

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Linda Rendlová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**ZMĚNY CITLIVOSTI BAZOFILNÍCH GRANULOCYTŮ
BĚHEM SPECIFICKÉ ALERGENOVÉ IMUNOTERAPIE**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité zdroje jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 27. 3. 2018

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování patří Ing. Tomáši Vlasovi za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi prokázal v průběhu zpracování bakalářské práce. Děkuji Ústavu imunologie a alergologie FN Plzeň za poskytnutí laboratorního vybavení k vypracování praktické části práce. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině, přátelům a Tereze Bezpalcové za podporu a pochopení.

Abstrakt

Příjmení a jméno: Rendlová Linda

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Změny citlivosti bazofilních granulocytů během specifické alergenové imunoterapie

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Vlas

Počet stran číslovaných: 44

Počet stran nečíslovaných: 21

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 35

Klíčová slova: test aktivace bazofilních granulocytů – průtoková cytometrie – specifická alergenová imunoterapie – rekombinantní alergeny – alergie

Souhrn:

Bakalářská práce se zaměřuje na využití testu aktivace bazofilních granulocytů v rámci specifické alergenové imunoterapie. Teoretická část shrnuje charakteristiku bazofilů, alergické reakce, diagnostiku a terapii alergických onemocnění. V praktické části byl využit test aktivace bazofilů za pomoci průtokové cytometrie ke zhodnocení senzitivity pacientů v průběhu specifické imunoterapie. Srovnáním výsledků ve formě procenta aktivovaných bazofilů, CD-sens a plochy pod titrační křivkou s hodnotami alergen specifických protilátek IgE byla potvrzena validita testu aktivace bazofilů s použitím rekombinantních alergenů jako metody vhodné k posouzení citlivosti pacientů k alergenů.

Abstract

Surname and name: Rendlová Linda

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Changes in basophil granulocyte sensitivity during specific allergen immunotherapy

Consultant: Ing. Tomáš Vlas

Number of pages: 65

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 35

Keywords: basophil activation testing – flow cytometry – specific allergen immunotherapy – recombinant allergen – allergy

Summary: This bachelor thesis is focused on employing basophil activation test in the context of specific allergen immunotherapy. Theoretical part summarizes basophil characteristics, allergic reactions, diagnostics and therapy of allergic diseases and disorders. In practical part, flow cytometric basophil activation test was used to evaluate sensitivity of patients in the course of specific immunotherapy. By comparing the results in the percentage of activated basophils, CD-sens and areas under the titration curves with IgE-specific allergen values, the validity of the basophil activation test using recombinant allergens was confirmed as a method suitable for assessing patients' sensitivity to allergen.

Obsah

ÚVOD.....	11
TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BAZOFILNÍ GRANULOCYTY A MASTOCYTY	12
1. 1 Bazofilní granulocyty	12
1. 1. 1 Charakteristika	12
1. 1. 2 Vývoj.....	13
1. 1. 3 Povrchové znaky	14
1. 1. 4 Funkce	14
1. 2 Mastocyty.....	16
1. 2. 1 Charakteristika	16
1. 2. 2 Funkce	17
2 IMUNOPATOLOGICKÉ REAKCE.....	19
2. 1 Charakteristika	19
2. 2 Imunopatologická reakce I. typu	20
2. 3 Imunopatologická reakce II. typu	20
2. 4 Imunopatologická reakce III. Typu	21
2. 5 Imunopatologická reakce IV. typu.....	21
3 ALERGIE	22
3. 1 Charakteristika	22
3. 2 Fáze alergické reakce.....	22
3. 2. 1 Fáze senzibilizace.....	22
3. 2. 2 Akutní alergický zánět	23
3. 2. 3 Chronický alergický zánět.....	23
3. 3 Faktory ovlivňující vznik alergií.....	23
4 ALERGENY.....	25
4. 1 Charakteristika	25
4. 2 Inhalační alergeny.....	25
4. 2. 1 Pylové alergeny	25
4. 2. 2 Plísně.....	26
4. 2. 3 Živočišné alergeny	27
4. 2. 4 Roztoči	27
4. 3 Potravinové alergeny	27
4. 4 Alergie na léky.....	28

4. 5 Alergie na hmyz.....	28
4. 6 Rekombinantní alergeny	29
5 DIAGNOSTIKA ALERGIÍ.....	30
5. 1 Anamnéza	30
5. 2 Kožní testy	30
5. 3 Provokační testy.....	31
5. 4 Stanovení počtu eozinofilů	31
5. 5 Stanovení IgE.....	32
5. 6 Test aktivace bazofilů	32
5. 7 Průtoková cytometrie	33
6 LÉČBA ALERGIÍ.....	34
6. 1 Profylaxe.....	34
6. 2 Antihistaminika.....	34
6. 3 Kortikosteroidy	34
6. 4 Stabilizátory membrán žírných buněk	35
6. 5 Další léčiva	35
6. 6 Specifická imunoterapie	36
PRAKTICKÁ ČÁST	37
7 CÍL A ÚKOL PRÁCE.....	37
7. 1 Hlavní cíl práce.....	37
7. 2 Výzkumné otázky	37
9 METODIKA.....	38
9. 1 Zkoumaný vzorek	38
9. 2 Test aktivace bazofilů	38
9. 2. 1 Princip	38
9. 2. 2 Potřebné vybavení a materiál	38
9. 2. 3 Postup.....	39
9. 3 Stanovení procenta aktivovaných bazofilů	40
10 VÝSLEDKY.....	41
10. 1 Procenta aktivovaných bazofilů.....	41
10. 2 CD-sens.....	48
10. 3 Plocha pod křivkou	49
10. 4 Korelace	50
DISKUZE	52

ZÁVĚR.....	55
SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	56
SEZNAM ZKRATEK	60
SEZNAM OBRÁZKŮ	62
SEZNAM GRAFŮ	63
SEZNAM TABULEK	64
Příloha 1.....	65

ÚVOD

Při diagnostice alergických onemocnění lze využít vícero způsobů vyšetření pacienta. Výběr laboratorní metody závisí na dostupnosti přístrojového vybavení a na klinickém významu výsledku pro konkrétní osobu. Stále více laboratoří je vybaveno průtokovým cytometrem, díky tomu se zvyšuje uplatnění testu aktivace bazofilů. Jedná se o novější způsob testování, proto je předmětem diskuze indikace testu a správná interpretace jeho výsledků. Stále není plně ozřejmáno, pro vyšetření kterých alergenů je test nejvhodnější a jaké způsoby terapie či vnější faktory mohou zkreslit výsledky testu. Vzhledem k množství různých epitopů na alergenu, proti kterým mohou být protilátky namířeny. Lze polemizovat o tom, zda při použití rekombinantních alergenů nemůže dojít k falešné negativitě výsledků.

Tato bakalářská práce se zabývala využitím testu aktivace bazofilů při sledování pacientů alergických na pyly trav během specifické alergenové terapie. Ověřovali jsme, zda lze při diagnostice pylových alergií použít rekombinantní alergeny Phl p1 a Phl p5. Současně jsme hledali shodu mezi jednotlivými způsoby hodnocení BAT.

Teoretická část zahrnuje informace o klíčových buňkách testu BAT – bazofilních granulocytech, patofyziologických principech průběhu alergického onemocnění a možných alergenech. Dále jsme se věnovali laboratorním metodám diagnostiky alergií, jejich provedení a využitím, následně i terapii alergických pacientů.

V praktické části je uvedena metodika provedení testu aktivace bazofilů, včetně výběru patientských vzorků, použitého značení hledaných buněk, gatovací strategie a realizace samotného testu. Ve druhé polovině jsme analyzovali výsledky BAT a porovnávali je s dalšími způsoby hodnocení reakce bazofilů – CD-sens a AUC, i s hodnotami alergen specifických protilátek IgE, jež jsou považovány za nejspolehlivější ukazatel reaktivity vůči alergenu.

Diskuze je věnována srovnání našich výsledků s odbornými články různých autorů a doporučení ohledně volby testovací strategie.

TEORETICKÁ ČÁST

1 BAZOFILNÍ GRANULOCYTY A MASTOCYTY

1. 1 Bazofilní granulocyty

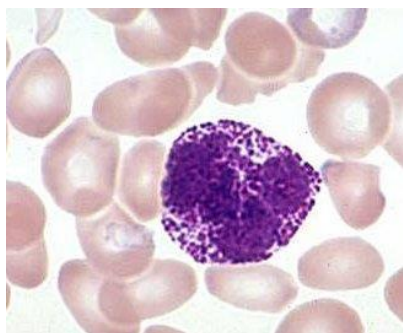
1. 1. 1 Charakteristika

Bazofilní granulocyty neboli bazofily patří mezi bílé krvinky, leukocyty, které jsou odpovědné za většinu imunitních reakcí zajišťujících naši obranyschopnost vůči patogenům. Společně s eozinofily a neutrofilny se řadí mezi granulocyty – leukocyty, jejichž cytoplazma obsahuje sekreční granula s preformovanými látkami, připravenými pro vypravení z buňky po obdržení příslušného signálu. ^[1]

Z celkového počtu bílých krvinek přítomných v krvi však bazofilní granulocyty tvoří méně než 1 %. Jejich koncentrace v krvi dosahuje $0,2 \cdot 10^9/l$. ^[2] Bazofilní granulocyty se za normálních podmínek vyskytují pouze v krevním oběhu. Jejich hodnoty mohou stoupat při některých zánětlivých onemocněních (pozdní fáze alergické reakce, rejekce transplantátu, Crohnova choroba). ^[3] Na popud zánětlivých mediátorů se mohou přesunout do tkání. Nacházíme je například ve sliznici bronchů u astmatiků či v místě ektoparazitární infekce (například přisátého klíštěte). ^[1]

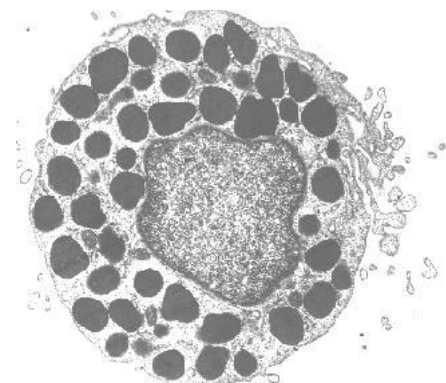
Bazofilní granulocyty byly poprvé popsány v roce 1879 německým vědcem Paulem Erlichem. ^[3] Bazofily je nazval kvůli jejich charakteristickému znaku – objemným granulám o velikosti $0,3-0,8\mu m$ s velkou afinitou k barvení bazickými barvivy. Průměr buněk bazofilů se pohybuje od 10 do $12\mu m$. Jádro těchto buněk bývá nepravidelné, laločnaté, s malým množstvím chromatinu. Je často špatně rozpoznatelné, jelikož bývá překryto bazofilními granuly, která se v hematologickém barvení roztoky May-Grünwald a Giemsa-Romanowsky jeví purpurově až fialovo černě. Cytoplazma bazofilů je v tomto barvení růžová s odstínem do hněda. ^[4]

Obrázek 1 Bazofilní granulocyt, krevní nátěr



Zdroj: <http://tahlil.com/tahlil.com/wp-content/uploads/2010/10/bazofilnedir.jpg>

Obrázek 2 Bazofilní granulocyt, transmisní elektronová mikroskopie



Zdroj: http://www.ufrgs.br/imunovet/molecular_immunology/blood.html#CFU-Baso

1. 1. 2 Vývoj

Vývoj bazofilních granulocytů začíná v kostní dřeni, kde se z pluripotentních kmenových buněk po celý život diferencují jednotlivé krevní řady. Tyto kmenové buňky vynikají unikátní schopností asymetrického dělení – z části dceřiných buněk stávají progenitorové buňky vyvíjející se v krvinky, zbytek kmenových buněk tvoří nevyčerpatelnou zásobu pro tvorbu krevních elementů v budoucnu. ^[5]

Z pluripotentní kmenové buňky se vytvoří myeloidní progenitor, který má stále potenciál stát se jakýmkoli granulocytem, monocytem, erytrocytem či megakaryocytem. Dále se progenitor musí vyvinout v prekurzorovou buňku – myeloblast, poté v promyelocyt, u kterého nejsme schopni rozpoznat, který z granulocytů z něj vznikne. První buňkou ve vývojové řadě obsahující bazofilní granula je bazofilní myelocyt. Metamyelocyt je další fází vývoje, posléze následuje zralý bazofilní granulocyt schopný plnit svou práci v krevním oběhu. ^[5] Pro vývoj bazofilů je klíčové prostředí za přítomnosti

IL-3 a růstové faktoru GM-CSF (granulocytární – makrofágový kolonie stimulující faktor).^[3]

1. 1. 3 Povrchové znaky

Bazofily na svoji buněčnou membránu exprimují množství povrchových znaků, podle kterých je můžeme identifikovat. Zároveň nám povrchové znaky pomáhají pochopit činnost jednotlivých typů buněk. Za charakteristický znak u bazofilů považujeme vysokoafinní receptor pro Fc část molekuly protilátek třídy IgE (FcεRI) účastníci se procesu degranulace. Na rozdíl od některých dalších leukocytů na membráně bazofilních granulocytů nenalezneme nízkoafinní receptory pro IgE (FcεRII, CD23), pouze nízkoafinní receptor pro třídu IgG (FcγII, CD32).^[3] H2 histaminové receptory se podílejí na regulaci uvolňování histaminu z buňky.^[6]

Na působky komplementu jsou bazofily schopny reagovat díky receptorům pro C5a a CR3a, dokáží samy, pomocí Toll-like receptorů (TLR), reagovat na typické molekulární struktury patogenů (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs, například lipopolysacharidy, manóza).^[1]

Aby byly bazofily schopny se navázat na povrch jiných buněk, například při přestupu z krevního oběhu do tkání, exprimují na svůj povrch adhezivní molekuly LAF1-CD11a (Leukocyte Function Associated Antigen-1) rozeznávající ligand ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), vyskytující se na endotelu i dalších leukocytech, a VLA-4-CD49d (Very Late Activation Antigen 4), receptor pro fibronectin a pro VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1).^[3]

Receptory pro růstové faktory IL-3, IL-4 a GM-CSF zprostředkovávají změny proliferace, diferenciaci a metabolismu bazofilních granulocytů.^[3]

1. 1. 4 Funkce

Pravý význam bazofilních granulocytů nebyl objeven, proto zůstává jejich úloha při imunologické odpovědi nedoceněna. Zřejmé je, že se svými metabolity podílejí na většině zánětlivých reakcí, zejména na průběhu akutní i chronické alergické reakce, pro kterou jsou spolu s mastocyty klíčové.

