

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

DISERTAČNÍ PRÁCE

Marian Šenkeřík

2017

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program

Pediatric

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

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

MUDr. Marian Šenkeřík

Školitel: Doc. MUDr. Jiřina Chládková, Ph.D.

Hradec Králové, 2017

Obhajoba dne:

Prohlášení autora:

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

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

Hradec Králové, 25.1.2017**Marian Šenkeřík**

Poděkování

Poděkování patří mým pre i postgraduálním učitelům, kteří ve mně probudili zájem o medicínu, následně o pediatrii. Všem kolegům, jimž jsem doposud měl možnost naslouchat a učit se od nich. Snad jsem zachytil alespoň zlomek jejich moudrosti a umění.

Poděkování patří mé školitelce paní Doc. MUDr. Jiřině Chládkové, Ph.D., ale i jejímu manželovi Doc. Ing. Jaroslavu Chládkovi Ph.D., bez jejichž pomoci a laskavého vedení by tato práce nikdy nevznikla. Jsou pro mě vzorem laskavosti a velkomyslnosti.

V neposlední řadě patří poděkování mým rodičům za neutuchající podporu a mé rodině za jejich toleranci a většinou jen tichý nesouhlas s mými četnými aktivitami nad rámec běžných pracovních povinností v nemocnici. Jsou ti nejdůležitější v mém životě.

Obsah

Použité zkratky	7
1. Úvod do problematiky	
1.1. Etiologie astmatu	9
1.2. Etiopatogeneze alergického zánětu	9
1.3. Diagnostika a léčba dětského astmatu	10
1.4. Inflamometrické metody	11
1.4.1. Stručný přehled biochemie a fyziologie oxidu dusnatého v dýchacích cestách	12
1.4.2. Anatomické oblasti dýchacích cest jako zdroje NO ve vydechovaném vzduchu	14
1.4.3. Modely pro přestup NO do vzduchu vydechovaného ústy	15
1.4.4. Metody výpočtu parametrů přestupu NO do vydechovaného vzduchu vycházející z dvoukompartmentového modelu	19
1.4.5. Praktické využití vyšetření FENO u astmatu	22
1.4.6. Možný přínos vyšetřování bronchiálního a alveolárního NO	23
2. Cíle práce	
2.1. Cíle disertační práce	25
2.2. Hypotézy	26
3. Metody	
3.1. Soubory nemocných	27
3.2. Vyšetření koncentrace exhalovaného oxidu dusnatého a odhad parametrů přestupu NO do vydechovaného vzduchu	27
3.3. Alergologická vyšetření	28
3.4. Statistické vyhodnocení	28
4. Výsledky	
4.1. Porovnání vyšetření alveolární koncentrace NO (C_{ANO}) a bronchiálního toku NO (J_{awNO}) metodami podle Pietropaoliho (metoda P) a Tsoukiase (metoda T), určení optimálního rozmezí výdechových koncentrací a jejich minimálního potřebného počtu	29
4.2. Odhad parametrů dvoukompartmentového modelu nelineární regresní analýzou	36
4.3. Porovnání optimálních rozmezí výdechových rychlostí pro vyšetření C_{ANO} a J_{awNO} u nemocných s alergickým astmatem (AA) a alergickou rýmou (AR). Ověření možného vlivu výdechových rychlostí na rozdíly zjištěné mezi výsledky u pacientů s alergickým astmatem a alergickou rýmou.	37
4.4. Vliv výdechové rychlosti na odhad parametrů	39
4.5. Odhad všech parametrů dvoukompartmentového modelu kombinací metod podle	

Tsoukiase (metoda T) a Högmanové	43
4.6. Diagnostický přínos FENO a parametrů přestupu NO do vydechovaného vzduchu pro odlišení dobré a nedostatečné kontroly nad astmatem	49
5. Diskuze	51
6. Závěry ke splnění stanovených cílů práce	61
7. Souhrn	63
8. Summary	65
9. Použitá literatura	67

Použité zkratky:

AA...alergické astma

ABK+...astma bronchiale s dobrou kontrolou

ABK-...astma bronchiale s nedostatečnou kontrolou

ACT...asthma control test, test kontroly nad astmatem

AR...alergická rýma

ATS ...American Thoracic Society

AUC...area under curve – „plocha pod ROC křivkou“

C_ANO...alveolární koncentrace oxidu dusnatého

C_{aw}NO...koncentrace oxidu dusnatého ve stěně průdušek

D_{aw}NO...koeficient difuze oxidu dusnatého stěnou průdušky

eNOS, NOS-III...endoteliální syntáza oxidu dusnatého

ERS ...European Respiratory Society

FEV₁...usilovná vitální kapacita za 1 sekundu

FENO...koncentrace NO vyjádřená jako objemová frakce NO

FENO₅₀...koncentrace NO měřená při výdechové rychlosti 50 ml/s

GINA...Global Initiative for Asthma

GTP...guanosintrifosfát

H1AH...H1-antihistaminika

IFN- γ ...interferon γ

IL-1 β ...interleukin 1 β

IL-4...interleukin 4

IL-5...interleukin 5

IL-13...interleukin 13

IKS...inhalační kortikosteroidy

iNOS, NOS-II...indukovatelná forma syntázy oxidu dusnatého

J_{aw}NO...příspěvek bronchiálního oxidu dusnatého

LTB₄...leukotrien B₄

MCP...monocytový chemotaktický protein

MIP3 α ...monocytový inhibiční protein

NK- κ B...nukleární faktor κ B

nKS...nosní kortikosteroidy

NO...oxid dusnatý

NOS...syntáza oxidu dusnatého

nNOS, NOS-I...neuronální syntáza oxidu dusnatého

ppb...parts per billion, tj. jeden nanolitr oxidu dusnatého v jednom litru vzduchu

ROC analýza...Receiver Operating Characteristic Curve, analýza vztahu senzitivity a specificity testu

SE...směrodatná odchylka

SPT...kožní prick test

SLIT...sublinguální alergenová imunoterapie

TNF- α ...tumor nekrotizující faktor α

Th-1, Th-2 lymfocyty...pomocné T lymfocyty typ 1, typ 2

V_{aw}...objem dýchacích cest

\dot{V}_E ...množství oxidu dusnatého vydechnuté za jednotku času

ZAt+...zdravý proband s atopií

ZAt-...zdravý proband bez atopie

1. Úvod do problematiky

Průduškové astma je heterogenní onemocnění charakterizované chronickým zánětem a remodelací průdušek. Chronický zánět vede k průduškové hyperreaktivitě a variabilní, obvykle reverzibilní, obstrukci průdušek. Mezi typické klinické příznaky v dětském věku patří opakující se epizody pískotů, dráždivého kašle, pocitu tlaku na hrudníku a dušnosti. Astma je nejčastějším chronickým onemocněním dětského věku. Počet astmatiků se v celosvětovém měřítku odhaduje na 300 miliónů. Incidence astmatu se v posledních letech významně zvýšila i v České republice. Naopak příznivý je pokles úmrtnosti na astma [1], který je připisován přesnější diagnostice, účinné farmakoterapii včetně propracované stupňové strategii léčby a v neposlední řadě i většímu povědomí o astmatu u odborné i laické veřejnosti.

1.1. Etiologie astmatu

Astma je onemocněním, jehož přesný spouštěcí mechanismus není znám. Hlavním rizikovým faktorem je atopie (geneticky podmíněná dispozice k tvorbě specifických IgE protilátek) a další alergická onemocnění (atopická dermatitida a alergická rýma). Genetická dispozice stojí na počátku zánětlivé reakce, kterou pak následně modifikují faktory zevního prostředí, epigenetika a prodělané infekce dýchacích cest. Výsledkem jejich spolupůsobení je průdušková hyperreaktivita a klinické známky průduškové obstrukce.

1.2. Etiopatogeneze alergického zánětu

Zánětlivá reakce byla prokázána u všech forem astmatu a ve všech věkových kategoriích. Na začátku se uplatňuje relativní převaha Th2 nad Th1 typem imunitní odpovědi na antigen. Tato nerovnováha vyústí ve zvýšené tvorbě specifických IgE protilátek. Přemostěním dvou molekul IgE antigenem/alergenem dochází k následné degranulaci mastocytů a uvolnění mediátorů časné fáze zánětu. Cysteinylové leukotrieny, histamin a prostaglandin D₂ jsou nejdůležitější látky v akutní fázi zánětlivé reakce, které se projevuje otokem sliznice průdušek a hypersekrecí vazkého hlenu. Vcestováním buněk se rozbíhá druhá (pozdní fáze) zánětlivé reakce. Nejvíce zastoupenými typy buněk jsou eozinofilní a bazofilní granulocyty, lymfocyty a antigen prezentující buňky. Na influxu eozinofilních granulocytů se podílí především interleukin 5 (IL-5). Z aktivovaných eozinofilních granulocytů jsou uvolňovány prostaglandiny, cysteinylové leukotrieny, cytokiny a chemokiny (např. monocytový chemotaktický protein – MCP a monocytový inhibiční protein MIP3 α). Selektivní vychytávání eosinofilních granulocytů do dýchacích cest je vyvoláno Th2 zprostředkovanou reakcí eotaxinu z rodiny chemoatraktantů (eotaxin-1/CCL11, eotaxin-2/CCL24 a eotaxin-3/CCL26), působících prostřednictvím CCR3 chemokinového receptoru [2]. Eotaxin se z velké části tvoří v

epitelových buňkách v odpovědi na IL-13 a IL-5. Důsledkem vysokých koncentrací těchto látek je stah hladkého svalu v průduškové stěně a toxické poškození celé stěny průdušky s její následnou remodelací. Remodelace dýchacích cest u astmatu je dlouho známý fenomén. Klinické studie u dětí ukázaly, že remodelace průdušek není děj sekvenční, ale paralelní se zánětlivou reakcí. Může probíhat skrytě, a to dokonce před klinickou manifestací astmatu. Remodelace průduškové stěny je již známkou přechodu astmatu do chronicity a je farmakologicky obtížně ovlivnitelná [2].

1.3. Diagnostika a léčba dětského astmatu

Komplexní souhrn diagnostických i léčebných postupů je uveden v mezinárodně uznávaném dokumentu GINA [3]. Tento dokument se odděleně zabývá problematikou opakovaných pískotů při dýchání ve skupině dětí mladších 5 let a u starších dětí. Stanovení diagnózy astmatu u dětí mladších 5 let je obtížnější, protože typické příznaky jako jsou pískoty při dýchání a dráždivý kašel se objevují často při akutních respiračních infekcích. Pokud se ale obstrukční příznaky při dýchání vyskytují i mimo akutní infekce dýchacích cest (např. fyzická námaha, smích, pláč) a rodiče či sourozenci mají alergické onemocnění, jedná se velmi pravděpodobně o průduškové astma.

Podrobně je v dokumentu rozpracována léčba. V akutní fázi bronchospazmu je kladen důraz na inhalační podání krátkodobě působících beta2mimetik a správný způsob inhalační techniky s využitím inhalačních nástavců s maskou nebo náustkem. Pro případ akutního zhoršení astmatu je doporučeno sestavení písemného plánu léčby s podrobným rozpisem navyšování dávek léčivých přípravků. Nedílnou součástí dokumentu je preventivní (stupňová) léčba astmatu – navyšování (step-up), či naopak snižování (step-down) dávky inhalačních kortikosteroidů (IKS) podle vývoje klinického stavu pacienta. Farmakoterapie musí být přehodnocována při každém vyšetření dítěte. Cílem je dosáhnout dobré kvality života, předcházet astmatickým záchvatům a zabránit omezení běžných aktivit. Současně je třeba snížit riziko poškození zdraví astmatika nadměrnou léčbou (over-treatment).

V každodenní alergologické praxi se k usnadnění rozhodnutí o včasném zahájení preventivní terapie IKS u dětí v prvních 5 letech života požívají mezinárodně uznávané diagnostické postupy, podle nichž lze ze skupiny dětí s recidivujícími pískoty při dýchání vyčlenit ty, které mají vysokou pravděpodobnost astmatu. Nejčastěji je používán klinický index podle Castro-Rodrigueze, který se opírá o důkladnou anamnézu (tab.1).

Tabulka 1. Klinický index podle Castro-Rodrigueze

Velká kritéria	Malá kritéria
1. ověřené astma u rodičů 2. ověřená atopická dermatitida u dítěte	1. ověřená alergická rýma u dítěte 2. pískoty mimo respirační infekce 3. eozinofilie ($\geq 4\%$)
Přítomnost nejméně jednoho z velkých kritérií nebo dvou z malých kritérií u dítěte s obstrukčními příznaky při dýchání ukazuje na vysoké riziko astmatu.	Při první obstrukční příhodě a splněných kritériích je relativní riziko 2,6-5,5. Při opakovaných obstrukcích 4,3-9,8.

Mezi hlavní diagnostická kritéria u dítěte s opakovanou průduškovou obstrukcí patří výskyt astmatu u rodičů a atopická dermatitida u dítěte. K malým kritériím se řadí pískoty mimo respirační infekce, ověřená alergická rýma u dítěte a eozinofilie. Pravděpodobnost astmatu je zvýšená u dětí, které mají epizody pískotů častěji než jednou měsíčně, kašel nebo pískoty jsou vyvolány tělesnou námahou, noční kašel se vyskytuje mimo období virových respiračních infekcí, chybí významnější sezónní variabilita ve výskytu příznaků (převládající obtíže v chladných měsících roku) a příznaky přetrvávají po třetím roce věku.

Mezi podmínky úspěšné terapie u dětí v prvních letech života s vysokým rizikem astmatu patří nejen terapeutický pokus s IKS, ale také pravidelné zhodnocení přínosu léčby. Důležitá je edukace rodičů a dětí ve správné inhalační technice a vysvětlení léčebného postupu včetně úpravy farmakoterapie při zhoršení kontroly nad astmatem. Cílem je získat rodiče k dlouhodobé spolupráci. Prospěšná jsou režimová opatření a úpravy bytového prostředí, která vedou ke snížené expozici alergenům bytového prostředí a dráždivým látkám (cigaretový kouř).

Diagnóza astmatu u dětí starších 4 let (výjimečně i mladších), které dobře spolupracují při spirometrickém vyšetření, vychází stejně jako u dospělých ze zhodnocení příznakového skóre, plicní funkce a průkazu její reverzibility. K průkazu eozinofilního zánětu v dýchacích cestách u pacientů s podezřením na průduškové astma a k monitorování protizánětlivého účinku dlouhodobé farmakoterapie IKS lze nově využít i měření koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého.

1.4. Inflamometrické metody

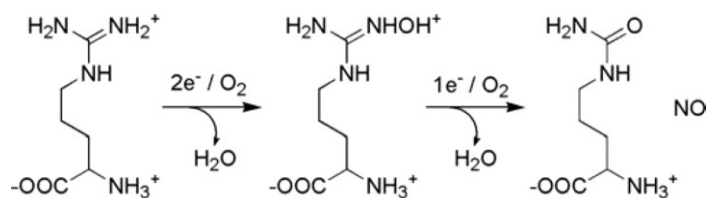
V současné době je důraz kladen na nalezení objektivních ukazatelů intenzity zánětu jako známky kontroly nemoci na úrovni tkání a buněk, přítomných v dýchacích cestách. Zánětlivý proces u astmatiků postihuje dýchací cesty v celém jejich průběhu – od centrálních dýchacích cest, až po nejmenší bronchy s průměrem pod 2 mm. Tuto periferní část bronchiálního stromu nazýváme malými (periferními) dýchacími cestami. V posledních letech se objevují nové poznatky o vlivu těchto malých dýchacích cest na klinický průběh i jejich úlohu v patogenezi astmatu. Byly již vyvinuty technologie umožňující farmakoterapeuticky zasáhnout v anatomicky nejmenších dýchacích cestách. V současné době je diskutována možnost přínosu této léčby pro pacienty s obtížně farmakologicky

kontrolovatelným astmatem, nebo pro nemocné vyžadující vysoké dávky IKS. Nové metody léčby a nový pohled na malé dýchací cesty vedly k oživení zájmu o možnost jejich zobrazení, či hodnocení pomocí nepřímých ukazatelů. Plicní periferie je jen obtížně dostupná přímé vizualizaci při bronchoskopii, přímé hodnocení je tedy možné pouze za pomoci invazivních metod (plicní biopsie, chirurgická resekce). Tyto metody mají pro svoji invazivitu jen minimální praktickou využitelnost, proto je badatelské úsilí zaměřeno na vyšetřování materiálu získaného z dýchacích cest neinvazivními postupy. Vyšetření indukovaného sputa naráží na nezbytnou metodiku sekvenční indukce sputa k odlišitelnosti vzorků z centrálních a z periferních dýchacích cest. Problematická je standardizace i reprodukovatelnost postupu a absence studií srovnávajících výsledky zánětlivé aktivity ve vzorcích sputa s transbronchálními biopsiemi. Z neinvazivních metod se nabízí analýza kondenzátu vydechovaného vzduchu a analýza vlastního vydechovaného vzduchu. Vyšetření zánětlivých ukazatelů v kondenzátu z dýchacích cest nedokáže odlišit zdroj chemických substancí. Zatím jedinou neinvazivní metodou vyšetření zánětu v dýchacích cestách, již využívanou v praxi, je stanovení koncentrace oxidu dusnatého (NO) ve vydechovaném vzduchu (FENO) [4, 5, 6, 7]. Využitím metodiky vyšetření koncentrace NO při více výdechových rychlostech je možné odhadnout frakci NO pocházející z periferních dýchacích cest. Aktuálně je tímto směrem zaměřen výzkum s cílem ověření metodiky vyšetření, matematických modelů odhadu původu NO i komparace výsledků s klinickými projevy astmatu.

1.4.1. Stručný přehled biochemie a fyziologie oxidu dusnatého v dýchacích cestách

V roce 1980 byla zjištěna schopnost endoteliálních buněk produkovat vazodilatační látku s extrémně krátkým biologickým poločasem. O dalších 7 let později se podařilo prokázat, že touto látkou je oxid dusnatý (NO). Během několika následujících let byly NO připsány důležité funkce v mnoha orgánech lidského těla. V roce 1998 byla za objasnění funkcí NO v kardiovaskulárním systému udělena Nobelova cena za fyziologii a lékařství (Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, Ferid Murad). Alving v roce 1993 poprvé pozoroval zvýšenou koncentraci NO ve vydechovaném vzduchu u astmatiků [8]. O tři roky později byla publikována práce vyzdvihující pozitivní účinky NO u astmatiků [9]. Od té doby byly získány komplexní informace o metabolismu a účincích NO. V současnosti je obecně přijímáno, že NO má v dýchacích cestách účinky jak prospěšné (např. bronchodilatace, bronchoprotekce, vazodilatace, zvýšení plicní cirkulace a distribuce krve do ventilovaných oblastí plic, ochrana před patogenními mikroorganismy), tak i škodlivé (např. nitrační stres, prohloubení zánětu a přestavby DC).

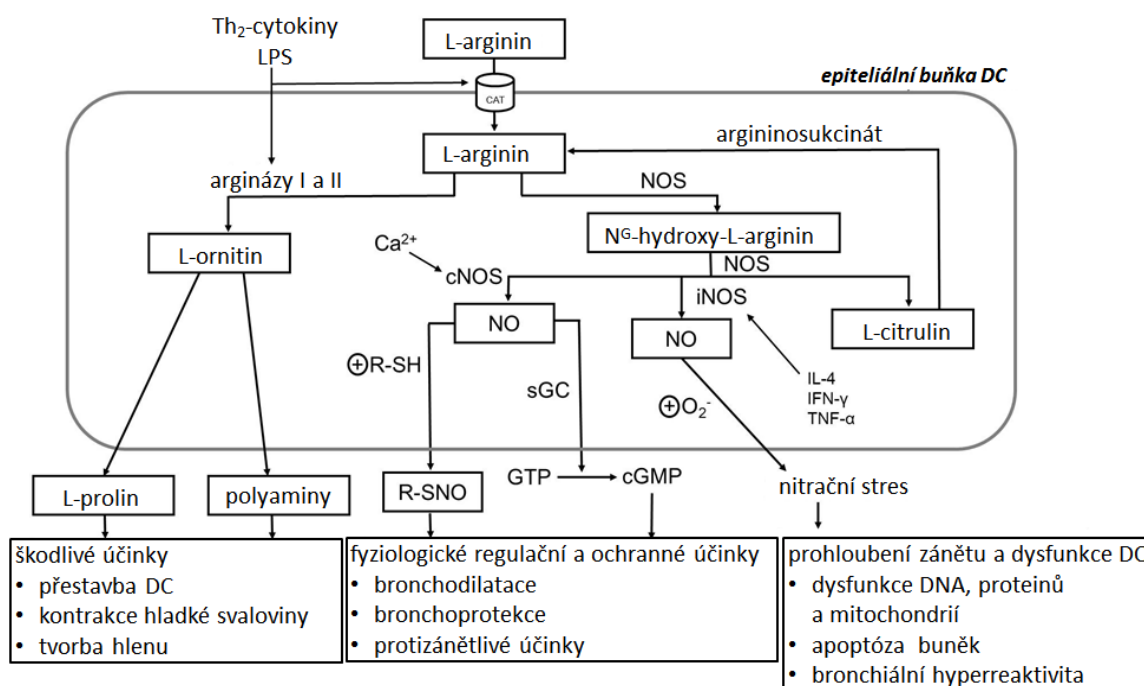
Molekula NO je tvořena z aminokyseliny L-argininu syntetázami NO (NOS) (obrázek 1) za spotřeby O₂. Dalším produktem reakce je L-citrulin. Jedná se o sled dvou monooxygenázových reakcí a meziproduktem je N^G-hydroxy-L-arginin. Jako kofaktory vystupují NADPH, 6(R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, FAD, FMN a kalmodulin.



