

KONDENZÁT VYDECHOVANÉHO VZDUCHU – SPECIFICKÁ MATRICE PRO MONITOROVÁNÍ PLICNÍCH ONEMOCNĚNÍ

JANA VONDROUŠOVÁ, KAMILA SYSLOVÁ
a PETR KAČER

Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5,
166 28 Praha 6
Petr.Kacer@vscht.cz

Došlo 15.7.16, přijato 15.10.16.

Klíčová slova: kondenzát vydechaného vzduchu, bronchiální astma, chronická obstrukční plicní nemoc, biomarker, prostaglandin, leukotrien, prostanoid, lipoxin

Obsah

1. Úvod
2. Bronchiální astma
3. Chronická obstrukční plicní nemoc
4. Kondenzát vydechaného vzduchu
5. Metody analýzy kondenzátu vydechaného vzduchu
6. Biomarkery bronchiálního astmatu a chronické obstrukční plicní nemoci
7. Závěr

1. Úvod

Terapie plicních onemocnění a onemocnění dýchacích cest se stávají důležitou oblastí moderní medicíny. Počet pacientů, ať už v důsledku zvýšené citlivosti organismu na vnější podněty, nesprávného životního stylu (kouření) či pobytem ve znečištěném životním prostředí, stále narůstá. Pro zajištění kvalitní léčby je nutná správná diagnostika těchto onemocnění, která je však mnohdy díky využívání řady invazivních (např. bronchiální biopsie, bronchoalveolární laváž) a seminvasivních (např. metoda indukovaného sputa) vyšetření pro pacienty zatěžující.

Novou, alternativní a především neinvazivní metodou diagnostiky plicních onemocnění a onemocnění dýchacích cest by mohla být kvantifikace specifických indikátorů onemocnění (především molekul) – tzv. biomarkerů v kondenzátu vydechaného vzduchu. Kondenzát vydechaného vzduchu jakožto specifická biologická matrice reflektuje pouze děje odehrávající se v plicích a dýchacích cestách a přináší tak zajímavé informace o daných onemocněních.

2. Bronchiální astma

Bronchiální astma je chronické (často celoživotní) zánětlivé onemocnění dýchacích cest, kterého se účastní rozdílné typy buněk^{1,2} (Th2 lymfocyty, eozinofilní granulocyty, žírné buňky, méně potom neutrofilní a bazofilní granulocyty)¹. Projevuje se opakovanými epizodami dušnosti, pískotu při dýchání, dráždivým kašlem, pocity sevření či tíhy na hrudi, a to převážně v noci, časně nad ránem nebo po námaze. Příznaky se zhoršují s virovými infekcemi, při námaze a kontaktu se spouštěči nebo chemickými parami^{1,2}.

Tyto stavy jsou vyvolány zvýšenou průduškovou reaktivitou, často doprovázenou proměnlivou reverzibilní bronchiální obstrukcí². Zánětem dochází i k poškození epitelu dýchacích cest a vzniku strukturálních změn. Na zvýšené bronchiální reaktivitě nese podíl i dysfunkce hladkých svalů průdušek. Při akutním záchvatu dochází ke bronchokonstrikci, vzniku edému, zvýšené mukózní sekreci a posílení zánětu. U neléčeného astmatu dochází k remodelaci dýchacích cest, zbytnění a změnám funkce hladkého svalu¹.

Faktory ovlivňující vznik astmatu lze rozdělit na vnitřní (např. predispozice jedince) a vnější (např. alergie). Specifické alergenů (např. pylů, prach, alergenů domácích zvířat) způsobují vznik přecitlivělosti dýchacích cest a jejich opakovanou expozicí vyvolávají zánět. Ten však může být vyvolán i působením nespecifických vlivů jako jsou kouření, změny počasí, hyperventilace, zvýšená tělesná námaha či emoční vypětí^{1,2}.

3. Chronická obstrukční plicní nemoc

Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) je zánětlivé onemocnění charakterizované téměř ireverzibilním omezením průtoku vzduchu průduškami díky emfyzému (definován jako trvalé zvětšení dechových cest distálně od terminálního bronchiolu, které je spojené s destrukcí jejich stěn bez zřetelné fibrózy) a bronchiální obstrukci vyvolané chronickou bronchiolitidou (definované jako „kašel s expektorací nejméně tři měsíců v roce alespoň v posledních dvou letech“)^{3,4}.

Zánět postihuje velké i malé bronchy a plicní parenchym. Příznaky jako kašel a nadměrná sekrece hlenu bývají způsobeny např. metaplazií pohárkových buněk, hypertrofií hladké svaloviny či hromaděním zánětlivých buněk. Snížená plicní ventilace je naopak způsobena ucpaním malých bronchů zánětlivými buňkami či tvorbou hlenových zátek. Porušení plicního parenchymu vede ke snížení elasticity plic během výdechu⁴. Kromě samotné respirace má CHOPN také negativní dopad na kardiovaskulární

systém či svalovou soustavu³.

Hlavním exogenním faktorem pro vznik CHOPN je kouření (aktivní i pasivní), dále pak působení anorganických a organických prachů a chemikálií, pobyt na místech se znečištěným ovzduším či infekce³.