Jejich charakteristická sekundární granula, obsahující histamin, proteoglykany a proteolytické enzymy, mohou ihned po aktivaci procesu degranulace splynout s buněčnou membránou, vylít svůj obsah do krevního řečiště a v krátkém časovém úseku tak zahájit

alergickou reakci. Průměrný bazofil ve svých granulách disponuje 1 pg histaminu, způsobujícího bronchokonstrikci, rozšíření a zvýšení propustnosti cév, vznik otoku a snížení krevního tlaku. Z proteoglykanů lze prokázat zejména chondroitin sulfát, ale také antikoagulans heparin, z proteolytických enzymů tryptázu. Mediátory jsou preformovány v krystalické struktuře a iontově se váží na proteoglykany. Během procesu degranulace se stávají rozpustné ve vodě, aby mohly být uvolněny do vodního prostředí. [3]

Aktivace bazofilů rovněž způsobuje produkci mediátorů de novo. Dochází k nastartování metabolismu kyseliny arachidonové a vzniku leukotrienů C4, D4 a E4, způsobujících konstrikci bronchů, vazodilataci a chemotaxi neutrofilů i eosinofilů. [7] Bazofilní granulocyty uvolňují různorodou směs cytokinů v čele s interleukiny 4 a 13, [8] podporujícími přesmyk protilátek na třídu IgE, diferenciaci B lymfocytů na plazmatické buňky a T lymfocytů na T_{h2}, hypersekreci hlenu, fibrózu a další symptomy provázející alergický zánět [9]; chemokiny MIP – 1 α (Macrophage Inflammatory Protein) a interleukin 8; či růstový faktor GM – SCF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) [1]

Reakce bazofilních granulocytů na podněty nebývá pokaždé stejná. Jejich degranulace může být anafylaktického charakteru, kdy se granula z bazofilů vyplavují najednou v průběhu několika minut. Takto rozsáhlá degranulace zapříčiňuje vznik anafylaktického šoku, při kterém kvůli náhlé generalizované vazodilataci a zvýšené permeabilitě cév dochází k úniku tekutin z cévního řečiště do tkání, vzniká otok, ale především se snižuje krevní tlak, což může vést ke kardiálnímu selhání a smrti. Pozvolná degranulace navazuje na anafylaktickou degranulaci a trvá i několik dní. [3]

Přímá aktivace bazofilů je nezávislá na IgE a objevuje se v průběhu infekčních onemocnění, při vystavení některým potravinovým či hmyzím alergenům nebo po podání některých léků (opiátů, lokálních anestetik), [3] dále při navázání anafylatoxinů C5a a CR3a na příslušné receptory či aktivaci Toll-like receptorů. [1]

IgE zprostředkovaná degranulace bazofilů se uplatňuje spíše u chronického alergického zánětu. [3] Na Fc ϵ RI bývají předem připravené IgE, typicky proti povrchovým molekulám mnohobuněčných parazitů. Pokud dojde k navázání multivalentního antigenu (parazita), dojde k agregaci několika molekul receptorů, iniciaci signální dráhy a degranulaci. [7]

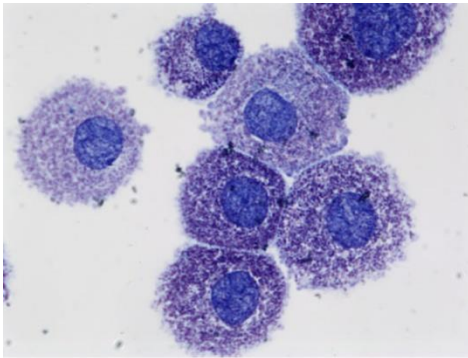
IL-3, IL-5 a GM-CSF umocňují aktivaci a degranulaci bazofilů, aniž by ji samy byly schopny spustit. [7]

1. 2 Mastocyty

1. 2. 1 Charakteristika

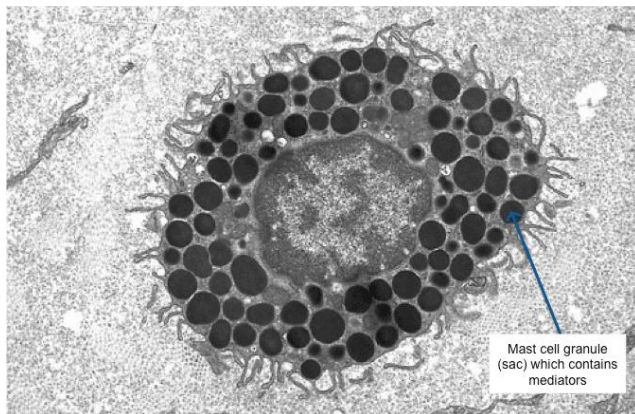
Mastocyty neboli žírné buňky jsou jak morfologicky, tak funkčně velmi podobné bazofilním granulocytům. Dříve byly považovány za tkáňovou formu cirkulujících bazofilů, postupem času byl prokázán původ z odlišného prekursoru. Mastocyty byly objeveny v roce 1878 taktéž Paulem Erlichem, který je nazval „mastzellen“, jelikož mu objemná granula žírných buněk připomínala kapénky tuku. ^[3] Tato granula se při použití anilinové modře či barvení dle Giemsy jeví fialově, jsou menší a početnější než u bazofilů. Od bazofilů se také odlišují oválným jádrem. Průměr buňky mastocytu se pohybuje od 8 do 20 μm . ^[10]

Obrázek 3 Mastocyt



Zdroj: https://krefting.gu.se/digitalAssets/1291/1291519_Human_Mastcell_MR_copy_edited-1.jpg

Obrázek 4 Mastocyt, transmisní elektronová mikroskopie



Zdroj: <https://tmsforacure.org/wp-content/uploads/figure-1-mast-cell-electron-micrograph.png>

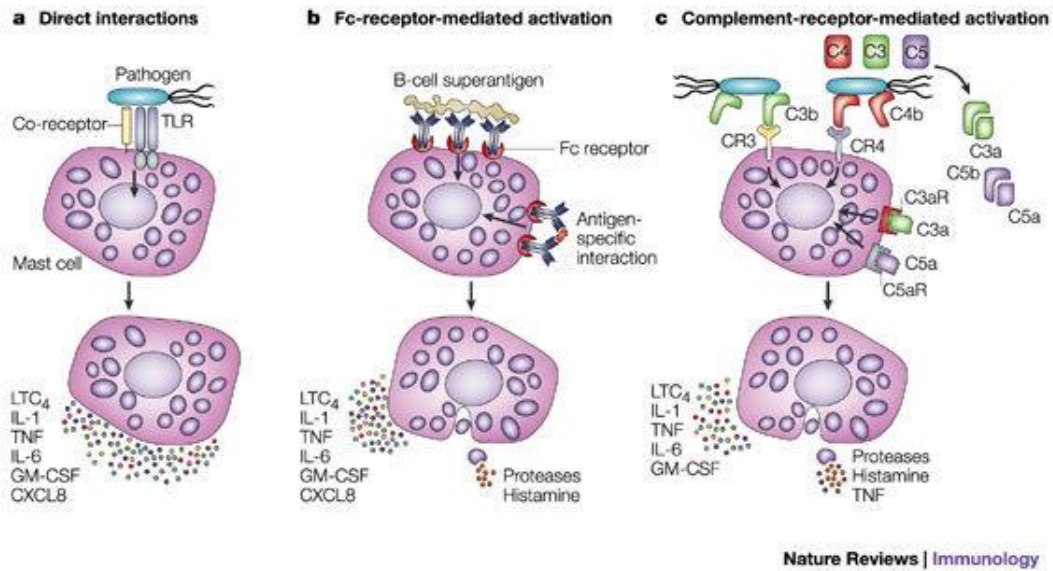
Mastocyty se diferencují z myeloidního prekursoru v kostní dřeni, avšak svůj vývoj dokončují až po vycestování do periferních tkání. Soustřeďují se zejména ve sliznicích, kůži, kolem cév a nervů. ^[1] Hlavním růstovým faktorem pro tuto populaci je SCF (Stem Cell Factor) přítomný na fibroblastech, vázající se na mastocyty pomocí Kit receptoru na jejich povrchu (CD117), který zároveň funguje jako adhezní molekula a lze jej aplikovat i jako znak pro identifikaci mastocytů ve tkáních. Růst mastocytů dále podporuje IL 6, naopak IL 4 potlačuje diferenciaci žírných buněk v kostní dřeni, nikoli však ve tkáních. ^[3]

1. 2. 2 Funkce

Pomocí imunohistologického barvení lze diferencovat dva podtypy žírných buněk. První typ, označovaný jako slizniční či MC_T fenotyp (závislý na T lymfocytech), se vyskytuje převážně ve sliznici dýchacího a gastrointestinálního traktu, kde se účastní antiparazitárních a alergických reakcí. Z možných proteáz produkuje pouze tryptázu. Druhý typ, pojivový či MC_{TC} fenotyp, převažuje v kůži a podslizničním vazivu. Neuplatňuje se při imunitních reakcích, ale podílí se na hojení ran, tkáňové remodelaci a angiogenezi. Bývá zmnožen při fibróze. Produkuje jak tryptázu, tak chymázu. ^{[3] [1]}

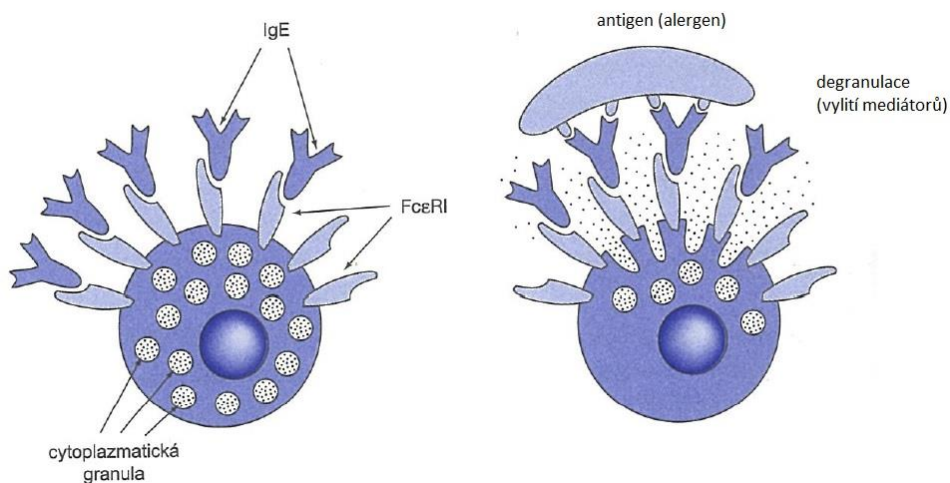
Granula mastocytů obsahují histamin, větší množství heparinu a tryptázy než váčky bazofilů, lze prokázat i karboxypeptidázu a katepsin G. ^[3] Mimo leukotrieny žírné buňky produkují de novo i prostaglandin D₂, způsobující bronchokonstrikci, vazodilataci a chemotaci neutrofilů. Oproti bazofilům exprimují interleukin 5, nutný pro vývoj a přežívání eozinofilů, a prozánětlivé interleukiny 1 a 6 či TGF β (Transforming Growth Factor). ^[7] Vzhledem k přítomnosti žírných buněk ve tkáních je účinek těchto produktů spíše parakrinní, omezený na okolí buňky. Aktivace mastocytů probíhá obdobnými principy jako u bazofilů.

Obrázek 5 Degranulace



Zdroj: <https://media.nature.com/m685/nature-assets/nri/journal/v4/n10/images/nri1460-f2.jpg>

Obrázek 6 Agregace IgE receptorů



Zdroj: HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. Základy imunologie. 6., aktualizované vydání. 48. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.

2 IMUNOPATOLOGICKÉ REAKCE

2.1 Charakteristika

Přestože primární funkcí imunitního systému je ochrana organismu proti škodlivým vlivům – patogenům, v některých případech mohou imunitní buňky způsobovat poškození vlastního těla. Do určité míry provází poškození vlastních tkání každou imunitní reakcí. Problém nastává, pokud závažnost poškození neodpovídá nebezpečnosti patogenu, či pokud imunitní systém reaguje na jinak neškodné podněty. Podněty, které náš obranný systém rozpoznává, nazýváme antigeny. Jako antigen může působit jakákoli chemická látka, nejčastěji se jedná o proteiny, polysacharidy, dále lipidy a lipoproteiny. ^[11] Jeden patogen (například bakterie) může mít na svém povrchu (i uvnitř) stovky rozdílných antigenů, z nichž některé disponují větším potenciálem ke spuštění obranné reakce než jiné. ^[3]

Pokud tělo reaguje na všední a zdraví neohrožující antigeny ze svého okolí, mluvíme o alergii. Zánětlivé procesy, doprovázející alergickou reakci při expozici danému alergenu, pak způsobují nejen diskomfort, ale mohou i ohrozit život. Naopak při selhání autotolerance imunitní systém rozeznává antigeny vlastního těla jako patogenní a snaží se proti nim bojovat, čímž způsobuje poškození struktur orgánů vedoucí ke snížení jejich funkce až úplnému selhání. Takováto onemocnění označujeme jako autoimunitní. Pod pojem imunopatologické reakce řadíme onemocnění způsobená neadekvátní odpovědí imunitního systému ve smyslu zvýšené reaktivity. Poruchy imunity se sníženou schopností obrany proti patogenům nazýváme imunodeficiencí. Pro studijní účely se povětšinou používá rozdělení imunopatologických reakcí zavedené Robertem Coombsem a Philipem Gellm v roce 1963, i když nezahrnují veškeré dnes známé imunopatologické mechanismy. Následující klasifikace rozděluje imunopatologie do čtyř základních typů. ^[11]

2. 2 Imunopatologická reakce I. typu

Reakce I. typu jsou nazývány také reakce časně přecitlivělosti či anafylaktické. Bývá s nimi nežádka zaměňován pojem alergie, který je však širší, jelikož při alergiích se mohou uplatňovat všechny imunopatologické mechanismy.

Pro vznik imunopatologické reakce I. typu je rozhodující geneticky podmíněný sklon k nadprodukci protilátek třídy IgE tzv. atopie. Takto dědičně predisponovaní jedinci – atopici – mohou při expozici neškodnému antigenu (alergenu) začít vytvářet IgE protilátky, ^[11] které se váží na bazofilní granulocyty v krevním řečišti nebo žírné buňky ve tkáních pomocí vysokoafinního receptoru FcεRI. Při dalším setkání s antigenem navázané IgE protilátky spouští degranulaci bazofilů a mastocytů a následnou syntézu dalších metabolitů. K reakci dochází během několika minut po kontaktu s alergenem, proto se mechanismus označuje jako přecitlivělost časného typu. Navzdory dědičnému podkladu však ne všichni atopici vykazují klinické příznaky alergie, tedy atopik se nerovná alergik.^[3]

Při vstupu alergenu inhalací, kontaktem s povrchem kůže či alimentární cestou, probíhá reakce lokálně, projev je doprovázen alergickou rýmou, zánětem spojivek, asthma bronchiale nebo atopickou dermatitidou. Proniknutím alergenu do krevního řečiště, dochází k systémové reakci s rizikem anafylaktického šoku. Důvodem bývá hmyzí bodnutí, nitrožilní podání léku nebo některé druhy potravin. ^[11] V časně fázi reakce se uplatňuje především vliv histaminu, proto lze při léčbě efektivně využít antihistaminika H1. U pozdní fáze hrají hlavní roli produkty eozinofilů, jejichž tvorbu blokují kortikosteroidy. ^[3]

2. 3 Imunopatologická reakce II. typu

Reakci zprostředkovávají protilátky třídy IgG a IgM. Imunitní buňky vybavené Fc receptory, nejčastěji NK buňky, jsou schopny rozpoznat buňky označené protilátkami a zlikvidovat je svými cytotoxickými mechanismy (ADCC – Antibody Dependent Cell Cytotoxicity). Protilátky rovněž způsobují aktivaci klasické cesty komplementu či fagocytózu označených buněk. Veškeré mechanismy mohou vyústit ve zničení buněk vlastního těla, ^[11] což se projevuje například hemolytickou anémií, leukopenií, trombocytopenií, thyroditidou, Goopastureovým syndromem nebo hyperakutní rejekcí transplantovaných orgánů. ^[12]

Do této skupiny řadíme i onemocnění zapříčiněné protilátkami proti buněčným receptorům s účinkem stimulujícím (Graves-Basedowova choroba) nebo blokujícím (myasthenia gravis, diabetes mellitus I. typu) ^[11]