Obrázek 1. Biosyntéza oxidu dusnatého

V současné době jsou popsány tři izoformy NOS: neuronální (nNOS, NOS I), indukovatelná (iNOS, NOS II) a endoteliální (eNOS, NOS III). Všechny NOS patří do rodiny hemoproteinů. Katalyzují oxygenaci L-argininu na L-citrulin molekulárním kyslíkem za účasti NADPH a uvolnění NO (obrázek 1). Tato reakce probíhá v mnoha tkáních a buňkách lidského těla v různé intenzitě a vzniklý NO má rozličné účinky na nejbližší cílové struktury. Isoformy s trvalou expresí (tzv. konstitutivní) nNOS a eNOS, které jsou pojmenovány podle přednostního (ale nikoli výhradního) místa výskytu v organismu, mají receptorově řízenou aktivitu. Tyto enzymy tvoří krátké pulzy nízkých koncentrací NO, působícího v místě vzniku jako mediátor buněčné signalizace. K velmi rychlým změnám jejich aktivity primárně dochází po vazbě komplexu Ca-kalmodulin na molekulu enzymu, tj. vlivem intracelulární koncentrace iontu Ca^{2+} . Enzym iNOS, zodpovědný za syntézu vysokých koncentrací NO (≥ 1000 -krát převyšujících produkci NO konstitutivními isoformami), má aktivitu závislou na expresi enzymu v příslušné tkáni nebo cirkulujících buňkách, která není trvalá a mění se v závislosti na syntéze a degradaci iNOS pomalu (za hodiny až dny). Výjimkou jsou epitelie horních a dolních dýchacích cest, kde byla prokázána trvalá exprese iNOS.

V průběhu zánětu v dýchacích cestách je tvorba zvýšených koncentrací NO stimulována cytokiny IL-4 a IL-13, které jsou syntetizovány v Th-2 lymfocytech. Naprostá většina NO vzniká v důsledku katalytického účinku iNOS, extenzivně exprimované v epitelu dýchacích cest. Příspěvek ostatních izoform NOS ke koncentraci NO ve vydechaném vzduchu je prakticky zanedbatelný [10]. Tvorba NO v dýchacích cestách je u eozinofilního astmatu udržována také dalšími prozánětlivými působky (např.: $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$) a především $\text{INF-}\gamma$, syntetizovaném v Th-1 lymfocytech (obrázek 2).



Obr. 2. Stručný přehled metabolismu a účinků NO v dýchacích cestách (podle Kim HB et al. Allergy Asthma Immunol Res. 2016) *Legenda: L-arginin je transportován do buňky membránovými přenašeči pro kationické aminokyseliny (CAT). Syntázy NO (NOS) jej přeměňují na L-citrulin a NO. Po vzestupu koncentrace Ca²⁺ v buňce se aktivují konstitutivní isoformy cNOS. Vzniklý NO rychle reaguje s nízkomolekulárními i vysokomolekulárními thioley (R-SH) za vzniku biologicky aktivních S-nitrosothiolů (R-SNO), které jsou schopny NO zase uvolnit. NO se váže na cytosolickou formu guanylát cyklasy (sGC) a enzym aktivuje. Důsledkem je zvýšená přeměna guanosintrifosfátu (GTP) na cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), důležitý mediátor zapojený do mnoha intracelulárních dějů (tzv. druhý posel). Prozáňtlivé cytokiny IL-4, interferon-γ (IFN-γ) a tumory nekrotizující faktor alfa (TNF-α) aktivují transkripční faktory a zvyšují syntézu indukovatelné formy NOS (iNOS). Vysoké koncentrace NO tvořené iNOS působí dlouhou dobu a reagují např. se superoxidovými radikály (O₂⁻) a ionty přechodných kovů. Peroxodusitan a další reaktivní sloučeniny dusíku vytvářejí nitrační stres a poškozují biomolekuly nitrací. O společný substrát L-arginin kompetují s NOS arginázy I a II, které katalyzují vznik L-ornithinu, dále metabolizovaného na polyaminy a L-prolin, tj. molekuly podporující tvorbu kolagenu a tím fibrogenezi. [11].*

1.4.2. Anatomické oblasti dýchacích cest jako zdroje NO ve vydechovaném vzduchu

Tvorba a uvolňování NO nejsou ve všech anatomických oblastech dýchacích cest stejné. Ve srovnání s bronchiálním stromem byla potvrzena výrazně vyšší exprese enzymu iNOS v epitelu dutiny nosní a vedlejších nosních dutin a tomu odpovídají řádově vyšší koncentrace NO. U astmatiků je diagnosticky přínosné vyšetření koncentrace NO z dolních dýchacích cest ve vzduchu vydechovaném ústy (FENO). Příspěvek horních dýchacích cest jako zdroje NO při vyšetření FENO je minimalizován technikou vyšetření, kdy při výdechu konstantní rychlostí ústy proti odporu se uzavře velum. V praxi se již delší dobu používá metoda měření FENO při výdechové rychlosti 50 ml/s. Kvantifikuje především NO

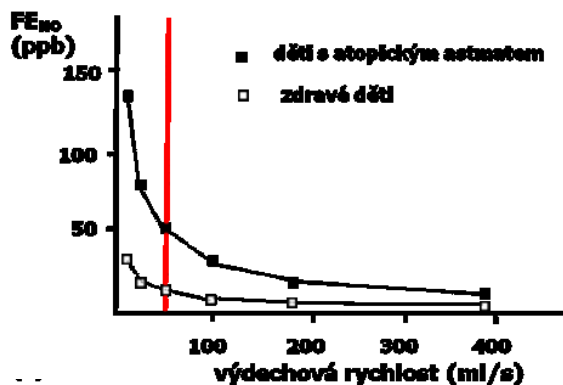
vytvořený v bronchiální stěně a uvolněný do lumen bronchu. Metoda je standardizovaná a je přínosná pro diagnostiku a monitorování léčby astmatu [12]. Ve druhé polovině 90. let byly publikovány práce o zánětlivých změnách u astmatu v centrálních i periferních dýchacích cestách. Tyto studie využívající resekovanou plicní tkáň a bronchiální biopsie prokázaly zánětlivé a strukturální změny v malých dýchacích cestách, stejné jako ve velkých dýchacích cestách [13, 14, 15, 16, 17]. Invazivnost těchto metod vylučuje jejich použití v běžné klinické praxi, proto bylo nezbytné začít hledat korelát těchto metod v neinvazivních metodách vyšetření zánětu. Pozornost se zaměřila na kvantifikaci NO uvolňovaného v bronších a alveolech, která spočívá ve vyšetření FENO při více výdechových rychlostech a v aplikaci modelů pro přestup NO do vydechovaného vzduchu.

1.4.3. Modely pro přestup NO do vzduchu vydechovaného ústy

Celková koncentrace FENO ve vydechovaném vzduchu z dolních dýchacích cest je součtem alveolární koncentrace NO a koncentrace určené bronchiálním zdrojem NO. První je nezávislá na výdechové rychlosti, zatímco druhá s rostoucí výdechovou rychlostí klesá. Na rozdíl od koncentrace jiných plynů (např. CO₂) se tak hodnota FENO exponenciálně snižuje při zvyšující se výdechové rychlosti. Dobrá kontrola výdechové rychlosti při vyšetření je základním předpokladem reprodukovatelnosti vyšetření FENO. Stěna bronchů, především epitel bronchiálního stromu, obsahuje vysoké koncentrace NO (C_{aw}NO). Jde řádově o stovky ppb (parts per bilion). NO difunduje radiálně mezi stěnou a lumen bronchu a převažující směr pohybu je ve směru koncentračního gradientu (koncentrace v průduškové stěně > koncentrace v lumen), tj. ze stěny do lumen. Alveolární koncentrace NO (C_ANO) je nízká z důvodu: 1/nízké rychlosti tvorby NO v alveolech, 2/ rychlého prostupu NO alveolokapilární membránou a 3/ jeho následné degradace metabolickými ději v krvi.

S klesající výdechovou rychlostí se více uplatňují průdušky jako zdroj NO. Nárůst hodnoty FENO je patrný zejména při rychlostech nižších než 100 ml/s. Při výdechové rychlosti 50 ml/s se průdušky v průměru podílejí na vydechovaném množství NO z 80% a 20% připadá na alveoly. Naopak při stoupající výdechové rychlosti klesá relativní podíl bronchiálního příspěvku na vydechovaném množství NO a FENO se více blíží nízké koncentraci v alveolech (obrázek 3).

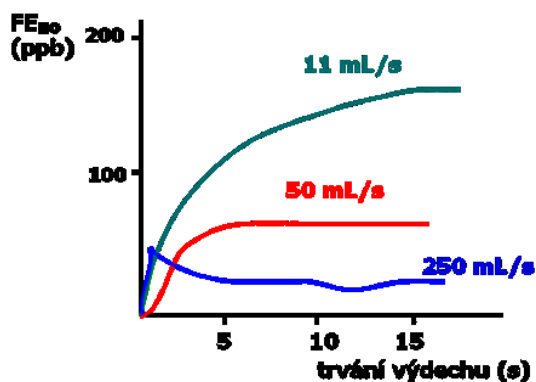
křivka FE_{NO} -výdechová rychlost



Obrázek 3: Exponenciální závislost Křivka koncentrace FENO na výdechové rychlosti. Děti s atopickým astmatem vydechují vyšší koncentrace FENO než zdravé děti. Červená linie ukazuje výsledky při výdechové rychlosti 50 ml/s.

Rozsah běžně užívaných výdechových rychlostí se pohybuje mezi 30-300ml/s [18]. Ke stanovení koncentrace NO při dané výdechové rychlosti je nutné udržet stabilní výdechovou rychlost po dobu, než se ustálí koncentrace FENO. S klesající výdechovou rychlostí se časový interval od zahájení výdechu po dosažení ustálené koncentrace FENO prodlužuje (obrázek 4). Udržení konstantní výdechové rychlosti v oblasti nízkých i vysokých výdechových rychlostí je pro děti předškolního a mladšího školního věku obtížné. V důsledku nedodržení podmínek měření často selhává. S narůstajícím počtem použitých rychlostí hrozí negativní vlivy únavy a ztráty koncentrace dětských astmatiků na kvalitu provedení vyšetření FENO.

křivka FE_{NO} -čas

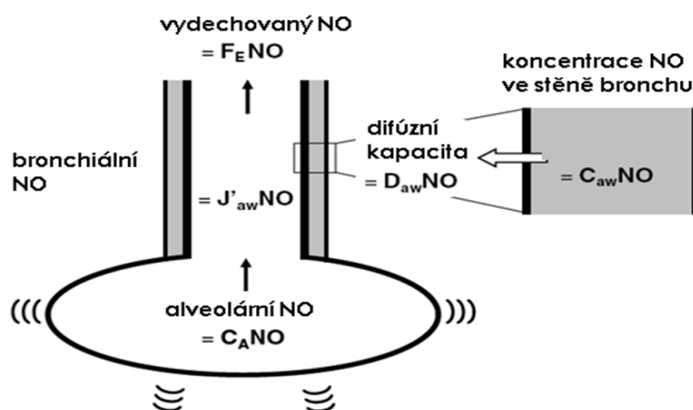


Obrázek 4: Závislost koncentrace FENO na čase po zahájení výdechu konstantní rychlostí. Ustálení koncentrace FENO vyžaduje při klesající výdechové rychlosti stále delší časový interval.

Nejjednodušší model, který kvantitativně vystihuje přestup NO do vydechovaného vzduchu je dvoukompartmentový model, který plicí a dolní dýchací cesty pojímá jako dva prostory, tzv.

kompartenty, ve kterých dochází k pohybu NO prouděním a difúzí (obrázek 5) [5]. Tento model je dnes akceptován jako přijatelné zjednodušení složitých procesů v dolních dýchacích cestách. Dýchací cesty jsou vnímány jako „rigidní trubky“ s „flexibilním balonem“ s velkým objemem, představujícím alveolární prostor. Model uvažuje pouze radiální difúzi NO, tj. vychází pouze z pohybu molekul ze stěny do lumen bronchu a zpět. Zcela ignoruje fakt, že v dýchacích cestách dochází i k axiální difúzi NO. Jde o pohyb z míst o vyšší koncentraci NO ve vyšších (proximálních) etážích průduškového stromu směrem distálně.

V alveolárním kompartmentu s velkým a proměnným objemem vzduchu se koncentrace NO při respiraci cyklicky mění. Její průměrná hodnota v čase je nízká především z důvodu nízké rychlosti tvorby NO v alveolárním kompartmentu a rychlého prostupu NO včetně inhalovaného množství NO alveolokapilární membránou včetně následného efektivního odstraňování NO z krve metabolickými ději.



Obrázek 5: Dvoukompartmentový model zdrojů NO v dýchacích cestách a přestupu NO do vydechovaného vzduchu. Symboly: $F_{E}NO$ – koncentrace oxidu dusnatého ve vydechovaném vzduchu, $C_A NO$ – alveolární koncentrace oxidu dusnatého, $J_{aw} NO$ – bronchiální tok NO (množství NO difundující do lumen z bronchiální stěny za jednotku času, $C_{aw} NO$ – koncentrace NO ve stěně bronchů $D_{aw} NO$ – difúzní kapacita pro NO

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

$$F_{E}NO = C_{aw}NO + (C_A NO - C_{aw}NO) \times e^{-(D_{aw}NO / \dot{V}_E)} \quad (1)$$

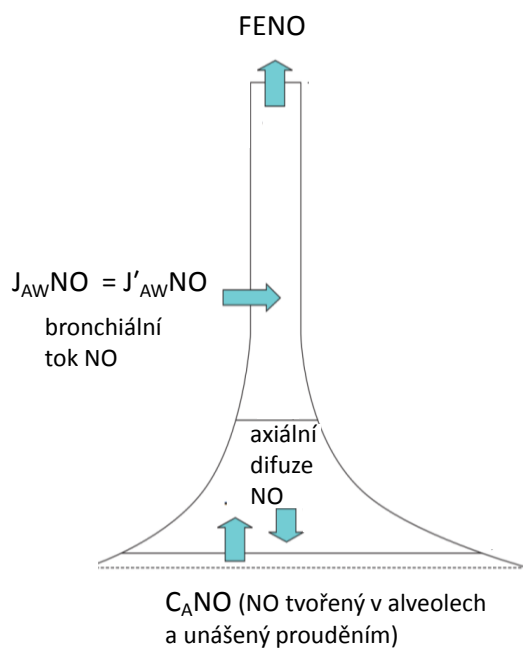
kde e je základ přirozeného logaritmu, $D_{aw}NO$ difúzní kapacita bronchiální stěny pro radiální difúzi NO, $C_A NO$ alveolární koncentrace NO a $C_{aw}NO$ koncentrace NO ve stěně bronchů.

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

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

$$FENO = J'_{aw}NO / D_{aw}NO + (C_{A}NO - J'_{aw}NO / D_{aw}NO) \times e^{- (D_{aw}NO / \dot{V}_E)}$$
 (1B)

Modelem, který více respektuje anatomické poměry v dýchacích cestách než dvoukompartmentový model, je trumpetový model dýchacích cest a přestupu NO do vydechovaného vzduchu (obrázek 6). Rozdíl je především v zohlednění „trumpetového“ tvaru dýchacích cest a axiální difuze NO v dýchacích cestách, zatímco dvoukompartmentový model v rámci zjednodušení uvažuje válcový tvar. Model odpovídá rostoucímu součtu plochy všech dýchacích cest v určité vzdálenosti od ústní dutiny distálním směrem. Podporuje význam difuze NO , uvolněného ze stěny bronchů, distálním směrem až do alveolárního prostoru, tj. z místa vyšší do místa nižší koncentrace a proti směru unášení NO prouděním s vydechovaným vzduchem. Alveolární vzduch je tak obohacován o NO z bronchů. Při stejné koncentraci $FENO$ poskytuje aplikace trumpetového modelu s axiální difuzí oproti dvoukompartmentovému modelu vyšší hodnotu $J_{aw}NO$ a nižší hodnotu $C_{A}NO$ [19].



Obrázek 6: Trumpetový model dýchacích cest a přestupu NO do vydechovaného vzduchu. Symboly: $FENO$ – koncentrace oxidu dusnatého ve vydechovaném vzduchu, $C_{A}NO$ – alveolární koncentrace oxidu dusnatého, $J_{aw}NO$ – bronchiální tok NO (množství NO difundující do lumen z bronchiální stěny za jednotku času).

1.4.4. Metody výpočtu parametrů přestupu NO do vydechovaného vzduchu vycházející z dvoukompartimentového modelu

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

Oblíbené matematické metody podle Pietropaoliho (metoda P) a metoda podle Tsoukiase (metoda T) využívají lineární regresní analýzu [20, 21]. Při výdechových rychlostech 50 ml/s a vyšších, kdy obvykle $\dot{V}_E \gg D_{aw}NO$ (má být alespoň 10krát větší), je možné exponenciální závislost (1) nahradit lineární rovnicí:

$$FENO = C_{ANO} + (C_{aw}NO - C_{ANO}) \times D_{aw}NO / \dot{V}_E \quad (2)$$

Podmínkou pro další zjednodušení vztahu je, aby hodnota C_{ANO} byla mnohem nižší než poměr $J'_{aw}NO/D_{aw}NO$. Potom se ve vztahu (2) použije veličina maximální bronchiální tok NO (tj. maximální množství NO, uvolněné do lumen dýchacích cest za jednotku času):

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

a výsledkem je lineární závislost FENO na reciproké hodnotě výdechové rychlosti, se kterou pracovali Pietropaoli se spolupracovníky (metoda P, obrázek 7c, d):

$$FENO = C_{ANO} + J'_{aw}NO \times (1/\dot{V}_E). \quad (3)$$

Tsoukias se svými kolegy využili vztah mezi množstvím NO vydechnutým za časovou jednotku a výdechovou rychlostí (metoda T, obrázek 7a, b):

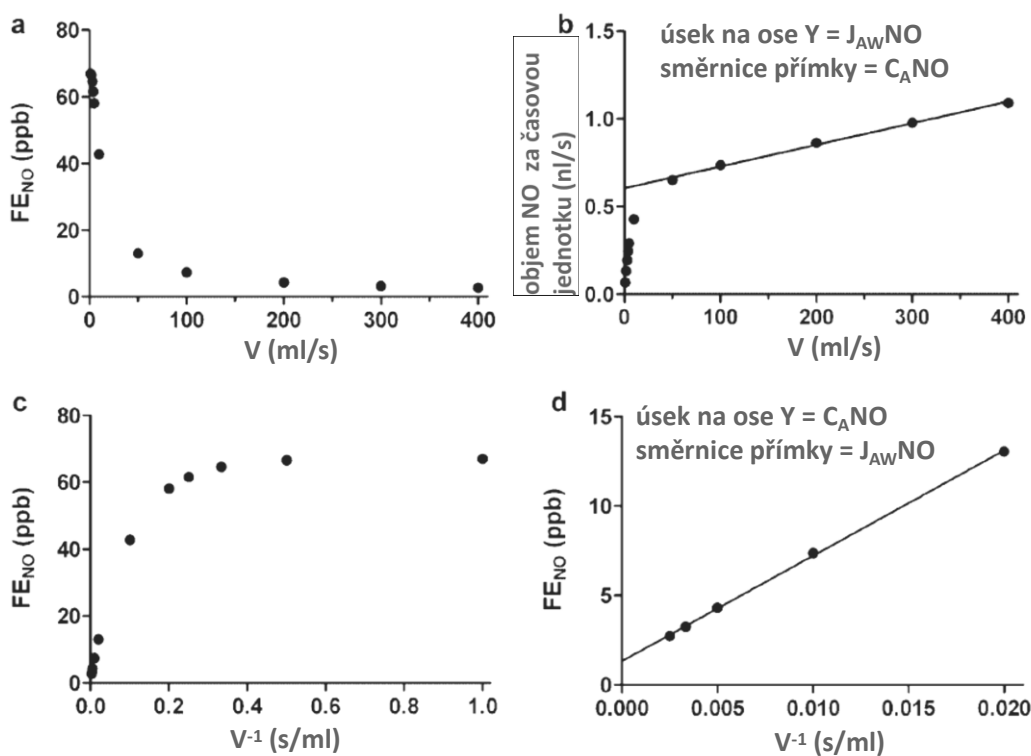
$$FENO \times \dot{V}_E = C_{ANO} \times \dot{V}_E + J'_{aw}NO \quad (4)$$

Parametry nezávislé na výdechové rychlosti C_{ANO} a $J'_{aw}NO$ je možné odhadnout lineární regresní analýzou závislostí metodami P, nebo T v intervalu vhodných výdechových rychlostí, kde je vztah mezi veličinami lineární.

Jiní autoři nahradili exponenciální člen ve vztahu (1) kvadratickým členem:

$$e^{-(D_{aw}NO/\dot{V}_E)} \approx 1 - D_{aw}NO/\dot{V}_E + \frac{1}{2} \times (D_{aw}NO/\dot{V}_E)^2$$

Výhoda postupu spočívá v méně přísných požadavcích na velikost výdechové rychlosti relativně k hodnotě $D_{aw}NO$, tj. v rozšíření platnosti vztahu i do oblasti nižších výdechových rychlostí [22].



