



Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

**Možnosti časné diagnostiky
profesionálního bronchiálního astmatu**

MUDr. Pavlína Klusáčková (roz. Janů)

Praha 2008

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: **Prof. MUDr. Stanislav Trojan,
DrSc.**

Školící pracoviště: **Klinika nemocí z povolání 1. LF UK v
Praze**

Autor: **MUDr. Pavlína Klusáčková**

Školitel: **Prof. MUDr. Daniela Pelclová, CSc.**

Školitel konsultant (byl – li): **MUDr. Jindřiška Lebedová**

Oponenti:

.....
.....
.....

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: v hod.
kde
.....

S disertací je možno se seznámit na děkanátě
1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

OBSAH

- 1 **Úvod**
- 2 **Profesionální astma**
- 3 **Kondenzát vydechovaného vzduchu (KVV)**
 - 3.1. Úvod a současný stav řešeného problému
 - 3.2. Cíle projektu
 - 3.3. Materiál a metodika
 - 3.4. Výsledky
 - 3.5. Diskuze
 - 3.6. Závěr
- 4 **Indukované sputum**
 - 4.1. Úvod a současný stav řešeného problému
 - 4.2. Cíle projektu
 - 4.3. Materiál a metodika
 - 4.4. Výsledky
 - 4.5. Diskuze
 - 4.6. Závěr
- 5 **Souhrn**
- 6 **Summary**
- 7 **Literatura**
- 8 **Seznam publikací, které jsou ve vztahu k disertaci**
- 9 **Seznam publikací bez vztahu k disertaci**

1 Úvod

Profesionální bronchiální astma je jednou z nejčastějších profesionálních chorob dýchacího systému. Jeho vyvolávající příčinou je alergen, který se nachází na pracovišti postižené osoby. Z dlouholetých sledování dalšího vývoje profesionálního astmatu po eliminaci z působení prokázaného profesionálního alergenu vyplývá, že u většiny pacientů nedochází k úplnému vymizení astmatu a onemocnění u nich přetrvává. Příčinou může být právě příliš pozdní diagnostika astmatu, kdy zánět v dýchacích cestách je již pokročilejší a zánětem postižená sliznice je vnímavější k působení dalších alergenů. Z tohoto důvodu je snaha o co nejčasnější diagnostiku profesionálního astmatu. V oblasti diagnostiky je snaha vyvíjet nové metody, které by počínající astma odhalily dříve než metody dosud dostupné. V souladu se světovým výzkumem astmatu jsme pro možnou časnou diagnostiku profesionálního astmatu zvolili dvě metody, které se z hlediska posledních poznatků jeví jako slibné v oblasti diagnostiky i dalšího sledování vývoje onemocnění astmatem. První metodou je analýza kondenzátu vydechovaného vzduchu. Druhou metodou je analýza indukovaného sputa.

2 Profesionální astma

Profesionální bronchiální astma je nemoc, která vzniká při práci, u níž je prokázána expozice prachu nebo plynným látkám s alergizujícími nebo iritujícími účinky. Profesionální astma lze rozdělit do dvou velkých skupin: na imunologické (senzibilizací navozené astma) a neimunologické (iritační, vyvolané působením látek s iritačním účinkem).

Profesionální alergeny lze také rozdělit do dvou skupin - na nízkomolekulární (<1kDa) a vysokomolekulární (>1kDa) (*Balmes 1997*). Mezi vysokomolekulární alergeny patří většinou látky rostlinného nebo živočišného původu a tvoří již samy o sobě vlastní reakce schopný antigen. Nízkomolekulárními alergeny jsou většinou látky chemické a potřebují k tvorbě kompletního antigenu spojení s proteinem (*Novotná 2000*).

Diagnostika profesionálního bronchiálního astmatu je založena na ověření a potvrzení základního onemocnění - tj. bronchiálního astmatu, na průkazu senzibilizace na noxu přítomnou na pracovišti

pacienta a na průkazu souvislosti mezi vznikem astmatu a pracovní expozicí. Průkaz vlastního profesionálního astmatu je možno provést více způsoby: monitorováním změny parametru PEF (peak expiratory flow) na pracovišti, monitorováním změny bronchiální hyperreaktivity v období vyřazení z pracovního procesu a v období expozice na pracovišti nebo provedením specifických bronchoprovokačních testů s alergeny.

3 Kondenzát vydechovaného vzduchu (KVV)

3.1. Úvod a současný stav řešeného problému

KVV je bohatým zdrojem látek, které odrážejí prostředí dýchacích cest. Mediátory jsou z dýchacích cest uvolňovány do vydechovaného vzduchu, který pak kondenzuje v ochlazované sběrné zkumavce. Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu je jednoduchá neinvazivní metoda, která může být prováděna i u dětí a vážně nemocných pacientů a opakována několikrát za sebou (*Barnes 2005, Čáp 2001*).

Leukotrieny (LT) patří mezi metabolity kyseliny arachidonové. LTC₄, LTD₄ a LTE₄ jsou, vzhledem ke své funkci, považovány za mediátory obstrukce. Produkce cysteinylových leukotrienů v organismu byla v minulosti monitorována převážně zjišťováním koncentrace LTE₄ v moči. Tato koncentrace odráží celkovou produkci leukotrienů v organismu, z níž vlastní produkce v dýchacích cestách představuje pouze část. Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu umožňuje sledovat změny koncentrací leukotrienů přímo v dýchacích cestách a zachytit tak nejen konečný LTE₄, ale i hlavní kontraktilní leukotrieny LTC₄ a LTD₄ (*Drazen 1998*). LTB₄ patří mezi chemoatraktanty neutrofilů a jeho zvýšená koncentrace v KVV byla popsána u astmatiků i u osob s chronickou obstrukční bronchopulmonální chorobou (*Hanazawa 2000b, Montuschi 2003*). Izoprostany jsou látky vznikající neenzymatickou peroxidací kyseliny arachidonové. Izoprostany nejsou jen markery oxidativního stresu, ale byla zjištěna také řada jejich účinků na dýchací systém. Zvýšená koncentrace 8-izoprostanu v KVV byla nalezena u astmatiků (*Anczak 2002*).

3.2. Cíle projektu

- A. Stanovit koncentrace leukotrienů B₄, C₄, D₄, E₄ a 8-izoprostanu v kondenzátu vydechovaného vzduchu u skupiny osob s profesionálním bronchiálním astmatem a u zdravých osob.
- B. Sledovat změny koncentrací leukotrienů B₄, C₄, D₄, E₄ a 8-izoprostanu v kondenzátu vydechovaného vzduchu během 24 hodin u osob v klidu bez provokace alergenem či nespecifickým podnětem.
- C. Sledovat změny koncentrací leukotrienů B₄, C₄, D₄, E₄ a 8-izoprostanu v kondenzátu vydechovaného vzduchu po expozici alergenu u osob s podezřením na profesionální bronchiální astma či rinitidu.

3.3. Materiál a metodika

Charakteristika sledovaných osob

A. Skupina osob s profesionálním bronchiálním astmatem a zdravých dobrovolníků

Bylo vyšetřeno 32 osob s profesionálním bronchiálním astmatem (z toho 29 osob léčených kortikosteroidy) a 39 zdravých dobrovolníků. Kromě běžných laboratorních a klinických vyšetření byl u každé osoby odebrán 1 vzorek kondenzátu vydechovaného vzduchu a provedeno funkční vyšetření plic.

B. Skupina osob, u nichž byla sledována 24-hodinová variabilita leukotrienů a 8-izoprostanu v klidu bez provokace alergenem

Bylo vyšetřeno 57 osob přijatých pro podezření na profesionální bronchiální astma nebo rinitidu. Kromě běžných laboratorních a klinických vyšetření bylo provedeno monitorování 24-hodinové variability KVV parametrů spolu s vyšetřením ventilačních parametrů (4x během 24 hodin).

C. Skupina osob vyšetřených pro podezření na profesionální bronchiální astma či rinitidu - sledování během specifických bronchoprovokačních testů s alergeny

Bylo vyšetřeno 47 osob přijatých pro podezření na profesionální bronchiální astma nebo rinitidu. Kromě běžných laboratorních a klinických vyšetření bylo provedeno sledování 24-

hodinové variability ventilačních parametrů a specifické bronchoprovokační testy s profesionálními alergeny spolu s odběrem KVV.

Metodika použitých vyšetření

Funkční vyšetření plic

Funkční vyšetření plic bylo provedeno vsedě spirometrem s bodypletysmografem MasterLab Jaeger.