2. 4 Imunopatologická reakce III. Typu

Principem této reakce je tvorba imunokomplexů mezi protilátkami třídy IgG a odpovídajícími antigeny. Pokud tyto komplexy nejsou úspěšně fagocytovány, usazují se ve tkáních, kde aktivují komplement, spouštějí zánětlivé procesy a vyvolávají sekundární poškození tkáně. Při přetrvání nefagocytovaných komplexů ve tkáních přechází zánět do chronicity. Po aplikaci cizorodé bílkoviny (očkovací látky, zvířecí monoklonální protilátky) může nastat sérová nemoc. Imunokomplexy se tvoří při některých autoimunitních onemocněních (systémový lupus erythematosus, poststreptokoková glomerulonefritida). Nejčastější místo nálezu imunokomplexů tvoří ledviny, endoteliální buňky a kloubní synovie, za vzniku glomerulonefritidy, vaskulitidy nebo artritidy. ^[11]

2. 5 Imunopatologická reakce IV. typu

Reakce IV. typu probíhají především lokálně. Vzhledem k buněčné povaze procesů odpověď na antigen přichází po 1 až 2 dnech, proto se tyto reakce jinak nazývají přecitlivělosti oddáleného typu. Dělíme je na dva podtypy dle účasti buněk. U prvního podtypu dochází k senzibilizaci Th1 (CD4+) lymfocytů aktivujících makrofágy. Pokud makrofágy nejsou schopny příčinu zánětu eliminovat, vzniká chronický granulomatózní zánět jako u tuberkulózy, lepry, sarkoidózy nebo granulomatózních vaskulitid. U druhého typu se uplatňují cytotoxické T-lymfocyty (CD8+) a Th17 zapříčiňující kontaktní dermatitidu, poškození při virových infekcích a akutní rejekci transplantátu. ^[11]

3 ALERGIE

3. 1 Charakteristika

„Alergii definujeme jako imunopatologický stav neúčelné obrany organismu na běžné podněty.“^[3] Výraz alergie zavedl v roce 1906 Clemens von Pirquet složením řeckých slov „allos“ – jiný a „ergon“ – činnost, jako označení pro chorobu vyznačující se pozměněnou schopností imunitního systému reagovat na jinak neškodný antigen.^[3] Alergie se může projevovat jakýmkoliv ze čtyř uvedených typů imunopatologických reakcí (například soli niklu mohou vyvolávat reakci IV. typu), nejběžnější příznaky jsou spojeny s I. typem.^[11] Ačkoliv projevy alergie bývají lokalizovány na určité místo, jedná se o systémovou chorobu manifestující se v místě kontaktu s alergenem. Předpokladem pro vznik alergických projevů je geneticky podmíněná atopie, jejíž zastoupení v populaci se odhaduje na 30–40 %. Počet alergiků s klinickými projevy ve vyspělých zemích přesahuje 20 % obyvatelstva.^[3]

Na etiopatogenezi alergických onemocnění se nejspíše podílí porucha rovnováhy mezi Th1 a Th2 lymfocyty s převahou Th2 lymfocytů, vyúsťující v nadprodukcii IgE protilátek, společně s dysbalancí zánětlivých a protizánětlivých faktorů včetně regulačních T lymfocytů.^[3]

3. 2 Fáze alergické reakce

3. 2. 1 Fáze senzibilizace

Důvody, proč dochází k senzibilizaci organismu k jinak neškodným a tolerovaným antigenům, nejsou plně objasněny. V některých případech lze vysledovat souvislost vystavení alergenu současně s probíhající infekcí, rozhodujícím faktorem pro vznik alergie s produkcí IgE se zdá být atopický genotyp.^[11] Pravděpodobnost propuknutí alergie u atopiků zvyšují níže zmíněné zevní faktory.

K procesu senzibilizace dochází převážně na sliznicích, jimiž alergen pronikne a setkává se s antigen prezentujícími buňkami (zejména dendritickými buňkami), které spustí aktivaci Th2 lymfocytů, přeměnu B lymfocytů na plazmatické buňky a následnou

produkci protilátek třídy IgE. Fáze senzibilizace probíhá bez klinických projevů, jelikož při prvním kontaktu s alergenem dosud nejsou v těle přítomny protilátky proti alergenům. ^[11]

3. 2. 2 Akutní alergický zánět

Pokud došlo k senzibilizaci organismu, IgE protilátky kolují volně v krevním oběhu či jsou vázány na FcεRI receptory na povrchu žírných buněk a bazofilních granulocytů. Při dalším setkání s příslušným antigenem se alergen váže na IgE a provokuje aktivaci mastocytů a bazofilů. ^[11]

V časně fázi akutní alergické reakce se uplatňují preformované mediátory vyplavené z granul (zvláště heparin a histamin), vyvolávající vazodilataci a zvýšení permeability cév s otokem a zarudnutím, kopřivku, svědění, bronchokonstrikci, produkci hlenu. Tato fáze se dostavuje již za 10 až 30 minut po vystavení alergenům. ^[3]

Pozdní fáze následuje po 4 až 8 hodinách, během kterých se tvoří mediátory de novo (prostaglandiny, interleukiny) a do místa zánětu migrují další imunitní buňky (eozinofily, lymfocyty, neurofily). Otok, zatvrdnutí a zarudnutí přetrvává. ^[3]

3. 2. 3 Chronický alergický zánět

Při perzistující přítomnosti alergenů se v místě styku hromadí Th2 lymfocyty, bazofily a eozinofily, jež udržují a stupňují zánětlivou reakci. Cytotoxické účinky tohoto buněčného infiltrátu pozměňují tkáň a snižují její schopnost správné funkce. Takto změněná tkáň je náchylnější k dalším patologickým reakcím. ^[3]

3. 3 Faktory ovlivňující vznik alergií

Dědičnost sklonů pro vznik alergie je polygenní a jen málo ze souvisejících genů bylo odhaleno. Patří do nich geny související s rozpoznáváním antigenu, geny pro sklon k nadměrné produkci IgE, geny pro receptory rozpoznávající IgE a geny pro některé z mediátorů zánětu. ^[11] Obecně platí, že pravděpodobnost postižení jedince alergií je vyšší při výskytu alergie v rodině (až 70 % pokud oba rodiče trpí stejnou formou alergie). ^[3]

„V uplynulém století došlo k takovému nárůstu alergických onemocnění, že se hovoří o novodobé neinfekční epidemii. Vzhledem k tomu, že nelze za tak krátkou dobu předpokládat podstatné změny v genetické výbavě postižených jedinců, je vliv prostředí nepochybný.“ ^[8] K rozvoji alergií prokazatelně přispívá aktivní i pasivní kouření cigaret,

indukující eosinofilní zánět, ^[3] znečištění ovzduší zejména výfukovými plyny, schopnými zvyšovat imunogenicitu pylových alergenů, nedostatek fyzické aktivity a nevhodná strava nejen během života, ale také v průběhu gravidity. ^[11] Jako pozitivní faktory se jeví prostředí vícečetných rodin, ^[3] styk s hospodářskými zvířaty a dostatečné osídlení mikroflórou, což zajišťuje přirozený kontakt s běžnými mikroby a stimulaci Th1 lymfocytů, čímž je udržována rovnováha mezi oběma liniemi pomocných T lymfocytů. Zejména opakované virové infekce však vedou k rozvoji astmatu. ^[11]

4 ALERGENY

4.1 Charakteristika

„Alergen je jakýkoliv antigen schopný vyvolat alergickou odpověď. Tento termín se užívá jak pro zdroj alergenu (bříza, roztoči, zvířecí srst), tak pro konkrétní imunochemicky nebo molekulárně definované antigenní struktury (Derp p1, Bet v2). Většina alergenů jsou proteiny nebo glykoproteiny s enzymatickou aktivitou.“^[11] Forma imunitní odpovědi závisí na povaze alergenu. Organické sloučeniny mají tendenci indukovat tvorbu protilátek, zatímco látky anorganické povahy indukují reakci buněčnou.^[11]

Alergeny jednoho druhu lze rozdělit na hlavní, navozující alergickou reakci až u 90% osob citlivých na daný druh, a vedlejší. Jako panalergeny se označují proteiny vyskytující se v mnoha potravinových, rostlinných a živočišných zdrojích. Tato podobnost aminokyselinových sekvencí zapříčiňuje vznik takzvaných zkřížených reakcí, kdy protilátky proti této sekvenci reagují i s jinými antigeny než pouze s původním spouštěčem reakce. Polypeptid profilin se vyskytuje v pylu břízy, arašíděch, celeru, jablkách a peckovinách. Alergik na pyl břízy tedy může vyvinout i potravinovou alergii na kořenovou zeleninu bez nové senzibilizace.^[11]

4.2 Inhalační alergeny

Reakce na inhalační alergeny je typickým zástupcem časně přecitlivělosti zprostředkované IgE protilátkami s nástupem v řádu minut po vystavení alergenu. Projevuje se alergickou rinitidou s rýmou, obstrukcí nosu a kýčáním; sinusitidou; konjunktivitidou s pálením, svěděním a slzením očí; asthma bronchiale s kašlem, dušností, pískáním a sípáním; únavou a subfebriliemi.^[11]

4.2.1 Pylové alergeny

Pylové alergeny způsobují až 20 % alergií a jsou nejčastější příčinou alergické rhinitidy. Největší množství pylových alergií, polinóz, je způsobeno pyly trav, plevelů a větroprašných (anemofilních) stromů. Rostliny rozmnožujících se prostřednictvím hmyzu

(entomogamní) vyvolávají alergie méně často. „Běžná koncentrace pylových zrn během sezóny je 100–500 zrn/m², ke vzniku obtíží u citlivých jedinců stačí již koncentrace 15 – 75 zrn/m²“ [3] Logicky výskyt obtíží kopíruje křivku koncentrace příslušného pylu v ovzduší, od čehož se odráží pojmenování polinózy – sezónní rýma. Na jaře způsobují problémy nejčastěji pyly stromů jako líska, olše, topol, dub, bříza, jasan; v létě převládají trav a obilovin v čele s bojínkem, srhou, lipnicí, ovsíkem, jílkem, žitem a kukuřicí; podzimu dominují plevele pelyněk, ambrózie a čeled' merlíkovité. V současné době je pozorováno prodloužení pylové sezóny od února do října. Zároveň se i snižuje věk propuknutí polinóz. Dříve byl tento typ alergie typický pro starší děti a mladé dospělé, dnes se může projevit v kojeneckém věku. [13]

Obrázek 7 Pylový kalendář

Tabulka 1. Pylový kalendář												
Druh rostliny	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
STROMY												
Líska	•	•	•	•								
Olše	•	•	•	•								
Bříza			•	•	•							
Habr			•	•	•	•						
Topol			•	•	•							
Buk			•	•	•							
Jasan			•	•	•							
Víba			•	•	•							
Lipa					•	•	•					
KÉRE												
Šeřík				•	•	•						
Černý bez				•	•	•	•					
Jasmín				•	•	•						
TRAVINY A OBILOVINY												
Bojíněk					•	•	•	•	•			
Jílek					•	•	•	•	•			
Lipnice					•	•	•	•	•			
Sveřep					•	•	•	•	•			
Žito					•	•	•	•	•			
Pšenice					•	•	•	•	•			
Oves					•	•	•	•	•			
BYLINY												
Pampeliška			•	•	•	•						
Řepka				•	•	•	•	•				
Pelyněk					•	•	•	•	•	•		
Kopřiva					•	•	•	•	•	•		
Ambrózie					•	•	•	•	•	•		
Merlík					•	•	•	•	•	•		
Šťovík					•	•	•	•	•	•		

Zdroj: <https://www.alergologie-imlaufova.cz/alergeny/pylovy-kalendar/>

4. 2. 2 Plísňe

Dalším původcem inhalačních alergií jsou plísňe tvořící spóry. Především v letních měsících způsobují sezónní rýmu spóry venkovních plísňí rodu *Alternaria*, *Cladosporium* a *Botrytis*. V domácnostech mohou celoročně produkovat alergeny rody *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* a *Fusarium* nebo *Aspergillus* (spojen s vývojem astmatu). [3]

4. 2. 3 Živočišné alergen

Největším problémem těchto alergenů je jejich přilnavost k povrchům. Zachycují se na předmětech, ošacení i interiérech. Zahrnují srst zvířat, sliny, epitelie a exkrementy. Nejčastějším zdrojem v domácnostech bývá kočka a pes, v externích prostorách převažuje alergie na koně, myši, králíky a podobné drobnější hlodavce. Při styku zvířecích slin s kůží či při poškrábání a pokousání dochází ke kožním projevům s výsevem pupenů, začervenáním a svěděním. ^[3]

4. 2. 4 Roztoči

Tito drobní živočichové z řádu členovců jsou příčinou mnoha závažných alergií, jež indukují hydrolytické enzymy ve výměšcích roztočů a bílkoviny z jejich rozpadlých tělesných schránek. Nejlepšími podmínkami pro množení roztočů je vlhkost 80 % a teplota 25 °C, proto jsou pro ně ideální lůžkoviny, matrace, koberce a čalouněný nábytek, kde mají zároveň přístup k oloupaným lidským epitelům, kterými se živí. V domácnostech jsou nejfrekventovanějšími druhy *Dermatophagoides pretonyssinus*, *Dermatophagoides farinae* a *Euroglyphus maynei*. Vzhledem k jejich neustálé přítomnosti v lidských obydlích způsobují celoroční rýmu s obstrukcí nosu a kýchním. Podobné příznaky vyvolávají také rus domácí a šváb obecný, jejichž antigeny vykazují podobnost s proteiny roztočů, ale také koryšů, proto citlivost na inhalační alergen roztočů a švábů může mít za následek potravinovou alergii na mořské plody. ^[3]

4. 3 Potravinové alergen

Alergii na složku potravy, která většině populace nenavozuje žádné nežádoucí účinky, je často složité odhalit. Typicky se obtíže dostaví po každém požití potravy. Alergii lze doložit kožními testy s daným alergenem. Je nutno odlišovat alergii od intolerance podněcené odlišnými mechanismy (chybění enzymu laktázy u intolerance laktózy) s obvykle opožděnými, dlouhotrvajícími problémy. ^[14]

Nejsilnější odpověď vyvolávají alergen ve formě glykoproteinů. Mezi nejdůležitější patří složky kravského mléka (α a β laktalbumin, hovězí sérový albumin, kasein), bílku (ovomukoid, ovalbumin), žloutku, sóji, ořechů (zvláště arašídů), ovoce a koryšů. Některé z těchto alergenů se díky své bílkovinné struktuře mohou při vysokých

teplotách denaturovat, ztratit svou imunogenicitu a být alergiky snášeny (například α – livetin ve žloutku). Nazýváme je termolabilní alergeny. [3]

Spektrum příznaků potravinové alergie je široké. Závažné případy začínají při prvním soustu otokem rtů, jazyka a hltanu uzavírajícím dýchací cesty a ohrožujícím život. Po vstřebání do krve indukuje silný alergen anafylaktický šok, slabší ekzém, kopřivku, rýmu či asthma bronchiale. Časté jsou zaživací potíže typu kolikovitých bolestí či průjmu. [14]

Přímou degranulaci žírných buněk bez tvorby protilátek IgE mohou vyprovokovat rajčata, jahody, čokoláda, alkohol a další. Tuto „falešnou alergii“ nelze od alergické reakce dle příznaků odlišit. [14]

Alergeny nekomplikují pouze stravování, ale skrývají se i v léčebných prostředcích. Některé očkovací látky jsou připravovány na půdách z kuřecích embryí a nesmí být podána alergikům s reakcí na vaječné proteiny. [3]

