5)	35,7 (±7,4)	p<0.001
NO-Tyr (pg/ml)	51,6 (45,5-59,1)	31,2 (±7,2)	p<0.001
Cl-Tyr (pg/ml)	23,5 (19,8-28,0)	13,5 (±2,2)	p<0.001

7.3. Rozdíly ve složení KVV u fenotypů TRA dle eozinofilie periferní krve

Dále jsme rozdělili sledovaný soubor TRA na dvě podskupiny podle zánětlivého fenotypu astmatu. Nejprve jsme skupinu TRA rozdělili dle eozinofilie periferní krve (EC%) odebrané bezprostředně před sběrem kondenzátu vydechovaného vzduchu. Pacienty s $EC\% \geq 4\%$ jsme považovali za eozinofilní astma (EA), hodnoty s $EC\% < 4\%$ za non-eozinofilní astma. 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-nonenalu a 4-hydroxy-trans-hexenalu ve skupině pacientů bez eozinofilie periferní krve (NEA) – viz tabulka 8 a graf 5. Vztah mezi HNE a EC% potvrdila i metoda lineární regrese (slope -0.078 (95%CI -0.15 to -0.01), $r^2=0.12$) $p=0.02$.

Tabulka 8 Koncentrace markerů lipoperoxidace mezi TRA a KS v KVV (průměrné hodnoty ± směrodatná odchylka nebo mediány s interkvartilovým rozpětím)			
Parametr	NEA (n=26)	EA (n=13)	p
MDA (ng/ml)	52,9 (45,7-69,8)	46,7 (±11,8)	p=0.142
HNE (ng/ml)	48,5 (39,8-60,9)	41,1 (±7,8)	p=0.034
HHE (ng/ml)	52,6 (46,0-109,8)	48,9 (44-75)	p=0.006

Graf 5



V ostatních sledovaných parametrech oxidačního stresu nebyly zaznamenány statisticky významné změny mezi skupinou EA a NEA. 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 FEV1 ($R_s = -0.09$, $p=0.65$), s eozinofilií 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 ($R_s = -0.08$, $p=0.66$) a k podobným závěrům jsme došli u parametru HHE (4-hydroxy-trans-hexenal). 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. Pomocí logistické regrese jsme hledali vztah přítomnosti eozinofilie periferní krve k parametrům FEV1%, FeNO a HNE (tabulka 9). Eozinofilie periferní krve u TRA byla v signifikantní pozitivní závislosti k hodnotě FeNO a negativní závislosti k hodnotě HNE.

Tabulka 9 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

7.4. Rozdíly ve složení KVV u fenotypů TRA dle FeNO>30 ppb

Soubor TRA jsme rozdělili podle hodnoty FeNO naměřené ve stejný den jako odběr kondenzátu vydechovaného sputa na přítomný 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. Rozdíl byl přítomen pouze v absolutním množství HNE a HHE v naměřením kondenzátu, koncentrace vztažené na ml kondenzátu se však statisticky významně nelišily (např. HNE (4-hydroxy—trans-noneal u FeNO \geq 30 ppb = 45,1 vs. 48,1 ng/ml u FeNO \leq 30 ppb. 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.

7.5. Rozdíly ve složení KVV u fenotypů TRA dle dalších parametrů

Další hypotézou byl předpoklad supresivního vlivu systémové kortikoterapie na intenzitu oxidativního stresu a na specifické poškození lipidů, proteinů a nukleových kyselin oxidativním stresem. Vyšetření kondenzátu vydechovaného vzduchu však neprokázalo v žádném ze sledovaných markerů oxidativního stresu statisticky signifikantní rozdíly v koncentracích mezi nemocnými na trvalé kortikoterapii a bez této léčby. Složení kondenzátu vydechovaného vzduchu nebylo ovlivněno žádným z dalších parametrů (FEV1, intenzita příznaků dle astma kontrol testu, vznik astmatu před 12 roku věku, věkem, body-mass indexem).

8. Diskuse

V naší práci jsme se věnovali sledování intenzity oxidativního stresu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem pomocí analýzy kondenzátu vydechovaného vzduchu. Těžké refrakterní astma je heterogenní onemocnění, proto jsme hledali také rozdíly v markerech oxidačního a nitračního stresu nejen oproti kontrolní skupině zdravých dobrovolníků, ale také mezi eozinofilním a non-eozinofilním fenotypem těžkého refrakterního 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. Tento biomarker by mohl být v budoucnu použit při určování fenotypu astmatu a indikaci fenotypově specifické léčbě.

