

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. Lékařská fakulta

Ústav imunologie

HUMORÁLNÍ IMUNITA

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Prof. MUDr. Anna Šedivá, CSc.

Praha 2007

Petra Šrahůlková

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité informační zdroje uvedla v seznamu literatury.

Gratůlková

Ráda bych touto cestou poděkovala Prof. MUDr. A. Šedivé, CSc. a
Mgr. A. Mikšíkové za odborné vedení a poskytnutí cenných rad a informací při psaní
mé bakalářské práce.

Obsah

Seznam zkratek.....	6
1 Úvod.....	7
2 Cíl práce.....	8
3 Teoretická část.....	9
3.1 Nespecifická imunita humorální.....	9
3.1.1 Komplementový systém.....	9
3.1.2 Cesty aktivace komplementového systému.....	10
3.1.2.1 Klasická cesta.....	10
3.1.2.2 Lektinová cesta.....	10
3.1.2.3 Alternativní cesta.....	11
3.1.3 Proteiny akutní fáze.....	11
3.1.3.1 C-reaktivní protein.....	11
3.2 Specifická imunita humorální.....	11
3.2.1 Protilátky.....	12
3.2.2 Charakteristika jednotlivých tříd imunoglobulinů.....	13
3.2.2.1 IgG.....	13
3.2.2.2 IgA.....	14
3.2.2.3 IgM.....	15
3.2.2.4 IgD.....	15
3.2.2.5 IgE.....	15
3.2.3 Protilátková reakce.....	16
3.2.3.1 Primární protilátková reakce.....	16
3.2.3.2 Sekundární protilátková reakce.....	16
3.3 Reakce zprostředkované IgE.....	17
3.3.1 Alergie a alergený.....	17
3.3.1.1 Inhalační alergený.....	17
3.3.1.2 Potravinové alergený.....	17
3.3.1.3 Lékové alergený.....	18
3.3.1.4 Alergený bodavého hmyzu.....	18
3.3.1.5 Alergený kontaktní.....	18

3.3.2	Obrana proti parazitům	18
3.3.3	Imunopatologická reakce typu I.....	19
4	Praktická část	20
4.1	Metody	20
4.1.1	Soubor pacientů.....	20
4.1.2	Použité metody.....	21
4.1.2.1	Immulite 2000	21
4.1.3	Statistika.....	21
4.2	Výsledky	22
4.2.1	Porovnání zastoupení alergenů u mužů a žen	26
4.2.2	Porovnání zastoupení alergenů u dětí a dospělých	28
4.2.3	Porovnání četnosti výskytu potravinových a inhalačních alergenů	32
4.3	Diskuze.....	35
5	Závěr	36
	Seznam použité literatury.....	37

Seznam zkratek

- BCR – receptor lymfocytu B pro antigen (B-cell receptor)
- CRP – C reaktivní protein
- ECP – eozinofilní kationtový protein
- IgA – imunoglobulin A
- IgD – imunoglobulin D
- IgE – imunoglobulin E
- IgG – imunoglobulin G
- IgM – imunoglobulin M
- IL-4 – interleukin 4
- LTB4 – leukotrien B 4
- MAC – komplex aktivující membránu (membrane attack komplex)
- MBL – lektin vázající manózu (mannose-binding lectin)
- PAF – faktor aktivující krevní destičky (platelet activating factor)
- Th2 – pomocný T lymfocyt (helper T cell)

1 Úvod

Imunologie je nový, samostatný a stále se rozvíjející vědní obor. K jeho největšímu rozkvětu došlo za posledních padesát let a jeho poznatky zasahují do všech oborů medicíny.

Imunitní systém patří k základním homeostatickým mechanismům organismu, spolupracuje s jinými fyziologickými systémy, zejména nervovým, endokrinním, kardiovaskulárním, a dalšími. Základní vlastností imunitního systému je schopnost rozeznat škodlivé od neškodného, cizí od vlastního. Tato funkce se projevuje jako obranyschopnost, autotolerance a imunitní dohled.

Funkce imunitního systému vykonávají krevní buňky a také některé části krevního séra nazývané humorální faktory. Podle toho, která složka se v imunitní reakci více uplatní, dělíme imunitu na humorální a buněčnou, dále imunitní mechanismy dělíme na specifické a nespecifické. Všechny složky imunity mezi sebou spolupracují a navzájem se regulují.

K nejčastějším poruchám imunitního systému patří alergická onemocnění, která jsou spojená se zvýšenou tvorbou imunoglobulinu E, na který je tato práce zaměřená.

2 Cíl práce

1. Naučit se metody rutinního stanovení parametrů humorální imunity.
2. Vyhledání pacientů, kteří mají normální hodnoty hladiny celkového IgE a současně zvýšenou hladinu IgE specifického vůči danému alergenu.
3. U těchto pacientů porovnat četnost výskytu specifického IgE proti jednotlivým alergenům, v závislosti na pohlaví a věku.
4. Srovnání četnosti výskytu inhalačních a potravinových alergií u sledované skupiny pacientů.

3 Teoretická část

Humorální imunita má jak specifické, tak i nespecifické mechanismy, které slouží k ochraně organismu proti cizorodým látkám, zvláště proti extracelulárně se množícím opouzdřeným bakteriím, jako jsou pneumokoky a streptokoky. Zajišťují ji protilátky a systém krevních bílkovin, které jsou součástí séra.

3.1 Nespecifická imunita humorální

Nespecifická imunita se také nazývá imunita neadaptivní, přirozená nebo vrozená. Její složky jsou schopny na škodlivinu reagovat rychle, neboť jsou v organismu připraveny předem a jsou účinné proti mnoha různým patogenům. Působí do jisté míry „naslepo“, což umožňuje ochranu organismu před škodlivinami dříve než se zapojí specifická imunita.

3.1.1 Komplementový systém

Komplementový systém je jeden z nejvýznamnějších obranných systémů těla. Je to soubor asi třiceti plazmatických proteinů, které se nacházejí v tělních tekutinách nebo jsou na povrchu buněk. Proteiny jsou produkovány jaterními buňkami a makrofágy. Je známo devět základních sérových proteinů, které se označují C1–C9.

Komplement má tři základní funkce. První funkcí je opsonizace, což je vazba součástí komplementového systému na mikroorganismus za účelem zlepšení účinnosti fagocytózy. Druhá funkce se nazývá chemotaxe, což je pohyb buněk do místa zánětu, a třetí je osmotická lýza buněk.

Složky komplementu neboli C složky jsou v séru přítomny v neaktivní formě. Pokud se setkají s nějakým aktivátorem, např. s patogenním mikrobenem, dojde k jejich aktivaci.

3.1.2 Cesty aktivace komplementového systému

Aktivace probíhá kaskádovitě, to znamená, že produkt jednoho kroku štěpí neaktivní prekursor dalšího faktoru. Na každém stupni aktivace se současně spouští regulační pochody, které jsou zajišťovány inhibitory a inaktivátory.

Existují tři způsoby aktivace, tzv. klasická, lektinová a alternativní cesta. Rozhodujícím stupněm aktivace je rozštěpení složky C3 na fragmenty C3a a C3b. Terminálním produktem je MAC (membrane attack komplex), který perforuje membrány některých mikroorganismů.

