

**Univerzita Karlova**  
**Lékařská fakulta v Plzni**



Autoreferát disertační práce  
MUDr. Olga Růžičková Kirchnerová

**Imunologické markery z krve, sputa, BALTE  
a plicních biopsií při posuzování aktivity  
a cílenosti léčby chronických zánětlivých  
a fibrotizující nemoci plic a průdušek**

The role of biomarkers obtained from serum, sputum, BALF and lung tissue samples in  
assessing the activity and targeting therapy  
of chronic inflammatory and fibrotic diseases of the lungs and bronchi

Doktorský studijní program  
Vnitřní nemoci  
Klinika pneumologie a ftizeologie LF UK v Plzni a FN Plzeň

Plzeň, 2019

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného postgraduálního doktorandského studia na Klinice pneumologie a ftizeologie LF UK v Plzni

Uchazeč: MUDr. Olga Růžičková Kirchnerová  
Klinika pneumologie a ftizeologie, LF UK a FN v Plzni  
Dr. E. Beneše 13, 305 99 Plzeň

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.  
Centrální laboratoř pro imunoanalýzu,  
FN a LF UK v Plzni  
Dr. E. Beneše 13, 305 99 Plzeň

Školitel: doc. MUDr. Milan Teřl, Ph.D.  
Klinika pneumologie a ftizeologie,  
LF UK a FN v Plzni

Konzultant: prof. MUDr. Petr Panzner, CSc.  
Ústav Klinické imunologie a alergologie,  
LF UK a FN v Plzni

Oponenti: prof. MUDr. Eva Rozborilová, DrSc.  
Klinika pneumologie a ftizeologie, Jesseniova lékařská fakulta v Martine,  
Univerzita Komenského v Bratislave

doc. MUDr. Vladimír Koblížek, Ph.D.  
Klinika pneumologie,  
LF UK a FN v Hradci Králové

Autoreferát odevzdán dne 30.4.2019.

Obhajoba disertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací v oboru vnitřní nemoci na LF UK v Plzni.

se koná dne:                    v:                    hod.

Místo obhajoby: Seminární místnost centrálních laboratoř pro imunoanalýzu, FN, Plzeň.

Tato disertační práce vznikla za částečné podpory grantu VZ MSM 002160812

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

## 1. ÚVOD

Dnešní doba přináší raketový nástup poznatků o nemocech na molekulárně-buněčné úrovni. Děje se tak především v souvislosti s hledáním a testováním nových léků, určených pro těžké formy jednotlivých nemocí. Ukazuje se, že tyto nové léky („biologika“), cílené většinou na dílčí patogenetické mechanismy, na rozdíl od pleiotropně působících klasických léčiv, bývají účinné pouze u části pacientů se stejnou diagnózou. Jako ilustrativní případy k výše uvedenému lze uvést univerzální protizánětlivý efekt kortikosteroidů prakticky u všech astmatiků, anti-IgE terapie je však efektivní pouze u části z nich. Podobné příklady nalezneme i v léčbě např. Crohnovy nemoci (kortikosteroidy vs anti-TNF terapie), revmatoidní artritidy (DMARDS vs biologická léčba) a dalších. V rámci jedné nemoci jsou poznávány různé etiopatogenetické mechanismy, resp. nověji molekulárně-buněčné signální dráhy, vyúsťující v tzv. "endotypy". Různorodost jednotlivých diagnóz na molekulárně-buněčné úrovni narůstá a jejich hranice se stávají neostré. Z hlediska klinické praxe tak dochází k paradoxu. Navenek tyto různé signální dráhy (endotypy) vedou všechny k zastřešujícímu jednotnému klinickému obrazu konkrétní diagnózy, zároveň však jsou výsledkem různorodých etiopatogenetických cest. Pro klinickou praxi je třeba hledat praktické výstupy. Za prvé stanovení základní diagnózy na základě jasných kritérií, v dalším kroku pak pomocí biomarkerů stanovit jednotlivé fenotypy, tak aby odrážely konkrétní endotypy dané nemoci, umožňující racionální indikaci cílené biologické léčby.

Chronická zánětlivá a fibrotizující plicní onemocnění představují velmi heterogenní skupinu nemocí. S postupující úrovní poznání (viz. výše) je rovněž stále více zjišťována výrazná imunoetiopatogenetická heterogenita i v rámci jednotlivých diagnóz. Vzhledem k enormně narůstající šíři uvedené problematiky v oblasti tématu dizertační práce jsme se – vzhledem k zaměření našeho pracoviště na pacienty s těžkým astmatem – rozhodli zacílit naše úsilí právě na tuto skupinu nemocných.

Cílem práce bylo identifikovat ty biomarkery, které by pomohly odlišit a rozdělit pacienty do jednotlivých fenotypických, resp. endotypických podskupin, a na jejich základě pak určit konkrétní typ cílené léčby a/nebo predikovat její efekt u daného pacienta.

V naší práci jsme se snažili vyhledat a porovnat klinickou významnost jednotlivých biomarkerů přímých i nepřímých, získaných pomocí invazivních i neinvazivních technik, se zaměřením na pacienty s těžkými formami astmatu. Porovnávali jsme výhody a nevýhody biomarkerů získaných především z krve, sputa, bronchoalveolární laváže a nosních biopsií. Pozornost jsme věnovali i souvisejícím méně invazivním a v praxi lépe dostupným klinickým a funkčním markerům ze spirometrických a otorinolaryngologických vyšetření. Získané údaje nám pomohly rozdělit nemocné do jednotlivých fenotypických a endotypických podskupin, u řady z nich byla poté nasazena cílená terapie, jejíž efekt jsme následně vyhodnocovali. Naše plicní klinika patří mezi jedno z největších Národních center pro těžké astma v ČR, pacienti pro tuto práci byli vybíráni právě mezi těžkými astmatiky.

## 2. POPIS SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Zánět a remodelace jsou patofyziologické procesy, které jsou součástí rozvoje řady nemocí. Pestré etiopatogenetické/imunopatologické mechanismy vedou k rozvoji zánětu, vyúsťujícího v různou míru a vzájemné poměry destrukce a reparace, resp. remodelace.

Chronické zánětlivé nemoci plic a průdušek lze rozdělit na ty, postihující především průdušky, tedy nemoci s bronchiální obstrukcí (kam řadíme především CHOPN a astma) a nemoci postihující plicní intersticiu, tedy intersticiální a fibrotizující plicní nemoci.

V naší práci jsme se zaměřili na vyhledávání vhodných biomarkerů, které by nám pomohly v diagnostice a fenotypizaci jednotlivých plicních chorob.

### BIOMARKER

**Definice:** Jedná se o klinické příznaky nebo laboratorní aj. parametry, které slouží jako indikátory určité konkrétní patofyziologie a mohou být využívány k diagnostice, monitoraci, výběru efektivní terapie nebo určení budoucích rizik. Optimální biomarker by měl být dostatečně senzitivní a specifický, snadno zjištělný, spolehlivý, „pevný“, praktický, reprodukovatelný, levný a rychle dostupný. (Katial et al., 2017)(Křmčová, Novosad, Sedlák - 2018 - Biomarkery a biologická léčba, n.d.)

### **Charakteristiky a rozdělení biomarkerů:**

- **Klinické biomarkery:** jsou typické pro určitý endo/fenotyp dané choroby (např. nosní polypóza a intolerance NSAID u eosinofilního, non IgE fenotypu astmatu, paličkovité prsty a krepitus u IPF).
- **Laboratorní a histologické biomarkery:** získávané z krve, sputa, BALTE, moči, bioptických vzorků aj. - např. periferní eozinofilie u astmatu, deficit A1AT u CHOPN, stanovení SACE u sarkoidózy aj.
- **Funkční a zobrazovací biomarkery:** například míra bronchiální obstrukce, resp. její reverzibility nepřímo vypovídá o hypertrofii hladké svaloviny bronchů, hodnota FENO o přítomnosti eosinofilního zánětu, emfyzém na CT spoludetekuje emfyzematický fenotyp CHOPN, subpleurální predominance postižení a voštinovitá přestavba je typická pro UIP.

### **Biomarkery z hlediska výpovědní hodnoty pro klinickou praxi:**

- **Diagnostické:** vhodné pro stanovení správné diagnózy, čímž pomohou k výběru cílené/specifické terapie - např. specifické IgE u eosinofilního astmatu a indikace terapie omalizumabem, HRCT u emfyzematického fenotypu a indikace volumredukční operace atd.
- **Prognostické:** dokáží predikovat odpověď na podávanou terapii např. periostin-odpověď na anti-IL13/anti-IL4, u IPF možný marker predikce klinické progresse. Některé biomarkery mají schopnost plnit obě tyto funkce (např. IgE, ECP, eosinofily, periostin a další...)

### **Dělení z hlediska zátěže pro pacienta: biomarkery invazivní a neinvazivní**

*Pozn. biomarkery získané z krve v této práci zařazují mezi neinvazivní biomarkery s přihlédnutím k jednoduchosti metody a minimálním zásahem do integrity jedince.*

### **Ústřední téma naší práce představují biomarkery astmatu a jejich využití pro diagnostiku, resp. bližší fenotypizaci – viz dále tabulka a přehledy na následujících stranách.**

Astma je chronické, etiopatogeneticky velmi heterogenní onemocnění, charakterizované zánětem dýchacích cest, navozujícím variabilní bronchiální obstrukci dýchacích cest, spojenou s typickými symptomy. Rozlišujeme řadu endotypů (které jsou charakterizovány specifickými patofyziologickými procesy) a „vnější“ fenotypy, které navenek charakterizují daného jedince, a které jsou výsledkem vzájemných interakcí jak genotypu, tak faktorů prostředí. Jeden endotyp tak může vyústit ve více fenotypů, a naopak jeden endotyp může být spojen s řadou fenotypů, viz níže. (Lötvall et al.).

Česká republika se stala první zemí, kde vzniklo v r. 2015 národní doporučení, fenotypizující astma na základě spojitosti klinických projevů a bližších charakteristik zánětu, konkrétně přítomnosti eozinofilie a alergie, vyúsťující ve tři základní fenotypy: 1. eosinofilní alergické, 2. eosinofilní nealergické a 3. non-eozinofilní, nealergické astma.

**Alergický eosinofilní fenotyp** je výsledkem získané, specifické imunity a je imunologicky označován jako T helper-2 (Th2) zprostředkovaná nemoc. Hlavní roli zde hraje interleukin 4 (IL-4) a imunoglobulin E (IgE), dále IL-13 a ev. IL-5. Z klinického hlediska se jedná o nejčastější a zároveň většinou nejlépe léčitelný fenotyp astmatu. Nejtěžší formy se vyskytují zvláště při senzibilizaci na plísňe a/nebo významné senzibilizaci na jiné ubikviterní alergeny a jsou charakterizovány vysokými hladinami celkového i specifických IgE a někdy i významnou nejen průduškovou, ale i periferní eozinofilii. (Terl et al., 2017)

**Nealergický eosinofilní fenotyp** je výsledkem vrozené, nespecifické imunity a je imunologicky označován jako typ 2 innate lymphoid cells (ILC) zprostředkovaná nemoc. Podstatným z pohledu možností biologické léčby je zde IL-5, dále pak ev. IL-13. Z klinického hlediska se jedná o astma propukající většinou až ve středním věku, často doprovázené či předcházené nosní polypózou; pokud je přítomna i intolerance nesteroidních antirevmatik, mluvíme o Samterově trias. Nejtěžší formy jsou pravidelně provázeny významnou periferní, resp. systémovou eozinofilii. (Terl et al., 2017)

**Non-eozinofilní fenotyp** je výsledkem "type2-low" imunitní cesty, která je nejméně prozkoumána a téměř jistě budou charakterizovány její subtypy. Z pohledu biologické léčby neexistují k dnešku konkrétní terče, v úvahu přicházejí cytokinové dráhy směřující k neutrofilii, ev. makrofágům: TNF, IL-17 a IL-23, chemokiny (CXCR2) a.j. Z klinického hlediska se většinou jedná o starší obézní nemocné, častěji ženy, ev. pacienti s chronickou infekcí průdušek, ev. o kuřáky, kombinující astma s CHOPN. Ani u nejtěžších forem tohoto fenotypu se neseťkáváme s přítomností průduškové nebo systémové eozinofilie. (Terl et al., 2017)

Přehled a charakteristiky hlavních biomarkerů astmatu					
Biomarker	Základní charakteristika	Hraniční (resp. cut-off) hodnota, ev. rozpětí	Pozitiva (P+)	Predikce	Publikováno
			jednotlivých metod	A) fenotypu	
			Negativa (N-)	B) léčby	
Eozinofily v periferní krvi	Základní biomarker eozinofilie, dobře koreluje s analýzou sputa	150 bb/μL aktuálně nebo 300 bb/μL historicky (za posledních 12 měsíců)	P+ levná, dostupná	EOS alergický + EOS nealergický +++	(Katial et al., 2017) (Szeffler et al., 2012) (Medrek et al., 2017) (Flood-Page et al., 2007) (Ortega et al., 2014) (Zhang et al., 2014) (Bel et al., 2014) (Viswanathan and Busse, 2018)
			N-zvýšení z jiných příčin, fluktuace hodnot, ovlivnění SKS	anti IgE + anti IL-5 +++ anti IL-4,13 ++ DP2(Fevipritand) antimykotika+SKS CRTH2 antag.	
Koncentrace celkového IgE	Není spolehlivým markerem alergie; nízké hodnoty nevylučují klinicky významnou alergii	> 100 IU/ml z rozmezí hodnot 30-700/1500 IU/ml se odvíjí stanovení dávky anti-IgE léčby	P+ levná, dostupná	EOS alergický + až ++	(Katial et al., 2017) (Szeffler et al., 2012) (Medrek et al., 2017) (Růžičková Kirchnerová et al., 2018) (Agarwal, 2011)
			N-hodnoty nepredikují odpověď na anti-IgE léčbu Predikují odpověď u terapie ABPA/SAFS	anti-IgE (+) anti IL-5 (+) anti IL-4,13 (+) antimykotika+SKS	
Koncentrace specifických IgE, ev. kožní prick testace	Základní biomarker alergie	Pozitivní hodnoty většinou nad 0,35 - 1,0 IU/ml dle laboratoře	P+ relativně levná	EOS alergický +++	(Katial et al., 2017) (Szeffler et al., 2012)
			N-horší dostupnost některých alergenů (plísňě, profesní noxy)	anti-IgE +++ anti IL-5 (+) anti IL-4,13 + /++ antimykotika+SKS	
FeNO	Ideální biomarker přítomnosti eozinofilie v průduškách, zvláště v období před nasazením IKS, poté rychle klesá... vysoké hodnoty indikují riziko exacerbace	≤ 25 (ppb) negativní 25-50 šedá zóna > 50, resp.80 pozitivní (vysoce pozitivní)	P+ neinvazivní, výsledek ihned k dispozici, koreluje s eo ve sputu	EOS alergický ++ EOS nealergický +++	(Katial et al., 2017) (Szeffler et al., 2012) (Crespo et al., 2016) (Haldar et al., 2009) (Dweik et al., 2011) (Petsky et al., 2016)
			N-dražší, hůře dostupná, četné možnosti ovlivnění, nekoreluje s eo v krvi	anti IgE + anti IL-5 (+) anti IL-4 a IL-13 ++	
Eozinofily ve sputu	"Zlatý standard" detekující eozinofilní zánět v průduškách	> 3 % buněk	P+ exaktní, přímo vyšetřující metoda	EOS alergický ++ EOS nealergický +++	(Katial et al., 2017) (Szeffler et al., 2012) (SPANVELLO et al., 2000) (Pizzichini, 2002) (Claman et al., 1994) (Petsky et al., 2012) (Chlumský et al., 2006)
			N-špatně dostupná, zatěžující náročná na čas	Strategie léčby IKS anti IgE + anti IL-5 +++ anti IL-4,13 ++	
ECP v krvi (Ize i z IS, BALTe)	biomarker aktivace eosinofilů	rozmezí 0–24 μg/l	P běžně dostupný	EOS alergický ++ EOS nealergický +++	(Szeffler et al., 2012) (Milan Teřl et al., n.d.)
			N – řada interpretačních úskalí		

