

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**MONITOROVÁNÍ PRŮBĚHU SUBLINGVÁLNÍ
SPECIFICKÉ ALERGENOVÉ IMUNOTERAPIE POMOCÍ
SLEDOVÁNÍ HLADIN VYBRANÝCH CYTOKINŮ**

Bc. Adéla Brzáková

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Vladimíra Řezáčová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ 2023

Poděkování

Mé poděkování patří Mgr. Vladimíře Řezáčové, Ph.D., za odborné vedení práce, cenné rady, ochotu a vstřícnost, kterou mi v průběhu zpracovávání diplomové práce věnovala. Dále bych také chtěla poděkovat prof. RNDr. Ctiradu Andryšovi, Ph.D. a MUDr. Ireně Krčmové, CSc., za spolupráci při získávání údajů pro výzkumnou část práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 1. 5. 2023

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Autor: Bc. Adéla Brzáková

Vedoucí práce: Mgr. Vladimíra Řezáčová, Ph.D.

Název práce: Monitorování průběhu sublingvální specifické alergenové imunoterapie pomocí sledování hladin vybraných cytokinů

Klíčová slova: alergenová imunoterapie, cytokiny, ELISA technika, alergie na pyly trav

Cíl práce: Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda dochází v průběhu alergenové imunoterapie k detekovatelným změnám hladin $\text{IFN}\gamma$, IL-4 a IL-5 a zda by tak tyto cytokiny mohly sloužit jako biomarkery účinnosti této léčby.

Metody: Vybrané cytokiny byly stanoveny pomocí metod Quantikine[®] HS ELISA Human $\text{IFN}\gamma$ Immunoassay, Quantikine[®] HS ELISA Human IL-4 Immunoassay a Quantikine[®] ELISA Human IL-5 Immunoassay. Sledovaný soubor se skládal ze 32 polinotiků, přičemž 19 z nich byla podávána alergenová imunoterapie a 13 z nich tvořilo kontrolní soubor. V rámci sledování také obě skupiny průběžně zaznamenávaly tíži svých symptomů pomocí vizuální analogové škály.

Výsledky: U skupiny léčených pacientů byl v průběhu léčby pozorován pokles koncentrací IL-4, IL-5 i $\text{IFN}\gamma$, avšak mezi pacienty léčenými přípravkem Oralair a kontrolními jedinci nebyly v průběhu léčby nalezeny významné rozdíly hodnot těchto cytokinů. Pomocí vizuální analogové škály byl u souboru léčených pacientů v průběhu léčby zaznamenán výrazný pokles závažnosti symptomů jejich onemocnění v porovnání s kontrolním souborem, u kterého k žádným významným změnám nedošlo.

Závěr: Přestože změny v hladinách námi sledovaných cytokinů nebyly zcela přesvědčivé, u skupiny léčených pacientů došlo v průběhu alergenové imunoterapie k výraznému zlepšení jejich stavu. Sérové hladiny cytokinů $\text{IFN}\gamma$, IL-4 a IL-5 tak dle našich výsledků nejsou ideálními biomarkery pro sledování účinnosti alergenové imunoterapie.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Author: Bc. Adéla Brzáková

Supervisor: Mgr. Vladimíra Řezáčová, Ph.D.

Title of thesis: Monitoring of sublingual allergen immunotherapy using serum cytokine levels

Keywords: allergen immunotherapy, cytokine, ELISA, grass pollen allergy

Background: The aim of this thesis was to find out whether there are detectable changes in the levels of IFN γ , IL-4 and IL-5 during allergen immunotherapy and whether these cytokines could thus serve as biomarkers of the efficiency of this treatment.

Methods: Selected cytokines were determined using Quantikine[®] HS ELISA Human IFN- γ Immunoassay, Quantikine[®] HS ELISA Human IL-4 Immunoassay and Quantikine[®] ELISA Human IL-5 Immunoassay. The monitored population consisted of 32 polinotics, 19 of which were administered allergen immunotherapy and 13 of which constituted the control group. As part of the follow-up, both groups also continuously recorded the severity of their symptoms using a visual analog scale.

Results: In the group of treated patients, a decrease in IL-4, IL-5 and IFN γ concentrations was observed during treatment, but no significant differences in the values of these cytokines were found between patients treated with Oralair and control individuals. Using a visual analog scale, a significant decrease in the severity of the symptoms of their disease was recorded in a group of treated patients during the course of treatment compared to a control group in which there were no significant changes.

Conclusions: Although the changes in levels of cytokines monitored by us were not entirely convincing, the condition of treated patients significantly improved during allergen immunotherapy. According to our results, the serum levels of cytokines IFN γ , IL-4 and IL-5 are not ideal biomarkers for monitoring the effectiveness of allergen immunotherapy.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	8
SEZNAM OBRÁZKŮ	9
SEZNAM TABULEK	10
SEZNAM ZKRATEK	11
ÚVOD.....	13
CÍL PRÁCE	14
TEORETICKÁ ČÁST	15
1 ALERGIE	15
1.1 Atopická reaktivita a alergie	16
1.1.1 Alergeny pylů trav	18
1.2 Imunopatogeneze alergického zánětu	20
1.2.1 Buňky účastníci se alergického zánětu	22
1.2.2 Specifické IgE.....	25
1.2.3 Role cytokinů během alergické reakce	27
2 ALERGICKÁ ONEMOCNĚNÍ	32
2.1 Alergická rinitida	32
2.2 Astma	33
2.3 Atopická dermatitida.....	34
2.4 Anafylaxe.....	36
3 DIAGNOSTIKA ALERGICKÝCH ONEMOCNĚNÍ	37
3.1 Diagnostika <i>in vivo</i>	37
3.1.1 Kožní testy	37
3.1.2 Provokační testy	38
3.2 Diagnostika <i>in vitro</i>	38
3.2.1 Celkové IgE	38
3.2.2 Specifické IgE.....	39
3.2.3 Test aktivace bazofilů.....	39
4 LÉČBA ALERGIÍ	41
4.1 Specifická alergenová imunoterapie	41
4.1.1 Přípravek Oralair	43
4.2 Hodnocení účinnosti alergenové imunoterapie.....	45
4.2.1 Vizuální analogová škála.....	45
PRAKTICKÁ ČÁST	48
5 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	49
6 METODIKA PRÁCE	51

6.1	Odebíraný materiál a zpracování vzorků	51
6.2	Potřebné vybavení a reagentie	51
6.3	Stanovení IFN γ	51
6.4	Stanovení IL-4	53
6.5	Stanovení IL-5	55
6.6	Vizuální analogová škála	57
6.7	Statistická analýza.....	57
7	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	59
7.1	Hodnocení změn hladin IFN γ v souvislosti s průběhem AIT.....	59
7.2	Hodnocení změn hladin IL-4 v souvislosti s průběhem AIT	61
7.3	Hodnocení změn hladin IL-5 v souvislosti s průběhem AIT	63
7.4	Hodnocení účinku AIT pomocí vizuální analogové škály.....	65
	DISKUZE	67
	ZÁVĚR.....	72
	SEZNAM LITERATURY	73

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Porovnání naměřených hodnot IFN γ u pacientů a kontrolních jedinců	59
Graf 2: Porovnání naměřených hodnot IL-4 u pacientů a kontrolních jedinců	61
Graf 3: Porovnání naměřených hodnot IL-5 u pacientů a kontrolních jedinců	63
Graf 4: Porovnání hodnot VAS u pacientů a kontrolních jedinců.....	65

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Bojínek luční (*Phleum pratense*) a jeho pylové zrno..... 19

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Cytokiny účastníci se alergické reakce	31
Tabulka 2: Symboly pro označení p-hodnot	58
Tabulka 3: Souhrnná statistika naměřených hodnot IFN γ	60
Tabulka 4: Souhrnná statistika naměřených hodnot IL-4.....	62
Tabulka 5: Souhrnná statistika naměřených hodnot IL-5.....	64
Tabulka 6: Souhrnná statistika naměřených hodnot VAS.....	66

SEZNAM ZKRATEK

AIT.....	Alergenová imunoterapie
APC.....	Antigen prezentující buňky
BAT	Test aktivace bazofilů
cDC	Konvenční dendritické buňky
DPP10.....	Z angl. Dipeptidyl Peptidase 10
EAACI.....	Evropská akademie alergologie a klinické imunologie
ELISA	Z angl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FEIA.....	Z angl. Fluorescence Enzyme Immunoassay
FOXP3	Z angl. Forkhead box P3
GINA	Z angl. Global Initiative for Asthma
GM-CSF.....	Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
IDT.....	Intradermální testy
IFN γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulin A
IgE.....	Imunoglobulin E
IgG4	Imunoglobulin G podtřídy 4
IgM.....	Imunoglobulin M
IL.....	Interleukin
IR	Index reaktivity
ITAM	Z angl. Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
LTC ₄	Leukotrien C4
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex

PAF Faktor aktivující destičky

PRR..... Z angl. Pattern Recognition Receptor

RAST Z angl. Radioallergosorbent Test

SCF Z angl. Stem Cell Factor

SCIT..... Subkutánní imunoterapie

SLIT Sublingvální imunoterapie

SPT..... Kožní prick testy

STAT6 Převodník signálu a aktivátor transkripce 6

TGF- β Transformující růstový faktor beta

TNF- α Tumor nekrotizující faktor alfa

T_{Reg}..... Regulační T lymfocyty

VAS Vizuální analogová škála

VCAM-1 Z angl. Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VEGF-A..... Vaskulární endotelový růstový faktor A

WAO..... Světová alergologická organizace

ÚVOD

Alergická onemocnění představují celosvětově významnou příčinu morbidity a značnou zátěž zdravotnického systému vyspělých i rozvojových zemí a jejich prevalence celosvětově stále stoupá. V rámci respiračních alergií je dodnes považována za jedinou kauzální léčebnou strategii alergenová imunoterapie (AIT). Mezi primární klinické ukazatele účinnosti této léčby patří skórovací systémy pro hodnocení symptomů onemocnění a případná nutnost použití záchranné medikace. Tyto ukazatele jsou ovšem zatíženy jistou mírou subjektivity, a proto je v současnosti vyvíjena snaha o nalezení biomarkerů vhodných pro kvantitativní měření, které by byly ideálními objektivními ukazateli účinnosti AIT.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda $\text{IFN}\gamma$, IL-4 a IL-5 představují vhodné parametry ke sledování účinnosti AIT. Hladina těchto cytokinů byla monitorována v čase u skupiny aktivně léčených pacientů a u souboru kontrolních jedinců, jimž byla podávána pouze symptomatická léčba. Naměřené údaje byly také porovnány s výsledky hodnocení průběhu alergenové imunoterapie pomocí vizuální analogové škály.

V teoretické části této práce jsem se nejprve věnovala alergiím, alergenům pylů trav, imunopatogenezi alergického zánětu a úloze cytokinů v průběhu alergické reakce. Druhá kapitola je zaměřena na příklady alergických onemocnění a kapitola třetí se zabývá jejich diagnostikou. Léčbě alergií, se zaměřením na specifickou alergenovou imunoterapii, je poté věnována kapitola čtvrtá.

Praktická část této práce obsahuje postupy všech použitých metod, zpracování dat, která jsme pomocí nich získali, hodnocení výsledků a shrnutí, zda námi sledované cytokiny představují vhodné biomarkery pro sledování účinnosti alergenové imunoterapie.

CÍL PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce je zjistit, zda dochází v průběhu alergenové imunoterapie k detekovatelným změnám sérových hladin $\text{IFN}\gamma$, IL-4 a IL-5 a zda by tak tyto cytokiny mohly sloužit jako biomarkery její účinnosti. Úkolem je také porovnat změny v hladinách těchto cytokinů s výsledky hodnocení průběhu alergenové imunoterapie pomocí vizuální analogové škály.

TEORETICKÁ ČÁST

1 ALERGIE

Na počátku dvacátého století přišel vídeňský pediatr Clemens Peter Freiherr von Pirquet s revoluční myšlenkou, že hlavní příznaky nemocí způsobených infekcemi, nejsou pouze výsledkem působení mikroorganismů a jejich toxinů, ale také reakcí těla proti nim. Nejpřesvědčivějším důkazem, podporujícím tuto teorii, byla podobnost mezi mnoha spontánními a experimentálními nemocemi vnějšího původu v době inkubace a manifestace onemocnění, přičemž inkubační dobou byl myšlen čas, který uplyne před vytvořením protilátek. Von Pirquet došel k závěru, že vystavení těla určité substanci vede k tvorbě protilátek, které vyvolají změnu ve specifické reaktivitě jedince na tuto látku. Jinými slovy, první kontakt imunitního systému s antigenem pozmění reaktivitu daného jedince a při druhém a každém dalším kontaktu se stejným antigenem může tato změna vyvolat široké spektrum možných odpovědí, od protektivních, které zamezují projevu symptomů, až po hypersenzitivní, které způsobují příznaky a projevy onemocnění. K pojmenování této skutečnosti použil slovo „alergie“, z řeckého *allos* (jiná, změněná) a *ergia* (energie, akce), ve smyslu „změna reaktivity nebo schopnosti reagovat“. (Igea 2013)

Vědeckou společností byla tato myšlenka zprvu těžce přijímána, protože naznačovala, že imunitní systém, o kterém do této doby panovalo přesvědčení, že má čistě protektivní funkci, může svého nositele i poškozovat. Nicméně díky narůstajícímu množství klinických důkazů v průběhu let byl tento úhel pohledu nakonec přijat. To samé se bohužel nedá říct o samotném slovu „alergie“. Původní význam tohoto neologismu brzy upadl a byl omezen k popisu stavů hypersenzitivity. Možná právě kvůli zkreslení tohoto termínu nemá dnes „alergie“ mezi zdravotníky přesně vymezený význam. Slovo se navíc už dávno nepoužívá pouze v ordinacích lékařů, ale dostalo se i mezi laickou společností, kde je s oblibou užíváno jako synonymum antipatie či odmítání, což jeho nepřesnost ještě zvyšuje. (Igea 2013)

Ve snaze o standardizaci nomenklatury pro alergologii se Evropská akademie alergologie a klinické imunologie (EAACI) zasadila o deklaraci souborného stanoviska, které bylo publikováno v roce 2001. Toto prohlášení bylo podpořeno i Světovou alergologickou organizací (WAO) a lehce revidováno o 3 roky později. V tomto stanovisku byla hypersenzitivita definována jako „objektivně reprodukovatelné projevy nebo příznaky

vyvolané expozicí definovanému podnětu v dávce, která je zdravým jedincem tolerována“. Tyto hypersenzitivní reakce byly rozděleny do dvou skupin. V případě, kdy je prokázán imunologický mechanismus, hovoříme o alergické hypersenzitivitě. V opačném případě se jedná o hypersenzitivitu nealergickou. Alergie je považována za hypersenzitivní reakci iniciovanou specifickými imunitními mechanismy. Pod termín alergie se pak řadí jak reakce zprostředkované protilátkami, tak reakce zprostředkované buňkami. I přes veškerou snahu se však dodnes často můžeme setkat s nepřesnostmi v alergologické terminologii. (Igea 2013)

1.1 Atopická reaktivita a alergie

Jak již bylo zmíněno, alergologická terminologie je poměrně problematická, a tak není s podivem, že se často můžeme setkat se záměnou, či synonymním použitím pojmů alergie a atopie. Jejich význam je však odlišný. Atopie je vrozená predispozice ke zvýšené tvorbě protilátek třídy IgE v reakci na malé množství běžně se vyskytujících alergenů. Klinickým dopadem této predispozice je zvýšený sklon k hypersenzitivním reakcím a atopický jedinec je tak vystaven většímu riziku rozvoje jednoho či více atopických onemocnění. Alergie je definována jako imunologicky mediovaná hypersenzitivita, která může vést k celé řadě onemocnění, nezávisle na mechanismu. Zjednodušeně řečeno, sama o sobě není nemocí, ale mechanismem vedoucím k onemocnění. Oba tyto termíny tedy souvisí s hypersenzitivitou a spadají mezi imunopatologické reakce. Konkrétně se jich týká především imunopatologická reakce I. typu neboli reakce s účastí protilátek IgE. K projevům této reakce dochází obvykle do 24 hodin po expozici antigenem, proto se také označuje jako reakce časná. Tento typ reakce je základem všech atopických onemocnění a mnoha alergických onemocnění. Jinými slovy, všechny atopické poruchy patří pod I. typ imunopatologické reakce. Z toho také vyplývá, že všechna atopická onemocnění jsou považována za alergie, ale velké množství alergických onemocnění nejsou atopiemi, protože mechanismus vedoucí k jejich vzniku může být i jiný, než pouze ten závislý na tvorbě protilátek třídy IgE. (Ring 2014, Justiz 2022, Fernandez 2022)

Přesná etiologie atopie není dosud zcela objasněna, avšak z mnoha provedených studií vyplývá, že jednu z klíčových rolí ve sklonu k atopii má genetický faktor. Jedna z významných oblastí obsahující geny pro predispozici k atopii se nachází na 5q (dlouhé rameno 5. chromozomu) a je asociovaná s genovým klastrem pro cytokiny, konkrétně IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, CD14, β -2 adrenergní receptor a GM-CSF (faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů). IL-4 a IL-13 stimulují izotypový přesmyk, čímž vyvolávají

produkci IgE protilátek, IL-5 podporuje růst a aktivaci eozinofilů a β -2 adrenergní receptor reguluje kontrakci hladkého svalstva průdušek. Další významná oblast se nachází na 6p, kde jsou umístěny geny pro MHC II. třídy a některé z alel regulují odpověď T lymfocytů na antigeny či alergeny z vnějšího prostředí. Na 11q můžeme nalézt geny zodpovědné za aktivaci mastocytů. Na 12q se nachází geny pro SCF (*stem cell factor*), který ovlivňuje růst a diferenciaci mastocytů a dále také geny pro IFN γ , který inhibuje syntézu IL-4 a pro transkripční faktor STAT6, který zprostředkovává transdukci signálu IL-4. Mezi další geny spojené s atopií patří ještě například geny pro α -řetězec receptoru pro IL-4, DPP10, což je protein, který reguluje aktivitu chemokinů a cytokinů nebo ADAM33, který se podílí na remodelaci dýchacích cest. (Justiz 2022)

Dle provedených studií trpí genetickou predispozicí k atopii přibližně 20–30 % světové populace, což z ní činí poměrně závažný problém zdravotnictví, který může mít negativní vliv na kvalitu života značného počtu jedinců. Atopická onemocnění zároveň patří mezi nejčastější dětská chronická onemocnění a jejich prevalence stále stoupá. Ještě na počátku 20. století byla tato onemocnění popisována jako vzácná, avšak v posledních letech jejich prevalence velmi výrazně vzrostla, a to nejen ve státech západního světa, ale i v mnoha rozvojových zemích. Vzhledem k tomu, že je velmi nepravděpodobné, aby se naše genetická výbava v posledních několika letech tak výrazně změnila, předpokládá se, že na rapidním zvýšení prevalence atopických onemocnění se musí podílet i faktory vnějšího prostředí. (Thomsen 2015)

Jednou z teorií vysvětlující působení vnějších faktorů na rozvoj atopických onemocnění je takzvaná hygienická hypotéza. Dle této hypotézy může za zvýšenou prevalenci atopických onemocnění snižující se incidence infekčních onemocnění ve světě. Původním podkladem pro tuto teorii bylo zjištění, že nejmladší sourozenci mají nižší riziko rozvoje atopických onemocnění v porovnání s jejich staršími sourozenci. Tato skutečnost byla vysvětlena tím, že mladší sourozenci jsou již od narození vystaveni větší infekční náloži díky starším sourozencům. V posledních letech jsou také stále méně časté početné rodiny. Došlo ke zvýšení domácího komfortu a zvedly se i standardy osobní hygieny, což značně zredukovalo šanci pro přenosné infekce. Další výzkumy také přinesly zjištění, že děti vyrůstající v tradičním venkovském prostředí jsou díky vystavení pestré mikroflóry (pocházející například z chovu domácích zvířat) chráněny před rozvojem alergických onemocnění. Hygienická hypotéza nachází zastání i v samotných imunologických základech atopických onemocnění, kdy infiltrace eozinofilů a nadměrná produkce IgE protilátek je