4. 4 Alergie na léky

Alergie na léky jsou vzácnější, než se mnoho lidí domnívá. Komplikace po podání léku bývají častěji způsobeny předávkováním, vystupňovanými nežádoucími účinky, toxickou či idiosynkrastickou reakcí (nedostatek enzymu zpracovávajícího léčivo). Některé opiáty a kontrastní látky jsou schopny přímo vyvolat degranulaci mastocytů. Pouze menší procento léků má dostatečně velkou molekulu, aby vyvolalo tvorbu protilátek (například zvířecí inzulin). Drobné molekuly působí jako hapteny a musí se navázat na makromolekuly (bílkoviny séra, povrchové proteiny buněk), aby se proti nim imunitní systém začal bránit. Vlastním antigenem se může stát přímo lék – haptén, komplex haptenu a nosiče nebo pouze nosič pozměněný navázáním léku. Určité léky podněcují vždy jeden ze čtyř typů imunopatologické reakce. Nejčastějšími alergeny jsou antibiotika, opiáty, barbituráty, zvířecí inzulin a myorelaxancia, mohou to však být i vedlejší složky léčivých přípravků. [3]

4. 5 Alergie na hmyz

Pokud blanokřídlý hmyz svým štípnutím vpraví jed do těla člověka, dochází k několika typům reakcí. Samotný jed má toxické účinky na organismus, jež představují

pro dospělého člověka riziko asi při 100 žihadlech. Mohou být ovlivněny mastocyty, bazofily, komplement a koagulační systém i bez přítomnosti IgE protilátek. Za nejzávažnější je považována alergická reakce zprostředkovaná IgE, jelikož se velmi často projevuje anafylaktickým šokem. Při lokální alergické reakci se vytváří rudý bolestivý otok přetrvávající několik dní. Systémová reakce může být doprovázena kýcháním, rýmou, kopřivkou, otoky kůže, ale i hltanu, zarudnutím, dušností a zrychleným tepem s možností gradace do šokového stavu. ^[3]

Z blanokřídlého hmyzu se v alergologii nejvíce uplatňuje včela, čmelák, vosy, sršeň a mravenci. Uvnitř čeledí existuje zkřížená reaktivita, mezi čeleděmi je ovšem minimální, což umožňuje jednoznačnou diagnostiku, zda alergickou reakci vyvolává jed vosy či včely. ^[3]

4. 6 Rekombinantní alergeny

K diagnostice alergických onemocnění je zapotřebí získat alergen vhodný k rozpoznání zdroje obtíží pacienta. Původní technikou pro izolaci alergenu byla extrakce na vodní bázi a následná purifikace. Takto připravené nativní preparáty obsahovaly jak směs hlavních, tak směs vedlejších alergenů. Nevýhodou přirozených alergenů při aplikaci specifické alergenové imunoterapie bylo množství vedlejších účinků způsobené přítomností nežádoucích příměsí vyvolávajících senzibilizaci na další antigeny. ^[15]

S rozvojem genového inženýrství byly vyvinuty rekombinantní alergeny. Izolací DNA byl získán gen kódující antigen, jenž byl následně zabudován do plazmidu a vpraven do bakteriální buňky. Takto upravená celula syntetizuje velké množství kýženého proteinu.

Další snaha vedla k vytvoření rekombinantních alergenů se sníženou alergenní aktivitou pro využití v rámci specifické alergenové imunoterapie, jejichž pozměněná struktura by zredukovala přítomnost nežádoucích účinků. ^[16]

Diagnostika konkrétního antigenu je zásadní pro správné nastavení imunoterapie, i pro predikci možné zkřížené reaktivity. ^[16]

5 DIAGNOSTIKA ALERGIÍ

5.1 Anamnéza

Jakýkoli výsledek laboratorního vyšetření není relevantní bez srovnání s pacientovou anamnézou a klinickými projevy. Alergické reakce probíhají spíše ve tkáních, a proto testy nejužívanějšího vzorku – krve, nemusí plně korelovat se situací v místě zánětu, stejně jako s vážností pacientových obtíží. Bráno z ekonomického hlediska je navíc odebrání anamnézy to nejlevnější vyšetření, jaké lze provést. ^[13]

Velký důraz je třeba brát na anamnézu rodinnou, jelikož jak již bylo zmíněno, většina alergií vzniká na základě dědičného předpokladu, atopie. Pokud je znám výskyt alergie v rodině, měl by být pacient s obtížemi vysvětlitelnými alergií v tomto směru otestován. ^[13]

V osobní anamnéze se zaměřujeme na typické projevy alergie v určitém věku (například potravinové alergie u kojenců), dále zjišťujeme výskyt opakovaných bronchitid, recidivujících angín, sinusitid. Zjišťujeme rovněž užívané léky a možné alergeny vyskytující se na pracovišti. Alergická anamnéza se skládá nejen z dříve prokázaných alergií a obtíží, ale také z možných alergenů a rizikových faktorů, kterým je pacient vystaven (zvířata v domácnosti, aktivní i pasivní kouření). ^[13]

Do nynějšího onemocnění zaznamenáváme typ obtíží a časový úsek či místo, ve kterém se objevují. Z těchto informací se snažíme vydedukovat, o jaké alergeny by se mohlo jednat. V případě potravinových lze postupně vyřazovat nejčastější alergeny z jídelníčku a sledovat vývoj příznaků. ^[13]

Současně je třeba provést důkladné fyzikální vyšetření.

5.2 Kožní testy

Nejrozšířenějším kožním testem je prick test. Lze jím vyšetřit přecitlivělost I. typu, používá se zejména u inhalačních alergenů. Provádí se na kůži vnitřní strany předloktní, kam se po jedné kapce nanáší vyšetřované standardizované alergeny. Následně je pokožka narušena lancetou do hloubky 1 mm, aby nedošlo ke vniku krvácení. Výsledek se odečítá po 15 minutách, kdy je hodnocena velikost vzniklých pupenů a případné zarudnutí.

Prick test je levná a spolehlivá metoda zatížená malým rizikem nežádoucích účinků. Mezi nejzávažnější komplikace se řadí anafylaxe. ^[13]

Kvůli vyššímu riziku falešně pozitivních výsledků a nežádoucích účinků je v menší míře používán test intradermální, kdy je malé množství alergenu vpravováno přímo do kůže. ^[13]

Epikutánními testy se prokazují kontaktní alergie. Na kůži jsou přikládány standardizované náplasti s alergeny. Pozoruje se vznik reakce po 1, 2 a 3 dnech. Pro různé alergeny se užívají rozličné formy tohoto testu. ^[17]

Před samotným provedením všech kožních testů je třeba vysadit léky tlumící alergickou reakci z důvodu možného ovlivnění testu. ^[13]

5. 3 Provokační testy

Vedle kožních testů lze indikovat i nasální provokační test, kdy se po aplikaci alergenu na nosní sliznici měří stupeň vzniklé obstrukce. Vzhledem k riziku anafylaxe a bronchospasmu se pouze výjimečně přistupuje k bronchiálnímu provokačnímu testu. ^[18]

Pro průkaz potravinové alergie je třeba nejdříve postupně eliminovat jednotlivé složky potravy podezřelé z imunogenicity a sledovat výskyt potíží. Poté je pacient možným alergenům opět vystavován. Za nejprůkaznější je považován dvojité zaslepený, placebem kontrolovaný test, prováděný za hospitalizace, kdy jsou placebo i vyšetřované potraviny podávány ve formě kapslí. ^[18]

Provokační testy u lékových alergií se provádějí pouze na specializovaných pracovištích, ať už u průkazu hypersenzitivity nebo vyloučení zkřížených reaktivit. Lék je podáván stejnou cestou, která byla použita při prvotní alergické reakci. ^[18]

5. 4 Stanovení počtu eozinofilů

Alergická onemocnění provází vystupňovaná tvorba eosinofilních granulocytů, které se podílejí na alergickém zánětu. Ve vzorku patientské krve proto můžeme zjistit jejich zvýšený počet – eosinofilii. Nevýhodou tohoto vyšetření je, že množství eozinofilů v krevním řečišti neodráží skutečný stav v místě zánětu. Eosinofilie navíc provází i další onemocnění jako parazitární, autoimunní a nádorová. ^[19]

K určení počtu eozinofilů se využívá průtokové cytometrie. V případě výskytu morfologických vad krevních buněk či některých chorobných stavů je však nutno provést rozpočet pod optickým mikroskopem, jelikož krevní elementy nemusí být analyzátozem správně zařazeny. ^[19]

5. 5 Stanovení IgE

Zejména u alergií s celkovou reakcí dochází ke zvýšení hladiny protilátek třídy IgE. U lokalizovaných forem však hodnoty celkových IgE mohou být normální a průběh alergického zánětu to nevylučuje. Stejně jakou u eosinofilie, vzrůst protilátek může mít příčinu ve více chorobných stavech. Ke stanovení se užívá enzymová imunoanalýza (EIA) či enzymová imunoanalýza s fluorescenčním značením (FEIA). ^[19]

IgE specifické pro konkrétní antigen testujeme především při neproveditelnosti kožního testu (děti, anafylaxe, nedostupnost standardizovaného alergenu, nemožnost vysadit protialergickou léčbu) či při nesouladu výsledku kožního testu s anamnézou. Výsledek je opět nutno srovnat s obtížemi pacienta, jelikož i asymptomatické osoby mohou mít v krvi přítomny specifické IgE. Je třeba mít na mysli, že protilátky mohou být namířeny proti jiným epitopům, mohou soutěžit o vazebná místa s jinými třídami protilátek (zejména IgG4), nebo mohou vykazovat falešně pozitivní výsledky při zkřížené reakci protilátek. Využívá se metody ELISA. ^[19]

5. 6 Test aktivace bazofilů

Test aktivace bazofilů se aplikuje především v případech, kdy není možné využít provokační test. K odebranému vzorku krve je přidán hledaný alergen a následně je zkoumáno procento bazofilů, které bylo tímto alergenem aktivováno. Pro zahájení aktivace je nutná přítomnost specifických IgE navázaných na FcεRI receptorech bazofilů. Pokud dojde k přemostění několika receptorů pomocí alergenu, započne aktivace bazofilu. Jedním z důsledků je vystavení znaku CD63 na povrch buňky. Transmembránový receptor CD63 hraje roli v růstu, migraci a adhezi buněk mnoha tkání, na bazofilech a mastocytech je vystavován pouze po aktivaci přes receptor FcεRI, nikoli z jiných příčin. ^[20]

Bazofilní granulocyty lze od ostatních leukocytů odlišit pomocí znaku CD203c vyskytujícího se na jejich buněčných membránách. CD203c neboli ektonukleotid

pyrofosfatáza/fosfodiesteráza 3 patří mezi transmembránové proteiny hydrolyzující extracelulárně se vyskytující nukleotidy, nachází se na bazofilech, mastocytech a buňkách dělohy. ^[21]

Pokud tyto CD znaky označíme monoklonálními protilátkami konjugovanými s odlišnými fluorochromy, lze vzorek proměřit pomocí průtokové cytometrie. Buňky pozitivní na znak CD203c i CD63 jsou hledané aktivované bazofily. ^[19]

5.7 Průtoková cytometrie

Průtokový cytometr se skládá ze tří částí – fluidní systém, optický systém a elektronika. Fluidní systém zajišťuje správné dávkování vyšetřovaných buněk v suspenzi do měřící komůrky. Vzorek je vložen do zkumavky s kapilárou na konci. Konec kapiláry je obtékán hnací tekutinou, která s sebou strhává buňky vzorku nejlépe tak, aby měřícím bodem prošla vždy pouze jedna částice. ^[22]

Buňky dále procházejí paprsky laserů. Pokud jsou buněčné struktury označené fluorochromy, je zvolen laser o takové vlnové délce, aby fluorochrom absorboval světlo a vyemitoval záření o specifické vlnové délce. Vzniklá fluorescence či odražené světlo proniká filtry k detektorům. Zde je měřena fluorescence, přímý rozptyl (FSC) světla dávající informaci o velikosti buňky a boční rozptyl světla (SSC) odrážející granularitu buňky (množství struktur v cytoplasmě). ^[23]

Signály z optiky jsou převedeny na elektrické impulsy dále zpracovávané počítačovým programem. Výsledek je zobrazován ve formě grafů – histogramů, kde je na ose x vyjádřena intenzita signálu a na ose y četnost buněk. Z histogramu lze vybrat hledanou populaci a vytvořit pro ni tzv. dot plot, zobrazení se dvěma parametry (např. FSC na SSC). ^[21] Průtokové cytometry s využitím sorterů umožňují oddělovat hledané populace buněk do sběrných zkumavek. ^[22]

6 LÉČBA ALERGIÍ

6.1 Profylaxe

Ač se tento léčebný postup zdá banální, opravdu jediným zaručeným způsobem, jak zamezit propuknutí alergické reakce u již senzibilizovaného člověka, je striktní vyhýbání se styku s alergenem. U potravinových či zvířecích alergií je profylaxe reálně proveditelná, i když ne vždy stoprocentní. Ovšem i přes preventivní opatření může člověka náhodně bodnout vosa. Skutečně zamezit styku s všudypřítomnými roztoči také nelze. Proveditelnost profylaxe je tedy více či méně omezená v závislosti na typu alergenu a alergické reakce.

6.2 Antihistaminika

Léky této skupiny zamezují účinku histaminu na cílové buňky pomocí blokády H1 receptorů na povrchu buněk hladké svaloviny průdušek, trávicího traktu, endotelu, eozinofilů, neutrofilů, dendritických buněk a lymfocytů. Snižují permeabilitu cév a vazodilataci, čímž zmenšují otok. Nejsou však schopny ovlivnit probíhající šokový stav. Tlumí tvorbu hlenu v dýchacích cestách, nemají však velký účinek na bronchokonstrikci. Dříve užívaná antihistaminika první generace se vyznačovala sedativním efektem. V léčbě alergií se dnes preferuje druhá a třetí generace, jejichž molekuly neprostupují hematoencefalickou bariérou a netlumí tedy centrální nervovou soustavu. ^[24]

Využití nalézají v léčbě akutních příznaků a dlouhodobé prevenci sezónní i celoroční rýmy a kopřivky. Nejčastěji se užívají v kombinaci perorálních tablet s lokálními přípravky (nosní spreje, oční kapky, gely a emulze na kožní projevy). ^[13]

6.3 Kortikosteroidy

Tyto synteticky připravené analogy hormonů kůry nadledvin vykazují silné protizánětlivé účinky a inhibují syntézu histaminu, ovšem při dlouhodobém systémovém podávání je provázejí závažné nežádoucí účinky diabetes, osteoporóza a poruchy imunity, proto jsou v perorálním podání vyhrazeny pouze pro závažné stavy po co nejkratší dobu.