3.1.2.1 Klasická cesta

Klasická cesta se zahajuje na površích, na které se navázaly protilátky. Dochází k odhalení vazebného místa pro protein C1 (komplex podjednotek C1q, C1r, C1s), který po vazbě na protilátku změní svůj tvar a začne štěpit proteiny C4 na fragmenty C4a a C4b. Vznikne další enzym, který rozštěpí C2 na fragmenty C2a a C2b. Fragmenty C4b a C2a vytváří aktivní enzym, který představuje C3-konvertázu klasické dráhy a štěpí C3 na C3a a C3b. Fragmenty C3a působí chemotakticky na fagocyty, C3b slouží jako významné opsoniny. Fragment C3b se přidá k C3 konvertáze a vznikne enzymový komplex C4bC2aC3b, který se označuje jako C5-konvertáza, ten štěpí C5 na fragmenty C5a a C5b. Když se C5b naváže na terčovou buňku, do jeho blízkosti se naváží koncové části komplementu za vzniku MAC. [3,7]

3.1.2.2 Lektinová cesta

Lektin je glykoprotein a lektinová cesta je určitou variantou klasické cesty, ovšem některé první složky komplementu jsou vynechány. Hlavní roli zde hraje sérový lektin vázající manózu (MBL – mannose-binding lectin). Ten se váže na sacharidové struktury povrchů některých mikrobů nezávisle na protilátkách a jeho funkce a struktura je podobná C1, štěpí C4 a C2. Aktivace komplementu se účastní větší fragmenty jeho složek, jako jsou C4b, C3b a další označované jako „b“. [3,7]

3.1.2.3 Alternativní cesta

V případě této cesty se první tři složky aktivace (C1, C2 a C4) neuplatňují, ale jsou nahrazeny proteiny faktorem B a faktorem D. Složka C3 se rozštěpí na C3a a C3b a ve vzniklém C3b se odhalí reaktivní cyklická thioesterová skupina, která reaguje s hydroxylovými a aminoskupinami v blízkém okolí. Vzniká C3bBbC3b tedy alternativní C5-konvertáza, podle které se i tato cesta nazývá. [3,7]

3.1.3 Proteiny akutní fáze

Jako proteiny akutní fáze označujeme bílkoviny, jejichž koncentrace dynamicky stoupá v akutní fázi zánětu. Fyziologicky je koncentrace těchto proteinů nízká až neměřitelná. Patří sem C-reaktivní protein, složky komplementu C3, C4, orosomukoid, alfa-2-makroglobulin, ceruloplazmin, alfa1-antitrypsin, haptoglobin, transferin, albumin.

3.1.3.1 C-reaktivní protein

CRP byl objeven jako protein, který váže polysacharid bakteriální stěny pneumokoků typu C, ale má daleko širší funkce. Jeho syntéza v játrech je vyvolána cytokiny, zejména interleukinem 6. U zdravého člověka je jeho koncentrace neměřitelná, začíná růst 6-9 hodin po začátku zánětu a vrcholu dosahuje za 1-3 dny. Diagnostický význam má především v odlišení bakteriální infekce od virové.

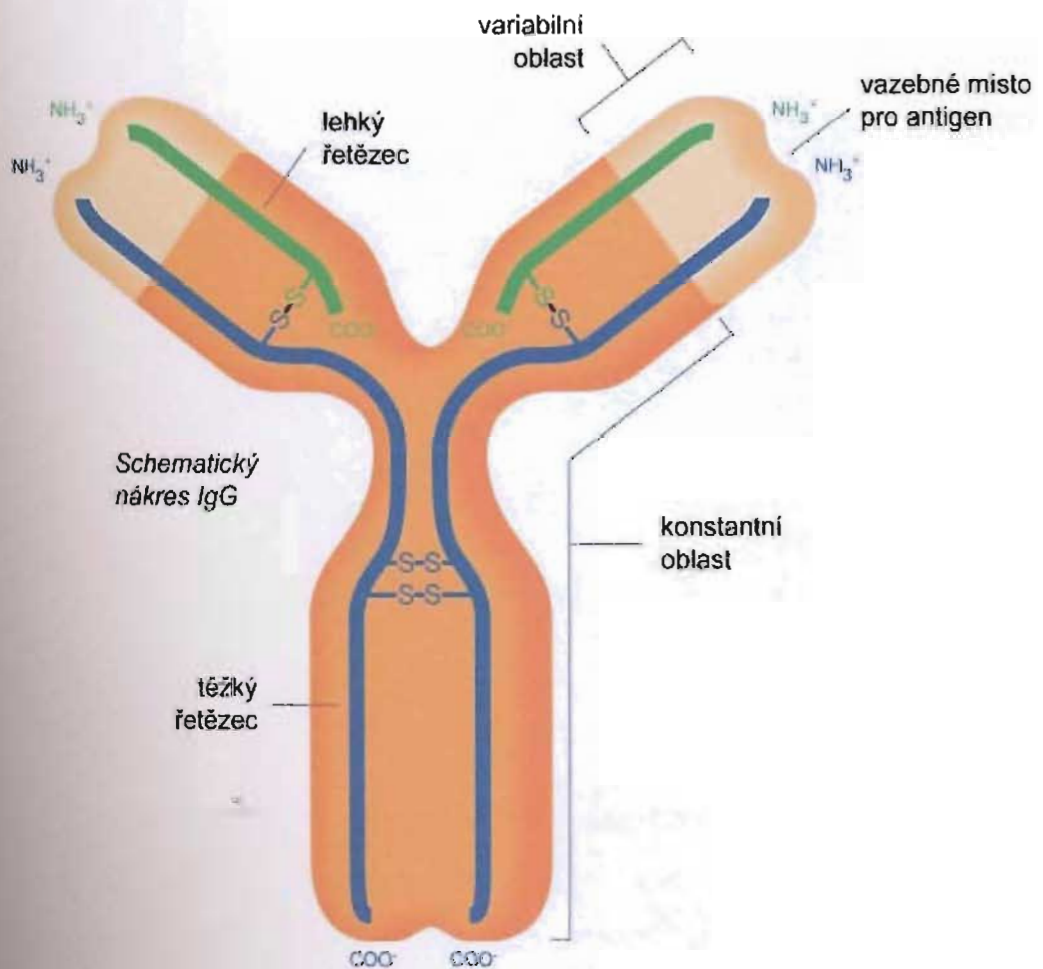
3.2 Specifická imunita humorální

Specifická imunita bývá označována také jako adaptivní nebo získaná. Je evolučně mladší než imunita nespecifická a k její aktivaci dochází až po setkání s daným antigenem. Je namířena proti přesně definovanému antigenu a funguje na základě jeho rozeznání. Její mechanismy tak pracují pomaleji, ale efektivněji.

3.2.1 Protilátky

Protilátky jsou glykoproteidy, zvané imunoglobuliny, které jsou produkovány terminálním stádiem diferenciací B lymfocytů, plazmatickými buňkami. Molekuly všech protilátek mají stejnou základní strukturu, která se skládá ze dvou těžkých řetězců (H) a dvou lehkých řetězců (L).

Typy řetězců jsou označovány malými písmeny řecké abecedy, lehké řetězce jsou dvojího typu κ a λ . Oproti tomu existuje pět základních typů těžkých γ , μ , α , δ a ϵ . Tyto typy těžkých řetězců určují izotypy imunoglobulinu (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE). H řetězce jsou spojeny disulfidickými, jinak též cystinovými, můstkami v tak zvané pantové oblasti. Dále je ke každému těžkému řetězci disulfidickým můstkem připojen jeden L řetězec, jak je patrné z obrázku 1.[1,3,7]



Obrázek 1 Imunoglobulin G [20]

Lehké i těžké řetězce jsou složeny z úseků obsahujících asi sto aminokyselinových jednotek, které se nazývají domény. Domény těžkých i lehkých řetězců na N-koncích molekul, těch koncích, na nichž jsou koncové aminokyseliny s volnou skupinou NH₂, jsou variabilní, kdežto na opačném konci molekuly jsou domény konstantní. Funkce těchto dvou domén je odlišná, funkcí variabilní domény lehkého a těžkého řetězce je tvorba vazebního místa pro antigen.[3,7,9]

3.2.2 Charakteristika jednotlivých tříd imunoglobulinů

Tabulka 1 Základní charakteristiky imunoglobulinů [1]

Třída (Izotop)	Obsah v séru (g/l)	Výskyt	Biologický poločas (dny)	Funkce
IgG	8 – 18	Sérum, intersticiální tekutina	21	Oponizace, neutralizace, sekundární imunitní reakce, prostupuje placentou
IgA	0,9 – 3,5	Sérum, slzy, sliny, povrch sliznic, mateřské mléko	6	Ochrana sliznic, oponizace, neaktivuje komplement
IgM	0,9 – 2,5	Sérum, membrána lymfocytů B	6	Aktivace komplementu, primární imunitní reakce, receptor pro antigen na lymfocytech B
IgD	0,1	Sérum, membrána lymfocytů B	3	Receptor pro antigen na lymfocytech B
IgE	3×10^{-4}	Sérum, intersticiální tekutina	2	Ochrana proti mnohobuněčným parazitům

3.2.2.1 IgG

Protilátky IgG jsou monomerní struktury, nachází se v séru a tělních tekutinách, jsou nejvíce zastoupeny v krevním séru, kde jejich koncentrace je 8–18 g/l, jak je znázorněno v tabulce 1. Uplatňují se při oponizaci patogenních mikroorganismů a

aktivují komplementový systém. Jedná se o jedinou třídu imunoglobulinů, která prochází placentou. [7]

Na základě jemných nuancí ve struktuře těžkého řetězce se protilátky IgG dělí na čtyři podtřídy (IgG1 – IgG4). Jednotlivé podtřídy IgG se liší počtem cystinových můstků v pantové oblasti, její délkou a flexibilitou, dále detaily struktur jednotlivých domén, schopností aktivovat komplementový systém a rozdíly v tvorbě disulfidických můstků připojujících lehké a těžké řetězce. [13]

Vyšetření IgG se doporučuje provést u pacientů, kteří trpí opakovanými a těžkými záněty středouší, sinusitidami, pneumoniemi a bronchitidami, přičemž podtřídy IgG by měly být stanoveny u všech pacientů, kteří mají sníženou hladinu celkového IgG. Ovšem normální nebo zvýšená hladina celkových protilátek IgG nevylučuje diferenciaci jednotlivých podtříd.

