

VÝVOJ NEINVAZIVNÍ DIAGNOSTIKY *Asthma bronchiale*

KAMILA SYSLOVÁ^{a*}, JAN PŘECH^a,
JINDŘIŠKA LEBEDOVÁ^b, DANIELA
PELCLOVÁ^b a PETR KAČER^a

^a Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Klinika nemocí z povolání, 1. lékařská fakulta, Universita Karlova, Na Bojišti 1, 120 00 Praha 2
kamila.syslova@vscht.cz

Došlo 1.6.07, přepracováno 1.4.08, přijato 17.4.08.

Klíčová slova: *Asthma bronchiale*, cysteinylované leukotrieny, LC-MS, kondenzát vydechaného vzduchu, imunoseparace

Úvod

Asthma bronchiale je civilizační onemocnění, jehož výskyt v moderní populaci neustále roste jako důsledek zvyšujícího se počtu alergenů v životním prostředí. Včasná diagnostika uvedeného onemocnění hraje důležitou roli z hlediska zahájení účinné terapie a minimalizace poškození pacienta. V současné době v praxi používané diagnostické metody spočívají v kombinaci invazivních (bronchiální biopsie¹, bronchoalveolární laváž²) a semi-invazivních metod (metoda indukovaného sputa³), které jsou pro pacienta zatěžující a u některých pacientů, zejména dětí a seniorů, mohou být až stresovou záležitostí. Analýza dechového kondenzátu je poměrně novou metodou, jež představuje alternativní cestu, kterou lze charakterizovat jako zcela neinvazivní a pro pacienta nezatěžující. Kondenzát vydechaného vzduchu (KVV) je kapalnou maticí, která odráží složení bronchoalveolární extracelulární plicní tekutiny, jejíž složení koresponduje s ději odehrávajícími se bezprostředně v plicích a dýchacích cestách. Látky obsažené ve vydechaném vzduchu se nacházejí ve dvou fázích – v plynné a v kapalně (ve formě aerosolů). V plynné fázi jsou vedle dusíku, kyslíku, oxidu uhličitého, oxidu uhelnatého a oxidu dusnatého přítomny látky s dostatečnou tenzí par při tělesné teplotě a atmosférickém tlaku – voda, peroxid vodíku, uhlovodíky a řada dalších organických látek. Molekuly málo těkavých látek se do KVV dostávají jako aerosolové částice, které jsou strhávány z povrchu sliznice proudem vzduchu. Aerosolové částice

a látky těkavé při tělesné teplotě mohou být zkondenzovány při dýchání přes chladicí zařízení – kondenzátor vydechaného vzduchu, které je dostupné na specializovaných klinických pracovištích. Vzniklá kapalina je označována jako kondenzát vydechaného vzduchu a obsahuje celou řadu z medicínského hlediska zajímavých látek – eikosanoidy (metabolity kyseliny arachidonové), peptidy, enzymy, DNA ad., kterých bylo k dnešnímu dni identifikováno⁴ více než 200. Některé z nich jsou považovány za citlivé biomarkery plicních onemocnění (leukotrien B₄ – LTB₄, cysteinylované leukotrieny C₄, D₄ a E₄ – LTC₄, LTD₄, LTE₄, 8-isoprostan aj.). Na základě stanovení jejich obsahu v KVV lze posoudit typ probíhajícího patologického procesu, rozsah onemocnění, případně úspěšnost terapeutického postupu. V případě *Asthma bronchiale* představují skupinu biomarkerů obsažených v KVV cysteinylované leukotrieny (cys LTs), jejichž koncentrace je v důsledku probíhající alergické reakce v dýchacích cestách a plicích významně zvýšena. Jedná se o metabolity kyseliny arachidonové, která je obsažena v buněčných membránách jako součást membránových fosfolipidů^{5,6}. Činností enzymu 5-lipoxygenasy se kyselina arachidonová přeměňuje na nestabilní epoxidový leukotrien A₄ (LTA₄), který může být dále přeměňován podle jedné ze dvou možných enzymatických drah. Při zánětlivých procesech v organismu se působením LTA₄ hydrolasy syntetizuje ve zvýšeném množství leukotrien B₄. Paralelní cestu pak představuje dráha, která je ve zvýšené míře preferována v průběhu alergických reakcí, kdy účinkem enzymu LTC₄ syntetasy vzniká první člen z rodiny cysLTs, a to leukotrien C₄. K cysLTs dále řadíme leukotrien D₄ a leukotrien E₄. Cys LTs se postupně přeměňují v řadě LTC₄ → LTD₄ → LTE₄ působením enzymů γ -glutamyltranspeptidasy (LTC₄ → LTD₄) a dipeptidasy (LTD₄ → LTE₄)⁷.

V řadě prací bylo popsáno stanovení cys LTs v různých tělních tekutinách (krevní plasma, moč, likvor a KVV) s využitím rozdílných analytických metod, jako je RIA (Radioimmunoassay)⁸, EIA (Enzyme Immunoassay)^{9–12}, ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)¹³, případně GC-MS^{14,15} nebo LC-MS. Biochemickými metodami lze stanovit řádově nižší koncentrace látek, než jakých je dnes dosahováno použitím hmotnostně-spektrometrických metod (GC-MS, LC-MS), nicméně meze detekce těchto instrumentálních metod se v průběhu posledního desetiletí dostaly na úroveň piko-, femto-, případně attomolů, což je plně postačující pro detekci většiny biologicky aktivních látek vyskytujících se v lidském organismu. Fyziologické koncentrace cys LTs v KVV se pohybují v rozmezí 1 až 200 pg ml⁻¹. Spojení kapalinové, případně plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem poskytuje oproti biochemickým metodám nejenom kvantitativní informaci, ale rovněž i informaci strukturní (kvalitativní), která je při

* Kamila Syslová získala s touto prací 1. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2007 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie.

využití MSⁿ technik vysoce specifická. Tím jsou vyloučeny falešně pozitivní či negativní výsledky, které se v důsledku „zkřížených reakcí“ vyskytují u imunochemických nebo enzymatických metod. Nevýhodou techniky GC-MS je tepelný převod látky do plynné fáze, který u termolabilních látek komplikuje získání obou typů informace.

