

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Metabolomická analýza kondenzátu dechu  
pacientů s astmatem a cystickou fibrózou**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Radana Karlíková</b>
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>RNDr. David Friedecký, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2. 5. 2013

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury“.

V Olomouci dne 2. 5. 2013

.....

„Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, trpělivost, cenné připomínky a rady. Dále doc. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D. a RNDr. Janě Tomkové, Ph.D. za poskytnuté konzultace. Mé poděkování také patří všem doktorandům z Laboratoře metabolomiky v zastoupení s Mgr. Hanou Janečkovou, kteří mi byli oporou při vypracovávání této práce. Nesmím opomenout ani Mgr. Petra Wojtowicze, kterému jsem za mnohé vděčná.

Také bych ráda poděkovala prof. MUDr. Františku Kopřivovi, Ph.D a personálu Dětské kliniky Fakultní nemocnice Olomouc za spolupráci a pomoc při odběru biologického materiálu.

Tato práce vznikla za podpory projektu, jehož infrastrukturální část (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030)“.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Radana Karlíková
Název práce	Metabolomická analýza kondenzátu dechu pacientů s astmatem a cystickou fibrózou
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř metabolomiky, Ústav molekulární a translační medicíny, UP Olomouc
Vedoucí práce	RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Princip analýzy kondenzátu vydechovaného vzduchu (EBC) spočívá v neinvazivním odběru biologického materiálu a následné detekci mediátorů souvisejících s ději probíhajícími v plicích a dolních cestách dýchacích. Astma a cystická fibróza (CF) jsou onemocnění, která jsou úzce spojena se zánětem respiračního traktu. Cílem předložené diplomové práce bylo porovnat metabolomické profily kondenzátů dechu získaných od pacientů s CF, astmatem, astmatiků léčených glukokortikosteroidy a zdravých jedinců. Cílená metabolomická analýza byla provedena pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, necílená metabolomická analýza probíhala v systému kapalinové chromatografie v kombinaci s vysoko-rozlišujícím hmotnostním spektrometrem. Cílenou metabolomickou analýzou bylo nalezeno 42 metabolitů, necíleným přístupem bylo nalezeno 110 potenciálních analytů definovaných přesnou <math>m/z</math> a retenčním časem. Diskriminační analýzou bylo dosaženo rozdělení studovaných skupin pacientů a zdravých kontrol. Byly nalezeny difference v hladinách aminokyselin, purinů a také kyseliny arachidonové. Výsledky této práce potvrdily, že metabolomika je vhodný nástroj pro metabolické profilování EBC.</p>
Klíčová slova	kondenzát vydechovaného vzduchu, metabolomika, astma, cystická fibróza
Počet stran	82
Počet příloh	0
Jazyk	Český

**Bibliographical identification:**

Autor's first name and surname	Bc. Radana Karlíková
Title	Metabolomic analysis of exhaled breath condensate in patients with cystic fibrosis and asthma
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Metabolomics, Institute of Molecular and Translational Medicine, UP Olomouc
Supervisor	RNDr. David Friedecký, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>The principle of exhaled breath condensate (EBC) analysis is based on non-invasive sampling of biological material and the subsequent detection of mediators associated with processes in the lungs and lower airways. Asthma and cystic fibrosis (CF) are diseases which are closely associated with inflammation of the respiratory tract. The aim of the thesis was to compare the metabolomic profiles of EBC from patients with CF, asthma, asthmatic patients treated with glucocorticosteroids and healthy individuals. Targeted metabolomic analysis was performed using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, untargeted metabolomic analysis was performed on liquid chromatography in combination with high resolution mass spectrometry. By the targeted metabolomic analysis 42 metabolites was found. By untargeted metabolomic analysis 110 potential analytes was found defined by <math>m/z</math> and retention time. The discriminant analysis show splitting of the patients and healthy controls groups. Differences in the levels of amino acids, purines and arachidonic acid were observed. The results of this study confirmed that metabolomics is a suitable tool for metabolite profiling of EBC.</p>
Keywords	exhaled breath condensate, metabolomics, asthma, cystic fibrosis
Number of pages	82
Number of appendices	0
Language	Czech

# Obsah

TEORETICKÁ ČÁST .....	- 9 -
1 Kondenzát vydechaného vzduchu.....	- 10 -
1.1 Odběr EBC .....	- 10 -
1.2 Faktory ovlivňující složení EBC .....	- 12 -
1.2.1 Okolní vzduch .....	- 12 -
1.2.2 Nosní vs. orální inhalace, použití nosního klipsu .....	- 12 -
1.2.3 Orální kontaminace .....	- 13 -
1.2.4 Nápoje a jídlo .....	- 13 -
1.2.5 Kouření .....	- 13 -
2 Vybrané mediátory zánětlivých onemocnění.....	- 14 -
2.1 Eikosanoidy .....	- 14 -
2.1.1 Leukotrieny .....	- 14 -
2.1.2 Prostanoidy .....	- 16 -
2.1.3 Isoprostany .....	- 18 -
2.2 Cytokiny .....	- 20 -
2.3 Dusíkaté deriváty .....	- 20 -
2.3.1 Oxid dusnatý, 3-nitrotyrosin, nitrosothioly .....	- 20 -
2.4 Aldehydy .....	- 22 -
3 Astma .....	- 23 -
3.1 Definice astmatu .....	- 23 -
3.2 Obstrukce dýchacích cest .....	- 23 -
3.3 Bronchiální hyperreaktivita .....	- 24 -
3.4 Záněť .....	- 25 -
3.5 Rizikové a vyvolávající faktory astmatu .....	- 26 -
3.5.1 Faktory vnitřní .....	- 26 -
3.5.2 Faktory vyvolávající exacerbaci a modifikující vnímavost astmatu.....	- 27 -
3.6 Klasifikace astmatu .....	- 28 -
3.6.1 Klasifikace podle závažnosti astmatu .....	- 28 -
3.6.2 Klasifikace podle stupně kontroly .....	- 29 -
3.7 Farmakoterapie.....	- 30 -
4 Cystická fibróza (CF) .....	- 31 -
4.1 Definice CF, CFTR protein .....	- 31 -

4.2 Mutace genu <i>CFTR</i> .....	- 33 -
4.2.1 Třídy mutací <i>CFTR</i> genu.....	- 34 -
4.3 Typické klinické projevy pacientů s CF.....	- 35 -
4.3.1 Respirační systém.....	- 35 -
4.3.2 Gastrointestinální systém.....	- 36 -
4.3.3 Další časté projevy nemoci.....	- 36 -
5 Metabolomika dechu „breathomics“.....	- 37 -
PRAKTICKÁ ČÁST.....	- 39 -
6 Materiál.....	- 40 -
6.1 Chemikálie.....	- 40 -
6.2 Přístrojové vybavení.....	- 40 -
6.3 Biologický materiál.....	- 40 -
6.3.1 Odběr a zpracování kondenzátu vydechaného vzduchu.....	- 41 -
6.3.2 Stanovení slinné $\alpha$ -amylasy.....	- 42 -
7 Metody.....	- 42 -
7.1 Cílená metabolomická analýza kondenzátu dechu.....	- 42 -
7.2 Necílená metabolomická analýza.....	- 44 -
7.3 Statistická analýza.....	- 45 -
8 Výsledky.....	- 47 -
8.1 Cílená metabolomická analýza.....	- 47 -
8.1.1 Statistická analýza.....	- 49 -
8.2 Necílená metabolomická analýza.....	- 54 -
8.2.1 Statistická analýza.....	- 57 -
9 Diskuze.....	- 62 -
POUŽITÁ LITERATURA.....	- 67 -
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	- 80 -

## Cíle práce

- Vypracování rešerše odborné literatury na dané téma
- Odběr a zpracování vzorků kondenzátu vydechovaného vzduchu
- Cílená metabolomická analýza vzorků dechu technikou LC-MS/MS (princip trojitého kvadrupólu)
- Necílená metabolomická analýza vzorků dechu technikou Orbitrap LC-MS (princip orbitální pasti)
- Vyhodnocení metabolomických profilů kondenzátu dechu pacientů a kontrol



# **Teoretická část**

# 1 Kondenzát vydechovaného vzduchu

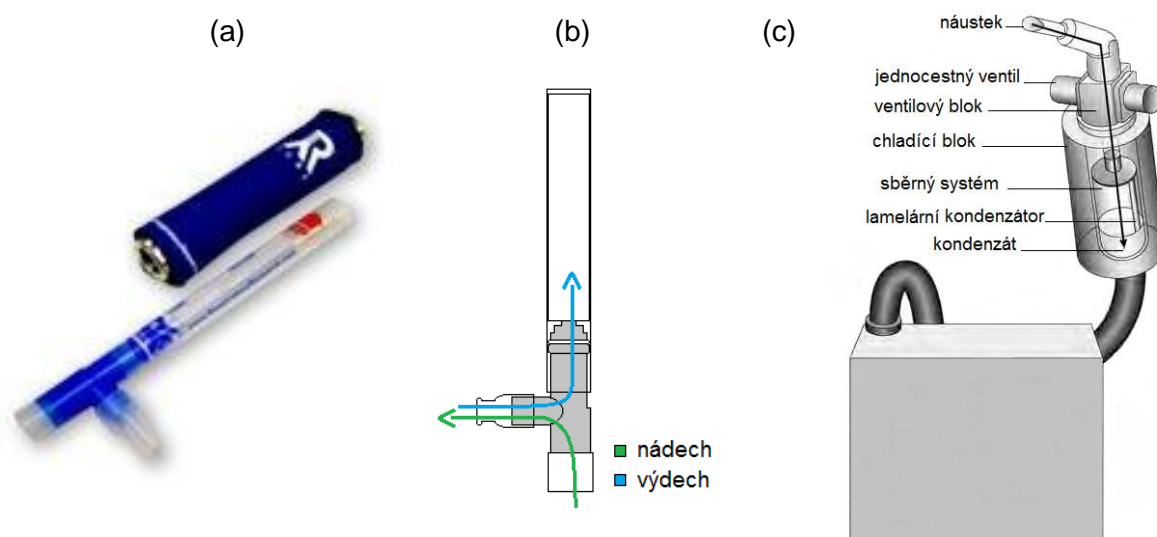
Ke klasickým postupům odběru sekretu z dolních cest dýchacích patří indukce sputa a bronchoskopie s bronchoalveolární laváží (BAL), (Mutlu et al., 2001). Ačkoli může bronchoalveolární laváž poskytnout klinicky hodnotné informace, jedná se o invazivní zákrok s možnými riziky jako je sedace a infekce. Problematická je také opakovatelnost výkonu v krátkých časových intervalech (Effros et al., 2003). Nejen z těchto důvodů vzrůstá zájem o sledování biomarkerů v kondenzátu vydechovaného vzduchu (EBC „exhaled breath condensate“), jako jednoduché, neinvazivní techniky, která by v budoucnu mohla nahradit výše zmíněné metody (Mutlu et al., 2001).

Dominantní složkou vydechovaného vzduchu je vodní pára obohacená o malé anorganické molekuly jako NO, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, těkavé organické sloučeniny (uhlovodíky, alkoholy, ketony, aldehydy, estery), (Buszewski et al., 2007) a netěkavé složky, např. aminokyseliny (Hanazawa et al., 2000), prostanoidy (Montuschi et al., 2002a), cytokiny (Shahid et al., 2002) aj., které se do exhalovaného vzduchu dostávají ve formě aerosolu (respiračních kapének) uvolňovaných z povrchu dýchacích cest. Mechanismus vzniku těchto částic není doposud zcela objasněn, jedna z variant předpokládá, že jsou vytvářeny díky turbulentnímu proudění vzduchu, jenž má dostatečnou energii nezbytnou k uvolnění kapének z výstelkové tekutiny dýchacích cest (Hunt, 2002). Množství částic aerosolu závisí na rychlosti proudění vzduchu a povrchovém napětí extracelulární výstelkové tekutiny (Mutlu et al., 2001). Kapénky mohou být formovány nejen v horních a dolních cestách dýchacích, ale dokonce i v horní části zažívacího traktu. Avšak je pravděpodobné, že většina aerosolu vzniká v dýchacích cestách, kde je turbulence nejvyšší (Effros et al., 2004).

## 1.1 Odběr EBC

Jednou z možností odběru vydechovaného vzduchu je použití RTube<sup>®</sup> kolektoru dechu (Respiratory Research Inc., Charlottesville, VA, USA), který je složen z předchlazeného hliníkového pouzdra, do nějž se zasouvá jednorázová polypropylenová sběrná tuba - v té je možno vzorek uchovávat, popř. převážet (Obr. 1a, 1b). Jednosměrný tok vydechovaného vzduchu zajišťují dva jednocestné ventily. Množství kondenzátu, které lze touto cestou získat, se u dítěte pohybuje v rozmezí 75-150 µl/min a u dospělého 100-250 µl/min. Výhodou přístroje je jeho přenosnost, jednorázové provedení navíc vylučuje možnost křížové kontaminace vzorku (<http://www.rtube.com>).

Další alternativou sběru EBC je kondenzátor vydechovaného vzduchu EcoScreen® (Jaeger Toennies, Hoechberg, Německo) s elektrickým chlazením (Obr. 1c). Jeho součástí je náustek, jednocestný ventil a sběrný systém umístěný v chladícím bloku. Sběrný systém se skládá z lamelárního kondenzátoru na jehož vnitřní stěně dochází ke zkapalnění frakce expirovaného vzduchu a jeho stékání do sběrné nádoby. Teplota uvnitř chladícího bloku udávána výrobcem je  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Okamžité mrazení vzorku je vhodné zejména pro sledování méně stabilních látek, jako jsou např. leukotrieny. Vzhledem k tomu, že je zmiňovaná teplota pravděpodobně vyšší než  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , není jednotná během celého odběru či díky možným technickým problémům, jsou bezprostředně odebrané vzorky často ve formě kapalné nebo ve směsi zmrzlá fáze/kapalina. Tato nejednotnost může ovlivnit koncentrace labilních sloučenin v EBC (Montuschi, 2005a). Při délce odběru 15 minut se získá průměrně 1,5 ml kondenzátu. Přístroj EcoScreen může být spojen s pneumotachografem a počítačem pro on-line zaznamenávání respiračních parametrů (Montuschi et al., 2005a).



Obr. 1: (a) Fotografie RTube kolektoru dechu (b) a jeho znázornění z pohledu toku vzduchu přístrojem, (c) schéma kondenzátoru EcoScreen. Převzato z <http://www.rtube.com>; Montuschi 2005a.

Srovnávací studie odběru EBC výše zmíněnými technikami ukázala, že typ kondenzátoru má vliv na pH vzorku, celkový obsah proteinů a koncentraci cysteinylových leukotrienů (cys-LT). Konkrétně, EBC zdravých osob získaný přístrojem EcoScreen byl zásaditější v porovnání s RTube odběrem ( $\text{pH} = 6,45 \pm 0,20$  versus  $\text{pH} = 6,19 \pm 0,23$ ), obsahoval více proteinů ( $c = 3,89 \pm 2,03\text{ }\mu\text{g/ml}$  respektive  $c = 2,65 \pm 1,98\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) a množství cys-LT bylo rovněž vyšší (Czebe et al., 2008).

Posledním zde zmíněným kondenzátorem je TURBO-DECCS (ItalChill, Parma, Itálie) s chladícím zařízením „TURBO“ pracujícím na principu Peltierova efektu. Chlazení je propojeno se sběrnou částí „DECCS“, což je jednorázový polyethylenový systém složený z náustku, jednocestného ventilu a sběrné nádoby. Pracovní teplota přístroje se pohybuje v rozmezí od -10 °C ~ 20 °C (i vyšší) s tolerancí  $\pm 1$  °C (Goldoni et al., 2005).

## **1.2 Faktory ovlivňující složení EBC**

### **1.2.1 Okolní vzduch**

Okolní vzduch obsahuje molekuly, které mohou ovlivnit složení EBC. Atmosférické sloučeniny mohou přímo přispět ke změně úrovně látek v EBC, rozkládat nebo reagovat s molekulami v kondenzátu dechu, popř. vést k zánětlivým a biochemickým procesům v dýchacích cestách, jenž mohou následně ovlivnit složení EBC (Horváth et al., 2005). Bylo například prokázáno, že atmosférický oxid dusnatý snižuje množství vydechovaného peroxidu vodíku (Latzin et al., 2002). Přístupu okolního vzduchu, který není přímo vdechován lze zabránit technologií odběru dechu, např. použitím jednocestného ventilu. Teplota vzduchu a jeho vlhkost mají vliv na pH EBC, což se také může projevit na konečném složení vzorku (Kullmann et al., 2008).

### **1.2.2 Nosní vs. orální inhalace, použití nosního klipsu**

Během inhalace nosem mohou některé mediátory formované v nose vstupovat do dolních cest dýchacích. Jejich případné vydechnutí ústy může následně ovlivnit složení EBC (Horváth et al., 2005). Studie srovnávající jednotlivé formy odběru dechu (vdechování nosem - vydechování ústy versus vdechování i vydechování ústy) u zdravých osob neprokázala rozdíly v koncentracích adenosinu, tromboxanu B2 a amoniaku v EBC. Avšak u pacientů s alergickou rýmou inhalujících nosem s výdechem ústy byly nalezeny vyšší koncentrace adenosinu, než při druhém uvedeném způsobu odběru (Vass et al., 2002).

Ztrátám vzorku náhodným vydechováním nosem lze zabránit užitím nosního klipsu. Jeho aplikace však může otevřít nasofaryngeální velum („velum“ - měkké patro) a následně tak kontaminovat kondenzát vzduchem z nosu. Toto je nutné uvážit zejména při sledování biomarkerů (např. některých eikosanoidů), které mohou být rovněž formovány v nose a ve vedlejších nosních dutinách (Shaw et al., 1985; Vass et al., 2002).

### 1.2.3 Orální kontaminace

Sliny obsahují řadu mediátorů, které mohou kontaminovat, případně navýšit úroveň metabolitů v kondenzátu vydechaného vzduchu. Gaber et al. (2006) ve své studii poukázal na vysokou hladinu leukotrienu B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) ve slinách a na jeho přítomnost v EBC zdravých osob s pozitivním testem na α-amylasu. Jako další příklad můžeme uvést adenosintrifosfát (ATP), jehož koncentrace se ve slinách pohybuje v řádu μM (Kochaňska et al., 2000), kdežto v EBC se jedná o pM množství (Lázár et al., 2008). Pro snížení rizika kontaminace vzorku slinami lze v rámci technologie kondenzátoru využít „slinné pastičky“ skládající se buď z komůrky, nebo trubky umístěné níže než jsou ústa exhalující osoby (Montuschi, 2005a).

Amoniak a některé sirné sloučeniny, jako např. sulfan, methylsulfid či merkaptany mohou být produkovány bakteriemi přítomnými v ústech. Částečnou prevencí může být sterilizace dutiny ústní před odběrem či polykání nahromaděných slin v průběhu odběru vzorku (Sofia et al., 2011).

### 1.2.4 Nápoje a jídlo

Vliv potravin před sběrem EBC zůstává nejasný. Nicméně pokud sledujeme mediátory v EBC, o nichž víme, že jsou přítomny v jídle či pití (např. kofeinové nápoje před měřením koncentrace adenosinu) je vhodné vyhnout se jejich požití několik hodin před samotným odběrem (Horváth et al., 2005; Huszár et al., 2002).

### 1.2.5 Kouření

Kouření má vliv na řadu mediátorů. V porovnání s nekouřícími kontrolami bylo v EBC kuřáků nalezeno např. zvýšené množství dusičnanů (Corradi et al., 2003c), interleukinu-6, LTB<sub>4</sub> (Carpagnano et al., 2003a) a nitrosothiolů (Corradi et al., 2001), viz tab. 1.

Tab. 1: Příklady mediátorů, jejichž koncentrace byly zvýšené v EBC kuřáků oproti nekouřícím kontrolám.

<i>mediátor</i>	<i>vyjádření koncentrace</i>	<i>koncentrace nalezené V EBC kouřících osob</i>	<i>koncentrace nalezené v EBC kontrol</i>
dusičnany	medián (rozsah)	62,5 (9,6-158,0) μM	9,6 (2,6-119,4) μM
interleukin-6	průměr ± SEM	5,6 ± 1,4 pg/ml	2,6 ± 0,2 pg/ml
LTB <sub>4</sub>	průměr ± SEM	9,4 ± 0,4 pg/ml	6,1 ± 0,3 pg/ml
nitrosothioly	průměr ± SEM	0,46 ± 0,09 μM	0,11 ± 0,02 μM

SEM - střední chyba průměru

## 2 Vybrané mediátory zánětlivých onemocnění

### 2.1 Eikosanoidy

Eikosanoidy, konkrétně prostanoidy, leukotrieny a isoprostany se řadí mezi silné mediátory zánětu, jenž jsou zodpovědné za vazodilataci/vazokonstrikci, exsudaci plasmy, mukózní sekreci, kašel, bronchokonstrikci/bronchodilataci, nábor zánětlivých buněk, aj. (Kharitonov & Barnes, 2001).

#### 2.1.1 Leukotrieny

Leukotrieny (LT) vznikají z kyseliny arachidonové 5-lipoxygenasovou dráhou. Jejich název souvisí s původní izolací mateřské molekuly z leukocytů v kombinaci s výskytem tří sériově umístěných dvojných vazeb v uhlíkovém skeletu (Drazen et al., 1999).

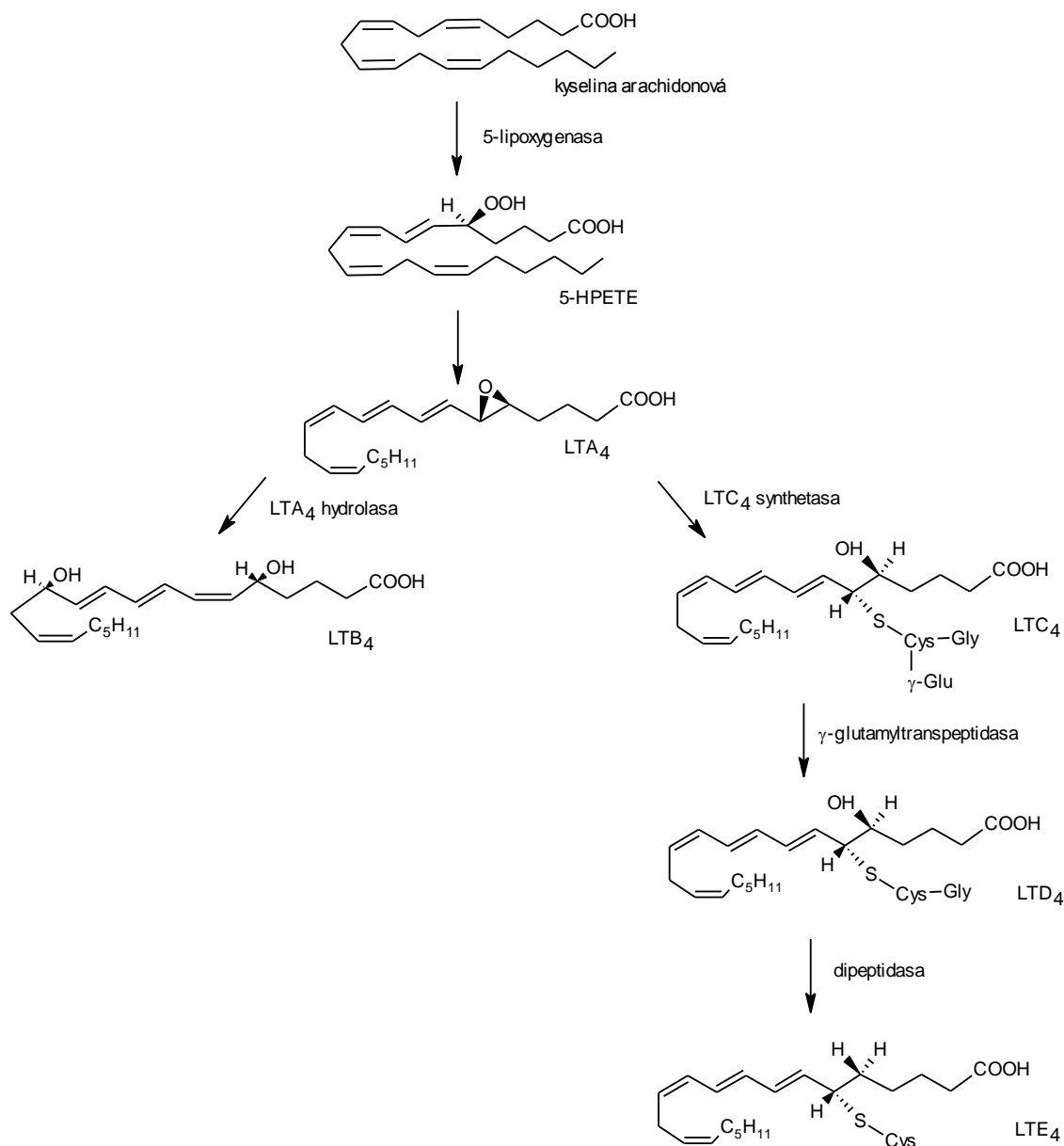
Leukotrieny dělíme do dvou tříd: první z nich zahrnuje leukotrien B<sub>4</sub>, zatímco druhá skupina je tvořena peptidolipidy: LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> a LTE<sub>4</sub>, které jsou v literatuře často uváděny pod společným názvem cysteinylové leukotrieny, dříve sulfidopeptidové LT (Nicosia et al., 2001).

LTB<sub>4</sub> je syntetizován monocyty, alveolárními makrofágy a neutrofily, zatímco cys-LT jsou formovány alveolárními makrofágy, eozinofily, basofily a žírnými buňkami (Nicosia et al., 2001). LT jsou dokonce tvořeny v kostní dřeni, kde ovlivňují proliferaci a diferenciaci hematopoetických buněk (Čáp & Brezina, 2009).

Vznik LT je indukován imunologickými i neimunologickými faktory, jako příklad můžeme uvést degranulaci žírných buněk, dále kys. acetylsalicylovou u aspirin-senzitivního astmatu, fyzickou zátěž, chladný vzduch, cigaretový kouř aj. (Fauler & Frölich 1997; Čáp & Brezina, 2009).