IgG1 je nejhojnější sérový izotop, velmi aktivně se transportuje z matky na dítě. Druhou podtřídou jsou protilátky IgG2, ty jsou namířeny proti polysacharidovým antigenům, které jsou součástí pouzder Gram-negativních bakterií, zatímco podtřída IgG3 má význam v obraně proti proteinovým, virovým a bakteriálním antigenům. Má největší schopnost aktivovat komplement. Hladina IgG4 je v séru zanedbatelná, proto se ani deficiencie nijak zvlášť neprojevuje.

3.2.2.2 IgA

Třída IgA má dvě podtřídy IgA1 a IgA2, přičemž v séru převládá IgA1. Imunoglobulin A se nevyskytuje pouze v séru, ale najdeme ho také ve slinách, slzách, v mateřském mléce nebo také ve střevním a bronchiálním sekretu. Podle toho jej dělíme na sekreční a sérový. Sekreční IgA se skládá ze dvou monomerů, sérový je buď monomer, dimer nebo trimer. Sekreční IgA má významnou úlohu ve slizniční imunitě, kde brání proniknutí patogenních organismů do podslizniční vrstvy tím, že neutralizuje antigeny, které se dostanou na sliznici. Protilátky IgA jsou jako opsonizující látky jen velmi málo účinné a neaktivují komplement. [7]

3.2.2.3 IgM

IgM je první třídou protilátek, která vzniká jako humorální imunitní reakce vůči antigenu, se kterým se organismus setkává poprvé. Jeho kompletní molekulu tvoří pentamer, ve kterém je pět monomerů spojeno do kruhu pomocí cystinových můstků. Na molekule tak vzniká deset vazebných míst, což se projevuje vysokou vazebnou kapacitou k příslušnému antigenu. IgM nacházíme v séru, kde má koncentraci 0,9-2,5 g/l (viz. Tabulka 1), ale také v sekretech, kde má podobnou funkci jako IgA. Pro svou velkou molekulu neprochází placentou a neproniká ani do tkání. Vazba protilátek třídy IgM je nejúčinnější cestou aktivace komplementu.[7]

3.2.2.4 IgD

Imunoglobulin D tvoří spolu s IgM povrchové receptory lymfocytů pro reakci s antigeny. IgD má monomerní strukturu, nachází se na povrchu B buněk a v séru, kde je jeho koncentrace 0,1 g/l, jak uvádí tabulka 1.[7]

3.2.2.5 IgE

Obranné reakce zprostředkované IgE mají význam v ochraně proti mnohobuněčným parazitům na sliznicích. Také bývají příčinou imunopatologické reakci typu I, která se označuje jako přecitlivělost časného typu. Jeho koncentrace v séru je velmi nízká a to $3 \cdot 10^{-4}$ g/l, protože je rozmístěn v různých tkáních v organismu.[7]

3.2.2.6 ECP

Stanovení hladiny IgE proti určitým alergenům je základním, ne však jediným kritériem pro diagnostiku alergických stavů. Velký význam zde má i stanovení hladiny ECP, což je eozinofilní kationtový protein, který je přítomen v granulech eozinofilů. V případě jejich aktivace se uvolňuje do okolí, kde působí toxicky na parazity, ale může také způsobit deskvamaci epitelu nebo poškozovat neurony či buňky myokardu. Ke

zvýšení jeho koncentrace dochází v pozdní fázi alergické reakce typu I, ale nemusí korelovat se zvýšenou hladinou IgE. ECP odráží aktivitu onemocnění a slouží hlavně ke sledování průběhu chronicky probíhajících alergických chorob.[1,3]

Je známo, že např. po odeznění anafylaktického šoku po hmyzím bodnutí může přetrvávat negativita hladin specifického IgE několik dní až týdnů. Záleží také na metodice vyšetření, některé orientační a levnější metody jsou méně spolehlivé. Laboratorní metodou, která slouží k průkazu aktuální aktivity alergického zánětu, je vyšetření eozinofilního kationtu (ECP).[18]

3.2.3 Protilátková reakce

Protilátkové reakce jsou charakteristické tím, že probíhají ve dvou fázích zvaných primární a sekundární reakce.

3.2.3.1 Primární protilátková reakce

Protilátky mají v humorální imunitě významnou úlohu. Při prvním kontaktu s antigenem dochází ke stimulaci a pomnožení B lymfocytů a následné diferenciaci na plazmatické buňky, které tvoří protilátky. V krevním řečišti se protilátky objeví během 3–5 dnů od prvního setkání s antigenem, protilátky jsou převážně třídy IgM. Produkce protilátek trvá asi 5–10 dní s maximem konstantní hladiny asi 3 dny. Po dosažení vrcholu koncentrace začíná hladina klesat.[5,7]

3.2.3.2 Sekundární protilátková reakce

K sekundární protilátkové reakci dochází při opakovaném kontaktu s identickým antigenem nebo může navazovat na primární protilátkovou odpověď a to v případě, že antigen v organismu přetrvává v dostatečném množství. Reakce je pak rychlejší a silnější. Sekundární protilátkové odpovědi se účastní paměťové buňky. Sekundární protilátková reakce má krátkou dobu latence, jen několik hodin, maximální hladina v krevním řečišti přetrvává delší dobu a ubývá pomaleji. Dochází k izotpovému

IZOTPOVĚMÝ
4

přesmyku, což je záměna konstantní části produkovaných protilátek a začnou se tvořit protilátky IgG, IgA, IgE. [5,7]

3.3 Reakce zprostředkované IgE

Ke zvýšené tvorbě imunoglobulinu E dojde za situace, kdy se organismus setká s parazitárním antigenem. Tato reakce je naprosto fyziologická a účelná. Někdy může dojít k nadměrné imunitní reakci, která vede k poškození tkání a orgánů, označované jako imunopatologická reakce I. typu. IgE je hlavním mediátorem alergické reakce.

3.3.1 Alergie a alergeny

Příčinou alergické reakce je alergen, což je látka nejčastěji bílkovinné povahy, která u vnímavého jedince je schopna vyvolat příznaky alergické reakce. Nejedná se o přirozenou obrannou reakci, o poškozující reakci imunitního systému.

Alergeny můžeme dělit podle různých kritérií. Podle místa vstupu do organismu je dělíme na inhalační, potravinové, kontaktní, pocházející od bodavého hmyzu a lékové. [3]

3.3.1.1 Inhalační alergeny

První skupinu inhalačních alergenů tvoří tak zvané sezónní alergeny, které se ve vnějším prostředí nachází jen v určitém ročním období. Patří sem pyly různých stromů, trav, plevelů a bylin. Druhou skupinou jsou alergeny interiérů, bytového a domovního prostředí. Mezi ty řadíme roztoče, plísně a v ýměšky domácích zvířat, jež jsou součástí bytového prachu.

3.3.1.2 Potravinové alergeny

Potravinové alergeny lze rozdělit na alergeny rostlinného a živočišného původu. Mnoho potravin ztrácí schopnost vyvolat alergii po tepelné úpravě, týká se to především

bílkovin rostlinného původu, neboť tepelným zpracováním dochází k denaturaci. U některých živočišných bílkovin alergeny vzdorují vaření a mohou být stejně agresivní, jako v syrovém stavu. Alergizující mohou být i přídavné látky, aditiva, která jsou součástí mnoha průmyslově vyráběných potravin.

3.3.1.3 Lékové alergeny

Mnoho léků má nejen žádoucí účinky, ale i nežádoucí účinky na organismus. Mezi tyto nežádoucí účinky léků patří i léková alergie.