4. Kondenzát vydechaného vzduchu

Kondenzát vydechaného vzduchu (KVV) je specifická matrice získávaná na speciálních klinických pracovištích vymražením vydechaného vzduchu pomocí kondenzátoru, jenž vede k jeho kondenzaci. Člověk během dne vydechne 15–25 m³ vzduchu, jehož složení v sobě odráží děje odehrávající se v plicích a dýchacích cestách⁵. V plicních sklípcích (alveolách), obklopených plicními kapilárami dochází k difuzi plynů mezi krví a atmosférou. Kromě samotné výměny plynů v plicích dochází v respiračním traktu k regulaci teploty a vlhkosti vdechaného vzduchu a odstranění většiny mechanických nečistot. Vniknutí infekce do organismu prostřednictvím plic brání také lymfatická bariéra⁶. Na povrchu plic a dýchacích cest se vyskytují látky jako enzymy, proteiny, rakovinné markery či specifické protilátky, jejichž přítomnost či koncentrační hladina signalizuje fyziologický/patologický stav organismu⁷. Tyto látky se dostávají do vydechaného vzduchu několika mechanismy. Látky dostatečně těkavé při tělesné teplotě (voda, peroxid vodíku, uhlovodíky a další těkavé organické molekuly) jsou obsaženy v plynné fázi vydechaného vzduchu, která je majoritně složená z atmosférických plynů (např. oxid uhličitý, dusík, kyslík). Kromě toho se v plynné fázi nachází i molekuly nerozpustné ve vodě, které na povrchu sliznice vytváří s vodou binární systém. Tenze par vody a molekul se potom sčítají a dochází k odpaření i málo těkavých látek (např. leukotrieny, prostanoidy). Málo těkavé látky rozpustné ve vodě (např. enzymy, vazoaktivní peptidy) jsou z povrchu bronchů strhávány turbulentním prouděním vzduchu jako aerosolové částice^{6,7}.

Výhodou monitorování stavu pacientů s plicními onemocněními analýzou KVV je neinvazivnost odběru matrice, možnost časté opakovatelnosti odběru a tím i sledování účinnosti farmakoterapie^{5–8}. Vzorek může být odebírán i pacientům odkázaným na dýchací přístroje. Odběr lze díky přenosnosti zařízení provádět přímo v terénu⁹. Nevýhodou získaných informací z KVV je vysoký vliv aktuálního stavu pacienta (např. hydratace/dehydratace organismu) na získané výsledky⁷. Při odběru dýchá pacient (s nosním klipsem) ústy do náhubku a vydechaný vzduch je veden skrz jednocestný ventil (pro oddělení vdechaného a vydechaného vzduchu a tím zamezení kontaminace vzorku molekulami z vnějšího prostředí). Nedílnou součástí kondenzátoru je lapač slin, které by mohly vzorek kontaminovat (a tím změnit koncentrační hladinu sledovaných látek). Možná kontaminace slinami je testována pomocí sledování aktivity slinné α -amylasy. Stěžejní částí kondenzátoru je samotný chladicí systém, který je u komerčně vyráběných tvořen protiproudým chla-

dicím okruhem s teplotou dosahující –10 až –20 °C, kdy dochází ke zkapalnění 93 % vodní páry z vydechaného vzduchu. Pro odběr jsou někdy používány experimentální zařízení, kdy ke kondenzaci dochází při teplotě 10 °C (kondenzace 81 % vodní páry) a 0 °C (kondenzace 89 % vodní páry)^{5,8}. Komerčními kondenzátory KVV se získá 1 až 2 ml matrice při klidovém dýchání po dobu 10 min (120 dm³ vydechnutého vzduchu)⁹.

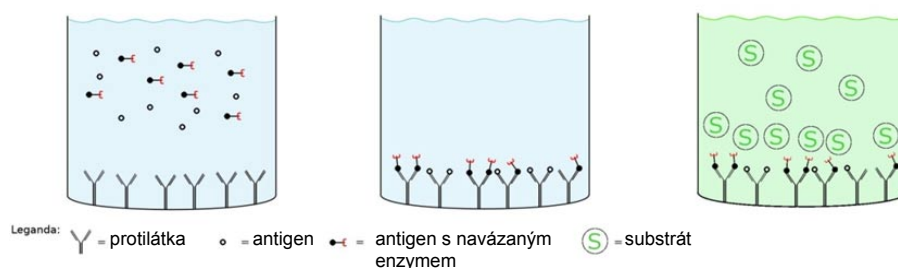
5. Metody analýzy dechového kondenzátu

Vzhledem ke komplexnosti matrice KVV a strukturální rozdílnosti analytů patří mezi nejčastěji používané analytické metody imunochemické metody (zejména ELISA, EIA a poslední dobou rozvíjené proteinové biočipy v multiplexovém uspořádání) a dále separační metody (především kapalinová chromatografie) v kombinaci s vhodným detektorem (hmotnostní spektrometrií, případně UV-Vis a elektrochemický detektor).

