

Uniwersytet Jagielloński

Collegium Medicum

Wydział Lekarski

Edyta Głowacka

Przydatność oznaczenia eikozanoidów w kondensacie powietrza wydechowego (EBC) u dzieci z astmą

Praca doktorska

Promotor: dr hab. med. Grzegorz Lis

Pracę wykonano w Katedrze Pediatrii CM UJ

Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. Jacek J. Pietrzyk

Kraków, 2012

*Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi,
Panu dr hab. med. Grzegorzowi Lisowi
za okazaną pomoc, życzliwość i poświęcony czas przy realizacji niniejszej pracy*

Spis treści

Spis treści	3
Skróty	5
1 Wstęp.....	8
1.1 Definicja astmy	8
1.2 Astma u dzieci.....	8
1.3 Zapalenie astmatyczne	13
1.4 Metody oceny procesu zapalnego w astmie.....	24
1.4.1 Metody pośrednie	25
1.4.2 Metody inwazyjne	25
1.4.3 Metody nieinwazyjne	25
1.5 Biomarkery zapalenia astmatycznego w EBC	30
1.5.1 Cytokiny	30
1.5.2 pH	31
1.5.3 Nadtlenek wodoru.....	31
1.5.4 Pokrewne związki tlenu azotu.....	32
1.5.5 Amoniak	32
1.5.6 Puryny.....	32
1.5.7 Eikozanoidy	32
2 Założenia i cel pracy	37
3 Materiał i metody	38
3.1 Charakterystyka grupy badanej.....	38
3.2 Opis badania.....	39
3.2.1 Pierwszy etap badania	39
3.2.2 Drugi etap badania.....	39
3.3 Metody	39
3.3.1 Badania ankietowe.....	39
3.3.2 Testy skórne prick	40
3.3.3 Oznaczanie FeNO.....	40
3.3.4 Badanie spirometryczne	40
3.3.5 Test wysiłkowy.....	40
3.3.6 Kolekcja EBC i pomiar eikozanoidów	40
3.3.7 Inne badania analityczne	43
3.3.8 Analiza statystyczna	43
4 Wyniki.....	45

4.1	Charakterystyka kliniczna grup badanych i ich porównanie	45
4.2	Pierwszy etap badania	47
4.2.1	Stężenia eikozanoidów w EBC.....	47
4.2.2	Zależności stężeń eikozanoidów w EBC od wieku, płci, BMI z-score, $\Delta\%$ FEV1 w obu badanych grupach	47
4.2.3	Porównanie stężeń eikozanoidów w EBC u astmatyków i dzieci zdrowych	47
4.2.4	Stężenia eikozanoidów w EBC astmatyków w zależności od parametrów klinicznych.....	50
4.2.5	Ocena przydatności stężeń eikozanoidów w diagnostyce astmy.....	51
4.3	Drugi etap badania	54
4.3.1	Charakterystyka kliniczna grupy badanej.....	54
4.3.2	Stężenia eikozanoidów w EBC u uczestników drugiego etapu badania	57
5	Dyskusja.....	62
5.1	Ocena wiarygodności uzyskanych wyników	62
5.1.1	Grupa badana	62
5.1.2	EBC	63
5.2	Stężenia eikozanoidów w EBC	65
5.2.1	Prostaglandyna D2 i F2 α	65
5.2.2	Prostaglandyna E2	66
5.2.3	Tromboksan B2 i prostacyklina.....	67
5.2.4	Izoprostany	68
5.2.5	5HETE	68
5.2.6	Leukotrieny cysteinylowe.....	69
5.2.7	Leukotrien B4	69
5.2.8	Stężenia eikozanoidów w EBC a płeć, wiek, BMI z-score, nadreaktywność oskrzeli.....	70
5.2.9	Stężenia eikozanoidów w zależności od parametrów klinicznych chorujących na astmę.....	71
5.3	EACR	74
5.4	Ocena zmienności eikozanoidów w EBC podczas kolejnych wizyt.....	76
5.5	Perspektywy dalszych badań	77
6	Wnioski	79
	Streszczenie	80
	Summary	80
	Piśmiennictwo.....	88
	Spis rysunków	106
	Spis tabel.....	107

Skróty

$\Delta\%$ FEV1	odsetkowe obniżenie FEV1 w teście wysiłkowym
11dehydro-TXB2	metabolit tromboksanu B2
12HETE	kwasy 12-hydroksyeikozatetraenowe
12HPETE	kwasy 12-hydroperoksyekozatetraenowe
12-LO	12-lipooksygenaza
15-DHPG	15-dehydrogenaza prostaglandynowa
15HETE	kwasy 15-hydroksyeikozatetraenowe
15HPETE	kwasy 15-hydroperoksyekozatetraenowe
15ketoPGE2	15keto prostaglandyna E2
15-LO	15-lipooksygenaza
5HETE	kwasy 5-hydroksyeikozatetraenowe
5HPETE	kwasy 5-hydroperoksyekozatetraenowe
5-LO	5-lipooksygenaza
6ketoPGF1 α	metabolit prostacykliny
8izo-PGF2 α	izoprostan PGF2 α
9 α ,11 β -PGF2 α	metabolit prostaglandyny D2
AA	kwasy arachidonowe
ACT	test kontroli astmy
AIC	kryterium informacyjne Akaike
ALF	płyn wyścielający oskrzela i pęcherzyki
APC	komórki prezentujące antygen
AUC	pole powierzchni pod krzywą
BAL	płukanie pęcherzykowo-oskrzelowe
BHR	nadreaktywność oskrzeli
COX1	cyclooksygenaza-1
COX2	cyclooksygenaza-2
cPGES	cytozolowa syntaza prostaglandyny E2
cPLA2	cytozolowa fosfolipaza A2
CRTH2/DP2	receptor 2 prostaglandyny D2
CYP	enzymy cytochromu P450
cysLTs	leukotrieny cysteinyłowe
DP1	receptor 1 prostaglandyny D2
EACR	wskaźnik predykcji astmy (w oparciu o eikozanoidy EBC)
EBC	kondensat wydychanego powietrza

EIA	metoda immunoenzymatyczna
EXC4	eoksyna C
EXD4	eoksyna D
EXE4	eoksyna E
EXs	eoksyny
FcεRI	receptory o wysokim powinowactwie dla IgE
FcεRII	receptory o niskim powinowactwie dla IgE
FeNO	stężenie tlenu azotu w wydychanym powietrzu
FEV1	natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa
FEV1%N	odsetek wartości należnej FEV1
FLAP	białko aktywujące 5-lipooksygenazę
GC-MS ²	chromatografia gazowa - tandemowa spektrometria masowa
GC-NICI-MS	chromatografia gazowa - spektrometria masowa z ujemną jonizacją chemiczną
GPCR	receptory błonowe sprzężone z białkiem G
HPLC-MS ²	wysokosprawna chromatografia cieczowa - tandemowa spektrometria masowa
ICC	wewnątrzgrupowy współczynnik korelacji
IL	interleukiny
INFγ	interferon γ
LABA	długodziałający β2-agoniści
LPAT	acyltransferaze lyzofosfolipidów
LTA4	leukotrien A4
LTB4	leukotrien B4
LTC4	leukotrien C4
LTD4	leukotrien D4
LTE4	leukotrien E4
LTRA	antagoniści receptora leukotrienów
LTs	leukotrieny
LXA4	lipoksyna A4
LXB4	lipoksyna B4
LXs	lipoksyny
mPGES	mikrosomalna syntaza PGE2
PGD2	prostaglandyna D2
PGE2	prostaglandyna E2

PGEM	tetranor-PGEM (11 α -hydroxy-9,15-dioxo-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20-dikarbo-ksylowy)
PGEMI	13,14 dihydro 15keto prostaglandyna E2
PGF2 α	prostaglandyna F2 α
PGG2	prostaglandyna G2
PGH2	prostaglandyna H2
PGI2	prostacyklina
RIAs	metody radioimmunologiczne
SPT	testy skórne z alergenami
Th	limfocyty pomocnicze
TP	receptor tromboksanu A2
transLTC4	izomer leukotrienu C4
TV	objętość oddechowa
TXA2	thromboksan A2
TXB2	thromboksan B2
wGKS	wziewne glikokortykosteroidy

1 Wstęp

1.1 Definicja astmy

W świetle aktualnej wiedzy astma jest chorobą zapalną dolnych dróg oddechowych definiowaną na podstawie objawów klinicznych oraz cech patofizjologicznych. Proces zapalny, w którym uczestniczy wiele komórek (zwłaszcza mastocyty, eozynofile i limfocyty oraz wydzielane przez nie substancje), prowadzi do rozlanego, zmiennego ograniczenia przepływu powietrza przez drogi oddechowe i następnej ich przebudowy. Klinikną manifestację choroby stanowią nawracające epizody świszczącego oddechu, duszności, uczucia ucisku w klatce piersiowej oraz kaszlu. Cechą charakterystyczną jest ich łatwe wyzwalanie przez czynniki swoiste i nieswoiste oraz ustępowanie samoistne lub pod wpływem leczenia [1;2]. Konsensus postępowania w astmie u dzieci (PRACTALL) opublikowany w roku 2008, opracowany we współpracy Europejskiej Akademii Alergologii i Immunologii Klinicznej oraz Amerykańskiej Akademii Alergologii, Astmy i Immunologii, w definicji astmy dziecięcej uwzględnia jej obraz kliniczny w poszczególnych przedziałach wiekowych związanych z rozwojem układu oddechowego oraz etiologiczny, wyróżniając postacie indukowane zakażeniem, wysiłkiem, alergenem i o innej nieustalonej etiologii [3].

1.2 Astma u dzieci

Astma jest najczęstszą przewlekłą chorobą układu oddechowego u dzieci. Jej złożony i niejednorodny charakter związany jest z jej wieloczynnikową i nie w pełni wyjaśnioną etiologią, różnorodnymi, złożonymi mechanizmami patogenetycznymi co znajduje odzwierciedlenie w wyodrębnieniu różnych fenotypów choroby. Istnieje coraz więcej dowodów na wpływ predyspozycji genetycznych na skłonności do nieprawidłowego rozwoju płuc z obniżeniem ich wydolności [4;5], opóźnienie dojrzewania immunologicznego ze zwiększoną zapadalnością na infekcje wirusowe dolnych dróg oddechowych [6], wcześniejszą prezentacją reakcji alergicznych oraz ujawnianie nadreaktywności oskrzeli [7-10]. Istotne znaczenie mogą mieć też: wzajemne interakcje genetyczno-środowiskowe prowadzące do zmiany ekspresji genów poprzez mechanizmy epigenetyczne [11], prenatalna ekspozycja na dym tytoniowy i zanieczyszczenia powietrza, choroby matki (astma, cukrzyca) oraz przebyte zakażenia przez dziecko [12;13]. Szczególnie ważna wydaje się synergia wirusowych infekcji dolnych dróg oddechowych oraz uczuleń na alergeny środowiskowe we wczesnym dzieciństwie [14;15].

Częstość występowania astmy w ostatnich dekadach znacząco wzrosła zwłaszcza w krajach rozwiniętych. Cennych danych epidemiologicznych dostarczyło międzynarodowe badanie na temat astmy i chorób alergicznych u dzieci (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood - ISAAC*), przeprowadzone w latach 1994-2004. Chorobowość wśród dzieci w wieku 6-7 i 13-14 lat oceniona w pierwszej fazie badania była bardzo zróżnicowana od 1% w krajach nisko rozwiniętych do 35% w wysoko uprzemysłowionych [16]. Wnioski raportu z trzeciej fazy badania mówią o utrzymującej się wysokiej częstości astmy w krajach o wysokim dochodzie narodowym i trendzie do występowania cięższych postaci choroby w państwach o jego niższych wartościach [17]. W Polsce częstość astmy oceniana podczas 7 letniego (1995-2002) okresu tego badania (Kraków, Poznań) wzrosła z 1,3 do 5,9% u dzieci w wieku 6-7 lat i z 2,0% do 6,8% w wieku 13-14 lat [18]. Przeprowadzone w latach 2007-2008 badanie ECAP (*Epidemiologia Chorób Alergicznych w Polsce*) wykazało, że w zależności od regionu kraju, astma występuje u 2-7% dzieci 6-7 letnich i u 4-10% dzieci 13-14 letnich [19]. Oba badania zwracają uwagę na dysproporcje między występowaniem objawów astmatycznych a faktem ustalonego rozpoznania astmy. Częstość tego zjawiska (stan niedodiagnozowania astmy) w Polsce zmniejsza się, ale nadal dotyczy ono zwłaszcza dzieci młodszych. Rozpoznanie astmy u dzieci przedszkolnych stanowi szczególnie trudny problem, bowiem zarówno bezpośrednie jak i pośrednie metody oceny zapalenia dróg oddechowych w tej grupie wiekowej mają ograniczone zastosowanie.

Wiek dziecka i związana z nim anatomia i fizjologia dróg oddechowych oraz czynniki wywołujące decydują o sposobie klinicznej manifestacji astmy. Na tej podstawie wyróżniane są dwa podstawowe fenotypy tej choroby u dzieci: astma wczesnodziecięca i astma dzieci w wieku szkolnym (> 6 r.ż.), a w tej grupie dodatkowo astma młodzieży [20]. Zaproponowane przez konsensus PRACTALL praktyczne podejście do wyróżnienia fenotypów astmy dziecięcej uwzględnia: astmę u dzieci do 2. r.ż. - wyróżniając fenotyp dziecka z przewlekłą lub nawracającą obturacją; astmę wieku przedszkolnego – z charakterystycznym ustępowaniem objawów między epizodami zaostrzeń spowodowanych czynnikami infekcyjnymi, wysiłkiem, ekspozycją na alergen lub innym nieokreślonym czynnikiem; astmę dzieci szkolnych - o podobnym przebiegu jak u przedszkolaków, jednak z bardziej eksponowaną rolą alergenów w indukcji zaostrzeń i zaznaczającą się sezonowością objawów; astmę młodzieży – często ujawniają się w tym okresie nowe przypadki astmy atopowej, ale możliwa jest również postać nieatopowa [3]. Kliniczne objawy astmy u dzieci szkolnych przyjmują najczęściej postać jej klasycznego fenotypu z okresami zaostrzeń (duszność wydechowa, świszczący oddech, kaszel) oddzielonych bezobjawowymi przerwami, lub

postać kaszlową objawiającą się suchym, napadowym kaszlem głównie w nocy i nad ranem. Około połowa dzieci prezentująca ten ostatni fenotyp rozwija w przyszłości klasyczne objawy astmy [21].

Mając na uwadze zapalenie jako istotę choroby, w oparciu o obraz cytologiczny indukowanej płwociny, w astmie przewlekłej wyróżnia się fenotypy: eozynofilowy, neutrofilowy oraz mieszany [22;23]. Aktualnie brak jest jednoznacznych ustaleń dotyczących zależności fenotypu klinicznego astmy z jej fenotypem zapalnym. Dzieci z ciężką astmą i częstymi zaostrzeniami prezentują nierzadko wysoką eozynofilę w płwocinie [22;24]. Eozynofilowe zapalenie wiąże się patofizjologicznie z pogrubieniem błony podstawnej i dobrą reakcją na leczenie kortykosteroidami. Nieeozynofilową astmę obserwuje się często u chorych z ciężką i relatywnie oporną na kortykosteroidy chorobą. Neutrofilia dróg oddechowych koreluje z przewlekłym ich zwężeniem i słabą odpowiedzią na bronchodilatatory [25]. Ostatnie doniesienia potwierdzają hipotezę, że nieatopowi astmatycy mają znacząco większy odsetek i bezwzględną liczbę neutrofilów w indukowanej płwocinie w stosunku zarówno do ich zdrowych jak i atopowych rówieśników z astmą. Z kolei dzieci atopowe z astmą, nie leczone wziewnymi kortykosteroidami, prezentują wyższy odsetek eozynofilów w płwocinie w porównaniu ze zdrowymi, czy z chorymi na astmę nieatopową rówieśnikami [26]. Wydaje się, że badania dotyczące zapalnego fenotypu astmy mogą okazać się pomocne w wyborze optymalnej terapii tego złożonego schorzenia.

W oparciu o aktualną wiedzę na temat mechanizmów, które inicjują proces zapalny zaproponowano podział astmy na postać alergiczną (IgE-zależną lub IgE-niezależną) i niealergiczną [27]. Wśród dzieci, astma alergiczna IgE-zależna (udział w patogenezie IgE udowodniony lub wysoce prawdopodobny) stanowi dominującą postać. Najczęściej rozpoczyna się ona we wczesnym dzieciństwie. Około 30-60% dzieci z nawracającymi epizodami obturacji jest uczulonych na alergeny środowiskowe, a liczba ta wzrasta do 70-90% wśród astmatyków w wieku szkolnym. Często dzieci te prezentują też inne kliniczne objawy atopii [28]. Astma niealergiczna, pojawia się częściej u dzieci starszych oraz młodzieży i charakteryzuje się ciężkim przebiegiem klinicznym. Patomechanizm astmy niealergicznej (wewnątrzpochodnej) nie został w pełni wyjaśniony. W tej postaci astmy, proces zapalny w drogach oddechowych, przebiega bardzo podobnie do astmy alergicznej, z zaangażowaniem limfocytów pomocniczych (Th₂), aktywacją mastocytów i tworzeniem nacieków eozynofiliowych, a w ciężkich postaciach również neutrofilowych [29;30]. Pojawiają się sugestie o istotnej roli superantygenów produkowanych przez mikroorganizmy np. gronkowce kolonizujące nabłonek dróg oddechowych. Te lokalnie uwalniane antygeny mogą

prowadzić do zmiany klasy produkowanych miejscowo immunoglobulin, z następową poliklonalną produkcją IgE oraz wytwarzaniem specyficznych IgE przeciw superantygenowi. Prowadzi to do sensytyzacji mastocytów, które mogą być aktywowane przez zwykłe czynniki wyzwalające zaostrenie (np. wysiłek). Superantygen może również odpowiadać za zmniejszenie odpowiedzi na kortykosteroidy, prowadząc do progresji ciężkości astmy [29].

Inny patomechanizm leży u podłoża astmy wysiłkowej, charakteryzującej się przejściowym skurczem oskrzeli, do którego dochodzi po intensywnym wysiłku fizycznym, rzadziej w jego trakcie. Istnieją dwie podstawowe teorie tłumaczące stymulowaną wysiłkiem nadreaktywność oskrzeli (BHR): termiczna i osmotyczna. Częstość występowania powysiłkowego skurczu oskrzeli szacuje się na około 80-90% chorych na astmę i na 11% w ogólnej populacji [31].

Wśród chorych na astmę osobną grupę stanowią pacjenci, u których epizody zaostreń są związane ze spożyciem kwasu acetylosalicylowego lub innych niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Jest to zespół kliniczny, zwany astmą aspirynową (*aspirin-induced asthma* - AIA), związany ze zmianami w metabolizmie kwasu arachidonowego i nadprodukcją leukotrienów cysteinylowych. U dzieci ta postać choroby występuje sporadycznie i objawia się w wieku dojrzewania, częściej u dziewczynek, a około 1/3 z nich wykazuje cechy atopii [32].

Pod względem ciężkości przebiegu wyróżniono astmę: epizodyczną, przewlekłą łagodną, umiarkowaną i ciężką. Z kolei, z punktu widzenia klinicznego najbardziej istotna jest klasyfikacja według stopnia jej kontroli. Ocena ta może opierać się na kryteriach szczegółowo opisanych w raporcie GINA i pozwalających zakwalifikować astmę jako kontrolowaną, częściowo kontrolowaną i niekontrolowaną. W praktyce klinicznej stosowane są wystandaryzowane narzędzia opisujące stopień kontroli astmy. Najczęściej używany jest w tym celu Test Kontroli Astmy (*Asthma Control Test* - ACT) w wersji dla dorosłych i młodzieży (≥ 12 r.ż.) oraz dla dzieci (4-11 lat) [33;34].

Większość zachorowań na astmę ujawnia się już w wieku dziecięcym. Ponad 50% niemowląt i dzieci do 6 roku życia prezentuje co najmniej jeden incydent świszczącego oddechu [35], u około 24% dzieci od 1 do 5 lat epizody takie mają charakter nawracający [36], a 20 % dzieci do 3 roku życia przechodzi infekcję dolnych dróg oddechowych z towarzyszącą dusznością wydechową [35]. Pomimo tak wysokiej częstości objawów astmatycznych w wieku przedszkolnym, w większości mają one charakter przejściowy i u 50-60% prezentujących je niemowląt ustępują w wieku szkolnym i młodzieńczym [37;38]. Do niekorzystnych czynników prognostycznych dla „wyrastania” z choroby należą: ciężkość

przebiegu astmy w dzieciństwie, objawy towarzyszących innych chorób o podłożu atopowym, rodzinny wywiad w kierunku chorób alergicznych u krewnych pierwszego stopnia. Jak wykazują długoletnie prospektywne badania aż 90% dzieci z ciężką postacią astmy w wieku 7 lat prezentuje objawy choroby w 35 r.ż., ale spośród osób, które w dzieciństwie prezentowały astmę łagodną bez objawów choroby w 35 r.ż. będzie 65% z nich [39]. Inni autorzy zwracają jednak uwagę, że u ponad 50% bezobjawowych pacjentów w wieku dojrzałym (w 30 letniej obserwacji) można potwierdzić subkliniczną postać choroby (nadreaktywność oskrzeli i/lub obniżenie parametrów czynnościowych płuc) [40]. Na toczący się proces remodelingu oskrzeli w czasie klinicznej remisji po okresie dojrzewania wskazują badania bioptatów śluzówki oskrzeli tych pacjentów. Występuje u nich zwiększona liczba eozynofiliów, limfocytów T i mastocytów w śluzówce dróg oddechowych w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Eozynofilia bioptatów tych chorych koreluje również z eozynofilią krwi obwodowej, stężeniem FeNO i stopniem nadreaktywności oskrzeli [41]. Utrzymywanie się procesu zapalnego u dzieci z astmą sporadyczną w przeszłości zostało też udokumentowane poprzez wykazanie w ich płwocinie wyższego odsetka komórek wykazujących barwienie dla podjednostki p65 czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w porównaniu do zdrowych rówieśników [42].

Trudności diagnostyczne astmy u dzieci

Podstawę rozpoznania astmy stanowi szczegółowo zebrany wywiad. Badanie przedmiotowe w okresie remisji może nie wykazywać istotnych odchyleń. U dzieci starszych podobnie jak u dorosłych pomocne w ocenie, mogą być badania czynnościowe układu oddechowego, z wykazaniem charakterystycznej dla astmy nadreaktywności oskrzeli. Wykazanie podłoża atopowego poprzez wykonanie testów skórnych lub oznaczenie swoistych IgE, podobnie jak eozynofilia krwi obwodowej, płwociny, popłuczyn oskrzelowych, czy w bioptacie błony śluzowej oskrzeli mają znaczenie pomocnicze. Kliniknym dowodem nadwrażliwości jest występowanie patologicznych objawów po ekspozycji na dany czynnik (najczęściej alergen).

Najtrudniejszą diagnostycznie grupę stanowią niewątpliwie dzieci przedszkolne, u których możliwości wykonania standardowych badań czynnościowych układu oddechowego są ograniczone. Rozpoznanie opiera się głównie na obrazie klinicznym. Pomocne może być wówczas zastosowanie indeksu przewidywania astmy (*Asthma Predictive Index* - API) zaproponowane w roku 2000 przez grupę Martineza [43]. Podstawowym, obligatoryjnym kryterium dla tego indeksu są: występowanie nawracających obturacji oskrzeli (> 3

epizodów) lub przebycie jednego ciężkiego epizodu obturacji wymagającego hospitalizacji. Ponadto, wyróżniane są kryteria główne: astma u rodziców, atopowe zapalenie skóry u dziecka w wieku 2-3 lat rozpoznane przez lekarza oraz kryteria małe: alergiczny nieżyt nosa, występowanie obturacji oskrzeli niezależnie od infekcji, eozynofilia krwi obwodowej powyżej 4%. Spełnienie kryterium podstawowego oraz 1 kryterium głównego lub 2 kryteriów małych wskazuje na wysokie prawdopodobieństwo astmy u danego dziecka [2].

Jednak nawracające epizody kaszlu, świszczącego oddechu oraz duszności występują u około 30% dzieci do 3 r.ż. a ich częstość wzrasta do 50% u dzieci z obecnością atopii w wywiadzie rodzinnym [35;36;44;45]. Pociąga to za sobą konieczność częstego różnicowania ich z nieastmatycznymi przyczynami. Złożoność zagadnienia ustalania rozpoznań w młodszej grupie wiekowej pogłębia również sytuacja niejednorodnej odpowiedzi na zastosowane typowe leczenie przeciwastmatyczne.

Heterogenna etiologia astmy, jej bogate zróżnicowanie fenotypowe, brak wystandaryzowanych i ilościowych kryteriów rozpoznania oraz niedostatek swoistych, rutynowych metod analitycznych, skłaniają do poszukiwania nowych, nieinwazyjnych wskaźników o charakterze diagnostycznym, a także służących do oceny przebiegu klinicznego choroby i stopnia zaawansowania zapalenia alergicznego dróg oddechowych.

1.3 Zapalenie astmatyczne

Astma jest chorobą zapalną o złożonym mechanizmie patofizjologicznym, obejmującą wszystkie odcinki dolnych dróg oddechowych. Ten specyficzny rodzaj zapalenia, jako skutek interakcji pomiędzy wieloma komórkami zapalnymi i komórkami nabłonka oddechowego, ze znaczącą rolą reakcji IgE-zależnej, jest podobny we wszystkich klinicznych postaciach astmy. Należy jednocześnie zaznaczyć, że wśród chorych dzieci na astmę ponad 80% z nich wykazuje cechy atopii [46]. Procesem inicjującym to alergiczne zapalenie jest prezentacja alergenów przez komórki dendrytyczne i makrofagi (*antigen presenting cells* – APC) limfocytom pomocniczym (Th) w obrębie węzła chłonnego, co zapoczątkowuje ich aktywację. Komórki Th₀, u chorych na astmę, prawdopodobnie w sposób genetycznie uwarunkowany oraz pod wpływem czynników środowiskowych, różnicują się w przewodzie limfocytów Th₂ w stosunku do Th₁. Proces ten jest kontrolowany przez miejscowo wydzielane cytokiny. W warunkach prawidłowych komórki typu APC po ekspozycji na alergen wywierają działanie przeciwzapalne poprzez wydzielaną IL-10 oraz zahamowanie uwalniania IL-5 (głównej cytokiny w procesach różnicowania, migracji, aktywacji oraz przeżyciu eozynofiliów), ale ten mechanizm jest niesprawny w astmie. Z kolei u zdrowych,

interleukina IL-12 uwalniana przez APC, działając bezpośrednio na Th₀ oraz przez stymulację komórek NK (*natural killers*) do wydzielania interferonu γ (INF γ), przesuwając równowagę Th₁/Th₂ na korzyść Th₁ i tym samym hamuje alergiczne reakcje zapalne. Ostatnie doniesienia sugerują, że za funkcję APC w astmie odpowiadają geny z rodziny białek szoku termicznego [47]. Głównymi komórkami astmatycznego zapalenia są limfocyty CD4⁺ (Th₂), mastocyty i eozynofile [48], natomiast priorytetowe znaczenie w jego rozwoju odgrywają cytokiny: IL-4 (produkowana przez: limfocyty Th₂, mastocyty, bazofile, komórki NK) oraz IL-13 (wydzielana przez: limfocyty Th₂, mastocyty). Interleukina 4 wpływa na limfocyty Th₀ kierując je na drogę rozwoju w kierunku Th₂. Przy współdziałaniu z IL-13 stymuluje proliferację limfocytów B i zmianę klas wytwarzanych przez nie przeciwciał z IgM na IgE i IgG₄. Ponadto IL-4 zwiększa liczbę receptorów o wysokim powinowactwie dla IgE (Fc ϵ RI) na komórkach tucznych i bazofilach oraz receptorów o niskim powinowactwie (Fc ϵ RII) na limfocytach B i makrofagach. Zwiększa też ekspresję naczyniowej cząsteczki przylegania typu 1 (*vascular cell adhesion molecule-1* /VCAM-1/) oraz receptorów dla cytokin i chemokin powodując wzrost liczby komórek biorących udział w kaskadzie zapalenia alergicznego. Zarówno IL-4 jak i IL-13 promują zapalenie dróg oddechowych przez aktywację eozynofili, makrofagów komórek dendrytycznych, przebudowę dróg oddechowych przez zwiększenie proliferacji fibroblastów, stymulowanie komórek nabłonka dróg oddechowych (hyperplazja komórek kubkowych, zwiększenie produkcji śluzu), aktywują komórki mięśni gładkich, co propaguje nadreaktywność oskrzeli [49]. Obie te cytokiny (IL-4, -13) są przekaźnikami sygnałowymi, które po połączeniu z właściwą sobie podjednostką wspólnego kompleksu receptorowego, aktywują czynnik transkrypcyjny-6. Jego aktywacja odpowiada za biologiczne efekty tych cytokin [50]. Na rolę IL4 wskazują badania kliniczne, które potwierdziły skuteczność terapeutyczną zastosowania w nebulizacjach rekombinowanego ludzkiego rozpuszczalnego receptora IL-4 (IL-4R α) w astmie przewlekłej umiarkowanej u dorosłych [51]. Prowadzone są też próby kliniczne z zastosowaniem w pełni humanizowanych monoklonalnych przeciwciał IgG₁ neutralizujących IL-13 [52] oraz wiążących się z receptorem IL-4, które funkcjonalnie blokują działanie IL-4 i IL-13 [50].

Uwalniane przez limfocyty Th₂ interleukiny (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13) są cząsteczkami sygnałowymi stymulującymi limfocyty B do wytwarzania IgE. W obecności swoistego antygeny cząsteczki IgE wiążą się z receptorem Fc ϵ RI na powierzchni komórek tucznych i bazofilów zapoczątkowując aktywację tych komórek [53]. Silny bodziec agregacji dwóch cząstek IgE stymuluje uwolnienie mediatorów preformowanych (histamina, tryptaza, proteazy, heparyna, cytokiny), co wyzwała wczesną reakcję astmatyczną. Następową syntezą

i uwalnianie *de novo* metabolitów kwasu arachidonowego z fosfolipidów błonowych, proteaz, cytokin, adenozyiny i wolnych rodników tlenowych jest przyczyną rozwoju późnej fazy reakcji astmatycznej [54-58]. Uwolnienie mediatorów zapalnych powoduje rozwój klinicznych objawów astmy takich jak kaszel, skurcz mięśni gładkich oskrzeli, obrzęk błony śluzowej, zwiększoną sekrecję śluzu i infiltrację komórek układu immunologicznego. Mastocyty przy udziale mediatorów zapalenia przyczyniają się do rekrutacji i aktywacji eozynofili, limfocytów T, makrofagów, bazofili, neutrofilów i komórek o charakterze strukturalnym (fibroblasty, komórki mięśni gładkich, komórki nabłonka) co stanowi histopatologiczny wyraz reakcji późnej [59]. Tą fazę zapalenia mediują komórki zrekrutowane przez mastocyty, a wśród nich najistotniejszą rolę odgrywają eozynofile. Produkują one cytokiny o profilu Th₂, leukotrieny, białka odpowiedzialne za uszkodzenie komórek dróg oddechowych (główne białko zasadowe /*major basic protein* - MBP/; eozynofilowe białko kationowe /*eosinophil cationic protein* - ECP/; neurotoksyna, peroksydaza) [60]. Ta samopodtrzymująca się kaskada reakcji, tocząca się mimo ustąpienia czynnika wywołującego, prowadzi do przewlekłego zapalenia i powstania zmian strukturalnych dróg oddechowych [61]. Głównymi komórkami uczestniczącymi w tej przewlekłej fazie zapalenia są mastocyty, komórki dendrytyczne, aktywowane limfocyty CD4⁺ oraz eozynofile, które po wielokrotnym kontakcie z alergenem pozostają w drogach oddechowych. Poprzez uwalnianie mediatorów i wzajemną aktywację są one zaangażowane w proces remodelingu oskrzeli. Powodują stymulację fibrogenyzy, angiogenezy i hiperplazji mięśni gładkich obwodowych dróg oddechowych [59;62-65]. Istotny element w tym procesie stanowią również komórki strukturalne. Liczba komórek nabłonka błony śluzowej u astmatyków wzrasta w przebiegu choroby stanowiąc element ograniczenia przepływu powietrza zwłaszcza w obwodowych drogach oddechowych. Komórki nabłonka, komórki mięśni gładkich i fibroblasty również produkują cytokiny i inne prozapalne mediatory [66]. Fibroblasty astmatyków produkują też więcej kolagenu i wykazują zwiększoną zdolność różnicowania w kierunku miofibroblastów w porównaniu do tych komórek u osób zdrowych [67].

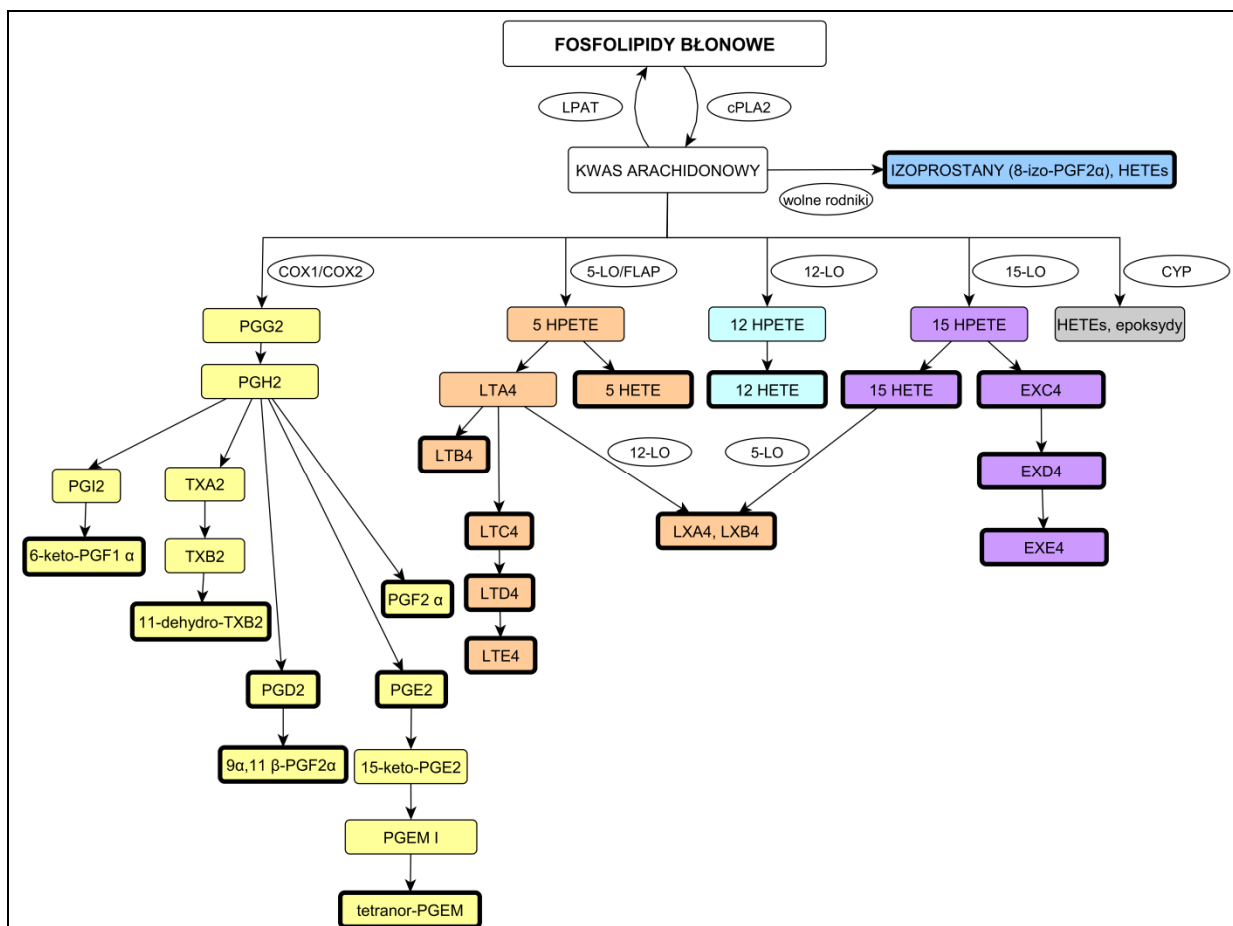
Udział eikozanoidów w zapaleniu astmatycznym

Do mediatorów procesu zapalnego, obok klasycznych autakoidów takich jak histamina, serotonina czy bradykinina, należą również drobnocząsteczkowe związki chemiczne (tlenek azotu, tlenek węgla) oraz produkty biotransformacji składników błony komórkowej takie jak eikozanoidy i czynnik aktywujący płytki (PAF). Błony komórkowe

poddane działaniu cytozolowej fosfolipazy A2 (cPLA2), aktywowanej poprzez zależną od jonów wapnia translokację z cytosolu do błony komórkowej, są źródłem PAF i kwasu arachidonowego (AA). Reakcję reacetylacji z odtworzeniem fosfolipidów katalizuje acylotransferaza lizofosfolipidów (LPAT). Kwas arachidonowy stanowi substrat dla kolejnych reakcji enzymatycznych, w wyniku których powstają eikozanoidy. Te dwudziestowęglowe (z greckiego *eikosi* - dwadzieścia) metabolity AA są uwalniane z komórek źródłowych w nano-molarnych stężeniach i działają na komórki docelowe za pośrednictwem receptorów sprzężonych z białkiem G.