3.3.1.4 Alergeny bodavého hmyzu

Jed blanokřídlého hmyzu je bohatý na proteiny, které mohou být alergenem. Kromě toho obsahují také histamin a biogenní aminy, jako jsou noradrenalin a dopamin, které způsobují fyziologickou odpověď na bodnutí. Tyto látky i když imunogenní nejsou, jsou schopny přímo vyvolat anafylaktoidní reakci.

3.3.1.5 Alergeny kontaktní

Mezi kontaktní alergeny patří velké spektrum látek, které působí alergické obtíže po dotyku s kůží nebo sliznicemi. Jako alergen mohou působit kosmetické přípravky, chemikálie, dezinfekční roztoky, kovy, umělé hmoty a další. Do této skupiny lze zařadit i působení chladu a tepla.

3.3.2 Obrana proti parazitům

Fyziologickou funkcí IgE je obranná reakce proti parazitům. Po té, co organismu dojde do kontaktu s antigeny parazita, dochází k stimulaci diferenciaci naivních T-lymfocytů do formy tzv. buněk Th2. Tyto buňky produkují určité cytokiny, nejvýznamnější je IL-4, který podporuje tvorbu protilátek IgE plazmatickými buňkami. Th2 buňky dále stimulují proliferaci a terminální diferenciaci B lymfocytů, které nesou

BCR (receptor lymfocyту B pro antigen) specifický pro parazitární antigeny. Poté dochází k produkci protilátek třídy IgE, které nasedají na vysokoafinní IgE receptory na povrchu mastocytů a bazofilů. Pokud se takto vybavená buňka setká s parazitem, dojde k agregaci IgE a degranulaci mastocytů s uvolněním jeho mediátorů obsažených v cytoplasmatických granulích, jako je histamin a serotonin. Některé takto uvolněné enzymy mohou přímo poškozovat napadené parazity. Dále se aktivuje membránová fosfolipáza A2 a prokudují se metabolity kyseliny arachidonové.[5,7,13]

3.3.3 Imunopatologická reakce I typu

Imunopatologická reakce je spojena s tvorbou protilátek IgE proti některým antigenům vnějšího prostředí. K nadměrné produkci IgE na malé dávky alergenů mají sklon jedinci trpící atopií, což je geneticky podmíněná predispozice k vzniku alergického onemocnění.

Při prvním setkání s alergenem dochází k senzibilizaci. Podobně jako u reakce na parazita dochází k navázání protilátek IgE na vysokoafinní receptory $Fc_{\epsilon}RI$ na mastocytech. Takto navázaný IgE rozeznává různé antigeny, které pak váže přímo na sebe.

Při opakovaném kontaktu s daným alergenem může dojít k přemostění IgE, agregaci receptorů na mastocytech a degranulaci mastocytů s uvolněním mediátorů, jako je histamin, tryptáza, ECP. V následující fázi dojde k syntéze a uvolnění zánětlivých mediátorů, jako jsou PAF, což je faktor aktivující destičky a kyselina arachidonová, která je metabolizována na leukotrieny zejména LTB4 a prostaglandiny především PGD2. Některé z těchto mediátorů, způsobí spasmus hladkého svalstva a vazodilataci cév a některé působí na chemotaxi neutrofilů, bazofilů, trombocytů a dalších buněk zánětu.[5,6,7,13]

4 Praktická část

4.1 Metody

4.1.1 Soubor pacientů

Pro tuto studii byli vybráni pacienti, kteří mají hladinu celkových protilátek IgE v normě a současně mají zvýšenou hladinu IgE specifických vůči danému alergenů. Pro objektivní statistické zpracování byla použita heterogenní skupina 75 osob různého pohlaví a věku. K získání takového množství pacientů, kteří splňují dané normy, byly použity výsledky měření, které jsem rutinně prováděla v laboratoři Ústavu imunologie doplněné výsledky z databáze laboratorního programu, celkem zahrnují období od prosince 2006 do února 2007.

Stanovení celkového IgE se používá jako orientační test na průkaz atopie, přestože u všech jedinců nemusí být zvýšeno. Fyziologické rozmezí koncentrace celkového IgE se liší podle věku, u dospělých se koncentrace vyšší než 150 IU/ml považuje za patologickou viz tabulka 2.

Tabulka 2 Fyziologické rozmezí IgE [17]

Věk	IgE (IU/ml)
0-1 týden	0-1,5
1 týden – 2roky	0,-30
2-7 let	0-60
7-9 let	0-90
9-16 let	0-200
16 let a více	0-150

ECP má fyziologické rozmezí < 24 ng/ml a fyziologická hladina specifického IgE je < 0,35 kU/l. Hladiny IgE se stanovují proti specifickým alergenům nebo směsím alergenů.[17]

4.1.2 Použité metody

Stanovení protilátek IgE vyžaduje senzitivní testy, neboť se organismu vyskytuje ve velmi nízkých koncentracích. Pro stanovení celkového i specifického IgE byla použita chemiluminiscenční metoda. Přístroj, který pracuje na principu chemiluminiscence a na kterém byly sebrány výsledky pro tuto práci, se jmenuje Immulite 2000.

4.1.2.1 Immulite 2000

Immulite 2000 je analyzátor, který provádí kvantitativní i kvalitativní imunochemické analýzy na pevné fázi, se značením alkalickou fosfatázou a detekuje tímto enzymem vyvolané luminiscenční záření.

System Immulite 2000 využívá specifické protilátky, vázané na polystyrénové kuličky jako pevné fázi. Kulička je dávkovaná do speciální reakční tuby, která slouží jako nádoba pro inkubaci a mytí a je podnětem pro vývojový proces. Po přidání vzorku dochází k inkubaci se značenou alkalickou fosfatázou při teplotě 37 °C. Po inkubaci je nenavázaná reakční směs separována z kuličky odstředivým promýváním. Dále je tekutina dopravena do koaxiální komůrky, která slouží jako promývací stanice kde proběhne čtyřikrát promytí a následně jsou všechny reakční tuby postupně zařazeny do procesu. Přidá se substrát dioxetanu, který hydrolyzuje stykem s alkalickou fosfatázou za vzniku nestabilního meziprojektu. Ten se ihned rozpadá za vzniku luminiscenčního záření, jehož intenzita je detekována fotonásobičem. Výsledky jsou pak vypočítány pro každý vzorek.[19]

4.1.3 Statistika

Pro statistické zpracování byl použit program Excel.

4.2 Výsledky

Tabulky 3 vysvětluje zkratky všech vyšetřovaných směsí alergenů a uvádí jejich obsah.

Tabulka 3 Směsi alergenů

<i>Zkratka směsí</i>	<i>Směsi</i>	<i>Obsah</i>
TP9	Stromy	T2- olše šedá T3- břiza bradavičnatá T4- líska T7- dub T12- jiva
DP1	Roztoči	
MP1	Plísňe	M1- Penicillium notatum M2- Cladosporium herbarum M3- Aspergillus fumigatus M5- Candida albicans M6- Alternaria tenuis
GP1	Trávy	G3- srha říznačka G4- kostřava G5- jilek G6- bojínek luční G8- lipnice luční
WP3	Byliny	W6- pelyněk černobýl W10- merlík bílý W12- zlatobýl obecný W20- kopřiva dvoudomá
EP71	Peří	E70- husí peří E85- kuřecí peří E86- kachní peří E89- krocení peří

Tabulka 4 vysvětluje zkratky všech vyšetřovaných alergenů.