^[24] Obvykle se užívají pouze lokální přípravky. Nezaměnitelnou pozici v léčbě asthma bronchiale zaujímají inhalátory s kortikoidy v aerosolu či prášku. Díky nastavené velikosti částic se po vdechnutí účinná látka usazuje v oblasti bronchů, kde ruší bronchokonstrikci, a neovlivňuje zbytek dýchací soustavy. S minimálními vedlejšími účinky se rovněž setkáváme u nosních sprejů odstraňujících neprůchodnost, výtok a kýchání. Efektivně lze použít kortikosteroidy i v léčbě očních a kožních projevů, ovšem s větší obezřetností vzhledem k možnosti nevratného poškození tkání při dlouhodobém užívání. ^[13]

6. 4 Stabilizátory membrán žírných buněk

Zabraňují degranulaci a účinku některých cytokinů na žírné buňky, tím tlumí zvláště časnou fázi alergické reakce. Nevýhodou je nutnost aplikace několikrát denně. Nejčastěji je využíván kromoglykát sodný a nedocromil sodný, který zároveň tlumí kašel, jako preventivní léčba astmatu, nosní a oční kapky či kapsle u potravinových alergií. ^[24]

6. 5 Další léčiva

Léčiva odstraňující příznaky se vyskytují především v kombinaci s dalšími lékovými skupinami. Při astmatu přinášejí úlevu bronchodilatancia β mimetika. ^[24] Obstrukci nosu snižují dekonjestanty s vazokonstrikčním účinkem. U anafylaktického šoku je zásadní podání adrenalinu pro udržení krevního tlaku díky zmírnění vazodilatace, bronchokonstrikce, permeability cév a podpoře kontrakce srdečního svalu. Pacienti se silnou alergií s sebou nosí injekční pera, díky nimž jsou schopni si při nástupu alergické reakce jako první pomoc sami podat nutnou nezbytnou adrenalinu pro dobu do příjezdu zdravotní záchranné služby. Po zajištění adrenalinem následuje léčba kortikoidy a antihistaminiky. ^[13] U těžkého alergického astmatu nereagujícího na jinou léčbu lze použít monoklonální protilátku proti Fc ϵ RI receptorům, blokující vazbu IgE na receptor, a tím znemožnit degranulaci mastocytů a bazofilů. ^[11]

6. 6 Specifická imunoterapie

Cílem specifické imunoterapie je dosažení tolerance imunitního systému vůči alergenu. Mechanismus účinku imunoterapie je ozřejměn pouze částečně. Předpokládá se, že správnou aplikací alergenu lze spustit Th1 imunitní odpověď, jež cytokinovým prostředím (IL-2) inhibuje Th2 lymfocyty a tvorbu IgE ve prospěch zejména IgG4 protilátek. Uplatňují se rovněž regulační T lymfocyty. ^[11] Účinnost specifické imunoterapie byla prokázána při léčbě alergie na hmyz, pyl, roztoče a některá zvířata. ^[26]

Provádí se u pacientů s potížemi vyvolanými alergií na jeden alergen doložený pozitivním kožním testem. Používají se standardizované roztoky o známé koncentraci alergenu. Roztok je možné vpravit v depotní formě do podkoží (subkutánně) s pomalým uvolňováním do těla, či ve formě perorální nebo kapek pod jazyk (inhalační alergeny). Léčba trvá 3–5 let. Je zahajována postupným zvyšováním dávky alergenu podávaného v kratších intervalech (depotní forma většinou 1x týdně). Po dosažení nejvyšší tolerované dávky se tato hladina udržuje s delšími intervaly (depotní forma 1x měsíčně). Subkutánní aplikace s sebou vždy nese riziko anafylaktické reakce. ^[26]

PRAKTICKÁ ČÁST

7 CÍL A ÚKOL PRÁCE

7.1 Hlavní cíl práce

Ověřit možnosti vyšetřování aktivity bazofilních granulocytů pomocí průtokové cytometrie s využitím rekombinantních alergenů. Nalézt vhodný aplikační protokol, strategii gatingu. Zjistit možnosti použití hodnocení testu ve formě procent aktivovaných bazofilních granulocytů, CD-sens a plochy pod titrační křivkou.

7.2 Výzkumné otázky

1. Ověřit možnost stanovení testu aktivace bazofilů pomocí rekombinantních alergenů Phl p1 a Phl p5.
2. Zjistit jakou shodu výsledků poskytují metody CD sens a plocha pod titrační křivkou.
3. Zjistit shodu mezi stanovením hodnoty specifických protilátek IgE, testu aktivace bazofilů, CD sens a plochy pod titrační křivkou.

9 METODIKA

9.1 Zkoumaný vzorek

Celkem testování probíhalo na 28 vzorcích patientské krve, z nichž 20 pocházelo od pacientů před nasazením specifické alergenové imunoterapie a 8 bylo zařazeno jako pozitivní kontrola. U každého vzorku byl proveden test aktivace bazofilů s použitím alergenů Phl p1 a Phl p5 a to v koncentracích 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 a 100 μ g/l. Zároveň byla všem pacientům stanoveny hodnoty alergen specifických IgE protilátek.

9.2 Test aktivace bazofilů

9.2.1 Princip

Cílem testu je vyvolat aktivaci bazofilů, proto byl vždy od stejného pacienta do jednoho vzorku přidán alergen Phl p1 a do druhého Phl p5. Za podmínky, že jsou receptory Fc ϵ RI na povrchu bazofilů dostatečně obsazeny alergenově specifickými IgE a alergen, vážící se na IgE, způsobí přemostění receptorů, dochází k zahájení aktivace bazofilů. Aktivované bazofily na svoji membránu exprimují aktivační znak CD63, díky němuž je lze detekovat pomocí monoklonální protilátky anti-CD63 (klon MEM-259) konjugovanou s fluorescein izothiokyanátem (FITC). Populace bazofilů je ve směsi leukocytů identifikována pomocí monoklonální protilátky anti-CD203c (klon NP4D6) konjugované s fykoerythrinem (PE). Pozitivní kontrolu testu připravíme ze vzorku přidáním monoklonální protilátky anti-IgE, zastupující stimulační účinek alergenu, a chemotaktického peptidu N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), aktivující bazofily přes fMLP receptor (FPR1).

9.2.2 Potřebné vybavení a materiál

Biologický materiál:

Plná nesrážlivá krev s heparinem

Pomůcky a vybavení:

5ml zkumavky pro barvení buněk, sada automatických pipet, vortex, termostat, centrifuga, průtokový cytometr

Chemikálie:

Ultračistá demineralizovaná voda, fosfátový pufr (PBS), BasoFlowEx[®] Kit (Stimulation Buffer – stimulační pufr, Stimulation Control – stimulant pozitivní kontroly, Staining Reagent – koktejl protilátek, Lysing solution – lyzační roztok), alergeny

9. 2. 3 Postup

- Do označených zkumavek pro alergenem stimulovaný vzorek bylo napipetováno 10 μ l alergenu.
- Do zkumavek určených pro negativní kontrolu nebylo pipetováno nic.
- Pro pozitivní kontrolu bylo napipetováno 10 μ l rekonstituovaného stimulantu (Stimulation Control).
- Do všech zkumavek bylo přidáno 100 μ l stimulačního pufru (Stimulation Buffer).
- Do všech zkumavek bylo napipetováno 100 μ l plné krve s heparinem.
- Všechny zkumavky byly promíchány pomocí vortexu.
- Po 15 minutách inkubace ve vodní lázni o teplotě 37 °C bylo doplněno 20 μ l koktejlu protilátek (Staining Reagent).
- Vše bylo promícháno pomocí vortexu a inkubováno v lednici při 2-8 °C.
- Poté bylo přidáno 300 μ l lyzačního roztoku (Lysing Solution), opět byl na promíchání použit vortex a vše bylo inkubováno 5 minut při laboratorní teplotě.
- Do zkumavek byly přimíchány 3 - 4ml demineralizované vody.
- Opět byl použit vortex a inkubace po dobu 5-10 minut při laboratorní teplotě, dokud nebylo dosaženo lyze erytrocytů.
- Následovala 5 minutová centrifugace zkumavek při 300 g.
- Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a resuspendován sediment pomocí 0,2-0,4ml PBS pufru.
- Nakonec byly vzorky proměřeny průtokovým cytometrem a následně vyhodnoceny.

9. 3 Stanovení procenta aktivovaných bazofilů

Pro stanovení aktivovaných bazofilů byla použita analýza pomocí průtokového cytometru Navios (Beckmann Coulter). Naměřená data byla zpracována a vyhodnocena softwarem Kaluza Analysis 1.5a. Pro identifikaci populace bazofilních granulocytů byla použita monoklonální protilátka anti-CD203c konjugovaná s fykoerythrinem (PE), emitující světlo červeného spektra. Aktivované bazofily byly odlišeny pomocí monoklonální protilátky anti-CD63 konjugované s fluorescein izothiokyanátem (FITC), projevující se zelenou fluorescencí. Zvolená gatovací strategie tedy zahrnovala nejprve vyčlenění bazofilů ze zbytku leukocytů pomocí CD203c a následné rozpoznání aktivovaných bazofilů podle znaku CD63. Výsledek byl vyjádřen jako procentuální zastoupení aktivovaných bazofilů exprimující molekulu CD63 v populaci všech bazofilních granulocytů.

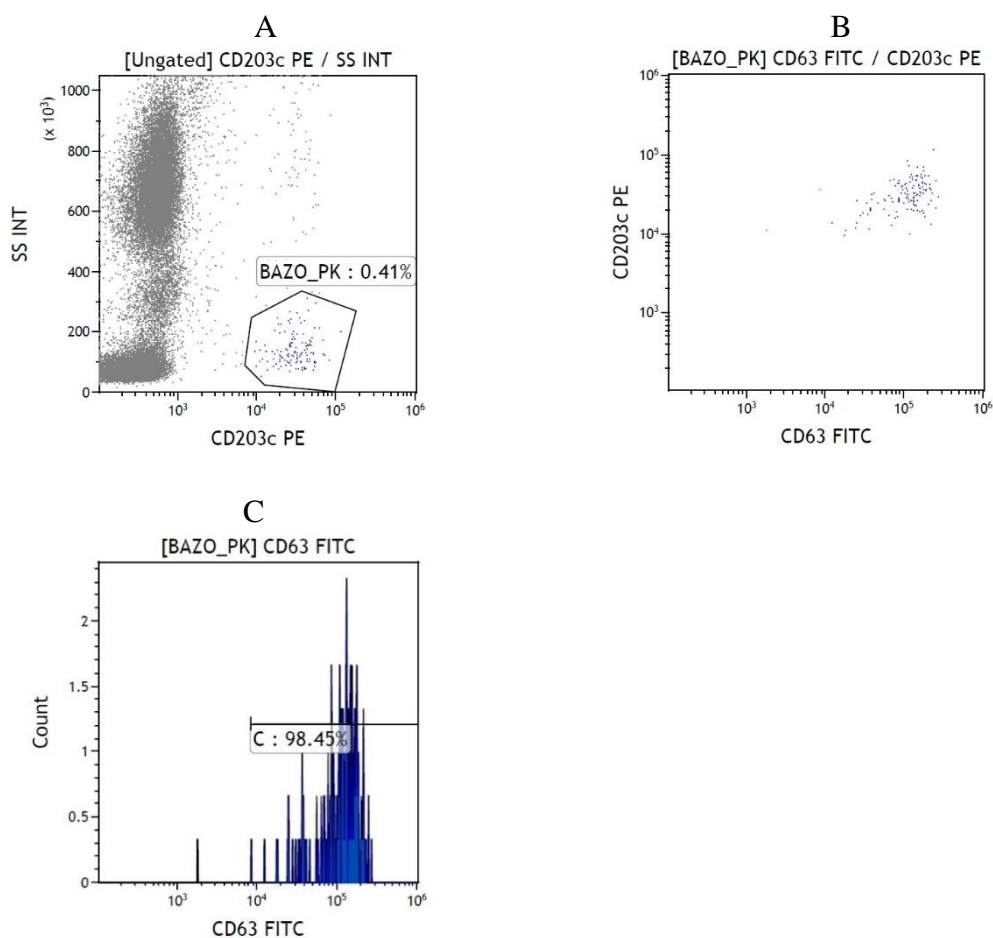
10 VÝSLEDKY

U 28 vzorků krve, z nichž 20 pocházelo od pacientů před nasazením specifické alergenové imunoterapie a 8 bylo zařazeno jako kontrola, byl proveden test aktivace bazofilů s použitím alergenů Phl p1 a Phl p5 v koncentracích 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 a 100 μ g/l. Pro každou koncentraci alergenů byla určena procenta aktivovaných buněk v populaci bazofilních granulocytů. Z těchto dat byly následně vypočteny hodnoty CD-sens a ploch pod křivkou (AUC). Mezi procenty aktivovaných bazofilů, CD-sens, AUC a hodnotami specifických protilátek IgE byla vytvořena korelace vyjadřující těsnost vztahu mezi těmito hodnotami a pomocí pravděpodobnosti spočtena statistická významnost tohoto vztahu.

10.1 Procenta aktivovaných bazofilů

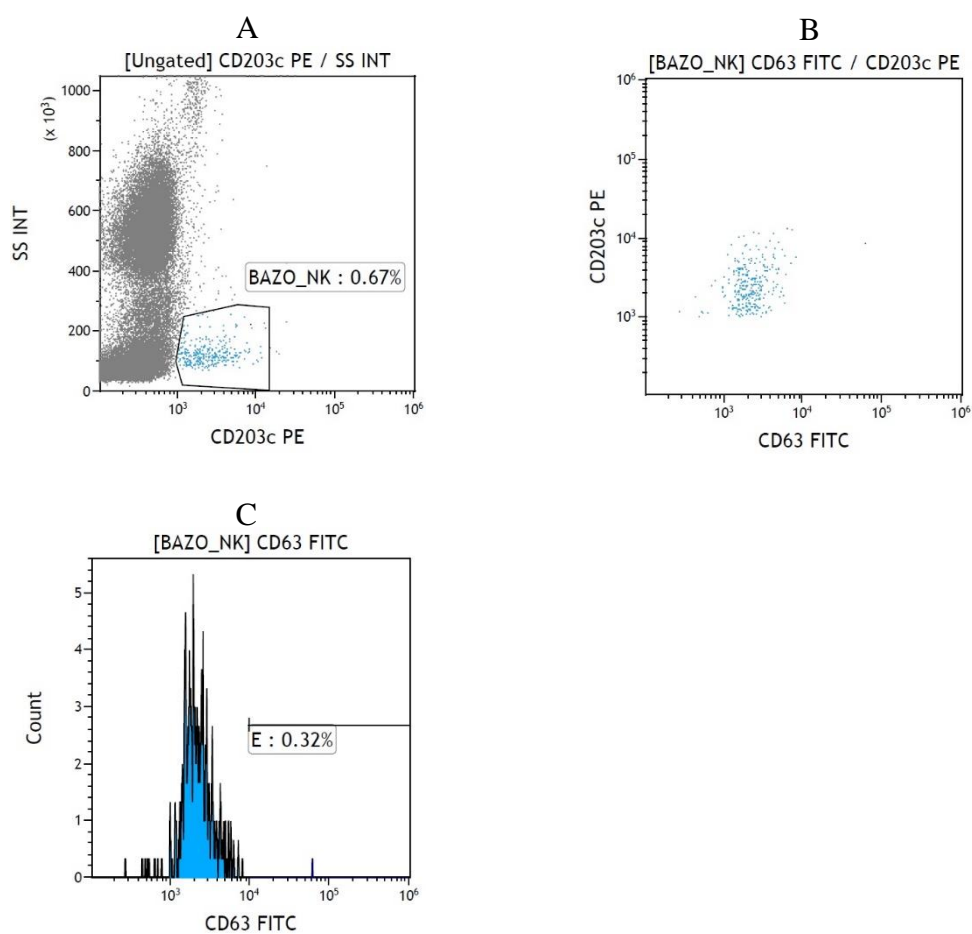
Pro správný gating průtokového cytometru byla vždy změřena pozitivní kontrola aktivovaná anti-IgE protilátkou (Graf 1/A-C) a negativní kontrola bez přídavku alergenů (Graf 2/A-C). Poté byly proměřeny vzorky a vytvořeny histogramy vyjadřující titrační křivku pomocí vzrůstající koncentrace (0,001-100 μ g/l) alergenů Phl p1 (Graf 3/A-E) a Phl p5 (Graf 4/A-E).

Graf 1/A-C, Gating průtokového cytometru, pozitivní kontrola.