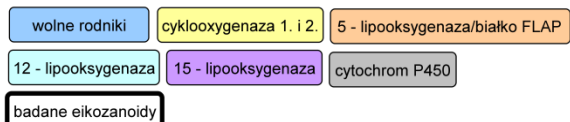
Cyclooxygenazy (COX) są enzymami decydującymi o metabolizmie AA w kierunku prostanoidów (prostacyklina/PGI₂/, prostaglandyny /PG/, tromboksany /TX/), podczas gdy lipooksygenazy (LO) odpowiadają za utlenianie kwasów tłuszczowych bez cyklizacji, z utworzeniem ich wodorotlenków, z których w kolejnych reakcjach powstają hydroksykwasy, epoksykwasy, lipoksyny (LXs), leukotrieny (LTs) i eoksyny (EXs) [68]. Choć praktycznie wszystkie typy komórek biorą udział w syntezie eikozanoidów to jednak spektrum sytezowanych produktów zależy od rodzaju komórki. Zasadniczo komórki strukturalne oraz parenchymalne (komórki nabłonka, śródbłonka, mięśni gładkich, fibroblasty) metabolizują AA głównie na drodze COX, wykazując skromne możliwości syntezy na szlaku 12- i 15-LO. Komórki pochodzące ze szpiku kostnego syntetyzują duże ilości produktów 5-LO, a niektóre z nich generują też znaczne ilości metabolitów szlaku COX, 12- lub 15-LO [69]. W procesie znanym jako transcelularna synteza eikozanoidów komórki jednego typu dostarczają pośrednich metabolitów innym rodzajom komórek. Ponadto taka międzykomórkowa wymiana półproduktów LO może prowadzić do podwójnego utleniania AA z udziałem 5-LO i/lub 12- lub 15-LO z wytworzeniem LXs [70]. Kwas arachidonowy ulega również hydroksylacji i epoksygenacji przy udziale enzymów cytochromu P450 (CYP) z wytworzeniem kwasów hydroksyeikozatetraenowych (HETEs) i epoksydów.

Na drodze nieenzymatycznej, przy udziale wolnych rodników tlenowych z AA powstają stereoizomery prostaglandyn nazywane izoprostanami i HETEs [71]. Główne szlaki biosyntezy eikozanoidów przedstawia rys. 1.



Rysunek 1. Schemat biosyntezy eikozanoidów

Główne szlaki metaboliczne zaznaczono kolorami:



LPAT - acylotransferaza lizofosfolipidów, cPLA2- cytozolowa fosfolipaza A2, COX1/COX2 – cyclooxygenaza 1. i 2., 5-LO/FLAP – 5-lipooksygenaza/białko aktywujące FLAP, 12-LO – 12-lipooksygenaza, 15-LO – 15-lipooksygenaza, CYP – enzymy cytochromu P450, PGG2 – prostaglandyna G2, PGH2 - prostaglandyna H2, PGI2 – prostacyklina, 6-keto-PGF1α – 6-keto –prostaglandyna F1α, TXA2 – tromboksan A2, TXB2 – tromboksan B2, 11-dehydro-TXB2 - 11-dehydro-tromboxan B2, PGD2 – prostaglandyna D2, 9α,11β-PGF2α - 9α,11β-prostagladyna F2α, PGE2 – prostaglandyna E2, PGEM I - 13,14-dihydro-15-keto-PGE2, tetranor-PGEM – 11α-hydroxy-9,15-dioxo-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20-dikarboksyłowy (w dysertacji nazywany PGEM), PGF2α – prostaglandyna F2α, 5HPETE – kwas 5-hydroperoksy-eikozatetraenowy, 12HPETE - kwas 12-hydroperoksy-eikozatetraenowy, 15HPETE - kwas 15-hydroperoksy-eikozatetraenowy, 5HETE – kwas 5-hydroksy-eikozatetraenowy, 12HETE - kwas 12-hydroksy-eikozatetraenowy, 15HETE - kwas 15-hydroksy-eikozatetraenowy, HETEs – kwasy hydroksy-eikozatetraenowe, LTA4 – leukotrien A4, LTB4 – leukotrien B4, LTC4 – leukotrien C4, LTD4 – leukotrien D4, LTE4 – leukotrien E4, LXA4 – lipoksyna A4, LXB4 – lipoksyna B4, EXC4 – eoksyna C4, EXD4 – eoksyna D4, EXE4 – eoksyna E4, 8-izo-PGF2α – 8-izo prostaglandyna F2α (8 –izoprostan)

Prostanoidy

Prostanoidy są znanymi od dawna modulatorami procesów biologicznych takich jak napięcie mięśni gładkich, przepuszczalność naczyń, ból, gorączka, agregacja płytek. Ostatnio poznana została również ich rola w regulacji proliferacji i przeżywalności komórek oraz odpowiedzi immunologicznej.

Syntezę prostaglandyn katalizuje syntaza endoperoxydów prostaglandynowych zwana cyklooksygenazą (COX). Znane są trzy formy tego enzymu: COX1- konstytutywna, prowadząca fizjologiczną produkcję prostaglandyn i COX2- indukowana (przez cytokiny, hormony, czynniki wzrostu, endotoksyny, lipopolisacharydy), odpowiedzialna za produkcję prostanoidów w stanie zapalnym. Niedawno odkryta COX3 będąca izoformą COX1, jest selektywnie hamowana przez leki przeciwbólne takie jak paracetamol i fenacetyna [72]. Indukcja COX2 w komórkach APC uważana jest za kluczowy element syntezy PG w procesie alergicznego zapalenia dróg oddechowych. Cyclooksygenazy są integralnymi białkami błonowymi. Większość komórek wykazuje zdolność ekspresji obu głównych typów COX. Powstała przy jej udziale PGG₂ ulega pod wpływem peroksydazy redukcji do PGH₂. Dalszy metabolizm następuje pod wpływem syntaz prostaglandyn do bioaktywnych prostanoidów. Rodzina tych związków obejmuje szereg ważnych cząsteczek sygnałowych, w tym PGI₂, TXA₂, PGE₂, PGD₂ i PGF₂α. Nomenklatura podkreśla dwie ważne ich cechy strukturalne: pięcioczłonowy pierścień prostanu oznaczany literami A-K (identyfikuje grupy funkcjonalne w pierścieniu cyklopentanowym) oraz liczbę wiązań podwójnych, oznaczoną indeksem liczbowym. Jedyne wyjątkiem stanowi tromboksan, który ma sześcioczłonowy pierścień i jest w skrócie nazywany TX [73]. Ekspresja syntaz PG zależy od typu komórki. Makrofagi wykazują zdolność syntezy szerokiego zakresu prostanoidów, ale większość komórek wykazuje zdolność do syntezy pojedynczego, dominującego produktu np. płytki krwi - TXA₂, mastocyty - PGD₂, komórki endotelium - PGI₂, komórki nabłonka, mięśni gładkich, fibroblasty - PGE₂, PGF₂α, PGI₂, TXA₂. Zahamowanie produkcji PG skutkuje nasileniem alergicznego zapalenia co sugeruje, że ogólny efekt ich działania w reakcjach wywołanych przez alergen to ograniczenie procesu zapalnego. Jednakże indywidualne prostanoidy mogą nasilać lub hamować zapalenie zależnie od specyficznych receptorów. Według aktualnej wiedzy PGD₂, PGF₂α i TXA₂ odpowiadają za nasilenie zapalenia alergicznego, podczas gdy PGE₂ i PGI₂ hamują odpowiedź zapalną [74].

Prostaglandyna D2

Od dawna wiadomo, że PGD2 odgrywa istotną rolę w patofizjologii astmy poprzez swoje działanie bronchokonstrykcyjne [75;76], wazodilatacyjne [77], zwiększające przepuszczalność naczyń włosowatych [78] oraz stymulujące produkcję śluzu [79]. PGD2 jest produkowana przez komórki tuczne, limfocyty Th₂ i komórki dendrytyczne w odpowiedzi na stymulację alergenem [80]. Prostaglandyna ta wywiera swoje działanie poprzez interakcję z trzema receptorami: DP1 i CRTH2/DP2 i TP (receptor TXA₂). Skutki aktywacji receptora DP1 są złożone. Jest prawdopodobne, że za ich pośrednictwem następuje tłumienie aktywacji leukocytów, w szczególności komórek dendrytycznych. Poprzez hamowanie produkcji przez nie IL-12 promuje różnicowanie limfocytów Th₀ w kierunku komórek o profilu Th₂ [81]. Osoby z wariantem genu receptora PD1, warunkującym niższy poziom jego transkrypcji mają niższe ryzyko zachorowania na astmę [82;83]. Endogennymi ligandami CRTH2/DP2 są obok PGD2 jej metabolity oraz 11dehydro-TXB₂. Jego pobudzenie odpowiada za chemotaksję komórek Th₂, eozynofilów i bazofilów do miejsc toczącego się procesu zapalnego [84;85]. Z uwagi na zasadniczą rolę CRTH2/DP2 w promowaniu produkcji cytokin Th₂ i IgE zastosowanie jego antagonistów wydaje się być potencjalnie użyteczne w leczeniu przewlekłych chorób alergicznych [86].

PGD2 ulega przy udziale 11-keto-reduktazy szybkiej transformacji do aktywnego metabolitu 9α11β-PGF₂α.

Prostaglandyna E

PGE₂ jest dominującym produktem COX nabłonka i mięśni gładkich dróg oddechowych. Zidentyfikowano co najmniej trzy różne izoformy syntazy PGE₂ (PGES): cytozolowa (cPGES) oraz dwie mikrosomalne (mPGES-1 i mPGES-2). Forma cytozolowa o konstytutywnej ekspresji w różnych tkankach, w preferencyjnym połączeniu z COX-1, odpowiada za promowanie natychmiastowej produkcji PGE₂. Niedawno zidentyfikowana mPGES-2, wszechobecna w różnych tkankach, jest funkcjonalnie powiązana zarówno COX-1 i COX-2. Natomiast mPGES-1 aktywowana przez bodźce prozapalne jest funkcjonalnie połączona z COX-2, promuje opóźnioną fazę syntezy PGE₂ [87]. W przekazywanie jej sygnału zaangażowane są cztery receptory: EP1-4. Prostaglandyna ta jest uznanym czynnikiem immunomodulującym i bronchoprotekcyjnym. Hamuje skurcz oskrzeli indukowany zarówno wysiłkiem jak i ekspozycją na alergen (wczesną i późną reakcję) oraz aspiryną w przypadku astmy aspirynowej [88-90]. Wang i wsp. wykazali jej hamujący wpływ na syntezę leukotrienów cysteinylowych (cysLTs) przez mastocyty chorych na astmę

aspirynową [91]. PGE2 jest silnym inhibitorem mitogenezy, syntezy kolagenu i chemotaksji komórek mezenchymalnych, a zatem może hamować zapalenie i aktywację fibroblastów [92]. Szybka, enzymatyczna przemiana PGE2 do 15-keto-PGE2 przy udziale 15-dehydrogenazy prostaglandynowej (15-DHPG) inaktywuje jej biologiczne działanie, a dalszy natychmiastowy metabolizm pod wpływem 15-keto-prostaglandyno- Δ reduktazy odpowiada za powstanie równie nietrwałego 13,14-dihydro-15keto-PGE2 (PGEM I). Zidentyfikowano dwa typy 15-DHPG. Większą aktywność przypisuje się 15-DHPG I, która poza metabolizmem prostaglandyn serii E uczestniczy w przemianach lipoksyn i 15HETE [71]. Ekspresja tego enzymu może być modulowana przez cytokiny i ma również wpływ na lokalne stężenia prostanoidów [67]. Markerem biosyntezy PGE jest 11 α -hydroxy-9,15-dioxo-2,3,4,5-tetranor-prostano-1,20-dikarbo-ksyowy (tetranor-PGEM) w dysertacji nazywany PGEM.

Tromboksany i prostacyklina

TXA2 produkowany głównie przez płytki krwi oprócz promowania ich agregacji jest również silnym bronchokonstryktorem i stymuluje uwalnianie acetylocholino. Polimorfizm genu jego receptora (TP) jest związany z rozwojem astmy [93]. Na modelu zwierzęcym wykazano, że zarówno inhibitor syntazy tromboksanu jak i antagonistą jego receptora redukują indukowaną alergenem eozynofilię [74]. Szybka hydroliza do TXB2, a następnie metabolizm przy udziale 11dehydrogenazy TXB2 prowadzi do powstania 11dehydroTXB2 będącego agonistą receptora CRTH2/DP2 dla PGD2 [71].

Podobnie jak w jak stosunku do agregacji płytek tak i w mechanizmie zapalenia alergicznego, antagonistyczny wpływ do TXB2 wywiera PGI2. Prawdopodobny mechanizm tego zjawiska polega na stymulacji limfocytów T do produkcji IL-10, hamującej odpowiedź typu Th₂ [74].

Stężenia prostanoidów w tkankach zależą nie tylko od ich syntezy, ale również od ich degradacji. Wiadomo, że przy pierwszym przejściu przez łożysko naczyń płucnych większość z nich jest inaktywowana. Dzieje się to poprzez wychwyt do komórek endotelialnych i następowy metabolizm. Ta szybka inaktywacja warunkuje ich jedynie miejscowe działanie [69].

Produkty lipooksygenaz

Wyróżnia się trzy główne izoformy lipooksygenazy: 5-LO, 12-LO i 15-LO.

Mediatory szlaku 5-lipooksygenazy

Na szlaku metabolicznym zainicjowanym przez 5-LO, w obecności białka aktywowującego (*five lipoxygenase associated protein* - FLAP) powstają z AA leukotrieny. Obecność 5-LO i FLAP wykryto w komórkach pochodzenia szpikowego (neutrofilach, eozynofilach, monocytach) oraz w makrofagach, komórkach tucznych i bazofilach. Aktywacja tych komórek powoduje wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia i ATP oraz translokację 5-LO z jej cytozolowej i nukleoplazmatycznej lokalizacji do błony okołojądrowej. Obecne w niej FLAP stabilizuje aktywną strukturę 5-LO i umożliwia prezentację AA jej aktywnemu miejscu. W wyniku dwustopniowej oksygenacji i dehydratacji AA powstaje niestabilny kwas 5-hydroperoksy-eikozatetraenowy (5HPETE), który jest substratem dalszych reakcji enzymatycznych w wyniku których powstają kwas 5-hydroksy-eikozatetraenowy (5HETE) lub LTA₄. Niestabilny epoksyd kwasu arachidonowego - LTA₄ może opuścić komórkę lub być konwertowany przez cytozolowe hydrolazy do LTB₄, a przez błonową syntazę LTC₄ sprzężaną z glutationem (przez resztę siarkową cysteiny) do postaci LTC₄, który jest transportowany na zewnątrz komórki przez wielolekooporne białko wiążące (*multidrug resistance-associated protein 1* - MRP1). Zewnątrzkomórkowo LTC₄ ulega (przy udziale γ -glutamyllo transpeptydazy lub glutamylleukotrienazy) konwersji do LTD₄ (odszczępienie kwasu glutationowego). Ten następnie przy udziale dipeptydazy (odszczępienie glicyny) ulega dalszej biokonwersji do LTE₄. Leukotrieny C₄, D₄, i E₄ z uwagi na obecność cysteiny w ich strukturze nazywane są cysteinylowymi (cysLTs). Produkcja LTC₄ przez eozynofile obdarzone wariantem zmutowanego genu promotora 5-LO jest ograniczona. Paradoksalnie osoby te wykazują częstszą zapadalność na ciężką postać astmy, a polimorfizm tego genu ma wpływ na efekty leczenia montelukastem [94;95]. Wykazano też, że uwalniane przez Th₂ cytokiny (IL3, IL4, IL13) wywierają wpływ na szlak metaboliczny 5-LO/LTC₄- syntaza i są niezbędne do w pełni zintegrowanej, funkcjonalnej odpowiedzi na IgE-zależną aktywację mastocytów [96]. Mastocyty i eozynofile wytwarzają w przewodzie LTC₄, natomiast monocyty, makrofagi i bazofile zarówno LTC₄ jak LTD₄, a neutrofile głównie LTB₄. Metabolizm leukotrienów odbywa się głównie wątrobie przy udziale cytochromu P-450 oraz w procesie β -oksydacji, a metabolity wydalane są z moczem.

Leukotrieny cysteinylowe

Przez długie lata leukotrieny cysteinylowe nazywano wolno działającą substancją anafilaksji (*slow-reacting substance of anaphylaxis* - SRSA). W przekazywaniu przez nie sygnałów zaangażowane są dwa receptory błonowe sprzężone z białkiem G (*G Protein-*

Coupled Receptor - GPCR): cysLTR1 i cysLTR2. Aktywacja receptora prowadzi do transdukcji sygnału przez uruchomienie wewnątrzkomórkowych przekaźników takich jak cAMP i jony wapnia. Ekspresja receptorów cysLTR1 wydaje się być najwyższa w układzie oddechowym na miocytach mięśni gładkich oskrzeli oraz komórkach produkujących te metabolity AA, natomiast cysLTR2 zasadniczo obecne są w płucach, sercu, mózgu, śledzionie, węzłach chłonnych i naczyniach krwionośnych. Głównym ligandem dla cysLTR1 jest LTD4 w mniejszym stopniu LTC4 i najmniejszym LTE4, natomiast cysLTR2 jest pobudzany w równym stopniu przez LTC4 i LTD4, a w mniejszym przez LTE4 [97]. Większość efektów cysLTs w patofizjologii astmy zależy od aktywacji cysLTR1. CysLTs powodują: skurcz mięśniówki gładkiej dróg oddechowych i naczyń krwionośnych, wzrost przepuszczalności naczyń i stymulację sekrecji śluzu przez komórki nabłonka oskrzeli [98]. Inhalacje LTC4 i LTD4 powodują 1000 krotnie, a LTE4 10 krotnie silniejsze działanie obkurczające oskrzela w porównaniu z histaminą [98;99]. Wpływają na rekrutację komórek zapalnych a w szczególności eozynofili nasilając eozynofilowy proces zapalny [100]. Udowodniono również, że ich akumulacja jest dodatkowo związana ze wzrostem ich przeżywalności, spowodowanej hamowaniem apoptozy przez LTs [101]. Wpływają one również na przebudowę ściany oskrzeli stymulując proliferację fibroblastów, wytwarzanie przez nie kolagenu oraz powodując przerost mięśniówki gładkiej [102].

Leukotrien B4

LTB4 jest uwalniany głównie przez neutrofile. Jego działanie związane jest z aktywacją dwóch (GPCR) receptorów: BLTR1 i BLTR2. Receptor BLTR1 ma 20 krotnie silniejsze powinowactwo do LTB4 w porównaniu do BLTR2. Oba mają wysoką ekspresję na leukocytach krwi obwodowej i mastocytach. BLTR1 są również obecne na komórkach dendrytycznych, efektorowych limfocytach T CD4+ migrujących do tkanek peryferyjnych oraz fibroblastach oskrzeli [103]. LTB4 jest dobrze poznanym czynnikiem aktywacji neutrofile i ich migracji (indukuje chemotaksję, agregację, degranulację i adhezję do komórek endothelium) [104], powoduje chemotaksję limfocytów Th₁ i Th₂ oraz wspomaga adhezję do endotelium zrekrutowanych limfocytów T CD4+ jak i CD8+ [105], bez znaczącego wpływu na mięśniówkę dróg oddechowych [106]. Choć Miyahara i wsp. na podstawie badań na mysich komórkach dendrytycznych z niedoborem BLTR1 wysunęli wniosek, że jego ekspresja jest niezbędna nie tylko do migracji tych komórek do węzłów chłonnych ale również do rozwoju nadreaktywności oskrzeli [107]. LTB4 odpowiada także za wzrost przepuszczalności naczyń mikrokrążenia [108]. Stosunkowo niedawno

zidentyfikowana została rola LTB₄ jako czynnika zwiększającego, mediowaną przez stymulację receptora Fc jak i zależną od receptora komplementu, fagocytozę neutrofilii [109].

Mediatory szlaku 12- i 15-lipooksygenaz

Na drodze 12-LO lub 15-LO powstają z AA odpowiednie HPETE oraz korespondujące: 12HETE, 15HETE i eoksyny (EXC₄, EXD₄, EXE₄). Komórki ludzkiego nabłonka dróg oddechowych, eozynofile, mastocyty i komórki dendrytyczne wykazują dużą aktywność 15-LO. Znane są dwie odmiany tego enzymu 15-LO1 i 15-LO2. Jego ekspresja jest indukowana przez IL4 i/lub IL13. Na ich drodze powstaje lewoskrętny izomer (15(S)HETE), natomiast enzymy cytochromu P 450 odpowiadają za syntezę zarówno lewo- jak i prawoskrętnego (15(R)HETE) enancjomeru [110]. Wykazano, że acetylowana przez aspirynę forma COX2 prowadzi do syntezy 15(R)HETE [111]. Najnowsze badania potwierdzają kluczową rolę 15-LO1 i jej produktu 15HETE jako wewnątrzkomórkowego sygnału. 15HETE jest przekaźnikiem w indukowanej przez IL-13 ekspresji genu mucyny, odpowiedzialnej za wzrost produkcji śluzu w ludzkich komórkach nabłonka dróg oddechowych [112]. Wykazuje również słabe działanie bronchokonstrykcyjne, stymuluje chemotaksję komórek zapalnych, a jego stężenia w BAL-u astmatyków po stymulacji alergenem wzrastają 30-krotnie [113].

Eoksyny

Produkowane przez eozynofile 14,15-LTs, nazwane w ostatnim czasie eoksynami (EXC₄, EXD₄, EXE₄), budową przypominają leukotrieny, lecz mają inną trójwymiarową strukturę. Mechanizm ich syntezy nie został ostatecznie wyjaśniony, ale prawdopodobnie przebiega drogą podobną do cysLTs. Eozynofile i mastocyty myszy potrafią je produkować z 14,15-LTA₄. Eoksyny wykazują słabą aktywność skurczową, natomiast w jednowarstwowej hodowli komórek śródbłonka demonstrują istotny wzrost jego przepuszczalności. Na tym polu wykazano ich prównywalne z LTC₄ i LTD₄, oraz 100-krotnie silniejsze działanie w porównaniu z histaminą [114].

Lipoksyny

Poprzez kilkukrotne utlenianie AA przy udziale dwóch lub więcej LO (5-, 12-, 15-) powstają lipoksyny (LXs). Mogą być one syntezowane dzięki trans-celularnej kooperacji i wymagać oddzielnych komórkowych źródeł lipooksygenaz. W środowisku zapalenia produkowany przez leukocyty LTA₄ jest szybko wchłaniany do płytek krwi bogatych w 12-LO oraz 15-LO i wykorzystywany do produkcji LXs. Alternatywna droga to produkcja 15HETE przy udziale 15-LO (w komórkach nabłonka, eozynofilach lub monocytach), który

pochłaniany przez neutrofile (z udziałem ich 5-LO) jest konwertowany do LXs. Ta droga kompetytywnie hamuje produkcję LTs przez neutrofile i eozynofile [113;115]. Lipoksyny są pierwszymi odkrytymi mediatorami lipidowymi, które działają przeciwzapalnie i biorą udział w fazie rezolucji zapalenia. Działają one lokalnie i ulegają szybko metabolicznej inaktywacji. Hamują rekrutację i aktywację eozynofili i neutrofilii, uczestniczą w regulacji aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, stymulują fagocytozę apoptotycznych komórek przez makrofagi. Ponadto hamują proliferację fibroblastów i angiogenezę [116]. Protekcyjna rola LXs została potwierdzona na mysim modelu astmy. Podanie analogów LXA4 powodowało zablokowanie nadreaktywności oskrzeli po ekspozycji na alergen oraz ograniczenie stanu zapalnego przejawiające się redukcją nacieków leukocytarnych, obniżeniem poziomu IL-5, IL-13, eotaksyn, prostanoidów, cysLTs [117].

Interakcje szlaku COX i lipooksygenaz

Badania ostatnich lat wskazują na ważne interakcje dwóch zasadniczych szlaków przemian AA. Pojawiły się doniesienia na temat modulacyjnego wpływu PGE2 na syntezę innych lipidowych mediatorów. Wykazano hamujący wpływ tej prostaglandyny na biosyntezę LTs. Działanie to wywierane jest poprzez inhibicję translokacji 5-LO bo błony jądrowej [118]. Harizi i wsp. wykazali hamujący wpływ PGE1 i PGE2 na produkcję LTB4. Efekt ten był zależny od IL-10, która hamowała ekspresję białka FLAP, bez żadnego innego efektu na 5-LO i cPLA2 [119].

Mediatory stresu oksydacyjnego

Peroksydacja lipidów jest procesem indukowanym w warunkach stresu oksydacyjnego przez wolne rodniki tlenowe. Reaktywne formy tlenu mogą odrywać atomy wodoru z wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, zapoczątkowując proces ich wewnętrznej cyklizacji. Powstające w jej wyniku izoprostany, a szczególnie pochodne AA pełnią ważne funkcje biologiczne. W ich nomenklaturze zachowano elementy nazewnictwa prostaglandyn. Główne klasy zostały oznaczone literami D, E, F, G, H dla podkreślenia typu cyklopentanowego pierścienia, a ilość podwójnych wiązań w łańcuchach bocznych wyrażana jest odpowiednią cyfrą. Jednym z lepiej poznanych izoprostanów jest 8izo-PGF2 α . Ma on właściwości konstrykcyjne w stosunku do naczyń krążenia płucnego i nerkowych [120].

1.4 Metody oceny procesu zapalnego w astmie

Pomimo postępu jaki dokonał się w ostatnich latach w zakresie poznawania mechanizmów patofizjologicznych astmy nadal poszukuje się prostych, nieinwazyjnych

metod diagnostycznych, pozwalających na ocenę zapalenia astmatycznego i monitorowanie leczenia. Dotychczas nie opracowano metody możliwej do wykorzystania u większości chorych na astmę.

1.4.1 Metody pośrednie

Pośrednim wykładnikiem procesu zapalnego w astmie jest nadreaktywność oskrzeli czyli ich nadmierna reakcja skurczowa na bodźce fizyczne, chemiczne i farmakologiczne, nie powodujące takiej odpowiedzi u osób zdrowych. Jej ocenę umożliwiają badania z wykorzystaniem metod spirometrycznych. Należą do nich próby prowokacyjne, a pewien wgląd daje monitorowanie dobowej zmienności szczytowego przepływu wydechowego (PEF). Metody te są trudne do wykonania u małych dzieci [121]. Próby prowokacyjne, choć przydatne w diagnostyce astmy, mają ograniczone zastosowanie w monitorowaniu leczenia i wiążą się z krótkotrwałym nasileniem jej objawów.

1.4.2 Metody inwazyjne

Badania inwazyjne takie jak fiberobronchoskopia z pobraniem wycinków i wykonaniem płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL) mimo, że przyczyniły się do wyjaśnienia patogenezy schorzenia, okazują się być mało przydatne w codziennej praktyce klinicznej [122]. Wzrosło więc zainteresowanie nowymi, nieinwazyjnymi sposobami oceny i monitorowania stanu zapalnego dróg oddechowych.

1.4.3 Metody nieinwazyjne

Plwocina indukowana

Badanie plwociny indukowanej (po nebulizacji hipertonicznym roztworem NaCl) choć jest bezpośrednim źródłem cennych informacji, niestety wymaga współpracy chorego. Ponadto, może podobnie jak wykonanie BAL-u wywołać nasilony kaszel, prowadzić do odruchowego skurczu oskrzeli, uszkodzenia śluzówki dróg oddechowych z następowym nasileniem *per se* zapalenia [123]. Ma ono więc ograniczone zastosowanie u pacjentów z ciężką postacią choroby i słabo kooperujących (dzieci < 6 r.ż).

Oznaczanie stężenia tlenu azotu w powietrzu wydechowym

Do niedawna główną uwagę koncentrowano na przydatności oznaczania stężenia tlenu azotu (NO) w powietrzu wydechowym (FeNO) jako prostego lecz nie bezpośredniego wykładnika procesu zapalnego. Za zdolność generowania go w dużych ilościach w procesie zapalnym w głównej mierze odpowiada indukcyjna postać syntazy NO (iNOS) obecna w komórkach nabłonka dróg oddechowych i komórkach zapalnych. Jej transkrypcja (z udziałem

NF- κ B) jest pobudzana przez cytokiny zapalne (czynnik martwicy guza alfa /TNF/, IL-1 β , INF γ) [124;125]. Wyniki badań *in vitro* wykazują zniesienie tego efektu przez zastosowanie kortykosteroidów [126]. Badania ostatnich lat wskazują na ograniczoną przydatność oznaczania FeNO w diagnostyce astmy [127;128]. Również zastosowanie seryjnych jego oznaczeń jako predyktorów kontroli astmy i następowych zmian w leczeniu zarówno u dorosłych jak i u dzieci dało niejednoznaczne wyniki [129]. Badania na dużych grupach astmatyków wskazują nawet na brak poprawy kontroli astmy i zastosowanie wyższych dawek wGKS w grupach chorych leczonych według algorytmów opartych na oznaczeniach FeNO [130;131].

Badanie składu wydychanego powietrza

Od połowy lat dziewięćdziesiątych XX-go stulecia wzrosło zainteresowanie badaniem składu wydychanego powietrza jako metody oceny procesu patologicznego w układzie oddechowym. Opracowano metody kolekcji próbek uzyskiwanych przez szybkie schładzanie wydychanego powietrza czyli kondensatu (*exhaled breath condensate* - EBC). W roku 2005 zostały opublikowane metodologiczne rekomendacje ATS (*American Thoracic Society*) i ERS (*European Respiratory Society*) dotyczące EBC [132]. Założenia techniczne metody opierają się na kilku do kilkunastu minutowym, spokojnym oddychaniu (na poziomie objętości oddechowej – *Tidal Volume* /TV/) przez kondensator, będący układem chłodzącym, z użyciem klipsa nosowego i pułapki śliny. W komercyjnych systemach służących do kolekcji EBC stosowane są zestawy jednokierunkowych zastawek, kierujące wydychane powietrze do zestawu schładzającego i kolekcjonującego skroploną parę wodną oraz zabezpieczające pacjenta przed zwrotnym zainhalowaniem ochłodzonego powietrza wydechowego. W kondensatorze powietrze zostaje schłodzone do temperatury od 0 do -20°C (zależnie od rodzaju kondensatora). Dochodzi wówczas do zjawiska polegającego na skraplaniu (kondensacji) pary wodnej na wewnętrznych ściankach kondensatora, wykonanych z chemicznie i biologicznie obojętnych materiałów np. z teflonu, polipropylenu lub szkła. Wraz z obniżeniem temperatury zgodnie z prawami fizyki (równanie Clapeyrona) spada bowiem ciśnienie parcjale pary wodnej i dochodzi do jej skraplania. Powietrze wydechowe jest prawie w 100% wysyczone parą wodną i ma temperaturę około 37°C. Głównym składnikiem EBC jest więc woda stanowiąca 99% jego objętości, a około 1% stanowią substancje uwalniane do wydychanego powietrza z powierzchni dróg oddechowych, krystalizujące i precypitujące pod wpływem niskiej temperatury. Do niedawna uważano, że źródłem wody wysycającej powietrze wydechowe jest proces jej parowania z powierzchni układu

oddechowego. Powstała w ten sposób para wodna nie mogłaby jednak zawierać substancji nielotnych. Tymczasem analiza EBC wykazała obecność takich związków, co wskazuje na konieczność formowania w drogach oddechowych aerosolu, w którym fazą płynną jest woda. Przyjmuje się, że tworzenie aerosolu z płynu wyścielającego oskrzela i pęcherzyki (*airway lining fluid* /ALF/) następuje podczas turbulentnego przepływu powietrza przez drogi oddechowe. Pierwsze badania wykazujące obecność aktywnych substancji powierzchniowych (w tym surfaktantu) w kondensacie zostały opublikowane już w roku 1980 [133]. Obliczenie zawartości ALF w EBC wymaga określenia czynnika, który pozwoliłby na oszacowanie jego rozcieńczenia. Ilość ALF w EBC zależna jest od trybu oddychania, stopnia nawodnienia pacjenta, jak również od wydajności kondensatora. Szacowane rozcieńczenie cząstek (fazy płynnej) ALF w EBC, wykazywane w różnych badaniach waha się od 5000-25000 razy [134]. Próby określenia współczynnika rozcieńczenia opierają się na założeniu, że może on być zmienny, ale możliwym jest jego ustalenie w każdej kolekcjonowanej próbce EBC przez oznaczenie w niej stężenia substancji, która ma dobrze znane stężenie w surowicy krwi i przenika przez błony komórkowe, lecz nie jest produkowana w pęcherzykach płucnych ani drogach oddechowych. Podejmowano różne próby takiej oceny posiłkując się przewodnością liofilizowanych lub odparowanych próżniowo próbek EBC, określeniem w nich stężenia Na^+ , K^+ czy mocznika [135;136]. Zastosowanie w tym celu stężeń elektrolitów poddawane jest obecnie w wątpliwość [137]. Zagadnienie rozcieńczenia ALF w EBC wydaje się być jeszcze bardziej skomplikowane. Wskazują na to doniesienia o braku wpływu toru oddychania na stężenia białek i nitratów oraz pH EBC, mimo istotnego zwiększenia objętości kondensatu ze wzrostem wentylacji minutowej [138]. Brak zależności stężeń 8-izoprostanu w EBC od częstości oddechów potwierdzili już wcześniej Montuschi i wsp. [139]. Podobne obserwacje poczyniła Huttman i wsp. Wykazali oni ponadto, że co prawda hiperwentylacja zwiększała całkowitą ilość białka (nie jego stężenia) w próbce EBC, to nie wpływała ona na zmianę źródła pochodzenia składowych kondensatu. Stosunek białka CCP (*Clara cell secretory protein*) jako markera frakcji oskrzelowej do białka A surfaktantu (*surfactant protein A* /SP-A/) jako markera frakcji pęcherzykowej nie ulegał bowiem zmianie. Autorzy proponują rozważenie ujednolicenia kolekcjonowania EBC poprzez standaryzację objętości oddechowej [140]. Wyniki te sugerują, że stężenia nielotnych substancji są niezależne od toru oddychania. Na potrzebę uwzględniania współczynnika rozcieńczenia ALF w EBC wskazują jednak badania Esther i wsp. [141] oraz badania Lazar i wsp. [142] Wykazali oni, że stężenia ATP (adenozyno-trójfosforanu) w EBC nie różnią się pomiędzy grupą zdrową a astmatykami, natomiast obliczone stężenie ATP w ALF wskazywało na jego odwrotną korelację z FEV1

[142]. W badaniu, oceniającym wpływ sposobu oddychania na liczbę cząsteczek i rozkład ich wielkości w wydychanym aerozolu, wykazano wzrost emisji liczby cząstek wydychanych podczas głębokiego oddychania. Niewielki wpływ natomiast miała częstotliwość oddechów. Stosunek FRC/TLC (czynnościowa pojemność zalegająca/całkowita pojemność płuc) istotnie korelował z liczbą wydychanych cząstek co wskazuje na rolę otwarcia terminalnych dróg oddechowych w ich emisji [143]. W ostatnim okresie opublikowane zostały doniesienia na temat zastosowania jednoczesnego oznaczenia wolnego kwasu palmitynowego jako współczynnika rozcieńczenia. Niewątpliwą zaletą jego zastosowania jest możliwość jednoczesnego oznaczenia jego stężenia wraz z innymi molekułami, w jednej próbce EBC, za pomocą wysoko rozdzielczych metod (np. GC/MS) [144-146].