Předkládaná práce popisuje metodu kombinující specifickou separaci – imunoafinitní extrakci – s vysoce selektivní detekcí (LC-MS) při stanovení cys LTs v matrici KVV. Cys LTs jako biomarkery *Asthma bronchiale* stanovené uvedenou metodou mohou sloužit k diferenciální diagnostice uvedeného onemocnění, což nabízí alternativu k existujícím diagnostickým metodám. Vyvinutá metoda, respektující řadu omezení vyplývajících z nízké stability cys LTs, byla úspěšně testována v klinických studiích zabývajících se diagnostikou bronchiálního astmatu a posouzením změn koncentrací cys LTs v důsledku denního biorytmu organismu, případně monitorováním astmatické reakce při histaminovém testu.

Experimentální část

Chemikálie

Chemikálie byly komerčního původu: cysteinylované leukotrieny (LTC₄, LTD₄, LTE₄), [20, 20, 20 ²H₃] leukotrien E₄ (LTE₄-d₃) – (Biomol, Německo), afinitní sorbent pro cysteinylované leukotrieny – (Cayman chemicals, USA), acetonitril, voda, methanol, (čistota LC/MS) – (Riedel de Haën, Německo), kyselina mravenčí, triethylamin (p.a.) – (Aldrich, USA).

Odběr dechového kondenzátu

KVV byl získáván prostřednictvím kondenzátoru vydechovaného vzduchu EcoScreen – (Jaeger, Německo) a byl shromažďován do polypropylenových sběrných nádobek (5 ml). Bezprostředně po odběru vzorku bylo do 1 ml KVV přidáno 250 pg LTE₄-d₃. Nepřítomnost slin v KVV se prokazovala testem na α-amylasu (aktivita < 0,1 %) pomocí soupravy Biolatest Kit – (Pliva-Lachema, Česká republika).

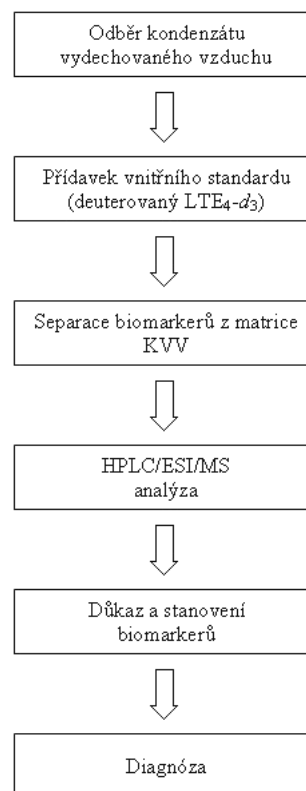
Imunoafinitní separace

Imunoafinitní extrakce byla prováděna následujícím postupem: k 1 ml KVV označenému LTE₄-d₃ bylo přidáno 50 μl afinitního sorbentu pro cys LTs. Suspenze byla míchána na třepače po dobu 60 min. Následně byl sorbent odstředěn (500 ot. min⁻¹, 10 min) a promyt 2 × 1 ml deionizované vody. K promytému sorbentu byl přidán methanol (2 × 0,5 ml) a po pětiminutovém protřepání byl sorbent odstředěn při 2500 ot. min⁻¹. Z methanolicých podílů byl odpařen methanol proudem dusíku. Zbytek po odpaření byl rozpuštěn v 50 μl mobilní fáze a podroben LC-ESI-MS analýze.

LC-ESI-MS byla realizována v systému vybaveném dvěma vysokotlakými pumpami Varian ProStar 210 (Varian, USA), autosamplerem Varian 410 (Varian, USA). Chromatografické dělení vzorku (nastříkované množství 20 μl) bylo realizováno na koloně Hypercarb Thermo (Thermo, USA) 100 × 2,1 mm × 5 μm s použitím mobilní fáze o složení acetonitril : voda = 70 : 30 (v/v) s pH upraveným triethylaminem na hodnotu 11 a průtokem 250 μl min⁻¹. Přístroj byl vybaven trojitým kvadrupólovým analyzátozem Varian 1200L (Varian, USA). Při měření bylo použito negativní elektrosprejové ionizace (ESI) v MRM módu. Podmínky na hmotnostním spektrometru byly následující: napětí na kapiláře –70 V, tlak kolizního plynu argonu 0,2 Pa, napětí na jehle –4500 V, teplota sušícího plynu 300 °C (dusík, 117 kPa) a teplota zmlžovacího plynu 50 °C (vzduch, 345 kPa).

Výsledky a diskuse

Analýza specifických látek (biomarkerů) obsažených v KVV je poměrně novou, rychle se rozvíjející oblastí v oboru lékařské diagnostiky. Biomarkery jsou označovány látky produkované organismem, jejichž fyziologická koncentrace zdravého organismu je dostatečně odlišná od



Obr. 1. Schéma metody stanovení cysteinylovaných leukotrienů jako markerů *Asthma bronchiale*

koncentrace patologicky zvýšené v důsledku poškození organismu. Mezi nejvýznamnější skupinu biomarkerů obsažených v KVV patří cys LTs, které jsou považovány za biomarkery bronchiálního astmatu. Zvýšený výskyt cys LTs v určitém místě organismu signalizuje probíhající alergickou reakci. Výhodou stanovení uvedených látek v KVV ve srovnání s krevní plasmou nebo močí je skutečnost, že jejich množství odráží bezprostřední alergickou reakci probíhající výhradně v plicích a není zkreslena případnými dalšími alergickými procesy odehrávajícími se na jiném místě organismu.