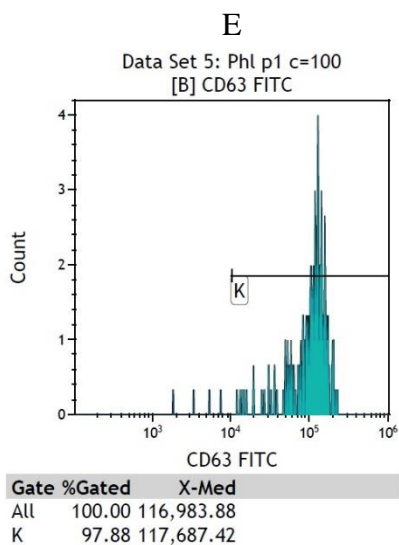
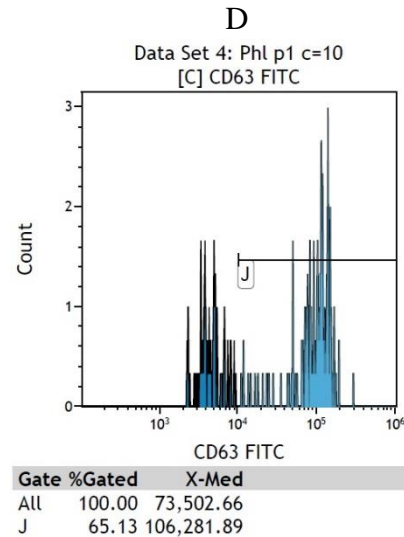
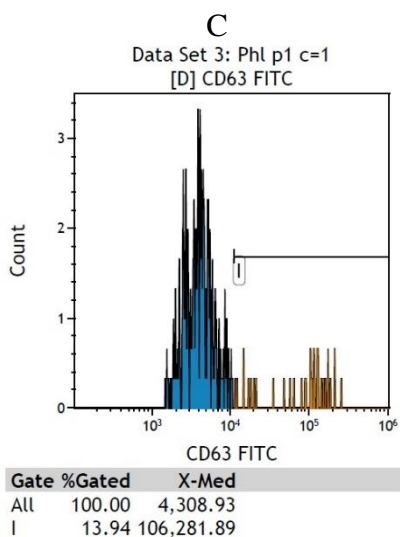
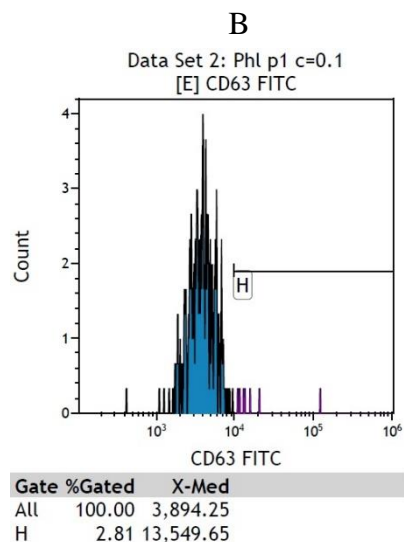
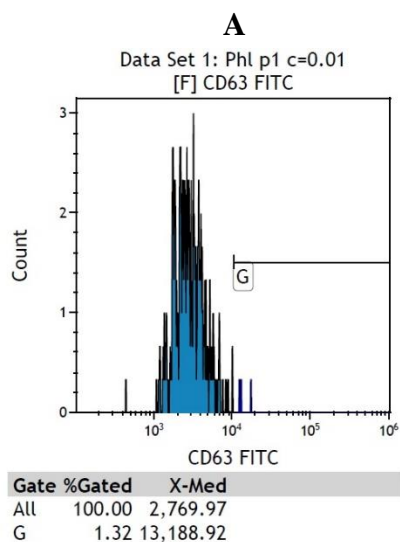
Dot plot A zobrazuje zastoupení populace pozitivní na znak CD203c vzhledem k hodnotám bočního rozptylu. Na dot plotu B jsou vyselektovány aktivované bazofily nesoucí znak CD 203c i CD63. Bazofily pozitivní kontroly na histogramu C dosahují aktivace 98,45 %.

Graf 2/A-C, Gating průtokového cytometru, negativní kontrola.



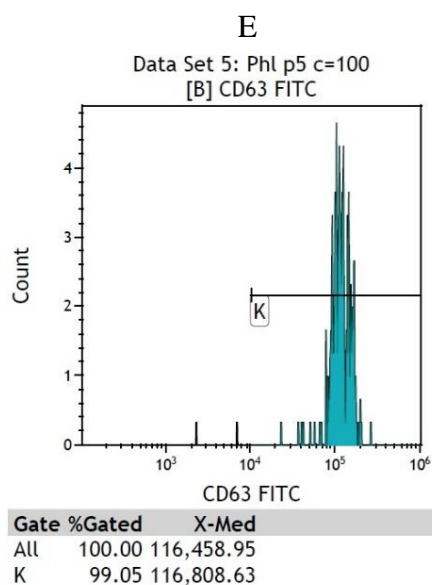
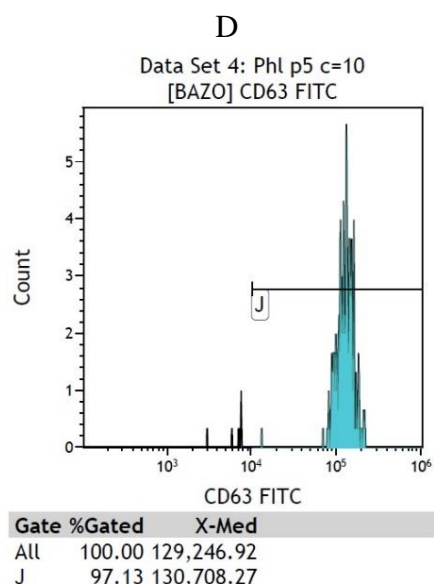
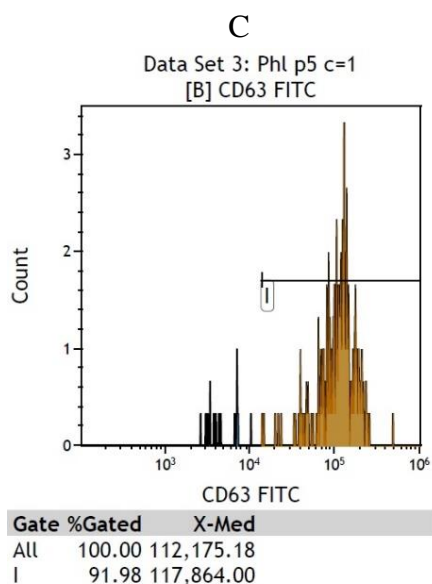
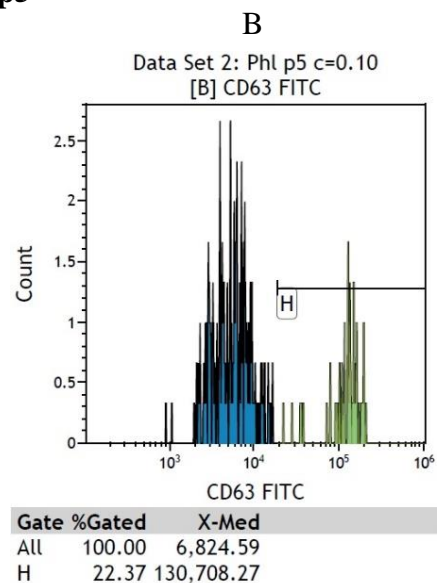
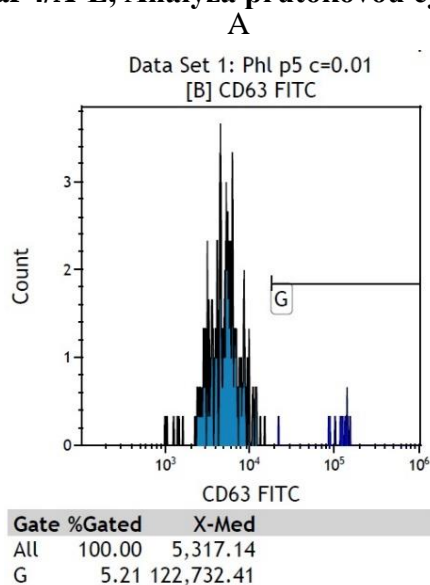
Dot plot A zobrazuje zastoupení populace pozitivní na znak CD203c vzhledem k hodnotám bočního rozptylu. Na dot plotu B jsou vyselektovány aktivované bazofily nesoucí znak CD 203c i CD63. Bazofily negativní kontroly na histogramu C dosahují aktivace 0,32 %.

Graf 3/A-E, Analýza průtokovou cytometrií Phl p1.



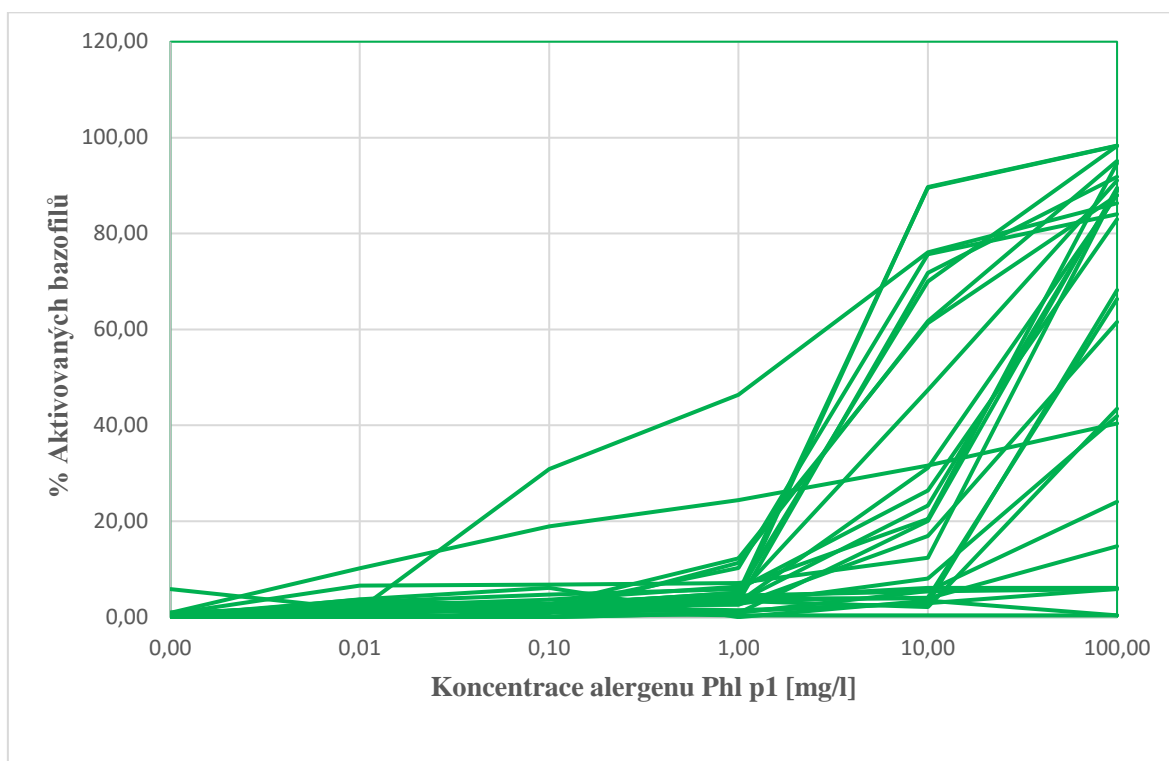
Grafy vzniklé analýzou průtokovou cytometrií za vzrůstající koncentrace alergenu Phl p1 (0,001-100µg/l). Na histogramech A-E pozorujeme přibývající zastoupení aktivovaných bazofilů.

Graf 4/A-E, Analýza průtokovou cytometrií Phl p5



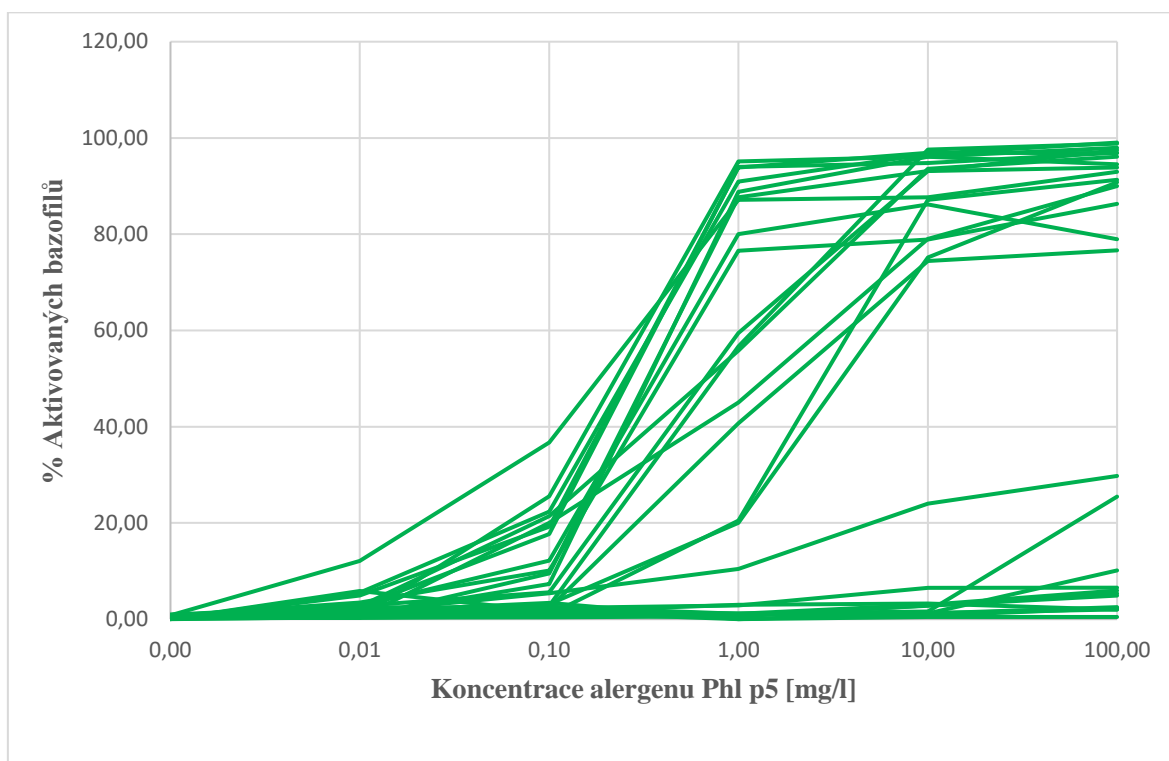
Grafy vzniklé analýzou průtokovou cytometrií za vzrůstající koncentrace alergenu Phl p5 (0,001-100µg/l). Na histogramech A-E pozorujeme přibývající zastoupení aktivovaných bazofilů.

Graf 5 Graf vyjadřující průběh titračních křivek Phl p1.



Křivky vznikly analýzou procesu aktivace bazofilů v závislosti na koncentraci alergenu Phl p1 u 28 zkoumaných vzorků. Pozorujeme nárůst procent aktivovaných bazofilů během zvyšování koncentrace alergenu Phl p1 0,001-100 μ g/l.