řízena Th2 diferenciací naivních T lymfocytů s produkcí cytokinů IL-4, IL-5 a IL-13, oproti Th1 diferenciaci, která je v ten moment inhibována. Mezi infekce stimulující Th1 odpověď patří například hepatitida A, tyfus nebo tuberkulóza, přičemž výskyt těchto onemocnění se v posledních letech v západních zemích snížil, což společně se zvýšeným užíváním antibiotik pravděpodobně také přispělo k vysvětlení zvýšené prevalence atopických onemocnění. (Thomsen 2015)

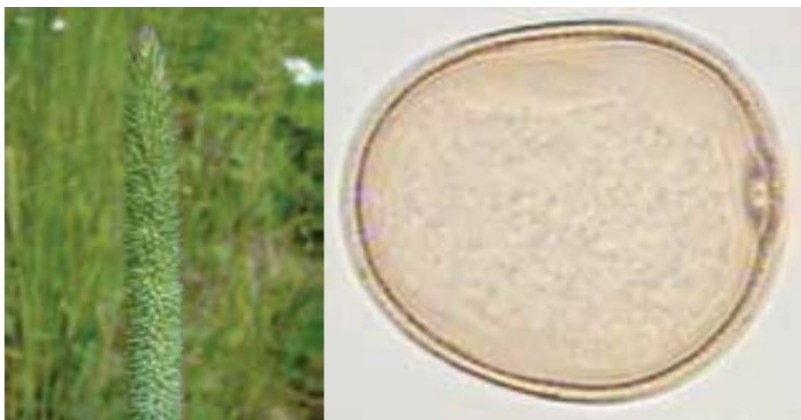
1.1.1 Alergeny pylů trav

Obecně je alergen definován jako jakýkoli antigen schopný vyvolat alergickou odpověď. Zpravidla se jedná o proteiny pocházející z vnějšího prostředí, které vyvolávají hypersenzitivitu mediovanou imunologickým mechanismem. Abychom mohli protein označit jako alergen, musí splnit základní předpoklad, kterým je schopnost vázat specifické IgE protilátky. Nicméně ne každý protein, který toto pravidlo splňuje, je zároveň schopný podnítit imunitní systém k tvorbě těchto protilátek a tím vést k primární senzibilizaci. Typickým příkladem takových alergenů jsou proteiny obsažené v ovoci, ořechách a zelenině, které zkříženě reagují se skupinou pylů břízy Bet v 1. Alergenicitu těchto proteinů pak závisí na jejich strukturální a funkční podobnosti „mateřské“ molekule Bet v 1, která způsobuje primární senzibilizaci. Z tohoto příkladu nám vyvstává otázka, co přesně určuje, zda je protein schopný způsobovat primární senzibilizaci. Odpověď na tuto otázku je ovšem složitá, endogenní proalergenní vlastnosti proteinu totiž nelze zkoumat izolovaně od jedince, který je alergenu vystaven a zároveň od kontextu expozice, který kromě načasování a dávky expozice zahrnuje také přítomnost kofaktorů, které mohou působit jako proalergenní či antialergenní adjuvans. V průběhu let bylo identifikováno několik strukturálních a funkčních vlastností, které se podílejí na alergenicitě. Jako marker alergenicity bývá často uváděna například glykosylace, nicméně pro potvrzení této teorie chybí dostatečné množství důkazů. Mnoho známých alergenů jsou proteiny schopné vázat lipidy, přičemž bylo prokázáno, že jejich lipidové ligandy a konjugované glykany interagují s PRR (*pattern recognition receptors*), jako jsou například Toll-like receptory nebo C-typ lektinů na antigen prezentujících buňkách, čímž směřují imunitní systém k Th2 odpovědi a produkci protilátek třídy IgE. Dále také bylo prokázáno, že proteázová aktivita, jakou má například cysteinová proteáza Der p 1 (alergen pocházející z roztoců), se podílí na řízení Th2 reakce. Všechny tyto vrozené vlastnosti podněcující Th2 odpověď mohou v rámci simultánní expozice přeměnit proteiny bez těchto proalergenních vlastností na alergeny. Nicméně jistotou zůstává, že neexistuje jediný společný faktor determinující alergenicitu. (van Ree 2014)

Významnou skupinu alergenů představují pyly trav. V závislosti na klimatu a geografické poloze tvoří podstatnou součást vzdušných alergenů především během období jara a léta. Trávy představují 25–30 % vegetace na Zemi a vyskytují se na všech kontinentech. V češtině se pod obecným označením „trávy“ ukrývá čeleď lipnicovité (*Poaceae*, někdy se můžeme setkat i s alternativním názvem *Gramineae*), což je čeleď jednoděložných rostlin z řádu lipnicotvaré (*Poales*). Původ této čeledi se datuje do doby před 80–100 miliony let a v dnešní době zahrnuje až 12 000 druhů, rozdělených do 771 rodů, patřících do 12 podčeledí (*Anomochlooideae*, *Aristidoideae*, *Arundinoideae*, *Bambusoideae*, *Chloridoideae*, *Danthonioideae*, *Micraioideae*, *Oryzoideae*, *Panicoideae*, *Pharoideae*, *Puelioideae* a *Pooideae*), přičemž více než 95 % druhů trav, u nichž byl prokázán vztah k alergiím, patří do podčeledí *Pooideae*, *Chloridoideae* a *Panicoideae*. *Pooideae* převládají v mírném podnebném pásu, *Chloridoideae* pokrývají oblast Severní Ameriky, Afriky a Austrálie a *Panicoideae* se nachází především v tropických a subtropických oblastech Asie, Austrálie, Afriky a Jižní Ameriky. (Kleine-Tebbe et al. 2014, García-Mozo 2017)

Většina druhů *Poaceae* jsou jednoleté rostliny s dutými stonky. Jedná se o velmi kosmopolitní skupinu, která zahrnuje významné druhy plodin, jako je pšenice, rýže či ječmen, ale i luční trávy, cukrovou třtinu nebo bambus. Všechny druhy z čeledi *Poaceae* jsou opylovány větrem. Velké množství pylu, které produkují, je uvolňováno do atmosféry a dle aktuálních zdrojů se celosvětově řadí mezi hlavní aeroalergeny. Zrna pylu trav mají sféroidní tvar a jejich průměrná velikost se pohybuje mezi 35–40 μm . (García-Mozo 2017)

Obrázek 1: Bojínek luční (*Phleum pratense*) a jeho pylové zrno



Zdroj: KLEINE-TEBBE, Jörg, DAVIES, Janet, 2014. Grass pollen allergens. In: Global Atlas of Allergy. Zürich (Switzerland): European Academy of Allergy and Clinical Immunology, s. 22-26. www.eaaci.org

K pojmenování alergenů byla zavedena speciální nomenklatura vycházející z latinských názvů jejich zdrojů. První tři písmena v názvu charakterizují rod, další písmeno v pořadí určuje druh a číslice na konci popisuje konkrétní epitop v pořadí objevení. Například tedy zdrojem alergenu Phl p 1 je *Phleum pratense* (Bojínek luční), což je rostlina pocházející z výše uvedené čeledi *Poaceae*. Alergeny pylů trav jsou rozděleny do 10 základních skupin podle jejich proteinového složení a funkce. První a pátá skupina obsahují alergeny pocházející z podčeledi *Pooideae*, které jsou díky svému hojnému výskytu a síle považovány za imunodominantní majoritní alergeny, s mírou senzibilizace vyšší než 50 %. Zatímco alergeny páté skupiny jsou omezeny pouze na podčeleď *Pooideae*, alergeny první skupiny se vyskytují ve všech podčeledích *Poaceae*. (Kleine-Tebbe et al. 2014)

Senzibilizace alergeny pylů trav, potvrzená pozitivním výsledkem kožních testů nebo nálezem specifických IgE protilátek v séru, odráží rozšíření konkrétních druhů trav v různých oblastech a zároveň podává informaci o expozici daným pylům. Alergie vyvolaná pyly trav je celosvětovým problémem, přičemž minimálně u poloviny senzibilizovaných jedinců dojde k rozvoji projevů alergické rinokonjunktivitidy či astmatu. (Kleine-Tebbe et al. 2014)

1.2 Imunopatogeneze alergického zánětu

Jednotlivá alergická onemocnění mohou vznikat a probíhat na bázi různých patologických mechanismů. Převážná část alergických onemocnění se odehrává na základě imunopatologické reakce I. typu, jejíž mechanismus bude v následujících odstavcích podrobněji rozebrán. Je ovšem nutné vzít v potaz, že se jedná o uměle zúžený pohled a některá onemocnění, jako je například kontaktní alergická dermatitida či hypersenzitivní pneumonie, jsou také považována za alergická onemocnění i přes to, že se nerozvíjí na základě stejného imunologického mechanismu. (Krčmová 2007, Galli et al. 2008)

Průběh alergické reakce založené na protilátkách IgE (imunopatologická reakce I. typu) můžeme rozdělit do třech základních fází. První fází je takzvaná senzibilizace, ke které dochází u predisponovaných jedinců po prvním kontaktu s alergenem. Po vniknutí do těla je alergen zpracován antigen prezentujícími buňkami (APC), rozložen na peptidy a vystaven na jejich povrchu. APC následně putují do lymfatických uzlin, kde T lymfocytům prezentují takto vystavené antigeny, což vede k přeměně naivních T lymfocytů v efektorové buňky. Charakteristickým znakem pro alergickou senzibilizaci je polarizace směrem k Th2 lymfocytům, která je podnícena působením IL-4 a vede k uvolnění cytokinů asociovaných

s Th2 odpovědí, jako je IL-4, IL-5 a IL-13. IL-4 dále také vyvolává izotypový přesmyk (*class switch*) B lymfocytů, což má za následek syntézu imunoglobulinů třídy IgE, místo původních IgM imunoglobulinů. Takto vzniklé IgE protilátky jsou uvolněny do cirkulace, kde dochází k jejich vazbě na vysokoafinitní IgE receptory (FcεRI receptory) na povrchu mastocytů a bazofilů. (von Bubnoff 2001, Pointner et al. 2020)

Pokud je senzibilizovaný jedinec, který má na povrchu mastocytů navázané specifické IgE protilátky, opětovně vystaven působení daného alergenu, dojde k přemostění (v angličtině *cross-link*) přilehlých molekul IgE pomocí bivalentního či multivalentního alergenu. Tento proces vyvolá degranulaci buňky a uvolnění zánětlivých mediátorů, které vedou k rozvoji příznaků alergického zánětu. V tomto momentě již hovoříme o takzvané časně fázi alergické reakce, která se rozvíjí v rámci několika minut po expozici alergenu. Degranulace je proces, kdy splyne membrána cytoplazmatických granul mastocytů s plazmatickou membránou, čímž dojde k uvolnění jejich obsahu z buňky. Kromě látek obsažených v granulách se v rámci degranulace uvolňují také lipidové mediátory, nově syntetizované prozánětlivě působící cytokiny (například IL-5 a TNF-α), chemokiny či růstové faktory (například VEGF-A). Uvolněné mediátory dále také zahrnují biogenní aminy (například histamin, někdy v malé míře i serotonin), serglycinové proteoglykany (například heparin či chondroitin sulfát), serinové proteázy (tryptázy, chymázy a karboxypeptidázy) a mnoho dalších enzymů. Mezi nově syntetizované produkty dále patří i mediátory vycházející z metabolické dráhy kyseliny arachidonové, jako jsou prostaglandiny, leukotrieny, tromboxan či faktor aktivující destičky (PAF). Uvolnění této rozmanité skupiny látek vede ke vzniku projevů a příznaků časně fáze alergické reakce, které se mohou lehce lišit v závislosti na místě reakce, ale nejčastěji zahrnují vazodilataci, která částečně odráží působení mediátorů na nervy v postiženém místě a způsobuje erytém kůže či spojivek, zvýšenou cévní permeabilitu, která vede k otoku tkání, kontrakce hladkého svalstva bronchů, vytvářející obstrukci proudění vzduchu, jejímž následkem je sípání a v neposlední řadě i zvýšenou sekreci hlenu, která zhoršuje obstrukci proudění vzduchu v dolních dýchacích cestách a podílí se na tvorbě rinitidy. Mediátory mohou dále také stimulovat nociceptory smyslových nervů nosní sliznice, kůže a dýchacích cest, což má za následek sternutaci (kýchání), pruritus (svědění) či kašel. (Pointner et al. 2020, Krčmová 2007, Galli et al. 2008)

V rozmezí 2–6 hodin po expozici alergenu obvykle dochází k rozvinutí pozdní fáze alergické reakce, která dosahuje vrcholu 6–9 hodin od expozice a během 1–2 dnů plně odeznívá. U některých pacientů ovšem není klinické vymezení mezi koncem časné a začátkem pozdní fáze jasně zřetelné. Pro pozdní fázi je charakteristický přísun Th2 lymfocytů, eozinofilů, bazofilů a dalších leukocytů do místa zánětu, kde následně dochází k jejich aktivaci. Dále také pokračuje produkce zánětlivých mediátorů buňkami, které byly přítomny již v časné fázi (mastocyty). Pozdní fáze alergické reakce je často doprovázena kožními projevy jako je otok, bolest, zteplání či erytém (způsobený rozšířením cév a zvýšeným prokrvením), ale i plicními projevy, mezi které patří například zúžení dýchacích cest či nadměrná sekrece hlenu. Předpokládá se, že pozdní fázi vyvolávají mediátory uvolněné z aktivovaných mastocytů během časné fáze alergické reakce nebo T lymfocyty, které rozpoznávají peptidy pocházející z alergenu, přičemž tyto lymfocyty mohou být buďto přítomny přímo v místě zánětu, nebo do něj mohou být během pozdní fáze přivolány. Není zatím však zcela objasněno, proč k rozvoji pozdní fáze nedochází u všech senzibilizovaných jedinců. (Galli et al. 2008)

Pokud je expozice alergenu kontinuální či opakovaná, zánět přetrvává a v postižených tkáních pacienta můžeme nalézt velké množství buněk jak vrozené, tak adaptivní imunity. Tento perzistentní zánět je často doprovázen změnami strukturálních buněk (jako jsou endotelové buňky, buňky epitelu a fibroblasty) v místech zasažených zánětem a v mnoha případech vede ke značně pozměněné funkci postižených orgánů. Kvůli obtížnému zkoumání tohoto typu zánětu není však stále zcela objasněno, jakým způsobem dochází po perzistentní či mnohonásobné expozici alergenu, k přechodu z časné a pozdní fáze alergické reakce do chronicity. (Galli et al. 2008)

1.2.1 Buňky účastnící se alergického zánětu

Specifická imunitní odpověď (označovaná také jako adaptivní nebo získaná) na alergen zahrnuje jak humorální (produkce IgE protilátek B lymfocyty), tak buněčnou složku. Aby mohlo dojít k jejímu rozvoji, musí nejprve alergen proniknout tělními bariérami (kůží či slizniční membránou) a setkat se s imunitními buňkami, které cirkulují lymfatickými uzlinami. Jako jedny z prvních přichází do kontaktu s alergenem na povrchu sliznic dendritické buňky. Klasické dendritické buňky (označovány též jako konvenční) představují prototyp antigen prezentujících buněk. Regulují typ, dobu trvání a rozsah imunitní odpovědi. Vyskytují se na bazolaterální straně epitelálních buněk kůže, plic a střev, kde zpracovávají antigeny pocházející z lumen, pomocí prodlužování svých dendritů napříč epitelální

bariérou. Poté co antigen takto převezmou, putují s ním do lymfatických uzlin, kde ho prezentují naivním T lymfocytům, což následně vede k jejich klonální expanzi a diferenciaci na T lymfocyty specifické pro daný antigen. V závislosti na prostředí, ve kterém se dendritické buňky vyskytují a na povaze antigenu, je poté vyvolána tolerogenní či imunogenní odpověď. Záchyt a následné zpracování alergenu dendritickými buňkami je považováno za jeden ze stěžejních kroků vyvolání Th2 odpovědi. Konvenční dendritické buňky lze podle jejich funkční specializace rozdělit do několika podtříd, přičemž základními skupinami jsou cDC1 a cDC2. První podtyp (cDC1) se specializuje především na zkříženou prezentaci, při které dochází k vazbě exogenního antigenu na MHC I. třídy, čímž může dojít k aktivaci CD8⁺ T lymfocytů. Na druhé straně cDC2 prezentují antigeny především MHC II. třídy, čímž dochází k aktivaci CD4⁺ T lymfocytů. (Lambrecht 2014, Iwanowycz et al. 2021)

Dalšími významnými buňkami, které se účastní alergické reakce jsou mastocyty (také označované jako žírné buňky či heparinocyty). Mastocyty lze nalézt prakticky ve všech tkáních, často v blízkosti epiteliálních povrchů (kůže, respirační systém, gastrointestinální trakt), cév, nervů, buněk hladkého svalstva či fibroblastů. Prekurzory mastocytů vznikají v kostní dřeni, cirkulují krevním řečištěm a usazují se ve tkáních, kde dokončují svou maturaci. V jejich cytoplazmě se nachází granula obsahující velké množství zánětlivých mediátorů, které jsou z buňky uvolňovány během degranulace. K degranulaci dochází z pravidla po aktivaci mastocytu a mezi významné mediátory uvolněné během tohoto procesu patří například histamin, heparin a proteázy. Mastocyty dále také uvolňují množství nově syntetizovaných mediátorů, jako jsou leukotrieny, prostaglandiny, cytokiny, chemokiny a růstové faktory. Na svém povrchu mají velké množství vysokoafinitních receptorů (FcεRI), které silně poutají Fc část IgE protilátek. Přemostění sousedních molekul IgE alergenem má za následek agregaci FcεRI receptorů s navázanými IgE, čímž dochází k aktivaci buňky a uvolnění mediátorů. Pokud dojde k rapidní aktivaci velkého množství mastocytů prostřednictvím systémové distribuce alergenu u jedinců, kteří mají již vytvořené specifické IgE vůči tomuto alergenu, může v rámci několika minut nastat život ohrožující stav, jímž je anafylaxe. Kromě pacientů s alergickým onemocněním můžeme zvýšené množství mastocytů nalézt také u jedinců s parazitárními infekcemi. (Galli 2014)

Podstatnou roli během alergické reakce mají také bazofily. Bazofily tvoří méně než 1 % leukocytů periferní krve a ze všech granulocytů jsou početně nejméně zastoupené. Svým charakterem připomínají žírné buňky. Jako ony ve své cytoplazmě obsahují granula, na svém

povrchu exprimují FcεRI receptor a v reakci na různé podněty mohou uvolňovat chemické mediátory. Na rozdíl od mastocytů však cirkulují v krvi a pouze zřídka se nachází v periferních tkáních. Dalším rozdílem je jejich životnost. Zatímco biologický poločas bazofilů se pohybuje okolo 2 dnů, mastocyty jsou schopné v periferních tkáních přežít měsíce. Mezi hlavní mediátory uvolňované z bazofilů patří preformovaný histamin, nově syntetizovaný leukotrien C₄ a Th2 cytokiny (IL-4 a IL-13), přičemž všechny z těchto látek se podílí na průběhu alergické reakce. Bylo také prokázáno, že bazofily infiltrují postižené tkáně během alergických onemocnění jako je alergická rinitida, chronická urticarie, atopická dermatitida či astma. (Karasuyama 2014)