Prvním krokem v biosyntéze leukotrienů je uvolnění kyseliny arachidonové (AA) z membrány fosfolipidů - děje se tak např. aktivací fosfolipasy A<sub>2</sub> (EC 3.1.1.4), hydrolyzující fosfatidylcholin (Dennis, 1987). Následnou metabolizací uvedené kyseliny 5-lipoxygenasou (EC 1.13.11.34) vzniká 5-HPETE (5S-hydroperoxyeikosa-6,8-*trans*-11,14-*cis*-tetraenová kyselina), který je totožným enzymem dále přeměňován na LTA<sub>4</sub> (Obr. 2), (Rouzer et al., 1986). Ten může být posléze konvertován buďto LTA<sub>4</sub> hydrolasou (EC 3.3.2.6) za vzniku LTB<sub>4</sub> či LTC<sub>4</sub> synthasou (EC 4.4.1.20), zprostředkující navázání glutathionu v C-6 pozici, za zisku LTC<sub>4</sub>. γ-Glutamyltranspeptidasou (EC 2.3.2.2) a dipeptidasou (EC 3.4.13.19) lze v uvedeném pořadí z LTC<sub>4</sub> dále syntetizovat LTD<sub>4</sub> a LTE<sub>4</sub> (Lewis et al., 1990).

Funkce leukotrienů je realizovaná vazbou na specifické receptory, doposud byly objeveny CysLT1, CysLT2 a LTB1. Prvně zmiňovaný, nalezený v hladké svalovině bronchů a v tkáňových makrofázích, je společný pro všechny cys-LT. CysLT2 byl detekován v lidských plicních cévách. U CD8+ T buněk produkujících interleukin-13 byla prokázána přítomnost vysokoafinitního receptoru LTB1 pro leukotrien B<sub>4</sub>. Exprese tohoto receptoru je esenciální pro rozvoj zánětu v dýchacích cestách (Čáp & Brezina, 2009; Lynch et al., 1999).



Obr. 2: Biosyntetická dráha leukotrienů z AA. Převzato z Nicosia et al., 2001.

Leukotrien B<sub>4</sub> se řadí mezi silné chemoatraktanty neutrofilů, stimuluje jejich degranulaci (Palmlad et al., 1981) a agregaci na cévní stěny (Dahlén et al., 1981). Ačkoli má slabý efekt na hladké svalstvo, může přispívat ke zúžení dýchacích cest tvorbou lokálního edému a zvýšením mukózní sekrece (Montuschi, 2005b). Také podporuje vznik některých cytokinů, např. interleukinu-5 z lidských T lymfocytů (Yamaoka et al., 1993) a interleukinu-6 z lidských monocytů (Brach et al., 1992).

Cysteinylové leukotrieny naopak silně indukují stah hladké svaloviny dýchacích cest, jsou 100 až 1000x účinnější než histamin (Barnes et al., 1984). Dále zvyšují permeabilitu cév a stimulují sekreci mukózy (Drazen et al., 1980, Samuelsson, 1983). Mohou také ovlivňovat počet histaminových H1 receptorů na povrchu buněk hladkého svalstva a periferních monocytů (Pynaert et al., 1999).

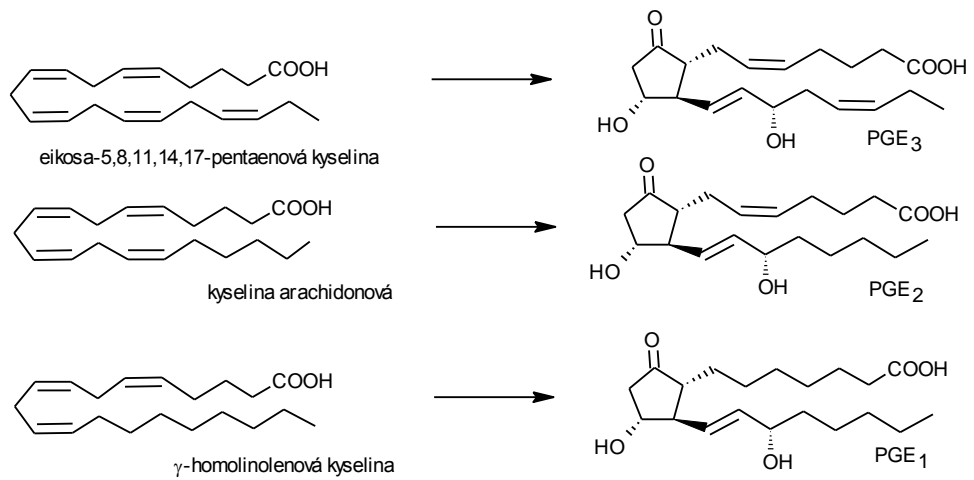
Ve srovnání s kontrolními subjekty byly nalezeny zvýšené hladiny LTB<sub>4</sub> v kondenzátech dechu pacientů s cystickou fibrózou (CF), ( $c_{\text{kontroly}} = 6,8 \pm 0,7$  pg/ml;  $c_{\text{CF}} = 28,8 \pm 4,3$  pg/ml), (Carpagano et al., 2003b) a astmatem, kdy u steroidně neléčených atopických astmatiků byla úroveň zmíněného leukotrienu vyšší [ $m' = 255,1$  (175,0-314,7) pg/15 min dýchání], než v případě EBC pacientů léčených glukokortikosteroidy [ $m' = 125,0$  (25,0-245,0) pg/15 min dýchání]. U kontrol byly zjištěné hodnoty LTB<sub>4</sub> následující: [ $m' = 87,5$  (82,5-102,5) pg/15 min dýchání], (Montuschi et al., 2005c).

### 2.1.2 Prostanoidy

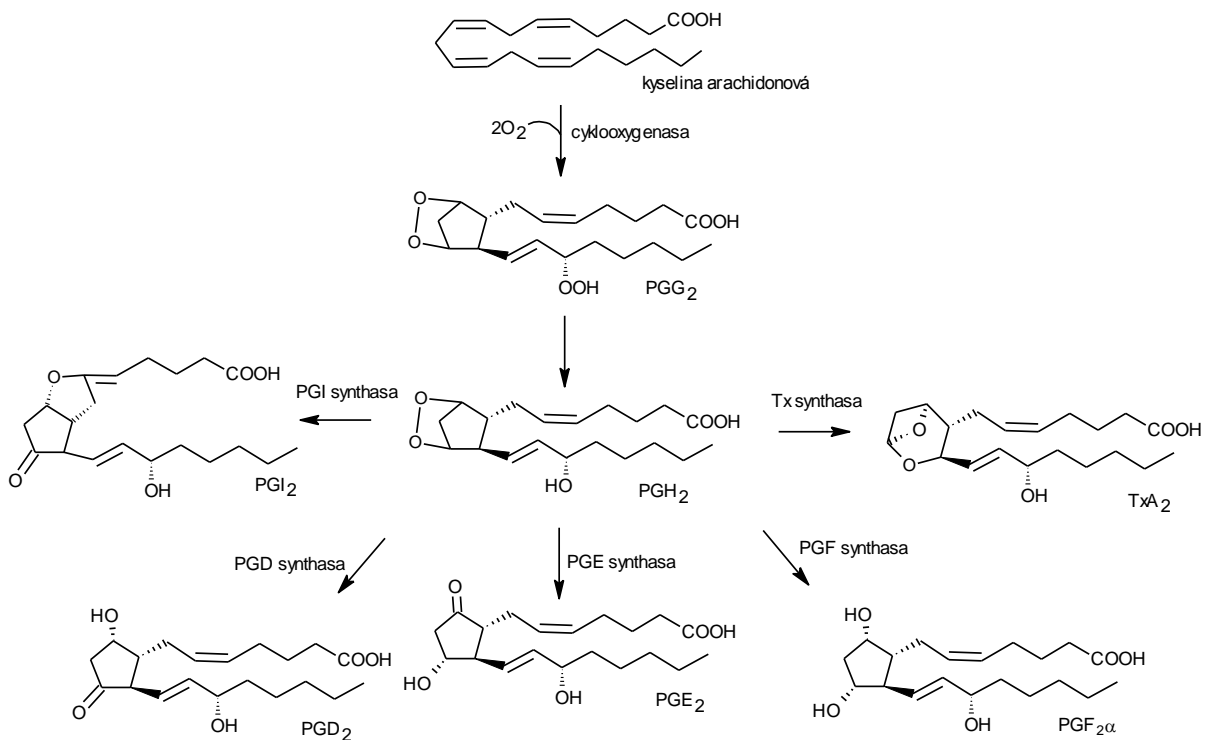
Prostanoidy lze rozdělit na prostaglandiny (PG) a tromboxany (Tx). Podrobněji lze PG klasifikovat z hlediska modifikací na cyklopentanovém kruhu (písmeny A-I) a také počtem násobných vazeb v postranních řetězcích (skupiny 1-3). PG ze série 1 vznikající z  $\gamma$ -homolinolenové kyseliny obsahují 13-*trans* dvojnou vazbu. 5-*Cis* a 13-*trans* dvojná vazba jsou přítomny u prostaglandinů ze série 2, které jsou odvozeny od kyseliny arachidonové. Výchozí molekulou syntézy poslední skupiny PG mající ve struktuře 5-*cis*, 13-*trans* a 17-*cis* dvojná vazba je eikosa-5,8,11,14,17-pentaenová kyselina (Obr. 3), (Narumiya et al., 1999).

Jelikož je u většiny savců z výše uvedených prekurzorů nejdominantnější kys. arachidonová, jsou v těle syntetizované prostaglandiny především ze série 2 (Narumiya et al., 1999). V této dráze je pak arachidonová kyselina přeměňována cyklooxygenasou (EC 1.14.99.1) za vzniku PGG<sub>2</sub>, který se posléze rozpadá na PGH<sub>2</sub>. Následným působením synthas vznikají konkrétní formy prostanoidů (Obr. 4), (Smith, 1992).





Obr. 3: Syntéza 1., 2. a 3. série prostaglandinů, převzato z Noverr et al., 2003.



Obr. 4: Biosyntetická dráha prostanoidů. Tvorba prostaglandinů série 2 (PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) a tromboxanu TxA<sub>2</sub>. PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub> mají stejnou kruhovou strukturu, liší se však hydroxyperoxy- resp. hydroxy- skupinou na uhlíku C15 (převzato z Narumiya et al., 1999).

Prostaglandiny G, H, I a TxA jsou chemicky nestabilní, rychle se přeměňují na inaktivní produkty. Ačkoli jsou zbylé formy stabilní, jsou rychle metabolizovány.

Především díky tomu se má za to, že prostanoidy působí lokálně, v místě jejich produkce (Narumiya et al., 1999).

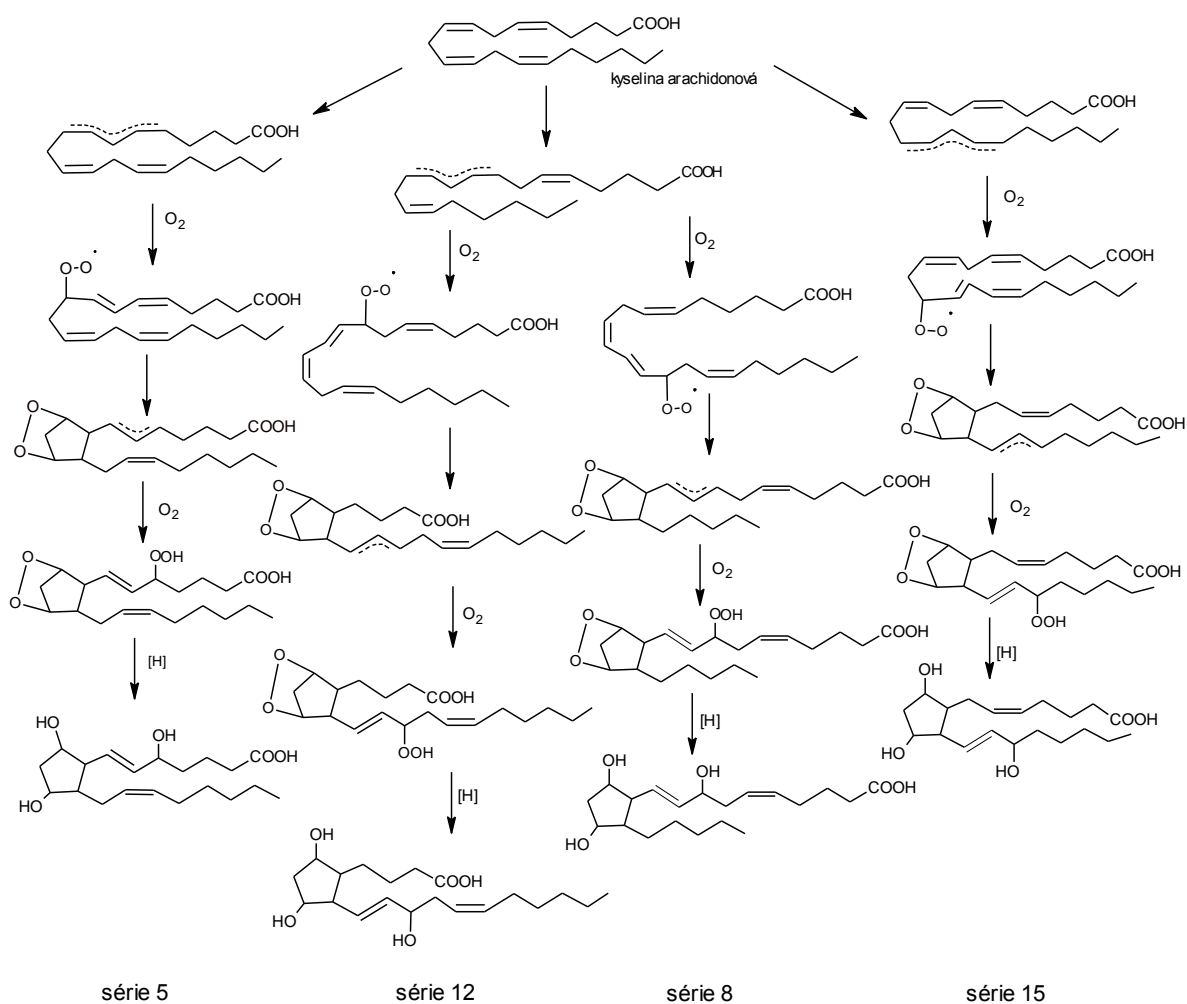
V organismu zastávají mnoho funkcí - například regulují transport vody a iontů v ledvinách, ovlivňují hojení ran, jsou zapojeny v apoptóze, buněčné diferenciaci a v onkogenezi (Narumiya et al., 1999). Hrají roli i v regulaci zánětu, mohou jej potlačovat či naopak podporovat. Typickým prozánětlivým prostaglandinem je  $\text{PGD}_2$ , jenž je syntetizován alveolárními makrofágy, krevními destičkami a žírnými buňkami. Je silným bronchokonstriktorem zvyšujícím sekreci mukózy (Sampson et al., 1997). Vyšší koncentrace této sloučeniny byla nalezena v tekutině z bronchoalveolární laváže pacientů s atopickým astmatem a rýmou, kteří byli vystaveni působení alergenu (Miodonna et al., 1990). Protizánětlivě a bronchoprotektivně se naopak projevuje  $\text{PGE}_2$ , který u astmatických pacientů inhibuje ranou a pozdní alergen-indukovanou odpověď (Pavord & Tattersfield, 1995), snižuje také produkci interleukinu-12 (Van Der Pouw Kraan et al., 1995), aj. V kondenzátu dechu byla nalezena zvýšená hladina  $\text{PGE}_2$  u pacientů s cystickou fibrózou [ $c_{\text{kontroly}} = 41,0$  (29,0-50,0) pg/ml;  $c_{\text{stabilní CF}} = 72,0$  (64,3-81,8) pg/ml;  $c_{\text{nestabilní CF}} = 83,0$  (74,3-91,3)], (Lucidi et al., 2008) či s chronickou obstrukční plicní nemocí (COPD „chronic obstructive pulmonary disease“), [ $c_{\text{kontroly}} = 44,3$  (30,2-52,1) pg/ml;  $c_{\text{COPD steroidní léčba}} = 93,6$  (52,8-157,0) pg/ml;  $c_{\text{COPD bez steroidů}} = 98,0$  (57,0 -128,4) pg/ml ], (Montuschi et al., 2003).

### 2.1.3 Isoprostany

V roce 1990 byly objeveny prostaglandinům  $\text{F}_2$  podobné sloučeniny, které nevznikaly enzymaticky přes cyklooxygenasu, nýbrž byly tvořeny radikálově katalyzovanou peroxidací kyseliny arachidonové (Morrow et al., 1990). Tyto látky, izomerické k  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , byly pojmenovány  $\text{F}_2$ -isoprostany. Jejich biosyntetická dráha je uvedena na obr. 5, kdy z kys. arachidonové po abstrakci vodíku a adici kyslíku vzniká peroxylový radikál, následuje exocyklizace a opětovná vazba kyslíku za tvorby sloučenin připomínajících prostaglandin  $\text{G}_2$ . Tyto nestabilní bicykloendoperoxidové meziproducty se pak spontánně přeměňují na isoprostany (Musiek et al., 2005). Tři radikály kys. arachidonové tedy vedou ke čtyřem  $\text{F}_2$  isoprostanovým regioisomerům, které jsou pojmenovány podle čísla uhlíku ve struktuře, na kterém leží hydroxylová skupina (uhlík karboxylu nese číslo 1). Alternativními cestami mohou vznikat i  $\text{E}_2$ -,  $\text{D}_2$ -,  $\text{A}_2$ - a  $\text{J}_2$ -isoprostany (Roberts II & Morrow, 2002).

Isoprostany lze považovat za markery oxidativního stresu - zejména proto, že se jedná o stabilní produkty lipidové peroxidace, které se vyskytují v řadě biologických tekutin a tkání v detekovatelném množství (Roberts II & Morrow, 2000). Zánětlivá

onemocnění jsou často spojována se zvýšenou produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS). Prostředí v dýchacích cestách astmatiků je z biochemického hlediska příznivé pro reakce zprostředkované právě těmito sloučeninami (Dworski, 2000). Není proto překvapením, že zvýšená hladina isoprostanu 8-epi-PGF<sub>2α</sub> (8-isoprostan) byla nalezena v EBC pacientů s astmatem [ $C_{\text{kontroly}} = (15,8 \pm 1,6)$  pg/ml;  $C_{\text{těžké astma}} = (48,9 \pm 5,0)$  pg/ml], (Montuschi et al., 1999), stejně tak jako u dalších onemocnění, pro něž je charakteristický oxidativní stres např. v kondenzátu dechu subjektů s CF [ $C_{\text{kontroly}} = 15,5$  (11,5-17,0) pg/ml;  $C_{\text{stabilní CF}} = 30,5$  (25,3-36,0) pg/ml;  $C_{\text{nestabilní CF}} = 47,5$  (44,0-50,0)], (Lucidi et al., 2008).



Obr. 5: Biosyntetická dráha F<sub>2</sub>-isoprostanů, převzato z Roberts II & Morrow, 2002.

Co se týče efektů isoprostanů na hladké svalstvo, tak tyto látky nejenže vyvolávají stahy svaloviny dýchacích cest, ale také vedou k zúžení cév a tepen včetně aorty, jak je přehledně shrnuto v review (Janssen, 2000).

## 2.2 Cytokiny

Pojem cytokiny zahrnuje širokou škálu peptidů s převážně parakrinním nebo autokrinním působením. Vedle interleukinů (IL), lymfokinů a monokinů zahrnuje tato skupina látek i některé růstové faktory. V organismu se účastní například imunitní reakce, zánětů, regenerace tkání, embryonálního vývoje, angiogeneze, oogeneze, spermatogeneze, kancerogeneze aj. V závislosti na typu cytokinu, jsou produkovány převážně T lymfocyty, makrofágy, bazofily, eozinofily a fibroblasty. T lymfocyty navozují chronickou zánětlivou reakci produkcí IL-3, IL-4, IL-5 (Kelner et al., 1997).

V BAL tekutině chronických astmatiků byly nalezeny zvýšené koncentrace IL-6, IL-5, IL-4 a TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor). U nealergického bronchiálního astmatu byla v bronchoalveolární plicní tekutině prokázána i zvýšená hladina IL-2 (Kelner et al., 1997). V EBC astmatiků byla nalezena zvýšená hladina IL-4 ( $c = 53,7 \pm 4,2$  pg/ml) ve srovnání s kontrolou ( $c = 35,7 \pm 6,2$  pg/ml) a s pacienty na steroidní léčbě ( $c = 37,5 \pm 5,6$  pg/ml), (Shahid et al., 2002).

## 2.3 Dusíkaté deriváty

### 2.3.1 Oxid dusnatý, 3-nitrotyrosin, nitrosothioly

Zvýšená hladina oxidu dusnatého (NO) byla například prokázána ve vydechovaném vzduchu pacientů s astmatem (Kharitonov et al., 1994).

Endogenně vzniká oxid dusnatý z L-argininu (Knowles et al., 1989) za katalýzy NO synthasy (NOS), (EC 1.14.13.39). U člověka se zmíněný enzym vyskytuje ve třech izoformách. Izoenzym I se nachází převážně v neuronech a epitelových buňkách. Variantu II můžeme nalézt u cytokin-indukovatelných typů buněk např. v lidských chondrocytech (Charles et al., 1993) a izoenzym III se vyskytuje zejména v buňkách endoteliálních. Aktivita izoform I a III je silně závislá na přítomnosti vápenatých iontů a kalmodulinu (Förstermann et al., 1994). Bronchiální biopsie u astmatických pacientů prokázala zvýšenou expresi indukovatelné NO synthasy ve srovnání s kontrolami (Hamid et al., 1993). Aktivitu této formy enzymu je možné potlačit steroidy, což bylo potvrzeno snížením úrovně NO ve vydechovaném vzduchu po podání kortikosteroidů ( $c_{NO}$  kontroly = 5,05 ppb;  $c_{NO}$  astma = 16,3 ppb;  $c_{NO}$  astma léčba = 13,5 ppb), (Nelson et al., 1997).

V klinické praxi se také setkáváme se stanovením hodnoty frakce vydechovaného oxidu dusnatého FENO „fractional exhaled nitric oxide“. Jedná se o vyhovující ukazatel eosinofilního zánětu podávající doplňkovou informaci v hodnocení stavu pacienta (Tab. 2). Mezi faktory ovlivňující hladinu FENO patří mimo

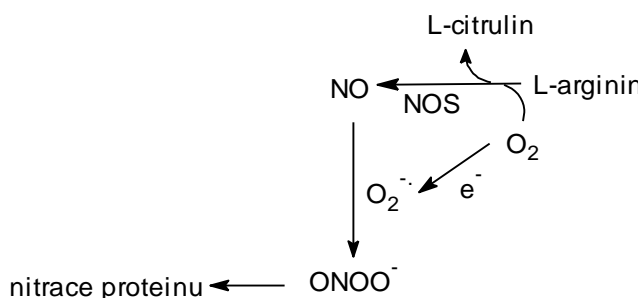
jiné kouření, inhalace chladného vzduchu, cystická fibróza, dieta bohatá na dusičnany, výška, věk a další (Čáp & Brezina, 2009).

Tab. 2: Ilustrativní tabulka znázorňující pravděpodobnost eosinofilního zánětu v závislosti na hodnotách FENO u dětí do 12 let, upraveno dle Čáp & Brezina, 2009.

Děti do 12 let				
Hodnoty FENO	snížené	normální	zvýšené	velmi zvýšené
ppb	<5	5-20	20-35	>35
Eosinof. zánět	nepravděpodobný	nepravděpodobný	slabý	významný

Oxid dusnatý zastává řadu fyziologických funkcí, mimo jiné se podílí na regulaci krevního tlaku (Rees et al., 1989), působí jako endogenní neurotransmitter bronchodilatačních nervů (Belvisi et al., 1992), má antimikrobiální účinky (De Groote & Fanq, 1995), podporuje vazodilataci a exudaci plasmy (Barnes, 1996) aj.

Mezi jeho významné patologické projevy řadíme účast na tvorbě reaktivních dusíkatých radikálů (RNS) a na nitraci tyrosinových reziduí proteinů vedoucí ke vzniku nitrotyrosinu. V souvislosti se zánětlivými onemocněními je často zmiňována nitrace tyrosinu cestou přes peroxynitrit (Obr. 6), který vzniká reakcí NO se superoxidovým radikálem (Koppenol et al., 1992; Kaminsky et al., 1999) či enzymaticky myeloperoksidázovou oxidací  $\text{NO}_2^-$  (Van Der Vliet et al., 2000).



Obr. 6: Proteinová nitrace cestou přes peroxynitrit: oxid dusnatý, vzniklý štěpením argininu enzymem NOS (synthasa oxidu dusnatého), reaguje se superoxidovým radikálem za uvolnění nestabilního peroxynitritu, který může následně atakovat tyrosinová rezidua proteinu, převzato a upraveno z Ghosh et al., 2011.

Zvýšená hladina 3-nitrotyrosinu byla nalezena v EBC pacientů s astmatem, kteří nebyli léčeni glukokortikosteroidy ( $c_{\text{astma}} = 15,3 \pm 2,0$  ng/ml;  $c_{\text{kontroly}} = 6,3 \pm$

0,8 ng/ml). Astmatici na léčbě měli tuto hladinu vůči kontrolám naopak sníženou (mírné astma:  $c = 5,0 \pm 0,6$  ng/ml; těžké astma:  $c = 3,3 \pm 0,6$  ng/ml), (Hanazawa et al., 2000).

S-nitrosothioly jsou sloučeniny s obecnou strukturou RS-NO. Mezi nejznámější patří S-nitrosoglutathion a S-nitrosocystein, které mohou vznikat interakcí peroxynitritu se sloučeninami obsahujícími thiolovou skupinu (Van Der Vliet et al., 1998).

V EBC pacientů s těžkým astmatem bylo nalezeno zvýšené množství nitrosothiolu ve srovnání s kontrolou ( $c_{\text{těžké astma}} = 0,81 \pm 0,06$   $\mu\text{M}$ ;  $c_{\text{kontroly}} = 0,11 \pm 0,02$   $\mu\text{M}$ ) a s mírnými astmatiky ( $c_{\text{mírné astma}} = 0,08 \pm 0,01$   $\mu\text{M}$ ). U subjektů s CF a COPD byla hladina nitrosothiolu v kondenzátu vydechovaného vzduchu rovněž vyšší ( $c_{\text{CF}} = 0,35 \pm 0,07$   $\mu\text{M}$  respektive  $c_{\text{COPD}} = 0,24 \pm 0,04$   $\mu\text{M}$ ), (Corradi et al., 2001).

