

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 6. Zdravotnictví

OBTÍŽNĚ LÉČITELNÉ ASTMA

Tereza Kačerová

Praha 2016

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 6. Zdravotnictví

OBTÍŽNĚ LÉČITELNÉ ASTMA

Autor: Tereza Kačerová

Škola: Gymnázium, Praha 7, Nad Štolou 1

Vedoucí práce: Ing. Marek Kuzma, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Marka Kuzmy, Ph.D. a veškerou použitou literaturu jsem uvedla v seznamu literatury. Postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

V dne podpis:

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat Ing. Marku Kuzmovi, Ph.D. za věnovaný čas při vypracovávání této práce a trpělivost při zodpovídání všech mých dotazů. Bez jeho pomoci by tato práce nikdy nemohla vzniknout.

Dále bych chtěla poděkovat Prof. MUDr. Daniele Pelclové, CSc. (1. LF Univerzity Karlovy), Doc. MUDr. Petru Čápovi, Ph.D. (Nemocnice Na Homolce) a Doc. MUDr. Vratislavu Sedlákov, Ph.D. (FN Hradec Králové) za možnost zúčastnit se studie PHAETON, a tím získat přístup ke klinickým vzorkům, které jsem využívala v předkládané práci.

Také bych chtěla poděkovat svému třídnímu, Mgr. Josefu Markovi, za jeho rady, které mi vždy ochotně poskytl.

Rovněž bych chtěla poděkovat svým rodičům, kteří byli ochotni vždy poradit s problémy, s kterými jsem se během vypracování této práce potýkala, a v neposlední řadě i za psychickou podporu ve chvílích, kdy mi přišlo, že se k cíli nedostanu.

Můj dík patří i všem dalším, kteří byli ochotní odpovídat na mé otázky a poskytnout mi svůj drahocenný čas.

Anotace

Předkládaná práce se zabývá problematikou obtížně léčitelného astmatu (OLA). V rámci práce byla vytvořena metodika na bázi molekulární diagnostiky z matrice, kondenzátu vydechaného vzduchu (KVV), umožňující nejen diagnostiku OLA, ale zároveň podle ní lze oddělit ostatní fenotypy astmatu. Stávající molekulární diagnostika založená na biomarkerech známých jako cysteinylované leukotrieny byla rozšířena o antiastmaticky působící lipoxiny, jejichž receptory mohou znamenat zajímavý cíl pro potenciální nová farmaka s antiastmatickým účinkem. Vyvinutá metodika byla použita v klinické studii, čímž byla potvrzena možnost její aplikovatelnosti i s ohledem na fenotypizaci astmatu.

Zároveň byla provedena studie zabývající se stanovení serotoninu v KVV s cílem posoudit pozitivní ovlivnění OLA antidepresivy ze skupiny SSRI (selective serotoninine re-uptake inhibitors). V KVV byly zjištěny vysoké hladiny serotoninu, což je v kontradikci k původnímu předpokladu. Současně se tak nabízí hypotéza, že OLA patrně funguje na odlišných molekulárních principech, které jsou patrně důvodem terapeutické neúčinnosti běžně používaných léčiv.

Klíčová slova

Bronchiální astma, obtížně léčitelné astma, molekulární diagnostika, hmotnostní spektrometrie, lipoxiny, leukotrieny, serotonin

Abstract

This work deals with the issue of difficult to treat asthma (DTA). As a part of this work, a methodology was created, which was based on molecular diagnostics of a matrix - exhaled breath condensate (EBC). This methodology does not only allow the diagnostics of DTA, but it can also be used for the separation of other asthma phenotypes. Existing molecular diagnostics which is based on biomarkers called cysteinyl leukotrienes has been extended by lipoxines which function as anti-asthmatics. The lipoxin receptors may represent an interesting potential target for new drugs with anti-asthmatic effect. The developed methodology was applied in a clinical trial, which confirmed the possibility of its applicability also for the phenotypisation of asthma.

A study focused on determining serotonin in the EBC was also conducted. The aim of this study was to assess the positive effects of the SSRI (selective serotonin re-uptake inhibitors) antidepressants on DTA. High levels of serotonin were detected in EBC, which is in contradiction to the initial assumption. Simultaneously, a hypothesis is provided that DTA probably works on different molecular principles. This would probably be the reason, why commonly used drugs for the DTA therapy are inefficient.

Key words

Bronchial asthma, difficult to treat asthma, molecular diagnostics, mass spectrometry, lipoxines, leukotrienes, serotonin

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ODBORNÝCH ZKRATEK	3
1. ÚVOD.....	4
2. LITERÁRNÍ ČÁST.....	5
2.1 BRONCHIÁLNÍ ASTMA.....	5
2.1.1 <i>Obtížně léčitelné astma (OLA)</i>	5
2.2 DÝCHÁNÍ.....	6
2.3 CHRONICKÉ ASTMA	7
2.4 FÁZE ASTMATU	7
2.5 DIAGNOSTIKA.....	8
2.6 FOSFOLIPIDOVÁ DVOUVRSTVA – ZDROJ AUTAKOIDŮ A JEJICH VÝZNAM V DIAGNOSTICE	10
2.6.1 <i>Lipidy</i>	10
2.6.2 <i>Fosfolipidy</i>	10
2.7 LÉČBA ASTMATU	11
2.7.1 <i>Léky pro prevenci akutního záchvatu astmatu</i>	12
2.7.2 <i>Léky užívané při chronickém astmatu</i>	13
2.8 DIAGNOSTIKA PLICNÍCH ONEMOCNĚNÍ.....	15
2.8.1 <i>Neinvasivní metody</i>	15
2.8.2 <i>Invasivní metody</i>	18
2.8.3 <i>Personalizované diagnostické metody</i>	18
2.9 BIOMARKERY ASTMATU	23
2.9.1 <i>Metabolity kyseliny arachidonové</i>	23
2.9.2 <i>Serotonin</i>	24
2.9.3 <i>Některé další biomarkery astmatu</i>	29
2.10 PRACOVNÍ HYPOTÉZA.....	29
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1 MATRICE	31
3.2 CHEMIKÁLIE.....	31
3.3 PŘÍSTROJE	32
3.3.1 <i>LC-MS/MS</i>	32
3.3.2 <i>Ostatní přístroje</i>	33
3.3.3 <i>Chromatografické kolony</i>	33
3.3.4 <i>Software</i>	33
3.4 ODBĚR BIOLOGICKÝCH VZORKŮ.....	34
3.4.1 <i>Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu</i>	34
3.5 EXTRAKCE BIOMARKERŮ Z BIOLOGICKÝCH MATRIC	34
3.5.2 <i>Zpracování vzorků KVV pro metabolický fingerprinting</i>	34
3.6 LC-MS/MS ANALÝZA.....	34
3.6.1 <i>Metabolické profilování</i>	34
3.6.2 <i>LC Metabolický fingerprinting</i>	35
3.7 STATISTICKÁ ANALÝZA.....	37
3.8 KLINICKÁ STUDIE	37
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	38

4.1	METABOLICKÝ „FINGERPRINTING“	38
4.1.1	Cysteinylované leukotrieny.....	41
4.1.2	Lipoxiny.....	42
4.1.3	Metabolické profilování	44
4.1.4	Serotonin a obtížně léčitelné astma	46
5.	ZÁVĚR.....	49
6.	ZDROJE LITERATURY	50
7.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	53
8.	SEZNAM TABULEK	54
9.	PŘÍLOHY	55
9.1	ABSTRAKT PŘÍSPĚVKU NA KONFERENCI IABR BREATH SUMMIT, CURYCH, ŠVÝCARSKO, 2016	55
9.2	RUKOPIS PUBLIKACE ODESLANÉ DO JOURNAL OF BREATH RESEARCH (IMPACT FACTOR = 4,631).....	57

SEZNAM POUŽITÝCH ODBORNÝCH ZKRATEK

5 – HT	serotonin
5 – LO	5-lipoxygenáza
12 – LO	12-lipoxygenáza
6MWT	šestiminutový test chůzí
ALF	výstelková tekutina
ASA	acetylsalicylová kyselina
BAL	bronchoalveolární laváž
BFFB	bronchiální tekutinový film
CT	počítačová tomografie
cysLTs	cysteinylované leukotrieny
eNose	elektronický nos
ESWT	šestiminutový vytrvalostní člunkový test chůzí
FeNO	frakční exkrece oxidu dusnatého
FEV1	usilovně vydechnutý objem za 1 sekundu
GIT	gastrointestinální trakt
HMDB	The Human Metabolome Database
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ISWT	stupňovaný člunkový test chůzí
KVV	kondenzát vydechaného vzduchu
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LTA ₄	leukotrien A ₄
LTB ₄	leukotrien B ₄
LTB ₄ -d ₄	[6, 7, 14,15- ² H ₄] leukotrien B ₄
LTC ₄	leukotrien C ₄
LTC ₄ -d ₅	[19,19,20,20,20 ² H ₅] leukotrien C ₄
LTD ₄	leukotrien D ₄
LTD ₄ -d ₅	[19, 19, 20,20,20 ² H ₃] leukotrien D ₄
LTE ₄	leukotrien E ₄
LTE ₄ -d ₅	[19, 19, 20,20,20 ² H ₃] leukotrien E ₄
LTs	leukotrieny
LXA ₄	lipoxin A ₄
LXB ₄	lipoxin B ₄
LXs	lipoxiny
OLA	obtížně léčitelné astma
PEF	vrcholová výdechová rychlost
SatO ₂	saturace krve kyslíkem
SRM	Selected Reaction Monitoring
SSRI	selective serotonin re-uptake inhibitors
VOCs	těkavé organické látky
TSDA	Two Sample Differential Analysis

1. ÚVOD

Předkládaná práce se zabývá onemocněním, které se obvykle označuje jako bronchiální astma. Toto onemocnění je známo velmi dlouho a na úrovni jeho diagnostiky a terapie bylo učiněno mnohé. Z tohoto důvodu je tato oblast v povědomí jak laické, tak i profesní veřejnosti považována za farmakoterapeuticky zvládnutou, neboť v současné době existuje velké množství přípravků, které nabízejí řadu alternativ pro „farmakoterapeutický návrat“ k víceméně normální kvalitě života. Vždyť na příkladu desetibojaře Tomáše Dvořáka lze demonstrovat, že astmatik je schopen vyhrát i olympijské hry v nejtěžší atletické disciplíně. Toto je důvod, proč je téma astmatu velmi často neprávem přehlíženo a pouze odborná část veřejnosti vnímá neustále se zvyšující incidenci tohoto onemocnění, klesající věk prvního astmatického záchvatu, obrovské částky plynoucí na farmakoterapeutické zvládnutí tohoto chronického onemocnění a nepříznivé odhady jeho budoucího vývoje. Za tím vším stojí neustále se zhoršující kvalita životního prostředí, růst počtu alergenů, snižující se obranyschopnost organismu atd. V každém případě je k dnešnímu datu Světovou zdravotnickou organizací registrováno 300 miliónů lidí trpících bronchiálním astmatem.

Pokud se podíváme na statistiky Světové zdravotnické organizace, zjistíme, že bronchiální astma je možné zvládnout v 95 – 97% diagnostikovaných případech, což je jistě skvělá vizitka pro zdravotnictví a farmaceutický průmysl. Kdo však je těch zbylých 3 – 5 procent pacientů, kteří na farmakoterapii nereagují. Celosvětový počet těchto nemocných je 9 – 15 miliónů, což je počet, který je srovnatelný s počtem obyvatel České republiky v té minimalistické hodnotě, až bývalého Československa. Tito pacienti jsou označováni jako obtížně léčitelní astmatici (OLA), protože nereagují na žádnou existující farmakoterapii, ani na tu nejrazantnější (kortikoidní léčbu). Z toho důvodu je pro ně návrat k „plnohodnotnému“ životu často nedosažitelným cílem. Pokud se dále podíváme do statistik, byť méně důvěryhodných, než jsou ty vytvořené Světovou zdravotnickou organizací, zjistíme, že jeden z nejhorších pocitů, které v životě může nastat, je pocit nedostatku vzduchu (resp. kyslíku). Tento pocit pak charakterizujeme slovem dušení. Obtížně léčitelný astmatik se ve své podstatě dusí celý život a má jen malou naději na zlepšení, kterého lze dosáhnout pouze nalezením nového léku. Na druhou stranu, pokud se na tuto skutečnost podíváme prizmatem 95 – 97% úspěšně léčených, zjistíme, že OLA je vlastně neexistujícím problémem.

Předkládaná práce se zabývá právě touto skupinou pacientů a snaží se nalézt rozdíl, který odlišuje OLA od dalších fenotypů astmatiků. Zjišťuje, zda je možné OLA pacienty již v rámci diagnostiky odlišit, a v neposlední řadě se snaží zjistit, proč se velice často po předepsání antidepresiv OLA pacientům jejich klinický obraz zlepší. V rámci předkládané práce se pokusím na všechny tyto otázky odpovědět.

2. LITERÁRNÍ ČÁST

2.1 Bronchiální astma

Bronchiální astma (latinsky *asthma bronchiale*) známé také jako průduškové astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest. Mezi nejčastější projevy onemocnění patří zejména záchvaty dušnosti s intervaly normálního dýchání, což bývá nejčastěji vyvoláno zúžením hyperreaktivních bronchů [13, 27]. Pro mnoho lidí astma znamená poruchu, při které jsou charakteristické zejména nepříjemné „pískoty“. Ve skutečnosti jsou však tyto pískoty pravděpodobně nejzřejmějším projevem poruchy, na které se účastní většina organismu. U postiženého člověka pak dochází k pocení, únavě, střevním poruchám, závratím a bolestem na hrudi. Hlavní příčinou je stažení dýchacích cest a přerušení přístupu vzduchu do plic. U asi poloviny případů astmatu je bezprostřední příčinou stahu dýchacích cest a nadměrné sekrece hlenu alergická reakce, přičemž povaha alergenů může být velice různá. Asi 30% dospělých a až 80% dětí s astmatem vykazuje příznaky nemoci po expozici výkalům roztočů žijících v domácím prachu [12, 27].

2.1.1 Obtížně léčitelné astma (OLA)

V současné době na světě žije přibližně 350 milionů lidí trpících astmatem (cca 5% lidí) [13]. Díky pokroku farmakologického výzkumu se podařilo zavést do klinické praxe široký výběr účinných léků, které většině nemocných trpících bronchiálním astmatem umožňují velmi dobrou nebo dokonce úplnou kontrolu nad nemocí. Navzdory tomu ale stále existují nemocní, kteří přes adekvátní léčbu trpí každodenními astmatickými obtížemi. V tomto případě se jedná o tzv. obtížně léčitelné astmatiky OLA (anglicky *Difficult to treat asthma (DTA)*). Do této skupiny spadají jednak lidé, jejichž rezistence k léčbě je způsobena špatnou diagnózou, případně špatně zvolenou léčbou, nebo lidé, jejichž léčba je komplikována jinou nemocí, nebo lidé, na které nezabírá žádná z dosud známých léčebných metod.

Těchto naposledy zmíněných obtížně léčitelných astmatiků (nezabírá na ně žádná ze známých léčeb) je přibližně 5% (17,5 milionu lidí) a můžeme u nich pozorovat intenzivní každodenní obtíže s výrazným omezením jejich denní aktivity a narušením kvality spánku a to i přesto, že dobře spolupracují, dodržují veškerá režimová opatření a jsou léčeni nejmodernějšími léčebnými postupy. Tito astmatici vybočují intenzitou svých obtíží ze skupiny pacientů, které lze klasifikovat jako těžké astmatiky, případně astmatiky trpící nekontrolovatelným astmatem, a je proto u nich nutné zavést specifický diagnostický i léčebný postup [20].

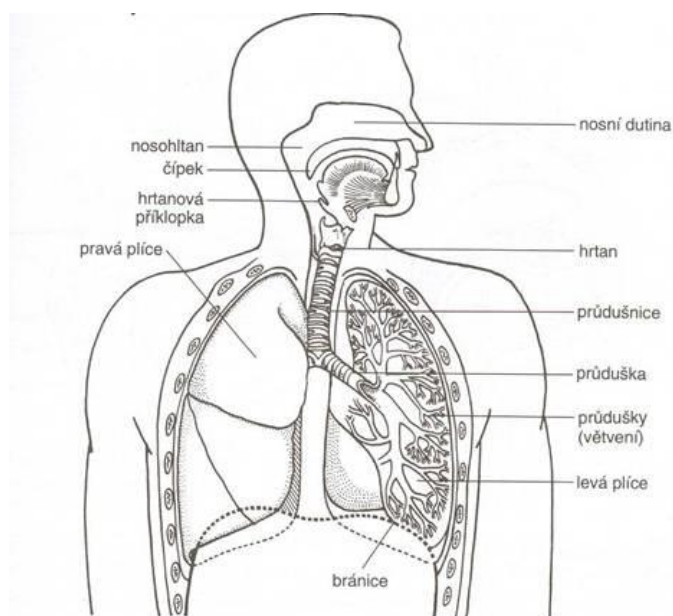
2.2 Dýchání [11, 27]

Lidé netrpící žádnými dýchacími obtížemi dýchají vzduch, který přichází do plic dýchacími cestami – tracheou (průdušnicí) a bronchy (průduškami). Při vdechu se vzduch nasává do plic, které obsahují přibližně 300 milionů alveolů (plicních sklípků). Alveoly jsou obklopeny velice tenkou stěnou, což umožňuje, aby kyslík velmi rychle a při každém vdechu přecházel stěnami alveolů do krve. Současně se oxid uhličitý (metabolit činnosti buněk) dostává z krve opačným směrem tj. přes stěny alveolů do dýchacích cest a ven z těla při každém výdechu [14].

Struktura nosu a jeho hlenové pokrytí (vazkým hlenem) na sliznicích způsobuje, že většina pevných částic ze vzduchu je zde odfiltrována. Když však člověk několikrát opakovaně vdechne ústy nebo když je ve vzduchu částic mnoho, některé z nich se dostanou až do plic.

Dýchací cesty mají senzorické i motorické nervy; senzorické nervy jsou pevnými částicemi drážděny, což vede k rychlému, explozivnímu výdechu, který se nazývá kašel (pouze v případě, že je vyvolán průduškami) nebo kýchnutí (pouze v případě, že je vyvolán nosem). Oběma zmíněnými způsoby pak člověk vypuzuje cizí částice do okolního vzduchu.

Svalové buňky jsou přítomny v celé trachee a bronších. Motorické nervy, které tyto svaly ovládají, uvolňují acetylcholin. Acetylcholin způsobuje stahy svalových buněk, zúžení dýchacích cest a produkci hlenu, která vede k zachycení bakterií, malého hmyzu a částec prachu, a brání jim tak v proniknutí do plic, kde by mohly způsobit poškození jemné stěny plicních sklípků. Dýchací cesty jsou dále vystlány buňkami s jemnými vlásky (ciliemi), které trvale posunují hlen a hlenem zachycené částice do úst a nosu, kde pak dochází k jejich odstranění kýchnutím, polknutím nebo plivnutím.



Obrázek 1 - Dýchací soustava [11]

Při astmatu se svalové buňky dýchacích cest stahují nadměrně, často dochází i ke zvýšené sekreci hlenu, který je u nemocných s astmatem abnormálně vazký a hustý, což může vést až k zablokování dýchacích cest. Svalové kontrakce a tvorba hlenu jsou často zvýšeny při plicních infekcích, v jiných případech však mohou být vyvolány např. alergiemi, stresem nebo úzkostí (k tomu pak dochází zejména u dětí a dospívajících). Zúžení dýchacích cest omezuje přísun vzduchu (tj. kyslíku do plic) a u nemocných se projeví obtížným dýcháním, pískotem a kašlem. V extrémních případech může zejména kvůli ucpání dýchacích cest hlenovými zátkami dojít až k smrti pacienta zadušením. Tomuto lze předejít pouze včasným odblokováním zúžení dýchacích cest. Někdy je zapotřebí umělého dýchání a těžce nemocní pacienti se umisťují na plicní ventilátor; takový postup může nemocným zachránit život.

2.3 Chronické astma

Pokud je nemocný vystaven cizím alergenům po delší dobu, mohou nastat dvě komplikace, které značně léčbu astmatu ztěžují.

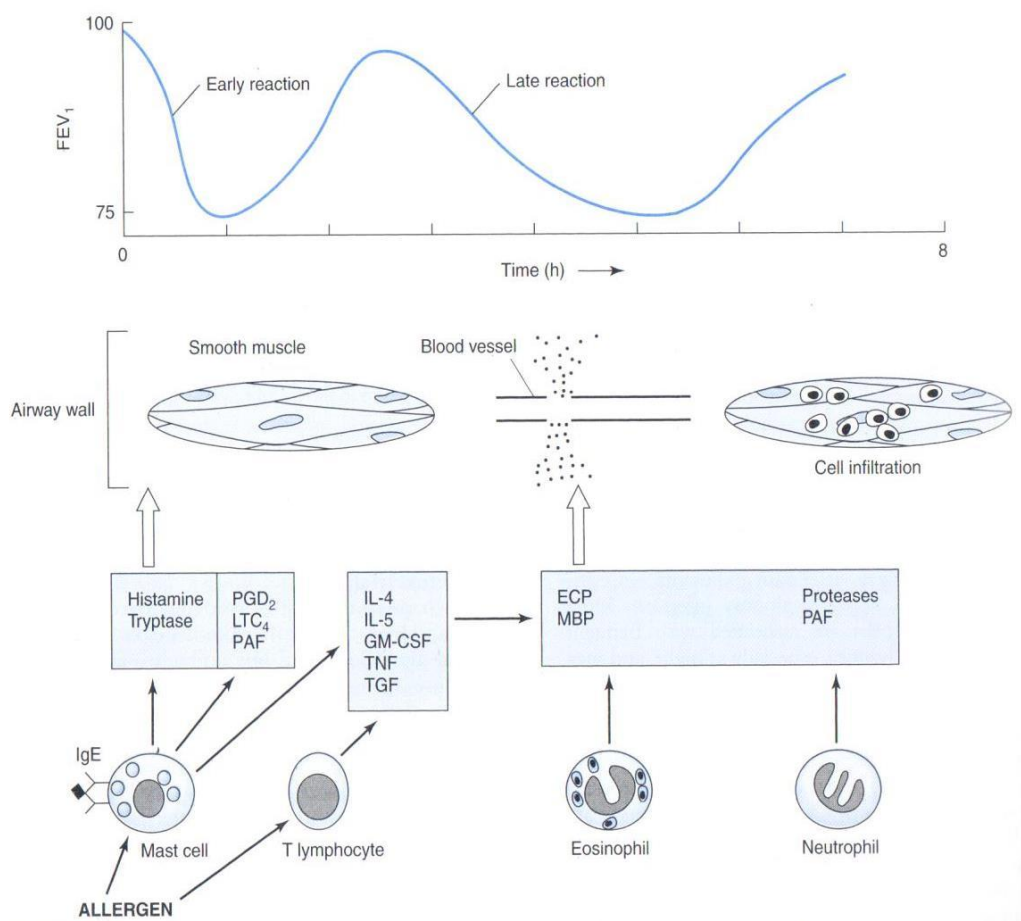
První z nich je zánět tkání průdušek, při kterém se rozšíří krevní cévy a tekutina proniká do tkáně, což ještě více zužuje dýchací cesty. Druhým problémem je pak to, že v důsledku zánětu se stanou svalové buňky hyperreaktivními na přirozené sloučeniny – mediátory, které vyvolávají stahy svalů. Tím pádem se běžně podávané léky, které mají bránit svalovým stahům a rozšiřovat tak dýchací cesty, stávají méně účinnými. Tato hyperreaktivita také způsobuje, že nemocní astmatem začnou mnohem více než ostatní lidé reagovat na vlivy, jako je stres, námaha nebo dýchání studeného vzduchu, což může vyvolat astmatický záchvat (u čtyř z pěti astmatiků dojde k astmatickému záchvatu, když cvičí v chladném a suchém vzduchu) [11, 21].

2.4 Fáze astmatu

U mnohých nemocných lze po každém vystavení spouštěcímu podnětu zaznamenat jak akutní, tak i chronickou fázi astmatu.

Iniciální fáze (neboli časná fáze astmatu) spočívá zejména v pouhé kontrakci dýchacích cest a v sekreci hlenu. Tato fáze obvykle trvá v řádech minut. V průměru obtíže dosahují vrcholu po patnácti minutách a vrchol odeznívá nejpozději do devadesáti minut. Tato první fáze se nejčastěji léčí stimulanty β -receptorů, xantiny a anticholinergními léky. Po časné fázi astmatu nastává další, zánětlivá fáze. K této fázi dochází až po několika hodinách, ale může trvat celý den (nebo i déle). Během této fáze jsou dýchací cesty nemocného mnohem citlivější než obvykle, což může být příčinou toho, proč jsou nemocní po počáteční nezvládnuté epizodě v nadcházejících dnech mnohem

náchylnější k dalším astmatickým záchvatům. Z toho důvodu se postiženým ve dnech následujících bezprostředně po záchvatu doporučuje vyhýbat se všem podnětů, které by mohly jejich astma zhoršit. Zánětlivé fázi astmatu lze především zabránit podáváním steroidů nebo kromoglykanu [13]. Fáze astmatu a biochemické pochody s vybranými molekulami typickými pro jednotlivé fáze jsou znázorněny na obrázku 2.



Obrázek 2 - Molekulární báze fází bronchiálního astmatu [25]

2.5 Diagnostika

Termín diagnóza označuje vymezení případně určení nežádoucího stavu (choroby). Obvykle vychází z pozorovatelných symptomů (příznaků) a jejím účelem je najít příčinu tohoto stavu [26].