V běžné praxi jsou k posouzení tíže astmatu a stupně kontroly nad astmatem užívány jednoduché metody (FEV₁, FeNO, astma kontrol test skóre). U nemocných TRA je však důležité rozpoznání typu převládajícího zánětu bronchiální stěny (zánětlivý fenotyp), protože může ovlivnit rozhodování o léčebné intervenci. Nemocní s TRA a perzistující eozinofilii jsou ohroženi častějšími exacerbacemi a poklesem plicních funkcí v čase a mohou mít potenciální benefit z léčby novými anti-eozinofilními léky (mepolizumab, pitrakinra), protože mají různě vyjádřenou kortikorezistenci a pravděpodobně nadprodukcii IL-5, hlavního chemokinu eozinofilního zánětu [29]. V současné době je za zlatý standard určení zánětlivého fenotypu astmatu považována 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. Zjištění typu zánětu je ve výzkumu a klinické praxi prováděno neinvazivními metodami jako je cytologie indukovaného sputa a měření koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého (FeNO). Několik studií prokázalo úspěšné řízení protizánětlivé léčby astmatu zejména dle změn eozinofilie v indukovaném sputu [28, 30]. Nevýhodou indukovaného sputa je však náročnost preanalytické přípravy vzorku a proto je tato metoda užívána spíše vyjimečně a převážně jen z výzkumných důvodů. V případě metody FeNO není přínos pro vedení protizánětlivé léčby astmatu zcela jednoznačný, např. u dětí sice dojde ke snížení počtu exacerbací oproti skupině sledované jen dle symptomů, avšak za cenu celkově vyšší dávky inhalačních kortikosteroidů zvyšuje [31]. Proto je v současnosti doporučováno používat FeNO v diagnostice astmatu, zjištění kortikosenzitivity, odhalení non-compliance s léčbou steroidy, nebo při identifikaci pacientů s perzistující eozinofilii dýchacích cest i přes řádně užívanou protizánětlivou léčbu [28, 32].

Nesplněná očekávání z přínosu FeNO pro vedení léčby astmatu je motivací pro hledání nových technologií a nových biomarkerů k odhalení typu zánětu dýchacích cest a intenzity oxidativního stresu u astmatu.

V našem souboru jsme podobně, jak popisuje literatura, zjistili pokles FeNO s věkem [33]. Vysoká hodnota FeNO byla spojena s plicní hyperinflací, výraznější bronchiální obstrukcí a častějšími exacerbacemi, naopak vztah k atopii jsme nezjistili. 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 [34]. 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 v naší práci hledali vztah vybraných ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu k běžně klinicky užívaným metodám monitorace zánětu a bronchiální obstrukce u těžkého refrakterního astmatu. Ověřovali jsme hypotézu, že je možné odlišit pomocí analýzy KVV metodou kapalinové/plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/GC-MS) pacienty s těžkým refrakterním astmatem od zdravé kontrolní skupiny a dále zánětlivé fenotypy

astmatu mezi sebou. Tato citlivá metoda garantuje vysokou přesnost i při detekci nanogramových množství látek. V odborné literatuře lze nalézt poměrně velmi variabilní výsledky naměřených koncentrací v kondenzátu vydechovaného vzduchu závislosti na typu odběrového systému, analytické metodě a počtu účastníků výzkumu. Dosud také nebyl určen jednotný standard hodnocení diluce vzorků kondenzátu a proto mohou být koncentrace látek v KVV rozdílné [21]. 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, 8-isoprostan, cysteinylové leukotrieny (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄), 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

V naší práci jsme zjistili výrazně vyšší koncentrace markerů oxidativního stresu u pacientů s TRA oproti kontrolní skupině a to ve všech parametrech a s vysokou statistickou významností. V naší práci jsme neměli možnost vyšetřit pacienty s astmatem, které dobře odpovídá na protizánětlivou léčbu inhalačními kortikosteroidy. Je možné, že u těchto pacientů by výsledky nebyly tak odlišné. 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% specifitu pro diskriminaci astmatu od zdravých v kontrolní skupině.

V literatuře dosud nebyl popsán rozdíl v biomarkerech v KVV u pacientů s různými zánětlivými fenotypy astmatu. Proto jsme se soustředili na skupinu TRA a její zánětlivé fenotypy hodnocené podle eozinofilie periferní krve a podle koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého. Předpokládali jsme, že se bude průběh oxidačního a nitračního stresu lišit u pacientů s eozinofilním a non-eozinofilním zánětem bronchiální stěny. Eozinofilie periferní krve koreluje se symptomy astmatu, s bronchiální hyperreaktivitou a odráží krevní a tkáňové koncentrace cytokinů eozinofilního zánětu (např. IL-5) [29]. Perzistující eozinofilii periferní krve EC > 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 fenotypu TRA na eozinofilní či non-eozinofilní dle eozinofilie periferní krve jsme podpořili zjištěnou vysokou korelací tohoto parametru s eozinofilí v bronchoalveolární laváži, ačkoliv toto vyšetření nebylo provedeno ve stejný den jako odběr periferní krve. Výhoda této metody je v dostupnosti a jednoduchém laboratorním zpracování s doručením výsledku v krátké době.