Principem imunochemických metod jsou specifické interakce analytu s protilátkou, která je produkována imunitním systémem organismu za účelem *in vivo* specifického rozlišení a zneškodnění cizorodé látky – tzv. antigenu. Enzymová imunoanalýza (EIA – Enzyme Immuno Assay a ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je imunochemická metoda, kde se k detekci a kvantifikaci analytu využívá enzymová reakce se substrátem, jehož katalytická přeměna enzymem je doprovázena barevným přechodem, jež je stanovován spektrofotometriky. Enzym je kovalentně vázán na některý z imunoreaktantů (nejčastěji peroxidasa nebo alkalická fosfatasa). Uživatelsky vhodnější metoda ELISA (enzymová imunoanalýza na pevné fázi) využívá imobilizace jednoho z reaktantů na pevném nosiči (např. na stěně zkumavky či mikrotitrační destičky), což umožňuje provést separaci analytu (antigeny) od matrice vzorku (v tomto případě KVV). ELISA test má dvě základní varianty provedení – kompetitivní a nekompetitivní uspořádání.

Při kompetitivním uspořádání (viz obr. 1) soutěží antigen značený enzymem s analytem z testovaného vzorku o omezené množství vazebných míst imobilizovaných protilátek. Barevná změna přidaného substrátu, která je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného analytu ve vzorku, je daná množstvím vytvořeného komplexu mezi imobilizovanou protilátkou a antigenem značeného enzymem.

Nekompetitivní uspořádání (viz obr. 2) se častěji označuje jako sendvičové uspořádání a patří k nejpoužívanějším typům ELISA testů pro stanovení antigenů s nejméně dvěma různými antigenními determinantami. Na pevný povrch je adsorbována specifická protilátka (většinou monoklonálního původu) proti jedné antigenní determinantě sledovaného antigenu. Po inkubaci vzorku a navázání antigenů na protilátku se následně přidává enzymem značená protilátka. Tato protilátka se váže na druhou antigenní determinantu antigenu. Barevná změna přidaného substrátu, která je přímo úměrná koncentraci sta-



Obr. 1. Schéma kompetitivního uspořádání ELISA

novovaného analytu ve vzorku, je daná množstvím vytvořeného sendvičového komplexu tvořeného imobilizovanou protilátkou – analytem – protilátkou značenou enzymem^{10,11}.

Imunochemické metody jsou nejčastěji používány pro detekci peptidových a proteinových biomarkerů, jejichž nejvýznamnější zástupci pro plicní onemocnění s bronchiální obstrukcí jsou uvedeny v tabulce I. Nevýhodou získaných kvantitativních informací je zkreslení koncentračních hladin analytů tzv. křížovými reakcemi, tj. získání falešně pozitivních či negativních výsledků¹².

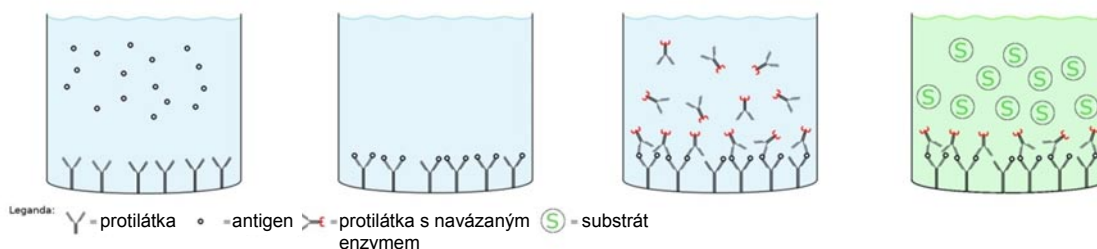
V poslední době se velice používanou metodou pro detekci biomarkerů v biologických matricích stala kombinace vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS). Kapalinová chromatografie se vzhledem k povaze analyzovaných biomarkerů obvykle používá v reverzním uspořádání (polární mobilní fáze a nepolární stacionární fáze kolony). Pro ionizaci analytů se využívají měkké ionizační techniky za atmosférického tlaku, nejčastěji tzv. elektrosprej, jako analyzátor hmotnostního spektrometru se nejčastěji volí trojitý kvadrupól, iontová, nebo lineární iontová past, TOF, nebo tzv. hybridní systémy (např. qTOF, lineární iontová past kombinovaná s orbitrapovou pastí). Moderní chromatografické kolony jsou velmi vhodné pro dělení analytů i z komplexních biologických matric a v kombinaci s hmotnostní spektrometrií se získává velmi citlivá analytická metoda schopná spolehlivě detegovat látky v řádu piko- či femtogramů. Navíc tato metoda poskytuje nejen kvantitativní, ale i kvalitativní informace. Kombinace ka-

palinové chromatografie s hmotnostní detekcí se nejčastěji využívá pro kvantifikaci biomarkerů s molekulovou hmotností do cca 2 kDa, ale lze je s vhodným analyzátozem použít i pro peptidy a proteiny. Přehled nejvýznamnějších biomarkerů pro plicní onemocnění s bronchiální obstrukcí jsou uvedeny v tabulce I.