Diagnostika založená na stanovení cys LTs jako markerů bronchiálního astmatu však není triviální záležitostí, což dokazuje absence standardizované metody pro jejich stanovení, přestože metod pro kvalitativní i kvantitativní analýzu prokazujících možnost diferenciální diagnostiky *Asthma bronchiale* byla v literatuře publikována celá řada^{8–12}. Důvodem chybějící standardizované metody je především nerespektování nízké stability cys LTs za laboratorních podmínek, přítomnost enzymů zodpovědných za vzájemnou přeměnu jednotlivých markerů ($LTC_4 \rightarrow LTD_4 \rightarrow LTE_4$) v matrici KVV a chemické změny odehrávající se v průběhu přípravy vzorku pro stanovení.

Nově vyvinutá metoda kombinuje rychlou separační metodu (imunoafinitní extrakci cys LTs z matrice KVV s vysoce selektivní metodou stanovení, LC-ESI-MS), která respektuje veškerá výše uvedená omezení a lze ji charakterizovat jako vysoce reprodukovatelnou a přesnou. Předkládaná metoda (obr. 1) je vhodná nejen k diagnostickým účelům, ale rovněž pro monitorování průběhu onemocnění, případně sledování efektivity farmakoterapie. V tomto ohledu může kombinace imunoafinitní separace s LC-ESI-MS aspirovat na metodu, která by se mohla stát standardní pro stanovení cys LTs v KVV jako prostředku pro neinvazivní diagnostiku onemocnění *Asthma bronchiale*.

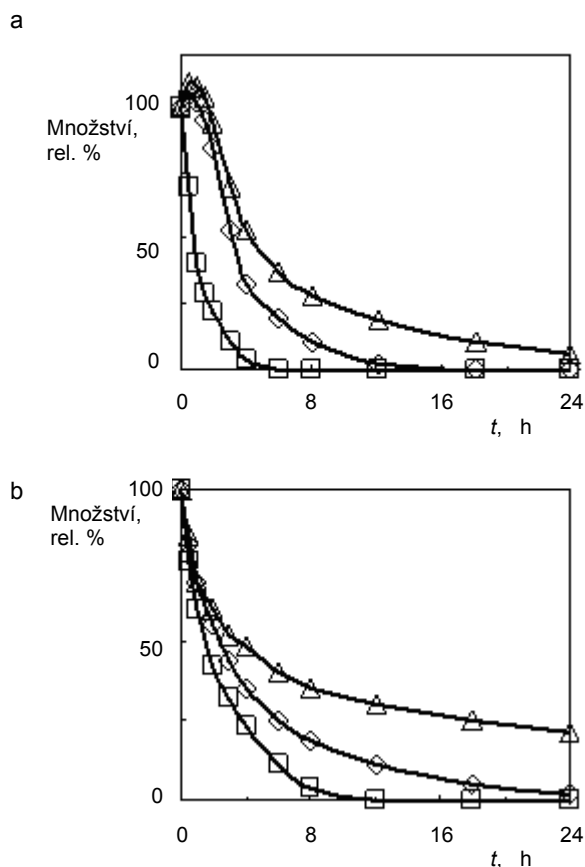
Stabilita cysteinylovaných leukotrienů v KVV

Biomarkery *Asthma bronchiale* – cys LTs jsou známy jako málo stabilní látky, které jsou za přítomnosti příslušných enzymů schopné vzájemné přeměny. Primární snahou při vývoji metody stanovení těchto látek v KVV bylo postihnout jejich chování v uvedené biologické matrici a nalézt postup přípravy vzorku vhodného pro hmotnostně-spektrometrickou analýzu umožňující zachytit koncentraci analytů ve vzorku bezprostředně po jeho odebrání.

Odběr KVV se provádí na specializovaném pracovišti vybaveném zařízením pro jeho odběr (viz Experimentální část). Již při odběru KVV je potřeba zachovat standardní postup respektující nízkou stabilitu řady látek v této matrici. K stanovení cys LTs postačuje odebrat KVV v množství alespoň 1 ml, jež se získá za dobu pěti až deseti minut pacientova klidného dýchání ústy přes kondenzátor vydechovaného vzduchu. Vhodné je provést test na kontaminaci vzorku slinami, ke které by mohlo dojít v důsledku špatně provedeného odběru KVV, neboť ve slinách se vyskytuje významné množství cys LTs, a byl by tak nale-

zen falešně pozitivní výsledek. Kontrolu kontaminace je možné provést prostřednictvím stanovení α -amylasy ve vzorku.