## 2.4 Aldehydy

Jak již bylo naznačeno výše, řada plicních onemocnění včetně astmatu, COPD a cystické fibrózy je spojena s oxidativním stresem a tedy i se zvýšenou hladinou ROS. V plicích jsou tyto radikály produkovány zejména aktivovanými zánětlivými buňkami, jako jsou eozinofily, neutrofilové a alveolární makrofágy (Lärstad et al., 2005). ROS přispívají k oxidaci buněčných makromolekul včetně DNA, proteinů a lipidů. Jsou jedním z hlavních iniciátorů lipidové peroxidace - konkrétně se účastní přeměny polyenasycených mastných kyselin „PUFA“ (polyunsaturated fatty acids) na nestabilní lipidové hydroperoxy a aldehydy, jakým je i malondialdehyd. Pro zjištění obsahu malondialdehydu v kondenzátu dechu kapalinovou chromatografií bylo nutné zmíněnou látku podrobit derivatizaci 2,4-dinitrofenylhydrazinem - v EBC pacientů s COPD bylo nalezeno její zvýšené množství ve srovnání s kontrolou ( $c_{\text{COPD}} = 57,2 \pm 2,4$  nM a  $c_{\text{kontroly}} = 17,7 \pm 5,5$  nM), (Corradi et al., 2003a). V případě astmatických pacientů byla zjištěná koncentrace malondialdehydu ( $c_{\text{astma}} = 30,2 \pm 2,4$  nM) vyšší, a to jak u kontrolních osob ( $c_{\text{kontroly}} = 19,4 \pm 1,9$  nM), tak u astmatických pacientů léčených pětidenním orálním podáváním steroidního hormonu prednisonu ( $c_{\text{léčba}} = 18,5 \pm 1,6$  nM), (Corradi et al., 2003b). Rovněž byly v EBC pacientů s COPD nalezeny vyšší koncentrace hexanalů ( $c = 63,5 \pm 4,4$  nM) a heptanalů ( $c = 26,6 \pm 3,9$  nM) v porovnání s kontrolami ( $c = 17,7 \pm 5,0$  nM, resp.  $c = 14,2 \pm 3,5$  nM), (Corradi et al., 2003a).

## 3 Astma

### 3.1 Definice astmatu

Dle provedených epidemiologických studií vzrůstá prevalence a závažnost astmatu jak u dětí, tak dospělých. Odhaduje se, že tímto onemocněním trpí na celém světě okolo 300 milionů lidí, v některých zemích se jedná až o 18 % populace (Bateman et al., 2008). Prevalence astmatu se v České republice pohybuje kolem 8 %, u dětí je však vyšší - mezi 12-15 %. Úmrtnost je zde velmi nízká, řádově 1:100 000 obyvatel, což představuje přibližně 130 nemocných ročně. Mortalita souvisí především s nedostatečnou či zcela chybějící dlouhodobou protizánětlivou léčbou (Kašák, 2005).

Astma zahrnuje několik fenotypů, lišících se spouštěcími faktory, projevy, závažností, reakcí na léčbu aj. což v praxi ztěžuje klinickou diagnostiku (Wenzel, 2006).

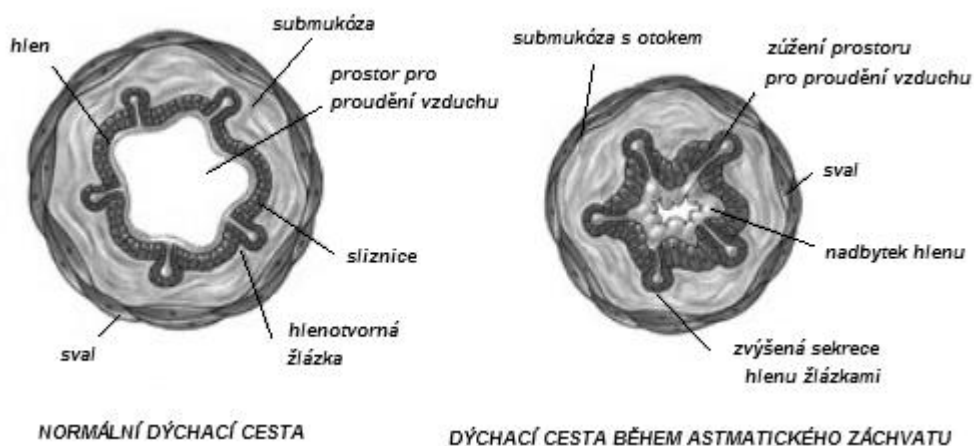
Definice podle GINA „Global initiative for asthma“ je následující: Astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, kde hrají roli mnohé buňky (zejména T lymfocyty, neutrofilové, žírné buňky, eozinofily a epitelové buňky) a buněčné částice. Chronický zánět je spojen s bronchiální hyperreaktivitou vedoucí k opakujícím se epizodám pískotu při dýchání, kašle, dušnosti a tlaku na hrudi - zejména večer nebo časně ráno. Tyto události jsou obvykle provázeny rozsáhlou, ale variabilní obstrukcí dýchacích cest, často reverzibilní, odeznívající spontánně nebo vlivem léčby (Bateman et al., 2008).

Na vzniku a rozvoji astmatu se podílí zejména intermitentní obstrukce dýchacích cest, bronchiální hyperreaktivita a zánět (Kašák, 2005).

### 3.2 Obstrukce dýchacích cest

Obstrukce patří mezi hlavní projevy astmatu, vzniká nejčastěji v důsledku stahu hladké svaloviny dýchacích cest (např. vlivem uvolnění bronchokonstrikčních látek jako je histamin, PGD<sub>2</sub>, cys-LT aj. zánětlivými buňkami), dále díky mukózní hypersekreci, edému či remodelaci stěn dýchacích cest (Lemanske et al., 2003), viz obr. 7. Remodelace čili přestavba průduškové stěny nastává v důsledku dlouhodobě probíhajícího zánětu (zvláště pozdě diagnostikovaného či neléčeného). Strukturální změny pak například zahrnují zvýšené ukládání kolagenu, fibronektinu a tenascinu do intersticia (vmezeřené tkáni) přiléhajícího k vrstvě epitelu, dále hyperplazii pohárkových buněk a slizničních žlázek či hypertrofii hladkého svalu (Kašák, 2005).

U pacienta vede obstrukce k ventilační poruše, snížení rychlosti výdechu a nádechu a často i k pocitu dušnosti (pomalu rozvíjející se obstrukce bývá zpravidla lépe tolerovaná než ta, která vzniká náhle). Reverzibilita a stupeň obstrukce je jedním z faktorů pro posouzení závažnosti astmatu. Jako těžké astma by mělo být hodnoceno astma s těžkým stupněm obstrukce a také to, kde byla prokázána špatná reverzibilita i přes kvalitní léčbu (Pohunek & Svobodová, 2007).



Obr. 7: Zúžení dýchacích cest během astmatického záchvatu, převzato z Ayres 2001.

### 3.3 Bronchiální hyperreaktivita

Bronchiální hyperreaktivita (BHR), čili sklon k bronchokonstrikci je pro průduškové astma charakteristická - na základě vystavení různým spouštěcím faktorům při něm dochází k snazšímu vyvolání bronchospasmu (zúžení průdušek), které u zdravých jedinců žádnou odpověď nevyvolají (Pohunek & Svobodová, 2007). Mezi takovéto faktory můžeme zařadit stimulace přímé, jako je provokace histaminem či metacholinem nebo stimuly nepřímé - cvičení, chlad, aj. (Čáp & Brezina, 2009).

Na průběhu BHR se podílí řada mechanismů, mimo nepřiměřené reakce hladkého svalstva je nutné zmínit i nadměrnou cévní reaktivitu mající za následek vyšší propustnost cévní stěny a snazší otok sliznice a také vyšší reaktivitu nervových vláken vedoucí ke zvýšené dráždivosti. Bronchiální hyperreaktivita je ovlivnitelná nejen prostředím, ale i genetickou predispozicí (např. vztah k BHR a astmatu byl prokázán pro gen *ADAM-33*, jenž je lokalizován na krátkém raménku 20. chromosomu). BHR nemusí být přítomna jen u alergického zánětu, ale může provázet i další nemoci, jako je např. CF a primární ciliární dyskineze (Pohunek & Svobodová, 2007; Kašák, 2005).

Hyperreaktivita průdušek se vyšetřuje bronchokonstrikčními testy a kvantifikuje se měřením plicní funkce před a po inhalaci látek stimulujících hladké svalstvo např. histaminu, metacholinu, acetylcholinu, cys-LT či PGD<sub>2</sub> nebo se zjišťuje podáním



specifických látek (inhalačních alergenů z vnějšího prostředí), které mohou vést k upřesnění etiologie BHR. Je možné využít i nepřímých bronchokonstrikčních podnětů, jako jsou hyper- a hypotonické roztoky, tachykininy, propranolol aj. (Kašák, 2005).

### 3.4 Zánět

Chronický zánět je u astmatického onemocnění přítomen vždy a to bez ohledu na alergii či jeho závažnost. Podílí se na něm řada buněk - zejména antigen prezentující buňky, lymfocyty, eozinofily, mastocyty (žírné buňky), neutrofilny, makrofágy, bazofily a buňky epitelové (Kašák, 2005).

T lymfocyty reagují na přítomnost antigenu, řídí také zánětlivou odpověď produkcí cytokinů, kdy např. Th2 lymfocyty tvorbou IL-4 stimulují B lymfocyty k uvolnění protilátek třídy IgE. Z dalších cytokinů, které jsou produkovány Th2 lymfocyty, můžeme uvést IL-3, který z výše uvedeným IL-4 ovlivňuje funkci bazofilů. IL-5 se naopak podílí na diferenciaci, proliferaci a aktivaci eozinofilů (Kašák, 2005). V oblasti plicní periferie zdravých osob tvoří lymfocyty asi 10 % buněk. Změny v jejich počtu můžeme pozorovat u kuřáků a vybraných chorob charakterizovaných chronickým zánětem, včetně astmatu (Kelner et al., 1997).

Eozinofily se uplatňují především v pozdní fázi alergické reakce, jsou také odpovědné za vznik alergického zánětu. Uvolňují velké množství mediátorů, které ovlivňují BHR, kontrakci hladkých svalů, vazodilataci aj. (Kašák, 2005). Jejich degranulací mohou být uvolněny i bazické proteiny, které extracelulárně poškozují strukturu bronchiální stěny - jedná se například o hlavní bazický protein (MBP), eozinofilní kationický protein (ECP), eozinofilní neurotoxin (EDN), eozinofilní peroxidasu (EPO), a faktor aktivující destičky (PAF). Tyto proteiny jsou zodpovědné za rozrušování pevných spojů epitelu, což vede k odloučení epitelálních buněk do lumina a obnažení bazální buněčné vrstvy, dále indukují zmnožení vaziva a hmoty hladkého svalu v subepiteliálním prostoru bronchiální sliznice. Eozinofily jsou schopny migrace na základě chemotaktických faktorů (např. IL-5, eotaxinu) z nichž některé i samy produkují - mohou tak eozinofilní zánět nezávisle udržet (Pohunek & Svobodová, 2007).

Žírné buňky jsou typické pro ranou fázi alergické reakce a pro anafylaxi (prudká alergická reakce). Na svém povrchu mají také vysokoafinitní receptory pro IgE (FcεRI). Jejich aktivací dochází k degranulaci a uvolnění řady mediátorů včetně histaminu, LT a PG vyvolávající bronchospasmus, vazodilataci s edémem aj. U mastocytů alergiků byl prokázán zvýšený počet těchto IgE receptorů, takže

i minimální množství alergenu vyvolá vylití obsahu cytoplasmatických granul a produkci zánětlivých mediátorů (Kašák, 2005; Brhel et al., 2008).

Neutrofilů se ve zvýšené míře vyskytují u pacientů s chronickým těžkým astmatem, dále je nalezneme u exacerbace následkem virové infekce a při vystavení vzdušným poutantům. Produkují tzv. matrixmetaloproteinasy, které hrají významnou roli v remodelaci průdušek. Neutrofilů rozdíl od eozinofilů špatně odpovídají na léčbu kortikosteroidy (Kašák, 2005).

Buňky epitelu mohou být jak poškozovány, tak aktivovány. Jejich aktivace vede k indukci tvorby zánětlivých cytokinů, antigenů HLA II. třídy a adhezivních molekul. Jsou významným producentem NO indukující vazodilataci a sekreci hlenu (Kašák, 2005).

Jak bylo naznačeno výše, imunopatologickou reakci můžeme rozdělit na časnou neboli ranou fázi s projevy nastávajícími mezi 10. až 30. minutou a pozdní fázi přicházející v rozmezí 4-8 hodin. U prvně jmenované jsou nejdůležitějšími mediátory histamin a leukotrieny. Klinicky se tato fáze projevuje otokem, zarudnutím, kopřivkou, kontrakcí hladkých svalů a tvorbou hlenu. V pozdní fázi se umocňují změny vyvolané zvýšenou permeabilitou cév, také zánětlivé buňky migrují do perivaskulárních prostor. Obecně se zde zánět prohlubuje (Brhel et al., 2008).

### **3.5 Rizikové a vyvolávající faktory astmatu**

Vznik a vývoj astmatického onemocnění je výsledkem individuálních vlivů jedince v kombinaci s pestrými škálami faktorů prostředí. Faktory prostředí můžeme dále konkretizovat na ty, které ovlivňují vnímavost k astmatu a na faktory precipitační, vyvolávající exacerbaci (Kašák, 2005).

Nejrizikovější skupinou náchylnou k astmatu jsou atopici, pro kterou jsou specifickými spouštěči alergeny (Brhel et al., 2008).

#### **3.5.1 Faktory vnitřní**

Z rizikových faktorů hostitele napomáhající propuknutí astmatického onemocnění lze vyzdvihnout genetickou predispozici a atopii, dále hyperreaktivitu dýchacích cest či perinatální faktory. Částečně se zde projevuje vliv věku a pohlaví (Kašák, 2005).

Astma se stejně jako ostatní alergické nemoci řadí k onemocněním s tzv. polygenní multifaktoriální dědičností. Zatím bylo identifikováno několik chromosomových oblastí vztahujících se k astmatu - jedná se o místa na 5., 6., 7., 10., 11., 14., 16., 17., 19. a 20. chromosomu (Kašák, 2005). Pro konkrétnost můžeme uvést

geny *ADAM-33*, *PHF11*, *DPP10*, *GRPA* či *SPINK5*, které jsou v určitých populačních skupinách spojovány se zvýšeným rizikem výskytu astmatu. Genetický vliv rodičů k predispozici astmatu dětí je uveden v tab. 3. Genetika může významně zasáhnout i do odpovědi na léčbu - jako příklad můžeme zmínit polymorfismy na beta-2-receptoru, kdy změny aminokyselin v pozici 16 a 27 vedou k ovlivnění reakce s beta-2-antagonisty (Pohunek & Svobodová, 2007).

Tab. 3: Výskyt astmatu u dětí na základě přítomnosti astmatu rodičů, dle Pohunek & Svobodová, 2007.

<i>Astma rodičů</i>	<i>Astma u dětí</i>
žádný rodič nemá astma	6 % dětí má astma
jeden rodič má astma	20 % dětí má astma
oba rodiče mají astma	60 % dětí má astma

Atopie je genetická predispozice k alergické reakci zprostředkovaná protilátkami třídy IgE. Je přítomna asi u poloviny astmatických pacientů, přičemž riziko propuknutí astmatu je u atopika asi 10-20x vyšší jak u zdravého jedince. Celosvětová prevalence atopie dosahuje k 40 %, v ČR je jí ovlivněno asi 33 % populace (Kašák, 2005, Pohunek & Svobodová, 2007).

Vliv pohlaví se u dětí projevuje cca do 14 let. V tomto období je astma diagnostikováno častěji u chlapců. V pubertě se však poměr mezi pohlavím vyrovnává a nad 40 let pak převažují ženy (Kašák, 2005, Brhel et al., 2008).

Perinatální faktory (resp. faktory vztahující se k období před porodem a krátce po něm) zahrnují zejména nízkou porodní hmotnost dítěte, se kterou např. souvisí nezralost plic. Neméně podstatnou roli dále sehrává kouření matky v těhotenství (Kašák, 2005).

### **3.5.2 Faktory vyvolávající exacerbaci a modifikující vnímavost astmatu**

Exacerbace astmatu neboli astmatický záchvat, je výsledným dějem, na kterém se podílí zánět, BHR a spouštěcí faktor iniciující řetězec pochodů, vedoucí k akutnímu stavu dušnosti vyžadující aktivní léčbu, popř. intenzivní lékařskou péči. Nízké koncentrace těchto spouštěčů mohou přispět k prohloubení chronického zánětu, vyšší koncentrace pak mohou zapříčinit akutní exacerbaci (Pohunek & Svobodová, 2007). Faktory navozující exacerbaci se tedy částečně kryjí s faktory modifikujícími vnímavost k astmatu. Řadíme zde např. alergeny, vzdušné polutanty, respirační infekce, tělesnou námahu, potraviny, léky a drogy (Kašák, 2005).

Alergen je substance schopna vyvolat tvorbu specifických IgE protilátek. Mezi typické inhalační alergeny obytných budov řadíme prach, roztoče a plísně. Z venkovního prostředí se nejčastěji jedná o pyly (Kašák, 2005).

Kouření zvyšuje riziko vzniku astmatického onemocnění a přispívá k jeho progresivnímu zhoršování (Kašák, 2005). Dráždění sliznice dýchacích cest kouřem může vést k indukci či umocnění intenzity zánětlivé reakce. Tabákový kouř také poškozuje integritu epitelu, což napomáhá průniku inhalačních alergenů do organismu (Pohunek & Svobodová, 2007).

Znečištění prostředí může být zodpovědné za zhoršení již existujícího astmatu, přičemž průmyslový smog vyvolává spíše chronickou bronchitidu, fotochemický smog (např. ozon, oxidy dusíku) pak ovlivňuje zejména BHR (Kašák, 2005).

Virové infekce dýchacích cest jsou hlavními iniciátory zhoršení astmatu v dětském věku. Mohou zapříčinit poškození bronchiální epitelové výstelky, vést ke vzplanutí zánětu, významně zvýšit BHR, aj. Řadíme zde např. rhinovirus a respiračně-syncytiální virus, známý také pod zkratkou RSV (Pohunek & Svobodová, 2007).

Tělesná námaha je dalším typickým spouštěčem astmatických příznaků dětí. Fyziologickou podstatou jsou osmotické a tepelné změny vyvolané hyperventilací při tělesné námaze (významnějším podnětem je vzduch studený a suchý). Tyto změny vedou ve sliznici dýchacích cest k degranulaci žírných buněk a tedy k uvolnění mediátorů akutní reakce (Pohunek & Svobodová, 2007).

V případě léků je typickým představitelem aspirin (kys. acetylsalicylová), kdy jím navozené astma může být buďto původu alergického či může souviset se samotným účinkem léku zasahujícím do metabolismu kyseliny arachidonové. U drog se jedná zejména o kokain a heroin (Kašák, 2005).

## **3.6 Klasifikace astmatu**

### **3.6.1 Klasifikace podle závažnosti astmatu**

Základním prvkem klasifikace dle závažnosti astmatu je rozdělení onemocnění na astma intermitentní a perzistující, které je dále blíže specifikováno na astma mírné, středně těžké a těžké, viz tab. 4. Tato forma klasifikace je nejvhodnější v situaci, nejsou-li projevy astmatického onemocnění ovlivněny léčbou (Pohunek & Svobodová, 2007).

Tab. 4: Klasifikace závažnosti před léčbou, kdy FEV<sub>1</sub> je usilovně vydechnutý objem za 1 s a PEF je vrcholový výdechový průtok, převzato z Pohunek & Svobodová, 2007.

<b>Příznaky a funkce plic pacienta</b>	
<i>Stupeň 1 - intermitentní</i>	příznaky méně než 1x týdně krátké exacerbace noční příznaky méně jak 2x za měsíc normální funkce plic mezi epizodami
<i>Stupeň 2 - lehké perzistující</i>	příznaky častější než 1x týdně, ale ne každý den noční příznaky častější jak 2x měsíčně, ale méně než 1x týdně normální funkce plic mezi epizodami
<i>Stupeň 3 - středně těžké perzistující</i>	příznaky denně exacerbace mohou narušit aktivitu a spánek noční obtíže nejméně 1x týdně 60 % < FEV <sub>1</sub> < 80 % náležité, nebo 60 % < PEF < 80% nejlepší osobní hodnoty
<i>Stupeň 4 - těžké perzistující</i>	každodenní příznaky časté exacerbace časté noční astmatické obtíže FEV <sub>1</sub> < 60 % náležité, nebo PEF < 60% nejlepší osobní hodnoty

Závažnost je pak hodnocena podle intenzity a frekvence příznaků astmatu - včetně exacerbací, dále podle stupně postižení funkce plic, omezení denní aktivity, popř. dle frekvence užívání záchranných léků (Kašák, 2005).

### **3.6.2 Klasifikace podle stupně kontroly**

Tato klasifikace rozlišuje astma pod kontrolou, pod částečnou kontrolou a pod nedostatečnou kontrolou, viz tab. 5. Astma pod kontrolou je takový stav nemoci, který neinterferuje s běžnými aktivitami nemocného, neobjevují se zde významné příznaky či akutní exacerbace. Stupeň kontroly je nutné hodnotit při každém vyšetření nemocného a dle zjištěného nálezu úroveň kontroly dále řídit (Pohunek & Svobodová, 2007).

Tab. 5: Klasifikace astmatu dle stupně kontroly, kdy NH je náležitá hodnota a ONH je osobní nejlepší hodnota, převzato z Pohunek & Svobodová, 2007.

	pod kontrolou	pod částečnou kontrolou	pod nedostatečnou kontrolou
<i>denní příznaky</i>	žádné (nejvýše 2x týdně)	více než 2x týdně	tři a více znaků částečné kontroly v týdnu
<i>omezení aktivity</i>	žádné	jakékoli	
<i>noční příznaky</i>	žádné	jakékoli	
<i>potřeba úlev. léků</i>	žádná	více než 2x týdně	
<i>funkce plic</i>	normální	< 80 % NH nebo ONH	
<i>exacerbace</i>	žádné	min. 1 za rok	1x v kterémkoli týdnu v roce

### 3.7 Farmakoterapie

Farmakoterapeutické léčebné postupy vycházejí ze znalosti podstaty astmatického onemocnění, zahrnují léčbu příznaků nemoci a také dlouhodobou protizánětlivou léčbu s cílem potlačit eozinofilní zánět, snížit úroveň BHR aj. Jsou také důležité jako prevence remodelačních změn v dýchacích cestách (Pohunek & Svobodová, 2007).

Inhalace léku je nečastější formou léčby. Hlavní výhodou je podání léku přímo do dýchacích cest pacienta, dosahuje se tak vyšší účinné koncentrace v místě zánětu, rychlejšího nástupu účinku a jsou minimalizovány nežádoucí systémové projevy léku. Mezi hlavní nevýhody patří dráždění ke kašli, riziko dysfonie a tvorba hlenových zátek (Kašák, 2005).

Preventivní antiastmatika se mohou podávat denně a dlouhodobě. Řadíme zde inhalační kortikosteroidy, jejichž účinek tkví ve snížení BHR, redukci příznaků astmatu včetně frekvence exacerbací, dále zlepšují plicní funkce aj. Od zavedení těchto léků výrazně poklesl počet astmatiků potřebujících intenzivní péči a ubylo i těžkých stavů způsobených astmatem. Vysoké dávky kortikosteroidů u dlouhodobě léčených pacientů, však mohou vést ke snadné zranitelnosti kůže, snížení minerální denzity kostí aj. Pokud se astma dostane pod kontrolu, stačí již minimální dávky kortikosteroidů. Při úplném vysazení léčby však hrozí riziko opětovné aktivace zánětu. Nejčastěji se na našem trhu setkáváme s beklomethasondipropionátem (BDP), budesonidem (BUD), flutikasonpropionátem (FP) a ciclesonidem (CIC). V posledních letech se kombinují kortikosteroidy s dlouhodobě působícími beta-2-antagonisty, čímž se synergicky podpoří protizánětlivý účinek a navodí se i účinek bronchodilatační.

K dispozici jsou léky jako seretide (salmeterol + flutikason) a symbicort (formoterol + budesonid). Další variantou je použití nesteroidních kromoglykanů, stabilizujících membránu žírných buněk a inhibujících jejich degranulaci. Tlumí také aktivaci senzoryckých nervů. Nevýhodou je nutnost časté denní aplikace a pomalý nástup účinku (Pohunek & Svobodová, 2007; Kašák, 2005; Brhel et al., 2008; Kopřiva, 2003).

Antileukotrieny jsou novou třídou antiastmatik, řadíme zde inhibitory 5-lipoxygenasy, blokuující syntézu všech leukotrienů a také antagonisty receptorů pro cys-leukotrieny (montelukast, pranlukast, zafirlukast), mající vliv na CysLT1 receptor. Antileukotrieny mají malý, ale variabilní bronchodilatační účinek, zlepšují plicní funkci a redukuje počet exacerbací. Podávají se v tabletové formě (Kašák, 2005).

Také jsou známy antihistaminika druhé generace tzv. H<sub>1</sub> - antagonisté mající selektivní účinek na H1 receptory. Patří zde například loratidin, který ovlivňuje nejen uvolnění histaminu, ale i dalších mediátorů alergické reakce (PGD<sub>2</sub> a leukotrienů), potlačuje chemotaxi eosinofilů aj. (Kopřiva, 2003).