<i>Biomarker</i>	<i>Základní charakteristika</i>	<i>Hraniční (resp. cut-off) hodnota, ev. rozpětí</i>	<i>Pozitiva (+) jednotlivých metod Negativa (-)</i>	<i>Predikce A) fenotypu B) léčby</i>	<i>publikace</i>
<b>Periostin v séru</b>	nově zaváděný <b>marker obou T-high fenotypů</b> , produkován epitelem dých. cest, nejužší vztah k IL-13	≥ 50 ng/ml, (cave na možnost falešného zvýšení – i produkce mimo dýchací cesty-kosti kůže aj.)	P+ stabilita sérových koncentrací v čase  N-špatně dostupná, cut-off není jednotná... není rutinní	EOS alergický ++ až +++ EOS nealergický ++ až +++  anti IgE + až ++ anti IL-5 + až ++ anti IL-4 a IL-13 +++	(Katial et al., 2017) (Szeffler et al., 2012) (Izuhara et al., 2014) (Rabe et al., 2018) (Castro et al., 2011a) (Novosad et al., n.d.)
<b>EPO, MBP v IS, BAL</b>	biomarker aktivace <b>eozinofilů</b>		N-málo specifická	EOS alergický ++ EOs nealergický +++	(O'Connell et al., 2011)
<b>MPO</b>	Biomarker aktivace <b>neutrofilů</b>		N-málo specifická	NEU ++	(Acharya 2014) (Racek, 2008)
<b>Neutrofilý v IS</b>	biomarker <b>neutrofilního zánětu</b>	hodnota mezi 40-65%	P+ exaktní, přímo vyšetřující metoda  N-náročně na čas nespecifická (i u jiných chorob, kouření, věk, znečištěné ovzduší)	NON EOS těžké, kortikodependentní astma  Makrolidy Brodalumab anti-IL17 anti-CXCR2	(Katial et al., 2017) (Szeffler et al., 2012) (Moore et al., 2014) (Gibson et al., 2017) (Simpson et al., 2008)
<b>Dipeptidyl peptidasa-4 (DPP-4) v séru a tkáních</b>	jako periostin <b>marker obou T-high fenotypů</b> , produkován epitelem DC, nejužší vztah k IL-13		P+ exaktní, přímo vyšetřující metoda  N-špatně dostupná není rutinní	EOS alergický ++ až +++ EOS nealergický ++ až +++  anti IL-13 +++	(Katial et al., 2017) (Szeffler et al., 2012) (Brightling et al., 2015)
<b>močový leukotrien E4 (LTE4)</b>	<b>biomarker cysteinyl leukotrien aktivity</b>	normalní hodnoty ≤50 pg/mg	P+dobře dostupný  N-léky (5LO inhibitory) významně snižují hladinu LTE4, ne však kortikoidy	EOS alergický ++ EOS nealergický +++  odpověď na anti-IL terapii (nebylo jasně potvrzeno)	(Katial et al., 2017) (Szeffler et al., 2012)
<b>močový bromotyrosin (BrTyr)</b>	biochemický <b>biomarker aktivace eozinofilů</b> Lze stanovit i v krvi.	ng/mg/kreat	P+jednoduchý odběr vzorku N-komplikované stanovení  N-hladina se snižuje při terapii KS	EOS alergický ++ EOS nealergický ++  odpovědi na KS ++	(Cowan et al., 2015)
<b>YKL-40</b> (chitinase-like protein) v séru a tkáních	<b>biomarker tkáňového zánětu</b> obecně prediktivní biomarker <b>tíže choroby a rizika exacerbací astmatiků, poklesu plicních funkcí</b>		P+  N-zatím není rutinně vyšetřován	biomarker tkáňového zánětu obecně, tíže choroby, poklesu plicních funkcí  Bronchiální termoplastika?	(Katial et al., 2017) (Szeffler et al., 2012)
<b>Eos v nosní biopsii, nosní polypóza</b>	Biomarker eosinofilního zánětu	Cytologie/biopsie Metoda nasosobce (picograms per mililitre)	P+snadno dostupná, relativně levná N-metoda nasosobce je nově popsána, není rutinní	EOS alergický ++ EOS í nealergický +++ NON EOS ++ Efekt terapie KS anti-IL-5	(Ruzickova O et al., n.d.) (Melo Jr. et al., 2018) (Pipkorn and Karlsson, 1988)

**Imunologické markery u chronických zánětlivých a fibrotizujících plicních nemocí se zaměřením na astma – dle analyzovaného biologického materiálu:**

❖ **Krev:**

- Celkové a specifické IgE
- Eosinofily
- ECP
- Periostin
- Dipeptidyl peptidasa-4 (DPP-4)
- Kortizol

❖ **Indukované sputum:**

- Eosinofily, neutrofilie, makrofágy
- IL-13
- ECP, MPO, MBP
- YLK-40

❖ **Bronchoalveolární lavážní tekutina (BALTE):**

- Eozinofily/neutrofilie/makrofágy/monocyty
- ECP, MPO, MBP a další

❖ **Moč:**

- Urinary LTE4 (močový leukotrien E4)
- Urinary BrTyr (močový bromotyrosin)
- Kortizol

❖ **Plicní biopsie:**

- Eozinofily, neutrofilie, makrofágy, monocyty, T buňky
- Epitelové buňky (ev. EGFR), pohárkové bb a submukózní žlázy, hladká svalovina a bazální membrána
- Angiogeneze (VEGF)
- YKL-40
- Stanovení genové exprese z brush epitelu-POSTN, CLCA1, serpinB2

❖ **Nosní biopsie:**

- Eozinofily
- PAS barvení k vyloučení plísňové infekce

**Rozdělení biomarkerů astmatu dle imuno-patofyziologické cesty:**

**1. Type 2 high fenotyp:**

A) Hlavní biomarkery (nejčastěji používané):

- Periferní eozinofilie ( $\geq 4\%$  resp.  $\geq 300-400/\text{mm}^3$ )
- Eosinofily ve sputu
- Celk. a specifické IgE
- ECP ( $\geq 20\ \mu\text{g}$ )
- FENO ( $\geq 50\ \text{ppb}$ )
- Klinicky: dobrý efekt systémové kortikoterapie, přítomnost nosních polypů a aspirinová senzitivita
- Spirometrie: pozitivní bronchomotorické testy, průkaz výrazné bronchiální hyperreakivity.

B) Vedlejší biomarkery: (zatím spíše v rámci studií):

- Periostin v séru, KVV
- Močový LTE4 a močový bromotyrosin
- Dipeptidyl peptidasa-4 (DPP-4) v séru
- Eozinofily v BAL, TBB, nosní biopsii

**Cílená terapie:** anti-IgE, anti IL5 mepolizumab, reslizumab, benralizumab, IL-4 and IL-13 (lebrikizumab, tralokinumab, dupilumab), GSK679586, AMG 317, CRTH2, PGD2

## 2. Type 2 low fenotyp:

### A) Hlavní biomarkery:

- Eosinofily v krvi (nízké zastoupení)
- Indukované sputum (paucigranulární a neutrofilní převaha, minimum eozinofilů)
- Klinicky: kortikorezistence
- Spirometrie: fixovaná obstrukce

### B) Vedlejší (v rámci studií)

- Subpopulaci Th1 a TH17 lymfocytů (CD4lymfocytů)
- Vyšetření chemoreaktantů-IL8 (kondenzát vydechaného vzduchu, v krvi)
- TNFα produkovaný Th1 lymfocyty
- C-X-C chemokine receptor 2 (CXCR2)

**Cílená terapie:** brodalumab, anti-IL-17; golimumab, anti-TNFα, makrolidy, CXCR2 antagonisté, 5lipoxygenase-activating protein (FLAP) inhibitors, prostaglandin E3/E4 inhibitory

## 3. CÍLE A STRUKTURA PRÁCE

Disertační práce se zabývá klinickou využitelností přímých i nepřímých imunologických markerů při diagnostice a volbě cílené terapie u nemocných s těžkým refrakterním astmatem a sledováním účinnosti zvolené terapie.

Této problematice bylo věnováno celkem 7 dílčích prací, rozdělených do 2 částí.

V první části jsme porovnávali výpovědní hodnotu, vzájemné korelace a klinickou použitelnost biomarkerů získaných z krve, indukovaného sputa, bronchoalveolární laváže a nosních biopsií u skupiny těžkých astmatiků, včetně jejich změn před a po nasazení systémové kortikoterapie. Význam tohoto tématu je dán skutečností, že v běžné klinické praxi je řada nemocných s těžkými formami astmatu různě dlouho léčena systémovou kortikoterapií, jako donedávna jedinou možnou alternativou léčby těžkého astmatu, která však zároveň může interpretační hodnotu biomarkerů významně ovlivnit.

Této problematice jsou věnovány celkem 3 navazující práce. Sledujeme zde kromě výše uvedeného i možnosti využití ORL nálezů při diagnostice a výběru terapie u pacientů s těžkým refrakterním astmatem a dále stanovení negativních prognostických faktorů rozvoje a vzniku těžké formy nemoci.

Druhá část je zaměřena na sledování efektu cílené terapie vybrané na podkladě fenotypizace pomocí imunologických a ev. ostatních biomarkerů a zahrnuje celkem 4 dílčí práce. Prvé dvě pojednávají o biomarkerech alergie/atopie a vyhodnocení efektu cílené léčby. Konkrétně se jedná o více než 10leté zkušenosti s biologickou terapií pomocí anti-IgE protilátky. Třetí práce se zabývá klinickou použitelností vyšetřování periostinu při výběru cílené biologické léčby. Čtvrtá práce posuzuje použití funkčně-klinického biomarkeru (bronchiální reverzibility) při racionální indikaci bronchiální termoplastiky.

## 4. ŘEŠENÍ VLASTNÍ STUDIE

### 4.1. Hodnocení klinické použitelnosti jednotlivých invazivních a neinvazivních imunologických biomarkerů u pacientů s těžkým refrakterním astmatem.

4.1.1. Vliv systémové kortikoterapie u pacientů s těžkým refrakterním astmatem na změny invazivních a neinvazivních markerů sledovaných z krve, sputa, bronchoalveolární laváže, nosních biopsií a jejich klinické využití.

4.1.1.1. Imunologické markery z indukovaného sputa a BALTE

4.1.1.2. Nosní biopsie v korelaci s ostatními markery

4.1.2. ORL nálezy a jejich využití při fenotypizaci pacientů s astmatem



## **4.2. Hodnocení klinických výsledků využití biomarkerů při fenotypicky cílené léčbě pacientů s těžkým refrakterním astmatem.**

### 4.2.1. Biomarkery eozinofilie a alergie z krve

4.2.1.1. Vyhodnocení efektu a bezpečnosti cílené biologické terapie omalizumabem v ČR

4.2.1.2. Vyhodnocení efektu biologické terapie omalizumabem po 10 letech v NCTA Plzeň

4.2.1.3. Význam měření periostinu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem

### 4.2.2. Ostatní biomarkery

4.2.2.1. Význam reverzibility bronchiální obstrukce při výběru pacientů pro ošetření bronchiální termoplastikou a sledování efektu této léčby na našem souboru pacientů.

### **4.1.1. Vliv systémové kortikoterapie u pacientů s těžkým refrakterním astmatem na změny invazivních a neinvazivních markerů sledovaných z krve, sputa, bronchoalveolární laváže, nosních biopsií a jejich klinické využití. (Ruzickova-Kirchnerova O et al., n.d.)**

**Cíl práce:** V úvodní prvé práci (4.1.1.1) jsme se pokusili zjistit, zda flowcytometrická analýza (FC) indukovaného sputa a BALTe může být využita k spolehlivému vyšetření buněčného profilu a zda výsledky našich měření korelují se standardním (DCC) a imunocytochemickým (ICC) barvením na sklíčku. Další navazující práce (4.1.1.2) se zabývala možnou souvislostí mezi typem zánětu v horních a dolních cestách dýchacích. Položili jsme si otázku, zda a do jaké míry jsou vyšetření indukovaného sputa (IS), bronchoalveolární laváže (BALTE) a nosní biopsie (NB) spolehlivými metodami pro stanovení buněčného profilu (typu zánětu). V obou případech jsme porovnávali jednotlivé metody mezi sebou a zjišťovali, jaký efekt má systémová kortikoterapie na zánětlivé změny, resp. biomarkery v horních i dolních cestách dýchacích. Pokusili jsme se tedy stanovit biomarkery použitelné pro běžnou klinickou praxi.

**Design studie:** Prospektivní studie v letech 2006-2008 zahrnovala pacienty s těžkým refrakterním astmatem pod nedostatečnou kontrolou, léčené vysokými dávkami inhalačních kortikosteroidů v kombinaci s dlouhodobě působícími  $\beta_2$  agonisty (IKS+LABA). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s touto studií. Na Ústavu imunologie a alergologie (ÚIA) jim bylo provedeno vyšetření indukovaného sputa (IS), spirometrie a FENO a následně byli přijati ke krátké hospitalizaci na naší plicní kliniku. V rámci hospitalizace byla odebrána důkladná anamnéza a provedeno fyzikální vyšetření a spirometrie včetně bodypletysmografie. Dále byly provedeny laboratorní odběry, viz níže. Následující den nemocní podstoupili bronchoskopické vyšetření s provedením bronchoalveolární laváže. Vzorky BALTe byly odeslány na ÚIA k dalšímu zpracování. Pacienti dále podstoupili odběr nosní biopsie na ORL klinice FN Plzeň, vzorek byl mikroskopicky analyzován na Šiklově ústavu Patologie. Poté byla u pacientů k stávající chronické medikaci přidána léčba vysokými dávkami systémových kortikoidů (40mg prednisonu/na den + antiulcesorní léčba) po dobu 1 měsíce. Po měsíci terapie byla veškerá vyšetření zopakována.

**Soubor pacientů:** Náš soubor zahrnoval celkem 30 pacientů, nekuřáků s těžkým refrakterním astmatem s mediánem věku 43,8 let (rozmezí 21-75 let), celkem 13 mužů (43,3 %) a 17 žen (56,6 %). Jednalo se o astmatiky, kteří byli v péči naší ambulance pro těžké astma. Všichni tito pacienti byli léčeni vysokými dávkami IKS v kombinaci s LABA, ev. s dalšími antiastmatiky (antileukotrieny, theofyliny).

### **Metody:**

- Vzorky krve byly odeslány na vyšetření základních biochemických parametrů včetně parametrů zánětu CRP, a především krevní obraz s diferenciálním rozpočtem, stanovení ECP, celkového a specifických IgE.
- Vyšetření funkce plic a FENO: Zaznamenávali jsme základní spirometrické parametry: usilovná a pomalá vitální kapacita (FVC, SVC), usilovně vydechnutý objem za první sekundu (FEV1), poměry FEV1/VC, kompletní bodypletysmografii, hodnoty FENO v ppb.
- Vyšetření indukovaného sputa: Indukované sputum bylo získáno inhalací roztoku NaCl o koncentraci 3 %, 4 % a 5 % po dobu 7 minut a bylo ihned předáno ke zpracování do laboratoře. Příprava suspenze buněk: ke 4ml DTT (dithyotreitolu) a 4 ml PBS (protiein-bovinní serum) bylo přidáno veškeré získané sputum. V tomto kroku dochází k rozpouštění disulfidických můstků působením DTT. Po 15minutové inkubaci na třepačce byla získaná suspenze buněk promyta do PBS a naředěna na koncentraci  $1 \cdot 10^6$  bb/ml. Takto získaný materiál byl dále zpracováván viz níže.

- Počet buněk (buněčnost) v suspenzi a jejich životnost byla změřena pomocí tropanové modři hodnocením v Bürkerově komůrce.

### **Buněčné složky:**

**Skličkové metody:** Klasické barvení (DCC). Diferenciální rozpočet byl stanoven pomocí cytopsinu, kde byly připraveny nátěry buněčné suspenze, které byly obarveny metodou Giemsa-Romanowsky. Preparáty byly připravovány z buněčné suspenze o koncentraci buněk  $1 \cdot 10^6$  bb/ml ředěné 1:1 a 1:100. Zaznamenávali jsme počet neutrofilů, monocytů, eozinofilů a lymfocytů. K imunocytochemickému barvení (ICC) byly použity protilátky vůči elastáze (neutrofilly), CD 68 (makrofágy) a MBP (eozinofily).

Pro *cytometrické stanovení* (FC) byla použita buněčná suspenze o koncentraci buněk  $1 \cdot 10^6$  bb/ml. Průtokovým cytometrem byly v první části práce stanoveny znaky CD45, CD16, CD14. Vhodnou kombinací těchto znaků lze stanovit většinu populací v indukovaném sputu. Neutrofilní granulocyty byly stanoveny jako CD14 negativní, CD16 pozitivní populace. Monocyty byly stanoveny jako CD14 pozitivní, CD16 pozitivní populace. Eozinofilní granulocyty byly stanoveny jako CD14 negativní, CD16 negativní populace. Makrofágy lze detekovat jako CD14 pozitivní, CD16 negativní populaci buněk. Lymfocyty jsou stanoveny ve vlastním gate SS/CD45. Ve druhé části práce byly stanoveny: elastáza, CD68, CD14, CRTH a CD45, MBP.

### **Humorální složky:**

Imunochemicky byl stanoven ECP (eozinofilní kationický protein) a MPO (myeloperoxidáza).

**Bronchoskopické vyšetření, odběr a analýza BALTE:** Vyšetření bylo provedeno flexibilním bronchoskopem dle standardů americké hrudní společnosti. Monitorace saturace kyslíku, EKG a krevního tlaku probíhala během celého výkonu. Lokální anestezie byla standardně provedena a byl použit flexibilní bronchoskop (Olympus BF p40, BF 1T40), bronchoalveolární laváž byla získána z pravého dolního lobárního bronchu, 3x50ml FR bylo instilováno a následně opětovně nasáto a předáno k okamžitému zpracování. V BALTE byla stanovena buněčnost, životnost a provedeno klasické barvení (DCC), imunochemické barvení (ICC) a flow-cytometrická analýza (FC) analogicky jako v indukovaném sputu, stejně jako vyšetření humorálních složek.

**Odběr nosní biopsie (NB):** Vzorky nosní sliznice jako možného markeru eosinofile v horních cestách dýchacích, byly odebrány vždy dva (po předchozím minimálně 2měsíčním vysazení nosních kortikosteroidů a systémových kortikosteroidů, antileukotrieny byly vysazeny 1 měsíc a antihistaminika 4dny před vyšetřením). Pacienti byli bez antikoagulační terapie. ORL lékař vyšetřil dutinu nosní, poté provedl lokální anestezii (na 10 min umístil malý tampónek s 0,5 % tetracainem a epinefrinem pod obě střední skořepky) a odebral pomocí ostrých klíčtek 2 vzorky z obou nosních skořep. Vzorky byly následně vyhodnoceny patoložkou, 5 $\mu$  vzorky byly nabarveny pomocí hematoxylin-eosinu a PAS (Periodic Acid Schiff) a hodnoceny mikroskopicky – zvětšení 10 a 20 a 40x. Hodnocena byla struktura respiračního epitelu, metaplasie a chronické zánětlivé změny včetně přítomnosti eosinofilů semikvantitativně (stupně 0-žádná přítomnost, 1-přítomny v menším množství a 2-bohatě prostoupena eosinofily). Barvení PAS bylo použito k vyloučení mykotické infekce.