Vzhledem k citlivosti biomarkerů k celé řadě faktorů je ideální ihned po odběru provést označení vzorku isotopicky značeným vnitřním standardem (přídavek 250 pg deuterovaného analogu $LTE_4 - LTE_4-d_3$ do 1 ml KVV). Standardizace isotopicky značeným analogem využívá zcela identického fyzikálního, chemického a biologického chování známého množství standardu, který ale při hmotnostně-spektrometrické analýze vykazuje odlišné chování v detektoru v důsledku nahrazení vodíku deuteriem (v tomto případě na 3 místech molekuly). Tato skutečnost umožňuje velice přesné provedení kvantifikace a monitorování změn ve složení vzorku, ke kterým došlo v průběhu jeho zpracování (stable-isotope-dilution assay). KVV (matrice s majoritním podílem vody) bezprostředně po odběru vykazuje hodnotu pH v rozmezí 7,2–7,7. Hodnota pH KVV se však v krátkém časovém intervalu snižuje (pH 6,0–6,5) jako důsledek absorpce CO_2 ze vzduchu¹⁵, což může být jednou z příčin změn, které se v uvedené matrici odehrávají po jejím odebrání. Bylo prokázáno, že



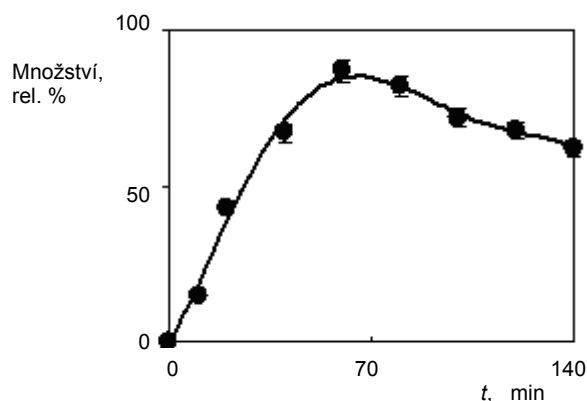
Obr. 2. Stabilita cysteinylovaných leukotrienů v kondenzátu vydechovaného vzduchu (A) a v mobilní fázi (B) při 25 °C; □ LTC₄, ◇ LTD₄, △ LTE₄

při uchovávání KVV pod inertní atmosférou (argon) se pH nemění, nicméně u cys LTs se tento parametr nejevil jako zásadní. Rovněž nebyl prokázán vliv světla na stabilitu cys LTs v KVV. Parametr, který významně ovlivňuje obsah těchto biomarkerů, je teplota. Bylo prokázáno, že za laboratorní teploty se obsah cys LTs velice rychle mění a to v důsledku 1) jejich vzájemné přeměny a 2) omezené teplotní stability. Chování cys LTs v KVV a organických rozpouštědlech (mobilní fáze použitá při LC analýze) je zachyceno na obr. 2, z kterého je zřejmý vliv teploty na obsah jednotlivých cys LTs. V matrici KVV byla vedle rozpadu jednotlivých látek (velmi dobře patrného v mobilní fázi) sledována i jejich přeměna v řadě $LTC_4 \rightarrow LTD_4 \rightarrow LTE_4$ katalyzovaná přítomnými enzymovými systémy. Dále bylo zjištěno, že při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$ je možné uchovávat KVV beze změny obsahu sledovaných látek po dobu 3 měsíců (rovněž teplota $-20\text{ }^\circ\text{C}$ se jevila jako vyhovující). Naproti tomu teplota $4\text{ }^\circ\text{C}$ k uskladnění KVV nebyla dostatečně nízká. Proces vzájemných přeměn a odbourávání odpovídající teplotní závislosti rychlostních konstant obou procesů se sice zpomaloval, ale přesto probíhala degradace sledovaných biomarkerů v obou maticích v horizontu jednotek hodin. Zlomovou teplotou pro stabilitu látek je zřejmě převedení vodné matrice z kapalného do pevného stavu (teplota $0\text{ }^\circ\text{C}$). S ohledem na uvedenou skutečnost byl posuzován parametr „cyklus rozmrazování – zamrazování“. Při každém obratu uvedeného cyklu se snižuje množství cys LTs v KVV o 8–9 %.

Imunoafinitní separace

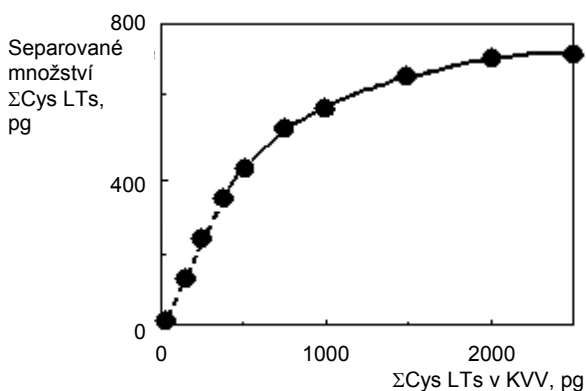
Vzhledem k velmi nízké koncentraci cys LTs v KVV a složitosti této matrice je vhodné sledované látky před samotnou LC-MS analýzou separovat, případně zkoncentrovat. Principem imunoafinitní extrakce je vysoce specifická reakce mezi antigenem (v tomto případě cys LTs) a protilátkou (v tomto případě myší protilátka proti LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 zakotvenou na Sepharose 4B). Imunoafinitní separace byla realizována přidávkem sorbentu (50 μl) do 1 ml KVV (vazebná kapacita imunoafinitního sorbentu byla stanovena na 100 ng cys LTs na 1 ml sorbentu). Typický časový průběh imunoextrakce je znázorněn na obr. 3, kde je zachycena závislost výtěžku na době imunoextrakce. Z grafu je zřejmé, že s prodlužujícím se časem imunoextrakce roste výtěžek cys LTs z KVV, nicméně paralelně s tím se tyto látky rozkládají v důsledku negativního vlivu teploty ($25\text{ }^\circ\text{C}$). Po dosažení maxima výtěžnosti začne proces rozkladu převažovat. Na základě uvedené závislosti byla zvolena optimální doba imunoseparace (60 min).