6. Biomarkery bronchiálního astmatu a chronické obstrukční plicní nemoci

Za biomarker je považován objektivně měřitelný indikátor (látko, struktura či proces) fyziologického/patologického stavu organismu či odpovědi na léčbu. Vlastnostmi biomarkeru jako diagnostického nástroje jsou potom citlivost, selektivita a snadná detekce. Vhodný biomarker by měl být vysoce specifický pro konkrétní onemocnění (v porovnání s ostatními onemocněními), reflektovat jeho základní patofyziologické procesy a reagovat na farmakoterapii. Monitorování biomarkerů by mělo být snadné, bezpečné, reprodukovatelné (na různých pracovištích v různých časech) a neinvazivní pro pacienty³².

V KVV lze sledovat velké množství organických a anorganických sloučenin včetně malých proteinů (např. cytokiny), lipidických mediátorů (např. prostaglandiny a leukotrieny) a derivátů nukleových kyselin³³. Kromě molekul lze u KVV jako robustní biomarker označit pH vzorku, které v sobě odráží acidobazickou rovnováhu dýchacích cest. Díky zánětu a oxidačnímu stresu dochází



Obr. 2. Schéma nekompetitivního uspořádání ELISA

Tabulka I

Přehled nejvýznamnějších biomarkerů pro plicní onemocnění s bronchiální obstrukcí a metod jejich stanovení

Typ biomarkeru	Biomarker	Utilita	Metoda stanovení	Patologický proces	Lit.
Oxid dusnatý a jeho deriváty	nitráty	nespecifický marker oxidačního stresu	fluorimetrie	zvýšení u kuřáků s CHOPN	13
	S-nitrosothioly	nespecifický marker oxidačního stresu	spektrofotometrie	bronchiální astma, cystická fibróza, CHOPN	8
	3-nitrotyrosin	nespecifický marker oxidačního stresu	LC/MS, EIA	bronchiální astma, cystická fibróza	14, 15, 16
Lipidové mediátory	8-isoprostan	nespecifický marker oxidačního stresu	LC/MS, EIA	bronchiální astma, cystická fibróza, kouření a CHOPN	17, 18, 19, 20
	LTB ₄	neutrofilní zánět	LC/MS, EIA	CHOPN, cystická fibróza, bronchiální astma	21, 22
	cysteinylované leukotrieny	eozinofily a mastocyty	LC/MS, EIA, ELISA	alergické astma	23, 24, 25, 26
Cytokiny a chemokiny	IL-1β	akutní zánětlivý cytokin	ELISA, MI	CHOPN	27
	IL-6	Th1 při zánětlivém procesu	ELISA, MI	bronchiální astma, CHOPN	27, 28, 29
	IL-8	neutrofilní zánět	ELISA, MI	bronchiální astma, CHOPN	27, 28, 30, 31
	IL-10	zánětlivý proces	ELISA, MI	bronchiální astma, CHOPN	27
	IL-12	Th1 při zánětlivém procesu	ELISA, MI	CHOPN	27, 28

k poklesu pH vzorku u pacientů postižených astmatem, CHOPN⁷, bronchiolitidou či cystickou fibrózou³⁴. Hodnoty pH korelují s dalšími indikátory zánětu, jako jsou množství eozinofilů a neutrofilů v indukovaném sputu³⁴. U zdravých jedinců se hodnota pH vzorku KVV pohybuje v rozmezí 7,8 až 8,1. U pacientů s bronchiálním astmatem je zaznamenán pokles pH na hodnotu 7,4 (medián). Nevýhodou monitorování pH je nutné uchování vzorku pod inertní atmosférou (jinak dochází k difuzi vzdušného CO₂ do vzorku a tím k dalšímu oxyselování vzorku). Další nevýhodou je neschopnost určit závažnost onemocnění a tudíž se výsledky klidových asymptomatických astmatiků neliší od zdravých jedinců⁷.

Dalším významným biomarkerem monitorovaným v KVV je H₂O₂, který vzniká spontánně nebo katalytickou přeměnou pomocí superoxidodismutasy ze superoxidového radikálu a dále poškozují buňky oxidačními mechanismy. Monitorován bývá spektrofotometricky, spektrofotometricky nebo chemiluminiscencí⁷. Až pětinašobné množství H₂O₂ je obsaženo v KVV kuřáků oproti nekuřákům. Zvýšené množství H₂O₂ je pozorováno také u pacientů bronchiálním astmatem oproti zdravým jedincům. S rostoucím množstvím H₂O₂ v KVV astmatiků také klesá jejich nuce-

ná vitální kapacita plic (maximální množství vzduchu, které lze vydechnout po maximálním inspiračním úsilí)³⁵. Kromě odlišení astmatických pacientů od zdravých jedinců reflektuje H₂O₂ závažnost onemocnění a reakci na farmakoterapii (pokles množství H₂O₂ při léčbě kortikosteroidy). Též u CHOPN je zvýšená koncentrace H₂O₂, která ještě více roste s exacerbací onemocnění a koreluje s množstvím eozinofilů v indukovaném sputu³⁵.

