UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Dizertační práce

MOŽNOSTI ČASNÉ DIAGNOSTIKY PROFESIONÁLNÍHO BRONCHIÁLNÍHO ASTMATU

MUDr. Pavlína Klusáčková (roz. Janů)

Doktorský studijní program biomedicíny

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Školitel: Prof. MUDr. Daniela Pelclová, CSc.

Školitel konzultant: MUDr. Jindřiška Lebedová

Klinika nemocí z povolání 1. LF UK a VFN Praha
Na Bojišti 1, Praha 2, 120 00

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce prof. MUDr. Daniele Pelclové, CSc., přednostce Kliniky nemocí z povolání 1. LF UK v Praze, za to, že mi umožnila na klinice provádět výzkum týkající se dizertační práce a za cenné rady a podnětné připomínky při vypracování této disertační práce. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce MUDr. Jindřišce Lebedové, vedoucí Laboratoře funkční diagnostiky na Klinice nemocí z povolání 1. LF UK v Praze, a všem spolupracovníkům z Laboratoře funkční diagnostiky, kteří mi po celou dobu studia a výzkumu pomáhali. Ing. Marku Brabcovi, PhD. z Ústavu informatiky Akademie věd ČR a Státního zdravotního ústavu a Dr. Ing. Tomáši Navrátilovi z Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského Akademie věd ČR bych chtěla poděkovat za pomoc při statistickém zpracování výsledků výzkumu. Doc. Ing. Petru Kačerovi, PhD. z Vysoké školy chemicko-technologické v Praze a Ing. Marku Kuzmovi, PhD. z Mikrobiologického ústavu Akademie věd ČR a celému jejich kolektivu bych chtěla poděkovat za pomoc při chemických analýzách.

Děkuji také své rodině za podporu a trpělivost během studia.

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury.

V Praze dne 1.4.2008 MUDr. Pavlína Klusáčková

OBSAH

1 **Seznam zkratek**

2 **Úvod**

3 **Profesionální bronchiální astma- definice, současná diagnostika**
- 3.1. Definice profesionálního astmatu
- 3.2. Rozdělení profesionálního astmatu
- 3.3. Patologická anatomie bronchiálního astmatu
- 3.4. Diagnostika profesionálního astmatu
- 3.5. Prevence profesionálního astmatu

4 **Diagnostické metody v oblasti profesionálního bronchiálního astmatu**
- 4.1. Kondenzát vydechovaného vzduchu (KVV)
  - 4.1.1. *Úvod a současný stav řešeného problému*
  - 4.1.2. *Cíle projektu*
  - 4.1.3. *Provedení projektu*
    - 4.1.3.1. *Charakteristika sledovaných osob*
    - 4.1.3.2. *Metodika použitých vyšetření*
  - 4.1.4. *Výsledky*
  - 4.1.5. *Diskuze*
  - 4.1.6. *Závěr*
  - 4.1.7.*Využití poznatků pro praxi*
- 4.2. Indukované sputum
  - 4.2.1. *Úvod a současný stav řešeného problému*
  - 4.2.2. *Cíle projektu*
  - 4.2.3. *Provedení projektu*
    - 4.2.3.1. *Metoda neselektovaného sputa*
      - 4.2.3.1.1. *Charakteristika sledovaných osob*
      - 4.2.3.1.2. *Metodika použitých vyšetření*
      - 4.2.3.1.3.*Výsledky*
    - 4.2.3.2. *Metoda selektovaného sputa*
      - 4.2.3.2.1. *Charakteristika sledovaných osob*
      - 4.2.3.2.2. *Metodika použitých vyšetření*
      - 4.2.3.2.3.*Výsledky*
  - 4.2.4. *Diskuze*
  - 4.2.5. *Závěr*
  - 4.2.6. *Využití poznatků pro praxi*

5 **Souhrn**

6 **Summary**

7 **Literatura**

8 **Přílohy**- nejdůležitější publikace týkající se dizertace

1 SEZNAM ZKRATEK

% NH	procento náležité hodnoty
AEX	plocha pod výdechovou částí křivky průtok-objem
cys-LT	cysteinylové leukotrieny
EIA	enzymová imunoanalýza
ECP	eosinofilní kationický protein
FEV_1	objem vzduchu vydechnutý během 1. sekundy usilovného výdechu
FVC	usilovná vitální kapacita
GC/MS	plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií
HMW	vysokomolekulární
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
KVV	kondenzát vydechovaného vzduchu
LC/MS	kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií
LMW	nízkomolekulární
LT	leukotrien
MEF	maximální výdechový průtok na různých úrovních FVC (25%, 50%, 75%)
PEF	vrcholový výdechový průtok
PC_{20}	koncentrace látky, která způsobí pokles FEV_1 o 20 %
R_{tot}	odpor dýchacích cest
SD	směrodatná odchylka
TLC	totální plicní kapacita

2 ÚVOD

Profesionální bronchiální astma je jednou z nejčastějších profesionálních chorob dýchacího systému. Jeho vyvolávající příčinou je látka (alergen), která se nachází na pracovišti postižené osoby. Diagnostika profesionálního astmatu je ztížena o fakt, že případné uznání profesionality onemocnění má významný vliv na další pracovní zařazení pacienta a většina osob musí svého původního povolání zcela zanechat. Z tohoto důvodu také pacienti své obtíže nezřídka disimulují a k lékaři se dostávají, až když je choroba v pokročilém stádiu.

Z dlouholetých sledování dalšího vývoje profesionálního astmatu po eliminaci z vlivu prokázaného profesionálního alergenu vyplývá, že u většiny pacientů nedochází k úplnému vymizení astmatu a onemocnění u nich přetrvává (*Tarlo 1998, Lombardo 2000, Klusáčková 2006*). 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 (*Tarlo 2000*). V prvé řadě se jedná o důslednější sledování osob potenciálně více vnímavých k vývoji astmatu (atopici) zařazených do provozů s ofenzivními alergeny. 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.

3 PROFESIONÁLNÍ BRONCHIÁLNÍ ASTMA (definice, současná diagnostika)

3.1. Definice profesionálního bronchiálního astmatu

Profesionální bronchiální astma je stejně jako neprofesionální bronchiální astma definováno jako chronické zánětlivé onemocnění, které je spojeno s bronchiální hyperreaktivitou. Vede k opakovaným epizodám pískotů, dušnosti, tísně na hrudi a kašle objevujícím se převážně v noci nebo v časných ranních hodinách. Tyto epizody jsou spojeny s bronchiální obstrukcí, která je většinou reverzibilní buď spontánně nebo pomocí léků (*GINA Report 2007*). S bronchiálním astmatem je velmi úzce spojena alergická rýma. Nosní i bronchiální sliznice mají společné rysy a alergická rýma se často vyskytuje společně s bronchiálním astmatem. Vzhledem k tomu byl zaveden termín „společného onemocnění dýchacích cest“ - „one airway one disease“. Přítomnost alergické rýmy často způsobuje exacerbace astmatu, zvyšuje četnost astmatických záchvatů a hospitalizací z důvodu zhoršení astmatu (*ARIA Report 2007*). Proto je i diagnostika a sledování pacientů s profesionální alergickou rýmou spojena s diagnostikou pacientů s profesionálním astmatem. Z tohoto důvodu jsou v naší práci zařazeny i výsledky pacientů s alergickou rinitidou, pokud byla diagnostikována.

Dle platné legislativy je v oblasti pracovního lékařství definováno onemocnění profesionálním bronchiálním astmatem a ohrožení profesionálním bronchiálním astmatem. Profesionální bronchiální astma, případně profesionální rinitida, jsou uvedeny v příloze k nařízení vlády č. 290/1995 Sb., kterou se stanoví seznam nemocí z povolání, v kapitole III, položce 10 (astma bronchiale a alergická onemocnění horních cest dýchacích) jako nemoci, které vznikají při práci, u níž je prokázána expozice prachu nebo plynným látkám s alergizujícími nebo iritujícími účinky. Ohrožení nemocí z povolání (např. profesionálním astmatem nebo profesionální rinitidou) je definováno v zákoníku práce a rozumí je jím takové změny zdravotního stavu, které vznikly při výkonu práce nepříznivým působením stejných podmínek, které vyvolávají nemoc z povolání. Nedosahují však takového stupně poškození, které lze posoudit jako nemoc z povolání a další práce za stejných podmínek by vedla ke vzniku nemoci z povolání (zákon č. 262/2006, *Fenclová 2006*).

Mezi nemoci z povolání bylo profesionální bronchiální astma v naší republice zařazeno vyhláškou č. 129/1975 Sb., která vstoupila v platnost 1. ledna 1976 (*Brhel 2001*). Předpokládá se, že profesionální astma představuje 5-15 % nově diagnostikovaných případů astmatu (*Blane 1996, Bernstein 2001*).

V posledních pěti letech nedochází v České republice k významnějším změnám v počtu hlášených onemocnění profesionálním astmatem (tabulka č. 1), ale je otázkou, jaký počet onemocnění zůstává neodhalen. V roce 2006 bylo (podobně jako v předchozích letech) nejvíce onemocnění profesionálním bronchiálním astmatem a profesionální alergickou rinitidou uznáno u pracovníků v potravinářství (58,9 %), nejčastěji u pekařů-cukrářů, na druhém místě v zemědělství (14,4 %), především u ošetřovatelů hospodářských zvířat. Profesionální astma a rinitida byly v 38,9 % vyvolány pouze jedním alergenem, zbývající část byla způsobena kombinací několika alergenů. Nejčastějším alergenem byla mouka (43x vyvolavatelem bronchiálního astmatu, 45x vyvolavatelem alergické rinitidy), ostatní noxy byly zastoupeny méně (*Fenclová 2007*). Tohle spektrum vyvolávajících alergenů se v posledních letech výrazně nemění (tabulka č. 2), ale s rozvíjejícím se pokrokem především v chemickém průmyslu se stále objevují nové alergeny (*Klusáčková 2007a*).

Tab. 1. Počet onemocnění profesionálním bronchiálním astmatem, profesionální rinitidou a kombinace obou v České republice v letech 2002-2006 (*Fenclová 2003, 2004, 2005, 2006, 2007*)

Roky	**2002**	**2003**	**2004**	**2005**	**2006**
	Počet onemocnění	**Počet onemocnění**	**Počet onemocnění**	**Počet onemocnění**	**Počet onemocnění**
Profesionální astma	44	36	69	50	47
Profesionální rinitida	23	30	44	28	43
Profesionální astma s rinitidou v kombinaci	31	27	6	X	X
Celkem	**98**	**93**	**119**	**78**	**90**

Poznámka: X- společná položka se již nepoužívá

Příklady vyvolavatelů profesionálního bronchiálního astmatu

Mouka, moučný prach, obilný prach

Nejvíce alergických obtíží způsobuje mouka pšeničná a žitná. U senzibilizovaných pekařů byly nalezeny především specifické IgE protilátky proti albuminu a glutenu - zahrnující globulin, gliadin a glutenin. Další příčinou astmatu u pekařů mohou být různé kontaminující látky mouky - alergeny moučných roztočů, plísně (Aspergillus, Alternaria), amyláza, hmyz či exkrety hlodavců (*Novotná 2000, Krčmová 2004*).

Textilní vlákna

Vlna, bavlna, len, konopí, juta a syntetický textil jsou významné alergeny především ve státech s rozvinutým textilním průmyslem. V přádelnách bavlny, juty, lnu a konopí bývají popisovány febrilní reakce, které jsou spojeny s inhalací prachu obsahujícího bakteriální endotoxiny. Tyto endotoxiny jsou schopné aktivovat komplementový systém. Bronchiální astma s intermitentními febriliemi je nazýváno bysinóza (*Novotná 2000, Krčmová 2004*).

Dřevěný prach

Dřevěný prach způsobuje největší obtíže u pracovníků nábytkářského průmyslu a truhlářů, nejčastěji při zpracování vzácného dřeva (mahagon, sekvoj, cedr). Mezi ofenzivní alergeny patří kyselina plikatová, která je obsažená v červeném západním cedru (*Novotná 2000, Krčmová 2004*). V České republice se jako alergen uplatňuje zejména prach z dřev ovocných stromů a ostatních tvrdých dřev.

Latex

Přírodní latex se získává ze stromu Hevea brasiliensis. Obsahuje polymery cis 1,4-polyizoprenu a asi 1,5 % dalších proteinů. Latex se používá k výrobě latexových rukavic,

katetrů a tak mezi nejčastěji postižené osoby alergizací na latex patří zdravotníci (*Novotná 2000, Krčmová 2004*).

Izokyanáty

Tato skupina látek je charakteristická chemickou skupinou –N=C=O. Mezi nejvýznamnější z hlediska alergizace patří toluendiizokyanát (TDI) - bývá nejčastěji spojován s vývojem profesionálního astmatu, dále metylendifenyldiizokyanát (MDI) a hexametylendiizokyanát (HDI). Izokyanáty jsou meziproduktem při výrobě plastů na bázi polyuretanů. Vznikají polyadiční reakcí mezi izokyanáty, které reagují s aktivním vodíkem látek bohatých na hydroxylové skupiny (glykoly, polyestery). Polyuretany se používají k výrobě vstřikovacích hmot, montážních pěn, lepidel a dvousložkových barev. Mají široké použití v automobilovém, nábytkářském a textilním průmyslu. Diizokyanáty jsou také často obsaženy v nátěrových hmotách (*Novotná 2000, Krčmová 2004*).

Tab. 2. Zastoupení nox vyvolávajících profesionální bronchiální astma a profesionální rinitidu v České republice v letech 2004-2006 (*Fenclová 2005, 2006, 2007*)

Noxa	**Počet v roce 2004**	**Počet v roce 2005**	**Počet v roce 2006**
Mouka	48	33	88
Dřevěný prach a jiné rostlinné alergeny	18	12	6
Živočišné alergeny	13	8	6
Textilní prach	12	2	3
Potraviny a potravinové přípravky (kromě mouky)	8	4	15
Lepidla a adheziva	7	3	3
Pryskyřice	7	2	0
Dezinfekční prostředky	7	4	0
Ostatní chemické látky	7	1	6
Krmné směsi	7	2	12
Organická rozpouštědla	6	2	0
Izokyanáty	4	2	3
Organická barviva	4	4	5
Jiné noxy	4	9	6
Kovy	3	2	0
Kalafuna a spalné produkty pájení	3	1	1
Jiné biologické faktory	2	2	2
Čisticí a kosmetické přípravky	1	1	0
Ropné výrobky	1	2	10
Pryž a gumárenské chemikálie	1	0	0
Latex	1	2	0
Léky	0	2	0
Roztoči	0	0	5
Počet výskytu jednotlivých nox	**164**	**100**	**176**

Poznámka: U některých osob bylo uvedeno několik nox vyvolávající onemocnění, proto se počet hlášených onemocnění a počet nox liší

3.2. Rozdělení profesionálního bronchiálního astmatu

Profesionální bronchiální astma lze rozdělit do dvou velkých skupin:

1/ imunologické (senzibilizací navozené astma)

2/ neimunologické (iritační, vyvolané působením látek s iritačním účinkem) (*Lebedová 2006*)

1/ Imunologické profesionální bronchiální astma

Imunologické profesionální astma vzniká po určité době latence po expozici senzibilizujícímu alergenu. Imunologické astma zahrnuje IgE imunologickou odpověď I. typu, ale i odpověď III. a IV. typu.

I. typ imunitní odpovědi

U IgE zprostředkované odpovědi je prvním krokem aktivace T lymfocytů s rozpoznáním antigenu, který je prezentován na povrchu pomocných (antigen prezentujících) buněk (makrofágy, dendritické buňky, B lymfocyty). Předpokládá se, že dendritické buňky jsou hlavními antigen prezentujícími buňkami v dýchacích cestách. Dendritické buňky s navázaným antigenem migrují do lokálních lymfatických uzlin, kde prezentují peptidové řetězce alergenů T lymfocytům. Během antigenní prezentace se lymfocyty T (CD4+) diferencují do formy Th2. Tyto buňky produkují velké množství cytokinů - interleukin (IL) 3 -3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 a IL-13. Následně dochází k nahromadění Th2 buněk v příslušné tkáni a to pomocí adhezních molekul. Th2 buňky jsou zde odpovědné za rozvoj alergického zánětu. Jejich nejvýznamnější rolí je produkce IL-4, který podporuje tvorbu protilátek IgE B lymfocyty. IgE protilátky se dostávají do oběhu a infiltrují tkáně. Váží se svými Fc-oblastmi na vysokoafinní receptor pro IgE - $Fc_{\varepsilon}RI$ na žírných buňkách a bazofilech. Při opakovaném kontaktu s inhalovaným alergenem dochází k tomu, že se tento alergen váže ke specifickým IgE na povrchu žírných buněk, bazofilů, makrofágů, eozinofilů a destiček. Reakce mezi antigenem a IgE vyústí v kaskádu dějů s výslednou aktivací zánětlivých buněk. Aktivace žírných buněk způsobuje bronchokonstrikci, která je mediována histaminem, leukotrieny (LT) C_4, D_4 a E_4, prostaglandinem D_2. Dále se uvolňuje řada cytokinů: IL-4, 5, 8, 13 a „granulocyte-macrophage colony stimulating factor“ (GM-CSF) a faktor nekrotizující nádory (TNFα). Uvolněné cytokiny jsou důležité v modulaci zánětlivé reakce a prodlužují zánětlivou odpověď po expozici alergenu. Cytokiny uvolňované T lymfocyty mají regulační roli v expresi adhezních molekul na endoteliálních a epiteliálních buňkách. T lymfocyty řídí zánětlivý proces. Představiteli buněk efektorových jsou eozinofily, žírné buňky, epiteliální buňky a neutrofily (*Mapp 1994, Novotná 2000, Panzner 2004*).

III. typ imunitní odpovědi

Tato reakce je spojena s protilátkami třídy IgG nebo IgM, které se váží na antigen a tvoří imunokomplexy. Imunokomplexy se váží na Fc-receptory fagocytů nebo aktivují komplement. Prostřednictvím jeho chemotaktických fragmentů se dostanou do místa reakce neutrofily, pomocnou úlohu hrají také žírné buňky. Aktivace komplementu a produkty aktivovaných neutrofilů (proteolytické enzymy, kyslíkové radikály, metabolity kyseliny arachidonové) vedou k zánětlivé reakci, která může skončit tkáňovou nekrózou. Typickým příkladem tohoto typu alergického imunokomplexového onemocnění je tzv. farmářská plíce,

kdy se vytváří IgG protilátky proti různým inhalačním alergenům - převážně plísňovým antigenům nebo součástem sena (*Bartůňková 1994, 2004*).

IV. typ imunitní odpovědi

T lymfocyty a makrofágy patří mezi efektorové buňky tohoto typu odpovědi. Senzibilizované T lymfocyty uvolňují po kontaktu s alergenem cytokiny a mediátory zánětu a ty pak způsobují aktivaci makrofágů (*Bartůňková 1994*). Tento typ odpovědi se dělí na 3 podtypy: IVa1, IVa2 a IVb. IVa1- je opožděným typem odpovědi mediovaný Th1 CD4+ buňkami. IVa2 je buňkami zprostředkovaný typ eozinofilní hypersenzitivní odpovědi mediovaný Th2 CD4+ buňkami. Tento typ je pravděpodobně zodpovědný za pozdní fázi alergické reakce. Také CD8+ Tc2 buňky mohou být iniciačními buňkami v některých typech IVa2 odpovědi. Typ IVb je cytotoxická odpověď mediovaná CD8+ Tc1 typem buněk (*Grammer 2001*).

Mezi alergeny, které nejčastěji způsobují časnou IgE mediovanou reakci I. typu ihned po expozici, patří mouka, živočišné, rostlinné alergeny a roztoči. Alergeny lnu, konopí, bavlny a spory plísní způsobují nejčastěji reakce III. typu s rozvojem klinických příznaků 6-8 hodin po expozici alergenu. Buňkami zprostředkovanou imunologickou odpověď IV. typu se symptomy astmatu 6-48 hodin po expozici se nejčastěji vyznačují diizokyanáty, dezinfekční prostředky a soli kovů (*Krčmová 2004*).

2/ <u>Neimunologické profesionální bronchiální astma</u>

Jedná se o tzv. iritační astma, které vzniká bez období latence a může se objevit po jedné či opakovaných expozicích iritačním látkám většinou ve vysokých koncentracích (plyny, kouře, dýmy, kapalné aerosoly). Tento typ onemocnění je označován termínem RADS (reactive airways dysfunction syndrome). Masivní expozice způsobuje významné epiteliální poškození spojené s aktivací non-adrenergní noncholinergní (NANC) neurální dráhy a neurogenní zánět. Aktivace makrofágů a degranulace žírných buněk vede k uvolnění prozánětlivých chemotaktických a toxických mediátorů. Poškozený bronchiální epitel pak prostřednictvím prozánětlivých mediátorů, redukcí neutrální endopeptidázové aktivity či sníženým uvolňováním „epitelial-derivated relaxing factor“ přispívá k perzistenci zánětlivého procesu. Vlivem zvýšení epiteliální permeability jsou subepiteliální iritační receptory exponovány nespecifickým stimulům a spolu se zvýšenou vaskulární permeabilitou a edémem tkání posilují zánětlivou odpověď, která přispívá k perzistenci zánětu dýchacích cest a k nespecifické bronchiální hyperreaktivitě (*Mapp 1994 Balmes 1997, Novotná 2000, Brhel 2001*).

Rozdělení profesionálních alergenů

Profesionální alergeny lze rozdělit do dvou skupin - na nízkomolekulární (LMW) (<1kDa) a vysokomolekulární (HMW) (>1kDa) (*Balmes 1997*). Mezi HMW alergeny patří většinou látky rostlinného nebo živočišného původu a tvoří již samy o sobě vlastní reakce schopný antigen. LMW látkami jsou většinou látky chemické a potřebují k tvorbě kompletního antigenu spojení s proteinem (*Novotná 2000*). HMW alergeny, ale i některé LMW alergeny způsobují převážně alergické reakce časné (IgE dependentní), LMW alergeny i reakce pozdní (*Grammer 2001*).

Genetická predispozice

Často se diskutuje o možné genetické predispozici k některým profesionálním alergenům. Osoby s HLA-DQA1 a DQB1 Asp57 mohou mít zvýšené predispozice k vývoji astmatu způsobeného diizokyanáty, HLA-DR3 bývá spojována s větším rizikem senzibilizace na trimelitanhydrid a čpavek, HLA-DQB1*0302 a DQB1*0603 se senzibilizací na kyselinu plikatovou (obsaženou ve dřevě červeného cedru). Jako protektivní se ukazuje alela DQB*0501 při expozici izokyanátům a kyselině plikatové (*Krčmová 2004*).

3.3. Patologická anatomie bronchiálního astmatu

Typickým histologickým obrazem bronchiálního astmatu je ztluštění bronchiální stěny v důsledku hypertrofie hladkých svalů. Povrchový epitel bronchů je vysoký s převahou pohárkových buněk a možnou dlaždicovou metaplazií. Depozita imunoglobulinů způsobují ztluštění bazální membrány. Sliznice dýchacích cest je infiltrována převážně eozinofily a lymfocyty. Je patrná hyperplazie pohárkových buněk a hypersekrece hlenu. Sliznice je pokryta vazkým sekretem, odloupanými epiteliemi a eozinofily. Vše vede k remodelaci stěny dýchacích cest (*Lebedová 2006, GINA Report 2007*).

3.4. Diagnostika profesionálního astmatu

Diagnostika profesionální bronchiálního astmatu je založena jednak na ověření a potvrzení základního onemocnění - tj. bronchiálního astmatu, dále na průkazu senzibilizace na noxu přítomnou na pracovišti pacienta a současně na průkazu souvislosti mezi vznikem astmatu a pracovní expozicí.

Souvislost mezi bronchiálním astmatem a pracovním prostředím je dána některou z následujících podmínek (*Balmes 1997*):

- příznaky astmatu se objevují jen v práci
- příznaky astmatu se zlepšují ve dnech pracovního volna
- příznaky astmatu se objevují pravidelně po pracovní směně
- příznaky astmatu se postupně zhoršují během pracovního týdne
- příznaky astmatu se zlepšují po změně pracovního prostředí

Mezi příznaky bronchiálního astmatu patří pískoty s maximem v exspiriu, tachypnoe, kašel, tíseň na hrudi, pocit dušnosti. Tyto symptomy se objevují během práce na pracovišti nebo nejčastěji do 4-8 hodin po opuštění pracoviště. HMW alergeny způsobují převážně alergickou odpověď časného či duálního typu, látky LMW způsobují nejčastěji alergické odpovědi pozdního typu, které se objevují až po skončení pracovní doby. Při déletrvající expozici alergenní látce se však symptomy mohou stát chronickými a ztrácí se tak jasná vazba na pracovní expozici (*Balmes 1997*).

Laboratorní diagnostika bronchiálního astmatu vychází ze zjišťování přítomnosti atopie a alergie (eozinofilie v periferní krvi, pozitivity kožních prick testů s alergeny, zvýšených celkových či specifické IgE protilátek v séru, zvýšeného eosinofilního kationického proteinu (ECP)).

Důležitou součástí diagnostiky je funkční vyšetření plic, které u neléčeného pacienta bylo podkladem pro klasifikaci závažnosti astmatu (dřívější doporučení Global Initiative for Asthma (*GINA Report 2005*). Podle současných doporučení se rozlišení na intermitentní a perzistující (lehké, střední a těžké) bronchiální astma využívá již jen výzkumně, pro klinické použití se doporučuje rozdělení na bronchiální astma dobře kontrolované a astma špatně či nedostatečně kontrolované léčbou (*GINA Report 2007*). U špatně kontrolovaného astmatu je typická přítomnost obstrukční ventilační poruchy (obstrukce v dýchacích cestách - parametr

FEV_1 (flow expiratory volume in 1stsecond - objem vzduchu vydechnutý během 1. sekundy usilovného výdechu) nižší než 80 % předpokládané hodnoty). U astmatu intermitentního nebo léčbou dobře kontrolovaného jsou však hodnoty FEV_1 v klidu v normě a snižují se až při astmatickém záchvatu. U osob se suspektním astmatem se sleduje denní variabilita plicních funkcí v klidu. Patologická je větší než 20% variabilita parametru PEF (peak expiratory flow, nejvyšší výdechová rychlost). U bronchiálního astmatu je typická přítomnost bronchiální hyperreaktivity. K průkazu nespecifické bronchiální hyperreaktivity slouží nespecifický bronchoprovokační test. Nespecifický bronchoprovokační test je nejčastěji prováděn inhalací roztoku histaminu či metacholinu. Jako pozitivní výsledek se označuje pokles parametru FEV_1 po inhalaci o více než 20 % oproti hodnotě před testem. K průkazu reverzibility bronchiální obstrukce slouží naopak bronchodilatační testy. Bronchodilatační test se provádí aplikací bronchodilatační látky (nejčastěji salbutamol, fenoterol, terbutalin, ipratropium bromid). Hodnoty FEV_1 by se do 30 min po testu měly zvýšit alespoň o 12 % a současně o minimálně 200 ml v absolutní hodnotě. Pozitivní bronchodilatační test potvrzuje reverzibilitu obstrukce (*Lebedová 2006, GINA Report 2007*).

Průkaz vlastního profesionálního astmatu je možno provést více způsoby:

- Nejčastěji doporučovaný postup je monitorování PEF. Tuto metodu zavedl do praxe Burge a kol. (*1979*). Indikací k provedení tohoto typu monitorování je nejčastěji případ, kdy se jedná o novou alergenní látku, která může způsobovat profesionální astma - jako první screening spojitosti obtíží s expozicí, dále pokud není specifický bronchoprovokační test v laboratoři možné provést nebo jeho výsledek je negativní i přes velmi suspektní vazbu na pracoviště, k odlišení astmatu zhoršovaného prací či k otestování, zda je pracovní prostředí pro danou osobu bezpečné (*Chan Yeung 1995*). Nejčastějším schématem je takové, kdy si pacient po dobu 2 týdnů vyřazení z pracovního prostředí a následně po dobu 2 týdnů na pracovišti opakovaně měří PEF pomocí peak-flow metru (*Novotná 2000*). Samozřejmě je nutné délku měření přizpůsobit zdravotnímu stavu pacienta během opakované expozice noxám na pracovišti. Měření by mělo být prováděno alespoň 4x denně (například pro pracovníky v denních směnách po probuzení, v poledne, po práci, před usnutím), ideálně každé 2 hodiny, což však klade velké nároky na spolupráci pacienta (*Chan Yeung 1995*). Pozitivním nálezem je diurnální variabilita PEF>20 % během měření v práci proti eliminaci z pracovního prostředí. Významnou nevýhodou je možnost volního ovlivnění hodnoty PEF, což tohle vyšetření činí v podstatě nepoužitelným pro rozhodování o diagnóze profesionálního astmatu v našich podmínkách s významným finančním odškodněním pro bolestné a doplatky do výše původního platu.
- Další možností je monitorování změny bronchiální hyperreaktivity v období vyřazení z pracovního procesu a v období expozice na pracovišti. Pozitivním nálezem je zvýšení bronchiální hyperreaktivity - alespoň dvojnásobné zvýšení hodnoty PC_{20} v období po expozici vzhledem k období vyřazení z práce (*Novotná 2000*).
- Za zlatý standard se považují specifické bronchoprovokační testy s podezřívanými alergeny. Expozici alergenu je možné provést buď přímou inhalací standardizovaného komerčně vyrobeného alergenu (např. mouky), dále expozicí ve speciálním boxu s řízeným odtahem vzduchu, kde pacient simuluje práci na pracovišti (např. lakování), případně reexpozicí na pracovišti, pokud není možné identifikovat podezřelou alergenní noxu či není možné expozici napodobit v laboratoři. Expozice alergenu přímou inhalací by měla začínat nejnižší koncentrací alergenu, která vyvolala pozitivní kožní reakci při testu end-point titrace

(intradermální test s alergenem v ředění 1:10000 až 1:10), případně koncentrací 10x nižší (*Novotná 2000*). Pokud inhalace alergenu v této koncentraci nevyvolá bronchospastickou odpověď, přistupuje se k inhalaci téhož alergenu o vyšších koncentracích. Při expozici podezřívanému alergenu jsou opakovaně sledovány funkční parametry plic a jako pozitivní výsledek je brán pokles FEV_1 v období 24 hodin po testu o 20 % vzhledem k hodnotě před testem (*Brhel 1997*). Provádění specifických bronchoprovokačních testů je rizikové z důvodu možného anafylaktického šoku či vzniku výrazné obstrukce v dýchacích cestách. Personál proto musí být odborně vyškolen ke zvládání akutních komplikací a pracoviště musí být speciálně vybaveno. Významným pozitivem těchto testů je přímé potvrzení noxy - profesionálního alergenu.

Pokud to zdravotní stav vyšetřovaného dovolí, je během testů s alergeny doporučováno vysazení léků, které by mohly výsledek testů negativně ovlivnit - krátkodobě působící β_2-mimetika a ipratropium bromid 8 hodin před testem, dlouhodobě působící β_2-mimetika a antileukotrieny 8 hodin před testem, teofyliny 48-72 hodin před expozicí (*Hendrich 2002*). Pokud se vysazují inhalační kortikosteroidy, mělo by tak být provedeno 4-8 týdnů před testem (*Satinská 2003*). Někteří autoři však vysazení kortikosteroidů nedoporučují. Důvodem je možná falešná pozitivita testu v důsledku zhoršení stavu pacienta po vysazení protizánětlivé medikace. Pokud se testuje bez přerušení léčby inhalačními kortikosteroidy, reakce na podaný alergen nemusí být tak výrazná, jako by byla bez kortikoidní léčby, ale léčba by neměla u senzibilizovaného pacienta reakci zcela zamaskovat. Aplikace kortikosteroidů, kromoglykátu sodného a nedokromilu sodného by však měla být přizpůsobena protokolu testu - tj. celá denní dávka by měla být aplikována až ve večerních hodinách (*Hendrich 2002*).

Často nelze specifický bronchoprovokační test provést z důvodu nedostatečného vybavení laboratoře plicních funkcí expoziční kabinou a školeným personálem, získání vzorku alergenu z pracoviště, z organizačních či ekonomických důvodů nebo bezpečnosti a proto byla zkoumána specificita a senzitivita ostatních prováděných vyšetření v kombinaci i samotných. Při sledování senzitivity a specificity samotného PEF monitorování na pracovišti Côté a kol. (*1990*) uvádějí senzitivitu 86 % a specificitu 89 % v porovnání se zlatým standardem - specifickými provokačními testy, Perrin a kol. (*1992*) ve své studii popsali senzitivitu 81 % a specificitu 74 %. Beach a kol. (*2007*) provedli systematickou revizi 77 studií zabývající se diagnostikou profesionálního astmatu. Při vyšetření nespecifické bronchiální hyperreaktivity, kožních prick testů a specifické IgE protilátky z krve byla senzitivita ve srovnání se specifickým bronchoprovokačním testem průměrně: 79,3 % (HMW látky) a 66,7 % (LMW látky); 80,6 % a 72,9 %; 73,3 % a 31,2 %. Specificita byla nejvyšší pro specifické IgE protilátky (79 % HMW a 88,9 % LMW látky). Vysoká specificita byla zjištěna pro pozitivní nespecifický bronchoprovokační test a kožní prick testy (82,5 %) nebo v kombinaci se specifickým IgE (74,3 %). U LMW alergenů byla nejvyšší senzitivita zjištěna pro kombinaci pozitivního nespecifického bronchoprovokačního testu a pozitivního kožního prick testu a to ve výši 100 %. Při opakovaných měření ventilačních parametrů (nejčastěji PEF) byla pro LMW látky senzitivita 86,7 % a specificita 90,0 %. Pro opakované testování nespecifické bronchiální hyperreaktivity byla senzitivita i specificita pro HMW 100 %, pro LMW 67,5 % a 65,6 %.

V případě, že tedy není možné specifický bronchoprovokační test provést, může být kombinace pozitivního nespecifického bronchoprovokačního testu s pozitivními specifickými IgE protilátkami nebo kožními prick testy alternativou, která zvyšuje pravděpodobnost diagnózy profesionálního astmatu (*Beach 2007*).

3.5. Prevence profesionálního astmatu

Mezi primární prevenci vzniku profesionálního astmatu řadíme vhodnou volbu povolání a vhodné pracovní zařazení v zaměstnání. Na pracovišti by to měla být důsledná kontrola procesů, které zahrnují expozici potenciálním alergizujícím látkám a iritantům - ochrana pracovníků pomocí odpovídajících ventilačních systémů, ochranných pomůcek a instruktáž pracovníků. Do sekundární prevence patří včasné rozpoznání příznaků počínajícího profesionálního astmatu a včasná eliminace z vlivu profesionálního alergenu. Terciální prevencí rozumíme zabránění zhoršení a vzniku komplikací již vzniklého profesionálního astmatu (*Balmes 1997, Brhel 2000, Brhel 2001*).

