

# MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKA BRONCHIÁLNÍHO ASTMATU ZALOŽENÁ NA OBSAHU CYSTEINYLOVANÝCH LEUKOTRIENŮ A LIPOXINŮ V KONDENZÁTU VYDECHOVANÉHO VZDUCHU

TEREZA KAČEROVÁ<sup>a,b</sup>, MAREK KUZMA<sup>a</sup>  
a PETR KAČER<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5,  
166 28 Praha 6, <sup>b</sup> Gymnázium Praha 7, Nad Štolou 1,  
170 00 Praha 7  
Petr.Kacer@vscht.cz

Došlo 5.10.16, přijato 25.11.16.

Klíčová slova: bronchiální astma, molekulární diagnostika, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, lipoxiny, cysteinylované leukotrieny

## Úvod

Bronchiální astma je plicní onemocnění, pro které jsou ve většině případů charakteristické záchvaty dušnosti. Astma pak bývá vyvoláno zúžením hyperreaktivních bronchů a nadměrnou sekrecí hlenu, který je nezvykle hustý a vazký. V současné době žije na světě přibližně 350 milionů lidí trpících astmatem a prognózy ukazují, že toto množství bude v budoucnu dále narůstat. Na druhou stranu existuje široká škála antiastmaticky působící farmakoterapie, která většině pacientů umožňuje návrat k plnohodnotnému životu. A právě proto se může zdát, že je astma onemocněním, jehož diagnostika i terapie jsou již uspokojivě vyřešeny. Z toho důvodu je astma velmi často neprávem přehlíženo a pouze odborná část veřejnosti vnímá jeho neustále se zvyšující incidenci, klesající věk prvního záchvatu a nepříznivé odhady jeho budoucího vývoje<sup>1</sup>. Stejně tak je opomíjena úzká skupina astmatiků, pro které je veškerá farmakoterapie neúčinná – obtížně léčitelné astmatiky (OLA), kteří tvoří přibližně 3 % z celkového množství astmatiků, tedy více jak 10 milionů lidí.

Předkládaná práce se zabývá vývojem a aplikací molekulárně-diagnostické metody založené na pro-astmaticky působících cysteinylovaných leukotrienech (cys-LTs)<sup>2</sup> a antiastmaticky působících lipoxinech (LXs). Cílem studie pak bylo stanovit koncentrační hladiny biomarkerů alergické reakce – cys-LTs (konkrétně: LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> a LTE<sub>4</sub>) a látek působících fyziologicky protizánětlivě – LXs (konkrétně: LXA<sub>4</sub>, LXB<sub>4</sub>) v KVV. Obě tyto skupiny biomarkerů jsou generovány různými enzymatickými cestami z arachidonové kyseliny. Kyselina arachidonová

(*cis*-5,8,11,14-eikosatetraenová kyselina) je nenasycená mastná kyselina, která je přítomná ve fosfolipidových buňčných membránách a umožňuje vznik uvedených biomarkerů, které jsou schopny regulovat zánětlivou odpověď. LTs jsou zánětlivé mediátory, které se dělí na dvě skupiny podle svého účinku a místa působení. Do první skupiny patří leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), který vzniká v monocytech, neutrofilech a alveolárních makrofázech. Jeho autakoidním „úkol“ je aktivovat celou řadu imunitních efektorových buněk a je hlavním účastníkem v patogenezi různých zánětlivých onemocnění. Navázání LTB<sub>4</sub> na receptor pak může vést až k zúžení dýchacích cest, zvýšení sekrece hlenu a tvorbě lokálního edému. Mezi cys-LTs pak lze zařadit leukotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), leukotrien D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) a leukotrien E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>), které jsou formovány eozinofily, bazofily, žírnými buňkami a makrofágy. Jejich receptory (cys-LTs receptory) jsou především na buňkách hladkých svalů a tkáních dýchacích cest a navázáním cys-LTs dochází k bronchiální hyperreaktivitě a bronchokonstrukci<sup>2,3</sup>. Na receptor cys-LT<sub>1</sub> se váží všechny cys-LTs a jejich navázáním se vyvolá obstrukce dýchacích cest (stažení průdušek, edém sliznice, zvýšení sekrece hlenu<sup>4</sup>). Receptor cys-LT<sub>2</sub> může být aktivován pouze LTC<sub>4</sub>, který způsobuje stažení plicních cév. Je prokázáno, že hladina cys-LTs v KVV je významně vyšší u pacientů s astmatem oproti zdravým jedincům.