Prvním člověkem, který si uvědomil „význam diagnózy“, byl zhruba před 2 500 lety filosof Hippokrates z Kósu (460 – 377 př. n. l.). Právě on pronesl větu: „Jedině správná diagnóza může vést ke správné terapii.“ Tento výrok pak nejen shrnuje podstatu diagnózy, ale zároveň upozorňuje na důležitost správné diagnózy v procesu léčby nemoci. Je nutné si uvědomit, že bez správné diagnózy

není možné zahájit efektivní léčbu a zároveň pokud je diagnóza stanovena chybně, může dojít i k nesprávné léčbě, která následně může mít negativní vliv na zdraví pacienta [26].

Už v době Paracelsa (16. století) si lékaři začali všimnout souvislosti některých změn jako např. barvy, zápachu a chuti moče se zdravotním stavem pacientů. Tak byla podle sladké moče diagnostikována cukrovka (*diabetes mellitus*) již ve středověku, ještě před tím, než byla v devatenáctém století s rozvojem přírodních věd potvrzena chemickou analýzou a než byla poznána její podstata [26]. Diagnóza na základě pozorování však není pouze metodou středověku. I v dnešní době jsme schopni některá onemocnění určit jen pomocí našich smyslů. V případě cukrovky (*diabetes mellitus*) můžeme neléčené diabetiky bezpečně poznat podle zápachu acetonu. Aceton v tomto případě funguje jako biomarker onemocnění diabetem (inzulin umožňuje vstup glukózy do buněk, a tak tělo neléčeného diabetika trpí nedostatkem energie v buňkách, který se snaží kompenzovat rozkladem tuků, kdy jako metabolity vznikají ketolátky (např. aceton)).

Diagnostika se v minulosti vyvíjela s využíváním empirického přístupu. V toku věků se tak sbíraly a předávaly informace, nejprve ústně a s postupujícím vývojem písemně, a byly založeny na popsané zkušenosti. V dnešní době je medicínská diagnostika samostatnou vědní disciplínou, která využívá celou řadu biochemických standardizovaných postupů, stejně jako výsledky fyzikálních metod a to hlavně zobrazovacích (počítačová tomografie (CT), zobrazovací magnetická resonance (MRI), ultrazvukové vyšetření (SONO)). V současné době je medicínská diagnostika velmi úzce spojena s molekulární diagnostikou, která se zabývá stanovením nemoci na molekulární úrovni.

Poprvé se však o možnosti využití molekulární diagnostiky začalo uvažovat až v druhé polovině dvacátého století a lze říct, že její vývoj pokračuje až do současnosti. Jednou z nejvýraznějších postav počátků moderní molekulární diagnostiky pak byl americký vědec a držitel Nobelovy ceny (1965), Richard Phillips Feynman, (11. 5. 1918 – 15. 2. 1988). Ten na význam a zejména pak na budoucnost „nanosvěta (světa molekul)“ a tedy i molekulární diagnostiky upozornil v roce 1959 svou přednáškou s názvem „Tam dole je spousta místa“ (*There's Plenty of Room at the Bottom*), která mimo jiné předznamenávala vývoj nanotechnologií se všemi klady i záporů [7].

V současné době je diagnóza jedním z nejdůležitějších kroků během celé léčby onemocnění. Při léčbě je nutné v první řadě včas zachytit chorobu pomocí analýzy vhodných biochemických ukazatelů (biomarkerů). Následně je nutné stanovit resp. upřesnit diagnózu pacienta a zvolit optimální léčbu [26].

Molekulární diagnostika pak představuje velký pokrok zejména v tom směru, že je možné na základě některých biomarkerů efektivněji pozorovat a stanovovat pravý původ onemocnění, a tím pádem i zvolit nejvhodnější léčbu případně i předejít samotnému vzniku onemocnění.



Obrázek 3 - Laboratoř molekulární diagnostiky VŠCHT Praha [34]

2.6 Fosfolipidová dvouvrstva – zdroj autakoidů a jejich význam v diagnostice

2.6.1 Lipidy

Lipidy jsou přírodní látky živočišného i rostlinného původu. Vyskytují se jak v pevném, tak i kapalném skupenství. Chemicky se jedná o estery vyšších karboxylových kyselin (nasycených i nenasycených). Přesněji řečeno se jedná o deriváty mastných kyselin jednosytného nebo trojsytného alkoholu [17].

Přestože jsou lipidy funkčně i chemicky navzájem velmi různorodé látky, jejich společnou charakteristickou vlastností je hydrofobnost (jedná se o nepolární sloučeniny tj. látky, které jsou nerozpustné ve vodě, ale naopak je lze rozpustit v mnoha organických rozpouštědlech).

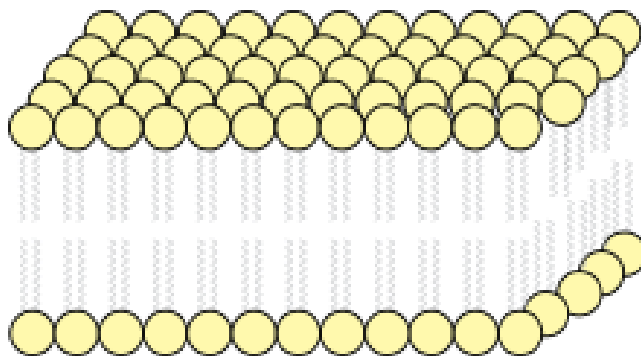
Lipidy v organismu velice často slouží jako zdroj a zásoba energie. Zároveň často plní ochrannou a izolační funkci a slouží i jako rozpouštědlo některých lipofilních látek – především vitamínů.

Mnohé druhy lipidů jsou však významné i z jiných hledisek, jako lipidová dvouvrstva jsou součástí buněčných membrán [23].

2.6.2 Fosfolipidy

Fosfolipidy patří mezi složené lipidy obsahující fosfor a jsou hlavní částí všech buněčných membrán spolu s glykolipidy, cholesteroly a bílkovinami.

Část fosfolipidu je hydrofilní (polární konec = jedná se např. o fosfáty), opačná část je hydrofobní (nepolární, mastná). Ve vodním prostředí a vodných roztocích se fosfolipidy staví proti sobě tak, že hydrofobní (ocasně) části jsou namířeny proti sobě. Tímto vytvoří bimolekulární membránu, která je důležitá pro mnoho buněčných struktur. Takovéto uspořádání umožňuje spontánní průnik malých částic (např. lipozomů). Větší částice jsou přepravovány skrz membránu transportním proteinem. Tato membrána je selektivně propustná a elastická: dovoluje průnik všech potřebných látek, ale zabráňuje průniku některých nežádoucích látek [17].

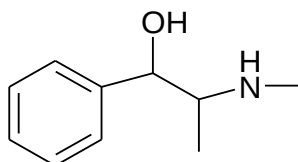


Obrázek 4 - Fosfolipidová dvouvrstva [33]

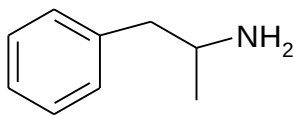
2.7 Léčba astmatu

O léčení astmatu se lidstvo pokouší už od dob raného středověku, avšak prvním známým a prokázaným lékem se roku 1926 stal efedrin. Poprvé byl extrahován z rostliny *Ephedra sinica* (chvojník čínský) Ko-Kui Chenem v roce 1923. Díky své efektivitě se efedrin k léčbě astmatu využívá i v dnešní době [27].

Kolem roku 1930 se objevily první snahy o přípravu syntetického efedrinu. Tyto pokusy byly zpočátku neúspěšné. O přípravu syntetického efedrinu se také pokoušel Američan Gordon Alles, chemik z farmakologického ústavu University of California, jehož pokusy vedly k vytvoření amfetaminu. Amfetamin byl poprvé použit v roce 1932 jako benzendrin, který lze při léčbě astmatu podávat inhalací. Amfetamin se začal také aplikovat při léčbě obezity, protože mezi jeho účinky patří i snižování apetitu (anorektický efekt). Dnes se už však pro tento účel nevyužívá pro negativní vedlejší účinky a návykovost [22, 27].



Obrázek 5 - Efedrin



Obrázek 6 - Amfetamin

2.7.1 Léky pro prevenci akutního záchvatu astmatu

Léky pro prevenci akutního záchvatu astmatu jsou léky, které uvolňují dýchací cesty (uvolňují stah svalových cest) a dále snižují produkci hlenu. Účinky těchto léků nastávají poměrně rychle, díky čemuž je možné je využít k prevenci, zastavení nebo snížení závažnosti akutního záchvatu astmatu.

Mezi léky pro prevenci akutního záchvatu astmatu patří zejména agonisté β -receptorů (β_2 -sympatomimetika), anticholinergika (např. ipratropium) a z dříve používaných pak xantiny (např. kofein, theofylin a teobromin) [27, 29].

2.7.1.1 Agonisté β_2 -receptorů

V současné době jsou agonisté β_2 -receptorů považovány za jedny z neúčinnějších léků při příznacích astmatu. Tyto látky jsou velmi podobné přirozeným sloučeninám adrenalinu a noradrenalinu a působí na β_2 -receptory. (Sympatické nervy uvolňují neurotransmiter noradrenalin, který může působit na dvě skupiny receptorů zvané alfa a beta. Když noradrenalin působí na α -receptory, dochází ke stahu svalovin cév (periferní vazokonstrikce prostřednictvím α_1 receptorů) a následnému zvýšení krevního tlaku. Při působení noradrenalinu na β_1 -receptory se naopak cévy uvolňují, ale zároveň zrychlují stahy srdce, dalším účinkem působení na β -receptor je mimo jiné i uvolnění svalů dýchacích cest (β_2 -receptory) [15]. Kromě uvolnění svalů dýchacích cest se β_2 -receptory podílejí na snížení sekrece hlenu na stěnách dýchacích cest.

Ačkoliv jsou agonisté β_2 -receptorů neúčinnějšími a nejrozšířenějšími léky k terapii astmatu, mají některé nevýhody. V první řadě je nutné, aby pacienti nepřekračovali doporučené dávky, zejména proto, že při vysokých dávkách β -agonisté stimulují receptory i jinde v těle (hlavně v srdci β_1), což vede k poruchám srdečního rytmu a vysokému krevnímu tlaku.

Druhou nevýhodou pak je skutečnost, že pokud pacient s těžkým astmatem bere vysoké dávky β_2 -agonistů po řadu let, dojde k adaptaci buněk dýchacích cest a tyto buňky sníží počet svých β_2 -receptorů. To může vést k tomu, že β -agonisté i adrenalin z vlastního organismu ztratí schopnost obrany proti účinkům jiných chemických mediátorů, které se na astmatu podílejí, což může paradoxně vést k zhoršení pacientova astmatu [27].

2.7.1.2 Xantiny

Xantiny byly pravděpodobně mezi prvními farmaky k terapii astmatu. Do této skupiny sloučenin spadají mimo jiné kofein, theofylin a theobromin, z nichž pouze theofylin se v některých případech užívá pro léčbu astmatu i v dnešní době.

Podobně jako agonisté β -receptorů i xantiny uvolňují průdušky a dá se jich použít k přerušení astmatického záchvatu.

Xantiny však nejsou oblíbenými léky pro léčbu astmatu, protože vyvolávají celou řadu vedlejších účinků, mezi které např. patří stimulace srdce a působení na mozek, které je spojeno s vyvoláním třesu, úzkosti, dráždivosti a nespavosti [9, 27].

2.7.1.3 Anticholinergika

Nervy ovládající dýchací systém uvolňují acetylcholin, který způsobí stahy svaloviny dýchacích cest a zvyšuje sekreci hlenu. Z toho důvodu léky blokující účinky acetylcholinu, anticholinergika, mohou často snížit vážnost astmatického záchvatu, zejména v případě, kdy byl tento záchvat vyvolán chemickými podněty, námahou nebo stresem [27].

Mezi anticholinergika patří např. atropin, který sice může být v případě léčení astmatu účinný, ale současně blokuje acetylcholinové receptory jinde v těle (nejen v průduškách). To má za následek nežádoucí projevy, včetně snížené sekrece slin a sucha v ústech, což často vede k ztížení požívání potravy. Dalším nežádoucím účinkem může být paralyzování svalů zaostřujících oční čočku, což má za následek rozmazané vidění. V neposlední řadě může atropin způsobit ochabnutí svalů střev a následnou zácpu.

Pro tyto nežádoucí účinky atropinu se začaly vyvíjet léky, jako ipratropium, který se běžně pacientovi podává ve formě aerosolu. Sprej se inhaluje přímo do dýchacích cest a díky svému chemickému složení se ipratropium minimálně vstřebává do krve. Vyvolává proto mnohem méně vedlejších účinků než jiné léky, které jsou podobné atropinu, nebo se podávají v tabletách [8, 12].

2.7.2 Léky užívané při chronickém astmatu

Léky užívané při chronickém astmatu se oproti lékům pro prevenci akutního záchvatu příliš nehodí pro léčbu astmatických záchvatů, ale na druhou stranu omezují zánět v průduškách. Tímto pak hlavně brání dalšímu rozvoji astmatického záchvatu [29].

Mezi léky užívané při chronickém astmatu pak patří kromoglykan a steroidy.

2.7.2.1 Kromoglykan a nedocromil

Jak kromoglykan, tak nedocromil potlačují pozdní, zánětlivou fázi astmatického záchvatu tím, že omezují reakci průdušek na dráždivé podněty.

Nejčastěji používaným lékem je kromoglykan sodný, který bývá nejčastěji aplikován ve spreji. Kromoglykan sodný působí na bílé krvinky a zároveň na žírné buňky a potlačuje v nich tvorbu mediátorů, které způsobují astmatický záchvat. Zároveň zabraňuje některým mediátorům vyvolávat stahy svalů dýchacích cest, čímž také předchází vzniku astmatického záchvatu.

Kromoglykan také potlačuje aktivitu cholinergních nervů, které vyvolávají stahy svalů dýchacích cest při reflexní reakci na podráždění jejich stěn [27, 29].

Kromoglykan je více účinný při léčbě dětí než dospělých.

2.7.2.2 Steroidy

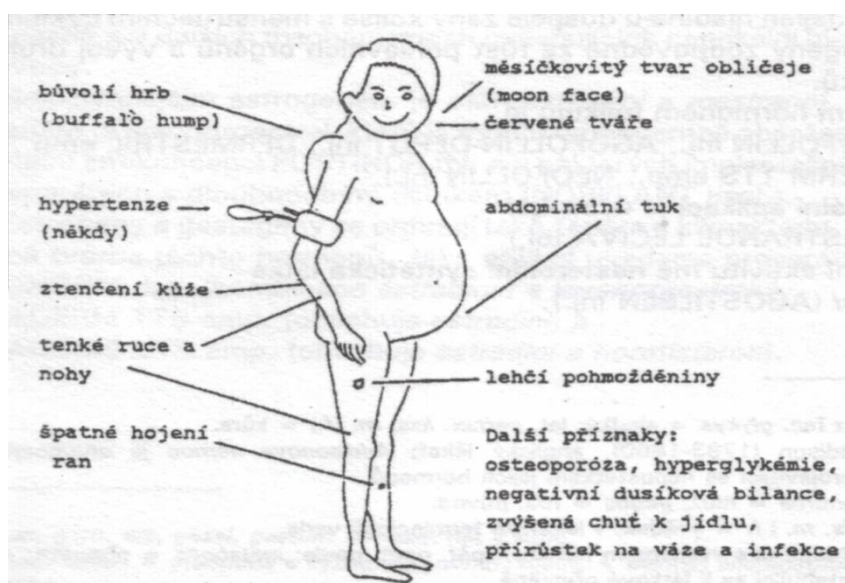
Steroidy, které jsou přítomné v lidském těle, mají velmi výrazný protizánětlivý účinek. Z toho důvodu byla vyvinuta velká řada příbuzných látek, které se využívají jako léky při chronických zánětlivých onemocněních, tedy i při bronchiálním astmatu.

Při léčbě astmatu se nejčastěji využívá beclomethason a betamethason, které kromě jiného potlačují tvorbu a uvolňování mediátorů ze žírných buněk [27].

Tyto steroidy se obvykle podávají inhalačně (z inhalátorů nebo z rozprašovače), čímž se maximálně zabraňuje většině vedlejších účinků, které jinak mohou nastat při užívání vysokých dávek steroidů perorálně. Při inhalaci však mohou vyvolat chrapot a také dochází k místnímu potlačení imunitního systému, což vede ke zvýšenému riziku infekce v krku a ústech.

Steroidy v dýchacích cestách potlačují zánět, snižují sekreci hlenu a zvyšují počty β -receptorů na svalových buňkách, takže buňky jsou pak citlivější na uvolňující účinek β -agonistických léků.

V současné době se však někteří lékaři snaží léčbě astmatu steroidy vyhnout, zejména kvůli vedlejším účinkům (viz obrázek 7) [16].



Obrázek 7 - Nežádoucí účinky steroidů [16]

2.7.2.3 Antagonisté leukotrienů

Leukotrieny jsou sloučeniny, které jsou mediátory produkované bílými krvinkami a žírnými buňkami. Tyto látky jsou příbuzné tukům, které vyvolávají silné stahy svalových buněk v dýchacích cestách a podporují tvorbu hlenu [9].

Mezi nejčastější léky patří montelukast a zafirlukast. Oba tyto léky jsou antagonisty leukotrienů a brání tedy jejich účinkům na dýchací cesty. Nedovedou sice zastavit již probíhající astmatický záchvat, ale pokud se užívají denně, potlačují zánět v dýchacích cestách, snižují tvorbu hlenu a uvolňují svalové buňky dýchacích cest, čímž snižují potřebu β -agonistických léků. Tyto léky jsou pak zejména účinné u astmatu vyvolaného fyzickou námahou.

Jejich účinky na astmatiky jsou podobné jako účinky steroidů, měly by však být bezpečnější, jelikož mají podstatně menší rozsah vedlejších účinků. Další výhodou je to, že u nemocných během trvalého užívání nedochází k poklesu citlivosti na tento typ léků, jak se může stát při užívání některých β -agonistů [27].

2.8 Diagnostika plicních onemocnění

Pro diagnostiku plicních onemocnění spojených s chronickou bronchiální obstrukcí je velmi důležité anamnéza. Na druhou stranu tyto onemocnění nemají mnoho specifických znaků, a tak je vždy nutné kromě již zmíněné anamnézy provést i funkční vyšetření plic.

Běžně lze v praxi použít velké množství funkčních neinvazivních diagnostických metod. Jejich nevýhodou je ale to, že ve většině případů vyžadují spolupráci a úsilí pacienta, což může být značně problematické, zejména pak při vyšetřování malých dětí a seniorů. Stále však chybí diagnostické metody, které by dokázaly ihned poskytnout jasnou a komplexní představu o charakteru zánětu dýchacích cest [20].

V současnosti se stávají populárními nově se rozvíjející personalizované diagnostiky v oblasti analýzy složení kondenzátu vydechovaného vzduchu. V některých případech je zde ale nutné při vyšetřování onemocnění dýchacích cest použít i invazivní diagnostiku (indukované sputum, bronchoalveolární laváž, biopsie dýchacích cest) [23].

2.8.1 Neinvazivní metody

2.8.1.1 Vrcholová výdechová rychlost

Měření vrcholové výdechové rychlosti (anglicky *peak expiratory flow rate*, (PEF)) je metoda využívaná k orientačnímu vyšetření funkce plic. Podstatou tohoto vyšetření je změření nejvyšší možné rychlosti, které je pacient schopen dosáhnout při prudkém výdechu. PEF je velmi jednoduchou

metodou a její hlavní výhodou je zejména to, že ji lze využít k dlouhodobému sledování funkce plic a to i v domácím prostředí pacienta. Naopak její nevýhodou je skutečnost, že ji není možné použít k stanovování plicního objemu ani k získávání přesného přehledu o výdechových rychlostech [6].

2.8.1.2 Spirometrie [4]

Spirometrie patří mezi základní vyšetření funkce plic. Během spirometrie je měřen objem nadechnutého a zejména pak vydechnutého vzduchu. Dále je pak možné měřit rychlost, kterou je vzduch nadechován a vydechován.

Jako ukazatel rychlosti (tato rychlost závisí na průchodnosti dýchacích cest) výdechu vzduchu lze použít usilovně vydechnutý objem za 1 sekundu (FEV1). Hlavní nevýhodou této metody je to, že neukazuje tzv. reziduální objem (objem vzduchu, který pacientovi zůstane v plicích i po maximálním výdechu) a tím pádem není možné určit celkovou plicní kapacitu. Spirometrie sama o sobě poskytuje pouze informaci o aktuálním stavu plic, a tak je pro celkové zhodnocení plicního stavu nutné ji doplnit dalšími vyšetřeními. Nevýhodou je také nutná aktivní účast pacienta při vyšetření, což může být problémem zejména během vyšetření dětí, seniorů a nespolupracujících osob.



Obrázek 8 - Pacient při spirometrickém vyšetření [12]

2.8.1.3 Bronchomotorické testy

Na rozdíl od spirometrie bronchomotorické testy poskytují informaci o změně funkce plic bronchodilatačním nebo bronchokonstrikčním stimulem.

Bronchodilatační test je využíván hlavně při zúžení dýchacích cest, které bylo zjištěno během spirometrického vyšetření. Při bronchodilatačním testu je pacientovi podán bronchodilatační lék (inhalačně salbutamol tj. β_2 -sympatomimetikum, 30 minut) a následně se zjišťuje, zda se po požití přípravku spirometrický parametr FEV1 zlepšil o více než 12 % a současně o 200 ml. Pokud je výsledek bronchodilatačního testu pozitivní, znamená to prokázání reverzibility bronchiální obstrukce. Toto je typické zejména pro bronchiální astma [13].

Bronchoprovokačním testem je možné u pacienta zjistit zvýšenou průduškovou reaktivitu po inhalaci bronchokonstrikčně působících látek (histamin, metacholin, mannitol). Zatímco pacient tyto

látky inhaluje, je zároveň prováděno spirometrické měření, jehož cílem je zjistit, jak velká dávka nebo koncentrace bronchoprovokační látky způsobí pokles parametru FEV1 pod 20 % oproti vstupní hodnotě. Kromě bronchoprovokačních testů je také možné využít provokace tělesnou zátěží. V současné době se k tomuto účelu používá převážně několikaminutový běh. Výhodou bronchoprovokačního testu je to, že s ohledem na kontraindikaci (snížení FEV1 pod 60 %, známá alergie na metacholin, histamin, respirační infekce, nestabilní srdeční onemocnění) se jedná o zcela bezpečnou metodu a k těžkému bronchospasmu dochází zcela výjimečně [13].

2.8.1.4 Elektronický nos [18]

Elektronický nos (eNose) je možné využít zejména k detekci některých organických látek obsažených ve vydechovaném vzduchu (anglicky *volatile organic compounds*, (VOCs)). Mezi tyto látky patří např. aceton, etanol, isopren atd.

Všechny tyto látky jsou následně rozpoznávány a určovány pomocí vzorů za použití elektronických nosů (senzorová pole na polymerní bázi) a kombinací plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Metoda dosud není standardizovaná pro klinickou praxi a dosud ani neprokázala svůj přínos v monitoraci nemocí dýchacích cest či v diferenciální diagnostice těchto nemocí.

2.8.1.5 Pulzní oxymetrie

Během pulzní oxymetrie dochází k okysličování krve, k čemuž se využívá malého kolíčku vybaveného zdrojem červeného světla. Vyšetření pacienta probíhá tak, že je na jeho prst (případně na ušní lalůček) připevněn tento kolíček a podle prosvícení tkáně je pak možné odhadnout saturaci krve kyslíkem (SatO₂) [31].

Nevýhodou pulzní oxymetrie je její omezené využití ve chvíli, kdy pacient trpí poruchami periferního nervstva nebo anemií.

2.8.1.6 Další metody funkčního vyšetření plic

V diagnostice plicních onemocnění lze využít řadu dalších vyšetření, ale většina těchto testů podstatně více zatěžuje pacienta. Mezi takové testy patří např. body pletysmografie, která slouží k detailnějšímu vyšetření plicních funkcí. Touto metodou je možné získat informaci o objemu vzduchu zadržného v plicích, tedy informaci, kterou nelze zjistit při spirometrii [4].

Dalším poměrně často využívaným vyšetřením je změření transfer faktoru alveol kapilární membrány plicních sklípků pro oxid uhelnatý tzv. TLCO (plicní difúze). Pomocí tohoto vyšetření lze určit počet funkčních plicních sklípků [12].

K diagnostice plicních onemocnění je také možné využít terénní zátěžové testy, které se používají převážně k hodnocení snášení zátěže a fyzické výkonnosti pacienta. V současné době patří

mezi nejčastěji používaný zátěžový test tzv. šestiminutový test chůzí (anglicky *6 - minute walk test*, (6MWT)). Druhou možností je vytrvalostní člunkový test chůzí (anglicky *endurance shuttle walk test*, (ESWT)). A posledním z běžně využívaných vyšetření je stupňovaný člunkový test chůzí (anglicky *incremental shuttle walk test*, (ISWT)). Všechny tyto testy nabízejí adekvátní náhradu ke spirometrii, na druhou stranu jsou však pro pacienta velmi náročné. Zároveň je však lze využít k predikci dalšího vývoje plicních onemocnění [31].

Do standardních diagnostických metod plicních onemocnění lze zařadit i skiagram hrudníku, díky kterému je možné získat orientační přehled nitrohrudních patologií. Rozhodující diagnostickou metodou je ale až počítačová tomografie (CT) [29].