Obrázek 7. Nelineární vztah mezi FE_{NO} a výdechovou rychlostí V (a), a mezi FE_{NO} a převrácenou hodnotou výdechové rychlosti (c) Odhad bronchiálního toku NO ($J_{aw}NO$) a alveolární koncentrace $C_{A}NO$ pomocí lineární regresní analýzy v lineárních oblastech závislostí metodami podle Tsoukiase (b) a Pietropaolliho (d). Data byla simulována s využitím rovnic dvoukompartimentového modelu a hodnot $C_{A}NO$ 1,1ppb, $J_{aw}NO$ 67ppb a $D_{aw}NO$ 10 pl/s/ppb.

Högmanová et al navrhli robustní metodu odhadu na výdechové rychlosti nezávislých parametrů přestupu NO do vydechovaného vzduchu s využitím vyšetření FE_{NO} při třech rychlostech (10, 100 a 300 ml/s) a iteračního algoritmu s kontrolou kvality výsledků měření FE_{NO} [23]. Tato metoda je součástí softwarového vybavení chemiluminiscenčního analyzátoru CLD88sp (Ecomedics, Duernten, Švýcarsko). Parametry $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ jsou nejdříve získány metodou T. Následně jsou použity jako počáteční odhady v dalším výpočetním kroku spočívajícím na iteračním algoritmu, který exponenciální člen ve vztahu (1) nahrazuje polynomem 3. řádu. Metoda dovoluje kromě $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ vypočítat další parametry dvoukompartimentového modelu - koncentraci NO ve stěně bronchů ($C_{aw}NO$) a difuzní kapacitu bronchiální stěny pro NO ($D_{aw}NO$).

Výpočetní metody, které zohledňují trumpetový tvar dýchacích cest a axiální difuzi NO vypracovali Condorelli et al [19] a Kerckx et al [24]. První metoda nejdříve počítá parametry $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ metodou T pro výdechové rychlosti 100 až 300 ml/s a následně provádí korekci získaných parametrů:

$$C_{A}NO^C = C_{A}NO^T - J'_{aw}NO^T/740 \quad (= \text{kompensace vlivu axiální zpětné difuze na } C_{A}NO)$$

$$J_{aw}NO^C = 1,7 \times J'_{aw}NO^T$$

Korekční faktory 740 ml/s a 1.7 byly získány ve studii s 8 zdravými dospělými. Pro přepočtení parametrů u dětí byly navrženy korekční faktory s proměnlivými hodnotami, závislémi na objemu dýchacích cest (V_{aw}):

$$C_{ANO}^C = C_{ANO}^T - J'_{aw}NO^T / (534 - 0.49 \times V_{aw})$$

$$J_{aw}NO^C = ((164 + 0.161 \times V_{aw}) / 100) \times J'_{aw}NO^T$$

Objem dýchacích cest je možné odhadnout pomocí vztahu:

$$V_{aw} = \text{věk [roky]} + 2,2 \times \text{ideální tělesná hmotnost [kg]}.$$

Kerckx vychází při výpočtu C_{ANO} z metody T pro rychlosti > 30 ml/s a upravuje získanou hodnotu pomocí rovnice:

$$C_{ANO}^K = (C_{ANO}^P - (0,08 \times FENO_{50})) / 0,92.$$

Nelineární regresní analýza dovoluje odhad parametrů dvoukompartimentového modelu přímo z rovnice (1) bez dalších jejích úprav. Metoda je teoreticky výhodná v tom, že na rozdíl od oblíbených metod podle Pietropaoliho (metoda P) a metody podle Tsoukiase (metoda T), spočívajících v linearizaci vztahu (1), nevyžaduje nelineární regresní analýza splnění předpokladů o hodnotách odhadovaných parametrů. Její další výhodou je, že dovoluje získat všechny 3 parametry a nikoli pouze C_{ANO} a $J_{aw}NO$. Naopak nevýhodou je, že aplikace nelineární regresní analýzy vyžaduje větší počet výdechových rychlostí včetně nízkých hodnot v oblasti 30 ml/s až 10 ml/s, při kterých musí trvat výdechový manévr i déle než 20 s. Výpočetní algoritmus je iterační metoda např. Gaussova-Newtonova. Její výsledek závisí na vhodných počátečních hodnotách odhadovaných parametrů. Nezřídka dojde k selhání iteračního minimalizačního algoritmu z důvodu nekonvergence. Recentně Eckel a kol. navrhli a ověřili upravenou metodu nelineární regresní analýzy provedené po logaritmické transformaci obou stran rovnice (1). Postup aplikovali na výsledky měření FENO při výdechových rychlostech 30, 50, 100 a 300 ml/s v populační studii provedené u 1507 dětí ve věku 12-15 let. Výpočet parametrů dvoukompartimentového modelu selhal pouze u 0,6 % souboru (9 dětí). Autoři provedli výpočet parametrů všemi doposud publikovanými postupy a doložili výhody nové metody [23].

Recentně byla publikována další metoda, rovněž vycházející z dvoukompartimentového modelu, která hodnotí separátně NO z velkých i malých cest ze dvou výdechů o nízké a vysoké rychlosti 50 a 200 ml/s. Hodnoty $J_{aw}NO$ a C_{ANO} jsou extrapolovány z plochy pod křivkou (area under curve) na grafu závislosti koncentrace FENO na trvání výdechu [26].

Pro úplnost je třeba uvést, že parametry alveolární a bronchiální produkce a přestupu NO do

vydechovaného vzduchu je možné získat i analýzou cyklicky se měnící vydechované koncentrace NO při klidovém dýchání pomocí tříkompartimentového modelu. Metoda ale vyžaduje přístrojové vybavení na měření NO s malým mrtvým objemem a speciální výpočetní postupy pro korekci šumu a má výzkumný charakter [27]. Jinou zajímavou metodou, poskytující přesné odhady parametrů NO, je měření profilu koncentrace NO v průběhu krátkého (≤ 2 s) výdechu vysokou rychlostí (≈ 300 ml/s). Výdech je proveden po různě dlouhém intervalu zadržení dechu (5, 10, 15, 20 a 30 s). Dechový manévr byl ale hodnocen jako obtížný zejména pro osoby s průduškovou hyperreaktivitou. Metoda se v praxi neprosadila [28].

1.4.5. Praktické využití vyšetření FENO u astmatu

Monitorování FENO při výdechové rychlosti 50 ml/s je v současné době standardizovanou, jednoduchou a bezpečnou metodou. Americká hrudní společnost a Evropská respirační společnost společně vydaly dokument, v němž se vyšetření FENO doporučuje [7]:

- ke stanovení diagnózy eozinofilního zánětu dýchacích cest
- ke dlouhodobému sledování eozinofilního zánětu v dýchacích cestách
- k predikci efektu léčby IKS u průduškového astmatu
- jako vyšetření, jehož přetrvávající zvýšené hodnoty při léčbě IKS mohou upozornit na neadekvátní farmakoterapii (nízká dávka a/nebo špatná inhalační technika a/nebo nespolupráce nemocného) nebo na vysokou expozici příčinným alergenům

Klinický výzkum v dalším období upozornil na další potenciální přínos FENO:

- nízká hodnota FENO u nemocného s respiračními příznaky vylučuje diagnózu atopického astmatu (negativní prediktivní hodnota vyšší než 90%)
- pravidelné sledování individuální hodnoty FENO může být vodítkem při vedení dlouhodobé preventivní farmakoterapie astmatu (potvrzeno zejména u těhotných žen) a může upozornit na blížící se akutní exacerbaci.

V návaznosti na mezinárodní doporučení ERS a ATS [4, 7] k vyšetření FENO a jeho interpretaci byla v roce 2014 publikována ve zjednodušené formě pravidla pro interpretaci hodnot FENO₅₀ při diagnóze a monitorování farmakoterapie průduškového astmatu [29]. Využití FENO se opírá o prahové hodnoty, stanovené odděleně pro děti a dospělé pacienty (tabulka 2).

Tabulka 2: Prahové hodnoty FENO a jejich interpretace ve vztahu k diagnóze a léčbě průduškového astmatu

FENO (ppb)	normální	zvýšená	vysoká
děti	< 15/20	15/20-35	>35
dospělí	< 20/25	15/20-50	>50
Th ₂ -zprostředkovaný zánět DC	nepravděpodobný	možný	významný

Největší shoda odborné veřejnosti panuje v tom, nezvýšená hodnota FENO u neléčeného nemocného s respiračními příznaky znamená, že se s vysokou pravděpodobností jedná o jinou diagnózu než o atopické průduškové astma. Normální hodnoty FENO vylučují atopické astma s vysokou negativní prediktivní hodnotou (> 90%). FENO tak může pomoci odlišit průduškové astma od chronického kašle z jiných příčin, nebo odhalit zveličování symptomů. Interpretace zvýšených hodnot musí být individuální s ohledem na demografické a klinické charakteristiky nemocného, které se promítají do interindividuální variability FENO. Vysoké hodnoty jsou známkou významného eozinofilního zánětu dýchacích cest, který dobře odpovídá na léčbu IKS. Stále nejsou dořešeny některé důležité otázky, které komplikují interpretaci hodnot FENO u průduškového astmatu. Hromadí se práce upozorňující na velký počet dalších faktorů, které zvyšují interindividuální variabilitu FENO. Zohlednění vlivu alespoň hlavních rušivých faktorů má potenciál zpřesnit interpretaci hodnot FENO v rozmezí zvýšených hodnot, tj. 25-50 ppb u dospělých a hodnot v rozmezí 20-35 ppb u dětí (tabulka 3).

1.4.6. Možný přínos vyšetřování bronchiálního a alveolárního NO

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

Tabulka 3: Některé faktory s vlivem na výsledek vyšetření FENO u dětí

faktor	vliv na koncentraci FENO
věk	nárůst s věkem (cca 4%/rok)
pohlaví	vyšší FENO u chlapců
rasa/etnikum	aziáté a černoši vyšší hodnoty než běloši (studie v USA) hispánci vyšší hodnoty než běloši
tělesná výška	zvýšuje se s výškou
potrava bohatá na dusičnany	zvýšení
kofein	nejednotné závěry studií
akutní infekce DC	nejednotné závěry studií
- rhinovirová	
cirkadiální rytmus	nejednotné závěry studií
tělesná aktivita	přechodné snížení
spirometrie, bronchoprovokace, indukce sputa	přechodné snížení
kouření	
- aktivní	snížení (vliv dlouhodobý + akutní)
- pasivní	snížení (závěry studií nejednotné)
atopie	zvýšení (+ závislost na počtu pozitivních výsledků v kožním prick testu)
znečištění vzduchu ve venkovním prostředí (zejména NO ₂ a pevné prachové částice < 2,5 µm)	zvýšení (akutní i dlouhodobý vliv)
genetické vlivy	
protizánětlivá farmakoterapie	výrazné snížení (nejvíce inhalační a perorální kortikosteroidy)
bronchodilatancia	malé zvýšení (cca 15%)

2. Cíle práce

První desetiletí po roce 2000 bylo obdobím intenzivního výzkumu zaměřeného na fyziologii a patofyziologii NO v dýchacích cestách. Publikace mezinárodních metodických doporučení k vyšetření NO ve vydechovaném vzduchu v roce 2005 završila úsilí o standardizaci techniky vyšetření FENO při výdechové rychlosti 50 ml/s. Byl zveřejněn první souhrn informací o biologických faktorech ovlivňujících výsledek vyšetření FENO a první návrh možného využití metody v praxi. Vyšetření alveolárního a bronchiálního příspěvku k vydechovanému NO technikou měření při více výdechových rychlostech dokument věnoval krátký odstavec se závěrem, že se jedná o metodu slibnou, která se ale stále nachází na začátku svého vývoje [7]. Nebylo jasné, který z modelů přestupu NO do vydechovaného vzduchu, formulovaných v teoretických studiích, bude nejvýhodnější pro praxi. Další otázkou byl rozsah a počet zvolených výdechových rychlostí a jejich vliv na správnost a přesnost odhadu parametrů NO a na rozdíly mezi výsledky vyšetření u nemocných s onemocněními dýchacích cest. Bylo také nutné zhodnotit, zda vyšetření při více výdechových rychlostech, které klade vyšší nároky na spolupráci vyšetřované osoby než vyšetření FENO při rychlosti 50 ml/s, budou schopny a ochotny zvládnout děti předškolního a mladšího školního věku. V období let 2005-2010 se začaly objevovat více klinicky orientované práce, zabývající se interpretací a využitím přesnějšího vyšetření alveolárního a bronchiálního NO při diagnóze a sledování léčby onemocnění dýchacích cest a jiných onemocnění. Z podrobnějšího studia publikací bylo možné učinit závěr o heterogenitě přístupů autorů k vyšetření parametrů NO v dýchacích cestách. Srovnávání výsledků různých studií tak bylo obtížné a závěry často protichůdné. V rozsáhlých klinických studiích, zabývajících se důležitými otázkami, byla metodická a technická stránka vyšetření NO nezdědky podceňena, což znehodnotilo výsledky.

2.1. Cíle dizertační práce:

1. A/ ve vzorku populace školních dětí a dospívajících porovnat výsledky vyšetření alveolární koncentrace NO ($C_{A}NO$) a bronchiálního toku NO ($J_{aw}NO$), získané analýzou závislosti FENO na výdechové rychlosti s použitím dvoukompartmentového modelu lineární regrese analýzou metodami podle Pietropaoliho (metoda P) a Tsoukiase (metoda T),
B/ zjistit, jak rozmezí výdechových rychlostí, použitých při měření FENO, ovlivňuje hodnoty $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$,
C/ vybrat z výdechových rychlostí 50, 100, 150, 200 až 250 ml/s, které nabízí analyzátor CLD88sp (Ecomedics, Švýcarsko), pro analýzu lineární regrese nejmenší možný počet rychlostí a jejich vhodnou kombinaci zaručující přijatelnou přesnost výsledku,
2. zjistit, zda optimální rozmezí výdechových rychlostí pro odhad $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ je stejné nebo jiné u nemocných s alergickým astmatem (AA) a alergickou rýmou (AR). Posoudit, jaký má vliv rozmezí výdechových rychlostí na rozdíly v hodnotách $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ mezi

skupinami nemocných s AA a AR

3. ověřit, zda v rozmezí výdechových rychlostí dostupných na analyzátoru NO (30 až 250 ml/s) je ve vyšetřovaném souboru možné získat přesný odhad parametrů NO nelineární regresní analýzou
4. algoritmem podle Högmanové et al [23] vypočítat koncentraci NO ve stěně bronchu (C_{awNO}) a difúzní kapacitu bronchiální stěny pro NO (D_{awNO}) a porovnat výsledky mezi skupinami nemocných s průduškovým astmatem (v závislosti na kontrole nad onemocněním), alergickou rýmou a zdravých dětí a mladistvých.

2.2. Hypotézy:

1. mezi metodami P a T existuje rozdíl v odhadu hodnot $C_{A}NO$ a J_{awNO} ve skupině nemocných s astmatem
2. mezi metodami P a T existuje rozdíl v odhadu hodnot $C_{A}NO$ a J_{awNO} ve skupině nemocných s alergickou rýmou
3. dostatečně přesný odhad hodnot $C_{A}NO$ a J_{awNO} je možné provést s menším počtem než je aktuálně používaných pět výdechových rychlostí
4. mezi nemocnými s alergickým astmatem a alergickou rýmou existuje rozdíl v hodnotách $C_{A}NO$ a J_{awNO}

3. Metody

3.1. Soubory nemocných

Studie byla schválena Etickou komisí Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Informovaný souhlas byl získán od všech rodičů a navíc od dětí starších 12 let. Probandy studie byli nemocní dispenzarizovaní v alergologické ordinaci Dětské kliniky Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Jednalo se o nemocné s atopií, lehkým až středně těžkým průduškovým a/nebo o nemocné s alergickou rýmou. Diagnóza i podrobné informace o zdravotním stavu byly ve všech případech známy z předchozích 4 až 8 vyšetření v alergologické poradně v posledních 2 letech před vstupem do studie. Účastníci studie byli nekuřáci, kteří neprodělali v uplynulých 6 měsících exacerbaci astmatu vyžadující farmakoterapii perorálními kortikosteroidy a v období jednoho měsíce před začátkem studie neměli akutní respirační infekci. Před provedením studijního měření byli všichni nemocní lékařem dotázáni na symptomy astmatu, alergické potíže a dodržování předepsané medikace od poslední návštěvy. Všechny subjekty měly praktickou osobní zkušenost s měřením FENO při výdechové rychlosti 50ml/sec. Všechny subjekty podstoupily měření při více výdechových rychlostech. Pro každou výdechovou rychlost byla provedena dvě samostatná měření. V odstupu minimálně 15 minut od měření FENO byla provedena spirometrie a kožní prick testy.

Soubor: 59 nemocných ve věku 8-18 let, skupina nemocných s lehkým až středně těžkým alergickým astmatem (AA) pod dobrou kontrolou podle kritérií GINA a/nebo o nemocné s alergickou rýmou (AR). AR byla přítomna u 79% nemocných ve skupině AA. 20 nemocných mělo pouze diagnózu AR. Tito nemocní astma neměli vůbec (n=14), nebo bylo astma v remisi, bez medikace (n=6). Charakteristika souboru viz tabulka 4

3.2. Vyšetření koncentrace exhalovaného oxidu dusnatého a odhad parametrů přestupu NO do vydechovaného vzduchu

K vyšetření FENO byl použit chemiluminiscenční analyzátor CLD88sp (Ecomedics, Duernten, Švýcarsko). Vyšetřované osoby podstoupily dvě měření při každé z pěti výdechových rychlostí (50, 100, 150, 200 a 250 ml/s). K udržení adekvátní výdechové rychlosti byla na monitoru měřícího počítače zobrazena v průběhu měření vizuální zpětná vazba. Pro děti nad 12 let byl nastaven výdechový čas 12 sekund (resp. 8 sekund pro mladší děti), k zaznamenání hodnoty FENO při výdechu bylo nutné udržení plató výdechové rychlosti 6 sekund (resp. 4 sekundy pro mladší). Byla provedena 2 měření pro každou rychlost, v případě rozdílu hodnot nad 15% bylo provedeno 3. měření. Mezi dvěma měřeními byla přestávka 30 sekund. Odhad C_{ANO} a J_{awNO} byl proveden výpočtem metodami P a T popsanými výše.

3.3. Alergologická vyšetření

Atopie byla hodnocena reakcí na 12 běžných inhalovaných alergenů (pyl břízovitých stromů, travin, obilovin, pelyňku, alergeny roztočů, kočky, psa a plísní rodu *Cladosporium* a *Alternaria*) včetně pozitivní a negativní kontroly, vyšetření bylo provedeno soupravou Alyostal (Stallergènes, Paris, France). Spirometrie byla provedena podle standardů Americké hrudní společnosti spirometrem Masterscreen (Jaeger, Hochberg, Gemany). Nejlepší hodnota ze třech měření byla vyjádřena jako procento normální hodnoty. Děti s astmatem vyplnili standardizovaný dotazník „Test kontroly nad astmatem“ (ATC, škála 0-25) s následným vyhodnocením podle kritérií GINA [3].

3.4. Statistické vyhodnocení

Lineární regresní analýza byla provedena v programu GrapPad Prism verze 6.01 (GraphPad Software, Kalifornie, USA). Nelineární regresní analýza byla realizována v programu NLREG (verze 5.0, Phillip H. Sherrod, Nashville, TN, <http://www.nlreg.com>). U všech dat byla ověřena normalita rozložení. V případě, že distribuce byla normální, nebo téměř normální, byl kalkulován aritmetický průměr a směrodatná odchylka (SE). V případě dat s nenormálním rozložením (FENO, \dot{V}_E , C_ANO, J_{aw}NO) byl stanoven medián a interkvartilové rozpětí (25.-75. percentil). Byl hodnocen vliv expirační rychlosti na FENO a \dot{V}_E a rozsah výdechových rychlostí na odhad C_ANO a J_{aw}NO. Byly kalkulovány průměr a směrodatná odchylka ve skupině AA a AR. Hodnoty průměru byly hodnoceny Friedmanovým testem a testem mnohonásobného porovnání podle Dunnové. Srovnání skupin AA a AR bylo provedeno Kruskal-Wallisovým testem a následně testem mnohonásobného porovnání, jehož autorem je Tukey. Za statisticky významnou byla považována hodnota $p < 0,05$. Statistická analýza byla provedena softwarem GrapPad Prism verze 6.01 (GraphPad Software, Kalifornie, USA).

4. Výsledky

4.1. Porovnání vyšetření alveolární koncentrace NO (C_{ANO}) a bronchiálního toku NO (J_{awNO}) metodami podle Pietropaoliho (metoda P) a Tsoukiase (metoda T), určení optimálního rozmezí výdechových koncentrací a jejich minimálního potřebného počtu (výsledky se vztahem ke stanoveným cílům práce 1A, 1B a 1C, publikované v časopise Alergie 1/2011)

Charakteristiky souboru jsou shrnuty v tabulce 4. Jednalo se ve většině případů o děti s atopií, lehkým až středně těžkým průduškovým astmatem pod dobrou kontrolou a/nebo s alergickou rýmou. Jen u menší části souboru nešlo o alergické onemocnění a příčinou nespecifických respiračních příznaků byly např. adenoidní vegetace a psychogenní kašel. Výsledky vyšetření FE_{NO} technikou jednoho výdechu při výdechových rychlostech 50, 100, 150, 200 a 250 ml/jsou uvedeny v tabulce 5 a na obrázku 8.