LTs obecně vznikají syntézou z kyseliny arachidonové, kdy působením enzymu 5-lipoxygenasa (5-LO) se arachidonová kyselina oxiduje na 5*S*-hydroperoxyeikosa-6,8,11,14-tetraenovou kyselinu (5*S*-HPETE). 5-HPETE se LTA syntetizací přemění na vysoce reaktivní leukotrien A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>), který se ihned metabolizuje při zánětlivých procesech, čímž vznikají další „členové rodiny cys-LTs“ (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, LTF<sub>4</sub>)<sup>3</sup>.

Naproti tomu LXs a jejich epimery 15-epi-lipoxiny mají v organismu přesně opačnou funkci, jedná se totiž o protizánětlivé mediátory. Zároveň jsou LXs schopny podporovat rekonstrukční proces, ke kterému dochází v plicích ihned po astmatickém záchvatu. LXs stejně jako LTs vznikají metabolicky z arachidonové kyseliny, existují ovšem hned tři možné cesty vzniku. První z nich je zprostředkována 15-lipoxygenasou (15-LO)<sup>5</sup>, která je přítomna v tkáňových buňkách dýchacích cest a zahajuje tak biosyntézu LXs. Druhá cesta je podmíněna oxidací leukotrienu A<sub>4</sub> za pomoci 12-lipoxygenasy (12-LO). Tyto dvě syntézy pak nejen umožňují produkci LXs, ale zároveň redukuje produkci LTs. Poslední cesta je podmíněna acetylsalicylovou kyselinou (ASA) a dochází k ní zejména u pacientů trpících zvláštním fenotypem astmatu – aspirinem indukovaným astmatem.

Vyvinutá metoda pak byla použita v několika případových studiích, které byly zaměřeny na několik oblastí molekulární diagnostiky a to možnosti fenotypizace bronchiálního astmatu a možnost oddělit právě OLA pacienty, posouzení účinnosti antiastmatické farmakoterapie, případně posouzení efektivnosti různých aplikačních cest antiastmaticky působících farmak. Rovněž možnost oddělení pacientů s astmatem od chronické obstrukční nemoci plic-

ní na úrovni vyvinuté molekulárně-diagnostické metody, která byla rozšířena o některé další biomarkery (biomarker oxidačního stresu – 8-isoprostan).

## Experimentální část

### Chemikálie

Standarty: leukotrien  $C_4$  ( $\geq 97\%$ ), leukotrien  $D_4$  ( $\geq 97\%$ ), leukotrien  $E_4$  ( $\geq 97\%$ ), leukotrien  $C_4-d_5$  ( $\geq 99\%$ ), leukotrien  $D_4-d_5$  ( $\geq 99\%$ ), leukotrien  $E_4-d_5$  ( $\geq 99\%$ ), lipoxin  $A_4-d_5$  ( $\geq 95\%$ , Cayman Chemicals, USA). Pomocné chemikálie: acetonitril (LC-MS, Fisher Scientific, USA), voda (LC-MS, Fisher Scientific, USA), octan amonný (99,99%, Sigma-Aldrich, USA), propan-2-ol (LC-MS, Acros Organics, USA), methanol (LC-MS, Fisher Scientific, USA), kyselina mravenčí (LC-MS, Fisher Scientific, USA), kyselina octová ( $\geq 99,8\%$ , Acros Organics, USA), butylhydroxytoluen (BHT) ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, USA). Plyny: dusík (99,5%, Generátor dusíku, Peak Scientific, USA), helium (5.5, SIAD, Česká republika), argon (5.0, SIAD, Česká republika).