**Statistická analýza:** Rozdíly spojitých parametrů mezi zkoumanými skupinami byly hodnoceny neparametrickou metodou ANOVA, především Kruskal-Wallisovým testem. Vztahy mezi proměnnými jsme hodnotili pomocí pořadové korelace – Spearmanovým korelačním koeficientem. Výsledky s hodnotou  $p < 0.05$  byly považovány za statisticky významné. Dále pro hodnocení vzorků před a po terapii systémovými kortikoidy byl použit párový znaménkový test.

#### **4.1.1.1. Imunologické markery z indukovaného sputa a BALTE**

Téma bylo zpracováno v práci "**Porovnání využitelnosti flowcytometrie, rutinních a imunocytochemických metod při stanovení buněčného profilu v indukovaném sputu a bronchoalveolární laváži u pacientů s těžkým refrakterním astmatem.**" (Malkusová I., Ružičková O., Teř M., Vlas T., 2009)

**Cílem naší práce bylo zjistit, zda lze při vyšetřování buněčného profilu IS a BALTE pracnější metody sklíčkové nahradit vyšetřováním na průtokovém cytometru.**

**Výsledky:** K výslednému porovnání bylo získáno 62 % vzorků IS a 79 % vzorků BALTE od vyšetřených pacientů. Porovnávali jsme výsledky vyšetření obou sklíčkových metod (DCC a ICC) a průtokové cytometrie (FC) před a po nasazení systémové kortikoterapie (40mg prednisonu/den po dobu 1 měsíce).

#### **Indukované sputum (IS):**

DCC vs FC: neutrofilů  $r=0.264, 0.287$ , p values 0.15, 0.21, makrofágy  $r=0.216, 0.404$ , p values 0.24, 0.07 lymfocyty  $r=0.165, 0.123$ , p values 0.37, 0.36.

ICC vs FC: neutrofilů  $r=0.41, 0.29$ , p values 0.02, 0.21 a makrofágy  $r=0.29, 0.36$ , p values 0.12, 0.11, resp.

#### **Bronchoalveolární lavážní tekutina (BALTE):**

DCC vs FC: neutrofilů  $r=0.56, 0.02$ , p values 0.01, 0.8 makrofágy  $r=0.56, 0.13$ , p values 0.01, 0.5 lymfocyty  $r=0.34, 0.22$  resp, p values 0.05, 0.28, resp.

ICC vs FC: neutrofilů  $r=0.14, 0.16$ , makrofágy 0.37, 0.27 resp., p values 0.46, 0.41, a 0.04, 0.15, resp.

**Re:** V případě indukovaného sputa byla nalezena statisticky významná korelace mezi výsledky průtokové cytometrie a DCC pouze při stanovení makrofágů, mezi výsledky průtokové cytometrie a ICC pouze při stanovení neutrofilů, v obou případech pouze před nasazením systémové kortikoterapie.

V případě vyšetření BALTE byla nalezena statisticky významná korelace mezi výsledky průtokové cytometrie a DCC u všech typů buněk, rovněž však pouze před zahájením kortikoterapie.

#### **4.1.1.2. Nosní biopsie v korelaci s ostatními markery**

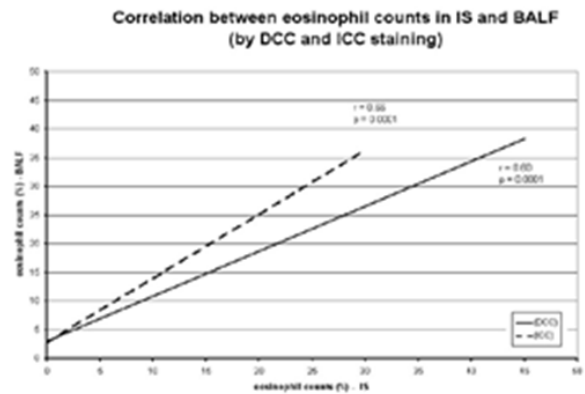
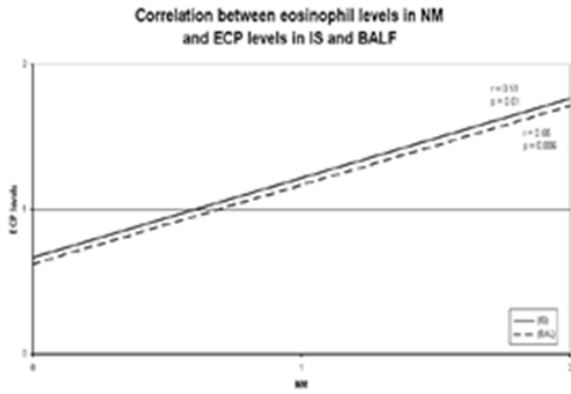
Téma bylo zpracováno v práci "**Vyšetření indukovaného sputa, bronchoalveolární laváže, FENO a biopsií nosní sliznice u pacientů s těžkým astmatem**".

**Výsledky a resume:** Statisticky významnou korelaci jsme zjistili při porovnání počtu eozinofilů ve vzorcích nosní biopsie (NB) a hladinami ECP ve vzorcích indukovaného sputa IS ( $p = 0.01$ ) a BALTE ( $p = 0.006$ ) **Graf č.1**, dále mezi počtem eozinofilů ve vzorcích nosní biopsie (NM) a IS stanoveným metodou DCC ( $p = 0.0005$ ) a ICC ( $p = 0.01$ ), **Graf č.2**. Nenalezli jsme žádnou statisticky významnou korelaci mezi počtem eozinofilů ve vzorcích nosní biopsie (NM) a BALTE ( $p = 0.06$ ,  $p = 0.26$  resp.) při použití DCC a ICC metod stanovení **Graf č.3**.

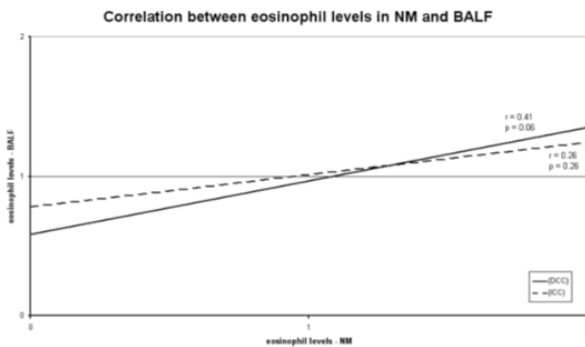
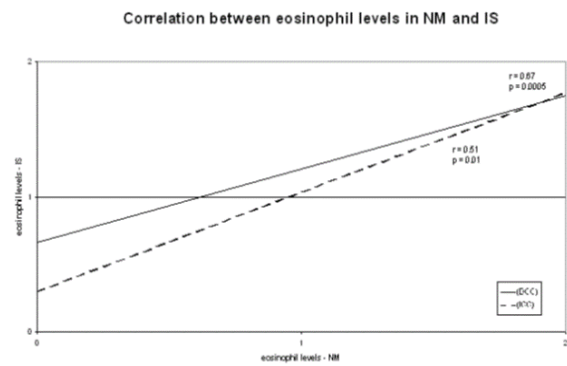
Po 4 týdnech terapie systémovými kortikoidy byl zaznamenán pokles eozinofilů ve vzorcích indukovaného sputa (IS) **graf č.4+5** (metoda DCC a ICC) a BALTE **Graf č. 7+8** (metoda DCC a ICC) ( $p < 0.0003$ ,  $p < 0.0002$ ) a pokles hladiny ECP v IS **Graf č.6** a BALTE **Graf č.9** ( $p < 0.0003$ ,  $p < 0.007$ ) a FENO ( $p < 0.0054$ ) **Graf č. 10 a+b**.

Vyšetření IS a BALTE metodou průtokové flowcytometrie (FC) při porovnání s ostatními metodami stanovení nepřineslo žádné statisticky významné výsledky. Nebyla nalezena žádná korelace mezi počtem eozinofilů v nosní biopsii a hodnotou FENO před podáním systémové kortikoterapie.

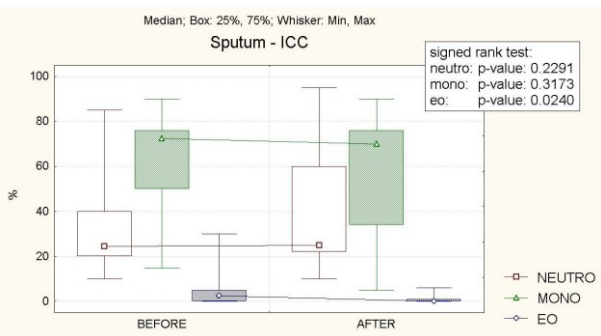
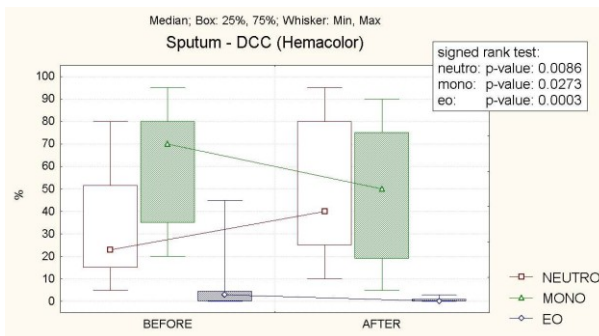
**Graf č.1** Porovnání počtu eozinofilů ve vzorcích nosní biopsie (NM) a hladinami ECP ve vzorcích indukovaného sputa IS ( $p = 0.01$ ) a BALTE.



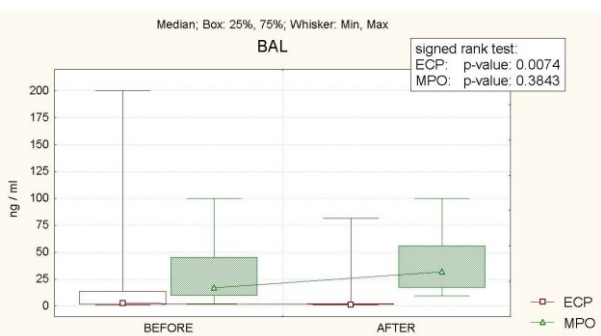
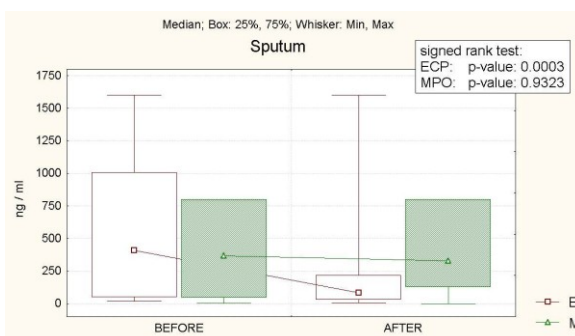
**Graf č. 2** Počet eozinofilů ve vzorcích nosní biopsie (NM) a IS stanoveným metodou DCC a ICC (vlevo) **Graf č.3** Počet eozinofilů ve vzorcích nosní biopsie (NM) a BALTE ( $p=0.06$ ,  $p=0.26$  resp.) při použití DCC a ICC metod stanovení (vpravo).



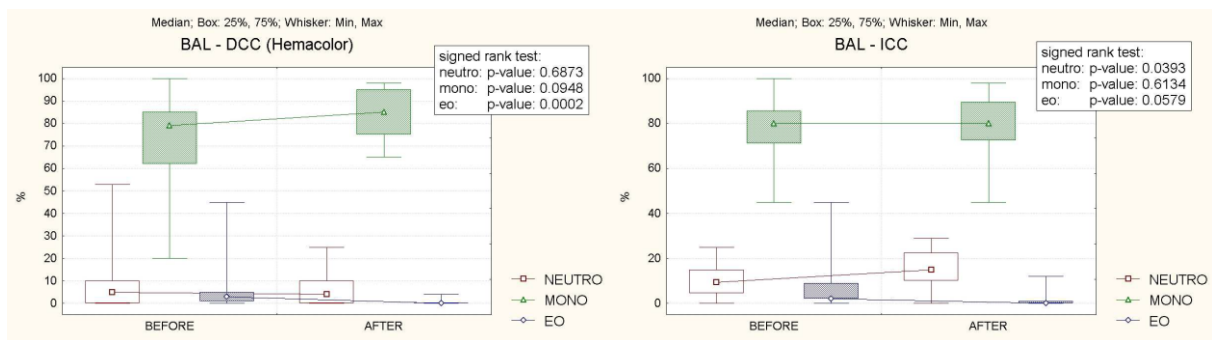
**Graf č.4+5** Počty neutrofilů, monocytů a eozinofilů ve vzorcích indukovaného sputa před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie stanovené metodou DCC (vlevo) a ICC (vpravo).



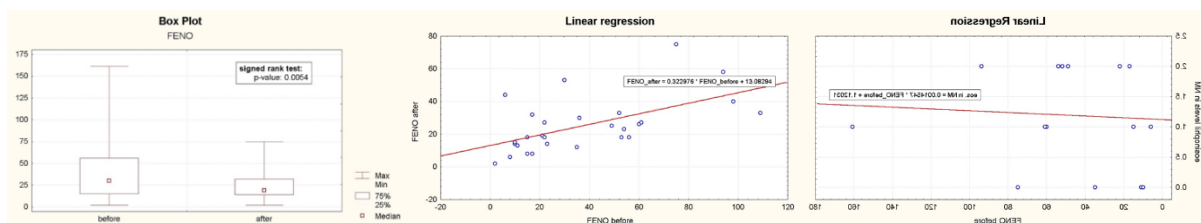
**Graf č. 6+9.** Hodnota ECP a MPO ve vzorcích indukovaného sputa (vlevo) a BALTE (vpravo) před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie.



**Graf č.7+8** Počty neutrofilů, monocytů a eozinofilů ve vzorcích BALTE před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie stanovené metodou DCC (vlevo) a ICC (vpravo).



**Graf č. 10 a, b (vlevo)** Hodnota FENO před a po 4 týdnech systémové kortikoterapie. **Graf č. 12 (vpravo)** Počet eozinofilů v nosní biopsii (NM) a hodnota FENO před a po nasazení systémové kortikoterapie.



#### 4.1.2. ORL nálezy a jejich využití při fenotypizaci pacientů s astmatem

Cílem této práce bylo zjistit, zda existují rozdíly, resp. korelace mezi intenzitou bronchiální eozinofilie a přítomností nosních polypů u rozdílných fenotypů astmatu a jejich praktický přínos.

##### Soubor pacientů a metody stanovení:

Provedli jsme retrospektivní hodnocení 128 pacientů s astmatem s různou tíží nemoci mezi lety 2004 až 2011. Do studie nebyli zařazeni pacienti s cystickou fibrózou, imunodeficitem, vrozenou poruchou mukociliární clearance, invazivními plísnovými onemocněními a nádory. Na základě přímých a nepřímých známek eozinofilie a alergie jsme pacienty rozdělili do 3 základních skupin (fenotypů): I. Eozinofilní a alergické, II. Eozinofilní a nealergické a III. Neeosinofilní astma, blíže viz kap. 2. Alergologické vyšetření zahrnovalo i cílenou detekci alergie na plísně, cílená anamnéza zjišťovala intoleranci nesteroidních antiflogestik (NSAID). Tíže astmatu byla hodnocena dle GINA kritérií (lehké, středně těžké a těžké perzistující astma).

K posouzení přítomnosti alergie a eozinofilie DCD (průdušek) byly u pacientů provedeny:

1. Kožní testy na běžné alergenů (dle standardů s použitím Alyostal Prick Test, Stallergens).
2. Měření hladin specifických IgE (pomocí Immulite analyzáru  $\geq 0.7$  IU/ml).
3. Měření vydechaného oxidu dusnatého (FENO), systémem Niox Mino set.
4. Stanovení ECP (eosinofilní kationický protein) jako marker aktivity eosinofilů v séru, sputu a BALTE za použití chemiluminiscenční imunometrické assay (Immulite, DPC), výsledky byly upraveny dle dilučního faktoru. Prahová hodnota detekce byla 0.2 mg/ml.
5. Stanovení počtu eozinofilů v krvi.
6. Stanovení počtu eosinofilů v indukovaném sputu; vyšetření indukovaného sputa proběhlo standardní metodou (dle Pizzichini). Diferenciální buněčný rozpočet byl stanoven pomocí klasického a imunocytochemického barvení, (viz předchozí studie).
7. Stanovení počtu eozinofilů v BALTE. 32 pacientů s těžkým astmatem podstoupilo bronchoskopii dle ATS guidelines (viz předchozí práce). Diferenciální rozpočet byl stanoven stejnou metodikou jako u vyšetření indukovaného sputa.

K posouzení intenzity eozinofilie HCD a přítomnosti nosní polypózy byly využity tyto metody:

1. anamnestická data předchozích ORL operací
2. přímá rinoskopie
3. CT scany (axiální a koronární)
4. histologická vyšetření vzorků nosní sliznice

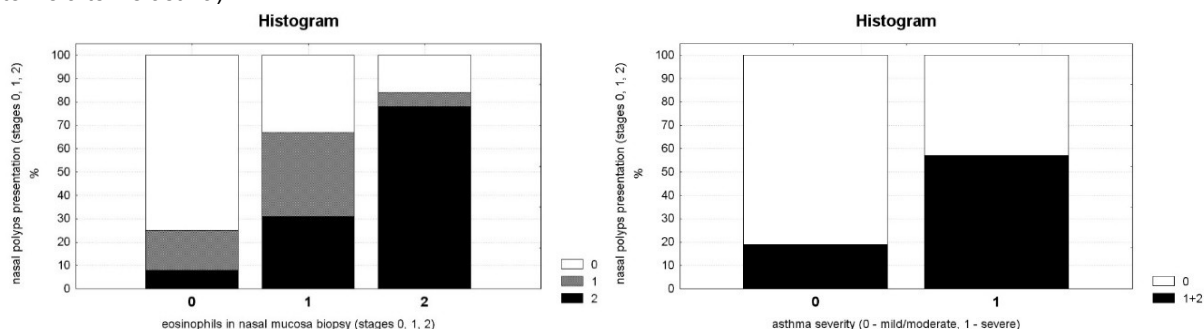
Použili jsme modifikovaný endoskopický stagingový systém pro hodnocení stádia nosní polypózy s rozšířením o CT scany. Stadium 0 – bez nosních polypů, I – polypy dosahují maximálně ke střednímu meatu a dle CT scanů jsou nízkého stupně, II – polypy přesahují střední meatus a kompletně vyplňují dutinu nosní a dle CT scanů jsou přítomny ve vysokém stupni.