2.8.2 Invazivní metody

2.8.2.1 Bronchoalveolární laváž

Bronchoalveolární laváž (BAL) je založená na aplikaci fyziologického roztoku do pacientových dýchacích cest. Běžně se fyziologický roztok podává v množství 100 – 200 ml. Cílem této metody je získání tekutiny obsahující buněčné i nebuněčné složky z periferních dýchacích cest a alveolů, čehož lze dosáhnout zpětnou aspirací. BAL je v diagnostice zásadní metodou zejména pro zjištění a léčbu onemocnění spojených s plicní fibrózou. Nevýhodou této metody je podobně jako u indukovaného sputa skutečnost, že při jejím použití je možné uměle vyvolat zánět plic a bývá proto pacienty špatně snášena [10].

2.8.2.2 Indukované sputum

Indukované sputum patří mezi invazivní metody jen zčásti. Principem této metody je inhalace hypertonického roztoku chloridu sodného ve formě aerosolu. Tento aerosol je produkován ultrazvukovým nebulizátorem, který způsobuje tvorbu sputa (hlenu). Sputum je následně vykašláváno pacientem. Indukce sputa však není bez rizika. Zejména pro pacienty s vyšším stupněm hyperreaktivity průdušek je tato metoda nevhodná, protože může vést k navození bronchospasmu (zúžení průdušek bronchů) [6].

Indukované sputum je v běžné praxi využíváno jen velmi zřídka. Důvodem jeho omezeného využití je velká náročnost na provedení i následné preanalytické zpracování odebraného vzorku.

2.8.3 Personalizované diagnostické metody

2.8.3.1 Vydechovaný oxid dusnatý

Často využívanou diagnostickou metodou je měření množství vydechovaného oxidu dusnatého. Hlavní výhodou je to, že se jedná o neinvazivní metodu, kterou lze prakticky libovolně opakovat.

Měření množství vydechovaného oxidu dusnatého je využíváno ke zjištění eozinofilního zánětu v dolních dýchacích cestách. Principem této metody je stanovení vydechovaného oxidu dusnatého

(anglicky *fractional exhaled nitric oxide*, (FeNO)) [5]. Zkratka FeNO, vyjadřuje produkci vydechaného NO z bronchů za časový úsek. Oxid dusnatý je látkou, která má velký význam v patologii dýchacího systému. Obecně lze říct, že nízké koncentrace NO jsou fyziologické, zatímco jeho vysoké koncentrace jsou patologické.



Obrázek 9 - Pacient během FeNO vyšetření [12]

Oxid dusnatý je možné označit jako biomarker, pomocí kterého lze detekovat a sledovat průběh eozinofilního zánětu. Jeho stanovení může být užitečné i v obtížné diferenciální diagnostice chronického kašle a průduškového astmatu [30].

Hlavní nevýhodou FeNO je jeho nepřesnost, ke které dochází zejména u kuřáků či alergiků. Obecně platí, že kuřáci mají nižší hodnoty FeNO a naopak alergici mívají hodnoty tohoto biomarkeru vyšší [32]. Hodnoty vydechaného oxidu dusnatého (FeNO) u neléčených nekuřáků (viz tabulka 1).

Tabulka 1 – Hodnoty FeNO testu [30]

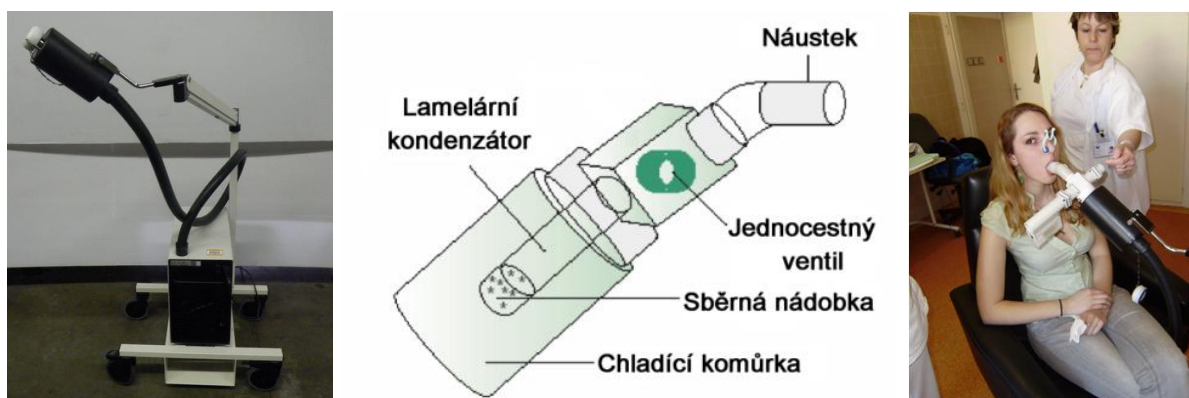
Hodnoty FeNO	Diagnóza
< 25 ppb	Normální
25 – 35 ppb	šedá zóna
35 – 50 ppb	velmi pravděpodobné
> 50 ppb	pozitivní

2.8.3.2 Kondenzát vydechovaného vzduchu

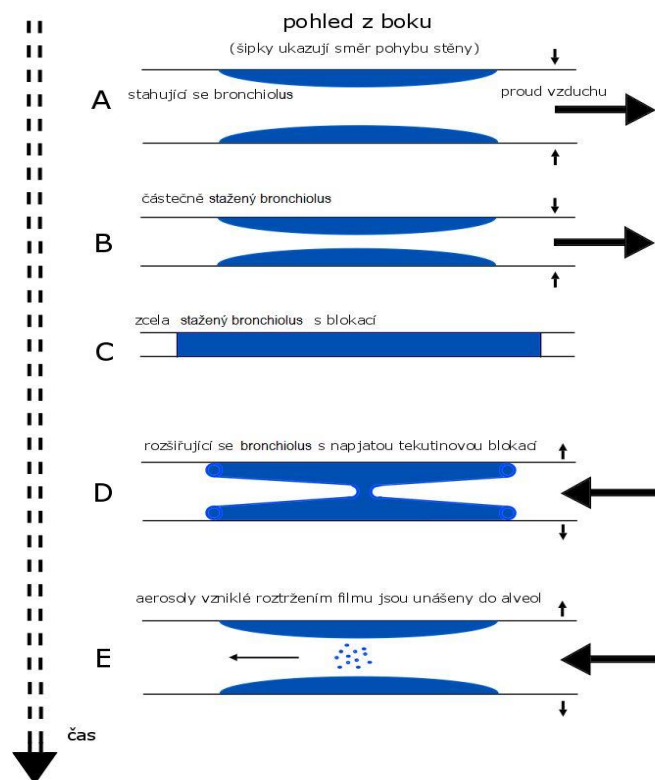
2.8.3.2.1 Složení kondenzátu vydechovaného vzduchu

Kondenzát vydechovaného vzduchu KVV lze získat kondenzací vydechovaného vzduchu. KVV je bronchoalveolární tekutina odrážející děje, které se odehrávají v plicích a hlavně pak v dýchacích cestách. KVV obsahuje velké množství netěkavých a více než 200 těkavých látek [10]. Hlavní složkou KVV je vodní pára, ve které lze dále najít mnohé anorganické sloučeniny (mezi nejčastější patří oxid dusnatý, kyslík, dusík, a oxid uhličitý) a některé těkavé organické sloučeniny (alkoholy, uhlovodíky, karboxylové kyseliny, atd.) [25]. Zároveň ale obsahuje i množství netěkavých látek jako jsou aminokyseliny, peptidy, enzymy, prostanoidy a cytokiny, které jsou ve vydechovaném vzduchu přítomny ve formě aerosolu [24].

Dosud není přesně znám mechanismus, kterým netěkavé látky přechází z pevné do plynné a kapalně fáze. Jedna z teorií pracuje s možností rozrušení bronchiálního tekutinového filmu. Aerosoly jsou pak během dýchání uvolněny z tekutinové výstelky a dostávají do dýchacích cest. Stažením bronchiolů se tekutinová výstelka spojí, ale následně je opět rychle roztažena. Tím se soudržnost tekutiny poruší a může dojít k uvolnění drobných kapiček aerosolu (obrázek 10). Tento navrhovaný mechanismus je podpořen několika studiemi. Během těchto studií bylo navíc experimentálně prokázáno, že hlubší dýchání zvyšuje počet vydechovaných částic, což znamená, že počet vydechovaných částic závisí na typu dýchání [25, 28].



Obrázek 10 - Přístroj k odběru KVV [25]



Obrázek 11 - Popis vzniku aerosolu [25]

Hlavní podstatou metody založené na analýze KVV je zjištění a určení biomarkerů plicních onemocnění. Zvýšená hladina těchto biomarkerů pak většinou upozorňuje na probíhající patologický proces v dýchacích cestách. [25, 28].



Obrázek 12 - Pacient během odběru KVV [25]

2.8.3.2.2 Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu

Při odběru kondenzátu vydechovaného vzduchu je pacientem vydechovaný vzduch veden skrz kondenzátor, kde jsou zkapalněny všechny kondenzující složky. Během celého odběru je důležité, aby pacient po celou dobu dýchal klidně a pokud možno pravidelně. Vydechovaný vzduch prochází náustkem přes jednocestný ventil do chladicího boxu, který je už předem vychlazen na teplotu -20 °C. V tomto chladicím boxu se získaná plynná fáze a aerosolové částice zkapalní a vzniklá kapalina se stále za nízké teploty shromáždí do sběrné nádoby [24]. Celý proces odběru trvá přibližně 7-12 minut. Celkově je nutné dosáhnout objemu 120 litrů vydechovaného vzduchu, čímž lze získat 1-2 ml kondenzátu. Takto získaný kondenzát se následně vloží do mikrozkuřavky. Ke kondenzátu je poté přidán deuterovaný vnitřní standard pro monitoring degradačních procesů. Tímto způsobem je získán vzorek, který se skladuje při -80 °C [28].

2.8.3.2.3 Faktory ovlivňující složení kondenzátu vydechovaného vzduchu

Složení KVV je ovlivňováno mnohými faktory, z nichž většina zásadně ovlivňuje skutečnost, zdali je možné daný vzorek opravdu pro analýzu použít, či ne.

Prvním z těchto faktorů je délka sběru KVV, kdy doba, po kterou je KVV pacientovi odebrán, značně ovlivňuje objem dechového kondenzátu. Z toho důvodu je nutné, aby doba odběru KVV nikdy nepřekročila 10 minut. Na druhou stranu doba sběru nemá žádný vliv na změnu pH nebo na koncentraci peroxidu vodíku, dusičnanů/dusitanů, adenosinů, 8-isoprostaglandinu F_{2a} a malondialdehydu ve vzorku KVV [24].

Dalším faktorem je okolní vzduch obsahující mnohé sloučeniny, které mohou rozkládat nebo mohou reagovat s látkami obsaženými v kondenzátu (pozn. látky jsou přítomny v koncentracích pmol/ml – fmol/ml). Tyto reakce pak mohou dokonce výrazně změnit celkové složení KVV. Příkladem takovéto kontaminace může být oxid dusnatý obsažený v okolním vzduchu, který v kondenzátu snižuje koncentraci peroxidu vodíku. Těmto kontaminacím lze ale včas předejít použitím jednocestného ventilu. KVV je dále ovlivňován vlhkostí a teplotou vydechovaného vzduchu, které mají vliv na celkový objem a pH KVV, ale naopak nemají vliv na množství přítomných proteinů a dalších látek.

Dále může kvalitu vzorků ovlivnit jejich uchování a zpracování. Při skladování vzorků je velmi důležité, aby veškeré vzorky byly uchovávány za nízké teploty, protože některé látky jsou termolabilní (např. leukotrieny, aldehydy, prostaglandiny) [25]. Doporučená teplota pro skladování vzorků KVV je -80°C, protože za této teploty lze předcházet rozkladu a *in vitro* změnám ve složení biomarkerů KVV. Zároveň ale i opakované zmrazování a rozmrazování vzorků má negativní vliv zejména na stabilitu látek. Z toho důvodu je nutné použít deuterované standardy o známé koncentraci, aby se nejen zvýšila přesnost kvantifikace, ale zároveň je pak možné pozorovat veškeré změny složení vzorků, ke kterým může v průběhu celého procesu docházet.

Pravděpodobně nejzávažnější kontaminací vzorků je kontaminace orální, tedy znečištění vzorků slinami pacienta. Tyto sliny pak obsahují velké množství biomarkerů (např. leukotrieny B₄), které znemožňují přesnou analýzu vzorků. Z toho důvodu je nutné využívat při odběru tzv. lapač slin. Kontaminaci slinami je možné monitorovat stanovením aktivity α -amylasy [24].

Složení KVV je ovlivněno i jídlem a pitím požitým před odběrem KVV. Zejména kyselé, ale i pH neutrální nápoje mohou snížit hodnotu pH. Také při analýze některých mediátorů, o kterých je známo, že jsou obsaženy v jídle nebo pití (jedná se například o nápoje obsahující kofein, které mohou ovlivnit výsledky při měření hladiny adenosinu), je nutné vyhnout se jejich konzumaci i několik hodin před odběrem KVV [24].

Dalším faktorem ovlivňující složení KVV je i kouření, které má vliv na hladiny některých biomarkerů. Konkrétně lze říct, že kouření zvyšuje koncentraci např. 8-isoprostaglandinu F_{2 α} , leukotrienu B₄ a peroxidu vodíku, ale zároveň snižuje koncentraci látek jako je např. interleukin-1 β a glutathion. Zároveň kouření i snižuje hodnotu pH [25].

2.9 Biomarkery astmatu

V KVV je přítomna celá řada biomarkerů, i když většina z těchto biomarkerů se v KVV vyskytuje pouze ve stopových koncentracích. Při analýze biomarkerů je nutné vzít v úvahu jejich buněčný vznik a zároveň i část dýchací soustavy, ve které vznikají [25].

Z těchto dvou lze snadněji určit buněčný původ, který je možné odhadnout ze struktury sloučeniny. Naopak určit přesnou část dýchacího systému, ze které byl daný biomarker uvolněn, představuje zásadní problém a ve většině případů to ani nelze přesně určit [12].

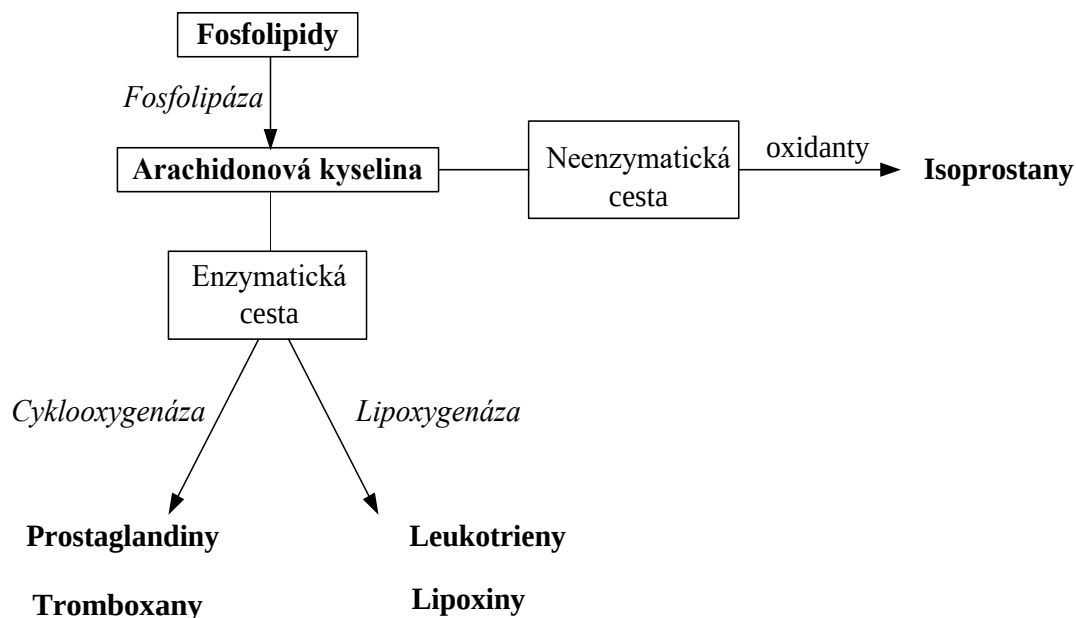
Klinicky relevantní sloučeniny jsou ve většině případů buď spojené s akutním oxidačním stresem, nebo se zánětem dýchacích cest. Zánět představuje jeden z nejdůležitějších ochranných mechanismů a aktivuje celou řadu buněk. Při zánětu je pak spuštěna produkce mnoha specifických mediátorů, mezi které patří zejména deriváty kyseliny arachidonové a reaktivní formy dusíku. Dále v průběhu zánětu také dochází k exacerbacím (vzplanutí nemoci) vedoucím ke vzniku volných radikálů nebo až k oxidačnímu stresu [15].

2.9.1 Metabolity kyseliny arachidonové [25]

Kyselina arachidonová (cis-5,8,11,14-eikosatetraenová kyselina) je vícesytná mastná kyselina, která je přítomná ve fosfolipidových buněčných membránách a umožňuje vznik biomarkerů, které jsou schopny regulovat zánětlivou odpověď. Mezi tyto biomarkery patří např. tzv. eikosanoidy, konkrétně prostanoidy, leukotrieny, isoprostany a lipoxiny (obrázek 13).

Prostanoidy, leukotrieny a isoprostany lze označit jako silné mediátory zánětu. Navíc všechny tři způsobují vazokonstrikci nebo vazodilataci. Naproti tomu lipoxiny mají jako jediné protizánětlivý

účinek. Všechny tyto látky pak vznikají enzymaticky. Jedinou výjimku tvoří isoprostany, které jsou tvořeny neenzymatickou cestou. O lipoxinech a leukotrienech dále pojednává experimentální část práce (kapitoly 4. 1. 2. – 4. 1. 3.).

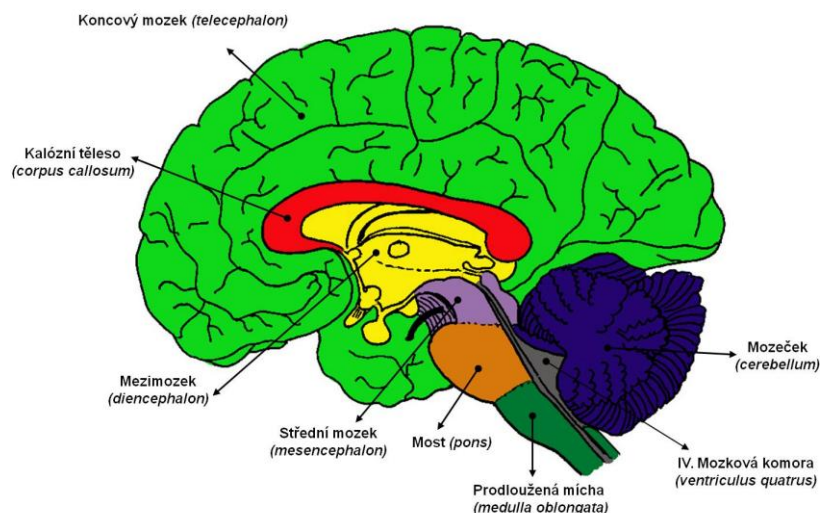


Obrázek 13 - Schéma metabolismu kyseliny arachidonové v organismu [17]

2.9.2 Serotonin

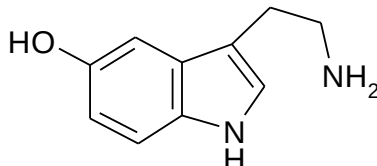
Serotonin (5-hydroxytryptamin, (5-HT)) je neurotransmitter nacházející se primárně v gastrointestinálním traktu (GIT) a centrální nervové soustavě (CNS). V GIT serotonin reguluje střevní pohyby. V CNS se podílí na regulaci nálady, chuti k jídlu, spánku, svalové kontrakce a některých kognitivních funkcí včetně paměti a učení. Je také přítomen v krevních destičkách, kde se podílí na regulaci hemostázy [19].

Serotoninové neurony vznikají ve hřbetní a střední části jader mozkového kmene a v terminálních nervových oblastech mozku jako je *substantia nigra*, *hypothalamus*, *thalamus*, oblast *amygdaly* a *hipokampu*, *caudate nucleu*, *caudate nucleu putamenu* a *nucleu accumbens*, dále v mozkové korové oblasti a mozečku (obrázek 14) [3].



Obrázek 14 - Části mozku [35]

5-HT hraje roli v řadě patofyziologických a neuropsychiatrických poruch. Serotogenní látky mají zásadní význam v neurofarmakologii. Geny kódující různé komponenty 5-HT systému jsou studovány jako rizikové faktory deprese, schizofrenie, obsedantně-kompulzivní poruchy, agrese, alkoholizmu, migrény a autismu [19].



Obrázek 15 - Serotonin

5-HT vzniklý na periférii nemůže působit v CNS, jelikož neprostupuje hematoencefalickou bariérou. Při uvolnění do synaptické šterbiny je velmi silně zpětně vychytáván a v cytosolu je odbouráván enzymem monoamidooxidasou-A (MAO-A) a monoaminooxidasou-B (MAO-B). Proto jsou mnohá léčiva užívaná v psychiatrii založena na principu inhibice zpětného vychytávání serotoninu nebo inhibice enzymu MAO. Do současné doby bylo objeveno 7 typů serotoninových receptorů (5-HT receptory), jejichž prostřednictvím mohou reagovat halucinogenní látky (diethylamid kyseliny lysergové =LSD, psilocibin) nebo euforianty ((+)-3, 4-metylenedioxyamfetamin nazývaný extáze) [2].

Kromě nervového systému působí serotonin i v dalších místech organismu. Je produkován v enterochromafinních buňkách střeva a následně je uložen do krevních destiček. Má vazokonstrikční i vazodilatační účinky a při reakci s 5-HT receptory v mozkových cévách působí proti migréně.

Serotoninový systém je navíc důležitý pro regulaci střevní motility. Při hyperstimulaci serotoninového systému nejčastěji farmakochemickou cestou dochází ke vzniku tzv. serotoninového syndromu, mezi jehož symptomy patří [1, 19]:

- Změny psychického stavu (úzkost, zmatenost)
- Neurologické změny (hyperreflexie, ztráta koordinace)
- Gastrointestinální příznaky (průjem, zvracení)
- Kardiovaskulární příznaky (tachykardie, hypertenze)
- Vegetativní symptomy (pocení, horečka)

2.9.2.1 Receptory serotoninu [3]

Serotoninergní neurotransmise je zprostředkována interakcí 5-HT s heterogenními receptorovými podtypy, které se vyznačují rozdíly v molekulární struktuře, anatomické lokalizaci, mechanismem transdukce signálu a farmakologickými reakcemi na přítomnost agonistů a antagonistů receptorů.

Dosud již bylo identifikováno sedm hlavních tříd (obrázek 16) a minimálně šestnáct molekulárně odlišných receptorových podtypů. Lze je rozdělit na autoreceptory a heteroreceptory.

Autoreceptory se nachází na presynaptických membránách nervových buněk a slouží jako součást zpětné vazby v přenosu signálu. Jsou citlivé pouze na ty neurotransmitery nebo hormony, které se uvolňují do neuronu, na jehož membráně je daný receptor přítomen [21].

Heteroreceptory a také neserotogenní receptory, jsou presynaptické receptory, které reagují na neurotransmitery, neuromodulátory nebo neurohormony uvolněné ze sousedních neuronů nebo buněk.

7 možných interakcí mezi 5-HT a receptory: [3]

5-HT₁ skupina: skládá se z 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} a 5-HT_{1F}, které jsou typické svojí vysokou afinitou k serotoninu. Serotoninová funkce je především regulována 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} a 5-HT_{1D} autoreceptory. Autoreceptor 5-HT_{1A} působí jako inhibitor vzniku akčního potenciálu po otevření draslíkových kanálů. Prostřednictvím aktivace 5-HT_{1B} receptorů, které jsou umístěny na serotogenních axonech, dochází ke snížení koncentrace extracelulárního serotoninu. Vlivem působení 5-HT_{1D} autoreceptorů přítomných v dendridech dochází k autoinhibici serotoninu.

5-HT₂ skupina: 5-HT₂ jsou receptory spojené s G-proteiny, které v současné době zahrnují tři podtypy: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} a 5-HT_{2C} receptory. Tyto podtypy jsou příbuzné v jejich molekulární struktuře, sekvenci aminokyselin a signalizačních vlastnostech. 5-HT_{2A} a 5-HT_{2C} receptory jsou v organismu široce distribuované a ovlivňují funkce v CNS. Antagonismem 5-HT_{2A} a 5-HT_{2C}

receptorů působí některá antipsychotika a antidepresanty. Reakce s 5-HT_{2B} receptory vyvolává kardiovaskulární účinky zahrnující kontrakci cév a tvarové změny krevních destiček.

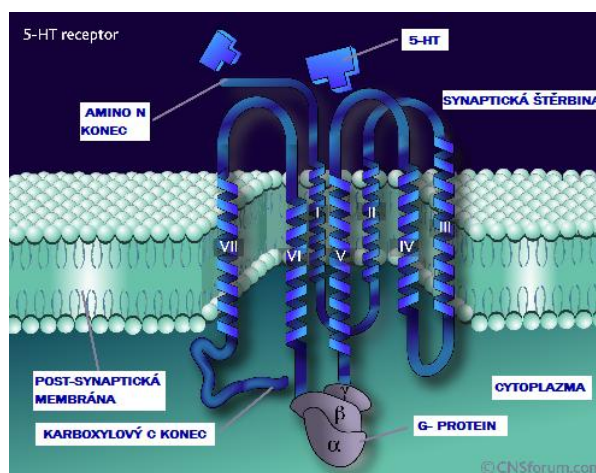
5-HT₃ skupina: tento receptor aktivovaný v centrálním a periferním nervovém systému vyvolává neuronální excitace a uvolňování neurotransmiterů. 5-HT₃ receptory mají silnou strukturální a funkční homologii s nikotinovou formou acetylcholinového receptoru. Stejně jako nikotinové receptory, 5-HT₃ receptory mají zanedbatelnou permeabilitu pro anionty. Tato skupina je složena z podjednotek 5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}, 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} a 5-HT_{3E}.