### Analytické podmínky

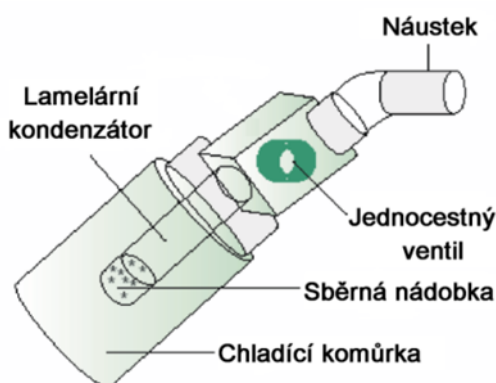
HPLC-MS analýzy pro stanovení cysteinylovaných leukotrienů a lipoxinů byly prováděny na hmotnostním spektrometru s trojitým kvadrupólem TSQ Vantage (Thermo Scientific, USA) spojeném s kvartérní vysokotlakou pumpou Accela 600 Pump (Thermo Scientific, USA), autosamplerem Open Accela AS (Thermo Scientific, USA) a kolonovým termostatem UltiMate 3000 (Dionex, USA).

Metabolické profilování: izokratická separace látek byla provedena metodou HPLC. Jako stacionární fáze byla použita kolona Hypercarb ( $100 \times 2,1$  mm,  $5 \mu\text{m}$ ; Thermo Scientific, USA) a mobilní fáze se skládala ze směsi o složení 75 % propan-2-ol s přísadkou kyseliny mravenčí (1% v/v) a 25 % octanu amonného ( $10 \text{ mmol l}^{-1}$ , vodný roztok). Průtok mobilní fáze byl nastaven na  $150 \mu\text{l min}^{-1}$

a byl po celou dobu měření konstantní. Chromatografická kolona byla temperována na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Objem nástřiku činil  $10 \mu\text{l}$ . Detekce byla provedena tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) s elektrosprejem pracujícím v negativním ionizačním módu (ESI<sup>-</sup>). ESI-MS analýza byla provedena v SRM (selected reaction monitoring) módu, monitorováním charakteristického přechodu ( $m/z \rightarrow m/z$ , kolizní energie (eV)): LTC<sub>4</sub> ( $624,1 \rightarrow 351,2$ , 17 eV); LTD<sub>4</sub> ( $495,2 \rightarrow 477,3$ , 16 eV); LTE<sub>4</sub> ( $438,2 \rightarrow 333,1$ , 16 eV); LXA<sub>4</sub> ( $351,2 \rightarrow 115,0$ , 17 eV); LXB<sub>4</sub> ( $351,2 \rightarrow 221,1$ , 17 eV) a kvantifikací s využitím deuteriem značených vnitřních standardů (LTC<sub>4-d\_5</sub>, LTD<sub>4-d\_5</sub>, LTE<sub>4-d\_5</sub>, LXA<sub>4-d\_5</sub>, LXB<sub>4-d\_5</sub>). Podmínky na hmotnostním spektrometru byly optimalizovány na následující hodnoty: napětí na jehle ( $-2500 \text{ V}$ ), tlak nosného plynu (dusík, 35 psi), tlak pomocného plynu (dusík, 10 arb), teplota kapiláry ( $300 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Data byla měřena a zpracovávána softwarem XCalibur 2.2, Sieve 2.1 (Thermo Scientific, USA), XLSTAT 2015 (Addinsoft, USA). Bylo provedeno profilování metabolitů vzniklých z kyseliny arachidonové (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, LXA<sub>4</sub>, LXB<sub>4</sub>) a grafické výstupy byly vyjádřeny pomocí krabicových diagramů a rozptylových diagramů komponentního skóre.

### Odběr klinických vzorků

Při odběru kondenzátu vydechaného vzduchu (KVV)<sup>6-9</sup> je pacientem vydechaný vzduch veden skrz kondenzátor, kde jsou zkapalněny všechny kondenzující složky. Vydechaný vzduch prochází náustkem přes jednocestný ventil do chladicího boxu, který je už předem vychlazen na teplotu  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . V tomto chladicím boxu se získaná plynná fáze a aerosolové částice zkapalní<sup>6</sup> a vzniklá kapalina se stále za nízké teploty shromáždí do sběrné nádoby (obr. 1). Celý proces odběru trvá přibližně 7–12 min. Celkově je nutné dosáhnout objemu 120 litrů vydechnutého vzduchu, čímž lze získat 1–2 ml kondenzátu. Takto získaný kondenzát se následně vloží do mikrozskumavky. Bezprostředně po odběru je vzorek označen deuterovanými standardy<sup>9</sup>, které slouží k monitoringu degradačních



Obr. 1. Přístroj k odběru kondenzátu vydechaného vzduchu<sup>6</sup>

procesů. Tímto způsobem je získán vzorek, který se skládá při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zamražený vzorek s přidavkem deuteriem značených standardů byl vložen do lyofilizátoru (Labconco Free Zone, USA) při  $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$  a tlaku 9 kPa po dobu 6 hodin. Lyofilizovaný zbytek byl rozpuštěn v mobilní fázi ( $50\text{ }\mu\text{l}$ ) a okamžitě analyzován LC-ESI-MS/MS.