Tabulka 4 Alergeny

<i>Zkratky alergenů</i>	<i>Alergeny</i>
F1	vaječný bílek
F2	kravské mléko
F13	burské ořšky
F14	sojové boby
F31	mrkev
F77	laktoglobulin
F92	banán
F224	mák
T3	bříza
E1	kočičí epitel
E2	psi epitel
E6	morče
I1	včela
I3	vosa
K82	latex
W6	pelyněk
M3	Aspergillus fumigatus
ECP	eozinofilní kationtový protein

← první alergen

V tabulce 5 jsou shrnuty výsledky souboru všech mužských pacientů

Tabulka 5 Soubor všech sledovaných mužů

Rok nar.	Cel. IgE	F1	F2	F13	F14	F77	F92	F224	T3	E1	I1	I3	W6	TP9	DP1	MP1	GP1	WP3	ECP	EP71
1983	69,4								3,6					2,7			19		22	
1966	84,1								0,7					0,6			39		25	
1976	144													> 100	37	40	> 100	10		4,7
1948	50								79					56						
1982	84,8								5,7				0,4	3,3			34			
1994	16,5														15					
1991	105													2,9	0,8		0,8			
1949	31																2,2			
2001	25													1	1,6		2,9			
2004	12,3	0,7																		
1958	28													1,6						
2006	10,2	1,1																		
1964	20,4								11											
2004	18,5	0,4																		
2004	39,1	0,8																		
2003	19,9	0,9																		
1998	88,3																29	33		
1989	44,5														0,8					
1986	8,2																1			
1977	12,6								12					6,4					26	
1985	88,7							7,3												
2001	42,8														1,3					
2004	51,4	2																		
1991	44,4								1,1								26			
2003	19,6					0,68														
1963	54,6													1,3					32	
2003	44,5	0,9	0,4																	
1992	112														16					
2004	53,1	0,9																		
1997	59,4															0,5			50	
1993	135			1,7	0,8									1,1			0,8	2,2		
2006	4,6	0,7					1,2													
1983	33,9									0,8	0,7		0,4							
2003	26,7																5,1			
1956	17,7																		31	
2003	39,7																		43	
1993	96,2																		26	
2003	15,6																		33	

*↑ křidni omezení
přehled jedinců!*

V tabulce 6 jsou shrnuty výsledky souboru všech ženských pacientů

Tabulka 6 Soubor všech sledovaných žen

Rok nar.	Cel. IgE	F1	F13	F31	T3	E1	E2	E6	I1	K82	TP9	DP1	MP1	GP1	WP3	ECP	M3
1986	143											0,4				27,4	
2001	46										64,6			1,49			
1966	62,1										15,4	11,3					
1999	75		0,39						9,71								
2003	34,8	0,51															
1981	118										3,38	1,54		54	0,48		
1993	107							41									
2006	9,8	6				0,37											
1993	148											0,4	1,83	2,79			
2004	15	0,37															
1988	113		1,19	1,48	> 100												
1983	71,9													25,5			
2002	38,9										0,48						
1995	44,4												0,85				
1990	91,3											1,1					
2006	2,8	0,46															
1980	53													48,9	3,29		
2003	3,6						0,65										
1988	98,2					4,18					2,22						
1999	69,2											15,2				25,3	
1996	67,2							0,44									
1972	88,3				3,41												
1998	52,6													0,48	36		
1945	101										2,79		0,58	7,39			
1972	26,6					7,34										24,8	
1963	47,9					10					30		4,3				
1993	61,6									0,36	0,37				1,22		
1949	88,1												1,43	0,53			
1999	78,2											20,6					
1983	34,1															27,5	
1994	7															36,5	
2000	26,5															28,8	
1986	78,1																2,5
1951	15,7															43	
1946	20,4															27	
1987	59,1															31,5	
1992	58,7																10,3

*→ křídlo směřující
přibližně před a v*

4.2.1 Porovnání zastoupení alergenů u mužů a žen

V daném časovém období bylo na ústavu imunologie u 658 pacientů stanovena hladina specifického IgE, z tohoto množství bylo 75 pacientů, což je 11,3%, kteří měli pozitivní specifické IgE a současně negativní celkové IgE. Z celkového počtu 75 sledovaných pacientů bylo 38 mužů a 37 žen. Seznam pacientů uvádí tabulky 5 a 6.

Tabulka 7 Procentuální zastoupení směsí alergenů u sledovaných pacientů

<i>Směsi alergenů</i>	<i>Muži [%]</i>	<i>Ženy [%]</i>	<i>Celkem [%]</i>
TP9	31,6	21,6	26,7
GPI	31,6	21,6	26,7
MP1	5,3	8,1	6,7
DP1	18,4	18,9	18,7
WP3	7,9	13,5	10,7
EP71	2,6	0	1,3

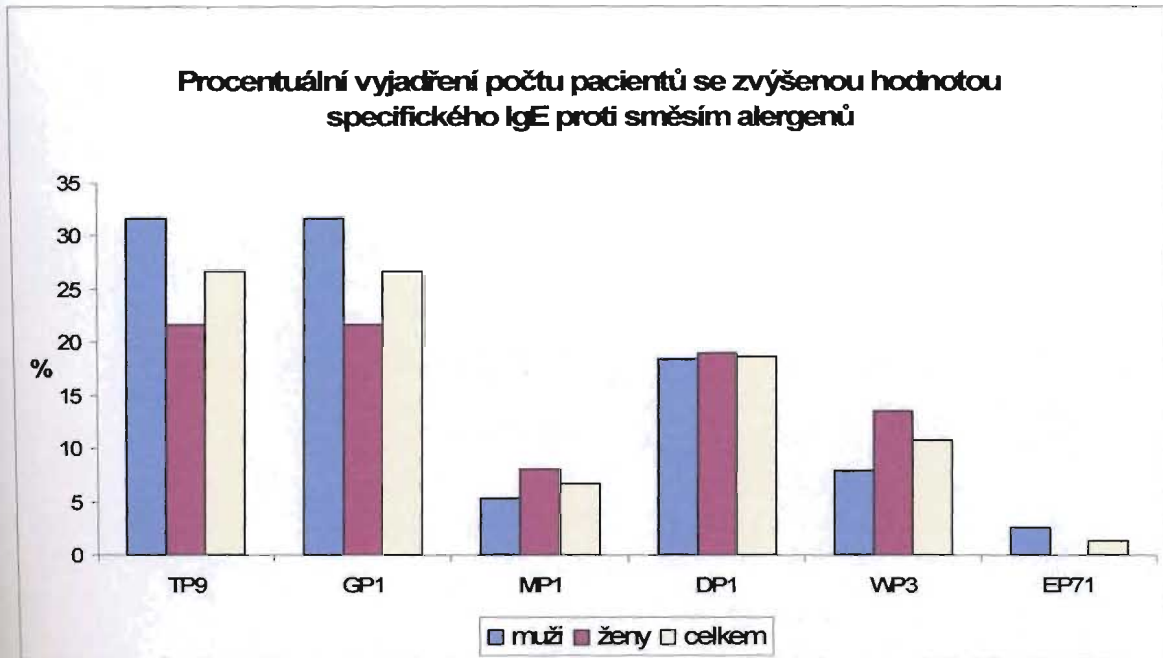
Tabulka 8 Procentuální zastoupení jednotlivých alergenů u sledovaných pacientů

<i>Jednot. alergeny</i>	<i>Muži [%]</i>	<i>Ženy [%]</i>	<i>Celkem [%]</i>
ECP	23,7	27	25,3
F1	23,7	10,8	17,3
T3	15,8	5,4	10,7
E1	2,6	10,8	6,7
F13	2,6	5,4	4
I1	2,6	2,7	2,7
E6	0	5,4	2,7
M3	0	5,4	2,7
F31	0	2,7	1,3
E2	0	2,7	1,3
K82	0	2,7	1,3
F2	2,6	0	1,3
F14	2,6	0	1,3
F77	2,6	0	1,3
F92	2,6	0	1,3
F224	2,6	0	1,3
I3	2,6	0	1,3
W6	2,6	0	1,3

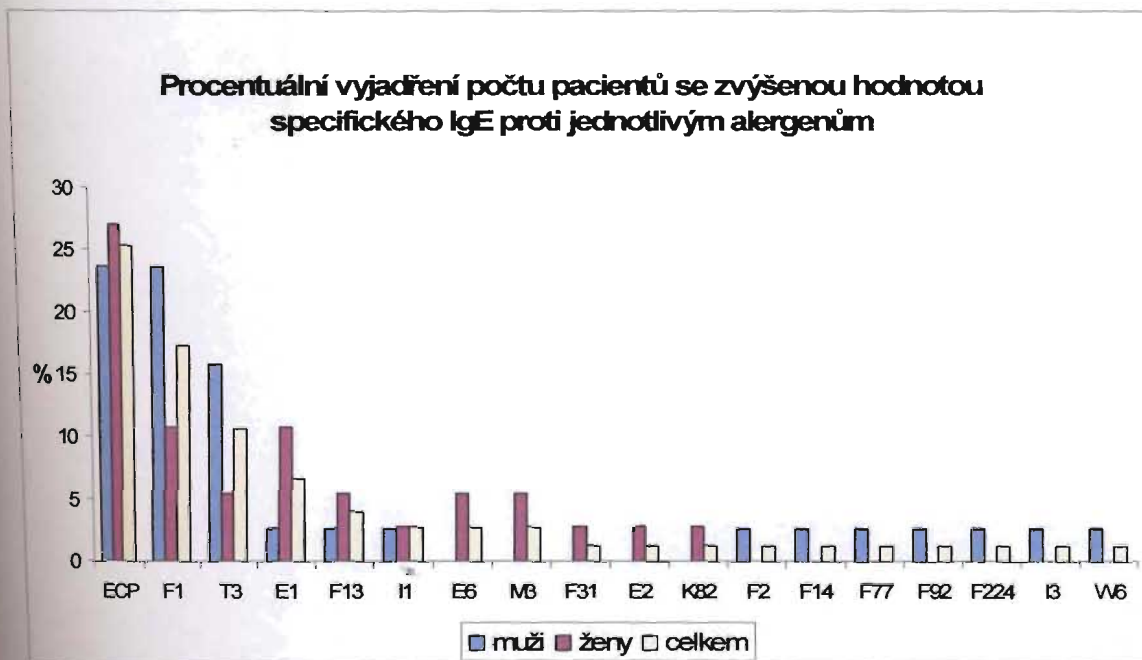
není alergen →

Grafické znázornění porovnání procentuálního zastoupení směsí alergenů u mužů a žen popisuje graf 1 zatímco graf 2 ukazuje zastoupení jednotlivých alergenů.