4 DIAGNOSTICKÉ METODY V OBLASTI PROFESIONÁLNÍHO BRONCHIÁLNÍHO ASTMATU

4.1. KONDENZÁT VYDECHOVANÉHO VZDUCHU

4.1.1. ÚVOD A SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉHO PROBLÉMU

Počátky analýzy vydechovaného vzduchu sahají do 18. století, kdy Lavoisier zkoumal proces dýchání právě analýzou vydechovaného vzduchu. Z vydechovaného vzduchu lze zjišťovat požití alkoholu, charakteristická je kyselina β-hydroxymáselná a aceton v dechu diabetiků. První práce, které se týkaly analýzy kondenzátu vydechovaného vzduchu (KVV) ve vztahu k onemocnění dýchacích cest, byly publikovány v 80. letech 20. století a zabývaly se plicním surfaktantem a produkty peroxidace lipidů. V 90. letech 20. století se spektrum prací rozšířilo o IL-1b, IL-2, IL-6 a TNF. Následovaly studie zaměřené na izoprostany a prostaglandiny u osob s astmatem, CHOPN, cystickou fibrózou a intersticiálními plicními nemocemi (*Čáp 2001*).

KVV je bohatým zdrojem substancí (metabolity kyseliny arachidonové, proteiny, peroxid vodíku, nitrosloučeniny a další látky), které odrážejí prostředí dýchacích cest a nabízí tak další možnosti diagnostiky a monitorování různých onemocnění (*Čáp 2001*). Mediátory jsou z dýchacích cest uvolňovány do vydechovaného vzduchu, který pak kondenzuje v ochlazované sběrné zkumavce. Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu je jednoduchá neinvazívní metoda, která může být prováděna i u dětí a vážně nemocných pacientů a opakována několikrát za sebou (*Barnes 2005*). Předpokládá se, že aerosolové částice vydechovaného vzduchu odrážejí složení bronchoalveolární extracelulární tekutiny (*Čáp 2001*).

Odběr KVV

Vzorky kondenzátu vydechovaného vzduchu jsou odebírány pomocí různých přístrojů. Tyto přístroje mohou být buď konstruovány samovýrobou či komerčně. Přístroje vznikající samovýrobou se obecně skládají z náústku s jednocestným ventilem připojeným ke sběrnému systému, který je chlazen buď ledem nebo tekutým dusíkem. Sběrný systém se skládá z dvojité skleněné stěny.

Mezi komerčně vyráběné přístroje patří Eco-Screen (Jaeger Tonnies, Hoechberg, Germany). Je to elektricky chlazený systém s jednocestným ventilem a sběrným systémem napojeným na pohyblivé rameno přístroje. Vyšetřovaná osoba dýchá do přístroje přes náústek, který je připojen k části přístroje s jednocestným ventilem, kde je oddělen vdechovaný a vydechovaný vzduch. Vzduch je ochlazován pomocí protiproudového chladicího okruhu ve sběrné části přístroje, který se skládá z lamelárního kondenzátoru, na který je nasazena standardní plastová sběrná zkumavka z inertního materiálu. Kondenzát precipituje na stěnách kondenzátoru a stéká do sběrné zkumavky. Teplota uvnitř chladícího systému je podle informace výrobce -10 °C. Přesto, že je tento systém široce užíván, je oproti samovýrobou vzniklým kondenzátorům výhodnější pouze v rychlém zchlazení vzorků, což je důležité především při analýzách chemicky nestabilních látek (leukotrieny). Avšak i tady je jeho výhoda sporná - odebíraný vzorek je často částečně ve stavu kapalném a částečně zmražený, což právě u nestabilních látek může být příčinou velké variability jejich koncentrací

v jednotlivých publikovaných pracech. Eco-Screen II (Jaeger Tonnies, Hoechberg, Germany) je novější verzí přístroje Eco-Screen a představuje vylepšení stávajícího přístroje v možnosti měřit ventilační parametry během odběru kondenzátu. Další výhodou je, že KVV může být odebírán ve stejném čase do dvou oddělených chladicích systémů, které se skládají z plastikových sáčků vložených do chladicího systému. Toto zařízení umožňuje sledování původu biomarkerů z různých plicních kompartmentů (*Montuschi 2007*).

Dalším z komerčně vyráběných přístrojů je RTube (Respiratory Research, Inc., Charlottesville, VA), který má výhodu v přenosnosti (*Hunt 2002*). Tento přístroj se skládá z polypropylenového sběrného systému s výdechovým ventilem. Chladicí systém obsahuje hliníkový chladicí obal obklopující výměnnou polypropylenovou trubičku. Teplota chladicího systému může být libovolně volena. Konstrukce přístroje zabraňuje kontaminaci vzorku KVV slinami a slinná amyláza nebyla v odebraných vzorcích detekována (*Hunt 2002*). Přístroj byl původně vyvinut pro měření pH ve vzorcích KVV, ale může být použit i pro detekci jiných parametrů KVV. Výhodou tohoto přístroje je jeho přenosnost, což umožňuje měření v domácím prostředí, kdy je polypropylenová trubička následně skladována při -20 °C (v domácím prostředí možné) do doby zpracování v laboratoři. Avšak pro analýzu chemicky nestabilních látek je nutno zamrazit trubičku ihned po odběru na -80 °C, což již v domácím prostředí možné není.

Soyer a kol. (*2006*) srovnávali vzorky odebrané systémem RTube a Eco-Screen u 20 zdravých dobrovolníků. Systém Eco-Screen umožňoval odběr většího objemu KVV, koncentrace cysteinylových leukotrienů a eotaxinu byla významně vyšší ve vzorcích odebraných systémem Eco-Screen, rozdíly v pH vzorků se významně nelišily. Rozdíly mezi výsledky analýz odebraných vzorků byly patrně způsobeny odlišností přístrojů v chladicím systému při odběru vzorku.

Kontaminace vzorků KVV

Během procesu odběru mohou být vzorky kontaminovány jak látkami z vnějšího prostředí, tak endogenními substancemi z úst a horních dýchacích cest. Riziko endogenní kontaminace je však velmi malé, neboť laminární proudění není dostatečné k tvorbě aerosolu. Také povrch horních dýchacích cest je vzhledem k dolním dýchacím cestám malý a tak případná kontaminace může být považována za zanedbatelnou. Výjimkou jsou však látky, jejichž koncentrace je vyšší v horních dýchacích cestách. Vzhledem k tomu, že např. eikosanoidy jsou přítomny ve vysokých koncentracích ve slinách, doporučuje se kontrola kontaminace slinami měřením slinné amylázy (*Čáp 2001*).

Analýza KVV

V současné době se ke stanovení jednotlivých látek v KVV používá velké množství metod. K analýze lze využít metod imunologických - enzymová imunoanalýza (EIA), které jsou používány především pro svou finanční dostupnost, fotometrických metod (fluorescence, chemiluminiscence), vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC), kombinace hmotnostní spektrometrie (MS) s kapalinovou či plynovou chromatografií (LC/MS, GC/MS). LC/MS či GC/MS se jeví jako nejvýhodnější pro stanovování leukotrienů a 8-izoprostanu díky vysoké specificitě a také proto, že pomocí těchto metod je možné detekovat velmi nízké koncentrace sledovaných parametrů (u leukotrienů jsou to pg/ml). Nevýhodou těchto metod je jejich poměrně vysoká cena. Při analýze se také používají citlivé ionizační techniky (negativní chemická ionizace), případně monitorování pouze některých typických iontů ve spektrech

měřených látek (SIM- Selected Ion Monitoring). Snížení detekčního limitu je možné pomocí předpřípravy vzorků pomocí lyofilizace či metody Solid Phase Extraction (SPE) (*Čáp 2001*).

Ve většině studií jsou markery v KVV měřeny pomocí imunologických metod, které je však nutno ověřit referenčními metodami jako je hmotnostní spektrometrie či kapalinová chromatografie. Tyto referenční techniky také umožní přesné změření koncentrací sledovaných markerů (*Montuschi 2007*). Leukotrieny jsou nejčastěji stanovovány pomocí EIA jako suma cys-LT (LTC_4/LTD_4/LTE_4) (*Hanazawa 2000b, Antzak 2002, Baraldi 2003a*). Jednotlivé cysteinylové leukotrieny (LTD_4 a LTE_4) stanovovali např. Čáp a kol. pomocí GC/MS (*2004*), LTE_4 zjišťovali pomocí EIA Mondino a kol. (*2004*) a Montuschi a kol. (*2006*). LTB_4 analyzovali metodou EIA Hanazawa a kol. (*2000*), Antzak a kol. (*2002*), Biernacki a kol. (*2003*) a další autoři; metodou LC/MS/MS Montuschi a kol. (*2004*), pomocí GC/MS Čáp a kol. (*2004*). 8-izoprostan byl analyzován nejčastěji metodou EIA (*Montuschi 1999, Antzak 2002 a další*), metodou RIA (*Montuschi 2003, Baraldi 2003b, Mondino 2004*) a metodou GC/MS (*Carpenter 1998*).

Leukotrieny v KVV

Leukotrieny patří mezi metabolity kyseliny arachidonové. Kyselina arachidonová je 20-uhlíková polynenasycená mastná kyselina. Je metabolizována enzymatickými i neenzymatickými cestami. Dvě hlavní cesty biotransformace závisí na enzymech cyklooxygenáze (COX) a 5-lipoxygenáze (5-LO).

Leukotrieny vznikají 5-lipoxygenázovou cestou. Iniciace biosyntézy leukotrienů závisí na stimulaci agonistou (alergenem iniciovaná IgE vazba na membránu žírných buněk), hydrolýze kyseliny arachidonové z membránových fosfolipidů fosfolipázou A_2 a interakci 5-LO s aktivačním proteinem (FLAP).

5-LO katalyzuje konverzi kyseliny arachidonové na 5-hydroperoxyeikosatetraenovou kyselinu (HPETE), která je dále přeměněna na 5-hydroxyeikosatetraenovou kyselinu (HETE) nebo na nestabilní epoxid - leukotrien A_4 (LTA_4). V alveolární makrofázích, monocytech a neutrofilech je LTA_4 metabolizován LTA_4 hydrolázou na leukotrien B_4 (LTB_4). V žírných buňkách, eozinofilech, bazofilech (hlavních buňkách alergického zánětu) probíhá přeměna LTA_4 na leukotrien C_4 (LTC_4) cestou LTC_4 syntázy. LTC_4 je dále extracelulárně metabolizován pomocí γ-glutamyltranspeptidázy na leukotrien D_4 (LTD_4) a ten dipeptidázou na leukotrien E_4 (LTE_4). LTC_4, LTD_4 a LTE_4 jsou označovány jako cysteinylové leukotrieny (cys-LT), dříve známy jako SRSA (slow reacting substance of anaphylaxis). Leukotrien E_4 je metabolitem této leukotrienové řady, který je vylučovaný do moči. V moči může být jeho koncentrace odrazem celkové produkce cysteinylových leukotrienů v organismu. Působení leukotrienů je spojeno s G proteinovými receptory BLT (pro LTB_4) a receptory $cysLT_1$ a $cysLT_2$ (pro cys-LT) (*Dworski 2005*). $CysLT_1$ je receptor přítomný na plicních makrofázích, buňkách hladkého svalstva, eozinofilech, bazofilech, monocytech a žírných buňkách, B lymfocytech a CD34 buněčných prekurzorech; byl prokázán ve slezině, střevě, placentě, slinivce, prostatě, srdci, mozku, ledvinách, játrech i tukové tkáni. $CysLT_2$ receptor se vyskytuje na Purkyňových vodivých vláknech srdce, chromatofinních buňkách nadledvinek a mozku, na eozinofilech a makrofázích (*Kopřiva 2005*). Při zkoumání kontraktilní kapacity in vitro byl leukotrienům C_4 a D_4 připisován zhruba stejný potenciál iniciovat kontrakci hladké svaloviny dýchacích cest. Potenciál kontrakce LTE_4 byl nižší (*Drazen 1998*). Cys-LT lze tedy považovat za mediátory obstrukce (*Dahlen 1986*). $CysLT_2$ receptor se dává do souvislosti v plicích hlavně s žilní vazokonstrikcí (*Dworski 2005*).

Cys-LT působí bronchokonstrikčně, zvyšují hyperreaktivitu dýchacích cest, exsudaci plazmy, podporují Th-2 odpověď, potlačují Th-1 odpověď, způsobují infiltraci a degranulaci eozinofilů, hyperplazii hlenových buněk, hypersekreci hlenu, inhibici plicních řasinek, hyperplazii hladkých svalů, proliferaci epiteliálních buněk, zvyšují depozici kolagenu, mohou působit vazodilatačně i vazokonstrikčně.

Mezi účinky LTB_4 patří chemotaxe neutrofilů, sekrece leukocytů, podpora syntézy IgE a nukleární transkripce.

Produkce cysteinylových leukotrienů v organismu byla v minulosti monitorována převážně zjišťováním koncetrace LTE_4 v moči. Tato koncentrace však 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 LTE_4, ale i hlavní kontraktilní leukotrieny LTC_4 a LTD_4 (*Drazen 1998*). Vzhledem k tomu, že se cys-LT podílejí na kontrakci hladké svaloviny dýchacích cest, byly sledovány koncetrace LTE_4 jako metabolitu cysteinylových leukotrienů v klidu a jejich změny během specifických a nespecifických bronchoprovokačních testů (*Taylor 1989, Manning 1990, Kumlin 1992, O´Sullivan 1998*).

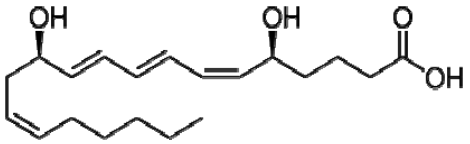
LTB_4 a cys-LT byly detekovány v KVV zdravých osob a zvýšeny byly u dospělých astmatiků se stabilním středně těžkým až těžkým astmatem (*Hanazawa 2000b*). U osob s aspirin senzitivním astmatem neléčených kortikosteroidy byly koncentrace cys-LT v KVV shledány významně vyšší než u aspirin-tolerujících astmatiků neléčených kortikosteroidy. Oproti tomu koncentrace cys-LT se významně nelišily u skupin aspirin-tolerantních astmatiků neléčených a léčených kortikosteroidy. Skupiny astmatiků měly koncentrace cys-LT vyšší než zdravé osoby (*Antzak 2002*). Studie Mondiniho a kol. *(Mondino 2004)* zjistila významně vyšší koncentrace LTE_4, LTB_4 a 8-izoprostanu u atopických astmatických dětí (neléčených i léčených kortikosteroidy) ve srovnání se zdravými kontrolami, což ukazuje možnou nezávislost koncentrací těchto markerů na léčbě steroidy. Na rozdíl od LTE_4 je LTB_4 zvýšen převážně u osob s chronickou bronchopulmonální nemocí (CHOPN). Montuschi a kol. *(Montuschi 2003*) nalezli zvýšenou koncentraci LTB_4 u kortikosteroidy léčených i neléčených pacientů s CHOPN, kteří byli exkuřáky, ve srovnání se zdravými osobami.

8-izoprostan v KVV

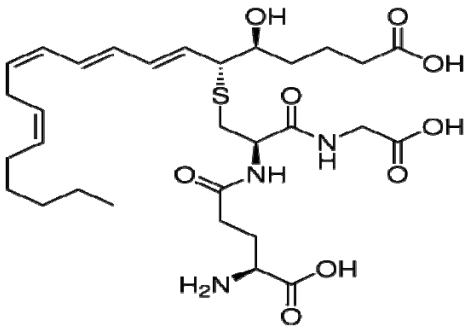
Izoprostany jsou látky vznikající neenzymatickou peroxidací kyseliny arachidonové (*Morrow 1990*). F_2-izoprostany jsou považovány za nejlepší biomarkery oxidativního stresu a peroxidace lipidů in vivo - vzhledem k jejich stabilitě, specificitě v endogenní peroxidaci a poměrně snadno detekovatelné koncentraci v biologických vzorcích (*Roberts 2000*). Izoprostany nejsou jen markery oxidativního stresu, ale byla zjištěna také řada jejich účinků na dýchací systém - např. kontrakce bronchiální hladké svaloviny (in vitro) (*Kawikova 1996*) a obstrukce dýchacích cest s exsudací plazmy u morčat in vivo (*Okazawa 1997*), což ukazuje na jejich možné využití jako mediátorů oxidativního postižení plic (*Montuschi 2005*). Tomu odpovídá skutečnost, že 8-izoprostan v KVV byl významně zvýšen u pacientů se silikózou plic (*Pelclová 2007a*) i u osob s předchozí expozicí azbestu (*Pelclová 2007b*).

Zvýšená koncentrace 8-izoprostanu v KVV byla nalezena u astmatiků se stabilním astmatem (ve srovnání se zdravými osobami) a její nárůst koreloval s obtížností nemoci a stupněm zánětu (*Montuschi 1999*), u astmatiků s aspirin senzitivním i aspirin tolerujícím astmatem (*Anczak 2002*), i u astmatických dětí léčených i neléčených kortikosteroidy (*Baraldi 2003*). Tyto výsledky podporují tvrzení, že 8-izoprostan jako marker oxidativního stresu je zvýšen u dospělých i dětí s astmatem a tento nárůst je relativně rezistentní vůči léčbě steroidy (*Montuschi 2005*).

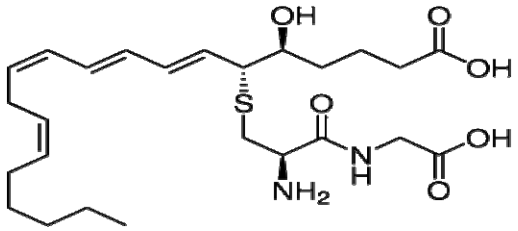
8-izoprostan v KVV byl zvýšen u kuřáků a exkuřáků se stabilní CHOPN a to ve srovnání se zdravými kuřáky i zdravými nekuřáky (*Montuschi 2000a)*. Bylo popsáno, že během exacerbací CHOPN se koncentrace 8-izoprostanu zvyšovala a následně po léčbě antibiotiky se snížila (*Biernacki 2003*). Nebyly zjištěny korelace mezi ventilačními parametry a 8-izoprostanem v KVV u astmatiků ani u osob s CHOPN (*Montuschi 2000a*). Negativní korelace byla však nalezena pro parametr FEV_1 u pacientů s cystickou fibrózou (*Montuschi 2000b, 2005*).



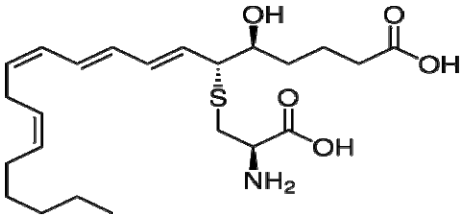
Leukotrien B_4



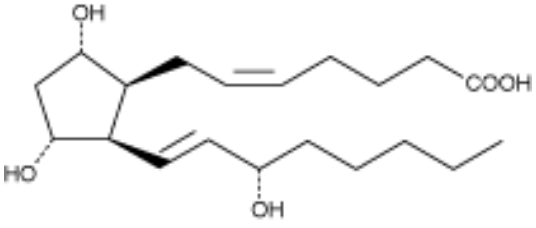
Leukotrien C_4



Leukotrien D_4



Leukotrien E_4



8-izoprostan

Leukotrieny a 8-izoprostan: chemická struktura

4.1.2. CÍLE PROJEKTU

Projekt byl součástí grantu IGA MZ ČR č. 8109-3/2004 „Sledování vývoje zánětlivých parametrů u nemocných s profesionálním bronchiálním astmatem“.

Cílem projektu bylo:

A. Stanovit koncentrace leukotrienů B_4, C_4, D_4, E_4 a 8-izoprostanu v kondenzátu vydechovaného vzduchu u skupiny osob s profesionálním bronchiálním astmatem a u zdravých osob.

B. Sledovat změny koncentrací leukotrienů B_4, C_4, D_4, E_4 a 8-izoprostanu během 24 hodin v kondenzátu vydechovaného vzduchu u osob v klidu bez provokace alergenem či nespecifickým podnětem.

C. Sledovat změny koncentrací leukotrienů B_4, C_4, D_4, E_4 a 8-izoprostanu v kondenzátu vydechovaného vzduchu po expozici alergenu u osob s podezřením na profesionální bronchiální astma či rinitidu.

4.1.3. PROVEDENÍ PROJEKTU

4.1.3.1. Charakteristika sledovaných osob

A. Skupina osob s profesionálním bronchiálním astmatem a skupina zdravých dobrovolníků

Bylo vyšetřeno 32 osob, u nichž bylo v předcházejících letech diagnostikováno profesionální bronchiální astma a 39 zdravých dobrovolníků (tabulka č. 3). S osobami obou skupin byl vyplněn standardizovaný respirační dotazník, osoby byly klinicky vyšetřeny, bylo provedeno laboratorní vyšetření (krevní obraz, IgE, ECP). U každé osoby byl odebrán 1 vzorek kondenzátu vydechovaného vzduchu. Dále bylo provedeno funkční vyšetření plic (spirometrie a bodypletysmografie), u osob sledovaných pro profesionální bronchiální astma navíc nespecifický bronchoprovokační test s histaminem (pokud nebyl vzhledem k aktuálnímu zdravotnímu stavu kontraindikován) a alergologické vyšetření s kožními prick testy.

Tab. 3. Charakteristika skupiny zdravých dobrovolníků a osob léčených pro bronchiální astma

		Zdravé osoby	**Osoby s profesionálním astmatem**
Počet	počet	39	32
Věk (SD)	roky	42,5 (12,5)	48,5 (11,0)
Pohlaví	muži/ženy	15/24	23/9
Kouření	ne/ex/ano	29/3/7	13/13/6
Léčba kortikosteroidy	počet	0	29
ECP (SD)	ng/ml	19,2 (11,8)	23,6 (12,1)
Eozinofily v krvi (SD)	%	2,9 (1,9)	3,1 (1,9)
Eozinofily v krvi (SD)	$x10^9/l$	0,18 (0,12)	0,22 (0,15)
IgE	pozitivní/negativní/neproveden	5/32/2	12/18/2
Kožní prick testy	pozitivní/negativní/neproveden	neprovedeno	9/22/1
Nespecifický bronchoprovokační test	pozitivní/negativní/neproveden	neprovedeno	22/1/9

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

Bylo vyšetřeno 57 osob přijatých k diagnostické hospitalizaci pro podezření na profesionální bronchiální astma nebo rinitidu (tabulka č. 4). Byl s nimi vyplněn standardizovaný respirační dotazník, osoby byly klinicky vyšetřeny, dále bylo provedeno laboratorní vyšetření (krevní obraz, IgE celkové, ECP), alergologické vyšetření s kožními prick testy, nespecifický bronchoprovokační test s histaminem. Vyšetření markerů KVV bylo provedeno během 24 hodin celkem 4x vždy před vyšetřením ventilačních parametrů.

Tab. 4. Charakteristika skupiny osob se suspektním profesionálním onemocněním dýchacích cest, u kterých byla sledována 24-hodinová variabilita markerů v KVV

n=57		
Věk (SD)	roky	43,5 (10,5)
Pohlaví	muži/ženy	22/35
Kouření	ne/ex/ano	28/18/11
ECP (SD)	ng/ml	40,8 (32,3)
Eozinofily v krvi (SD)	%	4,1 (3,7)
Eozinofily v krvi (SD)	$x10^9$/l	0,28 (0,38)
IgE	pozitivní/negativní	20/36/1
Kožní prick testy	pozitivní/negativní/neproveden	24/29/4
Nespecifický bronchoprovokační test	pozitivní/negativní	35/22

C. Skupina osob vyšetřených pro podezření na profesionální bronchiální astma a/nebo rinitidu - sledování leukotrienů a 8-izoprostanu v KVV během specifických bronchoprovokačních testů s alergeny

Bylo vyšetřeno 47 osob přijatých k diagnostické hospitalizaci pro podezření na profesionální bronchiální astma a/nebo rinitidu (tabulka č. 5). Byl s nimi vyplněn standardizovaný respirační dotazník, byly klinicky vyšetřeny, bylo provedeno laboratorní vyšetření (krevní obraz, IgE, ECP), alergologické vyšetření s kožními prick testy a nespecifický bronchoprovokační test s histaminem. Vyšetření 24-hodinové variability ventilačních parametrů a specifické bronchoprovokační testy s profesionálními alergeny byly provedeny standardně (viz dále 4.1.3.2), před každým vyšetřením plicních funkcí byl proveden odběr KVV. Tři osoby byly testovány za léčby inhalačními kortikosteroidy.

Tab. 5. Charakteristika skupiny osob vyšetřených pro podezření na profesionální bronchiální astma a/nebo rinitidu, u níž byly prováděny bronchoprovokační testy

n=47		
Věk (SD)	roky	44,0 (10,2)
Pohlaví	muži/ženy	18/29
Kouření	ne/ex/ano	22/16/9
ECP (SD)	ng/ml	42,0 (34,5)
Eozinofily v krvi (SD)	%	4,1 (4,1)
Eozinofily v krvi (SD)	$x10^9$/l	0,28 (0,42)
IgE	pozitivní/negativní	16/31
Kožní prick testy	pozitivní/negativní/ neprovedeny- nehodnotitelné	20/23/4
Nespecifický brochoprovokační test	pozitivní/negativní	29/18

4.1.3.2. Metodika použitých vyšetření

Funkční vyšetření plic

Funkční vyšetření plic bylo provedeno vsedě spirometrem s bodypletysmografem MasterLab Jaeger. Vyšetření bylo provedeno v souladu se standardy Evropské respirační společnosti (*Quanjer 1993*).

Nespecifický bronchoprovokační test

Nespecifický bronchoprovokační test s histaminem byl proveden pomocí inhalační jednotky Asthma Provocation System Jaeger, která umožňuje řízenou aplikaci roztoku v průběhu inspiria. Roztok histaminu byl inhalován v koncentraci 1 mg/ml, (případně 2,5 mg/ml), 5mg/ml, 10 mg/ml, (případně 15 mg/ml). Jako zásadní kriterium pro zhodnocení testu jako pozitivního byl brán pokles parametru FEV_1 o 20 % vzhledem k hodnotě před testem (*Sterk 1993*), případně pokles o více než 30 % v parametrech MEF (maximální výdechový průtok na různých úrovních usilovné vitální kapacity (FVC) a vzestup R_{tot} (odpor dýchacích cest) o více než 70 % spolu s poklesem FEV_1 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 jeho aplikaci, za 2 h, 5 h a 24 h po aplikaci alergenu a v případě náhle vzniklé bronchospastické odpovědi kdykoliv v průběhu 24 h následujících po aplikaci alergenu. Jako zásadní kriterium pro zhodnocení testu jako pozitivního byl brán pokles parametru FEV_1 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 FEV_1 alespoň o 15 % vzhledem k hodnotám naměřeným před testem.

Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu (KVV)

Kondenzát vydechovaného vzduchu byl odebírán pomocí přístroje EcoScreen Jaeger. Vyšetřované osoby měly během odběru nos ucpaný nosní svorkou, aby se zabránilo dýchání nosem. Byly tedy dodrženy standardní podmínky, kdy je vzduch nasáván jen plastovým ventilem přístroje EcoScreen Jaeger. KVV byl odebírán do plastových zkumavek z inertního materiálu a ihned po odebrání byl vzorek zamražen na -70°C do doby zpracování.

Časové schéma odběru KVV:

1. U zdravých dobrovolníků a osob s profesionálním bronchiálním astmatem byl proveden vždy 1x

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 ve výše uvedených časových intervalech, odpovídajících očekávanému odběru během bronchoprovokačního testu

b/ odběr KVV před specifickým bronchoprovokačním testem a následně ihned po testu, za 2 h, za 5 h a za 24 h po testu

KVV byl odebírán vždy před vyšetřením plicních funkcí.

Detekce slinné α-amylázy

Možná kontaminace vzorků KVV slinami byla zjišťována pomocí detekce α-amylázy. Byla použita kolorimetrická metoda (α-Amylase-Liquid BIO-LA-TEST kit, Pliva-Lachema, Czech Republic).

Analýza leukotrienů

Předpříprava vzorků KVV:

Imunoseparace s komerčně vyrobeným afinitním sorbentem (Cayman Chemicals, USA) byla provedena následovně: 1 ml KVV, 50 μl každého imunoafinitního sorbentu a 100 pg jednotlivých deuteriem značených standardů ([6,7,14,15 ^{2}H] leukotrien B_4, [17,18,19,20 ^{2}H] 8-izoprostan (Cayman Chemical, USA), [6,7,14,^{2}H] leukotrien E_4 (Biomol, USA)) bylo smícháno, suspenze byla třepána po dobu 120 min při 20 ^{o}C a centrifugována. Následovala separace sorbentu a vymytí vodou (2 x 1 ml). Poté byl přidán methanol (2 x 0.5 ml) pro vymytí substrátu z komplexu protilátka-substrát, suspenze byla třepána po dobu 5 min a centrifugována s následnou separací supernatantu. Rozpouštědlo bylo odstraněno ze supernatantu (pomocí dusíku) a bylo přidáno 50 μl mobilní fáze. Následovala analýza pomocí LC/MS.

Analýza vzorků metodou LC/MS:

Koncentrace jednotlivých markerů byly stanoveny pomocí LC/MS - přístroje Varian 1200L, Varian, USA. Analýza proběhla na koloně Hypercarb Thermo 100 x 2.1 mm x 5 μm, při pH = 11 a průtoku 200 μl/min. Detekce byla prováděna v režimu „selective reaction monitoring“ (SRM), který poskytuje vysokou citlivost a výbornou selektivitu ke stanovované látce. Byl sledován specifický rozpad mateřského iontu na ion dceřiný. Ionizace byla prováděna elektrosprayem v negativním modu (ESI^-).

Limit detekce (LOD); limit kvantifikace (LOQ) a návratnost (recovery) pro jednotlivé sledované parametry byly následující: LTB_4 - LOD = 1 pg/ml; LOQ = 4 pg/ml; recovery = 46%; LTC_4 - LOD = 2 pg/ml; LOQ = 16 pg/ml; recovery = 55%; LTD_4 - LOD = 1 pg/ml; LOQ = 6 pg/ml; recovery = 61%; LTE_4 - LOD = 1 pg/ml; LOQ = 5 pg/ml; recovery = 81%; 8-izoprostan - LOD = 1 pg/ml, LOQ = 5 pg/ml; recovery = 84%. Nepřesnost byla statisticky stanovena jako menší než 8%.

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 koncentrací markerů v KVV a ventilačními parametry (hladina významnosti $p<0,05$).

Protože hodnoty koncentrací leukotrienů nejevily normální distribuci (vychýlení doprava z důsledku výskytu občasných vysokých hodnot), byla data získaná během bronchoprovokačních testů a během sledování v klidu bez provokace zpracována pomocí vytvořeného modelu, který pracoval s logaritmy hodnot koncentrací a parametru FEV_1:

$$\log\left(\frac{conc_{it}}{conc_{i1}}\right) = a + b.\log\left(\frac{FEV1_{it}}{FEV1_{i1}}\right) + \varepsilon_{it}$$

Dále byla použita modifikace testu ANOVA pro logaritmicky transformované měření s časovým faktorem v LME modelu: $\log(conc_{it}) = a_t + \eta_i + b_t \log(FEV1) + \varepsilon_{it}$. Kdy $conc_{it}$ je koncentrace sledovaného KVV parametru pro pacienta *i* v čase *t* (stejné platí i pro FEV_1).

Cirkadiánní intraindividuální variabilita jednotlivých KVV parametrů byla vyjádřena variačním koeficientem, který byl vypočítán pro každou osobu (i-tou) jako CV_i=100.[směrodatná odchylka opakovaného měření pro i-tou osobu]/[průměrná hodnota opakovaných měření pro i-tou osobu]. Celkový variační koeficient pro každý KVV parametr byl spočítán jako $(CV=\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} CV_i)$.

Etická komise a informovaný souhlas

Studie byla schválena Etickou komisí 1. LF UK a všechny vyšetřované osoby podepsaly před vstupem do studie informovaný souhlas.

4.1.4. VÝSLEDKY

A. Skupina osob s profesionálním bronchiálním astmatem a zdravých dobrovolníků

U zdravých osob bylo rozmezí hodnot LTB_4 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.

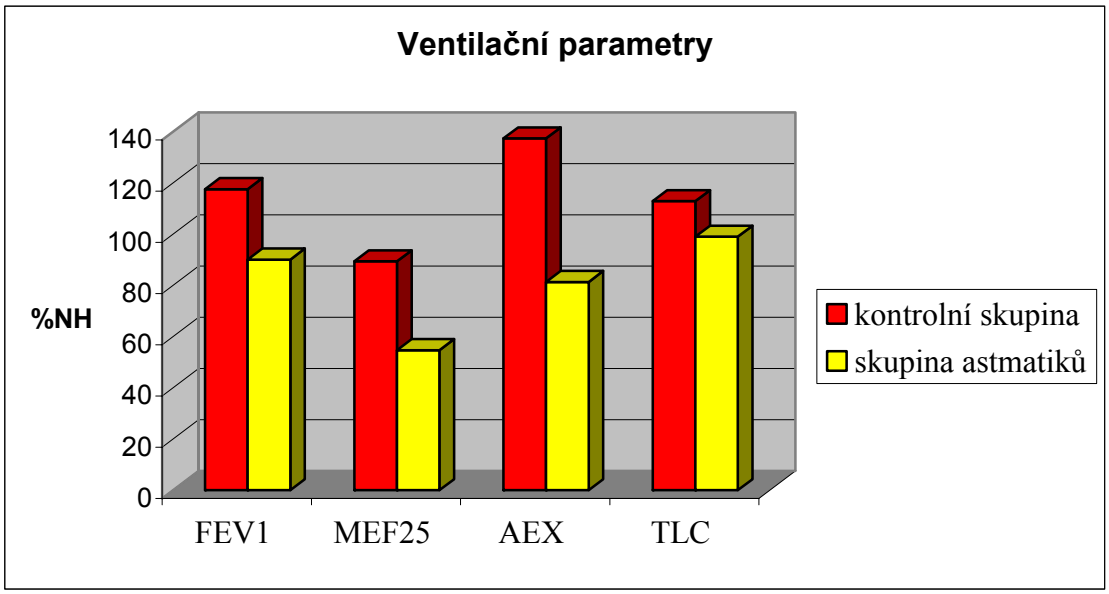
Průměrné hodnoty LTB_4, LTD_4 a LTE_4 byly vyšší ve skupině zdravých osob (významně však jen pro LTB_4 p=0,0002) než ve skupině osob s profesionálním astmatem. LTC_4 a 8-izoprostan byly oproti tomu vyšší ve skupině astmatiků (významně jen pro LTC_4 p=0,0010). Všechny sledované ventilační parametry byly významně nižší ve skupině osob s profesionálním astmatem (FEV_1, MEF_{25}, AEX, R_{tot} p<0,0001, TLC p=0,0006) (tabulka č. 6, graf č. 1 a 2).

Nebyla nalezena významná korelace mezi sledovanými ventilačními parametry a koncentracemi leukotrienů či 8-izoprostanu a to ani ve skupině zdravých osob, ani ve skupině osob s profesionálním astmatem.