## 4 Cystická fibróza (CF)

### 4.1 Definice CF, CFTR protein

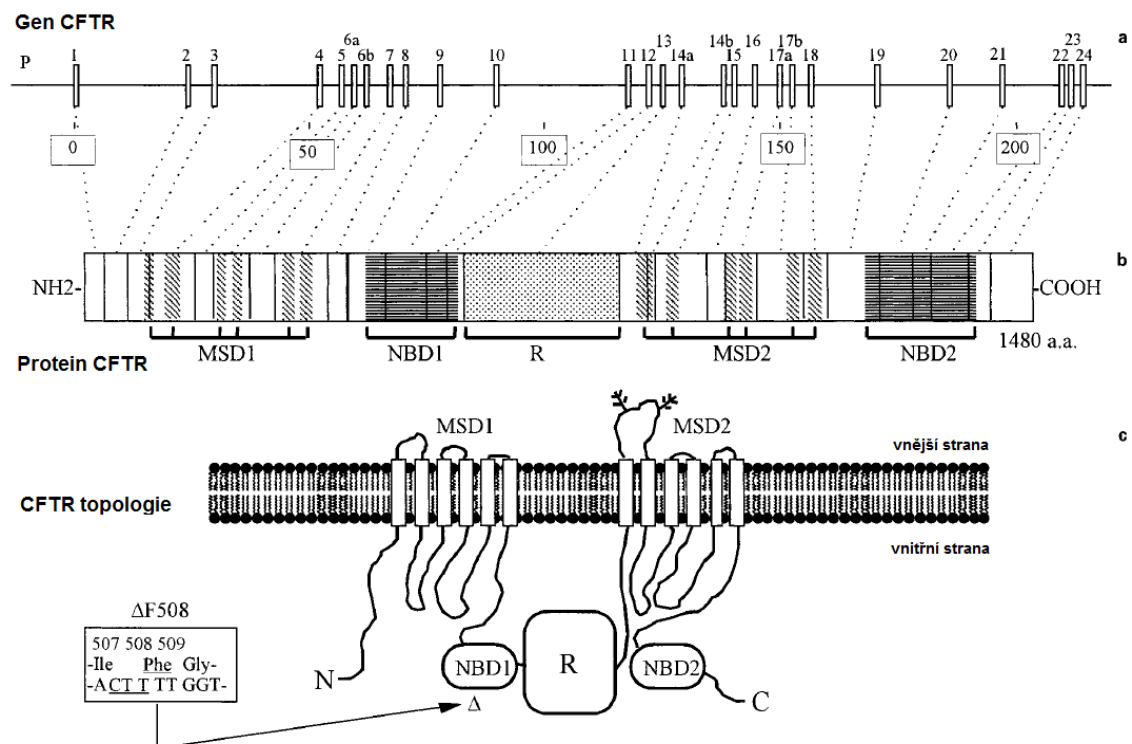
Nejčastější smrtelnou geneticky podmíněnou chorobou evropského obyvatelstva je cystická fibróza, s výskytem jednoho dítěte na 2500 - 4000 novorozenců (Jakubec, 2006). Incidence v České republice činí 1:2736 narozených dětí, z čehož plyne, že každý 26. jedinec je zdravým nositelem CF a každé 676. manželství může být partnerstvím dvou nosičů mající 25% pravděpodobnost narození nemocného potomka (Vávrová et al., 2006). V neevropských kulturách je výskyt zmíněného onemocnění podstatně nižší, pro příklad uveďme populaci hispánskou (1:9000) a africko-americkou (1:32000), (Grebe et al., 1994; Gibson et al., 2003)

Cystická fibróza je autozomálně recesivní onemocnění způsobené mutacemi v *CFTR* genu („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ neboli regulátor transmembránové vodivosti iontů), (Obr. 8), který je lokalizován na dlouhém raménku 7. chromosomu (lokus 7q31.2), (Jakubec, 2006; Riordan et al., 1989). Skládá se z 27 exonů, ležící v oblasti přibližně 250 kb dlouhé (Zielenski et al., 1991).

Výše uvedený gen kóduje CFTR protein, obsahující 1480 aminokyselin. Primárně zastává funkci chloridového kanálu, je však schopen ovlivnit i další kanály, mimo jiné chloridový kanál ORCC „outwardly rectified chloride channel“ a kanál sodíkový (ENaC „epithelial sodium channel“). Protein CFTR náleží do nadrodiny tzv.

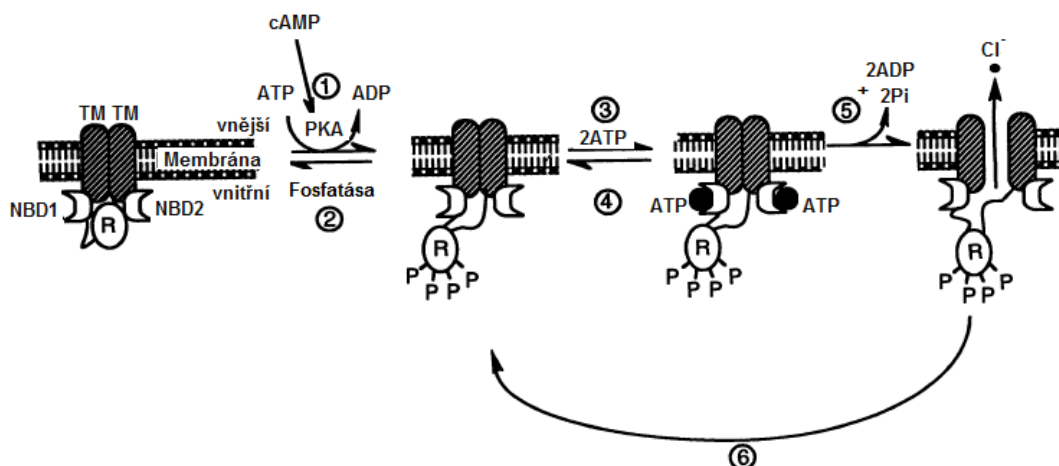
ABC transportérů (jedná se o skupinu transportérů zodpovědnou za přenos malých molekul, jako jsou ionty, ATP aj.), (Vávrová et al., 2006).

CFTR protein se skládá ze dvou transmembránových segmentů známých pod zkratkou TM1 a TM2 („transmembrane domain“, či pod názvem „membrane spanning domain“ MSD1 a MSD2), dále ze dvou v cytoplasmě lokalizovaných domén NBD1 a NBD2, vázajících aktivované nukleotidy (ATP) a konečně z regulační domény R, obsahující fosforylační místa (Obr. 8c). Transmembránové domény (TM1, TM2), ukotvující CFTR protein v buněčné membráně, vytváří vlastní chloridový kanál, spojující cytoplasmatickou oblast s lumen exokrinních žláz. Konformačně aktivní jsou domény NBD1 a NBD2, jenž umožňují otevírání a zavírání chloridového kanálu posunem regulační domény R. Tato regulace probíhající za účasti proteinkinasy A (PKA) a cAMP je znázorněna na obr. 9 (Vávrová et al., 2006; Collins, 1992).



Obr. 8: Schématický diagram *CFTR* genu, a) struktura *CFTR* genu zahrnující promotorový region (P) a 27 exonů, b) polypeptid *CFTR* s vyznačením předpokládaných domén, c) postavení *CFTR* proteinu vzhledem k cytoplasmatické membráně epitelární buňky a pozice nejznámější mutace, převzato z Zielenski, 2000.





Obr. 9: Duální kontrola CFTR kanálu pomocí PKA a ATP. Není-li R-doména fosforylovaná, kanál je uzavřen 1) cAMP stimuluje PKA k fosforylaci jedné či více serinových reziduí R domény 3) CFTR kanál je připraven vázat 2 molekuly ATP, jejichž hydrolýzou dochází ke konformační změně 5) otevření chloridového kanálu. Kroky 2) 4) 6) znázorňují předpoklad zpětné reakce vedoucí k uzavření kanálu, převzato z Collins, 1992.

Narušením funkce CFTR kanálu (např. v důsledku mutací), dochází k abnormálnímu transportu sodíkových a chloridových iontů přes epitelární membránu. Díky nastalým osmotickým změnám je pak narušena hydratace mukoidních sekretů a vývodů pankreatu, následkem čehož stoupá jejich viskozita, dochází k opakujícím se obstrukcím, zánětu a progresivní destrukci postižených orgánů zejména plic, slinivky břišní a mužského pohlavního orgánu irreverzibilní fibrotizací (Vávrová et al., 2006).

#### 4.2 Mutace genu *CFTR*

Do dnešní doby bylo nalezeno více jak 1300 mutací nukleotidové sekvence *CFTR* genu. Nejběžnější mutací v České republice je F508del, která se vyskytuje u 70 % populace postižené cystickou fibrózou. Zmíněná mutace spočívá v deleci 3 pb vedoucí ke ztrátě aminokyseliny fenylalaninu v pozici 508 proteinu CFTR, jenž je klíčová pro doménu CFTR-NBD1. Následuje mutace CFTRdele2,3 tj. delece exonu 2 a 3 s výskytem u 5,5 % nemocných a mutace G551D, což je záměna glycinu za aspartát v pozici 551, která byla nalezena u 3,8 % osob s CF. Další mutace v populaci ČR nepřesahují 3% hranici výskytu (Vávrová et al., Bobadilla et al., 2002).

#### 4.2.1 Třídy mutací *CFTR* genu

Na základě funkčního dopadu mutací *CFTR* genu byly jednotlivé mutace rozděleny do pěti tříd s pozdějším rozšířením o další dvě varianty (Tsui et al., 1995; Vávrová et al., 2006). První tři třídy mají klinicky nejzávažnější projevy, jsou spojeny s nepřítomností proteinu CFTR popř. s jeho minimální aktivitou. Následkem čehož dochází k exokrinní pankreatické insuficienci (nedostatečná tvorba trávicích enzymů slinivky břišní), mužské neplodnosti či se setkáváme s nadměrným množstvím chloridů v potu. Mutace tříd IV-VII jsou spojeny s vyšší variabilitou klinického projevu CF oproti třídám I-III (Vávrová et al., 2006).

Třída I. Zahrnuje mutace blokující syntézu CFTR proteinu či těžce postihující jeho strukturu. Řadí se zde především nesmyslné mutace, které zavádí do genu předčasný stop kodón (např. mutace R1162X), dále zde patří posunové mutace (jako 2143delT) zodpovědné za zkrácení proteinu CFTR, některé sestřihové mutace aj. Výsledkem je nepřítomnost CFTR kanálu v apikální membráně epitelálních buněk postiženého jedince (Vávrová et al., 2006).

Třída II. Tyto mutace vedou k abnormalitám posttranslační glykosylace a terciální konformace CFTR proteinu, jejichž důsledkem je nepřítomnost zmíněného proteinu v apikální membráně. Patří zde např. mutace F508del (Vávrová et al., 2006).

Třída III. Skýtá mutace zodpovědné za aktivaci popř. regulaci chloridového kanálu CFTR. Například zde zahrnujeme mutace vedoucí k blokádě vazby ATP na NBD domény nezbytné pro otevírání/zavírání kanálu. Typickým představitelem je mutace G551D. I v tomto případě je klinický průběh onemocnění závažný (Vávrová et al., 2006).

Třída IV. Tyto mutace vedou ke snížené vodivosti chloridového kanálu CFTR, aniž by byla ovlivněna jeho přítomnost v membráně. Patří zde zejména záměny aminokyselin např. mutace R347P. Tyto mutace mají klinicky mírný průběh a jsou spojeny s pankreatickou suficiencí (Vávrová et al., 2006).

Třída V. Jedná se o mutace zapříčiňující sníženou syntézu CFTR proteinu či redukováný výskyt plně funkčního proteinu CFTR v membráně epitelárních buněk. Patří zde zejména sestřihové mutace vedoucí k nesprávnému či neefektivnímu sestřihu mRNA *CFTR* genu. Jako příklad můžeme uvést mutaci 3849+10kb C→T. Klinicky se projevuje mírným průběhem onemocnění s hraničními koncentracemi chloridů v potu a mužskou fertilitou (Vávrová et al., 2006).

Třída VI. U této formy dochází ke ztrátě regulační funkce pro ostatní iontové kanály, tj. může dojít ke ztrátě schopnosti CFTR proteinu ovlivnit kanály jako ENaC či ORCC (Vávrová et al., 2006).

Třída VII. Je zapříčiněna sníženou stabilitou plně funkčního CFTR proteinu v apikální membráně. Bylo prokázáno, že zkrácení karboxylového konce o cca 70-100 pb ovlivňuje stabilitu CFTR proteinu. Patří zde zejména posunové a nesmyslné mutace, např. Q1412X (Vávrová et al., 2006).

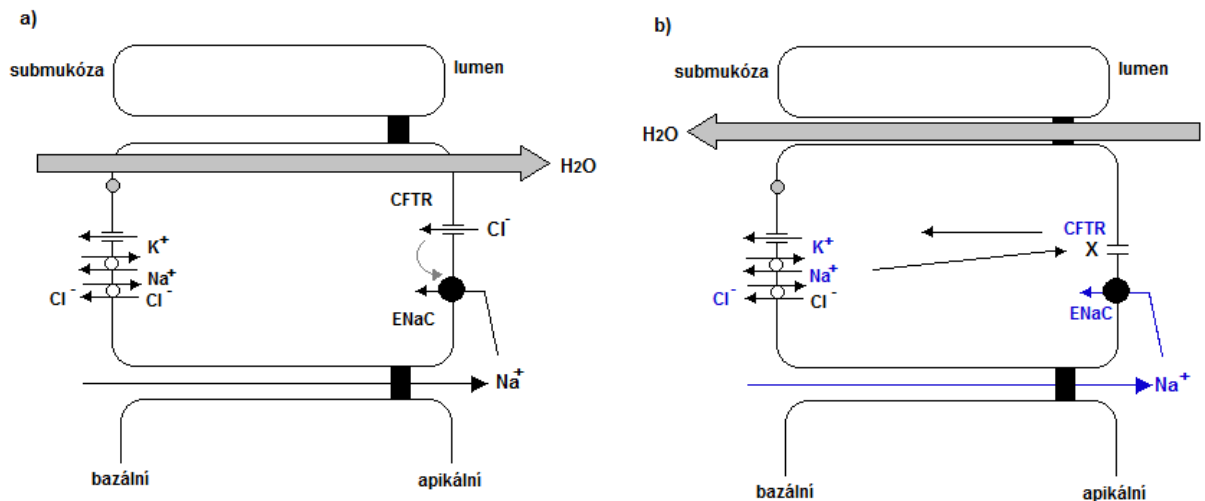
### 4.3 Typické klinické projevy pacientů s CF

#### 4.3.1 Respirační systém

Postižení plic a dýchacích cest je nejzávažnějším projevem cystické fibrózy, která zapříčiňuje až 90 % úmrtí. Primárním problémem v dýchacích cestách cystických pacientů je chronická endobronchiální infekce patogeny s následnou neutrofilovou zánětlivou odpovědí. Hlavními mediátory pro průnik neutrofilů jsou IL-8, TNF $\alpha$ , LTB $_4$  a IL-1. Zánět může později přecházet na okolní plicní tkáň s projevy fibrotizace plicního parenchymu a tvorbou emfyzematózních bul (plicní puchýře), které vedou k plicní hypertenzi. Mezi další z řady respiračních komplikací můžeme zařadit pneumotorax, kašel, hnisavé sputum aj. (Vávrová et al. 2006; Jakubec, 2006).

Povrchová tekutina dýchacích cest se skládá z hlenu a periciliární tekutiny (PCL „periciliary liquid layer“), jejíž vrstva se rovná výšce rovných řasinek. PCL umožňuje pohyb řasinek, neobsahuje muciny a má tedy nízkou viskozitu. Ve vrstvě hlenu jsou naopak muciny přítomny, její vlastnosti se mění v závislosti na množství přítomné vody, iontů a hodnoty pH. Poruchy proteinu CFTR vedou, mimo jiné, i k nízké sekreci HCO $_3^-$ , což ovlivňuje pH v dýchacích cestách. Tento fakt spolu s neutrofilovým zánětem zapříčiňuje okyselení povrchové tekutiny dýchacích cest. Snižuje se tak ciliální aktivita zvýšenou vazkostí hlenu, je ovlivněna adhezivita mikrobů aj. (Vávrová et al, 2006). Nižší pH CF pacientů bylo ve srovnání s kontrolou nalezeno i v kondenzátu vydechovaného vzduchu (pH = 5,67  $\pm$  0,45 respektive pH = 6,15  $\pm$  0,16), (Tate et al., 2002).

Rozdíly v povrchové tekutině dýchacích cest pacientů s CF a zdravých osob se pokoušejí vysvětlit dvě hypotézy a to hypotéza nízkého objemu a hypotéza vysokého obsahu solí. První z nich, je založena na hypersekreci sodných iontů díky dysfunkci CFTR kanálu. Spolu se sodíkem se resorbuje také voda, což vede ke snížení výšky PCL a zahuštění hlenu. Dochází také k poruše transportu hlenu a omezení mukociliální clearance (Obr. 10). Druhá hypotéza předpokládá neprůchodnost CFTR kanálu z lumina, následkem čehož PCL obsahuje vyšší koncentrace solí, brání normální funkci adhezivů (Vávrová et al., 2006).



Obr. 10: Model toku iontů a vody v membráně epiteliální buňky a) buňka zdravého jedince, b) buňka CF pacienta dle hypotézy nízkého objemu převzato z Vávrová et al., 2006.

#### 4.3.2 Gastrointestinální systém

U CF mohou být postiženy orgány jako pankreas, střeva, žlučové cesty aj. Zevní insuficience pankreatu (nedostatečná funkce slinivky břišní) je přítomná u 85-95 % pacientů. Díky odlišnému složení pankreatických šťáv dochází k hromadění sekretů slinivky břišní a obstrukci vývodu pankreatu vedoucí k sekundárnímu zánětu, destrukci acinárních buněk, fibrotizaci a atrofii pankreatické tkáně. Snižuje se také hladina pankreatických enzymů zapříčiňující další obtíže (Jakubec, 2006).

V porovnání se zdravými osobami je častější i gastroezofageální reflux (tj. proniknutí kyselých žaludečních šťáv do jícnu). Mezi typické střevní problémy CF pacientů patří fibrotizující kolonopatie (zúžení lumen tračníku fibrotizujícím procesem), mekoniový ileus (střevní obstrukce vazkou smolkou), distální intestinální obstrukční syndrom (ucpání střeva vazkým hlenem a fekálním obsahem) aj. (Jakubec, 2006; Vávrová et al., 2006). Je postižen i žlučovod, např. dochází k jeho ucpání, ke změně ve složení a viskozitě žluči (Jakubec, 2006).

#### 4.3.3 Další časté projevy nemoci

Významným projevem CF je slanost potu, prokazovaná potním testem. V důsledku nadměrného pocení zejména při horečce, může docházet k rychlé ztrátě soli a k následnému vazomotorickému šoku s hypoelektrolytemií (Vávrová et al., 2006; Beckerman & Taussig 1979).

Až u 98 % mužů s CF bývá postižen reprodukční systém obstruktivní azospermii vedoucí k jejich neplodnosti (Vávrová et al., 2006).

Relativně časté jsou i problémy s kostmi, osteoporózou trpí až 34 % nemocných, osteopenie se pak vyskytuje přibližně u dospělých 40 % pacientů s CF (Jakubec, 2006).

## 5 Metabolomika dechu „breathomics“

Metabolomika je vědní disciplína zabývající se analýzou a interpretací biochemických profilů nízkomolekulárních látek (metabolitů) v biologických vzorcích. Zahrnuje několik odvětví: metabolické profilování „metabolic profiling“, které je zaměřeno na analýzu metabolitů náležících do určité skupiny látek (cukry, aminokyseliny aj.) či konkrétní metabolické dráhy. Metabolický „fingerprinting“ je rychlá globální klasifikace vzorku (bez chromatografické separace) na základě jeho původu či biologické relevance. Zaoobírá se intracelulárními metabolity, narušil od metabolického „footprintingu“, který zkoumá metabolity extracelulární. Cílená metabolomika „targeted metabolomics“ se zaměřuje na analýzu konkrétní skupiny metabolitů, která nás zajímá a je součástí dané metody. Necílená metabolomika „untargeted metabolomics“ využívá analyzátorů s vysokým rozlišením, přičemž potenciální metabolity jsou charakterizovány přesnou hmotou a retencí na koloně. Nejvýznamnější metabolity pak mohou být identifikovány, např. za pomoci fragmentačního spektra. Metabolomika sleduje změny úrovně endogenních metabolitů, plynoucích z nemoci či z odpovědi na léčbu (Goodacre et al., 2004; Dunn et al., 2005).

Jednotlivé metabolity se v biologickém vzorku liší nejen svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, ale i širokým koncentračním rozmezím, pohybujícím se v nejčastěji řádech pmol-mmol (Dunn et al., 2005).

Pro sledování metabolického profilu EBC jsou preferovanými technikami nukleární magnetická rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie (MS) v kombinaci s chromatografickou separací (Sofia et al., 2011).

Carraro et al. (2007) aplikovali NMR analýzu na kondenzát vydechovaného vzduchu pacientů s astmatem a na kontrolní vzorky. Rozdíly ve spektrech byly zjištěny v oblastech 3,2-3,4 ppm naznačující přítomnost oxidovaných sloučenin a 1,7-2,2 ppm vztahující se k acetylovaným sloučeninám. NMR analýza byla rovněž použita pro sledování odlišností mezi EBC pacientů s cystickou fibrózou a zdravých kontrol. Jako nejvíce diskriminující látky oddělující obě skupiny byly určeny ethanol, acetát, propan-

2-ol a aceton (Montuschi et al., 2012). Studium bronchoalveolární plicní tekutiny pacientů s akutním poškozením plic ALI „acute lung injury“ a se syndromem akutní respirační tísně ARDS „acute respiratory distress syndrome“ technikou NMR poukázalo na laktát, taurin, threonin, arginin, asparagovou kyselinu, glutamát a acetát, jako na pravděpodobné biomarkery rozlišující oba typy onemocnění (Rai et al., 2012).

Těkové organické sloučeniny ve vydechaném vzduchu pacientů s CF byly zkoumány plynovou chromatografií v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Rozdíly v porovnání s kontrolou byly zjištěny pro 3,3-dimethylhex-1-en, but-2-en-1-ol, *N*-methyl-2-methylpropylamin, tolualdehyd a další (Robroeks et al., 2010). Necílenou metabolickou analýzou pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s Orbitrap hmotnostním spektrometrem (Orbitrap LC-MS) byly detekovány rozdíly mezi pacienty s těžkým astmatem a kontrolními subjekty. U astmatiků byly nalezeny odlišnosti v oblastech  $m/z$  327.204 s retenčním časem 9,40 minut a  $m/z$  252.182 s retencí 11,05 min, určené jako kyselina retinová ( $M+H^+$ ) resp. deoxyadenosin ( $M+H^+$ ). Pro kontrolní skupinu byla charakteristická oblast  $m/z$  429.286 s retenčním časem 11,18 minut. Zde se pravděpodobně jednalo o erkalcitriol ( $M+H^+$ ), aktivní metabolit vitamínu D<sub>2</sub> (Carraro et al., 2013).

Alternativou k výše uvedeným technikám může být tzv. eNose „electronic nose“ zařízení, umožňující sledovat těkové organické sloučeniny. Tento přístroj pracuje na bázi nanosenzorů, vytváří tzv. otisk „fingerprint“ vzorku plynu, který porovnává s uloženou databází (Di Francesko et al., 2005). Tímto přístupem se podařilo odlišit pacienty s COPD a to s přesností na 96 % ( $P < 0,001$ ) od nekouřících kontrol (přesnost 95 %,  $P < 0,001$ ) a od kouřících kontrolních osob (přesnost 92,5 %,  $P < 0,001$ ), podobně byli odlišeni i pacienti s astmatem (Fens et al., 2009).

# **Praktická část**

## 6 Materiál

### 6.1 Chemikálie

Acetonitril (LC-MS Chromasolv, značka Fluka, dodala Sigma-Aldrich Chemie, Německo), dezinfekce Desam ox (Bochemie, Česká republika), fyziologický roztok 0,9 % NaCl (B. Braun Medical, Německo), hydroxid amonný (LC-MS; >25% vody; značka Fluka, dodala Sigma-Aldrich Chemie, Německo), kit AMYL2 (Roche Diagnostics, Německo), kyselina octová (LC-MS, značka Fluka, dodala Sigma-Aldrich Chemie, Německo), voda LC-MS (Sigma Aldrich Chemie, USA)

### 6.2 Přístrojové vybavení

Chlazená centrifuga (Rotina 410; Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Německo), lyofilizátor (FreeZone; Labconco, USA), hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA, USA), kapalinový chromatograf UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), kondenzátor dechu EcoScreen (Jaeger Toennies, Hoechberg, Německo), modulární analyzátor (Cobas® 8000, Roche Diagnostics, Mannheim, Německo), tandemový hmotnostní spektrometr QTRAP 5500 (AB Sciex, Foster City, CA, USA), pH metr (Cyberscan pH 510; Thermo scientific, Waltham, MA, USA), přístroj NIOX pro měření vydechovaného NO (Niox Mino, Aerocrine AB, Solna, Švédsko), vortex (V-1 plus; Biosan, Riga, Lotyšsko), ultrazvuková lázeň (PS-40A; Jeken, Guangdong, Čína)

### 6.3 Biologický materiál

Vzorky kondenzátu vydechovaného vzduchu byly odebrány ve spolupráci s Dětskou klinikou Fakultní nemocnice Olomouc, oddělení alergologie a klinické imunologie. Pro cílenou a necílenou metabolomickou analýzu byly použity kondenzáty dechu pacientů s cystickou fibrózou, astmatem a dále EBC astmatických pacientů inhalačně léčených glukokortikosteroidy a kontrolních osob. Pacienti byli vybráni na základě klinické historie. V době odběru netrpěli příznaky jiných respiračních obtíží (rýma a kašel), horečkou ani přidruženými záněty.

Před sběrem EBC bylo pacientům s astmatem a kontrolám provedeno vyšetření přístrojem NIOX (Niox Mino, Aerocrine AB, Solna, Švédsko) pro zjištění hodnoty frakce vydechovaného oxidu dusnatého. Základní údaje o osobách, jejichž vzorky byly analyzovány, jsou shrnuty v tab 6.



Tab. 6: Tabulka shrnující údaje pacientů a kontrol, jejichž vzorky EBC byly použity v klinické studii.