Charakteristické pro alergickou odpověď jsou dále také eozinofily. Eozinofily jsou buňky schopné regulovat mechanismy jak vrozené, tak získané imunity. Řadí se mezi granulocyty a ve svých granulech obsahují biologicky aktivní molekuly, včetně cytotoxických proteinů, lipidových mediátorů, chemotaktických peptidů a cytokinů. Vznikají v kostní dřeni působením IL-3, IL-5 a GM-CSF. Následně jsou uvolněny do periferní krve a usazují se zejména v hematopoetických a lymfatických orgánech jako je kostní dřeň, slezina, lymfatické uzliny nebo thymus. Počet eozinofilů může stoupnout během různých zánětlivých reakcí včetně těch alergických. V rámci alergických onemocnění je eozinofilie z velké části způsobena IL-5, který je produkován T lymfocyty. Provedené studie ukázaly, že počet eozinofilů v krvi a v jimi infiltrovaných tkáních často koreluje se stupněm závažnosti onemocnění, což poukazuje na jejich možný význam v patogenezi alergických onemocnění. Z toho důvodu se v rámci terapie alergií často volí metody, které jejich počet redukuje. Eozinofily jsou také významným zdrojem lipidových mediátorů, jako je leukotrien C₄ nebo faktor aktivující destičky, které mohou způsobovat bronchokonstrikci. Dále také produkují cytokiny umocňující Th2 imunitní odpověď. (Simon 2014)

Klíčovým okamžikem pro rozvoj alergické reakce je vznik alergen-specifických CD4⁺ T lymfocytů. Pro alergická onemocnění je podstatný především jejich 2. podtyp, jímž jsou Th2 lymfocyty. Ty regulují imunitní odpověď pomocí sekrece cytokinů, především IL-4, IL-5, IL-10 a IL-13. Tyto cytokiny svým účinkem zprostředkovávají mnoho regulačních a efektorových funkcí, například vyvolávají tvorbu specifických IgE protilátek B lymfocyty, ovlivňují vývoj eozinofilů, dále také přispívají například k tvorbě hlenu a ke vzniku kontrakcí hladkého svalstva. (Akdis et al. 2005)

Nelze také opomenout významný podtyp T lymfocytů, jímž jsou regulační T lymfocyty (T_{Reg}). Jak už z jejich názvu vyplývá, jsou klíčovými regulátory imunologických procesů periferní tolerance alergenů. V experimentálních modelech bylo prokázáno, že oba přirozeně se vyskytující typy ($CD4^+ CD25^+ T_{Reg}$ a alergen-specifické T_{R1} lymfocyty produkující IL-10) inhibují alergen-specifické efektorové buňky. Odpověď alergen-specifických T_{Reg} lymfocytů se podílí na kontrole alergického zánětu. Předpokládá se, že směrování alergen-specifických efektorových T lymfocytů směrem k fenotypu T_{Reg} lymfocytů, je klíčovým bodem pro rozvoj zdravé imunitní odpovědi na alergeny a pro úspěšný výsledek specifické alergenové imunoterapie. Zvýšené hladiny IL-10 a TGF- β , které jsou produkovány T_{Reg} , mohou výrazně potlačit produkci IgE a současně zvýšit produkci nezářlivých imunoglobulinových izotypů, jako jsou IgG4 a IgA. Dále také mají schopnost přímo či nepřímo potlačovat efektorové buňky alergického zánětu, například mastocyty, bazofily a eozinofily. Modulace funkcí T_{Reg} by tak mohla poskytovat inovativní strategii v prevenci a léčbě alergických onemocnění. (Woodfolk 2006, Zhang et al. 2014)

Pro B lymfocyty je během alergické reakce typická především tvorba IgE protilátek, kterou vyvolává působení IL-4. Nicméně v posledních letech se poměrně velké množství studií zabývá jejich schopností tlumit zánět prostřednictvím různých mechanismů. Podtypy regulačních B lymfocytů, produkující IL-10, byly popsány jako silné supresorové buňky schopné potlačit zánětlivou odpověď jak *in vitro*, tak *in vivo*, prostřednictvím diferenciaci regulačních T lymfocytů nebo přímou inhibicí zánětu mediovaného T lymfocyty. Navození tolerance alergenu skrze specifickou imunoterapii vyvolá specifickou expanzi těchto buněk. Nicméně, regulační funkce plněné B lymfocyty nejsou závislé pouze na IL-10. Dalšími regulačními mechanismy B lymfocytů je například produkce TGF- β , podněcování apoptózy T lymfocytů pomocí Fas – Fas ligandu nebo granzymu B a dále také jejich kapacita produkovat inhibiční IgG4 a sialylované IgG schopné zprostředkovat protizánětlivé mechanismy. Tato zjištění poukazují na skutečnost, že regulační B lymfocyty jsou zajímavým cílem rozvoje nových terapeutických strategií k navození alergenové tolerance. (Braza et al. 2014)

1.2.2 Specifické IgE

Imunoglobulin E (IgE) tvoří jednu z pěti základních tříd protilátek (IgM, IgG, IgA a IgD). Jeho koncentrace v séru je ze všech tříd nejnižší a zároveň má také nejkratší poločas rozpadu (přibližně 2 dny). IgE nemá schopnost procházet placentou a za fyziologických podmínek je jeho koncentrace v pupečnickové krvi nízká (<4,8 mg/L). Během dětství se pak

jeho hladina v krvi postupně zvyšuje, kolem 10–15 let dosahuje vrcholu a v průběhu dospělosti opět klesá. Celková hladina IgE je dále také ovlivněna genetickou výbavou, rasou, stavem imunitního systému a environmentálními faktory (jako je například expozice pylu). Imunoglobuliny E mají největší význam během atopických stavů, kdy přispívají k vyvolání časně imunopatologické reakce. Dále se také podílí na imunitní odpovědi na parazitární infekce. (Stone et al. 2010, Hostoffer et al. 2022)

Aby mohlo dojít k syntéze specifických IgE protilátek, musí být nejprve specifický alergen převzat dendritickou buňkou, B lymfocylem, či jinou antigen prezentující buňkou, která v přítomnosti IL-4 nebo IL-13 prezentuje zpracovaný antigen naivním T lymfocytům, které se díky cytokinovému prostředí mění na podtyp Th2. Th2 následně zapojují B lymfocyty skrze MHC II. třídy a kostimulační molekuly, dochází k sekreci IL-4 a IL-13, čímž dojde u B lymfocytů k vyvolání izotypového přesmyku. V (*variable*), D (*diverse*) a J (*joining*) oblastí, které byly zprvu napojeny na konstantní (C) oblast v lokusu pro těžký řetězec imunoglobulinu (například C μ nebo C γ), se místo toho napojí na C ϵ . (Galli et al. 2012)

Část IgE můžeme nalézt v plazmě, ale převážná většina se vyskytuje ve tkáních, kde jsou molekuly IgE pevně navázány na efektorové buňky jako jsou mastocyty a bazofily, prostřednictvím vysokoafinitních IgE Fc receptorů (Fc ϵ RI) a nízkoafinitních IgE receptorů (Fc ϵ RII), které vážou Fc doménu molekuly IgE. Díky těmto receptorům je umožněna imunitní odpověď zprostředkovaná protilátkami IgE. Struktura Fc ϵ RI je exprimována různými způsoby v závislosti na typu efektorové buňky, na které se nachází. Například na mastocytech a bazofilech se nachází ve formě $\alpha\beta\gamma_2$ tetramerů, zatímco na dendritických a Langerhansových buňkách se nachází v izoformě trimerů $\alpha\gamma_2$. Fc ϵ RI působí jako aktivátor různých signálních komplexů jako jsou kinázy rodiny Src, mezi které patří například Fyn, Lyn, Zap70 a Syk, které jsou nezbytné pro správnou funkci receptoru a následnou aktivaci dalších molekul. Po přemostění Fc ϵ RI antigenem dojde na jejich γ řetězci k fosforylaci ITAMs (z anglického *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*). Tato tyrosinová fosforylace receptoru, zprostředkována kinázou Lyn z rodiny Src, je počátečním krokem spouštějícím stimulaci mastocytů a bazofilů antigenem. Po fosforylaci váží ITAMs Syk kinázu, což je nerekceptorická tyrosinkináza se dvěma Src Homologie 2 (SH2) doménami. Po navázání na aktivované ITAMs je Syk fosforylována pomocí Lyn, což jí umožní vzájemně transfosforylovat další Syk kinázy a jiné cílové molekuly. Syk má také klíčovou

úlohu v rozvoji následného signalizačního procesu IgE a jakékoli narušení její aktivity nebo exprese vede ke zdatelné funkční poruše mastocytů. (Hostoffer et al. 2022)

1.2.3 Role cytokinů během alergické reakce

Cytokiny jsou malé signální proteiny s růstovými, diferenciacními a aktivačními funkcemi, které regulují a determinují povahu imunitní odpovědi. Označení „cytokiny“ je pouze obecným pojmem, který zahrnuje řadu podskupin jako jsou například lymfokiny (druh cytokinů tvořený lymfocyty), monokiny (druh cytokinů produkovaný monocyty a makrofágy), chemokiny (cytokiny s chemotaktickými schopnostmi) nebo interleukiny (cytokiny podílející se na regulaci imunitních dějů). Jaké cytokiny jsou produkovány v reakci na imunitní podnět, determinuje, zda dojde k rozvoji imunitní reakce a také zda bude tato reakce cytotoxická, humorální, buněčně zprostředkovaná, alergická nebo tolerogenní. Zásadní význam v řízení a zesílení alergické reakce mají především cytokiny odvozené od Th2 lymfocytů, mezi které se řadí IL-4, IL-5, IL-9 a IL-13. (Adkinson et al. 2009)

Základní funkcí interleukinu 4 (IL-4) v rozvoji alergického zánětu je směřovat diferenciaci naivních Th0 lymfocytů k Th2 lymfocytům, které následně produkují IL-4, IL-5, IL-9 a IL-13. Kromě Th lymfocytů je IL-4 uvolňován také bazofily, NKT buňkami, eozinofily a mastocyty. U eozinofilů a bazofilů se IL-4 vyskytuje jako preformovaný peptid v cytoplazmatickém granulu, který je během alergické reakce z buňky rychle uvolňován. IL-4 stimuluje expresi molekul MHC II. třídy, CD80/CD86 (membránové proteiny exprimované na APC), CD40 (receptor na povrchu APC) a také nízkoafinitního IgE receptoru (CD23, FcεRII) B lymfocyty, čímž podporuje schopnost B lymfocytů prezentovat antigen. Dalším významným účinkem IL-4 je vyvolání izotypového přesmyku z izotypu IgM na IgE a následné zvýšení sekrece těchto protilátek (za spoluúčasti IL-2, IL-5, IL-6 a IL-9). Kromě účinků na B lymfocyty má IL-4 také podstatný vliv na růst, diferenciaci a životnost T lymfocytů. Jak již bylo dříve zmíněno, směřuje počáteční diferenciaci Th0 lymfocytů k jejich Th2 podtypu. Kromě toho také zabraňuje jejich apoptóze, čímž se podílí na udržení alergické imunitní odpovědi. Další důležitou funkcí IL-4 během alergické reakce je jeho schopnost vyvolat expresi VCAM-1 na endoteliálních buňkách, což způsobuje zvýšenou přilnavost endotelu pro T lymfocyty, eozinofily, bazofily a monocyty. Významným účinkem IL-4 v rámci alergické reakce je také jeho schopnost vyvolat expresi LTC₄ syntázy na mastocytech, čímž je určena schopnost mastocytu produkovat cysteinylové leukotrieny. IL-4 také stimuluje produkci mucinu, čímž přispívá

k nadměrné tvorbě hlenu v dýchacích cestách. IL-4 byl nalezen v séru, bronchoalveolární laváži a plicní tkáni pacientů s astmatem a v nosní sliznici pacientů s alergickou rinitidou. (Adkinson et al. 2009)

Interleukin 13 (IL-13) je svou funkcí homologní k IL-4 a sdílí s ním většinu biologické aktivity, přičemž se především jedná o účinky na mononukleární fagocyty, endotelové a epiteliální buňky a B lymfocyty. Z toho lze odvodit, že IL-13 se stejně jako IL-4 podílí na vyvolání izotypového přesmyku ve prospěch IgE a na expresi VCAM-1. Receptory pro IL-13 jsou heterodimery obsahující řetězec IL-4R α a IL-13R α . IL-13R α řetězce zahrnují aktivní formu receptoru IL-13R α 1 a takzvaný „návnadový“ receptor (v angličtině *decoy receptor*) IL-13R α 2, kterému chybí motiv potřebný pro iniciaci intracelulárních signalizačních kaskád. IL-13R α 1 nalezneme na endotelových buňkách, B lymfocytech, mononukleárních fagocytech a bazofilech, ale například na mastocytech či T lymfocytech k jeho expresi nedochází, což poukazuje na omezení jeho exprese v porovnání s receptory pro IL-4. Tato limitovaná distribuce IL-13R α 1 pomáhá objasnit jedinečnou schopnost IL-4 vyvolat diferenciaci Th2 lymfocytů a aktivaci mastocytů. Nicméně IL-13 je oproti IL-4 produkován ve větším rozsahu a také se snadněji identifikuje ve tkáních postižených alergickým zánětem. Studie na myších prokázaly, že úloha IL-13 také spočívá v tvorbě hlenové hypersekrece a ve vzniku nepřiměřené odpovědi dýchacích cest na různé podněty. (Adkinson et al. 2009)

Interleukin 9 (IL-9) byl původně označován jako růstový faktor mastocytů. Svým účinkem přispívá k alergické odpovědi zprostředkované mastocyty díky své schopnosti stimulovat produkci mastocytových proteáz. Dále také podporuje růst a přežívání antigen specifických T lymfocytů a zvyšuje jejich expresi vysokoafinitního IgE receptoru. Zdrojem IL-9 jsou především eozinofily a Th2 lymfocyty. Mezi jeho jiné podstatné aktivity v rámci alergické reakce patří například vyvolání exprese CCL11 (eotaxin-1, eozinofilní chemotaktický protein), IL-5 receptorů a chemokinového receptoru 4. Dále také spolupracuje s IL-4 na zvýšení syntézy IgE protilátek a s IL-5 se společně podílí na zvýšení produkce eozinofilů. (Adkinson et al. 2009)

Mezi klíčové cytokiny podílející se na regulaci syntézy IgE patří také interferon γ (IFN γ). Díky své schopnosti inhibovat izotypový přesmyk směrem k IgE a potlačovat expresi Fc ϵ R2 zprostředkovanou IL-4, je považován za inhibitor alergické reakce. IFN γ je obecně považován za jeden z hlavních regulačních prvků v poškozujícím i obranném zánětu.

Jeho přítomnost v dostatečné míře je nezbytná pro vyzrávání Th0 lymfocytů do Th1 subsetu. Takto vzniklé Th1 lymfocyty se pak stávají hlavním zdrojem IFN γ v organismu. V rámci regulace tvorby IFN γ hrají významnou roli Th2 lymfocyty, které mají regulačně antagonistický účinek vůči Th1 subsetu, který tvoří IFN γ . (Adkinson et al. 2009, Krejsek 2016)

Jedním z charakteristických znaků alergických onemocnění je přítomnost zvýšeného množství aktivovaných eozinofilů, přičemž nejvýznamnějším růstovým faktorem eozinofilů je interleukin 5 (IL-5). Kromě stimulování produkce eozinofilů má IL-5 i chemotaktické účinky, aktivuje zralé eozinofily a vyvolává jejich sekreci a zvýšenou cytotoxicitu. IL-5 má také schopnost *up*-regulovat (regulace směrem ke zvýšení) odpověď na chemokiny a $\alpha_D\beta_2$ integriny na eozinofilech, čímž napomáhá jejich přilnutí k endotelovým buňkám exprimujícím VCAM-1 a zprostředkovává tak nashromáždění eozinofilů. IL-5 je schopný prodloužovat životnost eozinofilů blokováním apoptózy. Z provedených studií bylo zjištěno, že podání IL-5 lidským subjektům způsobuje slizniční eozinofilii a zvýšení bronchiální hyperreakivity. Další aktivity spojené s účinkem IL-5 zahrnují maturaci cytotoxických T lymfocytů a diferenciaci bazofilů. Kromě Th2 lymfocytů jsou zdrojem IL-5 také mastocyty, NKT buňky a pravděpodobně i samotné eozinofily. (Adkinson et al. 2009)

Vedle IL-5 stimulují aktivitu eozinofilů v rámci alergické reakce také dva významné růstové faktory, jimiž jsou interleukin 3 (IL-3) a GM-CSF. Oba mají schopnost prodloužit životnost eozinofilů a generovat aktivované eozinofily. IL-3 je důležitým faktorem, který podporuje růst prekurzorů různých hematopoetických buněk. Hlavním zdrojem IL-3 jsou T lymfocyty, ale během alergické reakce ho mohou uvolňovat také eozinofily a mastocyty. GM-CSF je podobně jako IL-3 důležitým kolonie stimulujícím faktorem, který podporuje maturaci dendritických buněk, neutrofilů a makrofágů. Společně s jinými CSF napomáhá tvorbě trombocytů a erytrocytů. GM-CSF dále také slouží jako aktivační faktor pro zralé granulocyty a mononukleární fagocytující buňky. Úloha GM-CSF během alergické reakce je odvozena od jejich sdílené schopnosti s IL-3 a IL-5 inhibovat apoptózu eozinofilů a tím prodloužit jejich přežívání v místech výskytu alergického zánětu. Obzvláště důležitým je během alergického zánětu postihujícího dýchací cesty, kdy zralé aktivované eozinofily ztratí svou expresi IL-5Rs a tím i schopnost reagovat na IL-5 a namísto toho *up*-regulují receptory pro GM-CSF. Z toho vyplývá, že za udržení životnosti a funkčnosti eozinofilů v dýchacích cestách astmatiků, není odpovědný pouze IL-5, ale i GM-CSF. (Adkinson et al. 2009)

Dalším charakteristickým znakem alergických onemocnění je zvýšený počet mastocytů, přičemž nejvýznamnějším cytokinem, který je odpovědný za zrání mastocytů a jejich proliferaci je *stem cell factor* (SCF, růstový faktor působící na úrovni kmenové buňky). SCF je zdaleka nejdůležitějším faktorem potřebným ke vzniku mastocytů z CD34+ prekurzorů. Pochází ze stromálních buněk kostní dřeně, endotelových buněk nebo fibroblastů. SCF vyvolává uvolnění histaminu z mastocytů a inkonzistentně i z bazofilů. Z provedených studií bylo vyzorováno, že lokální podání SCF je spojeno s uvolněním histaminu z mastocytů, zatímco systémové podání je asociováno s proliferací kožních mastocytů a urtikárií. (Adkinson et al. 2009)

Nově byly mezi cytokiny podílející se na průběhu alergické reakce zařazeny také interleukin 25 a interleukin 31. Interleukin 25 (IL-25, někdy také označován jako IL-17E) byl původně řazen do rodiny cytokinů IL-17, ale díky jeho jedinečnému spektru účinků mu byla věnována jeho vlastní nomenklatura. IL-25 přispívá sekreci IgE díky své schopnosti stimulovat produkci IL-4 a IL-13. Podobě jako IL-4, IL-5 a IL-9 pochází z Th2 lymfocytů. Stimuluje uvolnění IL-4, IL-5 a IL-13 z příslušných buněk, čímž se podílí na expanzi eozinofilů. IL-25 dále také zvyšuje expresi CCL5 (chemokinový ligand 5) a CCL11 (eotaxin 1, chemotaktický protein eozinofilů), což může dále přispívat k usazování eozinofilů v plicní tkáni. Interleukin 31 (IL-31) je dalším cytokinem identifikovaným na základě sekvenční homologie. Je členem cytokinové rodiny hemopoetinů, která zahrnuje i IL-3, IL-5 a GM-CSF. Primárně je exprimován na Th lymfocytech za podmínek směřujících k Th2 odpovědi. Mezi jeho účinky patří například vyvolání exprese chemokinů, které zprostředkovávají přilákání neutrofilů, monocytů a T lymfocytů. (Adkinson et al. 2009)