Vzorky nosní sliznice jako možného markeru eosinofíle v horních cestách dýchacích, byly odebrány vždy dva (postup viz předchozí studie).

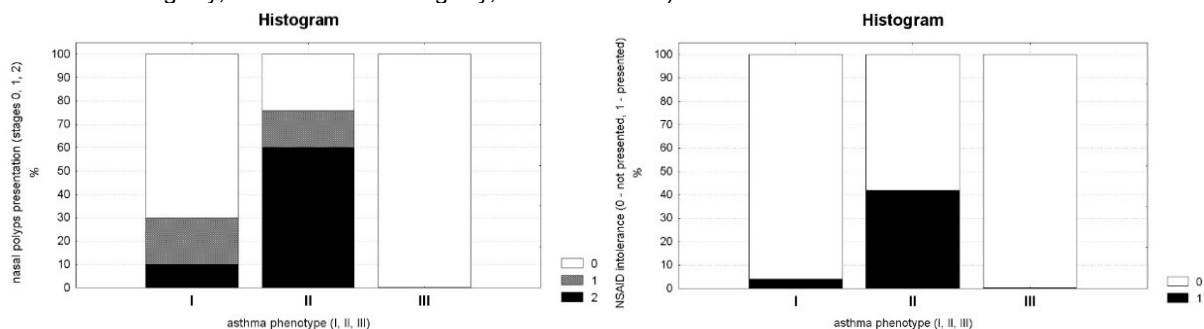
Statistické výpočty byly provedeny s použitím Chi-square testu a Spearmanova korelačního koeficientu. Hodnota  $p < 0,05$  byla považována jako statisticky významná.

**Výsledky:** Statistická významnost byla zjištěna při porovnání přítomnosti eosinofilního typu zánětu ve vzorcích nosních biopsií (NB) s přítomností nosních polypů ( $p = .0001$ , coeff. 0.55) a rovněž i stadium nosních polypů (I,II, III) odpovídalo intenzitě eosinofíle ve vzorcích nosní biopsie (st. I, II, III) ( $p = .0001$ , coeff.0.44) viz **Graf č.13**. Dále byla potvrzena korelace mezi přítomností nosních polypů a tíží nemoci-těžkým astmatem ( $p = .0001$ , coeff. 0.358) - **Graf č.14**. Přítomnost nosních polypů se sdužovala s eosinofilním a nealergickým typem zánětu ( $p = .0001$ ), viz **Graf č.15**. NSAID intolerance nejčastěji provázela eosinofilní a nealergický typ zánětu ( $p < .0001$ ), viz **Graf č.16**. U pacientů s eosinofilním a alergickým fenotypem astmatu, přítomnost nosních polypů korelovala s přítomností alergie na plísňe ( $p = .0004$ , coeff. 0.39) - **Graf č.17**. Alergie na plísňe ( $p = .0031$ , coeff. 0.259) a intolerance NSAID ( $p = .0090$ , koef 0.230) nejčastěji provázely těžké perzistující astma **Graf č. 18 a, b**. v "core" dizertační práci, zde neuveden.

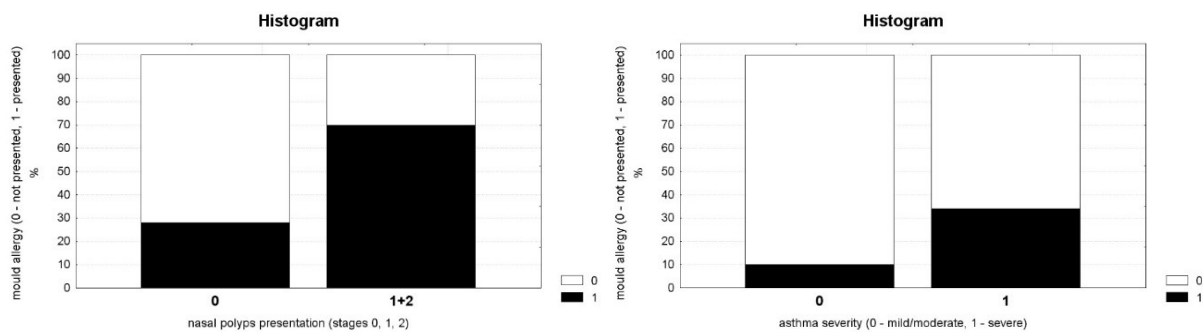
**Graf č. 13 (vlevo)** Porovnání přítomnosti eosinofilního typu zánětu (dle intenzity 1-3) v nosní biopsii a přítomnost nosních polypů dle stádií (I-III). **Graf č. 14.** (vpravo) Přítomnost nosních polypů a tíže nemoci (lehké, středně těžké a těžké astma)



**Graf.č.15 (vlevo)** Přítomnost nosních polypů u jednotlivých fenotypů astmatu (I-eozinofilní+alergický, II-eozinofilní nealergický, III-neeosinofilní). **Graf.č.16** (vpravo) Přítomnost intolerance NSAID a astma fenotypy (I-eozinofilní+alergický, II-eozinofilní nealergický, III-neeosinofilní).



**Graf.č.17** Soubor pacientů s eosinofilním alergickým (I.) fenotypem astmatu – sledování přítomnosti nosní polypózy u pacientů s alergií na plísňe.



## 4.2. Hodnocení klinických výsledků využití biomarkerů při fenotypicky cílené léčbě pacientů s těžkým refrakterním astmatem

### 4. 2.1. Biomarkery eozinofilie a alergie z krve

#### 4.2.1.1. Vyhodnocení efektu a bezpečnosti cílené biologické terapie omalizumabem v ČR

Téma bylo zpracováno v impaktované práci, viz "Real-word effectiveness" (Kirchnerová et al., 2018)

**Cíl práce:** Tato práce vyhodnocuje efekt přídavné léčby omalizumabem u pacientů v ČR, kteří byli zařazeni do registru eXperRience

**Metody:** Registr eXperRience byl 2letý, mezinárodní, postmarketingový, neintervenční, multicentrický (14 zemí Evropy, Ameriky a Asie), otevřený, jednoramenný observační registr, který shromáždil údaje o bezpečnosti a účinnosti léčby omalizumabem u pacientů s těžkým perzistujícím alergickým (IgE) astmatem. Dávka omalizumabu byla stanovena na základě evropského souhrnu údajů o léčivých přípravcích. Do studie byli zařazeni ti pacienti, kteří podepsali informovaný souhlas a splnili všechny podmínky pro podání omalizumabu. Nebyli zařazeni pacienti, kteří se účastnili jiné klinické studie nebo ti, kteří užívali omalizumab v posledních 18 měsících. Návrh registru byl přezkoumán nezávislými etickými výbory nebo kontrolními komisemi v každém středisku a samotný registr byl veden v souladu s Helsinskou deklarací. Současná studie byla post-hoc analýzou globálního registru eXperience.

**Vyhodnocení:** Po vstupu do registru byla z předchozích záznamů získána základní data (anamnéza, tíže astmatu a jeho kontrola, léčba v posledních 12 ti měsících). Pacienti byli sledováni v následujících dvou letech od zahájení terapie omalizumabem, a to v 16.týdnu a v 8.,12.,18. a 24. měsíci, kdy byl proveden sběr dat. Hodnocen byl efekt terapie dle GETE (physician's global evaluation of treatment effectiveness). Dotazník hodnotí pacienty na škále 1-5 (1- výborný, kompletní kontrola, 2- dobrý, viditelné zlepšení, 3- střední, viditelné, ale limitované zlepšení kontroly 4- špatné, žádná viditelná změna, 5- zhoršení).

Hodnotili jsme plicní funkce (FEV1% predikované hodnoty), PEF (peak expiratory flow), klinické symptomy (noční a denní), četnost užití úlevové medikace, potřebu orálních a inhalačních kortikosteroidů. Dále počet a tíži exacerbací, astma kontrol test, mini-AQLQ dotazník (test kvality života), potřebu zdravotní péče (akutní ošetření, hospitalizací, neplánovaných návštěv), počet zameškaných školních a pracovních dnů, vážné nežádoucí účinky a smrt.

**Statistické metody:** Proměnné hodnotící efekt léčby byly analyzovány u všech pacientů z České republiky, kteří byli zařazeni do registru a obdrželi minimálně jednu dávku omalizumabu a zároveň dospěli alespoň k jednomu hodnocení efektu (populace intent-to-treat, ITT). Pro analýzy jednotlivých časových intervalů byla použita data pacientů, která byla v daném intervalu k dispozici. Bezpečnostní data byla analyzována u všech pacientů z ČR, kteří byli zařazeni do registru, obdrželi alespoň jednu dávku omalizumabu a zároveň absolvovali alespoň jedno hodnocení efektu. Tato populace byla použita zároveň pro výpočty demografických a vstupních charakteristik. Deskriptivní (popisné) statistiky jsou vyjádřeny jako průměry a směrodatné odchylky (SD) respektive jako frekvence (četnosti) u kategoriálních dat. Opakovaná měření byla hodnocena s využitím obecného lineárního modelu (GLM-RM) nebo Friedmanovy ANOVY v případě, že data nespĺňovala podmínky normálního rozdělení. Četnostní data byla hodnocena pomocí testu  $X^2$  (Chí kvadrát). Analýza přežití byla provedena s využitím Kaplanova-Meierova algoritmu (s vyčíslením střední doby přežití) nebo Coxovy regrese (vyčísľující poměr rizik "HR" a 95% interval spolehlivosti). Pro všechny analýzy byla označena jako statisticky významná hodnota  $p < 0.05$ . Všechny analýzy byly provedeny pomocí analytického programu IBM SPSS Statistics, verze 22.0 (Windows), Armonk, NY: IBM Corp. Jedná se o post-hoc analýzu dat globálního registru eXperience.

**Výsledky:** Z celkového počtu 943 pacientů zařazených do registru eXperience, 114 pocházelo z České republiky. ITT a bezpečnostní populace zahrnovala 112 pacientů. Téměř 15 % (14,9 %) pacientů bylo vyřazeno z registru, důvodem byla ztráta pacienta ze sledování ( $n = 5$ ), přerušeni léčby ( $n = 3$ ), úmrtí ( $n = 1$ ), ostatní důvody ( $n = 8$ ), 7 pacientů z ČR mělo nekompletní záznamy, resp. nedořešené dotazy ze strany registru. Po 24 měsících, tedy na konci registru, byla kompletní data přístupná pro zpracování u 81 pacientů z ČR.

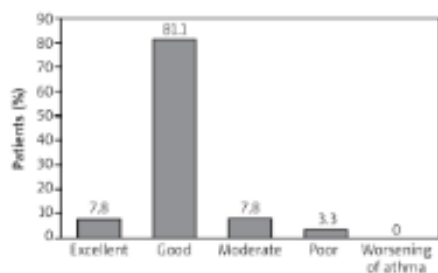


Figure 1. Physician's global evaluation of treatment effectiveness (GETE) at week 16 ± 1 weeks ( $n = 90$ )

**GETE (physician's global evaluation of treatment effectiveness):** Vyhodnocení pomocí GETE dotazníku po 16 týdnech terapie bylo provedeno u 90 pacientů, 88,9 % z nich ( $n = 80$ ) byli respondéři (excelentní a dobrá odpověď na terapii v 7,8 % ( $n = 7$ ) a 81,1 % ( $n = 73$ ) pacientů), 11,1 % ( $n = 10$ ) pacientů na terapii nereagovalo (non-respondéři). V případě vyhodnocení GETE dotazníku v kterémkoli časovém bodě po dobu registru, 85,7 % ( $n = 96$ ) byli respondéři a 14,3 % ( $n = 16$ ) non respondéři).



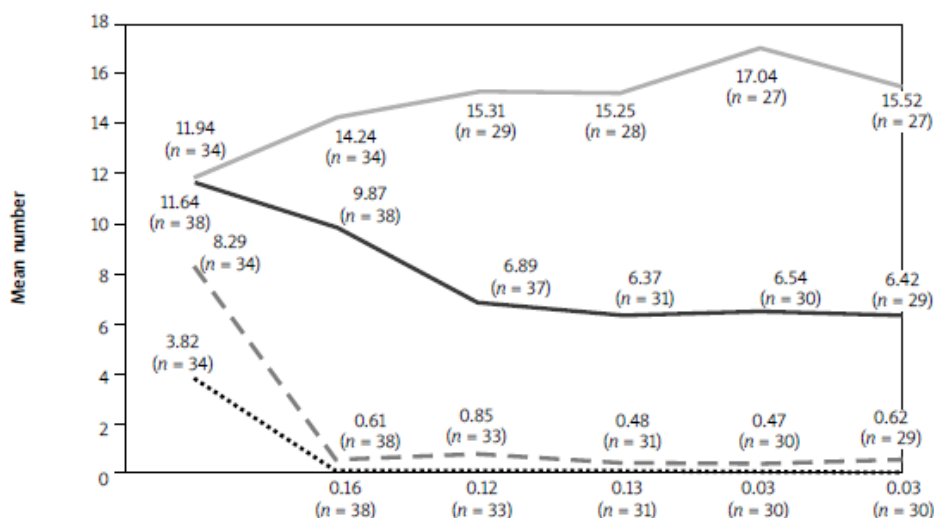
**Plicní funkce:** Terapie omalizumabem vedla k zlepšení FEV1 se střední změnou oproti výchozím hodnotám (ml) 205 (n = 105), 215 (n = 88), 273 (n = 87), 200 (n = 85) a 137 (n = 80) v 16. týdnu, 8., 12., 18. a 24. měsíci terapie. Došlo ke zlepšení PEF se střední změnou oproti výchozí hodnotě (l/min) 11,01 (n = 82), 18,38 (n = 66), 32,82 (n = 65), 25,18 (n = 63) a 21,85 (n = 60) v 16. týdnu, 8., 12., 18. a 24. měsíci terapie.

**Astma symptomy a užití úlevové medikace:** Omalizumab snižuje denní i noční příznaky, probouzení v noci, omezení denní aktivity a potřebu úlevové medikace v týdnu 12 a 24 měsíci oproti výchozím hodnotám. Týden před zahájením terapie (baseline visit) 108 (96,4 %) pacientů užívalo pravidelně záchranou medikaci, tato potřeba byla snížena na 61 (75,3 %) pacientů po 24 měsících terapie. Střední změna úlevové medikace (krátkodobě působící  $\beta_2$  agonisté) se snížila z 5,2 dní/týdnu na 2,9 dní/týdnu po 24 měsících terapie.

**Užití systémových kortikosteroidů:** Pravidelně systémovými kortikosteroidy bylo léčeno 38 pacientů (33,9 %) s průměrnou denní dávkou 11,6mg (ekvivalentu prednisolonu). Procento pacientů užívajících systémové kortikoidy při porovnání se zahájením terapie kleslo o 50 % (n = 19) a 52,6 % (n = 18) po 12 a 24 měsících léčby a průměrná denní dávka systémové kortikoterapie (ekvivalent prednisolonu) klesla v populaci pacientů trvale užívající kortikoidy při zahájení léčby na 6,4mg po 12 a 24měs (**Graf č.20**)

**Počet exacerbací:** Průměrný počet klinicky významných exacerbací poklesl při terapii omalizumabem z 5.7 (n = 104) výchozích na 1,1 (n = 89) a 0,7 (n = 80) a těžké exacerbace klesly z 2,2 (n = 105) výchozích na 0,2 (n = 89) a 0,1 (n = 81) po 12 a 24 měsících terapie (Graf č.20). Navíc podíl pacientů bez klinicky významných/závažných exacerbací se výrazně zvýšil při terapii omalizumabem na 56,2 % (n = 50) / 89,9 % (n = 80) a 63 % (n = 51) / 95,1 % (n = 77) po 12 a 24 měsících terapie. **Graf č.20**.

**Graf.20** Efekt omalizumabu na potřebu systémových kortikoidů, kontrolu astmatu a exacerbace u pacientů na dlouhodobé terapii systémovými kortikosteroidy



	Baseline	Week 16	Month 8	Month 12	Month 18	Month 24
— Total daily dose of OCS (in prednisolone equivalent mg)	11.64	9.87	6.89	6.37	6.54	6.42
— ACT™ overall score	11.94	14.24	15.31	15.25	17.04	15.52
- - Clinically significant exacerbations	8.29	0.61	0.85	0.48	0.47	0.62
— Severe clinically significant exacerbations	3.82	0.16	0.12	0.13	0.03	0.03

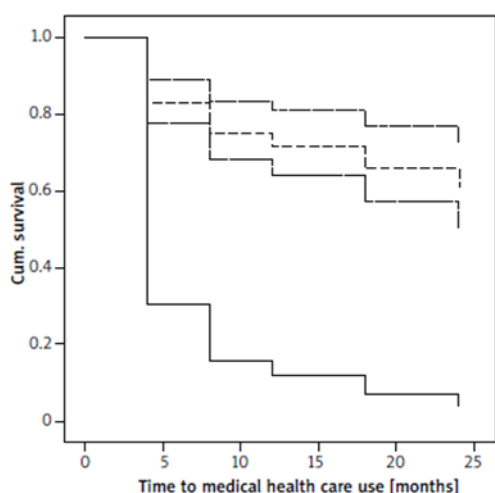
Values for OCS and ACT are for the week before the specified time points. Values for exacerbations at baseline are for 12 months prior to the start of omalizumab treatment. OCS – oral corticosteroids, ACT – Asthma Control Test, N – number of evaluable patients.