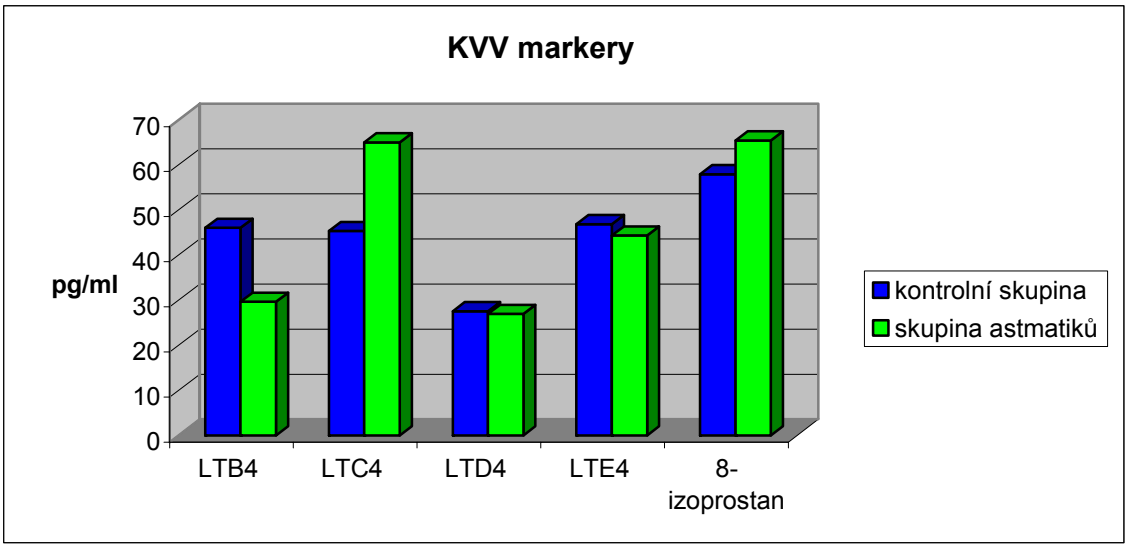
Tab. 6. Průměrné hodnoty a SD vybraných ventilačních parametrů a KVV markerů u skupiny zdravých dobrovolníků a osob s profesionálním bronchiálním astmatem

		Zdravé osoby	Osoby s bronchiálním astmatem	p-hodnota
FEV_1 (SD)	%NH	117,6 (15,5)	90,1 (20,4)	< 0,0001
MEF_{25} (SD)	%NH	89,4 (32,4)	54,7 (18,1)	< 0,0001
AEX (SD)	%NH	137,4 (41,1)	81,3 (42,5)	< 0,0001
R_{tot} (SD)	kPa*s/l	0,19 (0,08)	0,33 (0,15)	< 0,0001
TLC (SD)	%NH	112,9 (17,8)	99,0 (14,0)	0,0006
LTB_4 (SD)	pg/ml	46,0 (18,9)	29,6 (15,2)	0,0002
LTC_4 (SD)	pg/ml	45,3 (24,9)	65,0 (22,9)	0,0010
LTD_4 (SD)	pg/ml	27,5 (11,7)	26,9 (14,3)	0,8267
LTE_4 (SD)	pg/ml	46,8 (20,7)	44,3 (26,3)	0,6592
8-izoprostan (SD)	pg/ml	57,9 (36,3)	65,4 (26,2)	0,3309

Graf 1. Vybrané ventilační parametry u kontrolní skupiny a skupiny osob s profesionálním astmatem



Graf 2. LTB_4, cys-LT a 8-izoprostan v KVV kontrolní skupiny a skupiny pacientů s profesionálním astmatem



B. Sledování 24-hodinové variability leukotrienů a 8-izoprostanu u osob vyšetřovaných pro podezření na profesionální onemocnění dýchacích cest (v klidu bez provokace alergenem)

U 57 osob bylo provedeno celkem 58 měření (1 osoba byla během 3 let průběhu výzkumu hospitalizována na naší klinice 2x) 24-hodinové variability markerů v KVV bez provokace alergenem. V tabulkách č. 7 a 8 (znázorněno graficky v grafech č. 3 a 4) jsou uvedeny průměrné hodnoty parametrů měřených 4 x během 24 hodin v klidu (*měření 1* - mezi 7:00 a 10:15 h, *měření 2* - mezi 10:30 a 14 h, *měření 3* - mezi 13:30 a 17:30 h, *měření 4* - mezi 7:00 a 10:15 h následující den) a v tabulce č. 9 variační koeficienty jednotlivých KVV markerů. Osoby byly rozděleny do 2 skupin podle objektivního nálezu nespecifické bronchiální hyperrektivity na bronchiální hyperreaktory a bronchiální non-hyperreaktory.

Hodnoty sledovaných KVV markerů se poněkud lišily (ne však významně) v markeru LTC_4, kdy se u bronchiálních hyperreaktorů průměrné hodnoty pohybovaly v rozmezí 60,8 až 70,0 pg/ml a u bronchiální non-hyperreaktorů v rozmezí 48,4-57,5 pg/ml. Při statistickém zpracování se však variační koeficient se mezi skupinami bronchiálních hyperreaktorů a non-hyperreaktorů významně nelišil (tabulka č. 9).

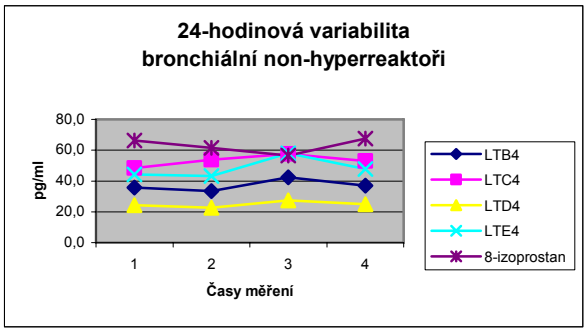
Tab. 7. Výsledky (průměrné hodnoty a SD) jednotlivých parametrů při 24-hodinovém měření v klidu - skupina bronchiálních non-hyperreaktorů

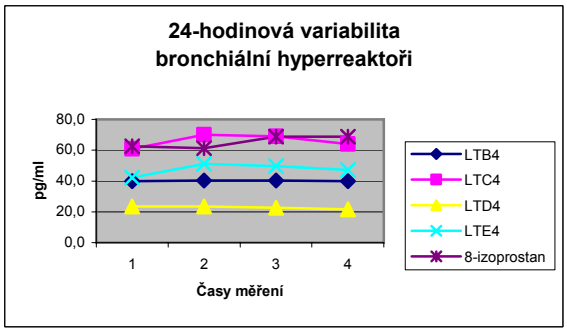
		Měření 1	**Měření 2**	**Měření 3**	**Měření 4**
FEV_1 (SD)	%NH	106,72 (18,11)	105,93 (17,29)	106,08 (16,25)	106,35 (14,56)
MEF_{25} (SD)	%NH	68,27 (25,45)	67,87 (27,91)	67,30 (22,81)	72,30 (26,30)
AEX (SD)	%NH	112,70 (33,68)	110,57 (33,50)	109,61 (30,30)	111,51 (28,61)
R_{tot} (SD)	kPa*s/l	0,24 (0,08)	0,23 (0,07)	0,24 (0,07)	0,24 (0,07)
LTB_4 (SD)	pg/ml	35,8 (17,1)	33,5 (16,2)	42,4 (15,6)	36,9 (13,1)
LTC_4 (SD)	pg/ml	48,4 (19,8)	53,9 (20,8)	57,5 (17,5)	53,0 (17,6)
LTD_4 (SD)	pg/ml	24,3 (8,4)	22,7 (10,2)	27,5 (10,9)	25,0 (9,8)
LTE_4 (SD)	pg/ml	44,3 (19,8)	43,2 (19,9)	58,0 (24,6)	47,8 (24,7)
8-izoprostan (SD)	pg/ml	66,2 (31,1)	61,5 (24,8)	56,6 (27,0)	67,5 (30,4)

Tab. 8. Výsledky (průměrné hodnoty a SD) jednotlivých parametrů při 24-hodinovém měření v klidu- skupina bronchiální hyperreaktorů

		Měření 1	**Měření 2**	**Měření 3**	**Měření 4**
FEV_1 (SD)	%NH	94,22 (16,70)	93,08 (16,30)	91,95 (14,89)	92,98 (14,62)
MEF_{25} (SD)	%NH	59,19 (27,60)	54,11 (21,58)	51,77 (22,48)	53,54 (23,59)
AEX (SD)	%NH	88,34 (35,99)	86,87 (35,05)	84,63 (31,69)	86,56 (31,65)
R_{tot} (SD)	kPa*s/l	0,37 (0,21)	0,35 (0,17)	0,37 (0,22)	0,37 (0,20)
LTB_4 (SD)	pg/ml	39,8 (13,5)	40,3 (14,7)	40,3 (13,2)	39,9 (14,3)
LTC_4 (SD)	pg/ml	60,8 (31,9)	70,0 (26,5)	68,9 (26,3)	63,9 (26,4)
LTD_4 (SD)	pg/ml	23,4 (14,3)	23,5 (10,9)	22,7 (7,4)	21,6 (10,0)
LTE_4 (SD)	pg/ml	42,1 (21,6)	51,1 (26,4)	49,7 (27,0)	47,2 (23,3)
8-izoprostan (SD)	pg/ml	62,5 (23,1)	61,2 (24,8)	68,8 (26,7)	68,7 (25,8)

Graf 3, 4. Výsledky 24-hodinového měření markerů v KVV bez provokace – grafické znázornění





Tab. 9. Variační koeficienty markerů v KVV, rozděleno na skupiny podle bronchiální hyperreaktivity

		Bronchiální non-hyperreaktoři	**Bronchiální hyperreaktoři**	**p-hodnota**
LTB_4	%	23,61	19,29	0,2250
LTC_4	%	20,66	22,00	0,7517
LTD_4	%	28,03	26,73	0,7935
LTE_4	%	28,93	26,00	0,5228
8-izoprostan	%	23,71	19,49	0,2176

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

U 47 osob byly provedeny specifické bronchoprovokační testy a sledování markerů v KVV a ventilačních parametrů v klidu bez provokace s alergenem. Z nich čtyřicet jeden test s alergenem byl zhodnocen dle výsledků ventilačních parametrů (podmínky viz metodika) jako negativní, a 6 testů bylo uzavřeno jako pozitivní bronchoprovokační odpověď na testovaný alergen. Výsledky jsou tedy rozděleny do dvou skupin: osoby s negativním výsledným provokačním testem a osoby s pozitivním provokačním testem

Osoby s negativním provokačním testem

a) Sledování denní variability v klidu (bez provokace alergenem)

V tabulce č. 10 jsou uvedeny průměrné hodnoty ventilačního parametru FEV_1 a markerů v KVV v klidu bez provokace s alergenem- celkem 4 měření (1. měření mezi 7:00 a 10:15 h, 2. měření mezi 10:30 a 14 h, 3. měření mezi 13:30 a 17:30 h, 4. měření mezi 7:00 a 10:15 h následující den).

Tab. 10. Průměrné hodnoty parametru FEV_1 a markerů v KVV v klidu bez provokace s alergenem u osob s následným negativním provokačním testem

		Čas 1	Čas 2	Čas 3	Čas 4
FEV_1 (SD)	%NH	98,0 (16,5)	97,5 (16,2)	97,1 (15,2)	97,4 (14,0)
LTB_4 (SD)	pg/ml	39,2 (15,0)	35,2 (14,4)	39,7 (13,7)	37,6 (11,0)
LTC_4 (SD)	pg/ml	56,7 (21,9)	64,7 (28,4)	65,8 (25,1)	64,3 (25,1)
LTD_4 (SD)	pg/ml	24,9 (13,6)	23,2 (11,3)	24,5 (9,4)	22,5 (10,5)
LTE_4 (SD)	pg/ml	41,8 (19,9)	45,8 (23,4)	50,3 (21,8)	45,2 (22,9)
8-izoprostan (SD)	pg/ml	69,4 (27,2)	61,7 (24,6)	65,2 (26,7)	73,8 (27,4)

Byla provedena statistická analýza (modifikace testu ANOVA) s logaritmicky transformovanými hodnotami FEV_1 a markerů v KVV s časovým faktorem. Mezi uvedenými 4 časovými intervaly byl nalezen statisticky významný rozdíl pro parametr 8-izoprostan ($p=0,0138$). Pro ostatní parametry byly změny nevýznamné: FEV_1 $p=0,6340$, LTB_4 $p=0,1185$, LTC_4 $p=0,0889$, LTD_4 $p=0,4027$, LTE_4 $p=0,0504$.

Při testování korelace mezi ventilačním parametrem FEV_1 a markery v KVV nebyl nalezen statisticky významný vztah mezi transformovanými poměry markerů v KVV a FEV_1.

b) Sledování KVV markerů během negativních bronchoprovokačních testů s alergenem

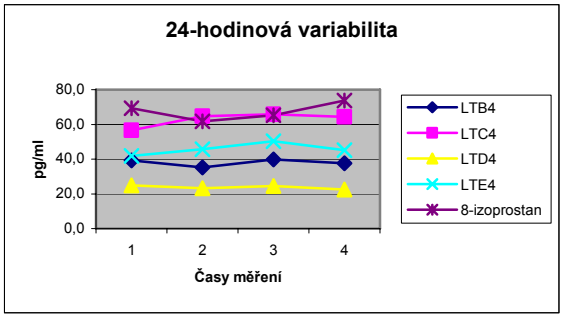
V tabulce č. 11 jsou uvedeny průměrné hodnoty ventilačního parametru FEV_1 a KVV markerů sledovaných během negativních bronchoprovokačních testů s alergenem (před specifickým bronchoprovokačním testem a ihned po testu, za 2 h, za 5 h a za 24 h po testu).

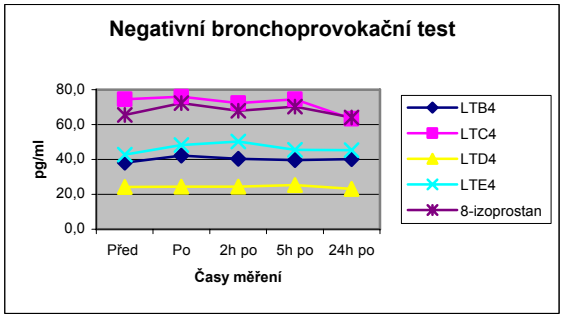
Tab. 11. Průměrné hodnoty a SD parametru FEV_1 a KVV markerů sledovaných během negativních bronchoprovokačních testů s alergenem

		Před testem	Po testu	2 h po testu	5 h po testu	24 h po testu
FEV_1 (SD)	%NH	95,3 (19,5)	94,7 (20,0)	94,5 (19,2)	94,6 (19,4)	94,7 (17,2)
LTB_4 (SD)	pg/ml	38,1 (19,2)	42,3 (21,0)	40,4 (19,2)	39,7 (16,1)	40,3 (17,3)
LTC_4 (SD)	pg/ml	74,4 (51,5)	76,0 (48,7)	72,3 (37,7)	74,4 (38,6)	63,3 (25,0)
LTD_4 (SD)	pg/ml	24,3 (11,8)	24,4 (10,5)	24,4 (9,2)	25,3 (15,4)	23,2 (10,5)
LTE_4 (SD)	pg/ml	42,8 (22,4)	48,2 (30,4)	50,3 (27,0)	45,5 (25,2)	45,3 (22,0)
8-izoprostan (SD)	pg/ml	65,5 (24,4)	72,3 (28,3)	67,8 (34,0)	70,2 (30,6)	64,1 (24,0)

Byla provedena analýza (modifikace testu ANOVA) s logaritmicky transformovanými hodnotami FEV_1 a KVV markerů s časovým faktorem. Mezi uvedenými 5 časovými intervaly nebyla nalezena statisticky významná změna: FEV_1 p=0,7610, LTB_4 p=0,4716, LTC_4 p=0,0556, LTD_4 p=0,9030, LTE_4 p=0,5365 a 8-izoprostan p=0,3110. Mezi transformovanými poměry KVV parametrů a FEV_1 byla nalezena významnost jen pro LTB_4 (p=0.0299) mezi intervaly před testem a za 5 h po testu. Průměrné hodnoty leukotrienů a 8-izoprostanu v KVV v klidu a po provokaci alergenem jsou znázorněny v grafech č. 5 a 6.

Graf 5, 6. Průměrné hodnoty leukotrienů a 8-izoprostanu v KVV v klidu a po provokaci alergenem - negativní výsledek testu





Osoby s pozitivním provokačním testem

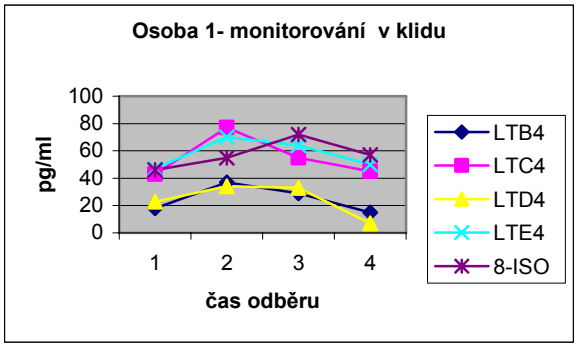
Šest provedených bronchoprovokačních testů s profesionálními alergeny bylo vyhodnoceno jako pozitivní z hlediska bronchomotoriky (testy splňovaly požadavek poklesu parametru FEV_1 o 20 % vzhledem k hodnotě naměřené před testem, případně pokles FEV_1 alespoň o 15 % spolu s poklesem některého z vedlejších parametrů - MEF_{25-75} o 30 % či vzestup R_{tot} o 70 % v průběhu 24 h po testu). U 3 osob se objevila bronchokonstrikce ihned po testu (alergeny: žitná mouka, tvrdidlo s pastou, molitan s lepidlem), u 3 osob se objevila bronchokontrikce po 5 h po expozici alergenu (vše jako reakce na nízkomolekulární alergeny: tavidlo, izokyanát, polyuretan s lepidlem) (tabulka č. 12). Počet osob s pozitivním provokačním testem byl malý (6), proto nebylo provedeno statistické zpracování a data byla zhodnocena pouze vizuálně s přihlédnutím k průběhu reakce. Koncentrace KVV markerů jsou vyznačeny v grafech č. 7-18, změny parametru FEV_1 v grafech č. 19-22.

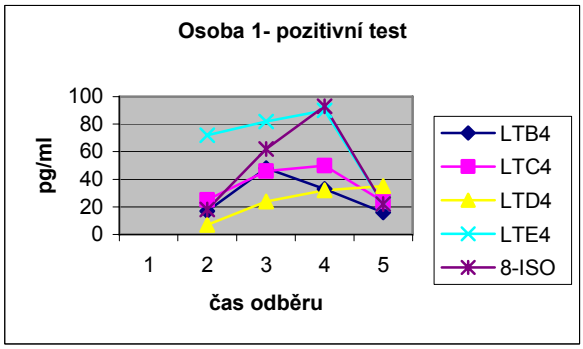
Tab. 12. Alergeny s pozitivní reakcí a průběh alergické odpovědi

Osoba	Alergeny s pozitivní reakcí	Typ astmatické reakce	Maximální zaznamenaný pokles FEV_1 v %
1	žitná mouka	časná (ihned po testu)	42,5
2	molitan s lepidlem	časná (ihned a za 2 h po testu)	23,7 a 23,1
3	tvrdidlo s pastou	časná (ihned po testu)	20,0
4	tavidlo	pozdní (za 5 h po testu)	21,6
5	4,4´diizokyanát a polyol 23	pozdní (za 5 h po testu)	18,8
6	polyuretan a lepidlo	pozdní (za 5 h po testu)	19,5

Osoba 1: V klidu byla pozorována tendence k nárůstu koncentrace KVV markerů v době poledne a pozdního odpoledne. Během pozitivního testu s profesionálním alergenem (časná reakce) se objevil nárůst LTC_4, D_4, E_4 a 8-izoprostanu 2 h po testu a 5 h po testu, u LTB_4 jen 2 h po testu.

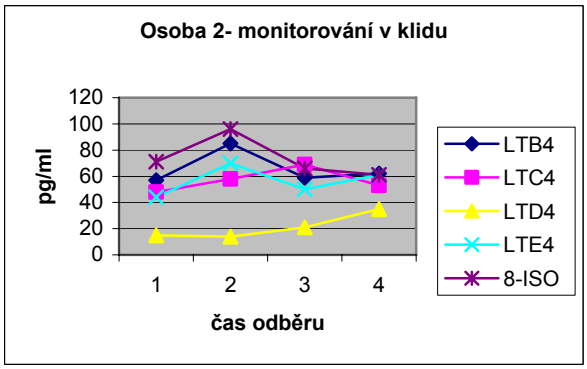
Graf 7, 8. Osoba 1- grafické znázornění (časná reakce- bod 2 pozitivního testu)

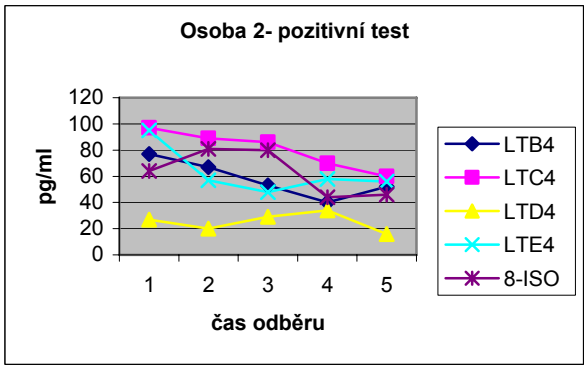




Osoba 2: V klidu byla pozorována tendence k nárůstu koncentrace KVV parametrů v době poledne (LTB_4, E_4, C_4, 8-izoprostan) a pozdního odpoledne (LTC_4). Během pozitivního testu s profesionálním alergenem (časná reakce) byl patrný nárůst 8-izoprostanu ihned a 2 h po testu.

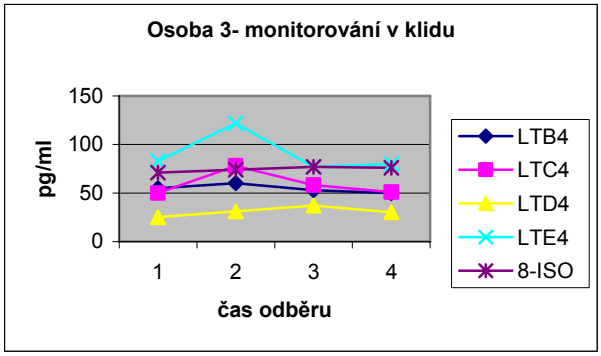
Graf 9, 10. Osoba 2- grafické znázornění (časná reakce- bod 2,3 pozitivního testu)

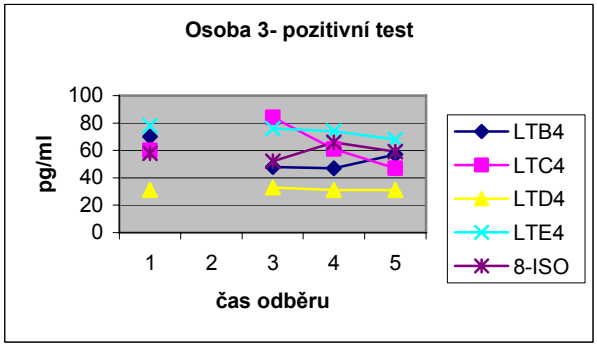




Osoba 3: V klidu byla tendence k nárůstu LTC_4 a LTE_4 při poledním měření. Během pozitivního testu s profesionálním alergenem (časná reakce) byl nárůst LTC_4 za 2 h po testu.

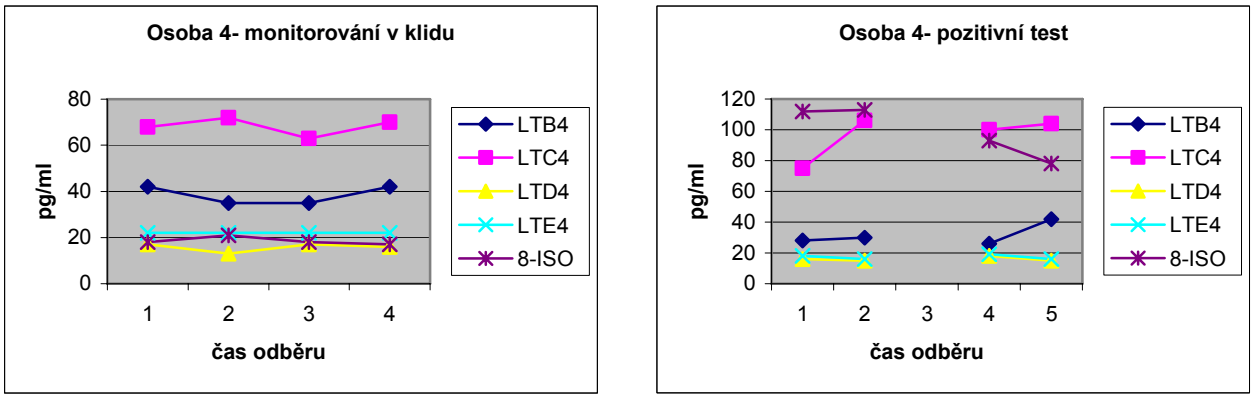
Graf 11, 12. Osoba 3- grafické znázornění (časná reakce- bod 2 pozitivního testu)





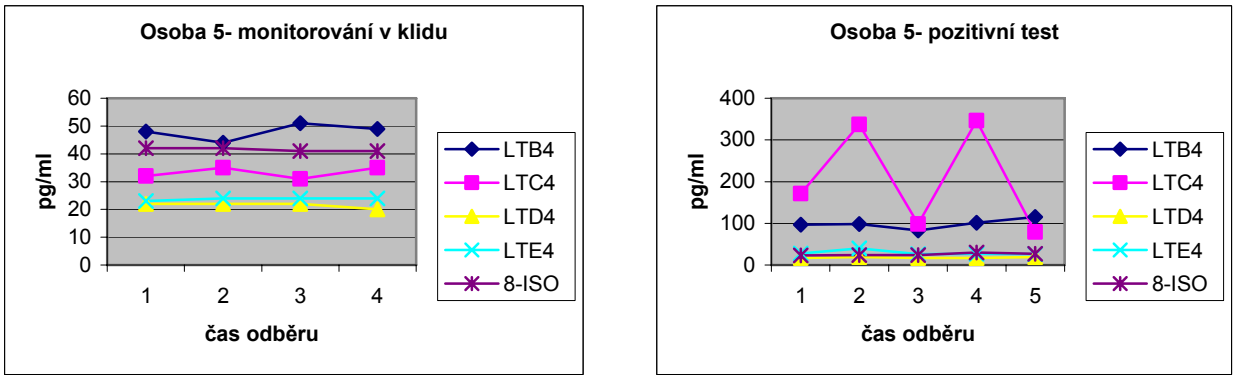
Osoba 4: V klidu nebyla výrazná fluktuace v hladinách KVV markerů. Během pozitivního testu (pozdní reakce) byl nárůst LTC_4 ihned po testu, hodnota 8- izoprostanu byla vysoká (oproti hodnotám naměřeným v klidu) po celou dobu testu.

Graf 13, 14. Osoba 4- grafické znázornění (pozdní reakce- bod 4 pozitivního testu)



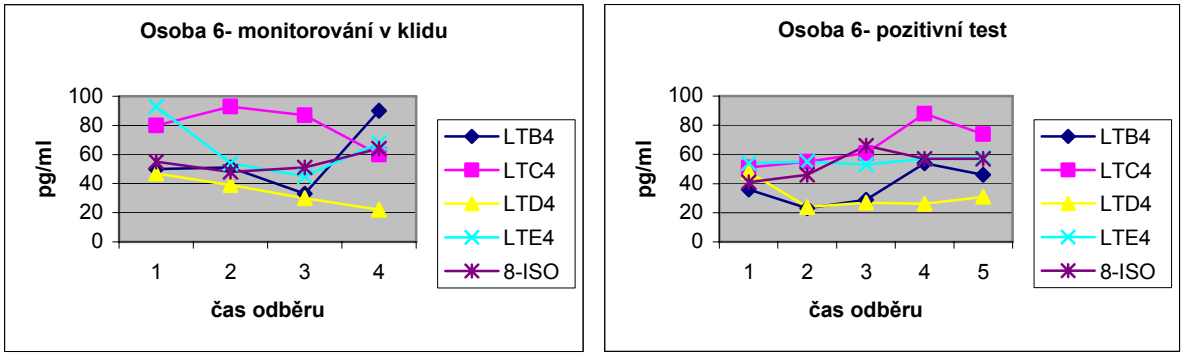
Osoba 5: V klidu nebyla výrazná fluktuace v hladinách KVV markerů. Během pozitivního testu (pozdní reakce) byl nárůst LTC_4 ihned po testu a 5 hodin po testu, hodnota LTB_4 byla vysoká (oproti hodnotám naměřeným v klidu) po celou dobu testu.

Graf 15, 16. Osoba 5- grafické znázornění (pozdní reakce- bod 4 pozitivního testu)

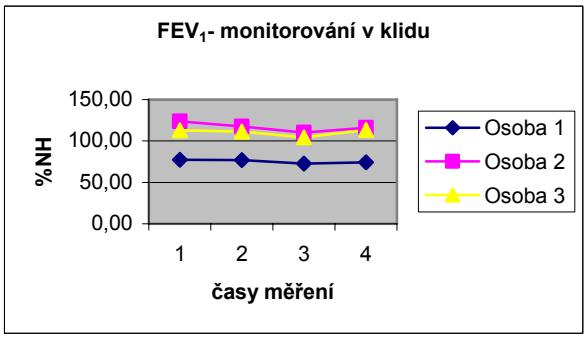


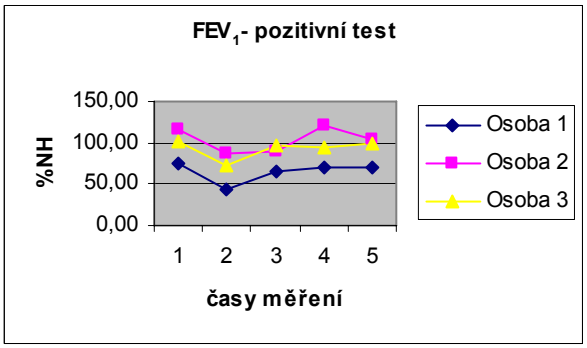
Osoba 6: V klidu byla zaznamenána fluktuace v hladinách všech KVV markerů. Během pozitivního testu byl nárůst LTC_4 a LTB_4 v době maximální zaznamenané bronchokonstrikce (5h po testu), 8-izoprostan byl zvýšený 2h po testu.

Graf 17, 18. Osoba 6- grafické znázornění (pozdní reakce- bod 4 pozitivního testu)

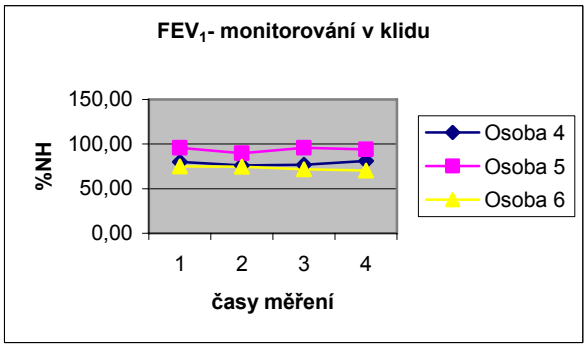


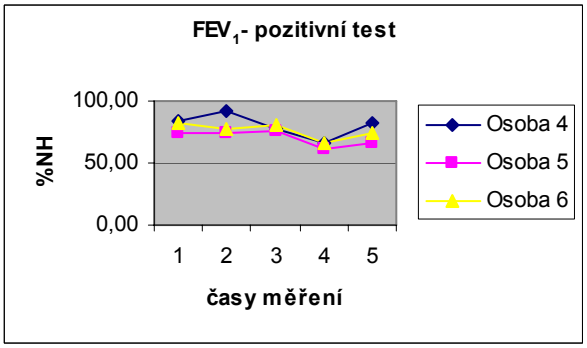
Graf 19, 20. Změny ventilačního parametru FEV_1 u osob s časnou astmatickou reakcí (monitorování v klidu a během pozitivního testu)





Graf 21, 22. Změny ventilačního parametru FEV_1 u osob s pozdní astmatickou reakcí (monitorování v klidu a během pozitivního testu)





Poznámky:
chybějící hodnoty: porucha analytického přístroje

Časy odběru KVV- monitorování v klidu: čas 1 - mezi 7:00 a 10:15 h, čas 2 - mezi 10:30 a 14 h, čas 3 - mezi 13:30 a 17:30 h, čas 4 - mezi 7:00 a 10:15 h následující den, pozitivní test: čas 1 - před specifickým bronchoprovokačním testem, čas 2 - ihned po testu, čas 3 - za 2 h, čas 4 - za 5 h, čas 5 - za 24 h po testu

4.1.5. DISKUZE

Analytická metoda

Klíčovou částí vyšetření kondenzátu vydechovaného vzduchu bylo nalezení optimální analytické metody, která umožnila detekci jednotlivých cys-LT, které byly až dosud ve většině studií zabývajících se analýzou KVV uváděny jako suma cys-LT (LTC_4, LTD_4 a LTE_4 dohromady). Tato analytická metoda byla vyvíjena na Vysoké škole chemicko-technologické. Byla nutná úzká spolupráce mezi naší klinickou skupinou (která zajišťovala odběr vzorků a jejich skladování) a skupinou chemickou, která zajišťovala zpracování a analýzu vzorků. K analýze byla (vzhledem k charakteru sledovaných látek - polární málo stabilní látky) zvolena metoda LC/MS. Tato metoda je vysoce citlivá, selektivní a s nízkým rizikem degradace látek během analytického procesu (*Kačer 2004a, Kačer 2004b, Lebedová 2007*).

Vzhledem k již uvedenému faktu nízké stability sledovaných látek, bylo nutné najít vhodný vnitřní standard, který by bylo možné přidat do odebraného vzorku a jehož charakter by odpovídal sledovaným parametrům. Důležitost vhodného vnitřního standardu uvádějí ve svých studiích např. Montuschi (*2005*) a Čáp (*2004*). Jako vhodný standard byl vybrán přídavek deuterovaných analog uvedených markerů. Byla použita deuterovaná analoga (d_3, případně d_4), která byla optimální z hlediska chování v hmotnostním spektrometru (*Kačer 2004a, Kačer 2004b*).

Srovnání markerů v KVV u skupiny osob s profesionálním bronchiálním astmatem a skupiny zdravých dobrovolníků

Tato část studie se zabývala srovnáním koncentrací leukotrienů a 8-izoprostanu mezi skupinou zdravých osob a osob, u nichž bylo již v minulosti diagnostikováno profesionální bronchiální astma na základě provokačních testů s profesionálními alergeny.

Spektrum astmatiků bylo od intermitentního astmatu po středně těžké perzistující astma (*Lebedová 2007*). Předpokládali jsme, že ve skupině astmatiků budou vyšší hodnoty leukotrienů v KVV než ve skupině zdravých osob. Zvýšený LTB_4 a cys-LT v KVV u astmatiků oproti zdravým osobám popsali Hanazawa a kol. (*2000b*), cysteinylové leukotrieny byly vyšší u astmatiků (oproti zdravým osobám) také ve studii Antzaka a kol. (*2002*). Montuschi a kol. *(2003*) popsali zvýšenou koncentraci LTB_4 u kortikosteroidy léčených i neléčených pacientů s CHOPN, kteří byli exkuřáky, ve srovnání se zdravými osobami.

Dvacet devět osob (tj. 90,6 %) z naší skupiny s profesionálním astmatem bylo léčeno inhalačními kortikosteroidy. Sledovali jsme rovněž, zda bude koncentrace leukotrienů u astmatiků ovlivněna léčbou, kterou jim nebylo možno přestat podávat.