Přehled cytokinů účastnících se alergické reakce je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1: Cytokiny účastníci se alergické reakce

Funkce	Cytokin	Aktivita
Regulace syntézy IgE	IL-4, IL-13	vyvolání izotypového přesmyku ϵ
	IFN γ , TGF- β	inhibice produkce IL-4 a IL-13
	IL-25	zvýšení produkce IL-4 a IL-13
	IL-4, IL-19, IL-33	tvorba lymfocytů produkujících IL-4
Eozinofilie	IL-5	tvorba eozinofilů
	IL-5, IL-3, GM-CSF, IL-4, TNF- α , IFN γ	inhibice apoptózy
	IL-5, IL-3, GM-CSF, IL-1, TNF- α , IFN γ	chemotaxe, degranulace a aktivace eozinofilů
Vývoj mastocytů	SCF	růst a diferenciacie mastocytů, uvolnění histaminu
	IL-3, IL-4, IL-9, IL-10, IL-11	kofaktory pro růst mastocytů
Expres adhezních molekul	IL-1, IL-4, IL-13, TNF- α	vyvolání exprese VCAM-1
	IL-1, TNF- α , IFN γ	vyvolání exprese ICAM-1
Fibróza a remodelace dýchacích cest	IL-4, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-17, TGF- β	podpora proliferace fibroblastů a ukládání kolagenu

Zdroj: Adkinson et al. 2009 (přepřacováno)

2 ALERGICKÁ ONEMOCNĚNÍ

Alergická onemocnění představují celosvětově významnou příčinu morbidity a značnou zátěž zdravotnického systému vyspělých i rozvojových zemí. Alergická onemocnění jako je například astma, alergická rinitida, či atopická dermatitida, postihují až 30 % populace a jejich prevalence celosvětově stoupá. (Sánchez-Borges 2018)

2.1 Alergická rinitida

Jedním z nejčastějších atopických onemocnění je alergická rinitida, kterou trpí přibližně 10–30 % světové populace. Jedná se o chronické zánětlivé onemocnění postihující nosní sliznici, mezi jehož typické projevy patří rinorea (silný výtok z nosu), sternutace (kýchání), nazální pruritus (svědění) či kongesce. Dříve byla alergická rinitida rozlišována na sezónní a celoroční. Sezónní alergická rinitida, někdy také označovaná jako senná rýma, je periodicky vyvolávána venkovními alergeny, nejčastěji pyly trav, stromů a bylin, v závislosti na aktuálním ročním období a geografické poloze. Celoroční alergickou rinitidu naopak způsobuje vystavení perzistentním alergenům v domácím prostředí, jako jsou například roztoči, zvířecí srst, hmyz či plísně. Postupem času se ovšem od této klasifikace upustilo a byl vypracován nový systém dělení dle frekvence příznaků, jejich intenzity a vlivu na kvalitu života. Ta je u postižených jedinců často snížena, neboť projevy onemocnění mohou mít dopad na kvalitu spánku, schopnost učení, pracovní výkonnost a celkově na sociální fungování jedince. Od ostatních druhů rinitid, jako je například infekční, hormonální nebo nealergická profesní rinitida, se alergická rinitida liší přítomností specifických IgE protilátek a eozinofilním nazálním zánětem. Jejím podkladem je totiž, jako u všech ostatních atopických onemocnění, imunopatologická reakce I. typu. (Humlová 2010, Drazdauskaitė et al. 2021)

Významným mediátorem alergické rinitidy, který je uvolňován během degranulace mastocytů, je histamin. Uvolnění histaminu vyvolává kýchání skrze trojklaný nerv a stimulací hlenových žláz způsobuje rinoreu (silný výtok z nosu). Další mediátory, jako jsou například leukotrieny a prostaglandiny, se pak svým působením na cévy podílejí na nazální kongesci. Uvolnění cytokinů IL-4 a IL-13 z mastocytů během pozdní fáze alergické reakce následně umožní infiltraci nosní sliznice eozinofly, T lymfocyty a bazofily. Dále také svým působením vyvolávají otok sliznice, který umocní kongesci nosu. Kromě nazálních projevů se u pacientů s alergickou rinitidou může současně vyskytovat také alergická

konjunktivitida, suchý kašel, dysfunkce Eustachovy trubice či chronická sinusitida. (Akhouri et al. 2022)

Farmakologický přístup k léčbě v současné době představují především antihistaminika a intranazální kortikosteroidy, které ovšem poskytují pouze dočasnou úlevu od projevů onemocnění a u 30–60 % pacientů jejich účinek zcela selže. V takových případech, kdy je tradiční forma terapie neúspěšná, je doporučovanou možností léčby alergenová imunoterapie, což je dodnes jediná léčebná strategie, která je schopná modifikovat samotné onemocnění. (Drazdauskaitė et al. 2021)

Pacienti s alergickou rinitidou často podceňují závažnost svého stavu a nevyhledají lékařskou pomoc. Přitom adekvátní kontrola tohoto onemocnění je velmi důležitá, především kvůli jeho spojitosti s astmatem. Pro zmírnění příznaků je také zásadní, aby pacient dodržoval léčebný režim a byl řádně edukován o svém stavu a jeho možných důsledcích. (Akhouri et al. 2022)

2.2 Astma

Astma je chronické onemocnění postihující dýchací cesty. Jeho projevy se mohou u každého pacienta mírně lišit, ale mezi nejčastější příznaky patří dyspnoe (dušnost), dechová nedostatečnost, kašel, sípání, ale také panika a úzkostné stavy, které jsou s projevy tohoto onemocnění spojeny. Jedná se o velmi časté onemocnění, jehož rozsah závažnosti se může pohybovat od velmi mírného občasného sípání, po akutní život ohrožující uzavření dýchacích cest. V krajním případě může dojít až k fatální zástavě dechu. Astma se obvykle objevuje již v dětském věku a často bývá doprovázeno i dalšími projevy atopie jako je například alergická rinitida či atopická dermatitida. (Hashmi et al. 2022)

Patofyziologický proces začíná inhalací dráždivého podnětu nebo alergenu, což díky bronchiální hypersenzitivitě vede ke vzniku zánětu dýchacích cest a zvýšené produkci hlenu. Následkem je výrazné zvýšení rezistence plic, které je nejvíce zřetelné při výdechu. Obstrukce dýchacích cest je způsobena infiltrací tkáně zánětlivými buňkami, nadměrnou hlenovou sekrecí a formováním hlenové zátky a kontrakcemi hladkého svalstva. Tyto změny se po určité době mohou stát nezvratnými v důsledku zesílení bazální membrány, ukládání kolagenu a deskvamace epitelu, společně s remodelací dýchacích cest. Pokud nedojde k rychlému zásahu a korekci, může nastat stav, kdy hlenová hypersekrece brání inhalovaným lékům v dosažení sliznice a astma se tak stává obtížněji léčitelným a zánět více edematózním. (Hashmi et al. 2022)

Z epidemiologického hlediska je astma velmi rozšířeným onemocněním. V rozvinutých zemích se jeho prevalence pohybuje kolem 15–20 %, zatímco v zemích méně rozvinutých pouze okolo 2–4 %. I přes to, že postihuje všechny věkové kategorie, častěji můžeme jeho výskyt pozorovat u dětí. Uvádí se, že až 40 % dětí během svého dětství zažije minimálně jednu epizodu sípání. Dále bylo také zjištěno, že v dětství jsou astmatem více zasaženi chlapci než dívky (v poměru 2:1). Během puberty pak dochází k vyrovnání poměru a po pubertě je prevalence astmatu vyšší u žen. Až 66 % jedinců je diagnostikováno před dosažením 18 let, přičemž téměř u 50 % z nich dojde ke zmírnění závažnosti či k úplnému vymizení symptomů během časné dospělosti. (Hashmi et al. 2022)

Etiologie astmatu je komplexní a stále není zcela objasněna. Kromě genetické predispozice se na jeho rozvoji značně podílejí i faktory vnějšího prostředí. Mezi nejčastější dráždivé podněty patří například fyzická zátěž, virové infekce dýchacích cest, gastroezofageální reflux, chronická sinusitida, různé alergeny, tabákový kouř či chemické výpary, ale i psychické faktory, především stres. (Hashmi et al. 2022)

Z pohledu léčby zatím bohužel neexistuje žádný lék, který by byl schopný astma zcela vyléčit. Většině pacientů pomáhá v úlevě od symptomů inhalační terapie, která nemá téměř žádné vedlejší účinky. Nicméně u pacientů se závažnějšími formami astmatu, nebo u jedinců, kteří nejsou schopni řádně dodržovat léčbu, není astma zcela pod kontrolou. Krátký astmatický záchvat obvykle dobře reaguje na inhalaci β_2 agonistů. Při perzistentní formě astmatu se typicky používají inhalační kortikosteroidy. U těžších forem, nebo v případě kdy pacient na klasickou léčbu neodpovídá, mohou být k léčbě přidány antagonisté leukotrienů, theofylin, anti-IgE protilátky či anticholinergika. (Virchow 2013)

2.3 Atopická dermatitida

Atopická dermatitida je nejčastějším chronickým zánětlivým onemocněním kůže. Jeho etiologie je, jako u jiných atopických onemocněních, opět komplexní a zahrnuje jak genetické, tak environmentální faktory. Projevuje se obvykle již od dětství a mezi typické projevy patří velmi suchá pokožka, pruritus (svědění), ekzematózní léze a lichenifikace (zhrubění kůže). V posledních 30 letech došlo v rozvinutých zemích ke značnému nárůstu incidence tohoto onemocnění. Uvádí se, že atopickou dermatitidou trpí až 20 % dětí a 2–10 % dospělých. Stejně jako jiná atopická onemocnění, i atopická dermatitida má velký dopad na kvalitu života postižených jedinců. (Bieber 2014)

Atopická dermatitida je společně s alergickou rinokonjunktivitidou a astmatem součástí tzv. atopické triády. Jedná se o skupinu onemocnění, která mohou začínat souběžně, nebo postupně za sebou, což je označováno jako takzvaný atopický pochod (*atopic march*). Pacienti, kterých se tento stav týká, mají narušenou bariéru kůže a horních i dolních dýchacích cest, což vede k symptomatologii těchto onemocnění. (Kolb 2022)

Pacienti s atopickou dermatitidou mají porušenou kožní bariéru, která je tak náchylná k projevům xerózy a citlivá na dráždivé podněty okolního prostředí a alergeny, které mohou vést ke vzniku zánětu, pruritu a dalším typickým klinickým projevům tohoto onemocnění. Porušení kožní bariéry může být z části způsobeno sníženou hladinou ceramidů, což jsou sfingolipidy ve *stratum corneum* (rohová vrstva), která se podílí na funkci kožní bariéry a dále také zabraňuje transepidermální ztrátě vody. Porušená kožní bariéra následně umožňuje iritantům a alergenům penetrovat kůži a vyvolat tak zánět nadměrnou aktivací Th2 odpovědi (se zvýšenými cytokiny IL-4 a IL-5) v případě akutních lézí, nebo Th1 odpovědi (IFN γ a IL-12) v případě chronických lézí. Škrábání svědivé pokožky dále stimuluje keratinocyty k uvolnění dalších zánětlivých cytokinů jako je TNF α , IL-1 nebo IL-6. U více než 90 % pacientů s atopickou dermatitidou dochází ke kolonizaci postiženého místa zlatým stafylokokem (*Staphylococcus aureus*), v důsledku snížených hladin antimikrobiálních peptidů (β -defenziny a katelicidiny) v epidermis. *Staphylococcus aureus* může léze atopické dermatitidy výrazně zhoršit a v některých případech vést k sekundární infekci či impetiginizaci. (Kolb 2022)

Z genetického hlediska může u jedinců s atopickou dermatitidou docházet ke změnám, jako je například ztráta funkce genu pro filagrin. Filagrin (z anglického *filament aggregation protein*) je epidermální protein, který se rozkládá na přirozený hydratační faktor. Mutace genu pro filagrin se vyskytují až u 30 % pacientů s atopickou dermatitidou a mohou být predispozičním faktorem pro vznik ichtyózy (*ichthyosis vulgaris*), alergické rinitidy či folikulární keratózy (*keratosis pilaris*). Projevy atopické dermatitidy mohou zhoršovat i různé potravinové hypersenzitivity, přičemž 90 % z těchto reakcí bývá způsobeno vejci, mlékem, arašídy, sójou či pšenicí. Nedávné studie také indikují, že existuje spojitost mezi kouřením a rozvojem atopické dermatitidy v dospělosti. (Kolb 2022)

Hlavním cílem terapie atopické dermatitidy je dostat onemocnění dlouhodobě pod kontrolu, redukovat případná vzplanutí a předcházet bakteriálním či virovým komplikacím. Je důležité, aby se postižení jedinci vyhýbali spouštěčům zánětlivé reakce. Dále je

doporučováno dodržování speciální rutiny v péči o pokožku, která nejčastěji zahrnuje aplikaci topických steroidů a emoliencií. Topické steroidy se také používají při akutním vzplanutí nemoci. Jejich použití s sebou ovšem nese i riziko vedlejších účinků, jako je atrofie kůže nebo teleangiektázie. (Bieber 2014, Kolb 2022)

2.4 Anafylaxe

Anafylaxe je závažná, multisystémová alergická reakce, která se objevuje náhle po kontaktu s alergenem. Nejčastěji vzniká jako následek uvolnění zánětlivých mediátorů během degranulace mastocytů zprostředkované IgE protilátkami. Tyto mediátory způsobují zvýšenou cévní permeabilitu, periferní vazodilataci, zvýšenou produkci hlenu a kontrakci hladkého svalstva bronchů. Anafylaxe může být ovšem vyvolána i jinými imunologickými mechanismy nebo přímou stimulací mastocytů. Jedná se o potenciálně fatální stav s velmi rychlým nástupem. Mezi typické projevy patří urtikárie, angioedém, hypotenze a bronchospasmus. Nicméně, až 20 % anafylaktických reakcí postrádá jakékoli kožní projevy či příznaky vazomotorické nestability, a tak i přes svou závažnost může být anafylaxe často obtížně diagnostikovatelná. (Tupper 2010)

Nejčastějšími spouštěči anafylaktické reakce jsou potravinové alergeny (mléko, sója, vajíčka, ořechy a mořské plody), léky (antibiotika – penicilin, nesteroidní protizánětlivé léky, anestetika), jedy (především blanokřídlého hmyzu), intravenózní kontrastní látky a latex. Až 20 % anafylaktických reakcí však vzniká na základě neznámé etiologie, v takovém případě hovoříme o idiopatické anafylaxi. (Tupper 2010)

Primární příčinou úmrtí během anafylaktické reakce bývá poškození dýchacích cest nebo kardiovaskulární kolaps. Riziko fatálního konce hrozí především u astmatických pacientů. (Tupper 2010)

Prvním krokem při léčbě anafylaxe je odstranění podnětu, který reakci vyvolal. Lékem první volby bývá epinefrin a preferovanou cestou jeho podání je intramuskulární injekce do anterolaterální strany stehna. K intravenóznímu podání se přistupuje v případě kardiovaskulárního kolapsu, který nereaguje na intramuskulární podání. Po léčbě anafylaktického záchvatu by měl být pacient poučen a připraven na to, aby mohl případné recidivy sám zvládat. Proto je nezbytné, aby u sebe jedinci s rizikem anafylaxe neustále nosili jeden či dva epinefrinové autoinjektory a v případě známek anafylaxe si epinefrin okamžitě aplikovali. (Tupper 2010, Simons 2014)

3 DIAGNOSTIKA ALERGICKÝCH ONEMOCNĚNÍ

Jak již bylo zmíněno, prevalence alergických onemocnění celosvětově stoupá a nese s sebou značnou zátěž zdravotnického systému a negativně ovlivňuje také kvalitu života postižených jedinců. Stanovení přesné diagnózy, společně s optimální léčbou, vyžaduje použití patřičných testů k potvrzení senzibilizace alergenem a detailní informace o expozici danému alergenem. V momentě, kdy dojde ke stanovení diagnózy a jsou identifikovány příslušné alergeny, je možné zahájit specifickou terapii. (Ansotegui et al. 2020)

3.1 Diagnostika *in vivo*

Nejčastější formou *in vivo* diagnostiky alergických stavů jsou kožní testy, které v současné době představují nejspolehlivější a nákladově nejefektivnější přístup k diagnóze IgE zprostředkovaných onemocnění. (Genser et al. 2014)

3.1.1 Kožní testy

Nejrozšířenějším typem kožních testů jsou takzvané kožní prick testy (SPT, z anglického *skin prick tests*). Jedná se o velmi jednoduchou metodu, kterou lze zjistit, zda je jedinec senzibilizován IgE protilátkami. Principem tohoto testu je vnesení specifického alergenu (ve formě kapky roztoku obsahujícího daný alergen) vpichem do kůže pomocí lancety, což u alergika vede k přemostění specifických IgE navázaných na membránové receptory, čímž je vyvolána degranulace mastocytů přítomných v kůži. Nejčastěji se alergeny aplikují na volární stranu předloktí, případně na plochu zad. V rámci degranulace jsou uvolněny mediátory alergické reakce způsobující kožní projevy, pro které je charakteristický vznik zarudlých a svědivých pupenů svědčících o pozitivitě reakce. Výsledek reakce se obvykle hodnotí po uplynutí 5–20 minut. SPT poskytují s velkou přesností objektivní a spolehlivé potvrzení alergické senzibilizace. V případě indikace jsou SPT jednoduchou, biologicky relevantní, reprodukovatelnou, nákladově a časově příznivou a vysoce citlivou metodou. (Ansotegui et al. 2020, Bartůňková et al. 2011)

U pacientů s vážným klinickým podezřením na onemocnění zprostředkované IgE protilátkami, jejichž výsledek prick testu byl negativní, je navrženo provedení intradermálních testů (IDT). Intradermální testy se využívají k odhalení přecitlivělosti časného typu, zprostředkované protilátkami IgE (I. typ imunopatologické reakce), ale také k průkazu imunopatologické reakce IV. typu (oddálená přecitlivělost). V rámci IDT jsou pacientům podávány alergeny formou intradermální injekce, což v případě positivity vede ke vzniku zarudlého pupenu o průměru minimálně 5 milimetrů. Výsledek se opět hodnotí

přibližně po 20 minutách. Negativním aspektem IDT při stanovování časné přecitlivělosti je zvýšené riziko nepříznivých reakcí. Z toho důvodu je aplikace těchto testů omezena na klinické prostředí, kde je k dispozici vybavení pro promptní zásah v případě potřeby. (Ansotegui et al. 2020, Bartůňková et al. 2011)

3.1.2 Provokační testy

Pokud jsou výsledky získané pomocí kožních testů a *in vitro* stanovení specifických IgE protilátek neprůkazné, mohou se pro potvrzení diagnózy alergického onemocnění využít takzvané provokační testy. Princip těchto testů spočívá v aplikaci alergenových extraktů přímo na sliznici spojivky, bronchů či nosu, s cílem vyvolat projevy onemocnění a klinicky demonstrovat závažnost IgE mediované senzibilizace u pacientů s alergickou rinokonjunktivitidou či alergickým astmatem. Rizikem těchto testů je však potenciální systémová reakce, především v případě inhalačních alergenů. (Ansotegui et al. 2020, Braunstahl 2014)

3.2 Diagnostika *in vitro*

Cílem diagnostického procesu je identifikace příčinného alergenu odpovědného za rozvoj alergie. Od roku 1967, kdy poprvé došlo k purifikaci IgE, se sérologické testování stalo běžně užívanou metodou k hodnocení alergických onemocnění. (Ansotegui et al. 2020)