Źródła składników EBC i zagadnienia związane ze zmiennością ich pomiarów

Potencjalnie składniki kondensatu odzwierciedlają „biochemiczną kondycję” nabłonka górnych i dolnych dróg oddechowych. Jednak ścisła korelacja między ciśnieniem parcyjnym O_2 i CO_2 w powietrzu wydechowym i kondensacie sugeruje, że cząsteczki aerosolu w powietrzu wydechowym odzwierciedlają skład płynu wyścielającego oskrzela i pęcherzyki płucne [147]. Ponadto przy uwzględnieniu faktu, że powierzchnia górnych dróg oddechowych stanowi ok. 1% powierzchni całego układu oddechowego można wnosić, że analizowany kondensat reprezentuje skład płynu wyścielającego dolne drogi oddechowe. Próby dokładniejszej oceny anatomicznego miejsca będącego źródłem EBC podjęła się Bondesson i wsp. [137]. Badacze wykorzystali różne wzory depozycji radioaerosolu znakowanego technetem-99 w drogach oddechowych. Kolekcja kondensatu miała miejsce 20 min. po jego podaniu. Radioaktywność kondensatu pozyskanego od pacjentów z przewagą depozycji izotopowego znacznika w centralnych drogach oddechowych w porównaniu do grupy z obwodową depozycją była 3,8 krotnie wyższa, co wskazuje na przewagę udziału ALF z centralnych dróg oddechowych w składzie EBC. Nie wykazano natomiast różnicy w radioaktywności EBC w zależności od ilości zdeponowanego radioznacznika w płucach ani w jamie ustnej. Udział górnych dróg oddechowych w składzie EBC wydaje się być jednak zależny od analizowanego składnika. Stężenia nadtlenu wodoru i 8-isoprostanu w kondensacie uzyskanym z tracheostomii są porównywalne z kolekcjonowanym przez jamę ustną [132]. Natomiast stężenia amoniaku w EBC z tracheostomii są niższe niż w próbkach pochodzących z kolekcji przez jamę ustną [148].

Wiele czynników może wpływać na zmienność pomiarów, która ogranicza porównywanie poszczególnych parametrów zarówno w powtarzanych badaniach tego samego

pacjenta, między pacjentami, jak i pomiędzy różnymi badaniami. Najistotniejsze to tryb oddychania (jak przedstawiano powyżej), rodzaj urządzenia kolekcjonującego i metoda oznaczenia badanych substancji. Rodzaj kondensatora warunkuje objętość pozyskanej próbki i zawartość biomarkerów EBC. Jest to związane z daną powierzchnią kondensacji, zastosowaną temperaturą (niestabilność fizykochemiczna oznaczanych substancji), rodzajem powłoki ścian skraplacza i kolekcjonującej fiolki (adhezja do ścian) oraz systemem cyrkulacji powietrza wydechowego (zintegrowana recyrkulacja zwiększa wydajność kondensatora). Stosowanie odmiennych procedur kolekcjonowania, z użyciem różnych kondensatorów i warunków przechowywania oraz metod oznaczania biomolekuł w EBC powoduje, że ich stężenia istotnie różnią się w poszczególnych badaniach. Dlatego zaleca się aby w badaniach stosować się do zasad zawartych w konsensusie ATS/ERS [132]. W trakcie ich prowadzenia należy zachowywać stałe warunki dla wszystkich pomiarów i dokładnie je udokumentować przy prezentowaniu wyników.

Ograniczenia metodologiczne oceny składu EBC

Wpływ zanieczyszczenia śliną na zawartość chemiczną EBC nie został ostatecznie ustalony. Przy zastosowaniu pułapki śliny w zestawie kolekcjonującym (zgodnie z obowiązującymi standardami) kontaminacja nią winna być znikoma. Jej domieszka nie wpływa na poziom cytokin w EBC gdyż ich stężenia w ślinie okazują się być niższe [149]. Gaber i wsp. wykazali natomiast wysoki poziom LTB₄ w ślinie i próbkach EBC nią zanieczyszczonych [150].

Kolejne ograniczenie stanowi czułość metod oznaczania składowych EBC. Głównym składnikiem EBC jest woda, a biomolekuły występują w nim w bardzo niskich stężeniach, dlatego konwencjonalne metody ich oznaczania często stają się niewystarczające. Stężenia te są niejednokrotnie poniżej dolnej granicy detekcji komercyjnych, stosowanych do oznaczeń dla innych płynów biologicznych, odpowiednich testów immunoenzymatycznych (*enzyme immunoassay* /EIA/) [151]. Efektywne okazały się próby oceny stężenia cytokin w EBC metodą *multiplex immunoassays* z cytometrią przepływową. Wcześniejsze zastosowanie liofilizacji próbki EBC z ponownym wytworzeniem zawiesiny pozwala na około 33-krotny wzrost stężenia cytokin [152]. Montuschi i wsp. potwierdzili przydatność metod radioimmunologicznych (*radioimmunoassays* /RIAs/) w oznaczaniu 8-isoprostanu, PGE₂ i LTB₄ w EBC [153;154]. Nowe możliwości otwiera zastosowanie technik łączonych opartych na spektrometrii mas, pozwalające na oznaczanie śladowych stężeń (nano-, piko- i femto-gramowych). Połączenia chromatografu gazowego ze spektrometrem masowym

(chromatografia gazowa - tandemowa spektrometria masowa /GC-MS²/), lub ze spektrometrem masowym z ujemną jonizacją chemiczną (GC-NICI-MS) oraz wysokosprawna chromatografia cieczowa - tandemowa spektrometria masowa (HPLC-MS²) umożliwiają identyfikację powyżej kilkudziesięciu związków w próbce z progiem czułości w granicach 0,1-0,3 pg/ml.

Z uwagi na niestabilność chemiczną biomolekuł w EBC niezwykle istotne jest zamrażanie próbek kondensatu w bardzo niskiej temperaturze (ok. -80°C) natychmiast po ich uzyskaniu. Zachowanie tych warunków zapewnia zastosowanie komercyjnego kondensatora EcoScreen® II (Jaeger Tonnies, Hoechberg, Niemcy) [155].

Na uwagę zasługuje też przenośny, wyposażony w jednorazową tubę kondensacyjną kondensator RTube (Respiratory Research, Inc., Charlottesville, USA). Kolekcja EBC przy jego zastosowaniu jest łatwa, możliwa w domu pacjenta. Stwarza to możliwość sekwencyjnego pozyskiwania próbek EBC. Jego wersja pHTube® wyposażona w system odpowietrzania (celem usunięcia dwutlenku węgla) umożliwia pomiar pH kondensatu [156].

1.5 Biomarkery zapalenia astmatycznego w EBC

W składzie EBC potwierdzono obecność wielu biomolekuł pochodzących z centralnych i obwodowych dróg oddechowych takich jak: eikozanoidy, nitraty, jony (Na⁺, K⁺, H⁺, Cl⁻, Mg²⁺, Ca²⁺, S²⁻), adenozyne, glutation, H₂O₂, cytokiny (IL, TGFβ, TNFα, IGF1, interferon alfa i gamma) oraz z pęcherzyków płucnych (białka surfaktantu).

Możliwość oznaczenia stężeń uznanych biomarkerów zapalenia astmatycznego w EBC otwiera perspektywę nieinwazyjnej oceny nasilenia tego procesu.

1.5.1 Cytokiny

Interakcje między komórkami uczestniczącymi w procesie zapalnym są regulowane przez uwalniane przez mediatorów białkowe. Wiele z nich, zarówno związanych z „*up regulation*” limfocytów Th₂ (IL-4, IL-5, IL-13) jak i z obserwowaną w astmie „*down regulation*” Th₁ (IL-2, INFγ, TNFα) oznaczano w EBC. Stężenie IL-4 okazuje się być przydatne w diagnostyce i monitorowaniu zapalenia w astmie. Oznaczone jej stężenia są wyższe u astmatyków w porównaniu do grupy kontrolnej [157;158]. Podobne znaczenie mają również oznaczenia RANTES (*Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*), których poziom w EBC koreluje z parametrami ograniczenia przepływu i oporem dróg oddechowych [159;160]. Ponadto wzrost FEV1 po 12-tygodniowej terapii wGKS okazywał się być istotnie skorelowany z obniżeniem stężenia IL-4 i RANTES [160]. Prospektywne badanie dzieci w wieku szkolnym z astmą wykazało, że zaostrzenia choroby są

poprzedzone wzrostem stężenia IL-5 w EBC. Ocena poziomu FeNO jak i obniżenie wartości PEF nie okazały się być czynnikami predykcyjnymi zaostrzeń w tym badaniu [161]. Ocena cytokin profilu Th₁ przynosi jak dotąd sprzeczne wyniki. Część autorów donosi na przykład o wyższych (w stosunku do grupy zdrowej) stężeniach INF γ [162], podczas gdy Shahid wykazał jego niższe stężenie w EBC zarówno u leczonych jak i nieleczonych wGKS astmatyków [163]. Poziom TNF α i TGF β w badaniu Matsunaga i wsp. istotnie korelował z kolei ze stopniem nadreaktywności oskrzeli i tygodniową zmiennością PEF [159].

1.5.2 pH

Oznaczenie pH EBC daje wgląd w równowagę kwasowo-zasadową ALF, która zostaje naruszona w stanie zapalnym. Bezpośredni wpływ na jego wartość ma CO₂ i NH₃ oraz stosunek do ich odpowiednio nietlotnych form NH₄⁺ i HCO₃⁻. Ze względu na łatwą dyfuzję dwutlenku węgla kontakt z powietrzem atmosferycznym powoduje wzrost pH EBC. Pomiar ten, jak już wcześniej wspomniano, wymaga więc zastosowania systemu odpowietrzania z użyciem gazu obojętnego (argon). Zachowanie tych warunków zapewnia dobrą powtarzalność wyników nawet przy zastosowaniu różnych kondensatorów [155]. Wartości pH, jako jednego z nielicznych biomarkerów EBC, zostały ustalone dla zdrowych osobników (mediana: 8.0; 25centyl i 75centyl to: 7,8 i 8,1) [164]. Niskie pH koresponduje ze stopniem ciężkości astmy i jej słabą kontrolą [165;166]. Ostatnio przeprowadzone badania na grupie dzieci przedszkolnych wskazują na przydatność oznaczania pH kondensatu w diagnostyce różnicowej astmy u dzieci z epizodami świszczącego oddechu w wywiadzie [167].

1.5.3 Nadtlenek wodoru

Nadtlenek wodoru (H₂O₂) jest reaktywną formą tlenu o silnych właściwościach utleniających, prowadzących do uszkodzenia komórek. Jego podwyższone stężenie w EBC wydaje się być markerem stresu oksydacyjnego dróg oddechowych. Poza pH, H₂O₂ jest jedynym markerem EBC o ustalonym zakresie wartości dla osób zdrowych. Pomiaru mogą być wykonywane metodą kolorymetryczną lub *on-line* z zastosowaniem biosensorycznego systemu EcoCheck™. Pomiar stężenia H₂O₂ wykazuje dużą powtarzalność, jednak charakteryzuje się też zależnością od toru oddychania (różnice w stężeniach: 1400±170 nmol/l podczas spokojnego vs 840±130 nmol/l podczas głębokiego oddychania) [168]. Wykazano, że podwyższone stężenie H₂O₂ w kondensacie może być przydatne w odróżnieniu astmatyków od grupy zdrowej i koreluje z ciężkością choroby [165;169]. Jego stężenie w EBC u stabilnych, leczonych wGKS astmatyków jest niższe w porównaniu do chorych nieleczonych wGKS i porównywalne do obserwowanego u osób zdrowych [170].

1.5.4 Pokrewne związki tlenu azotu

Produkowany w nadmiarze w przebiegu procesu zapalnego tlenek azotu (NO) szybko reaguje z innymi rodnikami. W reakcji z anionami nadtlentowymi powstają wysoko reaktywne formy azotanów (NO_3^-), w obecności molekularnego tlenu konwertuje on do azotynów (NO_2), a w interakcji z reaktywnymi tiolami powstają nitrozotiole. Poziom azotanów i azotynów w EBC jest markerem produkcji tlenu azotu. Związki te są również produktem metabolizmu flory bakteryjnej jamy ustnej stąd istotne znaczenie ma procedura pobierania próbek EBC (płukanie jamy ustnej) [171]. Dotychczasowe badania wskazują na istotnie wyższe stężenia związków pochodnych do NO w EBC astmatyków. Poziomy ich są też dobrymi wskaźnikami ciężkości choroby. Nie wykazano natomiast korelacji między nimi a poziomami FeNO oznaczanymi *on-line* [158;172;173]. Ponadto wyższe stężenia NO_2 potwierdzono również w mukowiscydozie i zespole pierwotnej dyskinezy rzęsek, podczas gdy FeNO jest w ich przebiegu obniżony lub prawidłowy [171;174].

1.5.5 Amoniak

Wytwarzanie amoniaku w drogach oddechowych ma istotny wpływ na regulację równowagi kwasowo-zasadowej. Ze względu na wysoką lotność tego związku istotny jest czas procedury pobierania i temperatura. W EBC astmatyków stwierdza się obniżone stężenia amoniaku [166;175] jednak jego poziom zależy również od produkcji przez florę bakteryjną jamy ustnej.

1.5.6 Puryny

Nukleozydy i nukleotydy purynowe odgrywają istotną rolę w wewnątrzkomórkowych procesach biochemicznych jako źródło energii oraz strukturalne jednostki kwasów nukleinowych i enzymów, ale są również ważnymi zewnątrzkomórkowymi molekułami sygnałowymi. Badanie, którym oceniano stężenia adenozyno-trójfosforanu (ATP) w EBC nie wykazało różnic jego poziomu u astmatyków w stosunku do osób zdrowych [142], natomiast stężenia adenozyny były wyższe w grupie astmatyków nieleczonych wGKS w porównaniu do grupy nimi leczonej. Terapia za pomocą wGKS powodowała, że jej poziomy nie różniły się od obserwowanych u zdrowych osób [176].

1.5.7 Eikozanoidy

Metabolity kwasu arachidonowego są chyba najczęściej analizowanym składnikiem EBC. Wiele niezależnych badań wskazuje na możliwość przydatności ich oznaczenia w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu astmy. Ich skrajnie niskie stężenia w EBC i niestabilność chemiczna stanowią duży problem metodologiczny. Dotychczasowe

doświadczenia sugerują, że ekstrakcja do fazy stałej jest dla tych związków efektywniejszą metodą od liofilizacji, która powoduje nieakceptowalną degradację mediatorów lipidowych [177]. W większości opublikowanych badań poszczególne, najczęściej pojedyncze eikozanoidy oznaczane były metodami EIA lub RIAs. Ze względu na ich ograniczoną czułość (stężenia eikozanoidów nierzadko poniżej dolnej granicy czułości metody) oznaczenia charakteryzowały się istotną zmiennością [151]. Nowe możliwości otworzyło zastosowanie spektrometrii masowej umożliwiającej identyfikację i ilościowe oznaczenie lipidów. Wprowadzenie techniki HPLC-MS² i GC-MS pozwoliło na analizę profilu pochodnych AA w EBC [145;146].

Prostaglandyny

Prostaglandyna D₂

W badaniu Ono i wsp., wzrost stężenia PGD₂ w EBC oraz jego metabolitu 9α11β-PGF₂α w moczu u astmatyków z dodatnią reakcją ekspozycyjną na alergen, korelował z zakresem obniżenia FEV₁ w badaniu spirometrycznym ocenianych pacjentów [178]. Wcześniejsze badania u chorych na astmę potwierdzały wyższe stężenia tego eikozanoidu w surowicy [179], w płynie z płukania pęcherzykowo-oskrzelowego (BAL) [180;181] i płwocinie indukowanej [182] oraz zwiększone wydalanie 9α11β-PGF₂α z moczem [179;183].

Prostaglandyna E₂

Wyniki dotychczasowych badań dotyczących stężenia PGE₂ w EBC są niejednoznaczne. Część z nich wykazuje, że poziom PGE₂ w EBC astmatyków leczonych jak i nieleczonych wGKS nie różni się od stwierdzanego u dzieci zdrowych [184-186]. Nie ulega on też zmianie po włączeniu do leczenia wGKS u astmatyków dotychczas nimi nie leczonych [185]. Wyniki kolejnego badania wskazują jednak na podwyższone stężenia metabolitu PGE₂ u astmatyków zarówno z nietolerancją aspiryny jak i bez niej [146].

Tromboksan

Bardzo niskie stężenia metabolitów TXA₂ w EBC stanowią duże ograniczenie metodologiczne ich oznaczenia. Metoda RIA daje lepsze efekty ich oceny w porównaniu z EIA, ale dopiero wprowadzenie wysokoczulych metod chromatograficznych ze spektrometrią masową otwarło nowe możliwości na tym polu. Dotychczasowe doniesienia wskazują na podwyższone stężenia TXB₂ u astmatyków [187] lub brak istotnych różnic w poziomach tego eikozanoidu w EBC w stosunku do osób zdrowych [185]. Pucsek i wsp. wykazali natomiast wzrost stężenia TXB₂ u sportowców po obciążeniu wysiłkiem [188].

Leukotrieny cysteinyłowe

W ostatniej dekadzie pojawiły się doniesienia wykazujące wyższe stężenia cysLTs w EBC zarówno u dzieci jak i u dorosłych w porównaniu do grupy zdrowej. Marker ten odróżnia zdrowych od astmatyków zarówno nie leczonych jak i tych, u których stosowane jest leczenie wGKS [185;189-191]. Wydaje się jednak, że ta możliwość predykcyjna dotyczy głównie chorych na umiarkowaną i ciężką postać choroby, natomiast gorzej różnicuje tych z astmą łagodną i epizodyczną [192]. Stężenie LTE4 w EBC okazuje się być wyższe u dzieci z astmą atopową niż u tych z atopią bez astmy w przeciwieństwie do FeNO, którego poziom wzrasta również u dzieci z atopią [186]. Wzrost stężenia cysLTs u astmatyków po bronchoprowokacji alergenem, w stosunku do ich stężenia w próbkach EBC sprzed ekspozycji, wskazuje na przydatność ich oznaczeń w monitorowaniu ostrej fazy zapalenia astmatycznego [178;193]. Carraro i wsp. wykazali z kolei istotnie wyższe stężenia cysLTs u dzieci z objawami astmy indukowanej wysiłkiem w porównaniu do chorych bez tej reakcji. Zarówno stężenia cysLTs jak i FeNO korelowały w tym badaniu z powysiłkowym obniżeniem FEV1 [175]. Filla i wsp. stwierdzili podwyższone stężenie cysLTs w EBC zarówno u dzieci z izolowanym alergicznym nieżytem nosa jak i współistniejącym z astmą. Dwutygodniowe donosowe leczenie propionianem flutikazonu spowodowało znamienne spadek ich stężenia dotyczący obu grup chorych [194]. Podwyższone stężenia cysLT w EBC w okresach zaostrzenia astmy [195] mogą obniżać się do poziomu porównywalnego ze stwierdzanym u dzieci zdrowych pod wpływem kilkudniowego leczenia systemowymi kortykosteroidami [196]. Terapia wGKS również obniża stężenia cysLTs, ale w mniejszym zakresie [185;197]. Również wprowadzenie do leczenia LTRA u dzieci z astmą sporadyczną, obniżało istotnie stężenie LTE4 [186]. Podobnie, dołączenie do leczenia montelukastu u astmatyków leczonych wGKS również powodowało obniżenie stężenia cysLTs w EBC [198]. Patomechanizm tego zjawiska nie został jeszcze dokładnie poznany. Dotychczasowe wyniki badań wskazują na efekt ograniczenia biosyntezy cysLTs przez LTRA poprzez bezpośredni wpływ hamujący na aktywność 5-LO, prawdopodobnie zależny od wiązania jeszcze nie zdefiniowanego miejsca tego enzymu [199]. Lex i wsp. wykazali poza tym korelację poziomu cysLTs w EBC z remodelingiem dróg oddechowych, ocenianym na podstawie grubości błony podstawnej biopsjatu oskrzeli pobranego podczas bronchoskopii [200].

Leukotrien B4

Stężenia LTB4 w EBC u dzieci i dorosłych astmatyków są znamienne wyższe w stosunku do zdrowych [190;201]. Ponadto, ich poziomy w astmie przewlekłej przewyższają te

obserwowane w jej formie epizodycznej [202]. Mondino i wsp. wykazali, że podwyższone stężenia LTB4 dotyczą zarówno dzieci leczonych jak i nie leczonych wGKS w odróżnieniu od tych z atopią, ale nie chorujących na astmę [185]. Wprowadzenie wGKS nie wywołuje istotnego zmniejszenia poziomu LTB4 w porównaniu do stężeń oznaczonych przed ich zastosowaniem [197]. Wcześniejsze badania dały natomiast odmienne wyniki. Stężenia LTB4 u dzieci leczonych wGKS były niższe w stosunku do nie leczonych nimi chorych [203]. Próba eliminacji ekspozycji na uczulający alergen również nie przynosiła oczekiwanego obniżenia stężenia LTB4 [204].

Pozostałe produkty lipooksygenaz

Oznaczanie nietrwałych, występujących w ekstremalnie niskich stężeniach, pośrednich metabolitów AA produkowanych na drodze lipooksygenaz, wymaga zastosowania bardzo czułych metod. Doniesienia na temat stężeń 5-, 12-, 15HETE, LXs i EXs są w EBC są bardzo nieliczne. Sanak i wsp. wykazali, że poziom 5HETE jest wyższy u zdrowych palących papierosy w stosunku do niepalących [145], a kolejne ich badania wskazują na istotnie wyższe stężenia 5- i 15HETE u pacjentów z astmą aspirynową w porównaniu do astmatyków bez nadwrażliwości na aspirynę [146]. Potwierdzają to Mastalerz i wsp., których wyniki wykazują ponadto, że w obu grupach stężenia te pozostają niezmienione po ekspozycji na wziewną aspirynę [193]. Na podwyższoną aktywność szlaku 15-LO u dzieci z astmą wskazują badania Sachs-Olsen i wsp. Wykazali oni podwyższony poziom EXC4, EXD4 i EXE4 oraz 15HETE w tej grupie dzieci w porównaniu ze zdrowymi rówieśnikami. Wzrost ten nie wykazywał jednak istotnej zależności od stopnia ciężkości choroby [144].

Klinicznym potwierdzeniem protekcyjnej roli lipoksyn są wyniki badania Hasan i wsp. Dzieci hospitalizowane z powodu stanu astmatycznego miały istotnie niższe stężenia LXA4 w porównaniu do zdrowych, w przeciwieństwie do stwierdzanego u nich wyższego poziomu 8-izoprostanu [205].

Izoprostany

Oznaczanie izoprostanów jako wskaźników stresu oksydacyjnego ma przewagę w stosunku do innych jego wskaźników (np. H₂O₂, azotany/azotyny), ze względu na chemiczną stabilność tych związków oraz ich występowanie w formie wolnej w płynach biologicznych. Stężenie 8-izoprostanu okazuje się wyższe w EBC u dzieci z astmą niż u ich zdrowych rówieśników, bez względu na stosowane leczenie wGKS w przeciwieństwie do zależnych od takiej terapii zmian FeNO [184;206]. Podwyższony poziom tego izoprostanu obserwowany u pacjentów z astmą wysiłkową koreluje z obniżeniem FEV1 po 5 min od stymulacji

wysiłkiem [207]. Ponadto stężenia 8-izoprostanu są wyższe w ciężkiej astmie w porównaniu do umiarkowanej i łagodnej [192;208]. U dzieci z dobrze kontrolowaną astmą, poziom 8-izoprostanu jest niższy niż u tych z niekontrolowaną, co z kolei może przemawiać za udziałem stresu oksydacyjnego w tym ostatnim fenotypie choroby [209]. U chorych na astmę z nadwrażliwością na roztocza kurzu domowego, w wyniku naturalnego unikania ekspozycji na ten alergen, stężenie 8-izoprostanu w EBC obniża się [204]. Jego poziom wzrasta natomiast w zaostrzeniach choroby, a zwłaszcza w stanie astmatycznym [205]. Badanie Baraldiego i wsp. wykazało, że co prawda obniża się pod wpływem leczenia systemowymi kortykosteroidami, jednak pozostaje powyżej stężenia obserwowanego w grupie zdrowej [196]. Może to sugerować, że leczenie kortykosteroidami nie jest w pełni efektywne w ograniczeniu stresu oksydacyjnego w zaostrzeniach choroby.

2 Założenia i cel pracy

Pomimo stałego rozwoju i udoskonalania metod stosowanych w diagnostyce i monitorowaniu procesu zapalnego w astmie jej rozpoznawanie u dzieci stanowi nadal trudny problem i stymuluje do poszukiwania nowych, nieinwazyjnych procedur diagnostycznych. Należy sądzić, że określenie profilu eikozanoidów w EBC może okazać się pomocne w tym zakresie.

Celem pracy była ocena przydatności oznaczenia stężeń eikozanoidów w EBC z zastosowaniem wysokorozdzielczych metod biochemicznych dla rozpoznawania astmy u dzieci i ustalenie kierunku ich zmian w zależności od klinicznego przebiegu choroby.

Dla osiągnięcia założonego celu zaplanowano dwa etapy badań i podjęto próbę odpowiedzi na następujące zagadnienia:

Etap I

- stężenia których eikozanoidów w EBC najlepiej różnicują dzieci chorujące na astmę od zdrowych rówieśników,
- ocena siły i jakości związku wyznaczanych stężeń eikozanoidów w EBC ze stopniem ciężkości i kontroli astmy, rodzaju uczulenia, stosowanego leczenia,
- ocena trafności testu diagnostycznego przy stosowaniu pojedynczych oznaczeń stężeń eikozanoidów w EBC w porównaniu do użycia wybranego ich profilu/zestawu,
- ocena trafności testu diagnostycznego przy stosowaniu profilu/zestawu stężeń eikozanoidów w EBC w porównaniu do użycia innych biomarkerów astmy (FeNO, nadreaktywność oskrzeli).

Etap II

- ocena stopnia zmienności stężeń eikozanoidów w EBC w czasie wśród badanych dzieci,
- ocena kierunku zmian stężeń eikozanoidów w EBC w zależności od przebiegu klinicznego astmy.

Realizacja wyżej wymienionych celów pozwoliłaby na ustalenie na ile wyznaczanie stężeń eikozanoidów w EBC może być narzędziem diagnostyczno-monitorującym w astmie u dzieci.

3 Materiał i metody

3.1 Charakterystyka grupy badanej

Grupa badana

Do badania włączono 35 dzieci w wieku 7-18 lat z rozpoznaniem astmy atopowej, leczonych w Poradni i Oddziale Pulmonologii i Alergologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie.

Główne kryteria włączenia

Wszyscy chorzy spełniali kryteria rozpoznania astmy wg GINA (*The Global Initiative for Asthma*) [1]. Ich stopień ciężkości astmy był określany zgodnie z wytycznymi GINA, a dla oceny kontroli choroby posłużono się testem kontroli astmy ACT (*Asthma Control Test*) [33;34].

Dodatkowe kryteria włączenia

W ciągu ostatnich 12 miesięcy: występowały u nich napady duszności, stwierdzano znamiennej odwracalność po podaniu β 2-mimetyku lub bronchokonstrykcję w teście wysiłkowym oraz dodatnie testy skórne z co najmniej jednym alergenem.

Kryteria wykluczenia

Brak możliwości odstawienia krótkodziałających β 2-mimetyków i/lub leków antycholinergicznym na 8 godz., a długodziałających β 2-mimetyków na 24 godz. przed badaniem.

Grupa kontrolna

Do grupy kontrolnej zdrowych rówieśników (7-18 lat), bez cech atopii zakwalifikowano 25 dzieci rodzin personelu Szpitala. Miały one ujemny wywiad w kierunku chorób alergicznych, w tym astmy oraz ujemne testy skórne z panelem 17 alergenów wziewnych.

Kryteria włączenia wspólne dla grupy badanej i kontrolnej

1) adekwatna kooperacja dla wykonania badania spirometrycznego i uzyskania EBC oraz oceny FeNO, 2) brak objawów infekcji układu oddechowego w okresie 6 tygodni poprzedzających badania.

Kryteria wykluczenia wspólne dla grupy badanej i kontrolnej

1) obecność innych przewlekłych schorzeń układu oddechowego (poza alergicznym nieżytem nosa współistniejącym z astmą w grupie badanej) lub ogólnoustrojowych, 2) leczenie niesteroidowymi lekami zapalnymi, 3) bronchoskopia wykonana w tygodniu poprzedzającym badanie, 4) test prowokacji dooskrzelowej swoistej bądź nieswoistej lub 5) indukowanie płwociny mniej niż trzy dni przed badaniem.

Dokładną charakterystykę kliniczną uczestników badania przedstawiono w rozdziale 4.1.

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego, numer badania: KBET/139/B/2006, wraz z uzupełnieniami. Ponadto, pisemną zgodę na badania wyrażali opiekunowie prawni dzieci oraz same dzieci jeżeli ich wiek był powyżej 12 roku życia.

3.2 Opis badania

3.2.1 Pierwszy etap badania

W pierwszym etapie uczestniczyły wszystkie zrekrutowane dzieci.

Podczas wizyty dzieci zdrowych, po wykluczeniu schorzeń układu oddechowego, przeprowadzono badanie ankietowe na temat ewentualnych schorzeń i dolegliwości alergicznych. W grupie astmatyków wypełniano ankietę dotyczącą objawów astmy oraz stosowanych leków przeciwastmatycznych.

Następnie wykonywano testy skórne prick z 17 aeroalergenami.

Kolejnym punktem wizyty była kolekcja próbek EBC, które natychmiast po uzyskaniu zamrażano w temp. -70°C .

W dalszej kolejności, po ok 30 minutach odpoczynku oznaczano poziom FeNO.

Po jego wykonaniu przystępowano do podstawowego badania spirometrycznego, a następnie testu wysiłkowego na bieżni.

Z pobranej próbki krwi oznaczano eozynofilę bezwzględną oraz stężenie całkowite IgE w surowicy uczestników badania.

3.2.2 Drugi etap badania

W drugim etapie badania uczestniczyło 27 dzieci chorych na astmę. Składały się na niego dwie wizyty (wizyta B i C) kolejno po 2 i 6 tygodniach od pierwszej (wizyta A). Podczas każdej z nich ponownie przeprowadzono test kontroli astmy (ACT) oraz wywiad uwzględniający stosowane leczenie przeciwastmatyczne. Następnie dokonywano kolekcji EBC i pomiaru FeNO. Na zakończenie wykonywano podstawowe badanie spirometryczne i test wysiłkowy.

3.3 Metody

3.3.1 Badania ankietowe

Badania ankietowe przeprowadzono za pomocą kwestionariusza z pytaniami określającymi stopień kontroli astmy, występowanie jej zaostrzeń oraz stosowane leczenie w okresie poprzedzającym wizyty, z uwzględnieniem dawek i częstości podawania leków.

Korzystano również z testów kontroli astmy (ACT) w wersji zależnej od grupy wiekowej badanych (7-11 i ≥ 12 lat). Uzyskaną punktację ≥ 20 przyjęto jako wskaźnik astmy kontrolowanej.

3.3.2 Testy skórne prick

Posłużono się alergenami firmy Allergopharma. Wykonano je w sposób typowy z wykorzystaniem 17 alergenów, w tym 8 alergenów wewnątrzdomowych (Der. pteronyssinus, Der. farinae, pies, kot, pleśnie) oraz 9 zewnątrzdomowych (pyłki traw, chwastów, zbóż i drzew). Testy oceniano jako dodatnie, gdy średnia średnica bąbla alergenowego wynosiła co najmniej 3 mm.

3.3.3 Oznaczanie FeNO

Oznaczenie poziomu tlenu azotu w powietrzu wydychanym mierzono zgodnie z opublikowanymi rekomendacjami ATS/ERS [210], z wykorzystaniem urządzenia NIOX Mino® (Aerocrine AB, Solna, Szwecja), wyposażonego w czujnik elektrochemiczny. Dzieci utrzymywały przepływ wydechowy na poziomie 50 ± 5 ml/s za pomocą kalibrowanych rezystorów przepływu.

3.3.4 Badanie spirometryczne

Badania spirometryczne zostały wykonane wg zaleceń Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc [211] z wykorzystaniem spirometru Lungtest 1000 (firma MES, Kraków).

3.3.5 Test wysiłkowy

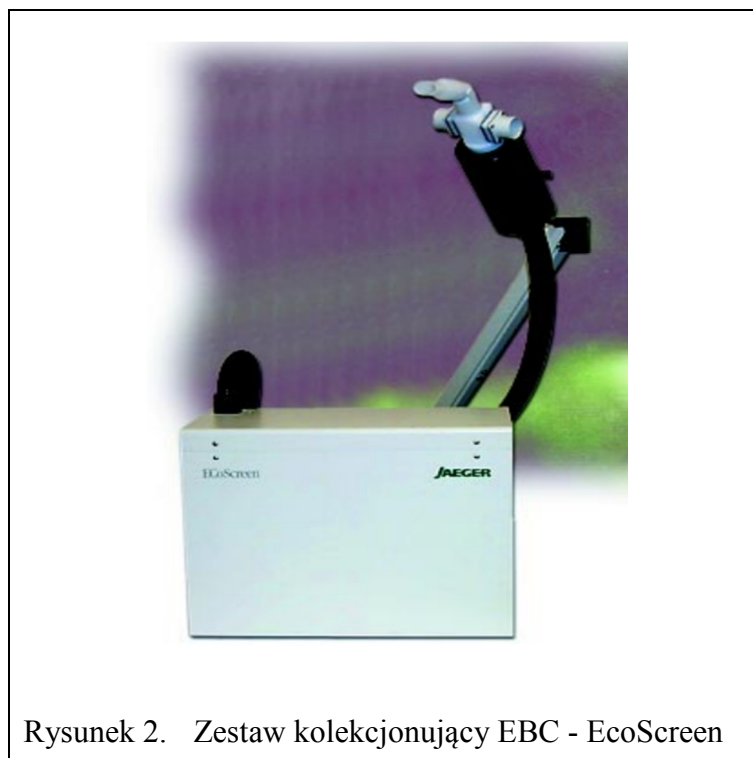
Próbie nieswoistej prowokacji wysiłkiem wykonywano według przyjętych standardów z użyciem bieżni [212]. Kolejne badania spirometryczne wykonywano po 3, 5, 10 i 20 min. od zakończenia 6 minutowego biegu. Test wysiłkowy kwalifikowano jako dodatni (obecna nadreaktywność oskrzeli /BHR/) wówczas, gdy względne powysiłkowe obniżenie FEV1 ($\Delta\%FEV1$) wynosiło co najmniej 10%.

