

V Brně 2. Srpna 2013

**OPONENTSKÝ POSUDEK DOKTORANDSKÉ DISERTAČNÍ PRÁCE
MUDR. VRATISLAVA SEDLÁKA****Sledování ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechaného
vzduchu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem****Autor disertace:** MUDr. Vratislav Sedlák
Plicní klinika, LF UK v Hradci Králové, Fakultní nemocnice Hradec Králové**Oponentka:** Prof. MUDr. Jana Skříčková, CSc.
Klinika nemocí plicních a tuberkulózy LF MU a FN Brno

Oponovaná práce je závěrem doktorského studia MUDr. Vratislava Sedláka. Byla vypracovaná v rámci postgraduálního studia na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové pod vedením doc. MUDr. Františka Salajky, CSc.

Podnětem k vypracování práce se zaměřením na těžké refrakterní astma je vlastní zkušenost autora s těmito nemocnými. Charakteristický pro refrakterní astma je chronický zánět dýchacích cest s bronchiální hyperreaktivitou a reverzibilní bronchiální obstrukcí, který vede k epiteliální deskvamaci, nadprodukcí hlenu a remodelaci dýchacích cest. Důležitou roli v patogenezi astmatu hraje oxidativní stres, který může být vyvolán exogenně (expozicí environmentálním zdrojům reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů) i endogenně (endogenním zdrojem oxidativního stresu u astmatu jsou reaktivní kyslíkové a dusíkové radikály, které vznikají v průběhu zánětu dýchacích cest). Standardizované metody ke sledování intenzity oxidativního stresu u astmatu nejsou doposud do klinické praxe zavedeny. Je standardizováno pouze měření intenzity eozinofilního zánětu u astmatu pomocí vyšetření koncentrace vydechaného oxidu dusnatého (NO), který má oxidační vlastnosti přímo nebo cestou svých dalších sloučenin (peroxynitrit). Koncentrace různých markerů oxidativního a nitračního stresu je možno zjistit v kondenzátu vydechaného vzduchu. Jde o neinvazivní metodu, při které je vydechaný vzduch ochlazován a kondenzuje na stěně sběrné nádoby. Následná analýza pomocí kapalinové/plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií umožňuje stanovit piko- až nano-molární koncentrace látek, které jsou obsaženy ve směsi vydechaného vzduchu a odráží tak informaci o složení tekutiny na povrchu epitelu dýchacích cest (epithelial lining fluid). Tato metoda je doposud využívána jen výzkumně přesto, že detekce konkrétního specifického poškození oxidativním a

nitračním stresem u astmatu v kondenzátu vydechaného vzduchu může být specifické pro konkrétní zánětlivý fenotyp astmatu a může tak pomoci k zavedení konkrétní fenotypově specifické léčby.

A právě jedním z cílů práce bylo nalezení rozdílů v koncentracích vybraných markerů oxidativního a nitračního poškození lipidů, bílkovin a nukleových kyselin u nemocných s těžkým refrakterním astmatem a u skupiny zdravých dobrovolníků. Dalším cílem bylo srovnání této metody s výsledky běžně klinicky užívaných metod k monitoraci zánětu a bronchiální obstrukce u těžkého refrakterního astmatu a snaha najít nové markery specifického poškození oxidativním stresem pro různé fenotypy těžkého refrakterního astmatu. Dále autor sledoval koncentrace ukazatelů oxidativního stresu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem ve vztahu k eozinofilii periferní krve a následně ve vztahu ke koncentraci vydechaného oxidu dusnatého. Autor se také zaměřil na vliv trvalé systémové kortikoterapie a vliv dalších klinických faktorů na koncentrace ukazatelů oxidativního stresu v kondenzátu vydechaného vzduchu u nemocných s těžkým refrakterním astmatem.

Soubor tvořilo 40 nemocných s těžkým refrakterním astmatem léčených ve specializované ambulanci pro tuto diagnózu. Kontrolní skupina byla složena z 19 zdravých dobrovolníků, nekuřáků, bez anamnézy alergie či astmatu. Ke zpracování výsledků byla použita data nemocných s těžkým refrakterním astmatem od roku 2006. V tomto období pacienti podstoupili standardní vyšetřovací program dle platného doporučeného postupu. 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 vydechaného 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). BALT 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. Autor dále sledoval další klinické parametry, které charakterizují fenotyp a tíži astmatu. Vzorky kondenzátu vydechaného vzduchu byly ihned po odběru zamrazeny do suchého ledu na teplotu -80st.C a byly následně zpracovány v Ústavu organické technologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze metodou kapalinové/plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. 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. Autor zvolil k porovnání správné statistické metody.