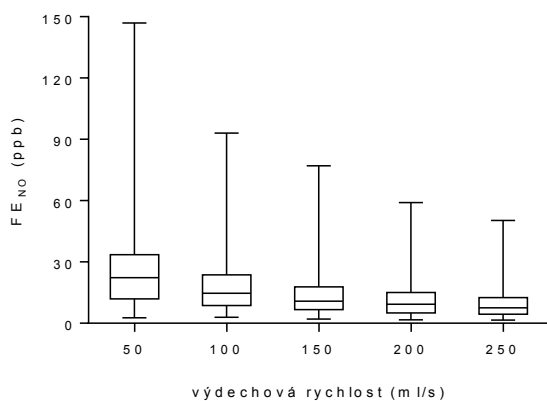
Tabulka 4: Charakteristiky účastníků studie

charakteristika		
počet	n	78
věk, průměr (rozsah)	[roky]	13,2 (8,0-17,8)
pohlaví (mužské/ženské)	n/n	42/36
tělesná výška, průměr (SD)	[cm]	156 (15)
tělesná hmotnost, průměr (SD)	[kg]	51,3 (16,8)
atopie	n (%)	59 (75,6 %)
astma	n (%)	53 (67,9 %)
alergická rýma	n (%)	52 (65,8 %)
sezónní		36 (46,2 %)
celoroční		25 (32,1 %)
FEV_1 , průměr (SD)	[% náležité hodnoty]	103 (15,3)
inhalační kortikosteroidy ^a	n (%)	39 (50,0 %)
nazální kortikosteroidy	n (%)	30 (38,5 %)
H_1 -antihistaminika p.o.	n (%)	39 (50,0 %)

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

Tabulka 5: Statistický souhrn hodnot koncentrace FENO, získaných metodou výdechu ústy rychlostmi 50, 100, 150, 200 a 250 ml/s.

výdechová rychlost (ml/s)	50	100	150	200	250
FENO(ppb) 25. percentil	12,0	8,7	6,7	5	4,4
medián	22,4	14,7	10,8	9,3	7,5
75. percentil	33,6	23,7	17,8	15,0	12,6

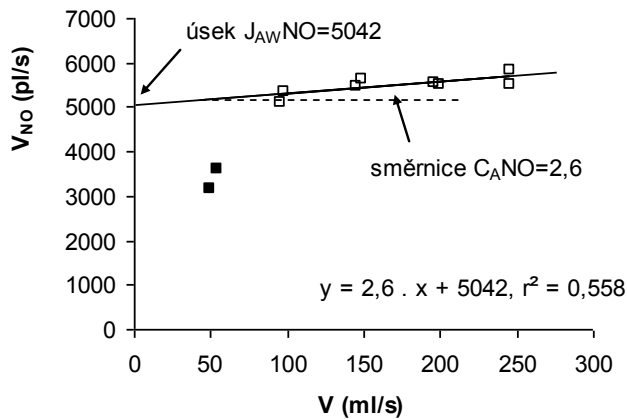
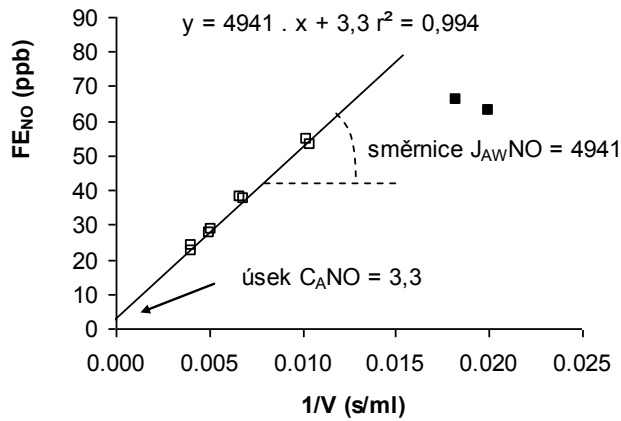


Obrázek 8: Koncentrace FENO vyšetřené při výdechových rychlostech 50, 100, 150, 200 a 250 ml/s. Krabicové grafy ukazují mediány, 25. až 75. percentily a rozsahy hodnot FENO v souboru 78 školních dětí a dospívajících. Vliv výdechové rychlosti byl statisticky velmi významný ($P < 0,0001$, Friedmanův test).

Dvě ustálené hodnoty FENO získané při každé z pěti výdechových rychlostí (50, 100, 150, 200 a 250 ml/s) byly vyneseny do grafu proti hodnotě výdechové rychlosti. Přesná hodnota výdechové rychlosti (reciproční hodnota průtoku) byla měřena za použití ultrazvukového průtokoměru. Byla provedena kalkulace jednoduché lineární regrese. Poté byla rychlost průtoku postupně zvyšována 50-100-150 ml/s s horním limitem na 250 ml/s a opakována kalkulace.

Srovnávané metody odhadu parametrů $C_{A\text{NO}}$ a J_{awNO} lineární regresní analýzou ukazuje obrázek 9. U obou metod (P i T) byla nalezena závislost výsledku vyšetření $C_{A\text{NO}}$ na rozmezí výdechových rychlostí. Vyšším hodnotám výdechových rychlostí odpovídala nižší koncentrace $C_{A\text{NO}}$ (tabulka 5, obrázek 9). Jedná se o důsledek nelinearity závislosti FENO na $1/V$ (metoda P) a FE na výdechové rychlosti (metoda T). Silnou závislost $C_{A\text{NO}}$ na rozmezí výdechových rychlostí

potvrzuje také skutečnost, že medián C_{ANO} byl třikrát vyšší při použití rychlostí v rozmezí 50 až 100 ml/s než v rozmezí 150 až 250 ml/s ($P < 0,001$, Wilcoxonův test). Také posun spodní hranice z hodnoty 50 ml/s až na hodnotu 150 ml/s při zachování horní hranice 250 ml/s vedl ke statisticky významnému poklesu mediánu C_{ANO} ($P < 0,0001$, Friedmanův test). Při analýze výsledků měření při rychlostech 150, 200 a 250 ml/s se hodnoty C_{ANO} získané metodami P a T nelišily, ale shodně je charakterizovala nepřijatelně vysoká standardní chyba odhadu ($> 40\%$). Navíc byly hodnoty C_{ANO} záporné u 11 dětí, jako projev nepřesnosti odhadu. Za nejlepší lze považovat čtyři rychlosti v intervalu 100-250 ml/s, i když nepřesnost odhadu zůstává nadále vysoká (medián standardní chyby odhadu C_{ANO} pod 27%, sedm záporných hodnot). V tomto rozmezí výdechových rychlostí poskytla metoda P o 15% vyšší koncentrace C_{ANO} než metoda T ($P < 0,0001$, Wilcoxonův test) (tabulka 5). Z praktického pohledu je zajímavé zjištění, že pokud byl odhad metodou T proveden pouze pomocí rychlostí 100 a 250 ml/s, nezměnily se oproti postupu se čtyřmi rychlostmi (100, 150, 200 a 25 ml/s) hodnoty C_{ANO} ($P = 0,13$, Wilcoxonův test) ani standardní chyba odhadu ($P = 0,11$, Wilcoxonův test). Metodu P lze v tomto ohledu označit za horší, protože snížení počtu rychlostí vedlo při stejných hodnotách C_{ANO} k vyšší nepřesnosti odhadu (tabulka 5).



Obrázek 9: Ukázkové výsledky odhadu parametrů přestupu NO do vydechovaného C_{ANO} a J_{AWNO} lineární regresní analýzou metodami podle Pietropaoliho (metoda P) a Tsoukiase (metoda T).

Prázdné čtverečky znázorňují hodnoty spadající do lineární oblasti výdechových rychlostí. Hodnoty získané při rychlosti 50 ml/s (plné čtverečky) jsou mimo lineární oblast. *Symbols: FE_{NO} ... frakce NO ve vydechovaném vzduchu, V_{NO} ...objem NO vydechnutý za 1 s, C_{ANO} ...alveolární koncentrace NO, J_{AWNO} ...bronchiální tok NO.*

Tabulka 5: Závislost hodnot alveolární koncentrace NO (C_{ANO}), získaných metodami podle Pietropaoliho (metoda P) a Tsoukiase (metoda T), a závislost standardní chyby odhadu C_{ANO} (SE v %) na rozmezí a počtu výdechových rychlostí použitých při měření. Hodnoty P jsou výsledky statistického srovnání obou metod.

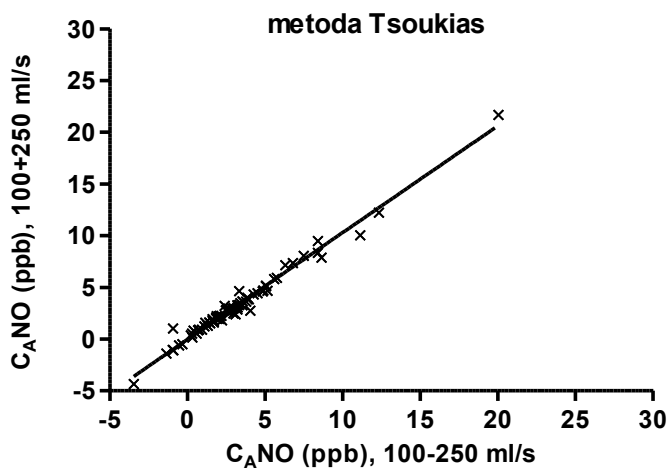
výdechové rychlosti (ml/s)	50+100	50-250	100-250	150-250	100+250
počet rychlostí	2	5	4	3	2
C_{ANO} (ppb), metoda P					
25. percentil	3,98	2,44	1,66	0,77	1,60
medián	5,98	4,78	3,03	1,94	2,68
75. percentil	13,1	8,05	4,35	4,00	4,02
C_{ANO} (ppb), metoda T					
25. percentil	3,66	2,09	1,46	0,81	1,59
medián	6,09	3,67	2,64	1,91	2,76
75. percentil	13,4	5,58	3,98	3,85	4,08
P	0,23	< 0,0001	< 0,0001	0,83	0,89
SE (%), metoda P					
25. percentil	12,8	13,1	16,4	28,9	19,7
medián	30,3	17,6	26,1	44,5	32,0
75. percentil	55,2	24,1	47,2	120	50,5
SE (%), metoda T					
25. percentil	14,1	13,5	18,4	29,4	15,3
medián	24,5	18,5	26,2	46,9	27,9
75. percentil	46,2	26,9	56,3	106	38,1
P	< 0,0001	0,0025	0,17	< 0,0001	< 0,0005

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

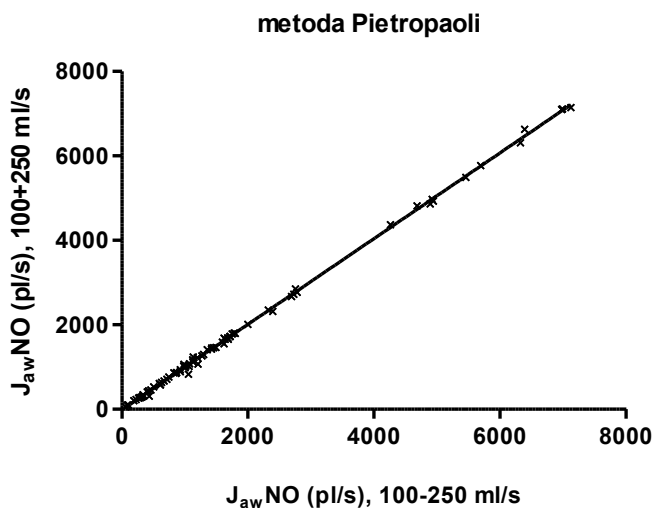
zjednodušenými metodami P a T využívajícími 2 rychlosti a výsledky při 4 rychlostech znázorňují obrázky 10 a 11. Důležitým zjištěním je existence těsné korelace mezi parametrem $J_{aw}NO$ a výsledkem vyšetření FENO při výdechové rychlosti 50 ml/s (obrázek 12). Nabízí se otázka, zda $J_{aw}NO$ přináší jinou informaci než vyšetření při jedné výdechové rychlosti 50 ml/s. Korelace mezi C_{ANO} a výsledkem vyšetření FENO při rychlosti 250 ml/s byla méně těsná (obrázek 13).

Tabulka 6: Závislost hodnot bronchiálního toku NO ($J_{aw}NO$), získaných metodami podle Pietropaoliho (metoda P) a Tsoukiase (metoda T), a závislost standardní chyby odhadu C_{ANO} (SE v %) na rozmezí a počtu výdechových rychlostí použitých při měření. Hodnoty P jsou výsledky statistického srovnání obou metod.

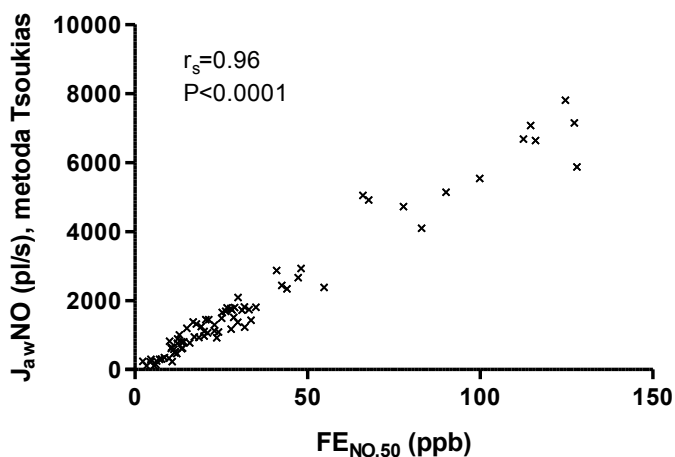
výdechové rychlosti (ml/s) počet rychlostí	50+100 2	50-250 5	100-250 4	150-250 3	100+250 2
$J_{aw}NO$ (pl/s), metoda P					
25. percentil	413	522	627	847	632
medián	736	949	1164	1385	1193
75. percentil	1283	1445	1849	2150	1852
$J_{aw}NO$ (pl/s), metoda T					
25. percentil	414	592	639	834	629
medián	728	1070	1268	1415	1201
75. percentil	1290	1580	1882	2130	1852
P	0,17	< 0,0001	< 0,0001	0.81	0.70
SE (%), metoda P					
25. percentil	9,5	5,0	5,7	8,6	4,4
medián	18,3	8,1	8,7	14,4	7,6
75. percentil	31,1	13,5	13,8	23,5	14,3
SE (%), metoda T					
25. percentil	9,7	7,6	6,3	8,6	5,4
medián	16,8	9,8	11,0	16,3	9,3
75. percentil	30,4	15,9	16,4	28,0	18,6
P	0,82	0,17	< 0,0001	< 0,005	< 0,001



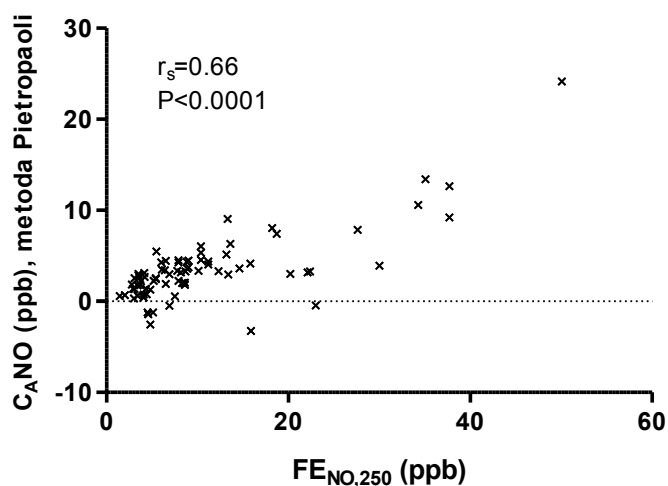
Obrázek 10: Srovnání výsledku odhadu CANO metodou podle Tsoukiase za pomoci 4 koncentrací v rozmezí 100 až 250 ml/s a zjednodušeným postupem (dvě krajní rychlosti, tj. 100 ml/s a 250 ml/s). Parametry lineární regresní analýzy podle Deminga: směrnice 1.033 (0.999 - 1.07), úsek: -0.034 (-0.188 - 0.120), $P < 0,0001$.



Obrázek 11: Srovnání výsledku odhadu $J_{aw}NO$ metodou podle Pietropaoliho za pomoci 4 koncentrací v rozmezí 100 až 250 ml/s a zjednodušeným postupem (dvě krajní rychlosti, tj. 100 a 250 ml/s). Parametry lineární regresní analýzy podle Deminga: směrnice 1.015 (1.008 - 1.022), $P < 0,0001$. Úsek: -18.04 (-35.2 až -0.87).



Obrázek 12: Korelace mezi hodnotami FENO vyšetřenými při výdechové rychlosti 50 ml/s a hodnotami bronchiálního toku NO (metoda podle Tsoukiase, 4 rychlosti v rozmezí 100-250 ml/s).



Obrázek 13: Korelace mezi hodnotami FENO vyšetřenými při výdechové rychlosti 250 ml/s a koncentracemi alveolárního NO (metoda podle Pietropaoliho, 4 rychlosti v rozmezí 100-250 ml/s).

4.2. Odhad parametrů dvoukompartmentového modelu nelineární regresní analýzou

Studie zkoumala výsledky odhadu na výdechové rychlosti nezávislých parametrů charakterizujících přestup NO do vydechaného vzduchu metodou nelineární regresní analýzy při aplikaci dvoukompartmentového modelu plic a dýchacích cest. Soubor vyšetřených osob byl popsán v tabulce 4. Při každé výdechové rychlosti (50, 100, 150, 200 až 250 ml/s) byla provedena dvě měření. Na výdechové rychlosti nezávislé parametry dvoukompartmentového modelu $C_{A}NO$, $J_{aw}NO$, $D_{aw}NO$ a $C_{aw}NO$ byly získány nelineární regresní analýzou pomocí programu NLREG (verze 5.0, Phillip H.

Sherrod, Nashville, TN, <http://www.nlreg.com>). Hodnoty $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ odhadnuté lineární regresní analýzou popsanou v odstavci 5.1 byly při fitování parametrů použity jako primární odhady jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Výsledky odhadu parametrů dvoukompartimentového modelu nelineární regresní analýzou.

	$C_{A}NO$ (ppb)	SE (%)	$J_{aw}NO$ (pl/s)	SE (%)	$D_{aw}NO$ (pl/s.ppb ⁻¹)	SE (%)	$C_{aw}NO$ (ppb)	r^2
minimum	-24,5	11,5	-50,9	0,5	-71	10,4	-1533	0,841
25. percentil	-1,24	55,3	849	13,3	15,2	29,9	14,1	0,956
medián	1,27	89,7	1544	24,7	29,9	58,7	31,8	0,984
75. percentil	2,65	180	3048	42,7	68,6	114	77,6	0,992
maximum	14,7	2239	15106	1975	270	1254	767,3	0,999

Symboly: $C_{A}NO$...alveolární koncentrace NO, $C_{aw}NO$...koncentrace NO ve stěně bronchů, $J_{aw}NO$...bronchiální tok NO, $D_{aw}NO$... difuzní kapacita bronchiální stěny, SE...standardní chyba odhadu, r^2 ...koeficient determinace charakterizující přesnost proložení naměřených koncentrací $F_{E}NO$ modelem; parametr $C_{aw}NO$ byl odhadnut jako podíl $J_{aw}NO$ a $D_{aw}NO$ a standardní chyba není z tohoto důvodu uvedena.

Odhad parametru $C_{A}NO$ byl nepřesný a více než 25% hodnot bylo záporných. Přesnost odhadu $J_{aw}NO$ byla lepší. Střední hodnota standardní chyby odhadu $J_{aw}NO$ (25%) byla ale horší než při výpočtu lineární regresní analýzou. Ve srovnání s výsledky získanými lineární regresní analýzou v rozsahu rychlostí 100 až 250 ml/s byl medián $C_{A}NO$ o 55 % nižší a medián $J_{aw}NO$ o 29% vyšší. Také odhad $D_{aw}NO$ nebyl podle výsledků studie přesný.

4.3. Porovnání optimálních rozmezí výdechových rychlostí pro vyšetření $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ u nemocných s alergickým astmatem (AA) a alergickou rýmou (AR). Ověření možného vlivu výdechových rychlostí na rozdíly zjištěné mezi výsledky u pacientů s alergickým astmatem a alergickou rýmou.

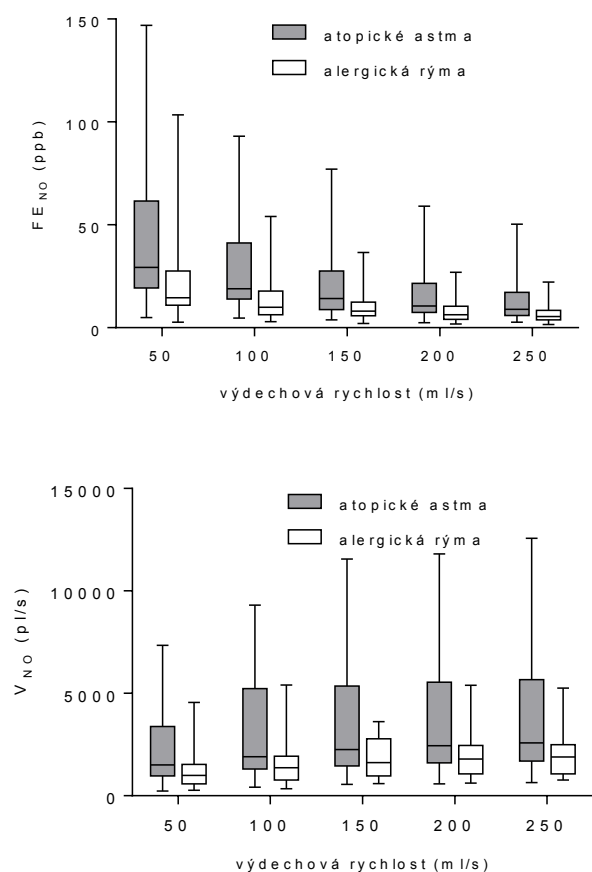
Demografické charakteristiky pacientů s AA a AR uvádí tabulka 8. Všichni astmatici užívali nízké až střední dávky IKS v monoterapii (n = 17), nebo ve fixní kombinaci s dlouhodobě působícím β_2 agonistou (n=25). Průměr \pm SE denní dávky IKS byl 251 \pm 122 μ g budesonidu, nebo ekvivalentní dávka jiného steroidu. V době vyšetření bylo astma pod dobrou kontrolou u všech nemocných, kromě tří pacientů, kteří vyžadovali vyšší dávku IKS. Průměrná hodnota FEV₁ byla lehce snižena (p = 0,070) a FENO₅₀ bylo vyšší (P = 0,075) u astmatiků ve srovnání s pacienty s AR. Rozdíly však byly pouze hraničně signifikantní (tabulka 8).