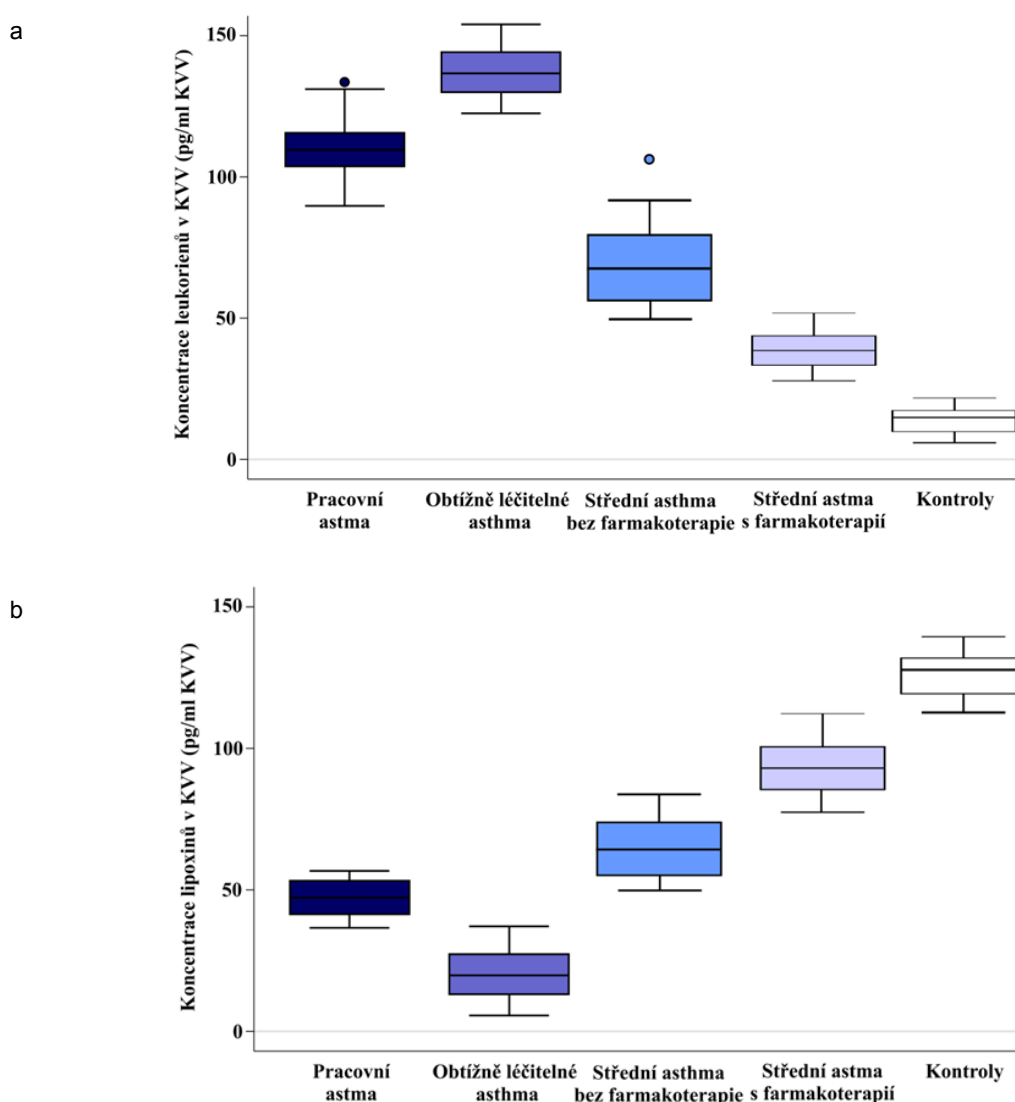
## Výsledky a diskuse

Fenotypizace astmatu založená na rovnováze mezi cys-LTs a LXs

V rámci práce byly provedeny HPLC-MS analýzy, kdy byla získána data o koncentračních úrovních výše

zmíněných látek v klinických vzorcích pacientů s vybranými fenotypy astmatu.