**Figure 2.** Effect of omalizumab on corticosteroid therapy, asthma control and exacerbations in OCS maintenance therapy population (n = 38)

**Kontrola astmatu a kvalita života:** Po 12 a 24 měsících terapie 92,1 % (n = 82) a 87,7 % (n = 7) pacientů hodnotilo své astma pod dobrou či částečně dobrou kontrolou, což je významně lepší výsledek v porovnání se vstupními hodnotami (24,1 %, n = 27).

Skóre ACT (astma control test) se zlepšilo z 12,4 (n = 103) na 17,3 (n = 84) a 17,3 (n = 75) po 12 a 24 měsících terapie. Klinicky významné zlepšení oproti výchozím hodnotám ACT skóre bylo pozorováno při terapii omalizumabem po 12 (průměrná změna 4,3 bodů, n=81) i 24 měsících (průměrná změna 4,3 bodů, n = 73). U pacientů na dlouhodobé terapii systémovými kortikoidy došlo k průměrné změně v ACT skóre v porovnání s výchozí hodnotou o 27,7 % a 29,9 % po 12 a 24 měsících léčby omalizumabem. K podobnému zlepšení došlo při posuzování kvality života související se zdravím hodnocené pomocí dotazníků mini AQLQ. Průměrné změny 0,8 a 0,94 bodů u mini AQLQ po 12 měsících (n = 38) a 24 (n = 32). Celkově 60,5 % (n = 23) a 65,6 % (n = 21) pacientů dosáhlo klinicky významného zlepšení v mini AQLQ skóre oproti výchozím hodnotám.

**Graf č.21** Vyhodnocení potřeby zdravotní péče pomocí evaluačního dotazníku GETE



(Overall model score:  $X^2(3) = 19,031$ ,  $P < 0,001$ ,  $-2LL = 373,9$ , reference value – poor responder, HR (moderate responder) = 0,26 ( $p = 0,04$ , 95% CI: 0,072–0,937), HR (good responder) = 0,168 ( $p < 0,001$ , 95% CI: 0,067–0,462), HR (excellent responder) = 0,117 ( $p = 0,01$ , 95% CI: 0,023–0,599). GETE – global evaluation of treatment effectiveness, HR – hazard ratio.

**GETE (investigator response assessment):**

- Poor responder (non-responder)
- Moderate responder (non-responder)
- △— Good responder (responder)
- Excellent responder (responder)

**Figure 3.** Effect of physician's global evaluation of treatment effectiveness (GETE) on medical healthcare use risk calculated by Cox regression (n = 112)

**Využití zdravotní péče v souvislosti s astmatem** (hospitalizace, akutní ošetření, neplánované návštěvy lékaře) na pacienta a zmeškané pracovní dny v důsledku zhoršení astmatu se sigifikantně snížily po 12 a 24 měsících terapie omalizumabem ve srovnání s výchozí hodnotou (**Graf č.21**). Průměrný počet dní (SD±) využití zdravotní péče na pacienta klesl z  $6,8 \pm 10$  během 12 měsíců před zahájením terapie (n=99) na  $0,8 (\pm 2,1)$  a  $0,4 (\pm 1,2)$  ve 12 (n = 88) a 24 (n = 80) při léčbě omalizumabem. Využití zdravotní péče bylo sníženo oproti výchozím hodnotám o 88,2 % a 94,1 % po 12 a 24 měsících léčby.

Účinky GETE na riziko zdravotní péče bylo vypočítané pomocí Cox regrese (celkové hodnocení modelu  $p < 0,001$ ). Referenční hodnota byla definována jako slabá odpověď. Výpočet poměru rizik (HR) u průměrných respondentů byl 0,26 ( $p = 0,04$ , 95% CI: 0,072–0,937), HR (dobrý respondér) = 0,168 ( $p < 0,001$ , 95% CI: (vynikající respondér) = 0,117 ( $p = 0,01$ , 95% CI: 0,023–0,599). V průběhu studie jsme nezaznamenali žádný případ zhoršování astmatu (**Graf č.21**). Na rozdíl od špatných respondentů měli vynikající, dobří a průměrní respondenti snížené riziko užívání zdravotní péče o 88,3 %, respektive 83,2 % a 74 %. Průměrná hodnota ± SD počet dní zmeškaných prací v důsledku zhoršení astmatu z  $24,3 \pm 27,4$  při výchozím stavu (n = 43) na  $2,4 \pm 6,4$  a  $1,7 \pm 5,1$  v měsících 12 (n = 43) a 24 (n = 38). Průměrný počet dnů

zameškané práce v důsledku astmatu se po měsících 12 a 24 snížil o 90,1 % a 93,0 %. Průměrný počet SD hospitalizací souvisejících s astmatem se snížil z  $0,5 \pm 1,2$  v 12 měsících před terapií (n = 105) až  $0,0 \pm 0,0$  po 12 měsících (n = 89) a  $0,0 \pm 0,2$  po 24 měsících (n = 81). Průměrný počet dnů SD v nemocnici v důsledku astmatu poklesl z  $3,3 \pm 9,8$  v 12měsíčním období před léčbou (n = 100) na  $0,3 \pm 2,0$  po 12 měsících (n = 89) a na  $0,2 \pm 2,2$  po 24měsících (n = 81). Celkově bylo 100 % a 98,8 % pacientů bez nutnosti hospitalizací spojených s astmatem po 12(n = 89) a 24 (n = 80) měsících léčby.

**Vážné nežádoucí účinky léčby (SAE):** Celkově bylo hlášeno 11 závažných nežádoucích účinků (SAE) u všech sledovaných 112 pacientů z bezpečnostní populace. Z toho 4 nemocní pocházeli z ČR. Tyto SAE (selhání jater, pravostranná pneumonie, plicní embolie, divertikulitida sigmoidu) nebyly dány do souvislosti se studijní medikací. Jeden pacient zaznamenal kumulativní nežádoucí účinky bolesti hlavy, závratě, návaly horka, hyperhidrózu, třes a sucho v ústech; tyto nežádoucí účinky byly považovány za vážné (SAE), byly podezřelé ze souvislosti se studijním lékem a vedly k ukončení léčby a vyřazení pacienta. Jedno úmrtí se vyskytlo v této studijní skupině během dvouletého období

pozorování (náhlá smrt, v důsledku virové endokarditidy), která byla hlášena jako nesouvisející s léčbou.

#### 4.2.1.2. Vyhodnocení efektu biologické terapie omalizumabem po 10 letech v NCTA Plzeň

Práce prezentována formou posteru na Kongresu ERS 2018, viz (Růžičková-Kirchnerová et al., 2018)

**Metody:** Retrospektivně jsme vyhodnotili data z našeho registru pacientů léčených omalizumabem v letech 2007-2017 (55 pacientů). Zaměřili jsme se kromě základních klinických parametrů (spirometrie, FENO, ACT, počet exacerbací, hospitalizací) i na hodnotu celkového IgE, intenzitu a spektrum senzibilizace dle specifických IgE a dále jsme sledovali efekt omalizumabu u pacientů v podskupině pacientů s alergickou bronchopulmonální aspergilózou a těžkým astmatem s přecitlivělostí na plísň ABPA/SAFS (11 pacientů). Rovněž jsme zaznamenali délku terapie a důvody jejího ukončení u jednotlivých pacientů.

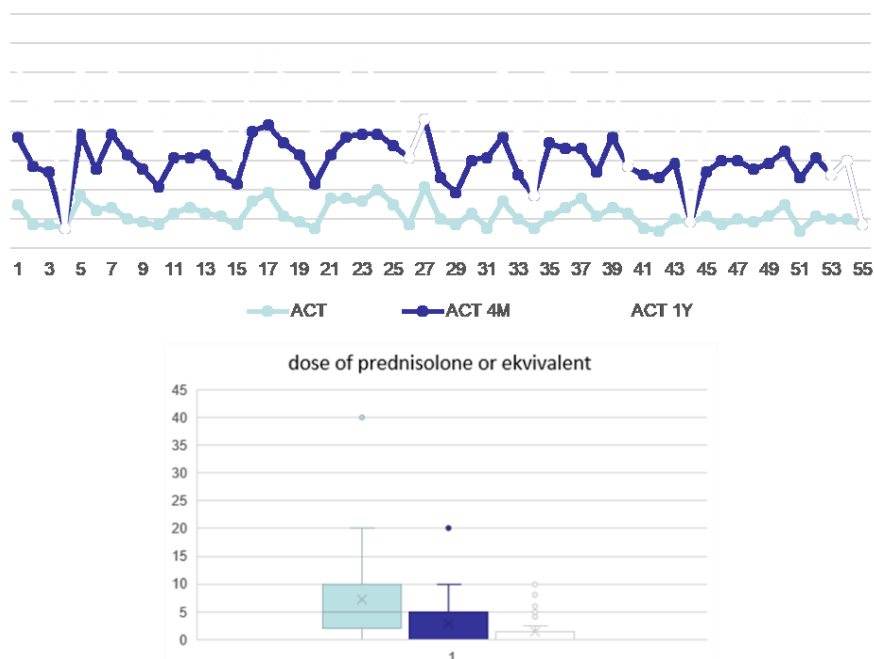
**Výsledky:** Terapie omalizumabem je velice efektivní léčba pro pacienty s alergickým eosinofilním typem astmatu, efekt je poměrně konstantní v průběhu let. U pacientů došlo ke zlepšení kontroly astmatu, kvality života, plicních funkcí a významně se snížil počet exacerbací, hospitalizací a potřeba užití úlevové medikace. V podskupině pacientů s ABPA/SAFS jsme zaznamenali velice dobré výsledky, především došlo k redukci počtu a tíže exacerbací a nutnosti kombinované dlouhodobé terapie antimykotikem +systémovým kortikosteroidem. Dále jsme shledali pozitivní efekt i u těch nemocných, kteří měli vyšší hladinu celkového IgE, ale nebyl prokázán žádný konkrétní specifický alergen.

15 pacientů terapii ukončilo, 4 z důvodu nedostatečného efektu, 2 pro mírné nežádoucí účinky, 2 pacienti zemřeli bez souvislosti s podávanou terapií, 1 nemocná ukončila léčbu pro těhotenství, 1 nemocný na vlastní žádost, 4 na doporučení lékaře, 1 pacient přestoupil do jiného centra.

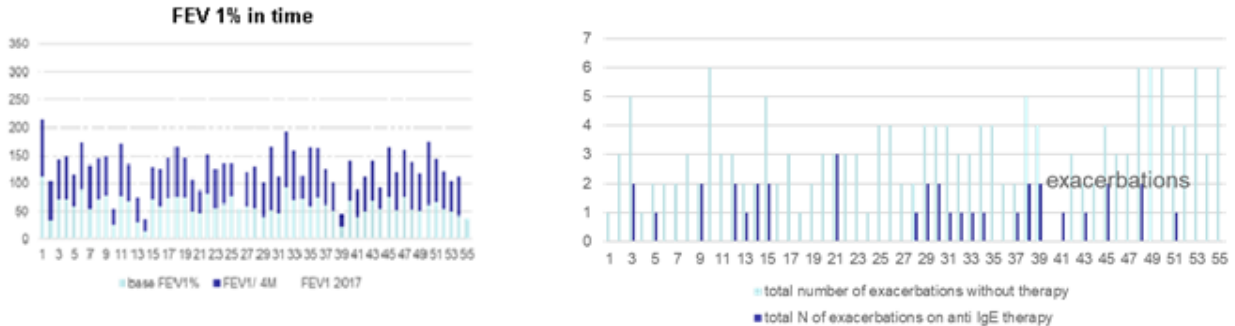
**Závěry:** Dosud se nám nepodařilo určit optimální délku podávání terapie anti-IgE protilátkou. V našem centru se snažíme podávat terapii tak dlouho, pokud přináší pacientovi zřejmý klinický efekt.

Do budoucna by bylo vhodné určit další přídatné biomarkery (kromě hodnot celkového IgE), které by nám pomohly tuto skupinu pacientů lépe stratifikovat, tak abychom jim mohli s různou mírou pravděpodobného efektu nabídnout tuto biologickou terapii. Jde především o markery eozinofilie (FENO, periostin, periferní/systémová eozinofilie), typ a stupeň přecitlivělosti na jednotlivé alergeny ideálně neovlivněné dlouhodobou léčbou systémovými kortikosteroidy, která pak jednotlivé výsledky zkrusluje. Data z našeho registru potvrdila a obohatila závěry jiných publikací (Kanu and Patel, 2008)(van der Ent et al., 2007), že omalizumab vykazuje dobrý efekt u pacientů s bronchopulmonální aspergilózou, respektive těžkých astmatiků s přecitlivělostí na plísň (ABPA/SAFS).

**Graf č.24** (vlevo) Hodnota testu kontroly astmatu (ACT) před zahájením léčby, po 4 měsících a roce terapie. **Graf č.27** (vpravo) Dávka systémové kortikoterapie na začátku terapie OMA, po roce a po 10 letech



**Graf č.25** (vlevo) Hodnota FEV<sub>1</sub> (%) v průběhu terapie OMA (vstupní, po 4 měsících a 10 letech), OMA **Graf č.26** (vpravo) Počet exacerbací rok před zahájením terapie OM a v průběhu 10leté terapie OM



#### 4.2.1.3. Význam měření periostinu u pacientů s těžkým refrakterním astmatem

Toto téma je zpracováno v práci: "Sérové hladiny periostinu u astmatických pacientů ve vztahu k terapii omalizumabem a přítomnosti chronické rinosinuitidy s nosními polypy".

Této práci jsme se účastnili jako spoluautoři, hlavním autorem je MUDr. Jakub Novosad, Ph.D. z FN Hradec Králové, jehož práce bude v letošním roce publikována (Novosad J, Krcmova I, Bartos V, Drahosova M, Vanik P, Ruzickova O, Terl M, Krejsek J. Effect of omalizumab therapy and chronic rhinosinusitis presence on serum periostin levels in asthma patients, a pilot study. *Clinical & Experimental Allergy*, CEA-2018-0252. Přijato k publikaci 2019.).

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, sérový periostin je slibným biomarkerem type-2 high zánětlivé cesty bronchiálního astmatu. Bylo prokázáno, že hladiny periostinu klesají v reakci na systémovou a inhalační terapii kortikosteroidy (ICS), nicméně máme jen omezené znalosti o změnách hladin sérového periostinu, které by odrážely léčbu omalizumabem (OMA) a další proměnné, jako je chronická rinosinuitida s nosními polypy (CRSwNP).

**Cíl:** Kriticky zhodnotit klinicky významné parametry ovlivňující hladiny periostinu u pacientů s astmatem.

**Metody stanovení:** Pilotní, průřezová observační studie k posouzení hladin periostinu v séru u 48 pacientů s astmatem (38 léčených konvenční terapií zahrnující ICS a 10 léčených ICS a OMA jako přídatná terapie) s ohledem na klinické znaky astmatu, komorbiditu a jiné biomarkery Th2 high fenotypu astmatu [celkový počet IgE, absolutní a relativní počet eozinofilů, eozinofilní kationtový protein (ECP) a FENO]. Hladina sérového periostinu byla stanovena pomocí Elisa metody. Vzhledem k tomu, že OMA vytváří malé, biologicky neaktivní komplexy s molekulami IgE, hladiny celkového IgE během léčby OMA jsou zkreslené. (Hamilton et al., 2005) Proto byla u skupiny pacientů léčených omalizumabem analyzována počáteční úroveň celkových IgE (údaje shromážděné retrospektivně z měření před zahájením léčby přípravkem OMA), nikoliv průběžné hodnoty IgE v době vyšetření periostinu (na rozdíl od měření všech ostatních biomarkerů).

**Výsledky:** Sérový periostin v séru koreluje s celkovými hladinami IgE (Spearman rho = 0.364, p = .025) u podskupiny konvenčně léčených pacientů a s počtem eozinofilů (Spearman rho = 0.401, p = .021) v podskupině pacientů se souběžnou rinosinuitidou s nosními polypy (CRSwNP). Hladiny periostinu v séru byly u pacientů léčených omalizumabem sníženy ve srovnání s běžně léčenými pacienty (p = .025). Tento účinek byl zřejmý pouze tehdy, pokud pacienti neměli současně chronickou rinosinuitidu s nosními polypy (CRSwNP) (p = .005). Naopak zvýšené hladiny periostinu byly naměřeny u pacientů léčených OMA, u nichž byla zároveň přítomna chronická rinosinuitida s nosními polypy CRSwNP (p = .017).

## 4.2.2. Ostatní biomarkery

### 4.2.2.1. Význam reverzibility bronchiální obstrukce při výběru pacientů pro ošetření bronchiální termoplastikou a sledování efektu této léčby na našem souboru pacientů.

**Cíl práce:** Identifikovat cílovou skupinu pacientů pro léčbu bronchiální termoplastikou a sledovat její efektivitu v následujících letech.

**Metodika:** Prospektivní hodnocení 6 pacientů léčených BT se zaměřením na výchozí fenotyp a funkční vyšetření s testy bronchiální reaktivity. Sledování efektu léčby a nežádoucích účinků (pomocí evaulačních dotazníků a klinických vyšetření) po 3, 6 a 12 (ev. 18 až 24) měsících od výkonu. Zaznamenávali jsme i počet radiofrekvenčních pulsů, který byl během výkonu použit.

**Výsledky:** Po ošetření BT došlo u většiny nemocných ke zřetelnému klinickému zlepšení zahrnujícímu nejen redukcí symptomů, exacerbací a spotřeby léků, ale (na rozdíl od dosavadních literárních údajů), rovněž zlepšení funkčních parametrů, především FEV1. Nejlepších efektů bylo dosaženo u nemocných s výrazně pozitivním bronchodilatačním testem (BDT) před zahájením léčby a s použitím vyššího počtu radiofrekvenčních pulsů.