3.2.1 Celkové IgE

V průběhu let bylo mnoha studiemi potvrzeno, že celková koncentrace IgE protilátek v séru vykazuje silnou korelaci s přítomností alergických onemocnění u vyšetřovaných jedinců. Z toho důvodu je stanovení celkové hladiny IgE považováno za jedno ze základních vyšetření pro screening atopických stavů. Hodnoty celkového IgE se uvádějí ve standardizovaných mezinárodních jednotkách IU/mL. V séru dospělého člověka je za normální obvykle považována hodnota nižší než 200 IU/mL. Mezi nejčastěji využívané metody ke stanovení celkových IgE patří například ELISA, FEIA či nefelometrie. Celková hladina IgE nemůže být však považována za zcela spolehlivý marker alergického procesu, protože zvýšené hodnoty IgE můžeme nalézt také u jiných klinických stavů, jako je například alergická bronchopulmonální aspergilóza, Wiscottův – Aldrichův syndrom, hyper IgE syndrom nebo různá parazitární onemocnění. Na druhou stranu snížené či normální hodnoty nevylučují přítomnost IgE mediovaných alergických onemocnění. Z toho vyplývá, že výsledky celkové koncentrace IgE by měly být pečlivě a pozorně interpretovány a nepovažovány ihned za indikaci přítomnosti alergického onemocnění. (Ansotegui et al. 2020, Bartůňková et al. 2011)

3.2.2 Specifické IgE

In vitro stanovení specifických IgE protilátek obvykle doprovází kožní prick testy v rámci diagnostiky alergických onemocnění založených na I. typu imunopatologické reakce. Jedná se o stanovení sérových IgE, které jsou namířeny proti konkrétnímu alergenu. Výsledky těchto testů jsou klíčové pro stanovení správné diagnózy alergického onemocnění a zároveň i k indikaci správné léčby (například specifické alergenové imunoterapie), proto musí být náležitě a pečlivě interpretovány. (Lokas et al. 2017)

Jedním z prvních testů pro rutinní stanovení specifických IgE protilátek v séru byl takzvaný RAST (z anglického *radioallergosorbent*). Tento test využíval pro detekci signálu polyklonální protilátky proti lidským IgE označené radioaktivním izotopem jódu. V průběhu let došlo k rozvoji nových technologií a vznikla metoda nazývaná *Pharmacia CAP Systems* založená na technologii ImmunoCAP. ImmunoCAP je *in vitro* test založený na principu fluorescenční enzymové imunoanalýzy se speciálním polymerním nosičem. Jedná se o kvantitativní test vyvinutý z původní technologie RAST společností *Pharmacia Diagnostics*. Díky svým analytickým a klinickým výsledkům, široké možnosti použití a dostatečné stálosti v porovnání s výsledky SPT je dodnes ImmunoCAP standardní metodou volby. (Lokas et al. 2017)

Novější přístup ve stanovení specifických IgE protilátek představují multiplexové metody (označované také jako biočipové metody). Multiplexové metody umožňují simultánní stanovení specifických IgE proti většímu počtu alergenů, díky čemuž jsme schopni získat velké množství informací o senzibilizačním profilu pacienta. Další výhodou je také potřeba pouze malého množství vzorku pro provedení analýzy. Testování je založeno na principu dot blotu, přičemž jako pevná fáze slouží membrána, na jejímž povrchu jsou umístěny alergeny. Mezi nejznámější rutinně používané biočipové testy patří například ISAC (z anglického *immuno solid-phase allergen chip*) nebo ALEX (z anglického *allergy explorer*). (Jakob et al. 2015)

3.2.3 Test aktivace bazofilů

Test aktivace bazofilů (BAT) je jedním z nejčastěji používaných buněčných funkčních testů. Uplatňuje se především v případě, kdy je hodnocení pacientovy anamnézy a výsledků stanovení specifických IgE protilátek nebo kožních testů rozporuplné, nebo pokud pacientova anamnéza indikuje, že by provedení kožních testů mohlo vyvolat systémovou reakci. Určení citlivosti bazofilů se sériovým ředěním alergenu může být použito k měření inflexního bodu nebo poloviční maximální koncentrace alergenu jako

měřítka alergické odpovědi. Oproti provokačním testům je BAT lépe reprodukovatelný. Citlivost bazofilů může být použita k identifikaci různých potravinových alergenů, primárních senzibilizátorů v rámci zkříženě reagujících alergenů nebo k přípravě alergenů a monitorování průběhu alergenové imunoterapie. Aktivace bazofilů může být detekována a kvantifikována pomocí průtokové cytometrie. Pro bazofily je typický znak CD203c a aktivační znak CD63, jehož exprese vykazuje silnou korelaci s degranulací těchto buněk. (Hoffmann 2014, Ansotegui et al. 2020)

4 LÉČBA ALERGIÍ

Základem terapie alergických onemocnění je v první řadě snaha o zamezení kontaktu s daným alergenem, čehož ovšem nelze vždy dosáhnout. Obvykle bývá jednoduché vyhnout se konkrétním potravinovým alergenům či chemickým substancím. Na druhé straně je téměř nemožné se zcela vyhnout expozici pylu. Jedincům postiženým tímto typem alergie mohou být nápomocné pylové kalendáře a předpovědi, které informují o pylové situaci v konkrétních regionech. (Tomčalová 2014)

Z hlediska farmakoterapie se nejčastěji využívají přípravky, které neutralizují mediátory alergického zánětu, inhibují jejich receptory nebo potlačují aktivitu buněk účastnících se alergické imunitní odpovědi. Patří mezi ně především antihistaminika, která působí jako antagonisté histaminu na H_1 -receptorech či glukokortikoidy, které mají silné protizánětlivé a imunosupresivní účinky a představují tak velmi efektivní způsob léčby alergických onemocnění, avšak v některých případech mohou vést k závažným nepříznivým reakcím. (Tomčalová 2014, Inagaki et al. 2001)

Zajímavou možností léčby nově představuje specifická alergenová imunoterapie, jejíž princip je založen na aplikaci postupně se navyšujícího množství konkrétního alergenu, který je příčinou alergie u daného jedince, přičemž cílem je modifikace či úplné odeznění projevů onemocnění. (Tomčalová 2014)

4.1 Specifická alergenová imunoterapie

Alergenová imunoterapie (AIT) je léčebnou strategií, která má schopnost modifikovat samotné onemocnění. Proces této léčby je specifický tím, že se zaměřuje na konkrétní alergeny, které byly pacientem i lékařem identifikovány jako příčina projevů alergie. Indikována bývá nejčastěji u pacientů s alergickou rinitidou, jejichž symptomy přetrvávají i po terapii konvenčními antihistaminiky či intranazálními kortikosteroidy. Mezi další indikace se dále řadí i alergické astma, alergická konjunktivitida či rinokonjunktivitida, atopická dermatitida, potravinové alergie (mediované IgE protilátkami) nebo alergie na jed blanokřídlého hmyzu s výraznou lokální reakcí či rizikem anafylaxe. (Drazdauskaitė et al. 2020, Persaud et al. 2022)

Specifická alergenová imunoterapie se může aplikovat ve formě subkutánních injekcí (SCIT – subkutánní imunoterapie), kdy se pacientovi podávají postupně se navyšující dávky senzibilizujícího alergenu obvykle po dobu 8–12 týdnů a následně vysoké dávky

v měsíčních intervalech po dobu 3–5 let. Další možností je aplikace ve formě tablety, která obsahuje vysoké dávky alergenu a vkládá se pod jazyk, kde se nechá pozvolně rozpustit. V tomto případě hovoříme o takzvané sublingvální imunoterapii (SLIT). Obě varianty poskytují dlouhodobý klinický prospěch a imunologickou toleranci i po skončení léčby. SCIT je považována za vysoce účinný způsob navození tolerance vůči sezónním i celoročním alergenům. Ne všichni pacienti jsou ovšem vhodnými kandidáty pro SCIT. Někteří jedinci mohou například trpět averzí vůči injekčnímu způsobu aplikace. Dále je také důležité vzít v potaz, že pravidelné návštěvy lékaře pro podání léčby mohou pro pacienta představovat značnou zátěž a případně i významné nepřímé náklady (absence v zaměstnání). V neposlední řadě je také nutné přihlédnout k riziku anafylaxe, které se s touto formou terapie pojí, i přes to, že její prevalence se pohybuje pouze kolem 0,13 %. Díky těmto skutečnostem může atraktivní alternativu pro mnoho pacientů představovat právě SLIT, která je považována za bezpečnější a obecně přijatelnější možnost terapie, zejména v případě sezónní alergické rinitidy. (Drazdauskaitė et al. 2020, Dranitsaris et al. 2014, Calderón et al. 2012)

Imunologické změny probíhající během specifické alergenové imunoterapie jsou komplexní a prozatím ne zcela objasněny. Nicméně bylo zjištěno, že AIT potlačuje vývoj dendritických buněk fenotypu 2 (cDC2) a podporuje diferenciaci naivních T lymfocytů v jejich regulační podtypy (indukované regulační T lymfocyty, FOXP3⁺ regulační T lymfocyty a folikulární regulační T lymfocyty). Tyto buňky se pak podílí na potlačení Th2 imunitní odpovědi, která je spojována s rozvojem atopických stavů, s přesměrováním k Th1 imunitní odpovědi, přičemž tento děj je považován za jeden z klíčových bodů úspěšné imunoterapie. Regulační T lymfocyty dále také produkují protizánětlivý IL-10, který se podílí na snížení hladiny specifických IgE protilátek a současném zvýšení hladiny blokujících IgG4 protilátek, které s IgE soutěží o vazebné místo alergenu. Tím zabraňují přemostění vysokoafinitních receptorů na povrchu mastocytů a bazofilů, čímž inhibují jejich degranulaci a redukuje uvolnění prozánětlivých cytokinů. Bylo také zjištěno, že specifická alergenová imunoterapie snižuje přísun mastocytů, bazofilů a eozinofilů do místa alergenové výzvy, jímž může být kůže, sliznice nosu, spojivka či bronchů. (Drazdauskaitė et al. 2020, Persaud et al. 2022, Moote et al. 2018)

Aplikování alergenové imunoterapie je nutné provádět s velkou opatrností, neboť pacientovi podáváme působek, o kterém víme, že vyvolává alergickou reakci. Komplikace imunoterapie mohou zahrnovat systémové reakce jako je anafylaxe, rozsáhlé kožní reakce

či lokální reakce v místě vpichu. U SCIT se také velmi vzácně mohou vyskytnout i fatální reakce, přičemž jedním z největších rizikových faktorů je nekontrolované či nestabilní astma. Dalším rizikovým faktorem je neúmyslné intramuskulární podání injekce, které může způsobit zvýšené riziko systémové reakce kvůli rapidní absorpci alergenu. Nežádoucí reakce u SLIT jsou většinou pouze lokálního charakteru, rychle odeznívají a obvykle nevedou k přerušení či ukončení léčby. Před rozhodnutím o aplikaci specifické alergenové imunoterapie musí být pacientův stav pečlivě posouzen, především co se týká spouštěcích alergenů. Vzhledem k tomu, že je léčba časově a často i finančně náročná, je důležité také posoudit rizika a náklady v porovnání se symptomatickou terapií antihistaminiky a kortikosteroidy. Kvůli možným komplikacím, musí být pacienti obeznámeni jak s benefity, tak i riziky léčby. (Persaud et al. 2022, Frew 2010)

4.1.1 Přípravek Oralair

Oralair je přípravek ve formě sublingvální tablety, který se používá k léčbě alergické rinitidy vyvolané pyly trav u jedinců s klinicky relevantními projevy a pozitivním výsledkem kožních testů nebo nálezem IgE protilátek specifických pro pyly trav *in vitro*. Terapie přípravkem Oralair se skládá z léčby úvodní (zahrnuje fázi navyšování dávky po dobu 3 dnů), která trvá přibližně měsíc, a udržovací léčby, která následuje od druhého měsíce podávání přípravku. Ideální je léčbu zahájit 4 měsíce před začátkem pylové sezóny a následně v ní pokračovat až do jejího konce. V případě, že během první pylové sezóny nedojde k významnému zlepšení symptomů, obvykle se v léčbě nepokračuje. (příbalová informace přípravku Oralair)

Přípravek Oralair obsahuje alergenové extrakty pylů pěti hlavních druhů trav z podčeledi Pooideae, které jsou často odpovědné za projevy alergické rinitidy u jedinců s alergií na pyly trav. Těmito hlavními druhy jsou Bojínek luční (*Phleum pratense*), Tomka vonná (*Anthoxanthum odoratum*), Srha laločnatá (*Dactylis glomerata*), Jílek vytrvalý (*Lolium perenne*) a Lipnice luční (*Poa pratensis*). Pylové alergeny z těchto rostlin jsou inkorporovány v lisované tabletě ve formě purifikovaných lyofilizovaných extraktů a obsahují hlavní alergeny z těchto druhů rostlin, především významnou skupinu 1 pylových alergenů (Phl p 1, Ant o 1, Dac g 1, Lol p 1 a Poa p 1) a dále také neméně důležitou skupinu 5. Zahrnuty jsou ale i některé méně významné alergeny. Použití alergenových extraktů z těchto pěti různých druhů trav poskytuje široké pokrytí napříč různými geografickými oblastmi, kde se expozice pacientů a senzibilizace alergeny specifických druhů trav může lišit. (Klimek et al. 2022)

Dávkování přípravku Oralair je určováno na základě indexu reaktivity (IR), což je jednotka definovaná jako míra alergenní účinnosti extraktu alergenů. Alergenový extrakt obsahuje 100 IR/mL, pokud provedení kožního prick testu vedlo k tvorbě pupene o průměru 7 mm u 30 jedinců senzibilizovaných vůči tomuto alergenů. (Klimek et al. 2022, příbalová informace přípravku Oralair)

Lyofilizované alergenové extrakty jsou doplněny inaktivními přísadami, jimiž jsou mannitol, mikrokrytalická celulóza, sodná sůl kroskarmelosy, koloidní bezvodý oxid křemičitý, magnezium-stearát a monohydrát laktózy k vytvoření finální lisované tablety. Toto finální složení bylo navrženo k dosažení trvalého uvolňování alergenů napříč sublingvální sliznicí po dobu 2–3 minut, kdy >90 % celkové alergenní aktivity je uvolněno v rámci 2 minut. Maximální alergenová absorpce vyžaduje 5 minut, přičemž dřívější spolknutí tablety může redukovat příjem alergenů slizničními APC. Po spolknutí polypeptidový/peptidový alergenový extrakt podléhá proteolytické degradaci v gastrointestinálním traktu bez významné systémové expozice. (Klimek et al. 2022)

Cílem léčby přípravkem Oralair je indukovat odpověď imunitního systému pacienta na alergen, jímž má být léčen. Přesný mechanismus působení však zatím není zcela znám a dokumentován. Obecně účinek AIT spočívá ve vyvolání imunitní tolerance na senzibilizující alergen skrze řadu mechanismů. Bylo zjištěno, že sublingvální aplikace přípravku Oralair vede k rychlému (15–30 minut) převzetí a zachycení alergenového extraktu dendritickými buňkami ústní sliznice (Langerhansovy buňky), což umožňuje zpracování antigenu s minimální proteolytickou degradací a zachování repertoáru epitopů T a B lymfocytů. V následujících 12–24 hodinách pak Langerhansovy buňky migrují do místních lymfatických uzlin, kde interagují s naivními CD4⁺ T lymfocyty, čímž indukují tvorbu regulačních T a B lymfocytů a vyvolávají supresi specifických Th1/Th2 lymfocytů. Společně s těmito ději dochází také k potlačení aktivity mastocytů, bazofilů a eozinofilů. Všechny tyto jevy patří do časně fáze vyvolání tolerance a dochází k nim v průběhu dní až týdnů. V rámci měsíců se poté rozvíjí fáze pozdní, během které dochází ke snížení hladiny alergen specifických IgE protilátek se současným nárůstem kompetitivních specifických IgG protilátek. Dále také dochází ke snížení množství či aktivity proalergenních efektorových buněk v periferních tkáních jako je kůže a sliznice. (Klimek et al. 2022, příbalová informace přípravku Oralair)

4.2 Hodnocení účinnosti alergenové imunoterapie

První kontrolní studie, která svědčila ve prospěch účinnosti AIT, byla zveřejněna již v roce 1954. V rámci této studie bylo pro hodnocení účinnosti AIT využito jako měřítko klinických výsledků snížení symptomů u pacienta a jeho celkový pocit z léčby. V současnosti je za zlatý standard sledování účinnosti AIT považováno hodnocení klinických symptomů a případná nutnost použití záchranné medikace v průběhu přirozené expozice alergenu. Jako sekundární parametry pro hodnocení účinnosti AIT mohou také sloužit například skóre kvality života nebo dny bez přítomnosti symptomů. (Pitsios 2021, Shamji et al. 2017)

Pacienti účastníci se klinických studií dobrovolně zaznamenávají indikovaná klinická data nebo vyplňují dotazníky týkající se jejich stavu. Úskalí tohoto typu hodnocení představuje skutečnost, že samonahlášená data jsou často subjektivní, mohou být ovlivněna osobním vnímáním závažnosti projevů onemocnění nebo mírou osobní spokojenosti s výsledky léčby. Každý pacient může zhodnotit symptomy nebo nutnost použití záchranné medikace jinak a ve výsledku je tedy promítnuta i pacientova osobnost. (Pitsios 2021)

Ideálním objektivním posouzením účinnosti AIT by bylo využití vhodných biomarkerů, umožňujících kvantitativní měření. Použití takovýchto biomarkerů by poskytlo mnoho výhod, jako je například identifikace „dobrých“ respondentů na AIT, zvolení odpovídajícího trvání léčby, predikce klinických výsledků, monitorování účinku léčby nebo případná potřeba boosterové dávky. I přes to, že se již mnoho studií zabývalo základními imunologickými mechanismy AIT a potenciálními *in vitro* biomarkery, doposud se žádný z nich neprokázal jako jednoznačný prediktivní ukazatel pro klinické výsledky. V současné době jsou nejvíce zkoumanými potenciálními biomarkery například IgE protilátky (celkové IgE, specifické IgE, nebo jejich poměr), podtřídy IgG (sIgG1, sIgG4, poměr sIgE a IgG4), aktivace bazofilů, cytokiny a chemokiny nebo buněčné markery (regulační T a B lymfocyty a dendritické buňky). (Pitsios 2021, Shamji et al. 2017)

4.2.1 Vizuální analogová škála

Získání podrobné a pečlivé pacientovy anamnézy, společně s lékařskou prohlídkou, tvoří základ diagnostického procesu v alergologii. U mnoha alergických onemocnění je nezbytné neustálé posuzování a monitorování závažnosti symptomů, jejich povahy a změn v závislosti na místě, čase a situaci, ve které se objevují. Příkladem takového onemocnění je alergická rinitida, jejíž příznaky jsou často subjektivní a těžko se posuzují či ověřují. Další

úskalí také představuje fakt, že symptomy takového onemocnění se často u každého pacienta liší, ať už ve smyslu jejich povahy, závažnosti či trvání. V posledních letech se také vyvinula snaha o individualizaci terapie a nepřetržité monitorování onemocnění, přičemž v rámci monitorování onemocnění je nezbytné získat spolehlivé a reprodukovatelné informace o účinnosti léčby (příznaky před a po aplikaci daného léčiva). Z toho všeho nám vyplývá, že je nezbytné mít k dispozici jednoduchý a účinný nástroj k objektivizaci symptomů a monitorování závažnosti onemocnění. Možnost takového nástroje pro nás představuje vizuální analogová škála. (Sybilski 2018)

Vizuální analogová škála (VAS, z anglického *visual analog scale*) je psychometrická škála využívaná pro hodnocení proměnlivých a subjektivních vlastností, které se mohou neustále měnit a není možné je přesně měřit jinými dostupnými metodami. (Sybilski 2018)