3.3.6 Kolekcja EBC i pomiar eikozanoidów

Zbiórka kondensatu wydychanego powietrza

Kolekcję EBC przeprowadzano zgodnie ze standardami ATS/ERS [132], z zastosowaniem systemu EcoScreen I (Jaeger GmbH, Hoechberg, Niemcy) – rys. 2. Badany pacjent przez 20 min. oddychał spokojnie, na poziomie objętości oddechowej (TV) przez ustnik połączony z zestawem jednokierunkowych zastawek, oddzielających powietrze wdechowe od wydychanego. W urządzeniu tym powietrze wdechowe kierowane jest do

kondensatora umieszczonego w mankietcie chłodzącym o temperaturze -10°C . Przechodząc przez jego lamele ulega kondensacji na wewnętrznych ściankach i EBC jest zbierany w umieszczonej w jego wnętrzu fiolce. Zestaw kolekcjonujący był wyposażony w pułapkę śliny, zabezpieczającą przed zanieczyszczeniem nią próbek kondensatu. Przed rozpoczęciem badania zalecano płukanie jamy ustnej wodą i dokładnie instruowano pacjenta na temat jego przebiegu. Zbiórkę EBC przeprowadzano w pozycji siedzącej. Badany pacjent szczelnie ustami obejmował ustnik, a celem ograniczenia przepływu powietrza przez nos zakładano na niego klips. Uzyskane próbki EBC o objętości około 1,5-3,0 ml wyjmowano z mankietu chłodzącego i umieszczano w temperaturze -70°C . W tych warunkach były one przechowywane do czasu wykonania oznaczeń eikozanoidów (1-3 miesięcy).



Rysunek 2. Zestaw kolekcjonujący EBC - EcoScreen

Oznaczanie eikozanoidów w EBC

Stężenia PGE2, PGEM, PGD2, 6keto-PGF1 α , 11dehydro-TXB2, LTB4, LTC4, trans-LTC4, LTD4, LTE4, LXA4, 5HETE, 12HETE, 15HETE, EXC4, EXD4, EXE4 oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej i tandemowej spektrometrii masowej (HPLC-MS²).

Poziomy PGF2 α , 8izo-PGF2 α , 9 α ,11 β -PGF2 α zostały wyznaczone metodą chromatografii gazowej i spektrometrii mas z ujemną jonizacją chemiczną (GC-NICI-MS).

Zastosowanie technik łączących chromatografię ze spektrometrią masową stanowi narzędzie analityczne, dające duże możliwości wykonywania oznaczeń związków chemicznych znajdujących się w jednej próbce, w ekstremalnie niskich stężeniach. Spektrometr masowy rejestruje widma masowe co pozwala na identyfikację analizowanej substancji. Dzięki analizie wyselekcjonowanych jonów, z zastosowaniem deuterowanych pochodnych, można przeprowadzać oznaczenia ilościowe badanych substancji.

Po rozmrożeniu, próbki kondensatu były mieszane z 2 μ l 1% kwasu octowego w celu poprawy ekstrakcji fazy organicznej w obniżonym do 4,5 pH. Następnie do próbek dodawano deuterowane analogi wszystkich mierzonych metabolitów AA (w metanolu) jako standardy wewnętrzne oraz dla kompensacji błędów analitycznych. Dodawano: PGE2-d4, tetranor-PGEM-d6, PGD2-d4, 6-keto-PGF1 α -d4, 11dehydro-TXB2-d4, LTB4-d4, LTD4-d5, LTE4-d3, 5HETE-d8, 12HETE-d8, 15HETE-d8, 8izo-PGF2 α -d4, 9 α ,11 β -PGF2 α -d4 (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA). Dalej próbkę ekstrahowano za pomocą eteru tert-butylowo-metylowego (Sigma Chemical Co, USA). Fazę organiczną odparowywano w atmosferze azotu w temperaturze pokojowej. Pozostałość rozpuszczono w metanolu i natychmiast poddawano dalszej analizie. [145].

Wysokosprawna chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią masową

Dla rozdziału składników próbek EBC zastosowano metodę odwróconej fazy HPLC pozwalającą na precyzyjne oddzielenie związków chemicznych na podstawie hydrofobowego oddziaływania i średnicy ich cząsteczek.

Ekstrakt EBC (w metanolu) automatycznie nastrzykiwano na kolumny chromatografu cieczowego (Shimadzu Sil-2-AC, Shimadzu Scientific Instruments, Inc Columbia, MD, USA). W celu elucji eikozanoidów użyto dwóch faz ruchomych: acetonitryl/woda/kwas octowy oraz acetonitryl/izopropanol/kwas octowy, z zastosowaniem prędkości przepływu 0,11 ml/min. Dogodne połączenie chromatografu z tandemowym spektrometrem masowym wyposażonym w źródło elektrorozpylania jonów (Qtrap 4000; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gwarantowało z kolei identyfikację związków (rozdzielonych na podstawie czasu retencji chromatograficznej) w oparciu o stosunek masy od ładunku elektrycznego (m/z).

Chromatografia gazowa ze spektrometrią masową z ujemną jonizacją chemiczną

Przed naniesieniem na kolumny chromatografu gazowego ekstrakty EBC były poddawane trzy stopniowej derywatywacji i następnie oczyszczaniu za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Taka chemiczna modyfikacja cząsteczek przez podstawienie ich karboksylowych lub hydroksylowych grup, odpowiada za uzyskanie wystarczających różnic

w czasie retencji chromatograficznej umożliwiającą zastosowanie pojedynczego analizatora spektrometru masowego. Oczyszczone próbki nastrzykiwano na kolumnę chromatografu gazowego połączonego ze spektrometrem masowym z ujemną jonizacją chemiczną (model Engine 5989B seria II Helwett Packard, Palo Alto, CA, USA). Rejestrowano widma masowe badanych eikozanoidów i zastosowanych wzorców wewnętrznych.

Stężenie analizowanego związku obliczano na podstawie znanej ilości deuterowanego wzorca wewnętrznego (metoda rozcieńczenia stabilnych izotopów), łatwo identyfikowanego przez wyższą masę cząsteczkową.

Oznaczone stężenia badanych eikozanoidów podano w pg/ml EBC.

3.3.7 Inne badania analityczne

Całkowitą liczbę eozynofilów oznaczano przy użyciu analizatora Sysmex XT-1800i (Sysmex America, Inc, USA) wykorzystującego fluorescencyjną cytometrię przepływową, według standardowych metod laboratoryjnych Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie. Stężenie IgE całkowitych wyznaczano metodą fluoroenzymologiczną z zastosowaniem testu UniCap 100 (Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Szwecja).

3.3.8 Analiza statystyczna

Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą oprogramowania STATISTICA (StatSoft Inc 9.0TM, USA). Istotność różnic pomiędzy porównywanymi grupami lub podgrupami według różnych kategoryzacji (np. astma kontrolowana vs niekontrolowana, nadreaktywność oskrzeli obecna vs nieobecna) dla zmiennych ciągłych została oszacowana przy użyciu testu Manna-Whitneya. Dla zmiennych kategorycznych zastosowano test χ^2 . Podsumowanie statystyk zostało wyrażone za pomocą median, kwartyli (pierwszy i trzeci) lub wartości odsetkowych, stosownie do potrzeb. Brakujące dane (brak stężeń eikozanoidów spowodowany błędem pomiaru) zostały w tych analizach pominięte. W celu określenia wpływu zmiennych niezależnych (wiek, płeć, BMI z-score, %, $\Delta\%$ FEV1) przeprowadzono odpowiednio analizę kowariancji (ANCOVA) lub wieloczynnikową ANOVA. Dla spełnienia warunków tej analizy przeprowadzono transformację wszystkich zmiennych metodą Boxa-Coxa. Przekształcenie to zostało użyte jako transformacja normalizująca, tak aby ciąg analizowanych zmiennych losowych stał się ciągiem o stałej (choćby w przybliżeniu) wariancji [213]. Ocenę monotonicznej zależności pomiędzy parametrami ilościowymi przeprowadzono z zastosowaniem współczynnika korelacji rangowej Spermiana.

Do budowy uogólnionego modelu liniowego dla diagnostyki astmy (w oparciu o wyróżnione w badaniu eikozanoidy) zostało wykorzystane modelowanie

prawdopodobieństwa wystąpienia choroby. Podejście to zostało wybrane ze względu na dychotomiczny charakter rozkładu analizowanych grup: dzieci zdrowe lub astmatycy. Jako metodę regresji logistycznej zastosowano funkcję logitową. Określa ona logarytm ilorazu szans ($\text{logit}(p) = \ln p/(1 - p)$) a po transformacji odwrotnej, definiuje prawdopodobieństwo choroby.

W celu wyznaczenia najlepszego uogólnionego modelu liniowego z podzbiorem analizowanych mediatorów zastosowano kryterium informacyjne Akaike (AIC) [214]. Podstawowym założeniem AIC jest wybór istotnych zmiennych, z jednoczesną minimalizacją strat informacji. W tym przypadku pozwoliło to wyodrębnić parametry EBC o najwyższej wartości diagnostycznej. Dla spełnienia warunków tej analizy (i tylko dla niej), brakujące wartości ocenianych parametrów EBC (błąd pomiaru) zostały zastąpione medianami w grupach, wyznaczonymi na podstawie uzyskanych wyników oznaczeń odpowiednio dla: grupy kontrolnej, astmy sporadycznej, astmy przewlekłej lekkiej, umiarkowanej, ciężkiej.

Dla oceny trafności diagnostycznej różnych testów, a przede wszystkim do porównania opisanego modelu wykorzystującego eikozanoidy EBC z innymi wyznacznikami astmy (FeNO, dane spirometryczne) wykorzystano krzywe ROC (*Receiver Operating Characteristic*) z analizą różnic pól powierzchni pod tymi krzywymi (AUC).

Porównanie wartości ocenianych parametrów podczas kolejnych wizyt przeprowadzono z zastosowaniem analizy wariancji powtarzanych pomiarów dla rang Friedmana. Korelację wyników pomiarów uzyskanych podczas wszystkich wizyt oszacowano obliczając wewnątrzgrupowe współczynniki korelacji – ICC (*Intraclass Corelation Coefficient*). Oceny zgodności kwalifikacji astmatyków w trakcie kolejnych wizyt dokonano obliczając współczynniki zgodności *kappa Cohena* i *kappa Fleissa*.

Został przyjęty poziom istotności statystycznej testów jako $p < 0,05$.

4 Wyniki

4.1 Charakterystyka kliniczna grup badanych i ich porównanie

Do grupy badanej zgodnie z warunkami włączenia i wykluczenia zakwalifikowano 35 dzieci chorujących na astmę, do grupy kontrolnej 25 zdrowych rówieśników.

Ze względu na błąd kolekcji (domieszka śliny) i pomiaru EBC u 2 dzieci z grupy badanej, dalsze analizy i opracowania przedstawiono z badań u 33 z tej grupy.

Grupa dzieci z astmą (grupa badana) nie różniła się istotnie od zdrowej grupy kontrolnej pod względem wieku, płci, wartości BMI z-score i FEV1. Bezwzględna eozynofilia krwi obwodowej, stężenia całkowitych IgE w surowicy oraz tlenu azotu w wydychanym powietrzu były natomiast znacząco wyższe u astmatyków. W grupie tej wykazano również większą częstość występowania nadreaktywności oskrzeli ocenianej w próbie prowokacji wysiłkiem. Astmatycy wykazywali znamienne większe, względem wartości wyjściowych, obniżenie FEV1 w teście wysiłkowym ($\Delta\%FEV1$).

Charakterystyka kliniczna astmy grupy badanej (n=33)

Astmę epizodyczną rozpoznawano u 6 (18%) dzieci grupy badanej. Pozostałe 27 (82%) prezentowało przewlekłą (łagodną, umiarkowaną i ciężką) postać kliniczną choroby. Tylko 1 (3%) dziecko z astmą przewlekłą było leczone wyłącznie za pomocą LTRA (montelukast). U 26 (79%) astmatyków stosowano leczenie wGKS: u 16 (49%) z nich w monoterapii, u 4 (12%) z długodziałającymi β_2 -mimetykami (LABA; salmeterol n=3, formoterol n=1), u 3 (9%) z LTRA (montelukast), u 4 (12%) łącznie z LABA i LTRA (montelukast). Dwoje dzieci z powodu utraty kontroli choroby w okresie między pierwszą a drugą wizytą miało włączone kilkudniowe (3 i 7 dni) leczenie glikokortykosteroidem systemowym w dawce 1mg/kg/dobę w przeliczeniu na prednison. Z uwagi na rozpoznanie alergicznego nieżyty nosa jedna trzecia astmatyków była również leczona doustnymi lekami przeciwhistaminowymi i donosowymi kortykosteroidami. Charakterystykę kliniczną uczestników badania przedstawia tab. 1.

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna uczestników badania

PARAMETR	ASTMATYCY (n=33)	ZDROWI (n= 25)	p
Wiek (lata) *	12,4 ± 3,1	11,8 ± 3,2	0,49
Płeć (dziewczynki/chłopcy) **	12/21	13/12	0,25
BMI (z-score) ***	-0,38 (-0,68 - 0,59)	0,17 (-0,51 - 0,69)	0,21
Bezwzględna eozynofilia krwi obwodowej (10 ⁹ /l) ***	468 (303 - 722)	155 (112 - 216)	<0,001
Surowicze całkowite IgE (kIU/l) ***	465,6 (234 - 513)	45,5 (10,7 - 88,7)	<0,001
FEV1 (% normy) ***	102,2 (95,84 - 109,14)	98,5 (90,67 - 112,63)	0,74
Δ%FEV1 (%)***	6,1 (1,74 - 11,6)	-1,54 (-4,17 - 4,31)	0,003
Dodatni wynik testu wysiłkowego (Δ%FEV1 ≥ 10%), n (%)**	11 (33)	3 (12)	0,04
FeNO, ppb ***	21 (14,5 - 42,5)	9,5 (4,5 - 14)	0,001
Nadwrażliwość na roztocza kurzu domowego, n (%)	25 (76)	0	
Nadwrażliwość tylko na alergeny zewnętrzdomowe, n (%)	8 (24)	0	
Stopień ciężkości astmy, n (%)			
- sporadyczna	6 (18)	nd	
- przewlekła	27 (82)		
Astma kontrolowana (ACT ≥ 20), n(%)	23 (70)	nd	
Leczenie astmy przewlekłej, n (%)			
- wGKS#			
budesonid ≤ 400 μg	14 (42)	nd	
> 400 μg	12 (36)		
- LABA	8 (24)		
- LTRA	8 (24)		
Towarzyszący alergiczny nieżyt nosa, n (%)	11 (32)	0	

Definicje skrótów: BMI – indeks masy ciała; FEV1- natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa; Δ%FEV1- procent spadku FEV1 w teście wysiłkowym; FeNO- poziom tlenu azotu w powietrzu wydychanym, ppb- części na bilion; ACT – test kontroli astmy; wGKS- wziewne glikokortykosteroidy; LABA – wziewni długodziałający β2-agoniści; LTRA – antagonist receptorów leukotrienów (montelukast), nd – nie dotyczy.

* średnia ±SD, test t-Studenta
** test X²
*** mediana (1. - 3. kwartył), test U Manna-Whitneya
dzienna dawka stosowanych wGKS w przeliczeniu na budesonid

4.2 Pierwszy etap badania

4.2.1 Stężenia eikozanoidów w EBC

Kondensat powietrza wydechowego (EBC) w objętości 1,5 – 3,0 ml pozyskano od 60 badanych pacjentów (35 z grupy astmatyków i 25 z grupy kontrolnej). Materiał 2 chorych nie nadawał się do analizy z powodu domieszki śliny (precypitat przy ekstrakcji). Dalszej analizie poddano skład próbek EBC 58 dzieci (33 z grupy astmatyków i 25 z grupy kontrolnej) – wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Stężenia pojedynczych eikozanoidów w badanych próbkach EBC były poniżej granicy oznaczalności dla progu detekcji 0,1-0,3 pg/ml kondensatu, w zależności od jakości linii podstawowej spektrogramu lub niemożliwe do oceny z uwagi na niewłaściwy, rozmyty zarys spektrogramu, prawdopodobnie spowodowany interferencją jej biologicznych składników. Brakujące dane stanowiły 3% wszystkich oznaczeń, ich rozkład dla poszczególnych oznaczanych eikozanoidów przedstawiono w tab. 2.

Poziomy transLTC₄ zostały oznaczone u 41 z 58, a EXC₄, EXD₄ i EXE₄ u 42 z 58 dzieci ze względu na techniczne możliwości wykonania tych oznaczeń dopiero w późniejszym okresie badania.

4.2.2 Zależności stężeń eikozanoidów w EBC od wieku, płci, BMI z-score, Δ%FEV₁ w obu badanych grupach

Płeć, BMI z-score oraz Δ%FEV₁ nie wpływały znamienne na stężenie ocenianych parametrów EBC ($p > 0,05$).

Wykazano natomiast istotny statystycznie związek stężeń EXE₄ z wiekiem dziecka ($\beta = 0,41$; $p = 0,005$). Podobną zależność uzyskano dla wieku i FeNO ($\beta = 0,30$; $p = 0,03$).

4.2.3 Porównanie stężeń eikozanoidów w EBC u astmatyków i dzieci zdrowych

Przeprowadzone analizy statystyczne wyłoniły 9 metabolitów kwasu arachidonowego, których stężenia w EBC istotnie odróżniały astmatyków od grupy kontrolnej. Stężenia PGEM, PGD₂, PGF₂ α , 6keto-PGF₁ α , LTC₄, trans-LTC₄, 5HETE i 9 α 11 β -PGF₂ α były znamienne wyższe u astmatyków, a poziom 11dehydro-TXB₂ był niższy w tej grupie w stosunku do dzieci zdrowych (tab. 2). Stężenia eikozanoidów różnicujących dzieci chore na astmę od zdrowych rówieśników przedstawia rys. 3.

Stężenia PGD₂ i LTC₄ były też znamienne wyższe w EBC dzieci chorych na astmę sporadyczną w stosunku do grupy kontrolnej – tab. 3.

Tabela 2. Stężenia eikozanoidów w EBC (pg/ml)

PARAMETR	ASTMATYCY (n=33)		ZDROWI (n=25)		P*
	Mediana (1. - 3. kwartyl)	Zakres	Mediana (1. - 3. kwartyl)	Zakres	
PGE2	0,64 (0,23 - 1,02)	0,05-31,13	0,57 (0,37 - 0,75)	0,12-1,20	0,49
PGEM	42,85 (23,33 - 3,73)	2,51-128,1	21,87 (2,51 - 39,87)	1,50-60,3	0,001
PGD2	0,88 (0,48 - 1,62)	0,31-7,26	0,28 (0,22 - 0,55)	0,16-1,11	<0,001
PGF2 α	0,64 (0,30 - 1,32)	0,07-3,44	0,29 (0,17 - 0,46)	0,09-2,38	0,001
6ketoPGF1 α	15,53 (11,73 - 7,97)	5,19-22,78	10,68 (6,44 - 6,48)	2,15-20,74	0,03
11dehydroTXB2	5,55 (4,44 - 6,26)	2,46-7,16	6,30 (5,69 - 6,73)	3,79-7,12	0,02
LTB4	3,00 (1,52 - 4,12)	0,21-17,02	2,21 (1,30 - 3,33)	0,69-8,73	0,43
LTC4	3,10 (1,86 - 5,3)	0,65-36,24	1,73 (0,92 - 2,18)	0,50-3,49	<0,001
transLTC4	5,37 (3,13 - 10,40)	2,21-17,10	4,72 (1,92 - 6,63)	0,69-8,54	0,04
LTD4	0,97 (0,55 - 1,34)	0,44-3,0	0,85 (0,57 - 1,11)	0,35-4,36	0,37
LTE4	1,04 (0,76 - 1,96)	0,14-5,49	1,83 (1,00 - 3,05)	0,08-6,56	0,07
LXA4	0,18 (0,12 - 0,30)	0,04-4,74	0,17 (0,11 - 0,35)	0,05-0,99	0,89
5HETE	4,53 (2,46 - 6,91)	1,14- 5,08	2,66 (2,22 - 3,79)	0,44-7,71	0,02
12HETE	4,49 (3,10 - 12,09)	1,04-48,29	3,96 (2,93 - 13,14)	0,61-42,95	0,93
15HETE	4,24 (2,19 - 7,07)	0,67- 26,9	4,19 (3,16 - 5,17)	0,26-8,80	0,93
EXC4	0,38 (0,24 - 0,66)	0,13-1,46	0,45 (0,29 - 0,56)	0,11-2,49	0,61
EXD4	0,63 (0,49 - 0,97)	0,38-10,07	0,59 (0,38 - 1,03)	0,12-2,73	0,54
EXE4	1,57 (0,80 - 3,50)	0,29-26,87	0,83 (0,50 - 1,80)	0,16-3,01	0,06
8izoPGF2 α	0,37 (0,21 - 0,56)	0,12-1,13	0,30 (,22 - 0,40)	0,10-1,04	0,48
9 α ,11 β PGF2 α	0,54 (0,28 - 1,03)	0,09-2,83	0,29 (0,20 - 0,35)	0,09-2,39	0,001

Z powodu ograniczeń metody nie zostały oznaczone stężenia następujących eikozanoidów (n – liczba próbek EBC odpowiednio: astmatyków; dzieci zdrowych): PGE2 (n=1; 1), PGEM (n= 5; 6), PGD2 (n=1; 2), PGF2 α (n=1; 0), 6ketoPGF1 α (n=1; 0), 11dehydroTXB2 (n=2; 0), LXA4 (n=1; 1), LTB4 (n=4; 1), LTC4 (n=1; 0) transLTC4 (n=14; 3), LTD4 (n=1; 0), LTE4 (n=1; 1), 5HETE (n=3; 0), 12HETE (n=1; 0), 15HETE (n=1; 0), EXC4 i EXD4 i EXE4 (n=14; 2), 8izoPGF2 α (n=1; 0), 9 α 11 β PGF2 α (n=1; 0)

* test U Manna-Whitneya

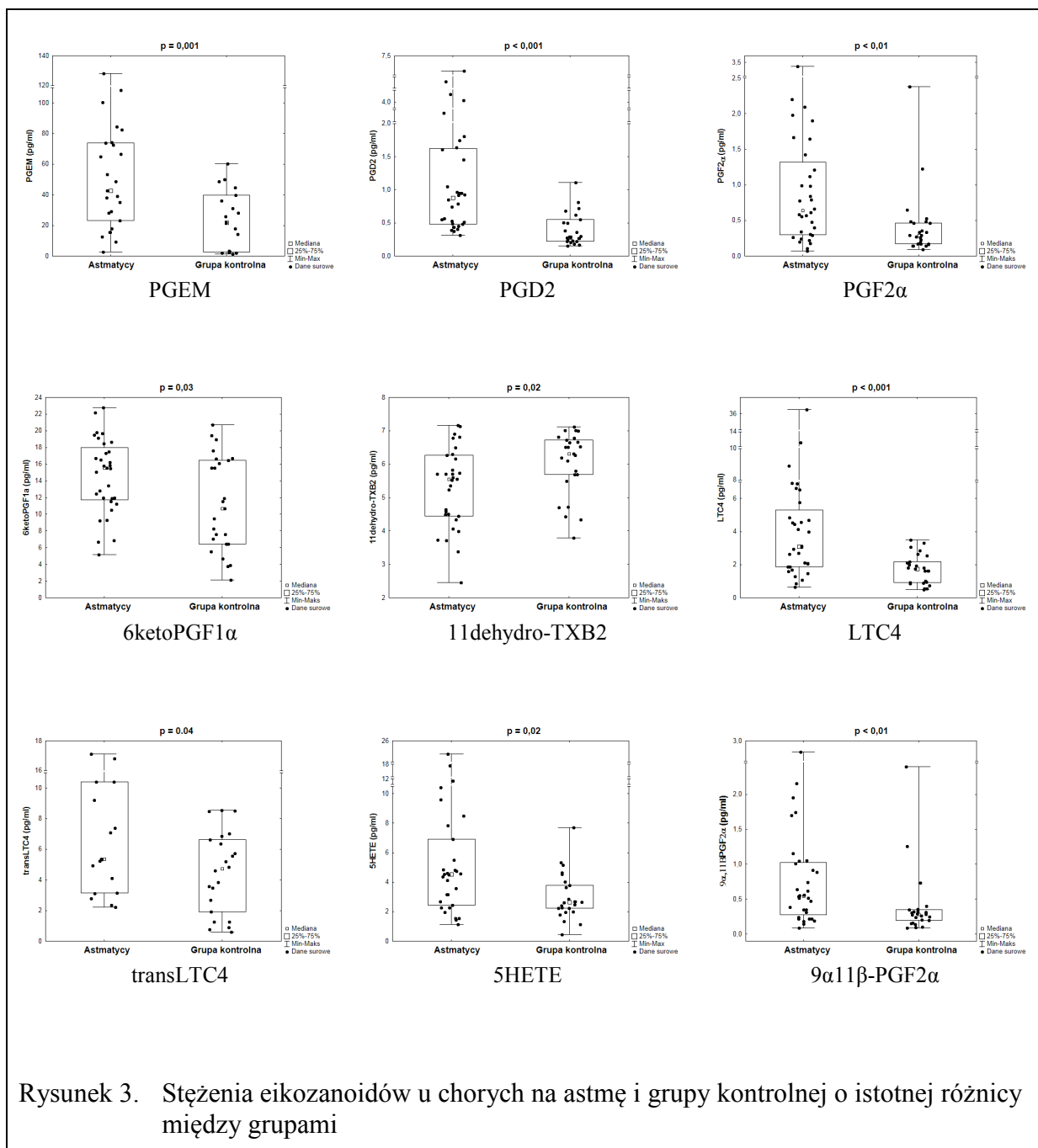


Tabela 3. Stężenia eikozanoidów u chorych na astmę epizodyczną i grupy kontrolnej o istotnej różnicy między grupami

Parametr	Astma epizodyczna Mediana (1. - 3. kwartyl)	Grupa kontrolna Mediana (1. - 3. kwartyl)	p*
PGD2	0,85 (0,53-2,75)	0,28 (0,22-0,55)	0,003
LTC4	3,90 (2,65-5,75)	1,73 (0,92-2,18)	0,003

* test U Manna-Whitneya

4.2.4 Stężenia eikozanoidów w EBC astmatyków w zależności od parametrów klinicznych

Zależności od stopnia ciężkości astmy i kontroli choroby

Nie wykazano istotnych zależności oznaczonych stężeń żadnego z eikozanoidów od stopnia ciężkości astmy ($p > 0,05$). Porównania dotyczące grup: astma epizodyczna vs przewlekła, jak również między grupami chorych z astmą epizodyczną i przewlekłą lekką a tymi z przewlekłą umiarkowaną i ciężką postacią choroby, nie wykazały różnic na przyjętym poziomie istotności (testy Manna –Whitneya i Kruskala-Wallis). Analiza kowariancji także nie dowiodła znamiennej zależności stężeń eikozanoidów od poziomu FeNO, odsetka wartości należnej FEV1 (FEV1%N) oraz wyników próby wysiłkowej ($\Delta\%FEV1$).

Porównanie stężeń poszczególnych eikozanoidów pomiędzy grupą dzieci prezentujących astmę kontrolowaną (ACT ≥ 20) a chorymi z niekontrolowaną postacią choroby również nie wykazało znamiennych różnic ($p > 0,05$). Mediana ACT w grupie dzieci z astmą kontrolowaną wynosiła 23, a z niekontrolowaną 17 punktów.

Zależności od stopnia zaawansowania leczenia

Stężenia eikozanoidów w EBC astmatyków leczonych wGKS były porównywalne z wynikami oznaczeń w grupie dzieci chorych na astmę, u których nie stosowano takiego leczenia. Ponadto, nie wykazano różnic w zależności od stosowanej dawki, przyjmując jako kryterium dawki wysokiej $>400 \mu\text{g}/\text{dobę}$ w przeliczeniu na budesonid ($p > 0,05$).

Podobne wyniki przyniosła analiza porównawcza terapii łączonej z montelukastem i/lub LABA ($p > 0,05$).

Zależności od nadwrażliwości na roztocza kurzu domowego oraz towarzyszącego alergicznego nieżytu nosa

Dzieci z potwierdzoną za pomocą wykonanych SPT nadwrażliwością na roztocza kurzu domowego miały porównywalne stężenia oznaczanych eikozanoidów z grupą astmatyków nie wykazujących takiego uczulenia ($p > 0,05$). Uczuleni na roztocza nie chorowali też częściej na alergiczny nieżyt nosa w porównaniu do uczulonych na inne alergeny ($p = 0,80$).

Zależność od nadreaktywności oskrzeli

Stężenia pochodnych AA nie różniły się istotnie między grupą dzieci z dodatnim wynikiem testu wysiłkowego (zastosowany punkt odcięcia dla $\Delta\%FEV1 \geq 10\%$) a uczestnikami badania bez nadreaktywności oskrzeli po wysiłku ($p > 0,05$).

Również analiza stężenia AA ograniczona tylko do grupy badanej (astmatycy) nie wykazała różnic w zależności od wyniku testu wysiłkowego ($p > 0,05$).

Korelacje z eozynofilią, stężeniem IgE całkowitego w krwi obwodowej

Dla oceny współzależności ocenianych parametrów AA w EBC z całkowitą eozynofilią krwi obwodowej i stężeniem IgE całkowitego przeprowadzono analizę korelacji rangowej Spermmana. Wykazano korelację eozynofilii bezwzględnej ze stężeniem: PGD2 ($r=0,64$; $p < 0,01$), $9\alpha,11\beta$ -PGF2 α ($r=0,48$; $p < 0,01$), PGF2 α ($r=0,43$; $p=0,01$) i 5HETE ($r=0,41$; $p=0,02$).

Nie wykazano istotnego związku pomiędzy stężeniem IgE całkowitego a oznaczanymi eikozanoidami w EBC ($r < 0,2$).

4.2.5 Ocena przydatności stężeń eikozanoidów w diagnostyce astmy

Uogólniony model liniowy oparty o eikozanoidy EBC w diagnostyce astmy

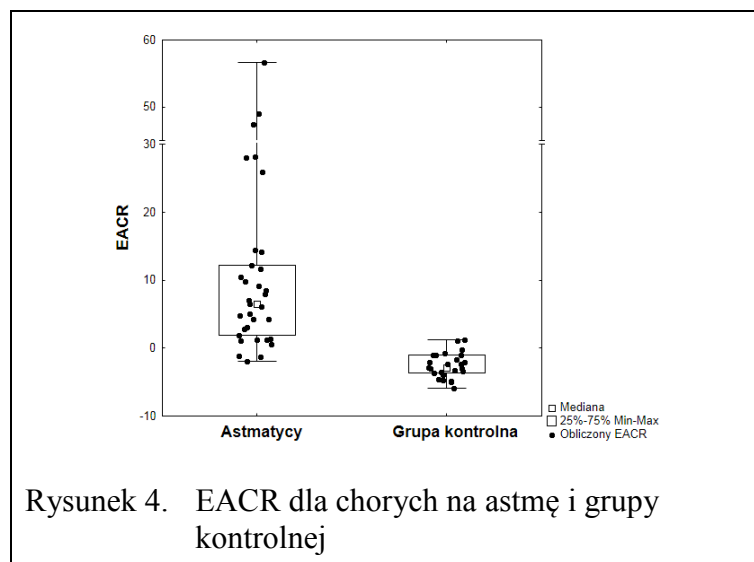
Uwzględniając parametry EBC istotnie statystycznie różniące chorujących na astmę od zdrowej grupy kontrolnej podjęto próbę budowy uogólnionego modelu liniowego dla diagnostyki astmy.

Regresja logistyczna z estymacją parametrów modelu liniowego pozwoliła na wyłonienie czterech składowych kondensatu: PGEM, PGD2, LTC4, 5HETE, które stanowiły predyktory dla optymalnego modelu statystycznego.

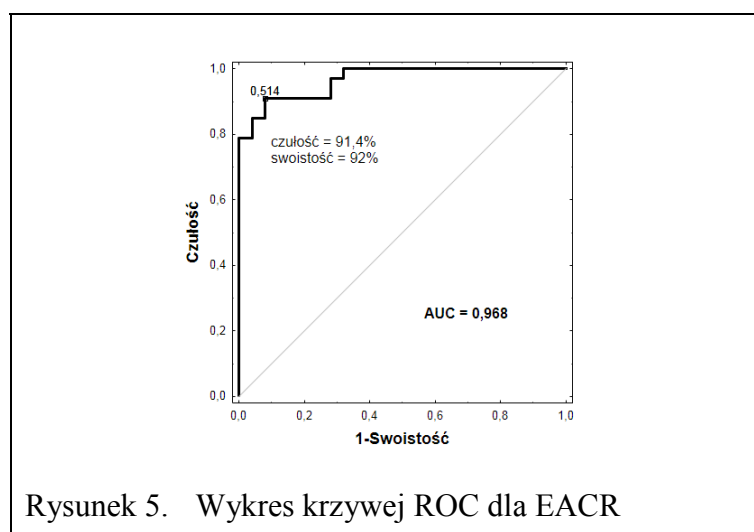
Równanie regresji opisujące wskaźnik predykcji astmy w oparciu o wyróżnione eikozanoidy (*Eicosanoids Asthma Classification Ratio / EACR*) przyjęło następującą postać:

$$EACR = -11.0458 + 0,0795 * PGEM1 + 7,0746 * PGD2 + 0,7991 * LTC4 + 0,8051 * 5HETE$$

Wartości EACR dla chorych na astmę i grupy kontrolnej przedstawia rys. 4.



Dla oceny wartości dyskryminacyjnej EACR posłużono się analizą krzywej ROC. Pole powierzchni pod krzywą (AUC) wyniosło 0,968. Dla proponowanego punktu odcięcia 0,514 (wg wskaźnika Youdena) czułość testu wynosiła 91,4%, swoistość - 92%, wartość predykcji dodatniej (PPV) - 94,1%, a predykcji ujemnej (NPV) - 88,5% (rys. 5) .



Spośród 58 dzieci uczestniczących w pierwszym etapie badania, których próbki EBC poddano analizie, na podstawie przyjętego punktu odcięcia prawidłowo zakwalifikowano 53 z nich (tab. 4).

Tabela 4. Kwalifikacja przynależności do grupy dzieci zdrowych lub astmatyków na podstawie EACR		
	Prawidłowo zakwalifikowani	Błędnie zakwalifikowani
ZDROWI <i>n</i> =25	23	2
ASTMATYCY <i>n</i> =33	30	3

Porównanie wartości dyskryminacyjnej EACR i jego składowych

Analiza porównawcza przydatności EACR dla rozpoznawania astmy u dzieci, w stosunku do wartości diagnostycznej pojedynczych jego predyktorów, wykazuje istotną statystycznie przewagę tego wskaźnika (AUC dla EACR największe). Wykresy krzywych ROC i wyniki porównania AUC dla EACR i jego składowych przedstawiają rys. 6. i tab. 5.