Při rozdělení souboru těžkého refrakterního astmatu dle eozinofilie periferní krve (EC%) jsme zjistili statisticky významně vyšší koncentraci nenasycených aldehydů 4-hydroxy-*trans*-nonenal (HNE) a 4-hydro-*trans*-hexanal (HHE) u non-eozinofilních pacientů, s klesajícím počtem eozinofilů hodnota HNE rostla. HNE i HHE jsou markery oxidativního poškození ω-3, resp. ω-6 nenasycených mastných kyselin. S dalšími atributy eozinofilního zánětu (FeNO, eozinofilie v BALu) hodnota HNE již nekorelovala. ROC analýza potvrdila hodnotu HNE 48,25ng/ml jako rozhodující pro non-eozinofilní systémový zánět, avšak senzitivita a specifita tohoto parametru je nízká a přínos pro diskriminaci zánětlivého fenotypu má tento parametr nepříliš významný. K podobným výsledkům jsme došli u parametru HHE. 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 nenasycených mastných kyselin (PUFA), než je tomu u eozinofilního zánětu. PUFA mají v organismu mnoho důležitých rolí. Jsou součástí buněčných membrán, regulují genovou expresi a podílí se na mezibuněčné komunikaci, jsou esenciální komponentou buněčných membrán, kde zajišťují jejich fluiditu, flexibilitu a selektivní permeabilitu. Lipidy s PUFA jsou velmi náchylné k oxidaci volnými kyslíkovými radikály.

V případě rozdělení fenotypů TRA na eozinofilní a noneozinofilní dle hodnoty FeNO jsme již neprokázali statisticky významné rozdíly v žádném ze sledovaných parametrů včetně parametrů HNE a HHE. Neprokázali jsme vztah ostatních měřených parametrů oxidačního a nitračního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu k žádné z metod zjištění typu zánětu (FeNO, EC%). Předpokládáme, že je to způsobeno relativně malým počtem vyšetřených pacientů, ačkoliv velká část publikovaných prací analyzujících KVV má podobně velký počet subjektů. Obě metody hodnocení floridního eozinofilního zánětu dýchacích cest (FeNO, EC%) 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. Sledovali jsme také vliv kortikoterapie na složení KVV u TRA, avšak statisticky významné rozdíly nalezeny nebyly. Klinické faktory (věk, BMI, pohlaví, atopie, aspirinová-senzitivita, refluxní nemoc jícnu, rinosinusitida, astma kontrol test) na složení kondenzátu vydechovaného vzduchu neměly vliv na koncentrace markerů oxidačního a nitračního stresu v KVV. Neprokázali jsme literárně dokumentovaný vztah aspirin-senzitivního astmatu ke koncentracím cisteinylových leukotrienů v kondenzátu vydechovaného vzduchu [35].

Poškození lipidů oxidativním stresem vede k přímým strukturálním změnám buněčné membrány, ale také k sekundární tvorbě další pro-oxidativních látek. K peroxidaci lipidů dochází zejména v membránových fosfolipidech, které jsou důležitou složkou buněčných membrán. Oxidativním stresem změněné fosfolipidy mění permeabilitu a fluiditu buněčné membrán, je alterován transport iontů, dochází k inhibici metabolických procesů buňky a dysfunkci membránových proteinů, inaktivaci enzymů a toxickému účinku na mechanismy dělení buňky. 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 hydroperoxydy se dále rozpadají na hydroxy-alkany HNE a HHE [17]. HNE vzniká lipoperoxidací ω -6 nenasycených mastných kyselin (kyselina linoleová, kyselina arachidonová). Lipoperoxidací ω -3 mastných kyselin (kyselina α -linolenová, docosa-hexa-enová) vzniká HHE. HNE i HHE jsou relativně stabilní látky. Mohou však 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 [36]. HNE a HHE poškozují mezibuněčnou komunikaci v gap-junctions, stimulují fosfolipázu C, intracelulární akumulace HNE vede k buněčné apoptóze. Existují důkazy o stimulaci migraci neutrofilů do místa oxidativního stresu [36].