Fenotypicky se jednalo častěji o nemocné s eozinofilním, ale nealergickým typem astmatu. Zárok nemněl vliv na hodnoty FENO. Bezprostřední nežádoucí účinky (tj. do měsíce po výkonu) byly časté (10 exacerbací z 12 ti celkových), závažné ani dlouhodobé nebyly u této malé skupiny pacientů zaznamenány.

**TAB č.10** Vliv ošetření bronchiální termoplastikou na FEV1, bronchiální hyperreaktivitu, FENO a kontrolu astmatu, počet exacerbací během prvního roku od posledního ošetření.

P	fenotype	c.date	FVC	dif.FVC %	FEV1 %	dif.FEV1 %	BRT + in %	FENO	ACQ	RF pulses	exacrb.
1	non IgE	before BT	3,99x		2,17x			9	28	46+34+3 86	7
		3M	4,67	17	3,2	47x		20		116	0
		6M	4,44	11,2	3,1	42,8x		48			1
		12M	4,82	20,8	3,38	55,7x		28	25		1
2	non IgE	before BT	2,76x		1,99x			21	33	35+35+3 6	3
		3M	3,26	18	2,27	14	12	25	25	114	0
		6M	2,95	6,8	2,05	3	19	17	25		0
		12M	3,44	24	2,39	20	8	26	25		0
3	non IgE	before BT	4,68x		2,41x			11	27	32+32+5 0	3
		3M	5,21	11,3	2,73	13,2	0			153	1
		6M	4,46	-4,7	2,28	-5,3	7	58	15		1
		12M	4,14	-11,5	1,77	-26,5	21	54	11		1
4	IgE	before BT	3,95x		2,71x			22	31	33+57+6 3	3
		3M	4,23	7	2,81	3,7x	18	23	153	0	
		6M	4,31	9	2,96	9x	26	22		0	
		12M	4,46	13	3,01	11	19	17	21		1
5	non IgE +IgE	before BT	2,13x		1,73x			18	22	36+39+6 4	3
		3M	2,31	8,5	1,82	5	7	37	25	139	0
		6M									
		12M									
6	non IgE	before BT	4,17x		2,86x			11	21	57+50+7 2	2
		3M	4,22	1	3,15	10	7	12	24	179	0
		6M									
		12M									

## 5. DISKUSE

### Diskuze k první části:

V první části vlastní práce jsme se pokusili zjistit, která vyšetření, resp. které biomarkery eosinofily jsou dostatečně specifické a senzitivní, aby dokázaly spolehlivě detekovat eosinofilní zánět v DCD. Dle našich iniciálních předchozích studií se jako vhodný biomarker jevila přítomnost eosinofilie a ECP v BALTE a indukovaném sputu. V klinické praxi jsou ale tyto metody spojeny s vyššími riziky a nároky (bronchoskopie-bronchospasmus, exacerbace astmatu, časová i finančně náročnost). Proto se naše navazující práce zaměřila na vyšetření horních cest dýchacích a jejich možnou provázanost s dolními dýchacími cestami pomocí ORL nálezů včetně vyšetření nosních biopsií.

Vzorky nosní sliznice byly častěji odebírány u pacientů s těžkým astmatem, u nichž docházelo častěji k zhoršování nemoci, a rovněž se potíže s horními cestami dýchacími vyskytovaly mnohem častěji. V našem souboru nemocných bylo daleko vyšší procentuální zastoupení těžších astmatiků, než je tomu v běžné populaci. Je to dáno především tím, že naše klinické pracoviště je zároveň centrem pro těžké astma pro širokou oblast jihozápadních Čech. Přesto procentuální zastoupení pacientů s lehkým a středně těžkým astmatem bylo dostačující pro statistické vyhodnocení celé skupiny. Zjistili jsme statisticky významnou korelaci mezi intenzitou eosinofily v nosní biopsii a markery eosinofily v dolních cestách dýchacích (hladiny ECP v IS a BALTE a eosinofily v IS).

Vzorky nosní sliznice byly standardně semikvantitativně hodnoceny stejnou patoložkou ve snaze minimalizovat interpretační rozdíly. Během odběru nosního vzorku nedošlo k žádné významné komplikaci, řešili jsme pouze mírnou epistaxi. Naproti tomu odběr vzorku endobronchiálně, transbronchiálně či odběr bronchoalveolární laváže představuje výrazně vyšší riziko pro pacienta-astmatika.

Otázkou zůstává, zda existuje ještě jiná jednodušší cesta, jak spolehlivě potvrdit eosinofilii v horních, a tedy i dolních dýchacích cestách. V naší retrospektivní studii jsme se pokusili tento biomarker najít, a to pomocí pečlivého sběru dat (operační ORL anamnéza, CT scany, rinoskopické vyš., nosní sliznice) a jejich korelací s výsledky z dolních dýchacích cest.

Zjištěné výsledky ukazují, že přítomnost a stupeň nosní polypózy dobře koreluje s ostatními biomarkery bronchiální eosinofilie úzce souvisí nejen s intenzitou eosinofilie ve vzorcích nosní biopsie, ale i průdušek. Průkaz nosní polypózy by tedy mohl být jednoduchým biomarkerem k potvrzení eosinofilního typu astmatu.

Klinický význam detekce nosní polypózy-byť třeba jen anamnestické-prudce stoupá především tam, kde díky intenzivní protizánětlivé léčbě mizí projevy/biomarkery lokální (FENO, cytologie sputa) i systémové eosinofilie (ECP, diff. KO). Zvláště hodnoty FENO klesají po zavedení protizánětlivé léčby velmi rychle, v řádu několika mála dní. Později (týdny až měsíce-v závislosti na intenzitě původní eosinofilie a léčby, ev. vlivem kouření) ustupuje i eosinofilie indukovaného sputa. V těchto případech ev. reziduální eosinofilní zánět dokáže prokázat pouze bronchiální biopsie a někdy ani ta již nezjistí přítomnost původní eosinofilie.

Zaměříme-li se na skupinu těžkých astmatiků (u alergického fenotypu je to především podskupina s přecitlivělostí na plísně, u nealergického fenotypu je to podskupina s intolerancí NSAID) je přítomnost nosní polypózy indikátorem problematického typu nemoci. U pacienta s těžkým refrakterním alergickým fenotypem astmatu s prokázanou alergií na plísně musíme pomýšlet na riziko rozvoje bronchopulmonální mykózy (ABPA, SAFS)(Agarwal, 2011). U nealergického eosinofilního fenotypu pomýšlíme vždy na možnost Samterovy triády (astma s chronickou rinosinuitidou a intolerancí NSAID). Rovněž bychom měli být obezřetní a pomýšlet i na riziko autoimunitních nemocí jako je syndrom Churg-Straussové a jiné vaskulitidy. Výsledky tedy potvrzují, že přítomnost nosních polypů je spolehlivým a pragmatickým biomarkerem přítomnosti eosinofilního typu zánětu u astmatických pacientů. Jedná se o jednoduché, nenákladné a ve srovnání s bronchologickými metodami pro astmatiky méně zatěžující vyšetření s benefitem pro lékaře i pacienta.

### Diskuze k druhé části:

Z výsledků naší studie, zahrnující celou léčenou populaci v ČR v mezinárodním registru je zřejmé, že doplňková léčba omalizumabem snížila počet klinicky významných exacerbací ročně z 5,7 před zahájením na 0,7 po 24 měsících léčby v subpopulaci ČR. Tyto výsledky byly podobné těm, pozorovaným v globálním registru (4,9 až 0,6), českém registru anti-IgE (CAR) a dalším údajům z reálné praxe s více než 9-tiletým sledováním. (Deschildre et al., 2013)(Braunstaahl et al., 2013)(Menzella et al., 2017)(Kupryś-Lipińska et al., 2016)(Hutyrova et al., 2017)(Novelli et al., 2015). Navíc bylo pozorováno klinicky významné zlepšení v testu kontroly astmatu (ACT), průměrná změna



oproti výchozím hodnotám o 4,3 jednotek a kvalitě života pacientů (mini-AQLQ), průměrná změna oproti výchozím hodnotám 0,94 jednotek. Tyto výsledky jsou opět podpořeny výsledky z různých dalších studií (zlepšení ACT o 5,01 a zlepšení AQLQ o 0,91 oproti výchozí hodnotě)(Humbert et al., 2005)(Bardelas et al., 2012). Dle vyhodnocení pacientů v ČR, mělo více pacientů kontrolované nebo částečně kontrolované astma ve 12. měsíci oproti výchozím hodnotám (92,1 % vs. 24,1 %) při léčbě omalizumabem. Tyto výsledky byly lepší než výsledky pozorované u celkové populace registru eXperience a příznaky zůstaly pod kontrolou i po 24. měsíci. U české subpopulace došlo také k snížení využívání zdravotní péče a zameškaných pracovních dnů pro astmatické potíže. Byla analyzována spolehlivost hodnocení GETE ve výši  $16 \pm 1$  týdnů jako prediktoru rizika užívání zdravotní péče. K významnému snížení rizika došlo u vynikajících respondentů (88,3 %), dobrých (83,2 %) a mírných respondentů (74,0 %). Tyto výsledky ukazují jak klinický přínos, tak i celkový ekonomický přínos (přímé úspory nákladů na zdravotní péči při využívání zdravotní péče a zlepšení produktivity práce (Braunstahl et al., 2014). Limitujícím faktorem naší analýzy dat ze subpopulace ČR je nízký počet pacientů a spolu s dalšími limitujícími faktory uvedenými pro celkový registr eXperience. (Braunstahl et al., 2013). Navíc mohou demografické a klinické faktory jiné, než je léčebný záměr, přispívat k pozorovaným účinkům v observačních studiích. Určitá předpojatost lékaře při výběru pacienta a pokračování léčby omalizumabem po uplynutí 16 týdnů mohlo mít vliv na výsledky (například lékaři nebyli zaslepeni). Dalším omezujícím faktorem mohl být poměrně řídký sběr dat. Navzdory těmto možným překážkám jsou současné poznatky v souladu s výsledky z randomizovaných kontrolovaných studií a statistická síla byla dále posílena návrhem opakovaných opatření. Ke zlepšení klinických výsledků došlo velmi pravděpodobně právě díky terapii omalizumabem. Vzhledem k tomu, že tato studie využívá observační registr, neexistovalo placebo. Je možné, že některá zlepšení, která se projevila při léčbě omalizumabem, mohla částečně souviset s účinkem placebo a / nebo častým a důkladným sledováním pacientů zařazených do registru. Určitým omezením je jistě i fakt, že základní údaje pacientů byly shromážděny retrospektivně z jejich lékařských záznamů. Nicméně základní charakteristiky byly podobné těm v globálním registru.(Braunstahl et al., 2013)

**Data z našeho NCTA centra** potvrdila, že omalizumab vykazuje dobrý efekt u pacientů s bronchopulmonální aspergilózou, respektive těžkých astmatiků s přecitlivělostí na plísň (ABPA/SAFS), což bylo potvrzeno i u pacientů s cystickou fibrózou a ABPA (Kanu and Patel, 2008) a publikovali jsme na ERS u těžkých astmatiků s ABPA v r. 2012 (Ruzickova Kirchnerova et al., 2012), v souladu s publikovaným doporučením Agarwala (Agarwal, 2011). U těchto nemocných bývá spíše problém s vyšší hladinou celkového IgE, která často vylučuje možnost indikace OMA. U většiny těchto nemocných byla nasazena terapie anti-IgE bezprostředně po doléčení exacerbace (kombinace OCS+antimykotika), což pomohlo snížit celkovou hladinu IgE, v průběhu terapie pak došlo k významné redukci exacerbací a potřebě antimykotické a systémové kortikoterapie. Také jsme zaznamenali (ve shodě s jinými předchozími publikacemi) úspěch u pacientů s vysokou hodnotou celkového IgE bez prokázaného konkrétního celoročního alergenu. (van den Berge et al., 2011). U některých pacientů s dlouhodobou kortikoterapií před zahájením léčby OMA jsme zaznamenali pozdější nástup efektu léčby v souladu i s daty z jiných registrů, tzv. late respondery (Menzella et al., 2009). U pacientů, u nichž nedošlo ke zlepšení nebo došlo pouze k částečnému zlepšení kontroly astmatu při terapii OMA, ale přetrvává potřeba dlouhodobé systémové kortikoterapie, máme nyní možnost indikace anti-IL5 terapie, tedy provést tzv. switch terapie dle současných doporučení. (Zervas et al., 2018)

Jednou z nejvíce diskutovaných otázek zůstává, kdy terapii OMA ukončit? V našem souboru pacientů jsme zaznamenali většinou zhoršení symptomů do 12 měsíců od vysazení, některé pacienty se nám již nepodařilo po vysazení léků dostatečně sledovat, jednalo se většinou o pacientky, které léčbu ukončily léčbu z důvodu těhotenství a dále o pacienty, kteří léčbu ukončili na vlastní žádost. Práce Del Carmen Vennera na menším souboru pacientů (49) popisuje relaps u 12 pacientů z 49 v prvním roce sledování a 7 během 13 a 48 měsíců. Tyto výsledky naznačují, že účinky 6 leté terapie omalizumabem mohou přetrvávat i po přerušení léčby u 60 % pacientů po dobu nejméně 4 let.(Del Carmen Vennera et al., 2018). Také ve francouzské studii Molimarda přerušení léčby omalizumabem nebylo spojeno s žádným rebound efektem nebo exacerbací onemocnění a kontrola byla udržována po dobu nejméně 6 měsíců u téměř poloviny všech pacientů, včetně všech těch, kteří byli léčeni OMA 3,5 roku nebo více. Po znovuzavedení omalizumabu 4 z 20 pacientů již znovu na terapii nezareagovali. (Molimard et al., 2014).

**Produkce sérového periostinu** je významně spojena s modalitou léčby (omalizumab vs. konvenční) a přítomností chronické rinosinusitidy s nosními polypy (CRSwNP). Tyto proměnné je třeba brát v úvahu při interpretaci vyšetření hladin periostinu.

Periostin byl objeven v r. 1993 (Takeshita et al., 1993), poté byl objevena jeho role při vzniku subepiteliální fibrózy (Takayama et al., 2006) a asociace s Th2 typem zánětu u astmatu. (Woodruff et al., 2009). Na rozdíl od jiných biomarkerů type-2 high zánětu může produkce periostinu pravděpodobně obsahovat přídavné informace, které se týkají fibrózy plicní tkáně a remodelace (Uchida et al., 2012), která mimo jiné pravděpodobně může vést k fixované obstrukci dýchacích cest (Takahashi et al., 2018)(Kanemitsu et al., 2013). Vyšetření produkce periostinu tak pravděpodobně odpovídá na poněkud odlišné klinické otázky s ohledem na patogenezi astmatu. Měření sérové hladiny periostinu bylo uvedeno do širší praxe v r. 2011 Correnem a kol. (Corren et al., 2011), v jehož práci pacienti s vysokou hladinou periostinu lépe odpovídali na léčbu Lebrikizumabem. Navzdory velmi slibnému potenciálu tohoto měření u pacientů s astmatem, postrádá tento test stále standardizaci a výsledky z různých studií, které používají různé metody pro měření periostinu s různými účinky, proto nejsou výsledky snadno porovnatelné a nelze je jednoduše generalizovat. (Arron and Izuhara, 2015).

Abychom mohli správně interpretovat hladiny periostinu, je potřeba rozpoznat většinu klinicky významných faktorů a jejich vzájemné interference, které mohou ovlivňovat či ovlivňují jeho expresi. V případě pacientů s bronchiálním astmatem je to zejména účinek léčby a účinek komorbidit. V tomto ohledu byl periostin intenzivně studován, k průkazu souvislosti s léčbou kortikosteroidy. Bylo prokázáno, že produkce periostinu může být ovlivněna kortikosteroidy na buněčné úrovni (Shoda et al., 2013).