Do studie byla zapojena skupina OLA, která obsahovala 60 osob, z toho 35 žen a 25 mužů, medián věku 54 let. Dále skupinu pacientů s profesním astmatem obsahující 50 osob, z toho 27 žen a 23 mužů, kdy medián věku byl 56 let. Skupina astmatiků se středně těžkým astmatem s léčbou glukokortikoid se skládala ze 42 osob, z toho 23 žen a 19 mužů, kdy medián věku byl 47 let. Skupina středně těžkých pacientů bez léčby glukokortikoidy pak obsahovala 33 osob, z toho 18 žen a 15 mužů, medián věku 54 let. Kontrolní skupina, zdraví nekuřáci bez diagnózy astmatu a alergie, čítala 30 osob, z toho 16 žen a 14 mužů, medián věku 43 let.



Obr. 2. a) Statisticky vyhodnocená klinická studie: hodnoty hladin cysteinylovaných leukotrienů u různých fenotypů astmatu, b) statisticky vyhodnocená klinická studie: hodnoty hladin lipoxinů u různých fenotypů astmatu

Z výsledků (obr. 2) je zřejmé, že v KVV astmatiků bylo nalezeno zvýšené množství zánětlivých cys-LTs, přičemž hladina u pacientů s OLA byla nejvyšší ze všech pozorovaných skupin. Naproti tomu hladiny protizánětlivých LXs byly významně zvýšeny u skupiny zdravých dobrovolníků a naopak u OLA pacientů byly tyto hladiny nejnižší.

Z výsledků vyplývá, že cys-LTs a LXs mohou sloužit pro diferenciální diagnostiku astmatu. Při diagnostice pak lze vycházet ze skutečnosti, že koncentrační hladiny cys-LTs a LXs jsou doplňkové a existuje mezi nimi vztah dynamické rovnováhy (tj. pokud roste koncentrační hladina prozánětlivých LTs, tak příslušně klesá hladina protizánětlivých LXs). Tento fakt je dán skutečností, že biochemické syntézy v organismu (mateřská molekula:  $LTA_4$  produkovaný za pomoci lipoxxygenas) umožňující produkci LXs, zároveň redukuje produkci LTs a naopak. Kombinace těchto dvou skupin biomarkerů tak představuje velice zajímavou možnost z hlediska molekulární diagnostiky, která může být použita pro fenotypizaci astmatu. Na obr. 2a a 2b je popsán princip rovnováhy mezi protizánětlivými LXs na straně jedné a prozánětlivými cys-LTs na straně druhé („princip houpačky“), což zpřesňuje stávající diagnostiku a umožňuje rozdělení astmatiků do skupin:

- profesní (pracovní) astma,
- přetrvávající střední astma bez farmakoterapie glukokortikoidy,
- přetrvávající střední astma s farmakoterapií glukokortikoidy,
- obtížně léčitelné astma,
- kontrolní skupina.

Vyvinutá metoda je pro pacienta nezatěžující a lze ji aplikovat na širokou škálu pacientů od dětí až po seniory. Jelikož je možné odběr KVV opakovat v krátkých intervalech, je tato metoda vhodná pro řadu klinických studií s cílem porozumět dějům, které se odehrávají v dýchacích

cestách jako odpověď na jistý konkrétní impuls (alergeny, klimatické podmínky, kvalita ovzduší, teplota vzduchu, fyzická aktivita ad.).