5-HT₄ skupina: receptory spojené s G-proteinem, které byly izolovány pomocí Escherichia coli. Receptor je široce distribuován v centrálním nervovém systému a periferních tkáních. Hraje důležitou roli ve funkci několika orgánových odpovědí včetně zažívacího traktu, močového měchýře, srdce a nadledvin.

5-HT₅ skupina: je složena ze dvou podjednotek - 5-HT_{5A} a 5-HT_{5B}. Receptor 5-HT_{5A} byl identifikován u myši, krysa a člověka. 5-HT_{5B} receptor se také vyskytuje u myši a krysa, ale u člověka nebyl nalezen. 5-HT₅ snižuje v organizmu hladinu cyklické adenosin monofosfatázy.

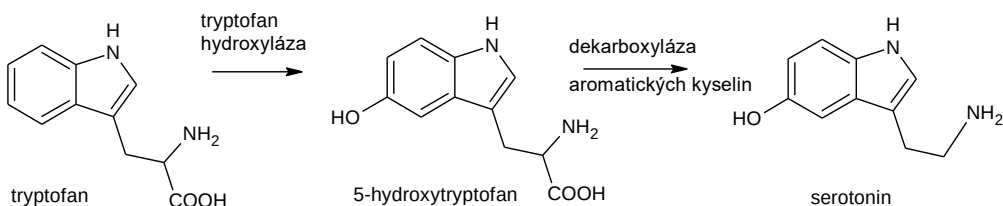
5-HT₆ skupina: receptory s vysokou afinitou k léčivům používaným při psychoterapiích s vysokou schopností exprese v CNS. Vyskytují se převážně v kortikální oblasti a v limbickém systému. Jsou schopné regulovat glutamatergí a cholinergní činnost. Mohou se podílet na schopnosti poznání, krmení, afektivních stavech, úzkosti a epilepsii.

5-HT₇ skupina: podílí se na mnoha behaviorálních a fyziologických procesech. Taktéž se jedná o receptory spojené s G-proteinem. Podílí se na cirkadiálním rytmu, senzoričtém zpracování a regulaci limbických procesů.



Obrázek 16 - Serotoninový receptor a jeho vazba na G protein [3]

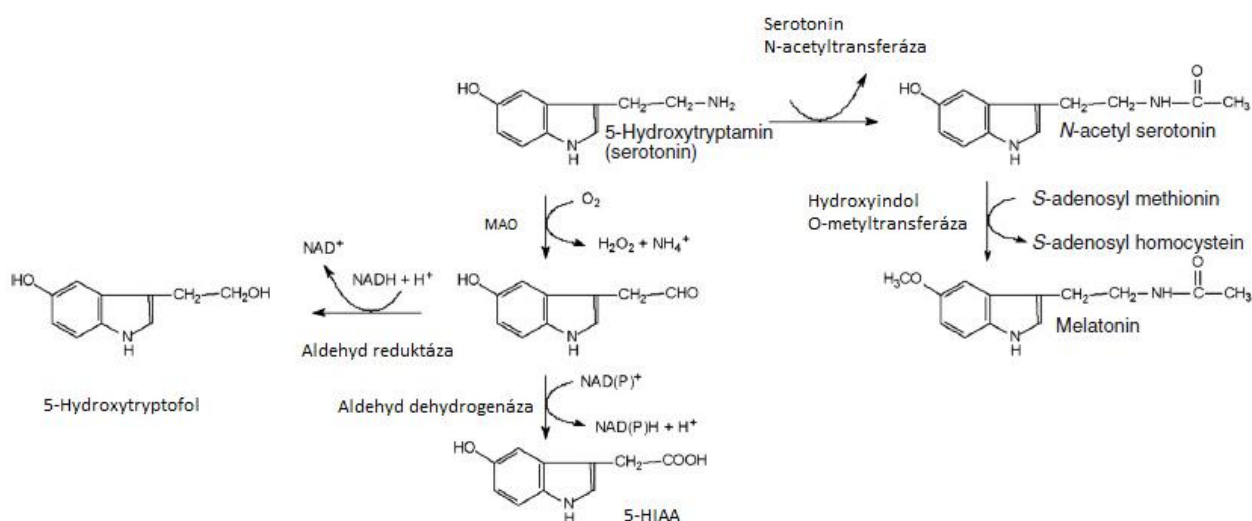
Syntéza serotoninu vychází z nepolární aminokyseliny tryptofanu, který patří mezi esenciální. Pomocí krevního oběhu se tryptofan dostává do mozku, kde se za přítomnosti vitamínu B₆ (pyridoxin) přemění na serotonin. Působením tryptofan hydroxylázy vzniká 5-hydroxytryptofan (viz obrázek 17), který je dekarboxylován pomocí dekarboxylázy aromatických kyselin na serotonin.



Obrázek 17 - Syntéza serotoninu [17]

2.9.2.2 Metabolismus serotoninu

5-HT je metabolizován dvěma metabolickými drahami. Prvním způsob zahrnuje oxidačně deaminované působení inhibitorů monoaminoxidázy (MAO), a to zejména A izoformy, na 5-hydroxyindol-3-yl-acetaldehyd. Tento aldehyd je pak převeden dehydrogenázou na 5-hydroxyindol-3-yl-octovou kyselinu (5-HIAA), která je hlavním oxidačním produktem. Po té proběhne redukce 5-HIAA za přítomnosti aldehyd reduktázy na 5 – hydroxytryptofol (obrázek 18) [3].



Obrázek 18 - Metabolismus serotoninu [17]

Druhým způsobem je biotransformace 5-HT doprovázená vznikem melatoninu v epifýze, která je složená za dvou fází. V první fázi je 5-HT acetylován za přítomnosti N-acetyltransferázy a ve druhé fázi je následně metylován působením hydroxyindoloctové-o-metyltransferázy za vzniku melatoninu (5-metoxy-N-acetyl-serotoninu). Melatonin reguluje mnoho tělesných funkcí, zejména rozmnožování. Dále ovlivňuje cirkadiánní rytmus a působí jako antioxidant [21].

2.9.3 Některé další biomarkery astmatu

Mezi další významné biomarkery spojené s bronchiální obstrukcí patří oxidační stres. Ten je příčinou mnoha akutních a chronických onemocnění a zároveň se výrazně podílí na přirozeném stárnutí organismu. Mezi onemocnění, kde se lze setkat s oxidačním stresem patří kromě bronchiálního astma např. chronická obstrukční plicní nemoc, Alzheimerova choroba nebo arterioskleróza [22].

Za biomarker lze považovat i hodnotu pH. Změna pH se totiž může podílet na patofyziologii obstruktivních onemocnění dýchacích cest. Pokles pH může způsobovat zúžení průdušek nebo může zvyšovat viskozitu hlenu v dýchacích cestách. Průměrná hodnota pH u zdravých jedinců je rovna 7,7. U pacientů trpících astmatem pak byly v KVV zjištěny nižší hodnoty pH (většinou 5 - 6,5) [25].

Dalšími biomarkery jsou dusíkaté deriváty. Zejména oxid dusnatý je již delší dobu jedním z nejvíce pozorovaných vydechovaných biomarkerů zánětu. Dále je u onemocnění jako je astma, chronická obstrukční nemoc nebo cystická fibróza možné pozorovat zvýšené hladiny látek jako jsou např. dusičnany či dusitany [29].

2.10 Pracovní hypotéza

Předkládaná práce se bude majoritně zabývat úzkou skupinou pacientů s bronchiální obstrukcí - obtížně léčitelných astmatiků (OLA). Tito pacienti představují přibližně 5 % z celkového počtu astmatiků a nepůsobí na ně žádná z dosud známých farmakoterapií používaných při léčbě astmatu. Z toho důvodu jsou obtížně léčitelní astmatici prakticky denně vystaveni riziku astmatického záchvatu, které jim zabraňuje v plnohodnotném životě.

V předkládané práci bude prověřován profil biomarkerů obtížně léčitelných astmatiků. Tento profil bude zároveň porovnáván s profilem biomarkerů astmatiků (resp. pacientů reagujících na předepsanou farmakoterapii). Porovnáváním biomarkerů bude dokázána případná shodnost biomarkerů astmatiků i obtížně léčitelných astmatiků. V případě, že biomarkery budou u obou skupin

pacientů rozdílné, bude možné uvažovat o variantě, že obtížně léčitelní astmatici nespádají do skupiny astmatiků, ale že se jedná o odlišné onemocnění demonstrující se bronchiální obstrukcí.

V předkládané práci bude shodnost biomarkerů pacientů prováděna pomocí dvou medicíně diagnostických přístupů využívajících hmotnostně-spektrometrickou analýzu kondenzátu vydechovaného vzduchu. Prvním přístupem bude tzv. molekulární monitoring, kdy budou pozorovány koncentrační hladiny známých biomarkerů u obtížně léčitelných astmatiků, stejně tak i u astmatiků s různými fenotypy tohoto onemocnění a zdravých kontrol. Podle různých hladin těchto biomarkerů pak bude možno porovnat jejich množství a určit zda existuje možnost jejich odlišení pro obtížně léčitelné astma.

Druhým použitým přístupem pak bude tzv. molekulární profilování, kdy bude provedena analýza vzorků získaných ze tří zkoumaných skupin (1/ lidí netrpících astmatem – zdravých kontrol, 2/ astmatiků a 3/ obtížně léčitelných astmatiků). Předpokládaným výsledkem této analýzy pak bude nález biomarkeru, který bude specifický pouze pro skupinu obtížně léčitelných astmatiků, čímž by mohla být potvrzena prvotní hypotéza, že obtížně léčitelné astma je samostatnou chorobou.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Matrice

Jako první krok je nutné zvolit biologický materiál, ze kterého se následně budou získávat biomarkery onemocnění. Existuje celá řada možných matric, ze kterých je možné tyto markery získat. Nejčastěji se jedná o tělní tekutiny (krev, moč, sliny...) a části tkání získané při biopsii. V současné době je nejběžnější získávat potřebné vzorky z krve případně z moči pacientů. Hlavní výhodou těchto dvou matric je jejich relativně snadný odběr, který příliš nezatěžuje organismus pacienta. Mezi další možnosti pak patří odběr mozkomíšního moku (anglicky *central spinal fluid (CSF)*) nebo biopsie. Oba tyto způsoby patří mezi velmi účinné metody, na druhou stranu však jsou poměrně náročné pro pacienta a nelze je provádět s příliš velkou frekvencí.

Společnou nevýhodou zmíněných matric je skutečnost, že se jedná o systémové tekutiny. Krev, která je sice nejčastěji odebíranou látkou, koluje po celém těle a z toho důvodu je pak obtížné přesně určit, z které části těla potřebné markery pocházejí (resp. ve které části těla dochází k pozorovanému biochemickému ději). Z toho důvodu je výhodnější pro odběr využívat látky specifické (resp. látky přítomné pouze na jednom konkrétním místě v organismu, látky, které necirkulují po celém těle, a tak ani neodráží stav celého organismu, ale pouze jeho části). Mezi takové látky lze zařadit např. sliny, mateřské mléko nebo plodovou vodu [14].

Pro určení biomarkerů astmatu je nejpraktičtější matricí k odběru KVV. Vychází se z předpokladu, že aerosolové částice ve vydechaném vzduchu jsou shodné se složením bronchoalveolární extracelulární tekutiny pokrývající povrch dýchacích cest [25].

3.2 Chemikálie

Tabulka 2 - Použité chemikálie

Název chemikálie	Čistota	Dodavatel
Acetonitril	LC-MS	Fisher Scientific, USA
Voda	LC-MS	Fisher Scientific, USA
Octan amonný	99,99%	Sigma Aldrich, USA
Propan-2-ol	LC-MS	Acros Organics, USA
Methanol	LC-MS	Fisher Scientific, USA
Kyselina mravenčí	LC-MS	Fisher Scientific, USA
Kyselina octová	≥ 99,8 %	Acros Organics, USA
Butylhydroxytoluen (BHT)	≥ 99 %	Sigma–Aldrich, USA

Tabulka 3 – Standardy

Název chemikálie	Čistota	Dodavatel
Leukotrien B ₄ -d ₄	≥ 97%	Cayman Chemical, USA
Leukotrien C ₄	≥ 97%	Cayman Chemical, USA
Leukotrien C ₄ -d ₅	≥ 99%	Cayman Chemical, USA
Leukotrien D ₄	≥ 97%	Cayman Chemical, USA
Leukotrien D ₄ -d ₅	≥ 99%	Cayman Chemical, USA
Leukotrien E ₄	≥ 97%	Cayman Chemical, USA
Leukotrien E ₄ -d ₅	≥ 99%	Cayman Chemical, USA
Lipoxin A ₄	≥ 95%	Cayman Chemical, USA
Lipoxin B ₄	≥ 95%	Cayman Chemical, USA

Tabulka 4 – Plyny

Název chemikálie	Čistota	Dodavatel
Dusík	99,50%	Generátor dusíku, Peak Scientific, USA
Helium	5,5	SIAD
Argon	5	SIAD

3.3 Přístroje

3.3.1 LC-MS/MS

LC–MS/MS analýzy byly prováděny pomocí dvou hmotnostních spektrometrů. Pro stanovení LTB₄, cysteinylovaných leukotrienů a lipoxinů byl použit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem TSQ Vantage (Thermo Scientific, USA) spojen s kvartérní vysokotlakou pumpou Accela 600 Pump (Thermo Scientific, USA), autosamplerm Open Accela AS (Thermo Scientific, USA) a kolonovým termostatem UltiMate 3000 (Dionex, USA) (obrázek 19).

**Obrázek 19 - TSQ VANTAGE**

Pro metabolický screening byl použit hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, USA), obsahující dva analyzátory - orbitrapovou past a linerání iotovou past, spojený s kvarterní pumpu Accela 600 Pump (Thermo Scientific, USA) a autosamplerm Open Accela AS (Thermo Scientific, USA) (obrázek 20).



Obrázek 20 - LTQ ORBITRAP VELOS

3.3.2 Ostatní přístroje

- Minishaker IKA MS3 digital (GmbH & Co. KG, Německo)
- Chlazená centrifuga Universal 320R (Hettich, UK)
- Trigon-plus RC lyofilizátor
- Ultrazvuková lázeň Sonorex digitec Bandelin (GmbH & Co. KG, Německo)
- Kondenzátor dechu EcoScreen (Jaeger, Německo)

3.3.3 Chromatografické kolony

- Hypercarb 100 x 2,1 mm, 5 μ m (Thermo Scientific, USA)
- Gemini C18 NX 150 x 2,0 mm (Phenomenex, USA)

3.3.4 Software

- XCalibur 2.2 (Thermo Scientific, USA)
- Sieve 2.1 (Thermo Scientific, USA)
- XLSTAT 2015 (Addinsoft, USA)

3.4 Odběr biologických vzorků

3.4.1 Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu

Vzorky KVV byly získány klidovým dýcháním do kondenzátoru EcoScreen. Odběr trval 5 – 12 minut. Celkově bylo získáno 1 – 2 ml kondenzátu (po dosažení objemu 120 litrů vydechovaného vzduchu). Aby bylo zabráněno dýchání nosem, byla pacientovi/dobrovolníkovi nasazena nosní svorka.

Takto nasbíraný kondenzát byl o přesném objemu přemístěn do mikrozkušavky se 100 pg deuteriovaných vnitřních standardů (LTC₄-d₅, LTD₄-d₅, LTE₄-d₅, 8-iso-PGF_{2α}-d₄) a 100 ng antioxidantu BHT. Ihned po odběru byly vzorky skladovány při – 80 °C.

3.5 Extrakce biomarkerů z biologických matric

3.5.1.1 Zpracování vzorků KVV pro metabolické profilování

Vzorky KVV byly zakoncentrovány extrakcí na pevné fázi na kolonce Bond elut C18. Před nanesením vzorku byla kolonka nejprve zaktivována promytím 5 x 1 ml metanolu a 3 x 1 ml 0,05 M vodného roztoku kyseliny mravenčí. Následně byl nanesen 1 ml KVV a matrice tohoto biologického vzorku byla odstraněna 2 x 1 ml vody. Sledované látky byly z kolonky vymyty 1 ml metanolu. Použitím proudu dusíku byla získaná frakce odpařena dosucha. Před samotnou LC-MS/MS analýzou byl zbytek rozpuštěn v 50 µl směsi skládající se ze 70 % acetonitril, 30 % voda.

3.5.2 Zpracování vzorků KVV pro metabolický fingerprinting

Kvůli zkoncentrování netěkavých látek rozpuštěných ve vodě byly vzorky KVV lyofilizovány (objem vzorků KVV byl 1 ml). Tato metoda umožňuje zachovat původního složení biologicky aktivních látek. K zlyofilizovanému vzorku bylo přidáno 100 µl LC-MS acetonitrilu a tato směs byla umístěna na třepačku, kde byla ponechána 5 minut, a následně byla odstředěna (10 min, 4 °C, 10 000 g), aby ulpělé látky na vnitřním povrchu mikrozkušavky byly staženy do roztoku. Připravené roztoky byly analyzovány LC-MS metodou.

3.6 LC-MS/MS analýza

3.6.1 Metabolické profilování

Izokratická separace lipoxinů a leukotrienů byla provedena pomocí HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Jako stacionární fáze byla použita kolona Hypercarb a stejně jako mobilní fáze se skládala ze směsi o složení 75 % propan-2-ol s přidavkem kyseliny mravenčí (1 % v/v) a 25 % octanu amonného (10 mmol/l, vodný roztok). Po celou dobu měření docházelo ke konstantnímu

průtoku mobilní fáze, kdy byl tento průtok nastaven na 150 $\mu\text{l}/\text{min}$. Teplota chromatografické kolony byla 40 $^{\circ}\text{C}$. Objem nástriku činil 10 μl .

Tabulka 5 – Parametry režimu SRM pro metabolity

Analyt	Mateřský ion m/z	Produkovaný ion m/z	Kolizní energie eV
Leukotrien C ₄	624	351	27
Leukotrien C ₄ -d ₅	629	356	27
Leukotrien D ₄	495	477	21
Leukotrien D ₄ -d ₅	500	482	21
Leukotrien E ₄	438	333	21
Leukotrien E ₄ -d ₅	443	338	19
Lipoxin A ₄	351	115	17
Lipoxin B ₄	351	221	17

Detekce byla provedena tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) s elektrosprejem pracující v negativním ionizačním módu (ESI). ESI-MS analýza byla provedena v SRM (anglicky *Selected Reaction Monitoring*) módu založeném na detekci konkrétních produktových iontů (viz tabulka 5). Podmínky na hmotnostním spektrometru byly zoptimalizovány na následující hodnoty (tabulka 6).

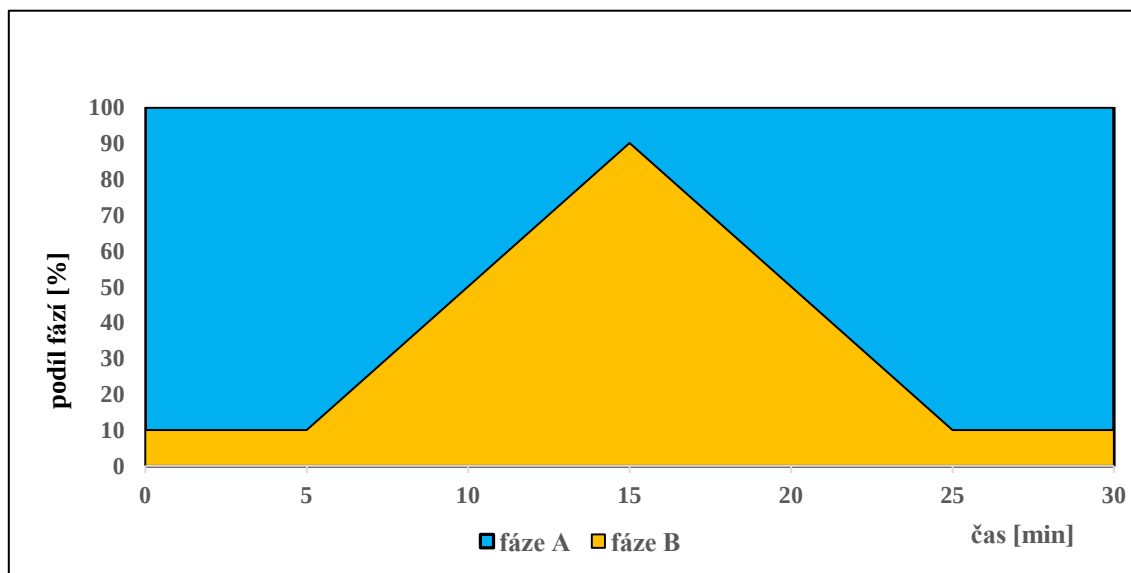
Tabulka 6 - Parametry použité u hmotnostního spektrometru; data byla měřena a zpracovávána využitím softwaru XCalibur 2.2 (Thermo Scientific, USA).

Parametr	Hodnota	Jednotka
Napětí na jehle	-2 500	V
Teplota elektrospreje	300	$^{\circ}\text{C}$
Tlak nosného plynu (dusík)	35	Psi
Tlak pomocného plynu (dusík)	10	Arb
Teplota kapiláry	300	$^{\circ}\text{C}$

3.6.2 LC Metabolický fingerprinting

Metabolity KVV byly analyzovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií.

Chromatografická separace byla provedena na koloně Gemini C18 NX. Mobilní fáze se skládala z 10 mM vodného roztoku octanu amonného (A – viz obr. 21) a LC-MS acetonitrilu (B). Na počátku analýzy byl podíl zmíněných mobilních fází 90 % fáze A a 10 % fáze B. Po pěti minutách bylo procento mobilní fáze A lineárně sníženo až na hodnotu 10 %. Během dalších 10 minut následoval lineární růst mobilní fáze A na 90 %. Tato hodnota byla udržena až do konce analýzy (30. minuta) konstantní. Průběh gradientové eluce je znázorněn na obrázku 21.



Obrázek 21 - Gradientový program LC metody pro stanovení biomarkerů

Průtok mobilní fáze byl po celou dobu měření konstantní - 150 $\mu\text{l}/\text{min}$. Nástřik vzorků činil 10 μl .

Pro detekci byl použit hmotnostní spektrometr LTQ Orbitrap Velos, který měřil v rozsahu m/z 80 – 1500 Da za podmínek popsanych v tabulce 7.

Tabulka 7 - Parametry použité u hmotnostního spektrometru

Parametr	Hodnota	Jednotka
Kolizní energie	35	eV
Napětí na jehle	3 000	V
Teplota elektrospreje	300	°C
Tlak nosného plynu (dusík)	35	Psi
Tlak pomocného plynu (dusík)	10	Arb
Teplota kapiláry	300	°C

3.7 Statistická analýza

Naměřená data byla zpracována v softwarech XLSTAT 2015 (Addinsoft, USA) a SIEVE 2.1 (Thermo Scientific, USA).

V programu XLSTAT bylo provedeno profilování metabolitů vzniklých z kyseliny arachidonové (LTC₄, LTD₄, LTE₄, LXA₄, LXB₄) a grafické výstupy byly vyjádřeny pomocí krabicových diagramů a rozptylových diagramů komponentního skóre.

Druhým softwarem byl následně proveden metabolický fingerprinting, který umožňuje hledání nových neznámých metabolitů v biologických matricích. Výpočet byl prováděn v režimu Two Sample Differential Analysis (TSDA). TSDA je metoda sloužící k odlišení dvou sad vzorků (nemocní vs. kontrola) bez odečtení pozadí. Identifikace nejvýznamnějších píků, byla provedena pomocí internetové databáze HMDB – Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca>) a celkovým výstupem je bezrozměrný 3D graf nesoucí informaci o korelaci jednotlivých pacientů či kontrol.

3.8 Klinická studie

Ve spolupráci s FN Hradec Králové, Klinikou pracovního lékařství 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Klinikou pneumologie a fteologie FN Plzeň byla realizována klinická studie, která se skládala z diferenciální diagnostiky pacientů s OLA a zdravých dobrovolníků.

Skupina OLA obsahovala 60 osob, z toho 35 žen a 25 mužů, medián věku 54 a průměr věku 53 let. Kontrolní skupina, zdraví nekuřáci bez diagnózy astmatu a alergie, čítala 30 osob, z toho 16 žen a 14 mužů, medián věku 43 let.

U obou skupin byly v KVV sledovány biomarkery, vzniklé z fosfolipidových membrán viz tabulka 8.

Tabulka 8 – Biomarkery stanovené v KVV

Biomarker	Označení
Leukotrien C ₄	LTC ₄
Leukotrien D ₄	LTD ₄
Leukotrien E ₄	LTE ₄
Lipoxin A ₄	LXA ₄
Lipoxin B ₄	LXB ₄

Cílem klinické studie byla detekce a identifikace známých a nových biomarkerů, které mohou přispívat k fenotypizaci pacientů trpících OLA.