Nespecifický bronchoprovokační test

Nespecifický bronchoprovokační test s histaminem byl proveden pomocí inhalační jednotky Asthma Provocation System Jaeger. Roztok histaminu byl inhalován v koncentracích 1 mg/ml, (případně 2,5 mg/ml), 5 mg/ml, 10 mg/ml, (případně 15 mg/ml). Jako kritérium pro zhodnocení testu jako pozitivního byl brán pokles parametru FEV₁ (usilovně vydechnutý objem vzduchu za 1s) o 20 % vzhledem k hodnotě před testem, případně pokles o více než 30 % v parametrech MEF (maximální výdechový průtok na různých úrovních usilovné vitální kapacity (FVC) nebo vzestup R_{tot} (odpor dýchacích cest) o více než 70 % spolu s poklesem FEV₁ alespoň o 15% vzhledem k hodnotám naměřeným před testem.

Specifické bronchoprovokační testy

Během specifických bronchoprovokačních testů byl pacient po dobu 30 min vystaven sledovaným látkám z pracoviště v podmínkách simulujících pracovní expozici podezřelému alergenu. Hodnoty ventilačních parametrů a klinický stav vyšetřovaného byl sledován před aplikací alergenu, bezprostředně po aplikaci, za 2h, 5h a 24 h po aplikaci alergenu a v případě náhle vzniklé bronchospastické odpovědi kdykoliv v průběhu 24 h následujících po aplikaci alergenu. Hodnocení pozitivivity bylo identické jako u nespecifického provokačního testu.

Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu

KVV byl odebírán pomocí přístroje EcoScreen Jaeger do plastových zkumavek z inertního materiálu a ihned po odebrání byl vzorek zamražen na -70°C do doby zpracování.

Metodika odběru KVV:

1. U zdravých dobrovolníků a osob s bronchiálním astmatem odběr KVV 1x vždy před vyšetřením ventilačních parametrů
2. U osob, u nichž byla sledována 24-hodinová variabilita leukotrienů a 8-izoprostanu v KVV: odběr KVV 4x během 24 h (1. odběr mezi 7:00 a 10:15 h, 2. odběr mezi 10:30 a 14 h, 3. odběr mezi 13:30 a 17:30 h, 4. odběr mezi 7:00 a 10:15 h následující den)
3. U osob vyšetřovaných pro podezření na profesionální bronchiální astma či rinitidu:
 - a/ odběr KVV 4x během 24 h při sledování denní variability ventilačních parametrů v časových intervalech odpovídajících očekávanému odběru během bronchoprovokačního testu (1. odběr mezi 7:00 a 10:15 h, 2. odběr mezi 10:30 a 14 h, 3. odběr mezi 13:30 a 17:30 h, 4. odběr mezi 7:00 a 10:15 h následující den)
 - b/ odběr KVV před specifickým bronchoprovokačním testem a následně ihned po testu, za 2h, za 5h a za 24h po testu, vždy před měřením plicních funkcí.

Analýza leukotrienů

Imunoseparace byla provedena s komerčně vyrobeným afinitním sorbentem a byly přidány deuteriem značené standardy. Koncentrace jednotlivých sledovaných parametrů byly stanoveny pomocí LC/MS- přístroj Varian 1200L, Varian, USA. Detekce byla prováděna v režimu „selective reaction monitoring“ (SRM). Limit detekce byl pro LTB₄, LTD₄, LTE₄ a 8-izoprostan 1 pg/ml, pro LTC₄ 2 pg/ml.

Statistické zpracování

Data získaná ve skupině zdravých dobrovolníků a osob s profesionálním astmatem byla zpracována pomocí běžných statistických metod (průměr, směrodatná odchylka). Pomocí korelačního koeficientu byla zhodnocena lineární korelace mezi hladinou KVV parametrů a ventilačními parametry (hladina významnosti $p < 0,05$).

Hodnoty koncentrací leukotrienů nejevily normální distribuci (vychýlení doprava z důsledku výskytu občasných vysokých hodnot), proto byla data získaná během bronchoprovokačních testů zpracována pomocí vytvořeného modelu, který pracoval s logaritmy hodnot koncentrací a parametru FEV₁. Dále byla použita modifikace

testu ANOVA pro logaritmičsky transformované měření s časovým faktorem v LME modelu.

Cirkadiánní intraindividuální variabilita jednotlivých KVV parametrů byla vyjádřena variačním koeficientem, který byl vypočítán pro každou osobu (i-tou) jako $CV_i = 100 \cdot [\text{směrodatná odchylka opakovaného měření pro } i\text{-tou osobu}] / [\text{průměrná hodnota opakovaných měření pro } i\text{-tou osobu}]$.

3.4. Výsledky

A. Skupina osob s profesionálním bronchiálním astmatem a zdravých dobrovolníků

U zdravých osob bylo rozmezí hodnot LTB_4 v KVV 15-95 pg/ml vs. 0-57 pg/ml u astmatiků, LTC_4 22-167 pg/ml vs. 29-115 pg/ml, LTD_4 7-68 pg/ml vs. 9-69 pg/ml, LTE_4 7-99 pg/ml vs. 5-112 pg/ml, 8-izoprostan 16-222 pg/ml vs. 28-116 pg/ml.

Průměrné hodnoty LTB_4 , LTD_4 a LTE_4 byly vyšší ve skupině zdravých osob (významně však jen pro leukotrien B_4 $p=0,0002$) než ve skupině osob s profesionálním astmatem. 8-izoprostan a LTC_4 byly oproti tomu vyšší ve skupině astmatiků (LTC_4 významně vyšší $p=0,0010$). Všechny sledované ventilační parametry byly významně nižší ve skupině osob s profesionálním astmatem ($FEV_{1,}$ $MEF_{25,}$ $AEX,$ R_{tot} $p<0,0001$, TLC $p=0,0006$).

Nebyla nalezena významná korelace mezi sledovanými ventilačními parametry a koncentracemi leukotrienů či 8-izoprostanu.

B. Sledování 24-hodinové variability leukotrienů a 8-izoprostanu v klidu bez provokace alergenem

U 57 osob bylo provedeno celkem 58 měření 24-hodinové variability KVV parametrů bez provokace alergenem (1 osoba byla během 3 let průběhu výzkumu hospitalizována na naší klinice 2x). Hodnoty sledovaných parametrů KVV se lišily (ne však významně) v parametru LTC_4 , kdy se u bronchiálních hyperreaktorů (BHR) průměrné hodnoty pohybovaly v rozmezí 60,8-70,0 pg/ml a u bronchiální non-hyperreaktorů (n-BHR) v rozmezí 48,4-57,5 pg/ml. Rozmezí průměrných hodnot pro ostatní parametry bylo: LTB_4 39,8-40,3 pg/ml (BHR) vs. 33,5-42,4 pg/ml (n-BHR), LTD_4 21,6-23,5 pg/ml (BHR) vs. 22,7-27,5 pg/ml (n-BHR), LTE_4 42,1-51,1 pg/ml

(BHR) vs. 43,2-58,0 pg/ml (n-BHR), 8-izoprostan 61,2-68,8 pg/ml (BHR) vs. 56,6 vs. 67,5 pg/ml (n-BHR). Ve skupině bronchiálních hyperreaktorů byl průměrný variační koeficient vyšší jen pro LTC₄ (22,00 % (BHR) vs. 20,66 % (n-BHR)), pro ostatní parametry byl vždy paradoxně vyšší ve skupině bronchiální non-hyperreaktorů. Při statistickém zpracování se však variační koeficient se mezi skupinami bronchiálních hyperreaktorů a non-hyperreaktorů významně nelišil.

C. Sledování koncentrací leukotrienů a 8-izoprostanu v KVV během specifických bronchoprovokačních testů s alergeny

U 47 osob byly provedeny specifické bronchoprovokační testy (s odběrem KVV) a měření KVV a ventilačních parametrů v klidu bez provokace s alergenem. Čtyřicet jedna testů s alergenem bylo uzavřeno dle výsledků ventilačních parametrů (podmínky viz metodika) jako negativní, 6 testů bylo uzavřeno jako pozitivní bronchoprovokační odpověď na alergen.

Osoby s negativním výsledkem specifického bronchoprovokačního testu

Při sledování 24-hodinové variability bez provokace alergenem byl mezi 4 měřeními nalezen statisticky významný rozdíl jen pro parametr 8-izoprostan ($p=0,0138$). Pro ostatní parametry byly změny nevýznamné: FEV₁ $p=0,6340$, LTB₄ $p=0,1185$, LTC₄ $p=0,0889$, LTD₄ $p=0,4027$, LTE₄ $p=0,0504$. Při testování korelace mezi ventilačním parametrem FEV₁ a KVV parametry, nebyl nalezen statisticky významný vztah mezi transformovanými poměry KVV parametrů a FEV₁. Během specifických bronchoprovokačních testů s alergeny nebyl mezi 5 měřeními nalezen statisticky významný rozdíl: FEV₁ $p=0,7610$, LTB₄ $p=0,4716$, LTC₄ $p=0,0556$, LTD₄ $p=0,9030$, LTE₄ $p=0,5365$ a 8-izoprostan $p=0,3110$. Mezi transformovanými poměry KVV parametrů a FEV₁ byla nalezena významnost jen pro parametr LTB₄ ($p=0,0299$) pro odběry před testem a 5h po testu.