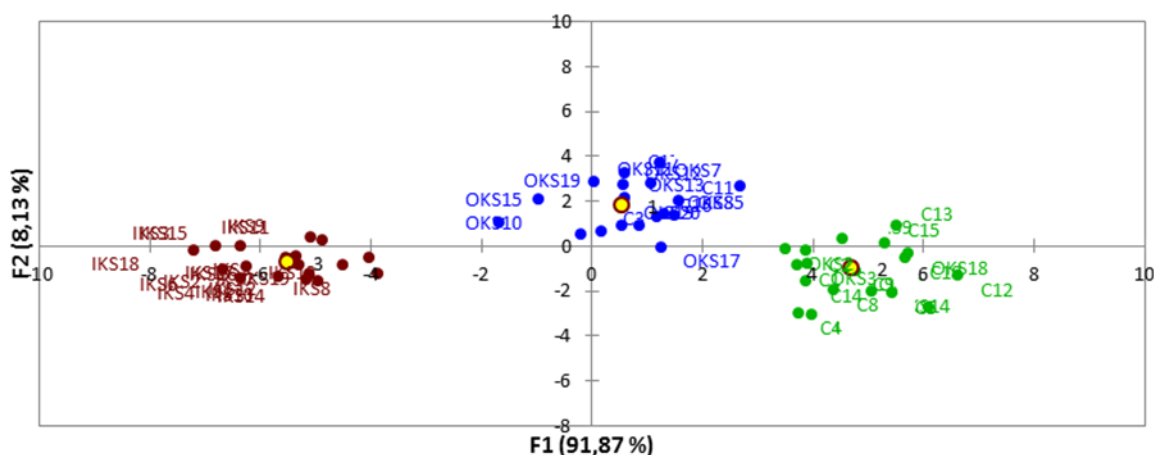
#### Monitorování efektivity použité farmakoterapie astmatu

Takto vyvinutá metodika využitelná v diagnostice astmatických onemocnění byla využita v paralelní studii, kdy byla ověřena možnost jejího využití pro monitorování účinnosti antiastmatické farmakoterapie, v tomto případě farmakoterapie steroidními léčivými na bázi glukokortikoidů. Výsledky jsou shrnuty na obr. 3, kde je zachycena klinická studie zahrnující 30 subjektů s farmakoterapií inhalačními glukokortikoidy, 30 subjektů po perorální kortikosteroidní terapii a 30 subjektů kontrolní skupiny.

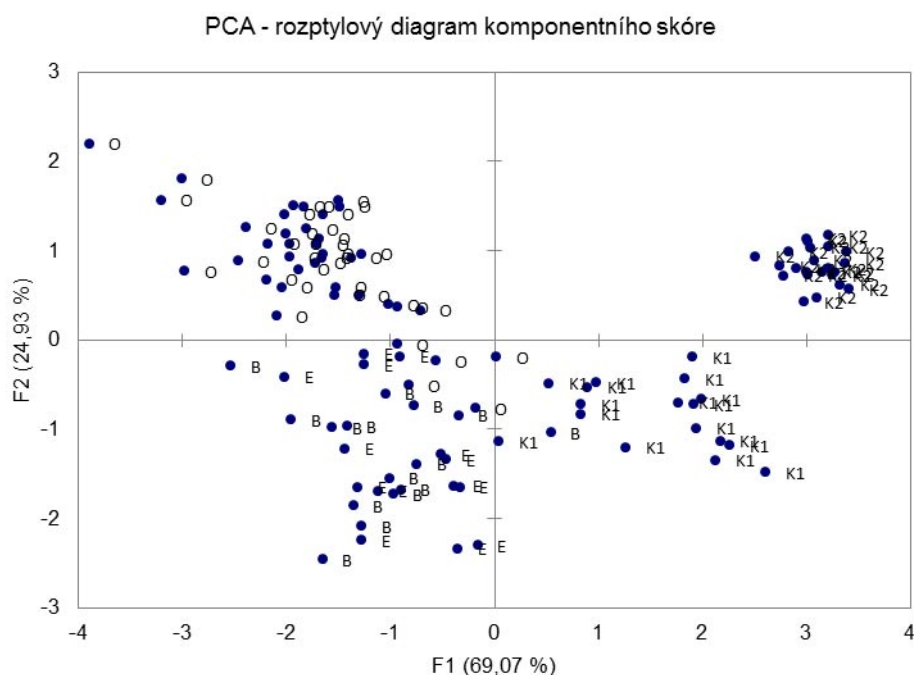
Z předložených výsledků je zřejmé, že došlo k vytvoření tří shluků (klastrů), kdy první skupina obsahovala pouze kontrolní skupinu pacientů, a zbylé dvě skupiny se oddělily podle způsobu aplikace farmakoterapie. Z obdržených výsledků je zřejmé, že předepsané dávkování a aplikace jsou vhodnější v případě perorálního podání, kdy se tento shluk více blíží zdravým jedincům, na rozdíl od shluku představujícího pacienty s inhalační terapií. Z výsledků také vyplývá, že vyvinutou metodiku je možno využít k monitorování účinnosti předepsané terapie, čímž bude v budoucnu možno zpřesnit farmakoterapii astmatu, kontrolovat dávkování a využívat další metody tzv. personalizované medicíny.