<b>Pacienti s cystickou fibrózou</b>				
<i>počet</i>	<i>z toho kuřáků</i>	<i>průměrný věk (rozsah)</i>	<i>průměr FENO</i>	<i>léčba</i>
9	1	14,6 (8-25)	neprováděno	6 osob na antibiotické léčbě
<b>Pacienti s astmatem</b>				
<i>počet</i>	<i>z toho kuřáků</i>	<i>průměrný věk</i>	<i>průměr FENO</i>	<i>léčba</i>
10	-	12,3 (7-17)	58,6 ppb	bez glukokortikosteroidů
<b>Pacienti s astmatem na léčbě</b>				
<i>počet</i>	<i>z toho kuřáků</i>	<i>průměrný věk</i>	<i>průměr FENO</i>	<i>léčba</i>
9	1	12,9 (5-18)	24,6 ppb	aktivní látka: FP
3	-	14,7 (13-18)	32,7 ppb	aktivní látka: BUD
1	-	8	16,0 ppb	aktivní látka: BDP
<b>Kontroly</b>				
<i>počet</i>	<i>z toho kuřáků</i>	<i>průměrný věk</i>	<i>průměr FENO</i>	<i>léčba</i>
10	-	8,8 (5-15)	10,4 ppb	-

### 6.3.1 Odběr a zpracování kondenzátu vydechovaného vzduchu

Před odběrem byli vybraní jedinci požádáni o výplach úst 200 ml pitné vody a poučení o způsobu odběru přístrojem EcoScreen (Jaeger Toennies, Hoechberg, Německo), který trval 20 minut vsedě s nasazeným nosním klipsem. Po ukončení odběru byl ventilový blok spolu s náustkem ponořen do dezinfekce a následně pečlivě omyt destilovanou vodou.

Množství získaného EBC se pohybovalo v rozmezí 60 - 4000  $\mu$ l. Před dalším postupem bylo z každého vzorku odebráno 7  $\mu$ l kondenzátu pro stanovení  $\alpha$ -amylasy (viz níže).

U nízkoobjemových vzorků byl lamelární kondenzátor s ulpěnými kapičkami EBC promyt 1 ml LC-MS vody, čímž se získalo maximální dostupné množství kondenzátu. Následně byl vzorek rozpipetován na dva podíly, zamrazen na -80 °C a při této teplotě uchovávan až do analýzy (přibližně 2 měsíce od prvního odběru).

Před analýzou byly vzorky kondenzátu dechu lyofilizovány, rozpuštěny ve 100  $\mu$ l LC-MS vody a centrifugovány (10 min, 4 °C, 14 000 g). Smícháním objemových alikvotů z uvedených vzorků byl, pro každou metabolomickou analýzu, připraven

vzorek kontroly kvality (QC), který byl měřen opakovaně za každým třetím vzorkem EBC.

### **6.3.2 Stanovení slinné $\alpha$ -amylasy**

Stanovení  $\alpha$ -amylasy bylo provedeno ve spolupráci s laboratoří Klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc na přístroji (Cobas<sup>®</sup> 8000, Roche Diagnostics, Mannheim, Německo).

Použitým kitem byl AMYL2 (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo), jehož princip spočívá v rozštěpení substrátu 4,6-ethyliden-(G<sub>7</sub>)-1,4-nitrofenyl-(G<sub>1</sub>)- $\alpha$ ,D-maltoheptaosidu  $\alpha$ -amylasou (ze vzorku). Vzniklé degradační produkty jsou posléze hydrolyzovány enzymem  $\alpha$ -glukosidasou za uvolnění glukosy a p-nitrofenolu. Absorbance zmíněného p-nitrofenolu, jenž je přímo úměrná aktivitě  $\alpha$ -amylasy, je měřena spektrofotometricky.

Pro stanovení slinné  $\alpha$ -amylasy bylo z jednotlivých vzorků kondenzátu odpipetováno 7  $\mu$ l a vhodně naředěno fyziologickým roztokem. Kontrolními vzorky byly sliny dětí odpovídajícího věku (6, 13, 17 let), které byly zpracovány obdobným způsobem. Dle článku Syslová et al. (2010) musela být hodnota aktivity enzymu v EBC nižší, než 0,1 % aktivity  $\alpha$ -amylasy ze slin. V opačném případě by nebyly vzorky dále zpracovávány.

## **7 Metody**

### **7.1 Cílená metabolická analýza kondenzátu dechu**

Metabolity v kondenzátu dechu byly analyzovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS).

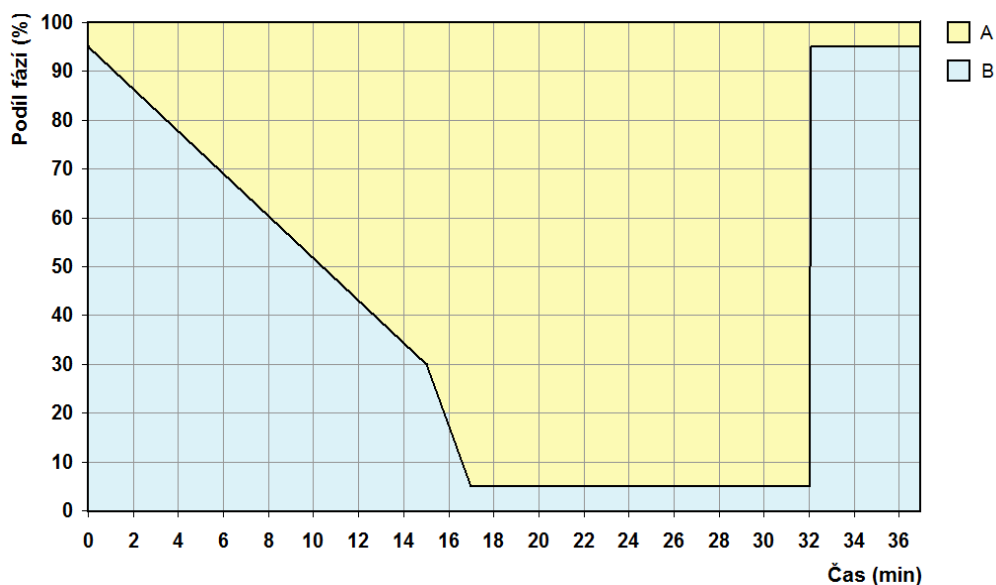
Chromatografická separace byla provedena na přístroji UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) s použitím aminopropylové kolony Luna (Phenomenex, CA, USA) termostatované na teplotu 25 °C (částice stacionární fáze měly velikost 3  $\mu$ m; délka kolony byla 150 mm, průměr 2,1 mm). Nástřik vzorků EBC činil 10  $\mu$ l. Použitá metoda vycházela z článku Bajad et al., 2011.

Pro eluci byl aplikován gradient o průtokové rychlosti mobilní fáze 0,3 ml/min. Mobilní fází A byl octan amonný (20 mmol/l; pH 9.45), jako mobilní fáze B byl použit acetonitril. Průběh eluce z vodné do acetonitrilové fáze je znázorněn na obr. 11. Před další analýzou byla kolona ekvilibrována 5 minut při iniciálních podmínkách.

Pro detekci byl použit tandemový hmotnostní spektrometr QTRAP 5500 (AB Sciex, Foster City, CA, USA) s ionizací elektrosprejem a přepínáním pozitivní

a negativní ionizace v jedné analýze. Detekce probíhala v tzv. MRM módu „multiple-reaction monitoring“ tj. sledováním produktu rozpadu molekulárního iontu. Parametry MS/MS použité v metabolické analýze jsou uvedeny v tab. 7.

Metoda umožňovala analýzu celkem 416 látek (Tab. 8), z toho 187 v negativním a 229 v pozitivním módu.



Obr. 11: Průběh gradientové eluce v chromatografickém systému u cílené metabolické metody. Mobilní fáze A: 20 mmol/l octan amonný (pH 9.45), mob. fáze B: acetonitril. Na počátku analýzy byl podíl zmíněných mobilních fází 95 % B a 5 % A. Do patnácti minut bylo procento mobilní fáze B lineárně sníženo na hodnotu 30 % B. Během dalších dvou minut následoval opětovný pokles na celkové složení mobilní fáze 0,5 % B a 95 % A, které bylo do 32. minuty konstantní. Poté došlo, během 0,1 min, k navrácení podmínek iniciačního stavu (5 % A; 95 % B), který zůstal neměnný až do konce analýzy (37. minuty).

Tab. 7: Parametry MS/MS použité při cílené metabolické analýze.

<i>parametr</i>	<i>hodnota</i>	<i>jednotka</i>
tlak „curtain gas“	30	psi
tlak kolizního plynu	medium	psi
tlak sušícího plynu	40	psi
tlak zmlžujícího plynu	40	psi
teplota zmlžujícího plynu	400	°C
napětí na kapiláře v iontovém zdroji	+/-4500	V
rozišení kvadrupólů	unit	
pause time	3	ms

Tab. 8: Tabulka upřesňující počty metabolitů z jednotlivých skupin látek, stanovitelné cílenou metabolomickou analýzou.

<i>skupina</i>	<i>negativní mód</i>	<i>pozitivní mód</i>
aminokyseliny	19	60
sacharidy	33	5
organické kyseliny	49	3
pyridiny/pyrimidiny	60	35
peptidy	6	29
látky ostatních skupin	20	38
acylované karnitiny	-	59

## 7.2 Necílená metabolomická analýza

Necílená metabolomická analýza dechu byla provedena na kapalinovém chromatografu UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA, USA).

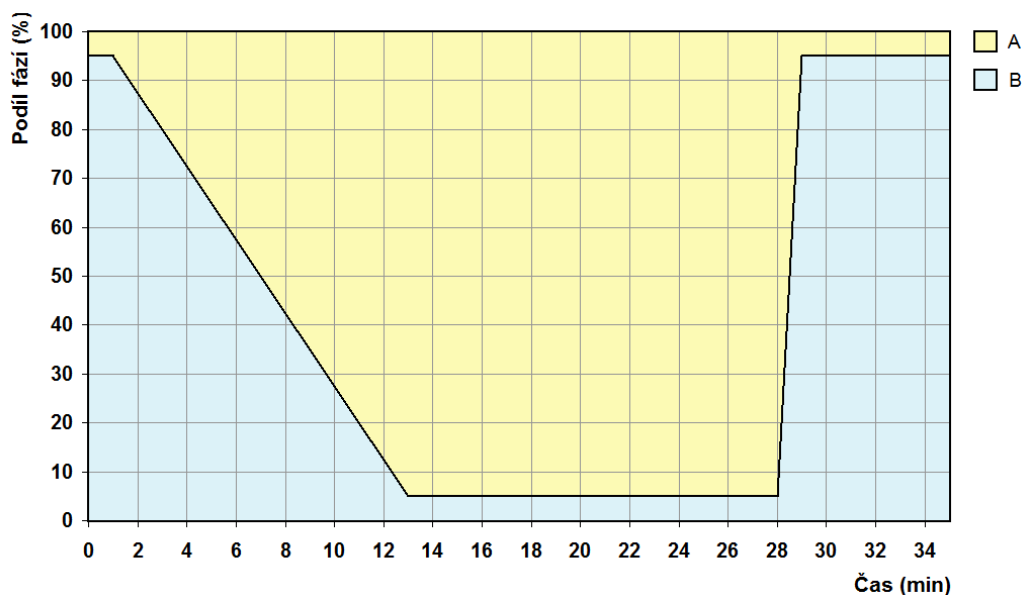
Pro chromatografickou separaci byla použita aminopropylková kolona Luna (3  $\mu\text{m}$  NH<sub>2</sub>, 150  $\times$  2,1 mm) termostatovaná na teplotu 25 °C s konstantním průtokem mobilní fáze 0,3 ml/min. Nástřik vzorku byl 10  $\mu\text{l}$ . Celková doba jedné analýzy trvala 35 minut.

Byla aplikována gradientová eluce z vodné do acetonitrilové fáze (Obr. 12), jako mobilní fáze A byl použit 20 mmol/l octan amonný o pH 9.45, mob. fází B byl acetonitril. Kolona byla mezi analýzami ekvilibrována 5 minut při iniciálních podmínkách.

Pro detekci byl použit hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite. Měření probíhalo v pozitivním módu, skenovací rozsah byl 70-1200  $m/z$  s rozlišením 120 000 FWHM. Nastavení elektrospreje (ESI) je uvedeno v tab. 9.

Tab. 9: Nastavení ESI, které bylo použito u hmotnostního spektrometru Orbitrap.

<i>parametr</i>	<i>hodnota</i>	<i>jednotka</i>
napětí na kapiláře v iontovém zdroji	3	kV
teplota sprejovací kapiláry	300	°C
teplota transférové kapiláry	350	°C
průtok „sheath“ plynu	35	arb
průtok pomocného plynu	10	arb



Obr. 12: Průběh gradientové eluce v chromatografickém systému u necílené metabolické analýzy. Mobilní fáze A: 20 mmol/l octan amonný (pH 9.45), mob. fáze B: acetonitril. Na počátku analýzy bylo složení směsi mobilních fází následující - 95 % B a 5 % A. Po jedné minutě začalo procento mobilní fáze B lineárně klesat až do 13. minuty, odkdy zůstalo konstantní (5 % B, 95 % A). Změna nastala ve 28. minutě, kdy během 60 sekund došlo k navrácení podmínek iniciačního stavu (95 % B a 5 % A) trvajících až do konce analýzy.

### 7.3 Statistická analýza

Naměřená data byla zpracována v softwaru „R“ ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)), verze 2.15.3.

V případě necílené metabolické analýzy byly detekce píků z chromatogramu provedeny pomocí metabolické programové knihovny XCMS (Smith et al., 2006; Tautenhahn et al., 2008; Benton et al., 2010). Pro identifikaci izotopických paternů a aduktů, byla použita knihovna CAMERA „collection of algorithms for metabolite profile annotation“ (Kuhl et al., 2012).

Pro obě analýzy byla, metodou LOESS „locally weighted regression“ (Cleveland & Delvin, 1988), provedena interpolace dat, sloužící k odstranění systematické chyby. Následně byl u vzorků kontrol kvality spočítán variační koeficient (CV). Metabolity mající variaci nad 30 % byly ze statistické analýzy vyloučeny. Vzhledem k povaze naměřených dat byla tato dále matematicky zpracována jako data kompoziční. Relevantní informace o kompozičním datovém souboru je obsažena v podílech mezi složkami. Díky danému přístupu byly srovnány koncentrační rozdíly mezi vzorky (vzhledem k různé intenzitě dýchání a tedy i k množství EBC).

Na zmíněná data byla následně aplikována tzv. clr transformace (centred logratio) a poté byla centrována na nulu. Grafickým výstupem datové matice byla: analýza hlavních komponent, biplot, krabicové grafy, diskriminační analýza, klastrová (shluková) analýza a tzv. „heatmap“.

Principem analýzy hlavních komponent „PCA“ (principal component analysis) je za pomoci transformace zredukovat dimenzi původních dat a to při zachování co největší informace výchozího souboru - lineární kombinací původních proměnných získáme tzv. latentní proměnné (hlavní komponenty), znázorňující variabilitu (proměnlivost) původního souboru. Biplot slouží k zobrazení objektů (v tomto případě pacientů/kontrol) a proměnných (metabolitů) do grafu. Znázornění objektů vychází z metody PCA, zdrojem pro zobrazení metabolitů je singulární rozklad původní datové matice. Diskriminační analýza „DA“ (discriminant analysis) zkoumá souvislost diskriminátorů (nezávisle proměnných) a jedné kvalitativní závisle proměnné. Umožňuje zařadit objekt do jedné z již existujících tříd. Klastrová analýza „CLU“ (cluster analysis) vyšetřuje podrobnosti vícerozměrných objektů, majících větší množství proměnných a klasifikuje je do tříd, čili shluků. Používá se zejména v případech, kde mají objekty tendenci se přirozeně seskupovat. Patří zde např. hierarchické shlukování, které na základě podobnosti postupně spojuje objekty do shluků (Meloun M. & Militký J., 2002).

## 8 Výsledky

Přítomnost slinné  $\alpha$ -amylasy byla pro všechny vzorky uvedené v kapitole 6.3 vyhodnocena jako negativní. Nasbírané kondenzáty dechu proto mohly být dále zpracovány a analyzovány.

### 8.1 Cílená metabolická analýza

Naměřená data byla zpracována v softwaru MultiQuant™ 2.1.1 (AB Sciex, Framingham, MA, USA). Celkem bylo identifikováno 87 metabolitů. Pro následnou statistickou analýzu bylo vybráno 42 metabolitů (Tab. 10, 11). Na obrázku 13 je jako příklad chromatogramu vzorek L3 (pacient 3, na léčbě glukokortikosteroidy).

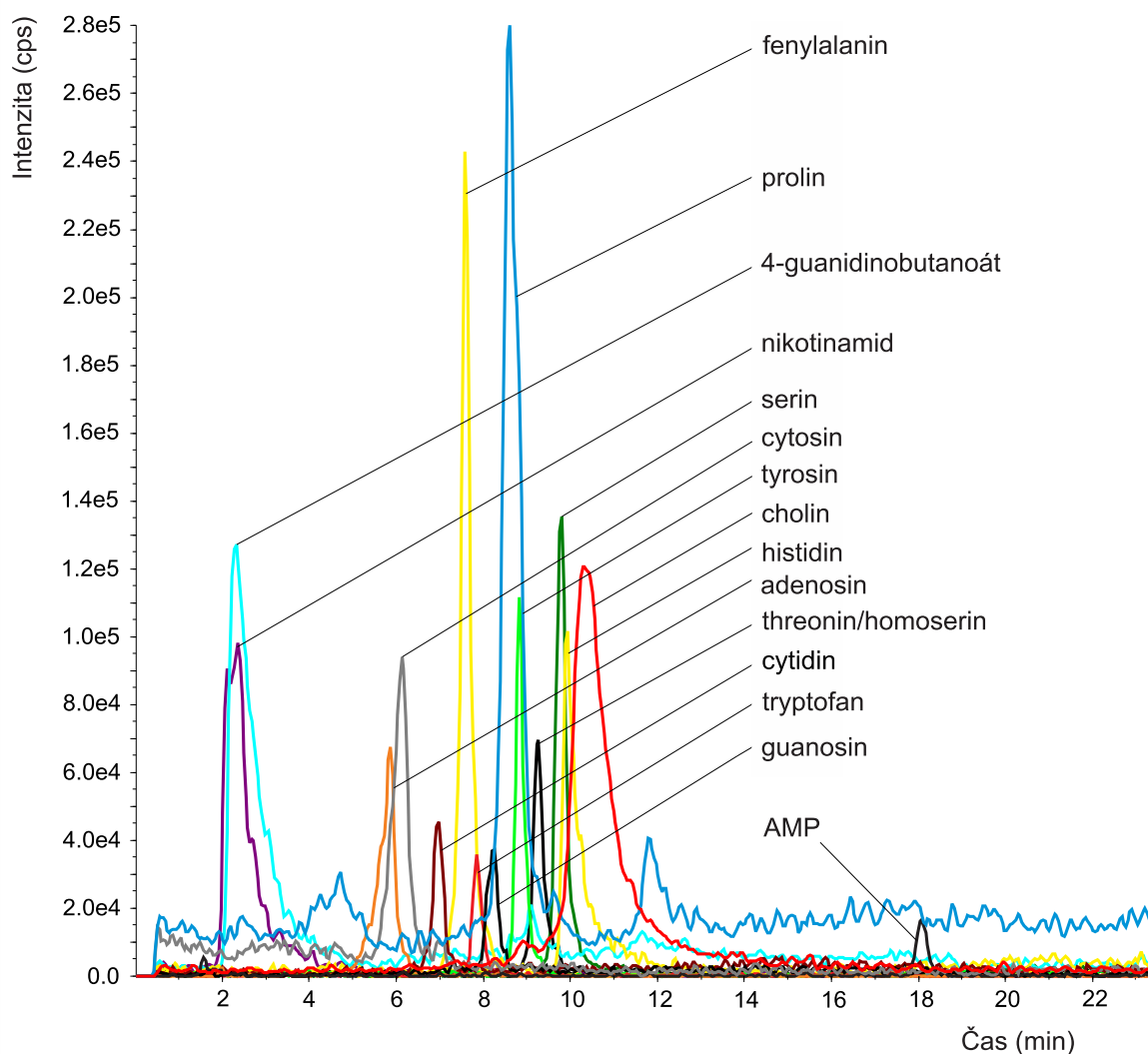
Tab. 10: Přehled metabolitů nalezených ve vzorcích EBC, které byly podrobeny statistické analýze - negativní mód (RT - retenční čas; Q1 - rodičovský ion, Q3 - dceřiný ion; DP- deklasterační potenciál; EP - vstupní potenciál; CE - kolizní energie; CXP - výstupní potenciál kolizní cely).

Negativní mód							
<i>metabolit</i>	<i>RT</i> <i>[min]</i>	<i>Q1</i>	<i>Q3</i>	<i>DP</i> <i>[V]</i>	<i>EP</i> <i>[V]</i>	<i>CE</i> <i>[V]</i>	<i>CXP</i> <i>[V]</i>
uracil	3.4	110.9	42.1	-35	-10	-22	-11
4-hydroxybenzaldehyd	4.9	120.8	92.0	-15	-10	-32	-9
hexosy (Glu, Fru, Gal, Man)	7.1	178.9	88.9	-40	-10	-12	-9
galaktitol	7.3	180.8	100.8	-35	-10	-16	-17
mannitol	7.4	180.9	89.1	-35	-10	-18	-9
levulinát	8.4	115.0	71.1	-40	-10	-14	-9
laktosa/maltosa/melobiosa/ sacharosa	8.8	340.9	161.0	-55	-10	-12	-11
2-hydroxyisobutanoát/2- hydroxybutanoát	9.0	102.9	57.0	-35	-10	-16	-7
taurin	9.1	123.8	79.9	-45	-10	-28	-7
laktát	10.4	88.9	43.0	-30	-10	-16	-7
pantotenát	10.9	217.9	88.0	-75	-10	-20	-7
threonát	11.3	135.0	75.1	-40	-10	-18	-9
glukonát	13.4	194.8	129.0	-40	-10	-18	-11
glycerol-3-fosfát	17.7	170.9	78.9	-35	-10	-34	-9

Tab. 11: Přehled metabolitů nalezených ve vzorcích EBC, které byly podrobeny statistické analýze - pozitivní mód.

<b>Pozitivní mód</b>							
<i>metabolit</i>	<i>RT</i> <i>[min]</i>	<i>Q1</i>	<i>Q3</i>	<i>DP</i> <i>[V]</i>	<i>EP</i> <i>[V]</i>	<i>CE</i> <i>[V]</i>	<i>CXP</i> <i>[V]</i>
2-aminofenol	2.1	109.9	65.1	71	10	29	6
nikotinamid	2.4	122.9	79.9	1	10	27	8
adenosin	5.9	267.9	118.9	41	10	67	10
cytosin	6.2	111.9	94.8	96	10	27	10
adenin	6.5	135.9	118.9	171	10	31	14
γ-glutamylcystein	6.5	251.0	149.0	61	10	29	14
cytidin	7.0	244.0	111.9	31	10	27	10
leucin/isoleucin	7.6	132.0	85.9	46	10	15	10
trigonellin	7.6	138.0	92.1	1	10	29	10
fenylalanin	8.0	165.9	119.9	36	10	19	12
homocystein	8.0	135.9	91.0	136	10	33	10
valin	8.1	117.9	72.1	56	10	17	8
tryptofan	8.2	204.9	145.8	41	10	25	14
5-aminolevulinát	8.3	131.9	89.9	61	10	19	8
<i>N</i> -acetylputrescin	8.4	131.0	71.9	76	10	21	8
guanosin	8.5	284.0	151.9	51	10	27	14
prolin	8.5	115.9	69.9	31	10	21	8
karnitin	8.6	161.9	102.9	56	10	23	10
guanidinoacetát	8.7	117.9	75.9	51	10	17	8
alanin/sarkosin/β-alanin	8.9	89.9	44.1	51	10	23	6
4-guanidinobutanoát	9.0	145.9	86.9	51	10	21	10
tyrosin	9.1	181.9	136.0	46	10	19	12
threonin/homoserin	9.4	119.9	73.9	41	10	15	8
4-aminobutanoát	9.6	104.0	68.9	56	10	21	8
serin	9.8	105.8	60.0	16	10	15	8
cholin	10.0	104.3	60.0	36	10	23	8
histidin	10.0	155.9	110.0	46	10	19	10
adenosinmonofosfát	18.4	348.0	135.9	116	10	27	14





Obr. 13: Chromatogram astmatického pacienta L3 na léčbě glukokortikosteroidy.

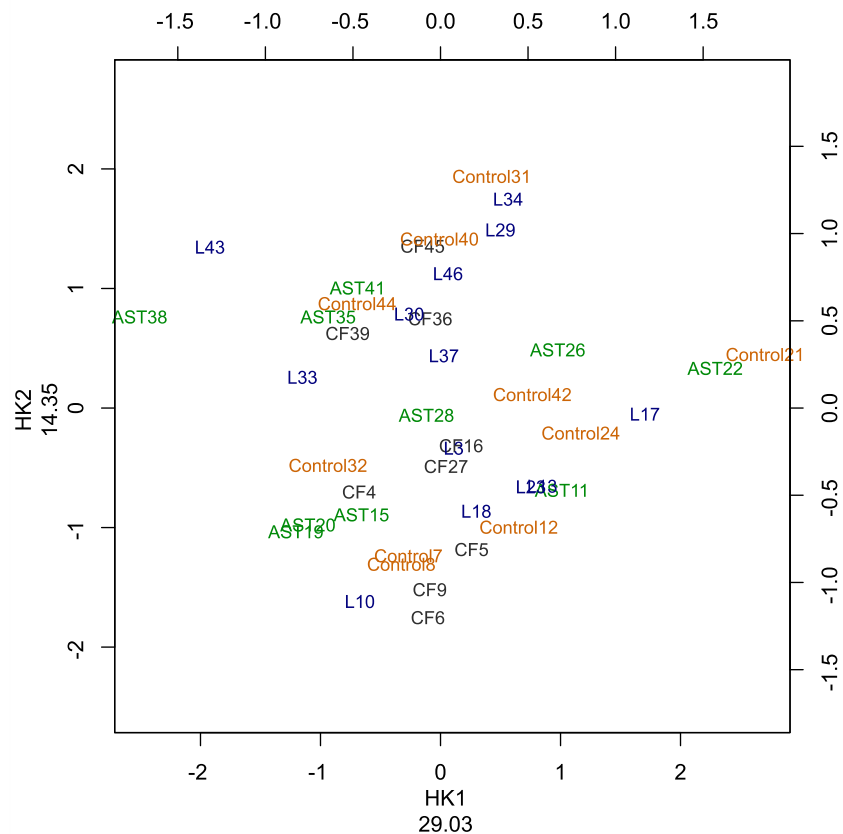
### 8.1.1 Statistická analýza

Na obrázcích 14 až 19 jsou uvedeny grafické výstupy ze statistického vyhodnocení cílené metabolické analýzy kondenzátu dechu.