Osoby s pozitivním výsledkem specifického bronchoprovokačního testu

Šest provedených bronchoprovokačních testů s alergeny bylo vyhodnoceno jako pozitivní z hlediska bronchomotoriky U 3 osob se objevila bronchokonstrikce ihned po testu, u 3 osob se

objevila bronchokonstrikce po 5h po expozici alergenu. Počet pozitivně testovaných osob byl malý (6), proto nebylo provedeno statistické zpracování a data byla zhodnocena pouze vizuálně s přihlédnutím k průběhu reakce.

Osoba 1: V klidu byla pozorována tendence k nárůstu koncentrace KVV markerů v době poledne a pozdního odpoledne. Během pozitivního testu (časná reakce) se objevil nárůst LTC₄, D₄, E₄ a 8-izoprostanu 2h po testu a 5h po testu, u LTB₄ jen 2h po testu.

Osoba 2: V klidu byla pozorována tendence k nárůstu koncentrace KVV markerů v době poledne (LTB₄, C₄, E₄, 8-izoprostan) a pozdního odpoledne (LTC₄). Během pozitivního testu (časná reakce) byl patrný nárůst 8-izoprostanu ihned a 2h po testu.

Osoba 3: V klidu byla tendence k nárůstu LTC₄ a LTE₄ při poledním měření. Během pozitivního testu (časná reakce) byl nárůst LTC₄ 2h po testu.

Osoba 4: V klidu nebyla výrazná fluktuace v hladinách KVV markerů. Během pozitivního testu (pozdní reakce) byl nárůst LTC₄ ihned po testu, hodnota 8-izoprostanu byla vysoká (oproti hodnotám naměřeným v klidu) po celou dobu testu

Osoba 5: V klidu nebyla výrazná fluktuace v hladinách KVV markerů. Během pozitivního testu (pozdní reakce) byl nárůst LTC₄ ihned po testu a 5 hodin po testu, hodnota LTB₄ byla vysoká (oproti hodnotám naměřeným v klidu) po celou dobu testu.

Osoba 6: V klidu byla zaznamenána fluktuace v hladinách všech KVV markerů. Během pozitivního testu byl nárůst LTC₄ a LTB₄ v době maximální zaznamenané bronchokonstrikce (5h po testu), 8-izoprostan byl zvýšený 2h po testu.

3.5. Diskuze

Skupina zdravých dobrovolníků a osob s profesionálním bronchiálním astmatem

Tato část studie se zabývala srovnáním koncentrací leukotrienů mezi skupinou zdravých osob a osob s profesionálním bronchiálním astmatem. Zajímalo nás, zda bude hladina leukotrienů u astmatiků ovlivněna léčbou, kterou nebylo možno vysadit. Dvacet devět osob (z 32) s profesionálním astmatem bylo léčeno inhalačními kortikosteroidy.

Předpokládali jsme, že ve skupině astmatiků budou vyšší hodnoty leukotrienů než ve skupině zdravých osob. Zvýšené cysteinylové leukotrieny, případně LTB_4 u astmatiků oproti zdravým osobám popsal Hanazawa (2000b); Antzak (2002). Náš předpoklad se potvrdil jen v parametru LTC_4 (významně vyšší) a dále u 8-izoprostanu (vyšší, ne však významně). Naopak koncentrace LTD_4 a LTE_4 byly vyšší ve skupině zdravých osob (ale ne významně), LTB_4 významně vyšší.

Důvodem vyšších koncentrací některých leukotrienů ve skupině zdravých osob (oproti skupině astmatiků) může být léčba kortikosteroidy, i když i tady se údaje různých studií liší. Nižší koncentrace cysteinylových leukotrienů u astmatiků léčených kortikosteroidy popsal Baraldi (2003) i Antczak (2002). Oproti tomu Mondino (2004) našla významně vyšší koncentrace LTE_4 a LTB_4 u atopických astmatických dětí (neléčených i léčených kortikosteroidy) ve srovnání se zdravými kontrolami. Montuschi (1999) našel vyšší koncentrace 8-izoprostanu u osob se středně těžkým i těžkým astmatem i přes léčbu orálními či vysokými dávkami inhalačních kortikosteroidů. Oproti tomu Antzak (2002) udává, že pacienti s aspirin senzitivním astmatem, kteří nebyli léčení kortikosteroidy, měli oproti pacientům s aspirin-senzitivním astmatem vyšší hodnoty 8-izoprostanu v KVV.

Leukotrien C_4 byl v naší studii i přes léčbu kortikosteroidy významně vyšší ve skupině astmatiků. To naznačuje jeho možné vhodné využití ve sledování vývoje a přetrvávání astmatu. Problémem však zůstává nízká stabilita uvedeného leukotrienu a nedostatek studií, které se jeho stanovováním zabývají (k analýze leukotrienů je ve většině studií používána imunoanalýza a cysteinylové leukotrieny jsou uváděny jako suma LTC_4 , LTD_4 a LTE_4).

Sledování 24-hodinové variability leukotrienů a 8-izoprostanu v KVV

První část sledování leukotrienů u osob hospitalizovaných pro podezření na profesionální bronchiální astma či rinitidu byla zaměřena na sledování a vyhodnocení variability leukotrienů a 8-izoprostanu v klidu bez provokace. Skupina 57 osob byla pro statistické zpracování dále rozdělena dle přítomnosti nespecifické bronchiální hyperreakivity na dvě podskupiny. Variační koeficienty získané výpočtem ze 4 měření během 24 hodin v těchto skupinách

byly kromě koeficientu pro LTC₄ vyšší paradoxně ve skupině bronchiálních non-hyperreaktorů, ale rozdíly nebyly statisticky významné. Pro všechny parametry však byly koeficienty poměrně vysoké (19-29 %), kdy nejvyšší byly pro leukotrien D₄ a E₄.

Údaje o opakovaném měření leukotrienů v kondenzátu vydechovaného vzduchu během 24 hodin (diurnální variabilita) či několika po sobě následujících dnech jsou v literatuře poměrně málo zastoupeny. Nejčastěji je u sledovaných osob uváděn pouze jeden denní odběr. Diurnální variabilita byla však sledována u LTE₄ vylučovaného jako hlavní metabolit cysteinylvé řady leukotrienů do moči. Wenzel (1995) popsal ranní hodnoty LTE₄ a LTB₄ u astmatiků s noční exacerbací astmatu významně vyšší než u zdravých osob. Asano (1995) zjistil také vyšší koncentrace LTE₄ u astmatiků než u zdravých osob, ale cirkadiánní variabilita nebyla prokázána ani v jedné ze skupin. Při srovnání variačních koeficientů při 24-hodinovém měření byl významný rozdíl mezi skupinou astmatiků (43,7 %) a zdravými osobami (29,9 %). Tyto variační koeficienty byly značně vyšší než koeficienty zjištěné při našem sledování leukotrienů v KVV. Oproti tomu Bellia (1996) neshledal významné rozdíly mezi hodnotami LTE₄ zdravých osob a astmatiků bez nočních exacerbací. Koncentrace LTE₄ měřené v nočních hodinách u astmatiků s nočními exacerbacemi astmatu byly v významně vyšší v porovnání se zdravými osobami a astmatiky bez nočních exacerbací. Oproti tomu Kurokawa (2001), zaznamenal cirkadiánní variabilitu LTE₄ ve skupině zdravých osob a astmatiků s nočními exacerbacemi astmatu s maximem v ranních hodinách (mezi 3. a 6. hodinou ranní). Z uvedených studií vyplývá, že názor na diurnální variabilitu LTE₄ v moči u zdravých osob i u astmatiků je značně rozdílný.

V našich skupinách byly u bronchiálních non-hyperreaktorů nejvyšší hodnoty leukotrienů zaznamenány mezi 13.30 a 17.00 hodinou, hodnoty 8-izoprostanu byly naopak v tuto dobu nejnižší. Ve skupině bronchiálních hyperreaktorů byl výraznější nárůst zaznamenán pouze pro LTC₄ v době mezi 10.30 a 17.30 hodin. Zvýšené hodnoty KVV parametrů v ranních hodinách (jako v některých studiích) jsme v naší studii nezaznamenali. Naše měření však začínala v 7 hodin ráno a končila v 17.30 večer, noční a brzké ranní hodnoty tedy nebyly sledovány.