Intracelulární antioxidační systém je výrazně vyčerpáván odbouráváním HNE konjugací s glutathion-S-transferázou za tvorby konjugátů (glutathionyl-4-hydroxy-noneal). Tím dochází ke značné konzumpci anti-oxidázové buněčné kapacity a pokračující antioxidační stres může dále 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 [37]. 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 [38]. V naší práci jsme zjistili zvýšené hodnoty HNE a HHE u non-eozinofilního astmatu. 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.

9. Závěry

Naše práce sledovala pacienty s těžkým refrakterním astmatem. Potvrdili jsme i na menším souboru těchto pacientů význam sledování koncentrace vydechovaného 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.

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 hyperinflací a výraznějším eozinofilním zánětem měřeným metodou FeNO. Eozinofilie periferní krve korelovala s eozinofilii v bronchoalveolární laváži a s hodnotou FeNO. 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.

Naše výsledky prokázaly schopnost analýzy oxidačních a nitračních produktů v kondenzátu vydechovaného vzduchu metodou LC/GS-MS odlišit astma od zdravých v kontrolní skupině. Zjistili jsme v kondenzátu vydechovaného vzduchu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem statisticky signifikantně výrazně vyšší koncentrace produktů oxidačního a nitračního poškození lipidů, proteinů a nukleových kyselin. Koncentrace měřených markerů oxidativního a nitračního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu vykazovaly inter-individuální variabilitu, která byla nižší v kontrolní skupině a u eozinofilního 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 astmatu 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

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 vydechovaného vzduchu.

Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu je neinvazivní, snadno proveditelné vyšetření, které může v budoucnu přispět v diagnostice a léčbě astmatu i dalších respiračních chorob. Nevýhodou této metody je chybějící standardizace odběrové techniky a laboratorních analytických metod a chybějící rozsáhlé prospektivní klinické studie s použitím KVV. Budoucnost analýzy vydechovaného vzduchu je závislá na technologickém pokroku a rozvoji on-line analytických metod velkého množství různorodých mediátorů a s interpretační asistencí statistických metod na bázi tzv. principal component analysis [18, 21]. V naší práci jsme se snažili popsat oxidativní stres u unikátní kohorty nemocných s těžkým refrakterním astmatem, kde je intenzita zánětu dýchacích cest největší.

10. Použitá literatura

1. TEŘL, M., POHUNEK, P. *Strategie diagnostiky, prevence a léčby astmatu. Uvedení globální strategie do praxe v ČR*, 1. vyd. Praha: Česká iniciativa pro astma, o.p.s., 2012. 90 s. ISBN 978-80-86396-67-5.
2. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention, G.I.N.A.* [online]. c2013, poslední revize 13.2.2013 [cit. 2013-04-24]. Dostupné z: <http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2012Feb13>.
3. SEDLÁK, V., CHLUMSKÝ, J., TEŘL, M., NOVOTNÁ, B., et al Doporučený postup pro diagnostiku a léčbu obtížně léčitelného astmatu v České republice. *Studia pneumologica et phthiseologica*, 2011, roč. 71, č. 2, p. 65-75.
4. 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.

5. MENZIES-GOW, A., GIBEON, D., HUI, C., ZHANG, Q., et al Management of difficult-to-treat severe asthma. *Eur Respir Mon*, 2011, vol. 51, p. 282-296.
6. SEDLÁK, V., KOBLÍŽEK, V. Budoucí léčba astma bronchiale. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2010, roč. 24, č. 2, s. 71-74.
7. SEDLÁK, V., KOBLÍŽEK, V. Určování fenotypu astmatu ve výzkumu a klinické praxi. *Medicína po promoci*, 2009, speciální vydání, s. 1-12, ISSN 1212-9445.
8. 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.
9. 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.
10. SAHINER, M.U., BIRBEN, E., ERZURUM, S., et al. Oxidative stress in asthma. *World Allergy Organization Journal*, 2011, vol. 4, p. 151-158.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. SYSLOVÁ, K., KACER, P., KUZMA, M., et al. Determination of 8-isoprostaglandin F_{2α} in exhaled breath condensate using combination of immunoseparation and LC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B*, 2008, vol. 867, p. 8-14.
16. PERONI, D.G. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. *Test kontroly astmatu*. [online]. c2012, poslední revize 20.4.2012 [cit. 2013-04-24]. Dostupné z: <<http://www.astmatest.cz/test.php>>.
21. 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.
22. 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.
23. 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.