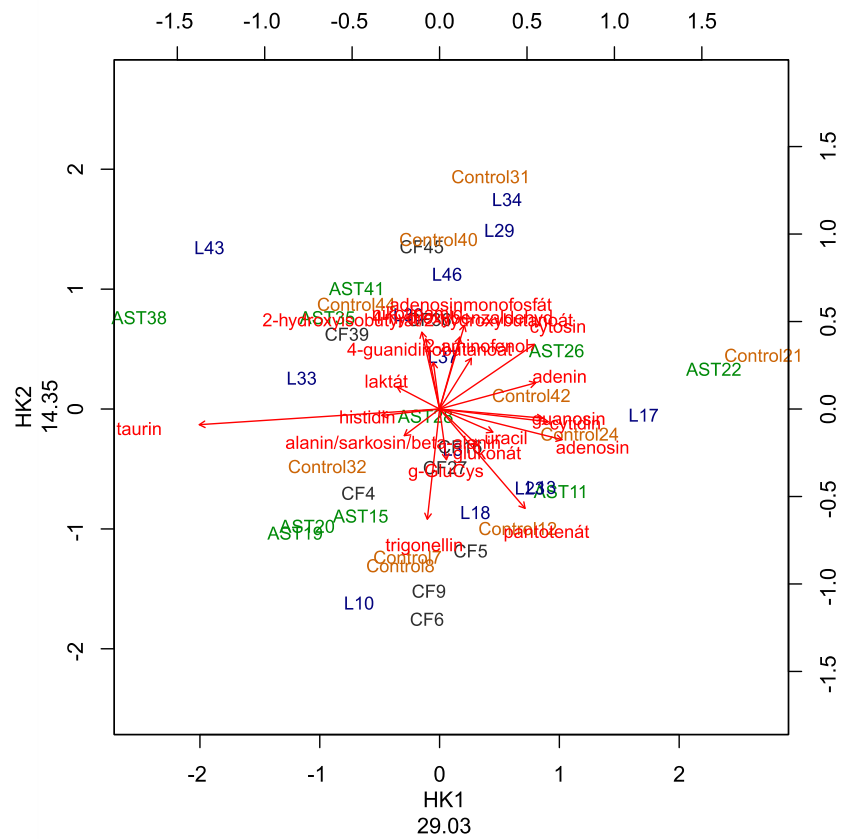
Metoda hlavních komponent nerozlišila jednotlivé skupiny, nebyly zjištěny žádné vybočující body nebo nepředpokládané skupiny. Vysvětlená variabilita původního datového souboru byla 43,38 % (za optimální je považováno 75 % a více).

Z toho důvodu byla na uvedená data aplikována analýza diskriminační, klasifikující vzorky EBC do čtyř skupin, které se tímto přístupem podařilo graficky oddělit.

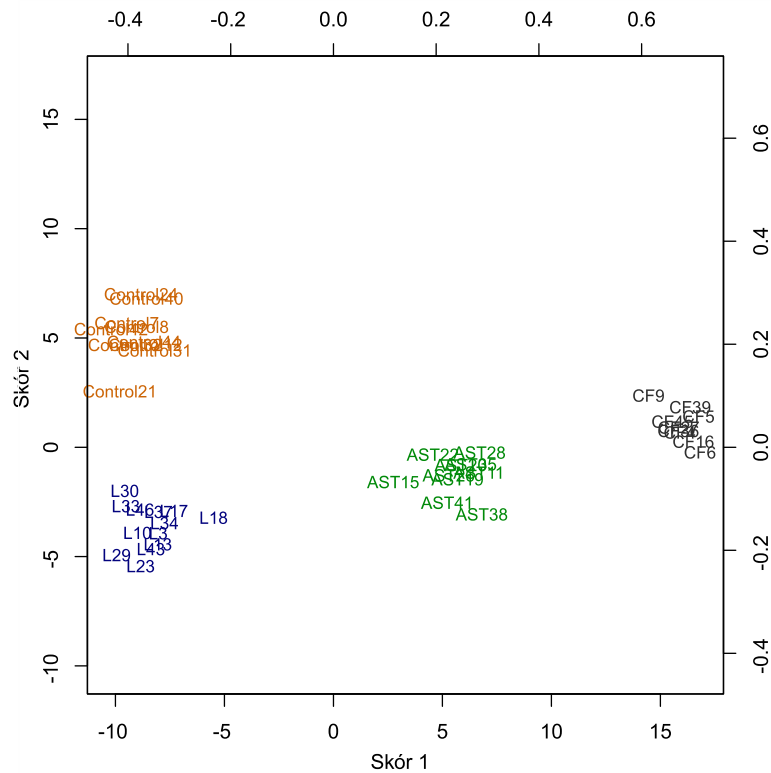
Diskriminační analýzou datového souboru byla, od kontrolních subjektů, nejvíce odlišena skupina pacientů s cystickou fibrózou. Nejméně rozdílné vůči kontrolám byly vzorky astmatiků na léčbě glukokortikosteroidy.



Obr. 14: Metoda hlavních komponent aplikovaná na metabolity EBC nalezené cílenou metabolickou analýzou. Kontrolní vzorky „Control“ jsou vyznačeny hnědě; EBC pacientů s cystickou fibrózou „CF“ černě, kondenzáty pacientů s astmatem „AST“ zeleně a astmatici na léčbě glukokortikosteroidy „L“ jsou označeni modře. Čísla uvedená za zmíněnými zkratkami znázorňují pořadí odběru vzorků.



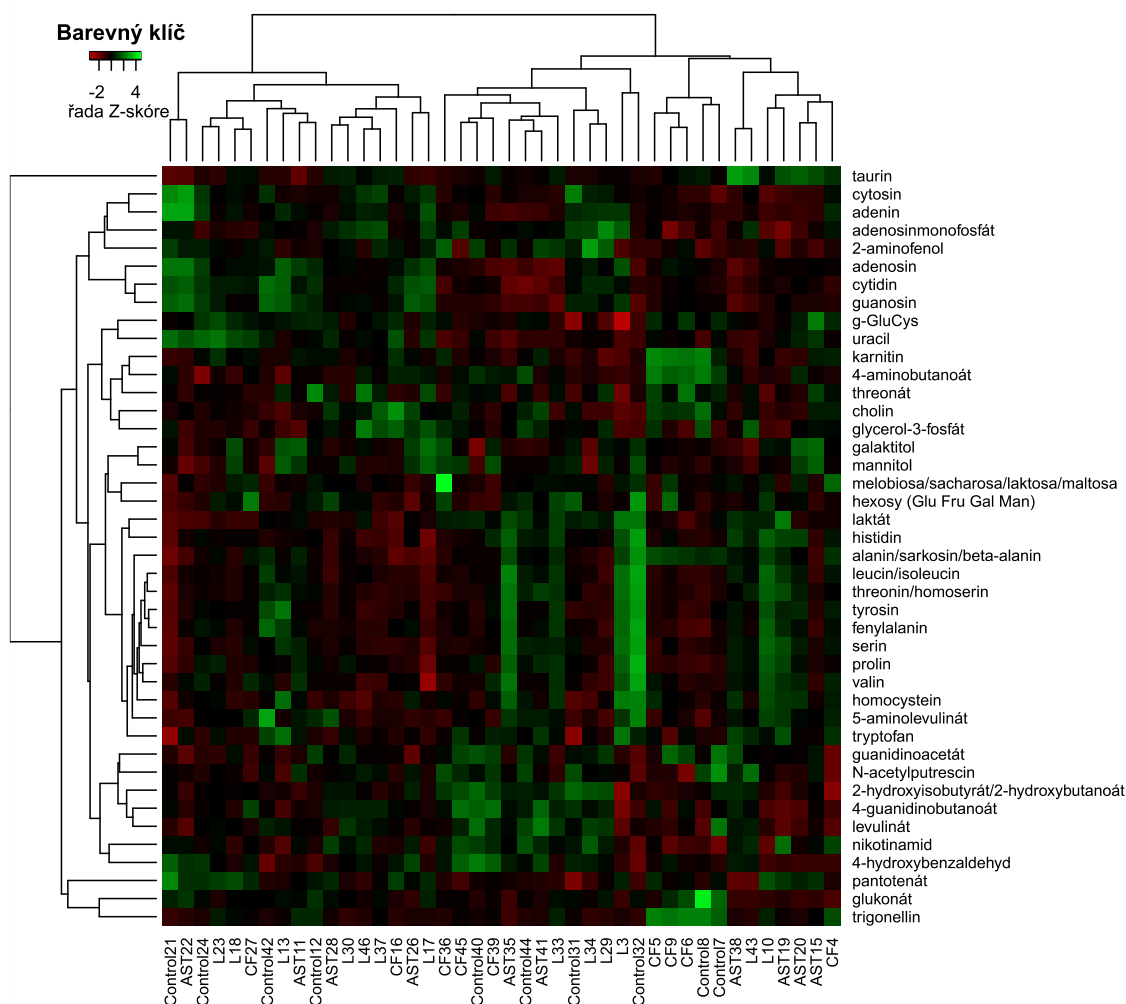
Obr. 15: Biplot (dvojný graf) zobrazující 20 nejvýznamnějších metabolitů. Šipky znázorňují proměnné (metabolity).



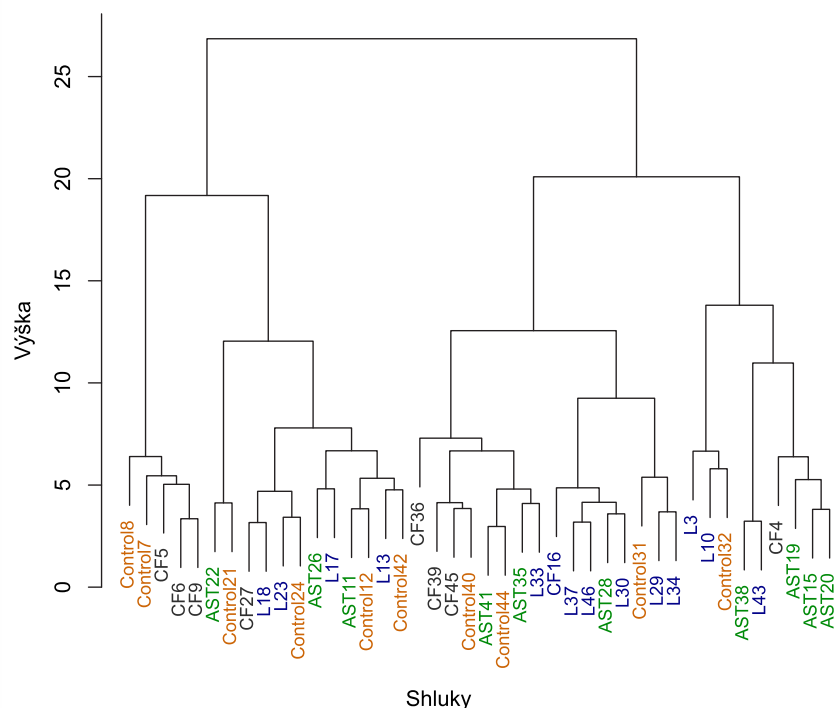
Obr. 16: Diskriminační analýza 4 skupin (pacientů s astmatem a CF, astmatiků na léčbě a kontrol).



Dalšími grafickými výstupy statistické analýzy byly shluková analýza a tzv. „heat mapa“ (Obr. 18 a 19). Ani jednou z uvedených metod se nepodařilo skupiny pacientů/kontrol od sebe oddělit - nebyly pozorovány žádné konzistentní shluky ani na nižších větvích.



Obr. 18: „Heat mapa“ metabolitů nalezených v EBC pacientů a kontrol cílenou metabolickou analýzou. Narozdíl od shlukové analýzy je brán v úvahu i vliv metabolitů.



Obr. 19: Shluková analýza 4 skupin.

## 8.2 Necílená metabolická analýza

Naměřená data byla zpracována v softwaru Xcalibur (Thermo Scientific, Franklin, MA, USA), verze 2.2-SP1. Celkem bylo nalezeno 132 píků. Po provedené variaci bylo ke konečnému statistickému vyhodnocení vybráno 110 píků definovaných přesnou hmotou  $m/z$  a retenčním časem.

Identifikace dvaceti nejvýznamnějších píků, určených z diskriminační analýzy (Tab. 12), byly provedeny pomocí internetových databází METLIN „Metabolite and tandem MS database“ (<http://metlin.scripps.edu>), LIPID MAPS „Metabolites and pathways strategy“ (<http://www.lipidmaps.org>) a HMDB „Human metabolome database“ (<http://www.hmdb.ca>).

Odchylka  $m/z$  vyjádřena pomocí  $\Delta\text{ppm}$  byla pro jednotlivé analýzy spočítána softwarem RawMeat, verze 2.1 (VAST Scientific, Inc. Cambridge, MA, USA). V případě vzorků EBC se tato odchylka pohybovala v rozmezí  $\pm (8 - 10)$  ppm.

Tab. 12: Dvacet nejvýznamnějších *m/z* plynoucích z DA (Obr. 23b), s uvedením příkladů potencionálních metabolitů, charakteristických svým *m/z* a tvarem píku. Měření probíhalo pouze v pozitivním módu.

<i>RT</i> (sec)	<i>m/z</i> zjištěná	<i>m/z</i> teoretická	potencionální metabolit	adukt	$\Delta$ ppm
123.9	271.274486	271.2744	1-deoxytetradekasfinganin (xestoaminol C)	M+ACN+H <sup>+</sup>	0
123.9	271.274486	271.2744	hexadeka-9-enamid (palmitolamid)	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0
124.8	313.298209	313.2969	eikosa-5,8,11,14-tetraenová kyselina (arachidonová kyselina)	M+H <sup>+</sup>	4
124.6	228.243425	-	-	-	-
120.2	291.195657	291.1955	8-hydroxyoktadek-17-en-9,11-diyonová kys.	M+H <sup>+</sup>	0
120.2	291.195657	291.1955	8-hydroxyoktadek-13-en-9,11-diyonová kys.	M+H <sup>+</sup>	0
120.2	291.195657	291.1955	8-hydroxyoktadek-17-en-10,12-diyonová kys.	M+H <sup>+</sup>	0
120.2	291.195657	291.1955	4-oxooktadeka-9,11,13,15-tetraenová kys.	M+H <sup>+</sup>	0
120.2	291.195657	291.1955	8-oxooktadeka-9,11-diyonová kyselina	M+H <sup>+</sup>	0
120.2	291.195657	291.1955	ecklonialakton A	M+H <sup>+</sup>	0
124.1	285.283786	-	-	-	-
124.1	310.285016	-	-	-	-
124.1	256.272923	256.2747	1-methyl-1-[5-(1-methylpyrrolidinium-1- yl)pentyl]pyrrolidinium (pentolinium)	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	6
125.0	286.285397	-	-	-	-
124.0	272.276073	-	-	-	-
466.6	250.180327	250.1802	4-heptyloxyfenol	M+ACN+H <sup>+</sup>	0
466.6	250.180327	250.1802	α-amylcinnamylformát	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0
466.6	250.180327	250.1802	eremofrullanolid	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0
466.6	250.180327	250.1802	frullanolid	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0
466.6	250.180327	250.1802	costunolid	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0
466.6	250.180327	250.1802	alantolakton	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0
466.6	250.180327	250.1802	lofocerin	M+H <sup>+</sup>	0
466.6	250.180327	250.1802	nufaridin	M+H <sup>+</sup>	0
466.6	250.180327	250.1802	N,O-didesmethylvenlafaxin	M+H <sup>+</sup>	0
466.6	250.180327	250.1802	glechomanolid	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0
466.6	250.180327	250.1802	isoalantolakton	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0
466.6	250.180327	250.1802	isovelleral	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0
466.6	250.180327	250.1802	pinguison	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0
466.6	250.180327	250.1802	furanogermenon	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0
466.6	250.180327	250.1802	alprenol	M+H <sup>+</sup>	0
755.3	256.964834	-	-	-	-
750.0	181.028505	181.0278	acesulfam-K	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	4

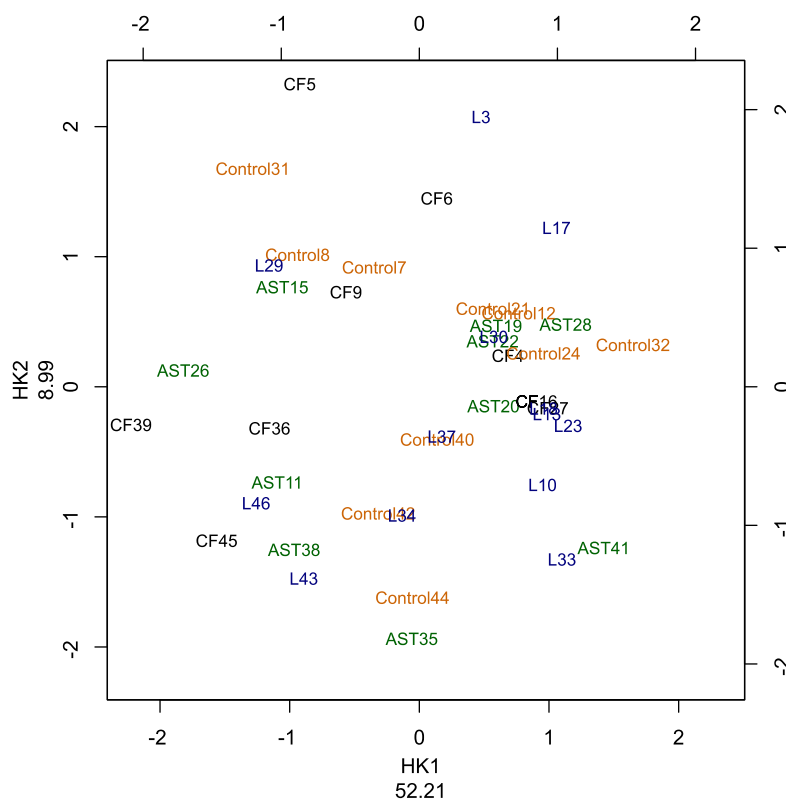
<i>RT</i> (sec)	<i>m/z</i> zjištěná	<i>m/z</i> teoretická	<i>potencionální metabolit</i>	<i>adukt</i>	<i>Δppm</i>
471.5	227.149814	227.1502	isokarbamid	M+ACN+H <sup>+</sup>	1
471.5	227.149814	227.1502	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1
647.2	136.940148	-	-	-	-
754.6	297.991284	-	-	-	-
123.0	372.346474	372.3472	2-oxodokosanová kys.	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1
123.0	372.346474	372.3472	3-oxodokosanová kys.	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1
123.0	372.346474	372.3472	4-oxodokosanová kys.	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1
123.0	372.346474	372.3472	10-oxodokosanová kys.	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1
123.0	372.346474	372.3472	21-oxodokosanová kys.	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1
123.0	372.346474	372.3472	22-oxodokosanová kys.	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1
123.0	372.346474	372.3472	hexadecylmethylglycerol	M+ACN+H <sup>+</sup>	1
123.0	372.346474	372.3472	1-hexadecyl-2-O-methylglycerol	M+ACN+H <sup>+</sup>	1
504.4	302.196208	302.1975	tegaserod	M+H <sup>+</sup>	4
124.1	195.122845	195.1240	2,4-diamino-6-hydroxylaminotoluen	M+ACN+H <sup>+</sup>	6
124.1	195.122845	195.1240	4-(β-acetylaminoethyl)imidazol	M+ACN+H <sup>+</sup>	6
124.1	195.122845	195.1240	N-acetylhistamin	M+ACN+H <sup>+</sup>	6
124.1	195.122845	195.1240	N'-nitrosonornikotin	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	6
124.4	233.078925	233.0808	3-(naftoxy)mléčná kys.	M+H <sup>+</sup>	8
124.4	233.078925	233.0808	altholakton	M+H <sup>+</sup>	8
124.4	233.078925	233.0768	isosorbid 2-mononitrát	M+ACN+H <sup>+</sup>	9
124.4	233.078925	233.0768	isosorbid 5-mononitrát	M+ACN+H <sup>+</sup>	9
124.4	233.078925	233.0768	γ-karboxyglutamová kys.	M+ACN+H <sup>+</sup>	9
124.4	233.078925	233.0768	O-oxaly-L-homoserin	M+ACN+H <sup>+</sup>	9
124.4	233.078925	233.0768	nitrilotriacetát	M+ACN+H <sup>+</sup>	9
123.9	336.290200	336.2897	nonadeka-5,9-dienová kys.	M+ACN+H <sup>+</sup>	1
123.9	336.290200	336.2897	nonadeka-10,13-dienová kys.	M+ACN+H <sup>+</sup>	1
123.9	336.290200	336.2897	nonadek-18-ynová kys.	M+ACN+H <sup>+</sup>	1
123.9	336.290200	336.2897	16-methyloktadeka-5,9-dienová kys.	M+ACN+H <sup>+</sup>	1
123.9	336.290200	336.2897	17-methyloktadeka-5,9-dienová kys.	M+ACN+H <sup>+</sup>	1
123.9	336.290200	336.2897	methyl-9,10-enoktadek-9-enová kys.	M+ACN+H <sup>+</sup>	1
123.9	336.290200	336.2897	17-hydroxy-5-androstan acetát	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1
123.9	336.290200	336.2897	2,17-dimethyldihydrotestosteron	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1
123.9	336.290200	336.2897	pregnanolon	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1
123.9	336.290200	336.2897	pregn-4-en-3,20-diol	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1
123.9	336.290200	336.2897	3-hydroxypregnan-20-on	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1
123.9	336.290200	336.2897	allopregnanolon	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1
123.9	336.290200	336.2897	5-[pentadek-8Z-en-1-yl]benzen-1,3-diol	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1
123.9	336.290200	336.2897	methyllinoleát	M+ACN+H <sup>+</sup>	1
123.9	336.290200	336.2897	methylester kys. arachidonové	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1
123.9	336.290200	336.2897	epimetendiol	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1



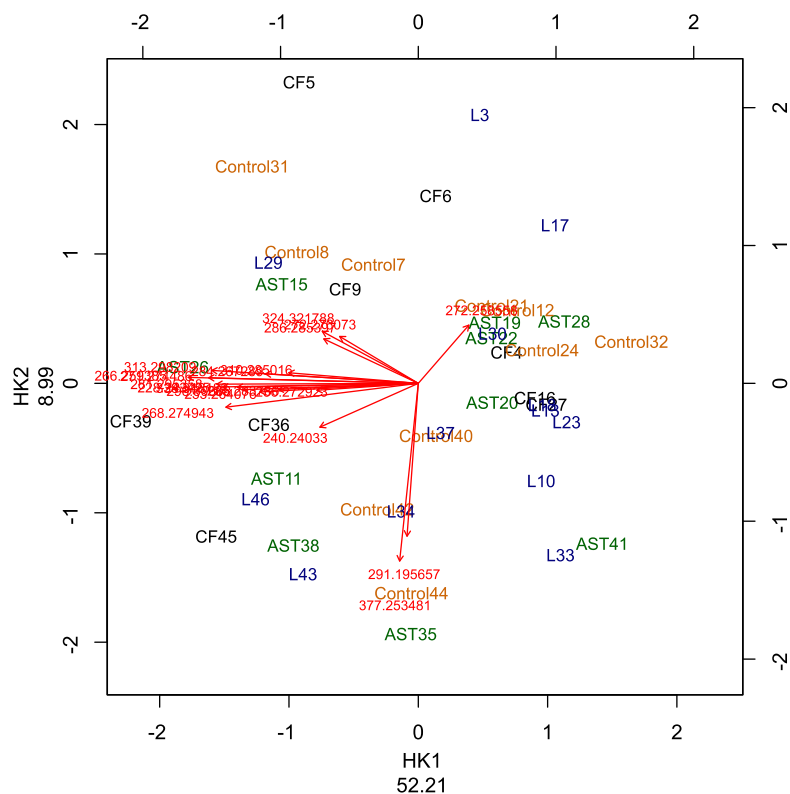
RT (sec)	m/z zjištěná	m/z teoretická	potencionální metabolit	adukt	$\Delta$ ppm
123.9	336.290200	336.2897	2[(1S,3R)-3-hydroxycyklohexyl]-5-(2-methyloktan-2-yl)fenol	M+NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1

### 8.2.1 Statistická analýza

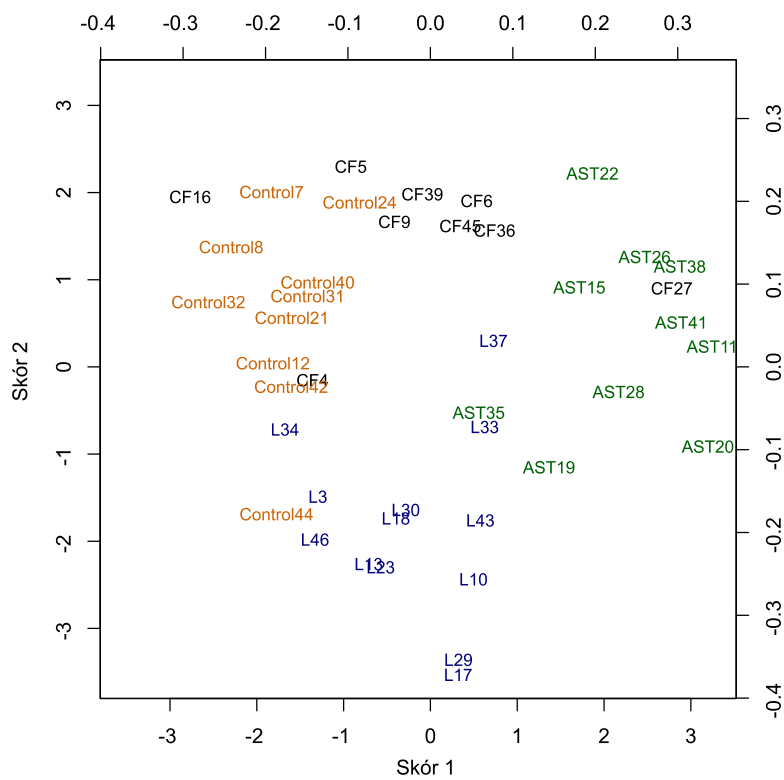
Na obrázcích 20 až 25 jsou uvedeny grafické výstupy ze statistického vyhodnocení necílené metabolické analýzy kondenzátu dechu. PCA analýza, klastrová analýza a heat mapa ani v tomto případě nerozlišily jednotlivé skupiny. Vysvětlená variabilita původního datového souboru pro PCA analýzu činila 61,2 %. Dělení do skupin bylo pozorováno u analýzy diskriminační.