Tabulka 8: Demografické a klinické charakteristiky nemocných s astmatem a alergickou rýmou

	atopické průduškové astma (n=42)	alergická rýma (n=20)	<i>P</i>
věk (roky)	13±2.9	13±3.4	0.76
pohlaví, m/ž (n)	26/16	11/9	0.57
tělesná výška (cm)	158±15	154±16	0.46
tělesná hmotnost (kg)	53±18	49±14	0.52
inhalační kortikosteroidy CS (%)	100	0	< 0.0001
nazální kortikosteroidy (%)	55	47	0.77
H ₁ -antihistaminika p.o. (%)	67	65	1.0
FEV ₁ (%)	101±14	110±16	0.070
MEF ₅₀ (%)	91±22	99±21	0.28
FENO ₅₀ (ppb)	29 (19-62)	23 (13-29)	0.075

Legenda: Tabulka uvádí aritmetické průměry ± SE. Frekvenční histogram FENO₅₀ odpovídal logaritmicko-normálnímu rozložení, a proto byl upřednostněn medián a rozmezí hodnot.

Opakovatelnost měření provedeného v duplikátech při každé výdechové rychlosti byla podobná v obou skupinách nemocných. Medián (rozsah) relativních rozdílů mezi dvěma správně provedenými měřeními FENO byl 7% (1-15%) při výdechové rychlosti 50 ml/s, 5% (0,1 - 13%) při 100 ml/s, 6% (0,3 - 14%) při 150 ml/s, 5% (0,9 - 13%) při 200 ml/s, a 5% (0,1 - 12%) při 250 ml/s. Hodnoty V_{NO} (= vydechnutý objem NO za jednotku času) vykazovaly podobné rozdíly mezi duplicitními měřeními (data neuvedena). Také kontrola výdechové rychlosti byla uspokojivá. Při dvou duplicitně provedených vyšetřeních se výdechová rychlost lišila maximálně o 15% při výdechové rychlosti 50 ml/s maximálně o 10% při vyšších rychlostech. Podle výsledků analýzy rozptylu pro opakovaná měření, provedené po logaritmické transformaci, byly hodnoty FENO i V_{NO} vysoce závislé na výdechové rychlosti (*P* <0,0001). Při žádné výdechové rychlosti nebyl nalezen významný rozdíl v hodnotě FENO nebo V_{NO} mezi skupinami nemocných s AA a AR (obrázek 14).



Obrázek 14: Vliv výdechové rychlosti na frakci oxidu dusnatého ve vydechaném vzduchu FENO (nahore) a na množství vydechnutého NO za časovou jednotku (V_{NO}) (dole) u dětí s atopickým astmatem a alergickou rýmou. V obou skupinách pacientů byly hodnoty FENO a V_{NO} vysoce závislé na výdechové rychlosti ($P < 0,0001$, Friedmanův test). Rozdíly mezi skupinou astmatiků a pacientů s alergickou rýmou nedosáhly statistické významnosti při žádné výdechové rychlosti ($P > 0,05$, analýza testem Dunnové).

4.4. Vliv výdechové rychlosti na odhad NO parametrů.

Posun spodní hranice rozmezí pro výdechové rychlosti směrem k vyšším rychlostem (tj. 50 → 100 → 150 ml/min) se projevil postupným snižováním C_{ANO} a zvyšováním J_{awNO} (tabulka 9). Vliv změny rozmezí výdechových rychlostí byl vyšší u astmatiků než u pacientů s AR. Medián C_{ANO} ve skupině AA, zjištěný při třech nejvyšších výdechových rychlostech (150-200-250 ml / sec), byl o 67% nižší (metoda P) a o 60% nižší (metoda T) ve srovnání s mediánem C_{ANO} vypočítaným při použití všech pěti výdechových rychlostí (50-100-150-200-250 ml/s). Ve skupině AR činil rozdíl 40% (metoda P) a 28% (metoda T). Naopak měření při 3 nejvyšších rychlostech výdechu poskytlo (shodně pro metody P a T) medián J_{awNO} o 50% vyšší ve skupině AA a pouze o 17% ve skupině AR ve srovnání s výsledky měření v rozsahu 50-250 ml/s. Shodně pro metodu P i T byla nejistota odhadu vyšší pro C_{ANO} než J_{awNO} . Postupné zvyšování spodní hranice výdechových rychlostí vedlo k paralelnímu zvýšení

standardní chyby odhadu. Tento jev byl nápadnější u C_{ANO} (2,9-násobné zvýšení) než v případě J_{awNO} (1,7-násobné zvýšení) (tabulka 10).

Tabulka 9: Vliv rozmezí výdechových rychlostí a jejich počtu na výsledky odhadu alveolární koncentrace NO (C_{ANO}) a bronchiálního toku (J_{awNO}) NO u dětí s atopickým astma a alergickou rýmou. Aplikace lineární regrese metodami P a T.

metoda	výdechové rychlosti		atopické astma (n=42)		alergická rýma (n=20)	
	rozmezí (ml/s)	n	C_{ANO} (ppb)	J_{awNO} (pL/s)	C_{ANO} (ppb)	J_{awNO} (pL/s)
P1	50-250	5	5.5 (2.9-11)	1170 (655-2260)	4.0 (2.7-5.5)	1000 (600-1270)
P2	100-250	4	3.2 (1.9-5.5) ^{P1}	1610 (990-3260) ^{P1}	3.0 (2.2-4.4)	1022 (681-1570)
P3	150-250	3	1.8 (0.8-4.3) ^{P1, P2}	1800 (962-3380) ^{P1, P2}	2.4 (0.8-3.9) ^{P1}	1175 (825-1962) ^{P1}
$P^{\#}$			< 0.0001	< 0.0001	< 0.005	< 0.01
T1	50-250	5	4.3 (2.2-8.3)	1310 (758-2590)	3.2 (2.6-4.3)	1010 (551-1390)
T2	100-250	4	2.7 (1.6-5.1) ^{T1}	1580 (998-3340) ^{T1}	3.0 (2.1-3.9)	1070 (604-1620)
T3	150-250	3	1.7 (0.9-3.9) ^{T1, T2}	1800 (950-3560) ^{T1, T2}	2.3 (0.8-3.7) ^{T1}	1180 (639-1950) ^{T1}
$P^{\#}$			< 0.0001	< 0.0001	< 0.01	< 0.01

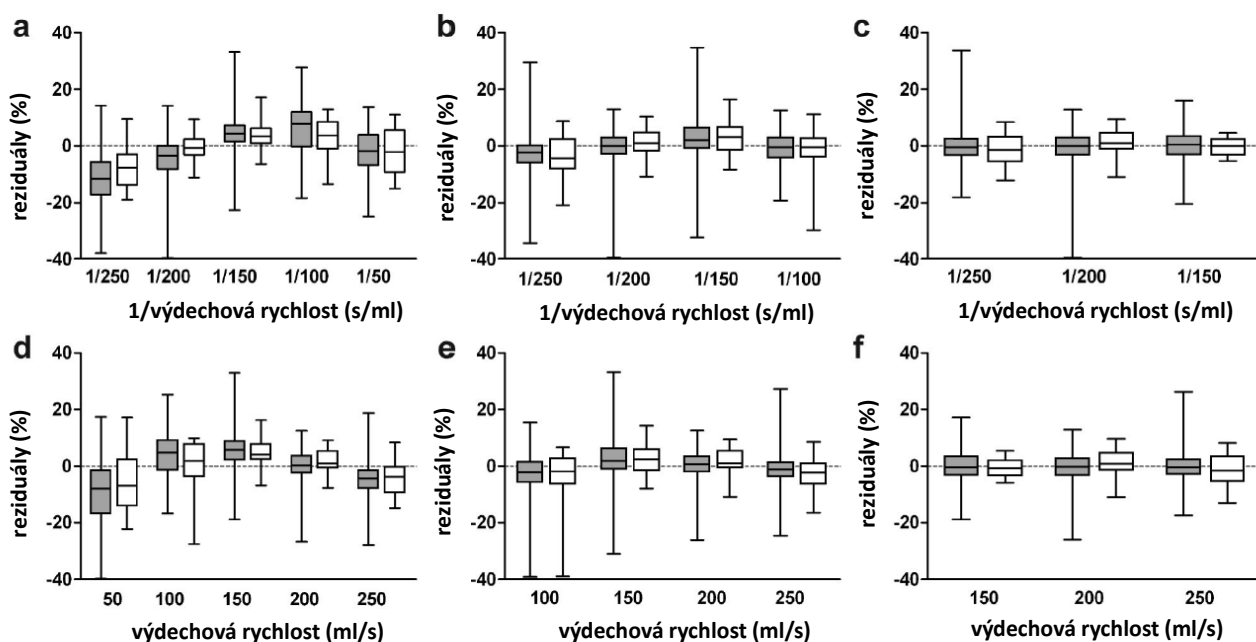
Data jsou uvedena jako medián (interkvartilové rozpětí), n: počet výdechových rychlostí, ^{P1, P2, T1, T2}: označení skupin, výsledky kterých se významně lišily ($p < 0,05$, testem dle Dunnové), [#]P: hodnota Friedmanova testu hodnotícího vliv výdechové rychlosti.

Tabulka 10: Vliv rozmezí výdechových rychlostí a jejich počtu na standardní chybu (SE) odhadu alveolární koncentrace NO (C_{ANO}) a) a bronchiálního toku (J_{awNO}) u dětí s atopickým astmatem a alergickou rýmou.

metoda	výdechové rychlosti		atopické astma (n=42)		
	rozmezí (ml/s)	n	r	C_{ANO} SE (%)	J_{awNO} SE (%)
P1	50-250	5	0.98 (0.95-0.99)	18 (13-26)	7.8 (4.7-12)
P2	100-250	4	0.98 (0.96-0.99)	27 (17-39) ^{P1}	7.2 (5.3-13)
P3	150-250	3	0.97 (0.94-0.99)	52 (30-112) ^{P1, P2}	13 (7.4-19) ^{P1, P2}
$P^{\#}$			< 0.01	< 0.0001	< 0.0001
T1	50-250	5	0.91 (0.86-0.94)	19 (14-28)	9.7 (7.4-13)
T2	100-250	4	0.89 (0.84-0.93)	26 (18-56) ^{T1}	7.7 (6.0-16)
T3	150-250	3	0.84 (0.80-0.91)	52 (31-100) ^{T1, T2}	13 (7.5-24) ^{T1, T2}
$P^{\#}$			< 0.0001	< 0.0001	< 0.001

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

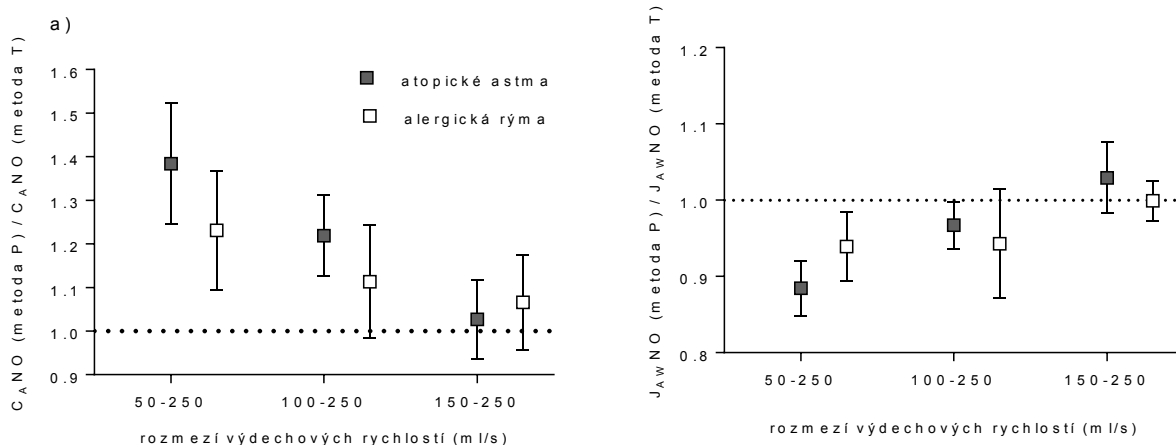
Data jsou uvedena jako medián (interkvartilové rozpětí). n: počet výdechových rychlostí; r: Pearsonův korelační koeficient; SE: směrodatná odchylka odhadu. ^{P1}, ^{P2}, ^{T1}, ^{T2}: označení skupin, výsledky kterých se významně lišily ($p < 0,05$, testem dle Dunnové), [#]P: hodnota Friedmanova testu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



Obrázek 15: Srovnání procentuálních rozdílů mezi naměřenými hodnotami FENO(a-c) a hodnotami predikovanými podle lineárního regresního modelu P (d-f), a mezi naměřenými hodnotami \dot{V}_E a predikovanými hodnotami podle modelu T ve třech různých výdechových rychlostech. V grafech (a - e) jsou zobrazeny procentuální rozdílů v závislosti na rychlosti výdechu vykazující šikmé rozložení, v souladu s výsledky Friedmanova testu, hodnoty rozděleně pro pacienty s atopickým astma (tmavé čtverce, $P \leq 0,0001$) a alergickou rýmou (prázdné čtverce, $P \leq 0,002$). Při zvýšení nejnižší výdechové rychlosti na 150 ml/s (c, f) se difference mezi procentuálními rozdílů staly nevýznamné jak u astmatiků ($P 0,85$), tak i u AR ($P 0,12$).

Pro účely srovnání obou metod byly vypočteny poměry (P/T) hodnot $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ získaných metodami P a T pro použitá rozmezí výdechových rychlostí (obrázek 15). Stejně jako rozdíly hodnot odhadů (P-T) i poměry hodnot (P/T) vykazovaly normální, nebo téměř normální rozdělení bez vztahu k absolutním hodnotám proměnných (data nejsou uvedena). V rozmezí od 50 do 250 ml/s, průměr poměrů hodnot P/T pro $C_{A}NO$ byl signifikantně vyšší než jedna, což naznačuje, že metoda P poskytovala vyšší odhady $C_{A}NO$ o 38% u astmatiků ($P < 0,001$) a o 23% u pacientů s AR ($p < 0,005$). Tento rozdíl však vymizel po zvýšení nejnižší výdechové rychlosti na 150 ml/s, a to jak ve skupině AA, tak i u pacientů ve skupině AR. V intervalu výdechových rychlostí 150 až 250 ml/s byly odhady $C_{A}NO$ získané metodami P a T srovnatelné (obrázek 15). Poměry (P/T) hodnot $C_{A}NO$ v tomto rozmezí výdechových rychlostí se blížily jedné: 1,03 (0,49-1,56) u astmatiků a 1,07 (0,55 - 1,59) u pacientů s AR.

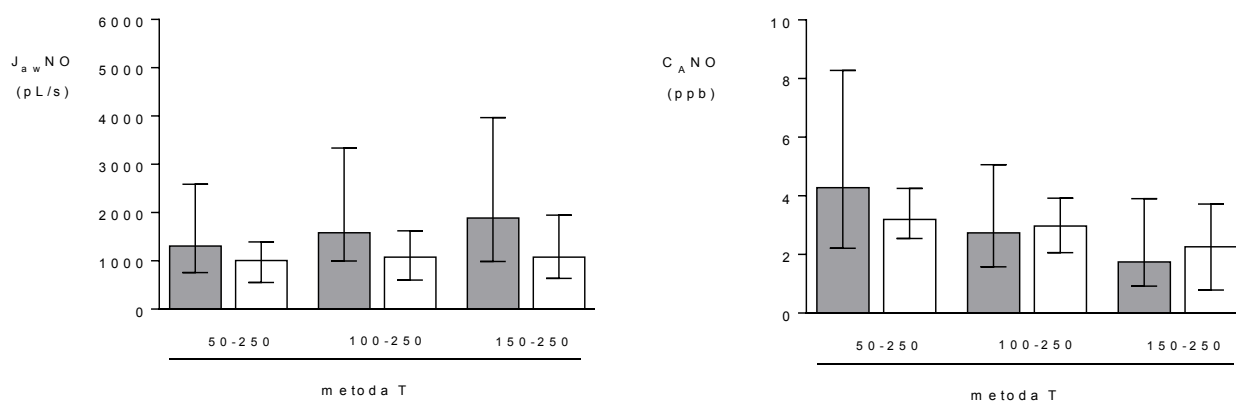
Při použití výdechových rychlostí od 50 do 250 ml/s byl poměr (P/T) hodnot $J_{aw}NO$ ve skupině astmatiků podstatně nižší než ve skupině AR (obrázek 16). V průměru byly odhady $J_{aw}NO$ metodou P o 12% nižší než odhady metodou T ($p < 0,001$), zatímco u nemocných s AR činil rozdíl mezi metodami jen 6%. Při vyšších výdechových rychlostech (rozmezí 150-250 ml/s) poskytly metody P a T srovnatelné hodnoty $J_{aw}NO$ (obrázek 16). Rozdíl hodnot $J_{aw}NO$ získaných metodami P a T u pacientů s AR v rozsahu 50-250 ml/min byl nižší než u astmatiků a posun spodní hranice rozmezí z 50 na 150 ml/s se projevil jen malým zlepšením srovnatelnosti výsledků. V intervalu nejvyšších výdechových rychlostí (150-250 ml/s) dosáhl poměr (P/T) hodnot $J_{aw}NO$ u astmatiků 1,03 (průměr, 95% interval spolehlivosti: 0,73 - 1,33). Ve skupině AR činil průměrný poměr 0,99 (95% interval spolehlivosti 0,90 - 1,10).



Obrázek 16: Aritmetické průměry a 95% interval spolehlivosti poměrů (P/T) odhadovaných hodnot (a) $C_{A}NO$ a (b) $J_{aw}NO$ zjištěných metodami P a T ve třech intervalech výdechových rychlostí. Analýza variability ukazuje významný vliv rozsahu výdechových rychlostí na poměry hodnot $C_{A}NO$ astmatiků ($P < 0,001$) a pacienti alergické rinitidy ($P < 0,05$) a na poměr hodnot $J_{aw}NO$ u astmatiků ($p < 0,001$). U

pacientů s alergickou rýmou, zúžení rozsahu výdechových rychlostí nemělo významný vliv na rozptyl poměrů hodnot J_{awNO} ($p = 0,19$).

Srovnání FENO parametrů u pacientů s astmatem a alergickou rýmou. Bez ohledu na rozsah výdechových rychlostí při měření a zvolenou metodu odhadu C_{ANO} a J_{awNO} nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v hodnotách těchto ukazatelů mezi pacienty s astmatem a AR (tabulka 10). Ve srovnávaných skupinách měl nicméně výběr rozsahu výdechových rychlostí značný vliv na procentuální rozdíly v hodnotě mediánu sledovaných hodnot. Hodnota mediánu C_{ANO} ve skupině astmatiků zjištěná metodou P při pěti výdechových rychlostech (50-250 ml/s) byla vyšší o 34% ve srovnání se skupinou AR pacientů, zatímco hodnota mediánu C_{ANO} získaná ze třech nejvyšších výdechových rychlostí (150-200-250 ml/sec), se lišila o 26%. Rozdíl v hodnotě mediánu J_{awNO} , mezi skupinami AA a AR dosáhl 17% při pěti výdechových rychlostech, a dále se zvýšil na 53%, v případě odhadu hodnoty z třech výdechových rychlostí (150-200-250 ml/sec). Volba rozsahu výdechových rychlostí měla stejný vliv na rozdíly mezi sledovanými skupinami v hodnotě mediánu pro odhad C_{ANO} a hodnotu mediánu J_{awNO} získané metodou T (obrázek 17).



Obrázek17: Vliv rozmezí výdechových rychlostí na výsledek srovnání hodnot J_{awNO} u nemocných s alergickým astmatem (tmavé sloupce) a alergickou rýmou (prázdné sloupce).

4.5. Odhad všech parametrů dvoukompartmentového modelu kombinací metod podle Tsoukiase (metoda T) a Högmanové

Vyšetřeny byly zdravé děti s atopií a bez atopie, děti s alergickou rýmou a děti s lehkým až středně těžkým průduškovým astmatem (tabulka 11). Při výdechových rychlostech 30, 50, 100, a 250 ml/s byly provedeny dva výdechy do přístroje. Parametry dvoukompartmentového modelu C_{ANO} a J_{awNO} byly získány lineární regresní metodou podle Tsoukiase (metoda T) s využitím duplicitního měření při

rychlostech 100 ml/s a 250 ml/s (viz část 5.1). Hodnoty $C_{aw}NO$ a $D_{aw}NO$ vypočítal software chemiluminiscenčního analyzátoru metodou podle Högmanové et al [23]. Naše modifikace metody podle Högmanové spočívala v nahrazení nejnižší výdechové rychlosti 10 ml/s rychlostí 30 ml/s. Úprava byla motivována záměrem zkrátit trvání výdechu, protože ustálení koncentrace FENO je při nízkých výdechových rychlostech mnohem pomalejší. Vyžaduje v mnoha případech až 20-30 s, a to je zejména pro malé děti příliš dlouhý interval.