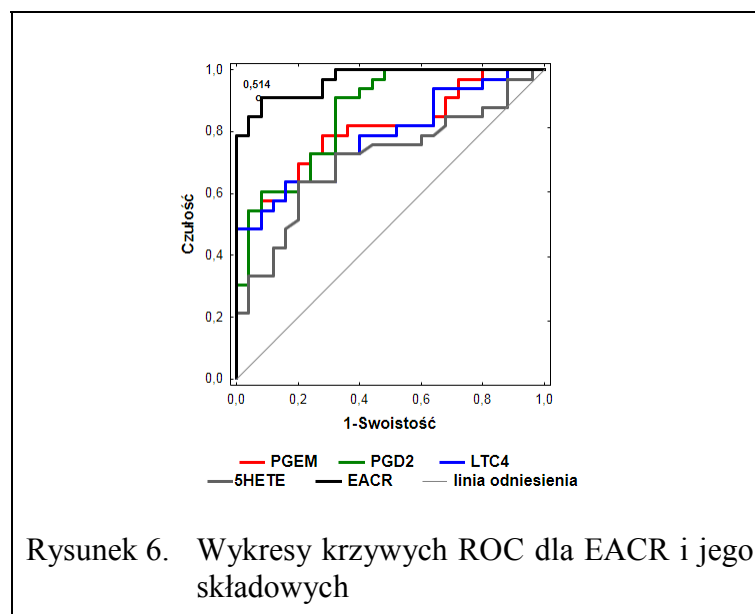


Tabela 5. Porównanie AUC dla EACR i jego składowych

PARAMETR	AUC	Różnica AUC (w porównaniu do EACR)	p (dla testu różnicy AUC)
EACR	0,9680		
PGEM	0,8103	0,1577	0,002
PGD2	0,8663	0,1017	0,018
LTC4	0,7966	0,1714	0,001
5HETE	0,7257	0,2423	<0,001

Analizy wskazują, że uwzględnienie w teście diagnostycznym dla astmy oznaczeń kilku istotnych mediatorów alergicznego stanu zapalnego w EBC (ich zestawu) korzystnie wpływa na jego wartość dyskryminacyjną.

Porównanie przydatności EACR z innymi testami diagnostycznymi w astmie

Dalsze analizy wskazują na istotnie wyższą użyteczność opracowanego wskaźnika - EACR, w stosunku do oceny nadreaktywności oskrzeli w teście wysiłkowym ($\Delta\%FEV1$)

i oznaczania poziomu FeNO, jako pomocniczych narzędzi dla rozpoznawania astmy (rys. 7, tab. 6)

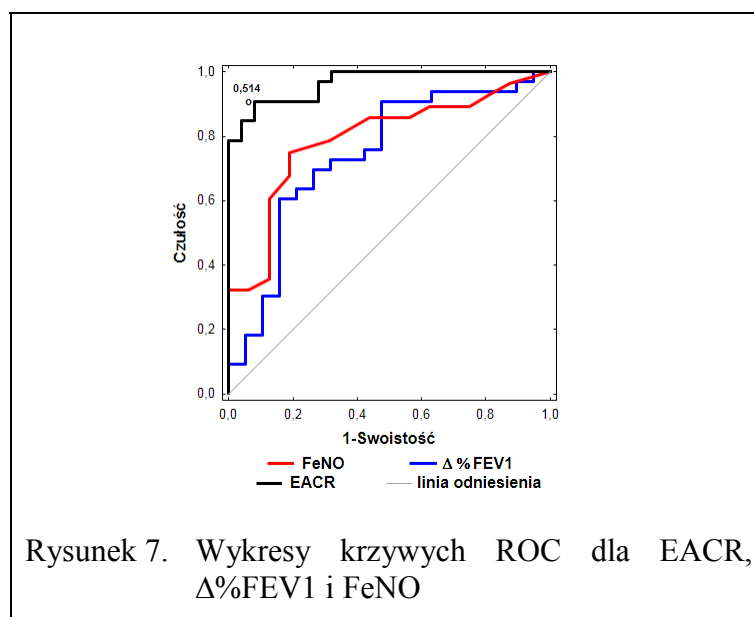


Tabela 6. Porównanie AUC dla EACR, Δ%FEV1, FeNO

Parametr	AUC	Różnica AUC (w porównaniu do EACR)	p (dla testu różnicy AUC)
EACR	0,9680		
Δ%FEV1	0,7566	0,2114	0,002
FeNO	0,8366	0,1314	0,033

4.3 Drugi etap badania

4.3.1 Charakterystyka kliniczna grupy badanej

W drugim etapie badania uczestniczyło 27 dzieci chorych na astmę. U każdego z nich podczas kolejnych wizyt A, B i C uzyskiwano kolekcję próbek EBC.

Większość pacjentów (22/27; 82%) uczestniczących w drugim etapie badania prezentowała stabilny przebieg astmy w ocenie ACT i spirometrycznej. Ponadto leczenie u nich nie podlegało zmianie w okresie badawczym (u 4 dzieci z astmą sporadyczną nie stosowano żadnych leków). Dwoje dzieci z astmą niekontrolowaną wymagało w trakcie zaostrzenia odpowiednio 3 i 7 dniowej systemowej kortykosteroidoterapii. Charakterystykę kliniczną uczestników drugiego etapu badania przedstawia tab. 7.

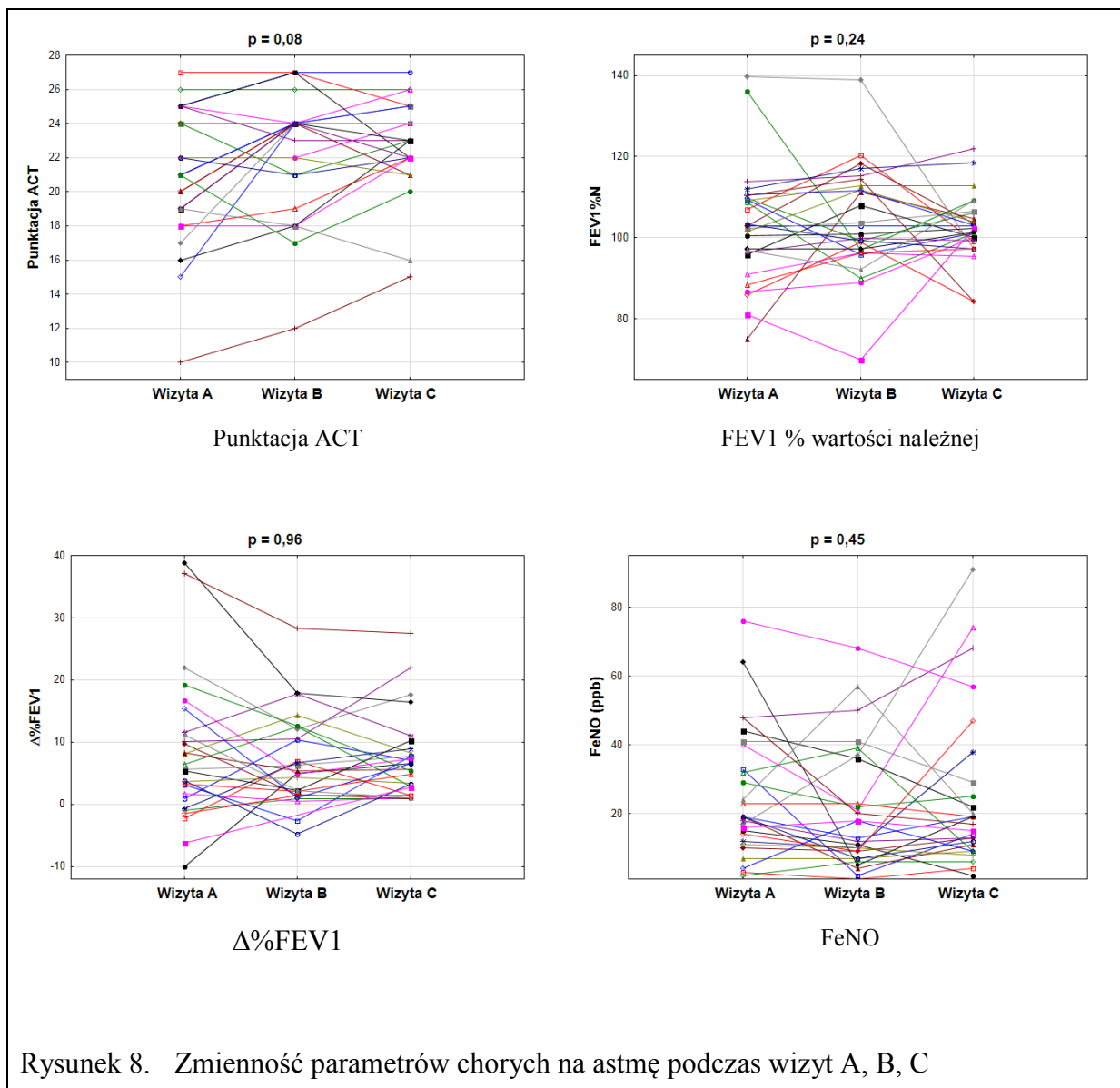
Tabela 7. Charakterystyka przebiegu astmy (wizyty A, B, C)		
a) uwzględnienie stopnia kontroli astmy (punktacja ACT)		
		Liczba badanych (%)
bez zmiany punktacji ACT	astma kontrolowana (ACT \geq 20 w trakcie wizyt A, B i C)	20 (74%)
	astma niekontrolowana (ACT $<$ 20 w trakcie wizyt A, B i C)	2 (7%)
z poprawą punktacji ACT	wizyta A: ACT $<$ 20 i wizyta C: ACT \geq 20	5 (18%)
Razem		27 (100%)
b) uwzględnienie farmakoterapii		
Niezmienna terapia	bez leczenia prewencyjnego (astma epizodyczna)	4 (15%)
	wyłącznie LTRA	1 (4%)
	wGKS \leq 400 μ g BUD	11 (41%)
	wGKS $>$ 400 μ g BUD	6 (22%)
Obniżenie dawki wGKS	wizyta A: $>$ 400 μ g BUD i wizyta C: \leq 400 μ g BUD	3 (11%)
Włączenie systemowych GKS	1mg/kg/dobę w przeliczeniu na prednizon	2 (7%)
Razem		27 (100%)

Porównanie wybranych parametrów w trakcie wizyt A, B i C

Przeprowadzona analiza wariancji powtarzanych pomiarów dla rang Friedmana, dla wartości punktowej ACT, odsetka normy FEV₁, wartości Δ %FEV₁ oraz poziomu FeNO podczas trzech kolejnych wizyt, wykazała brak istotnych zmian ocenianych parametrów (tab. 8, rys. 8.)

Tabela 8. Parametry chorych na astmę podczas wizyt A, B, C				
Parametr	Wizyty			p*
	A Mediana (1.- 3. kwartyl)	B Mediana (1. - 3. kwartyl)	C Mediana (1. - 3. kwartyl)	
ACT	21 (19 – 24)	24 (21- 24)	23 (22 – 24)	0,08
FEV ₁ (% N)	102,8 (95,8 - 109,7)	100,9 (96,3 - 12,9)	102,5 (99,0 - 106,1)	0,24
Δ %FEV ₁ (%)	6,05 (0,93 - 11,6)	5,24 (1,57 - 12,09)	5,12 (1,45 - 7,80)	0,96
FeNO (ppb)	21 (14,5 - 40,5)	12,5 (7 – 23)	19 (12 – 29)	0,45

* ANOVA Friedmana



Rysunek 8. Zmienność parametrów chorych na astmę podczas wizyt A, B, C

Korelacje wybranych parametrów podczas wszystkich trzech wizyt jako współczynniki korelacji wewnątrzgrupowej ICC (*Intraclass Correlation Coefficient*) zostały przedstawione w tab. 8. Wysokie wartości ICC wskazują na wysoką zgodność/powtarzalność trzykrotnych pomiarów ocenianych parametrów.

Tabela 9. Korelacja pomiarów uzyskanych podczas wizyt A, B, C	
PARAMETR	ICC (95% PU)
ACT (punkty)	0,82 (0,65 – 0,92)
FEV 1 (l)	0,98 (0,97 – 0,99)
$\Delta\%$ FEV1 (%)	0,60 (0,20 – 0,82)
FeNO (ppb)	0,53 (0,03 – 0,80)
95% PU- 95% przedział ufności	

4.3.2 Stężenia eikozanoidów w EBC u uczestników drugiego etapu badania

Wyniki oznaczeń stężeń eikozanoidów w próbkach EBC chorujących na astmę, kolekcjonowanych podczas trzech kolejnych wizyt przedstawiono w tab. 10.

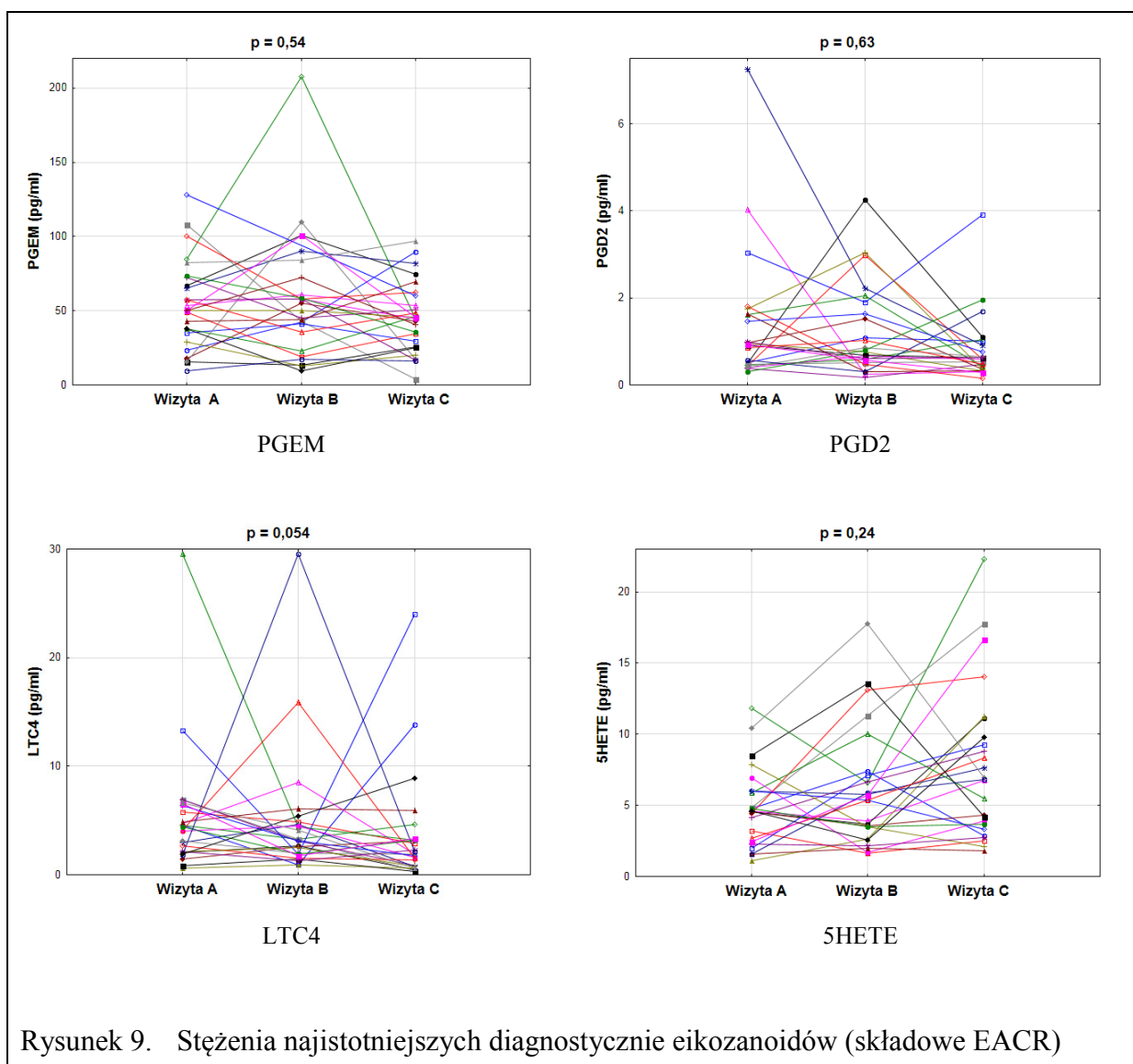
Porównanie stężeń eikozanoidów w próbkach EBC kolekcjonowanych podczas wizyt (A,B,C)

Porównanie eikozanoidów w EBC wskazuje na brak istotnej statystycznie różnicy stężeń większości z nich podczas kolejnych trzech wizyt ($p > 0,05$). Wyłonione drogą regresji logistycznej najistotniejsze diagnostycznie PGEM, PGD2, LTC4 i 5HETE (składowe EACR) wykazują stabilne stężenia w kolejnych trzech punktach czasowych (rys. 9, tab. 10). Istotne statystycznie różnice stężeń pomiędzy wizytami stwierdzono dla: 6ketoPGF1 α , LTB4 i 12HETE.

Ocenę korelacji wartości stężeń eikozanoidów wchodzących w skład EACR, uzyskanych podczas kolejnych wizyt, wyrażoną jako ICC, przedstawiono w tab. 11. Oznaczone w kolejnych wizytach stężenia PGEM i PGD2 w EBC wykazywały dobry (podobny do wartości FeNO) ($ICC > 0,5$), a 5HETE mierny stopień powtarzalności ($ICC > 0,25$). Stężenia LTC4 w EBC nie korelowały istotnie ze sobą podczas kolejnych wizyt.

Tabela 10. Stężenia eikozanoidów w EBC podczas wizyt A, B, C (pg/ml)				
Parametr	Wizyty			p*
	A Mediana (1. - 3. kwartyl)	B Mediana (1. - 3. kwartyl)	C Mediana (1. - 3. kwartyl)	
PGE2	0,57 (0,18 – 1,05)	0,71 (0,44 – 2,37)	0,52 (0,31 – 4,05)	0,47
PGEM	50,2 (35,2 – 73,7)	52,60 (35,72 – 84,14)	45,09 (25,63 – 60,16)	0,54
PGD2	0,93 (0,47; 1,75)	0,82 (0,57 - 2,05)	0,61 (0,36 - 1,05)	0,63
PGF2α	0,72 (0,40 – 1,42)	0,75 (0,35 – 1,95)	0,83 (0,18 – 1,65)	0,47
6ketoPGF1α	15,84 (11,95 – 18,67)	14,64 (12,30 – 19,27)	11,69 (9,34 – 15,07)	0,02
11dehydroTXB2	5,55 (4,5 – 6,26)	5,29 (4,17 – 7,37)	5,01 (4,03 – 6,44)	0,55
LTB4	2,99 (1,23 – 4,37)	3,63 (1,86 – 8,02)	4,7 (3,27 – 7,65)	0,013
LTC4	4,43 (2,09 – 6,53)	3,11 (1,89 – 4,83)	1,80 (0,74 – 3,17)	0,054
transLTC4	5,36 (3,13 – 11,18)	4,41 (2,46 – 8,24)	2,62 (1, 55 – 4,91)	0,14
LTD4	0,89 (0,55 – 1,37)	1,17 (0,67 – 1,80)	1,04 (0,80 – 1,42)	0,21
LTE4	1,24 (0,80 – 2,00)	1,33 (0,94 – 2,38)	1,58 (1,01 – 4,00)	0,055
LXA4	0,16 (0,12 – 0,29)	0,28 (0,16 – 0,73)	0,40 (0,21 – 0,60)	0,12
5HETE	4,59 (2,69 - 6,03)	5,55 (3,49 – 7,41)	6,87 (2,34 – 9,81)	0,24
12HETE	4,49 (3,24 – 11,41)	7,72 (2,78 – 13,42)	3,38 (2,32 – 5,17)	0,03
15HETE	4,24 (2,25 – 7,37)	3,58 (1,70 – 8,70)	3,49 (2,11 – 5,14)	0,84
EXC4	0,28 (0,23 – 0,66)	0,25 (0,11 – 0,44)	0,38 (0,27 – 0,81)	0,20
EXD4	0,60 (0,49 – 0,78)	0,91 (0,58 – 1,77)	1,17 (0,95 – 1,90)	0,23
EXE4	1,64 (0,82 – 2,83)	0,99 (0,51 – 2,31)	1,39 (0,83 – 2,27)	0,58
8izoPGF2α	0,37 (0,22 – 0,59)	0,40 (0,25 – 0,75)	0,36 (0,25 – 0,55)	0,75
9α,11βPGF2α	0,56 (0,35 – 1,05)	0,62 (0,34 – 2,08)	0,34 (0,16 – 0,88)	0,18

* ANOVA Friedmana



Rysunek 9. Stężenia najistotniejszych diagnostycznie eikozanoidów (składowe EACR)

Tabela 11. Korelacja wartości stężeń eikozanoidów wchodzących w skład EACR podczas wizyt A, B, C

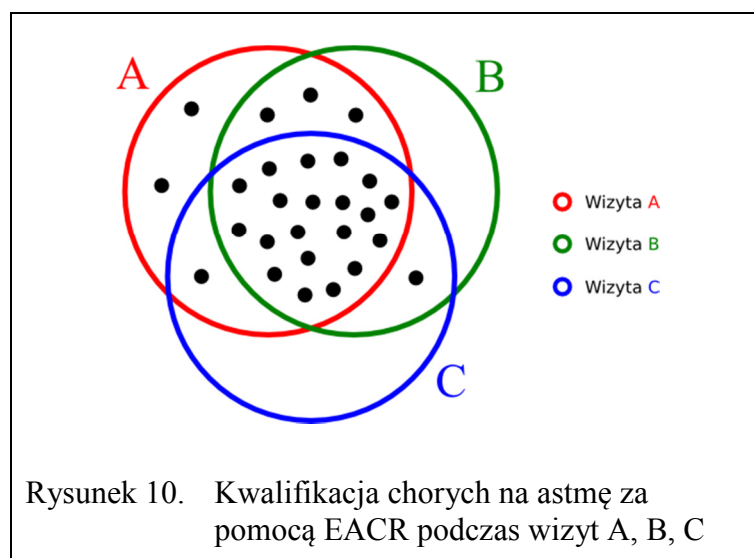
Parametr	ICC (95% PU)
PGE M (pg/ml)	0,51 (0,06 – 0,76)
PGD2 (pg/ml)	0,63 (0,27 – 0,68)
LTC4 (pg/ml)	0,00 (-0,91 – 0,51)
5HETE (pg/ml)	0,26 (-0,40 – 0,64)
95% PU - 95% przedział ufności	

Ocena trafności rozpoznania astmy na podstawie EACR podczas kolejnych wizyt

Celem dalszej weryfikacji przydatności oznaczeń wyróżnionych eikozanoidów (najlepszy podzbiór wg AIC) opisujących EACR, przeprowadzono ocenę trafności rozpoznania choroby przy zastosowaniu tego wskaźnika, na podstawie stężeń eikozanoidów w próbkach EBC uzyskanych podczas wizyt B i C. W kolejnych wizytach uczestniczyło tylko jedno dziecko nieprawidłowo zaklasyfikowane za pomocą EACR w wizycie A. Tabela 12. przedstawia zestawienie kwalifikacji astmatyków uczestniczących w trzech wizytach.

Tabela 12. Trafność kwalifikacji astmatyków (n=27) za pomocą EACR podczas wizyt A, B, C		
Wizyta	Kwalifikacja	
	Prawidłowa	Błędna
A	26	1
B	24	3
C	22	5

Przeprowadzona trzykrotnie kwalifikacja chorych na podstawie wartości EACR u dzieci w trakcie następujących wizyt, wykazała potwierdzenie rozpoznania u 20 z nich podczas każdego z trzech badań, u 25 - w co najmniej 2 badaniach. Dwóch astmatyków zostało prawidłowo zakwalifikowanych do grupy chorych tylko na podstawie jednego z trzech badań. Żadne z chorych dzieci nie zostało błędnie zakwalifikowane do grupy zdrowej w trakcie wszystkich 3 wizyt (rys. 10).



Celem oszacowania zgodności kwalifikacji astmatyków podczas kolejnych 3 wizyt posłużono się współczynnikami *kappa Cohena* i *kappa Fleissa* (tab. 13).

Tabela 13. Zgodność kwalifikacji astmatyków (n=27) za pomocą EACR podczas wizyt A, B, C			
Wizyta	Prawidłowo zaklasyfikowani	<i>Kappa Cohena</i>	<i>Kappa Fleissa</i>
A i B	23	0,85	
A i C	21	0,77	
B i C	21	0,85	
A i B i C	20		0,82

Uzyskane wartości współczynników *kappa Cohena* i *kappa Fleissa* wskazują na wysoki stopień zgodności kwalifikacji pacjentów, przeprowadzonej w oparciu o EACR obliczony podczas kolejnych wizyt.

5 Dyskusja

Przeprowadzone badanie, według dostępnych informacji, jako pierwsze poddaje analizie szereg metabolitów AA w EBC z następową próbą identyfikacji tych z nich, których profil najlepiej różnicuje dzieci chore na astmę od ich zdrowych rówieśników. Koncepcja analizy składu EBC w astmie zasługuje na szczególną uwagę ze względu na kompletną nieinwazyjność i prostotę procedury jego uzyskiwania, a co się z tym wiąże, możliwość zastosowania u dzieci. Próba osiągnięcia założonego celu, znalezienia pomocnego narzędzia diagnostycznego w astmie dziecięcej, była możliwa z dwóch powodów. Po pierwsze, eikozanoidy i ich metabolity były mierzone z bardzo wysoką dokładnością i czułością. Po drugie, zaawansowane metody statystyczne pozwoliły na określenie zestawu najistotniejszych eikozanoidów dla charakterystyki astmy. Dotychczasowe badania koncentrowały się na oznaczaniu jednego lub kilku związków w EBC, które jednak analizowano oddzielnie, bez jakiegokolwiek próby łączenia pomiarów kilku z nich. Obecnie głównym wyzwaniem w leczeniu astmy jest dokładne określenie podtypów różniących się patogenezą i odpowiedzią na stosowane leczenie. Dotychczas stosowane metody oceny stanu zapalnego dróg oddechowych nie wyłoniły sposobu jednoznacznego określenia przebiegu choroby, fenotypów klinicznych ani spodziewanej odpowiedzi na leczenie.

5.1 Ocena wiarygodności uzyskanych wyników

5.1.1 Grupa badana

W badaniu uczestniczyła grupa dzieci z astmą atopową i kontrolna grupa dzieci zdrowych bez cech atopii. Obie kohorty nie różniły się pod względem wieku, płci, wartości BMI z-score. Parametry różnicujące te dwie badane grupy (eozynofilia bezwzględna, stężenia IgE całkowitego w surowicy, FeNO, nadreaktywność oskrzeli w teście wysiłkowym) potwierdzają odpowiednią reprezentatywność grup astmatyków i dzieci zdrowych. Wśród chorych na astmę większość (79%) była leczona wGKS. Określenie profilu eikozanoidów EBC wyróżniających astmatyków, niezależnie od stosowanej terapii wGKS może mieć istotne znaczenie. Stwarza bowiem możliwość przeprowadzania diagnostyki różnicowej bez konieczności odstawiania już wcześniej włączonego leczenia.

5.1.2 EBC

Kolekcjonowanie i przechowywanie EBC

Kolekcję próbek kondensatu prowadzono przy użyciu komercyjnego zastawu Eco Screen I (Jaeger GmbH, Hoechberg, Germany) wyposażonego w pułapkę śliny, umieszczoną pomiędzy ustnikiem a właściwym kondensatorem zgodnie ze standardami ATS/ERS [132]. Zastosowanie klipsa nosowego ograniczało przepływ powietrza przez nos. Wstępne płukanie jamy ustnej, regularne przetykanie śliny w trakcie badania oraz czasowe jego przerywanie w przypadku odruchu kaszlowego, stanowiły kolejne zabezpieczenie przed zanieczyszczeniem próbek materiałem z jamy nosowej i ustnej. Skuteczność tych procedur potwierdzają badania, w których wykluczono obecność domieszki śliny przez brak detekcji amylazy w kolekcjonowanych próbkach EBC [145;189;203]. Ponadto takie zanieczyszczenie było dodatkowo weryfikowane w toku przygotowania próbek do oznaczeń eikozanoidów. Dwie z nich zostały wykluczone z analizy ze względu na precypitację przy ekstrakcji fazy organicznej spowodowaną kontaminacją śliną. Ma to istotne znaczenie z uwagi na zdolność produkcji leukotrienów przez komórki nabłonka jamy ustnej i neutrofile śliny [150]. Natychmiastowe zamrażanie uzyskanych próbek w temp – 70°C i przechowywanie ich w tych warunkach (1-2 miesiące) do momentu oznaczenia eikozanoidów gwarantowało wiarygodność oznaczeń niestabilnych biomolekuł eikozanoidów [155].

Metody oznaczeń eikozanoidów w EBC

Większość dotychczasowych badań składu EBC opierała się na wykorzystaniu metod immunoenzymatycznych i radioimmunologicznych, które nie pozwalały na uzyskanie zadowalającej czułości i dokładności pomiarów [215]. Może to również wyjaśniać różnice w bezwzględnych wartościach wydychanych eikozanoidów pomiędzy różnymi badaniami. Zastosowanie w niniejszym badaniu technik łączonych: GC-NICI-MS oraz HPLC-MS² pozwoliło na identyfikację i oznaczenie ilościowe 20 metabolitów AA. Dokładność pomiarów została potwierdzona i charakteryzuje je błąd: mniej niż 11% wewnątrz testowy i poniżej 15% między testowy. Z kolei dolne progi detekcji były co najmniej dwukrotnie niższe od najniższych oznaczonych stężeń badanych parametrów EBC. Jednak mimo tak wysokiej czułości zastosowanych metod nie udało się ustalić stężeń kilku eikozanoidów w EBC (około 3% oznaczeń).

Zastosowane metody analityczne pozwalały na kompensację błędów pomiarowych. W tym celu przed ekstrakcją analizowanych związków, do EBC dodawana była mieszanka chemicznie identycznych, oznaczonych deuterem eikozanoidów. Stężenie analizowanego

związku wyliczano w odniesieniu do znanej ilości deuterowanego wzorca wewnętrznego. Dla związków o niedostępnych identycznych, znakowanych deuterem odpowiednikach, wybierano te najbliższe strukturalnie [145]. W przypadku kilku próbek zarówno mierzony eikozanoid jak i dodany standard wewnętrzny były poniżej poziomu wykrywalności spektrometrii masowej. Sugeruje to raczej nieprawidłowości dotyczące ekstrakcji danej substancji z EBC niż jej bardzo niskie stężenie. Z tej przyczyny w analizie statystycznej dotyczącej budowy matematycznego modelu profilu eikozanoidów EBC w astmie dziecięcej (tylko dla zapewnienia wymagań tej metody statystycznej) brakujące dane zastąpiono medianami określonymi na podstawie uzyskanych oznaczeń w grupach o odpowiadającym stopniu ciężkości choroby. W analizach dotyczących porównania stężeń metabolitów AA między grupami brakujące dane zostały pominięte.

Ograniczenia badania

Ograniczeniem przeprowadzonego badania jest brak ustalonego współczynnika rozcieńczenia EBC. Może to być przyczyną dużej międzyosobniczej i wewnątrzosobniczej zmienności oznaczeń. Podjęta próba standaryzacji ocenianych parametrów w prezentowanym badaniu, poprzez obliczenie całkowitej ilości eikozanoidów wydychanych podczas 20-minutowej kolekcji EBC przyniosła podobne wyniki. Ma to zapewne uzasadnienie w porównywalnych objętościach uzyskanych próbek EBC (mediana 3,0 ml, 1. i 3. kwartył odpowiednio: 2,0 i 3,0 ml). Pomimo tych samych ograniczeń, Caballero i wsp. [202] oraz Samitas i wsp. [192] wykazali podwyższony poziom LTB₄, cysLTs i 8-izoprostanu w EBC astmatyków w porównaniu z grupą osób zdrowych. Cel ten został osiągnięty przy zastosowaniu mniej czułych metod pomiarów. Wyniki te mogą sugerować, że taka ocena może dostarczyć użytecznych informacji, jeśli stężenia rozcieńczonych substancji różnią się znacząco między zdrowiem a chorobą. Jednak zmienny stopień rozcieńczenia cząstek ALF w skondensowanej parze wodnej (od 5000 do 25000 razy) prezentowany w różnych badaniach wskazuje na konieczność uwzględniania współczynnika rozcieńczenia dla normalizacji wyznaczanych parametrów w EBC oraz precyzyjnego wnioskowania [134]. Pewne próby standaryzacji EBC były dokonywane z uwzględnieniem stałej objętości, czasu kolekcji kondensatu lub oceny względem stężeń jonów, mocznika czy białka w próbce EBC [132]. Chociaż ostatnio posiłkowanie się w tym celu stężeniem elektrolitów jest kwestionowane [137]. Z kolei Hüttmann i wsp. zasugerowali niedawno kolekcję EBC przy użyciu standaryzowanej objętości oddechowej [140]. Podobne zalecenia wypływają z badania Schwarz i wsp. Potwierdzili oni, że objętość oddechowa jest najważniejszym czynnikiem

warunkującym zakres emisji cząsteczek wydychanego aerosolu. Ich wielkość nie wykazywała istotnej zmienności między osobniczej (mediana 0,3 μm). Wskazuje to, że zawartość ALF w EBC jest ściśle powiązana z wydychaną liczbą jego cząstek a przez to obserwowanym stężeniem substancji w kondensacie. Jednak w wielu chorobach płuc mamy do czynienia ze zróżnicowanym zamykaniem się obwodowych dróg oddechowych co może powodować zmianę liczby i rozkładu wielkości wydychanych cząsteczek. Z tego względu autorzy sugerują, że monitorowanie *on-line* parametrów aerosolu umożliwi standaryzację pomiaru nietlotnych substancji w EBC. Będzie to więc metoda normalizacji z zastosowaniem wskaźnika emisji erozolu [55].

W ostatnim okresie podejmowane są również nieco inne próby. Wykorzystuje się w nich oznaczenia wolnego kwasu palmitynowego jako markera rozcieńczenia. Wstępne, niepotwierdzone wyniki badań wskazują na jego przydatność w analizach porównawczych badanych biomolekuł w EBC [144-146;193].

5.2 Stężenia eikozanoidów w EBC

Poziom 9 metabolitów kwasu arachidonowego w badanych próbkach EBC istotnie różnił się między astmatykami a zdrową grupą kontrolną. W grupie chorych na astmę stężenia PGEM, PGD2, 9 α 11 β -PGF2 α , PGF2 α , 6keto-PGF1 α , LTC4, transLTC4, 5HETE były z namiennie wyższe, a stężenie 11dehydro-TXB2 z namiennie niższe.

Dotychczasowe badania stężeń metabolitów AA w surowicy [179;216], moczu [191;193;217], płwocinie [182;218] czy w BAL-u [219] chorych na astmę wykazywały ich podwyższone stężenia, zwłaszcza w zakresie wartości cysLTs. Oznaczenie tych mediatorów zapalenia, z zastosowaniem czułych i dokładnych metod w EBC okazuje się szczególnie istotne z uwagi na możliwość oceny lokalnej produkcji tych chemicznie niestabilnych związków. Wysoka korelacja stężeń cysLTs w BAL-u z wynikami ich oznaczeń w EBC, wobec nieinwazyjności procedury kolekcji kondensatu przemawia za wykorzystaniem tej metody diagnostycznej [220].

Rola prostaglandyn w rozwoju i podtrzymywaniu alergicznego zapalenia w drogach oddechowych w astmie została jednoznacznie udowodniona. Badania *in vivo* i na zwierzętach wskazują, że PGD2 i TXB2 potęgują alergiczne zapalenie, podczas gdy PGE2 i PGI1 powstrzymują indukowaną alergenem reakcję zapalną [74].