Neméně důležitým parametrem je poměr množství imunoafinitního sorbentu a cys LTs, resp. objemu KVV (množství cys LTs v KVV se v klinických vzorcích pohybuje v intervalu 50–250 pg ml^{-1} KVV). Závislost množství imunoextrakcí separovaných cys LTs na jejich původním množství přítomném v KVV je zachycena na obr. 4. Uvedená závislost má charakter Langmuirovy adsorpční iso-

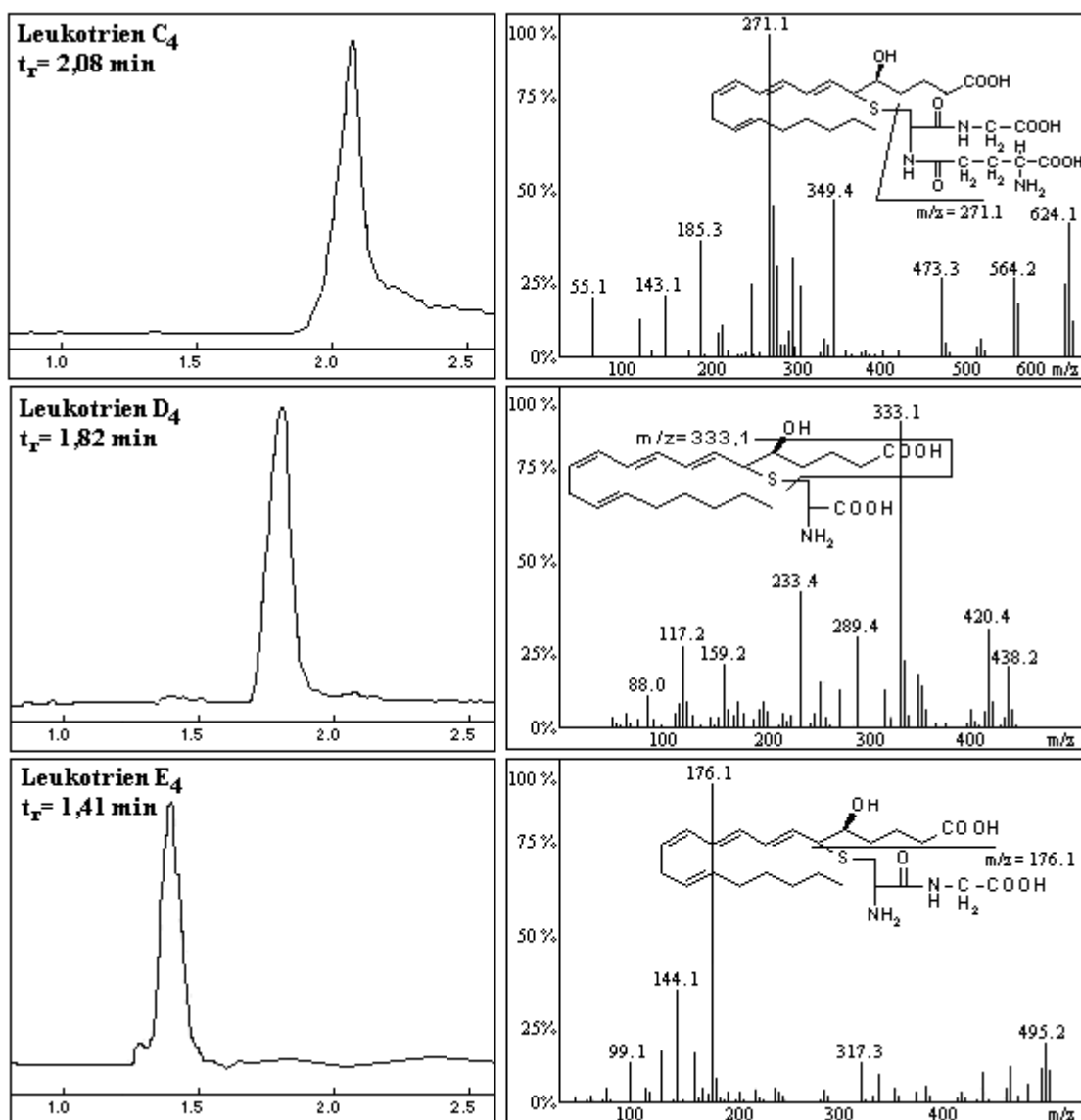


Obr. 3. Výtěžek cysteinylovaných leukotrienů v závislosti na době imunoextrakce

termy s oblastí lineární, v které s rostoucím množstvím cys LTs v matrici se zvyšuje množství zachycené protilátkou na povrchu sorbentu, a oblast nelineární, kde poměr množství cys LTs k protilátce je natolik velký, že množství zachycených látek se již téměř nemění s rostoucím množstvím markerů v matrici. Z hlediska přesnosti metody bylo v klinických analýzách používáno 50 μl sorbentu, což odpovídá imunoextrakční separaci probíhající v lineární části závislosti, která je na obr. 4 zachycena čárkovaně. Po separaci imunoafinitního sorbentu centrifugací (500 ot. min^{-1}) a oddělení horní vrstvy byl sorbent promyt 2×1 ml vody (separace zbylých nenavázaných látek z KVV) a následně byla vazba antigen – protilátka rozvolněna methanolem. Vzorek k nástřiku do analytického systému LC-ESI-MS byl získán odpařením methanolu proudem dusíku do sucha a jeho rozpuštěním v mobilní fázi



Obr. 4. Imunoseparace: Závislost separovaného množství cysteinylovaných leukotrienů na jejich obsahu v kondenzátu vydechovaného vzduchu



Obr. 5. Chromatogramy a kolizní spektra cysteinylovaných leukotrienů

(standardně používáno 50 μ l). Uvedeným postupem bylo možné separovat 80–90 % cys LTs přítomných v klinickém vzorku. Podíl nespecifických reakcí s imunoafinitním sorbentem byl zanedbatelný.