Sledování koncentrací leukotrienů a 8-izoprostanu v KVV během specifických bronchoprovokačních testů s alergeny

Tato část studie byla zaměřena na sledování koncentrací leukotrienů a 8-izoprostanu v kondenzátu vydechovaného vzduchu během bronchoprovokačních testů s profesionálními alergeny. Koncentrace těchto markerů byly měřeny u stejných osob také v klidu bez provokace. Jak již bylo popsáno ve výsledcích, významné změny v KVV parametrech bez provokace alergenem byly nalezeny pouze pro 8-izoprostan, u stejných osob během negativního bronchoprovokačního testu významné změny nalezeny nebyly.

Pozitivní bronchoprovokační test byl přítomen pouze u 6 osob, proto nebylo možné provést validní statistickou analýzu získaných výsledků. Navíc byla u 3 osob prokázána časná a u 3 osob pozdní reakce na alergen, což rozdělilo naši již tak malou skupinu na další dvě podskupiny. Problémem byl také fakt, že testované alergeny byly rozdílné u všech šesti osob, což je všeobecně problémem při sledování profesionálního astmatu- existuje velké množství nox, které mohou způsobovat profesionální astma.

V mnoha studiích byl detekován zvýšený LTE₄ v moči po bronchoprovokačních testech s alergeny (Taylor 1989, Smith 1991, Kumlin 1992). Hanazawa (2000a) našel zvýšené koncentrace cysteinylových leukotrienů v KVV po aplikaci alergenu během pozdní astmatické reakce. Macfarlane (2000) popsala významné zvýšení cysteinylových leukotrienů v indukovaném sputu také u osob s pozdní astmatickou reakcí po aplikaci alergenu. V naší skupině testovaných osob byla zaznamenána tendence ke zvýšení LTC₄ v KVV po testu u 5 pacientů. Nárůst koncentrace ostatních parametrů byl individuální u každého pacienta

3.6. Závěr

Analýza KVV je progresivně se vyvíjející diagnostická metoda. Koncentrace leukotrienů v KVV jsou velmi nízké (pg/ml), a proto je nutné pro analýzu užívat velmi přesných a citlivých metod. Naše studie použila analýzu pomocí LC/MS, která je sice finančně náročnější než dosud používané imunologické metody, ale její výhodou je právě citlivost a přesnost. Analytická metoda přinesla

možnost detekce jednotlivých cysteinylových leukotrienů odděleně (C₄, D₄ a E₄).

Při srovnání astmatiků a zdravých osob byl LTC₄ jako jediný ze sledovaných KVV markerů významně vyšší ve skupině astmatiků (přes léčbu kortikosteroidy). Tohle zjištění by mohlo být přínosné pro jeho další klinické využití.

Sledování 24-hodinové variability markerů vyšetřovaných v KVV ukázalo poměrně velkou intraindividuální i interindividuální variabilitu KVV parametrů. Je tedy zřejmé, že u astmatiků mohou být údaje z jednoho denního měření zavádějící (často uváděné v odborných člácích) a pokud jsou takto prezentovány výsledky jednoho měření, měly by být vzorky od sledovaných osob odebírány vždy ve stejnou dobu.

Během negativních bronchoprovokačních testů nebyly nalezeny významné změny v koncentracích KVV markerů. Zhodnocení pozitivních testů bylo omezeno na malý počet osob, takže bylo možné jen srovnávat individuální změny KVV markerů vzhledem ke stavu bez provokace alergenem.

Naše pracoviště funguje jako superkonziliární pro většinu pracovišť v Čechách, proto se u nás koncentrují sporné případy k diagnostice profesionálního astmatu, kdy není rozhodování o přítomnosti nemoci jednoduché. Z tohoto důvodu je počet diagnostikovaných případů profesionálního astmatu menší (převaha negativních testů), a ve většině případů se dosud dostupnými diagnostickými metodami nepodaří profesionální astma prokázat.

Do budoucna bude vhodné se zaměřit na jeden profesionální alergen. Jako optimální se jeví pšeničná mouka, která je v České republice nejčastěji prokázána jako profesionální alergen a tento alergen je možné laboratorně připravit ve formě vhodné k inhalaci.

4 Indukované sputum

4.1 Úvod a současný stav řešeného problému

Myšlenka indukce sputa vychází ze skutečnosti, že ne všechny osoby jsou schopné vyprodukovat spontánně sputum. Proto se začalo sputum indukovat pomocí inhalace roztoků hypertonických solí chloridu sodného (NaCl). Koncentrace roztoků NaCl, které se

k indukci sputa používají je nejčastěji 0,9-7 %. Během indukce sputa je nutné sledovat změny ventilačních parametrů. U osob se zvýšenou bronchiální hyperreaktivitou by mohly hypertonické roztoky soli vyvolat pokles ventilačních parametrů, proto se používá před inhalací soli aplikace salbutamolu (200-400 µg) nebo jiného bronchodilatačního léku, což u většiny osob možnému poklesu ventilačních parametrů zabrání.

Sputum je možné zpracovávat jako celek (celý vzorek i se slinami) nebo pouze selektovanou část sputa bez slin. Výhodou metody užívající selektované sputum je menší kontaminace skvamózními buňkami z dutiny ústní (pod 5 %), což ulehčuje a zrychluje následnou buněčnou analýzu. Nevýhodou této metody je delší doba zpracování a náročnější laboratorní vybavení. Při zpracování celého vzorku sputa je výhodou kratší doba zpracování. Nevýhodou je větší kontaminace skvamózními buňkami, což při kontaminaci větší než 20 % snižuje reprodukovatelnost výsledného buněčného rozpočtu.

Buněčný rozbor indukovaného sputa přispívá k diagnostice onemocnění dýchacích cest. Diferenciální rozpočet zdravých osob je následující (*90.percentil): *neutrofilů <64,4 %, eozinofilů <2 %, *makrofágy <86,1 %, *lymfocyty <2,6 % (*Efthimiadis 2004*). Bronchiální astma či eozinofilní bronchitida a expozice alergenu u vnímavých osob se vyznačují zvýšeným počtem eozinofilů ve sputu. U chronické bronchitidy, chronické obstrukční bronchopulmonální nemoci, u kuřáků, působením ozónu, při infekci dýchacích cest, vlivem některých znečišťujících látek v ovzduší, působením endotoxinů a při non-eozinofilním steroid-rezistentním bronchiálním astmatu dochází ke zvýšení neutrofilů ve sputu. Zvýšení lymfocytů ve sputu bylo popsáno u sarkoidózy a u chlamydiové pneumonie (*Jarayjam 2000*).

4.2. Cíle projektu

1. Zavedení metody odběru a zpracování indukovaného sputa-neselektivní a selektivní metoda.
2. Sledování buněčných změn v indukovaném sputu v průběhu bronchoprovokačních testů s profesionálními alergeny a využití v diagnostice bronchiálního astmatu u pacientů s podezřením na

profesionální bronchiální astma paralelně s dosud užívanými metodami.

3. Monitorování vývoje profesionálního bronchiálního astmatu (zánětu v dýchacích cestách) u pacientů po vyřazení z expozice profesionálnímu alergenu.

4.3. Materiál a metodika

Charakteristika sledovaných osob

A. Skupina osob se suspektním profesionálním bronchiálním astmatem - metoda neselektovaného sputa

Bylo vyšetřeno 22 osob, u kterých byly vyšetřeny a zhodnoceny tyto parametry: eozinofily v krvi, celkové IgE protilátky, eosin kationický protein (ECP), kožní prick testy, spirometrie a nespecifický bronchoprovokační test. Specifické bronchoprovokační testy byly provedeny s alergeny v expoziční kabině. Indukované sputum bylo odebráno před a 24 hodin po posledním specifickém bronchoprovokačním testu.

B. Skupina osob s již diagnostikovaným profesionálním astmatem - metoda neselektovaného sputa

Bylo vyšetřeno 37 osob s již diagnostikovaným profesionálním astmatem v časovém odstupu průměrně 6,5 roku po vyřazení z expozice. Vyšetření zahrnovalo: eozinofily v krvi, celkové IgE protilátky, ECP, kožní prick testy, spirometrii a nespecifický bronchoprovokační test. Byl proveden jeden odběr indukovaného sputa.

Kontrolní skupina - metoda neselektovaného sputa

Kontrolní skupinu tvořilo 19 osob bez projevů alergie či astmatu. Vyšetření zahrnovalo: eozinofily v krvi, celkové IgE protilátky, ECP, kožní prick testy, spirometrie a nespecifický bronchoprovokační test s histaminem. Byl proveden 1 odběr indukovaného sputa.