5.2.1 Prostaglandyna D2 i F2 α

Stosunkowo mało jest doniesień na temat oznaczeń PGD2 w EBC. Jej rola w patofizjologii astmy została dobrze udowodniona. Jednak do oznaczenia jej stężenia w EBC

wymagane jest zastosowanie warunków umożliwiających natychmiastowe zamrożenie próbki kondensatu, z uwagi na bardzo szybki metabolizm PGD2 do 9 α 11 β -PGF2 α . Większość prac dotyczących PGD2 u pacjentów z astmą głównie poświęca się oznaczaniu tego aktywnego metabolitu w moczu [183], płwocinie [182], BAL-u [181]. Bochenek i wsp. uzyskali wzrost stężenia 9 α 11 β -PGF2 α w surowicy oraz w moczu u astmatyków po prowokacji alergenem [179]. Wcześniejsze badanie Montuschi i wsp. nie wykazało podwyższonych stężeń PGD2 w EBC, ale najprawdopodobniej wynikało to z niedoskonałości metod oznaczania [201]. Zastosowanie HPLC-MS² i GC-NICI-MS pozwoliło Sanakowi i wsp. wykazać wyższe poziomy 9 α 11 β -PGF2 α u astmatyków zarówno tolerujących jak i nietolerujących aspiryny [146]. W aktualnie prezentowanym badaniu PGD2 okazała się jednym z czterech metabolitów AA, najlepiej różnicujących astmatyków od dzieci zdrowych. Stwierdzono także podwyższony poziom jej metabolitu (9 α 11 β -PGF2 α) w EBC. Potwierdza to, wykazywany wcześniej udział PGD2 w procesie astmatycznym.

Również obserwowane w innych badaniach wyższe stężenia PGF2 α , prostaglandyny wykazującej podobnie jak PGD2 działanie bronchokonstrykcyjne, przemawia za ich udziałem w reakcjach alergicznych [221].

5.2.2 Prostaglandyna E2

Wcześniejsze badania przeprowadzone u dorosłych chorych na astmę nie leczonych wGKS nie wykazywały różnic w stężeniach PGE2 w EBC pomiędzy astmatykami a zdrowymi [186;191;201;201]. Niemniej jednak inne doniesienia wskazywały na wyższe stężenia PGE2 w kondensacie palących chorych na astmę w porównaniu do astmatyków niepalących i osób zdrowych. Natomiast, nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach PGE2 między astmatykami niepalącymi i zdrową grupą kontrolną [222]. W badaniu tym, podobnie jak w prezentowanym w niniejszej pracy, nie wykazano istotnej korelacji stężeń PGE2 w EBC z nadreaktywnością oskrzeli. Mastalerz i wsp. udokumentowali obniżenie stężeń głównych metabolitów PGE2 w moczu po prowokacji aspiryną u astmatyków dobrze ją tolerujących. Nie obserwowali jednak takiego efektu u chorych z astmą aspirynową. W obu grupach stężenia tych metabolitów obniżały się natomiast po podaniu selektywnego blokera COX2 (celecoxib). Potwierdza to brak zmian systemowej produkcji PGE2 u chorych z objawami astmy aspirynowej. Ta różna odpowiedź obu grup astmatyków wskazuje też, że PGE2 jest uwalniana w trakcie reakcji na aspirynę na drodze COX2 [223]. Sanak i wsp. opisują istotne różnice w podstawowych stężeniach PGE2 w EBC pomiędzy chorymi na astmę aspirynową a astmatykami z dobrą tolerancją aspiryny i grupą zdrową. Przy czym

stężenie metabolitu PGE2 (tetranorPGEM) u chorych z nadwrażliwością na aspirynę było istotnie wyższe od stwierdzanego u dobrze ją tolerujących, a to z kolei wyższe niż w grupie zdrowej. W badaniu tym podobne zależności dotyczyły też $9\alpha11\beta$ -PGF2 α . Ponadto wykazano u wszystkich astmatyków wyższe stężenia PGF2 α , 6ketoPGF1 α , 8-izo-PGF2 α , 11dehydro-TXB2 i produktów 5-, 12- i 15-LO [146]. Wykazywany profil eikozanoidów wskazuje więc na aktywację zarówno drogi cyklo- jak i lipooksygenaz w przebiegu astmatycznego zapalenia. Z uwagi na bronchoprotekcyjne i immunomodulujące działanie PGE2 można by się spodziewać jej obniżonego poziomu u chorych na astmę w stosunku do osób zdrowych. Obserwowane w obecnym badaniu istotnie wyższe stężenia tetranorPGEM (PGEM) w EBC dzieci z astmą pozostaje w zgodzie z przytoczonymi powyżej wynikami Sanaka i wsp.[146]. Dane te, sugerują zwiększony metabolizm PGE2. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być zwiększona ekspresja 15-DHPG w komórkach nabłonka drzewa oskrzelowego u chorych na astmę. Wynika to z indukującego ją wpływu IL13, jednego z głównych mediatorów alergicznego zapalenia. Interleukina ta ma również istotnie zmniejszać ekspresję COX-2 i syntazy1 PGE2, co z kolei może tłumaczyć wykazany brak różnic między stężeniami PGE2 w EBC chorych na astmę ze stwierdzanymi u dzieci zdrowych [224].

Ponadto, wydaje się, że na zawartość eikozanoidów w ALF wpływają również mechanizmy związane z transportem przez błonowy. Brak dotychczas modelu opisującego stosunek mediatorów dyfundujących do ALF w porównaniu do wchłanianych do krwioobiegu. Od dawna wiadomo, że niektóre prostaglandyny jak PGE2, PGF2 α , są szybko usuwane przez pojedyncze przejście przez łożysko naczyń płucnych (lub innego narządu). Klirens ten odbywa się bez żadnej wykrywanej we krwi aktywności enzymatycznej zdolnej do metabolizowania tych cząsteczek, co wskazuje na udział w nim komórek śródbłonka naczyń. Transport przez błonowy prostaglandyn E2, E1, F2 α , D2, i B2 tromboksanu B2 jest regulowany przez niedawno odkryte białko transportujące hPMT (*human prostaglandin transporter*). Ekspresja genu hPMT w śródbłonku naczyń może wskazywać na jego rolę w tkankowym kliresie prostaglandyn [225].

5.2.3 Tromboksan B2 i prostacyklina

W obecnej pracy zaskakującym były niższe stężenia TXB2, stabilnego produktu hydrolizy TXA2 i potencjalnego bronchokonstryktora, w grupie chorych na astmę w stosunku do dzieci zdrowych. Metabolit ten był dotychczas rzadko oceniany, a jego stężenia w EBC pozostawały często poniżej progu czułości metod [215]. Dotychczas opublikowane wyniki badań są niejednoznaczne. Wskazują jednak na porównywalne [185] lub wyższe stężenia

TXB2 w EBC astmatyków [187]. Próba wyjaśnienia tych rozbieżności mogą być wyniki badania Arakidy i wsp. Wykazali oni, że zastosowanie wspólnego antagonisty dla receptora tromboksanu (TP) i cysLTR1 w większym stopniu ogranicza powodowany alergenem wzrost oporu dróg oddechowych niż każdy z zastosowanych oddzielnie specyficznych antagonistów dla tych receptorów (seratrodast dla TP, pranlukast dla cysLTR1). Autorzy sugerują, że chorzy mogą wykazywać różne, zależne od dominacji tromboksanu lub leukotrienów fenotypy astmy [40]. W łączności z obecnymi wynikami, należy sądzić, że dalsze badania i próba oceny korelacji stężeń tych eikozanoidów w EBC u chorych na astmę mogą przynieść korzyści dla głębszego poznania patomechanizmów tej choroby.

Poziom 6ketoPGF1 α – metabolitu prostacykliny, znanej z supresyjnego działania na proces zapalenia alergicznego [74], był wyższy u uczestniczących w obecnym badaniu dzieci chorych na astmę. Brak doniesień na ten temat innych autorów, nie pozwala na wyciągnięcie jednoznacznych, pewnych ustaleń co do obecności i zmienności tej prostacykliny w EBC u dzieci z astmą w porównaniu do zdrowych.

5.2.4 Izoprostany

W prezentowanym badaniu nie stwierdzono różnic w stężeniach 8izoPGF2 α (przedstawiciela izoprostanów) pomiędzy grupą astmatyków a dziećmi zdrowymi. Ten stabilny chemicznie, specyficzny produkt wolnorodnikowej peroksydacji lipidów jest praktycznym wskaźnikiem stresu oksydacyjnego i wynikających z niego uszkodzeń *in vivo*. Ilościowe jego oznaczenie pozwala na oszacowanie udziału wolnych rodników w patofizjologii wielu chorób. Podwyższone stężenia 8izoprostanu w EBC wykazano w przebiegu astmy, przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, mukowiscydozy, zespołu ostrej niewydolności oddychania typu dorosłych (ARDS), sarkoidozy płuc, obturacyjnego bezdechu sennego, a także u zdrowych osób po inhalacji ozonu [226]. Obserwowany w przypadku astmy wzrost 8izoPGF2 α w EBC wiązał się najczęściej ze stopniem ciężkości i zaostrzeniem choroby [195;196]. Uczestnicy obecnego badania w większości (23/70%/) prezentowali astmę kontrolowaną i tylko 2 (6%) z ich jej ciężką postać. Baraldi i wsp. obserwowali jednak podwyższone stężenia 8izoprostanu również w EBC dzieci ze stabilną astmą, niezależnie od stosowanego leczenia wGKS [184].

5.2.5 5HETE

Wykazane w obecnej pracy wyższe stężenia 5HETE w EBC dzieci z astmą potwierdzają aktywację szlaku 5-LO w przebiegu zapalenia astmatycznego. Niestety brak dotychczas doniesień na temat oznaczeń tego metabolitu w EBC u dzieci. Wyniki

omawianego badania pozostają w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi dorosłych, które wskazują też, że podwyższone poziomy 5HETE dotyczą zarówno chorych dobrze tolerujących aspirynę jak i tych z nadwrażliwością na nią [146;193], a nawet mogą być wyższe w astmie aspirynowej [193]. Levy i wsp., wykazali też wyższy poziom 5HETE towarzyszący podwyższonym poziomom leukotrienów w aktywowanych próbkach pełnej krwi dorosłych chorych na astmę w porównaniu do grupy kontrolnej [227].

5.2.6 Leukotrieny cysteinylowe

Podwyższone stężenie LTC₄ w EBC dzieci z astmą w stosunku do ich zdrowych rówieśników uczestniczących w prezentowanym badaniu pozostaje w zgodzie z ich rolą w patogenezie astmy i wcześniejszymi doniesieniami innych autorów. Wyższe stężenia cysLTs w EBC zostały potwierdzone w kilku badaniach dotyczących zarówno dzieci jak i dorosłych z astmą [185;190;191;195;201]. W EBC pacjentów z astmą aspirynową nieleczonych wGKS poziomy cysLTs są wyższe niż u leczonych wGKS astmatyków tolerujących niesteroidowe leki przeciwzapalne [228], natomiast u leczonych wGKS chorych z nadwrażliwością na aspirynę nie różnią się istotnie od stwierdzanego u osób zdrowych [146;228]. Prowokacja aspiryną nie zmienia poziomu wydychanych cysLTs ani w astmie aspirynowej ani u astmatyków z dobrą tolerancją aspiryny [193]. Obecnie już, dobrze zostało udokumentowane działanie bronchokonstrykcyjne, mukosekrecyjne, zwiększające przepuszczalność naczyń [98], rekrutację komórek zapalnych [100] oraz hamujące apoptozę eozynofili [101] przez cysLTs. Liczne badania potwierdziły też ich rolę w patofizjologii remodelingu dróg oddechowych. W badaniach *in vitro* wykazano, że LTD₄ zwiększa proliferację komórek mięśniowych dróg oddechowych indukowaną przez naskórkowy czynnik wzrostu [229], a LTC₄ zwiększa ekspresję kolagenazy w ludzkich fibroblastach płucnych [230]. Henderson i wsp. na modelu mysim wykazali, że montelukast ogranicza hyperplazję mięśniówki i podnabłonkowe włóknienie [231]. W tym kontekście interesujące wydaje się zastosowanie oznaczeń leukotrienów w EBC jako markerów procesu przebudowy ścian oskrzeli. Wyniki badania Lex i wsp. sugerują taką możliwość. Stężenia cysLTs w EBC dzieci z astmą, nieleczonych montelukastem, istotnie korelowały bowiem z grubością błony podstawnej, ocenianą w biopsjach błony śluzowej oskrzeli, pobranych podczas bronchoskopii [200].

5.2.7 Leukotrien B₄

W obecnej pracy, stężenia LTB₄ w EBC badanych astmatyków okazały się porównywalne ze stwierdzanymi u dzieci zdrowych. Ponieważ jest on uważany za silny czynnik chemotaktyczny dla neutrofilii obserwacje te mogą potwierdzać, że pacjenci nie

wykazywali cech ostrej infekcji bakteryjnej i prezentowali stosunkowo niski stopień alergicznego zapalenia dróg oddechowych. Należy również mieć na uwadze, że wszyscy badani astmatycy byli atopikami a tylko dwoje z nich miało ciężką postać choroby. Można się więc spodziewać, iż prezentują oni eozynofiliowy fenotyp astmy. Prawdopodobnie między innymi z tego względu, wyniki dotychczasowych badań dotyczących poziomu LTB4 u astmatyków są niejednoznaczne. Większość z nich wykazuje wyższe stężenia w stosunku do osób zdrowych [185;190;202;203]. Montuschi i wsp. stwierdzili, że wartości te są selektywnie podwyższone u dzieci chorych na astmę nie leczonych wGKS [203]. Inni autorzy wskazują, że takie leczenie ma ograniczony wpływ na poziom wydychanego LTB4 [185;197].

5.2.8 Stężenia eikozanoidów w EBC a płeć, wiek, BMI z-score, nadreaktywność oskrzeli

W przeprowadzonym badaniu nie wykazano istotnych zależności analizowanych parametrów EBC z płcią badanych. Podobne wyniki uzyskali Sanak i wsp., którzy oceniając metabolity AA w EBC osób zdrowych nie wykazali związku ich stężeń z płcią (poza wyższym poziomem $9\alpha11\beta$ -PGF2 α u mężczyzn) [145], a wśród badanych astmatyków (tolerujący i nietolerujący aspirynę) jedynie stężenie LTD4 było wyższe u mężczyzn, a PGEM wyższe u kobiet [146].

Wiek dziecka w badaniu będącym przedmiotem niniejszej dysertacji wpływał jedynie na stężenie EXE4 w EBC ($\beta=0,41$, $p=0,005$). Korelację stężenia tej eoksyny z wiekiem dziecka potwierdzają też Sachs-Olsen i wsp. [144].

Nie obserwowano też zależności pomiędzy BMI z-score a badanymi parametrami EBC. Należy jednak zauważyć, że w prezentowanym badaniu nie uczestniczyły dzieci otyłe (tab. 1). W opublikowanej ostatnio pracy Giuoleka i wsp. wykazano istotnie wyższy poziom LTE4 w moczu otyłych astmatyków w stosunku do chorych na astmę bez otyłości [232].

W obecnym badaniu nie znaleziono też związku stężeń eikozanoidów ze stopniem nadreaktywności oskrzeli ocenianym w teście wysiłkowym. Pozostaje to w zgodności z wcześniejszymi doniesieniami [190;222]. Badania Brockmanna i wsp. wykazują z kolei wzrost syntezy cysLTs po prowokacji wysiłkiem [217]. Wyniki uzyskane przez Carraro i wsp. wskazują na wyższe stężenia cysLTs w EBC dzieci z astmą wysiłkową w stosunku do astmatyków bez powysiłkowej nadreaktywności oraz ich korelację ze spadkiem FEV1 podczas próby wysiłkowej [175]. Shibata i wsp. wykazali z kolei ujemną korelację stężeń LTE4 w EBC ze stężeniami metacholiny w teście prowokacyjnym [233]. Może to wskazywać na zależność nadreaktywności oskrzeli od stopnia zaawansowania zapalenia dróg oddechowych.

5.2.9 Stężenia eikozanoidów w zależności od parametrów klinicznych chorujących na astmę

Oznaczone stężenia eikozanoidów nie wykazywały zależności od stopnia ciężkości astmy. W badaniu uczestniczyło jednak tylko 6 (18%) dzieci z astmą epizodyczną i 2 (6%) z ciężką postacią choroby co może stanowić jeden z czynników ograniczających wagę porównania między tymi grupami chorych. Należy jednak podkreślić, że poziomy PGD2 i LTC4 były wyższe nie tylko u przewlekłych astmatyków, ale także w grupie dzieci z astmą epizodyczną, mimo że ta podgrupa była nieliczna (6 dzieci) w porównaniu z grupą kontrolą (25 dzieci) – tab. 1. Doniesienia innych autorów wskazują na istotnie wyższe poziomy cysLTs w ciężkiej astmie w stosunku do chorych z astmą łagodną, a z kolei brak różnicy poziomów tych mediatorów pomiędzy zdrowymi a chorymi z łagodną postacią choroby [190;192]. Podgrupy uczestników tych badań wykazywały jednak istotne różnice w parametrach spirometrycznych, czego nie stwierdzano w obecnym opracowaniu.

Ponadto, w prezentowanym badaniu, stężenia eikozanoidów w EBC nie były powiązane ze stopniem kontroli astmy (brak różnic astma kontrolowana vs niekontrolowana). Trzeba jednakże zaznaczyć, że większość astmatyków (23 /70%/) demonstrowała klinicznie astmę kontrolowaną. Powodem braku związku między stężeniami eikozanoidów w EBC a ciężkością astmy lub wynikiem ACT może być fakt, że różnica pomiędzy podgrupami chorych z astmą kontrolowaną (mediana ACT: 17) a niekontrolowaną (mediana ACT: 23), przy przyjętym punkcie odcięcia na poziomie równym 19, nie była wystarczająca do identyfikacji znaczącej różnicy pomiędzy poziomami metabolitów AA w tych grupach badanych. Co więcej, różnice wartości FEV1% należnych między tymi grupami były niewielkie ($p>0,05$) i wynosiły odpowiednio: 98% i 104% normy. Można więc przyjąć, że odpowiednie leczenie zmniejszyło nasilenie procesu zapalnego i wyrównywało poziomy eikozanoidów w tych grupach badanych. Wyniki Zanconato i wsp. wskazują, na istotne różnice stężeń cysLTs u dzieci ze stabilną i niestabilną astmą, ale ta druga podgrupa charakteryzowała się znaczną niestabilnością choroby, wymagającą przynajmniej 3-krotnego leczenia systemowymi kortykosteroidami w roku poprzedzającym badanie, pozostawała na leczeniu LABA i wysokimi dawkami wGKS oraz prezentowała niższe parametry spirometryczne [195].

Obserwowany brak znaczących relacji stężeń metabolitów AA ze stopniem zaawansowania leczenia wydaje się wynikać z kilku powodów. Do badania włączono tylko siedmiu (21%) astmatyków, którzy nie przyjmowali wGKS, co ograniczało możliwości porównań pacjentów z różną formą farmakoterapii. Ponadto dostosowanie poziomu

zaawansowania leczenia, z zastosowaniem leków kontrolujących odpowiednich do stopnia ciężkości astmy, skutecznie ograniczyło poziom alergicznego zapalenia u badanych dzieci. Obserwowana supresja może odpowiadać za porównywalne stężenia eikozanoidów w EBC u tych chorych z różnymi stopniami ciężkości astmy. Za taką możliwość przemawia interwencyjne badanie, w którym grupie dzieci z astmą łagodną po włączeniu wGKS następowało istotne zmniejszenie stężenia LTE4 w ciągu 6 miesięcy ich stosowania w porównaniu do wartości wyjściowych. Zmianie tej towarzyszył wzrost wskaźników spirometrycznych uczestników badania [197]. Warto odnotowania jest fakt, że leczenie wGKS nie zakłócało jednak różnicowania astmatyków z ich zdrowymi rówieśnikami w badanej populacji. Dotychczasowe inne obserwacje potwierdzają ograniczone supresyjne działanie wGKS na metabolizm AA. Może to pozwalać na zastosowanie oznaczenia stężeń eikozanoidów w EBC jako czynnika różnicującego zdrowych od astmatyków niezależnie od stosowanego leczenia. Uczestnicy badania Cap i wsp. zarówno dzieci jak i dorośli astmatycy, charakteryzujący się prawidłowymi wartościami spirometrycznymi i leczeni wGKS mieli znamienne wyższe stężenia cysLTs i LTB4 w EBC w stosunku do zdrowych [189]. W badaniu Csoma i wsp. podwyższone stężenia cysLTs w EBC obserwowano u dzieci z astmą łagodną i umiarkowaną leczonych wGKS (niskie i wysokie dawki), natomiast astmatycy z epizodyczną manifestacją schorzenia mieli poziomy porównywalne z grupą zdrową [190]. Brak zaostrzeń astmy w okresie dłuższym niż 6 miesięcy (bez leczenia) powoduje normalizację stężeń LTE4 do poziomu dzieci zdrowych. Natomiast astmatycy, u których występują nawet pojedyncze epizody świszczącego wydechu w okresie 6 miesięcy mają już poziomy tego leukotrienu odróżniające ich znamienne od grupy zdrowej. Z kolei dzieci z niedawno występującymi zaostrzeniami, mimo leczenia dużymi dawkami wGKS wykazywały stężenia najwyższe [233]. Interesującym jest fakt, że podgrupy astmatyków w tym badaniu nie różniły się poziomem IgE całkowitych ani eozynofilią surowicy. Może to oznaczać, że raczej aktywacja eozynofilii i/lub mastocytów może bardziej znacząco wpływać na poziomy cysLTs w EBC niż rzeczywista liczba komórek.

Kortykosteroidy odpowiadają co prawda za wzrost apoptozy eozynofili *in vitro* [234], co potwierdzają badania wykazujące redukcję liczby eozynofili w płwocinie indukowanej u dzieci z astmą po włączeniu do leczenia wGKS [235]. Jednak, eozynofilia dróg oddechowych może utrzymywać się u dzieci, u których astma jest klinicznie kontrolowana wGKS [236]. Ponadto, zwiększone stężenie badanych mediatorów stanu zapalnego może być dodatkowo związane z aktywacją komórek tucznych. Leukotrieny cysteinylowe, których głównym źródłem produkcji są mastocyty, przez swój bezpośredni wpływ na wzrost przeżywalności

eozynofili podtrzymują eozyfilowe zapalenie w drogach oddechowych [101]. Prowadzi to do dalszego wzrostu produkcji cysLTs i zwiększenia rekrutacji eozyfilów. Wpływ leczenia kortykosteroidami na regulację uwalniania metabolitów AA i ich stężenia w EBC nie został ostatecznie wyjaśniony i opisany. Hamowanie ekspresji COX2 nie budzi wątpliwości, natomiast nie ustalono ich oddziaływania na szlak 5-LO. Sugeruje się, że może w tym odgrywać rolę niegenomowy mechanizm działania kortykosteroidów. Udowodniono, że w tym mechanizmie kortykosteroidy przesuwają metabolizm kwasu arachidonowego w kierunku syntezy przeciwzapalnych endokannabinoidów kosztem pozostałych przemian [237]. Potwierdzono też ich wpływ na aktywność lipokortyny1, która jest inhibitorem cPLA2 [238]. Kortykosteroidy prawdopodobnie częściowo blokują również syntezę cysLTs poprzez selektywne oddziaływanie na syntazę LTC4 [239].

Do niedawna duże nadzieje o charakterze diagnostyczno-monitorującym wiązano z tlenkiem azotu, który zaczął być uznawany jako czuły marker alergicznego zapalenia astmatycznego [240]. Jednak wyniki badań wskazujące na takie jego znaczenie wydają się być nieprzekonujące i niejednoznaczne. Jest wiele danych wykazujących, że poziom FeNO wzrasta nie tylko u atopowych astmatyków, ale również u atopików bez astmy [127;241]. Badanie Prasad i wsp. przeprowadzone na dużej liczbie uczniów wykazało wręcz brak przydatności znaczenia FeNO w różnicowaniu astmatyków od innych dzieci z atopią [128]. Ponadto leczenie kortykosteroidami zarówno systemowymi jak i wziewnymi powoduje nie zawsze znaczące obniżenie FeNO [60]. Z kolei badania, w których stosowano algorytmy modyfikacji leczenia na podstawie FeNO nie wykazały przewagi kontrolowania astmy w stosunku do zastosowania standardowych wytycznych [129-131]. W badaniu będącym przedmiotem dysertacji uczestniczyli atopowi astmatycy. Zgodnie z obserwacjami innych autorów grupa astmatyków (wszyscy z atopią) w obecnym badaniu wykazywała wyższe poziomy FeNO w porównaniu do zdrowych rówieśników (bez atopii). Były one niższe w grupie leczonej wGKS w stosunku do pozostałych chorych (odpowiednio: 19 ppb vs 31 ppb), ale nie była to jednak różnica istotna statystycznie ($p=0,64$). Taki rozkład wartości FeNO u badanych dzieci, w pewnym sensie, potwierdza u nich kontrolowane stadium choroby, co jest zgodne z oceną ACT oraz spirometryczną.

Na przewagę oznaczenia LTs w EBC dla celów diagnostycznych w porównaniu do FeNO wskazują wyniki kolejnych badań. Mondino i wsp. wykazali, że stężenia LTE4 i LTB4 w EBC są podwyższone zarówno u leczonych jak i nieleczonych wGKS dzieci z astmą atopową, ale nie u atopików bez astmy w stosunku do zdrowej grupy kontrolnej. Natomiast, poziomy FeNO są wyższe zarówno u atopików bez astmy jak i tych z astmą nieleczonych

wGKS. Nie wykazują natomiast istotnych różnic między zdrowymi a astmatykami leczonymi wGKS. Włączenie do leczenia wziewnego flutikazonu skutkowało 53% obniżeniem poziomu FeNO a tylko 18% zmniejszeniem stężenia LTE4 [185]. Dane te wskazują, że FeNO i stężenia LTs w EBC mogą odzwierciedlać różne aspekty zapalenia dróg oddechowych u dzieci chorych na astmę. Podobne wnioski można wyciągnąć z wyników prezentowanych przez Kiełbasa i wsp. Badana przez nich grupa dzieci z astmą leczona wGKS miała stężenia cys-LTs w EBC podobne do grupy bez takiego leczenia, a poziomy FeNO były u nich niższe [191].

Podwyższone stężenia wydychanych LTs przemawiają za jednak utrzymującym się procesem zapalnym u dzieci leczonych wGKS. Może to w pewien sposób uzasadniać potrzebę addycyjnego leczenia lekami antyleukotrienowymi. W prezentowanym badaniu tylko jedno z dzieci było leczone wyłącznie montelukastem, u siedmiorga stosowano go łącznie z wGKS stąd ocena wpływu tego leku na stężenia badanych eikozanoidów była utrudniona. Zastosowanie LTRA, jak wskazuje badanie Lex i wsp., obniża poziom cysLTs w EBC atopowych astmatyków, w stosunku do chorych bez takiego leczenia [200]. U dzieci z astmą atopową, montelukast powodował zmniejszenie o 1/3 wydychanego LTE4, a spadek ten korelował z wartościami wyjściowymi. Prawdopodobnie wpływ montelukastu związany jest z bezpośrednim hamowaniem aktywności 5-LO [199]. Lek ten nie wpływał natomiast na wydychany LTE4 u atopików bez astmy [186]. Obserwacja ta może mieć duże znaczenie w identyfikacji pacjentów, którzy potencjalnie mogą odnosić większe korzyści z leczenia LTRAs.

5.3 EACR

Spośród 9 eikozanoidów, których stężenia istotnie odróżniały astmatyków od zdrowej grupy kontrolnej, analizy statystyczne pozwoliły na wyłonienie czterech z nich jako najistotniejszych dla diagnostyki różnicowej. W oparciu o nie wyznaczono równanie regresji nazwane EACR.

Kryterium informacyjne Akaike, którym się posłużono, pozwoliło na wybór spośród modeli o różnej liczbie predyktorów (w omawianym przypadku 9 eikozanoidów) tego/tych, który/e najlepiej aproksymuje/ą rzeczywistość (prawidłowo przyporządkowuje badanego do grupy zdrowych lub astmatyków) i było możliwie najprostszym (zawierało najmniejszą liczbę parametrów). Innymi słowy, wyróżniło istotne parametry modelu, od parametrów dodatkowych, zwiększających jedynie ogólność modelu, ale nie mających znaczącego wpływu na poprawę jego dopasowania. Dla spełnienia wymagań tej metody

brakujące dane zostały zastąpione medianami w odpowiednich podgrupach. Należy jednak zauważyć, że ich brak i konieczność ich uzupełnienia do budowy modelu, dotyczył tylko 3% wszystkich wykonanych oznaczeń. Ponadto, zastosowanie EACR do różnicowania uczestników badania, u których oznaczono wszystkie parametry wykazało porównywalną wartość dyskryminacyjną testu (AUC: 0,968 vs 0,963, $p > 0,05$). Opisany, skonstruowany wskaźnik - EACR wykazywał wysoką czułość (91,4%) i swoistość (92%) diagnostyczną. Dokładność testu z zastosowaniem EACR była znacznie wyższa w porównaniu do kwalifikowania uczestników badania przy użyciu każdego z tych czterech eikozanoidów oddzielnie. Różnica AUC dla EACR w stosunku do pola pod krzywą ROC dla PGEM, PGD2, LTC4 jak i 5HETE była istotna statystycznie (rys. 6., tab. 5.). Ponadto, sprawność diagnostyczna testu z EACR była znamienne wyższa niż pomiar FeNO lub nadreaktywności oskrzeli w teście wysiłkowym (różnice AUC przedstawiono na rys. 7. i w tab. 6.). Uzyskane wyniki wskazują, że postawiona hipoteza, zakładająca różnice profilu metabolitów AA w EBC między astmatykami a dziećmi zdrowymi została potwierdzona. Dodatkowo ocena stężeń eikozanoidów w EBC, szczególnie z uwzględnieniem algorytmu EACR, okazała się przydatnym narzędziem w różnicowaniu astmatyków od dzieci zdrowych.

Należy zauważyć, że ciągle nierozstrzygnięty problem normalizacji wyników oznaczeń składników EBC (brak jednoznacznie określonej metody oceny współczynnika rozcieńczenia), stanowi istotny czynnik ograniczający testy z EBC jako narzędzie diagnostyczne. Być może, w przyszłości standaryzacja oznaczeń EBC pozwoli nie tylko na lepsze wyodrębnianie dzieci chorych, ale również stworzy możliwości monitorowania astmatycznego zapalenia i odpowiedniego dostosowywania poziomu zaawansowania leczenia.

Koncepcja tworzenia zbiorów zmiennych (w obecnej pracy wskaźnik EACR) dla poprawy różnicowania nie jest całkowicie nowa w badaniach nad astmą. Niedawno, na podstawie hierarchicznej analizy skupień (grupowania w klastry) Brasier i wsp. zidentyfikowali specyficzne, niezależne od leczenia wzorce cytokin w BAL-u charakterystyczne dla czterech wyróżnionych fenotypów astmy [242]. Co istotne, wykazali oni, że poziom żadnej z pojedynczych cytokin nie może być użyty do identyfikacji przynależności ocenianych chorych do odpowiedniej grupy, a jedynie zastosowanie wzorca uwzględniającego co najmniej 10 z nich zapewnia prawidłową kwalifikację. Poszczególne grupy o określonym wzorcu cytokin w BAL-u różniły się też istotnie parametrami klinicznymi, włącznie z rodzajem komórek w BAL-u, wynikami badań spirometrycznych, nadwrażliwością na metacholinę i odwracalnością obturacji po β_2 -mimetykach. Dane te

wskazują, że profil cytokin jest informatywny dla określenia fenotypów astmy bez udziału nakładających się objawów klinicznych. Wzór cytokin w BAL-u uczestników badania ze stabilną klinicznie przewlekłą astmą nie różnił się między astmatykami leczonymi i nie leczonymi wGKS. W badaniu tym, wśród astmatyków z BHR w teście z metacholiną zdefiniowano też 3 podgrupy o różnym profilu 5 najistotniejszych cytokin. Klasyfikacja w oparciu o ten model wykazała nie tylko istotne różnice stopnia nadreaktywności oskrzeli, ale grupy te różniły się również eozynofilią BAL-u [242]. Badanie to potwierdza słuszność koncepcji poszukiwania profilu czynników opisujących: fenotyp kliniczny, przebieg choroby oraz najlepsze metody terapeutyczne. Badacze nie zweryfikowali jednak powtarzalności pomiaru cytokin w BAL-u. Nie przetestowano też, podobnie jak w badaniu prezentowanym w dysertacji, opisanych modeli na autonomicznej populacji. Niemniej jednak wyniki te wskazują na otwierające się nowe możliwości diagnostyczne, wynikające z dostępności metod umożliwiających oznaczanie wzoru mediatorów zapalnych w ALF pozyskiwanym podczas procedury płukania oskrzelowo-pęcherzykowego lub obecnych w EBC.

5.4 Ocena zmienności eikozanoidów w EBC podczas kolejnych wizyt

Większość uczestników II etapu badania (82%) wykazywała stabilny klinicznie przebieg astmy (ocena ACT, wartości spirometryczne podstawowe i $\Delta\%$ FEV1 oraz poziom FeNO), jak i stały poziom zaawansowania leczenia (tab. 7). Przeprowadzone analizy statystyczne potwierdziły brak istotnych różnic pomiędzy badanymi parametrami klinicznymi ocenianymi podczas wizyt kontrolnych (tab. 8, rys. 8). Ponadto charakteryzowały się one wysokimi współczynnikami korelacji wewnątrzgrupowej (tab. 8). Stwarzało to warunki pozwalające na próbę oszacowania zmienności poziomów eikozanoidów oznaczanych w próbkach EBC pozyskiwanych podczas kolejnych wizyt u stabilnych klinicznie astmatyków. Wyniki analizy wariancji powtarzanych pomiarów dla rang Friedmana wskazały na brak istotnych różnic pomiędzy stężeniami większości ocenianych trzykrotnie pochodnych AA (tab. 10). Co ważne, wyłonione cztery najistotniejsze z nich, najlepiej różnicujące astmatyków od grupy zdrowej wykazywały stabilne stężenia przy niezmiennym się stanie klinicznym badanych (rys. 9), z dobrą korelacją (z wyjątkiem stężeń LTC4) wyników uzyskiwanych podczas kolejnych wizyt (tab. 11). Wyniki te, w kontekście z rezultatami dotychczas opublikowanych badań wykazujących wyższe stężenia cysLTs w zaostrzeniach astmy [195] i ciężkich jej postaciach [190;192], wydają się dawać nadzieję na otwarcie nowych możliwości w diagnostyce i monitorowaniu astmatycznego zapalenia. Brak korelacji w zakresie LTC4 wynikał prawdopodobnie z dużej zmienności międzyosobniczej, która w znacznej mierze

mogła być uzależniona od braku uwzględnienia współczynnika rozcieńczenia. Problem standaryzacji procedury kolekcji EBC, która zapewniałaby lepszą powtarzalność pomiarów, jak już wspomniano, wciąż nie został rozwiązany.

Badania innych autorów wskazują, że zapewnienie warunków zgodnych z rekomendacjami ATS/ERS, z zastosowaniem komercyjnego kondensatora EcoScreen pozwala jednak na pozyskanie porównywalnych objętości EBC (współczynnik zmienności ok. 20%), a stężenia H₂O₂ i 8-izoprostanu charakteryzują się odpowiednio 12% i 25% międzytygodniową zmiennością [243]. Niewątpliwie, powtarzalność pomiarów uwarunkowywana jest również czułością i dokładnością stosowanych technik analitycznych. Posługiwanie się w prezentowanym badaniu referencyjnymi, wysokoczułymi i dokładnymi metodami określenia stężeń eikozanoidów (GC-NICI-MS, HPLC-MS²) stanowi czynnik pozytywnie wpływający na zgodność wyników powtarzanych pomiarów. Metody o niższej czułości również pozwalają na uzyskanie akceptowalnej zgodności, przy czym EIA wykazuje niższą powtarzalność niż RIAs w odniesieniu do oznaczeń leukotrienów w EBC [185]. W badaniu Carraro i wsp. oznaczenie 8-izoprostanu za pomocą GC-NICI-MS w próbkach EBC pozyskanych w 1 godzinnych odstępach czasowych charakteryzowało się wartością ICC = 0.72, natomiast oznaczenia metodą EIA dawały ICC = 0,53, co jest wyraźną różnicą i przemawia za metodami wysokoczułymi [209].