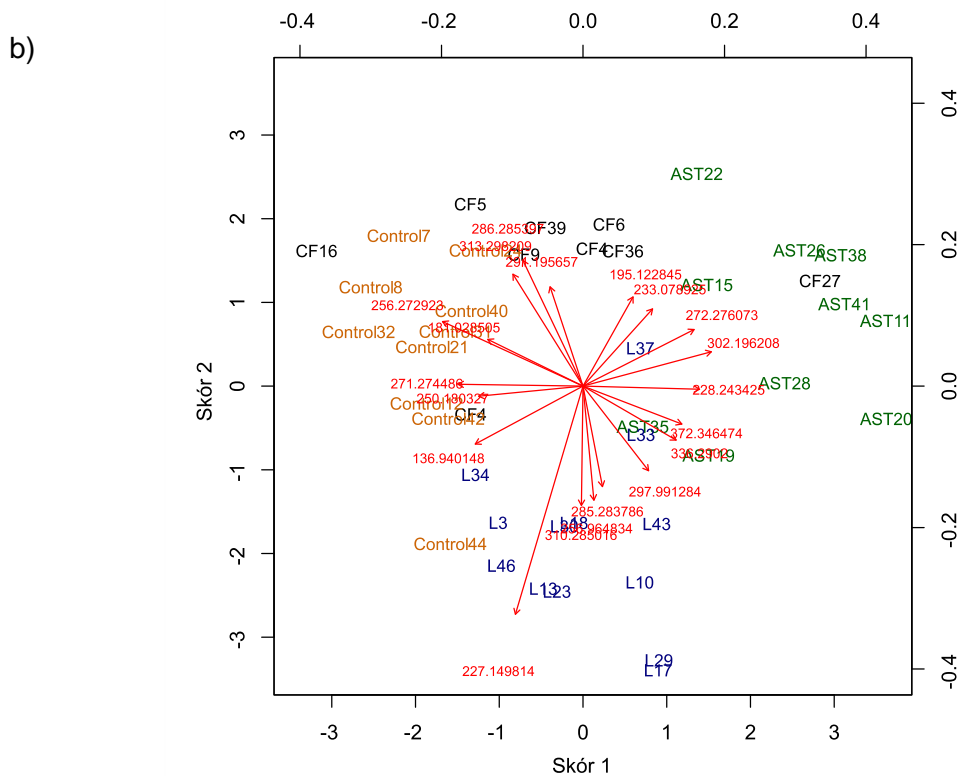
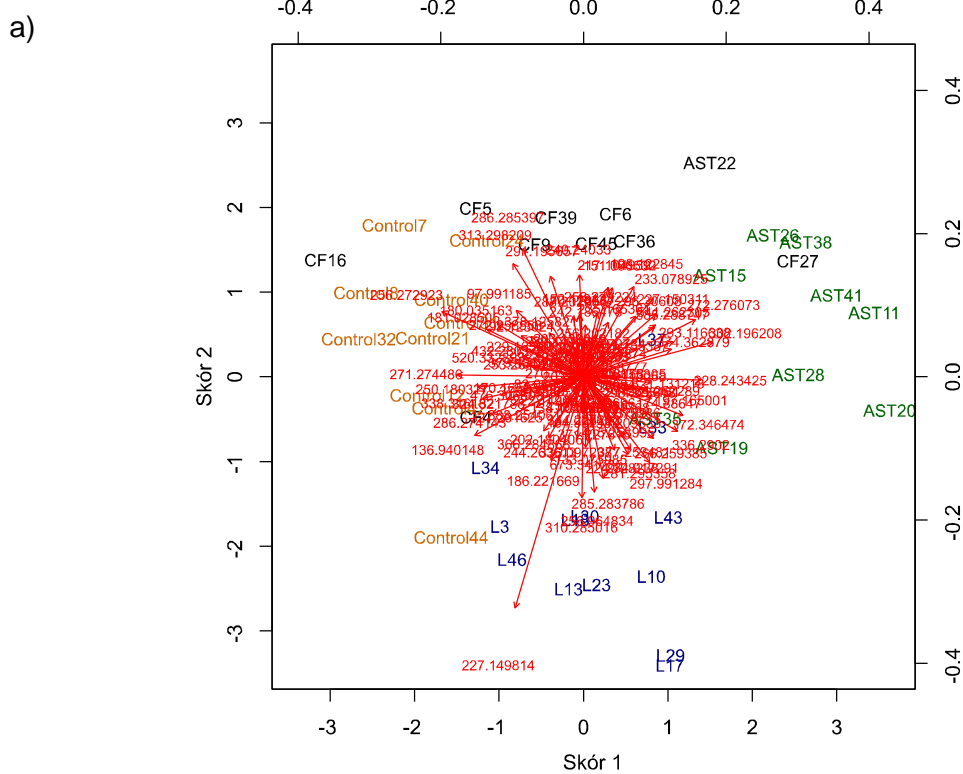
Obr. 20: Metoda hlavních komponent aplikovaná na přesné hmoty nalezené v EBC necílenou metabolickou analýzou. Vzorky kontrolní „Control“ jsou vyznačeny hnědě; pacienti s cystickou fibrózou jsou „CF“ černě, kondenzáty pacientů s astmatem „AST“ zeleně a astmatici na léčbě glukokortikosteroidy „L“ jsou označeni modře. Čísla uvedená za zmíněnými zkratkami opět znázorňují pořadí odběru vzorků.



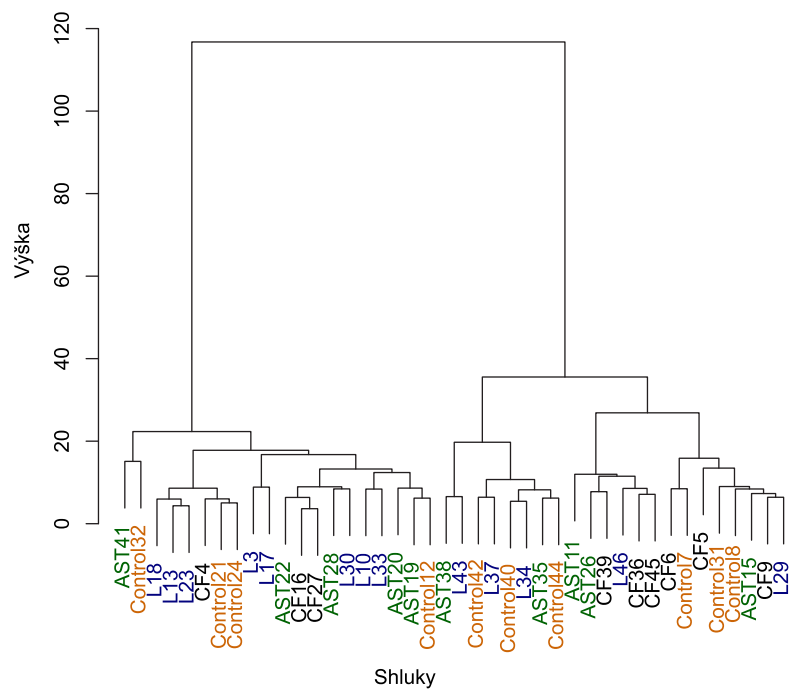
Obr. 21: Biplot zobrazující 20 nejvýznamnějších hmot. Šipky znázorňují proměnné (hmoty).



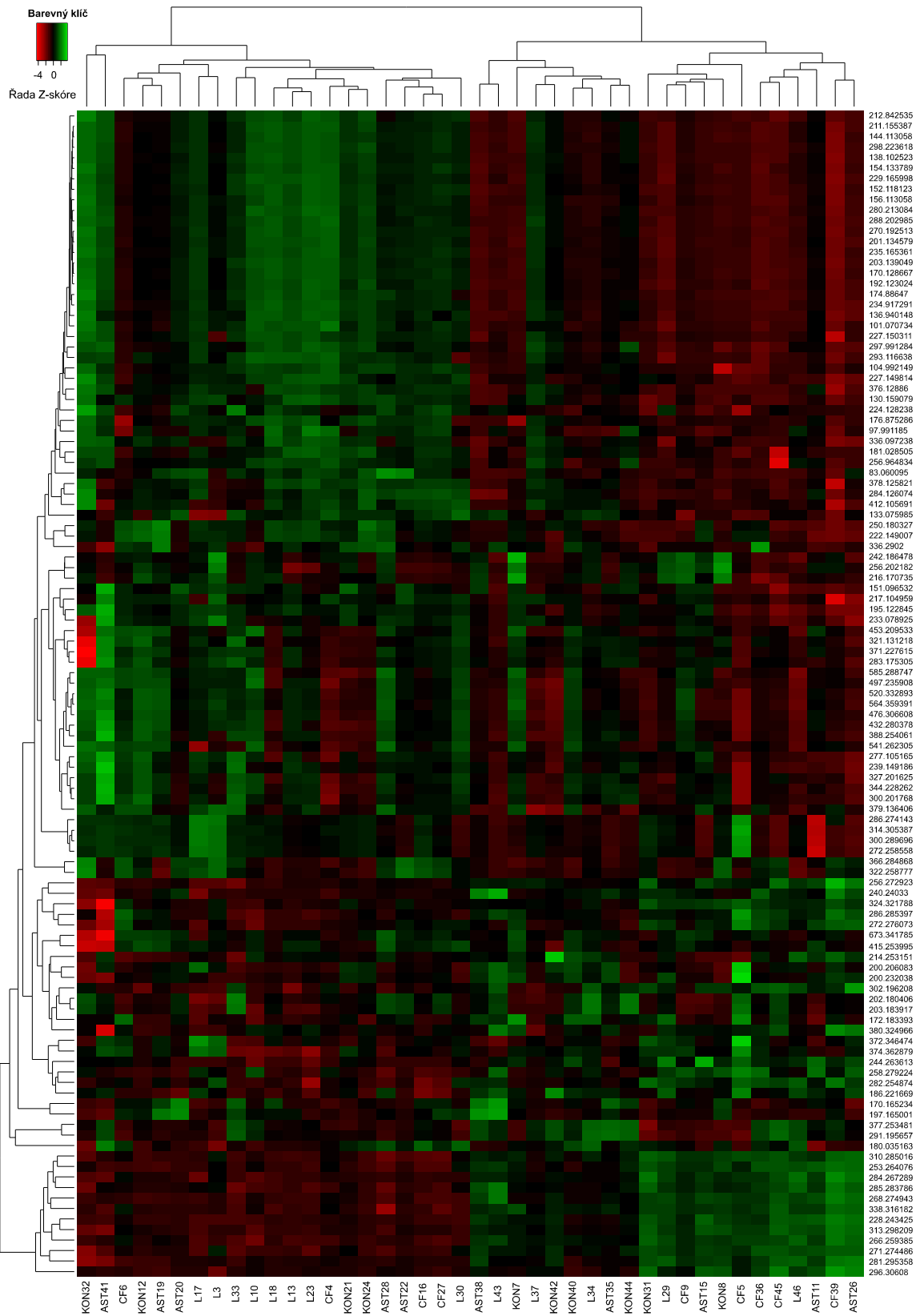
Obr. 22: DA necílené metabolické analýzy kondenzátu dechu.



Obr. 23: Diskriminační analýza necílené metabolické analýzy kondenzátu dechu  
 a) vyznačením všech hmot, b) se znázorněním dvaceti nejvýznamnějších hmot.



Obr. 24: Klastrová analýza EBC vzorků.



Obr. 25: „Heat mapa“ vzorků kondenzátu dechu.

## 9 Diskuze

Cílem předložené diplomové práce bylo porovnat, popř. charakterizovat rozdíly v metabolomických profilech kondenzátů dechu (EBC) získaných od pacientů s CF, astmatem, astmatiků léčených glukokortikosteroidy a od kontrol. Hlavní výhoda analýzy EBC spočívá v neinvazivním, jednoduchém odběru biologického materiálu, jehož součástí jsou i netěkavé mediátory uvolňované z plic a dolních cest dýchacích. Zmiňovaná přednost vynikne především v porovnání s invazivními (bronchoalveolární laváž; bronchiální biopsie) či semi-invazivními (indukce sputa) technikami (Montuschi & Barnes, 2002b).

Celkem bylo přístrojem EcoScreen nasbíráno 42 vzorků kondenzátu vydechaného vzduchu, a to převážně od dětí. Objemové rozdíly mezi vzorky byly srovnány lyofilizací, difference v celkových koncentracích metabolitů, zapříčiněné nejednotností v intenzitě a síle výdechu, byly redukovány statistickou úpravou dat.

Pomocí cílené metabolomické analýzy bylo identifikováno a dále statisticky zpracováno 42 metabolitů, jednalo se především o aminokyseliny, sacharidy, pyrimidiny a puriny. U poslední zmíněné skupiny je nutno podotknout, že extracelulární puriny, včetně ATP a jeho degradačních produktů, patří mezi důležité signální molekuly působící na povrchu dýchacích cest (Esther et al., 2008). V analyzovaných vzorcích kondenzátu dechu byl nalezen adenosinmonofosfát, adenosin a adenin. Narozdíl od studie Huszár et al. (2002), kde byly zjištěny zvýšené koncentrace adenosinu u pacientů s astmatem ( $c_{\text{průměr}} = 15 \text{ nM}$ , rozsah 12-18 nM) ve srovnání s astmatiky na léčbě ( $c_{\text{průměr}} = 10 \text{ nM}$ , rozsah 8-13 nM) a kontrolami ( $c_{\text{průměr}} = 9 \text{ nM}$ , rozsah 7-11), nebyly námi pozorovány žádné výrazné difference v koncentracích tohoto metabolitu mezi kondenzáty uvedených skupin. Nicméně diskriminační analýzou byla, mezi dvacet nejvýznamnějších metabolitů (obr. 17b), zařazena strukturně analogická purinová báze adenin.

Taurin byl, podobně jako adenosin, ve vzorcích EBC nalezen, ale diskriminační analýza jej nezařadila mezi 20 nejvíce diskriminujících metabolitů. Taurin je znám jako látka, která se intracelulárně hromadí v epiteliálních buňkách (včetně buněk cest dýchacích). Jeho funkcí je regulovat osmotickou rovnováhu. Bylo například zjištěno, že extracelulární přítomnost ATP a adenosinu zvyšuje únik taurinu přes buněčný kanál VSOAC „volume-sensitive organic anion channel“ (Musante et al., 1999). NMR analýzou BAL tekutiny pacientů s akutním poškozením plic a se syndromem akutní

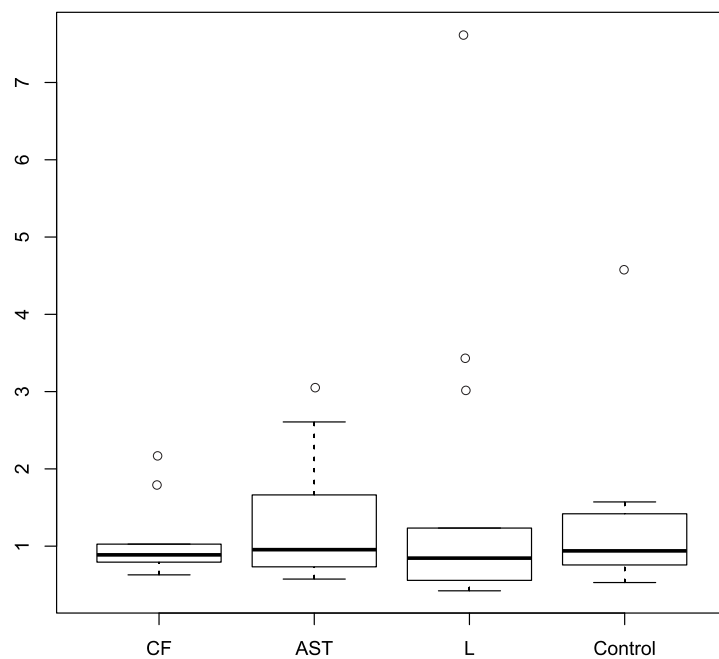
respirační tísňe byl tento metabolit shledán jako jedna z látek diskriminující uvedené skupiny (Rai et al., 2012).

Ve studii Barth & Pitt (1996) byl zkoumán obsah aminokyselin (AMK) ve sputu získaném od pacientů s CF a kontrolních osob. Vyšší množství AMK bylo, v porovnání s kontrolními subjekty ( $C_{\text{průměr}} = 2,52$  mg/ml), nalezeno u pacientů s cystickou fibrózou ( $C_{\text{průměr}} = 5,70$  mg/ml). Autoři se domnívají, že jednou z příčin tohoto nárůstu může být přítomnost exogenních proteas bakterií kolonizujících dýchací cesty CF. Nicméně sledování aminokyselin ve vzorcích kondenzátu dechu (zejména pro dvojici pacient  $\times$  kontrola) zůstává i nadále poměrně neprobádanou oblastí. Jednou z výjimek je tyrosinový derivát, konkrétně 3-nitrotyrosin, o kterém bude zmíněno níže.

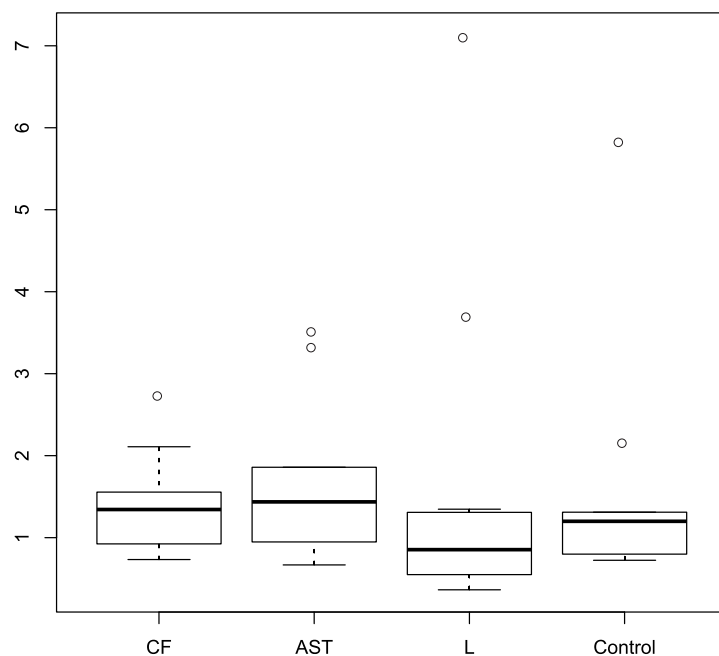
Autoři Conventz et al. (2007) se zabírali hydrofilní separací vybraných AMK nalezených v kondenzátu dechu pomocí LC-MS/MS. Jednalo se konkrétně o 3-nitrotyrosin, tyrosin, hydroxyprolin a prolin. Tyto AMK nebyly z EBC extrahovány, nýbrž byla pro úpravu vzorku, podobně jako v našem případě, zvolena lyofilizace. Za podmínek popsaných v publikaci, byly například zjištěny limity detekce uvedených metabolitů (pro dvojici 3-nitrotyrosin a hydroxyprolin - 5 ng/l; pro tyrosin a prolin - 0,05  $\mu$ g/l), dále byla navržena možnost využití aminokyselin tyrosinu a prolinu jako ředících markerů vzorků EBC. Aminokyseliny mohou také pocházet z proteinů (např. mucinů), které jsou přítomny v dýchacích cestách (Shankar et al., 1994).

Marker nitrosativního stresu 3-nitrotyrosin, nemohl být námi sledován, neboť nebyl zařazen do metody cílené metabolomické analýzy. Nicméně dle dosud publikovaných studií, byla nalezena zvýšená koncentrace uvedeného metabolitu v kondenzátech dechu pacientů s astmatem ( $C_{\text{astma}} = 15,3 \pm 2,0$  ng/ml,  $C_{\text{kontroly}} = 6,3 \pm 0,8$  ng/ml), (Hanazawa et al., 2000). Prekurzorem pro syntézu 3-nitrotyrosinu, je aminokyselina tyrosin, kterou se nám detekovat podařilo - navíc dle DA byla ve vztahu k jednotlivým skupinám zařazena jako jeden z metabolitů diskriminující právě vzorky pacientů s astmatem (Obr. 17b). Vynesením hodnot do krabicových grafů „box plot“, bylo zjištěno, že horní kvartil box plotu astmatických pacientů je sice vyšší, ale medián koncentrací je výrazně zešikmen k nižším hodnotám a nachází se tedy na úrovni ostatních skupin (Obr. 26).

Zajímavá je skutečnost, že diskriminační analýzou byl, pro rozdělení vzorků pacientů s CF a částečně i neléčených astmatiků vůči ostatním skupinám, jako významný metabolit shledán valin. Zvýšený medián koncentrací této aminokyseliny byl nalezen i ve vynesení krabicových grafů viz obr. 27.



Obr. 26: Vynesení box plotů pro aminokyselinu tyrosin. Použité zkratky: pacienti s cystickou fibrózou „CF“, astmatici „AST“, astmatici na léčbě glukokortikosteroidy „L“ a kontrolní osoby „Control“.



Obr. 27: Vynesení box plotů pro aminokyselinu valin.



V případě necílené metabolické analýzy bylo celkem nalezeno 132 píků ze kterých bylo, pro konečné statistické zpracování, vybráno 110 píků definovaných přesnou hmotou a retenčním časem. Identifikace dvaceti nejvýznamnějších analytů opět vycházela z diskriminační analýzy, neboť ani zde PCA metoda jednotlivé skupiny nediferencovala.

Jako potenciální metabolit byla s retenčním časem 124,8 sekund a hmotou  $m/z$  313.298 nalezena kyselina arachidonová ( $M+H^+$ ). Diskriminační analýza ji přiřadila na pomezí vzorků kontrolních a pacientů s CF. V publikaci Guilbault et al. (2009) bylo zmíněno, že pacienti s cystickou fibrózou trpí nerovnováhou ve výskytu polynenasycených mastných kyselin - konkrétně, že vykazují nízké koncentrace kyseliny dokosaheptanové a zvýšené koncentrace kyseliny arachidonové. Kyselina arachidonová je též známým prekurzorem biosyntézy zánětlivých biomarkerů (leukotrienů, prostanoidů a isoprostanů) - viz kap. 2.1. Zmíněné metabolické produkty však námi pozorovány nebyly. V řadě publikací bylo pro sledování uvedených metabolitů, využito specifické enzymové imunoanalýzy (Csoma et al., 2002; Carpagnano et al., 2003).

Další námi nalezený metabolit s hmotou  $m/z$  372.346 a retencí 123,0 sekund, může být vyhodnocen jako potenciální adukt kyseliny oxodokosaheptanové ( $M+NH_4^+$ ). Lipidy v plicích (zejména fosfatidylcholin a fosfatidylglycerol) přispívají ke snížení povrchového napětí na rozhraní vzduch - kapalina (Veldhuizen et al., 1998).

Narozdíl od studie Carraro et al. (2013) nebyly u vzorků kontrolních a u skupiny pacientů s astmatem pozorovány rozdíly ve hmotách  $m/z$  327.204, 252.182 a 429.286  $m/z$ , které byly autory vyhodnoceny jako kys. retinová, deoxyadenosin a erkalcitriol.

## 10 Závěr

V úvodu teoretické části předložené diplomové práce bylo pojednáno o kondenzátu vydechovaného vzduchu (EBC) s důrazem na technologii odběru a faktory ovlivňující jeho složení. V navazujících kapitolách byly shrnuty poznatky o mediátorech detekovatelných v kondenzátu dechu při zánětlivých onemocněních. Dále byla zmíněna základní fakta o astmatu, cystické fibróze a metabolomice dechu.

Praktická část byla zahájena odběrem biologického materiálu přístrojem EcoScreen - konkrétně bylo nasbíráno 42 vzorků EBC získaných od pacientů s astmatem, cystickou fibrózou, astmatiků léčených glukokortikosteroidy a od kontrol. Před metabolomickou analýzou byly vzorky podrobeny testu na přítomnost  $\alpha$ -amylasy pro vyloučení kontaminace slinami. Výsledek byl negativní pro všechny vzorky. Kondenzáty byly zpracovány lyofilizací a poté analyzovány.

Cílenou metabolomickou analýzou bylo identifikováno a dále statisticky zpracováno 42 metabolitů. Nalezeny byly zejména aminokyseliny, sacharidy, pyrimidiny a puriny. Metoda hlavních komponent (PCA) nenalezla žádné vybočující body a nerozdělila vzorky do skupin. Z toho důvodu byla provedena diskriminační analýza, která toto rozdělení umožnila. Nejvíce se od kontrol odlišila skupina pacientů s cystickou fibrózou, pro níž byla nejvíce diskriminující aminokyselina valin.

Necílenou metabolomickou analýzou bylo po provedené variaci ke konečnému statistickému zpracování vybráno 110 píků definovaných přesnou hmotou  $m/z$  a retenčním časem. Ani zde PCA nerozdělila vzorky do skupin. Byla proto provedena diskriminační analýza, kterou bylo rozdělení do skupin dosaženo. Mezi potencionálními metabolity nalezenými na základě přesné hmoty byla i kyselina arachidonová, která je známým prekurzorem zánětlivých biomarkerů, konkrétně prostanoidů, isoprostanů a leukotrienů.

Následující experimenty budou zaměřeny na potvrzení nalezených metabolitů na základě jejich fragmentace a následné identifikaci vzniklých fragmentů. Dále je plánovaná klinická studie, která bude zahrnovat větší počet pacientů a kontrol s důrazem na optimalizaci odběru a přípravy vzorků.