Dalším v KVV sledovaným biomarkerem je oxid dusnatý, se zvýšenou koncentrační hladinou u astmatiků oproti zdravým jedincům, který indukuje vznik dalších molekul zvyšujících nitrační stres (např. oxidy dusíku, peroxonitril, nitrotyrosin). Koncentrace NO je monitorována nepřímo, prostřednictvím stanovení koncentrace dusitanů a dusičnanů v KVV za pomoci chemiluminiscence či iontové chromatografie s vodivostním detektorem⁷. NO je produkován společně reaktivními kyslíkovými částicemi v zánětlivých buňkách eozinofilů, neutrofilů a makrofágů. Peroxonitril inhibuje působení plicních povrchově aktivních látek a poškozují plicní epitel. Silnou imunoreaktivní odpověď vykazují buňky plicního parenchymu a epitelu dýchacích cest na působení nitrotyrosinu³⁶.

Významnými molekulami monitorovanými v KVV

jsou dvacetihlíkaté sloučeniny (tzv. eikosanoidy), mezi něž patří prostaglandiny, leukotrieny, thromboxany a prostacykliny⁷. Jejich prekurzorem je kyselina arachidonová, která je v organismu syntetizována z kyseliny linolové nebo je přijímána potravou (obsažena např. v podzemnici olejné)³⁷. Vázána je v membránových fosfolipidech (hlavně ve fosfatidylinositolu), odkud může být odštěpena buď přímo (fosfolipasou A) za vzniku arachidonové kyseliny a lysofosfolipidu nebo přes meziprodukt 1,2-diacylglycerol (fosfolipasou C). Ten se následně štěpí (diacylglycerollipasou) na arachidonovou kyselinu a monoacylglycerol nebo přechází na kyselinu fosfatidovou (působením diacylglycerolkinasy), která je následně štěpena (fosfolipasou A2) na arachidonovou kyselinu a kyselinu lysofosfatidovou. Kyselina arachidonová je v organismu metabolizována třemi cestami: katalytickým působením cyklooxygenasy (za vzniku prostaglandinů a tromboxanů) nebo 5-lipoxygenasy (za vzniku leukotrienů). Nekatalyzovanou cestou je potom působení reaktivních kyslíkových částic (za vzniku isoprostanů)⁵.

Leukotrieny jsou tvořeny bílými krvinkami v organismu při zánětlivých procesech a alergických reakcích⁵. Mohou však být tvořeny i nespecifickými fyzikálními podněty (chlad) nebo nárůstem koncentrace extracelulárního vápníku. Svým působením navozují bronchokonstrikci, zvýšenou aktivitu dýchacích cest a nadměrnou sekreci hlenu. Stimulují hypertrofii hladkého svalstva a průnik eozinofilů do tkáně dýchacích cest³⁸. Nestabilní epoxidový leukotrien A₄ je metabolizován dvěma způsoby: při zánětlivých reakcích vzniká leukotrien B₄, během alergické reakce je preferován vznik cysteinylovaných leukotrienů. Leukotrien B₄ interaguje s BLT receptorem, který má dále afinitu k 20-hydroxyl-LTB₄ a 12-(R)-hydroxy-eikosatetraenové kyselině²¹. Leukotrien B₄, jehož zvýšená hladina je pozorována např. u CHOPN, cystické fibrózy³⁶ či středně těžkého a těžkého astmatu⁴⁰, způsobuje lokální zúžení dýchacích cest, vznik edému a zvýšenou sekreci hlenu³⁹. Cysteinylované leukotrieny interagují s Cys-LT receptory umístěnými např. na buňkách hladkých svalů a eozinofilů. Působením na receptory Cys-LT₁ v dýchacích cestách a plicích dochází k bronchokonstrikci, edému sliznic a zvýšené produkci hlenu, která vede ke snížení průsvitu dýchacích cest. Při působení cysteinylovaných leukotrienů na receptory Cys-LT₂ dochází ke konstrikci plicních cév⁵.

Prostanoidy (prostaglandiny a thromboxany) jsou tvořeny působením enzymu cyklooxygenasy na kyselinu arachidonovou. Prostaglandiny jsou díky svému cyklohexanovému kruhu rozděleny do 11 skupin označovaných písmeny A–K (cit.⁴¹). V těle plní fyziologické (např. homeostatická regulace dýchací, kardiovaskulární či vylučovací soustavy) a patologické funkce (např. zánět, rakovina, oxidační stres)⁵. Zvýšená hladina prostaglandinu D₂ v KVV byla pozorována u pacientů trpících astmatem oproti zdravým pacientům při alergeny indukované bronchokonstrikci⁴¹. Prostaglandin E₂ inhibuje bronchokonstrikci a podporuje vznik zánětu. Thromboxany jsou tvořeny v krevních destičkách působením thromboxan

A-syntasy na prostaglandin H₂ za vzniku nestabilního thromboxanu A₂, který je rychle transformován na thromboxan B₂ se silnými bronchokonstrikčními účinky^{42,43}.