Snížení produkce periostinu odrážející léčbu inhalačními kortikosteroidy u pacientů s astmatem může také odrážet snížení zánětu dýchacích cest (Hoshino et al., 2016). Naopak, přetrvávající zvýšení periostinu v séru i při vysokých dávkách inhalačních kortikosteroidů může poukazovat na riziko trvalé bronchiální obstrukce při steroidní rezistenci (Kanemitsu et al., 2013). Rovněž byla prokázána interference sérových hladin periostinu s biologickou léčbou. Vysoké počáteční hladiny sérového periostinu mohou předpovědět lepší léčebnou odezvu na lebrikizumab (Corren et al., 2011) a přinejmenším částečně na omalizumab (Hanania et al., 2013)(Tajiri et al., 2016). Na rozdíl od kortikosteroidů však máme pouze malé důkazy o snížení sérových hladin periostinu, které by odrážely léčbu omalizumabem(Caminati et al., 2017). Kromě léčby mají některé komorbidity významný vliv na hladiny periostinu. Bylo prokázáno, že periostin může být rozpoznán jako biomarker chronické rinosinuitidy u pacientů trpících těžkým astmatem (Asano et al., 2017) a hraje důležitou roli při atopické dermatitidě (Kou et al., 2014)(Shiraishi et al., 2012). Navíc produkce periostinu může poukázat i na pacienty s astmatem trpící přecitlivělostí na NSAID (Kim et al., 2016) a odhaluje slabou, avšak významně negativní korelaci s BMI (Kimura et al., 2018). Tato práce je zaměřena na vyšetřování nejdůležitějších kofaktorů, které je třeba vzít v úvahu pro přesnější interpretaci sérového měření periostinu u pacientů s astmatem. Zaměřili jsme se především na vzájemnou interakci mezi modalitou léčby (konvenční nebo biologickou léčbou) a komorbiditami. Periostin v séru vykazuje pouze slabou vzájemnou korelaci s jinými biomarkery type-2 high zánětu (Fingleton et al., 2016). V této studii byla pozorována izolovaná pozitivní korelace mezi periostinem a celkovými hladinami IgE ve skupině konvenční léčby a mezi periostinem a absolutním počtem eozinofilů nebo eos % u pacientů bez nosní polypózy. Možným vysvětlením tohoto výsledku může být pouze omezená statistická kolinearita mezi těmito biomarkery, která podněcuje potřebu jejich komplexního hodnocení. Měřili jsme významně nižší hladiny periostinu u pacientů léčených biologickou terapií na rozdíl od těch léčených konvenčně. Tento výsledek je v souladu se závěry Caminati et al. (Caminati et al., 2017). Přestože jsme neprováděli opakovaná měření, předpokládáme, že tento výsledek odráží biologický potenciál omalizumabu snížit produkci periostinu v plicní tkáni, neboť jsme nezaznamenali žádný jiný významný rozdíl mezi těmito dvěma skupinami z hlediska přítomnosti dalších komorbidit, antropometrie nebo jiných charakteristik. Navíc sérový periostin byl jediný biomarker typu 2, který se liší mezi těmito dvěma studijními skupinami, čímž potvrdil svou odlišnou výpovědní hodnotu. Pokusili jsme se prokázat význam dalších komorbidit na expresi periostinu v séru. V tomto ohledu jsme potvrdili v souladu s Asanoem et al. (Asano et al., 2017) významně vyšší hladiny periostinu u pacientů trpících chronickou rinosinuitidou s nosními polypy, ale nikoliv u těch bez nosní polypózy. Tento účinek byl však pozorovatelný pouze u podskupiny pacientů léčených omalizumabem. Naopak omalizumab uplatnil svůj potenciál snížení produkce periostinu pouze v podskupině pacientů bez CRSwNP (viz obr. 1). Pravděpodobné vysvětlení tohoto zjištění může být, že alergičtí pacienti trpící CRSwNP tvoří patogeneticky mírně odlišnou formu nemoci (pravděpodobně náchylnější k ILC2-mediovanému (ILC2-high) zánětlivému fenotypu navzdory alergické anamnéze). V této podskupině pacientů může být produkce periostinu více závislá na signalizačních drahách, které se liší od konvenční atopické cesty (například IL-5 nebo TGFβ). Tyto cesty jsou pravděpodobně méně ovlivněny léčbou OMA. Nicméně tato skupina pacientů stále odhaluje klinický přínos léčby OMA (Gevaert et al., 2013). Žádný jiný



biomarker eozinofilního zánětu se nezdá být schopen odhalit tuto konkrétní subpopulaci. Plně přiznáváme nedostatky naší studie, zejména pokud jde o její průřezový design a malý soubor pacientů, což vede k nízké statistické síle testů nulových hypotéz. Tato skutečnost však na druhou stranu může/má potenciál odhalit pouze klinicky významné výsledky.

**Bronchiální termoplastika** je zajímavou alternativní možností terapie pacientů s těžkým refrakterním astmatem, kteří jsou symptomatictí navzdory maximální terapii včetně systémových kortikoidů s dominující bronchiální hyperreaktivitou. K zajištění dostatečné bezpečnosti výkonu je nutné, aby nemocní měli vstupní hodnoty FEV1 nad 50% normy. V souladu s dříve publikovanými studiemi jsme i u našeho malého souboru pacientů jsme prokázali dobrý efekt terapie na funkční parametry (FVC, FEV1) a nezaznamenali jsme změny v bronchiální hyperreaktivitě. (Pavord et al., 2007) Z hlediska nežádoucích účinků se jako nejproblematičtější jeví období bezprostředně po zákroku, nejčastěji jsme zaznamenali exacerbaci astmatu s nutností podávání systémové kortikoterapie, závažné nežádoucí účinky nebyly u našich pacientů zaznamenány. Během následujícího roku od posledního bronchoskopického sezení došlo k postupnému zlepšení symptomů, měřeno pomocí astma kontrol testu – snížení potřeby úlevové medikace, exacerbací, zlepšení astma kontroly, akutních ošetření, tak jako bylo prokázáno jinými autory (Wechsler et al., 2013), (Thomson et al., 2012), (Castro et al., 2011b)

Nedostatkem této práce je malý soubor pacientů a krátká doba sledování po ošetření. Přestože naše centrum pro léčbu pacientů s těžkým refrakterním astmatem, patří mezi jedno z největších v ČR, pacientů k této léčebné modalitě jsme dosud vybrali relativně málo. Je to dáno několika faktory: zaprvé pacienti s těžkým refrakterním astmatem mají často velmi špatné plicní funkce a nesplňují tak indikační kritéria, dále mohou mít vlivem tíže nemoci již fixovanou obstrukci a malou bronchiální hyperreaktivitu anebo jsou na vysokých dávkách systémových kortikoidů. Řada pacientů navrhanou terapii z důvodu vlastní procedury (3 bronchoskopie v celkové narkóze) odmítají a v neposlední řadě je to nárůst možností biologické léčby těžkého astmatu cílená na eosinofilní alergické i nealergické astma, která je zahajována přednostně. Zbývá nám skupina noneosinofilních astmatiků, ale v této skupině opět bývá řada nemocných bez dostatečné bronchiální hyperraktivity (Zervas et al., 2018). Studie D.Doeing popisuje efekt BT u pacientů (8) s velmi těžkou fixovanou bronchiální obstrukcí na vysokých dávkách systémové kortikoterapie, kteří by nesplnili indikační kritéria, přesto BT podstoupili s dobrým efektem. (Doeing et al., 2013). Dle další publikované práce ošetření BT pomáhá v redukci air trappingu těžkých astmatiků (snížení RV/TLC poměru) (Langton et al., 2018). Je tedy otázkou, jestli se indikační kritéria pro BT v budoucnu nezmění. Tato práce vyhodnocovala pacienty mezi lety 2013-2014, jednalo se tedy pouze o roční sledování. V další fázi naší práce plánujeme soubor rozšířit a vyhodnotit efekt terapie v delším časovém intervalu 5-6 let. Jako další zajímavá skupina pacientů, kteří by mohli z terapie BT profitovat a na jejichž výsledky je třeba si počkat, jsou dle našeho pohledu pacienti s těžkým astmatem a refrakterním kašlem nereagujícím na dostupnou terapii.

## 6. ZÁVĚRY

V naší práci jsme se snažili vyhledat biomarkery, které by byly dostatečně spolehlivé, praktické, snadno dostupné, reprodukovatelné v klinické praxi, a které by nám pomohly zefektivnit a zacílit terapii zejména u pacientů s těžkým, refrakterním astmatem. Jednotlivé biomarkery jsme porovnávali ve smyslu jejich významnosti, použitelnosti a vzájemné zastupitelnosti.

Potvrdili jsme, že klíčovými a praktickými biomarkery pro bližší fenotypizaci pacientů s těžkým refrakterním astmatem jsou celkové a specifické IgE, ECP v krvi, eozinofilie periferní krve, sputa a nosní biopsie, dále přítomnost a stupeň nosní polypózy a reverzibilita bronchiální obstrukce.

Došli jsme k závěru, že při stanovení buněčného profilu vzorků indukovaného sputa a bronchoalveolární laváže se jako zlatý standard jeví sklíčkové metody cytologické a imunocytochemické. Metoda flowcytometrické analýzy nepřinesla validní výsledky. Odběry BALTE a IS jsou však poměrně časově náročné a pro nemocného (zvláště pak BALTE) nejvíce zatěžující. Pro běžnou klinickou praxi jsou nepraktické, mají však své místo při diagnostických rozpacích při určování fenotypu.

Potvrdili jsme význam nosní polypózy jako markeru eozinofilie v dolních cestách dýchacích a její korelaci s tíží nemoci a určitými konkrétními fenotypy. Jedná se o jednoduché, nenákladné a méně invazivní vyšetření.

Naše práce potvrdily výbornou efektivitu terapie, která byla vybrána zcela cíleně, na podkladě biomarkerů určujících konkrétní fenotypické a endotypické podskupiny.

Pacienti s těžkým refrakterním IgE mediováným alergickým fenotypem astmatu profitují z cílené terapie omalizumabem. U těchto nemocných došlo ke zlepšení plicních funkcí, kontroly astmatu a snížení až vysazení systémové kortikoterapie, redukci exacerbací a využití zdravotní péče a zameškaných pracovních dnů. Tento příznivý efekt se potvrdil i v podskupině pacientů s bronchopulmonální aspergilózou. Bohužel se nám nepodařilo odpovědět na otázku, kdy a za jakých podmínek terapii omalizumabem ukončit, a jaké to bude mít důsledky pro pacienta. Neměli jsme dostatečně velký soubor pacientů s ukončenou léčbou, který bychom mohli prospektivně sledovat, a někteří pacienti se ztratili ze sledování.

Pomocným biomarkerem Type2-high fenotypové cesty astmatu a chronické rinosinuitidy s nosními polypy se jeví sérový periostin. Jeho stanovení však nebylo zatím zařazeno do běžné praxe. Jeho zvýšené hladiny mohou provázet i jiná onemocnění, jeho hladina je ovlivněna kortikoterapií i anti IgE léčbou.

Cenným neinvazivním funkčním biomarkerem je reverzibilita bronchiální obstrukce. Pacienti s významnou bronchiální hyperreaktivitou profitovali z nefarmakologické terapie astmatu pomocí bronchiální termoplastiky. Došlo ke zlepšení plicních funkcí a poklesu exacerbací. Nicméně se jednalo o pilotní studii s pouhým ročním sledováním na malém souboru pacientů, výsledek bude nutné potvrdit dalšími studiemi s delším prospektivním sledováním.

## 7. PŘEHLED PRACÍ AUTORA SOUVISEJÍCÍCH S TÉMATEM DIZERTACE

### ➤ Impaktované:

Kirchnerová OR, Valena T, Novosad J, Teřl M. Real-world effectiveness and safety of omalizumab in patients with uncontrolled severe allergic asthma from the Czech Republic. *Adv Dermatol Allergol* 2018;1–10. doi:<https://doi.org/10.5114/ada.2018.76606>.

Novosad J, Krcmova I, Bartos V, Drahosova M, Vanik P, Ruzickova O, Terl M, Krejsek J, Effect of omalizumab therapy and chronic rhinosinusitis presence on serum periostin levels in asthma patients, a pilot study. *Clinical & Experimental Allergy*, CEA-2018-0252. Přijato k publikaci 2019.

### ➤ Recenzované:

#### *Hlavní autor:*

- 1) O. Růžičková Kirchnerová, M. Teřl, H. Mírka, J. Baxa VH. Alergická a bronchopulmonální aspergilóza (ABPA) a možnosti její léčby - kazuistika. *Stud Pneumol Phtiseol* 2010;2010, roč. 70, č. 4, s. 149–154. doi:ISSN: 1213-810X.
- 2) O. Růžičková Kirchnerová. Bronchiální termoplastika v léčbě těžkého astmatu. *Postgraduální medicína*. 2015, roč. 17, Příl. 1 (Pneumologie), s. 38-39. ISSN: 1212-4184.

#### *Spoluautor:*

- 1) Mepolizumab v léčbě těžkého astmatu. Vratislav Sedlák, Milan Teřl, Olga Růžičková-Kirchnerová, Vladimír Koblížek, Ondřej Kudela, Martin Blažek. *Acta medicae*. 2016, roč. 5, č. 5, s. 27-30. ISSN: 1805-398X
- 2) Milan Teřl, Olga Růžičková-Kirchnerová, Petr Vaník, Tatiana Ferková, Marie Nováková, Kamil Kleřha. Těžké astma s mykotickou senzibilizací a systémová enzymoterapie, [Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL](#). 2018, roč. 15, č. 1, s. 15-20. ISSN: 1802-0518.

#### *Postery – zahraniční:*

- 1) Ruzickova-Kirchnerova O, Malkusova I, Terl M, Panzner P, Kunschrova J. Nasal mucosa biopsy in severe asthma patients as a tool for the prediction of the inflammatory changes in lower airways. n.d. <https://www.ers-education.org/events/international-congress/barcelona-2010.aspx?idParent=80718> (accessed February 9, 2019).

- 2) Ruzickova Kirchnerova O, Terl M, Mirka H, Baxa J, Hrabe V. Complex treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in asthmatic patient including anti-IgE therapy - A case report. *European Respiratory Journal* 2012 40: P1957; DOI:
- 3) Olga Ruzickova Kirchnerova, Milan Terl, Jiri Votruba. Bronchial thermoplasty as an option for severe asthma patients-our experiences and retrospective evaluation. *European Respiratory Journal* 2014 44: P3735; DOI:
- 4) RuzickovaKirchnerova, Vladan Hrabe, Ivana Malkusova, Milan Terl, Petr Panzner, Jana KuntscherovaRhinoLOGY findings and their clinical usefulness for closer asthma fenotyping. *European Respiratory Journal* 2011 38: p4073; DOI:
- 5) Růžicková-Kirchnerová O, Moláčková P, Teřl M, Vaník P, Panzner P. 10 Year evaluation of patients with severe uncontrolled allergic asthma treated with Omalizumab. *Clin. Probl.*, vol. 52, *European Respiratory Society*; 2018, p. PA658. doi:10.1183/13993003.congress-2018.PA658.
- 6) Malkusová I., Růžicková O., Teřl M., Vlas T. PP. Flow cytometric analysis compared with routine and immunocytochemistry staining of cell profile in induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid in patients with bronchial asthma. *Allergy*, vol. 64, XXVIII ELACI Congress, Polsko, Varšava, 6.-10.6.2009. : 2009, p. 99–178 suppl. 90, 269. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02075.x.
- 7) Hutyrova B, Bystron J, Chlumsky J, Kindlova D, Klosova J, Krcmova I, et al. Effect of omalizumab treatment on allergic comorbidities in patients with severe allergic asthma – real life experience from Czech Anti-IgE Registry. *Allergy Immunol.*, vol. 50, *European Respiratory Society*; 2017, p. PA3541. doi:10.1183/1393003.congress-2017.PA3541.
- 8) Malkusova I., Teřl M., Růžicková O., Filarová Z., Panzner P.: Monitoring of inflammatory changes in patients with bronchial asthma before and after oral corticosteroid treatment. 18th ERS Annual Congress, SRN, BErlin, 4-8.10.2008. *Eur Respir J.*, 32, 2008, suppl.52, p. 642-643.
- 9) Malkusova I., Růžicková O., Teřl M., Hraško V., Filarová Z., Panzner P.: Invasive and non-invasive monitoring of inflammatory changes in patients with bronchial asthma before and after oral corticosteroid treatment. XXVII EAACI Congress, Spain, Barcelona, 7-11.6.2008.*Allergy*, 63,2008, suppl. 88, p. 286.
- 10) Malkusova I., Růžicková O., Hrabě V., Teřl M., Panzner P.: Induced sputum, bronchoalveolar lavage fluid and nasal mucosa biopsy in patients with severe bronchial asthma. XXI. World allergy congress, Argentina, Buenos Aires, 6.-10.12.2009.Abstract CD (poster).
- 11) Malkusova I., Růžicková O., Hrabě V., Teřl M., Panzner P.: Allergy to aeroallergens, induced sputum, bronchoalveolar lavage and nasal mucosa biopsy in patients with severe bronchial asthma. XXIX EAACI Congress, Velká Británie, Londýn, 5-9.6.2010.*Allergy*, 65, 2010, suppl. 92, p. 550-551. (poster).
- 12) Malkusova I., Růžicková O., Hrabě V., Panzner P., Teřl M., Kuntscherova J: Nasal mucosal biopsies compared to induced sputum and bronchoalveolar lavage in patients with severe bronchial asthma. XXX. EAACI Congress, Turecko, Istanbul, 11-15.6.2011.*Allergy*, 66, 2011, suppl.94, p.363. (poster).

## 8. SEZNAM LITERATURY

Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem* 2014;289:17406–15. doi:10.1074/jbc.R113.546218.

Agarwal R. Severe asthma with fungal sensitization. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011. doi:10.1007/s11882-011-0217-4.

Arron JR, Izuhara K. Asthma biomarkers: What constitutes a “gold standard”? *Thorax* 2015. doi:10.1136/thoraxjnl-2014-206069.

Asano T, Kanemitsu Y, Takemura M, Yokota M, Fukumitsu K, Takeda N, et al. Serum Periostin as a Biomarker for Comorbid Chronic Rhinosinusitis in Patients with Asthma. *Ann Am Thorac Soc* 2017;14:667–75. doi:10.1513/AnnalsATS.201609-720OC.

Bardelas J, Figliomeni M, Kianifard F, Meng X. A 26-Week, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Study to Evaluate the Effect of Omalizumab on Asthma Control in Patients with Persistent Allergic Asthma. *J Asthma* 2012;49:144–52. doi:10.3109/02770903.2011.648296.

Bel EH, Wenzel SE, Thompson PJ, Prazma CM, Keene ON, Yancey SW, et al. Oral Glucocorticoid-Sparing Effect of Mepolizumab in Eosinophilic Asthma. *NEJM Org N Engl J Med* 2014;13:1189–97.

doi:10.1056/NEJMoa1403291.

van den Berge M, Pauw RG, de Monchy JGR, van Minnen CA, Postma DS, Kerstjens HAM. Beneficial Effects of Treatment With Anti-IgE Antibodies (Omalizumab) in a Patient With Severe Asthma and Negative Skin-Prick Test Results. *Chest* 2011;139:190–3. doi:10.1378/chest.10-0128.

Braunstahl G-J, Canvin J, Peachey G, Chen C-W, Georgiou P. Healthcare Resource Utilization in Patients Receiving Omalizumab for Allergic Asthma in a Real-World Setting. *Biol Ther* 2014;4:57–67. doi:10.1007/s13554-014-0019-z.