V naší skupině astmatiků byly zjištěny významně vyšší hodnoty LTC_4 než ve skupině zdravých osob, u 8-izoprostanu byly průměrné hodnoty ve skupině astmatiků poněkud vyšší než u zdravých osob, avšak rozdíl nebyl statisticky významný. Naproti tomu ve skupině zdravých osob byly významně vyšší koncentrace LTB_4 proti skupině astmatiků.

Důvodem nižších koncentrací některých leukotrienů ve skupině astmatiků (proti zdravým dobrovolníkům) může být jejich léčba kortikosteroidy, i když i tady se údaje různých studií liší. Podobné výsledky jako naše přinesla studie Baraldiho (*2003*), který u dětí s exacerbací astmatu léčených perorálními kortikosteroidy popsal nižší koncentrace cys-LT v KVV. Také Antczak (*2002*) popsal podobné výsledky u osob s aspirin senzitivním astmatem léčených kortikosteroidy. Naproti tomu Mondino *(2004)* našla u atopických astmatických dětí (neléčených i léčených kortikosteroidy) významně vyšší koncentrace LTE_4 a LTB_4 ve srovnání se zdravými kontrolními osobami, což na druhou stranu ukazuje možnou nezávislost koncentrací těchto markerů na léčbě steroidy. Ve studiii Čápa (*2004*) byly hodnoty LTD_4, LTE_4 a LTB_4 zvýšeny u dospělých i dětských astmatiků s lehkým až středně těžkým astmatem léčených kortikosteroidy oproti zdravým osobám.

Montuschi (*1999*) uvádí vyšší koncentrace 8-izoprostanu u osob se středně těžkým i těžkým astmatem i přes léčbu orálními či vysokými dávkami inhalačních kortikosteroidů, což by mohlo dokazovat, že 8-izoprostan je relativně rezistentní oproti kortikosteroidům (*Montuschi 2007*). Oproti tomu Antzak a kol. (*2002*) zjistili, že pacienti s aspirin senzitivním astmatem, kteří nebyli léčeni kortikosteroidy, měli proti pacientům s aspirin-senzitivním astmatem vyšší hodnoty 8-izoprostanu v KVV. To by mohlo ukazovat na to, že efekt glukokortikoidní léčby by mohl být závislý na fenotypu nebo stupni zánětu (*Montuschi 2007*).

U dětí byly koncentrace 8-izoprostanu zvýšené jak ve skupinách užívající inhalační kortikosteroidy, tak ve skupině bez léčby kortikosteroidy (*Baraldi 2003a, Mondino 2004, Shahid 2005*). Baraldi (*2003b*) ve své studii popsal snížení koncentrace 8-izoprostanu u dětí s exacerbací astmatu po podání orálních kortikosteroidů. Avšak studie Mondino (*2004*) neprokázala vliv léčby flutikazonem v dávce 100 μg dvakrát denně po dobu 4 týdnů na koncentraci 8-izoprostanu (*Montuschi 2007*).

Významně zvýšený byl ve skupině astmatiků oproti kontrolám pouze LTC_4. To naznačuje jeho možné vhodné využití ve sledování vývoje a přetrvávání astmatu. Měření tohoto leukotrienu umožnila nově vyvinutá vysoce citlivá analytická metoda. Problémem však zůstává nízká stabilita uvedeného leukotrienu. K analýze leukotrienů je ve většině studií používána imunoanalýza a cys-LT jsou uváděny jako suma LTC_4, LTD_4 a LTE_4. Naše studie patří proto k těm, které přinášejí nové informace o LTC_4, neboť je zřejmý nedostatek studií, které se jeho stanovováním zabývají.

Ve studiích používající jako analytickou metodu imunoanalýzu (EIA) se hodnoty LTB_4 u zdravých osob pohybovaly v rozmezí 0-220 pg/ml, cys-LT 0-25 pg/ml a 8-izoprostanu 0-40 pg/ml (*Horváth 2005*). V naší skupině zdravých osob se hodnoty LTB_4 pohybovaly mezi 15-95 pg/ml, koncentrace cys-LT jsme díky analytické metodě mohli sledovat jednotlivě, jejich hodnoty byly v rozmezí 7-167 pg/ml, 8-izoprostan 16-222 pg/ml. Vyšší hodnoty cys-LT v naší skupině zdravých osob mohly být způsobeny jak odlišnou použitou analytickou metodou, tak rozdílným spektrem osob. Studie, které by sledovaly, zda se hodnoty LT a 8-izoprostanu mění v závislosti na věku a pohlaví chybí. Sledování bylo však prováděno například pro peroxid vodíků (H_2O_2), kdy bylo zjištěno, že marker není závislý na věku u dětí, avšak u dospělých byly hodnoty starších osob vyšší než mladších. Oproti tomu tělesná váha a výška neovlivňovala objem KVV ani koncentraci H_2O_2 (*Horváth 2005*). Nabízí se také možnost kontaminace vzorků slinami (kde se sledované látky ve větším množství nacházejí). Naše vzorky však byly testovány na přítomnost slinné α-amylázy a ty, kde byla α-amyláza detekována, byly ze závěrečného zpracování vyřazeny.

Sledovali jsme také, zda existuje korelace mezi ventilačními parametry a leukotrieny nebo 8-izoprostanem v KVV. Korelaci se však nepodařilo prokázat, stejně jako ve studii Montuschiho (*1999*).

Ve skupině astmatiků byly sledované ventilační parametry významně nižší než ve skupině zdravých osob, což potvrzuje přítomnost obstrukce v dýchacích cestách astmatiků.

<u>Sledování 24-hodinové varibility leukotrienů a 8-izoprostanu v KVV u osob hospitalizovaných pro podezření na profesionální bronchiální astma či rinitidu</u>

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. Při rozdělení dle přítomnosti nespecifické bronchiální hyperreaktivity na dvě podkupiny se však jejich variační koeficienty získané výpočtem ze 4 měření během 24 hodin významně nelišily.

Bohužel údaje o opakovaném měření leukotrienů v kondenzátu vydechovaného vzduchu během 24 hodin (diurnální variabilita) či několika po sobě následujích dnech jsou dnes v literatuře poměrně málo zastoupeny. Nejčastěji je u sledovaných osob uváděn pouze jeden denní odběr.

Diurnální variabilita byla však sledována u LTE_4 vylučovaného jako hlavní metabolit cysteinylové řady leukotrienů do moči. Wenzel (*1995*) prováděl dva odběry moči pro měření koncentrace LTE_4 během 24 hodin - ve 4 h ráno a v 16 h odpoledne. Ranní hodnoty LTE_4 a LTB_4 byly u astmatiků s noční exacerbací astmatu významně vyšší než u zdravých osob, v odpoledních hodnotách významné rozdíly nebyly.

Asano (*1995*) měřil LTE_4 v moči u astmatiků a zdravých osob v 6-hodinových intervalech ve čtyřech po sobě jdoucích dnech. Získané koncentrace LTE_4 byly také vyšší u astmatiků než u zdravých osob, ale zvýšená cirkadiánní variabilita nebyla prokázána ani v jedné ze skupin. Nebyl zjištěn ani významný rozdíl v mezidenní variabilitě LTE_4. Při srovnání variačních koeficientů při 24-hodinovém měření byl významný rozdíl mezi skupinou astmatiků (43,7 %) ve srovnání se zdravými osobami (29,9 %). Tyto variační koeficienty jsou značně vyšší než koeficienty zjištěné při našem sledování leukotrienů v KVV.

Bellia (*1996*) sledoval LTE_4 v moči u zdravých osob a astmatiků s nočními exacerbacemi astmatu a bez nočních exacerbací. Provedena byla 3 měření během 24 hodin (v intervalech 9-15 h, 15-21 h, 21-9 h). Mezi hodnotami LTE_4 zdravých osob a astmatiky bez nočních exacerbací se v této studii významné rozdíly nepodařilo prokázat. Koncentrace LTE_4 měřené v nočních hodinách u astmatiků s nočními exacerbacemi astmatu byly významně vyšší v porovnání se zdravými osobami a s astmatiky bez nočních exacerbací.

Oproti tomu Kurokawa (*2001*), který sledoval koncentraci LTE_4 v 3-hodinových intervalech během 24 hodin u zdravých osob a astmatiků s nočními exacerbacemi astmatu a bez nočních exacerbací, zaznamenal cirkadiánní variabilitu ve skupině zdravých osob a astmatiků s nočními exacerbacemi astmatu s maximem v ranních hodinách (mezi 3. a 6. hodinou ranní). U astmatiků s nočními exacerbacemi astmatu byl zaznamenán ještě jeden menší nárůst v době mezi 6. a 9. hodinou ranní. Limitujím faktem uvedených studií je poměrně malý počet zařazených osob ve skupinách (5 až 12). Z uvedených studií vyplývá, že výsledky měření diurnální variability leukotrienů u zdravých osob i u astmatiků jsou značně rozdílné.

V našich skupinách byly u bronchiálních non-hyperreaktorů nejvyšší hodnoty leukotrienů zaznamenány mezi 13.30 a 17.00 hodinou, hodnoty 8-izoprostanu byly v tuto dobu naopak nejnižší. Ve skupině bronchiálních hyperreaktorů byl výraznější nárůst zaznamenán pouze pro LTC_4 v době mezi 10.30 a 17.30 hodin. U skupiny bronchiálních hyperreaktorů byla patrně variabilita ovlivněna různou mírou kontroly astmatu a stability ventilačních parametrů. Zvýšené hodnoty markerů v KVV v ranních hodinách (jako ve studii Kurokawy) 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.

Skupina osob vyšetřených pro podezření na profesionální bronchiální astma

Tato část studie byla zaměřena na sledování koncentrací leukotrienů a 8-izoprostanu v kondenzátu vydechovaného vzduchu během bronchoprovokačních testů s profesionálními alergeny. Jak již bylo uvedeno, koncentrace těchto markerů byly měřeny u stejných osob také v klidu v průběhu 24 h bez provokace.

Významné změny v markerech KVV u osob s následně negativním bronchoprovokačním testem s profesionálním alergenem byly během sledování v klidu bez provokace nalezeny pouze pro 8-izoprostan. U stejných osob během negativního bronchoprovokačního testu významné změny nalezeny nebyly. Během měření bez provokace alergenem nebyl nalezen významný vztah mezi logaritmicky transformovanými KVV

parametry a ventilačním parametrem FEV_1. V případě negativních bronchoprovokačních testů byl nalezen významný vztah mezi transformovanými parametry LTB_4 a FEV_1 pouze v intervalu před a 5 h po testu. Vzhledem k tomu, že mezi ostatními intervaly významnost nalezena nebyla, je tento nález pro klinické využití nevýznamný.

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, co rozdělilo již tak malou skupinu na další dvě podskupiny. Problémem byl také fakt, že testované alergeny se u všech šesti osob lišily, což je všeobecně problémem při hodnocení profesionálního astmatu, poněvadž existuje velké množství nox, které mohou profesionální astma způsobovat. Přínosem bylo, že u těchto šesti pacientů byly získány nejdříve i výsledky z 24 h monitorování změn markerů v KVV v klidu bez provokace. Bylo možné tedy alespoň částečně porovnat reakce ve srovnatelných časových intervalech.

V mnoha studiích byl detekován zvýšený LTE_4 v moči po bronchoprovokačních testech s alergeny. Koncentrace LTE_4 v moči byla monitorována během bronchoprovokačních testů s alergenem a po aplikaci aspirinu u aspirin senzitivních astmatiků. Po aplikaci alergenu bylo u atopických astmatiků zjištěno zvýšení koncentrace LTE_4 v moči (*Kumlin 1992*). Taylor (*Taylor 1989*) i Smith (*Smith 1991*) popsali zvýšení LTE_4 v moči během tří hodin po inhalaci alergenu. Manning (*Manning 1990*) sledoval koncentrace LTE_4 během časné i pozdní alergické odpovědi. U časné fáze stupeň bronchokonstrikce koreloval se zvýšením koncentrací LTE_4 v moči, během pozdní fáze k signifikantnímu zvýšení LTE_4 nedošlo. Oproti tomu O´Sullivan (*O´Sullivan 1998*) popsal zvýšení koncentrací LTE_4 v moči během časné i pozdní fáze alergické reakce po inhalaci alergenu. U aspirin senzitivních astmatiků bylo popsáno signifikantní zvýšení koncentrace LTE_4 v moči po aplikaci aspirinu oproti stavu před aplikací (*Christie 1991, Knapp 1992, Kumlin 1992*). Z uvedených studií tedy vyplývá, že po expozici alergenu došlo u většiny osob ke zvýšení LTE_4 v moči.

Hanazawa (*2000a*) našel zvýšené koncentrace cys-LT v KVV po aplikaci alergenu během pozdní astmatické reakce. Macfarlane (*2000*) popsala významné zvýšení cys-LT v indukovaném sputu u 14 osob s pozdní astmatickou reakcí po aplikaci alergenu, které korelovalo se zvýšením eozinofilů. Odběr indukovaného sputa byl v této studii proveden pouze jednorázově za 24 h po aplikaci alergenu. V naší skupině 6 testovaných osob s pozitivním provokačním testem byla zaznamenána tendence ke zvýšení LTC_4 v KVV po testu u 5 pacientů. Nárůst koncentrace ostatních markerů byl individuální u každého pacienta.

4.1.6. ZÁVĚR

Analýza kondenzátu vydechovaného vzduchu je progresivně se vyvíjející diagnostická metoda. Leukotrieny, jako markery obstrukce, je možné v KVV detekovat, což přináší další možnosti pro sledování i diagnostiku plicních onemocnění, neboť dosud bylo možné leukotrieny sledovat pouze v moči (což odráželo celkovou produkci v organismu), nebo v indukovaném sputu či tekutině získané při bronchoalveolární laváži. Množství leukotrienů obsažených v KVV jsou velmi malá (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 nejvíce používané imunologické metody, ale její výhodou je právě citlivost a přesnost. Analytická metoda přinesla novou možnost detekce jednotlivých cys-LT odděleně (C_4, D_4 a E_4). Jinak jsou tyto leukotrieny v převážné většině studií popisovány jako suma cys-LT (*Hanazawa 2000b, Antzak 2002, Baraldi 2003a*). Separovaná analýza přinesla problém nízké stability LTC_4 a LTD_4, což se podařilo vyřešit přidáním značených standardů. Odběr KVV je neinvazívní metoda (v kontrastu s invazívní

bronchoalveolární laváží či relativně neinvazívní indukcí sputa). Z tohoto důvodu má jistě velký potenciál jako diagnostická metoda do budoucnosti. Jako relativně nová metoda však zatím nedisponuje dostatečným množstvím informací z výzkumu a diagnostiky z hlediska profesionálního astmatu.

Srovnáním léčených astmatiků a zdravých osob byla zjištěna potenciální důležitost LTC_4 mezi cysteinylovými leukotrieny, který jako jediný ze sledovaných markerů v KVV byl významně vyšší ve skupině astmatiků i přes jejich léčbu, včetně kortikosteroidů (*Klusáčková 2007b*). Tento fakt se může ukázat jako velmi užitečný, poněvadž při sledování tohoto markeru by nebylo nutné přerušovat terapii kortikosteroidy před testování s alergeny na dobu 4-8 týdnů, jak je dosud běžné. Přínosnost sledování LTC_4 však musí být ověřena v dalších studiích a na větší skupině osob.

Nové informace přineslo sledování denní 24-hodinové variability vyšetřovaných KVV parametrů, které ukázalo poměrně velkou intraindividuální i interindividuální variabilitu sledovaných parametrů (*Klusáčková 2007c*). Je tedy zřejmé, že u astmatiků mohou být údaje z jednoho denního měření zavádějící (při nestabilním onemocnění). Pokud lze vyšetřovat (například z ekonomických důvodů) jen 1x v průběhu dne, měly by být vzorky od sledovaných osob odebírány standardně vždy ve stejnou dobu.

Změny sledované během specifických bronchoprovokačních testů s alergeny ukázaly, že studium leukotrienů a 8-izoprostanu během bronchoprovokačních testů může přinést mnoho zajímavých informací o podstatě dějů v dýchacích cestách. Výsledky negativních bronchoprovokačních výsledků ukázaly na nepřítomnost významných změn LT a 8-izoprostanu v KVV během testů. Počet provokačních testů, hodnocených jako pozitivní, byl relativně nízký, takže bylo možné jen srovnávat individuálně změny parametrů po provokačním testu vzhledem ke stavu bez provokace alergenem.

Naše pracoviště funguje jako superkonziliární pro převážnou část pracovišť v Čechách, proto se u nás koncentrují sporné případy k diagnostice profesionálního astmatu. Z tohoto důvodu je počet pozitivně diagnostikovaných případů profesionálního astmatu menší (převaha negativních testů), neboť ve většině případů se dosud dostupnými diagnostickými metodami nepodaří profesionální astma prokázat. Tento fakt také omezuje naše výzkumné možnosti týkající se pozitivních testů.

V oblasti analýzy a diagnostiky je nutná standardizace metod používaných pro odběry a stanovování markerů zánětu a oxidačního stresu v KVV, aby bylo možné údaje získané z jednotlivých studií srovnávat. Dosud existuje v oblasti výzkumu profesionálního astmatu velmi málo dat, které by nám toto srovnávání umožňovaly. V blízké budoucnosti se hodláme proto cíleně zaměřit na jeden profesionální alergen. Jako nejvhodnější se jeví pšeničná mouka, která je v České republice nejčastějším profesionálním inhalačním alergenem, který je navíc možno laboratorně připravit ve formě vhodné k inhalaci. Inhalace alergenu by umožnila odlišit reakci na alergen mouky od alergické reakce na roztoče, jimiž může být mouka v případě testování na pracovišti kontaminována**.**

4.1.7. VYUŽITÍ POZNATKŮ PRO PRAXI

Přímé využití získaných poznatků pro praxi je zatím omezené. Přínosem studie je nepochybně validace nové diagnostické metody, která by v budoucnu mohla být pro stanovování leukotrienů a 8-izoprostanu v KVV používána. Byl již naznačen směr, kam by další vývoj v oblasti diagnostiky a sledování vývoje astmatu mohl směřovat. Tím je v oblasti sledování kontroly a vývoje profesionálního astmatu LTC_4.

V oblasti diagnostiky profesionálního bronchiálního astmatu bude patrně nutný individuální přístup k hodnotám pacientů a sledování změn leukotrienů či 8-izoprostanu v KVV po expozici alergenům stejné skupiny.

4.2. INDUKOVANÉ SPUTUM

4.2.1. ÚVOD A SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉHO PROBLÉMU

Indukce sputa (navození tvorby sputa inhalací roztoků solí) není v oblasti medicíny ničím neznámým. Metodu používal již v padesátých letech 20. století Bickerman k získání sputa, které bylo následně využito v diagnostice plicních nádorů. V devadesátých letech 20. století metodu indukovaného sputa modifikovali Pin a Fahy a začalo využívání indukce sputa v diagnostice a léčbě bronchiálního astmatu (*Hargreave 1999*). Rozborem indukovaného sputa lze získat údaje o buněčném zastoupení a analýzou supernatantu i o zánětlivých markerech. Informace o zánětu v dolních dýchacích cestách přináší i vyšetření bronchoalveolární laváže, bronchiálního výplachu nebo biopsie bronchiální sliznice. Jedná se však o vyšetření invazivní a pacienty často hůře tolerovaná. Při srovnání metod byla prokázána korelace v zastoupení eozinofilů v indukovaném sputu s jejich zastoupením v bronchoalveolární laváži, méně již s bronchiální biopsií (*Grootendorst 1997*).

Indukce sputa a používané roztoky

Myšlenka indukce sputa vychází ze skutečnosti, že ne všechny osoby jsou schopné spontánně vyprodukovat 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 v rozpětí 0,9-7 %. K indukci sputa lze používat stále stejnou koncentraci soli (nejčastěji se doporučuje 4,5% koncentrace soli, neboť se jedná o komerčně vyráběnou látku) nebo je možné při dobré toleranci pacientem postupně koncentraci inhalované soli zvyšovat (nejčastěji kombinace 3%, 4% a 5% roztoků NaCl) (*Paggiaro 2002*). Postupné zvyšování koncentrace soli je výhodné u pacientů se zvýšenou bronchiální hyperreaktivitou, kdy je třeba zvýšené opatrnosti. V případě pacientů s vysokým rizikem bronchospasmu je možné k inhalaci použít i roztok fyziologický (0,9% NaCl). Nejvyšší publikovaná koncentrace NaCl používaná k indukci sputa je 7% (*Hadvabová 2002*). Hypertonické soli jsou v indukci sputa efektivnější než roztok izotonický (0,9%). Buněčné zastoupení ve sputu se při indukci hypertonickým roztokem od indukce izotonickým roztokem významně neliší (*Popov 1995*). Další látkou, která byla úspěšně zkoušena k indukci sputa, byl uridin-5´-trifosfát. Po jeho použití se popisují nižší poklesy ventilačních parametrů a větší objem indukovaného sputa než při použití roztoků NaCl (*Tamaoki 2001*).

Nebulizátory používané k indukci sputa

K indukci sputa je možné použít ultrazvukový či kompresorový nebulizátor. Nejčastěji se doporučují ultrazvukové nebulizátory. Záleží ovšem na výkonu nebulizátoru, velikosti inhalovaných částic, které nebulizátor vytváří (jejich depozice a distribuce v proximálních či periferních dýchacích cestách), což může ovlivnit složení sputa i úspěšnost indukce. Kelly a kol. (*2002*) zkoumali vliv různě výkonných ultrazvukových nebulizátorů na indukci sputa u pacientů s chronickou obstrukční bronchopulmonální nemocí. Indukce pomocí přístroje s vyšším výkonem byla tolerovaná kratší dobu a došlo po ní k většímu poklesu v parametru FEV_1 u vyšetřovaných osob. Nebyl však rozdíl v zastoupení buněčných parametrů a markerů v supernatantu. Je všeobecný konsenzus v tom, že výkon nebulizátoru by měl být přibližně 1 ml/min (*Paggiaro 2002*).

Bezpečnost indukce sputa

Během indukce sputa je nutné sledovat změny ventilačních parametrů. U osob se zvýšenou bronchiální reaktivitou mohou hypertonické roztoky soli vyvolat pokles

ventilačních parametrů. Tomuto lze předcházet aplikací salbutamolu (200-400 μg) nebo jiného bronchodilatačního léku před inhalací soli, což u většiny osob možnému poklesu ventilačních parametrů zabrání. Vzhledem k tomu, že indukované sputum bylo zkoumáno v mnoha studiích, byl sledován i vliv premedikace β_2-agonisty na výsledný buněčný rozpočet. Nebylo zjištěno, že by premedikace salbutamolem významně ovlivňovala procentuální zastoupení buněk v indukovaném sputu (*Popov 1995,Cianchetti 1999*). Nebylo také popsáno ovlivnění koncentrací ECP ve sputu, na rozdíl od koncentrací histaminu, které významně snížené byly (*Cianchetti 1999)*.

Ke sledování ventilačních parametrů během indukce sputa se nejčastěji využívá parametru FEV_1. Doporučuje se jej sledovat v intervalu ≤ 5 min. Pokud není pokles tohoto parametru během indukce sputa větší než 10 %, je možné pokračovat s inhalací postupně se zvyšujících koncentrací hypertonických roztoků solí. Při poklesu FEV_1 o 10-20 % proti výchozí hodnotě před indukcí je nutná zvýšená opatrnost – koncentrace soli se nezvyšuje. Při poklesu FEV_1 o více než 20 % je nutno inhalaci soli ukončit a podat bronchodilatační lék.

Délka inhalace je také velmi významným faktorem v indukci sputa. Studie Holze (*1998*) a Gershmana (*1999*) ukázaly, že složení sputa na délce indukce závisí, neboť postupem času dochází k odběru sputa z různých oblastí dýchacích cest. Vzorky odebrané v různých časových periodách se liší jak v buněčném, tak nebuněčném zastoupení. Neutrofily a eozinofily jsou ve vyšším počtu zastoupeny ve vzorcích odebraných na začátku indukce sputa, zatímco počet lymfocytů a makrofágů narůstá až ve vzorcích sesbíraných později. Koncentrace mucinu je nejvyšší ve vzorcích odebraných po prvních 4 minutách indukce. Vzorky z periferních cest se do sputa dostávají později. Pro validitu studie je tedy důležité, aby doba indukce byla konstantní. Z hlediska bezpečnosti i komfortu pacienta by délka indukce neměla přesáhnout 20 min (doporučuje se 15-20 min) (*Paggiaro 2002*).

Zpracování indukovaného sputa

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, navíc koncentrace látek v supernatantu není ovlivněna jejich obsahem ve slinách. 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. Studie zkoumající, zda se výsledný rozpočet buněk při rozdílném zpracování liší, se rozcházejí. Spanevello a kol. (*1998*) pozorovali vyšší zastoupení eozinofilů a vyšší koncentrace ECP ve vzorcích selektovaného sputa ve srovnání se vzorky neselektovaného sputa, zatímco procentuální zastoupení neutrofilů bylo vyšší ve vzorcích sputa neselektovaného. V jiné studii to však potvrzeno nebylo. Pizzichini (*1996*) při srovnání obou analytických metod nenašel rozdíl v procentuálním zastoupení neutrofilů, eozinofilů ani lymfocytů, zatímco procento makrofágů bylo ve vzorku selektovaného sputa nižší. Ačkoli obě metody mohou být úspěšně používány v diagnostice astmatu, nelze výsledky z obou metod kombinovat a pro účely studie by měla vybrána pouze jedna metoda (*Efthimiadis 2002*).

Vzorky sputa by měly být zpracovány do 2 hodin od indukce sputa. Homogenizace vzorku sputa je důležitá a může být dosažena použitím dithiothreitolu (DTT) nebo dithioerythritolu, což jsou látky rozrušující disulfidické můstky, kterými jsou molekuly mucinu spojeny. Ve vzorcích, kde je mucin špatně rozpuštěn, dochází k tmavému zabarvení buněk, ty jsou pak mikroskopicky obtížně identifikovatelné. Doporučovaná doba homogenizace je 10-30 min při teplotě 4-37 °C (*Efthimiadis 2002*).

Buněčný rozbor indukovaného sputa

Buněčný rozbor indukovaného sputa přispívá k diagnostice onemocnění dýchacích cest. Diferenciální rozpočet zdravých osob je následující (*90.percentil): *neutrofily <64,4 %, eozinofily <2 %, *makrofágy <86,1 %, *lymfocyty <2,6 % (*Efthimiadis 2004*). Celkový počet buněk ve sputu vzrůstá u nekontrolovaného astmatu, u kuřáků a při infekcích (bakteriálních) (*Pizzichini 1996, Efthimiadis 1997*). Bronchiální astma či eozinofilní bronchitida a expozice alergenu u vnímavých osob se vyznačují zvýšeným počtem eozinofilů ve sputu. Až 80 % astmatiků neléčených kortikosteroidy a více než 50 % kortikosteroidy léčených astmatiků se symptomy astmatu vykazuje zvýšené zastoupení eozinofilů ve sputu (*Pavord 1997, Louis 2000, Pavord 2002*). U chronické bronchitidy, CHOPN, u kuřáků, dále 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*).

Ačkoli byla metoda indukce sputa původně vyvinuta pro detekci infekčních agens a diagnostiku nádorových buněk, v posledních letech se tato metoda ukázala jako velmi přínosná pro studium astmatu a CHOPN. První studie Pin a kol. (*1992*) prokázala zvýšený počet eozinofilů a metachromatických buněk buněčné části sputa astmatiků proti zdravým kontrolám. Fahy a kol. (*1993)* zjistili, že nebuněčná část sputa astmatiků obsahuje zvýšenou koncentraci ECP a albuminu ve srovnání se zdravými osobami. Zvýšený počet eozinofilů ve sputu před léčbou je také dobrým prediktorem úspěšnosti léčby kortikosteroidy (*Pizzichini 1998*). Závislost tíže bronchiální obstrukce a zastoupení eozinofilních leukocytů ve sputu popsal ve své studii Chlumský (*2001*). Přitom přítomnost eozinofilů ve sputu pacientů léčených inhalačními kortikosteroidy ukazovala na chronický perzistující zánět, který na tuto léčbu odpovídal špatně a často vyžadoval léčbu kortikosteroidy systémovými.

Změny buněčných parametrů v indukovaném sputu během bronchoprovokačních testů sledovala Lemiere (*2001*), která popsala významný nárůst počtu eozinofilů a neutrofilů, pokles procenta makrofágů ve sputu za 7 h po expozici profesionálním alergenům u osob po pozitivním specifickém bronchoprovokačním testu. U několika osob s negativním bronchoprovokačním testem došlo k signifikantnímu zvýšení počtu eozinofilů, které však nebylo tak výrazné jako u pozitivní odpovědi. Lemiere (*2000*) sledovala také změny ve sputu po postupně se zvyšujících dávkách alergenu u osob s již diagnostikovaným profesionálním astmatem paralelně s ventilačními parametry. Vzestup eozinofilů v indukovaném sputu po kontaktu s alergenem předcházel signifikantním poklesům ventilačních parametrů a byl výraznější u pacientů exponovaných nízkomolekulárním látkám. Obata a kol. (*1999*) popsali významné zvýšení procentuálního zastoupení eozinofilních leukocytů ve sputu za 6 a 24 hodin po pozitivním bronchoprovokačním testu u osob exponovaných červenému cedru (alergen kyselina plikatová – nízkomolekulární alergen), u negativního bronchoprovokačního testu byl po 6 hodinách významný nárůst procenta eozinofilů u 3 osob z 8. Změny v indukovaném sputu byly sledovány také během expozice podezíraným alergenům na pracovišti a při vyřazení z pracovního procesu. Pacienti s profesionálním astmatem měli v období expozice na pracovišti významný nárůst eozinofilů a ECP ve sputu (*Lemiere 1999*).

Sledování buněčných změn v indukovaném sputu ukazuje, že po expozici profesionálnímu alergenu dochází u většiny senzibilizovaných astmatiků k nárůstu počtu eozinofilů ve sputu. Tento nárůst je v literatuře popisován často u alergenů nízkomolekulárních. Není zřejmé, proč některé alergeny způsobují nárůst eozinofilů ve sputu a jiné jej nevyvolávají, přestože po aplikaci tohoto alergenu došlo prokazatelně k bronchokonstrikci. Girard a kol. (*Girard 2004*) ve své studii zkoumali specificitu a senzitivitu monitorování PEF a hodnocení indukovaného sputa, dvou testů používaných v diagnostice profesionálního astmatu. Došli k závěru, že použití výsledků buněčného rozboru

s monitorováním nárůstu eozinofilů ve sputu se současným sledováním PEF zvyšuje specificitu i senzitivitu diagnózy profesionálního astmatu.

4.2.2. 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 – srovnání subjektivních obtíží pacientů a objektivních výsledků vyšetření před vyřazením a v časovém odstupu od vyřazení z expozice alergenu.

4.2.3. PROVEDENÍ PROJEKTU

4.2.3.1. Metoda neselektovaného sputa

Metoda neselektovaného sputa byla na klinice zavedena s přispěním grantu GAUK 13/2003/C/1.LF „Využití metody indukovaného sputa pro diagnostiku a sledování vývoje profesionálního bronchiálního astmatu“. Jeho součástí bylo sledování pacientů s již přiznaným profesionální astmatem pomocí běžně používaných vyšetřovacích metod a nově i pomocí sledování zánětu v indukovaném sputu. U osob vyšetřovaných na Klinice nemocí z povolání poprvé pro podezření na profesionální astma bylo cílem srovnání již běžně používaných vyšetřovacích metod a nově možnost využití metody indukovaného sputa v průběhu testování s alergeny.

4.2.3.1.1. Charakteristika sledovaných osob

A. Skupina osob se suspektním profesionálním bronchiálním astmatem

Pro podezření na profesionální astma bylo vyšetřeno 22 pacientů (tabulka č. 13), u kterých byly provedeny specifické bronchoprovokační testy. U sledovaných osob byly dále vyšetřeny a zhodnoceny tyto parametry: krevní obraz a diferenciální rozpočet včetně zastoupení eozinofilů, celkové IgE protilátky, ECP, kožní prick testy řadou inhalačních alergenů, vyšetření ventilačních parametrů (spirometrie a bodypletysmografie) a vyšetření nespecifické bronchiální hyperreaktivity (nespecifický bronchoprovokační test s histaminem). Specifické bronchoprovokační testy byly provedeny s alergeny v expoziční kabině. Indukované sputum bylo odebráno před a 24 hodin po posledním specifickém bronchoprovokačním testu (pokud bylo prováděno více testů s podezřívanými alergeny z pracoviště).

Z hlediska hledání závislosti mezi pozitivitou testu a délkou expozice byl zhodnocen interval práce s alergenem do doby, kdy se objevily první alergické či dechové obtíže. Dále byla sledována délka intervalu práce s alergenem již s projevy alergie či astmatu.

Tab. 13. Charakteristika osob se suspektním profesionálním astmatem

n=22		
Pohlaví	muži/ženy	11/11
Věk (SD)	roky	43,5 (10,6)
Kouření	ano/ex/ne	11/3/8
Léčba kortikosteroidy	počet	8
Léčba antihistaminiky	počet	3
Léčba bronchodilatancii	počet	8
Bez léčby	počet	10

B. Skupina osob s diagnostikovaným profesionálním astmatem - vyšetření po vyřazení z expozice profesionálnímu alergenu

Byla vyšetřena skupina 37 osob s již diagnostikovaným profesionálním astmatem (tabulka č. 14). Vyšetření bylo provedeno v časovém odstupu po vyřazení z expozice profesionálnímu alergenu a zahrnovalo: krevní obraz a diferenciální rozpočet včetně zastoupení eozinofilů, celkové IgE protilátky, ECP, kožní prick testy řadou inhalačních alergenů, vyšetření ventilačních parametrů (spirometrie a bodypletysmografie) a nespecifický bronchoprovokační test s histaminem. Byl proveden jeden odběr indukovaného sputa. Parametry získané při prvním vyšetření na klinice v době hlášení nemoci z povolání a parametry získané při posledním vyšetření byly porovnány.

Tab. 14. Charakteristika osob s profesionálním astmatem

n=37		**Celkem**	**Expozice HMW látkám**	**Expozice LMW látkám**
Pohlaví	muži/ženy	14/23	3/15	11/8
Věk (SD)	roky	47,9 (9,4)	48,2 (7,2)	45,6 (11,0)
Kouření	ano/ex/ne	4/19/14	3/7/8	1/12/6
Léčba kortikosteroidy	počet	25	12	13
Léčba antihistaminiky	počet	17	9	8
Léčba bronchodilatancii	počet	28	13	15
Bez léčby	počet	5	4	1
Interval do začátku obtíží	roky	8,6	8,9	8,2
Interval práce s projevy alergie či astmatu	roky	2,6	3,5	1,8
Interval mezi vyšetřeními	roky	6,5	5,1	7,8

C. Kontrolní skupina

Kontrolní skupinu tvořilo celkem 19 dobrovolníků (tabulka č. 15) bez projevů alergie či astmatu. U všech osob byly vyšetřeny tyto parametry: krevní obraz a diferenciální rozpočet včetně zastoupení eozinofilů, celkové IgE protilátky, ECP, kožní prick testy řadou inhalačních alergenů, vyšetření ventilačních parametrů (spirometrie a bodypletysmografie), vyšetření nespecifické bronchiální hyperreaktivity (nespecifický bronchoprovokační test s histaminem). Byl proveden jeden odběr indukovaného sputa.