Graf 6 Graf vyjadřující průběh titračních křivek Phl p5

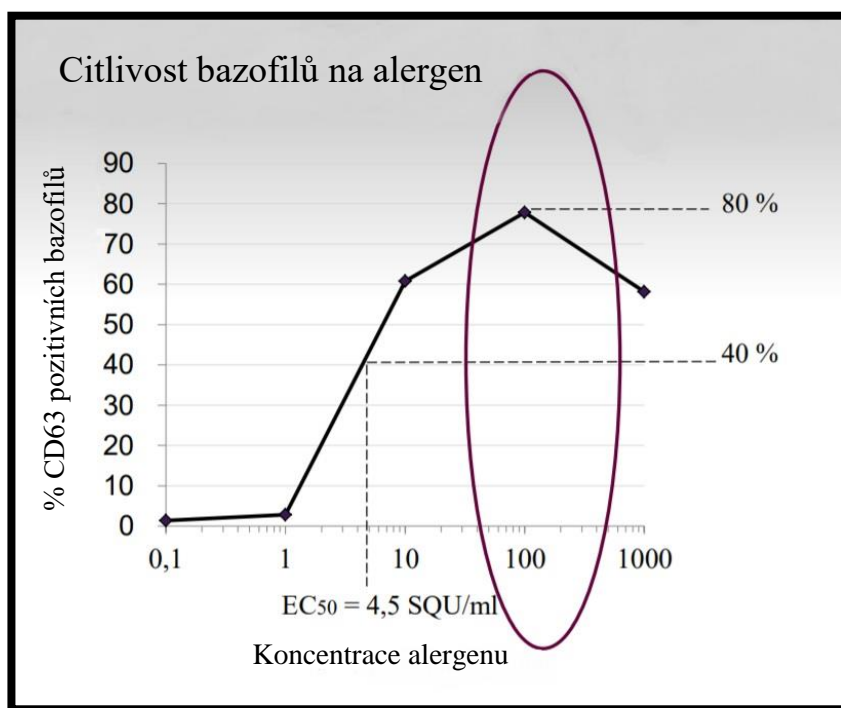


Křivky vznikly analýzou procesu aktivace bazofilů v závislosti na koncentraci alergenu Phl p5 u 28 zkoumaných vzorků. Pozorujeme nárůst procent aktivovaných bazofilů během zvyšování koncentrace alergenu Phl p5 0,001-100

10. 2 CD-sens

CD-sens je způsob vyjadřování citlivosti na alergen. Získáme ho zjištěním, při jaké koncentraci alergenu je dosaženo 50 % maxima aktivovaných bazofilů (EC_{50}). Tuto hodnotu je třeba převrátit a vynásobit 100. Hodnota $CD-sens = \frac{1}{EC_{50}} \times 100$. Čím vyšší je hodnota CD-sens, tím vyšší je i citlivost pro alergen, jelikož bazofily reagují při nižších koncentracích alergenu. Důvodem zavedení tohoto hodnocení citlivosti na alergen bylo snižování procenta aktivovaných bazofilů při vysokých koncentracích alergenu. Pokud bychom posuzovali reaktivitu bazofilů vůči alergenů pouze dle nejvyšší koncentrace alergenu, výsledky by vycházely falešně nižší. Hodnota CD-sens pracuje s maximálním procentem aktivovaných bazofilů, a proto tento problém obchází. ^[26]

Obrázek 8 Grafické vyjádření CD-sens

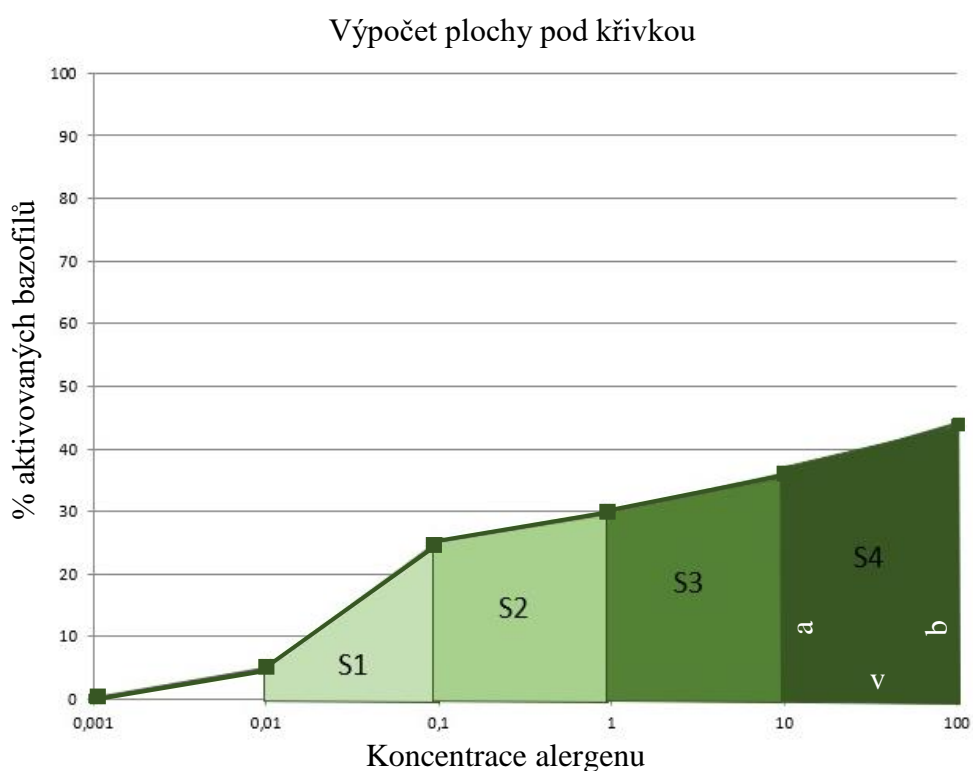


Zdroj: Nopp, Anna. *CD-sens -Funktionellt allergitest När, Var Hur?* [online]. Karolinska Institutet, 2016. [cit. 2018-02-03]. Dostupné z: <http://www.kitm.se/sv/wp-content/uploads/2016/11/CD-sens-funktionellt-allergitest.-N%C3%A4r-var-hur-Anna-Nopp.pdf>

10.3 Plocha pod křivkou

Hodnota plochy pod křivkou (AUC) vyplývá z grafu vzniklého snesením kalibrační křivky do bodů naměřených hodnot procenta aktivovaných bazofilů při jednotlivých koncentracích alergenu. Kvůli zvolení těchto bodů je křivka nespojitá a vytváří se pod ní plochy ve tvaru čtyřúhelníků. Plocha pod křivkou byla určena jako součet ploch jednotlivých čtyřúhelníků, $AUC = S_1 + S_2 + S_3 + S_4$, kde $S = \frac{a+b}{2} \times v$.

Obrázek 9 Grafické vyjádření AUC



Zdroj: Vlastní

10. 4 Korelace

Korelace vyjadřuje míru asociace hodnot dvou proměnných. Hodnotí tedy, zda mezi nimi existuje lineární závislost a jak je tato závislost těsná. Použili jsme Pearsonův korelační koeficient r , nabývající hodnot od -1 do 1. Čím větší je absolutní hodnota r , tím větší je korelace mezi proměnnými. Pod 0,6 považujeme korelaci za slabou, mezi 0,6 a 0,8 za středně dobrou a nad 0,8 za silnou. ^[27] Nejsilnější korelace jsou v tabulkách zvýrazněny barevně.

Tabulka 1 Korelace pro CD-sens Phl p1 a % aktivace u alergenu Phl p1

koncentrace alergenu [$\mu\text{g/l}$]	0,001	0,01	0,1	1	10	100
R	0,23	0,37	0,07	0,23	0,88	0,63
P	0,12	0,25	0,05	0,13	0,01	0,08

Tabulka 2 Korelace pro CD-sens Phl p5 a % aktivace u alergenu Phl p5

koncentrace alergenu [$\mu\text{g/l}$]	0,001	0,01	0,1	1	10	100
R	0,32	0,6	0,83	0,90	0,83	0,82
P	0,20	0,08	0,01	0,01	0,01	0,02

Tabulka 3 Korelace pro AUC Phl p1 a % aktivace u alergenu Phl p1

koncentrace alergenu [$\mu\text{g/l}$]	0,001	0,01	0,1	1	10	100
R	0,32	0,17	0,18	0,36	0,92	0,92
P	0,21	0,45	0,39	0,19	0,01	0,01

Tabulka 4 Korelace pro AUC Phl p5 a % aktivace u alergenu Phl p5

koncentrace alergenu [$\mu\text{g/l}$]	0,001	0,01	0,1	1	10	100
R	0,30	0,30	0,65	0,90	1,00	1,00
P	0,26	0,26	0,1	0,01	<0,01	<0,01

Tabulka 5 Korelace pro ISAC Phl p1 a % aktivace u alergenu Phl p1

koncentrace alergenu [$\mu\text{g/l}$]	0,001	0,01	0,1	1	10	100
R	0,28	0,35	0,06	0,24	0,86	0,66
P	0,24	0,28	0,87	0,25	0,01	0,05

Tabulka 6 Korelace pro ISAC Phl p5 a % aktivace u alergenu Phl p5

koncentrace alergenu [$\mu\text{g/l}$]	0,001	0,01	0,1	1	10	100
R	0,26	0,29	0,69	0,87	0,93	0,93
P	0,23	0,22	0,12	0,05	0,01	0,01

Tabulka 7 Korelace pro CD-sens

	AUC Phl p1	AUC Phl p5	ISAC Phl p1	ISAC Phl p5
R	0,81	0,84	0,77	0,76
p	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Tabulka 8 Korelace pro AUC

	ISAC Phl p1	ISAC Phl p5
R	0,82	0,93
p	<0,01	<0,01

Zjistili jsme, že výsledky stanovení CD-sens a AUC vykazují silnou korelaci u alergenu Phl p1 ($R = 0,81$; $p < 0,01$) i Phl p5 ($R = 0,84$; $p < 0,01$).

V porovnání s hodnotami IgE měly metody CD-sens a AUC vysokou ($R = 0,82$, $0,84$, $0,93$; $p < 0,01$) či středně silnou ($R = 0,76$; $p < 0,01$) korelaci.

Nejlepší shoda se vyskytuje u vyšetření CD-sens a procent aktivovaných bazofilů při koncentraci alergenu Phl p1=10 $\mu\text{g/l}$ a koncentraci alergenu Phl p5=1 $\mu\text{g/l}$, AUC vykazuje s procenty aktivovaných bazofilů nejvyšší korelaci při koncentraci Phl p1=100 $\mu\text{g/l}$ a Phl p5=10 $\mu\text{g/l}$, u srovnání s koncentrací specifických IgE vyšla nejlépe koncentrace Phl p1=10 $\mu\text{g/l}$ a Phl p5=100 $\mu\text{g/l}$.

DISKUZE

Tato bakalářská práce si dává za cíl ověřit možnosti stanovení aktivovaných bazofilů pomocí průtokové cytometrie s použitím rekombinantních alergenů. Byl navržen aplikační protokol a strategie gatingu. Test byl hodnocen ve formě procenta aktivovaných bazofilních granulocytů, CD-sens a plochy pod titrační křivkou (AUC). Následně byly výsledky jednotlivých pacientů porovnány mezi sebou a zároveň s hodnotami alergen specifických protilátek IgE.

Celkem bylo vyšetřeno 28 pacientů, 20 z nich před nasazením specifické alergenové imunoterapie a 8 jako kontrola. Test aktivace bazofilů se provádí před uplatněním SIT pro odhalení primárního zdroje senzibilizace z důvodu eventuální zkřížené reaktivity. Následná realizace BAT je určena ke kontrole efektivity terapie. Veškeré využívané metody posuzují pouze projevy alergické odezvy, doposud není znám charakteristický biologický marker pro kontrolu SIT. [28]

Během navyšování dávek alergenu podávaného pacientovi se výrazně zvyšuje senzitivita bazofilů k alergenu. Ve studii Mikkelsen et al. (2010) dosahuje senzitivita nejvyšší úrovně ve třetím týdnu průběhu terapie. Po dosažení udržovací hladiny alergenu dochází k postupnému snižování senzitivity bazofilních granulocytů (pokles hodnot CD-sens). Zatím co se výsledky našich kontrolních vzorků pohybovaly v téměř negativním spektru, při vyšších koncentracích alergenů bazofily pacientů před léčbou SIT vykazovaly velmi vysoké stupně aktivace.

Test byl provádět z plné krve pacientů co nejdříve po odebrání vzorku. Expres CD63 začíná ihned klesat, při skladování delším než čtyři hodiny je pokles aktivace bazofilů znatelný. Po 48 hodinách se aktivita bazofilů snížila o 42,3-58,5 %. Obecně se upřednostňuje testování z plné krve, kde jsou zachovány všechny bazofily, oproti získávání pomocí centrifugace či sedimentací nad dextranem. [29]

Pro identifikaci aktivovaných bazofilů bylo použito dvojité značení protilátkami proti znaku CD63 a CD203c. Téma nejvhodnějšího aktivačního ukazatele bylo mnohokrát diskutováno – tradiční volbou zůstává CD63, avšak marker CD203c skýtá potenciál, jelikož ho lze využít paralelně pro identifikaci bazofilů i jako aktivační znak. Jako nejvýhodnější strategie se jeví kombinace CD63 a CD203c. [30]

Názory na značení bazofilů se liší. Löttsch et al. (2016) se staví na stranu CD203c, jelikož vykazuje lepší schopnost diferenciací mezi senzibilitou bazofilů a klinickou alergií.

Oproti tomu Sturm et al. (2009) upřednostňuje CD63 s názorem, že CD203c vyžaduje další testování. Rozdíly ve výsledcích markerů však nedosahují statistické významnosti. [30]

K měření byl využit průtokový cytometr Navios (Beckmann Coulter). Volba přístroje může svou systematickou chybou ovlivnit pravdivost měření. Jednotlivé typy cytometrů mohou vykazovat výsledky rozdílné až o 10 % aktivovaných bazofilů. [29] Při práci na stejném pracovišti a vybavení byla však prokázána reprodukovatelnost výsledků. [31]

Na rozdíl od provokačních testů výsledek BAT není ovlivněn užíváním antihistaminik. Jelikož jsou antihistaminika antagonisty H1 receptorů, pouze zabraňují uvolňování histaminu, ne samotné aktivaci bazofilů a expresi CD63. [32] Vliv glukokortikoidů zatím nebyl objasněn, krátkodobá kultivace s kortikoidy však prokazatelně neměla účinek. [29]

Naměřená procenta aktivovaných bazofilů byla zanesena do grafu s odpovídajícími koncentracemi alergenu. Ze vzniklé titrační křivky byl odvozen CD-sens a plocha pod křivkou. Následně byly vypočteny korelace mezi procenty aktivovaných bazofilů, CD-sens a AUC. Výsledky byly vztahovány ke koncentraci alergen specifických IgE jakožto k metodě s prokazatelnými výsledky.