Graf 1



Graf 2



Nejvýznamnější rozdíly v četnosti výskytu specifického IgE proti jednotlivým alergenům jsou patrné u F1 a podobně tomu bylo i u T3.

4.2.2 Porovnání zastoupení alergenů u dětí a dospělých

Celkový soubor pacientů zahrnuje 29 dětí do 10 let věku, informace o těchto pacientech jsou obsaženy v tabulce 9 a 46 dospělých, jejichž výsledky zahrnuje tabulka 10.

Tabulka 9 Soubor všech sledovaných pacientů do 10 let

Rok nar.	Poh.	Cel. IgE	F1	F2	F13	F77	F92	E1	E2	I1	TP9	DP1	MP1	GP1	WP3	ECP
2001	X	46									64,6			1,49		
1999	X	75			0,39					9,71						
2003	X	34,8	0,51													
2001	Y	25									0,97	1,61		2,9		
2006	X	9,8	6					0,37								
2004	Y	12,3	0,73													
2006	Y	10,2	1,05													
2004	X	15	0,37													
2004	Y	18,5	0,42													
2004	Y	39,1	0,82													
2003	Y	19,9	0,92													
1998	Y	88,3												29	32,5	
2001	Y	42,8										1,31				
2004	Y	51,4	2,01													
2002	X	38,9									0,48					
2006	X	2,8	0,46													
2003	X	3,6							0,65							
2003	Y	19,6				0,68										
1999	X	69,2										15,2				25,3
2003	Y	44,5	0,89	0,43												
1998	X	52,6													0,48	36
2004	Y	53,1	0,85													
1997	Y	59,4											0,49			50,1
1999	X	78,2										20,6				
2006	Y	4,6	0,7				1,24									
2003	Y	26,7												5,1		
2000	X	26,5														28,8
2003	Y	39,7														43,3
2003	Y	15,6														32,8

Tabulka 10 Soubor všech dospělých pacientů

Rok nar.	Poh	Cel. IgE	F13	F14	F31	F224	T3	E1	E6	I1	I3	K82	W6	TP9	DP1	MP1	GP1	WP3	ECP	EP71	M3
1983	Y	69,4					3,6							2,7			19		22		
1966	Y	84,1					0,7							0,6			39		25		
1986	X	143													0,4				27		
1976	Y	144												> 100	37	40	> 100	10		4,7	
1966	X	62,1												15	11						
1948	Y	50					79							56							
1981	X	118												3,4	1,5		54	0,5			
1982	Y	84,8					5,7						0,4	3,3			34				
1994	Y	16,5													15						
1991	Y	105												2,9	0,8		0,8				
1993	X	107							41												
1949	Y	31																2,2			
1993	X	148													0,4	1,8	2,8				
1958	Y	28												1,6							
1964	Y	20,4					11														
1988	X	113	1,2		1,5		> 100														
1983	X	71,9															26				
1989	Y	44,5													0,8						
1986	Y	8,2															1				
1977	Y	12,6					12							6,4					26		
1985	Y	88,7				7,3															
1995	X	44,4														0,9					
1990	X	91,3													1,1						
1991	Y	44,4						1,1									26				
1980	X	53															49	3,3			
1988	X	98,2						4,2						2,2							
1963	Y	54,6												1,3					32		
1996	X	67,2							0,4												
1972	X	88,3					3,4														
1992	Y	112													16						
1945	X	101												2,8		0,6	7,4				
1993	Y	135	1,7	0,8										1,1			0,8	2,2			
1972	X	26,6						7,3											25		
1963	X	47,9						10									4,3				
1993	X	61,6										0,4		0,4				1,2			
1949	X	88,1															1,4	0,5			
1983	Y	33,9								0,8	0,7			0,4							
1956	Y	17,7																	31		
1983	X	34,1																	28		
1994	X	7																	37		
1986	X	78,1																			2,5
1951	X	15,7																	43		
1946	X	20,4																	27		
1987	X	59,1																	32		
1992	X	58,7																			10
1993	Y	96,2																	26		

Tabulka 11 Procentuální zastoupení směsí alergenů u dětí a dospělých

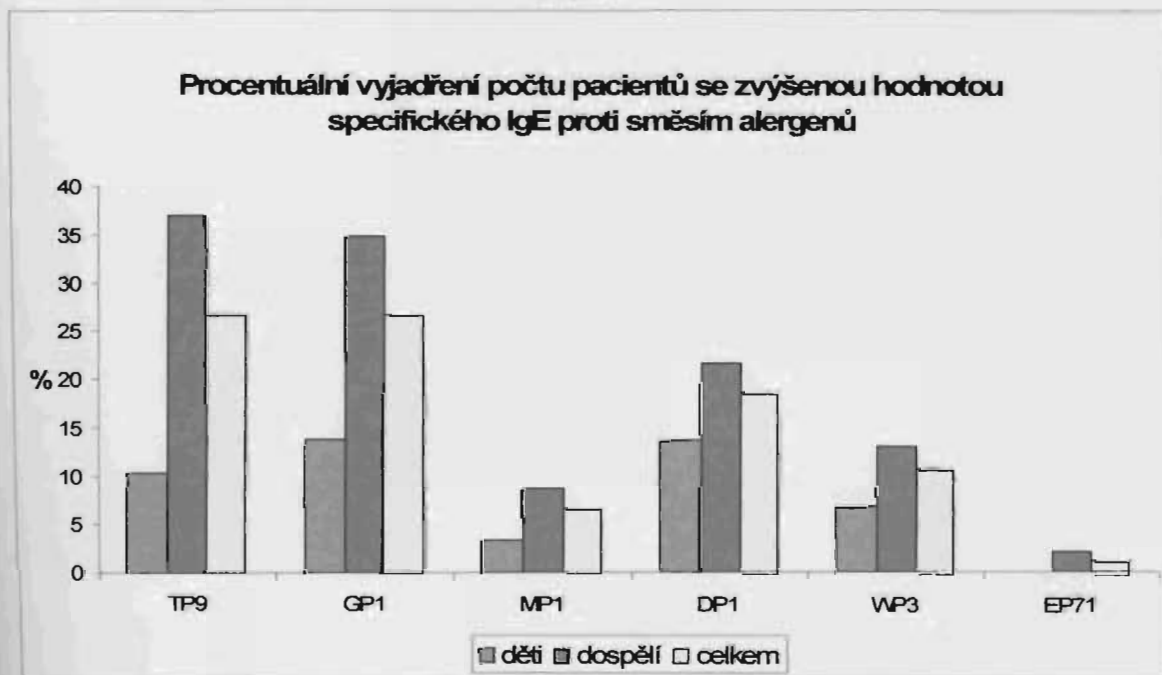
<i>Směsi</i>	<i>Děti [%]</i>	<i>Dospělí [%]</i>	<i>Celkem [%]</i>
TP9	10,3	37	26,7
GP1	13,8	34,8	26,7
MP1	3,4	8,7	6,7
DP1	13,8	21,7	18,7
WP3	6,9	13	10,7
EP71	0	2,2	1,3