4. Výsledky a diskuse

V současné době dochází k velkému rozvoji personalizovaného přístupu k diagnostice onemocnění. Tato diagnostika využívá analýzu malých molekul, často metabolitů různých biochemických drah v řadě tělních tekutin (KVV, moč, krevní plazma, sliny, cerebrospinální mok, atd.). Principem předkládané metabolické analýzy je hledání biomarkerů, jejichž zvýšená či snížená hladina může poukazovat na probíhající patologický proces v dýchacích cestách. Stanovení koncentračních hladin těchto biomarkerů může vést nejen k diagnostice, ale až k fenotypizaci onemocnění. Vzhledem k neinvazivnosti molekulární diagnostiky v KVV je možné stanovení biomarkerů opakovat v krátkých časových intervalech a monitorovat tak průběh onemocnění, ale zároveň i efektivnost aplikované farmakoterapie.

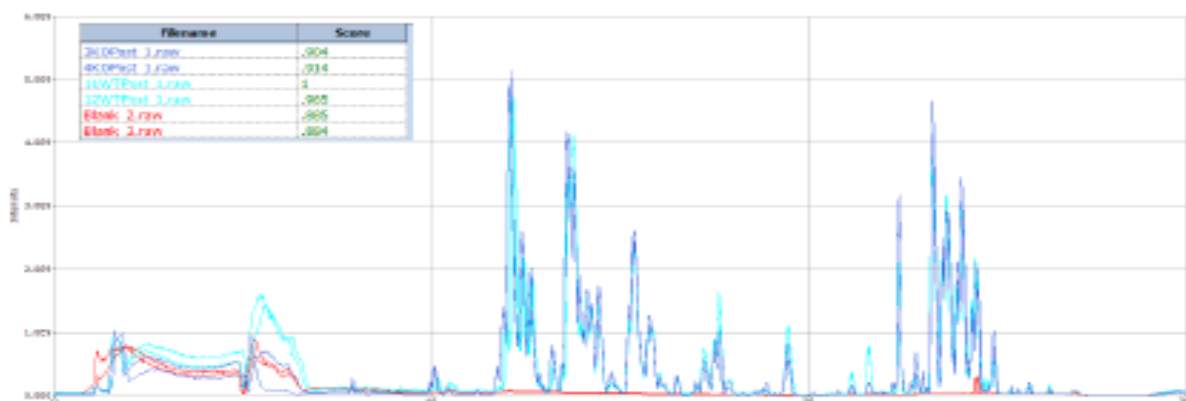
Cílem předkládané práce bylo vyvinout vlastní metodiku multimarkerového screeningu, který by měl přispět k fenotypizaci plicních nemocí. Při vývoji diagnostické metody ideálně sloužící k fenotypizaci nemocí spojených s bronchiální obstrukcí by měly být použity dva odlišné analytické přístupy využívající vysoce specifické metody hmotnostní spektrometrie k molekulární analýze kondenzátu vydechaného vzduchu – tzv. “metabolický fingerprinting” a “metabolické profilování”. Tyto metody by měly být použity při klinických studiích, které by následně měly být statisticky vyhodnoceny.

4.1 Metabolický „fingerprinting“

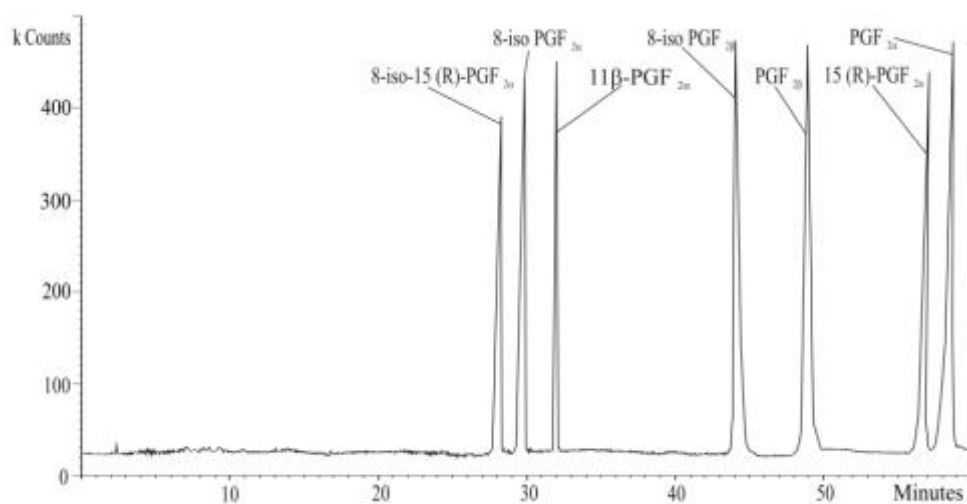
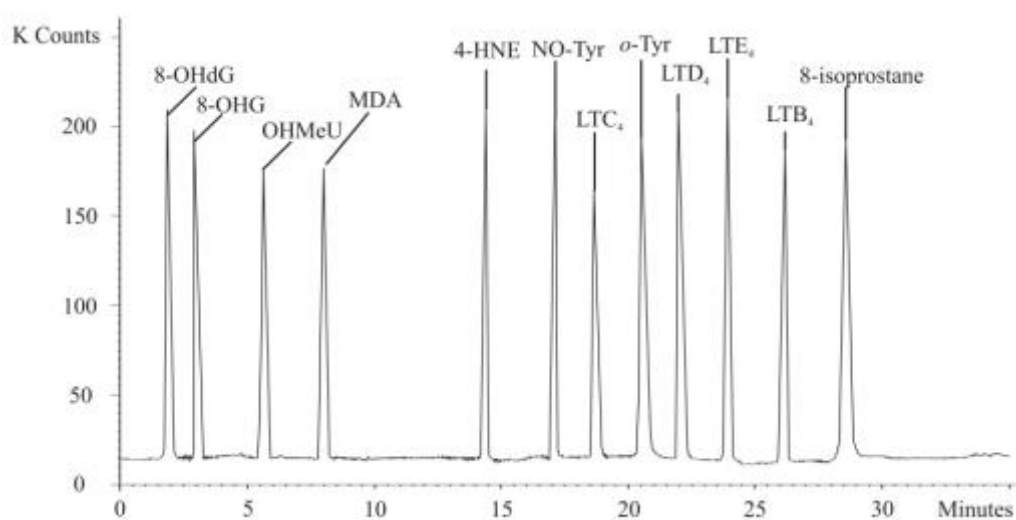
Cílem metabolického screeningu bylo detekovat a kvantifikovat látky, které mají souvislost s onemocněními diagnosticky zahrnovanými jako bronchiální astma a to ve skupině klinických vzorků rozčleněnými do skupin dle výsledků „standardních klinických vyšetření“ jako:

- a/ Profesní (pracovní) astma
- b/ Přetrvávající střední astma bez farmakoterapie glukokortikoidy
- c/ Přetrvávající střední astma s farmakoterapií glukokortikoidy
- d/ Obtížně léčitelné astma
- e/ Kontrolní skupina

Klinické vzorky KVV takto diagnostikovaných pacientů byly analyzovány, relativní kvantifikace spočívala v porovnání ploch pod křivkou mezi pacienty s různými fenotypy astmatických onemocnění a zdravými kontrolami. Typické chromatogramy, které demonstrují molekulární komplexnost biologické matrice kondenzátu vydechaného vzduchu, jsou zachyceny na následujících obrázcích 22 a 23.



Obrázek 22 - HPLC-MS chromatogramy vzorků KVV pacientů s různým fenotypem bronchiálního astmatu a zdravými kontrolami



Obrázek 23 - HPLC-MS chromatogramy vzorků KVV pacientů s různým fenotypem bronchiálního astmatu a zdravými kontrolami – iontové chromatogramy vybraných biomarkerů (oxidačního stresu, astmatu, zánětu)

Tabulka 9 **Identifikované biomarkery v KVV astmatiků**

Marker	Onemocnění	Původ
MDA Malondialdehyd	Marker oxidačního stresu	ω -3 a ω -6 nenasycených mastných kyselin, generováno z fosfolipidů
HNE 4-Hydroxy- <i>trans</i> -nonenal	Marker oxidačního stresu	ω -3 a ω -6 nenasycených mastných kyselin, generováno z fosfolipidů
HHE 4-Hydroxy- <i>trans</i> -hexenal	Marker oxidačního stresu	ω -3 a ω -6 nenasycených mastných kyselin, generováno z fosfolipidů
C6 Hexenal	Marker oxidačního stresu	ω -3 a ω -6 nenasycených mastných kyselin, generováno z fosfolipidů
C7 Heptenal	Marker oxidačního stresu	ω -3 a ω -6 nenasycených mastných kyselin, generováno z fosfolipidů
C8 Octanal	Marker oxidačního stresu	ω -3 a ω -6 nenasycených mastných kyselin, generováno z fosfolipidů
C9 Nonenal	Marker oxidačního stresu	ω -3 a ω -6 nenasycených mastných kyselin, generováno z fosfolipidů
C10 Dekanal	Marker oxidačního stresu	ω -3 a ω -6 nenasycených mastných kyselin, generováno z fosfolipidů
C11 Undekanal	Marker oxidačního stresu	ω -3 a ω -6 nenasycených mastných kyselin, generováno z fosfolipidů
C12 Dodekanal	Marker oxidačního stresu	ω -3 a ω -6 nenasycených mastných kyselin, generováno z fosfolipidů
C13 Tridekanal	Marker oxidačního stresu	ω -3 a ω -6 nenasycených mastných kyselin, generováno z fosfolipidů
LTB4 Leukotriene B4	Marker zánětlivé reakce	Kyselina arachidonová, působením enzymů; poškození fosfolipidů
LTC4 Leukotriene C4	Alergická reakce	Kyselina arachidonová, působením enzymů; poškození fosfolipidů
LTD4 Leukotriene D4	Alergická reakce	Kyselina arachidonová, působením enzymů; poškození fosfolipidů
LTE4 Leukotriene E4	Alergická reakce	Kyselina arachidonová, působením enzymů; poškození fosfolipidů
5-HOMeU 5-hydroxymethyl Uracil	Marker oxidačního stresu	Poškození nukleových kyselin (DNA)

8-OHG 8-hydroxy Guanosine	Marker oxidačního stresu	Poškození nukleových kyselin (RNA)
8-OHdG 8-hydroxy2'-deoxy Guanosine	Marker oxidačního stresu	Poškození nukleových kyselin (DNA)
o-Tyr o-tyrosine	Marker oxidačního stresu	Poškození aminokyselin
NO-Tyr 3-nitro-tyrosine	Marker oxidačního stresu	Poškození aminokyselin
Cl-Tyr 3-chlor-tyrosine	Marker oxidačního stresu	Poškození aminokyselin

Statistickým vyhodnocením vzorků KVV u pacientů s různými fenotypy bronchiálního astmatu bylo detekováno a strukturně určeno velké množství látek, od metabolitů až po léčiva. V porovnání skupin pacientů s bronchiálním astmatem a zdravými kontrolami byly zachyceny statisticky významné molekulární rozdíly, kterých by bylo možné využít jako biomarkerů oddělujících jednotlivé skupiny od sebe navzájem a to: v oblasti látek ze skupiny cysteinylovaných leukotrienů, které se již dnes využívají pro molekulární diagnostiku onemocnění s obstrukcí dýchacích cest a paralelně s tím v oblasti látek, jejichž množství paradoxně klesá při výskytu těchto onemocnění - lipoxinů. Těmto dvěma skupinám látek byla v rámci předkládané práce věnována další pozornost a byly využity pro metabolické profilování.

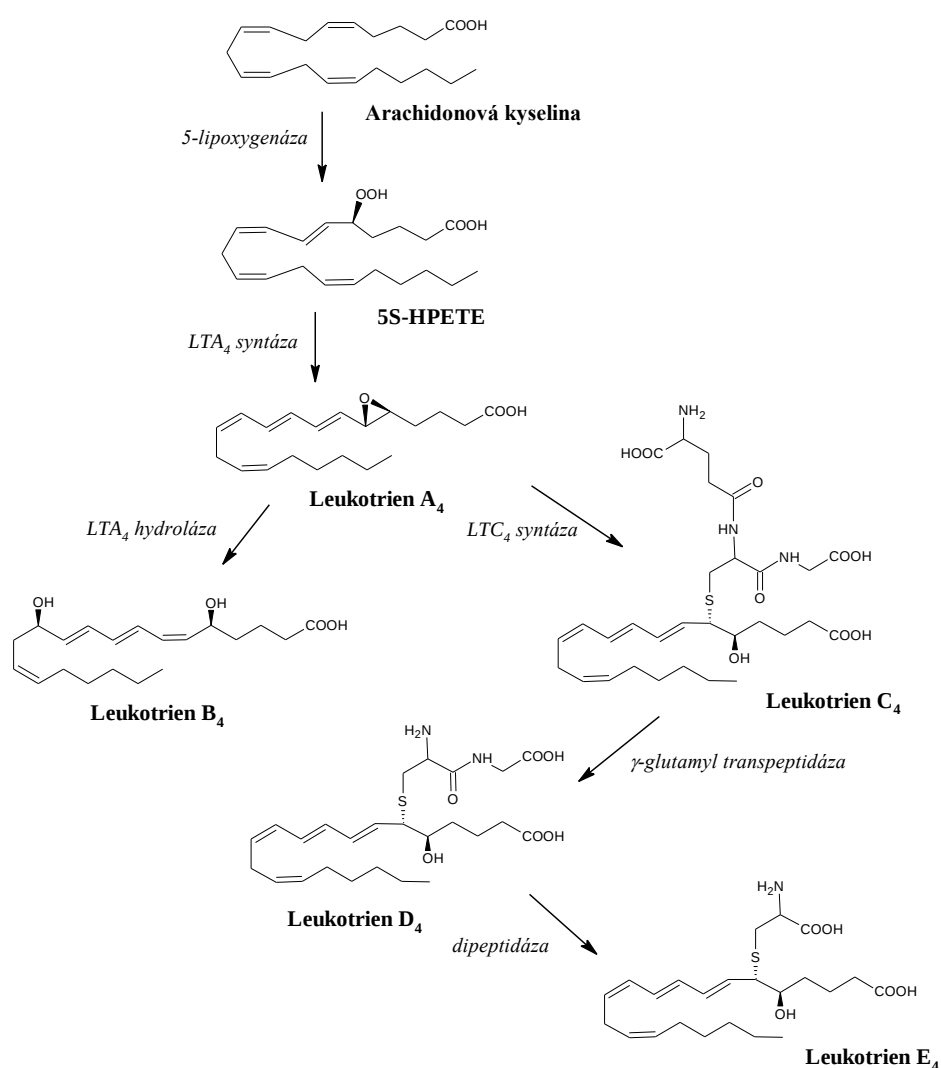
4.1.1 Cysteinylované leukotrieny

Leukotrieny (LTs) jsou zánětlivé mediátory, které se dělí na dvě skupiny podle svého účinku a místa působení. Do první patří leukotrien B₄ (LTB₄), který vzniká v monocitech, neutrofilech a alveolárních makrofázích. Jeho autakoidním „úkolem“ je aktivovat celou řadu imunitních efektorových buněk a je hlavním účastníkem v patogenezi různých zánětlivých onemocnění. Nemá vliv na hladké svalstvo, ale může přispívat k zúžení dýchacích cest zvýšením sekrece hlenů a tvorbou lokálního edému.

Druhá skupina leukotrienů obsahuje leukotrien C₄, leukotrien D₄ a leukotrien E₄, označované společným názvem cysteinylované leukotrieny (cys-LTs), které jsou formovány eozinofily, bazofily, žírnými buňkami a makrofágy. Jejich receptory (cys-LT receptory) jsou především na buňkách hladkých svalů a tkáních dýchacích cest a navázáním cys-LTs dochází k bronchiální hyperreaktivitě a bronchokonstrikci. Na receptor Cys-LT₁ se váží všechny cysteinylované leukotrieny a jejich navázáním se vyvolá obstrukce dýchacích cest (stažení průdušek a průdušinek, edém sliznice, zvýšení sekrece hlenu). Receptor Cys-LT₂ může být aktivován pouze leukotriem C₄, který způsobuje stažení plicních cév. Hladina cysteinylovaných leukotrienů v KVV je významně vyšší u pacientů s astmatem oproti zdravým jedincům.

Leukotrieny obecně vznikají syntézou z kyseliny arachidonové, kdy působením enzymu 5-lipoxygenáza (5-LO) se volná arachidonová kyselina oxiduje na 5S-hydroperoxyeikosa-6,8,11,14-

tetraenovou kyselinu (5S-HPETE). 5-HPETE se LTA syntetázou přemění na nestabilní leukotrien A₄ (LTA₄), který se ihned metabolizuje při zánětlivých procesech na LTB₄ enzymem LTA₄ hydrolázou nebo při průběhu alergické reakce se přeměňuje na LTC₄ působením LTC₄ syntetázou, a tím vzniká „první člen“ skupiny cysteinylovaných leukotrienů. Následně γ -glutamyl transpeptidáza metabolizuje LTC₄ na LTD₄, který se dipeptidázou přemění na LTE₄ (viz obrázek 24). Biosyntéza LTs vyžaduje aktivaci buněk včetně IgE receptoru na povrchu žírných buněk a pro aktivaci 5-lipoxygenázy musí být přítomen protein FLAP (5-lipoxygenase activating protein), který se váže na 5-LO a umožňuje tak syntézu leukotrienů (obrázek 24) [17].

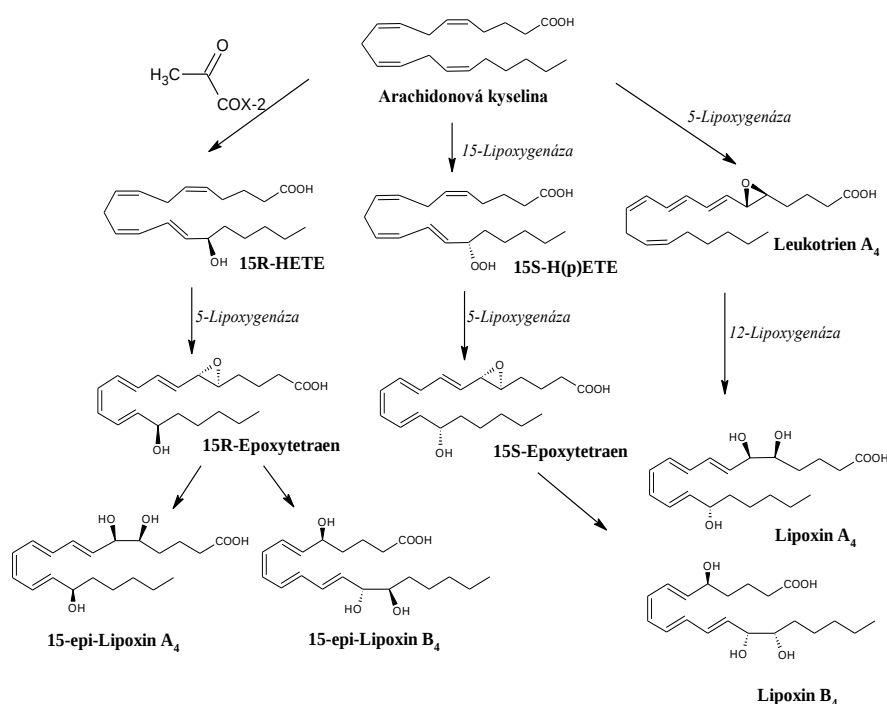


Obrázek 24 - Syntéza leukotrienů [17]

4.1.2 Lipoxiny

Lipoxiny (LXs) a jejich epimery 15-epi-lipoxiny jsou protizánětlivými mediátory, které podporují rekonstrukční proces po záchvatu, kdy jsou T-lymfocyty odstraněny z plic a obnovuje se

jejich normální funkce. Lipoxiny jsou tak, jako leukotrieny deriváty arachidonové kyseliny a vznikají několika cestami za pomoci enzymů lipoxygenáz (LOs). První z nich je zprostředkována 15-lipoxygenázou (15-LO), která je přítomna v tkáňových buňkách dýchacích cest a zahajuje tak biosyntézu LXs. Prvním krokem je oxidace kyseliny arachidonové na 15S-hydroperoxyeikosa-5, 8, 11, 13-tetraenovou kyselinu (15S-HPETE), která se v leukocytech za katalýzy 5-LO přemění na 15S-epoxytetraen, který samovolně přechází na lipoxin A₄ nebo lipoxin B₄. K další možné cestě vzniku LXs dochází v trombocytech oxidací leukotrienu A₄ za pomoci 12-lipoxygenázy (12-LO). Nejen že tyto dvě syntézy umožňují produkci LXs, ale zároveň redukuje produkci leukotrienů. Poslední cesta je podmíněna acetylsalicylovou kyselinou (ASA), která má antiflogistické účinky a inhibuje tak tvorbu prostaglandinů. ASA v monocitech, endoteliálních a epitelárních buňkách acetyluje enzym cyklooxygenázu-2 (COX-2), která vnáší do 15R-hydroxyeikosa-5, 8, 11, 13-tetraenové kyseliny (15R-HETE) hydroxylovou skupinu. 15R-HETE se v leukocytech působením 5-LO přemění na 15R-epoxytetraen, který poté konvertuje na 15-epi-lipoxiny (15-epi-LXA₄ a 15-epi-LXB₄). Tyto epimery se jinak nazývají aspirinem spouštěné LXs (aspirin-triggered LXs, ALT) a od LXs se liší nejen izomerií hydroxylové skupiny, ale také mají silnější a déle působící účinky, kvůli pomalejšímu odbourávání v organismu. Všechny zmíněné syntézy jsou shrnuty na obrázku 25 [17].



Obrázek 25 - Syntéza lipoxinů [17]

4.1.3 Metabolické profilování

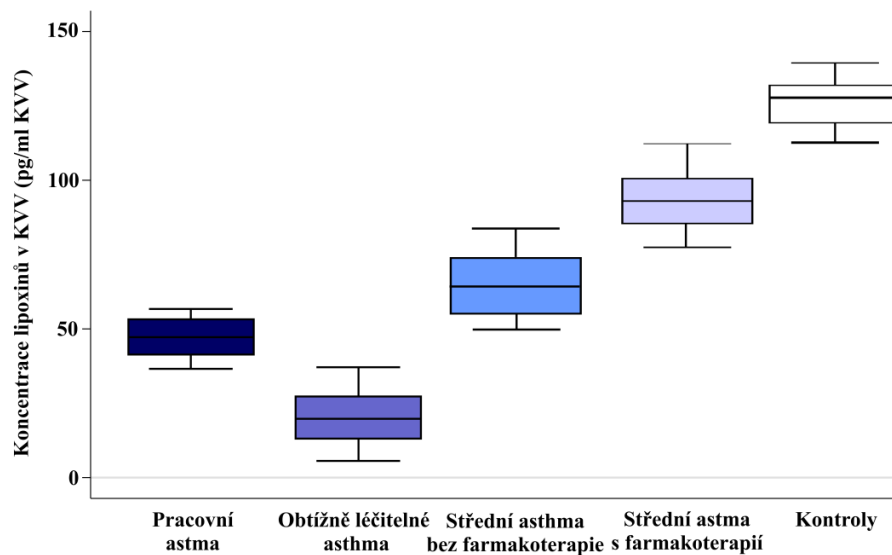
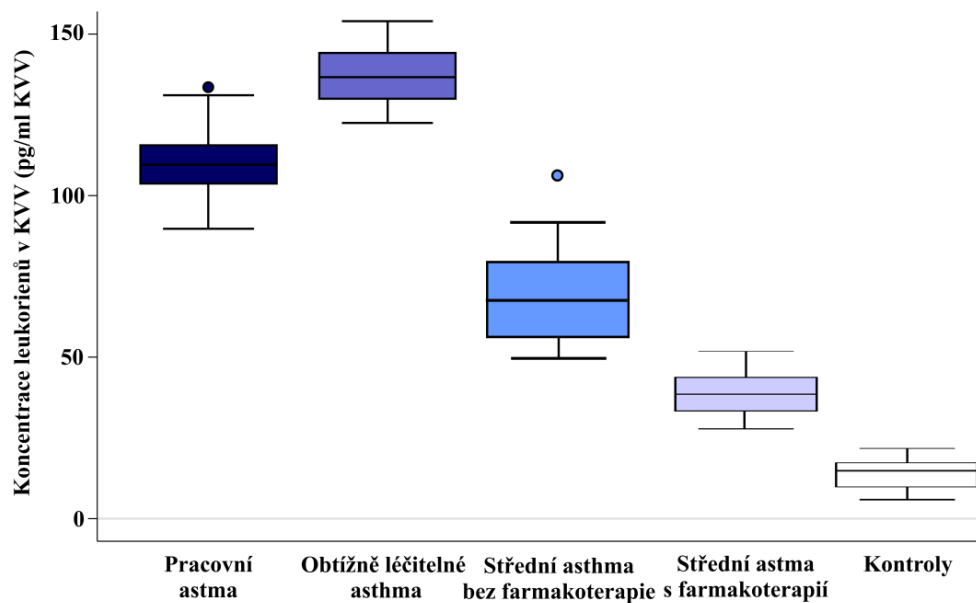
Cílem klinické studie bylo ověřit koncentrační hladiny biomarkerů alergické reakce (LTC_4 , LTD_4 a LTE_4) a látek působících protizánětlivě (LXA_4 , LXB_4) v KVV. Byly provedeny HPLC-MS analýzy (viz experimentální část) a získána data o koncentračních úrovních výše zmíněných látek v klinických vzorcích pacientů s vybranými fenotypy astmatického onemocnění a kontrolní skupiny.