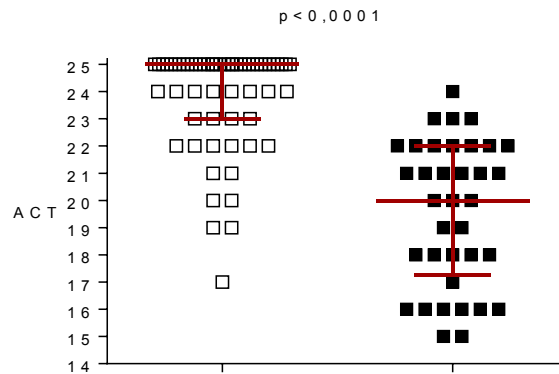
Rozdíl v osaženém skóre subjektivního vnímání kontroly nad astmatem mezi skupinami astmatiků s dobrou a nedostatečnou kontrolou v testu kontroly nad astmatem demonstruje obrázek 18. Hodnoceno podle kritérií GINA [3]. Závislost FENO na výdechové rychlosti znázorňuje obrázek 19. Obrázek 20 umožňuje zhodnotit rozdíly mezi skupinami v koncentracích FENO naměřených při všech výdechových rychlostech. Statistický souhrn a porovnání hodnot FENO (50 ml/s), C_{ANO} , $J_{aw}NO$, $D_{aw}NO$ a $C_{aw}NO$ uvádí tabulka 12 a obrázek 21. U dětí s astmatem pod nedostatečnou kontrolou byly zjištěny vyšší hodnoty koncentrace FENO a parametrů $J_{aw}NO$ a $C_{aw}NO$ než ve skupinách nemocných s astmatem pod kontrolou, s alergickou rýmou a v kontrolním souboru zdravých dětí s atopií. Hodnoty parametrů C_{ANO} a $D_{aw}NO$ byly ve všech skupinách srovnatelné.

Tabulka 11: Charakteristiky souboru a údaje o farmakoterapii

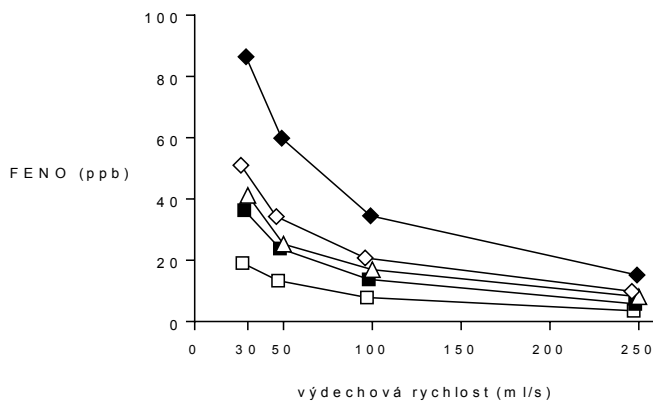
	zdravé osoby		alergická rýma	atopické průduškové astma	
	bez atopie	s atopií		pod kontrolou	nedostatečná kontrola
N	16	11	46	63	28
pohlaví (m/ž)	7/9	5/6	28/18	42/21	16/12
věk (roky)	14,1 (8,8-18,1)	13,2 (9,4-17,9)	12,4 (6,6-18,2)	13,7 (8,5-18,8)	12,9 (5,7-18,7)
výška (cm)	157 (132-185)	159 (138-169)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

ACT...test kontroly nad astmatem, SPT...kožní prick test, SLIT...sublinguální alergenová imunoterapie,

IKS...inhalační kortikosteroidy, nKS...nosní kortikosteroidy. H1AH...H₁-antihistaminika per os

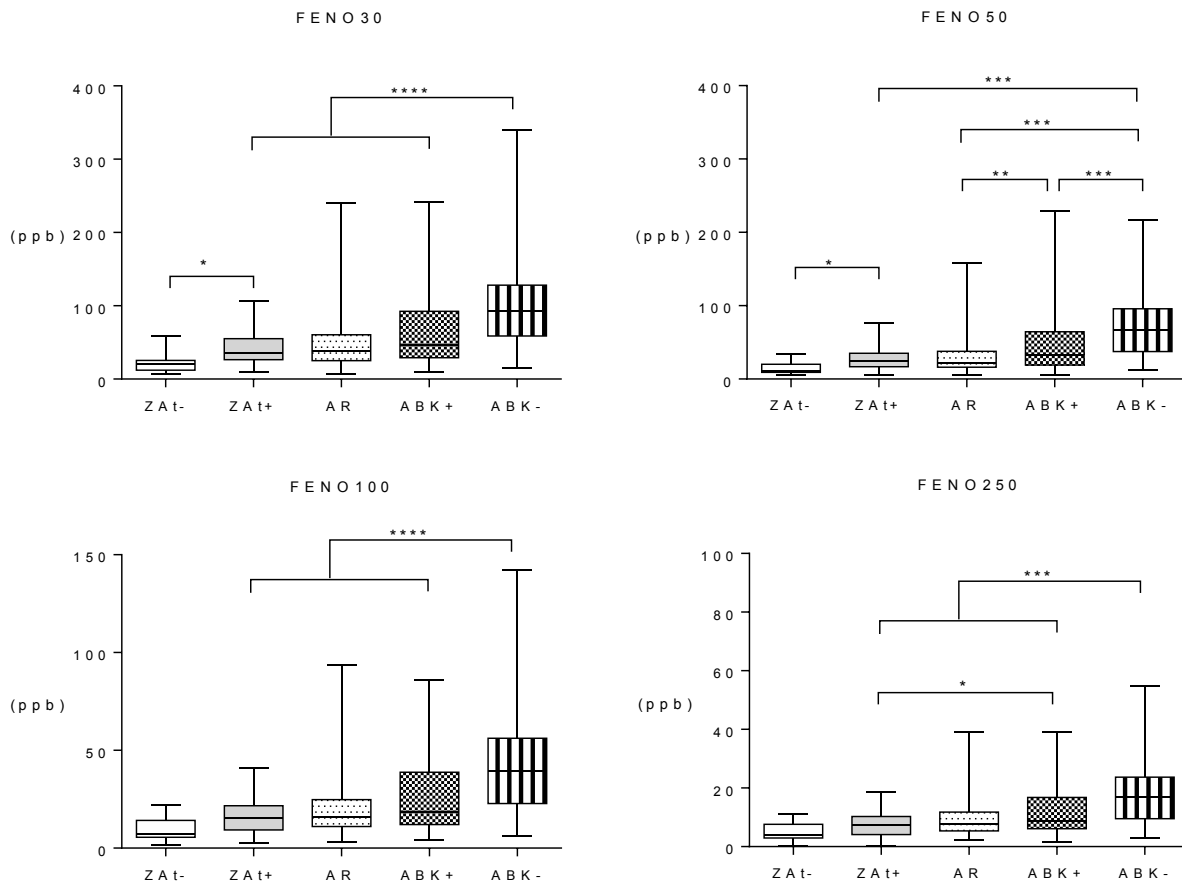


Obrázek 18: Subjektivní hodnocení kontroly nad astmatem pomocí standardizovaného dotazníku Test kontroly nad astmatem (ACT, škála 0-25). *Symbols:* □...astma pod dobrou kontrolou, ■...astma pod nedostatečnou kontrolou podle kritérií GINA.

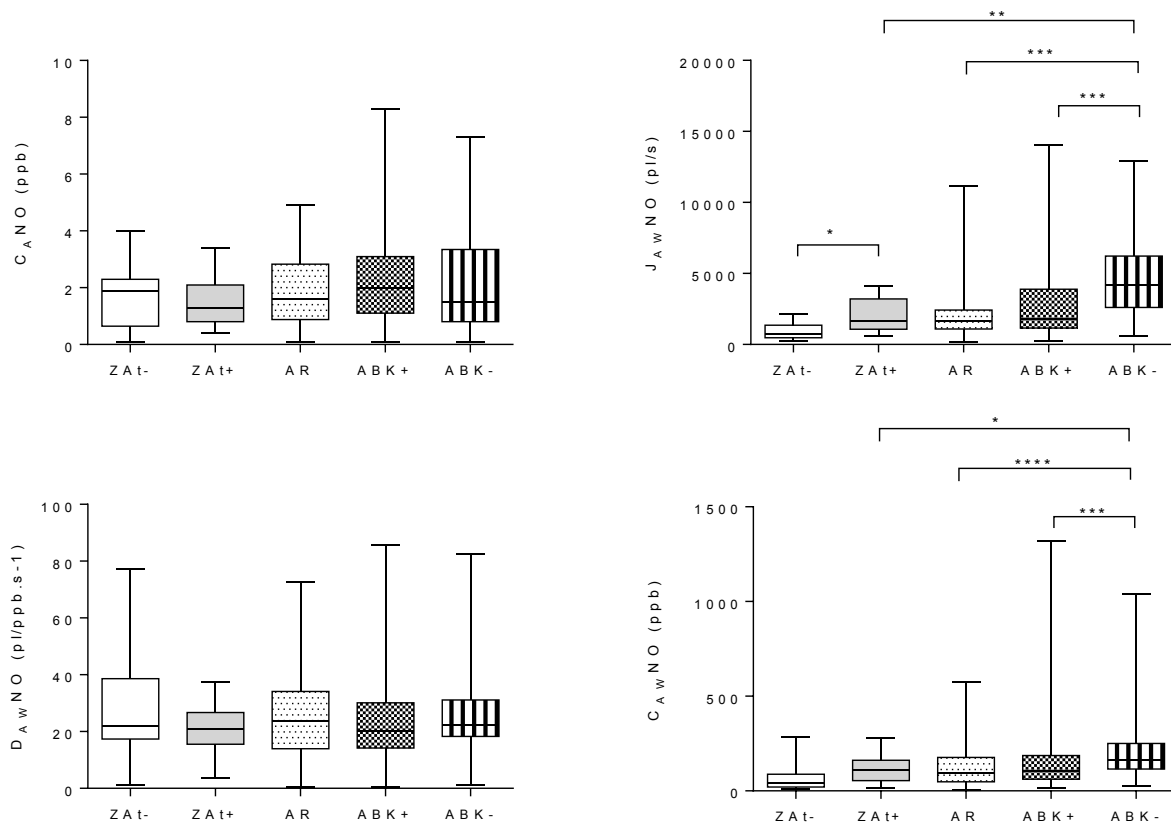


Obrázek 19: Závislosti frakce NO ve vydechovaném vzduchu (geometrické průměry FENO) na výdechové rychlosti, získané u zdravých dětí a mladistvých a jejich vrstevníků s alergickými onemocněními dýchacích cest. "

Symbols: □...zdravé osoby bez atopie, ■...zdravé osoby s atopií, Δ...alergická rýma bez astmatu, ◇...astma pod dobrou kontrolou, ◆...astma pod nedostatečnou kontrolou.



Obrázek 20: Srovnání koncentrací FENO vyšetřených při výdechových rychlostech 30, 50, 100 a 250 ml/s u zdravých dětí a mladistvých bez atopie a s atopií a jejich vrstevníků s alergickými onemocněními dýchacích cest. *Symbols:* ZAt-...zdravé osoby bez atopie, ZAt+...zdravé osoby s atopií, AR...alergická rýma bez astmatu, ABK+...alergické astma bronchiale pod dobrou kontrolou, ABK-...alergické astma bronchiale pod nedostatečnou kontrolou. Srovnání skupin: 1/ ZAt- vs. ZAt+ a 2/ všechny skupiny s atopií mezi sebou (ZAt+, AR, ABK, ABK-).



Obrázek 21: Srovnání parametrů přestupu NO do vydechovaného vzduchu u zdravých dětí a mladistvých bez atopie a s atopií a jejich vrstevníků s alergickými onemocněními dýchacích cest. *Symbols: ZAt-...zdravé osoby bez atopie, ZAt+...zdravé osoby s atopií, AR...alergická rýma bez astmatu, ABK+...alergické astma bronchiální pod dobrou kontrolou, ABK-...alergické astma bronchiální pod nedostatečnou kontrolou, $J_{aw}NO$...bronchiální tok NO, $C_A NO$...alveolární koncentrace NO, $D_{aw}NO$...difúzní kapacita bronchiální stěny pro NO, $C_{aw}NO$ koncentrace NO ve stěně bronchů* Srovnání skupin: 1/ ZAt- vs. ZAt+ a 2/ všechny skupiny s atopií mezi sebou (ZAt+, AR, ABK, ABK-).

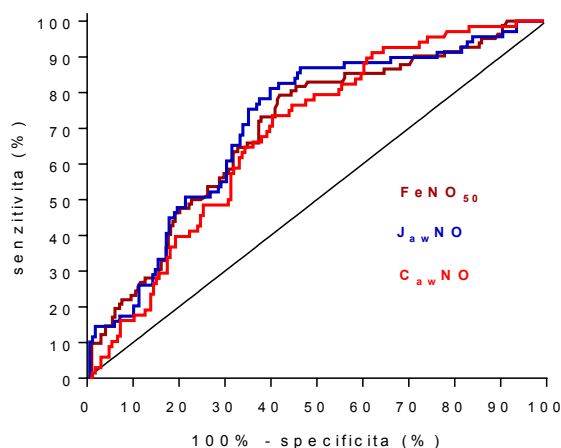
Tabulka12: Výsledky vyšetření frakce NO ve vydechovaném vzduchu (FENO₅₀) a parametrů dvoukompartimentového modelu, charakterizujících přestup NO do vydechovaného vzduchu u zdravých dětí a mladistvých a jejich vrstevníků s alergickou rýmou a alergickým průduškovým astmatem.

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

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

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

Hodnoty FENO₅₀ a parametrů J_{aw}NO a C_{aw}NO se významně lišily ve skupinách astmatiků s dobrou a nedostatečnou kontrolou nad astmatem (obrázek 21). Schopnost studovaných veličin plnit úlohu diagnostického testu pro hodnocení úrovně kontroly nad astmatem, tj odlišit nemocné s dobrou a nedostatečnou kontrolou nad astmatem) byla dále zhodnocena ROC analýzou (z angl. „Receiver Operating Characteristic Curve“). ROC křivka popisuje vztah senzitivity a specifity testu při různých prahových hodnotách testu. Plochy ROC byly u parametrů FENO₅₀, J_{aw}NO a C_{aw}NO srovnatelné a jejich hodnoty, blíží se 0,70, je možné označit za hraniční pro klinickou použitelnost testu (obrázek 22, tabulka 13). Test bez diagnostické efektivity s diagonálním průběhem ROC křivky má AUC = 0,50. Senzitivitu, specifitu a relativní pravděpodobnost pro vybrané hraniční hodnoty parametrů uvádí tabulka 14



Obrázek 22: ROC křivky pro parametry FENO₅₀, J_{aw}NO, C_{aw}NO

Tabulka 13: Plochy pod ROC křivkou pro parametry FENO₅₀, J_{aw}NO, C_{aw}NO.

	AUC	standardní chyba	95% interval spolehlivosti	P-hodnota ^a
FENO50	0,698	0,0340	0,631-0,764	<0,0001
J _{aw} NO	0,713	0,0362	0,642-0,784	<0,0001
C _{aw} NO	0,682	0,0359	0,612-0,753	<0,0001

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

Tabulka 14: Diagnostický přínos parametrů FENO₅₀, J_{aw}NO, C_{aw}NO pro odlišení nemocných s nedostatečnou a dobrou kontrolou nad astmatem

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

5. Diskuze

Ověření přínosu nové vyšetřovací metody musí předcházet standardizace postupu vyšetření a studium technických faktorů, které mohou negativně ovlivnit přesnost a správnost výsledku. Cílem značné části dizertační práce bylo ověřit, který z postupů vyšetření bronchiálního a alveolárního NO má dobrou přesnost a správnost a zároveň je přijatelný z pohledu nároků na spolupráci vyšetřované osoby i na časovou a pracovní zátěž personálu provádějícího vyšetření. Když je technická stránka vyšetření optimalizována, má teprve smysl zahájit další fázi ověřování metody, která spočívá ve zjišťování vlivu biologických faktorů včetně onemocnění a jeho tíže na výsledek vyšetření. Má-li plnit vyšetření úlohu bioindikátoru, využitelného při diagnóze a monitorování terapie určitého onemocnění, např. průduškového astmatu, měl by být vliv jiných biologických faktorů na výsledek vyšetření relativně malý nebo by měl být co nejvíce potlačen (instruktáž a příprava nemocného před vyšetřením, dodržení stanovených podmínek pro vyšetření, správně definované referenční hodnoty). K takovým faktorům s možným vlivem na výsledek vyšetření patří demografické charakteristiky včetně genetických, jiná onemocnění jako např. akutní infekce, cirkadiální vlivy, stravovací návyky, expozice toxickým látkám, další faktory vnějšího prostředí aj. Završení procesu validace bioindikátoru onemocnění je možné spatřovat v získání důkazů o tom, že jako diagnostický test spolehlivě potvrzuje nebo vylučuje přítomnost onemocnění, že hodnoty bioindikátoru korelují s tíží onemocnění a při dlouhodobém sledování odrážejí klinicky relevantní změny v průběhu onemocnění (remise, riziko akutní exacerbace, zhoršení stavu vyžadující úpravu terapie apod.).

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

Podmínkou aplikace lineární regresní analýzy na upravenou a zjednodušenou rovnici dvoukompartmentového modelu je, aby výdechová rychlost byla číselně alespoň 10krát větší než hodnota faktoru D_{awNO} , vystupujícího v rovnici. Aby mohla být použita rychlost 50 ml/s, hodnota D_{awNO} by měla optimálně být nižší než 5 pl/s.ppb⁻¹. Pokud je D_{awNO} vyšší, měla by být nejnižší výdechová rychlost při měření adekvátně vyšší. V opačném případě je poměr hodnot nižší než 10:1 [30]. Nedodržení podmínky se projevuje jako nelinearita závislostí, která negativně ovlivňuje správnost a

přesnost odhadu parametrů $J_{aw}NO$ a $C_{A}NO$.

V naší úvodní studii jsme zjistili, že:

- 1/ V rozmezí výdechových rychlostí 50 až 250 ml/s se v souboru dětí a mladistvých s alergickými onemocněními dýchacích cest projevuje nelinearita závislosti FENO na reciproké hodnotě výdechové rychlosti (metoda Pietropaoli) a V_{NO} na výdechové rychlosti (metoda Tsoukias), v jejímž důsledku jsou hodnoty $C_{A}NO$ vyšší a $J_{aw}NO$ nižší než v lineární oblasti závislosti, tj. při použití adekvátně vysokých výdechových rychlostí. Při odhadu parametrů z měření, zahrnujících nejnižší výdechovou rychlost 50 ml/s, dochází k nadhodnocení alveolárního zdroje (hodnoty $C_{A}NO$) a podhodnocení bronchiálního zdroje (hodnoty $J_{aw}NO$) vydechovaného NO.
- 2/ Jako optimální pro odhad $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ z lineární oblasti rovnice popisující dvoukompartmentový model je možné v našem studijním souboru dětí a mladistvých označit rozmezí 100-250 ml/s a počet výdechových rychlostí =4 (100, 150, 200 a 250). Naše zkušenosti i literární údaje ukazují, že většina pacientů je schopna vydechovat rychlostí 250 - 300 ml/s po dobu nutnou k ustálení hodnoty FENO [31, 32]. Je předností naší práce, že byl použit tak vysoký počet výdechových rychlostí, spadajících do lineární oblasti. To je v publikovaných pracích zaměřených na stejnou problematiku málo časté. Např. rozsáhlá prospektivní studie s 1507 účastníky, která srovnala různé metody výpočtu $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$, zpracovala výsledky měření FENO pro lineární regresi pouze při rychlostech 50, 100 a 300 ml/s [30]. Při optimální kombinaci výdechových rychlostí (100, 150, 200 a 250), definované v naší práci, jsou rozdíly mezi metodami P a T pravděpodobně klinicky nevýznamné: medián $C_{A}NO$ vypočítaný Pietropaolliho metodou je o 15 % vyšší a medián $J_{aw}NO$ o 9 % nižší ve srovnání s postupem podle Tsoukiase. Oba postupy charakterizuje srovnatelná nepřesnost odhadu, která je vyšší u $C_{A}NO$ (standardní chyba 26 %) než u $J_{aw}NO$ (10 %).
- 3/ Z pohledu splnění podmínky linearit závislosti byla ještě lepší kombinace rychlostí 150, 200 a 250 ml/s. Hodnoty $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ získané metodami P a T se při vyšetření v tomto rozmezí výdechových rychlostí nelišily. Přesto hodnotíme tyto výdechové rychlosti jako neoptimální z důvodu nepříjemně vysoké standardní chyby odhadu $C_{A}NO$ (> 40%), která shodně charakterizovala jak metodu P tak i T. Jedná se o důsledek příliš úzkých rozmezí pro veličiny vynášené na osách X a Y s negativním dopadem na přesnost odhadu parametrů lineární regresi přímky.
- 4/ Výpočet s použitím pouze dvou výdechových rychlostí vylučuje ověření linearit a nelze jej obecně doporučit. Zkrácení postupu a snížení zátěže pro vyšetřovanou osobu by byly z praktického pohledu naopak výhodné. Vyšetření FENO při rychlostech 100 ml/s a 250 ml/s jsme proto zkombinovali s odhadem $C_{A}NO$ metodou T a $J_{aw}NO$ metodou P. Použili jsme obě

metody současně, protože přesnost odhadu $C_{A}NO$ metodou T je mírně vyšší a naopak, metoda P přesněji odhaduje $J_{aw}NO$. Důvod mírně odlišné přesnosti odhadu souvisí s tím, že při lineární regresní analýze je obecně vyšší přesnost (= menší standardní chyba) odhadu směrnice přímky než úseku na ose Y. V našem souboru malého rozsahu zjednodušená technika zvýšila standardní chybu odhadu $C_{A}NO$ jen mírně (z 26% na 30%).