Vizuální analogová škála je obvykle vodorovná, 100 mm dlouhá linie (lze si ji také představit jako pravítko či přímku), jejíž opačné konce vyjadřují dva nejzazší či krajní pocity. Pacientovým úkolem je označit na škále bod, který nejlépe odpovídá závažnosti jeho příznaků a aktuálnímu stavu kontroly nad jeho onemocněním. Bodu, který pacient vyznačil je následně přiděleno skóre od 0 do 100. Pokud jsou záznamy prováděny v papírové verzi, mohou být výsledky prezentovány v milimetrech. Při výběru koncových bodů (0–100) je důležité prezentovat maximální extrémy závažnosti projevů onemocnění, aby bylo zahrnuto celé spektrum různých pocitů, a ne pouze jejich část. Jako příklad můžeme uvést hodnocení příznaků alergické rinitidy, mezi něž patří především nosní kongesce, rinorea, svědění nosu či kýchání. U nosní kongesce by 0 označovala volné dýchání nosem a 100 kompletní celodenní obstrukci. Pro rinoreu 0 znamená suchý nos po celý den a 100 naopak nepřetržitou sekreci z nosu. Symptomy onemocnění mohou být posuzovány hromadně nebo odděleně na jednotlivých škálách (všechny příznaky by tak měly svou vlastní škálu). Vizuální analogová škála by neměla mít označené žádné body, které by naznačovaly střed škály, či ji rozdělávaly na jiné pomyslné části, protože by tak mohlo dojít ke snížení její citlivosti. (Sybilski 2018)

Mezi hlavní výhody VAS patří vysoké rozlišení (0–100 mm), které umožňuje zachytit i nejmenší rozdíly v závažnosti onemocnění. Další velkou výhodou je minimální zátěž pacienta. K pozitivním faktorům dále také patří reprodukovatelnost (jednoduché hodnocení změn v závažnosti onemocnění), jednotný systém aplikace a interpretace, jednoduchost a možnost rutinního provedení bez závislosti na speciálních podmínkách

či místě provedení a v neposlední řadě také potvrzená spolehlivost a přesnost (možnost objektivního úsudku na základě výsledků VAS). (Sybilski 2018)

Hlavní praktickou nevýhodou VAS je nutnost provádět přesné měření v milimetrech. Další nevýhodu představuje nutnost provedení výhradně v psané (nebo digitální) podobě, verbální provedení není umožněno. Zaznamenávání výsledků pacientem také vyžaduje alespoň minimální vizuální dovednosti a koordinaci ruky a očí. Tento problém se týká především dětských pacientů, u kterých je velmi důležitá pomoc rodičů. Jedním z hlavních úskalí vizuální analogové škály je také fakt, že pro některé pacienty může být obtížné vybrat bod, který nejlépe koresponduje s jejich symptomy, a to především při prvním použití. Otázka kladená pacientovi by tedy měla být co nejvíce detailní a koncové body škály co nejpřesněji definovány. (Sybilski 2018)

PRAKTICKÁ ČÁST

Praktická část mé diplomové práce je věnována stanovení hladin vybraných cytokinů a sledování jejich změn v čase v souvislosti s průběhem alergenové imunoterapie. Cytokiny byly stanovovány pomocí metod Quantikine[®] HS ELISA Human IFN- γ Immunoassay, Quantikine[®] HS ELISA Human IL-4 Immunoassay a Quantikine[®] ELISA Human IL-5 Immunoassay, přičemž všechny tyto testy pochází od společnosti R&D Systems[®], Inc. Součástí praktické části je také hodnocení účinku alergenové imunoterapie v čase pomocí vizuální analogové škály.

5 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

K vypracování této práce byl využit randomizovaný soubor 32 polinotiků s dominující vazbou na pyl travin a s projevy sezónní alergické rinokonjunktivitidy. Průměrný věk pacientů v souboru při vstupu do studie (počítáno k roku 2013) byl 36 let (věkové rozmezí 20–61 let). Soubor tvořilo 15 žen a 17 mužů. U 18 pacientů z tohoto souboru byly také přítomny projevy bronchiálního astmatu lehkého intermitentního až lehkého perzistujícího charakteru. Diagnóza byla u pacientů potvrzena anamnézou, klinickým obrazem, prick testy a vyšetřením specifického IgE. Jednalo se o pacienty, kteří nebyli dosud léčeni alergenovou imunoterapií a nevyskytovaly se u nich žádné kontraindikace pro podání této léčby. Podmínkou pro vstup do studie byla anamnéza perzistující alergické rinokonjunktivitidy s dominující vazbou na pyl trav, která přetrvávala nejméně po dobu dvou let. Dle klinických příznaků byla tíže alergické rinokonjunktivitidy v korelujícím pylovém období středně těžká až těžká.

Sledovaný soubor je složen ze dvou skupin polinotiků. První skupinu tvoří 19 pacientů, kterým byl v rámci AIT podáván v sublingvální formě přípravek Oralair. Průměrný věk pacientů v této skupině při vstupu do studie byl 34 let a skupinu tvořilo 9 žen a 10 mužů. Druhou skupinou je kontrolní soubor 13 pacientů, jimž byla podávána pouze symptomatická léčba (řádně registrovaná léčba ordinovaná dle platného konsenzu WHO pro léčbu alergické rinitidy a bronchiálního astmatu). Průměrný věk pacientů v kontrolní skupině při vstupu do studie byl 39 let a skupinu tvořilo 6 žen a 7 mužů.

Z hlediska nosních a očních příznaků byla farmakoterapie pacientů standardně prováděna dle doporučení Evropské akademie alergologie a klinické imunologie (EAACI) a WHO (*ARIA guidelines*, DOI: 10.1016/j.jaci.2017.03.050). Léčba alergického eozinofilního astmatu byla stupňovitá dle obecně platného doporučení GINA (*Global Initiative for Asthma*).

U sledovaného souboru pacientů bylo provedeno šest odběrů, a to konkrétně v termínech únor 2013, duben 2013, červen 2013, únor 2014, červenec 2014 a únor 2015. Zde je nutné zmínit, že měření kontrolní skupiny v termínu 04/2013 neproběhlo a hodnoty tedy nejsou k dispozici. Měření v tomto termínu nebylo provedeno, protože se u kontrolního souboru, kterému nebyla podávána aktivní léčba, neočekávaly výrazné změny a důležité bylo především sledování akcelerace imunitních změn v aktivně léčené skupině. První z těchto odběrů (únor 2013) byl proveden před zahájením alergenové imunoterapie

u skupiny léčených pacientů. U všech vzorků byla stanovena hladina IFN γ , IL-4 a IL-5. Dále také obě skupiny pacientů vyplňovali každoročně (od roku 2012 do roku 2015) během návštěv lékaře vizuální analogovou škálu, kde zaznamenávali tíži projevů svého alergického onemocnění.

Účast pacientů ve studii byla dobrovolná. Podmínkou pro vstup do studie bylo seznámení pacienta s charakterem studie a podepsání „Informovaného souhlasu pacienta“. Osobní data pacientů jsou uchována s plnou důvěrností v souladu s aktuálními zákony České republiky.

6 METODIKA PRÁCE

6.1 Odebíraný materiál a zpracování vzorků

Pacientům byly v rámci jednotlivých termínů měření odebírány vzorky plné krve (venepunkcí). Krev odebraná do zkumavky separující sérum se nechala 30 minut srážet při pokojové teplotě a následně byla centrifugována po dobu 15 minut při 1000 x g. Po dokončení centrifugace byl vytvořen alikvot, který byl skladován při teplotě ≤ -20 °C. Z takto připravených alikvotů bylo po jejich rozmrazení provedeno stanovení IFN γ , IL-4 a IL-5.

6.2 Potřebné vybavení a reagentie

Mezi potřebné vybavení patří fotometr na mikrotitrační destičky (ELISA reader) Multiskan RC (Thermo Fisher Scientific), automatické pipety na objemy 5–50 μ L, 50–200 μ L, 100–1000 μ L a k nim náležící špičky. Dále je také potřeba promývačka mikrotitračních destiček MW-12A (Mindray), odměrné válce na 100 mL a 1000 mL, orbitální třepačka mikrotitračních destiček, polypropylenové testovací zkumavky pro ředění standardů a vzorků a deionizovaná či destilovaná voda. Ke stanovení jednotlivých cytokinů jsme využili testovací sady Quantikine[®] HS ELISA Human IFN- γ Immunoassay, Quantikine[®] HS ELISA Human IL-4 Immunoassay a Quantikine[®] ELISA Human IL-5 Immunoassay, přičemž všechny tyto testy pochází od společnosti R&D Systems[®], Inc.

6.3 Stanovení IFN γ

Stanovení IFN γ bylo provedeno pomocí testovací sady Quantikine[®] HS ELISA Human IFN- γ Immunoassay. Tento test je určený k měření lidského IFN γ v séru či plazmě. Je založen na principu kvantitativní nekompetitivní metody ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), kde dno jamek na mikrotitrační destičce pokrývají monoklonální protilátky specifické pro lidský IFN γ . Pokud vyšetřovaný vzorek, pipetovaný do takto upravených jamek, obsahuje IFN γ , dojde k jeho navázání na imobilizovanou protilátku na dně jamky. Po odmytí nenavázaných složek je do jamek přidána biotinylovaná monoklonální protilátka specifická pro lidský IFN γ . Následuje další promývání, po kterém je do jamek přidán značený streptavidin a po dalším odmytí nenavázaných složek je dále přidán substrátový roztok, který způsobí barevnou reakci. Tuto reakci lze měřit fotometricky, přičemž intenzita zbarvení je úměrná množství IFN γ , který se navázal v počátečním kroku na dno jamky.

Před provedením samotného testu je nutné připravit jednotlivé reagensie. Nejprve přivedeme všechny reagensie na pokojovou teplotu. U tohoto kroku je také důležité zmínit, že IFN γ se nachází mimo jiné i ve slinách a při zacházení s reagensii je tedy nutné použít ochranných prostředků, jako je ústenka a rukavice, aby se zamezilo případné kontaminaci testovacího kitu.

Pro přípravu 1000 mL promývacího pufru přidáme ke 40 mL koncentrátu 960 mL destilované vody. Dále si smícháním barevných činidel A a B ve stejném poměru připravíme substrátový roztok. Pro přípravu 100 mL Calibrator Diluent RD5P (zředěného v poměru 1:5) přidáme 20 mL Calibrator Diluent RD5P k 80 mL destilované vody. Streptavidin Polymer-HRP (1X) získáme přidáním 0,215 mL Streptavidin Polymer-HRP (100X) přímo k Streptavidin Polymer-HRP Diluent a dobře promícháme. Pro vytvoření 300 pg/mL standardu rekonstituujeme Human IFN- γ Standard destilovanou vodou. Před ředěním necháme standard minimálně 15 minut odležet a poté ho lehce protřepeme (není doporučováno použití vortexu). Dále začneme s tvorbou ředící řady. Do první zkumavky pipetujeme 900 μ L Calibrator Diluent RD5P (zředěného 1:5) a 100 μ L standardu, čímž dostaneme 30 pg/mL. Do zbývajících zkumavek pipetujeme po 500 μ L a za využití zásobního roztoku tak vytvoříme ředící řadu. Každou zkumavku před dalším transferem důkladně promícháme. Standard 30 pg/mL slouží jako vysoký standard a Calibrator Diluent RD5P (zředěný 1:5) slouží jako nulový standard (0 pg/mL).

Poté co si všechny reagensie, pracovní standardy a vzorky připravíme podle výše uvedených pokynů, dostáváme se k samotnému provedení testu. Do každé jamky přidáme 100 μ L Assay Diluent RD1-63. Dále do jamek přidáváme 100 μ L standardu, kontroly či vzorku, dle pipetovacího schématu. Po napipetování přikryjeme přiloženými adhezními stripy a inkubujeme 2 hodiny při pokojové teplotě na orbitální třepače mikrotitračních destiček nastavené na 500 ± 50 rpm. Následuje promytí destičky s celkovým počtem 4 cyklů. Každou jamku naplníme promývacím roztokem (400 μ L) za použití promývačky mikrotitračních destiček, nebo stříčky. Pro správný výsledek je nezbytné úplné odstranění tekutiny v každém kroku promývání. Po posledním promytí odstraníme aspirací či dekantací veškerý přebytečný promývací roztok, destičku převrátíme a opatrně otřeme o čisté papírové utěrky.

Následně přidáme 200 μ L Human IFN- γ HS Conjugate do každé jamky, překryjeme novým adhezivním stripem a inkubujeme 1 hodinu při pokojové teplotě na třepačce. Po inkubaci následuje opět proces promývání jako v předchozím kroku.

Do každé jamky přidáme 200 μ L Streptavidin Polymer-HRP (1X), opět překryjeme novým adhezivním stripem a inkubujeme po dobu 30 minut při pokojové teplotě na třepačce. Poté následuje opět proces promývání.

Dále přidáme do každé jamky 200 μ L roztoku substrátu a inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě na místě bez přístupu světla, nyní již bez použití třepačky.

Na závěr do každé jamky přidáme 50 μ L Stop Solution, čímž dojde ke změně zbarvení z modré na žlutou. Pokud je barva v jamkách zelená nebo dochází-li k barevné reakci nerovnoměrně, lehce destičkou poklepeme, aby bylo zajištěno důkladné promíchání.

Do 30 minut od provedení posledního kroku pak stanovíme optickou hustotu každé jamky za použití čtecího zařízení mikrotitračních destiček, nastaveného na 450 nm s korekční vlnovou délkou nastavenou na 540 nm nebo 570 nm.

K vyhodnocení naměřených absorbancí jsme využili softwarový program Genesis, který z absorbancí kalibračních standardů sestavil kalibrační křivku, stanovil její matematickou podobu a pomocí naměřených absorbancí jednotlivých vzorků jsme pak získali koncentrace cytokinu IFN γ .

6.4 Stanovení IL-4

Ke stanovení IL-4 byla použita testovací sada Quantikine[®] HS ELISA Human IL-4 Immunoassay. Tento test slouží ke stanovení koncentrace IL-4 v séru nebo supernatantu buněčných kultur. Je založen na principu kvantitativní nekompetitivní metody ELISA. Dno jamek mikrotitrační destičky je potaženo monoklonální protilátkou specifickou pro lidský IL-4. Pokud použité standardy a vzorky, které jsou pipetovány do jednotlivých jamek, obsahují IL-4, dochází k jeho navázání na imobilizovanou protilátku. Po odmytí nenavázaných složek je do jamek přidána polyklonální protilátka, specifická pro lidský IL-4, s enzymovou značkou. Po dalším promytí je do jamek přidán substrátový roztok. Následuje inkubace, po které je do jamek přidán zesilovací roztok. Ten vede k rozvoji barevné reakce, přičemž intenzita zbarvení je úměrná množství IL-4 navázaného v počátečním kroku. Vývoj barvy je poté zastaven a intenzita zbarvení je změřena.

Před provedením samotného testu se musí připravit jednotlivé reagensie. Začneme tím, že je všechny přivedeme na pokojovou teplotu. Alkalická fosfatáza je mimo jiné detekovatelná i ve slinách a při manipulaci s reagensii je tedy vhodné využít ochranných prostředků, jako je ústenka či rukavice, aby se zamezilo kontaminaci reagensii.

K přípravě 1000 mL promývacího roztoku přidáme 100 mL Wash Buffer Concentrate k 900 mL destilované vody. Pro přípravu substrátového roztoku rekonstituujeme lyofilizovaný substrát v 6 mL Substrate Diluent alespoň 10 minut před použitím. Poté vialku uzavřeme a důkladně promícháme. Zesilovací roztok připravíme rekonstitucí lyofilizovaného zesilovače v 6 mL Amplifier Diluent alespoň 10 minut před použitím. Vialku opět uzavřeme a důkladně promícháme. Human IL-4 HS Standard rekonstituujeme pomocí Calibrator Diluent RD6U. Calibrator Diluent RD6U může obsahovat precipitát a je tedy nutné ho před a mezi použitím dobře promíchat. Tato rekonstituce vytvoří zásobní roztok o 16 pg/mL. Standard necháme minimálně 15 minut odpočinout a před provedením ředění ho lehce protřepáme. Do každé zkumavky pipetujeme 500 μ L Calibrator Diluent RD6U a pomocí zásobního roztoku tak vytvoříme ředící řadu. Každou zkumavku před dalším transferem důkladně promícháme. Nežředěný Human IL-4 HS Standard (16 pg/mL) nám slouží jako vysoký standard a Calibrator Diluent RD6U jako nulový standard (0 pg/mL).

Poté co jsme si všechny reagensie náležitě připravily, následuje provedení samotného testu. Do každé jamky pipetujeme 50 μ L Assay Diluent RD1-6. Poté do každé z nich přidáme 200 μ L standardu, vzorku či kontroly, podle pipetovacího schématu. Zakryjeme adhezivním stripem a inkubujeme po dobu 3 hodin při pokojové teplotě. Následuje proces promývání. Nejprve je nutné zbavit se veškeré tekutiny přítomné v jamkách aspirací nebo vyklepáním destičky na čisté papírové utěrky. Každou jamku poté naplníme 400 μ L promývacího roztoku za pomoci stříčky (nebo promývačky mikrotitračních destiček). Poté obsah destiček opět vyprázdníme a tímto způsobem promytí ještě třikrát zopakujeme. Po posledním promytí destičku důkladně vyklepeme na čisté papírové utěrky tak, abychom se zbavily veškerých zbytků promývacího roztoku.

Přidáme 200 μ L Human IL-4 HS Conjugate do každé jamky. Zakryjeme novým adhezivním stripem a inkubujeme po dobu 2 hodin při pokojové teplotě. Poté následuje proces promývání stejným způsobem, jako v předchozím kroku.

Přidáme 50 μL Substrate Solution do každé jamky. Opět zakryjeme novým adhezivním stripem a inkubujeme 1 hodinu při pokojové teplotě. Po provedení tohoto kroku již destičku nepromýváme.

Do každé jamky přidáme 50 μL Amplifier Solution, zakryjeme novým adhezivním stripem a inkubujeme po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Přidáním Amplifier Solution je zahájen rozvoj barevné reakce.

Na závěr přidáme do každé jamky 50 μL Stop Solution. Do 30 minut od tohoto kroku určíme optickou hustotu každé jamky pomocí čtečky mikrotitračních destiček, nastavené na 490 nm s korekční vlnovou délkou nastavenou na 650 nm nebo 690 nm.

K vyhodnocení naměřených absorbancí jsme využili softwarový program Genesis, který z absorbancí kalibračních standardů sestavil kalibrační křivku, stanovil její matematickou podobu a pomocí naměřených absorbancí jednotlivých vzorků jsme pak získali koncentrace cytokinu IL-4.

6.5 Stanovení IL-5

Ke stanovení IL-5 byla využita testovací sada Quantikine[®] ELISA Human IL-5 Immunoassay. Tento test funguje na principu kvantitativní nekompetitivní metody ELISA. Dno jamek mikrotitrační destičky je potaženo monoklonální protilátkou specifickou pro lidský IL-5. Standardy a vzorky jsou pipetovány do jamek a jakýkoli přítomný IL-5 se naváže na imobilizovanou protilátku. Po odmytí nenavázaných složek je do jamek přidána monoklonální protilátka s navázanou enzymovou značkou, specifická pro lidský IL-5. Následuje promytí, kterým jsou opět odstraněny nenavázané složky, do jamek je přidán substrátový roztok a dojde k rozvoji barevné reakce, přičemž intenzita zbarvení je úměrná množství IL-5, který se navázal v počátečním kroku. Vývoj barevné reakce je zastaven a intenzita barvy je změřena.