Z výsledků uvedených na obrázku 26 je zřejmé, že v KVV bylo nalezeno zvýšené množství zánětlivých cysteinylovaných leukotrienů (LTC_4 , LTD_4 a LTE_4), přičemž hladina u pacientů s OLA byla nejvyšší ze všech pozorovaných skupin. Zcela originální informací doposud v literatuře nezachycenou jsou naproti tomu hladiny protizánětlivých látek – lipoxinů, které byly významně zvýšeny u skupiny zdravých dobrovolníků. Výsledky jsou shrnuty krabicovými diagramy na obrázku 26.

Na základě uvedených výsledků je zřejmé, že látky z oblasti cysteinylovaných leukotrienů a lipoxinů, které jsou v organismu generovány, mohou sloužit pro diferenciální diagnostiku bronchiálního astmatu, přičemž možnost využití biomarkerů pocházejících ze stejné mateřské molekuly - leukotrienu A_4 produkovanému za pomoci 12-lipoxygenázy (12-LO) odráží rovnovážný vztah mezi cysteinylovanými leukotrieny na straně jedné a lipoxinů na straně druhé zpřesňuje molekulární diagnostiku. Nejen že tyto dvě informace – koncentrační hladina cysteinylovaných leukotrienů a lipoxinů jsou doplňkové a existuje mezi nimi vztah tzv. dynamické rovnováhy („flip-flap relationship“ tj. pokud roste koncentrační hladina prozánětlivých leukotrienů, tak příslušně klesá hladina protizánětlivých lipoxinů). Tento fakt je dán skutečností, že biochemické syntézy v organismu umožňující produkci lipoxinů, zároveň redukuje produkci leukotrienů a naopak, což bylo experimentálně potvrzeno. Kombinace těchto dvou skupin biomarkerů tak představuje velice zajímavou možnost z hlediska molekulární diagnostiky, která může být použita pro fenotypizaci onemocnění astmatických onemocnění, jak je zřejmé z obrázku 26, kde je popsán princip rovnováhy mezi protizánětlivými lipoxiny na straně jedné a prozánětlivými leukotrieny na straně druhé („princip houpačky“).

Takto vyvinutá metodika využitelná v diagnostice astmatických onemocnění byla využita v paralelní studii, kdy byla ověřena možnost jejího využití pro monitorování účinnosti antiastmatické farmakoterapie, v tomto případě farmakoterapie steroidními léčivy na bázi glukokortikoidů. Výsledky jsou shrnuty na obrázku 27, kde je zachycena klinická studie zahrnující 30 subjektů s farmakoterapií inhalačními glukokortikoidy, 30 subjektů po perorální kortikosteroidní terapii a 30 subjektů kontrolní skupiny.

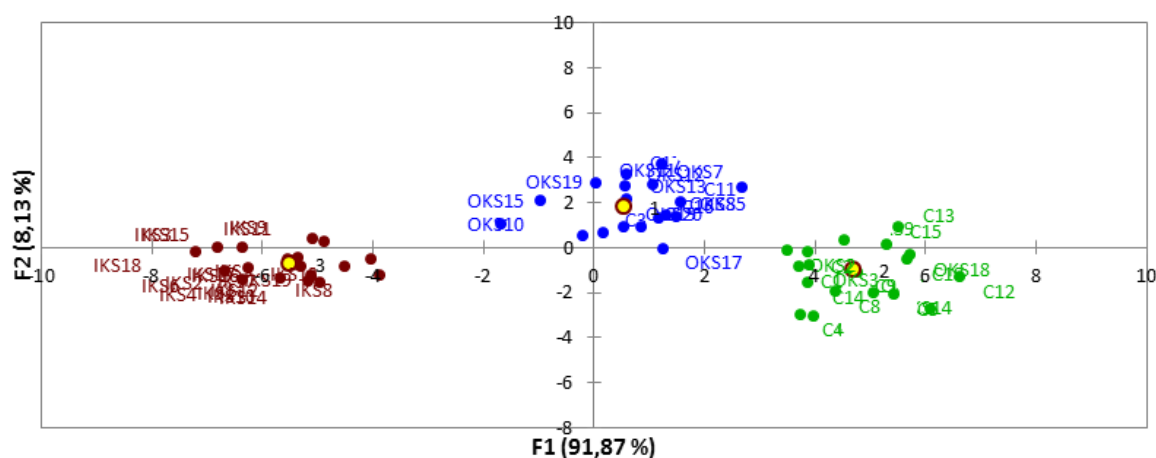
Z předložených výsledků hmotnostně spektrometrické analýzy je zřejmé, že došlo k vytvoření tří shluků, kdy první skupina obsahovala pouze kontrolní skupinu pacientů, a zbylé dvě skupiny se oddělily podle způsobu aplikace farmakoterapie. Z obdržených výsledků je zřejmé, že předepsané dávkování a aplikace je jednoznačně vhodnější v případě perorálního podání, kdy shluk odpovídající



(legenda: + aritmetický průměr, • minimum/maximum, o odlehlá hodnota, x extrémní hodnota)

Obrázek 26 Statisticky vyhodnocená klinická studie; horní graf = cysteinylované leukotrieny, dolní graf = lipoxiny

této terapii se více blíží zdravým jedincům, než je tomu v případě inhalační terapie. Samozřejmě toto nabízí celou řadu vysvětlení v oblasti biologických dostupností atd. Nicméně obdrženy výsledek jednoznačně potvrzuje, že lze vyvinuté diagnostické metodiky použít k monitorování vhodnosti terapie a její účinnosti. Tato skutečnost v kombinaci s možností poměrně rychlé opakovatelnosti neinvazivní diagnostiky a rychlého zisku výsledku, představuje velmi zajímavou možnost využití vyvinuté diagnostické metody.



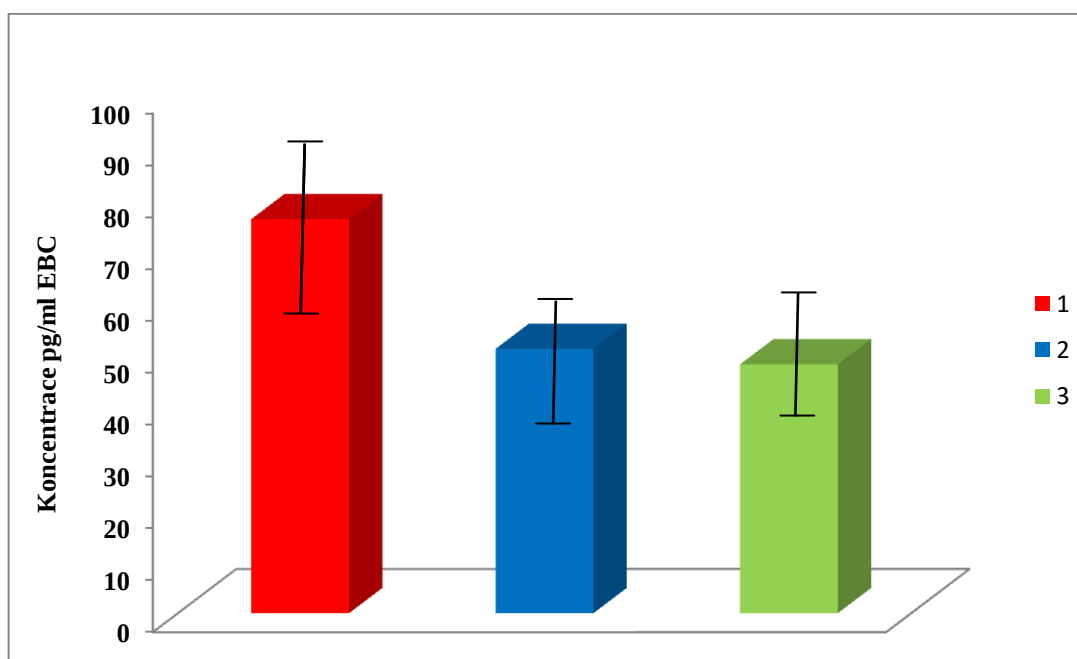
Obrázek 27 Výsledek klinické studie (klustrová analýza) zelené body - kontrolní skupina, modré body – astmatici léčení perorálními glukokortikoidy, hnědé body – astmatici léčení inhalačními glukokortikoidy

4.1.4 Serotonin a obtížně léčitelné astma

OLA je definováno jako astma nereagující adekvátně na léčbu antiastmatiky, zejména glukokortikosteroidy (steroidní terapie). U OLA se v průběhu onemocnění neustále zhoršuje kompenzace a vzrůstá riziko budoucích exacerbací i nežádoucích účinků léčby kortikosteroidy, kterou pacienti podstupují. OLA stále představuje onemocnění, kterému se snažíme lépe porozumět a u něhož pátráme po novějších účinných způsobech léčby. Důležitými oblastmi výzkumu jsou rizikové faktory pro rozvoj těžkého astmatu, fenotypizace onemocnění, charakterizace zánětlivé odpovědi a porozumění nedostatečné odpovědi na léčbu kortikosteroidy. Významný je vývoj v oblasti biomarkerů pro diagnostiku fenotypů a pro prognózu daného onemocnění. Využití jediného biomarkeru je většinou neúčinné pro fenotypizaci a pro predikci odpovědi na léčbu, ovšem v analýze je třeba zohlednit i mnohé další biomarkery, například ty, které byly odvozeny z přístupů s využitím technologií „-omik“ a směřují k tzv. multimarkerovému screeningu.

Předpokladem této závěrečné části předkládané studie bylo nahlédnout na OLA jako na problém, který má sice spojitost s bronchiálním astmatem, ale je onemocněním odlišným, jelikož na klasickou léčbu antiastmatiky nereaguje. Na základě klinických zkušeností je zřejmé, že OLA pacienti velice dobře reagují na léčbu antidepresiv ze skupiny SSRI (Selective Serotonine Re-uptake Inhibitors), které zvyšují v mozku hladiny neurotransmiteru serotoninu (5-hydroxytryptaminu). Toto má své logické zdůvodnění s ohledem na přetrvávající problémy OLA pacientů, nicméně ani toto nemění skutečnost absence farmakoterapeutického zlepšení jejich astmatických příznaků.

Cílem této části studie bylo posoudit množství serotoninu v organismu OLA pacientů a zdravých kontrol. Jelikož odběr mozkomíšního moku (lumbální punkce) jako biologické tekutiny, v které bude množství serotoninu korespondovat s terapií antidepresiv, je značně problematickou záležitostí, bylo stanovení serotoninu řešeno v odebraném KVV, což samozřejmě nemusí přinést požadovanou odpověď, jelikož antidepresivní účinek SSRI antidepresiv se odehrává za hematoencefalickou bariérou, zatímco detekce serotoninu v KVV je stavem, který naopak nastává před hematoencefalickou bariérou (stejně tak účinky serotoninu před a za hematoencefalickou bariérou jsou odlišné). Výsledky stanovení serotoninu v KVV jsou prezentovány na obrázku 28.



Obrázek 28 Koncentrační hladiny serotoninu (5-HT) v KVV u OLA pacientů (bez terapie antidepresiv) – červený sloupcový graf, u astmatiků se středním astmatem – modrý sloupcový graf a u kontrolní skupiny (zdravých jedinců) – zelený sloupcový graf

Na základě uvedených výsledků je zřejmé, že koncentrační hladiny serotoninu u OLA pacientů jsou statisticky významně vyšší, než u astmatiků s těžkým astmatem a u zdravých kontrol. Je rovněž velmi zajímavé, že koncentrační hladiny zdravých kontrol a pacientů se středně těžkým astmatem jsou srovnatelné a tudíž také vzdálené hladinám OLA. Interpretace tohoto výsledku je problematická a umožňuje jediné konstatování, že hladiny serotoninu jsou u OLA pacientů skutečně jiné než u astmatiků se středně těžkým astmatem a zdravých kontrol. Vzhledem k tomu, že hladiny serotoninu jsou v KVV proti našemu očekávání vyšší (očekávání bylo nalézt hladiny nižší, které se po terapii antidepressivy zvýší) a neznalosti toho, jak vypadají hladiny za hematoencefalickou bariérou, lze konstatovat, že tato myšlenka určitě není k zavržení, ale bude potřebovat podstatně větší úsilí, interpretaci apod. Bohužel námi získaný výsledek neumožňuje jakékoliv další konstatování. Jistě by bylo zajímavé provést další analýzy obou skupin vzorků a ověřit, zda neexistuje další marker, který by mohl poodhalit více ze skutečnosti, proč OLA pacienti nereagují na léčbu antiastmatiky a mají v KVV podstatně vyšší koncentrace serotoninu. Lze tedy jen doufat, že se dalšími analytickými testy mezi oběma skupinami klinických vzorků skrývá informace, jako je třeba biomarker troponin u infarktu myokardu, který přináší důkaz o komunikaci mezi CNS a kardiovaskulárním onemocněním s vysokou mortalitou a umožňuje tak velmi přesně predikovat pravděpodobnost „náhlé příhody srdeční“.

5. ZÁVĚR

Předkládaná práce je orientována do oblasti medicínální diagnostiky a jejím cílem bylo provést fenotypizaci obstrukčních plicních onemocnění z oblasti bronchiálního astmatu na základě detekce a kvantifikace biomarkerů v kondenzátu vydechovaného vzduchu. Primárním cílem bylo tímto molekulárně diagnostickým přístupem prověřit skupinu OLA pacientů, kteří nereagují adekvátně na podávanou antiastmatickou farmakoterapii.

Byly vyvinuty analytické metody pro metabolické profilování známých látek vzniklých z kyseliny arachidonové (leukotrieny a lipoxiny) a multimarkerový screening pro komplexní detekci neznámých nízkomolekulárních látek vyskytujících se při patologických procesech souvisejících s bronchiální obstrukcí v organismu.

Vyvinuté analytické metody byly testovány ve dvou klinických studiích. Bylo provedeno porovnání koncentračních hladin známých biomarkerů v tělních tekutinách u osob trpících OLA a u kontrolních skupin zdravých dobrovolníků. Kvantifikace známých biomarkerů v KVV poukázala na významný nárůst cysteinylovaných leukotrienů u OLA pacientů a významný pokles nových biomarkerů anastmaticky působících lipoxinů. Hladina lipoxinů byla naopak zvýšena u skupiny zdravých dobrovolníků. Jako významný výsledek lze hodnotit možnost fenotypizace astmatiků, kterou umožnilo využití cysteinylovaných leukotrienů s lipoxiny. Velice významným závěrem je také potvrzení antiastmatického účinku lipoxinů, přičemž toto by mohlo umožnit zacílení terapie astmatu na tento lipoxinový receptor, který není farmakoterapeuticky doposud využíván.

V neposlední řadě byl proveden i experiment, jehož cílem bylo zdůvodnit, proč OLA pacienti pozitivně reagují na terapii SSRI antidepressivy. Byly nalezeny statisticky významné rozdíly serotoninu v KVV u všech testovaných astmatiků, nicméně tento výsledek je problematicky interpretovatelný, jelikož tyto hladiny by bylo účelné posuzovat za hematoencefalickou bariérou, a nalézt tak případnou kauzalitu této skutečnosti.

6. ZDROJE LITERATURY

- [1] ACUNA-CASTROVIEJO, Dario, Germaine ESCAMES a Luisa-Carlota LOPEZ. Melatonin role in the mitochondrial function. *Frontiers in Bioscience*, 2007, vol. 12, no. 3, p. 947–963.
- [2] AXELROD, Julius. The pineal gland: a neurochemical transducer. Chemical signals from nerves regulate synthesis of melatonin and convey information about internal clocks. *Science*, 1974, vol. 184, no. 4144, p. 1341–1348.
- [3] BLENAU, Wolfgang a Arnd BAUMANN (eds.). *Serotonin Receptor Technologies*. 1. Berlin: Humana Press, 2015. ISBN Serotonin Receptor Technologies.
- [4] COLLINS, Douglas, Jan LOMÍČEK a Zuzana LOMÍČKOVÁ. *Diferenciální diagnostika prvního kontaktu*. 1. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-0897-3.
- [5] ČÁP, Petr, Alica BENČOVÁ a Miloš JESEŇÁK. *Vyšetřování vydechovaného oxidu dusnatého u asthma bronchiale*. 1. vyd. Praha: Mladá fronta, 2014. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3363-3.
- [6] DRNEK, Ivan. *Vyšetření v pneumologii* [online]. Ústí nad Labem: Soft Project, 2016 [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: <http://www.ivandrnek.cz/sluzby/vy%C5%A1et%C5%99en%C3%AD-v-pneumologii>
- [7] FEYNMAN, Richard, Robert LEIGHTON a Matthew SANDS. *Feynmanovy přednášky z fyziky 2/3*. 1. Praha: Fragment, 2006. ISBN 80-7200-420-4.
- [8] FUCHS, Martin. *Alergie*. 2., rozš. a přeprac. vyd. Plzeň: Adéla, c2007. Editio medicae. ISBN 978-80-902532-2-3.
- [9] HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 2., rozš. vyd. Ilustrace Jürgen Wirth. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. Aeskulap. ISBN 978-80-7080-639-5.
- [10] HOMOLKA, Jiří. *Pneumologie*. 1. Praha: Galén, 2001. ISBN 80-246-0369-1.
- [11] JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 11. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2014. ISBN 978-80-7182-338-4.
- [12] KAŠÁK, Viktor. *Asthma bronchiale: průvodce ošetřujícího lékaře*. Praha: Maxdorf, c2005. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 80-734-5062-3.
- [13] KAŠÁK, Viktor, Petr POHUNEK a Ester SEBEROVÁ. *Překonejte své astma: special edition*. Praha: Maxdorf, 2004. Medica. ISBN 80-734-5014-3.
- [14] KOČÁREK, Eduard. *Biologie člověka*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2010. Biologie pro gymnázia. ISBN 978-80-86960-47-0.

- [15] LINCOVÁ, Dagmar, Hassan FARGHALI a Jaroslav PALEČEK. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Ilustrace Jürgen Wirth. Praha: Galén, c2007. Aeskulap. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [16] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Lutz HEIN. *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 3., české. Ilustrace Jürgen Wirth. Praha: Grada, 2007. Aeskulap. ISBN 978-80-247-1672-5.
- [17] MCMURRY, John. *Organická chemie*. Vydání první. Překlad Jan Budka, Radek Cibulka, Dalimil Dvořák, Jaroslav Kvíčala, Pavel Lhoták, Jiří Svoboda. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTUM, 2015. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-4769-1.
- [18] MONTUSCHI, Paolo, Nicholas MORES, Ann TROVE, Chiara MONDINO a Peter BARNES. *Respiration* 2013, 85 (1), 72-84.
- [19] MULLER, Christian a Barry JACOBS (eds.). *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*. 1. Boston: Academic Press, 2009. ISBN 9780123746344.
- [20] MUSIL, Jaromír, Vladimír VONDRA a Stanislav KONŠTACKÝ. *Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN): doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné a praktické lékaře: [novelizace 2008]*. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, c2008. Doporučené postupy pro praktické lékaře. ISBN 978-80-86998-27-5.
- [21] NISHIZAWA, Seiichi., Chawki BENKELFAT a Marco LEYTON. Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain. *Medical Sciences*, 1997, vol. 94, no. 10, p. 5308–5313.
- [22] NOVÁK, František, Hassan FARGHALI a Jaroslav PALEČEK. *Úvod do klinické biochemie*. 1. vyd. Ilustrace Jürgen Wirth. Praha: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0366-7.
- [23] ODSTRČIL, Jaroslav. *Biochemie*. 2. Brno: NCO NZO BRNO, 2010. ISBN 80-7013-425-9.
- [24] PAPINENI, Ramsunder, *Journal of Aerosol Medicine: Deposition, Clearance, and Effects in the Lung* 1997, 10 (2), 105-116.
- [25] SAPEY, Elizabeth (ed.). *Bronchial Asthma: Emerging Therapeutic Strategies*. Rijeka: InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0140-6.
- [26] SLABÝ, Ondřej. *Molekulární medicína*. 1. Praha: Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-121-6.
- [27] STONE, Trevor, Gail DARLINGTONOVÁ a Vratislav SCHREIBER. *Léky, drogy, jedy*. 1. vyd. Praha: Academia, 2003. ISBN 80-200-1065-3.
- [28] Štípek, Stanislav, *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Grada publishing: Praha, 2000.
- [29] TEŘL, Milan. *Doporučený postup diagnostiky a léčby bronchiálního astmatu*. 1. Praha: Geum, 2015. ISBN 978-80-87969-08-3.

[30] VALÁŠKOVÁ, Michaela. *Alergie*. Vyd. 1. Praha: Literární akademie (Soukromá vysoká škola Josefa Škvoreckého), 2005. Prvotiny (Literární akademie). ISBN 80-868-7710-8.

[31] VESTBO, Jeremy, Samuel HURD. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2013, 187 (4), 347-365.

[32] VORLÍČEK, Jiří, Zdeněk ADAM a Yvona POSPÍŠILOVÁ. *Paliativní medicína*. 2. přepracované. Praha: Grada Publishing, 2004. ISBN 80-0279-7.

[33] Cell membrane. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2016 [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_membrane

[34] Laboratoře. *Laboratoř medicínální diagnostiky: Medicínální diagnostika, aplikovaná katalýza, chemické speciality* [online]. Ústav organické technologie VŠCHT Praha: Syntactic Sugar s.r.o, 2014 [cit. 2016-03-14]. Dostupné z: <http://pvac.vscht.cz/ustav/laboratore>

[35] Stavba a funkce lidského mozku. *E-learningová podpora mezioborové integrace výuky tématu vědomí na UP Olomouc* [online]. Olomouc, 2014 [cit. 2016-03-14]. Dostupné z: https://www.google.cz/search?hl=cs&site=imghp&tbm=isch&source=hp&biw=1920&bih=917&q=mozek+stavba&oq=mozek+stavba&gs_l=img.3.0.1756.4115.0.4310.14.9.1.4.4.0.130.894.6j3.9.0..0..1ac.1.64.img.0.13.900.hPkRp6gBVio#imgsrc=TCziYUQE8mEZKM%3A

7. Seznam obrázků

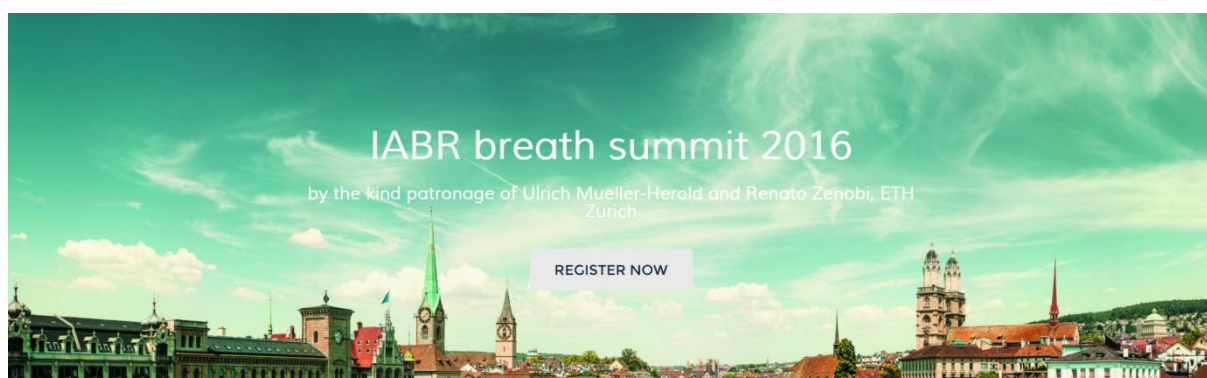
Obrázek 1 - Dýchací soustava [11]	6
Obrázek 2 - Molekulární báze fází bronchiálního astmatu [25]	8
Obrázek 3 - Laboratoř molekulární diagnostiky VŠCHT Praha [34]	10
Obrázek 5 - Efedrin	11
Obrázek 4 - Fosfolipidová dvouvrstva [33]	11
Obrázek 6 - Amfetamin	12
Obrázek 7 - Nežádoucí účinky steroidů [16]	14
Obrázek 8 - Pacient při spirometrickém vyšetření [12]	16
Obrázek 9 - Pacient během FeNO vyšetření [12]	19
Obrázek 10 - Přístroj k odběru KVV [25]	20
Obrázek 11 - Popis vzniku aerosolu [25]	21
Obrázek 12 - Pacient během odběru KVV [25]	21
Obrázek 13 - Schéma metabolismu kyseliny arachidonové v organismu [17]	24
Obrázek 14 - Části mozku [35]	25
Obrázek 15 - Serotonin	25
Obrázek 16 - Serotoninový receptor a jeho vazba na G protein [3]	28
Obrázek 17 - Syntéza serotoninu [17]	28
Obrázek 18 - Metabolismus serotoninu [17]	28
Obrázek 19 - TSQ VANTAGE	32
Obrázek 20 - LTQ ORBITRAP VELOS	33
Obrázek 21 - Gradientový program LC metody pro stanovení biomarkerů	36
Obrázek 22 - HPLC-MS chromatogramy vzorků KVV pacientů s různým fenotypem bronchiálního astmatu a zdravými kontrolami	39
Obrázek 23 - HPLC-MS chromatogramy vzorků KVV pacientů s různým fenotypem bronchiálního astmatu a zdravými kontrolami – iontové chromatogramy	39
Obrázek 24 - Syntéza leukotrienů [17]	42
Obrázek 25 - Syntéza lipoxinů [17]	43
Obrázek 26 - Statisticky vyhodnocená klinická studie; horní graf = cysteinylované leukotrieny, dolní graf = lipoxiny	45
Obrázek 27 - Výsledek klinické studie (klastrová analýza) zelené body - kontrolní skupina, ...	46
Obrázek 28 - Koncentrační hladiny serotoninu (5-HT) v KVV u OLA pacientů (bez terapie antidepresivy) – červený sloupcový graf, u astmatiků se středním astmatem – modrý sloupcový graf a u kontrolní skupiny zdravých jedinců – zelený sloupcový graf	47

8. Seznam tabulek

Tabulka 1 – Hodnoty FeNO testu [30]	19
Tabulka 2 - Použité chemikálie	31
Tabulka 3 – Standardy.....	32
Tabulka 4 – Plyny.....	32
Tabulka 5 – Parametry režimu SRM pro metabolity	35
Tabulka 6 - Parametry použité u hmotnostního spektrometru; data byla měřena a zpracovávána využitím softwaru XCalibur 2.2 (Thermo Scientific, USA).....	35
Tabulka 7 - Parametry použité u hmotnostního spektrometru	36
Tabulka 8 – Biomarkery stanovené v KVV	37

9. Přílohy

9.1 Abstrakt příspěvku na konferenci IABR Breath Summit, Curych, Švýcarsko, 2016



Imbalance of anti-inflammatory (lipoxines) and pro-inflammatory (cys-leukotrienes) arachidonic acid products in exhaled breath condensate of severe refractory asthma

Tereza Kačerová^a, Veronika Rotová, Kamila Syslová^a, Adéla Böhmová^a,

Daniela Pelclová^b, Vratislav Sedlák^c, Petr Čáp^d, Marek Kuzma^{a*}

^a - Institute of Microbiology, Videňská 142 40, Prague 4, Czech Republic;

^b - 1st Medicinal Faculty, Charles University, Na Bojišti 1, 120 00 Prague 2, Czech Republic;

^c - University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic;

^d - Na Homolce Hospital, 120 00 Prague, Czech Republic.