Tab. 15. Charakteristika kontrolní skupiny

n=19		
Pohlaví	muži/ženy	7/12
Věk (SD)	roky	44,1 (14,6)
Kouření	ano/ex/ne	6/1/12
Užívání kortikosteroidů	počet	0
Užívání antihistaminik	počet	0
Užívání bronchodilatancií	počet	0
Bez léčby	počet	19

4.2.3.1.2. Metodika použitých vyšetření

Indukce sputa

Indukce sputa byla provedena pomocí inhalace 5 ml 3%, 4% a 5% NaCl pomocí nebulizátoru Porta-Neb Sidestream (průtok 6-7l/min, výkon 0,46 g/min) v závislosti na úspěšnosti pacienta vykašlat sputum a na změnách plicních funkcí, které byly měřeny vždy po vyinhalování jedné dávky NaCl. Inhalační bronchodilatační látka (ve většině případů salbutamol 200 μg, pokud nebyl kontraindikován) byla aplikována před inhalací NaCl, případně po ní, také při případném poklesu FEV_1 o 20%. Ke zpracování byl použit celý objem vykašlaného sputa. Sputum bylo homogenizováno přidáním identického objemu dithiotreitolu ve fosfátovém pufru ředěném 1:10 destilovanou vodou (Sputolysin Reagent, Calbiochem), třepáno po dobu 30 min a filtrováno přes gázu. 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 potom barven dle May-Grűnwald-Giemsy. Buněčný rozpočet byl získán z 300 neskvamózních buněk (*Chlumský 2001*).

U skupiny osob přijatých k testování alergeny z pracoviště pro podezření na profesionální astma bylo indukované sputum odebráno vždy před začátkem prvního testu s profesionálními alergeny a 24 hodin po ukončení posledního testu. Testování několika podezřívanými alergeny se provádělo v případě, že pacient neměl pozitivní reakci na předchozí testy v expoziční kabině.

Funkční vyšetření plic a nosu

Funkční vyšetření plic se provádělo vsedě spirometrem s bodypletysmografem MasterLab Jaeger. Probíhalo 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 testy s histaminem byl proveden pomocí inhalační jednotky Asthma Provocation System Jaeger, která umožňuje řízenou aplikaci roztoku v průběhu inspiria. Roztok histaminu byl inhalován ve stoupajících koncentracích 1 mg/ml, 5mg/ml, 10 mg/ml. Jako zásadní kriterium pro zhodnocení testu jako pozitivního byl brán pokles parametru FEV_1 o 20 % vzhledem k hodnotě před testem (*Sterk 1993*), případně pokles o více než 30 % v parametrech MEF a vzestup R_{tot} o více než 70 %.

Specifické bronchoprovokační testy

Během specifických bronchoprovokačních testů s profesionálními alergeny byl pacient po dobu 30 min vystaven látkám z pracoviště, odebranými hygienickou službou, v podmínkách simulujících pracovní expozici podezřelému alergenu. Hodnoty ventilačních parametrů a klinický stav vyšetřovaného byly sledovány před aplikací alergenu, bezprostředně po aplikaci, za 2 h, 5 h a 24 h po aplikaci a v případě náhle vzniklé bronchospastické odpovědi kdykoliv v průběhu 24 h následujících po aplikaci alergenu. Jako zásadní kriterium pro zhodnocení testu jako pozitivního byl brán pokles parametru FEV_1 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 FEV_1 alespoň o 15% vzhledem k hodnotám naměřeným před testem.

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 s objektivními známkami rinitidy (zvýšená sekrece, nosní blokáda, kýchání, svědění).

Alergologické vyšetření

Kožní prick testy byly provedeny sadou běžných inhalačních alergenů: prach domácí, peří, roztoči, smíšený pyl travin, plísně domácí, plísně venkovní, jarní pylová směs, podzimní pylová směs, bakteriální směs horních cest dýchacích. U osob, kde podezřívaný profesionální alergen bylo možné testovat i prick testy a byl dostupný, byly prick testy provedeny i s tímto alergenem.

Statistické zhodnocení výsledků

Výsledky byly statisticky zhodnoceny pomocí McNemarova testu, párového t-testu a ANOVA testu, vždy na 5% hladině významnosti.

4.2.3.1.3. Výsledky

A. Skupina osob se suspektním profesionálním astmatem

Z 22 vyšetřených osob přicházejících k testování pro suspektní alergické profesionální onemocnění dýchacích cest byla diagnóza profesionálního astmatu potvrzena u 5 osob a profesionální rinitida u 4 osob. Zjištěnými alergeny byly: guma, kyselina 2,4-dichlor-5-sulfochlorbenzoová, krůtí podestýlka, ostazinová barva, prasečí hnůj, Plastizol, bavlna, chladicí obráběcí kapalina a pryskyřice.

Délka intervalu práce s alergenem do doby objevení se prvních alergických či dechových obtíží a délka intervalu práce s alergenem již s projevy alergie či astmatu jsou uvedeny v tabulce č. 16, statistické zhodnocení bylo provedeno pro podskupiny testovaných s pozitivním nebo negativním závěrem. Výsledky mezi podskupinami nebyly shledány statisticky významnými (na 5% hladině významnosti), přesto je však z tabulky patrné, že osoby „pozitivně“ testované pracovaly v expozici alergenu po průměrně delší dobu.

Tab. 16. Délka intervalu práce s alergenem do doby objevení se prvních alergických či dechových obtíží a délka intervalu práce s alergenem již s projevy alergie či astmatu

		Výsledek specifického testu-pozitivní (prof. astma či rinitida) (n=9)	Výsledek specifického testu-negativní (n=13)
Průměrná doba do začátku obtíží	měsíce	43,72	75,23
Průměrná doba práce s projevy alergie či astmatu	měsíce	29,78	18,75

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 byla vyšší - 82% (18 z 22 osob), i když se prováděná metodika u obou odběrů nelišila. 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 neprojevily objektivní známky rinitidy. Při srovnání průměrných hodnot buněk indukovaného sputa před testem a po specifickém bronchoprovokačním testu (eozinofily, neutrofily, makrofágy, lymfocyty) nebyly shledány statisticky významné rozdíly na hladině $p<0,05$. U osob s pozitivním výsledkem bronchoprovokačního testu s alergenem (dg. profesionálního astmatu) nebyl zjištěn nárůst eozinofilů po testu (u jedné osoby změna 0→0,3 % nevýznamná, v rámci normálních hodnot). U jedné z osob s diagnostikovanou profesionální rinitidou byl zaznamenán nárůst eozinofilů z 0,7 na 2,8%, u ostatních dvou osob byly změny nulové či nevýznamné (0→0,3 %).

Výsledky osob s pozitivními bronchoprovokačními testy jsou uvedeny v tabulkách č. 17, 18 a znázorněny v grafech č. 23-26, osob s profesionální rinitidou v tabulkách č. 19, 20 a grafech č. 27-30 a negativně testovaných osob v tabulce č. 21 a grafech č. 31-34.

Tab. 17. Pozitivní bronchoprovokační testy s alergenem - detaily testu

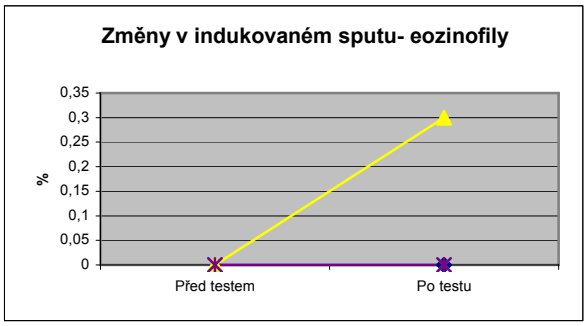
Osoba	Druh testu	Testováno s kortikosteroidy	Maximální pokles FEV_1 a čas	Typ astmatické reakce	Alergenní noxa
1	test v laboratoři	ne	23,1% ihned po testu	časná	LMW
2	test v laboratoři	ne	47% ihned po testu, 25,7% 5h po testu	duální	LMW
3	test v laboratoři	ne	22,7% 5h po testu	pozdní	LMW
4	test v laboratoři	ne	45,9% ihned po testu	časná	LMW
5	test v laboratoři	ano	16,3% ihned po testu s anafylaktickou reakcí	časná	HMW

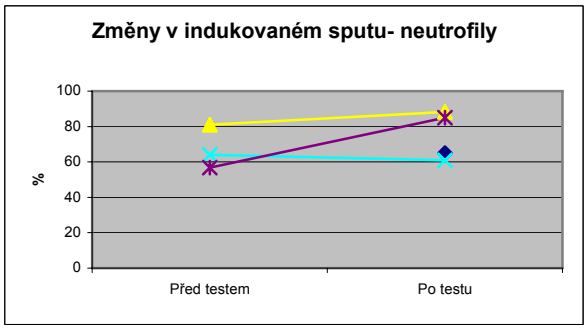
Tab. 18. Změny v indukovaném sputu po pozitivním bronchoprovokačním testu s alergenem

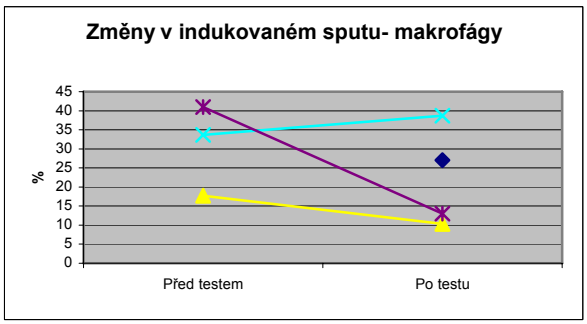
Osoba	Eozinofily %		Neutrofily%		Makrofágy %		Lymfocyty%	
	Před testem	Po testu	Před testem	Po testu	Před testem	Po testu	Před testem	Po testu
1	*NK*	0,0	*NK*	65,0	*NK*	27,0	*NK*	8,0
2	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*
3	0,0	0,3	81,0	88,3	17,7	10,3	1,3	1,0
4	0,0	0,0	64,0	61,0	33,7	38,7	2,3	0,3
5	0,0	0,0	56,7	85,0	41,0	13,0	2,3	2,0

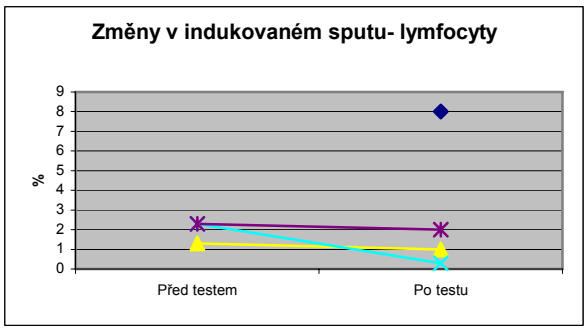
Poznámka: NK- vzorek nebylo možné hodnotit

Graf 23-26. Změny v indukovaném sputu u osob s pozitivním bronchoprovokačním testem s alergenem – diagnostikovaným profesionálním bronchiálním astmatem - grafické znázornění









Tab. 19. Diagnóza profesionální rinitidy - detaily testu

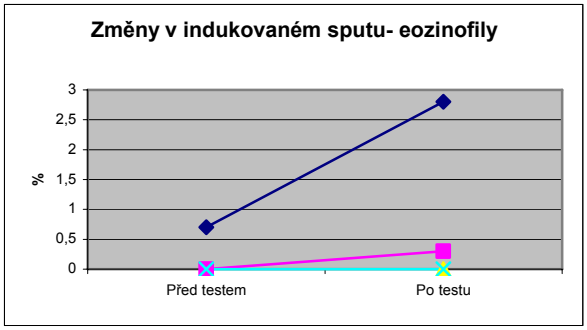
Osoba	Druh testu	Alergenní noxa	Závěrečná diagnóza
1	test v laboratoři	LMW	profesionální rinitida
2	test v laboratoři	LMW	profesionální rinitida
3	test v laboratoři	HMW	profesionální rinitida
4	test v laboratoři	LMW	profesionální rinitida

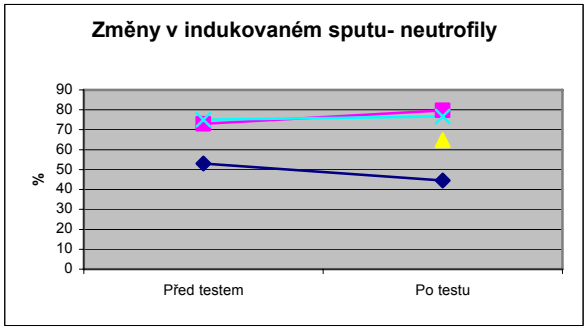
Tab. 20. Změny v indukovaném sputu u osob s diagnostikovanou profesionální rinitidou

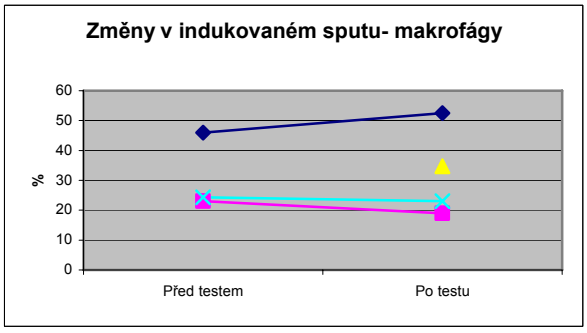
Osoba	Eozinofily %		Neutrofily%		Makrofágy %		Lymfocyty%	
	Před testem	Po testu	Před testem	Po testu	Před testem	Po testu	Před testem	Po testu
1	0,7	2,8	53,0	44,5	46,0	52,5	0,3	0,2
2	0,0	0,3	73,0	79,7	23,0	19,0	0,7	1,0
3	*NK*	0,0	*NK*	64,7	*NK*	34,7	*NK*	6,6
4	0,0	0,0	75,0	76,7	24,3	23,0	0,7	0,3

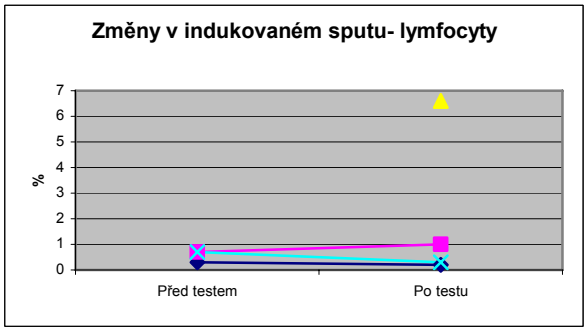
Poznámka: NK- vzorek nebylo možné hodnotit

Graf 27-30. Změny v indukovaném sputu u osob s pozitivním testem - diagnostikovanou profesionální rinitidou - grafické znázornění







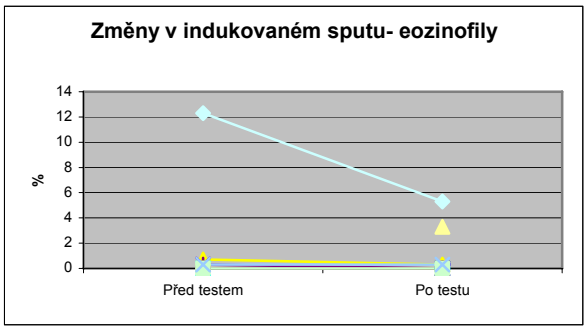


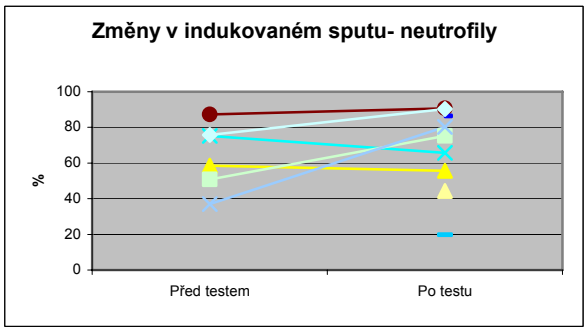
Tab. 21. Změny v indukovaném sputu u osob s negativním bronchoprovokačním testem

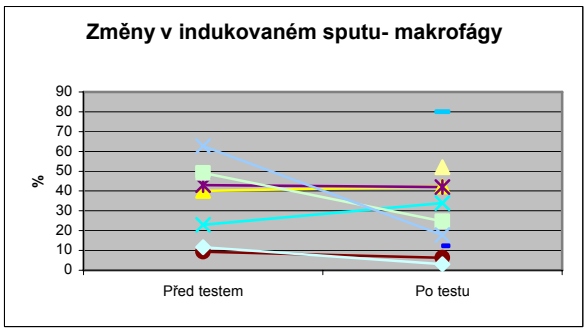
Osoba	Eozinofily %		Neutrofily%		Makrofágy %		Lymfocyty%	
	Před testem	Po testu	Před testem	Po testu	Před testem	Po testu	Před testem	Po testu
1	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*
2	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*
3	0,7	0,3	58,6	55,7	40,0	42,3	0,7	1,7
4	0,0	0,0	75,3	65,7	23,0	34,0	1,7	0,3
5	0,3	0,0	55,7	56,3	43,0	42,0	1,0	1,7
6	0,0	0,0	87,3	90,7	9,3	6,3	3,3	3,0
7	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*	*NK*
8	*NK*	0,3	*NK*	86,3	*NK*	12,3	*NK*	1,0
9	*NK*	0,0	*NK*	19,7	*NK*	80,0	*NK*	0,3
10	12,3	5,3	75,7	90,3	11,7	3,0	0,3	1,3
11	0,0	0,0	50,8	75,3	49,2	24,7	0,0	0,0
12	*NK*	3,3	*NK*	44,3	*NK*	52,0	*NK*	0,3
13	0,3	0,3	37,0	80,3	62,7	17,7	0,0	1,7

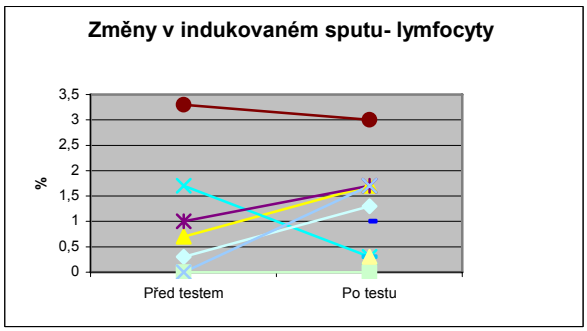
Poznámka: NK- vzorek nebylo možné hodnotit

Graf 31-34. Změny v indukovaném sputu u osob s negativním bronchoprovokačním testem a nepotvrzeným profesionálním bronchiálním astmatem









Korelace mezi eozinofily ve sputu před testem a parametry FEV_1, IgE protilátkami ani eozinofily v krvi nebyla v celé skupině testovaných osob nalezena. Při srovnání průměrných hodnot eozinofilů ve sputu před testem u podskupin dělených podle prick testů (negativní vs. pozitivní) byl shledán statisticky významný rozdíl na 5% hladině významnosti. Pro skupinu „prick pozitivní" byly průměrné hodnoty eozinofilů ve sputu významně vyšší.

Dále byly porovnány výsledky objektivních vyšetření mezi skupinou suspektních astmatiků (rozdělené i na podskupiny negativně testovaných a pozitivně testovaných) a kontrolní skupinou: eozinofily v periferní krvi - procentuální zastoupení a absolutní počet, celkové IgE protilátky, ECP, kožní prick testy, nespecifický bronchoprovokační test s histaminem, spirometrie (FEV_1, FVC) (tabulka č. 22, 23).

Statisticky významné rozdíly ($p<0,05$) těchto vyšetření mezi celou skupinou osob se suspektním profesionálním astmatem a kontrolní skupinou byly zjištěny pro parametry: **IgE protilátky, ECP a nespecifický bronchoprovokační test**. Při rozdělení na podskupiny podle výsledků testování při specifických provokačních testech byl shledán statisticky významný rozdíl ($p<0,05$) mezi podskupinou osob s konečnou diagnózou profesionálního astmatu proti kontrolní skupině pro parametry **IgE protilátky a FEV_1**.

Při statistickém srovnání parametrů podskupin s konečným výsledkem negativní a pozitivní nebyly shledány statisticky významné rozdíly ($p<0,05$) pro žádný z parametrů: eozinofily - procentuální zastoupení a absolutní počet v krvi, celkové IgE protilátky, ECP, prick testy, nespecifický bronchoprovokační test s histaminem, FEV_1, FVC.

Vzhledem k tomu, že u některých pacientů bylo nutné testovat i s léčbou lokálními inhalačními kortikosteroidy, byla statisticky zhodnocena i možnost ovlivnění těchto výsledků vyšetření léčbou: prick testy, IgE protilátky, eozinofily v krvi procentuálně, bronchoprovokační test s histaminem. Rozdíly mezi skupinami pozitivních a negativních z hlediska terapie kortikosteroidy nebyly statisticky významné na hladině $p<0,05$, avšak je nutno vzít v úvahu, že některé hodnocené skupiny byly malé.

Tab. 22. Výsledky laboratorních testů u celé skupiny osob se suspektním profesionálním astmatem a u kontrolní skupiny

		Celkem	**Kontrolní skupina**
ECP (SD)	ng/ml	28,7 (21,9)	11,6 (9,2)
Eozinofily v krvi (SD)	%	3,3 (1,8)	2,7 (1,0)
Eozinofily v krvi (SD)	10^9/l	0,23 (0,14)	0,20 (0,08)
FEV_1 (SD)	%NH	97,36 (14,31)	103,6 (11,1)
FVC (SD)	%NH	103,42 (15,55)	106,0 (12,3)
Zvýšené IgE	počet osob v %	36,4	10,5
Pozitivní prick testy	počet osob v %	28,6	10,5
Pozitivní nespecifický bronchoprovokační test	počet osob v %	66,7	26,3

Tab. 23. Výsledky laboratorních testů u osob se suspektním profesionálním astmatem (rozděleno na podskupiny podle závěrečné diagnózy)

		Profesionální astma	**Profesionální rinitida**	**Negativní**
ECP (SD)	ng/ml	18,3 (14,9)	38,2 (36,6)	29,8 (18,8)
Eozinofily v krvi (SD)	%	2,9 (1,0)	2,7 (2,4)	3,6 (1,9)
Eozinofily v krvi (SD)	10^9/l	0,22 (0,09)	0,21 (0,21)	0,24 (0,14)
FEV_1 (SD)	%NH	83,40 (12,90)	103,63 (15,54)	100,81 (11,64)
FVC (SD)	%NH	89,78 (10,74)	110,45 (13,21)	106,50 (15,38)
Zvýšené IgE	počet osob v %	40,0	25,0	38,5
Pozitivní prick testy	počet osob v %	40,0	25,0	25,0
Pozitivní nespecifický bronchoprovokační test	počet osob v %	75,0	75,0	61,5

B. Skupina osob s již diagnostikovaným profesionálním astmatem

U skupiny osob s diagnózou profesionálního bronchiálního astmatu byly srovnány výsledky vyšetření provedených při prvním pobytu na klinice, kdy bylo onemocnění diagnostikováno, a nyní v časovém odstupu po vyřazení z expozice danému alergenu. Pro žádné sledované parametry nebyly shledány statisticky významné rozdíly mezi prvním a posledním vyšetřením: eozinofily - procentuální zastoupení a absolutní počet, celkové IgE protilátky, nespecifický bronchoprovokační test, FEV_1, FVC, prick testy (pro prick testy byl parametr p= 0,0523, tedy hraniční).

Výsledky vyšetření získané při posledním vyšetření byly porovnány také s výsledky kontrolní skupiny. Statisticky významně ($p<0,05$) byly u skupiny astmatiků častější pozitivní výsledky pro parametry: **prick testy, ECP a nespecifický bronchoprovokační test**.

Byly srovnány i výsledky podskupin osob exponovaných vysokomolekulárním a nízkomolekulárním alergenům. Zde byla statisticky významně častější pouze pozitivita nespecifického bronchoprovokačního test s histaminem u podskupiny exponované vysokomolekulárním alergenům.

Statisticky byla zhodnocena i možnost ovlivnění výsledků vyšetření medikací kortikosteroidy či antihistaminiky: prick testy, IgE protilátky, eozinofily v krvi, bronchoprovokační test s histaminem. Vliv terapie na uvedené výsledky nebyl v této skupině na hladině $p<0,05$ prokázán.

V tabulce č. 24 jsou uvedeny výsledky skupiny osob s profesionálním astmatem (první vyšetření na klinice při potvrzení diagnózy profesionálního astmatu a zatím poslední vyšetření po vyřazení z expozice alergenu) ve srovnání s kontrolní skupinou.

Tab. 24. Výsledky vyšetření u skupiny osob s profesionálním astmatem při prvním a nynějším vyšetření a u kontrolní skupiny

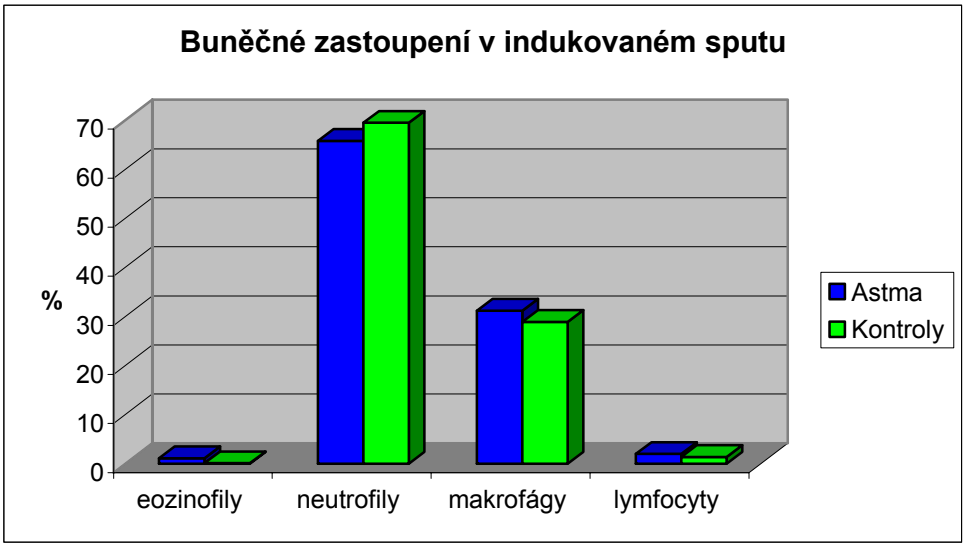
		Profesionální astma (první návštěva)	**Profesionální astma** (po vyřazení z expozice alergenu)	**Kontrolní skupina**
ECP (SD)	ng/ml	neprovedeno	22,8 (12,3)	11,6 (9,2)
Eozinofily v krvi (SD)	%	3,5 (3,3)	3,5 (2,2)	2,7 (1,0)
Eozinofily v krvi (SD)	$x10^9/l$	0,30 (0,25)	0,24 (0,18)	0,20 (0,08)
Zvýšené IgE	%	42,3	25,7	10,5
Pozitivní prick testy	%	70,2	45,9	10,5
FEV_1 (SD)	%NH	99,3 (17,8)	97,5 (18,9)	103,6 (11,1)
FVC (SD)	%NH	105,1 (15,7)	102,8 (17,2)	106,0 (12,3)
Pozitivní nespecifický bronchoprovokační test	%	85,7	80,6	26,3

Úspěšnost indukce sputa u astmatiků, tj. konečný počet vzorků bez zvýšené kontaminace skvamózními buňkami dutiny ústní, které bylo možné zhodnotit – 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 bylo u 6 osob s dříve diagnostikovaným profesionálním astmatem (tj. 25 % hodnocených vzorků) nalezeno zvýšené procentuální zastoupení eozinofilů (normální nález <2 %) (tabulka č. 25, graf č. 35). Pět osob bylo v minulosti exponováno HMW profesionálním alergenům, jedna osoba LMW profesionálnímu alergenu. 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, ale 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 častější ($p<0,05$) u skupiny osob exponovaných HMW alergenům. Tabulka č. 26 a graf č. 36 zobrazují průměrné hodnoty buněčných parametrů ve sputu skupiny osob exponovaných HMW a LMW profesionálním alergenům. Korelace mezi eozinofily ve sputu a současnými parametry FEV_1, IgE nebo eozinofily v periferní krvi nebyla nalezena. Taktéž korelace mezi neutrofily ve sputu a FEV_1 nebo FVC nebyla nalezena.

Tab. 25. Výsledky analýzy buněčného zastoupení v indukovaném sputu osob s profesionálním astmatem a kontrolní skupiny

		Profesionální astma	**Kontrolní skupina**
Eozinofily (SD)	%	1,1 (1,7)	0,1 (0,3)
Neutrofily (SD)	%	65,8 (18,4)	69,5 (20,8)
Makrofágy (SD)	%	31,2 (19,1)	28,9 (20,6)
Lymfocyty (SD)	%	2,0 (2,2)	1,4 (1,1)

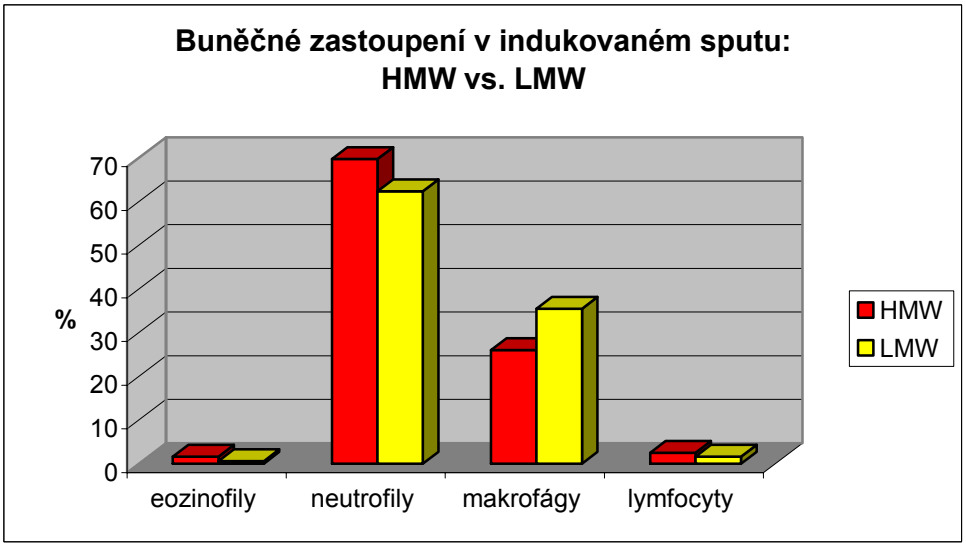
Graf 35. Výsledky analýzy buněčného zastoupené v indukovaném sputu u osob s profesionálním astmatem a u kontrolní skupiny - grafické znázornění



Tab. 26. Výsledky analýzy buněčného zastoupení v indukovaném sputu osob s profesionálním astmatem (rozděleno podle typu alergenu - HMW, LMW).

		HMW	**LMW**
Eozinofily (SD)	%	1,6 (2,2)	0,6 (1,0)
Neutrofily (SD)	%	69,8 (19,2)	62,4 (17,7)
Makrofágy (SD)	%	26,0 (19,7)	35,5 (18,2)
Lymfocyty (SD)	%	2,5 (2,8)	1,6 (1,5)

Graf 36. Výsledky analýzy buněčného zastoupení v indukovaném sputu osob s profesionálním astmatem (rozděleno podle typu alergenu - HMW, LMW)- grafické znázornění



4.2.3.2. Metoda selektovaného sputa

Při použití metody neselektovaného sputa se významné změny v buněčném zastoupení v indukovaném sputu během specifických bronchoprovokačních testů nepodařilo prokázat a proto byla zavedena metoda sputa selektovaného, která je sice metodicky náročnější, ale díky své selektivitě by mohla přinést lepší výsledky. Byly tedy opět sledovány změny zastoupení buněčných parametrů před a po expozici profesionálním alergenům spolu s vyšetřením ventilačních parametrů.

4.2.3.2.1. Charakteristika sledovaných osob

Pro podezření na profesionální astma bylo vyšetřeno 23 pacientů, u kterých byly provedeny specifické bronchoprovokační testy. U sledovaných osob byly vyšetřeny tyto parametry z krve: eozinofily (procentuální zastoupení, absolutní počet), celkové IgE protilátky a ECP. Byly provedeny prick testy řadou běžných inhalačních alergenů, vyšetření ventilačních parametrů (spirometrie a bodypletysmografie) a vyšetření nespecifické bronchiální hyperreaktivity (nespecifický bronchoprovokační test s histaminem). Specifické bronchoprovokační testy byly provedeny buď s alergeny v expoziční kabině nebo reexpozicí na pracovišti. Indukované sputum bylo odebráno před a 24 hodin po specifickém bronchoprovokačním testu.

Celá skupina osob byla následně rozdělena na tři podskupiny podle výsledků specifických bronchoprovokačních testů: na podskupinu s potvrzeným profesionálním astmatem (pozitivní výsledek bronchoprovokačního testu), podskupinu s konečnou diagnózou profesionální rinitidy (negativní výsledek bronchoprovokačního testu, avšak známky rinitidy během či po testu), podskupinu s negativním výsledkem bronchoprovokačního testu a bez známek rinitidy. Charakteristika jednotlivých podskupin je uvedena v tabulce č. 27.

Tab. 27. Charakteristika 23 osob, u nichž bylo vyšetřováno indukované sputum metodou selektovaného sputa

		Profesionální astma (n=7)	**Profesionální rinitida či ohrožení (n=4)**	**Osoby s negativním testem (n=12)**
Pohlaví	muži/ženy	4/3	0/4	4/8
Věk (SD)	roky	40,7 (10,1)	42,8 (4,3)	41,3 (11,4)
Kouření	ano/ex/ne	2/3/2	1/2/1	3/4/5
Testováno s inhalačními kortikosteroidy	ano/ne	2/5	0/4	0/12
ECP (SD)	ng/ml	52,7 (44,9)	49,0 (24,1)	41,1 (25,7)
Eozinofily v krvi (SD)	%	3,3 (2,7)	4,8 (4,2)	5,2 (7,1)
Eozinofily v krvi (SD)	$x10^9/l$	0,2 (0,2)	0,4 (0,5)	0,4 (0,8)
IgE	pozitivní/ negativní	3/4	2/2	4/8
Prick testy	pozitivní/ negativní	3/4	1/3	5/6 *
Nespecifický bronchoprovokační test	pozitivní/ negativní	7/0	1/3	6/6

** kožní prick test jedné osoby byl nehodnotitelný*

4.2.3.2.2. Metodika použitých vyšetření

Indukce sputa

Indukce sputa byla provedena pomocí inhalace 3%, 4% či 5% NaCl vždy 5 min pomocí nebulizátoru Porta-Neb Sidestream (průtok 6-7l/min, výkon 0,46 g/min). 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 přes gázu 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-Grűnwald-Giemsy. Buněčný rozpočet byl získán z 300 neskvamózních buněk (*Efthimiadis 1997*).

Indukované sputum bylo odebráno vždy před začátkem prvního testu s profesionálními alergeny a 24 hodin po ukončení posledního testu.