Před provedením samotného testu připravíme jednotlivé reagenty. Nejprve je všechny přivedeme na pokojovou teplotu. Pro přípravu 500 mL promývacího roztoku přidáme 20 mL Wash Buffer Concentrate k 480 mL destilované vody. Substrátový roztok připravíme smícháním barevné reagenty A a barevné reagenty B ve stejném poměru, minimálně 15 minut před použitím. Do každé jamky pak budeme potřebovat 200 μL této směsi. Human IL-5 Standard rekonstituujeme destilovanou vodou, přičemž rekonstituční objem je uveden na štítku lahvičky. Tato rekonstituce dá vzniknout 2500 pg/mL zásobního

roztoku. Standard necháme minimálně 15 minut odležet a před provedením ředění ho ještě lehce promícháme. Z takto připraveného zásobního roztoku následně do jedné ze zkumavek napipetujeme 100 μL a přidáme 900 μL Calibrator Diluent RD6-11 (pro vzorky sér), čímž dostaneme 250 pg/mL. Do zbývajících zkumavek pak pipetujeme po 500 μL Calibrator Diluent RD6-11 a pomocí zásobního roztoku tak vytvoříme ředící řadu. Každou zkumavku před dalším transferem důkladně promícháme. Standard o 250 pg/mL nám slouží jako vysoký standard a Calibrator Diluent RD6-11 jako nulový standard (0 pg/mL).

Poté co máme připraveny všechny potřebné reagentie můžeme začít se samotným testem. Do každé jamky přidáme 100 μL Assay Diluent RD1W. Poté do jamek přidáme 100 μL standardu, kontroly nebo vzorku, podle pipetovacího schéma. Zakryjeme adhezivním stripem a inkubujeme po dobu 2 hodin při pokojové teplotě na orbitální třepače nastavené na 500 ± 50 rpm.

Následuje proces promývání, kdy nejprve vyprázdníme obsah jamek a poté je plníme 400 μL promývacího roztoku pomocí stříčky nebo promývačky mikrotitračních destiček. Proces ještě třikrát zopakujeme. Kompletní odstranění tekutiny během každého kroku je základem pro dobrý výsledek testu. Po posledním promytí odstraníme zbytek promývacího roztoku aspirací nebo dekantací, destičku obrátíme a opatrně otřeme o čisté papírové utěrky.

Do každé jamky přidáme 200 μL Human IL-5 Conjugate. Zakryjeme adhezivním stripem a opět inkubujeme po dobu 2 hodin při pokojové teplotě na třepače. Po inkubaci následuje stejný proces mytí jako v předchozím kroku.

Následně do každé jamky přidáme 200 μL Substrate Solution a inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě, nyní již bez použití třepačky. K inkubaci je vhodné vybrat místo bez přístupu světla.

Na závěr do každé jamky přidáme 50 μL Stop Solution, čímž dojde ke změně barvy z modré na žlutou. Pokud je barva v jamkách zelená nebo pokud nedošlo k barevné změně v jamkách rovnoměrně, jemně s destičkou poklepeme, abychom zajistili důkladné promíchání. Do 30 minut od této reakce by měla být změřena optická hustota každé jamky, pomocí čtecího zařízení mikrotitračních destiček, nastaveného na 450 nm s korekční vlnovou délkou nastavenou na 540 nm a 570 nm.

K vyhodnocení naměřených absorbancí jsme využili softwarový program Genesis, který z absorbancí kalibračních standardů sestavil kalibrační křivku, stanovil její matematickou podobu a pomocí naměřených absorbancí jednotlivých vzorků jsme pak získali koncentrace cytokinu IL-5.

6.6 Vizuální analogová škála

Pacienti účastníci se studie vyplňovali každoročně (od roku 2012 do roku 2015) vizuální analogovou škálu, do které zaznamenávali tíži projevů svého alergického onemocnění. První záznam (2012) byl proveden uprostřed pylové sezóny před začátkem léčby. Použita byla škála o rozměru 100 mm (10 cm), přičemž bod 0 byl definován jako stav bez projevů alergické rinitidy, tedy absence nosní kongesce, sekrece, svědění nosu či kýchání. Druhý koncový bod (100) poté představuje těžké projevy onemocnění, jako je například kompletní celodenní obstrukce nebo nepřetržitá sekrece z nosu, které významně ovlivňují pacientův každodenní život.

6.7 Statistická analýza

Z naměřených dat bylo provedeno vyhodnocení změn hladin pozorovaných cytokinů na základě porovnání naměřených výsledků v čase. Jednotlivé parametry naměřené během šesti termínů měření byly navzájem porovnány a statisticky vyhodnoceny.

Měřenými parametry byly $IFN\gamma$, IL-4 a IL-5. Pomocí testu normality D'Agostino-Pearson bylo zjištěno, že valná většina dat nevykazuje normální rozložení a pro statistické vyhodnocení tedy bylo využito neparametrických analogů t-testu. Pro statistické zpracování dat byl využit softwarový program MedCalc[®].

Při analýze dat byly nejprve porovnávány hodnoty konkrétního cytokinu v jednotlivých termínech měření u pacientů, kteří byli podrobeni léčbě přípravkem Oralair. K tomu byl využit Wilcoxonův test, což je neparametrický analog párového t-testu. Následně byly stejným postupem vyhodnoceny i kontroly v jednotlivých termínech měření.

Dalším krokem bylo vzájemné porovnání hodnot léčených pacientů s kontrolami v jednotlivých termínech měření. V tomto případě byl použit Mann-Whitney U-test, což je neparametrický analog nepárového t-testu.

U výsledků získaných pomocí vizuální analogové škály byly nejprve porovnány hodnoty pacientů s léčbou v jednotlivých letech mezi sebou a následně bylo to samé

provedeno u kontrol, opět pomocí Wilcoxonova testu. Poté následovalo vzájemné porovnání výsledků léčených pacientů a kontrolních jedinců v jednotlivých termínech pomocí testu Mann-Whitney.

Pro vyhodnocení statisticky významného rozdílu v naměřených hodnotách byla použita p-hodnota, což je číselná hodnota používaná při statistickém testování hypotéz. Jinými slovy se jedná o pravděpodobnost výskytu pozorovaného nebo ještě extrémnějšího jevu vzhledem k platnosti nulové hypotézy. K zamítnutí nulové hypotézy dochází, pokud je p-hodnota menší než hladina významnosti α , přičemž v našem případě $\alpha = 5\%$ (tedy 0,05). Pro přehledné vyznačení významných rozdílů v grafech, které budou následovat, jsme využili hodnocení uvedené v Tabulce 2.

Tabulka 2: Symboly pro označení p-hodnot

p-hodnota	Označení
> 0,05	není statisticky významný rozdíl
0,01 – 0,05	*
0,001 – 0,01	**
< 0,001	***

Zdroj: vlastní

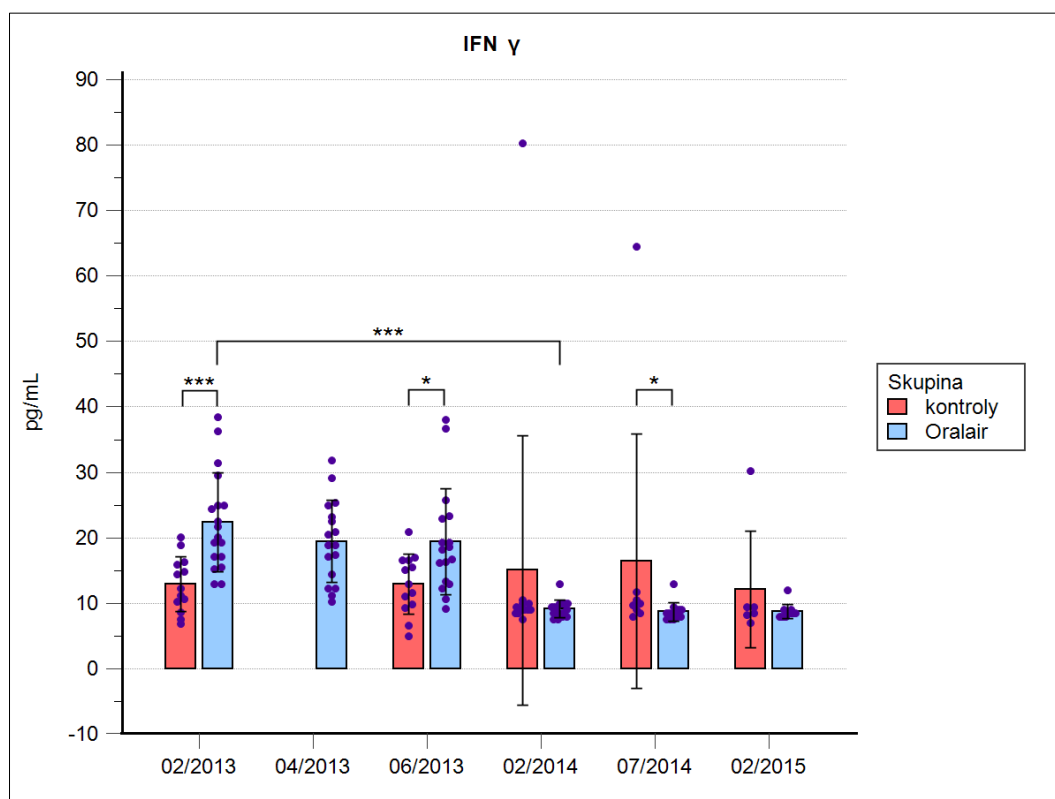
7 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

7.1 Hodnocení změn hladin IFN γ v souvislosti s průběhem AIT

Koncentrace IFN γ byla stanovena u pacientů léčených přípravkem Oralair i u kontrolních jedinců. U kontrolního souboru nebyl proveden druhý odběr (04/2013).

Graf 1 znázorňuje porovnání naměřených hodnot IFN γ u pacientů léčených přípravkem Oralair a u kontrolních jedinců. V grafu je vyznačen první statisticky významný rozdíl v hladině IFN γ u léčených pacientů mezi termínem 02/2013 a 02/2014, přičemž u termínu 02/2014 byla naměřena výrazně nižší hladina. Dále jsou také vyznačeny statisticky významné rozdíly mezi léčenými pacienty a kontrolními jedinci v termínech 02/2013 a 06/2013, kdy nižší hladinu IFN γ vykazoval kontrolní soubor a dále také u termínu 07/2014, kdy byla nižší hladina IFN γ naměřena u skupiny léčených pacientů.

Graf 1: Porovnání naměřených hodnot IFN γ u pacientů a kontrolních jedinců



Zdroj: vlastní

V Tabulce 3 můžeme vidět souhrnnou statistiku naměřených hodnot IFN γ . K jednotlivým termínům měření je vždy uveden počet měřených vzorků, průměrná koncentrace IFN γ \pm směrodatná odchylka a medián, přičemž uvedeny jsou hodnoty jak pro pacienty léčené přípravkem Oralair, tak i pro kontrolní soubor. V tabulce je poté také vyznačena statistická významnost mezi hodnotami léčených pacientů a kontrol.

Tabulka 3: Souhrnná statistika naměřených hodnot IFN γ

Termín měření	Oralair			Kontroly			Statistická významnost
	Počet vzorků	Průměrná koncentrace IFN γ \pm SD	Medián	Počet vzorků	Průměrná koncentrace IFN γ \pm SD	Medián	
02/2013	18	22,42 \pm 7,53	20,90	13	12,91 \pm 4,21	12,30	0,0003
04/2013	17	19,48 \pm 6,28	18,90	–	–	–	–
06/2013	17	19,39 \pm 8,13	18,20	13	12,92 \pm 4,56	12,90	0,0170
02/2014	16	9,19 \pm 1,35	9,25	12	15,06 \pm 20,54	9,00	0,5568
07/2014	13	8,69 \pm 1,44	8,50	8	16,5 \pm 19,43	9,88	0,0281
02/2015	12	8,71 \pm 1,10	8,50	6	12,17 \pm 8,91	9,00	0,4144

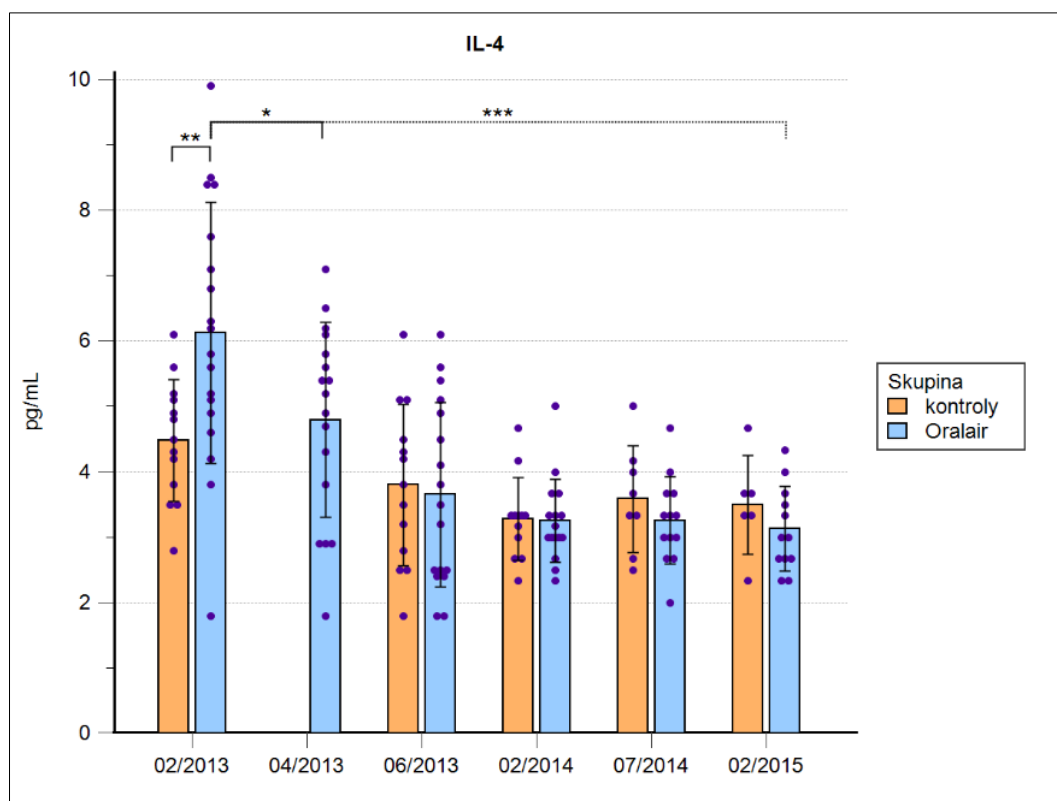
Zdroj: vlastní

7.2 Hodnocení změn hladin IL-4 v souvislosti s průběhem AIT

Koncentrace IL-4 byla stanovena u pacientů léčených přípravkem Oralair i u kontrolních jedinců. U kontrolního souboru nebyl proveden druhý odběr (04/2013).

Graf 2 znázorňuje porovnání naměřených hodnot IL-4 u pacientů léčených přípravkem Oralair a u kontrolního souboru. V grafu je vyznačen první statisticky významný rozdíl v hladině IL-4 u léčených pacientů mezi termínem 02/2013 a 04/2013, kdy nižší hladina byla naměřena u termínu 04/2013. Dále v grafu můžeme vidět, že se tento rozdíl v průběhu léčby umocňoval. Vyznačen je také statisticky významný rozdíl mezi léčenými pacienty a kontrolními jedinci v termínu 02/2013, kdy nižší hladina IL-4 byla naměřena u kontrolního souboru.

Graf 2: Porovnání naměřených hodnot IL-4 u pacientů a kontrolních jedinců



Zdroj: vlastní

V Tabulce 4 můžeme vidět souhrnnou statistiku naměřených hodnot IL-4. K jednotlivým termínům měření je vždy uveden počet měřených vzorků, průměrná koncentrace IL-4 \pm směrodatná odchylka a medián, přičemž uvedeny jsou hodnoty jak pro pacienty léčené přípravkem Oralair, tak i pro soubor kontrolních jedinců. V tabulce je poté také vyznačena statistická významnost mezi hodnotami léčených pacientů a kontrol.

Tabulka 4: Souhrnná statistika naměřených hodnot IL-4

Termín měření	Oralair			Kontroly			Statistická významnost
	Počet vzorků	Průměrná koncentrace IL-4 \pm SD	Medián	Počet vzorků	Průměrná koncentrace IL-4 \pm SD	Medián	
02/2013	18	6,12 \pm 2,00	6,00	13	4,49 \pm 0,93	4,50	0,0073
04/2013	17	4,79 \pm 1,49	5,20	–	–	–	–
06/2013	17	3,65 \pm 1,41	3,50	13	3,80 \pm 1,24	3,80	0,6440
02/2014	16	3,25 \pm 0,64	3,09	12	3,28 \pm 0,64	3,33	0,7768
07/2014	13	3,26 \pm 0,67	3,33	8	3,58 \pm 0,82	3,50	0,3601
02/2015	12	3,13 \pm 0,65	3,00	6	3,50 \pm 0,76	3,50	0,2986

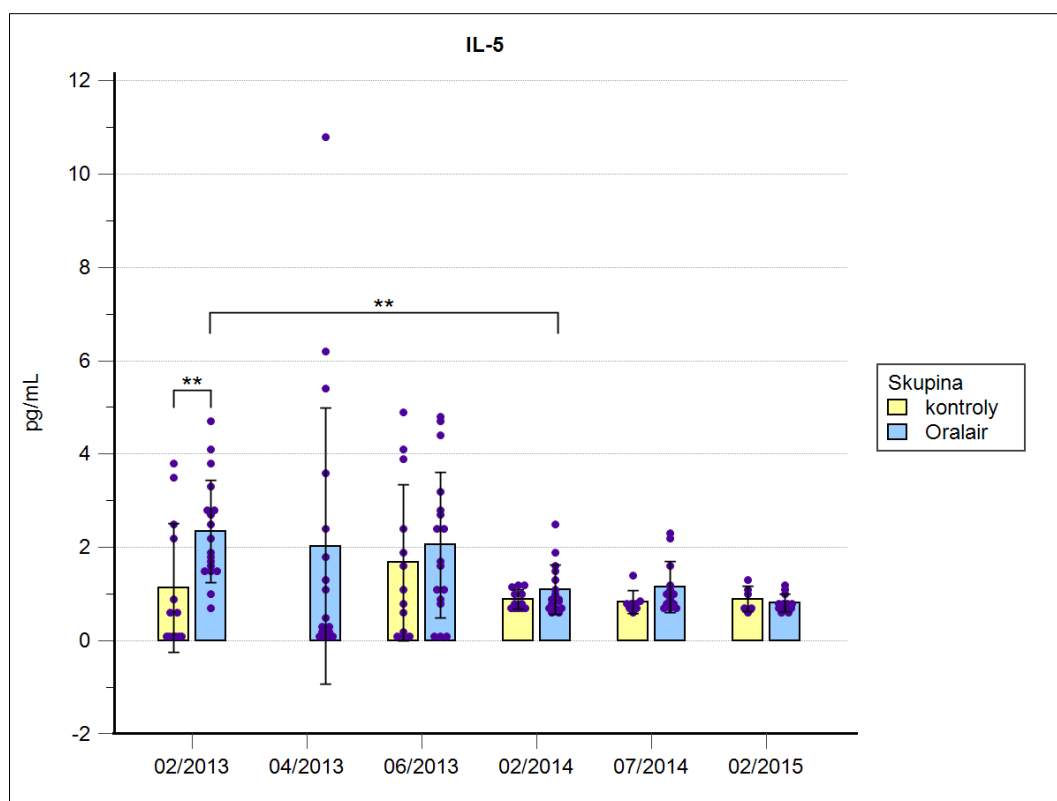
Zdroj: vlastní

7.3 Hodnocení změn hladin IL-5 v souvislosti s průběhem AIT

Koncentrace IL-5 byla stanovena u všech pacientů léčených přípravkem Oralair i u kontrolních jedinců. U kontrolního souboru nebyl proveden druhý odběr (04/2013).

Graf 3 znázorňuje porovnání naměřených hodnot IL-5 u pacientů léčených přípravkem Oralair a u kontrolních jedinců. V grafu je vyznačen první statisticky významný rozdíl v hladině IL-5 u léčených pacientů mezi termínem 02/2013 a 02/2014, přičemž nižší hladina IL-5 byla naměřena u termínu 02/2014. Dále je také vyznačen statisticky významný rozdíl mezi léčenými pacienty a kontrolními jedinci v termínu 02/2013, kdy byla nižší hladina IL-5 naměřena u kontrolního souboru.