Intro: Severe refractory asthma (SRA) is characterized by prominent airway inflammation and oxidative stress. Inadequate production of anti-inflammatory arachidonic acid product lipoxin was described in severe phenotype of asthma.

Aims: We sought to investigate whether concentration of lipoxin A4 (LXA) and leukotrien B4 (LTB) in exhaled breath condensate differs in various phenotypes of SRA.

Methods: We harvested EBC of 59 SRA patients and 38 healthy controls (HC) by standardized protocol (EcoScreen). LXA and LTB were compared between subgroups of eosinophilic (EA, n=29) and non-eosinophilic (NEA, n=30) phenotype defined by exhaled nitric oxide > 30ppb despite high dose of inhaled corticosteroid therapy. LXA and LTB in EBC were analyzed by liquid chromatography and mass spectrometry. Measured results were analyzed together with FEV1, FeNO50, PBE and subgroups statistically evaluated.

Results: EA and NEA were comparable by FEV1, ACT, peripheral blood eosinophilia (all $p > 0.05$). LXA and concentration in SRA were markedly lower than in HC (27.65 vs. 59.89 pg/ml, $p < 0.001$). The LXA/LTB ratio was lower in SRA than in HC 0.87 vs. 3.31, $p < 0.001$. LTB4 concentration reached the same level in EA and NEA (33.6 vs. 32.4 pg/ml, $p = 0.19$) LXA was higher in EA than in NEA (28.9 vs. 26.4 pg/ml, $p = 0.01$).

Conclusion: We showed imbalance of antiinflammatory and pro-inflammatory arachidonic acid products in SRA in comparison to HC. SRA is associated with decreased production of LXA4, which is significantly lower in non-eosinophilic asthma phenotype (NEA). NEA phenotype could be associated with prolonged resolving of airway inflammatory damage.

9.2 Rukopis publikace odeslané do Journal of Breath Research (Impact Factor = 4,631)



Liquid Chromatography -Tandem Mass Spectrometry Method for Parallel Monitoring of Cysteinyl Leukotrienes and Lipoxines

Veronika Rotová, Kamila Syslová^a, Adéla Böhmová^a, Tereza Kačerová^a,
Daniela Pelclová^b, Vratislav Sedlák^c, Petr Čáp^d, Marek Kuzma^{a*}

^a - Institute of Microbiology, Czech Academy of Science, Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech
Republic;

^b - 1st Medicinal Faculty, Charles University, Na Bojisti 1, 120 00 Prague 2, Czech Republic;

^c - University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech
Republic;

^d - Na Homolce Hospital, 120 00 Prague, Czech Republic.

* - Corresponding author

Tel: + 420 220 444 158; fax: + 420 220 444 340; e-mail address: kuzma@biomed.cas.cz

Abstract

A sensitive and precise method for simultaneous quantification of cysteinyl leukotrienes (= cys LTs; leukotriene C₄ (= LTC₄), leukotriene D₄ (= LTD₄) and leukotriene E₄ (= LTE₄)), essential biomarkers of bronchial asthma and lipoxines (=LXs; lipoxin A₄ (= LXA₄) a lipoxin B₄ (= LXB₄)), substances responsible for resolution of inflammation, both present in exhaled breath condensate (= EBC) has been developed and used for more accurate molecular based diagnostics of airways inflammation. An immunochemical molecular probe used for selective separation of the biomarkers from EBC was prepared by immobilization of cys LTs and LXs antibodies into a polymer beads (copolymer prepared from polyvinyl alcohol (= PVA) and polyethylene glycol (= PEG)). Immobilization of antibodies and the immunoaffinity capture procedure were optimized to maximize the amount of separated cys LTs and LXs which were detected “off-beads” after acidic elution by HPLC-ESI-MS/MS operated in a multiple reaction monitoring mode. The developed method was characterized with high intra-day precision ≤ 13.6 % (determined as RSD) and ≤ 14.5 % inter-day precision (determined as RSD), acceptable accuracy ≤ 18.5 % (determined as RE), and high recovery of immunoseparation (≥ 93.1 %). The applicability of the method was demonstrated on EBC samples of healthy subjects and bronchial asthma patients where reasonable improvement of diagnostic accuracy based on quantification of cys LTs and LXs in comparison with diagnostics based solely on cys LTs. The developed method could be used not only to aid diagnosis, but also to predict the most effective therapy, and monitor the response to treatment.

Keywords: Cysteinyl leukotrienes, Lipoxines, immunochemical separation, HPLC-MS, bronchial asthma, exhaled breath condensate.

1. Introduction

Bronchial asthma, defined as a chronic inflammatory disorder of the airways, is one of the top public health problems globally affecting both children and adults. Therefore, proper and early diagnostics and treatment is necessary. However, the diagnostics can be rather difficult. Currently, there is no precise physiological, immunological, or histological test for asthma diagnostics. In order to rule out other possible conditions, the lung functions are generally tested first in an asthma diagnosis process. Tests to measure the lung functions include spirometry test and peak expiratory flow rate test. In addition, methacholine or histamine challenge tests can evaluate the airways hyperactivity, typical for asthma, and fractional exhaled nitric oxide (FENO) test measures the level of eosinophilic inflammation in the airways. Unfortunately, this non-invasive test is negatively influenced in smokers.

At present, the quantification of inflammation in the lungs may be based on invasive (open lung biopsy [1-3], bronchoalveolar lavage [2, 4]) or semi-invasive methods (method of induced sputum [5, 6]) and the measurement of inflammatory markers in plasma and urine, which are likely to reflect systemic rather than lung inflammation. A relatively novel method is the analysis of EBC, collected during normal tidal breathing, which reflects the composition of extracellular lung fluid. The measurements of metabolite products in the EBC are absolutely non-invasive and repeatable with a good potential to become the preferred alternative. New approaches are based on attempts of identifying robust biomarkers which could be utilized in establishing the diagnosis of asthma [7-9]. The former studies investigated the predictive value of EBC pH for asthma, the latter researched hydrogen peroxide, nitrogen oxides (FENO is nowadays diagnostically/clinically used) [10], arachidonic acid derivatives, cytokines and others. Analysis of breath volatile compounds by electronic nose has been proposed as a new technique for assessing airway inflammation in respiratory medicine [11]. Various inflammatory markers present in EBC have been investigated as possible asthma biomarkers and several independent studies [12-16] have indicated the presence of elevated levels of arachidonic acid derivatives (cys LTs, leukotriene B₄ (= LTB₄)) in EBC of asthma patients. Arachidonic acid derivatives, especially cys LTs, have shown the most consistent results for the diagnosis of asthma [17].

Leukotrienes (LTs) and lipoxins (LXs) are eicosanoids derived from arachidonic acid by the 5- and 15-lipoxygenase pathways, respectively (unlike the prostaglandins and the thromboxanes are products of the cyclooxygenase pathway). LTs help mediate immune and inflammation responses in that they cause inflammation, increased vasodilation and vascular permeability, and trigger the release of additional mediators of immune response. In particular, the cys LTs mediate inflammation in anaphylaxis reactions such as allergic rhinitis and asthma. Leukotriene B₄ is extremely chemotactic for

neutrophils and eosinophils, drawing them to the site of inflammation and evoking the production and release of additional LTs and other mediators. LTB₄ may also play a role in mediating the response of B cells to antigens. LXs seem to have antagonist functions to the LTs. Lipoxin A₄ has been shown to inhibit inflammation, cell degranulation, and bronchial constriction, and to even compete with LTs for available cell membrane receptors. LTs and LXs undoubtedly play an important role into the nature of inflammation and immune response, and may indeed be the basis for asthma early stage diagnosis and monitoring of treatment. In the past, immunochemical and analytical techniques like RIA, ELISA and GC-MS were used for their concentration level evaluation [12, 27-30]. During the last decade, LC-MS has become a promising technique for trace analysis of various compounds contained in complex biological matrices (plasma, urine, cerebrospinal fluid, bronchoalveolar lavage fluid, etc.) and it has been successfully applied for the detection and quantification of EBC markers [8, 12-14, 17, 27]. Since the biomarkers are often detected in EBC at levels as low as picograms per millilitre, concentration steps (e.g. solid phase extraction, lyophilisation, immunoseparation etc.) are necessary in order to achieve such a relatively low detection limit.

In this study, cys LTs and LXs extraction from EBC is provided by immunoparticles developed for highly selective immunoseparation. By using an anchoring of antibodies into the polymeric beads, the produced antigen-antibody complex can be easily separated from the solution. For the quantification and detection of biomarkers, a highly selective and sensitive method by UHPLC-ESI-MS/MS was applied. For its extremely high degree of selectivity, the multiple reaction monitoring (MRM) mode was used together with stable-isotope dilution assay for its high precision of quantification. The analytical procedure was optimized, validated and analytically tested on EBC samples collected from patients diagnosed with bronchial asthma and on the control group of healthy subjects.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Chemicals and reagents were of commercial origin and the source was as follows: Polyvinyl alcohol (viscosity 17-99 mol % hydrolysis), polyethylene glycol (average molecular weight 1000 g.mol⁻¹), [Sigma-Aldrich USA], *anti*-cys LTs antibodies (monoclonal antibodies produced in rat) [Applied Biological Materials Inc., Canada], Cys LTs Mixture (contains cys LTC₄, cys LTD₄, cys LTE₄; ≥ 98 % for each compound), Leukotriene C₄-d₅ (≥ 99% of deuterium labelled forms), LTD₄-d₅ (≥99 % of deuterium labelled form), Leukotriene E₄-d₅ (≥99% of deuterated form), *anti*-Lipoxin A₄

antibodies (monoclonal antibodies producer in rat), *anti*-Lipoxin B₄ antibodies (monoclonal antibodies producer in rat) [Cloud-Clone Corporation, USA], 5(S),6(S)-Lipoxin A₄ (≥99%), 5(S),14(R)-Lipoxin B₄ (≥99%), 5(S),6(R)-Lipoxin A₄-d₅ (≥99% of deuterated forms), 5(S),14(R)-Lipoxin B₄-d₅ (≥99% of deuterated forms) [Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA], Cyanogen bromide-activated-Sepharose 4B (= CNBr-activated Sepharose 4B), sodium phosphate monobasic monohydrate (≥99.5 %) [Fluka, Switzerland], disodium phosphate dihydrate (≥99.0 %) [Riedel de Häen, Germany], sodium sulfate (≥99.99 %), triethylamine, 3,5-di-*tert*-4-butylhydroxytoluene (= BHT; ≥99.8 %), sodium azide (≥99.5 %), ammonium hydroxide (≥99.99 %, 28 % solution in water), 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (= Tris; ≥99.8%), sodium acetate (≥99%) [Aldrich, USA], acetonitrile (Optima LC-MS), water (Optima LC-MS) [Fisher Chemical, USA], hydrochloric acid (37 %) [Penta, Czech Republic].

The following buffers were used: **Buffer A:** 0.1 M Na-phosphate buffer pH 8.5 (0.034 g NaH₂PO₄ · H₂O and 1.442 g Na₂HPO₄ · 2H₂O was dissolved in water and volume adjusted to 100 ml). **Buffer B:** 0.1 M Na-phosphate buffer pH 7.4 (0.262 g NaH₂PO₄ · H₂O and 1.442 g Na₂HPO₄ · 2H₂O was dissolved in water and volume adjusted to 100 ml).

2.2 Coated antibodies on Sepharose 4B

CNBr-activated Sepharose 4B (0.3 g) was swell in 1mM HCl (pH 3; 5ml) for 15 minutes. The CNBr-activated Sepharose 4B was washed with 1 mM HCl (pH 3, 150 ml) on sintered glass filter (porosity G3). The antibody (anti-cys LTs, anti-LXA₄ and anti-LXB₄, 10 mg of each antibody) was dissolved in the buffer A (5 ml). The suspension was stirred for 5 hour at laboratory temperature. Then the suspension was centrifuged (500 × g, i.e. 3000 rpm, temperature 4°C). The supernatant was removed and the sorbent (Sepharose 4B with immobilization antibodies) was washed with buffer A (5 × 1 ml). After washing, 0.1 M Tris solution (blocking solution for active group on the Sepharose 4B; pH 8; 5 ml) was added and suspension was stirred for 2 hour at laboratory temperature. The suspension was centrifuged (500 × g, i.e. 3000 rpm, temperature 4°C) and the supernatant was removed and washed with 0.1 M sodium acetate (pH 4; 5 ml) and buffer A (pH 8; 5 ml). The prepared immunoaffinity sorbent was stored in buffer A with sodium azide (0.2 %, w) at temperature 4°C.

2.3 Preparation of polymer immunoparticles

A mixture of PEG (0.6 g) and deionized water (6 ml) was heated to the temperature 98°C under stirring. After dissolution of PEG, PVA (1 g) was gradually added. After dissolution of all PVA and clarifying solution (approx. 60-90 minutes heating of the mixture) the solution was cooled to the

temperature 37°C. The prepared immunoaffinity sorbent (0.3 ml of each immunoaffinity sorbent with coated antibodies anti-cys LTs, anti-LXA₄ and anti-LXB₄) diluted with deionized water (ratio immunoaffinity sorbent : deionized water was 1:1) was added to the polymer solution. The mixture of polymer solution and immunoaffinity sorbent was stirred 10 minutes at temperature 37 °C. The next step was the preparation of polymer particles which consisted in applying uniform drops (diameter of drops – 2-3 mm, height of drops - 0.5-1 mm) on the polyethylene surface by batch meter (syringe). The drops were dried to 25% of their original weight by evaporation of water. The polymer immunoparticles were re-swollen in buffer B (phosphate buffer with pH 7.4). The polymer immunoparticles were stored in a phosphate buffer B with 0.2 % sodium azide at temperature 4°C for max. 6 months.

2.4 Clinical sample collection

The commercially available condenser EcoScreen (Jaeger, Germany) was used to collect the samples of EBC. All clinical samples were collected between 8–12 a.m. The subjects (patients diagnosed with various sub-types of bronchial asthma and the control group of healthy non-smokers) were encouraged to perform a tidal breathing through a mouthpiece connected to the condenser (-20 °C) for 5–10 minutes (volume of exhaled air was held at a constant level of 120 l) while wearing a nose-clip. The acquired EBC volumes of samples ranged between 1–2 ml. The EBC sample (1.0 ml) was immediately spiked with 100 pg of each deuterium-labelled internal standard (LTC₄-d₅, LTD₄-d₅, LTE₄-d₅, LXA₄-d₅ and LXB₄-d₅) and subsequently frozen to –80 °C. The storage period did not exceed one month. The detailed description of EBC collection is available elsewhere [12, 31].

2.5 Preparation of samples for LC-ESI-MS/MS analysis (“Pre-treatment method”)

The prepared immunoparticles (approx. 0.1 g, stored in buffer B with 0.2 % (w/v) sodium azide at temperature 4 °C) were washed two times with Buffer B (1 ml) and re-suspended in 1 ml EBC. The EBC with the immunoparticles was incubated under shaking (560 rpm) for 1 h and then matrix of EBC was removed (pipetted out). The immunoparticles were washed three times in Buffer B (500 µl, the immunoparticles were shaken 5 min, 560 rpm). The supernatant was removed and the immunoparticles were washed with methanol (400 µl, the immunoparticles were shaken 10 min, 560 rpm) which caused elution of cys LTs and lipoxines from the antibody-antigen complex in the immunoparticles. The supernatant was removed and the methanol from the sample (400 µl of cys LTs and lipoxines solution in methanol) was stripped out by nitrogen. The residue was dissolved in 20 µl

of mixture of acetonitrile and water (ratio 70:30 (v/v)) and the sample prepared in this way was analyzed by HPLC-ESI-MS/MS. The immunoparticles were regenerated for the next immunoseparation. The immunoparticles were washed five times in Buffer B (500 µl). Regenerated immunoparticles were stored at temperature 4 °C in Buffer B (1ml) with 0.2 % sodium azide (w/v).

2.6 HPLC-ESI-MS/MS analysis

The HPLC system consisted of a quaternary pump with an Accela 1250 degasser (Thermo Scientific, USA) and Open Accela autosampler (Thermo Scientific, USA). The mobile phase acetonitrile and water with 1% formic acid in a ratio of 90:10 (v/v) was used for isocratic elution at a flow rate of 150 µl/min. The injection volume was 10 µl. The HPLC analysis was carried out using a Hypercarb Thermo 100 x 2,1 mm x 5 µm connected to a Hypercarb pre-column (Thermo Electron Corporation, USA).

A triple quadrupole mass spectrometer TSQ Vantage (Thermo Scientific, USA) was used as a detector operating with electrospray ionization in negative mode (ESI⁻). For the measurement of cys LTs, lipoxines and their deuterium-labelled analogues (LTC₄-d₅, LTD₄-d₅, LTE₄-d₅, LXA₄-d₅ and LXB₄-d₅), tandem mass spectrometry (MS/MS) was used, where the parallel scan of particularly detected cys LTs and lipoxines was set according to Table 1. The conditions on the mass spectrometer were optimized and were as follows: spray voltage -2500 V, temperature of ion transfer tube 350 °C, temperature of HESI vaporizer 350°C, pressure of sheath gas (nitrogen) 35 psi, flow of auxiliary gas (nitrogen) 10 arbitrary units. The data were acquired and processed using the software Xcalibur 2.1.0 (Thermo Scientific, USA).

2.7 Validation of assay procedure

The analytical method was validated for the following set of parameters: accuracy, precision, lower limit of detection (LLOD), lower limit of quantification (LLOQ) and linearity.

2.7.1 Standard preparation and calibration procedure

The cys LTs and lipoxines stock solution (20 ng/ml) was prepared by diluting biomarker standard in mixture of acetonitrile and water (ratio 70:30 (v/v)) and was used further for the preparation of a series of calibration samples with the following leukotriene and lipoxine concentrations: 5, 10, 25, 50, 100, 250 and 500 pg/50 µl (each calibration sample was spiked with 250

pg of each ISs (LTC₄-d₅, LTD₄-d₅, LTE₄-d₅, LXA₄-d₅ and LXB₄-d₅). The peak area of particular substances (cys LTs and lipoxines) with the assigned IS was used as the function to quantify the concentration.

2.7.2 Accuracy, precision, recovery, LLOD and LLOQ

Accuracy, intra-day precision and inter-day precision were determined at three different levels of cys LTs (LLOQ = low level; medium, and high level). Accuracy was evaluated by comparing the mean calculated values ($n = 5$ for each concentration level) with the respective nominal concentration values of cys LTs and lipoxines added to the biological matrix. Intra-day precision was determined by measuring 5 replicates per concentration level, on the same day. Inter-day precision was assessed by analysing 5 replicates per concentration level, on five consecutive days.

LLOD was defined as the lowest concentration of the analyte which gave a peak response with a signal to noise ratio (S/N) of at least three. LLOQ was defined as the lowest concentration of the analyte: (1) which could be reliably quantified with a precision not exceeding 20% of the relative standard deviation (RSD) and accuracy not deviating more than $\pm 20\%$ of the actual value and (2) which gave a peak response with a S/N of at least 10 [24]. Both LLOQ and LLOD were determined empirically using consecutive dilutions of cys LTs in free matrix of biological fluid (repeat separation of cys LTs and lipoxines from EBC by immunoextraction with immunoparticles). The linearity of the method was investigated by using linear regression analysis [32].

For the extraction recovery, cys LTs and lipoxines (at three concentration levels: LLOQ, medium and high level) and their internal standards (LTC₄-d₅, LTD₄-d₅, LTE₄-d₅, LXA₄-d₅ and LXB₄-d₅, amount 100 pg) were added to cys-LTs and lipoxines-free matrix EBC (1ml; prepared by combining EBC samples from healthy subjects and repeatedly performing the separation of cys LTs and lipoxines by immunoextraction) and then separated with immunoparticles by following a procedure described in Section 2.5 and quantified by HPLC-ESI-MS/MS methods.

2.8 Clinical study

The objective of the clinical study was to verify the possibility of using immunoaffinity separation as a pre-treatment method in combination with HPLC-ESI-MS/MS for the evaluation of clinical samples. EBC samples were collected from persons with various sub-types of bronchial asthma (mild to severe occupational asthma (43 subjects), steroid-resistant asthma (37 subjects), moderate with (44 subjects) and without corticosteroids therapy (41 subjects)). The control group was represented by 57 subjects with similar average age (46–54 years, male) and gender without bronchial asthma diagnosis (healthy subjects). The samples collected during the clinical study were worked up

by the above-mentioned immunoaffinity separation and the concentration levels of cys LTs were determined by HPLC-ESI-MS/MS.

The study was carried out according to the Helsinki Declaration. The Ethics Committee of the 1st Faculty of Medicine, Charles University, approved all examinations and tests, and all of the study subjects gave their written informed consent for all tests and examinations.

2.9 Statistical analysis

The acquired data were statistically analyzed using the software Statistica, version 7.0. The statistical analyses were materialized using Student's t-test, where the P values were considered significant if $p < 0.05$.

3. Results and discussion

A method based in combination of immunoaffinity separation of cys LTs and LXs by polymer immunoparticles and HPLC-MS/MS detection has been developed. Immunoseparation based on the interaction between antigen (cys LTs and LXs) and antibody (*anti*-cys LTs and *anti*-LXs immunoglobulins), offer a highly specific way of isolating a biomarker from complex biological matrices such as exhaled breath condensate, plasma, cerebrospinal fluid, etc. Anchoring the antibodies in polymer porous matrix offers not only high selectivity toward desired biomarker(s), but the polymer lens also allows easy and rapid separation and the possibility of reusability with excellent lifetime. A general scheme of the developed method is shown in fig. 1. The first step of the procedure was the preparation of the polymer immunoparticles with an antibody against cys LTs (= *anti*-cys LTs) and LXs (= *anti*-LXA₄ and *anti*-LXB₄). The second step was immunoseparation of cys LTs and LXs by polymer particles from clinical sample (EBC). After the immunocapture, the immunoparticles were removed from the EBC and immediately washed in order to remove non-binding components. The concentrated and purified cys LTs and LXs bound to the immunoparticles were then eluted with appropriate solvent, and subsequently detected by HPLC-ESI-MS/MS. However, it was also possible to analyze them after the elution by traditional immunochemical methods like ELISA.

3.1 Immunoseparation

Due to the very low concentration of cys LTs and LXs present in biological samples, their separation and pre-concentration prior to the HPLC-ESI-MS/MS analysis is highly desirable. The

separation was performed using polymer immunoparticles anchored *anti-cys* LTs, *anti-LXA₄* and *anti-LXB₄* antibody. The preparation of *anti-cys* LTs and *anti-LXA₄* and *anti-LXB₄* polymer immunoparticles was realized according to a procedure described in the experimental part (see chapter 2.3). The first step of the procedure was the preparation of the immunoaffinity sorbent (Sephacrose 4B) with antibodies. Immunoaffinity sorbents for immunoseparation of *cys* LTs and LXs from biological matrix are limited with stability for repetitive use (immunoaffinity sorbent exhibit a poor mechanical separation from an aqueous environment since boundless layers of water-sorbent are produced).

The immunoaffinity sorbents with antibody were immobilized in polymer matrix (for matrix was used biocompatibility polymer - mixture of PVA and PEG). The key parameter of polymer immunoparticles is the their surface structure, which must not meet only the requirement of the impossibility of passing of antibodies from the core of immunoparticles to the surrounding environment (biological matrix or washing buffer), but also must allow passing the antigen – a biomarker (*cys* LTs and LXs) to the antibody in the core of immunoparticles without significant diffusion limitations. Ways to reduce the demands on the requirement of the pore size in polymer structure is to increase the difference in size between the two key molecules (antigen versus antibody) by immobilizing the antibody to a suitable polymer surface. This was achieved by using antibodies immobilized on Sepharose 4B (procedure preparation – see chapter 2.2). The preparation of polymer immunoparticles consists of preparing a polymer mixture containing PVA, PEG and deionized water at temperature 98 °C. In this phase PVA was cross-linking. After cooling the mixture to temperature 35-37 °C, antibodies immobilized on Sepharose 4B were added. The polymer mixture with antibodies (temperature of mixture – 35-37°C) was dripped on a polyethylene plate in the form of lenses. The surface of prepared lenses was dried so they did not dissolve during the next step – swelling of lenses in phosphate buffer (pH 7.4), where the leaching of PEG from the surface of the lens occurred and a porous structure was formed. The lenses prepared by this way were used for the separation of a biomarker from a complex matrix.