Specifické bronchoprovokační testy

Sledované osoby byly vystaveny po dobu 30 min působení podezřívaným alergenům z pracoviště v expoziční kabině, kde byly simulovány pracovní podmínky. V případně nemožnosti adekvátně napodobit v laboratoři podmínky expozice byla provedena reexpozice na pracovišti, kde pacient vykonával po dobu 2 hodin obvyklé činnosti spadající do jeho náplně práce. Hodnoty ventilačních parametrů byly sledovány před expozicí alergenu (reexpozicí), bezprostředně po expozici, za 2h, 5h a 24 h po ní nebo v případě náhle vzniklé bronchospastické odpovědi kdykoliv v průběhu 24 h následujících po aplikaci alergenu. Jako kriterium pro zhodnocení testu jako pozitivního byl brán pokles parametru FEV_1 o 20 % vzhledem k hodnotě před testem, případně pokles o více než 30 % v parametrech MEF a současně pokles FEV_1 o minimálně 15 % či vzestup R_{tot} o více než 70 % a současně pokles FEV_1 o minimálně 15 % vzhledem k hodnotám naměřeným před testem.

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

4.2.3.2.3. Výsledky

U sedmi osob (z celkových 23 vyšetřených) byly výsledky bronchoprovokačních testů pozitivní - bylo potvrzeno profesionální bronchiální astma. Výsledky bronchoprovokačních testů jsou uvedeny v tabulce č. 28,29 a znázorněny v grafech č. 37-41.

Tab.28. Pozitivní bronchoprovokační testy s alergenem - detaily testu

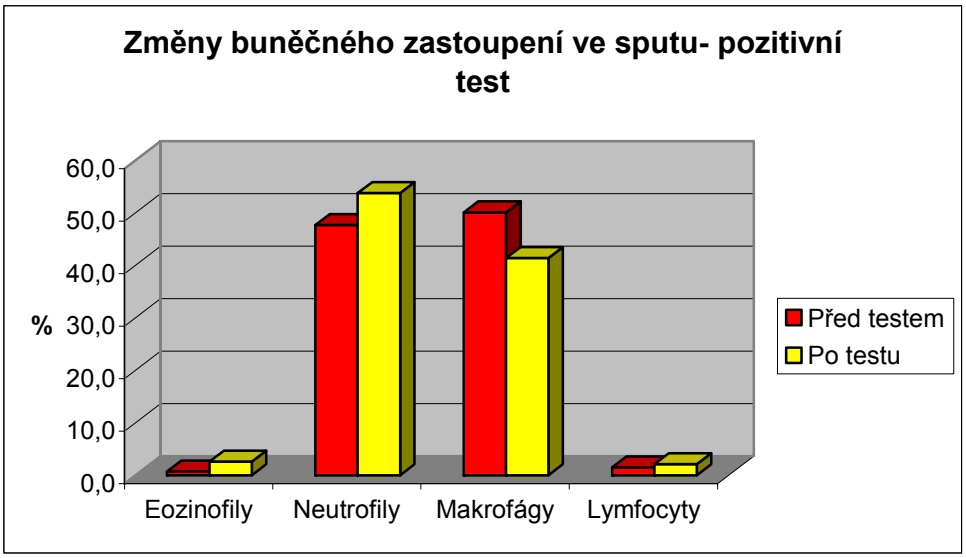
Osoba	Druh testu	Testováno s kortikosteroidy	Maximální pokles FEV_1 a čas	Typ astmatické reakce	Alergenní noxa
1	test v laboratoři	ne	42,5% ihned po testu	časná	HMW
2	test v laboratoři	ano	21,6% 5h po testu	pozdní	LMW
3	test v laboratoři	ne	29,4% ihned po testu	časná	LMW
4	reexpozice na pracovišti	ne	24% po testu a 30,8% 5h po testu	duální	LMW
5	test v laboratoři	ne	19,5% 5h po testu	pozdní	LMW
6	test v laboratoři	ano	20% ihned po testu	časná	LMW
7	reexpozice na pracovišti	ne	29,8 % ihned po testu a 24,2% 5h po testu	duální	HMW

Tab. 29. Změny buněčného zastoupení v selektovaném indukovaném sputu po pozitivním bronchoprovokačním testu s alergenem

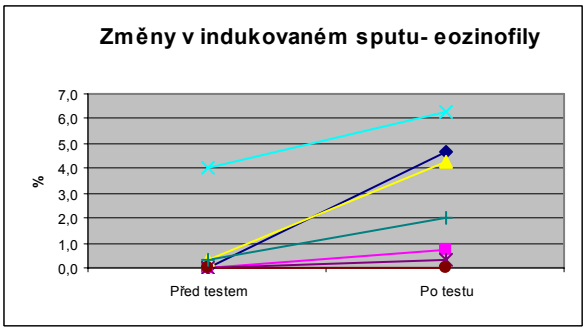
	Eozinofily %		Neutrofily %		Makrofágy %		Lymfocyty %	
Osoba	**Před testem**	**Po testu**	**Před testem**	**Po testu**	**Před testem**	**Po testu**	**Před testem**	**Po testu**
1	0,0	4,7	60,6	63,0	33,7	28,0	5,7	4,3
2	0,0*	0,7*	78,3	53,6	21,0	43,7	0,7	2,0
3	0,3	4,3	22,7	32,3	76,7	63,3	0,3	0,0
4	4,0	6,3	66,0	58,0	28,3	31,3	1,7	4,3
5	0,0	0,3	19,0	39,3	79,6	59,0	1,3	1,3
6	0,0*	0,0*	22,3	55,6	77,6	41,6	0,0	2,6
7	0,3	2,0	65,0	75,0	33,6	22,6	1,0	0,3

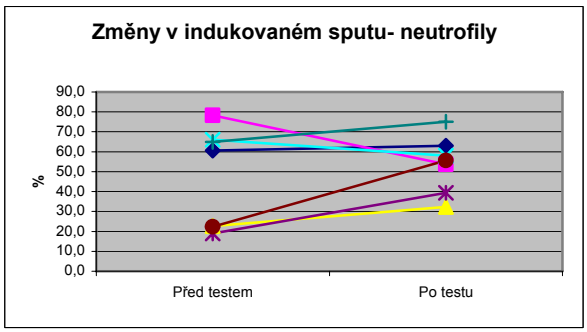
Pozn: *osoby 2 a 6 byly testovány za léčby inhalačními kortikosteroidy

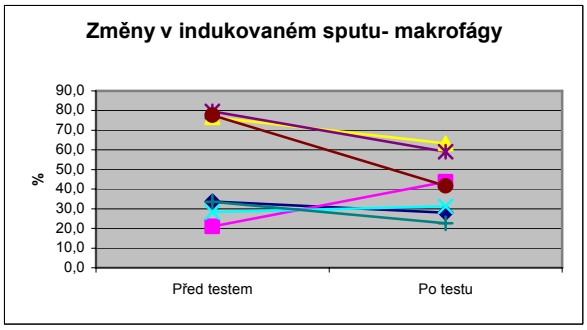
Graf 37. Změny buněčného zastoupení v selektovaném indukovaném sputu po pozitivním testu - průměrné hodnoty

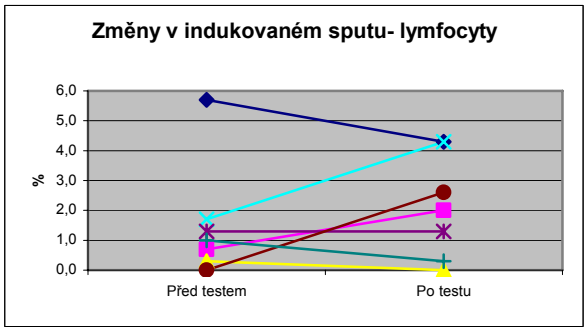


Graf 38-41. Změny v jednotlivých buněčných parametrech selektovaného indukovaného sputa po pozitivním bronchoprovokačním testu s alergenem - grafické znázornění









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 hlášena profesionální rinitida (osoba 1 a 2), u dvou osob s negativní rhinomanometrií bylo přiznáno ohrožení profesionální rinitidou (osoba 3 a 4). Detaily testů a výsledků analýzy indukovaného sputa jsou uvedeny v tabulkách č. 30, 31 a grafech č. 42-46.

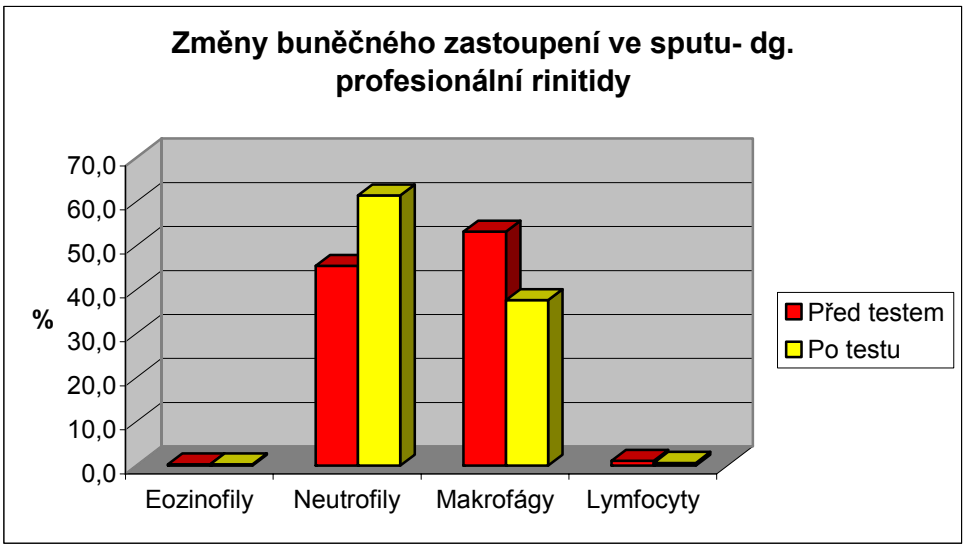
Tab. 30. Diagnóza rinitidy - detaily testu

Osoba	Druh testu	Pozitivní rhinomanometrie	Klinický nález odpovídající rinitidě	Alergenní noxa	Závěrečná diagnóza
1	test v laboratoři	ano	ano	LMW	profesionální rinitida
2	test v laboratoři	ano	ano	HMW	profesionální rinitida
3	test v laboratoři	ne	ano	HMW	ohrožení profesionální rinitidou
4	test v laboratoři	ne	ano	LMW	ohrožení profesionální rinitidou

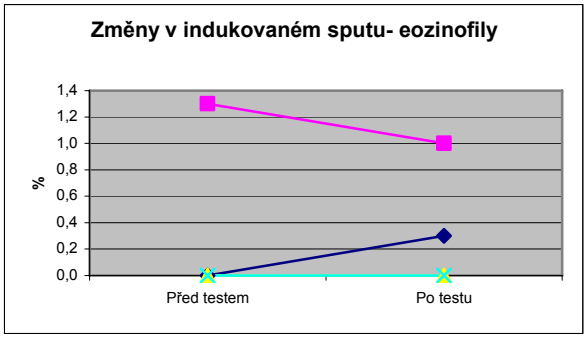
Tab. 31. Změny v buněčném zastoupení v selektovaném indukovaném sputu u 4 osob s diagnostikovanou profesionální rinitidou a ohrožením profesionální rinitidou

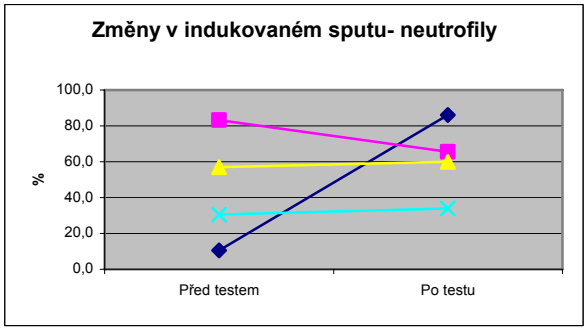
	Eozinofily %		Neutrofily %		Makrofágy %		Lymfocyty %	
Osoba	Před testem	Po testu	Před testem	Po testu	Před testem	Po testu	Před testem	Po testu
1	0,0	0,3	10,6	86,0	88,0	13,6	1,3	0,0
2	1,3	1,0	83,3	65,6	15,0	32,3	0,3	1,0
3	0,0	0,0	57,0	60,0	41,3	39,6	1,6	0,3
4	0,0	0,0	30,6	34,0	68,3	65,0	1,0	1,0

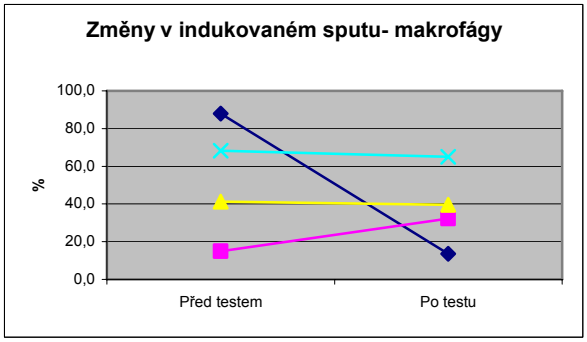
Graf 42. Změny buněčného zastoupení v selektovaném indukovaném sputu - dg. profesionální rinitidy- průměrné hodnoty

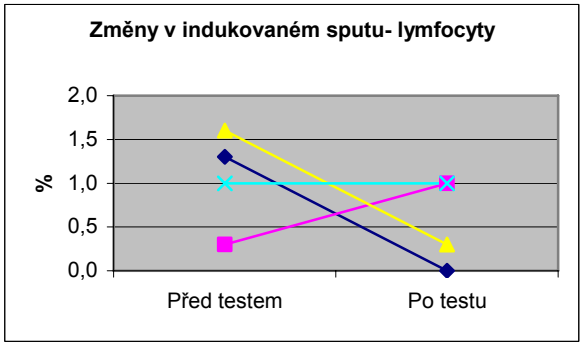


Graf 43-46. Změny v selektovaném indukovaném sputu u 2 osob s diagnostikovanou profesionální rinitidou a 2 osob s hlášeným ohrožením profesionální rinitidou - grafické znázornění jednotlivých osob









Negativní výsledky bronchoprovokačních testů byly zjištěny u 12 osob. Detaily testů jsou uvedeny v tabulce č. 32, změny buněčného zastoupení jsou uvedeny v tabulce č. 33 a graficky znázorněny v grafech č. 47-51.

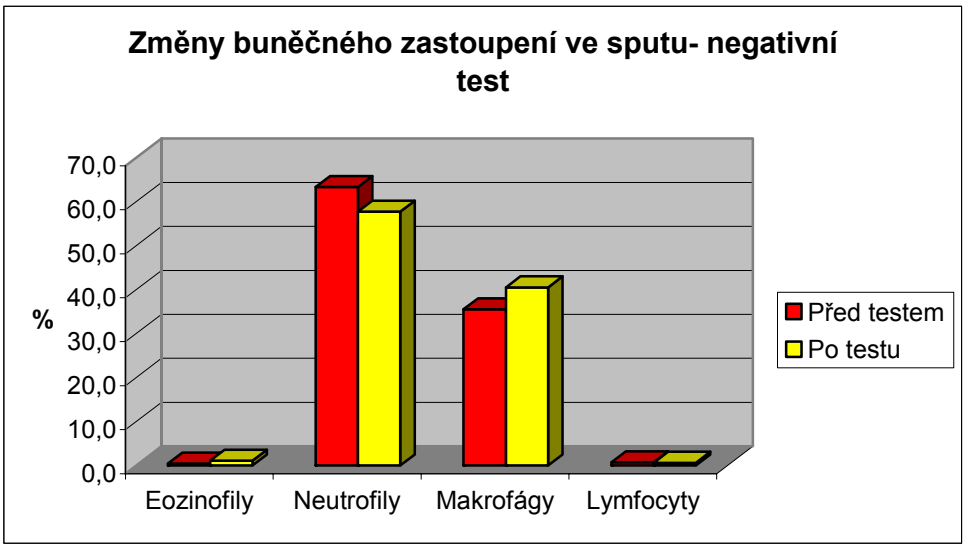
Tab. 32. Negativní bronchoprovokační testy u 12 osob- detaily

Osoba	Druh testu	Počet testů	Alergenní noxa	Výsledek testů
1	test v laboratoři	3	LMW	negativní
2	test v laboratoři	1	HMW	negativní
3	test v laboratoři	2	LMW	negativní
4	test v laboratoři	1	LMW	negativní
5	test v laboratoři	3	HMW	negativní
6	test v laboratoři	3	HMW	negativní
7	test v laboratoři	1	LMW	negativní
8	test v laboratoři	4	HMW i LMW	negativní
9	reexpozice	1	LMW	negativní
10	test v laboratoři	1	HMW	negativní
11	test v laboratoři	2	HMW	negativní
12	test v laboratoři	2	LMW	negativní

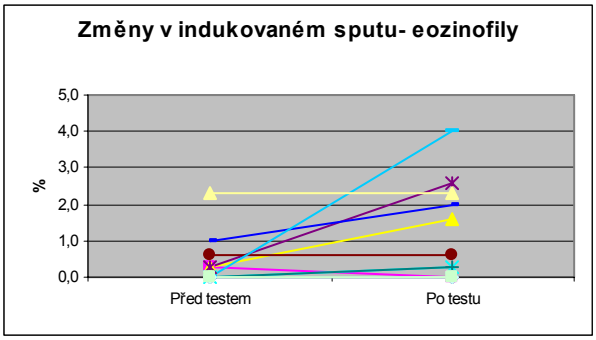
Tab. 33. Změny buněčného zastoupení v selektovaném indukovaném sputu u osob s negativním bronchoprovokačním testem. Tučným písmem jsou označeny osoby s významným zvýšením eozinofilů ve sputu po testu.

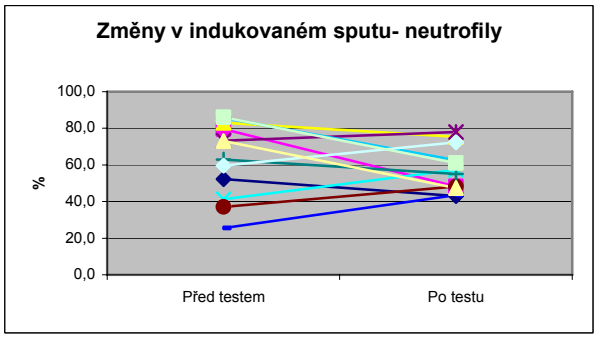
Osoba	Eozinofily %		Neutrofily %		Makrofágy %		Lymfocyty %	
	Před testem	Po testu	Před testem	Po testu	Před testem	Po testu	Před testem	Po testu
1	0,0	0,0	52,3	43,0	47,3	56,6	0,3	0,3
2	0,3	0,0	79,6	48,3	19,6	51,6	0,3	0,0
3	0,3	1,6	83,0	75,3	16,0	22,3	0,6	0,6
4	0	0,3	41,3	57,3	58,3	41,6	0,3	0,6
5	**0,3**	**2,6**	**73,3**	**78,0**	**26,0**	**19,3**	**0,3**	**0,0**
6	0,6	0,6	37,0	48,3	60,6	50,3	1,6	0,6
7	0,0	0,3	63,0	55,0	37,0	43,3	0,0	1,3
8	1,0	2,0	25,6	43,6	73,0	54,3	0,3	0,0
9	**0,0**	**4,0**	**85,6**	**62,6**	**14,3**	**33,0**	**0,0**	**0,3**
10	0,0	0,0	59,6	72,3	37,3	26,0	3,0	1,6
11	0,0	0,0	86,0	61,0	12,3	37,0	1,6	2,0
12	2,3	2,3	73,0	47,3	24,3	50,3	0,3	0,0

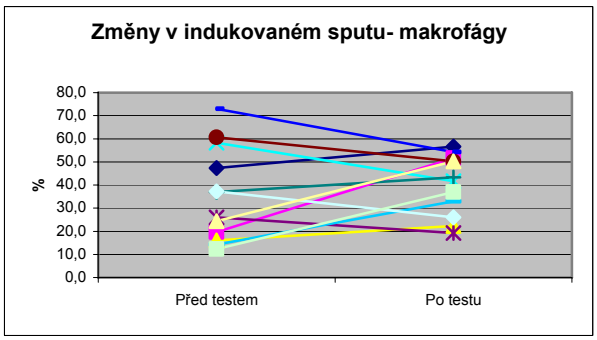
Graf 47. Změny buněčného zastoupení v selektovaném indukovaném sputu po pozitivním testu- průměrné hodnoty

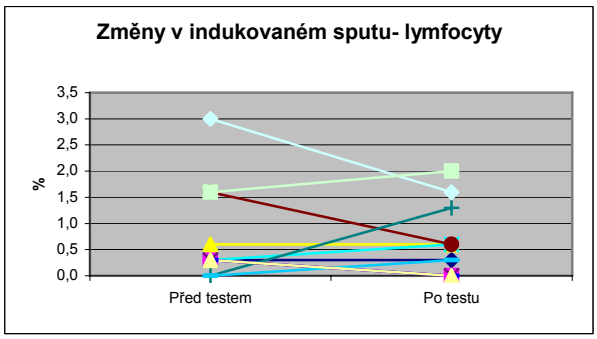


Graf 48-51. Změny v selektovaném indukovaném sputu u osob s negativním bronchoprovokačním testem- grafické znázornění









Při statistickém zhodnocení buněčných změn v selektovaném sputu bylo zjištěno významné zvýšení procentuálního zastoupení eozinofilů ($p=0,03$) po testu ve skupině osob s pozitivním bronchoprovokačním testem proti hodnotě před testem, další změny v buněčné zastoupení byly statisticky nevýznamné ($p<0,05$).

4.2.4. DISKUZE

Profesionální astma po vyřazení z expozice alergenu - metoda neselektovaného sputa

Při vyšetření skupiny osob s již přiznaným profesionálním astmatem nás zajímalo, zda vymizely nebo alespoň ustoupily příznaky astmatu po vyřazení z působení prokázaného profesionálního alergenu. V ideálním případě by se po zamezení kontaktu s alergenní noxou, vyvolávající prokazatelně astmatické obtíže pacientů, měly obtíže postupně zlepšovat či vymizet. Cílem dalšího sledování osob s profesionálním astmatem po vyřazení z expozice profesionálnímu alergenu je objektivní zjišťování přítomnosti a závažnosti astmatu. Kromě ryze výzkumných otázek je totiž třeba co nejpřesněji objektivizovat aktuální zdravotní stav vzhledem k nutnosti adekvátního zhodnocení ztížení společenského uplatnění pacienta s tímto onemocněním. Vyšetření indukovaného sputa je jednou z metod, která by mohla k objektivizaci pomoci.

V naší skupině bylo pouze pět osob z 37 vyšetřených osob (13,5 %) bez léčby a nevnímalo subjektivně astmatické obtíže po několika letech vyřazení z expozice profesionálnímu alergenu. Eozinofilní zánět ve sputu byl zjištěn u 25 % ze zhodnocených vzorků (u 5 osob s příznaky astmatu a pouze u jedné asymptomatické osoby). Také ve studii Maghniho (*2004*) bylo u 84 osob vyřazených z expozice profesionálnímu alergenu prokázáno

u podskupiny bez zlepšení zdravotního stavu významně vyšší zastoupení eozinofilů a neutrofilů než ve skupině se zlepšením. V naší skupině osob byl eozinofilní zánět významně častěji přítomný u osob, které byly v minulosti exponovány HMW alergenům než LMW alergenům. S tímto nálezem korespondoval i statisticky významně vyšší výskyt pozitivních výsledků nespecifického bronchoprovokačního testu u osob exponovaných také HMW látkám. Důvodem může být větší možnost expozice HMW alergenům, které jsou pro některé osoby profesionálním alergenem, ale nevyhnou se jim ani po opuštění svého pracoviště (tzv. ubikvitérní alergeny - pšeničná mouka, různé formy prachu) (*Klusáčková 2004a, Klusáčková 2005b, Klusáčková 2006*). Tyto osoby jsou tedy alergenu trvale exponovány. Eozinofilní zánět ve sputu byl v naší studii zjištěn i u jedné osoby bez subjektivních příznaků astmatu. Je otázkou, zda tato osoba potíže nevnímala či potlačovala či zda byl alergický zánět ve sputu zatím bez klinické odezvy a projeví se subjektivními obtížemi až později.

Často se diskutuje, zda by se měl laboratorně zjištěný asymptomatický zánět ve sputu již léčit. Giannini a kol. (*2000*) zjistili, že u asymptomatických osob léčených nízkými dávkami kortikosteroidů, kterým byly kortikosteroidy vysazeny, došlo nejprve k významnému zvýšení eozinofilů ve sputu a následně zhoršení astmatu.

Nález eozinofilního zánětu ve sputu u osob s profesionálním astmatem po vyřazení z expozice je tedy dalším významným objektivním faktorem přetrvávání onemocnění. U osob s bronchiálním astmatem se nejčastěji prokazuje eozinofilní zánět ve sputu (*Pin 1992, Fahy 1993*). U osob s perzistentním astmatem je popisován také noneozinofilní zánět vyznačující se zvýšeným zastoupením neutrofilů (*Gibson 2001*). Eozinofilní zánět se zpravidla uvádí jako prediktor dobré odpovědi na následnou kortikosteroidní léčbu (*Pavord 1999, Little 2000, Meijer 2002*). Oproti tomu Godon (*2002*) tento názor zpochybnil, neboť nenalezl rozdíl v odpovědi na kortikosteroidní léčbu u astmatiků s eozinofilním či noneozinofilním zánětem ve sputu.

Green (*2002*) srovnával výsledky léčby astmatiků buď podle doporučení Britské plicní společnosti nebo na základě analýzy buněčného zastoupení ve sputu (cílem byla normalizace eozinofilů ve sputu). Ve skupině léčené podle analýzy sputa nalezl výrazně snížený počet exacerbací astmatu bez potřeby další protizánětlivé terapie.

Jak vyplývá z uvedených studií, na využití analýzy sputa není dosud jednotný názor. Sledování eozinofilního, případně noneozinofilního zánětu ve sputu může být velmi cennou pomůckou v léčbě a diagnostice, ale na zánět v dýchacích cestách je nutno pohlížet komplexně. Je třeba si uvědomit, že astmatický zánět je charakterizován nejenom infiltrací aktivovaných eozinofilů, lymfocytů a žírných buněk, sekrecí prozánětlivých faktorů buněk a cytokinů, ale také zvýšenou mikrovaskulární permebilitou s exsudací plazmy, sekrecí hlenu a strukturálními změnami, zahrnujícími deskvamaci epitelu, ztluštění bazální membrány a hypertrofii hladké svaloviny dýchacích cest (*Pizzichini 2002*).

Při srovnání současných výsledků s odstupem průměrně 6,5 roku po vyřazení z profesionální expozice byly mezi skupinou astmatiků a osobami kontrolní skupiny nalezeny také statisticky významné rozdíly v dalších sledovaných parametrech: prick testech, ECP a nespecifickém bronchoprovokačním testu.

Jak je tedy patrné, ani po vyřazení u většiny pacientů nedošlo k normalizaci výsledků, ale spíš k přechodu profesionálního astmatu k astmatu perzistujícímu. Důvodem může být poměrně dlouhá průměrná doba, kdy tito lidé pracovali i přes obtíže v prostředí alergenu (průměrně 2,6 let).

Je tedy nepochybné, že při sledování vývoje onemocnění profesionálním astmatem u osob po vyřazení z expozice příslušnému alergenu by výsledky analýzy indukovaného sputa mohly výrazně přispět k monitorování stavu a případné úpravě léčby.

Ukazuje se tedy, že profesionální astma v naprosté většině případů přechází do chronicity. Příčinou může být skutečnost, že zánět v dýchacích cestách iniciovaný

profesionálním alergenem je dále udržován neprofesionálním alergenem, v dalších případech ubikvitérním profesionálním alergenem.

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

Změny v indukovaném sputu byly sledovány během specifických bronchoprovokačních testů za použití dvou metod - neselektovaného i selektovaného sputa. Obě metody byly zaváděny do praxe postupně s ohledem na náročnost. Metoda zpracování neselektovaného sputa nepotřebuje speciálnější vybavení laboratoře ani dlouhodobější zkušenosti a je rychlejší. Naopak metoda selektovaného sputa již vyžaduje jistou zkušenost v selekci sputa, aby vzorky byly co nejhodnotnější. Také požadavky na laboratorní vybavení jsou vyšší a doba zpracování je vzhledem k větší náročnosti delší. Proto byla do praxe nejdříve zavedena metoda neselektovaného sputa, později metoda selektovaného sputa. Postupné vyzkoušení obou metod nám umožnilo objektivněji zhodnotit výhody a nevýhody. Během postupného zavádění obou metod byla pozměněna i metoda samotné indukce sputa. V případě zpracování sputa neselektovaného předcházela inhalace vždy 5 ml NaCl roztoku v postupně se zvyšujících koncentracích (3%, 4%, 5%). V případě zpracování sputa selektovaného jsme na základě zkušeností tuto metodiku mírně modifikovali a pacienti inhalovali roztok NaCl každé koncentrace (3%, 4%, 5%) vždy jen po dobu 5 min. Modifikace metodiky byla zvolena na základě zkušeností s velmi rozdílnou dobou inhalace u jednotlivých osob a tím i délky celé indukce sputa. Nově zavedená metodika byla i příjemnější z hlediska komfortu pro pacienty.

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. Kontaminaci skvamózními buňkami jsme se snažili zabránit důsledným vyplachováním úst osobám před odběrem vzorku sputa, ale přesto byla kontaminace některých vzorků vysoká. Chybění výsledků některých vzorků bylo nevýhodné především u sledování během bronchoprovokačních testů, kdy se sputum odebíralo v určitých časových intervalech a nebylo možné odběr opakovat. Metoda zpracování neselektovaného sputa je sice rychlá, ale její nevýhodou je velká spotřeba roztoku k homogenizaci (DTT), protože celkový objem vzorku je větší. Tím je také tato metoda cenově náročnější. Pokud vzorek obsahuje velké množství slin, je velmi naředěný a při následném mikroskopickém odečtu je množství buněk v zorném poli malý a odečet trvá delší dobu.

Metoda zpracování selektovaného sputa se ukázala i přes větší náročnost výhodnější. Bylo nutné přesně selektovat části sputa z celého vzorku, což vyžadovalo zkušenost a jistou zručnost. Metoda také vyžadovala speciálnější laboratorní vybavení. Vzhledem k tomu, že výsledného materiálu ke zpracování (po selekci části sputa) bylo méně než při zpracování sputa neselektovaného, byl i objem roztoku použitý k homogenizaci nižší a tím byla výsledně tato metoda levnější. Úplné kontaminaci skvamózními buňkami nešlo zabránit, ale tato kontaminace byla podstatně menší než ve vzorcích sputa neselektovaného. Hustota buněk v zorném poli byla větší, a proto i mikroskopický odečet vzorků trval kratší dobu. Vzhledem k výsledným nálezům buněčného zastoupení během specifických testů se tato metoda ukázala jako výhodnější i přes vyšší počáteční náklady na laboratorní vybavení.

Při analýze neselektovaného sputa se významný nárůst eozinofilů po pozitivním bronchoprovokačním testu nepotvrdil (za významný se považuje alespoň nárůst o 2 %

(*Girard 2004*). V této výši bylo zaznamenáno zvýšení počtu eozinofilů pouze u jedné osoby s konečnou diagnózou profesionální rinitidy (nárůst o 2,1% po testu) (*Klusáčková 2004b, Klusáčková 2005a*).

Při analýze selektovaného sputa bylo zjištěno statisticky významné zvýšení počtu eozinofilů ve sputu po pozitivním testu. 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 , které užívaly během testování inhalační kortikosteroidy a došlo u nich k bronchospastické reakci po testovaném alergenu, nebyl nárůst eozinofilů zaznamenán. U dvou osob exponovaných polyuretanům (obsahující izokyanáty) došlo po testu ke zvýšení počtu neutrofilů ve sputu (o 20,3 % a 33,2 %). V celé skupině však zvýšení neutrofilů nebylo statisticky významné. K podobným závěrům došla i Lemiere, která také zaznamenala u některých osob po expozici izokyanátům zvýšení počtu neutrofilů ve sputu (*Lemiere 2002*). U osob s projevy alergické rinitidy po pozitivním testu nebyl zaznamenán významný nárůst eozinofilů po testu.

Ve skupině osob s negativním výsledkem bronchoprovokačních testů (z hlediska ventilačních parametrů) byl u dvou osob zaznamenán vyšší nárůst eozinofilů než 2% po ukončení testů (o 2,3 % a 4 %), i přes nevýznamné změny ve ventilačních parametrech.

Je možné, že po delší expozici by k významným poklesům ventilačních parametrů mohlo dojít. Podobně Lemiere (*2000*) zjistila při sledování buněčných změn ve sputu po aplikaci postupně se zvyšujících koncentrací alergenu u osob s potvrzeným profesionálním astmatem nárůst eozinofilů, k němuž došlo v den předcházející významnému poklesu ventilačních parametrů. U dvou osob z naší skupiny, kde byl zjištěn nárůst eozinofilů po testování, by možná k podobné reakci mohlo také dojít při opakované expozici alergenu. Problémem je, že u většiny pacientů se podezřívá více alergenů z pracoviště, takže se nemusí podařit určit jediný alergen k testování a testuje se více alergenů. Není proto schůdné, aby každý z potenciálních alergenů byl testován opakovaně. U osob se vzestupem eozinofilů v indukovaném sputu by však bylo ideální provést buď delší reexpoziční test na pracovišti za sledování změn ventilačních parametrů a změn ve sputu nebo opakovanou expozici po několik dní. Změny eozinofilů v indukovaném sputu během testu v laboratoři by tak mohly významně přispět k rozhodnutí o dalším postupu testování profesionálními alergeny.

Změny parametrů indukovaného sputa po specifických bronchoprovokačních testech s profesionálními alergeny byly sledovány v několika studiích. Jako přínosné se ukázalo právě sledování počtu eozinofilů ve sputu (*Lemiere 2007*). Lemiere (*2001*) popsala za 7 hodin po expozici profesionálním alergenům (HMW i LMW) významný nárůst počtu eozinofilů u 13 ze 17 osob s pozitivním bronchoprovokačním testem. Kromě toho došlo ke zvýšení u 2 ze 14 osob s negativním bronchoprovokačním testem, které však nebylo tak výrazné jako u pozitivní odpovědi. Obata (*1999*) zaznamenal zvýšení procentuálního zastoupení eozinofilů za 6 a 24 hodin po pozitivním bronchoprovokačním testu u všech 9 osob exponovaných červenému cedru (alergenem je kyselina plikatová – LMW alergen), naproti tomu u negativního bronchoprovokačního testu byl za 6 hodin významný nárůst procenta eozinofilů u 3 osob z 8, tj. u 37,5 %.