Isoprostany vznikají neenzymatickou peroxidací kyseliny arachidonové, a to reaktivními kyslíkovými částicemi. Jedná se tedy o chemicky stabilní ukazatele oxidačního stresu^{5,42–45}. Způsobují např. kontrakci hladkého svalstva. Nejvíce zkoumaným isoprostanem je 8-isoprostan, který reakcí s TP receptory způsobuje vazokonstrikci bronchů⁵. Zvýšená koncentrační hladina oproti zdravým jedincům je pozorována u bronchiálního astmatu (určuje závažnost onemocnění a stupeň zánětu), CHOPN, cystické fibrózy⁴². Kromě toho je pozorováno vyšší množství 8-isoprostanu v KVV kuřáků oproti nekuřákům³⁴.

Malé peptidické molekuly, cytokiny, jsou uvolňovány různými typy buněk na podnět imunitního systému v souvislosti se zánětem. Uplatňují se při růstu, diferenciaci a aktivaci imunokompetentních buněk a regulují imunitní odpověď organismu. Lze je rozdělit na prozánětlivé cytokiny (např. interleukin-1 (IL-1), interferon α (INF α), interferon γ (INF γ), faktor nekrotizující nádory (TNF), prozánětlivé cytokiny (IL-4, IL-10), cytokiny s protivirovým účinkem (INF α , INF β a INF γ), cytokiny s aktivitou růstových faktorů krevetvorných buněk (IL-2, IL-3, IL-7), cytokiny uplatňující se v buněčné imunitě (IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF), cytokiny uplatňující se v humorální imunitě (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10)⁴⁶. Monitorování hladin je prováděno především prostřednictvím ELISA, EIA nebo radioimunoanalýzou RIA (Radioimmunoassay)²⁵. U pacientů s astmatem byl pozorován nárůst koncentrační hladiny cytokinů uplatňujících se v buněčné a humorální imunitě oproti kontrolní skupině. Naopak v případě prozánětlivých cytokinů se hladiny obou skupin téměř nelišily⁴⁷.

Jako markery peroxidace lipidů jsou v KVV sledovány aldehydy⁴². Vysoce biologicky aktivní malondialdehyd⁴⁸, který vzniká z kyseliny arachidonové nebo dokosahexanové, je schopný interagovat s nukleovými kyselinami⁴⁹ a je považován za nejvíce mutagenní produkt lipidové peroxidace⁴⁸. Jeho zvýšená koncentrační hladina je pozorována u pacientů s bronchiálním astmatem, CHOPN^{42,50}, silikózou a azbestózou⁴⁸. Za nejvíce toxický produkt peroxidace lipidů bývá považován 4-hydroxynonenal vznikající oxidací ω -6 polynenasycených mastných kyselin (především kyseliny arachidonové a linolové)⁴⁸. Způsobuje inaktivaci enzymů, inhibici syntézy DNA, bílkovin a rozklad červených krvinek⁵¹ a je monitorován v KVV pacientů s CHOPN⁵².

Při astmatickém záchvatu dochází k aktivaci a migraci mnoha typů buněk do tkáně dýchacích cest a plic – např. eozinofilů, granulocytů, lymfocytů. V těchto místech dochází v době záchvatu k uvolňování prozánětlivých mediátorů (např. výše zmiňované cysteinylované leukotrieny). Když záchvat odeznívá, nastává opačný proces – granulocyty a eozinofily jsou odstraňovány z plic a dýchacích cest, což vede k poklesu přecitlivělosti a obnově normální funkce dýchací soustavy. V této době dochází k produkci protizánětlivých mediátorů lipoxinů a 15-epilipoxinů, kte-

ré rekonstrukční proces podporují⁵³. Stejně jako v případě leukotrienů se jedná o eikosanoidy, tj. deriváty kyseliny arachidonové, které ve svém řetězci obsahují tři hydroxylové skupiny a čtyři dvojné vazby (a samozřejmě karboxylovou skupinu). Nejvýznamnějšími zástupci lipoxinů jsou lipoxin A₄ (LXA₄) a lipoxin B₄ (LXB₄). Lipoxiny vznikají mezibuněčnou interakcí v zánětlivých ložiscích. Enzym zodpovědný za jejich biosyntézu je 15-lipoxygenasa (přítomná v epiteliálních buňkách, eozinofilech a dalších leukocytech), která je schopná jak iniciovat biosyntézu lipoxinů, tak transformovat nestabilní leukotrien A₄ na lipoxiny. Interakcí trombocytů (krevních destiček) s leukocyty dochází k přeměně leukotrienu A₄ pomocí trombocytické 12-lipoxygenasy na LXA₄ a LXB₄ (cit.⁵⁴).

Lipoxiny jsou také produkovány epitelem dýchacích cest, monocytů či eozinofilů, které v přítomnosti cytokinů IL-4 a IL-13 zvyšují produkci enzymů (15-LO) zodpovědných za přeměnu kyseliny arachidonové na kyselinu 15S-hydroxyeikosatetraenovou, která je neutrofilickou 5-lipoxygenasou přeměňována na LXA₄ a LXB₄ (cit.⁵³). Zvýšené koncentrační hladiny lipoxinu byly sledovány u pacientů s bronchiálním astmatem⁵⁵.