Powtórna kwalifikacja chorych wg algorytmu EACR, na podstawie badań EBC potwierdziła rozpoznanie astmy u 24 (89%) i 22 (81,5%) chorych odpowiednio podczas wizyt B i C. Wykazano też wysoką zgodność kwalifikacji poszczególnych chorych w kolejnych wizytach (rys. 10, tab. 13). Uzyskane wyniki sugerują potwierdzenie przydatności wyznaczonego EACR jako narzędzia diagnostycznego w astmie dziecięcej. Niewątpliwie wnioski powinny być ostrożne. W drugim etapie badania uczestniczyły jedynie dzieci chore na astmę. Ponadto grupę badaną stanowili atopowi astmatycy co stanowi kolejne ograniczenie kliniczne, zwłaszcza mając na uwadze wyniki badań dotyczących niepowodzenia diagnostycznego przy stosowaniu oznaczeń FeNO.

5.5 Perspektywy dalszych badań

Wyniki przeprowadzonego badania wskazują, że określenie profilu eikozanoidów w EBC z wykorzystaniem wysokorozdzielczych metod otwiera nowe, nieinwazyjne możliwości diagnostyczne w astmie u dzieci. Jednym z najistotniejszych jego ograniczeń jest brak określenia współczynnika rozcieńczenia ALF w próbkach EBC. Standaryzacja poprzez jego zastosowanie być może pozwoli również na określenie nasilenia zapalenia dróg oddechowych

w przebiegu astmy. Próby jednoczasowego z eikozanoidami oznaczenia poziomu wolnego kwasu palmitynowego w próbkach EBC metodą GC-MS, jako wskaźnika rozcieńczenia, skutkowały poprawą dokładności metody [144-146;193]. Praktyczne jego zastosowanie do standaryzacji próbek EBC wymaga jednak dalszych badań.

Dla odpowiedniej oceny opisanego algorytmu diagnostycznego (EACR) konieczna będzie jego weryfikacja w badaniach prospektywnych. Należałoby sprawdzić jego wartość dyskryminacyjną wśród dzieci atopowych bez objawów astmy i z astmą o różnym stopniu ciężkości i zaawansowania leczenia, a także pośród nieatopowych astmatyków w odniesieniu do zdrowej grupy kontrolnej.

Celowe byłoby także seryjne oznaczanie profilu eikozanoidów EBC w trakcie okresów zaostrzeń choroby do czasu uzyskania remisji objawów, z uwzględnieniem stosowanego leczenia. Mogłoby to rzucić nowe światło na patomechanizmy choroby.

W chwili obecnej ocena EBC nie wydaje się jeszcze przydatna do rutynowego zastosowania w praktyce klinicznej między innymi z powodu ograniczonej dostępności drogiego sprzętu. Z uwagi na zupełną nieinwazyjność, prostotę procedury uzyskiwania EBC, możliwość powtarzania badania w dowolnych odstępach czasowych i niezależnie od stanu klinicznego pacjenta oraz brak wpływu na funkcję układu oddechowego i nasilenie toczącego się procesu zapalnego, może ona jednak oferować poszerzenie pola poznawczego oraz leczniczego w astmie. W przyszłości, badanie EBC w połączeniu z innymi biomarkerami będzie być może pomocnym narzędziem diagnostyczno-monitorującym w tej częstej chorobie, zwłaszcza u małych dzieci, u których badania czynnościowe płuc są trudne do przeprowadzenia.

6 Wnioski

1. Zastosowanie wysokoczułych metod analitycznych (GC-NICI-MS, HPLC-MS²) pozwala na identyfikację eikozanoidów i wyznaczenie ich stężeń w EBC u dzieci z astmą, nawet w przypadku jej postaci epizodycznej.
2. W EBC u dzieci chorych na astmę występują istotnie wyższe stężenia PGEM, PGD2, 9α11β-PGF2α, PGF2α, 6keto-PGF1α, LTC4, trans-LTC4, 5HETE oraz niższe stężenie 11dehydro-TXB2 w stosunku do zdrowych rówieśników.
3. Stężenia badanych eikozanoidów nie różniły się istotnie w zależności od stopnia ciężkości astmy, stopnia jej kontroli, jakości uczulenia, zakresu stosowanego leczenia przeciwastmatycznego.
4. Zestaw czterech spośród oznaczanych eikozanoidów (PGEM, PGD2, LTC4 i 5HETE), z wyznaczeniem wartości regresji liniowej będącej funkcją tych czterech zmiennych, jest najtrafniejszym narzędziem diagnostycznym. Skonstruowana funkcja została nazwana eikozanoidowym wskaźnikiem predykcji astmy (EACR).
5. Trafność diagnostyczna wskaźnika EACR dla rozpoznawania astmy u dzieci nie zależała od stopnia ciężkości choroby, obecności atopii, czy stosowanego leczenia przeciwastmatycznego.
6. Wartość dyskryminacyjna funkcji EACR dla identyfikacji dzieci z astmą jest znacząco wyższa od dotychczas stosowanych wskaźników takich jak FeNO lub ocena nadreaktywności oskrzeli.
7. Zmienność międzyosobnicza oraz wewnątrzosobnicza stężeń wybranych eikozanoidów (PGEM, PGD2, LTC4 i 5HETE) oraz wartości EACR jest nieistotna w astmie stabilnej u dzieci.
8. Nie wykazano istotnych zmian kierunku stężeń wybranych eikozanoidów, czy wartości EACR w zależności od zmiany stopnia kontroli astmy.

Zestaw, profil wybranych eikozanoidów w EBC (wskaźnik EACR) wydaje się być wartościowym narzędziem diagnostycznym w astmie dziecięcej, jednak niewystarczającym dla monitorowania przebiegu tej choroby.

Streszczenie

Przydatność oznaczenia eikozanoidów w kondensacie powietrza wydechowego u dzieci z astmą

Rozpoznanie astmy stanowi trudny problem diagnostyczny u dzieci, ponieważ bezpośrednia ocena zapalenia dróg oddechowych i badania czynnościowe układu oddechowego mają w tej grupie wiekowej ograniczone zastosowanie. Z tego względu wszelkie nieinwazyjne metody diagnozowania w tej grupie wiekowej mogą mieć istotne znaczenie kliniczne. Analiza składu kondensatu powietrza wydechowego (EBC) z zastosowaniem wysoko czułych metod, takich jak wysokosprawna chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią masową (HPLC-MS²) oraz chromatografia gazowa ze spektrometrią masową z ujemną jonizacją chemiczną (GC-NICI-MS), może okazać się więc bardzo przydatna w tym zakresie.

Produkty biotransformacji lipidów błon komórkowych (w tym eikozanoidy) odgrywają istotną rolę w przebiegu procesu zapalenia astmatycznego. Celem I etapu prezentowanej pracy było poszukiwanie różnic w składzie eikozanoidów w EBC (za pomocą HPLC-MS² i GC-NICI-MS) oraz określenie powiązań między nimi, które mogłyby być najbardziej przydatne w diagnostyce astmy. W tym celu, w oparciu o najistotniejsze eikozanoidy (wyróżnione za pomocą metod dyskryminacyjnych), został opracowany matematyczny model diagnostyczny. W II etapie badania oceniano zmienność w czasie ocenianych parametrów w odniesieniu do przebiegu klinicznego astmy.

Do I etapu badania o charakterze przekrojowym i II etapu o charakterze prospektywnym włączono 35 dzieci w wieku $12,4 \pm 3,1$ lat, leczonych w Poradni Pulmonologiczno - Alergologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie. Wszyscy pacjenci spełniali kryteria diagnostyczne astmy, a ciężkość choroby została ustalana zgodnie z kryteriami GINA. Poziom kontroli astmy oceniano za pomocą testu kontroli astmy (ACT). Grupę kontrolną stanowiło 25 zdrowych, dzieci bez atopii (wiek $11,8 \pm 3,2$ lat).

Kolekcja próbek EBC została wykonana zgodnie ze standardami ATS/ERS, z wykorzystaniem urządzenia Eco Screen I Jaeger (Hoechberg GmbH, Niemcy) wyposażonego w pułapkę śliny. Do pomiaru stężeń: PGE2 i jego metabolitu PGEM /tetranor-PGEM/, PGD2, 6ketoPGF1 α , 11dehydro-TXB2, LTB4, LTC4 i jego izomeru transLTC4, LTD4, LTE4, 5HETE, 12HETE, 15HETE, LXA4, EXC4, EXD4, EXE4 w EBC zastosowano metodę HPLC-MS². Stężenia 9 α ,11 β -PGF2 α , PGF2 α oraz 8izo-PGF2 α zostały określone przy użyciu GC-NICI-MS.

Podczas pierwszej wizyty (wizyta A I etapu) wykonywane były następujące procedury: oszacowanie poziomu kontroli astmy (ACT), ujawnienie cech atopii w stosunku do pospolitych aeroalergenów (punktowe testy skórne), określenie poziomu wydychanego tlenu azotu (FeNO), pomiar spoczynkowych parametrów spirometrycznych, a następnie ocena nadreaktywności oskrzeli (BHR) za pomocą testu wysiłkowego. BHR rozpoznawano gdy względne obniżenie FEV1 po wysiłku ($\Delta\%FEV1$) wynosiło co najmniej 10%. Określano też bezwzględną eozynofilię krwi obwodowej i poziom IgE całkowitego w surowicy

W II etapie badania, 27 dzieci z grupy astmatyków było ocenianych podczas dwóch kolejnych wizyt, po 2 tygodniach (wizyta B) i 6 tygodniach (wizyta C) od wizyty A. Podczas każdej z nich powtarzano wszystkie procedury wizyty A (z wyjątkiem testów z krwi).

Istotność różnic pomiędzy grupą astmatyków a kontrolną dla zmiennych parametrycznych i nieparametrycznych była szacowana za pomocą, odpowiednio: testu Manna-Whitneya lub testu Ch2. Wpływ zmiennych towarzyszących oceniano za pomocą analiz ANOVA/ANCOVA. Ponadto, do modelowania stanu chorobowego na podstawie stężeń eikozanoidów zastosowano wieloczynnikową regresję logistyczną w oparciu o kryterium informacyjne Akaike. Krzywe ROC wykorzystano do oceny i porównania sprawności diagnostycznej odpowiednich parametrów z różnych badań. Porównań wartości zmiennych z kolejnych wizyt przeprowadzono za pomocą testu Friedmana, a ich korelację oszacowano obliczając współczynnik korelacji wewnątrzgrupowej (ICC). Oceny zgodności kwalifikacji astmatyków podczas wszystkich trzech wizyt dokonano obliczając współczynniki kappa Cohena i kappa Fleissa. Wartość $p < 0,05$ uznano za istotną statystycznie.

Dzieci chore na astmę wykazywały istotnie wyższą bezwzględną eozynofilię krwi obwodowej, stężenia IgE całkowitego w surowicy, poziom FeNO oraz $\Delta\%FEV1$. BHR była również częstsza u dzieci z astmą w porównaniu do zdrowych.

Stężenia następujących eikozanoidów: PGEM ($p=0,001$), PGD2 ($p < 0,001$), PGF2 α ($p=0,001$), 6ketoPGF1 α ($p=0,03$), LTC4 ($p < 0,001$), transLTC4 ($p=0,04$), 5HETE ($p=0,02$) oraz 9 α ,11 β -PGF2 α ($p=0,001$) były istotnie wyższe, podczas gdy poziom 11dehydro-TXB2 ($p=0,02$) był istotnie niższy w EBC u chorych na astmę w porównaniu do dzieci zdrowych. Nie wykazano znamiennego wpływu na stężenia eikozanoidów (w obu grupach): wieku, płci, BMI z-score, ani $\Delta\%FEV1$. W grupie astmatyków poziomy ich nie zależały też istotnie od stopnia ciężkości astmy, nadwrażliwości na roztocza kurzu domowego, stopnia zaawansowania leczenia, wyniku testu ACT i oceny BHR. Kryterium informacyjne Akaike oraz regresja logistyczna wyłoniły cztery składowe kondensatu: PGEM, PGD2, LTC4, 5HETE, które stanowiły predyktory dla opisanego eikozanoidowego współczynnika predykcji

astmy (EACR). Wykazano, że pole pod krzywą ROC (AUC) dla EACR było istotnie większe niż AUC każdego z jej składników z osobna (różnica AUC_{EACR} i : $AUC_{PGEM} = 0,1577$ ($p=0,002$); $AUC_{PGD2} = 0,1017$ ($p=0,018$); $AUC_{LTC4} = 0,1714$ ($p=0,001$); $AUC_{5HETE} = 0,2423$ ($p<0,001$)). Ponadto, EACR był lepszym (większe AUC) narzędziem przewidywania astmy u badanych dzieci niż FeNO lub BHR (różnica AUC_{EACR} i : $AUC_{FeNO} = 0,1314$ ($p=0,033$); $AUC_{\Delta\%FEV1} = 0,2114$ ($p=0,002$)). W okresie obejmującym II etap badania (wizyty B i C) większość pacjentów prezentowała stabilny przebieg astmy w ocenie ACT i wartości spirometrycznych oraz nie wymagała modyfikacji leczenia. Z tego względu, nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach większości eikozanoidów podczas kolejnych trzech wizyt ($p>0,05$). Ich stężenia wykazywały powtarzalność: dobrą dla PGEM i PGD2 (ICC dla obu $>0,5$) i umiarkowaną dla 5HETE (ICC $>0,25$). Klasyfikacja wszystkich 27 chorych na podstawie wartości EACR w trakcie następowych wizyt, wykazała potwierdzenie rozpoznania u 20 z nich podczas każdego z trzech badań, w 25 przypadkach w co najmniej 2 badaniach. Wykazano także wysoki stopień zgodności tej kwalifikacji (współczynniki dla 3 wizyt: kappa Cohena $\geq 0,77$ i kappa Fleissa = 0,82).

Koncepcja analizy składu EBC w astmie zasługuje na szczególną uwagę ze względu na kompletną nieinwazyjność metody. Eikozanoidy i ich metabolity w omawianym badaniu oznaczono z bardzo dużą dokładnością i czułością. Przeprowadzone badanie, według dostępnych informacji, jako pierwsze poddaje analizie szereg metabolitów AA w EBC z następową próbą identyfikacji tych z nich, których profil najlepiej różnicuje dzieci chorujące na astmę od ich zdrowych rówieśników. Skonstruowany wskaźnik - EACR wykazał wysoką czułość (91,4%) i swoistość (92,0%) diagnostyczną. Prezentowane badanie obejmowało tylko siedmiu (21%) astmatyków, którzy nie przyjmowali wGKS, co ograniczało możliwości porównań pacjentów z różnym stopniem zaawansowania leczenia kontrolującego. Należy jednak podkreślić, że stężenia PGD2 i LTC4 były wyższe nie tylko w EBC u przewlekłych astmatyków, ale także w grupie dzieci z astmą epizodyczną. Inne badania wykazały, że stężenia LTE4, LTB4 w EBC były podwyższone zarówno u leczonych jak i nieleczonych wGKS dzieci z astmą atopową, ale nie u zdrowych pacjentów atopowych. Te obserwacje pozostają w odwrotnej zależności wpływu wGKS na FeNO u dzieci i dorosłych z astmą (w większości przypadków poziom FeNO obniżał się po zastosowaniu wGKS). Wcześniejsze badania przeprowadzone u dorosłych chorych na astmę nie leczonych wGKS nie wykazywały różnic w stężeniach PGE2 w EBC pomiędzy astmatykami a zdrowymi. Niemniej jednak inni autorzy odnotowali różnicę w stężeniach PGE2 w EBC pomiędzy chorymi na astmę aspirynową a astmatykami z dobrą tolerancją aspiryny i grupą zdrową. Dane te wskazują na

zwiększony metabolizm PGE₂. Z kolei, badania nad inną prostaglandyną - PGD₂, u pacjentów z astmą, dotyczyły głównie pośredniej oceny poprzez oznaczanie jej metabolitów w moczu, BAL-u i osoczu. Prezentowane badanie dodaje informację, że stężenia PGD₂ również w EBC u dzieci z astmą były istotnie wyższe oraz fakt, że metoda HPLC-MS² była wystarczająca dla oznaczenia tego eikozanoidu. Odnotowane wyższe stężenia LTC₄ w EBC u dzieci z astmą w porównaniu do osób zdrowych są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami. Podwyższone stężenia cysLTs w EBC astmatyków zostały potwierdzone w kilku badaniach zarówno u dzieci jak i dorosłych, szczególnie w ciężkich postaciach choroby. Natomiast, w obecnym badaniu stężenia LTB₄ w EBC u chorych na astmę były porównywalne z obserwowanymi u zdrowych dzieci. Należy zauważyć, że wszyscy badani byli atopowymi astmatykami z podwyższonymi poziomami FeNO, stężeniami IgE całkowitych i bezwzględna eozynofilią oraz nie wykazywali cech infekcji bakteryjnej. Można to częściowo wyjaśniać odmiennością uzyskanych wyników w stosunku do wcześniejszych badań wykazujących wyższe stężenia LTB₄, ale mierzonych metodami immunologicznymi.

Nową obserwacją w prezentowanym badaniu są wyższe stężenia 5HETE w EBC u dzieci z astmą, co potwierdza aktywację szlaku 5-LO w przebiegu astmatycznego zapalenia. Ponadto, drugi etap badań wykazał, że stężenia eikozanoidów w stabilnej klinicznie astmie nie wykazują istotnych zmian w zebranych próbkach EBC podczas kolejnych wizyt.

Istnieją jednak pewne ograniczenia prezentowanego badania. Najważniejszym z nich jest stosunkowo mała liczba dzieci, zwłaszcza tych z niekontrolowaną astmą. Innym, jest fakt obserwowanej dużej zmienności międzyosobniczej oznaczanych stężeń eikozanoidów. Prawdopodobnie w przyszłości, ustalenie referencyjnego wskaźnika rozcieńczenia EBC pozwoli na bardziej precyzyjnie określanie zawartych w nim związków, w tym eikozanoidów.

Podsumowując: Stężenia PGEM i PGD₂, PGF₂ α , 6ketoPGF₁ α , LTC₄, transLTC₄, 5HETE i 9 α 11 β -PGF₂ α w EBC są wyższe, a stężenie 11dehydro-TXB₂ jest niższe u dzieci z astmą atopową w porównaniu ze zdrowymi rówieśnikami bez cech atopii. Oznaczenie stężeń eikozanoidów w EBC z zastosowaniem HPLC-MS² i GCMS-NICI-MS pozwoliło na określenie ich profilu w badanej populacji. Zdefiniowany EACR, uwzględniający stężenia: PGEM i PGD₂, LTC₄, 5HETE w EBC pozwolił na bardzo dokładne różnicowanie badanych chorych na astmę od grupy kontrolnej. Dalsze prospektywne badania są niezbędne do oceny proponowanego wskaźnika EACR w kontekście diagnozowania i monitorowania astmy u dzieci.

Summary

Usefulness of eicosanoids in exhaled breath condensate (EBC) analysis in children with asthma

In children, asthma diagnosis is a challenging process because the direct assessment of airway inflammation and respiratory function tests in this age group have limited application. For this reason, any non-invasive diagnostic methods for pediatric asthma would be of a great clinical value. In a such situation, acquisition of analyses of exhaled breath condensate (EBC) composition by highly sensitive methods, such as high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS²) or a gas chromatography negative-ion chemical ionization mass-spectrometry (GC-NICI-MS), will be very desirable.

Biotransformation products of the cell membrane lipids (including eicosanoids) play a vital role in the asthmatic inflammation process. The aim of the I Phase of this study was to find out differences in eicosanoids composition in EBC (using HPLC-MS² and GC-NICI-MS) and establish these compounds, which would be most adequate for asthma diagnosis in children. For this purpose, mathematical model was developed as a diagnostic tool, using the most relevant eicosanoids measured in EBC. In II Phase of this study, the time variability of the determined parameters was estimated and correlated with the course of asthma.

In this cross-sectional study in the I Phase and prospective in the II Phase, 35 children aged 12.4 yrs \pm 3.1 were recruited from the Outpatient Department of Pulmonology and Allergology of the University Children's Hospital in Kraków. All patients fulfilled diagnostic criteria for asthma and severity of the disease was determined according to the GINA criteria. The level of asthma control was assessed using the Asthma Control Test (ACT). The control group consisted of 25 healthy, non-atopic children (age 11.8 yrs \pm 3.2).

EBC collections were done in accordance with the standards of ATS/ERS using an Eco Screen I Jaeger (Hoechberg GmbH, Germany) condenser equipped with a saliva trap. Validated HPLC-MS² method was used to measure: PGE₂ and its metabolite PGEM /tetranor-PGEM/, PGD₂, 6ketoPGF₁ α , 11dehydro-TXB₂, LTB₄, LTC₄ and its isomer trans-LTC₄, LTD₄, LTE₄, 5HETE, 12HETE, 15HETE, LXA₄, EXC₄, EXD₄, EXE₄ in EBC. Levels of 9 α ,11 β -PGF₂ α , PGF₂ α and 8iso-PGF₂ α were determined using GC-NICI-MS methods.

During first visit (visit A in the I Phase) the following procedures were done: estimation of the asthma control levels (ACT), revealing atopy to common allergen (skin prick tests), collection of the ECB samples, determination of the exhaled nitric oxide (FeNO)

levels, measurement of the basic spirometric parameters and then after estimation of the bronchial hyperresponsiveness (BHR) by exercise challenge test. BHR was regarded present, when a relative fall of FEV1 after exercise ($\Delta\%$ FEV1) was at least 10%. Determinations of the absolute eosinophils counts and the total serum IgE levels were done.

In the II Phase of this study, 27 children out of asthmatic group were seen in the two consecutive visits, in 2 weeks (visit B) and in 6 weeks (visit C) after the visit A of the I Phase. All procedures of the visit A (except blood tests) were repeated during subsequent visits.

Differences between asthmatic and control groups in parametric or non-parametric variables were estimated by the Mann-Whitney test or the χ^2 test, appropriately. The impact of different variables was assessed by ANOVA/ANCOVA analyses. Moreover, the Akaike information criterion was applied to multivariate logistic regression modeling of the disease status based on the eicosanoids levels. The ROC curves were used to estimate and compare the diagnostic accuracy of different tests with the relevant parameters. Comparisons of subsequent visits variables were done using Friedman's test and their correlation was estimated by the ICC (Intraclass Correlation Coefficient). In asthmatics, assessment of classification compatibility through all three visits was made by calculating Cohen's kappa and Fleiss' kappa coefficients. A p-value 0.05 was considered statistically significant.

In this study, asthmatic group showed a significantly higher absolute eosinophils counts, serum total IgE, FeNO levels and $\Delta\%$ FEV1 in comparison to the control group. BHR was significantly more common in children with asthma than in healthy controls.

The levels of following eicosanoids: PGEM ($p=0.001$), PGD2 ($p<0.001$), PGF2 α ($p=0.001$), 6keto-PGF1 α ($p=0.03$), LTC4 ($p<0.001$), trans-LTC4 ($p=0.04$), 5HETE ($p=0.02$) and 9 α ,11 β PGF2 α ($p=0.001$) were significantly higher, while the level of 11dehydro-TXB2 ($p=0.02$) was significantly lower in asthmatics compared to controls. There was no significant impact of the following variables: age, gender, BMI z-scores, and $\Delta\%$ FEV1 on eicosanoids levels in either group. In asthmatic group, eicosanoids levels did not related to asthma severity level, atopy to house dust mites, grade of asthmatic treatment, ACT score and BHR. The Eicosanoids Asthma Classification Ratio (EACR) was computed (with the Akaike information criterion application) as the logistic regression function using four most relevant eicosanoids levels: PGEM, PGD2, LTC4 and 5HETE. It has been shown that area under the ROC curve (AUC) for EACR was significantly larger than AUC for the each component individually (differences between AUC_{EACR} and: $AUC_{PGEM}= 0.1577$ ($p=0.002$); $AUC_{PGD2}= 0.1017$ ($p=0.018$); $AUC_{LTC4}= 0.1714$ ($p=0.001$); $AUC_{5HETE}= 0.2423$ ($p<0.001$)). Moreover, EACR was significantly superior with comparison to FeNO or BHR as a tool for asthma

prediction in studied children (difference between AUC_{EACR} and: $AUC_{FeNO} = 0.1314$ ($p=0,033$); $AUC_{\Delta\%FEV1} = 0.2114$ ($p=0.002$)).

Within the range of visit A and visit C (II Phase of study), the most patients presented stable course of asthma by the ACT assessment and spirometric parameters and they did not require a treatment modifications. There were no significant differences in the levels of most of eicosanoids during the consecutive three visits ($p > 0.05$). Their levels showed repeatability: good for PGEM and PGD2 (ICC for both >0.5) and moderate for 5HETE (ICC >0.25). Classification of all 27 patients on the basis of EACR was checked during each visit. The diagnosis concordance was observed in 20 cases for all three visits and in 25 cases for at least two visits. High degree of conformity of classification based on EACR was shown (coefficients for 3 visits: kappa Cohen's ≥ 0.77 and kappa Fleiss = 0.82).

The idea of analysis of EBC for asthma assessment is very appealing, due to completely noninvasiveness of the method. Eicosanoids and their metabolites in this study were measured with very high precision and sensitivity. To the best of our knowledge, it is the first study, which analyzed a set of eicosanoids in EBC in order to identify their profile that would the best differentiate asthmatic children and healthy subjects. Constructed equation (EACR) distinguished asthma in this study with a high accuracy (91.4% sensitivity, 92.0% specificity). It should be emphasized that this study included only seven (21%) asthmatics without ICSs, what was limiting factor for the comparisons of patients in the relation to the controller medications. However, it should be stressed that the levels of PGD2 and LTC4 were higher not only in persistent asthmatics, but also in the group of children with intermittent asthma. Other studies show, that the levels of LTE4, LTB4 in EBC was elevated both in ICSs treated and untreated children with atopic asthma but not in healthy atopic subjects. This observations is opposite to the impact of ICSs on FeNO levels in pediatric and adult patients with asthma (in most cases, FeNO levels are diminished after ICSs). Previous studies conducted in adult steroid-naive asthmatics showed no difference in PGE2 levels between asthmatics and healthy controls. Nevertheless, other authors reported a difference in the levels of PGE2 metabolites between patients with aspirin induced or asthma tolerant and healthy adult subjects. These data suggest an increased metabolism of PGE2. In the past, prostaglandin D2 was precisely but indirectly evaluated in asthmatic patients, mainly its metabolite in urine, bronchoalveolar lavage fluid and plasma. This study added to the previous ones information that PGD2 levels in EBC are elevated in asthmatics, too. They were significantly higher in asthmatic children and this study showed that the determination of this eicosanoid by HPLC-MS² was satisfactory. In this study, reported higher levels of LTC4 in the condensate in children with asthma compared to the healthy control subjects are

consistent with previous reports. Elevated levels of cysLTs in asthmatics' EBC were observed in several studies in both children and adults, especially in severe forms of the disease. There was added in the present study that the levels of LTB₄ in EBC asthmatic subjects was comparable with these observed in healthy children. It should be noted that all subjects were atopic asthmatics with elevated FeNO, IgE levels and eosinophilic counts without bacterial infection during study. It could partially explain different LTB₄ results in this study to others showing higher levels of this eicosanoid in EBC but measured by immunoassays.

There is new observation in presented study that 5HETE levels in EBC in children with asthma are elevated, what confirms activation of 5-LO pathway in the course of asthmatic inflammation. The II Phase of the study showed that eicosanoids levels in clinically stable asthma show no significant variation in samples of EBC collected throughout the course of the disease.

However, there are certain shortcomings of our study. The most important one is a relatively small number of children, especially those with uncontrolled asthma. Another restriction of the present study is the fact that eicosanoids levels presented high inter-subject variability. Probably in the future, a reference dilution indicator will be discovered what will allow to estimated compounds of EBC more precisely.

In conclusion: The levels of PGEM, PGD₂, PGF₂ α , 6ketoPGF₁ α , LTC₄, trans-LTC₄, 5HETE, 9 α ,11 β PGF₂ α in EBC are higher but level of 11dehydro-TXB₂ is lower in children with atopic asthma as compared to healthy non-atopic peers. Measurements of eicosanoids profiles in EBC by HPLC-MS² and GCMS-NICI-MS had generated data arranged in a set/pattern of variables and showed a specific profile in this study population. The computed EACR, which takes into account levels of PGEM, PGD₂, LTC₄, 5HETE in EBC, allowed highly accurate discrimination of studied asthmatic and control group subjects. Other prospective studies are necessary to evaluate the proposed EACR in the context of diagnosing and monitoring childhood asthma.

Piśmiennictwo

- [1] Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). <http://www.ginasthma.com> . 2008.
- [2] Wytyczne Polskiego Towarzystwa Alergologicznego i Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc Dotyczące Postępowania w Astmie Oskrzelowej, ed 2. Warszawa, 2008.
- [3] Bacharier LB, Boner A, Carlsen KH i wsp.: Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report. *Allergy*. 2008;63:5-34.
- [4] Haland G, Carlsen KC, Sandvik L i wsp.: Reduced lung function at birth and the risk of asthma at 10 years of age. *N Engl J Med*. 2006;355:1682-1689.
- [5] Ober C, Hoffjan S: Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes Immun*. 2006;7:95-100.
- [6] Sly PD, Kusel M, Holt PG: Do early-life viral infections cause asthma? *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125:1202-1205.
- [7] Illi S, von ME, Lau S i wsp.: Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study. *Lancet*. 2006;368:763-770.
- [8] Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD i wsp.: Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178:667-672.
- [9] Lemanske RF, Jr., Jackson DJ, Gangnon RE i wsp.: Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:571-577.
- [10] Lowe LA, Woodcock A, Murray CS i wsp.: Lung function at age 3 years: effect of pet ownership and exposure to indoor allergens. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2004;158:996-1001.
- [11] Miller RL, Ho SM: Environmental epigenetics and asthma: current concepts and call for studies. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:567-573.
- [12] Gauderman WJ, Avol E, Lurmann F i wsp.: Childhood asthma and exposure to traffic and nitrogen dioxide. *Epidemiology*. 2005;16:737-743.
- [13] Moshhammer H, Hoek G, Luttmann-Gibson H i wsp.: Parental smoking and lung function in children: an international study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:1255-1263.
- [14] Martinez FD: The origins of asthma and chronic obstructive pulmonary disease in early life. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6:272-277.

- [15] Sly PD: The early origins of asthma: who is really at risk? *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2011;11:24-28.
- [16] Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet.* 1998;351:1225-1232.
- [17] Lai CK, Beasley R, Crane J i wsp.: Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax.* 2009;64:476-483.
- [18] Lis G, Breborowicz A, Cichocka-Jarosz E i wsp.: Wzrost występowania astmy oskrzelowej u dzieci szkolnych w Krakowie i Poznaniu - badanie ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Children). *Pneumonol Alergol Pol.* 2003;71:336-343.
- [19] Samolinski B, Bodzenta-Łukaszczyk A, Szpak A: Epidemiologia Astmy w Polsce według programu ECAP. *Terapia.* 2009;3:1-4.
- [20] Bręborowicz A, Emeryk A, Kulus M i wsp.: Postępowanie diagnostyczne i terapeutyczne w astmie oskrzelowej u dzieci. Stanowisko Sekcji Pediatrycznej PTA. *Alergia Astma Immunologia.* 2007;12:129-141.
- [21] Todokoro M, Mochizuki H, Tokuyama K i wsp.: Childhood cough variant asthma and its relationship to classic asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003;90:652-659.
- [22] Gibson PG, Norzila MZ, Fakes K i wsp.: Pattern of airway inflammation and its determinants in children with acute severe asthma. *Pediatr Pulmonol.* 1999;28:261-270.
- [23] Douwes J, Gibson P, Pekkanen J i wsp.: Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax.* 2002;57:643-648.
- [24] Gibson PG, Simpson JL, Hankin R i wsp.: Relationship between induced sputum eosinophils and the clinical pattern of childhood asthma. *Thorax.* 2003;58:116-121.
- [25] Fahy JV: Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. *Proc Am Thorac Soc.* 2009;6:256-259.
- [26] Drews AC, Pizzichini MM, Pizzichini E i wsp.: Neutrophilic airway inflammation is a main feature of induced sputum in nonatopic asthmatic children. *Allergy.* 2009;64:1597-1601.
- [27] Johansson SG, Bieber T, Dahl R i wsp.: Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:832-836.
- [28] Host A, Halken S: The role of allergy in childhood asthma. *Allergy.* 2000;55:600-608.

- [29] Barnes PJ: Intrinsic asthma: not so different from allergic asthma but driven by superantigens? *Clin Exp Allergy*. 2009;39:1145-1151.
- [30] Pillai P, Corrigan CJ, Ying S: Airway Epithelium in Atopic and Nonatopic Asthma: Similarities and Differences. *ISRN Allergy*. 2011;2011:1-7.
- [31] Gotshall RW: Exercise-induced bronchoconstriction. *Drugs*. 2002;62:1725-1739.
- [32] Szczeklik A, Nizankowska E, Duplaga M: Natural history of aspirin-induced asthma. AIANE Investigators. European Network on Aspirin-Induced Asthma. *Eur Respir J*. 2000;16:432-436.
- [33] Liu AH, Zeiger R, Sorkness C i wsp.: Development and cross-sectional validation of the Childhood Asthma Control Test. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:817-825.
- [34] Nathan RA, Sorkness CA, Kosinski M i wsp.: Development of the asthma control test: a survey for assessing asthma control. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:59-65.
- [35] Martinez FD, Wright AL, Taussig LM i wsp.: Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates. *N Engl J Med*. 1995;332:133-138.
- [36] Bisgaard H, Szeffler S: Prevalence of asthma-like symptoms in young children. *Pediatr Pulmonol*. 2007;42:723-728.
- [37] Blair H: Natural history of childhood asthma. 20-year follow-up. *Arch Dis Child*. 1977;52:613-619.
- [38] Morgan WJ, Stern DA, Sherrill DL i wsp.: Outcome of asthma and wheezing in the first 6 years of life: follow-up through adolescence. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:1253-1258.
- [39] Oswald H, Phelan PD, Lanigan A i wsp.: Outcome of childhood asthma in mid-adult life. *BMJ*. 1994;309:95-96.
- [40] Vonk JM, Postma DS, Boezen HM i wsp.: Childhood factors associated with asthma remission after 30 year follow up. *Thorax*. 2004;59:925-929.
- [41] van den Toorn LM, Overbeek SE, de Jongste JC i wsp.: Airway inflammation is present during clinical remission of atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:2107-2113.
- [42] Gagliardo R, La GS, Chanez P i wsp.: Non-invasive markers of airway inflammation and remodeling in childhood asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009;20:780-790.
- [43] Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Wright AL i wsp.: A clinical index to define risk of asthma in young children with recurrent wheezing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1403-1406.
- [44] Ly NP, Gold DR, Weiss ST i wsp.: Recurrent wheeze in early childhood and asthma among children at risk for atopy. *Pediatrics*. 2006;117:e1132-e1138.