## Použitá literatura

Ayres J. (2001) Česká lékařská společnost J. E. Purkyně - Informace a rady pro lékaře: Astma, pp 17, Grada Publishing, Praha

Bajad S., Shulaev V. (2011) LC-MS-Based metabolomics. *Methods Mol. Biol.* **708**, 213-228

Barnes N. C., Piper P. J., Costello J. F. (1984) Comparative effects of inhaled leukotriene C<sub>4</sub>, leukotriene D<sub>4</sub>, and histamine in normal human subjects. *Thorax* **39**, 500–504

Barnes P. J. (1996) NO or no NO in asthma? *Thorax* **51**, 218-220

Barth A. L., Pitt T. L. (1996) The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* **45**, 110-119

Bateman E. D., Hurd S. S., Barnes P. J., Bousquet J., Drazen J. M., FitzGerald M., Gibson P., Ohta K., O'Byrne P., Pedersen S. E., Pizzichini E., Sullivan S. D., Wenzel S. E., Zar H. J. (2008) Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur. Respir. J.* **31**, 143-178

Beckerman R. C., Taussig L. M. (1979) Hypoelectrolytemia and metabolic alkalosis in infants with cystic fibrosis. *Pediatrics* **63**, 580-583

Belvisi M. G., Stretton C. D., Yacoub M., Barnes P. J. (1992) Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur. J. Pharmacol.* **14**, 221-222

Benton H. P., Want E. J., Ebbels T. M. D. (2010) Correction of mass calibration gaps in liquid chromatography-mass spectrometry metabolomics data, *Bioinformatics* **26**, 2488

Bobadilla J. L., Macek M. Jr, Fine J. P., Farrell P. M. (2002) Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum. Mutat.* **19**, 575-606

Brach M. A., de Vos S., Arnold C., Gruss H. J., Mertelsmann R., Herrmann F. (1992) Leukotriene B4 transcriptionally activates interleukin-6 expression involving NK-chi B and NF-IL6. *Eur. J. Immunol.* **22**, 2705-2711

Brhel P., Feketeová E., Fuchs M., Kašák V., Kočí T., Kopřiva F., Krčmová I., Novotná B., Panzner P., Paráková Z., Petrů V., Pohnutek P., Režný J., Rybníček O., Salajka F., Staniská J., Seberová E., Sedlák V., Sýkora T., Šnorek V., Špičák V., Turzíkova J. (2008) Diagnostika, léčba a prevence průduškového astmatu v České republice: Uvedení globální strategie do praxe, pp 13-24, Česká iniciativa pro astma o. p. s., Jalna, Praha

Buszewski B., Kęsy M., Ligor T., Amann A. (2007) Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed. Chromatogr.* **21**, 553-566

Carpagnano G. E., Barnes P. J., Geddes D. M., Hodson M. E., Kharitonov S. A. (2003b) Increased leukotriene B4 and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 1109-1112

Carpagnano G. E., Kharitonov S. A., Foschino-Barbaro M. P., Resta O., Gramiccioni E., Barnes P. J. (2003a) Increased inflammatory markers in the exhaled breath condensate of cigarette smokers. *Eur. Respir. J.* **21**, 589-593

Carraro S., Giordano G., Reniero F., Carpi D., Stocchero M., Sterk P. J., Baraldi E. (2013) Asthma severity in childhood and metabolomic profiling of breath condensate. *Allergy* **68**, 110-117

Carraro S., Rezzi S., Reniero F., Héberger K., Giordano G., Zanconato S., Guillou C., Baraldi E. (2007) Metabolomics applied to exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 986-990

Cleveland W. S., Devlin S. J. (1988) Locally weighted regression: an approach to regression analysis by local fitting. *J Am Stat Assoc*, **83**, 596-610

Collins F. S. (1992) Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* **256**, 774-779

Conventz A., Musiol A., Brodowsky C., Müller-Lux A., Dewes P., Kraus T., Schettgen T. (2007) Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine, tyrosine, hydroxyproline and proline in exhaled breath condensate by hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **860**, 78-85

Corradi M., Folesani G., Andreoli R., Manini P., Bodini A., Piacentini G., Carraro S., Zanconato S., Baraldi E. (2003b) Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 395-399

Corradi M., Montuschi P., Donnelly L. E., Pesci A., Kharitonov S. A., Barnes P. J. (2001) Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 854-858

Corradi M., Pesci A., Casana R., Alinovi R., Goldoni M., Vettori M. V., Cuomo A. (2003c) Nitrate in exhaled breath condensate of patients with different airway diseases. *Nitric Oxide* **8**, 26-30

Corradi M., Rubinstein I., Andreoli R., Manini P., Caglieri A., Poli D., Alinovi R., Mutti A. (2003a) Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 1380-1386

Czebe K., Barta I., Antus B., Valyon M., Horváth I., Kullmann T. (2008) Influence of condensing equipment and temperature on exhaled breath condensate pH, total protein and leukotriene concentrations. *Respir. Med.* **102**, 720-725

Čáp P., Brezina M. (2009) Neinvazivní vyšetřování zánětu u astmatu, pp 23-75, Mladá fronta a. s., Praha

Dahlén S. E., Björk J., Hedqvist P., Arfors K. E., Hammarström S., Lindgren J. A., Samuelsson B. (1981) Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 3887-3891

Dennis E. A. (1987) Regulation of eicosanoid production: role of phospholipases and inhibitors. *Nat. Biotechnol.* **5**, 1294-1300

De Groote M. A., Fang F. C. (1995) NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. *Clin. Infect. Dis.* **Suppl 2**, S162-S165

Di Francesco F., Fuoco R., Trivella M. G., Ceccarini A. (2005) Breath analysis: trends in techniques and clinical applications. *Microchem J.* **79**, 405-410

Drazen J. M., Austen K. F., Lewis R. A., Clark D. A., Goto G., Marfat A., Corey E. J. (1980) Comparative airway and vascular activities of leukotrienes C-1 and D in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 4354-4358

Drazen J. M., Israel E., O'Byrne P. M. (1999) Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N. Engl. J. Med.* **340**, 197-206

Dunn W. B., Ellis D. I. (2005) Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trac-Trends Anal. Chem.* **24**, 285-294

Dworski R. (2000) Oxidant stress in asthma. *Thorax* **Suppl 2**, S51-S5

Effros R. M., Biller J., Foss B., Hoagland K., Dunning M. B., Castillo D., Bosbous M., Sun F., Shaker R. (2003) A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 1500–1505

Effros R. M., Dunning III M. B., Biller J., Shaker R. (2004) The promise and perils of exhaled breath condensates. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **287**, 1073-1080

Esther C. R. Jr, Alexis N. E., Clas M. L., Lazarowski E. R., Donaldson S. H., Ribeiro C. M., Moore C. G., Davis S. D., Boucher R. C. (2008) Extracellular purines are biomarkers of neutrophilic airway inflammation. *Eur. Respir. J.* **31**, 949-956

Fauler J., Frölich J. C. (1997) Cigarette smoking stimulates cysteinyl leukotriene production in man. *Eur. J. Clin. Invest.* **27**, 43-47

Fens N., Zwinderman A. H., van der Schee M. P., de Nijs S. B., Dijkers E., Roldaan A. C., Cheung D., Bel E. H., Sterk P. J. (2009) Exhaled breath profiling enables discrimination of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **180**, 1076-1082

Förstermann U., Closs E. I., Pollock J. S., Nakane M., Schwarz P., Gath I., Kleinert H. (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* **23**, 1121-31

Gaber F., Acevedo F., Delin I., Sundblad B. M., Palmberg L., Larsson K., Kumlin M., Dahlén S. E. (2006) Saliva is one likely source of leukotriene B4 in exhaled breath condensate. *Eur. Respir. J.* **28** 1229-1235

Ghosh S., Erzurum S. C. (2011) Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta* **1810**, 1008-1016

Gibson R. L., Burns J. L., Ramsey B. W. (2003) Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 918-951

Goldoni M., Caglieri A., Andreoli R., Poli D., Manini P., Vettori M. V., Corradi M., Mutti A. (2005) Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. *BMC Pulm Med.* **5**, 10

Goodacre R., Vaidyanathan S., Dunn W. B., Harrigan G. G., Kell D. B. (2004) Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* **22**, 245-252

Grebe T. A., Seltzer W. K., DeMarchi J., Silva D. K., Doane W. W., Gozal D., Richter S. F., Bowman C. M., Norman R. A., Rhodes S. N., Hernried L. S., Murphy S., Harwood I. R., Accurso F. J., Jains K. D. (1994) Genetic analysis of Hispanic individuals with cystic fibrosis. *Am. J. Hum. Genet.* **54**, 443-446

Guilbault C., Wojewodka G., Saeed Z., Hajduch M., Matouk E., De Sanctis J. B., Radzioch D. (2009) Cystic fibrosis fatty acid imbalance is linked to ceramide deficiency and corrected by fenretinide. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **41**, 100-106

Hamid Q., Springall D. R., Riveros-Moreno V., Chanez P., Howarth P., Redington A., Bousquet J., Godard P., Holgate S., Polak J. M. (1993) Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* **342**, 1510-1513

Hanazawa T., Kharitonov S. A., Barnes P. J. (2000) Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate of patients with asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**, 1273-1276

Horváth I., Hunt J., Barnes P. J., Alving K., Antczak A., Baraldi E., Becher G., van Beurden W. J., Corradi M., Dekhuijzen R., Dweik R. A., Dwyer T., Effros R., Erzurum S., Gaston B., Gessner C., Greening A., Ho L. P., Hohlfeld J., Jöbsis Q., Laskowski D., Loukides S., Marlin D., Montuschi P., Olin A. C., Redington A. E., Reinhold P., van Rensen E. L., Rubinstein I., Silkoff P., Toren K., Vass G., Vogelberg C., Wirtz H. (2005) Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur. Respir. J.* **26**, 523–548

Hunt J. (2002) Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**, 28-34

Huszár E., Vass G., Vizi E., Csoma Z., Barát E., Molnár Világos G., Herjavec I., Horváth I. (2002) Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma. *Eur. Respir. J.* **20**, 1393-1398

Charles I. G., Palmer R. M., Hickery M. S., Bayliss M. T., Chubb A. P., Hall V. S., Moss D. W., Moncada S. (1993) Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 11419-11423

Jakubec P. (2006) Cystická fibróza, pp 5-23, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc

Janssen L. J. (2000) Isoprostanes: generation, pharmacology, and roles in free-radical-mediated effects in the lung. *Pulm Pharmacol Ther* **13**, 149-155

Kaminsky D. A., Mitchell J., Carroll N., James A., Soutanakis R., Janssen Y. (1999) Nitrotyrosine formation in the airways and lung parenchyma of patients with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 747-754

Kašák V. (2005) Asthma bronchiale - průvodce ošetřujícího lékaře, pp 10-110, Jessenius Maxdorf s.r.o., Praha



Kelner P., Tesař V., Bartůňková J. (1997), Cytokiny ve vnitřním lékařství, pp 19-45, Grada Publishing, Praha

Kharitonov S. A., Barnes P. J. (2001) Exhaled markers of pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 1693-1722

Kharitonov S. A., Yates D., Robbins R. A., Logan-Sinclair R., Shinebourne E. A., Barnes P. J. (1994) Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* **343**, 133-135

Knowles R. G., Palacios M., Palmer R. M., Moncada S. (1989) Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 5159-5162

Kochańska B., Smoleński R. T., Knap N. (2000) Determination of adenine nucleotides and their metabolites in human saliva. *Acta Biochim. Pol.* **47**, 877-879

Koppenol W. H., Moreno J. J., Pryor W. A., Ischiropoulos H., Beckman J. S. (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 834-842

Kopřiva F. (2003) Chronický eozinofilní zánět a astma bronchiale, pp 15-185, Jessenius Maxdorf s.r.o., Praha

Kuhl C., Tautenhahn R., Boettcher C., Larson T. R., Neumann S. (2012) CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Anal. Chem.* **84**, 283-289

Kullmann T., Barta I., Antus B., Valyon M., Horváth I. (2008) Environmental temperature and relative humidity influence exhaled breath condensate pH. *Eur. Respir. J.* **31**, 474-475

Latzin P., Griese M. (2002) Exhaled hydrogen peroxide, nitrite and nitric oxide in healthy children: decrease of hydrogen peroxide by atmospheric nitric oxide. *Eur. J. Med. Res.* **7**, 353-358

Lázár Z., Huszár E., Kullmann T., Barta I., Antus B., Bikov A., Kollai M., Horváth I. (2008) Adenosine triphosphate in exhaled breath condensate of healthy subjects and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflamm. Res.* **57**, 367-73

Lärstad M., Söderling A. S., Caidahl K., Olin A. C. (2005) Selective quantification of free 3-nitrotyrosine in exhaled breath condensate in asthma using gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Nitric Oxide* **13**, 134-144

Lemanske R. F. Jr, Busse W. W. (2003) 6. Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, S502-S519

Lewis R. A., Austen K. F., Soberman R. J. (1990) Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N. Engl. J. Med.* **323**, 645-655

Lucidi V., Ciabattini G., Bella S., Barnes P. J., Montuschi P. (2008) Exhaled 8-isoprostane and prostaglandin E(2) in patients with stable and unstable cystic fibrosis. *Radic. Biol. Med.* **45**, 913-919

Lynch K. R., O'Neill G. P., Liu Q., Im D. S., Sawyer N., Metters K. M., Coulombe N., Abramovitz M., Figueroa D. J., Zeng Z., Connolly B. M., Bai C., Austin C. P., Chateauneuf A., Stocco R., Greig G. M., Kargman S., Hooks S. B., Hosfield E., Williams D. L. Jr, Ford-Hutchinson A. W., Caskey C. T., Evans J. F. (1999) Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* **399**, 789-793

Meloun M., Militký J. (2002) Kompendium statistického zpracování dat - metody a řešené úlohy včetně CD, pp 213-350, Academia, Praha

Miadonna A., Tedeschi A., Brasca C., Folco G., Sala A., Murphy R. C. (1990) Mediator release after endobronchial antigen challenge in patients with respiratory allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **85**, 906-913

Montuschi P. (2005a) Analysis of exhaled breath condensate: methodological issues. In *New perspectives in monitoring lung inflammation: Analysis of exhaled breath condensate*, pp 11-27, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA

Montuschi P. (2005b) Isoeostanes, prostanoids, and leukotrienes in exhaled breath condensate. In *New perspectives in monitoring lung inflammation: Analysis of exhaled breath condensate*, pp 53-64, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA

Montuschi P., Barnes P. J. (2002b) Analysis of exhaled breath condensate for monitoring airway inflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 232-237

Montuschi P., Barnes P. J. (2002a) Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **109**, 615-620

Montuschi P., Corradi M., Ciabattoni G., Nightingale J., Kharitonov S. A., Barnes P. J. (1999) Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 216-220

Montuschi P., Kharitonov S. A., Ciabattoni G., Barnes P. J. (2003) Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax* **58**, 585-588

Montuschi P., Martello S., Felli M., Mondino C., Barnes P. J., Chiarotti M. (2005c) Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotriene B4 in asthmatic children. *Respir. Res.* **6**, 119

Montuschi P., Paris D., Melck D., Lucidi V., Ciabattoni G., Raia V., Calabrese C., Bush A., Barnes P. J., Motta A. (2012) NMR spectroscopy metabolomic profiling of exhaled breath condensate in patients with stable and unstable cystic fibrosis. *Thorax* **67**, 222-228

Morrow J. D., Hill K. E., Burk R. F., Nammour T. M., Badr K. F., Roberts II L. J. (1990) A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 9383-9387

Musante L., Zegarra-Moran O., Montaldo P. G., Ponzoni M., Galiotta L. J. (1999) Autocrine regulation of volume-sensitive anion channels in airway epithelial cells by adenosine. *J. Biol. Chem.* **274**, 11701-11707

Musiek E. S., Yin H., Milne G. L., Morrow J. D. (2005) Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway. *Lipids* **40**, 987-994

Mutlu G. M., Garey K. W., Robbins R. A., Danziger L. H., Rubinstein I. (2001) Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 731-737

Narumiya S., Sugimoto Y., Ushikubi F. (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* **79**, 1193-1226

Nelson B. V., Sears S., Woods J., Ling C. Y., Hunt J., Clapper L. M., Gaston B. (1997) Expired nitric oxide as a marker for childhood asthma *J. Pediatr.* **130**, 423-427

Nicosia S., Capra V., Rovati G. E. (2001) Leukotrienes as mediators of asthma. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **14**, 3-19

Noverr M. C., Erb-Downward J. R., Huffnagle G. B. (2003) Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 517-533

Palmlblad J., Malmsten C. L., Uden A. M., Radmark O., Engstedt L., Samuelsson B. (1981) Leukotriene B<sub>4</sub> is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. *Blood* **58**, 658-661

Pavord I. D., Tattersfield A. E. (1995) Bronchoprotective role for endogenous prostaglandin E<sub>2</sub>. *Lancet* **345**, 436-438

Pohunek P., Svobodová T. (2007) Průduškové astma v dětském věku - průvodce ošetřujícího lékaře, pp 10-79, Jessenius Maxdorf s.r.o., Praha

Pynaert G., Grooten J., van Deventer S. J., Peppelenbosch M. P. (1999) Cysteinyl leukotrienes mediate histamine hypersensitivity ex vivo by increasing histamine receptor numbers. *Mol. Med.* **5**, 685-692

Rai R. K., Azim A., Sinha N., Sahoo J. N., Singh C., Ahmed A., Saigal S., Baronia A. K., Gupta D., Gurjar M., Poddar B., Singh E. K. (2012) Metabolic profiling in human lung injuries by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy of bronchoalveolar lavage fluid (BALF). *Metabolomics*, 1-10

Rees D. D., Palmer R. M., Moncada S. (1989) Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 3375-3378

Riordan J. R., Rommens J. M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N., Chou J. L., (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**, 1066-1073

Roberts II L. J., Morrow J. D. (2000) Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 505-513

Roberts II L. J., Morrow J. D. (2002) Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 808-820

Robroeks C. M., van Berkel J. J., Dallinga J. W., Jöbsis Q., Zimmermann L. J., Hendriks H. J., Wouters M. F., van der Grinten C. P., van de Kant K. D., van Schooten F. J., Dompeling E. (2010) Metabolomics of volatile organic compounds in cystic fibrosis patients and controls. *Pediatr. Res.* **68**, 75-80

Rouzer C. A., Matsumoto T., Samuelsson B. (1986) Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 857-861

Sampson S. E., Sampson A. P., Costello J. F. (1997) Effect of inhaled prostaglandin D2 in normal and atopic subjects, and of pretreatment with leukotriene D4. *Thorax* **52**, 513-518

Samuelsson B. (1983) Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220**, 568-575

Shahid S. K., Kharitonov S. A., Wilson N. M., Bush A., Barnes P. J. (2002) Increased interleukin-4 and decreased interferon-gamma in exhaled breath condensate of children with asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **195**, 1290-1293

Shankar V., Gilmore M. S., Elkins R. C., Sachdev G. P. (1994) A novel human airway mucin cDNA encodes a protein with unique tandem-repeat organization. *Biochem. J.* **300**, 295-298

Shaw R. J., Fitzharris P., Cromwell O., Wardlaw A. J., Kay A. B. (1985) Allergen induced release of sulphidopeptide leukotrienes (SRS-A) and LTB<sub>4</sub> in allergic rhinitis. *Allergy* **40**, 1-6

Smith C. A., Want E. J., O'Maille G., Abagyan R., Siuzdak G. (2006) XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching and identification, *Anal. Chem.* **78**, 779-787

Smith W. L. (1992) Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Eur. J. Immunol.* **263**, F181-F191

Sofia M., Maniscalco M., de Laurentiis G., Paris D., Melck D., Motta A., (2011) Exploring Airway Diseases by NMR-Based Metabonomics: A Review of Application to Exhaled Breath Condensate. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011**, 403260

Syslová K., Kačer P., Kuzma M., Pankráčová A., Fenclová Z., Vlčková S., Lebedová J., Pelclová D. (2010) LC-ESI-MS/MS method for oxidative stress multimarker screening in the exhaled breath condensate of asbestosis/silicosis patients. *J Breath Res* **4**, 017104

Tate S., MacGregor G., Davis M., Innes J. A., Greening A. P. (2002) Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate. *Thorax* **57**, 926-929

Tautenhahn R., Boettcher Ch., Neumann S. (2008) Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS BMC, *Bioinformatics*, **9**, 504

Tsui L. C. (1995) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, S47-S53

Van Der Pouw Kraan T. C., Boeije L. C., Smeenk R. J., Wijdenes J., Aarden L. A. (1995) Prostaglandin-E<sub>2</sub> is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* **181**, 775-779

Van Der Vliet A., Hoen P. A., Wong P. S., Bast A., Cross C. E. (1998) Formation of S-nitrosothiols via direct nucleophilic nitrosation of thiols by peroxyxynitrite with elimination of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **273**, 30255-30262

Van Der Vliet A., Nguyen M. N., Shigenaga M. K., Eiserich J. P., Marelich G. P., Cross C. E. (2000) Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **279**, L537-L546

Vass G., Huszár E., Barát E., Valyon M., Kiss D., Péntzes I., Augusztinovicz M., Horváth I. (2002) Comparison of nasal and oral inhalation during exhaled breath condensate collection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **167**, 850–855

Vávrová V., Bartošová J, Brázová J., Čumlivská E., Dřevínek P., Fila L., Fišerová H., Hladíková M., Hroboňová V., Chladová H., Koloušková S., Krebsová A., Lischke R., Macek M., Macek M. jr., Nevolová P., Nožička J., Nyč O., Pelikán L., Pohnutek P., Pozler O., Rejtar P., Skalická V., Smolíková L., Suková M., Svobodová T., Šedivá A., Škovrániková J., Šumník Z., Tomášková H., Valentová P., Vaníček H., Zapletal A., Zemková D. (2006) Cystická fibróza, pp 17-409, Grada Publishing a.s., Praha

Veldhuizen R., Nag K., Orgeig S., Possmayer F. (1998) The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim. Biophys. Acta* **1408**, 90-108

Wenzel S. E. (2006) Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* **368**, 804–813

Yamaoka K. A., Kolb J. P. (1993) Leukotriene B4 induces interleukin 5 generation from human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2392-2398

Zielenski J. (2000) Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* **67**, 117-133

Zielenski J., Rozmahel R., Bozon D., Kerem B., Grzelczak Z., Riordan J. R., Rommens J., Tsui L. C. (1991) Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* **10**, 214-228

#### Internetové zdroje

Respiratory research: Rtube. [online]. 2009 [cit. 2013-02-19]. Dostupné z: <http://www.rtube.com/>

## Seznam použitých zkratk

AA	kyselina arachidonová
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
ALI	akutní poškození plic (acute lung injury)
AMK	aminokyseliny
AMP	adenosinmonofosfát
ARB	arbitrážní jednotka
ARDS	syndrom akutní respirační tísně (acute respiratory distress syndrome)
AST	astma
ATP	adenosintrifosfát
BAL	bronchoalveolární laváž
BDP	beklomethasondipropionát
BHR	bronchiální hyperreaktivita
BUD	budesonid
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAMERA	metabolomická programová knihovna „collection of algorithms for metabolite profile annotation“
CE	kolizní energie (collision energy)
CF	cystická fibróza (cystic fibrosis)
CFTR	regulátor transmembránové vodivosti iontů (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
CIC	ciclesonid
clr	centred logratio
CLU	klastrová analýza (cluster analysis)
Control	kontrolní osoby
COPD	chronická obstrukční plicní nemoc (chronic obstructive pulmonary disease)
CV	variační koeficient
CXP	výstupní potenciál kolizní cely (collision cell exit potential)
cys-LT	cysteinylové leukotrieny
CysLT	receptor pro cysteinylové leukotrieny
DA	diskriminační analýza (discriminant analysis)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DP	deklasterační potenciál (declustering potential)



EBC	kondenzát vydechaného vzduchu (exhaled breath condensate)
ECP	eozinofilní kationický protein
EDN	eozinofilní neurotoxin
ENaC	sodíkový kanál (epithelial sodium channel)
eNose	electronic nose
EP	vstupní potenciál (entrance potential)
EPO	eozinofilní peroxidasa
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionisation)
FcεRI	vysokoafinitní receptor pro imunoglobulin E
FENO	frakce vydechaného oxidu dusnatého (fractional exhaled nitric oxide)
FEV <sub>1</sub>	usilovně vydechnutý objem za 1 s
FP	flutikasonpropionát
Fru	fruktosa
FWHM	full width at half maximum
Gal	galaktosa
GC	plynová chromatografie
GINA	Globální iniciativa pro astma (Global initiative for asthma)
Glu	glukosa
GluCys	glutamylcystein
HLA	human leukocyte anitgen
HMDB	internetová metabolomická databáze „Human metabolome database“
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
IgE	imunoglobulin E
IL	interleukin
L	pacienti s astmatem na léčbě glukokortikosteroidy
LIPID MAPS	internetová metabolomická databáze „Metabolites and parthways strategy“
LT	leukotrien
LC	kapalinová chromatografie
LOESS	statistický přístup „locally weighted regression“
MS	hmotnostní spektrometrie
MSD	membrane spanning domain
MBP	hlavní bazický protein

NH	náležitá hodnota
NMR	nukleární magnetická rezonance
NBD	doména vázající nukleotidy (nucleotide binding domain)
NOS	synthasa oxidu dusnatého
Man	manosa
METLIN	internetová metabolomická databáze „Metabolite and tandem MS database“
MRM	multiple-reaction monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie
ONH	osobní nejlepší hodnota
ONOO <sup>-</sup>	peroxynitrit
ORCC	chloridový kanál (outwardly rectified chloride channel)
PAF	faktor aktivující destičky
PEF	vrcholový výdechový průtok
PCA	analýza hlavních komponent (principal component analysis)
PCL	periciliární tekutina (periciliary liquid layer)
PG	prostaglandin
PKA	proteinkinasa A
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)
Q1	rodičovský ion
Q3	dceřiný ion
QC	kontrola kvality
R	regulační doména CFTR proteinu
RNS	reaktivní dusíkaté radikály
ROS	reaktivní kyslíkaté radikály
RSV	respiračně syncytiální virus
RT	retenční čas (retention time)
SEM	střední chyba průměru
TH lymfocyt	pomocný lymfocyt (helper lymphocyte)
TNF	faktor nádorové nekrózy (tumor necrosis factor)
TM	transmembránová doména (transmembrane domain) CFTR proteinu
Tx	tromboxan
VSOAC	buněčný kanál „volume-sensitive organic anion channel“
XCMS	metabolomická programová knihovna
5-HPETE	5S-hydroperoxy-6,8- <i>trans</i> -11,14- <i>cis</i> -eikosatetraenová kyselina
8-epi-PGF <sub>2α</sub>	8-isoprostan