Tabulka 12 Procentuální zastoupení jednotlivých alergenů u dětí a dospělých

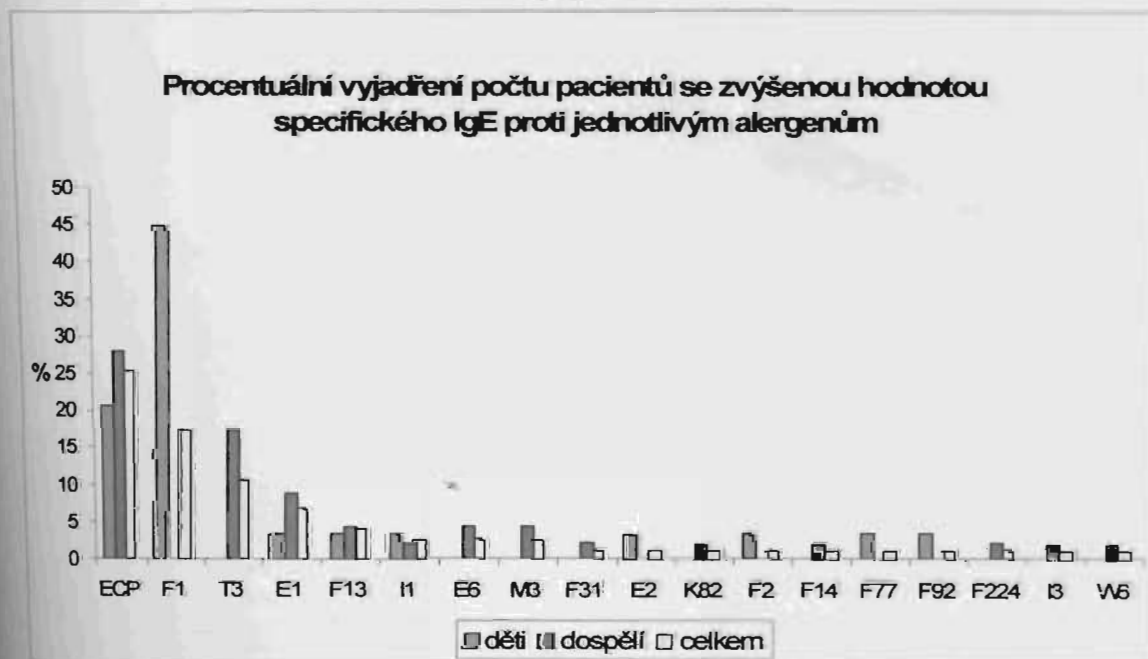
<i>Jednot. alergenů</i>	<i>Děti [%]</i>	<i>Dospělí [%]</i>	<i>Celkem [%]</i>
ECP	20,7	28	25,3
F1	44,8	0	17,3
T3	0	17,4	10,7
E1	3,4	8,7	6,7
F13	3,4	4,3	4
II	3,4	2,2	2,7
E6	0	4,3	2,7
M3	0	4,3	2,7
F31	0	2,2	1,3
E2	3,4	0	1,3
K82	0	2,2	1,3
F2	3,4	0	1,3
F14	0	2,2	1,3
F77	3,4	0	1,3
F92	3,4	0	1,3
F224	0	2,2	1,3
I3	0	2,2	1,3
W6	0	2,2	1,3

Grafické znázornění porovnání procentuálního zastoupení směsí alergenů u dětí do 10 let a ostatních popisuje graf 3, zatímco graf 4 ukazuje zastoupení jednotlivých alergenů u této skupiny pacientů.

Graf 3



Graf 4



V případě každé směsi alergenů je výskyt mezi pacienty nad 10 let vždy výraznější než u dětí do 10 let, přičemž největší rozdíl je u směsí TP9 a GP1

Nejvýznamnější rozdíly v četnosti výskytu specifického IgE proti jednotlivým alergenům jsou zřejmé F1, který je typický pro dětský věk.

4.2.3 Porovnání četnosti výskytu potravinových a inhalačních alergenů

Z celkového počtu sledovaných pacientů mělo 48 pacientů zvýšený některý z inhalačních alergenů, což odpovídá 64%. Oproti tomu zvýšenou hodnotu potravinových alergenů mělo pouze 18 osob, což je 24% z celkového počtu.

Tabulka 13 Množství pacientů se zvýšenou hladinou inhalačních a potravinových alergenů

<i>Inhalační alergeny</i>	<i>Pacienti [%]</i>	<i>Potravinové alergeny</i>	<i>Pacienti [%]</i>
TP9	30,7	F1	17,3
GP1	26,7	F2	1,3
MP1	6,6	F13	4
DP1	18,7	F14	1,3
WP3	12	F31	1,3
EP71	1,3	F77	1,3
E1	6,6	F92	1,3
E2	1,3	F224	1,3
E6	2,6		

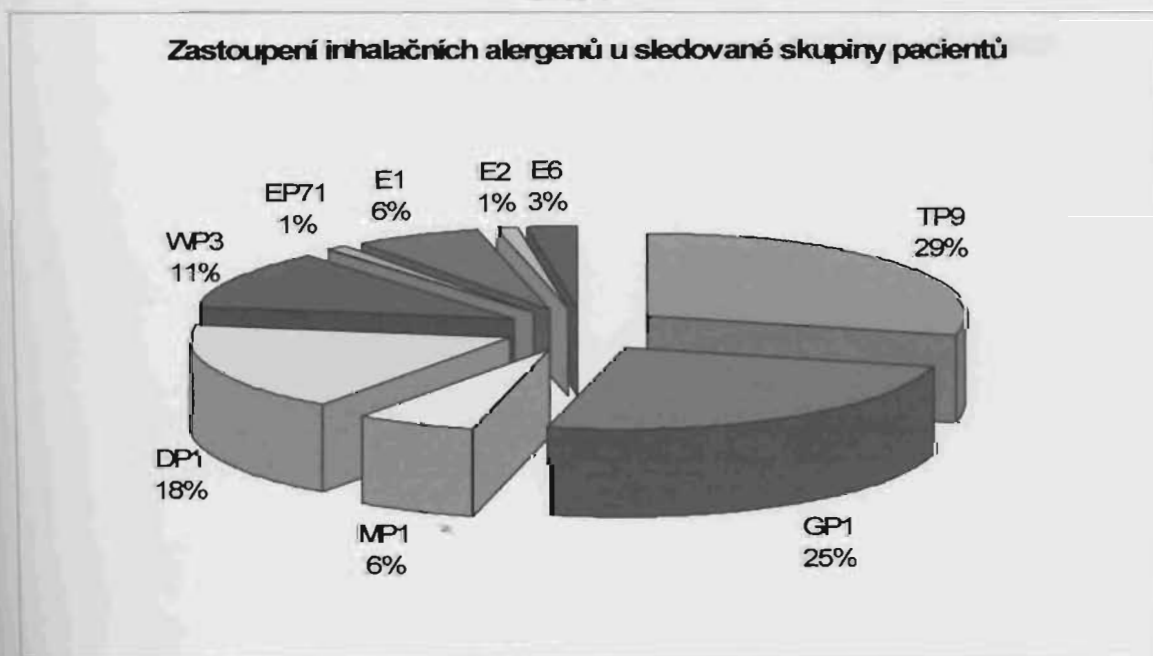
Procentuální zastoupení pacientů se zvýšenou hladinou inhalačních a potravinových alergenů znázorňuje graf 5.

Graf 5



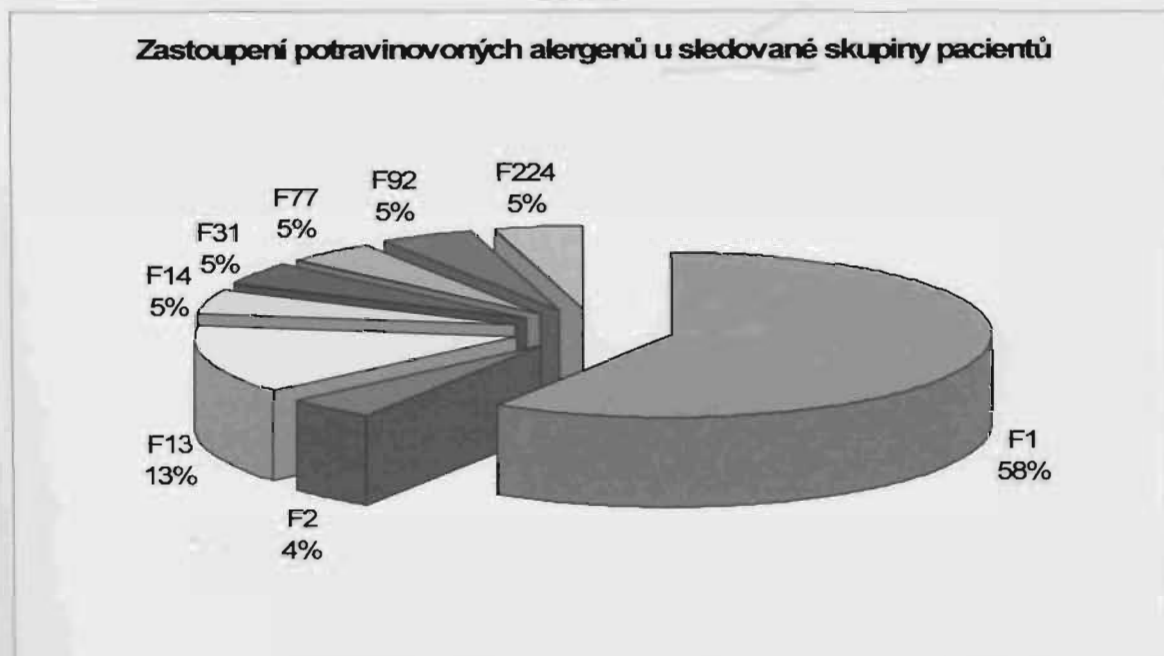
Graf 6 zobrazuje procentuální zastoupení alergenů z celkového množství naměřených inhalačních alergenů.