- [45] Patel SP, Jarvelin MR, Little MP: Systematic review of worldwide variations of the prevalence of wheezing symptoms in children. *Environ Health*. 2008;7:57.
- [46] Arbes SJ, Jr., Gergen PJ, Vaughn B i wsp.: Asthma cases attributable to atopy: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:1139-1145.
- [47] Madore AM, Perron S, Turmel V i wsp.: Alveolar macrophages in allergic asthma: an expression signature characterized by heat shock protein pathways. *Hum Immunol*. 2010;71:144-150.
- [48] Kay AB: The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med*. 2005;11:148-152.
- [49] Venkayya R, Lam M, Willkom M i wsp.: The Th2 lymphocyte products IL-4 and IL-13 rapidly induce airway hyperresponsiveness through direct effects on resident airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26:202-208.
- [50] Oh CK, Geba GP, Molfino N: Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. *Eur Respir Rev*. 2010;19:46-54.
- [51] Borish LC, Nelson HS, Corren J i wsp.: Efficacy of soluble IL-4 receptor for the treatment of adults with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:963-970.
- [52] Gauvreau GM, Boulet LP, Cockcroft DW i wsp.: The Effects of IL-13 Blockade on Allergen-Induced Airway Responses in Mild Atopic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;
- [53] Kraft S, Rana S, Jouvin MH i wsp.: The role of the FcepsilonRI beta-chain in allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol*. 2004;135:62-72.
- [54] Pejler G, Ronnberg E, Waern I i wsp.: Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood*. 2010;115:4981-4990.
- [55] Schwartz LB: Effector cells of anaphylaxis: mast cells and basophils. *Novartis Found Symp*. 2004;257:65-74.
- [56] Chai OH, Han EH, Lee HK i wsp.: Mast cells play a key role in Th2 cytokine-dependent asthma model through production of adhesion molecules by liberation of TNF-alpha. *Exp Mol Med*. 2011;43:35-43.
- [57] Wenzel SE, Westcott JY, Smith HR i wsp.: Spectrum of prostanoid release after bronchoalveolar allergen challenge in atopic asthmatics and in control groups. An alteration in the ratio of bronchoconstrictive to bronchoprotective mediators. *Am Rev Respir Dis*. 1989;139:450-457.
- [58] Comhair SA, Bhatena PR, Dweik RA i wsp.: Rapid loss of superoxide dismutase activity during antigen-induced asthmatic response. *Lancet*. 2000;355:624.
- [59] Bradding P, Walls AF, Holgate ST: The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:1277-1284.

- [60] Madore AM, Laprise C: Immunological and genetic aspects of asthma and allergy. *Journal of Asthma and Allergy*. 2010;3:107-121.
- [61] Fedorov IA, Wilson SJ, Davies DE i wsp.: Epithelial stress and structural remodelling in childhood asthma. *Thorax*. 2005;60:389-394.
- [62] Plante S, Semlali A, Joubert P i wsp.: Mast cells regulate procollagen I (alpha 1) production by bronchial fibroblasts derived from subjects with asthma through IL-4/IL-4 delta 2 ratio. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:1321-1327.
- [63] Lipscomb MF, Masten BJ: Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev*. 2002;82:97-130.
- [64] Julia V, Hessel EM, Malherbe L i wsp.: A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity*. 2002;16:271-283.
- [65] Humbles AA, Lloyd CM, McMillan SJ i wsp.: A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science*. 2004;305:1776-1779.
- [66] Bergeron C, Boulet LP: Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. *Chest*. 2006;129:1068-1087.
- [67] Bosse Y, Pare PD, Seow CY: Airway wall remodeling in asthma: from the epithelial layer to the adventitia. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2008;8:357-366.
- [68] Szczeklik A, Sanak M. Zapalenie-Autakoidy. *Medycyna Praktyczna*, <http://www.mp.pl/artykuly/index.php?aid=10569&>. 2010.
- [69] Brock TG, Peters-Golden M: Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *ScientificWorldJournal*. 2007;7:1273-1284.
- [70] Fabre JE, Goulet JL, Riche E i wsp.: Transcellular biosynthesis contributes to the production of leukotrienes during inflammatory responses in vivo. *J Clin Invest*. 2002;109:1373-1380.
- [71] Buczynski MW, Dumlaio DS, Dennis EA: Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J Lipid Res*. 2009;50:1015-1038.
- [72] Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL i wsp.: COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:13926-13931.
- [73] Nelson NA: Prostaglandin nomenclature. *J Med Chem*. 1974;17:911-918.
- [74] Moore ML, Peebles RS, Jr.: Update on the role of prostaglandins in allergic lung inflammation: separating friends from foes, harder than you might think. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:1036-1039.

- [75] Black JL, Armour CL, Vincenc KS i wsp.: A comparison of the contractile activity of PGD₂ and PGF₂ alpha on human isolated bronchus. *Prostaglandins*. 1986;32:25-31.
- [76] Hardy CC, Robinson C, Tattersfield AE i wsp.: The bronchoconstrictor effect of inhaled prostaglandin D₂ in normal and asthmatic men. *N Engl J Med*. 1984;311:209-213.
- [77] Alving K, Matran R, Lundberg JM: The possible role of prostaglandin D₂ in the long-lasting airways vasodilatation induced by allergen in the sensitized pig. *Acta Physiol Scand*. 1991;143:93-103.
- [78] Flower RJ, Harvey EA, Kingston WP: Inflammatory effects of prostaglandin D₂ in rat and human skin. *Br J Pharmacol*. 1976;56:229-233.
- [79] Marom Z, Shelhamer JH, Kaliner M: Effects of arachidonic acid, monohydroxyeicosatetraenoic acid and prostaglandins on the release of mucous glycoproteins from human airways in vitro. *J Clin Invest*. 1981;67:1695-1702.
- [80] Lewis RA, Soter NA, Diamond PT i wsp.: Prostaglandin D₂ generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. *J Immunol*. 1982;129:1627-1631.
- [81] Theiner G, Gessner A, Lutz MB: The mast cell mediator PGD₂ suppresses IL-12 release by dendritic cells leading to Th₂ polarized immune responses in vivo. *Immunobiology*. 2006;211:463-472.
- [82] Oguma T, Palmer LJ, Birben E i wsp.: Role of prostanoid DP receptor variants in susceptibility to asthma. *N Engl J Med*. 2004;351:1752-1763.
- [83] Oguma T, Asano K, Ishizaka A: Role of prostaglandin D₂ and its receptors in the pathophysiology of asthma. *Allergol Int*. 2008;57:307-312.
- [84] Shiraishi Y, Asano K, Nakajima T i wsp.: Prostaglandin D₂-induced eosinophilic airway inflammation is mediated by CRTH₂ receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312:954-960.
- [85] Yoshimura-Uchiyama C, Iikura M, Yamaguchi M i wsp.: Differential modulation of human basophil functions through prostaglandin D₂ receptors DP and chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th₂ cells/DP₂. *Clin Exp Allergy*. 2004;34:1283-1290.
- [86] Uller L, Mathiesen JM, Alenmyr L i wsp.: Antagonism of the prostaglandin D₂ receptor CRTH₂ attenuates asthma pathology in mouse eosinophilic airway inflammation. *Respir Res*. 2007;8:16.
- [87] Murakami M, Kudo I: Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E₂-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res*. 2004;43:3-35.
- [88] Pavord ID, Wong CS, Williams J i wsp.: Effect of inhaled prostaglandin E₂ on allergen-induced asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148:87-90.

- [89] Pavord ID, Tattersfield AE: Bronchoprotective role for endogenous prostaglandin E2. *Lancet*. 1995;345:436-438.
- [90] Sestini P, Armetti L, Gambaro G i wsp.: Inhaled PGE2 prevents aspirin-induced bronchoconstriction and urinary LTE4 excretion in aspirin-sensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;153:572-575.
- [91] Wang XS, Wu AY, Leung PS i wsp.: PGE suppresses excessive anti-IgE induced cysteinyl leukotrienes production in mast cells of patients with aspirin exacerbated respiratory disease. *Allergy*. 2007;62:620-627.
- [92] Stumm CL, Wettlaufer SH, Jancar S i wsp.: Airway remodeling in murine asthma correlates with a defect in PGE2 synthesis by lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;301:L636-L644.
- [93] Unoki M, Furuta S, Onouchi Y i wsp.: Association studies of 33 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 29 candidate genes for bronchial asthma: positive association a T924C polymorphism in the thromboxane A2 receptor gene. *Hum Genet*. 2000;106:440-446.
- [94] Telleria JJ, Blanco-Quiros A, Varillas D i wsp.: ALOX5 promoter genotype and response to montelukast in moderate persistent asthma. *Respir Med*. 2008;102:857-861.
- [95] Kalayci O, Birben E, Sackesen C i wsp.: ALOX5 promoter genotype, asthma severity and LTC production by eosinophils. *Allergy*. 2006;61:97-103.
- [96] Hsieh FH, Lam BK, Penrose JF i wsp.: T helper cell type 2 cytokines coordinately regulate immunoglobulin E-dependent cysteinyl leukotriene production by human cord blood-derived mast cells: profound induction of leukotriene C(4) synthase expression by interleukin 4. *J Exp Med*. 2001;193:123-133.
- [97] Kanaoka Y, Boyce JA: Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J Immunol*. 2004;173:1503-1510.
- [98] Griffin M, Weiss JW, Leitch AG i wsp.: Effects of leukotriene D on the airways in asthma. *N Engl J Med*. 1983;308:436-439.
- [99] Weiss JW, Drazen JM, McFadden ER, Jr. i wsp.: Comparative bronchoconstrictor effects of histamine, leukotriene C, and leukotriene D in normal human volunteers. *Trans Assoc Am Physicians*. 1982;95:30-35.
- [100] Mulder A, Gauvreau GM, Watson RM i wsp.: Effect of inhaled leukotriene D4 on airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:1562-1567.
- [101] Lee E, Robertson T, Smith J i wsp.: Leukotriene receptor antagonists and synthesis inhibitors reverse survival in eosinophils of asthmatic individuals. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1881-1886.

- [102] Holgate ST, Peters-Golden M, Panettieri RA i wsp.: Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:S18-S34.
- [103] Lundeen KA, Sun B, Karlsson L i wsp.: Leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2: expression and function in human and murine mast cells. *J Immunol.* 2006;177:3439-3447.
- [104] Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV i wsp.: Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature.* 1980;286:264-265.
- [105] Tager AM, Bromley SK, Medoff BD i wsp.: Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nat Immunol.* 2003;4:982-990.
- [106] Claesson HE, Odlander B, Jakobsson PJ: Leukotriene B4 in the immune system. *Int J Immunopharmacol.* 1992;14:441-449.
- [107] Miyahara N, Ohnishi H, Matsuda H i wsp.: Leukotriene B4 receptor 1 expression on dendritic cells is required for the development of Th2 responses and allergen-induced airway hyperresponsiveness. *J Immunol.* 2008;181:1170-1178.
- [108] Wedmore CV, Williams TJ: Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature.* 1981;289:646-650.
- [109] Mancuso P, Nana-Sinkam P, Peters-Golden M: Leukotriene B4 augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 2001;69:2011-2016.
- [110] Capdevila J, Yadagiri P, Manna S i wsp.: Absolute configuration of the hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) formed during catalytic oxygenation of arachidonic acid by microsomal cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;141:1007-1011.
- [111] Lecomte M, Laneuville O, Ji C i wsp.: Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. *J Biol Chem.* 1994;269:13207-13215.
- [112] Zhao J, O'Donnell VB, Balzar S i wsp.: 15-Lipoxygenase 1 interacts with phosphatidylethanolamine-binding protein to regulate MAPK signaling in human airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:14246-14251.
- [113] Nasser SM, Lee TH: Products of 15-lipoxygenase: are they important in asthma? *Clin Exp Allergy.* 2002;32:1540-1542.
- [114] Feltenmark S, Gautam N, Brunnstrom A i wsp.: Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:680-685.
- [115] Chavis C, Vachier I, Godard P i wsp.: Lipoxins and other arachidonate derived mediators in bronchial asthma. *Thorax.* 2000;55 Suppl 2:S38-S41.

- [116] Maderna P, Godson C: Lipoxins: revolutionary road. *Br J Pharmacol.* 2009;158:947-959.
- [117] Levy BD, De Sanctis GT, Devchand PR i wsp.: Multi-pronged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A(4). *Nat Med.* 2002;8:1018-1023.
- [118] Flamand N, Surette ME, Picard S i wsp.: Cyclic AMP-mediated inhibition of 5-lipoxygenase translocation and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. *Mol Pharmacol.* 2002;62:250-256.
- [119] Harizi H, Juzan M, Moreau JF i wsp.: Prostaglandins inhibit 5-lipoxygenase-activating protein expression and leukotriene B4 production from dendritic cells via an IL-10-dependent mechanism. *J Immunol.* 2003;170:139-146.
- [120] Roberts LJ, Morrow JD: The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1345:121-135.
- [121] Stocks J: Clinical implications of pulmonary function testing in preschool children. *Paediatr Respir Rev.* 2006;7 Suppl 1:S26-S29.
- [122] Payne D, McKenzie SA, Stacey S i wsp.: Safety and ethics of bronchoscopy and endobronchial biopsy in difficult asthma. *Arch Dis Child.* 2001;84:423-426.
- [123] Cataldo D, Foidart JM, Lau L i wsp.: Induced sputum: comparison between isotonic and hypertonic saline solution inhalation in patients with asthma. *Chest.* 2001;120:1815-1821.
- [124] Nathan C, Xie QW: Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem.* 1994;269:13725-13728.
- [125] Rahman I, MacNee W: Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax.* 1998;53:601-612.
- [126] Radomski MW, Palmer RM, Moncada S: Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:10043-10047.
- [127] Jouaville LF, Annesi-Maesano I, Nguyen LT i wsp.: Interrelationships among asthma, atopy, rhinitis and exhaled nitric oxide in a population-based sample of children. *Clin Exp Allergy.* 2003;33:1506-1511.
- [128] Prasad A, Langford B, Stradling JR i wsp.: Exhaled nitric oxide as a screening tool for asthma in school children. *Respir Med.* 2006;100:167-173.
- [129] de Jongste JC, Carraro S, Hop WC i wsp.: Daily telemonitoring of exhaled nitric oxide and symptoms in the treatment of childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179:93-97.
- [130] Shaw DE, Berry MA, Thomas M i wsp.: The use of exhaled nitric oxide to guide asthma management: a randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:231-237.

- [131] Szeffler SJ, Mitchell H, Sorkness CA i wsp.: Management of asthma based on exhaled nitric oxide in addition to guideline-based treatment for inner-city adolescents and young adults: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2008;372:1065-1072.
- [132] Horvath I, Hunt J, Barnes PJ i wsp.: Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J*. 2005;26:523-548.
- [133] Sidorenko GI, Zborovskii EI, Levina DI: [Surface-active properties of the exhaled air condensate (a new method of studying lung function)]. *Ter Arkh*. 1980;52:65-68.
- [134] Effros RM: Exhaled breath condensate: delusion or dilution? *Chest*. 2010;138:471-472.
- [135] Dwyer TM: Sampling airway surface liquid: non-volatiles in the exhaled breath condensate. *Lung*. 2004;182:241-250.
- [136] Effros RM, Biller J, Foss B i wsp.: A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:1500-1505.
- [137] Bondesson E, Jansson LT, Bengtsson T i wsp.: Exhaled breath condensate-site and mechanisms of formation. *J Breath Res*. 2009;3:016005.
- [138] McCafferty JB, Bradshaw TA, Tate S i wsp.: Effects of breathing pattern and inspired air conditions on breath condensate volume, pH, nitrite, and protein concentrations. *Thorax*. 2004;59:694-698.
- [139] Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G i wsp.: Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax*. 2000;55:205-209.
- [140] Huttmann EM, Greulich T, Hattesoehl A i wsp.: Comparison of two devices and two breathing patterns for exhaled breath condensate sampling. *PLoS One*. 2011;6:e27467.
- [141] Esther CR, Jr., Boysen G, Olsen BM i wsp.: Mass spectrometric analysis of biomarkers and dilution markers in exhaled breath condensate reveals elevated purines in asthma and cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;296:L987-L993.
- [142] Lazar Z, Cervenak L, Orosz M i wsp.: Adenosine triphosphate concentration of exhaled breath condensate in asthma. *Chest*. 2010;138:536-542.
- [143] Schwarz K, Biller H, Windt H i wsp.: Characterization of exhaled particles from the healthy human lung--a systematic analysis in relation to pulmonary function variables. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2010;23:371-379.
- [144] Sachs-Olsen C, Sanak M, Lang AM i wsp.: Eoxins: a new inflammatory pathway in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;126:859-867.

- [145] Sanak M, Gielicz A, Nagraba K i wsp.: Targeted eicosanoids lipidomics of exhaled breath condensate in healthy subjects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;878:1796-1800.
- [146] Sanak M, Gielicz A, Bochenek G i wsp.: Targeted eicosanoid lipidomics of exhaled breath condensate provide a distinct pattern in the aspirin-intolerant asthma phenotype. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127:1141-1147.
- [147] von Pohle WR, Anholm JD, McMillan J: Carbon dioxide and oxygen partial pressure in expiratory water condensate are equivalent to mixed expired carbon dioxide and oxygen. *Chest.* 1992;101:1601-1604.
- [148] Vass G, Huszar E, Barat E i wsp.: Comparison of nasal and oral inhalation during exhaled breath condensate collection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167:850-855.
- [149] Ichikawa T, Matsunaga K, Minakata Y i wsp.: Possible impact of salivary influence on cytokine analysis in exhaled breath condensate. *Anal Chem Insights.* 2007;2:85-92.
- [150] Gaber F, Acevedo F, Delin I i wsp.: Saliva is one likely source of leukotriene B4 in exhaled breath condensate. *Eur Respir J.* 2006;28:1229-1235.
- [151] Bayley DL, Abusriwil H, Ahmad A i wsp.: Validation of assays for inflammatory mediators in exhaled breath condensate. *Eur Respir J.* 2008;31:943-948.
- [152] Sack U, Scheibe R, Wotzel M i wsp.: Multiplex analysis of cytokines in exhaled breath condensate. *Cytometry A.* 2006;69:169-172.
- [153] Montuschi P, Ragazzoni E, Valente S i wsp.: Validation of leukotriene B4 measurements in exhaled breath condensate. *Inflamm Res.* 2003;52:69-73.
- [154] Montuschi P, Ragazzoni E, Valente S i wsp.: Validation of 8-isoprostane and prostaglandin E(2) measurements in exhaled breath condensate. *Inflamm Res.* 2003;52:502-507.
- [155] Soyer OU, Dizdar EA, Keskin O i wsp.: Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection. *Allergy.* 2006;61:1016-1018.
- [156] Hunt JF, Fang K, Malik R i wsp.: Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:694-699.
- [157] Carpagnano GE, Foschino Barbaro MP, Resta O i wsp.: Exhaled markers in the monitoring of airways inflammation and its response to steroid's treatment in mild persistent asthma. *Eur J Pharmacol.* 2005;519:175-181.
- [158] Robroeks CM, van de Kant KD, Jobsis Q i wsp.: Exhaled nitric oxide and biomarkers in exhaled breath condensate indicate the presence, severity and control of childhood asthma. *Clin Exp Allergy.* 2007;37:1303-1311.

- [159] Matsunaga K, Yanagisawa S, Ichikawa T i wsp.: Airway cytokine expression measured by means of protein array in exhaled breath condensate: correlation with physiologic properties in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:84-90.
- [160] Matsunaga K, Ichikawa T, Yanagisawa S i wsp.: Clinical Application of Exhaled Breath Condensate Analysis in Asthma: Prediction of FEV(1) Improvement by Steroid Therapy. *Respiration.* 2009;78:393-398.
- [161] Robroeks CM, van VD, Jobsis Q i wsp.: Prediction of asthma exacerbations in children: results of a one-year prospective study. *Clin Exp Allergy.* 2012;42:792-798.
- [162] Robroeks CM, Rijkers GT, Jobsis Q i wsp.: Increased cytokines, chemokines and soluble adhesion molecules in exhaled breath condensate of asthmatic children. *Clin Exp Allergy.* 2010;40:77-84.
- [163] Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM i wsp.: Increased interleukin-4 and decreased interferon-gamma in exhaled breath condensate of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1290-1293.
- [164] Paget-Brown AO, Ngamtrakulpanit L, Smith A i wsp.: Normative data for pH of exhaled breath condensate. *Chest.* 2006;129:426-430.
- [165] Al Obaidi AH, Al Samarai AM: Biochemical markers as a response guide for steroid therapy in asthma. *J Asthma.* 2008;45:425-428.
- [166] Carraro S, Folesani G, Corradi M i wsp.: Acid-base equilibrium in exhaled breath condensate of allergic asthmatic children. *Allergy.* 2005;60:476-481.
- [167] von JM, Pessler F, Akmatov M i wsp.: Reduced breath condensate pH in asymptomatic children with prior wheezing as a risk factor for asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128:50-55.
- [168] Gajdocsi R, Bikov A, Antus B i wsp.: Assessment of reproducibility of exhaled hydrogen peroxide concentration and the effect of breathing pattern in healthy subjects. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2011;24:271-275.
- [169] Emelyanov A, Fedoseev G, Abulimity A i wsp.: Elevated concentrations of exhaled hydrogen peroxide in asthmatic patients. *Chest.* 2001;120:1136-1139.
- [170] Loukides S, Bouros D, Papatheodorou G i wsp.: The relationships among hydrogen peroxide in expired breath condensate, airway inflammation, and asthma severity. *Chest.* 2002;121:338-346.
- [171] Zetterquist W, Marteus H, Kalm-Stephens P i wsp.: Oral bacteria--the missing link to ambiguous findings of exhaled nitrogen oxides in cystic fibrosis. *Respir Med.* 2009;103:187-193.
- [172] Ratnawati, Morton J, Henry RL i wsp.: Exhaled breath condensate nitrite/nitrate and pH in relation to pediatric asthma control and exhaled nitric oxide. *Pediatr Pulmonol.* 2006;41:929-936.

- [173] Ueno T, Kataoka M, Hirano A i wsp.: Inflammatory markers in exhaled breath condensate from patients with asthma. *Respirology*. 2008;13:654-663.
- [174] Csoma Z, Bush A, Wilson NM i wsp.: Nitric oxide metabolites are not reduced in exhaled breath condensate of patients with primary ciliary dyskinesia. *Chest*. 2003;124:633-638.
- [175] Carraro S, Corradi M, Zanconato S i wsp.: Exhaled breath condensate cysteinyl leukotrienes are increased in children with exercise-induced bronchoconstriction. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:764-770.
- [176] Huszar E, Vass G, Vizi E i wsp.: Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma. *Eur Respir J*. 2002;20:1393-1398.
- [177] Kazani S, Israel E: Exhaled breath condensates in asthma: diagnostic and therapeutic implications. *J Breath Res*. 2010;4:047001.
- [178] Ono E, Mita H, Taniguchi M i wsp.: Increase in inflammatory mediator concentrations in exhaled breath condensate after allergen inhalation. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122:768-773.
- [179] Bochenek G, Nizankowska E, Gielicz A i wsp.: Plasma 9alpha,11beta-PGF2, a PGD2 metabolite, as a sensitive marker of mast cell activation by allergen in bronchial asthma. *Thorax*. 2004;59:459-464.
- [180] Liu MC, Bleecker ER, Lichtenstein LM i wsp.: Evidence for elevated levels of histamine, prostaglandin D2, and other bronchoconstricting prostaglandins in the airways of subjects with mild asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1990;142:126-132.
- [181] Murray JJ, Tonnel AB, Brash AR i wsp.: Release of prostaglandin D2 into human airways during acute antigen challenge. *N Engl J Med*. 1986;315:800-804.
- [182] Brightling CE, Ward R, Woltmann G i wsp.: Induced sputum inflammatory mediator concentrations in eosinophilic bronchitis and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:878-882.
- [183] O'Sullivan S, Dahlen B, Dahlen SE i wsp.: Increased urinary excretion of the prostaglandin D2 metabolite 9 alpha, 11 beta-prostaglandin F2 after aspirin challenge supports mast cell activation in aspirin-induced airway obstruction. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98:421-432.
- [184] Baraldi E, Ghiso L, Piovan V i wsp.: Increased exhaled 8-isoprostane in childhood asthma. *Chest*. 2003;124:25-31.
- [185] Mondino C, Ciabattini G, Koch P i wsp.: Effects of inhaled corticosteroids on exhaled leukotrienes and prostanoids in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:761-767.
- [186] Montuschi P, Mondino C, Koch P i wsp.: Effects of a leukotriene receptor antagonist on exhaled leukotriene E4 and prostanoids in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:347-353.

- [187] Huszar E, Szabo Z, Jakab A i wsp.: Comparative measurement of thromboxane A2 metabolites in exhaled breath condensate by different immunoassays. *Inflamm Res*. 2005;54:350-355.
- [188] Pucsok JM, Gyore I, Argay K i wsp.: Effect of exercise on levels of cyclooxygenase mediators in exhaled breath condensate in elite athletes. *J Sports Med Phys Fitness*. 2007;47:223-227.
- [189] Cap P, Chladek J, Pehal F i wsp.: Gas chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotrienes in asthmatic patients. *Thorax*. 2004;59:465-470.
- [190] Csoma Z, Kharitonov SA, Balint B i wsp.: Increased leukotrienes in exhaled breath condensate in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1345-1349.
- [191] Kielbasa B, Moeller A, Sanak M i wsp.: Eicosanoids in exhaled breath condensates in the assessment of childhood asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008;19:660-669.
- [192] Samitas K, Chorianopoulos D, Vittorakis S i wsp.: Exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in patients with asthma and their relation to clinical severity. *Respir Med*. 2009;103:750-756.
- [193] Mastalerz L, Sanak M, Kumik J i wsp.: Exhaled Eicosanoids following Bronchial Aspirin Challenge in Asthma Patients with and without Aspirin Hypersensitivity: The Pilot Study. *J Allergy (Cairo)*. 2012;2012:696792.
- [194] Failla M, Biondi G, Provvidenza PM i wsp.: Intranasal steroid reduces exhaled bronchial cysteinyl leukotrienes in allergic patients. *Clin Exp Allergy*. 2006;36:325-330.
- [195] Zanconato S, Carraro S, Corradi M i wsp.: Leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with stable and unstable asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:257-263.
- [196] Baraldi E, Carraro S, Alinovi R i wsp.: Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbations. *Thorax*. 2003;58:505-509.
- [197] Steiss JO, Rudloff S, Landmann E i wsp.: Effect of inhaled corticosteroid treatment on exhaled breath condensate leukotriene E(4) in children with mild asthma. *Allergy Asthma Proc*. 2008;29:371-375.
- [198] Biernacki WA, Kharitonov SA, Biernacka HM i wsp.: Effect of montelukast on exhaled leukotrienes and quality of life in asthmatic patients. *Chest*. 2005;128:1958-1963.
- [199] Ramires R, Caiaffa MF, Tursi A i wsp.: Novel inhibitory effect on 5-lipoxygenase activity by the anti-asthma drug montelukast. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324:815-821.
- [200] Lex C, Zacharasiewicz A, Payne DN i wsp.: Exhaled breath condensate cysteinyl leukotrienes and airway remodeling in childhood asthma: a pilot study. *Respir Res*. 2006;7:63.

- [201] Montuschi P, Barnes PJ: Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109:615-620.
- [202] Caballero BS, Martorell AA, Cerda Mir JC i wsp.: Leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with episodic and persistent asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2010;20:237-243.
- [203] Montuschi P, Martello S, Felli M i wsp.: Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotriene B4 in asthmatic children. *Respir Res.* 2005;6:119.
- [204] Bodini A, Peroni D, Vicentini L i wsp.: Exhaled breath condensate eicosanoids and sputum eosinophils in asthmatic children: a pilot study. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004;15:26-31.
- [205] Hasan RA, Thomas J, Davidson B i wsp.: 8-Isoprostane in the exhaled breath condensate of children hospitalized for status asthmaticus. *Pediatr Crit Care Med.* 2011;12:e25-e28.
- [206] Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM i wsp.: Exhaled 8-isoprostane in childhood asthma. *Respir Res.* 2005;6:79.
- [207] Barreto M, Villa MP, Olita C i wsp.: 8-Isoprostane in exhaled breath condensate and exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children and adolescents. *Chest.* 2009;135:66-73.
- [208] Montuschi P, Corradi M, Ciabattini G i wsp.: Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:216-220.
- [209] Carraro S, Cogo PE, Isak I i wsp.: EIA and GC/MS analysis of 8-isoprostane in EBC of children with problematic asthma. *Eur Respir J.* 2010;35:1364-1369.
- [210] ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:912-930.
- [211] Zalecenia Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc Dotyczące Wykonywania Badań Spirometrycznych. *Pneumonol Alergol Pol.* 2006;74:
- [212] Crapo RO, Casaburi R, Coates AL i wsp.: Guidelines for methacholine and exercise challenge testing-1999. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:309-329.
- [213] Osborne JW: Improving your data transformations: Applying the Box-Cox transformation. *Practical Assessment Reserch & Evaluation.* 2010;15:1-9.
- [214] Akaike H: A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control.* 1974;19:716-723.

- [215] Montuschi P: Analysis of exhaled breath condensate in respiratory medicine: methodological aspects and potential clinical applications. *Ther Adv Respir Dis.* 2007;1:5-23.
- [216] Chavis C, van VT, Chanez P i wsp.: Leukotriene E4 plasma levels in adult asthmatic patients with variable disease severity. *Allergy.* 1997;52:589-592.
- [217] Brockmann PE, Castro-Rodriguez JA, Holmgren NL i wsp.: Urinary leukotriene excretion profile in children with exercise-induced asthma compared with controls: A preliminary study. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2011;
- [218] Aggarwal S, Moodley YP, Thompson PJ i wsp.: Prostaglandin E2 and cysteinyl leukotriene concentrations in sputum: association with asthma severity and eosinophilic inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2010;40:85-93.
- [219] Wenzel SE, Larsen GL, Johnston K i wsp.: Elevated levels of leukotriene C4 in bronchoalveolar lavage fluid from atopic asthmatics after endobronchial allergen challenge. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142:112-119.
- [220] Ono E, Mita H, Taniguchi M i wsp.: Comparison of cysteinyl leukotriene concentrations between exhaled breath condensate and bronchoalveolar lavage fluid. *Clin Exp Allergy.* 2008;38:1866-1874.
- [221] Bloemen K, Verstraelen S, Van Den Heuvel R i wsp.: The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunol Lett.* 2007;113:6-18.
- [222] Kostikas K, Papatheodorou G, Psathakis K i wsp.: Prostaglandin E2 in the expired breath condensate of patients with asthma. *Eur Respir J.* 2003;22:743-747.
- [223] Mastalerz L, Sanak M, Gawlewicz-Mroccka A i wsp.: Prostaglandin E2 systemic production in patients with asthma with and without aspirin hypersensitivity. *Thorax.* 2008;63:27-34.
- [224] Trudeau J, Hu H, Chibana K i wsp.: Selective downregulation of prostaglandin E2-related pathways by the Th2 cytokine IL-13. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:1446-1454.
- [225] Topper JN, Cai J, Stavarakis G i wsp.: Human prostaglandin transporter gene (hPGT) is regulated by fluid mechanical stimuli in cultured endothelial cells and expressed in vascular endothelium in vivo. *Circulation.* 1998;98:2396-2403.
- [226] Janicka M, Kot-Wasik A, Kot J i wsp.: Isoprostanes-biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluating oxidative stress and analysis. *Int J Mol Sci.* 2010;11:4631-4659.
- [227] Levy BD, Bonnans C, Silverman ES i wsp.: Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172:824-830.
- [228] Antczak A, Montuschi P, Kharitonov S i wsp.: Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in aspirin-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:301-306.

- [229] Panettieri RA, Tan EM, Ciocca V i wsp.: Effects of LTD4 on human airway smooth muscle cell proliferation, matrix expression, and contraction In vitro: differential sensitivity to cysteinyl leukotriene receptor antagonists. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19:453-461.
- [230] Medina L, Perez-Ramos J, Ramirez R i wsp.: Leukotriene C4 upregulates collagenase expression and synthesis in human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1224:168-174.
- [231] Henderson WR, Jr., Tang LO, Chu SJ i wsp.: A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:108-116.
- [232] Giouleka P, Papatheodorou G, Lyberopoulos P i wsp.: Body mass index is associated with leukotriene inflammation in asthmatics. *Eur J Clin Invest.* 2011;41:30-38.
- [233] Shibata A, Katsunuma T, Tomikawa M i wsp.: Increased leukotriene E4 in the exhaled breath condensate of children with mild asthma. *Chest.* 2006;130:1718-1722.
- [234] Woolley KL, Gibson PG, Carty K i wsp.: Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154:237-243.
- [235] Oh JW, Lee HB, Kim CR i wsp.: Analysis of induced sputum to examine the effects of inhaled corticosteroid on airway inflammation in children with asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1999;82:491-496.
- [236] Cai Y, Carty K, Henry RL i wsp.: Persistence of sputum eosinophilia in children with controlled asthma when compared with healthy children. *Eur Respir J.* 1998;11:848-853.
- [237] Malcher-Lopes R, Franco A, Tasker JG: Glucocorticoids shift arachidonic acid metabolism toward endocannabinoid synthesis: a non-genomic anti-inflammatory switch. *Eur J Pharmacol.* 2008;583:322-339.
- [238] Roviezzo F, Getting SJ, Paul-Clark MJ i wsp.: The annexin-1 knockout mouse: what it tells us about the inflammatory response. *J Physiol Pharmacol.* 2002;53:541-553.
- [239] Leff AR: Regulation of leukotrienes in the management of asthma: biology and clinical therapy. *Annu Rev Med.* 2001;52:1-14.
- [240] Hatziagorou E, Tsanakas J: Assessment of airway inflammation with exhaled NO measurement. *Hippokratia.* 2007;11:51-62.
- [241] Horvath I, Barnes PJ: Exhaled monoxides in asymptomatic atopic subjects. *Clin Exp Allergy.* 1999;29:1276-1280.
- [242] Brasier AR, Victor S, Boetticher G i wsp.: Molecular phenotyping of severe asthma using pattern recognition of bronchoalveolar lavage-derived cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:30-37.

- [243] Rosias PP, Robroeks CM, Kester A i wsp.: Biomarker reproducibility in exhaled breath condensate collected with different condensers. *Eur Respir J.* 2008;31:934-942.

Spis rysunków

Rysunek 1.	Schemat biosyntezy eikozanoidów	17
Rysunek 2.	Zestaw kolekcjonujący EBC - EcoScreen.....	41
Rysunek 3.	Stężenia eikozanoidów u chorych na astmę i grupy kontrolnej o istotnej różnicy między grupami.....	49
Rysunek 4.	EACR dla chorych na astmę i grupy kontrolnej	52
Rysunek 5.	Wykres krzywej ROC dla EACR.....	52
Rysunek 6.	Wykresy krzywych ROC dla EACR i jego składowych.....	53
Rysunek 7.	Wykresy krzywych ROC dla EACR, $\Delta\%$ FEV1 i FeNO.....	54
Rysunek 8.	Zmienność parametrów chorych na astmę podczas wizyt A, B, C	56
Rysunek 9.	Stężenia najistotniejszych diagnostycznie eikozanoidów (składowe EACR)	59
Rysunek 10.	Kwalifikacja chorych na astmę za pomocą EACR podczas wizyt A, B, C	60

Spis tabel

Tabela 1.	Charakterystyka kliniczna uczestników badania.....	46
Tabela 2.	Stężenia eikozanoidów w EBC (pg/ml)	48
Tabela 3.	Stężenia eikozanoidów u chorych na astmę epizodyczną i grupy kontrolnej o istotnej różnicy między grupami.....	49
Tabela 4.	Kwalifikacja przynależności do grupy dzieci zdrowych lub astmatyków na podstawie EACR	52
Tabela 5.	Porównanie AUC dla EACR i jego składowych.....	53
Tabela 6.	Porównanie AUC dla EACR, $\Delta\%$ FEV1, FeNO.....	54
Tabela 7.	Charakterystyka przebiegu astmy (wizyty A, B, C).....	55
Tabela 8.	Parametry chorych na astmę podczas wizyt A, B, C	55
Tabela 9.	Korelacja pomiarów uzyskanych podczas wizyt A, B, C	57
Tabela 10.	Stężenia eikozanoidów w EBC podczas wizyt A, B, C (pg/ml)	58
Tabela 11.	Korelacja wartości stężeń eikozanoidów wchodzących w skład EACR podczas wizyt A, B, C.....	59
Tabela 12.	Trafność kwalifikacji astmatyków (n=27) za pomocą EACR podczas wizyt A, B, C.....	60
Tabela 13.	Zgodność kwalifikacji astmatyków (n=27) za pomocą EACR podczas wizyt A, B, C.....	61