5/ Parametr $J_{aw}NO$ těsně koreloval s koncentrací $FENO_{50}$ vyšetřenou při výdechu rychlostí 50 ml/s ($r_s=0.96$). Existence těsné korelace potvrzuje obecně přijímaný názor, že při této výdechové rychlosti se NO uvolněné v bronších podílí na celkově vydechnutém množství NO z více než 80%. Nabízí se otázka, zda složitější vyšetření $J_{aw}NO$ přináší navíc nějakou upřesňující informaci o množství NO uvolňovaném v bronších oproti vyšetření $FENO_{50}$. Naopak korelace mezi $C_{A}NO$ a koncentrací $FENO_{250}$ byla mnohem méně těsná ($r_s=0.66$).

I výsledky druhé studie podporují závěr, že metody P a T vyžadují analýzu závislosti vydechovaného NO na větším počtu výdechových rychlostí ≥ 100 ml/s, aby bylo možno odhadnout $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ s dostatečnou přesností a správností. V úvahu připadá i doplnění měření o nižší výdechové rychlosti, ale výhradně za podmínky pečlivého posouzení linearitu závislosti u každého pacienta. Vliv nelinearity na výsledek odhadu $C_{A}NO$ byl v naší studii vyšší u dětí s průduškovým astmatem než u dětí s alergickou rýmou. Tato skutečnost se promítla do výsledku vzájemného srovnání $C_{A}NO$ mezi skupinami. Podobný závěr platí i pro parametr $J_{aw}NO$. Pro obě skupiny nemocných byla linearita závislosti potvrzena až v rozmezí rychlostí 150-250 ml/s. V uvedeném rozmezí nebyly zjištěny rozdíly mezi výsledky odhadu $C_{A}NO$ a $J_{aw}NO$ metodami P a T. Nicméně snížení rozsahu a počtu výdechových rychlostí se opět projevilo zvýšenou chybou odhadu parametrů, zejména $C_{A}NO$. Výsledky dizertační práce jednoznačně potvrzují nutnost měření koncentrace vydechovaného NO v rozmezí výdechových rychlostí vyhovujících podmínce linearitu upravených rovnic dvoukompartimentového modelu. V obou sledovaných skupinách nemocných byly rozdíly výsledků spadající na vrub nedodržení podmínky linearitu natolik významné, že je není možné ignorovat.

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

přesnost odhadu je lepší, pokud jak počet i rozsah výdechových rychlostí jsou vyšší. Navrhujeme tolerovat pokles o 20%, což je procento odpovídající běžné dosahované chybě odhadu C_{ANO} .

S problémem nelinearity se při odvození parametrů dvoukompartimentového modelu potýkali i další autoři. Ve své studii použili Paraskakis et al. metodu T a porovnávali skupinu astmatiků a zdravých dětí [31]. Z důvodu porušení linearity bylo z hodnocení vyřazeno 20% subjektů. Jejich společným rysem byly vyšší hodnoty FENO při výdechové rychlosti 50 ml/s a nižší FEV_1 . Z těchto údajů lze dovozovat, že se jednalo o děti s astmatem. Vyšší hodnota FENO potvrzuje intenzivněji probíhající zánět ve stěně dýchacích cest, který u dětí může vést ke snížení FEV_1 . Metodická chyba v hodnocení J_{awNO} z důvodu nelinearity se u těchto nemocných uplatní více než u nemocných s AR, jak potvrzují naše vlastní data i data jiných autorů [33].

Hodnoty C_{ANO} a J_{awNO} , získané v naší studii, jsou dobře porovnatelné s literárními údaji jiných autorů (tabulka 15). V tabulce jsou uvedeny studie, v nichž autoři nepoužili korekci vlivu axiální difuze NO na sledované parametry alveolárního a bronchiálního NO. Je patrné, že pokud autoři použili nízké výdechové rychlosti a současně lineární regresní analýzu, u zdravých neatopických dětí naměřili $C_{\text{ANO}} >4$ ppb a J_{awNO} naopak bylo nízké (310 ppb) [34]. Naopak při aplikaci nelineární regresní analýzy v širokém rozmezí rychlostí včetně velmi nízkých byla střední hodnota C_{ANO} blízká převažujícím výsledkům metody T, aplikované na měření koncentrace NO při vyšších výdechových rychlostech [35]. Ve většině studií nebyl nalezen rozdíl mezi koncentrací C_{ANO} u nemocných dětí s astmatem léčených protizánětlivou farmakoterapií (ve velké většině IKS) a výsledky zdravých dětí nebo byly rozdíly malé. Naše výsledky jsou nejlépe srovnatelné s výsledky studie, kterou publikovali Pedroletti a spolupracovníci [36].

Na problém obtížné srovnatelnosti metod odhadu C_{ANO} použitých v různých studiích upozornila zcela jednoznačně recentní práce autorů z Kalifornie [33]. V souboru 1640 dětí ve stáří 12-15 let vyšetřili FENO při 4 výdechových rychlostech (30, 50, 100, 300ml/s) a poté provedli odhad hodnot C_{ANO} a J_{awNO} pomocí lineárního modelu Tsoukiase, nelineárního modelu Hogmanové a Condoreliho modelu, zohledňujícího axiální difuzi NO (model T, H, C) [20, 21, 23]. Srovnatelnost výsledků všech tří metod byla dobrá pro hodnotu J_{awNO} (75-89%), zatímco pro C_{ANO} to bylo pouze (13-41%). V případě modelu T absence korekce chyby axiální difuze vedla k nadhodnocení J_{awNO} i C_{ANO} . U modelu C bylo, pravděpodobně v důsledku nadhodnocené korekce chyby axiální difuze NO v dýchacích cestách, mnoho hodnot C_{ANO} negativních, naopak hodnoty J_{awNO} byly nápadně vyšší ve srovnání s dalšími metodami. V souboru byli nemocní s astmatem, pravděpodobně ne zcela dobře kontrolovaným léčbou (IKS u méně než 20% nemocných), čímž mohla být chyba modelu C ještě amplifikována. Metoda H se s chybou axiální difuze vyrovnává nejlépe.

Tabulka 15: Metody vyšetření a mediány alveolární koncentrace NO u dětí s astmatem a zdravých dětí

studovaná populace	výdechové rychlosti a metoda výpočtu	C_ANO (ppb)	J_{aw}NO (pl/s)	cítace
děti s atopickým astmatem, IKS, 8-19 let, průměr 14 let zdravé děti bez atopie, 9-18 let, průměr 14 let	100 a 250 ml/s, metoda T	2 1,9	1810 738	disertační práce
děti s atopickým astmatem, léčené IKS 7-18 let, průměr 13 let	50-250 ml/s, metoda T	4,3	1310	disertační práce
děti s atopickým astmatem, IKS, 8-18 let, průměr 14 let zdravé děti bez atopie, 8-18 let, průměr 12 let	100 a 500 ml/s, metoda T	1,5 1,2	2600 800	Pedroletti [37]
děti s atopickým astmatem, IKS, 10-19 let, průměr 14 let zdravé děti bez atopie, 10-20 let, průměr 15 let	100 a 300 ml/s, metoda T	2,1 1,8	651 470	Heijkenskjold- Rentzhog [38]
zdravé děti bez atopie, 7-13 let, průměr 9 let	50, 100 a 200 ml/s, metoda T	1,9	400	Sepponen [39]
zdravé děti bez atopie, 8-16 let, průměr 14 let	100, 200 a 260 ml/s, metoda T	1,5	509	Suri [40]
zdravé děti bez atopie, 4-18 let, průměr 11 let	10, 20, 45, 86, 184 a 237 ml/s, metoda T	4,3	310	Latzin [41]
zdravé děti bez atopie, 6-18 let, průměr 12 let	50, 100 a 150 ml/s, metoda T	1,0	833	Radhakrishnan [34]
zdravé děti, průměr 13,6 let (SD 3,2) děti s atopickým astmatem, 13,2 let (SD 3), IKS 84%	30, 50, 100, 150, 200 a 250 mL/s nelineární regrese	1,4 1,2	664 1260	Keen [42]
zdravé děti bez atopie, 7-13 let, průměr 10 let	100, 200 a 300 ml/s, metoda T	2,4	500	Linkosalo [35]
děti s atopickým astmatem, léčené IKS (85 %) nebo montelukastem (15 %), 10-19 let, průměr 14 let	50-250 ml/s, metoda T	4,2	800	Mahut [43]
zdravé děti, 7-17 let, průměr 13 let	50-150 ml/s, metoda T	4,2	320	Mahut [18]

Autoři vyslovili hypotézu, že tato metoda by mohla být cestou k přesnějšímu hodnocení rozdílů hodnot C_{ANO} a J_{awNO} především v případě nemocných s lehkým a středně těžkým astmatem. Shin publikoval teoretickou práci zabývající se podhodnocením FENO vlivem axiální difúze NO, která je opomíjena v dvoukompartmentovém modelu [44]. Následně Condorelli ve své práci provedl matematickou korekci výpočtu C_{ANO} podle Tsoukiase, kterou ale ověřil pouze ve studii se zdravými osobami [19]. Tuto korigovanou Tsoukiasovu metodu použil Kerckx pro srovnání hodnot J_{awNO} i C_{ANO} u zdravých osob a astmatiků s astmatem pod dobrou kontrolou a nenašel mezi těmito dvěma skupinami rozdíl [24]. Funkčnost modelu na zdravých dobrovolnících a selhání u astmatiků jasně demonstruje problém v analýze NO ve vydechovaném vzduchu při více výdechových rychlostech. Numerická chyba odhadu hodnoty J_{awNO} i C_{ANO} je dána nejen použitým modelem a z něj vycházející matematickou konstrukcí odhadu J_{awNO} a C_{ANO} , ale i charakteristikami vyšetřovaných osob.

Výsledky nelineární regresní analýzy, která umožňuje získat všechny parametry dvoukompartmentového modelu, byly v našem souboru při měření v rozmezí výdechových rychlostí 50 ml/s až 250 ml/s nevyhovující. Více než 25% hodnot C_{ANO} bylo záporných, což je nepochybně důsledek vysoké chyby odhadu. Nepřesnost byla ovlivněna skutečností, že měření při nejnižší výdechové rychlosti 30 ml/s, vyžadující jiný adaptér pro regulaci průtoku, jsme v době práce na této části studie neměli k dispozici. Ve srovnání s výsledky, získanými lineární regresní analýzou v rozsahu rychlostí 100 - 250 ml/s, byl medián C_{ANO} o 55 % nižší a medián J_{awNO} o 29% vyšší. Také odhad parametrů D_{awNO} a C_{awNO} nebyl přesný. Teoretické práce uvádějí, že k lepším výsledkům při analýze nelineární regresí je nutné vyšetření při výdechu konstantní rychlostí 10 ml/s i nižší. Výdech musí trvat po dobu 30 s i déle. To se zdá být u dětí obtížně realizovatelné.

Další ověřovanou metodou na získání parametrů NO bylo vyšetření FENO při třech rychlostech (30, 100 a 250 ml/s) hodnocené iteračním algoritmem podle Högmanové a spolupracovníků [23]. Výpočet byl výrobcem přístroje naprogramován v nové verzi software, ovládajícího chemiluminiscenční analyzátor. Jedinou modifikací oproti publikovanému postupu bylo zařazení nejnižší výdechové rychlosti 30 ml/s namísto 10 ml/s, které bylo motivováno naší snahou zkrátit trvání výdechu. Parametry dvoukompartmentového modelu byly srovnány mezi skupinami zdravých neatopických a atopických dětí, dětí s alergickou rýmou a dětí s atopickým astmatem. Většina astmatiků užívala v době vyšetření inhalační kortikosteroidy (81%) a astma bylo pod dobrou kontrolou u 69% souboru.

Závěry z této části práce jsou následující:

- 1/ Děti s astmatem měly vyšší hodnoty FENO₅₀ a C_{awNO} než ostatní děti. Rozdíly byly způsobeny vyššími hodnotami pozorovanými u astmatiků se špatnou kontrolou astmatu.
- 2/ Hodnoty parametru J_{awNO} nedovolily odlišit děti s astmatem od dětí s alergickou rýmou a atopických zdravých dětí. Při analýze s přihlédnutím k dosažené kontrole astmatu však byly

hodnoty $J_{aw}NO$ u nemocných s nekontrolovaným astmatem výrazně vyšší než v ostatních skupinách.

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

4/ Diagnostická schopnost odlišit nemocné s dobrou a špatnou kontrolou astmatu byla u parametrů $FENO_{50}$, $J_{aw}NO$ a $C_{aw}NO$ srovnatelná. Hodnota AUC pod křivkou ROC rovná 0,70 je na hranici klinické použitelnosti testu.

Přehled studií, které se zaměřily na možný přínos vyšetření C_{ANO} a $J_{aw}NO$ uvádí tabulka 16. Závěry všech důležitých studií dokládají v soulase s výsledky dizertační práce, že parametr $J_{aw}NO$ těsně koreluje s $FENO_{50}$ a nepřináší při diagnóze a monitorování astmatu výhody. Proto tabulka obsahuje pouze ty závěry studií, které se týkaly C_{ANO} . Paraskakisova studie byla jedna z prvních, které se pokusily odpovědět na otázku přínosu $J_{aw}NO$ a C_{ANO} . Její závěr byl opatrný: $J_{aw}NO$ má podobnou výpovědní hodnotu jako $FENO_{50}$ a C_{ANO} je zvýšeno u astmatiků v porovnání se zdravou populací dětí s atopií [31]. V závěru autoři spekulují, že vyšší koncentrace C_{ANO} by mohla být odrazem zánětu v malých dýchacích cestách při špatné kontrole nad astmatem. Velkou limitací zmíněné studie byly potíže se splněním podmínky linearitity při výpočtu parametrů, které byly důvodem vyřazení 15% účastníků. Puckett a spolupracovníci zvolili trumpetový model dýchacích cest ve studii s 200 astmatiky. Popsali korelaci mezi výsledky vyšetření C_{ANO} a klinickými potížemi [32]. Závislosti C_{ANO} na výsledku bronchodilatačního testu, na dávce steroidů, atopii, ani na plicní funkci naopak prokázány nebyly. Autoři vyslovili názor, že C_{ANO} je ukazatelem dysfunkce malých dýchacích cest. Mahut v rozsáhlé studii použil Condoreliho metodu korekce vlivu axiální difuze na C_{ANO} . Soubor nemocných dětí starších 10ti let a dospělých osob ($N = 200$) byl heterogenní a zahrnul převážně osoby s atopickým astmatem (82 % souboru) užívající preventivní protizánětlivou farmakoterapii (78 % kombinace IKS+LABA, 5% IKS). Při souhrnné analýze bez ohledu na věkové skupiny měla převažující část souboru středně těžké (33 %) nebo těžké (47 %) průduškové astma. Úroveň kontroly nad astmatem podle dotazníku ACQ, („Asthma control questionnaire“) neměla na korigovanou hodnotu C_{ANO} vliv. Autoři nepozorovali ani vztah mezi C_{ANO} a tíží astmatu podle kritérií GINA, přihlížejících k intenzitě symptomů, plicní funkci a dávce protizánětlivé farmakoterapie. Důležitým pozorováním byla existence inverzní korelace mezi $MEF_{25-75\%}$ a C_{ANO} [43].

Tabulka 16: Přehled klinických studií zaměřených na možný přínos vyšetřování alveolární koncentrace NO u dospělých s astmatem

studovaná populace	výdechové rychlosti a metoda výpočtu	závěr o přínosu C _A NO	citace
dospělí s atopickým astmatem léčení IKS a zdravé osoby	10 až 200 ml/s, nelineární regrese	významně vyšší koncentraci 7,1 ppb u nemocných s nekontrolovaným astmatem (lehké/středně těžké AB 3,4 ppb; zdravé osoby 3,4 ppb) snížila kúra prednisonu na úroveň zdravých osob, zdvojnásobení dávky IKS bez efektu na C _A NO	Berry [45]
dospělí s atopickým astmatem před léčbou a zdravé osoby	50-200 ml/s, metoda T i trumpetový model s korekcí na axiální difuzi NO	C _A NO u astmatiků vyšší než u zdravých osob: 12,9 vs 3,9 ppb, po korekci 10,1 vs 2,8 ppb, korelace s FEF ₂₅₋₇₅	Kobayashi [46]
dospělí s atopickým astmatem před a po léčbě IKS a zdravé osoby	50 až 200 ml/s, metoda T	C _A NO u astmatiků vyšší než u zdravých osob: 14,4 vs 3,8 ppb, snížení po 4t léčbě IKS vyšší po 400 mcg/ den HFA-BDP (o 30%) než po stejné dávce FP (o 10%)	Kanazawa [47]
dospělí s atopickým astmatem léčení IKS a zdravé osoby	100, 150, 200 ml/s, metoda T	C _A NO u astmatiků vyšší než u zdravých osob: 7,4 vs 3,2 ppb, 30 mg/d prednisonu po dobu 5 dní snížilo C _A NO na úroveň zdravých osob,	Gelb [48]
dospělí nekuřáci se středně těžkým a těžkým astmatem léčení kombinací IKS+LABA	100, 150, 200 ml/s, metoda T	abnormální zvýšení C _A NO bylo spojeno s 3krát vyšším rizikem exacerbace astmatu	Gelb [49]
dospělí nekuřáci s atopickým astmatem léčení IKS prospektivně sledovaní 3 roky	100, 150, 200 ml/s, metoda T s korekcí i bez korekce na axiální difuzi NO	C _A NO u astmatiků s dobrou kontrolou nemoci mírně vyšší než u zdravých osob: 5,3 vs 3,9 ppb, při exacerbaci zvýšení na 11 ppb a opět pokles po kúře prednisonu na 5,9 ppb; korekce C _A NO zcela potlačila rozdíly mezi skupinami	Gelb [50]
dospělí nekuřáci s atopickým astmatem léčení IKS+LABA	100, 150, 200 ml/s, metoda T s korekcí na axiální difuzi NO	klinická a spirometrická odpověď na kúru prednisonu při exacerbaci nezávisela na tom, zda FENO nebo C _A NO bylo zvýšené nebo ne, autoři nevidí přínos vyšetřování pro predikci exacerbace	Gelb [51]
dospělí nekuřáci s lehkým atopickým astmatem před léčbou, 37±15 let	50-350 ml/s, metoda T bez korekce	C _A NO vyšší ve skupině s nedostatečnou kontrolou nad astmatem (Asthma Control Test, ACT < 20 (6,7 vs 4,9 ppb)	Scichilone [52]

Tabulka 17: Přehled klinických studií zaměřených na možný přínos vyšetřování alveolární koncentrace NO u dětí s astmatem

studovaná populace	výdechové rychlosti a metoda výpočtu	závěr o přínosu C _A NO	citace
děti s atopickým astmatem (IKS, KS p.o.) a zdravé děti, 4-18 let, průměr 13	50-260 mL/s metoda T bez korekce na axiální difuzi NO	C _A NO u dětí s astmatem bylo vyšší než u a zdravých dětí (2,2 vs 1,4 ppb), atopie u zdravých dětí neměla vliv, nedostatečná kontrola nad astmatem se projevila vyšší hodnotou C _A NO (3,2 ppb)	Paraskakis [31]
děti s atopickým astmatem před léčbou 6-19 let, průměr 10 let a zdravé děti	50-300 ml/s, metoda P bez korekce i s korekcí na axiální difuzi NO	pouze nemocní s BHR indukovanou cvičením měli vyšší koncentraci C _A NO oproti zdravým dětem (4,7 vs 2,3 ppb), která korelovala se změnou FEF75; při použití korekce se rozdíly zmenšily a korelace zmizela	Linkosalo [35]
děti s „lehkým atopickým astmatem před léčbou, medián 10 let	10-200 mL/s metoda T bez korekce na axiální difuzi NO	děti s větším poklesem plicní funkce indukovaným cvičením (deltaFEV1 ≥ 10% nebo deltaFEF ₂₅₋₇₅ ≥ 26%) měly vyšší koncentraci C _A NO (6,6 vs 3,7 ppb)	Chinellato [36]
děti s atopickým astmatem, léčené IKS (79 %) nebo montelukastem (21 %), 6-18 let, průměr 14 a zdravé děti	30 až 250 ml/s, nelineární regrese	C _A NO nemocných a zdravých dětí bylo srovnatelné (1,2 vs 1,4 ppb), 30% nemocných mělo známky zánětu malých DC v testu difúzní kapacity s inhalací inertního plynu a výsledek testu koreloval s C _A NO	Keen [42]
děti starší 10ti let a dospělí (medián 16 let) s astmatem (80% atopie), léčené IKS (83 %)	50 až 250 ml/s, metoda T s korekcí (Kerckx)	nebyla pozorována závislost hodnoty korigované C _A NO na stupni tíže astmatu (kritéria GINA - symptomy a plicní funkce) nebo kontrole nad astmatem zjištěné pomocí dvou dotazníků	Mahut [43]
populační studie, děti s lehkým astmatem (IKS 3 %), alergickou rýmou a zdravé děti, 12-15 let, průměr 13,4	30, 50, 100, 300 ml/s, 3 metody T, T+korekce (Condorelli), Hogman	pouze metoda T poskytla hodnoty C _A NO s konzistentním trendem: astma+IKS (3 ppb) > astma (2,5 ppb) > alergická rýma (2 ppb) > zdravé děti (1,7 ppb), malé rozdíly mezi skupinami	Linn [33]
populační studie, děti a mladí dospělí s atopickým astmatem (IKS 80 %), 10-35 let, průměr 20	100, 200, 300 ml/s, metoda T bez korekce a s korekcí (Condorelli)	pouze metoda T bez korekce poskytla hodnoty C _A NO, které (podobně jako J _{AW} NO) a/závisely na přítomnosti symptomů v posledních 12 měsících a byly vyšší u osob b/s ACT<20 (3 vs 2,6 ppb), c/ s nižší hodnotou FEF ₅₀ , d/ se středně těžkou a těžkou BHR (test s metacholinem), e/ s atopií, f/ a eozinofilii v krvi (>0,5×10 ⁹ /L)	Heijckenskj old-Re ntzhog [54]