C. Skupina osob se suspektním profesionálním bronchiálním astmatem - metoda selektovaného sputa

Pro podezření na profesionální astma bylo vyšetřeno 23 osob, u kterých byly provedeny specifické bronchoprovokační testy.

Byly vyšetřeny tyto parametry: eozinofily (procentuální zastoupení, absolutní počet), celkové IgE a ECP v krvi, kožní prick testy, spirometrie a nespecifický bronchoprovokační test s histaminem. Specifické bronchoprovokační testy byly provedeny s alergeny v expoziční kabině nebo reexpozicí na pracovišti. Indukované sputum bylo odebráno před a 24 hodin po specifickém bronchoprovokačním testu.

Metodika použitých vyšetření

Indukce a zpracování sputa - neselektované sputum

Indukce sputa byla provedena pomocí inhalace 5 ml 3%, 4% a 5% NaCl pomocí nebulizátoru Porta-Neb Sidestream. Inhalační bronchodilatační látka byla aplikována před inhalací NaCl, případně po ní, také v závislosti na změnách plicních funkcí (při poklesu FEV₁ o 20%). Ke zpracování byl použit celý objem vykašlaného sputa. Sputum bylo homogenizováno přidáním identického objemu dithiotreitolu ve fosfátovém pufru ředěného 1:10 destilovanou vodou (Sputolysin Reagent, Calbiochem), roztřepáno po dobu 30 min a filtrováno. Vzorek byl centrifugován při 1200 rpm po dobu 10 minut. Po odstranění supernatantu byl buněčný shluk resuspendován ve fosfátovém pufru a byl proveden nátěr na sklíčko. Vzorek byl barven dle May-Grünwald-Giemsy. Buněčný rozpočet byl získán z 300 neskvamózních buněk (*Chlumský 2001*).

Indukce a zpracování sputa - selektované sputum

Indukce sputa byla provedena pomocí inhalace 3%, 4% a 5% NaCl vždy 5 min pomocí nebulizátoru Porta-Neb Sidestream. Inhalační bronchodilatační látka (salbutamol 200 µg) byla aplikována před inhalací NaCl. Ke zpracování byla použita selektovaná část sputa bez slin. K selektované části sputa byl přidán objem (v µl) dithiotreitolu ve fosfátovém pufru (Sputolysin Reagent, Calbiochem) odpovídající 4-násobku hmotnosti vzorku v mg. Vzorek byl třepán po dobu 30 min, filtrován a centrifugován při 1200 rpm po dobu 10 minut. Po odstranění supernatantu byl buněčný shluk resuspendován ve fosfátovém pufru a byl proveden nátěr na sklíčko. Vzorek byl barven dle May-Grünwald-Giemsy. Buněčný rozpočet byl získán z 300 neskvamózních buněk. (*Efthimiadis 1997*)

Funkční vyšetření plic a nosu

Funkční vyšetření plic bylo provedeno vsedě spirometrem s bodyplety smografem MasterLab Jaeger v souladu se standardy Evropské respirační společnosti (*Quanjer 1993*). Měření nosních průtoků a rezistence byla prováděna metodou přední rhinomanometrie na přístroji Rhinoscreen (Jaeger).

Nespecifický bronchoprovokační test

Nespecifický bronchoprovokační test s histaminem byl proveden pomocí inhalační jednotky Asthma Provocation System Jaeger. Roztok histaminu byl inhalován v koncentraci 1 mg/ml, (případně 2,5 mg/ml), 5 mg/ml, 10 mg/ml, (případně 15 mg/ml). Jako kritérium pro zhodnocení testu jako pozitivního byl brán pokles parametru FEV₁ o 20 % vzhledem k hodnotě před testem, případně pokles o více než 30 % v parametrech MEF nebo vzestup R_{tot} o více než 70 % spolu s poklesem FEV₁ alespoň o 15 % vzhledem k hodnotám naměřeným před testem.

Specifické bronchoprovokační testy

Během specifických bronchoprovokačních testů s profesionálními alergeny byl pacient po dobu 30 min vystaven sledovaným látkám z pracoviště v podmínkách simulujících pracovní expozici podezřelému alergenu. Hodnoty ventilačních parametrů a klinický stav vyšetřovaného byl sledován před aplikací alergenu, bezprostředně po aplikaci, za 2h, 5h a 24 h po aplikaci a v případě náhle vzniklé bronchospastické odpovědi kdykoliv v průběhu 24 h následujících po aplikaci alergenu. Hodnocení testu bylo stejné jako u nespecifického bronchoprovokačního testu.

Jako pozitivní výsledek pro diagnózu profesionální rinitidy byl brán oboustranný pokles nosních průtoků o 40% a vzestup nosní rezistence o 60% při přední rhinomanometrii současně se známkami rinitidy (zvýšená sekrece, nosní blokáda, kýčání, svědění). Jako ohrožení profesionální rinitidou byly uzavřeny testy, kdy byly přítomny pouze známky rinitidy bez pozitivní rhinomanometrie.

Alergologické vyšetření

Kožní prick testy byly provedeny sadou běžných inhalačních alergenů, v případě dostupnosti i profesionálním alergenem.

Statistické zhodnocení výsledků

Statistické zhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí McNemarova testu, párového t-testu a ANOVA testu, vždy na 5% hladině významnosti.

4.4. Výsledky

A. Skupina osob se suspektním profesionálním astmatem - metoda neselektovaného sputa

Z 22 vyšetřených osob přicházejících pro suspektní alergické profesionální onemocnění dýchacích cest byla diagnóza profesionálního astmatu potvrzena u 5 osob a profesionální rinitida u 4 osob. Úspěšnost indukce sputa (vzorek bez nadměrné kontaminace squamózními buňkami z dutiny ústní) byla pro odběr před testem 60 % (13 z 22 osob), pro odběr po testu 82 % (18 z 22 osob). Zhodnocení změn v indukovaném sputu před a po testu bylo tedy možné u 3 osob s potvrzenou diagnózou profesionálního astmatu (pozitivní výsledek specifického bronchoprovokačního testu), u 3 osob s profesionální rinitidou a u 7 osob, které na testovanou látku nezareagovaly ani bronchospasticky, ani se u nich neprojevíly známky rinitidy. Při srovnání průměrných hodnot buněčných parametrů indukovaného sputa před a po specifickém bronchoprovokačním testu (eozinofily, neutrofilů, makrofágy, lymfocyty) nebyly shledány statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$. U osob s pozitivním výsledkem bronchoprovokačního testu s alergenem (dg. profesionálního astmatu) nebylo zjištěno zvýšení počtu eozinofilů ve sputu po testu. U jedné z osob s diagnostikovanou profesionální rinitidou byl zaznamenán nárůst eozinofilů z 0,7 na 2,8 %.

Korelace mezi eozinofily ve sputu před testem a parametry FEV_1 , IgE, eozinofily v krvi nebyla nalezena.

Statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) v provedených vyšetřeních mezi celou skupinou se suspektním profesionálním astmatem a kontrolami byly zjištěny pro parametry IgE, ECP a nespecifický bronchoprovokační test. Při rozdělení na podskupiny byl shledán statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi podskupinou pozitivně testovaných s konečnou diagnózou profesionálního astmatu a kontrolami pro parametry IgE a FEV_1 .

Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly na hladině $p < 0,05$ mezi skupinami osob s pozitivním a negativním výsledkem bronchoprovokačních testů v možnosti ovlivnění léčbou kortikosteroidy během testů.

B. Skupina osob s již diagnostikovaným profesionálním astmatem - metoda neselektovaného sputa

U skupiny osob s diagnózou profesionálního bronchiálního astmatu byly srovnány výsledky vyšetření provedených při prvním pobytu na klinice a v časovém odstupu průměrně 6,5 roku po vyřazení s expozice danému profesionálnímu alergenů. Pro žádné sledované parametry nebyly shledány statisticky významné rozdíly mezi prvním a posledním vyšetřením.

Výsledky vyšetření získané při posledním vyšetření byly porovnány s výsledky kontrolní skupiny. Statisticky významné ($p < 0,05$) byly u skupiny astmatiků častější pozitivní výsledky pro parametry: prick testy, ECP a nespecifický bronchoprovokační test. U podskupiny exponované vysokomolekulárním alergenům byl v současnosti významně častější ($p < 0,05$) výskyt pozitivního nespecifického bronchoprovokačního testu s histaminem.