#### Molekulární diagnostika dalších plicních onemocnění

Vyvinutá metoda nabízí celou řadu dalších rozšíření, kdy jedním z nich je možnost stanovovat v KVV další biomarkery např. oxidačního stresu (8-isoprostan, malon-



Obr. 3. Výsledek klinické studie (klasterová analýza): kontrolní skupina (C), astmatici léčení perorálními glukokortikoidy (OKS), astmatici léčení inhalačními glukokortikoidy (IKS)



Obr. 4. Výsledky klinické studie (klastrová analýza): oddělení pacientů s CHOPN (B – bronchitida, E – emfyzém) od OLA pacientů (O); současně jsou znázorněny kontrolní skupiny: K1 – kontrola k CHOPN a K2 – kontrola k OLA

dialdehyd, *o*-tyrosin, ad.), zánětlivé reakce (LTB<sub>4</sub>, ad.), což by mohlo vést k diagnostice dalších plicních onemocnění. Příkladem aplikace vyvinuté metodiky může být její využití k posouzení molekulárních rozdílů mezi skupinou astmatiků a pacientů s chronickou obstrukční nemocí plicní (CHOPN).

Skupina OLA obsahovala 60 osob, z toho 35 žen a 25 mužů, medián věku 54. Kontrolní skupina, zdraví nekuřáci bez diagnózy astmatu a alergie, čítala 30 osob, z toho 16 žen a 14 mužů, medián věku 43 let. Skupina CHOPN obsahovala 29 osob, z toho 7 žen a 22 mužů, medián věku 68. Kontrolní skupina, zdraví nekuřáci, čítala 17 lidí, z toho 6 žen a 11 mužů, věku činil 64 let.

Analýza hlavních komponent rozdělila pacienty a kontroly na 4 shluky, představující skupinu OLA (O), jejich kontrolní skupinu (K2), skupinu CHOPN (kdy se avšak nepodařilo rozdělit skupinu CHOPN na fenotypy bronchitidu (B) a emfyzém (E)) a kontrolní skupinu CHOPN (K1). Tento výsledek pak poskytuje vysokou perspektivu pro oddělení diagnózy astma od CHOPN, což v klinické praxi je značně problematickou záležitostí (obr. 4).

## Závěr

Předkládaná práce je orientována do oblasti medicínské diagnostiky a jejím cílem bylo provést fenotypizaci obstrukčních plicních onemocnění z oblasti bronchiálního astmatu na základě detekce a kvantifikace biomarkerů přítomných v KVV, jakožto ve vysoce specifické matici pro dýchací soustavu. Primárním cílem bylo tímto molekulárně diagnostickým přístupem prověřit skupinu OLA pacientů, kteří nereagují adekvátně na podávanou antiastmatickou farmakoterapii.

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

Vyvinuté analytické metody byly testovány v klinických studiích. Bylo provedeno porovnání koncentračních hladin známých biomarkerů v KVV u osob trpících OLA a u kontrolních skupin zdravých dobrovolníků. Kvantifikace známých biomarkerů v KVV poukázala na významný nárůst cys-LTs u OLA pacientů a významný pokles antiastmaticky působících LXs. Hladina LXs byla naopak zvýšena u skupiny zdravých dobrovolníků. Jako významný výsledek pak lze hodnotit možnost fenotypizace

astmatiků, kterou umožnilo využití rovnováhy mezi cys-LTs a LXs.

Díky skutečnosti, že je odběr KVV pro pacienta prakticky nezátěžující, lze tuto metodu použít i k monitorování efektivity používané farmakoterapie případně ke sledování vnějších faktorů ovlivňujících průběh astmatu. Navíc tato metoda v kombinaci s dalšími biomarkery umožňuje i molekulární diagnostiku jiných plicních onemocnění, jako je například oddělení CHOPN a astmatu s vysokou spolehlivostí.