O 4 roky později publikovaná práce autorů Scichilone et al [52] přinesla opačný závěr. Úroveň kontroly nad astmatem ovlivnila C_{ANO} v homogenním souboru dospělých osob s lehkým perzistujícím atopickým astmatem bez léčby kortikosteroidy, celoživotních nekuřáků s plicní funkcí v normě. Pokud nemocný užíval preventivní farmakoterapii, bylo vyšetření provedeno za jeden měsíc po jejím přerušení. Exacerbace astmatu v mezidobí po vysazení léčby byla kritériem vylučujícím další účast ve studii. U nemocných s nedostatečnou kontrolou nad astmatem (< 20 bodů v dotazníku ACT, „Asthma Control Test“) byla průměrná hodnota C_{ANO} vyšší než ve skupině s dobrou kontrolou a ACT v rozmezí 20-25 (6,7 oproti 4,9, $p=0,02$). Byla nalezena inverzní korelace mezi skóre ACT a C_{ANO} . V dopisech editorovi časopisu J Allergy Clin Immunol bylo autorům vytýkáno, že neprovedli korekci C_{ANO} na axiální difuzi. Navíc jsou hodnoty C_{ANO} , získané pomocí elektrochemického analyzátoru a 4 výdechových rychlostí v rozmezí 150 až 350 ml/s, mnohem vyšší než ve studiích jiných autorů. Jak Scichilone et al. v odpovědi na kritiku správně argumentují, parametr C_{ANO} není možné získat přímým měřením a jeho odhad pomocí modelů dýchacích cest má svoje skryté limitace, které nelze ignorovat. Hodnota C_{ANO} vypočtená pomocí modelů je nadhodnocená vlivem axiální difuze NO z bronchů. Je ale otázkou, zda je správná snaha příspěvek bronchiálního NO eliminovat pomocí jiných matematických postupů. Ty mají také svoje předpoklady a limitace a mohou do výpočtu vnést další chyby. Od bronchiálního NO „očištěná“ koncentrace C_{ANO} může mít menší schopnost vypovídat o patologických procesech v dýchacích cestách. Např. bylo zjištěno, že konstriktce malých dýchacích cest snižuje zpětnou axiální difuzi NO [53]. Vzorce na korekci C_{ANO} byly odvozeny podle výsledků měření u zdravých dospělých osob a později upraveny, aby zohledňovaly měnící se anatomické poměry v dýchacích cestách u dětí. Jejich aplikace u nemocných s periférní abstrukcí dýchacích cest a menší zpětnou difuzí NO než u zdravých osob tak může způsobit větší než správnou korekci nebo poskytnout záporné hodnoty C_{ANO} [33].

Zvláštní pozornost při hodnocení významu vyšetřování C_{ANO} u dětí s astmatem zasluhují rozsáhlé klinické studie [43, 33, 54], jejichž závěry se rozcházejí přinejmenším částečně z důvodu vlivu provedené korekce nebo její absence na hodnoty C_{ANO} (tabulka 17). Naše výsledky ukazují na malý rozdíl mezi hodnotou koncentrace C_{ANO} u dětí s nedostatečnou a dobrou kontrolou nad astmatem (2,5 vs 2 ppb), který nedosáhl statistické významnosti. Publikace Heijkenskjold-Rentzhog et al uvádí srovnatelný rozdíl mezi dětskými a dospělými astmatiky s nedostatečnou a dobrou kontrolou nad astmatem (3 vs 2,6 ppb), který byl hodnocen jako statisticky významný pravděpodobně vlivem větší velikosti skupin ($N= 109$ vs 267) [54]. Závěry některých studií z poslední doby naznačují, že zvýšené hodnoty C_{ANO} , získané bez použití korekce na axiální difuzi NO, by mohly plnit funkci ukazatele dysfunkce malých dýchacích cest u nemocných s astmatem [42, 35]. Ve srovnání s vyšetřením FENO, které se jako vyšetřovací metoda prosadilo v péči o nemocné astmatem v několika zemích včetně České republiky, zbývá vykonat mnoho výzkumné práce zaměřené na biologické

faktory ovlivňující C_{ANO} a ověření možné úlohy C_{ANO} jako bioindikátoru využitelného v péči o nemocné s astmatem.

6. Závěry ke splnění stanovených cílů práce

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

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

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

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

Cíl 2/ Vliv nelinearity na výsledek odhadu parametrů přestupu NO do vydechovaného vzduchu byl v naší studii vyšší u dětí s průduškovým astmatem než u dětí s alergickou rýmou. Tato skutečnost se promítla do vzájemného srovnání C_{ANO} i $J_{aw}NO$ mezi oběma skupinami nemocných. Výsledky srovnání mohou být při nedodržení podmínky linearity zavádějící. Z tohoto důvodu jsme v práci navrhli metodu na ověření linearity a výběr individuálně vhodného rozsahu výdechových rychlostí, která by měla být automaticky aplikována při každém vyšetření C_{ANO} a $J_{aw}NO$.

Cíl 3/ Výpočet na výdechové rychlosti nezávislých parametrů přestupu NO nelineární regresní analýzou vyžaduje zařazení velmi nízkých výdechových rychlostí (10 ml/s), při kterých trvá ustálení

koncentrace FENO při výdechu dlouhou dobu. Vzhledem k obtížnosti dechového manévru jsou nároky na spolupráci vyšetřované osoby vysoké a vyšetření obtížně realizovatelné u dětí mladšího školního věku.

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

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

Souhrn

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

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

Hodnoty na výdechové rychlosti nezávislých parametrů J_{awNO} a C_{awNO} (koncentrace NO ve stěně bronchu) vypočtené algoritmem podle Högmanové et al (výdechové rychlosti 30, 100 a 250 ml/s) závisely na úrovni kontroly nad astmatem a byly významně vyšší u nemocných s nedostatečnou kontrolou než u nemocných s dobrou kontrolou, zatímco koncentrace C_{ANO} byla srovnatelná. Podle výsledků ROC analýzy je senzitivita a specifita parametrů J_{awNO} a C_{awNO} při diagnóze nedostatečné úrovně kontroly nad astmatem srovnatelná jako u koncentrace FENO. Velikost plochy pod křivkou AUC blízka 0,70 odpovídá diagnostické hodnotě na hranici klinické použitelnosti testu.

Na výdechové rychlosti nezávislé parametry přestupu NO do vydechovaného vzduchu nepřinesly v naší studii lepší informaci než vyšetření FENO standardizovanou metodou při výdechu rychlostí 50 ml/s.

Summary

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

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

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

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

Thus, the results of comparing parameters $C_{aw}NO$ and $J_{aw}NO$ between groups of patients may be misleading if the condition of linearity is not respected. For this reason, we have proposed an iterative method to verify linearity and a selection of individually appropriate range of flow rates. The values of expiratory flow independent parameters $J_{aw}NO$ and $C_{aw}NO$ (concentration of NO in the wall of the bronchus) calculated using the Högman algorithm (expiratory flow rates of 30, 100 and 250 ml /s) depended on the level of asthma control and were significantly higher in patients with poor asthma control over patients with good asthma control, while CANO concentration was similar. According to the results of ROC analysis, the sensitivity and specificity of $J_{aw}NO$ and $C_{aw}NO$ parameters for the detection of poor asthma control is comparable to FENO measurement. The area under the AUC curve

close to 0.70 corresponds to the diagnostic value bordering on the clinical applicability level of this test. Expiratory flow independent parameters for transfer of NO in exhaled air in our study did not produce better information than FENO testing using a standardized method during exhalation rate of 50 ml / s.

Použitá literatura:

1. Teřl, M, Pohunek, P. Strategie diagnostiky, prevence a léčby astmatu. Uvedení globální strategie do praxe v ČR. 1. vyd. Praha: Česká iniciativa pro astma, o.p.s., 2012. ISBN 978-80-86396-67-5
2. Murdoch, JR, Lloyd, CM. Chronic inflammation and asthma. *Mutation Research*. 2010, 690, 24–39. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.09.005
3. Global Initiative for Asthma (GINA). Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 2014. Dostupné z: <http://ginasthma.org>
4. Dweik, RA, Boggs, PB, Erzurum, SC, Irvin, CG, Leigh, MW, Lundberg, JO, Olin, AC, Plummer, AL, Taylor, DR. An Official ATS Clinical Practice Guideline: Interpretation of Exhaled Nitric Oxide Levels (FeNO) for Clinical Applications. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011, 184(5), 602–615
5. Chládková, J, Chládek, J. Přínos měření oxidu dusnatého ve vydechovaném vzduchu pro farmakoterapii průduškového astmatu u dětí. *Alergie*. 2007, 9:177-181
6. Chládková, J, Havlínová, Z, Krčmová, I, Chyba, T, Chládek, J. Metodická hlediska vyšetření vydechovaného oxidu dusnatého u dětí. *Alergie*. 2008, 10, 262-268
7. American Thoracic Society/European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005, vol. 171, 912-930
8. Alving, K, Weitzberg, E, Lundberg, JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J*. 1993, vol. 6, 1368-1370
9. Barnes, PJ. NO or no NO in asthma? *Thorax*. 1996, 51:218-220. Dostupné z: doi:10.1136/thx.51.2.218
10. Alving, K, Malinovschi, A. Basic aspects in exhaled nitric oxide. *Eur Respir Mon*. 2010, vol. 49, 1-31
11. Kim, HB, Eckel, SP, Kim, JH, Gilliland, FD. Exhaled NO: Determinants and Clinical Application in Children With Allergic Airway Disease. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2016, Jan 8(1), 12-21
12. Dweik, RA, Comhair, SA, Gaston, B, Thunnissen, FB, Farver, C, Thomassen, MJ, Kavuru, M, Hammel, J, Abu-Soud, HM, Erzurum, SC. NO chemical events in the human airway during the immediate and late antigen-induced asthmatic response. *Proc Natl Acad Sci*. 2001, 98, 2622–2627
13. Carroll, N, Carello, S, Cooke, C, et al. Airway structure and inflammatory cells in fatal attacks of asthma. *Eur. Respir. J*. 1996, 9, 709–15
14. Carroll, N, Cooke, C, James, A. The distribution of eosinophils and lymphocytes in the large

- and small airways of asthmatics. *Eur. Respir. J.* 1997, 10, 292–300
15. Faul, JL, Tormey, VJ, Leonard, C, et al. Lung immunopathology in cases of sudden asthma death. *Eur. Respir. J.* 1997, 10, 301–7
 16. Kraft, M, Djukanovic, R, Wilson, S, et al. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996, 154, 1505–10
 17. Kraft, M, Martin, RJ, Wilson, S, et al. Lymphocyte and eosinophil influx into alveolar tissue in nocturnal asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999, 159, 228–34
 18. Mahut, B, Delacourt, C, Zerah-Lancner, F, De Blic, J, Harf, A, Delclaux, C. Increase in alveolar nitric oxide in the presence of symptoms in childhood asthma. *Chest.* 2004, 125, 1012-1018
 19. Condorelli, P, Shin, HW, Aledia, AS, et al. A simple technique to characterize proximal and peripheral nitric oxide exchange using constant flow exhalations and an axial diffusion model. *J. Appl. Physiol.* 2007, 102, 417–25.17
 20. Pietropaoli, AP, Perillo, IB, Torres, A, Perkins, PT, Frasier, LM, Utell, MJ, et al. Simultaneous measurement of nitric oxide production by conducting and alveolar airways of humans. *J Appl Physiol.* 1999, 87, 1532–1542
 21. Tsoukias, NM, George, SC. A two-compartment model of pulmonary nitric oxide exchange dynamics. *J. Appl. Physiol.* 1998, 85, 653–66
 22. Linn, WS, Rappaport, EB, Berhane, KT, Bastain, TM, Salam, MT, et al. Extended exhaled nitric oxide analysis in field surveys of schoolchildren: a pilot test. *Pediatr Pulmonol.* 2009, 44, 1033–1042
 23. Hogman, M, Merilainen, P. Extended NO analysis in asthma. *J Breath Res.* 2007, 1. Dostupné z: doi:10.1088/1752-7155/1/2/024001
 24. Kerckx, Y, Michils A, Van Muylem A. Airway contribution to alveolar nitric oxide in healthy subjects and stable asthma patients. *Journal of Applied Physiology.* 2008, Apr 104 (4), 918-924. Dostupné z: doi:10.1152/jappphysiol.01032.2007
 25. Eckel, SP, Linn, WS, Berhane, K, Rappaport, EB, Salam, MT, Zhang, Y, Gilliland, FD. Estimation of parameters in the two-compartment model for exhaled nitric oxide. *PLoS One.* 2014, Jan 17, 9(1). Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0085471
 26. Paredi, P, Kharitonov, SA, Meah, S, Barnes, PJ, Usmani, OS. A novel approach to partition central and peripheral airway nitric oxide. *Chest.* 2014, Jan 145(1),113-9. Dostupné z: doi:10.1378/chest.13-0843.
 27. Condorelli, P, Shin, HW, George, SC. Characterizing airway and alveolar nitric oxide exchange during tidal breathing using a three-compartment model. *J Appl Physiol.* 2004, 96(5), 1832-42
 28. Shin, HW, Condorelli, P, George, SC. A new and more accurate technique to characterize airway nitric oxide using different breath-hold times. *J Appl Physiol.* 2005, May, 98(5), 1869-

29. Bjermer, L, Alving, K, Diamant, Z, Magnussen H, Pavord, I, Piacentini, G, Price, D, Roche, N, Sastre, J, Thomas, M, Usmani, O. Current evidence and future research needs for FeNO measurement in respiratory diseases. *Respir Med.* 2014, 108(6), 830-41
30. Eckel PS, Linn, WS, Berhane, K, Rappaport, EB, Salam, MT, Zhang, Y, Gilliland FD. Estimation of Parameters in the Two-Compartment Model for Exhaled Nitric Oxide. *PLoS ONE* 2014, Jan 17, 9(1), e85471. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0085471
31. Paraskakis, E, Brindicci, C, Fleming, L, Krol, R, Kharitonov, SA, Wilson, NM, Barnes, PJ, Bush, A. Measurement of bronchial and alveolar nitric oxide production in normal children and children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006, 174, 260-267
32. Puckett, JL, Taylor, RW, Leu, SY, Guijon, OL, Aledia, AS, Galant, SP, George, SC. Clinical patterns in asthma based on proximal and distal airway nitric oxide categories. *Respir Res.* 2010, 11-47
33. Linn, WS, Rappaport, E, Eckel, SP, Berhane, KT, Zhang, Y, Salam, MT, Bastain, TM, Gilliland, FD. Multiple-flow exhaled nitric oxide, allergy, and asthma in a population of older children. *Pediatr. Pulmonol.* 2013, 48, 885–896. Dostupné z: doi:10.1002/ppul.22708
34. Radhakrishnan, DK, Bendiak, GN, Mateos-Corral, D, Al-Saleh, S, Bhattacharjee, R, Kirby-Allen, M, Grasemann, H. Lower airway nitric oxide is increased in children with sickle cell disease. *J Pediatr.* 2012, Jan, 160(1), 93-7
35. Linkosalo, L, Lehtimäki, L, Holm, K, Kaila, M, Moilanen, E. Relation of bronchial and alveolar nitric oxide to exercise-induced bronchoconstriction in atopic children and adolescents. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012, Jun 23(4), 360-6
36. Chinellato, I, Piazza, M, Peroni, D, Sandri, M, Chiorazzo, F, Boner, AL, Piacentini, G. Bronchial and alveolar nitric oxide in exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children. *Clin Exp Allergy.* 2012, Aug 42(8), 1190-6
37. Pedroletti, Ch, Högman, M, Meriläinen, P, Nordvall, LS, Hedlin, G, Alving, K. Nitric Oxide Airway Diffusing Capacity and Mucosal Concentration in Asthmatic Schoolchildren *Pediatric Research.* 2003, 54, 496–501
38. Heijkenskjöld-Rentzhog, Ch, Alving, K, Stephens, PK, Lundberg, JO, Nordvall, L, Malinovschi, A. The fraction of NO in exhaled air and estimates of alveolar NO in adolescents with asthma: Methodological aspects. *Pediatr Pulm.* 2012, Vol. 47, (10), Oct, 941–949
39. Sepponen, A, Lehtimäki, L, Huhtala, H, Kaila, M, Kankaanranta, H, Moilanen, E. Alveolar and bronchial nitric oxide output in healthy children. *Pediatr Pulmonol.* 2008, Dec 43(12), 1242-8
40. Suri, R, Paraskakis, E, Bush, A. Alveolar, but not bronchial nitric oxide production is elevated in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2007, Dec 42(12), 1215-21

41. Latzin, P, Beck, J, Griese, M. Exhaled nitric oxide in healthy children: Variability and a lack of correlation with atopy. *Pediatric allergy and immunology*. 2002, Vol 13(1), February 37–46
42. Keen, Ch, Olin, AC, Wennergren, G, Gustafsson P. Small airway function, exhaled NO and airway hyper-responsiveness in paediatric asthma. *Respiratory Medicine*. 2011 Vol 105(10), 1476 - 1484
43. Mahut, B, Trinquart, L, Le Bourgeois, M, Becquemin, MH, Beydon, N, Aubourg, F, Jala, M, Bidaud-Chevalier, B, Dinh-Xuan, AT, Randrianarivelo, O, Denjean, A, de Blic, J, Delclaux, C. Multicentre trial evaluating alveolar NO fraction as a marker of asthma control and severity. *Allergy*. 2010, 65, 636-644
44. Shin, HW, George, SC. Impact of axial diffusion on nitric oxide exchange in the lungs. *J Appl Physiol*. 2002, 93, 2070–2080
45. Berry, M, Hargadon, B, Morgan, A, Shelley, M, Richter, J, Shaw, D, Green, RH, Brightling, C, Wardlaw, AJ, Pavord, ID. Alveolar nitric oxide in adults with asthma: evidence of distal lung inflammation in refractory asthma. *Eur Respir J*. 2005, Jun 25(6), 986-91
46. Kobayashi, D, Tochino, Y, Kanazawa, H, Ichimaru, Y, Kyoh, S, Asai, K, Hirata, K. Comparison of alveolar nitric oxide concentrations using two different methods for assessing small airways obstruction in asthma. *Respirology*. 2011, Jul 16(5), 862-8
47. Kanazawa, H, Kyoh, S, Asai, K, et al. Validity of measurement of two specific biomarkers for the assessment of small airways inflammation in asthma. *J Asthma*. 2010, 47, 400–406.
48. Gelb, AF, Taylor, CF, Nussbaum, E, Gutierrez, C, Schein, A, Shinar, CM, Schein, MJ, Epstein, JD, Zamel, N. Alveolar and airway sites of nitric oxide inflammation in treated asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004, Oct 170(7), 737-41
49. Gelb, AF, Taylor, CF, Shinar, CM, et al. Role of spirometry and exhaled nitric oxide to predict exacerbations in treated asthmatics. *Chest*. 2006, 129, 1492–1499
50. Gelb, AF, George, SC, Silkoff, PE, et al. Central and peripheral airway/alveolar sites of exhaled nitric oxide in acute asthma. *Thorax*. 2010, 65, 619–625
51. Gelb, AF, Moridzadeh, R, Singh, DH, Fraser, C, George, SC. In moderate-to-severe asthma patients monitoring exhaled nitric oxide during exacerbation is not a good predictor of spirometric response to oral corticosteroid. *J Allergy Clin Immunol*. 2012, Jun 129(6), 1491-8
52. Scichilone, N, Battaglia, S, Taormina, S, Modica, V, Pozzocco, E, Bellia, V. Alveolar nitric oxide and asthma control in mild untreated asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2013, Jun, 131(6), 1513-7
53. Verbanck, S, Kerckx, Y, Schuermans, D, Vincken, W, Paiva, M, Van Muylem, A. Effect of airways constriction on exhaled nitric oxide. *J Appl Physiol*. 2008, 104, 925–930
54. Heijkenskjöld-Rentzhog, C, Nordvall, L, Janson, C, Borres, MP, Alving, K, Malinovschi, A.

Alveolar and exhaled NO in relation to asthma characteristics-effects of correction for axial diffusion. *Allergy*. 2014, Aug, 69(8), 1102-11