Úspěšnost indukce sputa u astmatiků byla 65 %. Úspěšnost indukce u osob kontrolní skupiny byla 87,9 %. U všech osob kontrolní skupiny bylo normální procentuální zastoupení eozinofilů ve sputu tj. < 2 %. Při buněčném zhodnocení indukovaného sputa astmatiků bylo u 6 osob (tj. 25 % z hodnocených vzorků) nalezeno zvýšené procentuální zastoupení eozinofilů (normální nález < 2 %). Pět osob bylo v minulosti exponováno vysokomolekulárním profesionálním alergenům, jedna osoba byla exponována nízkomolekulárním profesionálnímu alergenů. Průměrná hodnota zvýšeného procentuálního zastoupení eozinofilů u těchto osob byla 3,5 %. Jedna osoba ze skupiny se zvýšenými eozinofily ve sputu nepozorovala subjektivně astmatické obtíže. Ostatní sledované objektivní parametry byly u této osoby také zvýšené (nespecifická bronchiální hyperreaktivita, prick testy, ECP, eozinofily v krvi procentuálně). Nález zvýšených eozinofilů ve sputu byl statisticky významně vyšší ($p < 0,05$) u skupiny osob exponovaných vysokomolekulárním alergenům. Korelace mezi eozinofily ve sputu a současnými parametry FEV₁, IgE nebo eozinofily v periferní krvi

nebyla nalezena. Taktéž korelace mezi neutrofilů ve sputu a FEV₁ nebo FVC nebyla nalezena.

C. Skupina osob se suspektním profesionálním astmatem - metoda selektovaného sputa

U sedmi osob (z celkových 23 vyšetřených) byly výsledky bronchoprovokačních testů pozitivní - bylo potvrzeno profesionální bronchiální astma. Při analýze sputa bylo zjištěno statisticky významné zvýšení počtu eozinofilů ve sputu po pozitivním testu ($p=0,03$). U tří osob z pěti testovaných bez kortikosteroidů byl nárůst eozinofilů průměrně o 3,7 %, u jedné osoby z pěti byl nárůst hraniční jen 1,7 %. U všech těchto osob byla bronchospastická reakce na alergen bezprostředně po aplikaci alergenu (u dvou osob dokonce opakovaná reakce i po 5 hodinách - duální reakce). U dvou osob s bronchospastickou reakcí po testovaném alergenu, které užívaly během testování inhalační kortikosteroidy, nebyl zaznamenán významný nárůst eozinofilů. U dvou osob exponovaných polyuretanům (obsahující izokyanáty) bylo zaznamenáno po testu zvýšení počtu neutrofilů ve sputu (o 20,3 % a 33,2 %). V celé skupině však zvýšení neutrofilů nebylo statisticky významné.

Čtyři osoby měly klinické příznaky rinitidy během či po provedeném specifickém bronchoprovokačním testu. U dvou osob bylo pozitivní i měření přední rhinomanometrií, a proto u nich byla stanovena závěrečná diagnóza profesionální rinitidy, u dvou osob s negativní rhinomanometrií bylo přiznáno ohrožení profesionální rinitidou. U osob s projevy alergické rinitidy po testu nebyl zaznamenán významný nárůst eozinofilů po testu.

Negativní výsledky bronchoprovokačních testů (z hlediska bronchomotoriky) byly u 12 osob. U dvou osob byl zaznamenán vyšší nárůst eozinofilů než o 2 % po ukončení testů (o 2,3 % a 4 %), i přes nevýznamné změny ve ventilačních parametrech. Změny v buněčném zastoupení v celé skupině byly statisticky nevýznamné (na hladině $p<0,05$).

4.5. Diskuze

Profesionální astma po vyřazení z expozice alergenů - metoda neselektovaného sputa

Při vyšetření skupiny osob s již přiznaným profesionálním astmatem nás zajímalo, zda došlo k vymizení příznaků astmatu po vyřazení z působení prokázaného profesionálního alergenů. V ideálním případě by se po zamezení kontaktu s alergenní noxou vyvolávající prokazatelně astmatické obtíže pacientů měly obtíže postupně zlepšovat či vymizet. V naší skupině pouze pět osob z 37 vyšetřených nevnímalo subjektivně astmatické obtíže po letech vyřazení z expozice profesionálnímu alergenů a bylo bez léčby. Oproti zdravým osobám byly u astmatiků i po vyřazení z expozice alergenů významně častější pozitivní kožní prick testy, ECP a nespecifický bronchoprovokačním test. Eozinofilní zánět ve sputu byl zjištěn u 25 % ze zhodnocených vzorků (u 5 osob s příznaky astmatu a jedné osoby subjektivně bez příznaků astmatu). Ve studii Maghniho (2004) bylo u 84 osob vyřazených z expozice profesionálnímu alergenů prokázáno u podskupiny bez zlepšení zdravotního stavu významně vyšší zastoupení eozinofilů a neutrofilů ve sputu než ve skupině se zlepšením. V naší skupině osob byl eozinofilní zánět významně častěji přítomný u osob v minulosti exponovaných vysokomolekulárním alergenům než alergenům nízkomolekulárním. S tímto nálezem korespondoval i statisticky významně vyšší výskyt pozitivních výsledků nespecifického bronchoprovokačního testu u osob exponovaných vysokomolekulárním profesionálním alergenům. Důvodem může být možnost expozice vysokomolekulárním alergenům, které jsou pro některé osoby profesionálním alergenem, ale nevyhnou se jim ani po opuštění svého pracoviště.

Změny v indukovaném sputu během specifických bronchoprovokačních testů s alergenů - metoda neselektovaného i selektovaného sputa

Buněčné změny v indukovaném sputu byly sledovány během specifických bronchoprovokačních testů za použití metody neselektovaného i selektovaného sputa. Postupné zavedení obou metod nám umožnilo objektivněji zhodnotit jejich výhody a nevýhody. Vzorky zpracované metodou neselektovaného sputa měly

vyšší zastoupení skvamózních buněk, což u některých vzorků vedlo k tomu, že vzorky nebylo možno spolehlivě hodnotit a výsledky z některých odběrů chyběly. Nevýhodou byla velká spotřeba roztoku k homogenizaci, protože celkový objem vzorku byl větší. Metoda zpracování selektovaného sputa se ukázala i přes větší náročnost zpracování výhodnější. Bylo nutné přesně vyselektovat části sputa z celého vzorku, což vyžadovalo zkušenost a jistou zručnost. Objem roztoku použitý k homogenizaci byl nižší (z důvodu menšího množství vzorku) a tím byla výsledně tato metoda levnější. Úplné kontaminaci skvamózními buňkami nešlo zabránit, ale tato kontaminace byla daleko menší než ve vzorcích sputa neselektovaného. Hustota buněk v zorném poli byla větší, a proto i mikroskopický odečet vzorků trval kratší dobu.

Při analýze neselektovaného sputa se významný nárůst eozinofilů po pozitivním bronchoprovokačním testu nepotvrdil (za významný se považuje alespoň nárůst o 2 %) (*Girard 2004*). Zaznamenáno bylo pouze zvýšení počtu eozinofilů u jedné osoby s konečnou diagnózou profesionální rinitidy (nárůst o 2,1 % po testu).

Při analýze selektovaného sputa bylo zjištěno statisticky významné zvýšení počtu eozinofilů ve sputu po pozitivním testu. Významné zvýšení počtu eozinofilů nebylo zjištěno u tří osob (dvě léčeny kortikosteroidy) s pozitivním testem. Zvýšení počtu eozinofilů po pozitivním bronchoprovokačním testu popsala Lemiere (*2001*) a Obata (*1999*). Lemiere (*1999*) také sledovala změny ve sputu u osob v práci a během periody mimo práci. Zjistila, že ve skupině osob s profesionálním astmatem dochází při vyřazení z pracovního prostředí s působícím alergenem k poklesu počtu eozinofilů ve sputu.

U dvou osob exponovaných polyuretanům (obsahující izokyanáty) bylo zaznamenáno po testu výrazné zvýšení počtu neutrofilů ve sputu. K podobným závěrům došla i Lemiere (*2002*), která také popsala u některých osob po expozici izokyanátům zvýšení počtu neutrofilů ve sputu.

V celé skupině osob s negativním výsledkem bronchoprovokačních testů nebyly změny v buněčných parametrech významné. U dvou osob však byl zaznamenán vyšší nárůst eozinofilů než 2 % po ukončení testů (o 2,3 % a 4 %) i přes nevýznamné změny ve ventilačních parametrech. Lemiere (*2000*), která sledovala osoby

s potvrzeným profesionálním astmatem, zjistila při sledování změn ve sputu po aplikaci postupně se zvyšujících koncentrací alergenu nárůst eozinofilů den před významným poklesem ventilačních parametrů. U dvou osob z naší skupiny, kde byl zjištěn nárůst eozinofilů po testování, by možná k podobné reakci mohlo dojít při opakované expozici alergenu. Problémem je, že téměř pokaždé je podezříváných alergenů z pracoviště více, takže se nemusí podařit vytipovat jeden alergen, který by bylo možné opakovaně testovat a testuje se více alergenů, což je časově náročné a každý alergen je testován jen jednou. Změny v indukovaném sputu během testu v laboratoři by tak mohly přispět k rozhodnutí o dalším testování.