24. 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.
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. 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.
27. GIBSON, P.G., WANG, F., HE, X.Y., et al. Noninvasive assesment of inflammation in severe asthma. *Eur Respir Mon*, 2011, vol. 51, p. 208-217.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. PETSKEY, 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.
32. 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.
33. COLUMBO, M., WONG, B., PANETTIERI, R.A., Asthma in the elderly: The role of exhaled nitric oxide measurements. *Respir Med*, 2013, vol. 197, no. 5., p. 785-787.
34. 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.
35. MONTUSCHI, P. Exhaled breath condensate: 8-isoprostane and eicosanoids. *Eur Respir Mon*, 2010, vol. 49, p. 196-206.
36. 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.
37. 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.
38. SRISTAVA, S.K., YADAV, U.C.S., REDDY, A.B.M., et al. Aldose reductase inhibition supresses oxidative stress-induced inflammatory disorder. *Chem Biol Interact*, 2011, vol. 191, no.1-3, p. 330-33.

11. Přehled publikační činnosti autora

11.1. Monografie

- SEDLÁK, V., VANÍK, P., et al. *Ultrazvuk hrudníku v klinické praxi*, Praha: Maxdorf Jesenius, 2013, ISBN 978-80-7345-349-7 – v tisku

11.2. Kapitoly v monografiích

- TEŘL, M., POHUNEK, P., *Strategie diagnostiky, prevence a léčby astmatu. Uvedení globální strategie do praxe v ČR*, 1. vydání, Praha: Česká iniciativa pro astma, o.p.s., 2012, 90 stran, ISBN 978-80-86396-67-5 (autor kapitol o těžkém refrakterním astmatu)
- KOLEK, V., KAŠÁK, V., VAŠÁKOVÁ, M., et al. *Pneumologie*, 1. vydání, Praha: Maxdorf, 2012, 552 stran, ISBN 978-80-7345-255-1 (autor kapitol UZ hrudníku, intenzivní péče v pneumologii) - publikace vyhodnocena jako nejlepší publikace České lékařské společnosti JEP v roce 2012.
- KAŠÁK, V., KOBLÍŽEK V., et al. *Naléhavé stavy v pneumologii*, 1. vydání, Praha: Maxdorf, 2008, 535 stran, ISBN 978-80-7345-185-1 (spoluautor kapitoly hemoptýzy)

11.3. Původní články

- SYSLOVÁ, K., BÖHMOVÁ, A., DEMIRBAG, E., ŠIMKOVÁ, K., KUZMA, M., PELCLOVÁ, D., SEDLÁK, V., ČÁP, P., MARTÁSEK, P., KAČER, P. Immunomagnetic molecular probe with UHPLC-MS/MS: A promising way for reliable asthma diagnostics based on quantification of cysteinyl leukotriens. *J Pharm Biomed Analysis*, vol. 2013, no. 81-82, p. 108-117. **IF=2.979**
- KOBLÍŽEK, V., TOMŠOVÁ, M., ČERMÁKOVÁ, E., PAPOUŠEK, P., PRACHAŘOVÁ, Š., MANDALIA, R.A.A., CERAL, J., NOVOSAD, J., FILA, L., SEDLÁK, V., RUTA, J., BARTOŠ, V., SALAJKA, F., HRNČIARIK, M. Impairment of nasal mucociliary clearance in former smokers with stable chronic obstructive pulmonary disease relates to the presence of a chronic bronchitis phenotype. *Rhinology*, 2011, vol. 49, p. 397-406. **IF=1.321**
- KOBLÍŽEK, V., CHLUMSKÝ, J., ZINDR, V., NEUMANNOVÁ, K., ZATLOUKAL, J., ŽÁK, J., SEDLÁK, V., KOCIÁNOVÁ, J., ZATLOUKAL, J., HEJDUK, K., PRACHAŘOVÁ, Š. *Biomed Pap*, 2013, vol. 157: XX – in print, <http://dx.doi.org/10.5507/bp.2013.039>. **IF=0.702**
- DRAHOTA, Z, RAUCHOVÁ, H, SEDLÁK, V., KOČÍ, J., ČERVINKOVÁ, Z. The effect of triiodothyronine on changes of membrane fluidity in regenerating rat liver. *Physiol Res*, 1999, vol. 48, no. 2: 167-170. **IF=1.555**
- **SEDLÁK, V.**, KOBLÍŽEK, V., BARTOŠ, V., et al. Transbronchiální biopsie v diagnostice bronchiálních obstrukcí. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL*, 2010, roč. 7, suppl. 1, s. 9-10
- SALAJKA, F., BARTOŠ, V., NOVOSAD, J., SEDLÁK, V., et al. Failure of noninvasive prediction of pulmonary hypertension in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Monaldi Archives for Chest Disease*, 2011, vol. 75, no. 3, p. 172-177
- PLÍŠEK, S., KOSINA, P., CHLÍBEK, R., SEDLÁK, V., et al. Analýza případů nové pandemické chřipky A(H1N1) 2009 v Královéhradeckém regionu. *Vakcinologie*, 2010, roč. 4, č. 4, s. 137-143
- KRÁL, B., KRČMOVÁ, I., SEDLÁK, V., CHLÁDKOVÁ, J., CHYBA, T. Výsledky hodnocení kontroly astmatu na čtyřech specializovaných ambulancích Fakultní nemocnice v Hradci Králové - pilotní studie, *Alergie*, 2006, roč. 8, č. 1, s. 39-46