Krakowiak (*2005*) zjistila v indukovaném sputu u skupiny 43 osob významný nárůst eozinofilů, lymfocytů a bazofilů 22 hodin po pozitivním provokačním testu se směsí alergenů mouky a obilovin. Nárůst neutrofilů nezaznamenala. Fernandez-Nieto (*2006*) našel u osob s profesionálním astmatem po expozici styrenu malý nárůst eozinofilů a výrazný nárůst aktivovaných bazofilů ve sputu 24 hodin po testu. Gauvreau (*2000*) zjistil zvýšení eozinofilů a bazofilů ve sputu u osob po bronchoprovokačním testu s alergeny plevelů, domácího prachu,

trávy a kočky. Anees a kol. (*2002*) popsala při sledování 38 profesionálních astmatiků exponovaných LMW alergenům, že eozinofilní zánět ve sputu mělo pouze u 36,8 % osob. U ostatních byl zánět non-eozinofilní. Obě skupiny astmatiků měly zvýšené procento neutrofilů ve sputu (více než 55%). Nebyla zjištěna závislost eozinofilie ve sputu na alergenu, délce expozice, atopii či léčbě. Moscato (*2005*) zjistil eozinofilní zánět u 7 z 10 astmatiků (kadeřníků) s profesionálním astmatem s přecitlivělostí na amonium persulfát, potvrzenou specifickým bronchoprovokačním testem.

Lemiere (*1999*) také hodnotila změny ve sputu u 16 osob sledovaných po dobu profesionální expozice a během období vyřazení z práce. Zjistila, že ve skupině osob s profesionálním astmatem dochází při vyřazení z pracovního prostředí s působícím alergenem k poklesu počtu eozinofilů (u 8 osob z 10). Tento pokles nebyl pozorován u skupiny neprofesionálních astmatiků jako celku (u tří osob byl sice pozorován pokles v počtu eozinofilů v období mimo práci, tyto změny však byly velmi malé).

Ani v naší skupině pacientů s pozitivním provokačním testem se neobjevilo zvýšení procentuálního zastoupení eozinofilů ve sputu u všech sedmi osob. Výjimkou byly dvě osoby, které byly testovány za léčby inhalačními kortikosteroidy, u nichž mohl být eozinofilní zánět kortikoidní léčbou potlačen. Dále u osoby s astmatickou reakcí pozdního typu po expozici polyuretanu za 5 hodin po expozici. Hledání podobnosti mezi osobami s nárůstem eozinofilů po testu malé skupiny je obtížné. Společným faktorem by mohla být přítomnost časné reakce na alergen bez léčby kortikosteroidy během testování.

4.2.5. ZÁVĚR

Vyšetření indukovaného sputa umožňuje téměř neinvazivně získat informaci o stavu zánětu přímo v dýchacích cestách po vyřazení z působení profesionálnímu alergenu a doplňuje tak informace získané funkčním vyšetřením plic - spirometrií a nespecifickým bronchoprovokačním testem. Výsledky potvrdily klinickou zkušenost, že prognóza alergického zánětu u astmatu s primární přecitlivělostí na alergeny omezené na pracoviště - zejména nízkomolekulární látky, je příznivější, než u alergenů ubikvitérních, zejména vysokomolekulárních. Nález eozinofilního zánětu ve sputu pacientů tedy podporuje diagnózu bronchiálního astmatu a kromě toho ukazuje na perzistenci či horší kontrolu onemocnění (*Klusáčková 2003a, Klusáčková 2003b*). Vyšetření indukovaného sputa potvrdilo jeho přínos pro diagnostiku alergického zánětu v dýchacích cestách.

Metoda neselektovaného sputa, kdy jsou jeho součástí i sliny, se nejeví jako přínosná metoda - v naší studii nedošlo k nárůstu eozinofilů u osob s pozitivním provokačním testem. Naproti tomu při použití metody selektovaného sputa byly změny procentuálním zastoupení eozinofilů po testu statisticky významné. Zvýšení počtu eozinofilů bylo zjištěno u osob, u nichž byl pozitivní specifický bronchoprovokační test s časnou reakcí. Nárůst eozinofilů byl zaznamenán i u některých osob s negativním bronchoprovokačním testem. Je pravděpodobné, že jde o předstupeň k bronchospastické reakci, jak nasvědčují literární údaje. Vyšetření sputa by tedy mohlo pomoci vymezit okruh osob, které by mohly zareagovat pozitivní bronchospastickou reakcí na testovaný alergen po delší či opakované expozici.

4.2.6. VYUŽITÍ POZNATKŮ PRO PRAXI

Použití indukovaného sputa je cenným markerem, který verifikuje přetrvávání onemocnění bronchiálním astmatem a současně stupeň závažnosti alergického zánětu v dýchacích cestách. Má proto velký přínos v pracovním lékařství a v dispenzarizaci osob s profesionálním bronchiálním astmatem, které již nejsou v kontaktu s profesionálním

alergenem. U osob s již potvrzeným profesionálním astmatem po vyřazení z expozice profesionálního alergenu, které jsou již bez subjektivních obtíží, nález v indukovaném sputu umožní sledovat, zda alergický zánět skutečně po eliminaci alergenu ustoupil, popřípadě, zda je léčba postižené osoby dostatečná a onemocnění je dobře kontrolováno (*Klusáčková 2003a, Klusáčková 2006*). Tato objektivní laboratorní metoda přispěje ke zhodnocení míry závažnosti tohoto profesionálního onemocnění, což je významné pro zhodnocení stupně ztížení společenského uplatnění.

Při diagnostice suspektního profesionálního astmatu u osob s negativním výsledkem prováděných provokačních testů, ale s nárůstem eozinofilů po negativním testu, by mohl tento nález rozhodnout o přínosu dalšího provokačního testu buď na pracovišti či opakovanou expozici alergenu po více dní, neboť po dlouhodobé eliminaci z prostředí profesinálního alergenu nemusí pacient zareagovat výraznou bronchospastickou reakcí po jedné expozici alegenu.

Klinikám a oddělením pracovního lékařství se tak rozšiřuje možnost hodnocení stupně závažnosti bronchiálního astmatu u hlášených onemocnění i ztížení společenského uplatnění a sociálně ekonomických dopadů onemocnění pro jednotlivé pacienty.

5 SOUHRN

Profesionální astma je jedním z nejčastějších profesionálních onemocnění dýchacího systému. Jeho časná diagnostika je důležitá pro další rozvoj onemocnění. V současné době se v diagnostice používají specifické bronchoprovokační testy, reexpozice na pracovišti, monitorování PEF nebo bronchiální hyperreaktivity na pracovišti a mimo něj. Někdy je však stanovení diagnózy obtížné, protože některá vyšetření nelze provést nebo jejich výsledky nejsou jednoznačné. Proto se hledají další parametry, které by pomohly při závěrečném rozhodování o diagnóze profesionálního astmatu. K takovým patří vyšetření kondenzátu vydechovaného vzduchu a analýza indukovaného sputa.

Kondenzát vydechovaného vzduchu (KVV)

1. Kondenzát vydechovaného vzduchu a sledované markery

KVV je bohatým zdrojem substancí, které odrážejí prostředí dýchacích cest a nabízí tak možnosti diagnostiky a monitorování různých onemocnění. Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu je jednoduchá zcela neinvazívní metoda, která může být prováděna i u dětí a vážně nemocných pacientů a opakována několikrát za sebou.

Leukotrieny (cys-LT a LTB_4) patří mezi metabolity kyseliny arachidonové. Vzhledem k funkci lze cys-LT považovat na markery obstrukce (působí bronchokonstrikčně, zvyšují hyperreaktivitu dýchacích cest). LTB_4 se podílí na chemotaxi neutrofilů, podporuje syntézu IgE protilátek a nukleární transkripci. Produkce cys-LT byla v minulosti sledována v moči (koncentrace LTE_4 jako hlavního metabolitu) a opakovaně byl popsán nárůst koncentrace LTE_4 v moči po pozitivním bronchoprovokačním testu s alergenem.

8-izoprostan je považován za marker oxidativního stresu a jeho koncentraci lze stanovit i v KVV. Zvýšená koncentrace 8-izoprostanu byla popsána u astmatiků včetně osob léčených kortikosteroidy.

2. Odběr KVV a analytická metoda

KVV byl odebírán pomocí přístroje Eco-Screen Jaeger. Leukotrieny a 8-izoprostan v KVV byly stanoveny pomocí imunoafinitní separace v kombinaci s LC/MS.

3. Sledování leukotrienů a 8-izoprostanu v KVV u osob s profesionálním astmatem a zdravých osob a korelace s dalšími parametry

Bylo vyšetřeno 39 zdravých dobrovolníků a 32 osob s bronchiálním astmatem, u kterých byl spolu s vyšetřením ventilačních parametrů odebrán jeden vzorek kondenzátu vydechovaného vzduchu.

U zdravých osob bylo rozmezí hodnot LTB_4 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.

Průměrná koncentrace LTC_4 v KVV byla významně vyšší ve skupině astmatiků ($p=0,0010$), ostatní markery se významně nelišily, kromě koncentrace LTB_4, která byla vyšší ve skupině zdravých osob ($p=0,0002$) než ve skupině osob s bronchiálním astmatem. Všechny sledované ventilační parametry byly významně nižší ve skupině osob s profesionálním astmatem.

Nebyla nalezena významná korelace mezi sledovanými ventilačními parametry a koncentracemi jednotlivých leukotrienů či 8-izoprostanu a to jak ve skupině zdravých osob, tak ani ve skupině osob s profesionálním astmatem.

4. Sledování 24-hodinové variability leukotrienů a 8-izoprostanu v KVV u osob vyšetřovaných pro podezření na alergické onemocnění dýchacích cest

Bylo vyšetřeno 57 osob přijatých k vyšetření pro podezření na profesionální bronchiální astma nebo rinitidu. Vyšetřena byla 24-hodinová variabilita markerů v KVV s vyšetřením ventilačních parametrů.

Provedeno bylo celkem 58 měření 24-hodinové variability KVV parametrů bez provokace alergenem - vždy 4x během 24 hodin v klidu (1. mezi 7:00 a 10:15 h, 2. mezi 10:30 a 14 h, 3. mezi 13:30 a 17:30 h, 4. mezi 7:00 a 10:15 h následující den). Osoby byly rozděleny do 2 skupin podle nálezu nespecifické bronchiální hyperrektivity.

Hodnoty sledovaných markerů v KVV se významně nelišily ani v parametru LTC_4, i když u bronchiálních hyperreaktorů (BHR) se průměrné hodnoty pohybovaly v rozmezí 60,8 až 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 pro 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). Variační koeficient jednotlivých markerů se mezi skupinami bronchiálních hyperreaktorů a non-hyperreaktorů významně nelišil.

5. Sledování leukotrienů a 8-izoprostanu v KVV během testů s profesionálními alergeny

Bylo vyšetřeno 47 osob přijatých pro podezření na profesionální bronchiální astma nebo rinitidu. Vyšetřena byla 24-hodinové variabilita ventilačních parametrů s odběrem KVV a byly provedeny specifické bronchoprovokační testy s profesionálními alergeny s odběrem KVV. Tři pacienti byli testováni za léčby inhalačními kortikosteroidy.

Čtyřicet jeden test s alergenem byl uzavřen dle výsledků ventilačních parametrů jako negativní, 6 testů bylo uzavřeno jako pozitivní bronchoprovokační odpověď na alergen.

Při sledování denní variability (4 měření) u osob s následně negativními bronchoprovokačními testy byla nalezena statisticky významná změna jen pro 8-izoprostan ($p=0,0138$). Pro ostatní parametry byly změny nevýznamné: FEV_1 $p=0,6340$, LTB_4 $p=0,1185$, LTC_4 $p=0,0889$, LTD_4 $p=0,4027$ a LTE_4 $p=0,0504$. Během specifických brochoprovokačních testů (vyšetření před testem, ihned po testu, za 2 h, za 5 h a za 24 h po testu) nebyla nalezena statisticky významná změna: FEV_1 $p=0,7610$, LTB_4 $p=0,4716$, LTC_4 $p=0,0556$, LTD_4 $p=0,9030$, LTE_4 $p=0,5365$ a 8-izoprostan $p=0,3110$.

Šest bronchoprovokačních testů s alergeny bylo vyhodnoceno jako pozitivní z hlediska bronchomotorické odezvy. U 3 osob se objevila bronchokonstrikce ihned po testu, u 3 osob se za 5 h po expozici alergenu. Počet osob s pozitivitou testu byl malý (6), proto nebylo provedeno statistické zpracování a data byla zhodnocena pouze vizuálně s přihlédnutím k průběhu reakce.

Pacient 1: V klidu byla pozorována tendence k nárůstu koncentrace markerů v KVV v době poledne a pozdního odpoledne. Během pozitivního testu (časná reakce) se objevil nárůst koncentrace LTC_4, D_4, E_4 a 8-izoprostanu za 2 h a 5 h po testu, u LTB_4 jen 2 h po testu.

Pacient 2: V klidu byla pozorována tendence k nárůstu koncentrace markerů v KVV v době poledne (LTB_4, E_4, C_4, 8-izoprostan) a pozdního odpoledne (LTC_4). Během pozitivního testu (časná reakce) byl patrný nárůst koncentrace 8-izoprostanu ihned a za 2 h po testu.

Pacient 3: V klidu byla tendence k nárůstu koncentrací LTC_4 a LTE_4 při poledním měření. Během pozitivního testu (časná reakce), byl vzestup koncentrace LTC_4 za 2 h po testu.

Osoba 4: V klidu nebyla evidentní fluktuace v hladinách markerů v KVV. Během pozitivního testu (pozdní reakce) byl nárůst koncentrace LTC_4 ihned po testu, koncentrace 8- izoprostanu byla vysoká (oproti hodnotám naměřeným v klidu) po celou dobu testu.

Osoba 5: V klidu nebyla evidentní fluktuace v hladinách markerů v KVV. Během pozitivního testu (pozdní reakce) byl nárůst koncentrace LTC_4 ihned po testu a za 5 hodin po testu, hodnota LTB_4 byla vysoká (oproti hodnotám naměřeným v klidu) po celou dobu testu.

Osoba 6: V klidu byla zaznamenána fluktuace v hladinách všech markerů v KVV. Během pozitivního testu byl nárůst LTC_4 a LTB_4 v době maximální zaznamenané bronchokonstrikce (5h po testu), 8-izoprostan byl zvýšený 2h po testu.

6.Diskuze a závěr

Při srovnání koncentrací LT a 8-izoprostanu v KVV mezi zdravými osobami a pacienty s astmatem byly i přes léčbu nalezeny významně vyšší hodnoty LTC_4 ve skupině astmatiků. Parametr LTC_4 by mohl být po validaci na větší skupině osob používán ke sledování vývoje a přetrvávání astmatu. Jeho detekci nám umožnila nově vyvinutá analytická metoda využívající LC/MS.

Při sledování 24-hodinové variability LT a 8-izoprostanu u osob vyšetřovaných pro podzření na profesionální alergické onemocnění dýchacích cest nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi podskupinami bronchiálních hyperreaktorů a non-hyperreaktorů. Pro všechny parametry byly zjištěny poměrně vysoké variační koeficienty. V našich skupinách byly u bronchiálních non-hyperreaktorů nejvyšší hodnoty leukotrienů zaznamenány mezi 13.30 a 17.00 hodinou, koncentrace 8-izoprostanu byly naopak v tuto dobu nejnižší. Ve skupině bronchiálních hyperreaktorů byl výraznější nárůst zaznamenán pouze pro LTC_4 v době mezi 10.30 a 17.30 hodin. U skupiny bronchiálních hyperreaktorů byla variabilita ovlivněna různou mírou stability astmatu a ventilačních parametrů. Vzhledem k velké variabilitě sledovaných KVV parametrů je nutné v každé studii týkající KVV dodržovat identické časy odběru vzorků u všech pacientů, pokud bude prováděn pouze jeden odběr KVV.

Během negativních provokačních testů nebyly nalezeny signifikantní změny ve sledovaných markerech v KVV. Provokační testy s alergeny prokázaly profesionalitu pouze u šesti pacientů, nebylo tedy možné tyto změny statisticky hodnotit. Byla však zaznamenána tendence ke zvýšení LTC_4 v KVV po testu u 5 pacientů. Nárůst koncentrace ostatních KVV markerů byl individuální u každého pacienta.

Pro další vývoj poznatků o KVV markerech během testů s profesionálními alergeny bude nutné se zaměřit na jeden alergen z důvodu již tak vysoké intraindividuální variability KVV parametrů.

Indukované sputum

1. Indukované sputum- možnosti analýzy

Indukované sputum je sputum, jehož tvorba je indukovaná pomocí inhalace roztoku NaCl. Rozborem indukovaného sputa lze získat údaje o buněčném zastoupení a analýzou supernatantu i o markerech zánětu nebo oxidativního stresu. Koncentrace roztoků NaCl, které se k indukci sputa používají, se pohybují nejčastěji v rozmezí 0,9-7 %. U bronchiálních hyperreaktorů by mohla inhalace hypertonického roztoku soli způsobit pokles ventilačních parametrů, proto se doporučuje aplikace salbutamolu (200-400 μg) nebo jiného β_2-agonisty

před inhalací NaCl, což u většiny osob možnému poklesu ventilačních parametrů zabrání. Sputum je možné zpracovat jako neselektované (včetně slin) nebo selektované (bez slin). Buněčný rozbor indukovaného sputa přispívá k diagnostice a sledování onemocnění dýchacích cest - především bronchiálního astmatu. U bronchiálního astmatu jsou sledovanými buňkami především eozinofily (normální nález do 2 %).

2. Metoda neselektovaného sputa - sledování buněčných parametrů během testů s profesionálními alergeny a korelace s ostatními parametry

Pro podezření na profesionální astma bylo vyšetřeno 22 pacientů, u kterých byly provedeny specifické bronchoprovokační testy. Kromě specifických bronchoprovokačních testů byly sledovány tyto parametry: eozinofily v krvi, celkové IgE, ECP, kožní prick testy, vyšetření ventilačních parametrů 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.

Indukované sputum bylo analyzováno také u 19 osob kontrolní skupiny v rámci jednoho odběru, ostatní vyšetření byla stejná s výjimkou bronchoprovokačního testu s alergenem.

Úspěšnost indukce sputa byla pro odběr před testem 60 % (13 z 22 osob), pro odběr po testu byla 82 % (18 z 22). Zhodnocení změn v indukovaném sputu bylo tedy možné u 3 osob s potvrzenou diagnózou profesionálního astmatu, u 3 osob s profesionální rinitidou a u 7 osob, které na testovanou látku nezareagovaly.

Při srovnání průměrných hodnot parametrů indukovaného sputa před specifickým bronchoprovokačním testem a po něm (hodnoceny byly eozinofily, neutrofily, makrofágy, lymfocyty) nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly na hladině $p<0,05$. U osob s pozitivním výsledkem bronchoprovokačního testu s alergenem (dg. profesionálního astmatu) nebyl po testu pozorován výrazný nárůst eozinofilů. U jedné z osob s diagnostikovanou profesionální rinitidou byl zaznamenán vzestup eozinofilů z 0,7 na 2,8 %.

Při hodnocení výsledků nebyla nalezena korelace mezi eozinofily ve sputu před testem a parametry FEV_1, IgE a eozinofily v krvi. Při srovnání průměrných hodnot eozinofilů ve sputu před testem u podskupin pacientů dělených na neatopiky a atopiky podle prick testů (negativní vs. pozitivní) statisticky významný rozdíl ($p<0,05$).

Statisticky významné rozdíly ($p<0,05$) byly zjištěny pro parametry IgE, ECP a nespecifický bronchoprovokační test mezi skupinou všech pacientů se suspektním profesionálním astmatem bez ohledu na konečný výsledek specifických bronchoprovokačních testů a mezi skupinou kontrolních osob. Tento výsledek odpovídá skutečnosti, že šlo o osoby s alergickým onemocněním dýchacích cest. Podskupina pacientů s pozitivním provokačním testem a konečnou diagnózou profesionálního astmatu se také signifikantně lišila v parametrech IgE protilátky a FEV_1 ($p<0,05$) od kontrolní skupiny.

3. Metoda neselektovaného sputa - sledování buněčných parametrů u pacientů s profesionálním astmatem a korelace s ostatními parametry

Byla vyšetřena skupina 37 osob s diagnostikovaným profesionálním astmatem průměrně 6,5 roku po vyřazení z expozice alergenu a 19 osob kontrolní skupiny. Vyšetření astmatiků bylo provedeno v časovém odstupu po vyřazení z expozice profesionálnímu alergenu a zahrnovalo: eozinofily v krvi, celkové IgE, ECP, kožní prick testy, vyšetření

ventilačních parametrů a nespecifický bronchoprovokační test s histaminem. Byl odebrán jeden vzorek indukovaného sputa.

U astmatiků byly srovnány výsledky získané při prvním vyšetření na klinice v době hlášení nemoci z povolání a výsledky získané při posledním vyšetření. Pro žádné sledované parametry nebyly shledány statisticky významné rozdíly mezi prvním a posledním vyšetřením (pro prick testy byl parametr p= 0,0523, tedy hraniční).

Výsledky vyšetření získané při posledním vyšetření byly také porovnány s výsledky kontrolní skupiny. Statisticky významně ($p<0,05$) byly u skupiny astmatiků častější pozitivní výsledky pro parametry: prick testy, ECP a nespecifický bronchoprovokační test.

Byly srovnány i výsledky podskupin osob exponovaných vysokomolekulárním a nízkomolekulárním alergenům. U podskupiny osob exponované vysokomolekulárním alergenům byla statisticky významně ($p<0,05$) častější zvýšená bronchiální hyperreaktivita při bronchoprovokačním testu s histaminem, ostatní parametry se významně nelišily.

Úspěšnost indukce sputa byla u astmatiků 65%, u osob kontrolní skupiny 87,9%. U všech kontrolních osob 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 %). Jedna osoba ze skupiny se zvýšenými eozinofily neudávala subjektivní astmatické obtíže, ale ostatní sledované objektivní parametry byly u této osoby také patologické (nespecifická bronchiální hyperreaktivita, prick testy, ECP, eozinofily v krvi procentuálně).

Zvýšené procentuální zastoupení eozinofilů ve sputu bylo významně častější ($p<0,05$) u skupiny osob exponovaných HMW alergenům než LMW alergenům. Korelace mezi eozinofily ve sputu a současnými parametry FEV_1, IgE nebo eozinofily v periferní krvi nebyla nalezena. Ani korelace mezi neutrofily ve sputu a FEV_1 nebo FVC nebyla nalezena.

4. Metoda selektovaného sputa- sledování buněčných parametrů během provokačních testů s profesionálními alergeny a korelace s dalšími faktory

Pro podezření na profesionální astma nebo rinitidu bylo vyšetřeno 23 pacientů, u kterých byly provedeny specifické bronchoprovokační testy. Dále byly vyšetřeny tyto parametry z krve: eozinofily, celkové IgE a ECP. Byly provedeny kožní prick testy, vyšetření ventilačních parametrů a proveden nespecifický bronchoprovokační test s histaminem. Specifické bronchoprovokační testy byly provedeny s alergeny v expoziční kabině nebo reexpozicí na pracovišti. Indukované sputum bylo odebráno před specifickým bronchoprovokačním testem a 24 hodin po něm.

U sedmi osob byly výsledky bronchoprovokačních testů pozitivní - bylo potvrzeno profesionální bronchiální astma, u čtyř osob byla potvrzena profesionální rinitida či ohrožení profesionální rinitidou a u dvanácti osob byl test s alergenem negativní.

Ve skupině osob s pozitivním bronchoprovokačním testem byla zjištěna statisticky významná ($p=0,03$) změna procentuálního zastoupení eozinofilů před testem a po testu. Při analýze selektovaného sputa došlo k významnému vzestupu eozinofilů ve sputu u tří ze sedmi osob - o více než 2% (průměrně o 3,7 %) po pozitivním bronchoprovokačním testu, u čtvrté osoby byl nárůst hraniční (1,7 %). U dalších dvou osob s bronchospastickou reakcí po testovaném alergenu, které užívaly během testování inhalační kortikosteroidy a u jedné osoby s pozdní astmatickou reakcí, nebyl zaznamenán významný nárůst eozinofilů. U žádné osoby nebyl zaznamenán pokles v zastoupení eozinofilů.

U všech osob s významným či hraničním nárůstem počtu eozinofilů po testu byla pozorována bronchospastická reakce na alergen bezprostředně po aplikaci alergenu (u dvou osob dokonce opakovaná reakce i po 5 hodinách, tedy duální reakce).

U osob s diagnostikovanou rinitidou po provokačním testu nebyl zaznamenám významný nárůst eozinofilů.

Naproti tomu ve skupině s negativním provokačním testem k významné změně buněčného zastoupení ve sputu před testem a po testu nedošlo. U dvou osob byl však zaznamenán nárůst procentuálního zastoupení eozinofilů ve sputu (o 2,3% a 4%), u dalších 10 osob k významnému vzestupu podílu eozinofilů nedošlo.

5. Diskuze a závěr

Při analýze neselektovaného sputa významný nárůst eozinofilů v případě pozitivního bronchoprovokačního testu nebyl nalezen. Vzestup eozinofilů byl zaznamenán pouze u jedné osoby s konečnou diagnózou profesionální rinitidy (nárůst o 2,1 % po testu). Metoda neselektovaného sputa se v našich podmínkách neukázala jako přínosná pro sledování změn v dýchacích cestách během testování s alergeny.

Velmi vhodnou se však jeví analýza selektovaného sputa. Při ní byl nárůst eozinofilů nalezen u osob s pozitivní reakcí na alergen, které nebyly léčeny kortikosteroidy, u tří osob byl vzestup nejméně 2%, u jedné osoby byl vzestup nižší - 1,7 %. U žádného pacienta s pozitivním výsledkem bronchoprovokačního testu nebyl zaznamenán pokles v procentuálním zastoupení eozinofilů. Ke vzestupu nedošlo u osob léčených kortikosteroidy během testování, z toho důvodu analýza indukovaného sputa za léčby kortikosteroidy nebude patrně vhodná.

Nárůst alespoň o 2 % eozinofilů ve sputu byl zaznamenán také u dvou osob s negativním výsledkem bronchoprovokačních testů. U těchto osob by pokračování v expozici alergenu buď formou reexpozice na pracovišti či opakované expozice alergenu po více dní umožnilo zjistit, zda byl nárůst náhodný, či osoba opravdu na alergen zareaguje.

Profesionální bronchiální astma poskytuje jedinečnou příležitost studia vývoje astmatu po eliminaci kontaktu s alergenem. Velmi významné bylo proto sledování, zda u osob s již přiznaným profesionálním astmatem došlo k vymizení příznaků astmatu při vyřazení z původního pracoviště. Eozinofilní zánět ve sputu byl zjištěn v 25 % hodnocených vzorků. Byl statisticky významně častější u osob exponovaných v minulosti vysokomolekulárním alergenům než alergenům nízkomolekulárním. S tímto nálezem korespondoval i statisticky významně vyšší výskyt zvýšené bronchiální reaktivity u osob exponovaných také vysokomolekulárním látkám. Důvodem může být obtížnější eliminace ubikviterních vysokomolekulárních alergenů v běžném životě, které jsou pro některé osoby profesionálním alergenem, ale nevyhnou se jim ani po opuštění svého pracoviště (pšeničná mouka, rostlinné alergeny, různé formy prachu).

Srovnání výsledků vyšetření u astmatiků při první a poslední hospitalizaci - eozinofily v krvi, celkové IgE, ECP, vyšetření ventilačních parametrů a nespecifický bronchoprovokační test - přinesly na první pohled překvapivý závěr, neboť výsledky se významně nelišily přesto, že vyšetřované osoby byly již průměrně 6,5 roku mimo kontakt s profesinálním alergenem.

Analýza selektivního indukovaného sputa ani markerů v KVV jako speciální izolované metody nepřinášejí zatím dostatečnou informaci o stavu zánětu v dýchacích cestách při profesionálním bronchiálním astmatu. Jsou však užitečným kamínkem do mozaiky při posuzování tohoto onemocnění. Další perspektivu naznačuje možnost kombinace obou metod a provedení analýzy leukotrienů a dalších markerů zánětu přímo v indukovaném sputu.

Celý komplex vyšetření provedených v této studii svědčí o tom, že bronchiální astma je chronické onemocnění, které zatím nelze zcela vyléčit. Pokud jde o profesionální bronchiální astma, je odůvodněné trvalé vyřazení z kontaktu s alergenem, dispenzarizace a důsledná léčebná kontrola astmatu, stejně jako zvýšení bodového hodnocení pro ztížení společenského uplatnění při zhoršení stavu.

6 SUMMARY

Occupational asthma is one of the most frequent occupational diseases of the respiratory tract. Early diagnosis is important for the next development of the disease. Nowadays, the specific challenge tests, workplace exposure, PEF or bronchial hyperreactivity monitoring at the workplace and out the workplace are used in occupational asthma diagnostics. Sometimes the assessment of the final diagnosis is difficult because some examination cannot be performed or the results are ambiguous. Therefore the new parameters, which could help in final diagnostic resolution, are needed. Exhaled breath condensate analysis and analysis of induced sputum belong to them.

Exhaled breath condensate (EBC)

1. Exhaled breath condensate and EBC markers

EBC is a rich source of substances reflecting respiratory tract and offers many possibilities of diagnostics and monitoring of various diseases. Collection of EBC is a simple, non-invasive method which can be used in children or seriously ill patiens and can be repeated frequently.

Leukotrienes (cys-LT and LTB_4) are metabolites of arachidonic acid. With regard to their function, cys-LT can be thought as markers of obstruction (they cause the bronchoconstriction, and increase the airways hyperreactivity). LTB_4 acts as a chemoattractant of the neutrophils, supports the synthesis of IgE and the nuclear transcription. Production of cys-LT was monitored in the urine in the past (concentration of LTE_4 as a main metabolite of cys-LT). The elevation of LTE_4 in urine was repeatedly reported in the literature after positive challenge tests with allergens.

8-isoprostane is considered to be a marker of oxidative stress and it can be detected in the EBC. Increased concentration of 8-isoprostane has been described in asthmatics including those treated by corticosteroids.

2. Collection and analysis of the EBC

EBC was collected using Eco-Screen Jaeger. Leukotrienes and 8-isoprostane in the EBC were analysed by the immunoafinite separation in combination with LC/MS.

3. Monitoring of leukotrienes and 8-isoprostane in EBC in patients with occupational asthma and in healthy subjects

Thirty-nine healthy subjects and 32 patients with occupational asthma were examined. Ventilatory parameters in parallel with the EBC collection were analysed.

In healthy subjects the concentration of leukotrienes were following: LTB_4 15-95 pg/ml vs. 0-57 pg/ml in asthmatics, 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-isoprostane 16-222 pg/ml vs. 28-116 pg/ml.

Mean concentration of LTC_4 was significantly higher in the group of asthmatics ($p=0.0010$); LTB_4, on the other hand, was higher in the group of controls ($p=0.0002$). All monitored ventilatory parameters were significantly lower in the group of occupational asthmatics.

No correlation was found in the group of either healthy subjects or occupational asthmatics between ventilatory parameters and EBC markers (leukotrienes or 8-isoprostane) concentrations.

4. Monitoring of diurnal variation of leukotrienes and 8-isoprostane in EBC in persons examined for suspected allergic respiratory disease

Fifty-seven people were examined with suspicion on occupational asthma or rhinitis. 24-hours variation of EBC markers in parallel with ventilatory parameters was examined.

Totally 58 measurements of 24-hours variation of EBC parameters without allergen provocation were performed - four times during 24 hours in rest (1. between 7:00 and 10:15 hours, 2. between 10:30 and 14:00 hours, 3. between 13:30 and 17:30 hours, 4. between 7:00 and 10:15 on the second day). Patients were divided into two groups according to the presence of non-specific bronchial hyperresponsiveness.

Values of analysed EBC parameters slightly differed (but not significantly) in parameter LTC_4, the mean values in bronchial hyperreactors (BHR) were in the range of 60.8-70.0 pg/ml and in bronchial non-hyperreactors (n-BHR) in the range of 48.4-57.5 pg/ml. The range of mean values for other parameters were: 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-isoprostane 61.2-68.8 pg/ml (BHR) vs. 56.6 vs. 67.5 pg/ml (n-BHR). There were no differences between the coefficients of variation between the groups of BHR and n-BHR.

5. Monitoring of leukotrienes and 8-isoprostane in EBC during tests with occupational allergens

Forty-seven people with suspicion on occupational asthma or rhinitis were examined. Diurnal variation of ventilatory parameters in combination with EBC collection and specific challenge tests with occupational allergens with EBC collection were performed. Three patients were tested while on therapy with inhaled corticosteroids.

Forty-one tests with allergens were concluded according to the results of ventilatory parameters of obstruction as negative, six tests were closed as positive.

In monitoring of the diurnal variation (4 measurements) in persons finally concluded as negative, there was a significant change only for parameter 8-isoprostane ($p=0.0138$). In other parameters the changes were not significant: FEV_1 $p=0.6340$, LTB_4 $p=0.1185$, LTC_4 $p=0.0889$, LTD_4 $p=0.4027$, LTE_4 $p=0.0504$. During specific challenge tests (examination before, immediately after, 2 hours, 5 hours and 24 hours after the test) no significant changes were found for following parameters: FEV_1 $p=0.7610$, LTB_4 $p=0.4716$, LTC_4 $p=0.0556$, LTD_4 $p=0.9030$, LTE_4 $p=0.5365$ a 8-izoprostane $p=0.3110$.

Six challenge tests with allergens were concluded as positive. In three persons the bronchoconstriction occurred immediately after the challenge test, in three persons the bronchoconstriction occurred 5 hours after the exposure to allergen. The number of positive tests was small (6) therefore the statistic evaluation was not executed. The data was evaluated only visually,and the reaction course was taken into consideration.

In patient 1, during the examination without the exposure to the allergen (at rest), there was tendency to elevation of marker concentrations during the midday and the afternoon measurements. In the course of the positive challenge test, when the early asthmatic reaction (EAR) was observed, the elevation of LTC_4, LTD_4, LTE_4 and 8-isoprostane was found 2 hours and 5 hours after the test, in LTB_4 only 2 hours after the test.

In patient 2, on the basal examination at rest, there was the tendency to elevation of marker concentration during the midday (LTB_4, LTE_4, LTC_4, 8-isoprostane) and afternoon measurements (LTC_4). After the positive test (EAR) there was the elevation of 8-isoprostane shortly after and 2 hours after the test.

In patient 3, at rest there was tendency to elevation of LTC_4 and LTE_4 on the midday measurements. In the positive test (EAR) the elevation of LTC_4 was observed 2 hours after the test.

In patient 4, there was no evident (from the figures) fluctuation of EBC marker concentrations during the basic monitoring at rest. During the positive test (late asthmatic reaction - LAR) there was an elevation of LTC_4 after the allergen administration. In addition, 8-isoprostane was very high in all measurements before and after test (differently to basic values).

In patient 5, there was no evident fluctuation of marker concentrations during the monitoring at rest. In the positive test (LAR) there was some elevation of LTC_4 after the allergen administration and 5 hours after the test (two peaks), LTB_4 was very high in all measurements before and after the test (contrary to values from the rest).

In patient 6, the fluctuation was seen at rest in all markers studied. In the positive test (LAR) there was an elevation of LTC_4 and LTB_4 during the maximum bronchoconstriction (5 hours after the test); in addition 8-isoprostane increased 2 hours after the test.

6. Discussion and conclusion

Comparing the concentrations of leukotrienes and 8-isoprostane in EBC in controls and asthmatics, significantly higher values of LTC_4 were found in asthmatics. Therefore, after a validation in a greater group, LTC_4 could be useful for the monitoring of the severity and persistence of occupational asthma. Its detection was enabled by a new analytic method using LC/MS.