Imunoafinitní sorbent bylo možné regenerovat opakovaným promytím následujícími rozpouštědly: voda (1 ml) \rightarrow 85 % ethanol (1 ml) \rightarrow 0,1 M fosfátový pufr (pH 4; 1 ml) \rightarrow voda (1 ml). Takto zregenerovaný imunoafinitní sorbent byl připraven k opakovanému použití k imunoextrakci bez měřitelné ztráty sorpční kapacity. Experimentálně bylo ověřeno použití sorbentu v deseti po sobě následujících cyklech.

Z hlediska diagnostiky *Asthma bronchiale* byl použí-

ván, jako isotopicky značený standard LTE_4-d_3 , který umožnil monitorovat ztráty cys LTs v průběhu celé metody, nicméně neumožňoval postihnout následnou reakci jednotlivých cys LTs v průběhu imunoseparace ($LTC_4 \rightarrow LTD_4 \rightarrow LTE_4$). Tento nedostatek, který ovšem není významný z hlediska diferenciální diagnostiky *Asthma bronchiale*, by bylo možné odstranit přidáním všech isotopicky značených cys LTs a monitorovat tak jejich ztráty nezávisle. Nicméně sumární hodnota cys LTs byla získána s maximální relativní chybou 5,6 % a pro jednotlivé cys LTs nepřesáhla 6,5 %.

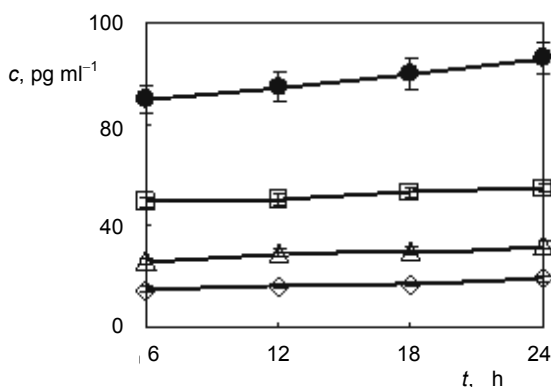
Tabulka I

Parametry MRM modu včetně hodnoty kolizní energie cysteinylovaných leukotrienů pro hmotnostně-spektrické stanovení

Biomarker	MRM	Kolizní energie [eV]
	Q1→Q3	
LTC ₄	624,1 → 271,1	27
LTD ₄	495,2 → 176,1	21
LTE ₄	438,2 → 333,1	19
LTE ₄ -d ₃	441,2 → 336,1	19

LC-ESI-MS

Nedávný bouřlivý vývoj v oblasti LC-MS umožňuje dnes bezproblémovou separaci a paralelní detekci množství analytů v značně složitých maticích. Z tohoto důvodu stejně jako pro svou velkou citlivost a schopnost přinést vysoce specifické strukturní informace se LC-MS stává metodou první volby v analýze biologických matic. Stanovení pikogramových množství cys LTs v poměrně složité tělní tekutině KVV je problémem řešitelným metodou LC-MS, a to i z hlediska budoucí rutinní praxe. Kapalinová chromatografie byla při analýze cys LTs realizována na koloně Hypercarb a sloužila 1) nejen k oddělení látek od čela analýzy, kde by v důsledku případné koeluce soli a endogenních složek matrice mohlo docházet k potlačení signálu hmotnostního detektoru (signal suppression effect) negativním vlivem na probíhající ionizaci, 2) ale rovněž k separaci jednotlivých cys LTs (LTC₄ – t_R = 1,4 min, LTD₄ – t_R = 1,8 min a LTE₄ – t_R = 2,0 min; viz obr. 6) a dalších prostanoidů (leukotrien B₄ – t_R = 2,8 min, 8-iso-prostan – t_R = 2,2 min, mrtvý čas kolony = 0,8 min). Podmínky chromatografické analýzy byly optimalizovány



Obr. 6. Změna hladiny cysteinylovaných leukotrienů v průběhu denního biorytmu; □ LTC₄, ◇ LTD₄, △ LTE₄, ● Σ Cys LTs

s ohledem na omezení na straně hmotnostního detektoru (průtok mobilní fáze kompatibilní s použitou ionizací), ale rovněž s důrazem na citlivost detektoru.

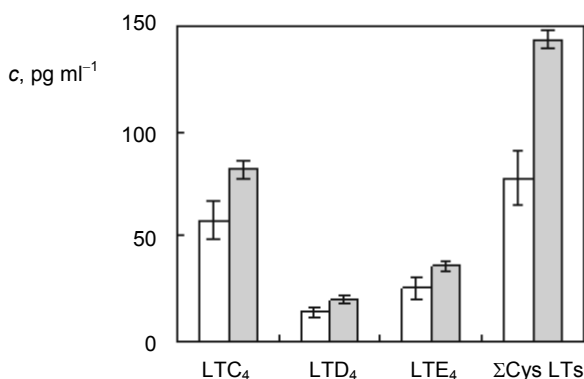
Hmotnostně-spektrická detekce byla realizována negativní elektrosprejovou ionizací ve vysoce selektivním módu MRM. Na prvním kvadrupólu byl izolován quasimolekulární ion (deprotonovaný molekulární ion) [M-H]⁻ příslušného cys LT, který byl použit jako prekurzor pro následnou kolizně-indukovanou disociaci (CID) na druhém kvadrupólu. V „kolizní“ cele (Q2) docházelo k selektivnímu rozpadu molekuly za vzniku dceřiného spektra (obr. 5), z kterého byl na třetím kvadrupólu izolován specifický ion (dceřiný) s nejvyšším zastoupením. Podmínky MRM ve formě typických rozpadových reakcí a energie kolizně-indukované disociace pro jednotlivé cys LTs jsou zachyceny v tabulce I. Kolizní energie, stejně jako další parametry na hmotnostním spektrometru, byly optimalizovány z hlediska získání maximální citlivosti vyvinuté metody (viz experimentální část).