11.4. Přehledové články

- **SEDLÁK, V.** Terapie průduškového astmatu. *Zdravotnické noviny (příl. Lékařské listy)*, 2012, č. 13, s 15-16
- **SEDLÁK, V.,** CHLUMSKÝ, J., TEŘL, M., NOVOTNÁ, B., et al. Doporučený postup pro diagnostiku a léčbu obtížně léčitelného astmatu v České republice. *Studia pneumologica et phthiseologica*, 2011, roč. 71, č.2, p. 65-75
- **SEDLÁK, V.,** CHLUMSKÝ, J., TEŘL, M., KRÁL, B., et al. Doporučený postup diagnostiky a léčby obtížně léčitelného bronchiálního astmatu. Doporučení pro ambulantní specialisty. Standardní léčebný plán. *Alergie*, 2011, č. 13, suppl 2, s. 43-54
- **SEDLÁK, V.** Astma v roce 2011 - vítězství na dosah? *Studia Pneumologica et Phthiseologica*, 2011, roč. 71, č. 4, 143-145
- **SEDLÁK, V.,** KOBLÍŽEK, V. Budoucí léčba astma bronchiale. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2010, roč. 24, č. 2, p. 71-74
- **SEDLÁK, V.** Nové klinické zkušenosti s léčbou těžkého astmatu anti-IgE protilátkou. *Farmakoterapie*, 2009, roč. 5, č. 1, p. 87-92
- **SEDLÁK, V.,** KOBLÍŽEK, V. Tiotropium v léčbě CHOPN. *Interní medicína pro praxi*, 2009, roč. 11, č. 5, s. 245-249
- **SEDLÁK, V.,** KOBLÍŽEK, V. Určování fenotypu astmatu ve výzkumu a klinické praxi. *Medicína po promoci*, 2009, speciální vydání, p. 1-12
- **SEDLÁK, V.** Těžké a obtížně léčitelné asthma bronchiale. *Alergie*, 2007, roč.9, č.2, s. 19-21
- **SEDLÁK, V.,** KRÁL, B., SALAJKA, F., Alternativní léčba obtížně léčitelného astmatu. *Farmakoterapie*, 2006, č. 1, p. 61-67
- **SEDLÁK, V.,** KRÁL, B., KOBLÍŽEK, V. Diagnostika a léčba obtížně léčitelného astmatu. *Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové*, 2006, roč. 51, č. 2, s. 93-102
- **SEDLÁK, V.,** KOBLÍŽEK, V., LÁNSKÝ, M., ŠIMEK, R., SMOLÍK, P. Léčba syndromu obstrukční spánkové apnoe, *Medicína pro praxi*, 2006, č. 3, s. 124-128
- **SEDLÁK, V.,** KRÁL, B., SALAJKA, F. Co přinesla mezinárodní multicentrická studie ENFUMOSA o těžkém astmatu. *Alergie*, 2004, suppl. 2, s. 10-12
- **SEDLÁK V.,** PARÁKOVÁ, Z., KRÁL, B., KOPECKÝ, O., SALAJKA, F. Úskalí terapie obtížně léčitelného astma bronchiale. *Stud Pneumol Phtiseol*, 2004, roč. 64, č. 4, s. 164-171
- **SEDLÁK, V.** Jednotný protokol diagnostiky a léčby obtížně léčitelného astmatu, Národní centrum pro těžké astma. *Respirace*, 2006, roč. 12, č. 2, s. 37-41
- **SEDLÁK, V.,** CHLÁDEK, J., SALAJKA, F., Neinvazivní monitorování bronchiálního astmatu *Respirace*, 2005, roč. 11, č. 2, s. 43-49
- **SEDLÁK, V.,** KOBLÍŽEK, V., NOVOTNÝ, J., VIŽĎA, J., SALAJKA, F., Je diagnostika plicní embolie u pacientů s bronchiální obstrukcí obtížnější? *Respiro*, 2004, roč. 6, č. 1, s. 32-32