In monitoring of 24-hours variation of leukotrienes and 8-isoprostane no significant change was found in subgroups BHR and n-BHR. Relatively high coefficients of variation were found in all parameters in both groups. In BHR, the highest values of leukotrienes were found between 1.30 and 5.00 p.m., but values of 8-isoprostane were lowest during this time. In n-BHR group, the highest values were found only for LTC_4 in the time between 10.30 a.m. and 5.30 p.m. In the group of bronchial hyperreactors the possible variation could be influenced by asthma treatment and ventilatory parameters. With regards to the high variation of monitored EBC markers, it is necessary to perform the collection of EBC in the same time in all persons, if only one EBC sample is collected.

During negative tests no significant changes were found in EBC parameters studied. Changes in positive test were monitored only in six persons, so the statistic analysis was not performed. However, the tendency to elevation of LTC_4 after allergen application was found in 5 patients. The increase of other parameters differed among subjects.

In the future, it appears necessary to focus on one allergen in all subjets studied, because the intraindividual variation of EBC markers is very high.

Induced sputum

1. Induced sputum- analysis

Induced sputum is a sputum induced by inhalation of saline solution. Analysis of induced sputum brings data about cells and analysis of supernatant provides information about markers of inflammation and oxidative stress. Concentrations of sodium chloride solution used for the sputum induction are in the range of 0.9-7 %. In bronchial hyperreactors the inhalation of hypertonic saline can lead to decrease of ventilatory parameters that is why salbutamol (200-400 μg) or other β_2-agonist pre-treatment is recommended before inhalation of sodium chloride solution. In most persons it prevents the decrease of ventilatory parameters. Sputum can be analysed as either nonselected (the whole sample with saliva) or selected (without saliva). Cell analysis of induced sputum contributes to the diagnostic steps and to the monitoring of the respiratory diseases - especially bronchial asthma. Main attention in bronchial asthma is focused on eosinophils (normal range below 2%).

2. Nonselected sputum method - monitoring of cell parameters in tests with occupational allergens and correlation with other factors

Twenty-two persons were examined for suspicion on occupational asthma. In addition to specific challenge tests with occupatinal allergens following parameters were monitored: eosinophils in the blood, total IgE, ECP, skin prick tests, ventilatory parameters and a nonspecific bronchoprovocation test with histamine. Specific challenge tests with allergens were performed either in the exposure chamber or at the workplace. Induced sputum was collected twice - before and 24 hours after the specific challenge test.

Induced sputum was analysed also in 19 subjects of the control group (one collection). Excepting the specific challenge test, the same parameters were studied in the control group.

The success rate for the sputum collection was 60 % (13 from 22 samples) and 82 % (18 from 22 samples) before and after the challenge test, respectively. The evaluation of the induced sputum changes was possible in 3 persons with final diagnosis of occupational asthma, in 3 persons with occupational rhinitis, and in 7 persons with negative reaction on tested allergen.

No significant changes were found ($p<0.05$) between mean values of parameters before and after the specific challenge test (eosinophils, neutrophils, macrophages and lymphocytes). In persons with positive results of the challenge tests (final diagnosis of occupational asthma), no significant increase in eosinophils after the test was found. In one person with occupational rhinitis the percentage of eosinophils increased from 0.7% to 2.8%.

No correlation was found between eosinophils in the sputum before the test and FEV_1, IgE, and eosinophils in the blood. On the other hand, a significantly higher percentage ($p<0.05$) of sputum eosinophils before the test was found in the group of subjects with a positive skin prick tests comparing to the subjects with a negative skin prick test.

Significant changes ($p<0.05$) between the total group of subjects examined for suspicion on occupational asthma (regardless to the final results of challenge tests) and controls were found for parameters IgE, ECP, and nonspecific challenge test. This findings are in agreement with the fact, that these persons suffered from an allergic respiratory disease. The group with final diagnosis of occupational asthma had significantly higher parameters IgE and FEV_1 ($p<0.05$) comparing with the controls.

3. Nonselected sputum method - monitoring of cell parameters in persons with occupational asthma and correlation with other factors

Thirty-seven patients with occupational asthma (6.5 years on average after the removal from the occupational allergen exposure) and 19 controls were examined. The examination included: eosinophils in blood, total IgE, ECP, skin prick tests, ventilatory parameters and non-specific challenge test. Only one sample of induced sputum was taken in each person.

Results obtained during the first examination at our department at the time of diagnosis of occupational asthma were compared to the last examination. No significant changes were found between these results (p-value for skin prick tests was borderline, $p=0.0523$).

Results obtained during the last examination were compared with the control group results. In asthmatics significantly ($p<0.05$) more frequent positive results were found in skin prick tests, ECP and the non-specific bronchoprovocation test.

The subgroups of patients exposed in the past to HMW and LMW allergens were compared. In those with exposure to HMW allergens, the increased non-specific bronchial hyperreactivity was more frequent ($p<0.05$) at the recent examination, however no difference was found for other parameters studied.

The success rate of sputum induction was 65 % and 87.9 % in asthmatics and in the control group, respectively. All persons of the control group had the percentage of eosinophils in the normal range. In 6 persons (25% from analysed samples in asthma patients) the concentration of sputum eosinophils was increased (normal finding <2%). One person among this group did not complain of any asthmatic symptoms, however other laboratory parameters were also pathologic (non-specific bronchial hyperresponsiveness, skin prick tests, ECP, eosinophils percentage in blood).

The positive finding of increased sputum eosinophils was significantly more frequent in persons exposed to HMW than LMW occupational allergens in past. Correlation between sputum eosinophils and FEV_1, IgE or eosinophils in blood at the last examination was not found. Correlation between sputum neutrophils and FEV_1 or FVC was not found, either.

4. Selected sputum method - monitoring of cell parameters in tests with occupational allergens and correlation with other factors

We examined 23 persons for the suspicion on occupational asthma or rhinitis in whom specific challenge tests were done. Other parameters were analysed from blood: eosinophils, total IgE and ECP. In addition to them, the skin prick tests, ventilatory parameters and non-specific challenge test were examined. Specific challenge tests were performed with allergens in the exposure box or by a workplace exposure. Induced sputum was collected before and 24 hours after the specific challenge test.

The results of specific challenge tests were positive in 7 persons and the diagnosis of occupational asthma was confirmed, in 4 persons the diagnosis or risk of occupational rhinitis was confirmed, and in 12 persons the challenge test was negative.

In the group with positive challenge tests a significant increase ($p=0.03$) in sputum eosinophils after the test comparing with the finding before the test was found. In three patients the increase in sputum eosinophils after the positive test was higher than 2% (mean increase 3.7%), and in one person the elevation was borderline (1,7 %). In two patients treated with inhaled corticosteroids during the hospitalization and in one person with LAR, no important increase in sputum eosinophils was found. In no person a decrease in eosinophil percentage was documented.

In all subjects with significant or borderline increase of sputum eosinophils after the test, the bronchospastic reaction occurred immediately after the allergen application (in two persons developed a dual reaction, the second being 5 hours after the allergen application).

In persons with confirmed occupational rhinitis after testing, no important increase of sputum eosinophils was found.

In the whole group with negative challenge tests, the mean pre-test percentage of eosinophils in the sputum did not significantly differ from the value after the test. In two persons with negative challenge test, an increase in sputum eosinophils was found (2.3% and 4%), however in further 10 persons the percentage of sputum eosinophils was not significantly different.

5. Discussion and conclusion

The analysis of nonselected sputum did not bring a significant increase of sputum eosinophils in patients with positive specific challenge tests. In only one person with final diagnosis of occupational rhinitis we found an increase of sputum eosinophils (2.1%). According to these results, the analysis of nonselected sputum does not seem useful for the evaluation of airways changes after testing with occupational allergens.

The analysis of selected sputum, on the other hand, brought interesting results. An important increase of sputum eosinophils was found in patients with positive early reaction after allergen application (except those treated by corticosteroids during the testing). In three the increase was minimally 2 %, and in one person only the increase was lower (1.7 %). No decrease in sputum eosinophils was found. As no significant increase was found in patients treated with corticosteroids, induced sputum analysis should not be used in patients who cannot abstain the medication.

An higher increase in eosinophils than by 2% was found also in two persons with finally negative challenge tests. In persons with such increase of sputum eosinophils after testing, the continuation of allergen exposure could be performed, either at workplace or in the exposure chamber for some more days. Sputum analysis could then help to differentiate if the increase in sputum eosinophils was only a random finding or if the persons will react later on to this allergen after repeated exposure.

The occupational asthma, differently from other asthma types, is unique due to the possibility to monitor the development of asthma after the elimination of the contact with the allergen. It appeared very important follow-up the patients with occupational asthma to learn, if their asthmatic symptoms and specific findings disappeared after the withdrawal from the allergen exposure. Eosinophilic inflammation was found in 25% of analysed samples. The inflammation was significantly more frequent in those exposed to HMW occupational allergens in the past. It was associated with the presence of bronchial hyperresponsiveness (which also was significantly more frequent in those exposed previously to HMWoccupational allergens). The reason can be in the fact that many HMW allergens are also frequently present in the home environment and therefore the removal from the allergen cannot be complete (wheat flour, plant allergens, various dusts, etc.).

The comparison of further results from the first and the last examination in occupational asthmatics, such as eosinophils in blood, total IgE, ECP, ventilatory parameters and nonspecific bronchial challenge test, brought a surprising conclusion. The differences between results were not significant despite the removal from the contact with the occupational allergen for 6.5 years on average.

However, neither the analysis of selected induced sputum nor EBC markers analysis, as special methods, brought satisfactory information about the level of inflammation in the airways in occupational bronchial asthma. They appear to be a useful piece of the mosaic in the evaluation of this disease. A combination of both methods and analysis of leukotrienes and other markers of inflammation in induced sputum could bring another useful data.

The whole set of examination which was done in this study proved that asthma is a chronic disease, which cannot not be completely cured. The permanent removal from the occupational allergen exposure, follow-up and pharmaceutical control of occupational asthma is necessary, in parallel with social benefits for the occupational disease, adequate to impaired life capacity in case of asthma worsening.

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. Anees W, Huggins V, Lavore ID, Robertson AS, Burge PS. Occupational asthma due to low molecular weight agents: eosinophilic and non-eosinophilic variants. Thorax 2002;57:231-236.
3. ARIA Report 2007. ARIA Update. In collaboration with GA^{2}LEN and Allergen, http://www.whiar.org/docs/ARIA_WR_wm.pdf.
4. Asano K, Lilly CM, O´Donnell WJ, Izrael E, Fischer A, Ransil BJ, Drazen JM. Diurnal variation of urinary leukotrine E4 and histamine excretion rates in normal subjects and patiens with mild-to-moderate asthma. J Allergy Clin Immunol 1995; 96 (5): 643-651.
5. 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.
6. 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.(a)
7. Baraldi E, Ghiro L, Piovan V, Carraro S, Ciabattoni G, Barnes PJ, Montuschi P. Increased Exhaled 8-Isoprostane in Childhood Astma. Chest 2003;124:25-31.(b)
8. 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.
9. Bartůňková J, Panzner P. Patologické imunitní reakce. In: Fučíková T. Základy klinické imunologie. RDI´ PRESS, KRIGL, Praha 1994. s. 20-29.
10. Bartůňková J. Alergie a autoimunita. In: Špičák V, Panzner P. Alergologie. Galén, Praha, 2004. s. 99-110.
11. Beach J, Russell K, Blitz S, Hooton N, Spooner C, Lemiere C, Tarlo SM, Rowe BH. A systematic review of the diagnosis of occupational asthma. Chest 2007;131(2):569-578.
12. 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.
13. Bernstein JA, Bernstein DI. Occupational asthma. Diagnostic Approaches and Treatment. In: Bush R.K. Environmental Asthma. New York, Basel: Marcel Dekker Inc., 2001. s. 265-284.
14. Biernacki WA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. Thorax 2003;58:294-298.
15. Blane PD, Cisternas M, Smith S, Yelin E. Occupational astma in community-based survey of adult astma. Chest 1996;109(3):56S-57S.
16. Brhel P. Zásady diagnostiky profesionality bronchiálního astmatu. Pracov lék 1997;2:93-97.
17. Brhel P, Hassmanová V, Boušová K. Profesionální astma v České republice. Alergie 2000;2:84-89.

18. Brhel P, Nakládalová M, Boušová K, Hajduková Z, Lebedová J, Novotná B. Doporučený postup diagnostické a léčebné péče (reg. č. 0/037/040). Profesionální průduškové astma. Alergie 2001;1:75-80.
19. Burge PS, O'Brien IM, Harries MG. Peak flow rate records in the diagnosis of occupational asthma due to isocyanates. Thorax 1979;34:317-323.
20. Carpenter CT, Price PV, Christian BW. Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patiens with acute lung injury and ARDS. Chest 1998;114:1653-1659.
21. Cianchetti S, Bacci E, Ruocco L, Bartoli ML, Carnevali S, Dente FL, Di Franco A, Giannini D, Scuotri L, Vagaggini B, Paggiaro PL. Salbutamol pretreatment does not change eosinophil percentage and eosinophilic cationic protein concentration in hypetonic saline-induced sputun in ashmatic subjects. Clin Exp Allergy 1999;29:712-718.
22. Côté J, Kennedy S, Chan-Yeung M. Sensitivity and specificity of PC_{20} and peak expiratory flow rate in cedar asthma. J Allergy Clin Immunol 1990;85:592-598.
23. Čáp P, Pehal F, Petrů V, Musil J. Kondenzát vydechovaného vzduchu a možnosti jeho vyšetření. Alergie 2001;4:275- 280.
24. Čáp P, Chládek J, Pehal F, Malý M, Petrů V, Barnes PJ, Montuschi P.Gas chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotrienes in asthmatic patients. Thorax 2004;59:465-470.
25. Dahlen SE, Kumlin M, Granstrom E, Hedqvist P. Leukotrienes and other eicosanoids as mediators of airway obstruction. Respiration 1986;50 (Suppl 2):22-29.
26. Drazen J. Leukotrienes as mediators of Airway Obstruction. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:193-200.
27. Dworski R, Peebles RS Jr, Sheller JR. The Role of Leukotrienes nd Prostanoids in Airway 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. 149-166.
28. Efthimiadis A, Pizzichini E, Pizzichini MMM, Hargreave FE. Sputum examination for indices of airway inflammation: Laboratory procedures, Astra Draco, Lund, Sweeden, 1997. s.1-29.
29. Efthimiadis A, Spanevello A, Hamid Q, Kelly MM, Linden M, Louis R, Pizzichini MMM, Pizzichini E, Ronchi C, Van Overveld F, Djukanovic R. Methods of sputum processing for cell counts, immunochemistry and in situ hybridisation. Eur Respir J 2002;20 (Supl. 37):19s-23s.
30. Efthimiadis A, Hamid Q. Analysis of sputum cells: cytology, immunocytochemistry and in situ hybridization. In Djukanovic R, Sterk PJ: An Atlas of induces sputum,The Parthenon Publishing Group, a CRC Press Copany, London, UK, 2004.s. 21-34.
31. Fahy JV, Liu J, Wong H, Boushey HA. Cellular and biochemical analysis of induced sputum from asthmatics and from healthy subjects. Am Rev Respir Dis 1993;147:1126-1131.
32. Fenclová Z, Urban P, Pelclová D, Lebedová J, Lukáš E, Navrátil T. Profesionální onemocnění hlášená v České republice v roce 2002. České pracov lék 2003;2:54-59**.**
33. 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.
34. Fenclová Z, Urban P, Pelclová D, Lebedová J, Lukáš E, Navrátil T Profesionální onemocnění hlášená v České republice v roce 2004. České pracov lék 2005;2:67-74.
35. Fenclová Z, Urban P, Pelclová D, Lebedová J, Lukáš E, Navrátil T Profesionální onemocnění hlášená v České republice v roce 2005. České pracov lék 2006;2:60-68.

36. Fenclová Z. Profesionální onemocnění. In: Pelclová D. a kol. Nemoci z povolání a intoxikace, Karolinum, Praha, 2006. s.11-19.
37. Fenclová Z, Urban P, Pelclová D, Lebedová J, Lukáš E, Navrátil T Profesionální onemocnění hlášená v České republice v roce 2006. České pracov lék 2007; 2:72-81.
38. Fernandez-Nieto M, Quirce S, Fraj J, del Pozo V, Seoane C, Sastre B, Lahoz C, Sastre J. Airway inflammation in occupational asthma caused by styrene. J Allergy Clin Immunol 2006;117:948–950.
39. Gershman NH, Liu H, Wong HH, Liu JT, Fahy JV. Fractional analysis of sequential induced sputum samples during sputum induction: Evidence that different lung compartments are sampled at different time points. J Allergy Clin Immunol 1999;104(2):322-328.
40. Giannini D, Di Franco A, Cianchetti S, Bacci E, Dente FL, Vagaggini B, Paggiaro PL. Analysis of induced sputum before and after withdrawal of treatment with inhaled corticosteroids in asthmatic patiens. Clin Exp Allergy 2000;30 (12):1777-1784.
41. Gibbon PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogenity of airway inflammation in persistent asthma- Evidence of neutriphilic inflammation and increased sputum interleukin-8. Chest 2001;119 (5):1329-1336.
42. GINA Report 2005(Global Strategy for Asthma Management and Prevention- updated 2005) URL: http://www.ginasthma.com/Guidelineitem.asp?l1=2&l2=1&intId=1169
43. GINA Report 2007(Global Strategy for Asthma Management and Prevention- updated 2007) URL: http://www.ginasthma.com/Guidelineitem.asp?l1=2&l2=1&intId=60
44. 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.
45. Godon P, Boulet L-P, Malo J-L, Cartier A, Lemiere C. Assessment and evaluation of symptomatic steroid-naive asthmatics without sputum eosinophilia and their response to inhaled corticosteroids. Eur Respir J 2002;20:1364-1369.
46. Grammer LC. The Role of Low Molecular Weight Agents in Environmental Asthma. In: Environmental Asthma. Eds. by Bush RK, Dekker, New York, Basel, 2001. s. 239-263.
47. Green RH, Brightling CE, MacKenna S, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Reduced asthma exacerbations with a management strategy directed at normalizing the sputum eosinophil count. Am J Respir Care Med 2002;165: A320.
48. Grootendorst DC, Sont JK, Willems LN, Klein-Nelemans JC, Van Krieken JH, Sterk PJ. Comparion of inflammatory cell count in asthma: induced sputum vs bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies. Clin Exp Allergy 1997;27:769-779.
49. Hadvabová S, Majerník J, Magera M. Využiti indukovaného sputa v diferenciálnej diagnostike astmy bronchiale a chronickém obštrukčnej choroby pľuc. Studia pneumologika et phtiseologica, Abstrakta z 11. kongresu České a Slovenské pneumologické a ftizeologické společnosti 2002;62(1):5.
50. 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)
51. Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes, PJ. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in patients with asthma. Am J Resp Crit Care Med 2000;162:1273-1276. (b)
52. Hargreave FE, Leigh R. Induced sputum, eosinophilic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:53-57.

53. Hendrick DJ, Burge PS. Asthma. In: Hendrick DJ, Burge PS, Beckett WS, Churg A. Occupational disorders of the lung. Elsevier Science, 2002. s.33-76.
54. Holz O, Jörres RA, Koschyk S, Speckin P, Welker L, Magnussen H. Changes in sputum composition during sputum induction in healthy and asthmatic subjects. Clin Exp Allergy 1998;28(3):284–292.
55. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ. Exhaled breath condenstae: methodological recommendations and unresolved questions. Eur Respir J 2005; 26:523-548.
56. Hunt J. Exhaled breath condensate: an evolving tool for non-invasive evaluation of lung disease. J Allergy Clin Immunol 2002;10:28-34.
57. Chan Yeung M. ACCP konsensus statement. Assessment of asthma in the workplace. Chest 1995;108:1084-1117.
58. Chlumský J, Pokorná H. Buněčné parametry indukovaného sputa jako neinvazivní znak zánětu dýchacích cest u pacientů s astmatem: absence korelace mezi maximálním poklesem FEV_1 a PEF po inhalaci hypertonického roztoku NaCl a zastoupením eosinofilních leukocytů v indukovaném sputu. Alergie 2001;2:108-111.
59. Christie PE, Tagari P, Ford-Hutchinson AW, Charlesson S, Chee P, Arm JP, Lee TH. Urinary leukotriene E4 concentrations increase after aspirin challenge in aspirin-sensitive asthmatic subjects. Am Rev Respir Dis 1991;143:1025-1029.
60. Jarayjam L, Parameswaran K, Sears MR, Hargreave FE. Induced sputum cell counts: thein usefulness in clinical practise. Eur Respir J 2000;16(1):150-158.
61. Kačer P, Kuzma M, Lebedová J, Klusáčková P. Cysteinyl leukotrienes analysis by combination of immunoaffinity separation and LC/MS, 22nd Informal Meeting on Mass Spectrometry, May 2-6, 2004, Tokaj, Hungary. (a)
62. Kačer P, Kuzma M, Pelclová D, Lebedová J, Klusáčková P. Monithoring of inflammatory mediators in the exhaled breath condensate by PHLC/MS, 21st (Montreux) SYMPOSIUM, Liquid chromatography, Mass Spectrometry, November 10-12, 2004, Montreux, Switzerland. (b)
63. Kawikova I, Barnes PJ, Takahashi T, Tadjkarimi S, Yacoub MH and Elvisi MG. 8-epi-PGF2α, a novel noncyclooxygenase-derived prostaglandin, constricts airways in vitro. Am J Respir Crit Care Med 1996;153(2):590-596.
64. Kelly MG, Brown V, Martin SL, Ennis M, Elborn JS. Comparison of Sputum Induction Using High-Output and Low-Output Ultrasonic Nebulizers in Normal Subjects and Patients With COPD. Chest 2002;122:955-959.
65. 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. (a)
66. Klusáčková P, Pelclová D, Lebedová J. Buněčné změny v indukovaném sputu u pacientů s astma bronchiale profesionale. Klinická imunológia a alergológia-Abstrakta z 20. Kongresu České a Slovenské alergologické a imunologické společnosti 2003, Banská Bystrica, Slovenská Republika;13(3):19,21. (b)
67. Klusáčková P, Lebedová J, Pelclová D. Vývoj zdravotního stavu osob s profesionálním bronchiálním astmatem. Respiro- Zborník abstraktov z XII. kongresu Českej a Slovenskej ftizeologickej společnosti 2004, Nitra, Slovenská Republika;6(Suppl. 1):18. (a)
68. Klusáčková P, Pelclová D, Lebedová J, Brabec J. Sledování změn buněčného zastoupení v indukovaném sputu a dalších parametrů během specifických bronchoprovokačních testů s profesionálními alergeny. Alergie- Abstrakta z XXI. sjezdu českých a slovenských alergologů a klinických imunologů 2004, Brno;6 (Suppl. 2):15. (b)

69. Klusáčková P, Lebedová J, Pelclová D, Chvalová M, Marečková H, Brabec M. Změny buněčných parametrů v indukovaném sputu během specifických bronchoprovokačních testů s profesionálními alergeny. České pracov lék 2005;6 (2):83-88. (a)
70. Klusáčková P**,** Pelclová D, Lebedová J. Elimination from occupational allergen exposure in patients with occupational asthma. Abstract Book, Leiden International Medical Student Congress 2005, Leiden, The Netherlands. (b)
71. Klusackova P, Pelclova D, Levedova DJ, Mareckova H, Brabec M. Occupational asthma after withdrawal from the occupational allergen exposure. Industrial Health 2006;44:629-638.
72. Klusackova P, Lebedova J, Pelclova 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. (a)
73. Klusackova P, Lebedova J, Kacer P, Kuzma M, Ricarova B, Brabec M, Pelclova D, Fenclova Z. Contribution of breath condensate analysis in occupational asthma monitoring. Allergy- Abstract Book, XXVI. Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Imunology 2007, Göteborg, Sweeden; 62(Suppl. 83):286. (b)
74. Klusackova P, Lebedova J, Kacer P, Kuzma M, Brabec M, Pelclova D, Fenclova Z. Monitoring of 24-hours variation of leukotrienes in exhaled breath condensate. Eur Respir J- Abstracts 17th ERS Annual Congress, Stockholm, Sweeden, September 15-19, 2007; 30(Suppl. 51):476s. (c)
75. Knapp HR, Sladek K, Fitzgerald GA. Increased excretion of leukotriene E4 during aspirin-induced asthma. J Lab Clin Med 1992;119(1):48-51.
76. Kopřiva F. Eikosanoidy. In: Kopřiva F. Leukotrieny. Jessenius Maxdorf, Praha, 2005. s. 25-43.
77. Krakowiak A, Krawczyk-Adamus P, Dudek W, Walusiak J, Palczynski C. Changes in cellular and biochemical profiles of induced sputum after allergen-induced asthmatic response: method for studying occupational allergic airway inflammation. Int J Occup Med Environ Health 2005;18:27-33.
78. Krčmová I. Profesní alergie. In: Špičák V, Panzner P.Alergologie.Galén, Praha, 2004. s. 315-328.
79. 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.
80. Kurokawa K, Tanaka H, Tanaka S, Abe S. Circadian characteristics of urinary leukotriene E4 in healthy subjects and nocturnal asthmatic patiens. Chest 2001;120:1822-1828.
81. Lebedová J. Profesionální bronchiální astma. In: Pelclová D. a kol. Nemoci z povolání a intoxikace, Karolinum, Praha, 2006. s.89-93.
82. Lebedová J, Pelclová D, Fenclová Z, Klusáčková P, Kačer P, Červený L, Kuzma M. Závěrečná zpráva o řešení programového projektu s účelovou podporou Interní grantové agentury MZČR- Sledování vývoje zánětlivých parametrů u nemocných s profesionálním bronchiálním astmatem (NR 8109-3/2004), 2007.
83. 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.
84. Lemiere C, Chaboillez S, Trudeau C, Taha R, Maghni K, Martin JG, Hamid Q. Characterization of airway inflammation after repeated exposures ti occupational agents. J Allergy Clin Immunol 2000;106(6):1163-1170.

85. 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.
86. 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.
87. Lemiere C. Induced sputum and exhaled nitric oxide as noninvasive markers of airway inflammation from work exposures.Curr Opin Allergy Clin Immunol 2007;7(2):133-7.
88. Lombardo LJ, Balmes JR. Occupational Asthma: A Review. Environ Health Perspect 2000;108(Suppl.4):697-704.
89. Little SA, Chalmers GW, MacLeod KJ, McScharry C, Thomson NC. Noninvasive markers of airway inflammation as predictors of oral steroid responsiveness in asthma. Thorax 2000;55:232-234.
90. Louis R, Lau LC, Bron AO, Roldaan AC, Radermecker M, Djukanovic R. The relationship between airways inflammation and asthma Severiny. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:9-16.
91. Macfarlane AJ, Dworski R, Sheller JR, Pavord ID, Kay AB. Sputum cysteinyl leukotrienes increase 24 hours after alergen inhalation in atopic asthmatics. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:1553-1558.
92. Maghni K, Lemiere C, Ghezzo 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.
93. Manning PJ, Rokach J, Malo JL, Ethier D, Cartier A, Girard Y, Charleson S, O´Byrne PM. Urinary leukotriene E4 levels during early and late asthmatic responses. J Allergy Clin Immunol 1990;86(2):211-220.
94. Mapp CE, Saetta M, Maestrelli P, Di Stefano A, Chirano P, Boschetto P, Ciaccia A, Fabbri LM. Mechanisms and pathology of occupational asthma. Eur Respir J 1994;7:544-554.
95. Meijer RJ, Postma DS, Kauffman LR, Koster GH, Kerstjens HAM. Accuracy of eosinophils and eosinophil cationic protein to predict steroid improvement in asthma. Clin Exp Allergy 2002;32:1096-1113.
96. Mondino C, Ciabattoni G, Koch P, Pistelli R, Trove A, Barnes PJ, Montuschi P. Effects of inhaled corticosteroids on exhaled leukotrienes and prostanoids in asthmatic children. J Allergy Clin Immunol 2004;114(4):761-767.
97. Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a biomarker of oxidative stress, in exhaled condensate of astma patients. Am J Respir Crit Care Med 1999 Jul;160(1):216-220.
98. Montuschi P, Collins JV, Ciabattoni G, Lazzeri N, Corradi M, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled 8-Isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. Am J Respir Crit Care Med 2000;162(3):1175-1177.(a)
99. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G, Corradi M, Rensen L, Geddes DM, Hodson MF, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. Thorax 2000;55:205-209.(b)
100. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G, Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. Thorax 2003;58:585-588.(a)
101. Montuschi P, Ragazzoni E, Valente S, Corbo G, Mondino C, Ciappi G,Ciabattoni G. Validation of 8-isoprostane and prostaglandin E_2 measurements in exhaled breath condensate. Inflamm Res 2003;52:502-507. (b)

102. Montuschi P, Martello S, Felli M, Mondino C, Chiarotti M. Ion Trap liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of leukotriene B4 in exhaled breath condensate. Rapid Commun Mass Spectrom 2004;18:2723-2729.
103. Montuschi P, Martello S, Felli M, Mondino Ch, Barnes PJ, Chiarotti M. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotriene B4 in asthmatic children. Resp Research 2005;6:119.(a)
104. Montuschi P. Isoprostanes, Prostanoids and Leukotrienes in Exhaled Breath Condensate. 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. 53-66.(b)
105. Montuschi P, Mondino C, Koch P, Barnes PJ, Ciabattoni G. Effects of a leukotriene receptor antagonist on exhaled leukotriene E4 and prostanoids in children with asthma. J Allergy Clin Immunol 2006;118:347-353.
106. Montuschi P. Review: Analysis of exhaled breath condensate in respiratory medicine: methodological aspects and potential clinical applications. Therapeutic Advances in Resp Dis 2007;1:5-23.
107. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr K F, and Roberts LJ, 2nd. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical catalyzed mechanism. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87(23):9383–9387.
108. Moscato G, Pignatti P, Yacoub MR, Romano C, Spezia S, Perfetti L. Occupational Asthma and Occupational Rhinitis in Hairdressers. Chest 2005;128:3590-3598.
109. Novotná B, Brhel P. Profesionální bronchiální astma. Alergie 2000;2(2):120-126.
110. O´Sullivan S, Roquet A, Dahlen B, Dahlen S, Kumlin M. Urinary excretion of inflammatory mediators during allergen-induced early and late phase asthmatic rections. Clin Exp Allergy 1998;28(11):1332-1339.
111. 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.
112. Okazawa A, Kawikova I, Cui ZH, Skoogh BE and Lotvall J. 8-Epi-PGF2alpha induces airflow obstruction and airway plasma exudation in vivo. Am J Respir Crit Care Med 1997;155(2):436-441.
113. Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, Ind PW, Djukanovic R, Maestrelli P, Sterk PJ. Sputum induction. Eur Respir J 2002;20(Suppl 37):3s-8s.
114. Panzner P. Imunologické základy alergické odpovědi. In: Špičák V, Panzner P. Alergologie.Galén, Praha, 2004. s. 33-47.
115. Pavord ID, Pizzichini MM, Pizzichini E, Hargreave FE. The use of induced sputum to investigate airway inflammation. Thorax 1997;52:498-501.
116. Pavord ID, Brightling CE, Walkman G, Wardlaw AJ. Non-eosinophilic corticosteroid unresponsive asthma. Lancet 1999;353:2213-2214.
117. Pavord ID, Sterk PJ, Hargreave FE, Kips JC, Inman MD, Louis R, Pizzichini MMM, Bel EH, Pin I, Grootendorst DC, Paremeswaran K, Djukanovic R. Clincal applications of assessment of airway inflammation usány induced sputum. Eur Respir J 2002;20(Suppl. 20):40s-43s.
118. 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. a

119. 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. b
120. Perrin B, Lagier F, L´Archevêque J, Cartier A, Boulet LP, Côte J, Malo JL. Occupational asthma: validity of monitoring of peak expiratory flow rates and nonallergic bronchial responsiveness as compared to specific inhalation challenge. Eur Respir J 1992;5:40-48.
121. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE, Dolovich J. Dolovich J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. Thorax 1992;47:25-29.
122. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Efthimiadis A, Evans S, Morfia MM, Squillace D, Gleich G, Dolovich J, Hargreave FE. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid phase measurement. Am J Respir Crit Care Med 1996;154:308-317. (a)
123. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Hargreave FE, Dolovich J. Measurement of inflammatory indices in induced sputum: effects of selection of sputum to minimize salivary contamination. Eur Respir J 1996;9:1174-1180. (b)
124. Pizzichini E, Pizzichini MMM, Gibson P, Parameswaran K, Gleich GJ, Berman L, Dolovich J, Hargreave FE. Sputum eosinophilia predicts benefit from prednison in smokers with chronic obstruktive bronchitis. Am J Respir Crit Care Med 1998;158(5):1511-1517.
125. Pizzichinni MMM. Is sputum eosinophilia a good or poor predictor of benefit from inhaled corticosteroid therapy in asthma. Eur Respir J 2002;20 (6):1359-1361.
126. Popov TA, Pizzichini MM, Pizzichini E, Kolendowicz R, Punthakee Z, Dolovich J, Hargreave FE. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis. Eur Respir J 1995;8:559-565.
127. 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.
128. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. Free Radic Biol Med 2000;28(4):505-513.
129. Satinská J. Testy bronchiální reaktivity. In: Fišerová J, Chlumský J, Satinská J a kol. Funkční vyšetření plic. Geum, Praha, 2003. s. 37-55.
130. Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, Bush A, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane in childhood asthma. Respir Res 2005;6:79-84.
131. 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.
132. Soyer OU, Dizdar EA, Keskin O, Lilly C, Kalayci O. Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection. Allergy 2006;61:1016-1018.
133. Spanevello A, Beghé B, Bianchi A, Migliori GB, Ambrosetti M, Neri M, Ind PW. Comparison of Two Methods of Processing Induced Sputum: Selected versus Entire Sputum. Am J Respir Crit Care Med 1998;157(2):665-668.
134. Sterk PJ, Fabbri LM, Quanjer PH et al. Airway Responsiveness. Standardized challenge testing with pharmacological, physical and sensitizing stimuli in adults. 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):53-83.

135. Tamaoki J, Kondo M, Kuroda H, Toshiba K, Takeyama K, Nakata J, Nagai A. Validity and safety of sputum induction by inhaled uridin-5´-triphosphate. Am J Respir Crit Care Med 2001;164(3):378-381.
136. Tarlo S, Boulet LP, Cartier A, Cockcroft D, Côté J, Hargreave FE, Holness L, Liss G, Malo JL, Chan-Yeung M. Canadian Thoracic Society Giudelines for occupational asthma. Can Respir J 1998;5(4):289-300.
137. 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.
138. Wenzel SE, Trudeau JB, Gaminsky DA, Cohn J, Martin RJ, Westcott JY. Effect of 5-lipoxygenase inhibition on bronchoconstriction and airway inflammation in nocturnal asthma. Am J Respir Crit Care Med 1995;152(3):897-905.

8 PŘÍLOHY

Nejdůležitější publikace týkající se dizertace- 1. autor:

1. **Klusackova P**, Lebedova J, Kacer P, Kuzma M, Brabec M, Pelclova 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**.
2. **Klusackova** P, Pelclova 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, Pelclova 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**.
4. **Klusackova P**, Lebedova J, Pelclova 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.
5. **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.