4.6. Závěr

Vyšetření indukovaného sputa potvrdilo jeho význam pro diagnostiku alergického zánětu v dýchacích cestách. Výsledky potvrdily, že prognóza profesionálního astmatu s přecitlivělostí na nízkomolekulární látky je příznivější než u alergenů vysokomolekulárních, které se často vyskytují i v mimopracovním prostředí. Nález eozinofilního zánětu ve sputu pacientů podporuje diagnózu bronchiálního astmatu a kromě toho ukazuje na perzistenci či horší kontrolu onemocnění (*Klusáčková 2003*). U osob s již potvrzeným profesionálním astmatem po vyřazení z expozice profesionálního alergenu, které jsou již bez subjektivních obtíží, nález eozinofilů v indukovaném sputu umožňuje sledovat, zda alergický zánět skutečně po eliminaci alergenu ustoupil.

Při analýze neselektovaného sputa nebylo prokázáno zvýšení počtu eozinofilů po pozitivním bronchoprovokačním testu. Oproti tomu při použití metody selektovaného sputa byly změny procentuálním zastoupení eozinofilů po pozitivním testu významné. Zvýšení počtu eozinofilů bylo zjištěno u osob, u nichž byl specifický bronchoprovokační test pozitivní s časnou (případně duální) reakcí. Zvýšení procenta eozinofilů bylo zaznamenáno i u některých osob s negativním bronchoprovokačním testem. Vyšetření sputa by tedy mohlo být citlivějším markerem a mohlo by pomoci vymezit okruh osob, u nichž by se pozitivní bronchospastická reakce na alergen pravděpodobně objevila po delší či opakované expozici.

5 Souhrn

Časná diagnostika profesionálního astmatu je důležitá především z hlediska prognózy onemocnění. Za použití dosud dostupných diagnostických metod je někdy obtížné onemocnění prokázat. Proto je důležité hledání metod nových.

Analýza kondenzátu vydechaného vzduchu (KVV) umožňuje pomocí kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií detekovat jednotlivé cysteinylové leukotrieny (LT) - (LTC_4 , LTD_4 a LTE_4), LTB_4 a 8-izoprostan. Při srovnání astmatiků a zdravých osob byl LTC_4 jako jediný ze sledovaných KVV markerů významně vyšší ve skupině astmatiků (i přes léčbu kortikosteroidy). Tohle zjištění by mohlo být přínosné pro jeho další diagnostické využití. Sledování 24-hodinové variability KVV parametrů u osob vyšetřovaných pro podezření na profesionální astma ukázalo poměrně velkou intraindividuální i interindividuální variabilitu KVV parametrů. Je tedy zřejmé, že u astmatiků mohou být údaje z jednoho denního měření (často uváděné v odborných člancích) zavádějící a vzorky KVV by měly být odebírány vždy u všech sledovaných osob ve stejnou dobu. Během negativních bronchoprovokačních testů nebyly nalezeny významné změny v koncentracích KVV parametrů. Zhodnocení pozitivních testů bylo omezeno na malý počet osob. U pěti osob z šesti bylo však zjištěno zvýšení LTC_4 po aplikaci alergenu.

Vyšetření indukovaného sputa potvrdilo jeho význam pro diagnostiku alergického zánětu v dýchacích cestách a tedy zejména bronchiálního astmatu. Při použití metody neselektovaného sputa nebylo neprokázáno zvýšení eozinofilů po pozitivním testu. Oproti tomu při použití metody selektovaného sputa bylo zvýšení počtu eozinofilů po pozitivním testu významné. U dvou osob s negativním bronchoprovokačním testem bylo také prokázáno zvýšení (o více než 2 %) eozinofilů po testu. Vyšetření sputa by tedy mohlo pomoci vymezit okruh osob, které by mohly zareagovat pozitivní bronchospastickou reakcí na alergen po delší či opakované expozici.

U osob s již diagnostikovaným profesionálním astmatem byl v 25 % analyzovaných vzorků nalezen zvýšený počet eozinofilů ve sputu. U těchto osob i po vyřazení z expozice profesionálního alergenu lze tedy touto metodou potvrdit eozinofilní zánět v dýchacích cestách a tím přetrvávání onemocnění.

6 Summary

Early diagnosis of occupational asthma is important especially for the prognosis of this disease. The confirmation of the diagnosis of occupational asthma is sometimes difficult using diagnostic methods available nowadays. That is why searching new methods is very important.

Analysis of exhaled breath condensate (EBC) by liquid chromatography combined with mass spectrometry enables the separate detection of cysteinyl leukotrienes (LT) - LTC₄, LTD₄, LTE₄; LTB₄ and 8-isoprostane. If patients with occupational asthma and controls were compared, only LTC₄ was significantly higher among all EBC parameters studied in asthmatics (despite corticosteroid treatment). This marker could be used in the future diagnostics. Monitoring of 24-hours variability of EBC parameters in patients, in whom occupational asthma is suspected, showed relatively high intraindividual and interindividual variation. It is evident therefore, that if only one daily measurement in asthmatics would be possible (which is common in articles of several authors), it should be collected in the same period of day in all persons. In negative bronchoprovocation tests significant changes of EBC parameters were not found. The evaluation of positive bronchoprovocation tests was limited by small number of patients, however in five persons from six, the elevation of LTC₄ after application of the allergen was seen.

Analysis of the induced sputum confirmed its importance for the diagnosis of allergic inflammation in the respiratory tract and especially of bronchial asthma. If non-selected sputum method was used, the elevation of eosinophils after the positive bronchoprovocation test was not found. On the other hand, using the selected sputum method, a significant average elevation of eosinophils was found after the positive bronchoprovocation test. In two patients the elevation of eosinophils (higher than 2 %) was found after the negative bronchoprovocation test too. Analysis of induced sputum could represent a more sensitive marker that might indicate subjects, in whom a positive reaction could develop after a prolonged or repeated exposure to the allergen.

In patients with previously diagnosed occupational asthma, the elevated eosinophils in sputum were found in 25 % of analysed

samples. In these asthma patients, in spite of 6.5 years withdrawal from the occupational allergen the eosinophilic inflammation in the airways was proved by this method and confirmed the persistence of the disease.

7 Literatura

1. Anczak A, Montuschi P, Kharitonov S, Gorski P, Barnes PJ. Increased exhaled cysteinyl-leukotrienes and 8-isoprostane in aspirin-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(3):301-306.
2. Asano K, Lilly CM, O'Donnell WJ, Izrael E, Fischer A, Ransil BJ, Drazen JM. Diurnal variation of urinary leukotriene E4 and histamine excretion rates in normal subjects and patients with mild-to-moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96 (5): 643-651.
3. Balmes JR, Scannell CH. Occupational Lung Diseases. In: LaDou J. Occupational and Environmental Medicine. Second Edition. McGraw-Hill, Appleton and Lange, USA, 1997. s.305-327.
4. Baraldi E, Carraro S, Alinovi R, Pesci A, Ghiro L, Bodini A, Piacentini G, Zacchello F, Zanconato S. Cysteinyl leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbations. *Thorax* 2003;58:505-509.
5. Barnes PJ. Exhaled Breath Condensate: A New Approach to Monitoring Lung Inflammation. In Montuschi P: New Perspectives in monitoring lung inflammation: Analysis of Exhaled Breath Condensate, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, United States of America, 2005. s.1-10.
6. Bellia V, Bonanno A, Cibella F, Cuttitta G, Mirabella A, Profita M, Vignola AM, Bonsignore G. Urinary leukotriene E4 in the assessment of nocturnal asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97(3):735-741.
7. Čáp P, Pehal F, Petrů V, Musil J. Kondenzát vydechovaného vzduchu a možnosti jeho vyšetření. *Alergie* 2001;4:275- 280.
8. Drazen J. Leukotrienes as mediators of Airway Obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:193-200.
9. Efthimiadis A, Hamid Q. Analysis of sputum cells: cytology, immunocytochemistry and in situ hybridization. In Djukanovic