- BRANDTL, P., LUKÁS, K., TURZÍKOVÁ, J., CHLUMSKÝ, J., SEDLÁK, V., VYDROVÁ, J., ZELENÍK, K., VOJTÍSKOVÁ, J., SEIFERT, B. Extraesofageální refluxní nemoc jícnu – mezioborový konsenzus. *Cas Lek Cesk* 2011;150(9):513-8
- KOBLÍŽEK, V., SEDLÁK, V. Použití inhalačních kortikosteroidů u různých typů bronchiálních obstrukcí. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2010, roč. 24, č. 2, s. 80-84.
- NOVOTNÝ, J., ELIÁŠ, P., ŠPRIŇAR, Z., HABAL, P. SEDLÁK, V. Přínos kontrastního CT v detekci maligní etiologie pleurálního výpotku, *Česká radiologie*, 2007, roč. 61, č. 4, s. 392-399

- KRÁL, B., SEDLÁK, V. Účinky beta2-agonistů na kardiovaskulární systém při jejich podávání pacientům s bronchiální obstrukcí. *Studia Pneumologica et Phthiseologica*, 2006, roč. 66, č. 2/3, s. 58-64
- BROŽÍK, J., ELIÁŠ, P., NOVOTNÝ, J., SEDLÁČEK, Z., SEDLÁK, V. Kuřácká plíce - spektrum CT a HRCT nálezů. *Česká radiologie*, 2006, roč. 60, č. 5, s. 399-399
- HÁJKOVÁ, P., FRIC, M., BROŽÍK, J., KOBLÍŽEK, V., SEDLÁK, V. Miliární tuberkulóza a aspergilová pneumonie u 81leté ženy. *Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové*, 2006, roč. 51, č. 2, s. 123-135
- KOBLÍŽEK, V., SEDLÁK, V., PARÁKOVÁ, Z., KRÁL, B., SALAJKA, F. Obtížně léčitelné astma (OLA) - přístup k pacientovi s těžkým astmatem. *Alergie*, 2006, roč. 8, suppl. 1, s. 46-48
- KRČMOVÁ, I., KRÁL, B., PARÁKOVÁ, Z., SEDLÁK, V., NOVOTNÁ, B., KAŠÁK, V., HALÍKOVÁ, J., CHMELAROVÁ, S. Aspirinem zlepšené astma (AZA) - vzácný fenotyp astmatu? *Alergie*, 2006, roč. 8, suppl. 1, s. 39-41
- KRÁL, B., SALAJKA, F., KRČMOVÁ, I., SEDLÁK, V. Podávání kardioselektivních beta-blokátorů pacientům s bronchiální obstrukcí - kdy a jak. *Farmakoterapie*, 2005, roč. 1, č. 2, s. 183-185
- ŠTEINER, I., JÍLKOVÁ, V., LACO, J., SEDLÁK, V., DRUGDA, J. Adenokarcinom plic pod obrazem plicní fibrózy. *Lékařské zprávy Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové*, 2005, roč. 50, č. 3-4, s. 115-124

11.5. Statě ve sbornících

- **SEDLÁK, V.** Současný stav NCTA – Národního centra pro těžké astma. S obstrukcí i bez obstrukce – sborník přednášek. 2005, Praha: Galén, ISBN 80-7262-385-0
- **SEDLÁK, V.**, KRÁL, B., KOBLÍŽEK, V., LÁNSKÝ, M. Komplikující faktory obtížně léčitelného astmatu: refluxní nemoc jícnu, rhinosinusitida. S obstrukcí i bez obstrukce – sborník přednášek. Praha: Galén, ISBN 80-7262-385-0
- **SEDLÁK, V.**, KOBLIŽEK, V., SALAJKA, F., NOVOTNY, J. Does a bronchial obstruction influence a diagnostic approach in patient with pulmonary emboliím.? *Eur Respir J (Supplementum)*, vol. 24, no. 48, p. 275s.
- KOBLÍŽEK, V., DITTRICH, M., SELKE-KRULICHOVÁ, I., TOMŠOVÁ, M., POHNĚTALOVÁ, D., SEDLÁK, V. Mucociliary clearance of COPD patients. *Mucociliary clearance of COPD patients. Eur Respir J (Supplementum)*, 2006, vol. 28, no. 50, p. 35-35.
- BARTOŠ, V., KOBLÍŽEK, V., POLÁK, J., SEDLÁK, V. Komunitní pneumonie u mladších a starších pacientů. *Novinky v pneumologii : pneumologie, ftizeologie, ošetřovatelství*, 1. vyd., Hradec Králové, Nadační fond pro léčbu a výzkum plicních a přidružených onemocnění, 2006, 48 s., ISBN 80-239-7293-6.
- KOBLÍŽEK, V., SALAJKA, F., SEDLÁK, V., VOŇKOVÁ, K. Efficacy and safety of bronchoscopy in the elderly ? *Eur Respir J (Supplementum)*, 2004, vol. 24, no. 48, p. 70s.