Graf 6



V grafu 7 je uvedeno procentuální zastoupení jednotlivých alergenů z celkového množství vyšetřovaných potravinových alergenů. Nejčetnější skupinou je F1, který je pozitivní u 58 procentech pacientů s potravinovou alergií.

Graf 7



4.3 Diskuze

Pomocí přístroje Immulite 2000, který pracuje na principu chemiluminiscence byla porovnána četnost výskytu specifického IgE proti jednotlivým směsím alergenů a jednotlivým alergenům, a to u mužů a u žen, poté také u dětí a dospělých. K dispozici byly naměřené hodnoty skupiny 75 pacientů, ve které bylo 38 mužů a 37 žen. Tato skupina pacientů splňovala dané podmínky, kterými byla normální hladina celkového IgE a současně zvýšená hladina specifického IgE.

U mužů a žen nebyly velké rozdíly v zastoupení jednotlivých směsí alergenů. Nejčetnějšími směsmi u mužů i u žen byly směsi TP9 (stromy) a GP1 (trávy), jejichž hodnoty byly v obou případech zvýšeny u 31,6% mužů a u 21,6% žen.

Nebyl pozorován výraznější rozdíl v zastoupení jednotlivých alergenů mezi pacienty obou pohlaví.

Četnost výskytu specifického IgE byla posouzena i u dětí a dospělých. Věková hranice byla určena na 10 let z důvodů stoupající hranice fyziologického rozmezí u dětí od 9 let věku. Z celkového počtu sledovaných pacientů bylo 29 dětí do věku 10 let a 46 dospělých. Za zmínku stojí, že v případě každé směsi alergenů byl výskyt mezi pacienty nad 10 let vždy výraznější než u dětí do 10 let, přičemž největší rozdíl byl u směsi TP9, který byl u dětí zvýšen v 10,3% případů a u dospělých tomu bylo v 37%, což je více než 3x častější než u dětí

V zastoupení jednotlivých alergenů u dětí a dospělých byl významný rozdíl pouze u alergenu F1, který mělo zvýšeno 44,8% dětí, což je typické pro dětský věk.

Při porovnání četnosti inhalačních a potravinových alergenů bylo zjištěno více než dvojnásobné množství pacientů s pozitivním specifickým IgE proti inhalačním alergenům oproti pacientům s reakcí na potravinové alergy. Přičemž 64% pacientů mělo zvýšeno IgE některý z inhalačních alergenů a 24% IgE na potravinové alergy.

Porovnáním výskytu jednotlivých alergenů bylo zjištěno, že průměrně 25% všech sledovaných pacientů má zvýšenou hodnotu ECP. Tím se potvrdily informace z literatury o nekorelujících hodnotách ECP a celkového IgE. Předpokládá se, že u pacientů byla vyloučena přítomnost parazita.

5 Závěr

Cílem této práce bylo porovnat četnost výskytu specifického IgE proti jednotlivým alergenům a směsím alergenů u různých skupin pacientů a srovnat četnost výskytu potravinových a inhalačních alergenů

Rozdílná četnost výskytu specifického IgE proti jednotlivým alergenům a směsím alergenů u mužů a žen nebyla prokázána.

Rozdíly mezi soubory dětských a dospělých pacientů rovněž nebyly prokázány.

Při porovnání četnosti výskytu inhalačních a potravinových alergenů u pacientů s normální hladinou celkového IgE byly z inhalačních směsí nejčastěji zastoupeny směsi stromů (29%) a trav (25%), u potravinových se jednoznačně nejčastěji vyskytoval vaječný bílek (58%)

Přes 11% pacientů z původní hodnocené skupiny nemělo zvýšenou hladinu celkového IgE. Toto číslo představuje množství pacientů, u kterých by dg. alergických onemocnění zůstala neodhalena při vyšetření samotného celkového IgE.

U těchto 11% pacientů byla nalezena zvýšená hladina ECP ve čtvrtině případů. ECP se tak jeví jako vhodný doplňující marker i při stanovení dg. alergie a aktuálního klinického stavu.

Seznam použité literatury

1. Bartůňková, J., Paulík, M., a kol.: Vyšetřovací metody v imunologii, Grada Publishing, Praha, 2005.
2. Bartůňková, J., Šedivá, A.: Imunologie minimum pro praxi, Triton, Praha, 2002.
3. Ferenčík, M., Rovenský, J., Shoenfeld, Y., Matřha, V.: Imunitní systém informace pro každého, Grada Publishing, Praha, 2005.
4. Ferenčík, M., Rovenský, J., Matřha, V.: Ilustrovaný imunologický slovník, Galén, Praha, 2004.
5. Fučíková, T.: Klinická imunologie v praxi druhé, přepracované vydání, Galén, Praha, 1997.
6. Fučíková, T., a kol.: Základy klinické imunologie, RDÍ PRESS a Agentura KRIGL, Praha, 1994.
7. Hořejší, V., Bartůňková, J.: Základy imunologie 2. vydání, Triton, Praha, 2002.
8. Kessler, S.: Laboratorní diagnostika, Scientia Medica, Praha, 1993.
9. Krejsek, J., Kopecký, O.: Klinická imunologie, Nucleus, HK, 2004.
10. Masopust, J.: Klinická biochemie požadování a hodnocení biochemických vyšetření II část, Karolinum – nakladatelství Univerzity Karlovy, Praha, 1998.
11. Prokešová, L., John, C., Fraňková, V.: Imunologické mechanismy a obrana proti infekci, Praha, 1889.
12. Stites, D.P., Terr, A.I.: Základní klinická imunologie, Victoria Publishing, Praha, 1994.
13. Špičák, V., Panzner, P.: Alergologie, Galén, Praha, 2004.
14. Šterzl, J.: Imunitní systém a jeho fyziologické funkce, Česká imunologická společnost, Praha, 1993.
15. Trojan, S., a kol.: Lékařská fyziologie, Grada Publishing, Praha, 2003.
16. Lékařské listy 5/2007
17. <http://imunologie.lf2.cuni.cz/laborator.php?str=seznam-metod>
18. <http://www.practicus.cz/2003/practicus03-03.pdf>
19. <http://www.nemstbk.cz/olm/pristroje/imul2000.htm>
20. http://www.vscht.cz/eds/knihy/uid_es-002/hesla/imunoglobuliny.html
21. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Protil%C3%A1tk>

22. <http://www.tigis.cz/alergie/aler103/05lochman.htm>
23. <http://www.tigis.cz/alergie/aler404/06.htm>
24. <http://www.tigis.cz/alergie/aler404/04.htm>
25. <http://www.tigis.cz/alergie/aler403/11.htm>
26. <http://www.tigis.cz/alergie/aler303/10.htm>
27. <http://www.tigis.cz/alergie/alergie204/07.htm>
28. http://www.tigis.cz/alergie/Alergie_04_2006/web/pdf/Setinova_web.pdf
29. http://www.tigis.cz/alergie/Alergie_04_2006/web/pdf/Prazna_web.pdf
30. http://www.pharmanews.cz/2004_06/imunita.htm
31. <http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/alergie.pdf>
32. <http://www.stripky.cz/nemoci/alergie.html>
33. <http://www.fnb.cz/oddeleni/okbi/vlastni/AlerVysetreni.htm>
34. http://kddl.lf1.cuni.cz/download/fruhauf/nestle_alergie.pdf
35. https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/47_17661.html