Pro jednotlivé cys LTs byla sestrojena kalibrační závislost poměru ploch leukotrienu a vnitřního standardu na koncentraci daného analytu. Získané experimentální body byly v rozmezí limitu kvantifikace až 1000 pg zpracovány metodou lineární regrese s přesností (udáno Pearsonovým korelačním koeficientem) pro LTC₄ ≥ 0,9993, LTD₄ ≥ 0,9996 a LTE₄ ≥ 0,9991. Ekvivalentní kalibrační závislosti byly získány z matrice KVV přidáním odpovídajícího množství cys LTs do uvedené matrice, z které byly následně separovány imunoextrakčním postupem a kvantifikovány LC-ESI-MS/MS. Kalibrační křivky připravené využitím matrice KVV se vyznačovaly lineární závislostí v rozmezí limitu kvantifikace – 1000 pg s korelačním koeficientem pro LTC₄ ≥ 0,9955; LTD₄ ≥ 0,9983 a LTE₄ ≥ 0,9947. Shodností kalibračních křivek získaných z matrice KVV a mobilní fáze se prokázala absence vlivu matrice na kalibrační závislost. Správnost metody byla stanovena pro pět sérií vzorků (počet vzorků v jedné sérii n = 6), jednotlivé série se lišily množstvím cys LTs (25, 50, 75, 100 a 250 pg) v matrici KVV. Správnost metody pro jednotlivé cys LTs, limit kvantifikace, limit detekce a přesnost jsou uvedeny v tab. II.

Tabulka II

Charakteristiky metody kombinující imunoextrakci s LC-ESI-MS pro stanovení cysteinylovaných leukotrienů

	LTC ₄	LTD ₄	LTE ₄
Mez detekce, pg ml ⁻¹	2	1	1
KVV			
Mez kvantifikace, pg ml ⁻¹	16	6	5
KVV			
Správnost, %	93,5	94,2	95,4
Přesnost, %	90,3	90,9	91,6

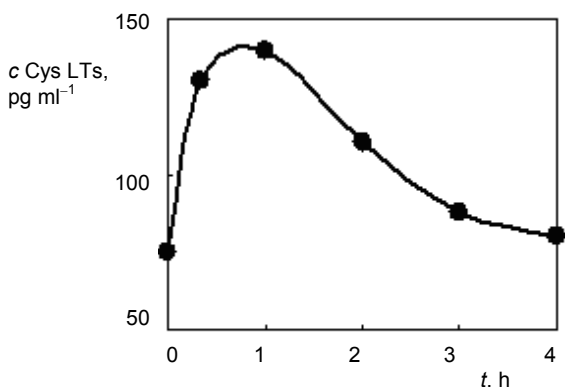


Obr. 7. Výsledky klinické studie – diferenciální diagnostika *Asthma bronchiale*; □ kontrolní skupina, ■ *Asthma bronchiale*

Klinická studie

Vyvinutá metoda byla použita pro analýzu klinických vzorků, přičemž bylo nutné zmapovat chování biologického systému s ohledem na produkci cys LTs v průběhu denního biorytmu. Ve skupině 10 dobrovolníků (věk 18 ± 1 , nekuřáci, bez diagnózy *Asthma bronchiale*) byly odebrány čtyři vzorky KVV vždy v průběhu jednoho dne (v 6, 12, 18 a 24 h). U všech subjektů byl prokázán zcela shodný trend ve vývoji koncentrací cys LTs, které se v průběhu dne zvyšovaly a na svou původní koncentrační hladinu se vracely až v době spánku (obr. 6). V průběhu dne (18 až 20 hodin bez spánku) se suma cys LTs zvýšila v průměru o 25,4 %. Pro diferenciální diagnostiku *Asthma bronchiale* je proto nutné respektovat tuto skutečnost a dodržovat stejný čas odběru (v klinických studiích byly vzorky odbírány vždy mezi 8. a 12. hodinou).

Cílem klinické studie bylo ověřit možnost diferenciál-



Obr. 8. Monitorování hladiny cys LTs v kondenzátu vydechaného vzduchu během histaminového (bronchoprovokačního) testu

ní diagnostiky *Asthma bronchiale*. Byla prováděna u 20 osob s touto diagnózou a stejně početnou kontrolní skupinou. Výsledky byly statisticky zpracovány a jsou uvedeny na obr. 7, z kterého je zřejmé, že existuje významný rozdíl mezi hodnotami koncentrací některých leukotrienů (především C₄ a E₄) u osob s diagnostikovaným onemocněním, který je zvýrazněn u sumárních hodnot cys LTs. Význam leukotrienu D₄ pro diferenciální diagnostiku *Asthma bronchiale* nebyl zcela potvrzen, ačkoliv i u tohoto biomarkeru byl zaznamenán rozdíl v jeho průměrné hodnotě, která byla vyšší u pozitivně diagnostikovaných subjektů, nicméně rozdíl v konfidenčních intervalech byl statisticky nevýznamný.