11.6. Přednášky na odborných setkáních

- **SEDLÁK, V.**, ČÁP, P., PELCLOVÁ, D., MALÝ, M. *Influence of oral steroid use in difficult-to-control asthma patients on metabolomic profile of oxidative stress in exhaled breath condensate (EXAIR project)*, European Respiratory Society Annual Congress, Vídeň, 2012 – thematic poster session
- **SEDLÁK, V.**, PARÁKOVÁ, Z., KRČMOVÁ, I., KOBLÍŽEK, V., SALAJKA, F. *Relation of pulmonary hyperinflation to phenotype of adults and elderly severe asthma patients*, European Respiratory Society Annual Congress, Amsterdam, 2011 – oral presentation
- **SEDLAK, V.**, PARAKOVA, V., KRAL, B., KOBLIŽEK, V., SALAJKA, F. *Gender and its relation to asthma phenotype and comorbidities in difficult-to-control asthma patients from Czech*

- National Severe Asthma Registry*, European Respiratory Society Annual Congress, Berlin, 2008 – poster presentation
- SEDLÁK, V., KOBLIZEK, V., SALAJKA, F., NOVOTNY, J. *Does a bronchial obstruction influence a diagnostic approach in patient with pulmonary embolism?* European Respiratory Society Annual Congress, Glasgow, 2004 – poster presentation
 - SEDLÁK, V. *Indikace neinvazivní plicní ventilace – evidence based medicine. 1. hradecký workshop neinvazivní plicní ventilace. XVII. Hradecké pneumologické dny, 19-20.4.2013, Hradec Králové*
 - SEDLÁK, V. *Vyšetřování markerů oxidativního stresu v kondenzátu vydechaného vzduchu u těžkého refrakterního astmatu. XVII. Hradecké pneumologické dny, 19-20.4.2013, Hradec Králové*
 - SEDLÁK, V. *Sonopneumologie. I. Kongres České pneumologické a ftizeologické společnosti a XVI. Hradecké pneumologické dny, 20.-21.4.2013, Hradec Králové*
 - SEDLÁK, V. *Obtížně léčitelné astma v mlze. I. Kongres České pneumologické a ftizeologické společnosti a XVI. Hradecké pneumologické dny, 20.-21.4.2013, Hradec Králové*
 - SEDLÁK, V. *U-BIOPRED – systematický přístup v poznání příčin těžkého astmatu. Konference České iniciativy pro astma. Mariánské Lázně, 24.10.2011*
 - SEDLÁK, V. *Poruchy dýchání ve spánku u obézních pacientů. 13. postgraduální kurz Sepse a MODS, Ostrava 25.1.2011*
 - SEDLÁK, V. *Léčba omalizumabem v ČR. XVII. kongres České pneumologické a ftizeologické společnosti, 24.6.2011, Plzeň*
 - SEDLÁK, V. *Obézní pacient před propuštěním z intenzivní péče. XVIII. kongres České společnosti anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Praha, 6.10.2011*
 - SEDLÁK, V. *Hemoptýza v intenzivní péči, V. kongres České společnosti intenzivní medicíny. Praha, 11.5.2011*
 - SEDLÁK, V. *Difficult-to-control-asthma. 1st School AR, European school of allergology, Praha, 11.3.2011*
 - SEDLÁK, V., PARÁKOVÁ, Z. *Vliv pohlaví na výskyt komorbidit a ovlivnění klinického fenotypu u pacientů s obtížně léčitelným astmatem. XVII. Moravskoslezské pneumologické dny, Olomouc, 17.-18.10.2008*
 - SEDLÁK V. *Komplikující faktory obtížně léčitelného astmatu. Možnosti multicentrické spolupráce v rámci Národního centra pro těžké astma. XIII. kongres České a Slovenské pneumologické a ftizeologické společnosti, Hradec Králové, 15.-18.6.2006*
 - SEDLÁK V. *Plicní manifestace ANCA-asociovaných vaskulitid, XIII. kongres České a Slovenské pneumologické a ftizeologické společnosti, Hradec Králové, 15.-18.6.2006*
 - SEDLÁK, V., KOBLÍŽEK, V., NOVOTNÝ, J., VIŽĎA, J., SALAJKA, F. *Je diagnostika plicní embolie u pacientů s bronchiální obstrukcí obtížnější ? XII. kongres Slovenské a České pneumoftizeologické společnosti s mezinárodní účastí, Nitra, Slovensko 6.6.2004*