#### Seznam zkratk

5S-HPETE	5S-hydroperoxyeikosa-6,8,11,14-tetraenová kyselina
5-LO	5-lipoxygenasa
12-LO	12-lipoxygenasa
15-LO	15-lipoxygenasa
ASA	acetylsalicylová kyselina
CID	collision induced dissociation = kolizně-indukovaná disociace
cys-LTs	cysteinyllované leukotrieny
cys-LT <sub>1</sub>	receptor cysteinyllovaných leukotrienů 1
cys-LT <sub>2</sub>	receptor cysteinyllovaných leukotrienů 2
ESI	electrosprey ionization = elektrosprejová ionizace
HPLC	high performance liquid chromatography = vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHOPN	chronická obstrukční nemoc plicí
KVV	kondenzát vydechaného vzduchu
LTs	leukotrieny
LTA <sub>4</sub>	leukotrien A <sub>4</sub>
LTB <sub>4</sub>	leukotrien B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	leukotrien C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	leukotrien D <sub>4</sub>
LTE <sub>4</sub>	leukotrien E <sub>4</sub>
LTF <sub>4</sub>	leukotrien F <sub>4</sub>
LXs	lipoxiny
MS/MS	tandem mass spectrometry = tandemová hmotnostní spektrometrie
OLA	obtížně léčitelné astma
SRM	selective reaction monitoring = selektivní monitorování reakcí

*Autoři by rádi poděkovali za finanční podporu Národnému programu udržitelnosti I číslo LO-1215 (MŠMT – 34870/2013).*

#### LITERATURA

- Holz O., Kips J., Magnussen H.: Eur. Respir. J. 16, 355 (2000).

- Csoma Z., Kharitonov S. A., Balint B., Busch A., Wilson N. M., Barnes P. J.: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166, 1345 (2002).
- Higashi N., Mita H., Ono E., Fukutomi Y., Yamaguchi H., Kajiwara K., Tanimoto H., Sekiya K., Akiyama K., Taniguchi M.: J. Allergy Clin. Immunol. 125, 1084 (2010).
- Chappell G. P., Xiao X., Pica-Mendez A., Varnell T., Green S., Tanaka W. K., Laterza O.: J. Chromatogr. B 879, 277 (2011).
- Syslova K., Kacer P., Kuzma M., Pankracova A., Fenclova Z., Vlckova S., Lebedova J., Pelclova D.: J. Breath Res. 4 (1), 017104/1 (2010).
- Sapey E. (ed.): *Bronchial Asthma: Emerging Therapeutic Strategies*. InTech, Rijeka 2012.
- Montuschi P.: *New perspectives in monitoring lung inflammation. Analysis of exhaled breath condensate*, str. 11. CRC Press, Boca Raton 2005.
- Samitas K., Chorianoopoulos D., Vittorakis S., Zervas E., Economidou E., Papatheodorou G., Loukides S., Gaga M.: Respir. Med. 103, 750 (2009).
- Syslová K., Kačer P., Kuzma M., Klusáčková P., Fenclová Z., Lebedová J., Pelclová D.: J. Chromatogr. B 867, 8 (2008).

#### **T. Kačerová, M. Kuzma, and P. Kačer (University of Chemistry and Technology, Prague): Molecular Diagnosis of Bronchial Asthma Based on the Content of Cysteinyl Leukotrienes and Lipoxines in Exhaled Breath Condensate**

This work was engaged to enhancing the diagnostics of bronchial asthma, with the main emphasis on non-invasive approaches, effective differentiation and phenotypic background. In particular, a methodology is described, based on monitoring of a highly specific matrix - exhaled breath condensate (EBC), applied to asthma patients. The previous method, based on the biomarkers of cysteinyl leukotrienes, was extended with anti-asthmatic lipoxines, yielding a novel correlation to different asthma phenotypes. Moreover, inverse relationship between the pro-inflammatory and anti-inflammatory biomarkers was found and herein depicted. The developed methodology was used in a clinical study, which confirmed its applicability for asthma phenotyping. The method also enables differentiating a severe form of refractory asthma, i.e. asthma irresponsive to any kind of currently available pharmacotherapy. It was also proved that the method can be used for monitoring of the disease genesis and the efficiency of an administered pharmacotherapy. Finally, the method allows a reliable differentiation of asthma and chronic obstructive pulmonary disease.