Braunstahl GJ, Chen CW, Maykut R, Georgiou P, Peachey G, Bruce J. The eXpeRIence registry: The “real-world” effectiveness of omalizumab in allergic asthma. *Respir Med* 2013. doi:10.1016/j.rmed.2013.04.017.

Brightling CE, Chanez P, Leigh R, O’Byrne PM, Korn S, She D, et al. Efficacy and safety of tralokinumab in patients with severe uncontrolled asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir Med* 2015;3:692–701. doi:10.1016/S2213-2600(15)00197-6.

Caminati M, Gatti D, Dama A, Lorenzetti L, Senna G. Serum periostin during omalizumab therapy in asthma: A tool for patient selection and treatment evaluation. *Ann Allergy, Asthma Immunol* 2017. doi:10.1016/j.anai.2017.08.004.

Del Carmen Vennera M, Sabadell C, Picado C. Duration of the efficacy of omalizumab after treatment discontinuation in “real life” severe asthma. *Thorax* 2018. doi:10.1136/thoraxjnl-2017-210017.

Castro M, Mathur S, Hargreave F, Boulet LP, Xie F, Young J, et al. Reslizumab for poorly controlled, eosinophilic asthma: A randomized, placebo-controlled study. *Am J Respir Crit Care Med* 2011a. doi:10.1164/rccm.201103-0396OC.

Castro M, Rubin A, Laviolette M, Hanania NA, Armstrong B, Cox G. Persistence of effectiveness of bronchial thermoplasty in patients with severe asthma. *Ann Allergy, Asthma Immunol* 2011b;107:65–70. doi:10.1016/j.anai.2011.03.005.

Chlumský J, Striz I, Terl M, Vondracek J. Strategy Aimed at Reduction of Sputum Eosinophils Decreases Exacerbation Rate in Patients with Asthma. *J Int Med Res* 2006;34:129–39. doi:10.1177/147323000603400202.

Claman DM, Boushey HA, Liu J, Wong H, Fahy J V, Francisco S. Analysis of induced sputum to examine the effects of prednisone on airway inflammation in asthmatic subjects. 1994.

Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey M V., Arron JR, et al. Lebrikizumab Treatment in Adults with Asthma. *N Engl J Med* 2011. doi:10.1056/NEJMoa1106469.

Cowan DC, Taylor DR, Peterson LE, Cowan JO, Palmay R, Williamson A, et al. Biomarker-based asthma phenotypes of corticosteroid response. *J Allergy Clin Immunol* 2015. doi:10.1016/j.jaci.2014.10.026.

Crespo A, Giner J, Torrejón M, Belda A, Mateus E, Granel C, et al. Clinical and inflammatory features of asthma with dissociation between fractional exhaled nitric oxide and eosinophils in induced sputum. *J Asthma* 2016. doi:10.3109/02770903.2015.1116086.

Deschildre A, Marguet C, Salleron J, Pin I, Rittié JL, Derelle J, et al. Add-on omalizumab in children with severe allergic asthma: A 1-year real life survey. *Eur Respir J* 2013. doi:10.1183/09031936.00149812.

Doeing DC, Mahajan AK, White SR, Naureckas ET, Krishnan JA, Hogarth DK. Safety and feasibility of bronchial thermoplasty in asthma patients with very severe fixed airflow obstruction: a case series. *J Asthma* 2013;50:215–8. doi:10.3109/02770903.2012.751997.

Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, Irvin CG, Leigh MW, Lundberg JO, et al. An official ATS clinical practice guideline: Interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications. *Am J Respir Crit Care Med* 2011. doi:10.1164/rccm.9120-11ST.

van der Ent CK, Hoekstra H, Rijkers GT. Successful treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis with recombinant anti-IgE antibody. *Thorax* 2007;62:276–7. doi:10.1136/thx.2004.035519.

Fingleton J, Braithwaite I, Travers J, Bowles D, Strik R, Siebers R, et al. Serum periostin in obstructive airways Disease. *Eur Respir J* 2016. doi:10.1183/13993003.01384-2015.

Flood-Page P, Swenson C, Faiferman I, Matthews J, Williams M, Brannick L, et al. A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007. doi:10.1164/rccm.200701-085OC.

Gevaert P, Calus L, Van Zele T, Blomme K, De Ruyck N, Bauters W, et al. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2013. doi:10.1016/j.jaci.2012.07.047.

Gibson PG, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, et al. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2017. doi:10.1016/S0140-6736(17)31281-3.

- Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and Exacerbations of Refractory Eosinophilic Asthma. *N Engl J Med* 2009. doi:10.1056/NEJMoa0808991.
- Hamilton RG, Marcotte G V., Saini SS. Immunological methods for quantifying free and total serum IgE levels in allergy patients receiving Omalizumab (Xolair) therapy. *J Immunol Methods* 2005;303:81–91. doi:10.1016/J.JIM.2005.06.008.
- Hanania NA, Wenzel S, Roseń K, Hsieh HJ, Mosesova S, Choy DF, et al. Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: An analysis of biomarkers in the EXTRA study. *Am J Respir Crit Care Med* 2013. doi:10.1164/rccm.201208-1414OC.
- Hoshino M, Ohtawa J, Akitsu K. Effect of treatment with inhaled corticosteroid on serum periostin levels in asthma. *Respirology* 2016. doi:10.1111/resp.12687.
- Humbert M, Beasley R, Ayres J, Slavin R, Hébert J, Bousquet J, et al. Benefits of omalizumab as add-on therapy in patients with severe persistent asthma who are inadequately controlled despite best available therapy (GINA 2002 step 4 treatment): INNOVATE. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2005. doi:10.1111/j.1398-9995.2004.00772.x.
- Hutyrova B, Bystron J, Chlumsky J, Kindlova D, Klosova J, Krcmova I, et al. Effect of omalizumab treatment on allergic comorbidities in patients with severe allergic asthma – real life experience from Czech Anti-IgE Registry. *Allergy Immunol.*, vol. 50, European Respiratory Society; 2017, p. PA3541. doi:10.1183/1393003.congress-2017.PA3541.
- Izuhara K, Arima K, Ohta S, Suzuki S, Inamitsu M, Yamamoto K. Periostin in Allergic Inflammation. *Allergol Int* 2014. doi:10.2332/allergolint.13-RAI-0663.
- Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, et al. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol* 2013. doi:10.1016/j.jaci.2013.04.050.
- Kanu A, Patel K. Treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in CF with anti-IgE antibody (omalizumab). *Pediatr Pulmonol* 2008;43:1249–51. doi:10.1002/ppul.20907.
- Katial RK, Bensch GW, Busse WW, Chipps BE, Denson JL, Gerber AN, et al. Changing Paradigms in the Treatment of Severe Asthma: The Role of Biologic Therapies. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2017. doi:10.1016/j.jaip.2016.11.029.
- Kim MA, Yoon MK, Lee YS, Izuhara K, Ohta S, Ono J, et al. Clinical implication of the serum periostin level for differentiating phenotypes of NSAID hypersensitivity. *Allergol Int* 2016. doi:10.1016/j.alit.2016.04.013.
- Kimura Hirokazu, Konno S, Makita H, Taniguchi N, Kimura Hiroki, Goudarzi H, et al. Serum periostin is associated with body mass index and allergic rhinitis in healthy and asthmatic subjects. *Allergol Int* 2018. doi:10.1016/j.alit.2017.11.006.
- Kirchnerová OR, Valena T, Novosad J, Teř M. Real-world effectiveness and safety of omalizumab in patients with uncontrolled severe allergic asthma from the Czech Republic. *Adv Dermatol Allergol* 2018;1–10. doi:https://doi.org/10.5114/ada.2018.76606.
- Kou K, Okawa T, Yamaguchi Y, Ono J, Inoue Y, Kohno M, et al. Periostin levels correlate with disease severity and chronicity in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2014;171:283–91. doi:10.1111/bjd.12943.
- Krčmová, Novosad, Sedlák - 2018 - Biomarkery a biologická léčba. n.d.
- Kupryś-Lipińska I, Majak P, Molinska J, Kuna P. Effectiveness of the Polish program for the treatment of severe allergic asthma with omalizumab: a single-center experience 2016. doi:10.1186/s12890-016-0224-2.
- Langton D, Ing A, Bennetts K, Wang W, Farah C, Peters M, et al. Bronchial thermoplasty reduces gas trapping in severe asthma. *BMC Pulm Med* 2018;18:155. doi:10.1186/s12890-018-0721-6.
- Malkusová I., Ružičková O., Teř M., Vlas T. PP. Flow cytometric analysis compared with routine and immunocytochemistry staining of cell profile in induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid in patients with bronchial asthma. *Allergy*, vol. 64, XXVIII ELACI Congress, Polsko, Varšava, 6.-10.6.2009. : 2009, p. 99-178 suppl. 90, 269. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02075.x.
- Medrek SK, Parulekar AD, Hanania NA. Predictive Biomarkers for Asthma Therapy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2017. doi:10.1007/s11882-017-0739-5.
- Melo Jr. JT, Tunstall T, Pizzichini MMM, Maurici R, Rocha CC, Dal-Pizzol F, et al. IL-5 Levels in Nasosorption and Sputosorption Correlate with Sputum Eosinophilia in Allergic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;199:rccm.201807-1279LE. doi:10.1164/rccm.201807-1279LE.
- Menzella F, Facciolo N, Castagnetti C, Simonazzi A, Zucchi L. Omalizumab: when the non-responder is a late-responder. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2009;41:155–9.
- Menzella F, Galeone C, Formisano D, Castagnetti C, Ruggiero P, Simonazzi A, et al. Real-life efficacy of

omalizumab after 9 years of follow-up. *Allergy, Asthma Immunol Res* 2017. doi:10.4168/aaair.2017.9.4.368.

Milan Teřl A, Čáp P, Dvořáková R, Kašák V, Kočí T, Novotná B, et al. Doporučený postup diagnostiky a léčby bronchiálního astmatu. n.d.

Molimard M, Mala L, Bourdeix I, Le Gros V. Observational study in severe asthmatic patients after discontinuation of omalizumab for good asthma control. *Respir Med* 2014. doi:10.1016/j.rmed.2014.02.003.

Moore WC, Hastie AT, Li X, Li H, Busse WW, Jarjour NN, et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2014. doi:10.1016/j.jaci.2013.10.011.

Novelli F, Latorre M, Vergura L, Caiaffa MF, Camiciottoli G, Guarnieri G, et al. Asthma control in severe asthmatics under treatment with omalizumab: A cross-sectional observational study in Italy. *Pulm Pharmacol Ther* 2015;31:123–9. doi:10.1016/J.PUPT.2014.09.007.

Novosad J, Bartoš V, Drahošová M, Sedlák V, Krejsek J, Krčmová I. Periostin – nový slibný biologický znak bronchiálního astmatu a idiopatické plicní fibrózy Periostin-a novel promising biomarker of bronchial asthma and idiopathic pulmonary fibrosis. n.d.

O'Connell AE, Hess JA, Santiago GA, Nolan TJ, Lok JB, Lee JJ, et al. Major basic protein from eosinophils and myeloperoxidase from neutrophils are required for protective immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infect Immun* 2011;79:2770–8. doi:10.1128/IAI.00931-10.

Ortega HG, Liu MC, Pavord ID, Brusselle GG, FitzGerald JM, Chetta A, et al. Mepolizumab Treatment in Patients with Severe Eosinophilic Asthma. *N Engl J Med* 2014. doi:10.1056/NEJMoa1403290.

Pavord ID, Cox G, Thomson NC, Rubin AS, Corris PA, Niven RM, et al. Safety and Efficacy of Bronchial Thermoplasty in Symptomatic, Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:1185–91. doi:10.1164/rccm.200704-571OC.

Petsky HL, Cates CJ, Lasserson TJ, Li AM, Turner C, Kynaston JA, et al. A systematic review and meta-analysis: tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils). *Thorax* 2012;67:199–208. doi:10.1136/thx.2010.135574.

Petsky HL, Kew KM, Turner C, Chang AB. Exhaled nitric oxide levels to guide treatment for adults with asthma. *Cochrane Database Syst Rev* 2016. doi:10.1002/14651858.CD011440.pub2.

Pipkorn U, Karlsson G. Methods for obtaining specimens from the nasal mucosa for morphological and biochemical analysis. vol. 1. 1988.

Pizzichini MMM. Is sputum eosinophils a good or poor predictor of benefit from inhaled corticosteroid therapy in asthma? *Eur Respir J* 2002. doi:10.1183/09031936.02.00068102.

Rabe KF, Nair P, Brusselle G, Maspero JF, Castro M, Sher L, et al. Efficacy and Safety of Dupilumab in Glucocorticoid-Dependent Severe Asthma. *N Engl J Med* 2018. doi:10.1056/NEJMoa1804093.

Racek M. Struktura a vznik MPO. *Klin Biochem Metab* 2008;16:222–7.

Ruzickova-Kirchnerova, O. Malkusova, I. Terl, M. Hrabec, V. Panzner, P. Kunschrova J. Annual Congress Barcelona 2010, NASAL MUCOSA BIOPSY IN SEVERE ASTHMA PATIENTS AS A TOOL FOR THE PREDICTION OF THE INFLAMMATORY CHANGES IN LOWER AIRWAYS n.d. <https://www.ers-education.org/events/international-congress/barcelona-2010.aspx?idParent=80718> (accessed February 9, 2019).

Ruzickova-Kirchnerova O, Malkusova I, Terl M, Panzner P, Kunschrova J. Nasal mucosa biopsy in severe asthma patients as a tool for the prediction of the inflammatory changes in lower airways. n.d.

Růžičková-Kirchnerová O, Moláčková P, Teřl M, Vaník P, Panzner P. 10 Year evaluation of patients with severe uncontrolled allergic asthma treated with Omalizumab. *Clin. Probl.*, vol. 52, European Respiratory Society; 2018, p. PA658. doi:10.1183/13993003.congress-2018.PA658.

Ruzickova Kirchnerova O, Terl M, Mirka H, Baxa J, Hrabec V. Complex treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in asthmatic patient including anti-IgE therapy - A case report. *Eur Respir J* 2012;40.

Růžičková Kirchnerová O, Valena T, Novosad J, Teřl M, *Dermatol Allergol A*. Real-world effectiveness and safety of omalizumab in patients with uncontrolled severe allergic asthma from the Czech Republic. *Adv Dermatology Allergol* 2018;3. doi:10.5114/ada.2018.76606.

Shiraishi H, Masuoka M, Ohta S, Suzuki S, Arima K, Taniguchi K, et al. Periostin Contributes to the Pathogenesis of Atopic Dermatitis by Inducing TSLP Production from Keratinocytes. *Allergol Int* 2012. doi:10.2332/allergolint.10-OA-0297.

Shoda T, Futamura K, Kobayashi F, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Cell type-dependent effects of corticosteroid on periostin production by primary human tissue cells. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2013. doi:10.1111/all.12240.

Simpson JL, Powell H, Boyle MJ, Scott RJ, Gibson PG. Clarithromycin targets neutrophilic airway inflammation in refractory asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2008. doi:10.1164/rccm.200707-1134OC.

SPANEVELLO A, CONFALONIERI M, SULOTTO F, ROMANO F, BALZANO G, MIGLIORI GB, et al. Induced Sputum Cellularity. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1172–4. doi:10.1164/ajrccm.162.3.9908057.

Szefer SJ, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fahy J V., Hamilton RG, et al. Asthma outcomes: Biomarkers. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:S9–23. doi:10.1016/j.jaci.2011.12.979.

Tajiri T, Matsumoto H, Gon Y, Ito R, Hashimoto S, Izuhara K, et al. Utility of serum periostin and free IgE levels in evaluating responsiveness to omalizumab in patients with severe asthma. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2016. doi:10.1111/all.12922.

Takahashi K, Meguro K, Kawashima H, Kashiwakuma D, Kagami S ichiro, Ohta S, et al. Serum periostin levels serve as a biomarker for both eosinophilic airway inflammation and fixed airflow limitation in well-controlled asthmatics. *J Asthma* 2018. doi:10.1080/02770903.2018.1455855.

Takayama G, Arima K, Kanaji T, Toda S, Tanaka H, Shoji S, et al. Periostin: A novel component of subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *J Allergy Clin Immunol* 2006. doi:10.1016/j.jaci.2006.02.046.

Takehita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J* 1993. doi:10.1042/bj2940271.

Terl M, Sedlák V, Cap P, Dvořáková R, Kašák V, Kočí T, et al. Asthma management: A new phenotype-based approach using presence of eosinophilia and allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2017. doi:10.1111/all.13165.

Thomson NC, Bicknell S, Chaudhuri R. Bronchial thermoplasty for severe asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012. doi:10.1097/ACI.0b013e32835335ca.

Uchida M, Shiraishi H, Ohta S, Arima K, Taniguchi K, Suzuki S, et al. Periostin, a matricellular protein, plays a role in the induction of chemokines in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012. doi:10.1165/rcmb.2011-0115OC.

Viswanathan R, Busse W. Biologic Therapy and Asthma. *Semin Respir Crit Care Med* 2018. doi:10.1055/s-0037-1606218.

Wechsler ME, Laviolette M, Rubin AS, Fiterman J, Lapa e Silva JR, Shah PL, et al. Bronchial thermoplasty: Long-term safety and effectiveness in patients with severe persistent asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:1295–302. doi:10.1016/j.jaci.2013.08.009.

Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009. doi:10.1164/rccm.200903-0392OC.

Zervas E, Samitas K, Papaioannou AI, Bakakos P, Loukides S, Gaga M. An algorithmic approach for the treatment of severe uncontrolled asthma. *ERJ Open Res* 2018. doi:10.1183/23120541.00125-2017.

Zhang X-Y, Simpson JL, Powell H, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, et al. Full blood count parameters for the detection of asthma inflammatory phenotypes. *Clin Exp Allergy* 2014;44:1137–45. doi:10.1111/cea.12345.