Vyvinutá diagnostická metoda byla použita rovněž v klinickém experimentu, jehož cílem bylo ověřit možnost monitorování průběhu alergického onemocnění, případně terapeutického postupu. U skupiny dobrovolníků (10) byl proveden bronchoprovokační test podáním histaminu. KVV byl odebrán před histaminovým testem a potom v časových intervalech 30, 60, 120, 180 a 240 min. Výsledek testu je zachycen na obr. 8, z kterého je zřejmé, že organismus na histamin reagoval zvýšenou produkcí cys LTs, jejichž hladina se po dosažení maxima koncentrace vracela na svou původní hodnotu. Z daného testu vyplývá, že uvedená metoda v sobě zahrnuje i možnost sledování účinnosti terapeutických postupů.

Závěr

Byla vyvinuta metoda pro detekci a kvantifikaci cys LTs jako potenciálních biomarkerů *Asthma bronchiale* v KVV. Stanovení cys LTs v uvedené matici umožňuje monitorovat děje odehrávající se bezprostředně v plicích a dýchacích cestách nezávisle na procesech probíhajících v celém organismu, jak je tomu při stanovení biomarkerů v krevní plasmě nebo moči. Ačkoliv v nedávné době byla vyvinuta řada metod pro stanovení cys LTs v KVV a prokázána možnost diferenciální diagnostiky *Asthma bronchiale*, neexistuje dosud standardizovaný postup pro stanovení jejich koncentračních hladin a výsledky z různých pracovišť vykazují značnou nesourodost. Předkládaná práce si kládla za cíl identifikovat možné zdroje uvedených inkonsistencí a respektovat je při vývoji metody stanovení a návrhu metodiky měření od odběru vzorku až po získání validních dat v podobě koncentrací jednotlivých cys LTs v uvedené matici a jejich korelaci s fyziologickými/patologickými procesy odehrávajícími se v plicích, případně dýchacích cestách. Vyvinutá metoda kombinující imunoextrakční separaci s hmotnostně-spektrometrickou detekcí respektuje celou řadu omezení plynoucích ze složitosti matrice a nízké stability cys LTs. Je charakterizována dobrou přesností a vysokou reprodukovatelností.

Seznam symbolů a zkratek

cys LTs	cysteinylované leukotrieny – LTC ₄ , LTD ₄ a LTE ₄
LTA ₄	leukotrien A ₄
LTB ₄	leukotrien B ₄
LTC ₄	leukotrien C ₄
LTD ₄	leukotrien D ₄
LTE ₄	leukotrien E ₄
KVV	kondenzát vydechaného vzduchu
MRM	monitorování více reakcí – Multiple Reaction Monitoring
ESI	elektrosprejová ionizace
CID	kolizně indukovaná disociace – Collision Induced Dissociation

LITERATURA

- Jeffery P. K., Laitinen A., Venge P.: *Respir. Med.* 94, S9 (2000).
- Reynolds H. Y., *Lung* 178, 271 (2000).
- Holz O., Kips J., Magnussen H.: *Eur. Respir. J.* 16, 355 (2000).
- Čáp P., Pehal F., Petrů V., Musil J.: *Alergie* 3, 275 (2001).
- Musiek E. S., Cha J. K., Yin H., Zacker W. E., Terry E. S., Porter N. A., Montine T. J., Morrow J. D.: *J. Chromatogr., B* 95, 799 (2004).
- Dworski R., Peebles Stokem R., Sheller J. R., v knize: *New Perspectives in Monitoring Lung Inflammation. Analysis of Exhaled Breath Condensate* (Montuschi P., ed.), kap. 12. CRC Press, Boca Raton 2005.
- Montuschi P., v knize: *New Perspectives in Monitoring Lung Inflammation. Analysis of Exhaled Breath Condensate* (Montuschi P., ed.), kap. 2. CRC Press, Boca Raton 2005.
- Lindgren J. A., Hammarström S., Goetz E. J.: *FEBS Lett.* 152, 83 (1983).
- Hanazawa T., Kharitonov S. A., Barnes P. J.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 1175 (2001).
- Antczak A., Montuschi P., Kharitonov S. A., Gorski P., Barnes P. J.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 301 (2002).
- Baraldi E., Carraro S., Alinovi R., Pesci A., Ghiso L., Bodini A., Piacentini G., Zacchello F., Zanconato S.: *Thorax* 58, 505 (2003).
- Csoma Z., Kharitonov S. A., Balint B., Bush A., Wilson N. M., Barnes P. J.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1345 (2002).
- Alison J. MacFarlane, Dworski R., Sheller J. R., Pavord I. D., Barry Kay A., Barnes N. C.: *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1553 (2000).
- Čáp P., Chládek J., Pehal F., Malý M., Petrů V., Barnes P. J., Montuschi P.: *Thorax* 59, 456 (2004).
- Effros R. M., Miller J., Dubbing M., Shaker R., v knize: *New Perspectives in Monitoring Lung Inflammation. Analysis of Exhaled Breath Condensate* (Montuschi P., ed.), kap. 12. CRC Press, Boca Raton 2005.

K. Syslová^a, J. Přech^a, J. Lebedová^b, D. Pelclová^b, and P. Kačer^a (^a Department of Organic Technology, Institute of Chemical Technology, Prague, ^b Department of Occupational Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague): **Development of a Non-Invasive Diagnostic Method for Bronchial Asthma**

A method was developed for rapid and accurate determination of cysteinylleukotrienes (LTC₄, LTD₄, LTE₄), essential biomarkers of bronchial asthma, in exhaled breath condensate. The method consists of an immunoseparation procedure combined with selective and sensitive detection by LC-ESI-MS in the multiple reaction monitoring mode (MRM) and using a stable-isotope-dilution assay. The precision of the method was around 94 %. The mean accuracy was higher than 90 % for the content of cysteinylleukotrienes in the concentrate up to 250 pg ml⁻¹. The method was tested on patients with occupational bronchial asthma and compared with healthy subjects. The differences between the two groups were significant.