- R, Sterk PJ: An Atlas of induced sputum, The Parthenon Publishing Group, a CRC Press Company, London, UK, 2004. s. 21-34.
10. Girard F, Chaboillez S, Cartier A, Côté J, Hargreave FE, Labrecque M, Malo JL, Tarlo SM, Lemiere C. An Effective Strategy for Diagnosing of Occupational asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:845-850.
 11. Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Levels of cysteinyl leukotrienes are increased in exhaled breath condensate in asthmatic patients during late phase reaction after allergen challenge. [Abstract A24, 3699], ERS 10th Annual Conference, Florence, 30th August-3rd September 2000.(a)
 12. Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1273-1276.(b)
 13. Chlumský J, Pokorná H. Buněčné parametry indukovaného sputa jako neinvazivní znak zánětu dýchacích cest u pacientů s astmatem: absence korelace mezi maximálním poklesem FEV₁ a PEF po inhalaci hypertonického roztoku NaCl a zastoupením eosinofilních leukocytů v indukovaném sputu. *Alergie* 2001;2:108-111.
 14. Jarayjam L, Parameswaran K, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts: their usefulness in clinical practice. *Eur Respir J* 2000;16(1):150-158.
 15. Klusáčková P, Pelcová D, Chvalová M. Využití metody indukovaného sputa pro diagnostiku a sledování vývoje profesionálního bronchiálního astmatu. Závěrečná zpráva řešení grantu GAUK 13/2003/C/1.LF.
 16. Kumlin M, Dahlen B, Bjorck T, Zetterstrom O, Granstrom E, Dahlen SE. Urinary excretion of leukotriene E4 and 11-dehydro-thromboxane B2 in response to bronchial provocations with allergen, aspirin, leukotriene D4, and histamin in asthmatics. *Am Rev Respir Dis* 1992;146(1):96-103.
 17. Kurokawa K, Tanaka H, Tanaka S, Abe S. Circadian characteristics of urinary leukotriene E4 in healthy subjects and nocturnal asthmatic patients. *Chest* 2001;120:1822-1828.
 18. Lemiere C, Pizzichini MMM, Balkissoon R, Clelland L, Eftimiadis A, O'Shaghnessy D, Dolovich J, Hargreave FE.

- Diagnosing of Occupational asthma: use of induced sputum. *Eur Respir J* 1999;13:482-488.
19. Lemiere C, Chaboillez S, Trudeau C, Taha R, Maghni K, Martin JG, Hamid Q. Characterization of airway inflammation after repeated exposures to occupational agents. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106(6):1163-1170.
 20. Lemiere C, Chaboillez S, Malo JL, Cartier A. Changes in sputum cell counts after exposure to occupational agents: What do they mean? *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(6):1063-1068.
 21. Lemiere C, Romeo P, Chaboillez S, Tremblay C, Malo JL. Airway inflammation and functional changes after exposure to different concentrations of isocyanates. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110(4): 641-646.
 22. Macfarlane AJ, Dworski R, Sheller JR, Pavord ID, Kay AB. Sputum cysteinyl leukotrienes increase 24 hours after allergen inhalation in atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1553-1558.
 23. Maghni K, Lemiere C, Ghezzi H, Yuquan W, Malo JL. Airway inflammation after cessation of exposure to agents causing occupational asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:367-372.
 24. Mondino C, Ciabattini G, Koch P, Pistelli R, Trove A, Barnes PJ, Montuschi P. Effects of inhaled corticosteroids on exhaled leukotrienes and prostanooids in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(4):761-767.
 25. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax* 2003;58:585-588.
 26. Novotná B, Brhel P. Profesionální bronchiální astma. *Alergie* 2000;2(2):120-126.
 27. Obata H, Dittrick M, Chan H, Chan-Yeung M. Sputum eosinophils and exhaled nitric oxide during late asthmatic reaction in patients with western red cedar asthma. *Eur Respir J* 1999;13(3):489-495.
 28. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung Volumes and Forced Ventilatory Flows. Report Working Party. Standardization of Lung Function Tests. European Community for Steel and Coal. Official

- Statement of the European Respiratory Society. Eur Respir J 1993;6(suppl 16):5-40.
29. Smith CM, Christie PE, Hawksworth RJ, Thien F, Lee TH. Urinary leukotriene E4 levels after allergen and exercise challenge in bronchial asthma. Am Rev Respir Dis 1991;144(6):1411-1413.
 30. Taylor GW, Taylor I, Black P, Maltby NH, Turner N, Fuller RW, Dollery CT. Urinary leukotriene E4 after antigen challenge and in acute asthma and allergic rhinitis. Lancet 1989;1(8638):584-588.

8 Seznam odborných článků, které jsou ve vztahu k disertaci

S IF- první autor:

1. **Klusackova P**, Lebedova J, Pelcova D, Salandova J, Senholdova Z, Navratil T. Occupational asthma and rhinitis in workers from a lasamide production line. Scand J Work Environ Health 2007;33(1):74-78. **IF(2006)=1,820.**
2. **Klusackova P**, Pelcova D, Levedova DJ, Mareckova H, Brabec M. Occupational asthma after withdrawal from the occupational allergen exposure. Industrial Health 2006;44:629-638. **IF(2006)= 0,911.**
3. **Klusackova P**, Lebedova J, Kacer P, Kuzma M, Brabec M, Pelcova D, Fenclova Z, Navratil T. Leukotrienes and 8-isoprostane in exhaled breath condensate in bronchoprovocation tests with occupational allergens. Prostagl. Leukotr. and Essent. Fatty Acids (přijato k tisku). **IF(2006)= 2,261.**

S IF- spoluautor:

1. Syslová K, Kačer P, Kuzma M, **Klusáčková P**, Fenclová Z, Lebedová J, Pelclová D. Determination of 8-*iso*-prostaglandin F_{2α} in exhaled breath condensate using combination of immunoseparation and LC-ESI-MS/MS. Journal of Chromatography B, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.02.019>, (přijato k tisku) **IF(2006)=2,647**

Bez IF- první autor:

1. **Klusackova P**, Lebedova J, Pelcova D, Chvalova M, Mareckova H, Brabec M. Změny buněčných parametrů v indukovaném sputu během specifických bronchoprovokačních testů s profesionálními alergeny. České pracov. lék. 2005;6 (2):83-88.
2. **Janů P**, Pelclová D, Lebedová J. Možnosti využití indukovaného sputa pro diagnostiku a kontrolu profesionálního bronchiálního astmatu. České pracov. lék. 2003;4(3):127-130.
3. **Klusáčková P**, Pelclová D, Chvalová M. Využití metody indukovaného sputa pro diagnostiku a sledování vývoje profesionálního bronchiálního astmatu. Závěrečná zpráva řešení grantu GAUK 13/2003/C/1.LF.

Bez IF- spoluautor:

1. Lebedová J, **Klusáčková P**, Kačer P, Kuzma M, Brabec M, Pelclová D, Fenclová D. Sledování zánětlivých markerů v kondenzátu vydechovaného vzduchu u pacientů s profesionálním asthma bronchiale. České pracov. lék. 2007;8 (4): 161-164.
2. Lebedová J, Fenclová Z, **Klusáčková P**, Dlouhá B, Navrátil T, Hurťová L. Úloha praktického lékaře a odborníka pro nemoci z povolání při diagnostice profesního bronchiálního astmatu a profesní rinitidy. Prakt. Léč. 2008;88(1):42-46.

9 Seznam článků bez vztahu k disertaci- spoluautor:

S IF- spoluautor

1. Bartůňková J, Pelclová D, Fenclová Z, Šedivá A, Lebedová J, Tesař V, Hladíková M, **Klusáčková P**. Exposure to Silica and Risk of ANCA-Associated Vasculitis. Am J Ind Med 2006;49(7):569-576. **IF(2006)=1,433**
2. Pelclová D, Fenclová Z, Kačer P, Navrátil T, Kuzma M, Lebedová J, **Klusáčková P**. 8-isoprostane and leukotrienes in exhaled breath condensate in Czech subjects with

silicosis. *Industrial Health* 2007;45(6):766-774.

IF(2006)=0,911

3. Pelclová D, Fenclová Z, Kačer P, Kuzma M, Navrátil T, Lebedová J, **Klusáčková P**. Arachidonic acid derivatives in the exhaled breath condensate in pneumoconioses and their correlation with individual factors. *Chemické listy* 2007; 101(14):144-146. **IF(2006)=0,431**

Bez IF- spoluautor

1. Pelclová D, Fenclová Z, Kačer P, Kuzma M, Lebedová J, **Klusáčková P**, Navrátil T. Pneumokoniózy a vyšetření kondenzátu vydechovaného vzduchu. *České pracov. lék.* 2006;7(3):125-127.
2. Fenclová Z, Urban P, Pelclová D, Lebedová J, Lukáš E, Navrátil T, **Klusáčková P**, Žák J. Profesionální onemocnění hlášená v České republice v roce 2003. *České pracov. lék.* 2004;2:60-66.