The immunoseparation of *cys* LTs and LXs by antibodies immobilized in polymer immunoparticles was realized by the procedure described in experimental part (see chapter 2.5). During the optimization of immobilization and affinity capture, if not stated otherwise, a mixture of *cys* LTs (LTC₄, LTD₄ and LTE₄; amount of each substance 100 pg) and LXs (LXA₄ and LXB₄; amount of each substance 100 pg) dissolved in water (1.0 ml) was used as a sample. The immunoparticles in samples were incubated under shaking at 25 °C for 1 h and the supernatant was removed. The immunoparticles were washed three times with Buffer B (500 µl). The supernatant was removed and the elution of *cys* LTs and LXs from the antibody-antigen complex and regeneration of *cys* LTs and LXs antibodies immobilized in the polymer immunoparticles for re-use was performed using methanol (400 µl). The immunoparticles with methanol were shaken for 10 min and the

methanol with cys LTs and LXs was removed. The immunoparticles were washed five times in Buffer B (500 µl) and finally were stored in Buffer B (1000 µl) for the next immunoseparation. The isolation-elution procedure of purified cys LTs and LXs was repeated ten times using the same affinity probe. After the last cycle no reasonable loss of capacity was determined (approx. loss activity of antibody after ten cycles was determined as 6.3 % for each of cys LTs, 5.8 % for LXA₄ and 6.1 for LXB₄).

The immunoextraction step was optimized to obtain conditions exhibiting high reproducibility and precision. The experiments were performed with externally added cys LTs and LXs into cys LTs and LXs-free EBC matrix (obtained by repeated immunoextraction by immunoaffinity sorbent) and 0.1 g of immunoparticles. This amount was selected based on the binding capacity (which was determined to be 1.72 ng for LTC₄, 1.67 ng for LTD₄, 1.12 ng for LTE₄, 2.11 ng for LXA₄ and 2.23 ng for LXB₄ / 0.1g polymer immunoparticles) and expected levels of cys LTs and LXs in EBC clinical samples which range in the interval of 20 – 200 pg/ml of EBC (citace).

The time dependence of the immunoseparation of cys LTs and LXs levels by the immunoparticles (0.1 g immunoparticles: 100 pg 8-iso PGF_{2α} in 1 ml of EBC) is shown in Fig. 2. With prolongation of the immunoseparation time, the separated amount of cys LTs and LXs from EBC increased, however, the decomposition of the substances occurred because of their known temperature unstability (temperature of immunoseparation ~ 25 °C). After achieving the maximum separated amount (30 min), a degradation process started to prevail, therefore the optimal period for the immunoseparation of cys LTs and LXs from EBC was determined as 30 min.

Polymer immunoparticles with coated antibody (*anti*-cys LTs, *anti*-LXA₄ or *anti*-LXB₄) were compared with a mixture of polymer immunoparticles with three different specific antibodies - *anti*-cys LTs, *anti*-LXA₄ or *anti*-LXB₄. The prepared polymer immunoparticles were compared on the basis of determined specificity of the antibodies – see Table 3. The polymer immunoparticles with an *anti*-cys LTs antibody demonstrated worse specificity to LTE₄ (65 %), which is comparable to the specificity of its metabolite *N*-acetyl-LTE₄ (60 %). Antibodies against individual leukotrienes (*anti*-LTC₄, *anti*-LTD₄ and *anti*-LTE₄) show a high cross reaction with the leukotriene of the fifth row (e.g. LTC₅, LTD₅ and LTE₅), but these leukotrienes are not involved in the pathophysiology of bronchial asthma. Other eicosanoids demonstrate low levels of cross-reactions with all types of tested antibodies.

3.2 UHPLC-ESI-MS/MS analysis

The determination of picogram levels of cys LTs and LXs in EBC (alternatively urine or plasma) is a tractable problem when the HPLC-MS/MS method is employed. Using HPLC-MS/MS

offers not only high selectivity, sensitivity, accuracy and precision, but also high throughput, which is important for a method designated for routine practice.

The UHPLC conditions were optimized with respect to the limitations of the ionization method (electrospray ionization, ESI) and also with the emphasis on high detector sensitivity (HypercarbThermo (5 μ m); mobile phase acetonitrile: 1 % formic acid in water 90:10 (v/v); isocratic elution at a flow of 150 μ l/min). The LC method allowed the separation of monitored individual cys LTs (LTC₄: t_R = 0.5 min, LTD₄: t_R = 0.7 min, LTE₄: t_R = 1.2 min; LXA₄: t_R = min and LXB₄: t_R = min; dead time of column: t_R = 0.9 min, Fig. 4). The mass-spectrometric detection was realized using negative electrospray ionization (ESI⁻) in a very selective SRM mode. The collision energy (CE) and other parameters related to the mass spectrometer were optimized in order to acquire maximal yield of the dissociation and thereby high sensitivity of the developed method (see the experimental part – chapter 2.6). With regard to the sensitivity of the biomarkers to several factors, it is essential to label the sample immediately after the collection with an isotope-labelled internal standard (addition of 100 pg of LTC₄-d₅, LTD₄-d₅, LTE₄-d₅, LXA₄-d₅ and LXB₄-d₅ to 1 ml of EBC). This allows a highly precise quantification together with monitoring the changes in sample composition which occur during its processing (“stable-isotope dilution assay”).

3.3 Calibration procedure

The calibration graphs for cys LTs were constructed for EBC (matrix was originally free of cys LTs). The calibration was created from artificially prepared samples with increasing amounts of cys LTs and their corresponding internal standards (100 pg of particular internal standard in 1 ml of EBC) after the pre-treatment with polymer immunoparticles with anti-cys LTs and anti LXs antibodies. The samples were immediately analyzed by HPLC/MS in the SRM mode. The calibration graphs were formed using the ratio of a particular biomarker peak area to the corresponding internal standard peak area (axis x) versus the biomarker concentration in the mobile phase (axis y). The calibration curve was evaluated by the least square regression in the form $y = ax + b$. The results are summarized in Table 3. All cys LTs exhibited a linear dependence within the range starting at the LLOQ up to 5000 pg with the Pearson’s correlation coefficients (R^2) higher than 0.998 for all analytes (the acceptable value of R^2 for each calibration curve was $R^2 \geq 0.99$).

3.4 Method validation

The validation parameters of the method, such as the accuracy (RE) and intra and inter-day precision (RSD), were assessed by analyzing three various concentration levels of the cys LTs and

LXs, which were determined five times by the developed method consisting of separation with polymer immunoparticles with anti-cys LTs and anti-LXs antibodies and HPLC-ESI-MS/MS in an independent series of spiked EBC samples. The values of accuracy and precision for each cys LT and LXs in EBC were evaluated and are listed in Table 4. The values of LLOD and LLOQ are summarized in Table 5.

3.6 Human study

In this study, EBC, plasma and urine were acquired from a group of subjects diagnosed with various subtypes of bronchial asthma (mild to severe occupational asthma, steroid-resistant asthma with corticosteroid therapy, moderate with and without corticosteroids therapy) and a control group of healthy subjects, and the concentration values of cysteinyl leukotrienes were determined. All groups were of a similar average age and equal gender (45-54 years, male subjects). The control group was limited to individuals without bronchial asthma and other respiratory disorders. All samples were collected between 8 to 12 a.m. Table 7 and Figure S4 depict the results of the clinical study. In the EBC matrix, substantial differences in the levels of LTC₄ and LTE₄ were observed among the groups of subjects. No significant difference in the LTD₄ levels for the diagnosis was found, although its average level was higher in the subjects with bronchial asthma (24.4 ± 8.5 pg/ml) compared to controls (16.4 ± 4.9 pg/ml). However, the confidence intervals were overlapping and this parameter thus seemed statistically insignificant. The variations observed in matrices of both clinical groups were relatively tenuous; nevertheless, the values of mean concentrations demonstrated a statistical significance. The highest statistically significant difference in the concentrations levels of cys LTs for patients and the control group was seen for sums of cys LTs in EBC (see Fig. S4D). On the other hand, cys LTs in plasma and urine in the patients and controls group did not statistically differ (see Fig. S4E–L).

The developed diagnostic method was also applied in a clinical experiment, the aim of which was to verify the possibility of monitoring the course of an allergic disease or therapeutic procedure. A non-specific bronchoprovocation test was performed in a group of volunteers (10) who were administered histamine, and EBC was collected both before the test and subsequently in ten minute intervals. From the results obtained (Fig. 5) it is clear that the subject responded to histamine by increased production of cys LTs, whose levels finally returned to the initial concentration. The test showed that this method has the potential for monitoring the level of inflammation [35] and the effectiveness of the elimination from the exposure to the allergen or therapeutic procedures.

4 Conclusion

An analytical method was developed for a parallel, rapid and precise detection and quantification of cysteinyl leukotrienes in three different biological matrices (EBC, urine, plasma). The assay incorporated a pre-treatment step for a rapid and effective pre-concentration (immunomagnetic particles with anchored *anti*-cys LTs antibodies) of markers present in biological samples in low concentrations. This step complied with the requirements of a rapid and mild isolation prior to subsequent analysis that was compatible with the limited stability of cys LTs. Magnetic and mechanical properties of the developed immunomagnetic tool also allowed its repeatable use for sample pre-concentration. UHPLC–ESI-MS/MS was used as the detection method, where the MRM mode was used for its extremely high degree of sensitivity and selectivity. Stable-isotope dilution assay was employed for its high precision in quantification, which has been established as the technique of choice for trace analyses of various compounds present in complex biological matrixes. The combination of mass spectrometry detection with liquid chromatography separation was selected to retain the analytes from the solvent front. The analytical procedure was optimized and validated. The precision values for cys LTs in the EBC, urine and plasma ranged in an interval of 7.2–13.6 % (intra-day precision, determined as RSD), and recovery values ranged in an interval of 93.1–97.1 %. The performed clinical study confirmed the possibility of differential diagnosis of bronchial asthma using the developed pre-treatment method for the determination of cys LTs in EBC. The simplicity, rapidity, and robustness of the whole method make it suitable for use as a high-throughput assay in routine clinical biochemical laboratories.

Acknowledgement

This work was financially supported by the EU structural funds - “Operational Programme Prague – Competitiveness” (Grants CZ.2.16/3.1.00/22197).

References

- [1] M.T. Chuang, J. Raskin, D.J. Krellenstein, A.S. Teirstein, Bronchoscopy in diffuse lung disease: evaluation by open lung biopsy in nondiagnostic transbronchial lung biops, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 96 (1987), 654-657.
- [2] N.N. Jarjour, S.P. Peters, R. Djukanovic, W.J. Calhoun, Investigative Use of Bronchoscopy in Asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157 (1998), 692–697.

450 [3] P.K. Jeffery, A. Laitinen, P. Venge, Biopsy markers of airway inflammation and remodelling,
451 *Respir. Med.*, 94 (2000), S9–S15.

452 [4] H.Y. Reynolds, Use of Bronchoalveolar Lavage in Humans-Past Necessity and Future
453 Imperative, *Lung*. 178 (2000), 271–293.

454 [5] R.H. Green, Ch.E. Brightling, S. Mc Kenna, B. Hargadon, D. Parker, P. Bradding, A.J.
455 Wardlaw, I.D. Pavord, Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled
456 trial, *Lancet*. 360 (2002), 1715-1721.

457 [6] O. Holz, J. Kips, H. Magnussen, Update on sputum methodology, *Eur. Respir. J.* 16 (2000),
458 355–359.

459 [7] I.Horváth, J. Hunt, P.J. Barnes, P.J, Exhaled breath condensate: methodological
460 recommendations and unresolved questions, *Eur. Respir. J.*, 26 (2005), 523-548.

461 [8] A. Motta, D. Paris, D. Melck, G. de Laurentiis, M. Maniscalco, M. Sofia, P. Montuschi,
462 Nuclear magnetic resonance-based metabolomics of exhaled breath condensate: methodological
463 aspects, *Eur. Respir. J.*, 39 (2012), 498-500.

464 [9] P. Montuschi, D. Paris, D. Melck, V. Lucidi, G. Ciabattini, V. Raia, C. Calabrese, A. Bush,
465 P.J. Barnes, A. Motta: NMR spectroscopy metabolomic profiling of exhaled breath condensate in
466 patients with stable and unstable cystic fibrosis, *Thorax* 67 (2012), 222-228.

467 [10] P. Montuschi, C. Mondino, P. Koch, G. Ciabattini, P.J. Barnes, G. Baviera, Effects of
468 Montelukast Treatment and Withdrawal on Fractional Exhaled Nitric Oxide and Lung Function in
469 Children With Asthma, *Chest*, 132 (2007),1876-1881.

470 [11] P. Montuschi, N. Mores, A. Trové, C. Mondino, P.J. Barnes, The Electronic Nose in
471 Respiratory Medicine, *Respiration* 85 (2013), 72-84.

472 [12] U. Hatipoglu, I. Rubinstein, New perspectives in monitoring lung inflammation. Analysis of
473 exhaled breath condensate, CRC press, Boca Raton, Florida, 2004.

474 [13] Z. Csoma, S.A. Kharitonov, B. Balint, A. Busch, N.M. Wilson, P.J. Barnes, Increased
475 Leukotrienes in Exhaled Breath Condensate in Childhood Asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166
476 (2002), 1345 -1349.

477 [14] S. Kazani, E. Israel, Exhaled breath condensates in asthma: Diagnostic and therapeutic
478 implications, *J. Breath Res.* 4 (2010), 047001.

479 [15] M. Kupczyk, S. Lundstrom, B. Dahlén, D. Balgoma, C.E. Wheelock, S-E., Dahlén, Lipid
480 mediators in severe asthma. *Eur Respir Mon*, 51 (2011), 218-235.

481 [16] M.U. Sahiner, E. Birben, S. Erzurum, C. Sackesen, O. Kalayci, Oxidative stress in asthma,
482 *World Allergy Organ J.* 4 (2011), 151–158.

483 [17] P. Montuschi, P.J. Barnes, Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma, *J. Allergy Clin.*
484 *Immunol.* 109 (2002), 615-620.

485 [18] P. Montuschi, D. Currò, E. Ragazzoni, P. Preziosi, G. Ciabattoni, Anaphylaxis increases 8-iso-
 486 prostaglandin F2 α release from guinea-pig lung in vitro, *Eur J Pharmacol.* 365 (1999), 95-64.[19] M.
 487 Barreto, M.P. Villa, C. Olita, S. Martella, G. Ciabattoni, P. Montuschi, 8-Isoprostane in Exhaled
 488 Breath Condensate and Exercise-Induced Bronchoconstriction in Asthmatic Children and Adolescents,
 489 *Chest*, 135 (2009), 66-73.

490 [20] P. Montuschi, P.J. Barnes, G. Ciabattoni, Measurement of 8-isoprostane in exhaled breath
 491 condensate, *Methods Mol. Biol.* 594 (2010), 73-84.

492 [21] V. Lucidi, G. Ciabattoni, S. Bella, P.J. Barnes, P. Montuschi, Exhaled 8-isoprostane and
 493 prostaglandin E(2) in patients with stable and unstable cystic fibrosis., *Free Radic. Biol. Med.*, 45
 494 (2008), 913-919.

495 [22] M. Malerba, P. Montuschi, Non-invasive biomarkers of lung inflammation in smoking
 496 subjects. *Curr. Med. Chem.*, 19 (2012), 187-196.

497 [23] P. Montuschi, M.L. Peters-Golden, Leukotriene modifiers for asthma treatment, *Clin. Exp.*
 498 *Allergy*. 40 (2010), 1732-1741.

499 [24] P. Montuschi, Leukotrienes, antileukotrienes and asthma, *Mini Rev. Med. Chem.*, 8 (2008),
 500 647-656.

501 [25] P. Montuschi, Toward a personalized pharmacotherapy of respiratory diseases, *Front*
 502 *Pharmacol.* 1 (2010), 131.

503 [26] P. Montuschi, P.J. Barnes, New perspectives in pharmacological treatment of mild persistent
 504 asthma, *Drug Discov Today*, 16 (2011), 1084-1091.

505 [27] P. Čáp., J. Chládek, F. Pehal, M. Malý, V. Petrů, P. J. Barnes, P. Montuschi, Gas
 506 chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotrienes in asthmatic patients, *Thorax* 59
 507 (2004), 465–470.

508 [28] D. Tsikas, Application of gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–
 509 tandem mass spectrometry to assess in vivo synthesis of prostaglandins, thromboxane, leukotrienes,
 510 isoprostanes and related compounds in humans, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 717 (1998) 201-
 511 245.

512 [29] M. Takamoto, T. Yano, T. Shintani, S. Hiraku, A highly sensitive and selective method for the
 513 determination of Leukotriene B4 in human plasma by negative ion chemical ionization/gas
 514 chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13 (1995), 1465-1472.

515 [30] Y.J. Bai , X. Y. Gao, J. Q. Lu, H. G.i Zhang, A LC-MS-Based Method for Quantification of
 516 Biomarkers from Serum of Allergic Rats, *Molecules*, 15, 2010, 3356-3365.

517 [31] P. Montuschi, Analysis of exhaled Breath Condensate: Methodological Issues in New
 518 Perspectives in Monitoring Lung Inflammation, *Analysis of Exhaled Breath Condensate*, P.
 519 Montuschi, (Ed.), 11-30, CRC press, ISBN 0-415-32465-3.

- [32] D. Tsikas, A proposal for comparing methods of quantitative analysis of endogenous compounds in biological systems by using the relative lower limit of quantification (rLLOQ), *J. of Chromatogr. B*, 877 (2009), 2244-2251.
- [33] G. Schlosser, P. Kačer, M. Kuzma, Z. Szilágyi, A. Sorrentino, C. Manzo, R. Pizzano, L. Malorni, G. Pocsfalvi, Coupling immunomagnetic separation on magnetic beads with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for detection of staphylococcal enterotoxin B, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007), 6945-6952.
- [34] K. Syslova, P. Kacer, B. Vilhanova, M. Kuzma, P. Lipovova, Z. Fenclova, J. Lebedova, D. Pelclova, Determination of cysteinyl leukotrienes in exhaled breath condensate: Method combining immunoseparation with LC–ESI-MS/MS, *J. Chromatogr. B.* 879 (2011), 2220-2228.
- [35] P. Klusackova, J. Lebedova, P. Kacer, M. Kuzma, M. Brabec, D. Pelclova, Z. Fenclova, T. Navratil. Leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate in bronchoprovocation tests with occupational allergens. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 78 (2008), 281-292.

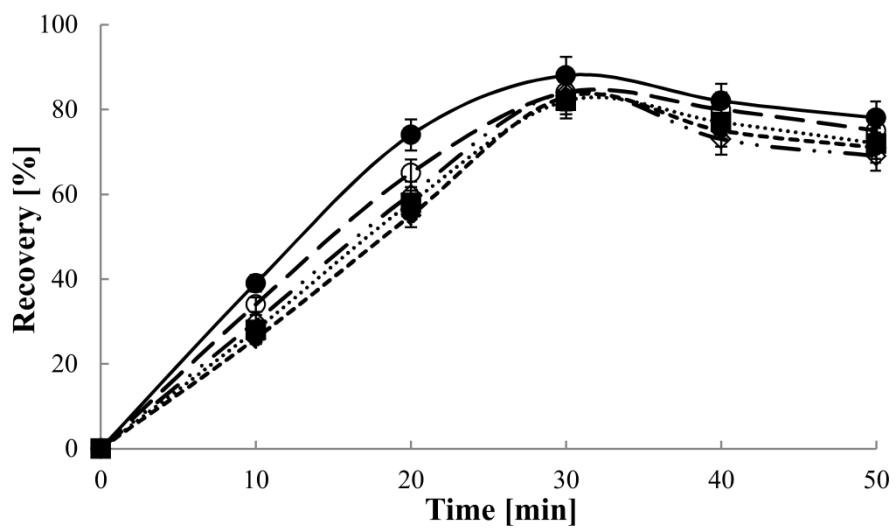


Fig. 1 Time dependence extraction of cys LTs and LXs from EBC sample

Table 1 SRM transitions, collision energies (CE) and voltage on S-lens for cys LTs, LXs and their internal standards

Analyte	SRM transmissions (<i>m/z</i> → <i>m/z</i>)			CE (eV)	S-Lens (V)
LTC ₄	624.1	→	351.2	17	58
LTC ₄ - <i>d</i> ₅	629.1	→	356.2	17	58
LTD ₄	495.2	→	477.3	16	52
LTD ₄ - <i>d</i> ₅	500.2	→	482.3	16	52
LTE ₄	438.2	→	333.1	16	47
LTE ₄ - <i>d</i> ₅	443.2	→	338.1	16	47
LXA ₄	351.2	→	115.0	17	45
LXA ₄ - <i>d</i> ₅	356.2	→	120.0	17	45
LXB ₄	351.2	→	221.1	17	48
LXB ₄ - <i>d</i> ₅	356.2	→	226.1	17	48

552 **Table 2** Specificity of polymer immunoparticles

553

554 **Analyte**

Antibody

555 *anti-cys* LTs *anti-LXA₄* *anti-LXB₄* mix of *anti-cys* LTs and *anti-LXA₄* and *anti-LXB₄*

556 **LTC₄** 100 % < 0.1 % < 0.1 % 100 %

557 **LTD₄** 100 % < 0.1 % < 0.1 % 100 %

558 **LTE₄** 65 % < 0.1 % < 0.1 % 65 %

559 **LXA₄** < 0.1 % 100 % 23 % 100 %

560 **LXB₄** < 0.1 % 31 % 100% 100 %

561 **LTB₄** < 0.1 % 18% 12 % 8.7 %

562 **LTF₄** 12% < 0.1 % < 0.1 5.8 %

563 **N-acetyl LTE₄** 60 % < 0.1 % 24 % 31 %

564 **LTB₅** < 0.1 % 4.9 % < 0.1 % 1.2 %

565 **LTC₅** 67 % < 0.1 % 44 % 35 %

566 **LTD₅** 53 % < 0.1 % 56 % 32 %

567 **LTE₅** 36 % < 0.1 % 44 % 24 %

568 **Arachidonic acid** < 0.1 % 8.7 % < 0.1 % 2.1 %

569 **Prostaglandin E₂** < 0.1 % 3.7 % < 0.1 % 1.1 %

570 **Prostaglandin D₂** < 0.1 % 2.8 % < 0.1 % 0.7 %

Table 3 Linear regression analysis of calibration curve ($n = 10$) for cys LTs and LXs

Substance	Slope	Intercept	SD	RSD [%]	R^2
LTC₄	654.12	-28.45	15.87	2.43	≥ 0.9981
LTD₄	687.24	-34.17	15.49	2.25	≥ 0.9983
LTE₄	784.12	-47.1	16.26	2.07	≥ 0.9980
LXA₄	632.24	-24.5	13.87	2.19	≥ 0.9984
LXB₄	607.15	-21.1	14.25	2.35	≥ 0.9983

Table 4 Validation parameters (accuracy, precision and recovery) for methods combination separation by polymer immunoparticles and LC- MS/MS analysis

Concentration	Precision RSD (%)		Accuracy	Recovery
	Intra-day	Inter-day	RE (%)	(%)
LTC₄				
LLOD	10.2	10.8	-11.2	93.2
50 pg/ml	9.4	9.9	-9.7	95.2
100 pg/ml	8.5	8.8	-8.4	96.3
LTD₄				
LLOD	10.0	10.5	-10.8	90.2
50 pg/ml	9.3	9.6	-9.4	94.2
100 pg/ml	8.4	8.6	-8.5	96.0
LTE₄				
LLOD	9.7	10.2	-10.1	87.3
50 pg/ml	8.3	8.7	-9.0	91.2
100 pg/ml	7.2	7.5	-8.3	93.4
LXA₄				
LLOD	9.8	10.3	-9.8	90.3
50 pg/ml	9.5	9.9	-9.3	92.6
100 pg/ml	8.9	9.4	-8.6	95.1
LXB₄				
LLOD	10.2	10.6	-10.2	90.8
50 pg/ml	9.7	10.0	-9.7	92.1
100 pg/ml	9.2	9.6	-8.4	94.7

611 **Table 5** Validations parameters for methods consist of immunoseparation and LC- MS/MS
612 detection – lower limit of detection (LLOD) and quantification (LLOQ)

613		LLOD (pg/ml)	LLOQ (pg/ml)
614			
615	LTC₄	4	10
616	LTD₄	3	9
617	LTE₄	3	8
618	LXA₄	2	7
619	LXB₄	2	7

Table 6 Results of the clinical study (95 % confidence interval)

	LTC₄	LTD₄	LTE₄	LXA₄	LXB₄
Occupational asthma	62-101	14-45	43-126	20-26	16-21
<i>Steroid-resistant asthma</i>	54-78	18-43	48-87	11-16	6-11
<i>Moderate asthma without therapy</i>	45-83	22-29	54-93	27-32	21-25
<i>Moderate asthma with therapy</i>	32-58	18-25	38-72	42-54	36-41
<i>Controls</i>	23-37	13-19	34-48	61-80	59-67