Autorovi se i na relativně malém souboru pacientů s těžkým refrakterním astmatem podařilo potvrdit význam sledování koncentrace vydechaného oxidu dusnatého (FeNO). I tato práce potvrdila, že jde o užitečný ukazatel, který při hodnotě > 30 ppb identifikuje pacienty s perzistujícím eosinofilním zánětem i přes podávanou protizánětlivou terapii. Tato skupina nemocných pak měla nejtěžší bronchiální obstrukci, plicní hyperinflaci a častější exacerbace astmatu. Autor prokázal, že eozinofilie periferní krve může být důležitým ukazatelem nedostatečně kontrolovaného systémového eosinofilního zánětu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem. Hodnota eozinofilie periferní krve >4% upozornila na nemocné s vyšším výskytem exacerbací astmatu, vyšší hyperinflací a výraznějším eosinofilním zánětem bronchiální stěny (měřeným metodou FeNO). Eozinofilie periferní krve korelovala s eozinofilií v bronchoalveolární tekutině a s hodnotou FeNO. Zjištění autora, že se výsledky měření FeNO a eozinofilie periferní krve velmi dobře doplňují a mohou přinést lékařům důležitou informaci o nedostatečné kontrole eosinofilního zánětu u refrakterního těžkého astmatu, je velmi podstatné pro klinickou praxi. Právě tato skupina nemocných má zisk z navýšení protizánětlivé léčby buď o systémové kortikoidy nebo o biologickou anti-eozinofilní léčbu. U pacientů se zvýšením obou parametrů je naopak zapotřebí ověřit spolupráci pacienta s léčbou a dodržování režimových opatření.

Výsledky práce prokázaly schopnost analýzy oxidačních a nitračních produktů v kondenzátu vydechaného vzduchu odlišit nemocné s astmatem od zdravých dobrovolníků. V kondenzátu vydechaného vzduchu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem byla 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.

Autor správně upozorňuje na to, že odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu je neinvazivní, snadno proveditelné vyšetření, které může v budoucnu přispět především k upřesnění diagnostiky a léčby nejen astmatu, ale i dalších plicních nemocí.

Všechny použité vyšetřovací metody a zvolené statistické metody považuji za správné vzhledem k řešené problematice.

Práci velmi obohatilo dostatečné množství tabulek a velmi názorných grafů i fotografická dokumentace.

Za velmi podstatné a nové pro praxi i další výzkum považuji především zjištění, že se výsledky měření FeNO a eozinofilie periferní krve velmi dobře doplňují a mohou přinést lékaři důležitou informaci o nedostatečné kontrole eozinofilního zánětu u refrakterního těžkého astmatu, což je velmi podstatné pro klinickou praxi. Dále považuji za přínosné zjištění, že výsledky práce prokázaly schopnost analýzy oxidačních a nitračních produktů v kondenzátu vydechovaného vzduchu odlišit nemocné s astmatem od zdravých dobrovolníků.

Práce splnila cíl. Autor prokázal, že je zdatný jak v klinické praxi, tak při výzkumné práci, která velmi podrobně řeší aktuální problematiku. Způsob zpracování tématu svědčí o tom, že autor má velmi hluboké teoretické i praktické znalosti v oblasti bronchiálního astmatu. Dokázal při klinické práci i velmi dobře zorganizovat výzkum a výsledky výzkumu objektivně vyhodnotit. Práce je velmi dobře dokumentována, je přehledná a srozumitelná. Jedná se o práci, která je určitě začátkem dalšího výzkumu a publikací. Přílohou práce je i seznam publikovaných prací autora souvisejících s tématem, který odpovídá požadavkům na publikace v průběhu postgraduálního studia.

Práce i předložený seznam publikací jednoznačně vyhovují předpisům pro disertační práce a postgraduální studium. Navrhuji tuto práci přijmout k obhajobě a v případě úspěšné obhajoby udělit MUDr. Vratislavovi Sedlákovvi akademický titul doktor ve zkratce Ph.D. dle paragrafu 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

Prof. MUDr. Jana Skříčková, CSc.