7. Závěr

Monitorování biomarkerů v kondenzátu vydechaného vzduchu není triviální záležitostí. Sledované analyty se nachází ve velmi nízkých koncentracích v komplexní matici, tudíž je nutné využívat dostatečně selektivní, citlivé a robustní analytické metody.

Důležitá je rovněž interpretace získaných informací. Jeden biomarker lze totiž sledovat i u více onemocnění. Dochází tedy k vytváření skupin biomarkerů, typických pro dané onemocnění, kde se biomarkery navíc vyskytují ve specifických koncentračních hladinách. Pomocí kombinace těchto parametrů lze od sebe odlišit nejen pacienty s plicním onemocněním od zdravých jedinců, ale také jednotlivá onemocnění od sebe a různá stádia konkrétního onemocnění.

Tato práce se uskutečnila v rámci Národního programu udržitelnosti (NPU I LO1215) MŠMT - 34870/2013 a IGA MZ (NV16-27075A).

Seznam zkratk

15-LO	15-lipoxygenasa
CHOPN	chronická obstrukční plicní choroba
Cys-LT receptor	receptor pro cysteinylované leukotrieny
BLC receptor	receptor pro leukotrien B ₄
EIA	enzymová imunoanalýza
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné fázi
IL	interleukin
INF	interferon
KVV	kondenzát vydechaného vzduchu
MI	multiplexní imunoanalýza
q TOF	hybridní typ analyzátoru spojující

TNF	kvadrupól s analyzátozem
TOF	na bázi doby letu
	faktor nekrotizující nádory
	analyzátor na bázi doby letu

LITERATURA

1. Kašák V., Špičák V., Posunek P.: Interní medicína pro praxi 10, 442 (2001).
2. Horáček T., Špičák V., Švihovec J.: *Asthma bronchiale. Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře*. Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře, Praha 2005.
3. Musil J., Vondra V., Konštacký S.: *Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN). Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře*. Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře, Praha 2008.
4. Musil J.: Interní medicína pro praxi 11, 319 (2009).
5. Bondesson E., Jansson L T., Benstsson T., Wollmer P.: J. Breath Res. 3, 016005 (2009).
6. Kapounková K.: http://is.muni.cz/el/1451/podzim2013/bk2156/Fyziologie_dychacihio_systemu.ppt, staženo 18.7.2016.
7. Syslová K., Kačer P., Kuzma M., Novotný P., Pelclová D., v knize: *Bronchial Asthma - Emerging Therapeutic Strategies*, kap. 3. InTech, 2012.
8. Montuschi P.: Clin. Chim. Acta 356, 22 (2005).
9. Horváth I., Hunt J., Barnes P.: Eur. Respir. J. 26, 523 (2005).
10. Daussant J., Desvaux F. X.: *Introduction to Immunochemical Techniques for Medical Diagnosis, Food Quality Control and Environmental Testing*. ICT Prague, Praha 2007.
11. Šafařík I., Šafaříková M.: Chem. Listy 89, 280 (1995).
12. Juncker D., Bergeron S., Laforte V., Li H.: Arrays 18, 29 (2014).
13. Hunt J.: J. Allergy Clin. Immunol. 110, 28 (2002).
14. Ichinose M., Sugiura H., Yamagata S., Koarai A., Shirato K.: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 162, 701 (2000).
15. Velsor L. W., van Heeckeren A., Day B. J.: Am. J. Physiol.: Lung Cell. Mol. Physiol. 281, 31 (2001).
16. Pignatelli B., Li C. Q., Boffetta P., Chen Q., Ahrens W., Nyberg F., Mukeria A., Bruske-Hohlfeld I., Fortes C., Constantinescu V.: Cancer Res. 61, 778 (2001).
17. Montuschi P., Kharitonov S. A., Ciabattini G., Corradi M., van Rensen L., Geddes D. M., Hodson M. E., Barnes P. J.: Thorax 55, 205 (2000).
18. Montuschi P.: Respiration 74, 134 (2008).
19. Montuschi P., Barnes P. J., Ciabattini G.: *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*, kap. Measurement of 8-isoprostane in exhaled breath condensate. Springer, 2010.
20. Johns N. P.: Johns, J. R.: APJCP 13, 775 (2012).
21. Seggev J., Thornton W., Edes T.: CHEST J. 99, 289