Provokační testy (kožní prick test, nasální, bronchiální a potravinové) jsou základem diagnostiky alergických onemocnění. Provedení testu však může být časově náročné a je zatíženo rizikem nežádoucích reakcí. Zároveň výsledek testu ve smyslu „negativní x pozitivní“ často špatně odráží míru individuální citlivosti k alergenu. [31] Z těchto důvodů panuje snaha o nalezení in vitro vyšetření schopného poskytnout podobně validní výsledky. Velké naděje jsou kladeny na test aktivace bazofilů s hodnocením CD-sens. U některých pacientů ve věku 2-4 let bylo detekováno pozitivní CD-sens a IgE, dříve než byly zaznamenány první klinické potíže spojené s alergií. Tato stanovení by mohla sloužit k podchycení vyvíjejícího se alergického onemocnění a brzkému nasazení terapie. [33] CD-sens přesně měří stupeň citlivosti na alergen, metoda může být tedy použita jako alternativa k provokačním testům, sledování průběhu onemocnění a hodnocení efektivity léčby. [31] [34]

Při testu aktivace bazofilů byly použity rekombinantní formy alergenů Phl p1 a Phl p5, jež mezi sebou vykazují zkříženou reaktivitu. Zkoumané vzorky pacientů léčených SIT ve většině případů (18/20) vykazovaly pozitivitu u obou alergenů. Předností rekombinantních alergenů je znalost struktury alergenu a jeho čistota. Při aplikaci v testu

aktivace bazofilů slouží k odhalení konkrétního epitopu vyvolávajícího imunitní reakci. Vzhledem k jejich výrobě však mohou ztratit terciární strukturu a neobsahují vedlejší alergeny. V některých případech (zvláště u potravinových alergií) se tedy může projevit rozkol mezi příznaky pacienta a negativním výsledkem BAT, vzhledem k senzitivitě na jiné alergeny, nebo zkřížené reaktivitě. ^[34]

ZÁVĚR

Byla ověřena možnost provedení testu aktivace bazofilů za použití rekombinantní formy alergenů Phl p1 a Phl p5 u pacientů s alergií na pyly trav s indikovanou léčbou specifickou alergenovou imunoterapií. Při stanovování nebyly shledány žádné komplikace ukazující na nevhodnost využití rekombinantních alergenů v metodě BAT. Aplikace těchto alergenů se naopak jeví velice příznivá z důvodu snížení zkřížené reaktivity oproti nativním alergenům. Přínos rovněž spočívá v nižším výskytu falešně negativních výsledků z důvodu nízkého zastoupení hlavní složky alergenu ve směsi u přirozených alergenů. Současně zvyšují senzitivitu metody vzhledem ke známé koncentraci a nepřítomnosti marginálních alergenů, které nemusí u daného pacienta vyvolávat alergickou reakci.

Z výsledků můžeme usoudit, že test aktivace bazofilů poskytuje srovnatelně validní výsledky jako diagnostika alergen specifických protilátek IgE. Pro zhodnocení je možné použít jak procento aktivovaných bazofilů, tak CD-sens a plochu pod křivkou v závislosti na účelu vyšetření. Díky možnosti využití rekombinantních alergenů může test aktivace bazofilů sloužit také pro identifikaci konkrétního alergenu, proti kterému je zaměřena imunitní odpověď pacienta, i při nejasném výsledku kožních testů. Při odhalení alergenu může být léčba vedena individuálně. Současně lze BAT využít i pro monitoraci průběhu specifické alergenové imunoterapie. Jedná se o diagnostickou metodu s bohatým uplatněním v odvětví alergologie.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. OCHOTNÁ, J., LIŠKA, M. a PANZNER, P. *Základy alergologie a klinické imunologie pro studenty lékařských fakult - I.část* [elektronická skripta]. [cit. 2018-01-05].
Dostupné z: <http://mefanet.lfp.cuni.cz>
2. *Normální laboratorní hodnoty dospělých* [online]. Praha: Maxdorf, 2018 [cit. 2018-01-06]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/normalni-hodnoty>
3. ŠTERZL, I. *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékaře*. Praha: Karolinum, 2005. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0972-X.
4. *Bazofily* [online]. Praha: Odbor informatiky Ministerstvo zdravotnictví, 2017 [cit. 2018-01-06]. Dostupné z:
http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd_ds3/hypertext/_KOMP_201612120846BAS.htm
5. HAFERLACH, T. *Kapesní atlas hematologie*. překlad 6., přepracovaného vydání. Praha: Grada, 2014. ISBN 9788024747873.
6. TEDESCHI, A., LORINI, M., ARQUATI, M. a MIADONNA, A. Regulation of histamine release from human basophil leucocytes: role of H1, H2 and H3 receptors. *Allergy* [online], 1991, 46(8), 626-631. [cit. 2018-01-06] DOI: 10.1111/j.1398-9995.1991.tb00634.x Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1724117>
7. STONE, K. D., PRUSSIN C. a METCALFE D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2010, 125(2), 73-80 [cit. 2018-01-06]. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.11.017. ISSN 00916749. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2847274/>
8. LIŠKA, M.; OCHOTNÁ, J. a PANZNER P. *Základy alergologie a klinické imunologie pro studenty lékařských fakult – II. část* [elektronická skripta]. [cit. 2018-01-05]. Po registraci a přihlášení je plný text dostupný z: <http://mefanet.lfp.cuni.cz>
9. KLENER, P. *Cytokiny ve vnitřním lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada, 1997. ISBN 80-7169-335-9
10. TĚŠÍKOVÁ, M. Mastocytózy. *Dermatologie v praxi* [online]. Solen, 2010, 4(1), 21–24. [cit. 2018-01-06]. Dostupné z:
<https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2010/01/05.pdf>
11. HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ J., BRDIČKA T a ŠPÍŠEK R. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.

12. BARTŮŇKOVÁ, J. a PAULÍK, M. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.
ISBN 9788072006106
13. LITZMAN, J., KUKLÍNEK, P. a RYBNÍČEK, O. *Alergologie a klinická imunologie*. Brno: Vydavatelství IDVPZ, 2001. ISBN 80-7013-345-7
14. [Z ANGLICKÉHO ORIGINÁLU PŘELOŽILA KATEŘINA ORLOVÁ], c2002.
Alergie: problémy s imunitou, příznaky, léčba. Havlíčkův Brod: Fragment, c2002s.
15. THON, V. *Rekombinantní alergeny*. [online] Brno: Masarykova univerzita. [cit. 2018-01-08]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/4153836-Rekombinantni-alergeny.html>
16. AMBRUSOVÁ, Z. *Rekombinantní alergeny*. *Alergie*. [online] Praha: Tigis, 2011, 1, 50-53. [cit. 2018-01-08]. Dostupné z: http://www.tigis.cz/images/stories/Alergie/2011/01/10_ambrusova_al_1-11.pdf
17. PIZINGER, K. *Dermatovenerologie*. Plzeň: Euroverlag, 2012. ISBN 978-80-7177-985-8.
18. PETRŮ, V. *Diagnostika alergických onemocnění*. [online] Praha: Mladá fronta, 2004. [cit. 2018-01-08]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/diagnostika-alergickych-onemocneni-163569>
19. ZIMA, T. *Laboratorní diagnostika*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2013. ISBN 978-80-7492-062-2.
20. *UniProtKB - P08962 (CD63_HUMAN)* [online]. UniProt, 2018 [cit. 2018-03-05]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/P08962#function>
21. *ENPP3 ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 [Homo sapiens (human)]*. [online] Bethesda: National Center for Biotechnology Information, 2018. [cit. 2018-03-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5169#gene-expression>
22. ŠINKOROVÁ, Z. a ZÁRYBNICKÁ, L. Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda I. část. *Vojenské zdravotnické listy*. [online] Hradec Králové: Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, 2008, 3, 98–103. [cit. 2018-01-07]. Dostupné z: http://www.pmfhk.cz/VZL/vzl3_2008/05-%C5%A1inkorov%C3%A11.pdf
23. Výuková prezentace 2. lékařské fakulty UK v Praze, *Průtoková cytometrie*, Praha 2009. Dostupné z: http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/Prutokova%20cytometrie_Laboratorni%20vysetrovaci%20metody.pdf

24. SLÍVA, J. a VOTAVA, M. *Farmakologie*. Praha: Triton, 2011. Lékařské repetitorium. ISBN 978-80-7387-500-8.
25. PANZNER, P. *Specifická alergenová terapie*. [online] Praha: Mladá fronta, 2004. [cit. 2018-01-08]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/specificka-alergenova-imunoterapie-163576>
26. Nopp, A. *CD-sens -Funktionellt allergitest När, Var Hur?* [online]. Karolinska Institutet, 2016. [cit. 2018-02-03]. Dostupné z: <http://www.kitm.se/sv/wp-content/uploads/2016/11/CD-sens-funktionellt-allergitest.-N%C3%A4r-var-hur-Anna-Nopp.pdf>
27. *Lineární korelační závislost*. [online] Brno: Fakulta veterinární hygieny a ekologie. [cit. 2018-03-08]. Dostupné z <https://cit.vfu.cz/statpotr/POTR/Teorie/Predn5/linearni.htm>
28. WANG, J-Y.. Surrogate Markers for Allergen-Specific Immunotherapy. *Allergy Bioinformatics* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015, 139-146 [cit. 2018-03-8]. Translational Bioinformatics. DOI: 10.1007/978-94-017-7444-4_9. ISBN 978-94-017-7442-0. Dostupné z: http://www.researchgate.net/publication/292347455_Surrogate_Markers_for_Allergen-Specific_Immunotherapy
29. STURM, G. J., KRANZELBINDER, B., STURM, E. M., HEINEMANN, A., GROSELJ-STRELE, A. a ABERER, W. The basophil activation test in the diagnosis of allergy: technical issues and critical factors. *Allergy* [online]. 2009, 64(9), 1319-1326 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2009.02004.x. ISSN 01054538. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1398-9995.2009.02004.x>
30. MIKKELSEN, S., BIBBY, B., DOLBERG, M., DAHL, R., a HOFFMANN H. Basophil sensitivity through CD63 or CD203c is a functional measure for specific immunotherapy. *Clinical and Molecular Allergy* [online]. 2010, 8(1), [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1186/1476-7961-8-2. ISSN 1476-7961. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/41450703_Basophil_sensitivity_through_CD63_or_CD203c_is_a_functional_measure_for_specific_immunotherapy
31. NOPP, A., CARDELL, L.O. a JOHANSSON, S.G.O. CD-Sens Can Be a Reliable and Easy-to-Use Complement in the Diagnosis of Allergic Rhinitis. *International Archives of Allergy and Immunology* [online]. 2013, 161(1), 87-90 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1159/000345133. ISSN 1423-0097. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23257907?dopt=Abstract>

32. ERDMANN, S. M., SACHS, B., KWIECIEN, R., MOLL-SLODOWY, S., SAUER, I. a MERK, H. F. The basophil activation test in wasp venom allergy: sensitivity, specificity and monitoring specific immunotherapy. *Allergy*. 2004, 59 (10), 1102–1109. [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2004.00624.x
33. NILSSON, N., NILSSON, C., HEDLIN, G., JOHANSSON, S. G. O., BORRES, M. P. a NOPP, A. Combining Analyses of Basophil Allergen Threshold Sensitivity, CD-sens, and IgE Antibodies to Hydrolyzed Wheat, ω -5 Gliadin and Timothy Grass Enhances the Prediction of Wheat Challenge Outcome. *International Archives of Allergy and Immunology* [online]. 2013, 162(1), 50-57 [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1159/000350923. ISSN 1423-0097. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/350923>
34. GLAUMANN, S., NILSSON, C., JOHANSSON, S. G. O., ASARNOJ, A., WICKMAN, M., BORRES, M. P. a NOPP, A. Evaluation of basophil allergen threshold sensitivity (CD-sens) to peanut and Ara h 8 in children IgE-sensitized to Ara h 8. *Clinical and Molecular Allergy* [online]. 2015, 13(1), - [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1186/s12948-014-0007-3. ISSN 1476-7961. Dostupné z: <http://www.clinicalmolecularallergy.com/content/13/1/5>
- LÖTZSCH, B., DÖLLE, S., VIETHS, S. a WORM, M. Exploratory analysis of CD63 and CD203c expression in basophils from hazelnut sensitized and allergic individuals. *Clinical and Translational Allergy* [online]. 2016, 6(1), - [cit. 2018-03-08]. DOI: 10.1186/s13601-016-0134-7. ISSN 2045-7022. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/311339883_Exploratory_analysis_of_CD63_and_CD203c_expression_in_basophils_from_hazelnut_sensitized_and_allergic_individuals

SEZNAM ZKRATEK

ADCC – protilátkami zprostředkovaná cytotoxicita

AUC – plocha pod křivkou

BAT – test aktivace bazofilů

CD – cluster of differentiation, diferenciační skupina

CSF – kolonie stimulující faktor

EIA – enzymový imunoanalýza

ELISA – enzyme – linked immunosorbent assay, enzymová imunoanalýza

Fc fragment – fragment crystallizable region

FcγII – nízkoafinní receptor pro IgG

FcεRI – vysokoafinní receptor pro Fc část IgE protilátek

FEIA – fluorescenční enzymová imunoanalýza

FITC – fluoresceinizoithiokyanát

fMLP – N-formyl-methionin-leucin-fenylalanin

FSC – přímý rozptyl světla

GM – CSF – granulocytární makrofágový kolonie stimulující faktor

H1 receptor – histaminový receptor 1

ICAM – 1 – intercelulární adhezivní molekula

Ig – imunoglobulin, protilátka

IL – interleukin

LAF 1 – CD11a – antigen asociovaný s funkcí leukocytů

MC_T – mastocyt produkující tryptázu

MC_{TC} – mastocyt produkující tryptázu a chymázu

MIP 1α – macrophage inflammatory protein

NK – natural killer, přirozený zabíječ

PBS – fosfátový pufr

PE – fykoerythrin

SIT – specifická alergenová imunoterapie

SSC – boční rozptyl světla

TLR – Toll-like receptor

TGF β – transformující růstový faktor

Th – pomocný T – lymfocyt

TNF α – tumor nekrotizující faktor alfa

VCAM – 1 – vaskulární adhezivní molekula

VLA – 4 – CD49 a – very late antigen

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Bazofilní granulocyt, krevní nátěr	13
Obrázek 2 Bazofilní granulocyt, transmisní elektronová mikroskopie	13
Obrázek 3 Mastocyt.....	16
Obrázek 4 Mastocyt, transmisní elektronová mikroskopie	16
Obrázek 5 Degranulace	18
Obrázek 6 Agregace IgE receptorů	18
Obrázek 7 Pylový kalendář	26
Obrázek 8 Grafické vyjádření CD-sens.....	48
Obrázek 9 Grafické vyjádření AUC	49

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Gating průtokového cytometru, pozitivní kontrola	42
Graf 2 Gating průtokového cytometru, negativní kontrola	43
Graf 3 Analýza průtokovou cytometrií Phl p1	44
Graf 4 Analýza průtokovou cytometrií Phl p5	45
Graf 5 Graf vyjadřující průběh titračních křivek Phl p1	46
Graf 6 Graf vyjadřující průběh titračních křivek Phl p1	47

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Korelace pro CD-sens Phl p1 a % aktivace u alergenu Phl p1.....	50
Tabulka 2 Korelace pro CD-sens Phl p5 a % aktivace u alergenu Phl p5.....	50
Tabulka 3 Korelace pro AUC Phl p1 a % aktivace u alergenu Phl p1	50
Tabulka 4 Korelace pro AUC Phl p5 a % aktivace u alergenu Phl p5	50
Tabulka 5 Korelace pro ISAC Phl p1 a % aktivace u alergenu Phl p1	50
Tabulka 6 Korelace pro ISAC Phl p5 a % aktivace u alergenu Phl p5	51
Tabulka 7 Korelace pro CD-sens.....	51
Tabulka 8 Korelace pro AUC.....	51

Příloha 1

Povolení o sběru informací



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

Linda Rendlová

Studentka oboru Zdravotní laborant

Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních metod, používaných v *Ústavu imunologie a alergologie (ÚIA) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Změny citlivosti bazofilních granulocytů během specifické alergenové imunoterapie*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vedoucí zdravotní laborantka ÚIA souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.**
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět v době Vaší, školou schválené, odborné praxe a pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým **je Ing. Bc. Tomáš Vlas, odb. prac. v laboratorních metodách ÚIA FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

*Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči*

*Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.: 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovas@fnplzen.cz*

23. 3. 2018