- (1991).
22. Montuschi P.: *J. Chromatography B* 887, 1272 (2009).
 23. Montuschi P., Collins J. V., Ciabattini G., Lazzari N., Corradi M., Kharitonov S. A., Barnes P. J.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 1175 (2000).
 24. Montuschi P.: *New perspectives in monitoring lung inflammation: analysis of exhaled breath condensate*. Taylor & Francis, USA 2004.
 25. Sampson A. P., Spencer D., Green C., Piper P., Price J.: *Br. J. Clin. Pharmacol.* 30, 861 (1990).
 26. Usery J. B., Self T. H., Muthiah M. P., Finch C. K.: *The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 28, 1183 (2008).
 27. Gessner C., Scheibe R., Wötzel M., Hammerschmidt S., Kuhn H., Engelmann L., Hoheisel G., Gillissen A., Sack U., Wirtz H.: *Respiratory Medicine* 99, 1229 (2005).
 28. Garcia Marcos L., Sanchez Solis M., Martinez Torres A. E., Lucas Moreno J. M., Sastre V. H.: *PAI* 18, 240 (2007).
 29. Bonfield T. L., Panuska J. R., Konstan M. W., Hilliar, K. A., Hilliard J. B., Ghnaim H., Berger M.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1152, 2111 (1995).
 30. Jabara H., Ahern D., Vercelli D., Geha R.: *J. Immunol.* 147, 1557 (1991).
 31. Jones A., Martin L., Bright-Thomas R., Dodd M., McDowell A., Moffitt K., Elborn J., Webb A.: *Eur. Respir. J.* 22, 503 (2003).
 32. Syslová K.: *Dizertační práce*. VŠCHT Praha, Praha 2015.
 33. Caffarelli C., Calcinai E., Rinaldi L., Povesi Dascola C., Terracciano L., Corradi M.: *Respiration* 84, 291 (2012).
 34. Tonnel A., Wallaert B.: *Eur. Respir. J.* 3, 987 (1990).
 35. Mutlu G., Garey W., Robbins R., Danziger L., Rubinstein I.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 731 (2001).
 36. Hanazawa T., Kharitonov S., Barnes P.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 1273 (2000).
 37. Katsuki H., Okuda S.: *Prog. Neurobiol.* 46, 607 (1995).
 38. Scott D., Luttermoser G., Dickerson, K.: <http://www.tribune.cz/clanek/10901-inhibitory-leukotrienu-vecbe-alergie-a-astmatu>, staženo 26.7. 2016.
 39. Montuschi P., Ragazzoni E., Valente S., Corbo G., Mondino C., Ciappi G., Ciabattini G.: *Inflamm. Res.* 52, 502 (2003).
 40. Caballero Balanza S., Martorell Aragones A., Cerda Mir J. C., Ramirez J. B., Navarro Ivaner R. Navarro Soriano A., Felix Toledo R., Escribano Montaner A.: *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 20, 237 (2010).
 41. Ono E., Mita H., Taniguchi M., Higashi N., Tsuburai T., Hasegawa M., Miyazaki E., Kumamoto E., Akiyama K.: *J. Breath Res.* 122, 768 (2008).
 42. Ahmadzai H., Huang S., Hettiarachchi R., Lin J., Thomas P., Zhang Q.: *Clin. Chem. Lab. Med.* 51, 1343 (2013).
 43. Komprda T., Angsorgová A., Rozílková V., Němcová B.: *Chem. Listy* 109, 140 (2015).
 44. Bolechová M., Čáslavský J., Mácová D., Vávrová M., Taggart M.: *Chem. Listy* 109, 305 (2015).
 45. Montuschi P., Barnes J., Roberts L.: *FASEB J.* 18, 1791 (2004).
 46. Navrátil L. (ed.): *Vnitřní lékařství - Pro nelékařské zdravotnické obory*. Grada, Praha 2008.
 47. Robroeks C., Rijkers G., Jöbsis Q., Hendriks H., Damoiseaux J., Zimmermann L., Van Schayck O., Dompeling E.: *Clin. Exp. Allergy* 40, 77 (2010).
 48. Esterbauer H., Eckl P., Ortner A.: *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* 238, 223 (1990).
 49. Marnett L.: *Mutat. Res.* 424, 83 (1999).
 50. Syslová K., Kačer P., Pelclová D.: *J. Chromatogr. B* 887, 2477 (2006).
 51. Uchida K., Stadtman E.: *Biochemistry* 89, 4544 (1999).
 52. Rahman I., De Boer W., Van Schadewijk A.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 490 (2002).
 53. Levy B. D.: *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 73, 231 (2005).
 54. Serhan C. N.: *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 433, 68 (2002).
 55. Wu S. H., Yin P. L., Zhang Y. M., Tao H. X.: *Pediatric Pulmonology* 45, 333 (2010).
- J. Vondroušová, K. Syslová, and P. Kačer**
(*University of Chemistry and Technology in Prague, Prague*): **Exhaled Breath Condensate – Specific Matrix for Monitoring Lung Diseases**
- Diagnostic methods used in the contemporary medical practice consist of a combination of distressing invasive (bronchial biopsy, bronchoalveolar lavage) and semi-invasive (induced sputum technique) methods. Monitoring of specific molecules produced during pathological processes in biological matrices is a relatively new technique which represents an alternative, entirely non-invasive and comfortable method. The principle is based on the quantification of specific substances – "biomarkers", which are considered to be objectively measurable indicators of a physiological/pathological condition of the organism. In contrast with non-specific matrices such as blood plasma (reflecting the state of the whole organism), the exhaled breath condensate is a specific matrix. Concentration levels of biomarkers in the latter matrix point at pathological processes only in the airways and lungs. Typical molecules to be monitored include hydrogen peroxide, leukotrienes, prostaglandins, lipoxins and prostanoids.