Graf 3: Porovnání naměřených hodnot IL-5 u pacientů a kontrolních jedinců



Zdroj: vlastní

V Tabulce 5 můžeme vidět souhrnnou statistiku naměřených hodnot IL-5. K jednotlivým termínům měření je vždy uveden počet měřených vzorků, průměrná koncentrace IL-5 \pm směrodatná odchylka a medián, přičemž uvedeny jsou hodnoty jak pro pacienty léčené přípravkem Oralair, tak i pro soubor kontrolních jedinců. V tabulce je poté také vyznačena statistická významnost mezi hodnotami léčených pacientů a kontrol.

Tabulka 5: Souhrnná statistika naměřených hodnot IL-5

Termín měření	Oralair			Kontroly			Statistická významnost
	Počet vzorků	Průměrná koncentrace IL-5 \pm SD	Medián	Počet vzorků	Průměrná koncentrace IL-5 \pm SD	Medián	
02/2013	18	2,34 \pm 1,09	2,05	13	1,13 \pm 1,38	0,60	0,0084
04/2013	17	2,03 \pm 2,95	0,50	–	–	–	–
06/2013	17	2,05 \pm 1,56	1,70	13	1,68 \pm 1,68	1,10	0,4242
02/2014	16	1,10 \pm 0,53	0,90	12	0,89 \pm 0,21	0,80	0,4659
07/2014	13	1,15 \pm 0,55	1,00	8	0,83 \pm 0,24	0,80	0,1063
02/2015	12	0,82 \pm 0,19	0,80	6	0,90 \pm 0,28	0,85	0,7026

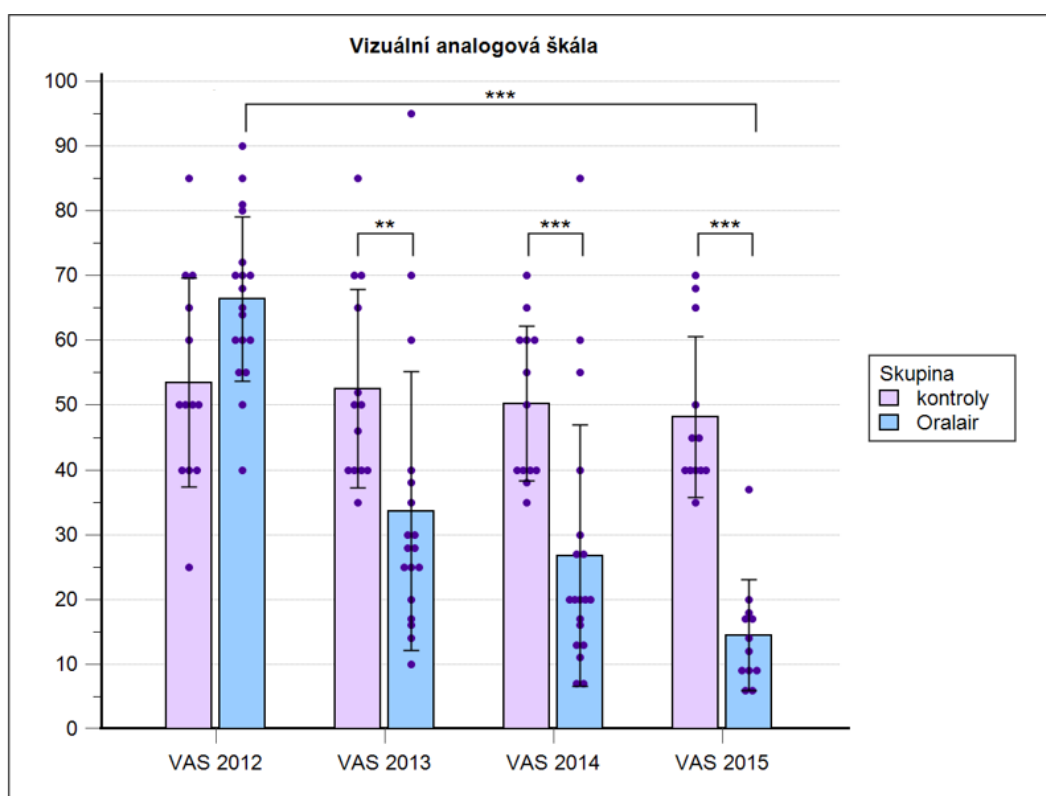
Zdroj: vlastní

7.4 Hodnocení účinku AIT pomocí vizuální analogové škály

Porovnávány byly hodnoty VAS, které léčení pacienti i kontrolní jedinci každoročně v průběhu let 2012 až 2015 zaznamenávali.

Graf 4 znázorňuje porovnání hodnot VAS u pacientů léčených přípravkem Oralair a u kontrolních jedinců. V grafu je vyznačen statisticky významný rozdíl hodnot VAS u léčených pacientů mezi roky 2012 a 2015, tedy před začátkem a na konci léčby, přičemž nižší hodnoty byly naměřeny v roce 2015. Dále je také vyznačen statisticky významný rozdíl mezi léčenými pacienty a kontrolními jedinci v letech 2013, 2014 a 2015, kdy nižší hodnoty byly vždy pozorovány u souboru léčených pacientů.

Graf 4: Porovnání hodnot VAS u pacientů a kontrolních jedinců



Zdroj: vlastní

V Tabulce 6 můžeme vidět souhrnnou statistiku naměřených hodnot VAS. K jednotlivým termínům měření je vždy uveden počet měřených vzorků a medián, přičemž uvedeny jsou hodnoty jak pro pacienty léčené přípravkem Oralair, tak i pro soubor kontrolních jedinců. V tabulce je poté také vyznačena statistická významnost mezi hodnotami léčených pacientů a kontrol.

Tabulka 6: Souhrnná statistika naměřených hodnot VAS

Termín měření	Oralair		Kontroly		Statistická významnost
	Počet vzorků	Medián	Počet vzorků	Medián	
2012	18	66,50	13	50,00	0,0241
2013	18	28,00	13	50,00	0,0014
2014	19	20,00	13	50,00	0,0006
2015	12	13,00	12	42,50	< 0,0001

Zdroj: vlastní

DISKUZE

Alergenová imunoterapie je v rámci respiračních alergií dodnes považována za jedinou kauzální léčebnou strategii mající schopnost modifikovat samotné onemocnění. Její princip spočívá v opakovaném podávání alergenu postiženému jedinci, což vede k modulaci jeho imunitní odpovědi a dochází k navození zvýšené tolerance vůči příčinnému alergenu. Dodnes stále probíhají klinické studie zaměřené na sledování bezpečnosti a účinnosti této léčby, přičemž mezi primární klinické ukazatele účinnosti patří skórovací systémy pro hodnocení symptomů onemocnění a případná nutnost použití záchranné medikace. Jako sekundární ukazatel může poté sloužit například skóre kvality života nebo počet dnů bez projevů onemocnění. Všechny tyto ukazatele jsou založeny na zaznamenávání údajů samotným pacientem, z čehož vyplývá, že jsou zatíženy jistou mírou subjektivity, která může představovat nedostatek prováděných klinických studií. Proto je v současnosti vyvíjena snaha o nalezení biomarkerů vhodných pro kvantitativní měření, které by byly ideálními objektivními ukazateli účinnosti AIT. (Pitsios 2021, Fritzsching et al. 2021)

Tím se dostáváme k cíli této diplomové práce, jímž bylo zjistit, zda $IFN\gamma$, IL-4 a IL-5 představují vhodné parametry ke sledování účinnosti AIT. Hladina těchto cytokinů byla monitorována v čase u skupiny aktivně léčených pacientů a u souboru kontrolních jedinců.

Obecně přijatý model vyvolání dlouhodobé tolerance pomocí AIT, je vysvětlován přeměrováním z převládající Th2 odpovědi směrem k Th1 odpovědi. V průběhu léčby by se tedy dala očekávat snížená produkce Th2 cytokinů (IL-4, IL-5) a naopak zvýšená produkce Th1 cytokinů, jako je například $IFN\gamma$ (Shamji et al. 2017).

Z námi naměřených dat jsme u pacientů léčených přípravkem Oralair zjistili klesající trend $IFN\gamma$ v průběhu léčby. V porovnání s prvním termínem měření (02/2013), které bylo provedeno před zahájením alergenové imunoterapie, začínáme pozorovat statisticky významný rozdíl od termínu 02/2014, tedy přibližně rok po zahájení léčby, kdy $p = 0,0001$. Statisticky významný rozdíl, v porovnání s prvním termínem měření, pak přetrvává až do posledního měření (02/2015), což jsou přibližně dva roky od zahájení léčby, kdy $p = 0,0022$. Zaměříme-li se na porovnávání hodnot léčených pacientů s kontrolními jedinci v jednotlivých termínech měření, statisticky významné rozdíly pozorujeme u termínů 02/2013 ($p = 0,0003$), 06/2013 ($p = 0,0170$) a 07/2014 ($p = 0,0281$). V případě termínu 02/2013, tedy těsně před zahájením léčby, byla významně vyšší hladina $IFN\gamma$ naměřena

u pacientů, kteří následně budou podrobeni alergenové imunoterapii. Vzhledem k tomu, že výběr pacientů do studie byl náhodný a pacienti si sami mohli zvolit, zda se chtějí podrobit léčbě, je tato skutečnost nečekaná. Faktem ovšem zůstává, že na hladinu cytokinů má kromě alergií vliv i mnoho jiných faktorů, o kterých lékař (alergolog) nemusí vědět, například infekční onemocnění prodělané v nedávné době nebo exacerbace autoimunitní choroby. Dalším možným vysvětlením by bylo, že i přesto, že pacienti byli vybíráni náhodně, nezávisle na tíži svých symptomů, mohli s léčbou souhlasit častěji pacienti, kteří se subjektivně cítili hůře, a proto s léčbou souhlasili. U termínu 07/2014 již pozorujeme, že se trend otočil a u pacientů léčených přípravkem Oralair, v porovnání s kontrolními jedinci, hladina IFN γ významně klesla.

Klesající trend IFN γ v průběhu SLIT zmiňuje také Zhang et al. (2022). Ten se ve své práci zabýval sledováním hladin cytokinů u pacientů s projevy alergické rinitidy v reakci na prachové roztoče (*Dermatophagoides farinae*) a zkoumal jejich spojitost s účinností AIT. Jedním z poznatků v této studii bylo, že u skupiny respondentů na AIT byla zjištěna nižší hladina IFN γ než u skupiny non-respondentů. Za účelem ověření prediktivních schopností tohoto cytokinu bylo následně provedeno nové nezávislé testování, jehož výsledek v tomto případě ovšem byl, že hladina IFN γ se u respondentů a non-respondentů nijak významně nelišila. K závěru, že se hladina IFN γ v průběhu AIT nijak významně nemění došel ve své práci také Keskin (1999). Existují ovšem i studie, které popisují vzestup IFN γ v rámci AIT (Jutel 1995). Z těchto poznatků lze vyvodit závěr, že IFN γ pravděpodobně není vhodným biomarkerem pro sledování účinnosti AIT a jeho výpovědní hodnota o průběhu léčby je pouze velmi omezená. K detailnějšímu objasnění jeho role v rámci AIT je potřeba provést další zkoumání.

Druhým námi zkoumaným cytokinem je IL-4. Zaměříme-li se nejprve na změnu hladiny IL-4 u pacientů léčených přípravkem Oralair, můžeme statisticky významný rozdíl pozorovat již mezi prvním (02/2013) a druhým (04/2013) měřením, tedy přibližně dva měsíce po zahájení léčby, kdy $p = 0,0279$. Porovnáme-li pak první a poslední termín (02/2015), který odpovídá dvěma rokům od zahájení léčby, můžeme si všimnout, že pozorovaný statisticky významný rozdíl se ještě umocnil a $p = 0,0005$. Je také patrné, že hladina IL-4 má u pacientů léčených přípravkem Oralair klesající trend. Při porovnávání naměřených hodnot mezi léčenými pacienty a kontrolními jedinci byl zjištěn statisticky významný rozdíl pouze v prvním měření, tedy v termínu 02/2013, což bylo ještě před zahájením samotné léčby. Tento rozdíl může být vysvětlen obdobným způsobem jako u výše

zmíněného IFN γ . V rámci ostatních termínů měření nebyly nalezeny žádné jiné statisticky významné rozdíly mezi léčenými pacienty a kontrolními jedinci.

Jak již bylo zmíněno výše, IL-4 patří mezi Th2 cytokiny a v průběhu AIT by se tedy dal očekávat pokles jeho hladiny. Z námi naměřených výsledků jsme zjistili, že koncentrace IL-4 u léčených pacientů měla opravdu v průběhu AIT klesající trend. Pokles IL-4 v rámci AIT zmiňuje ve své studii také Scadding et al. (2015), který ve své práci uvádí sníženou koncentraci IL-4 v nosním sekretu pacientů léčených AIT v porovnání s neléčenými jedinci. Pokles IL-4 by tak mohl souviset s účinností léčby. Musíme ovšem přihlídnout k tomu, že během našeho pozorování nebyly nalezeny významné rozdíly hodnot IL-4 mezi léčenými pacienty a kontrolními jedinci (kromě prvního měření před začátkem léčby) a IL-4 tak pravděpodobně také nepředstavuje ideální biomarker pro hodnocení účinku AIT.

Posledním z námi sledovaných cytokinů je IL-5. Při porovnávání hladin IL-5 u pacientů léčených přípravkem Oralair v rámci jednotlivých termínů měření, pozorujeme první statisticky významný rozdíl mezi prvním (02/2013) a čtvrtým (02/2014) měřením, tedy přibližně po roce od zahájení léčby, kdy p-hodnota vyšla $p = 0,0018$. Statisticky významný rozdíl, v porovnání s prvním termínem měření, pak přetrvává až do posledního měření (02/2015), kdy p-hodnota vyšla $p = 0,0010$. Je opět patrné, že hladina IL-5 vykazuje u léčených pacientů v průběhu léčby klesající trend. Během porovnávání hladin IL-5 léčených pacientů s kontrolními jedinci, byl zjištěn statisticky významný rozdíl pouze v prvním termínu měření (02/2013), což bylo ještě před zahájením samotné léčby. Tento rozdíl můžeme vysvětlit stejným způsobem jako v případě IFN γ a IL-4. V rámci ostatních termínů měření nebyly mezi léčenými pacienty a kontrolními jedinci nalezeny žádné jiné statisticky významné rozdíly.

IL-5 patří mezi Th2 cytokiny a v průběhu AIT by se tak dal, stejně jako u IL-4, předpokládat jeho pokles. Pokles IL-5 ve své práci také uvádí Jutel (1995). I přes to, že námi naměřené hodnoty u pacientů léčených AIT mají také klesající tendenci, nebyly opět nalezeny statisticky významné rozdíly mezi léčeným souborem a kontrolní skupinou. Dále je tu také skutečnost, že existuje velmi málo recentních studií, které by se sledováním tohoto parametru v rámci AIT zabývaly a je tedy obtížné tento nálezní podložit jiným výzkumem. Objasnění přesné role IL-5 v průběhu AIT je tedy stále předmětem bádání.

V rámci této práce byly také porovnávány hodnoty VAS, které zaznamenávali jak pacienti podstupující léčbu, tak kontrolní jedinci. Porovnáme-li hodnoty VAS u pacientů

léčených přípravkem Oralair během jednotlivých termínů měření, můžeme první statisticky významný rozdíl pozorovat již mezi prvním (2012) a druhým (2013) měřením. Statisticky významný rozdíl, v porovnání s prvním měřením, potom přetrvává až do posledního měření v roce 2015, tedy dva roky od zahájení léčby, kdy p-hodnota vyšla $p = 0,0005$. V průběhu let je patrný výrazně klesající trend, z čehož vyplývá, že u léčených pacientů došlo k významnému poklesu závažnosti projevů jejich alergického onemocnění. Při porovnávání hodnot mezi léčenými pacienty a kontrolními jedinci byly zjištěny významné statistické rozdíly ve všech termínech měření, ovšem zatímco u prvního termínu (2012) byl rozdíl mezi pacienty a kontrolami $p = 0,0241$, v rámci posledního měření (2015) byla již zjištěna hodnota $p < 0,0001$, z čehož nám vyplývá, že statisticky významný rozdíl mezi léčenými pacienty a kontrolními jedinci se v průběhu léčby postupně umocňoval.

Z našeho sledování tedy vyplývá, že i přesto, že hladiny IL-4 a IL-5 vykazovaly u pacientů léčených přípravkem Oralair klesající trend, což by mohlo poukazovat na účinnost léčby, mezi hodnotami léčených pacientů a kontrolních jedinců nebyly nalezeny významné statistické rozdíly. Na druhé straně, výsledky VAS vypovídají o významném poklesu projevů onemocnění u léčených pacientů v průběhu AIT, zatímco u neléčeného kontrolního souboru k žádným výrazným změnám v průběhu let, kdy byli sledováni, nedošlo. Tyto skutečnosti tedy poukazují na to, že i přes to, že měření na úrovni cytokinů nebylo v našem případě zcela přesvědčivé, u pacientů léčených přípravkem Oralair došlo v průběhu léčby oproti neléčeným jedincům k výraznému snížení závažnosti projevů jejich alergického onemocnění. Z toho tedy lze odvodit, že námi sledované cytokiny nejsou ideálními biomarkery pro hodnocení účinnosti AIT.

Závěrem je nutné zmínit, že měření hladin sérových cytokinů má mnohá úskalí. Jak již bylo zmíněno, na hladinu sérových cytokinů má vliv i mnoho jiných faktorů, než jsou alergie, například infekční nebo autoimunitní onemocnění. Další skutečností je, že se aktivní proces alergického zánětu odehrává především v zasažené tkáni a v séru se cytokiny často vyskytují pouze ve velmi nízkých koncentracích, což limituje citlivost jejich detekce. Tato skutečnost tak přispívá k tomu, že teze o potlačení Th2 cytokinů ve prospěch Th1 cytokinů, v průběhu AIT, nebyla prozatím patřičně prokázána. Slibnější metodou pro monitorování průběhu této léčby by mohlo být sledování buněčné produkce cytokinů nebo detekce cytokinů přímo v zasažených tkáních. Také Shamji (2017) ve své práci zmiňuje, že stále nebyla prokázána jasná spojitost mezi sérovými cytokiny a klinickými výsledky AIT, a proto v současnosti nejsou považovány za vhodné biomarkery účinnosti AIT. Mohly by ovšem

sloužit k detailnějšímu pochopení mechanismu účinku této léčby. Na místo sérových cytokinů se tak nabízí možnost zkoumání cytokinů v zasažených tkáních, které by mohlo být pro zkoumání imunologického a klinického účinku AIT více přínosné. I toto tvrzení je ovšem nutné v budoucnu prokázat více studiemi.

Zůstaneme-li u cytokinů, podle Zhang et al. (2022) by dalším z možných kandidátů na vhodný biomarker vypovídající o účinnosti AIT mohl být IL-10. IL-10 je protizánětlivý cytokin, který funguje jako stěžejní imunoregulační molekula a účastní se zánětlivých a alergických procesů. Zhang et al. (2022) ve své studii uvádí, že hladina sérového IL-10 je silně spojena s účinností SLIT a koncentrace IL-10 jsou značně zvýšené u respondentů po jednom roce léčby, zatímco u non-respondentů ke změně jeho koncentrace před a po léčbě nedošlo. Ačkoli by model útlumu Th2 odpovědi ve prospěch Th1 odpovědi poskytoval jednoduché a lehce přijatelné vysvětlení, celý proces mechanismu účinku AIT je mnohem komplexnější. Stěžejním procesem imunoterapie je rozvinutí imunotolerance, přičemž bylo prokázáno, že tvorba regulačních T a B lymfocytů je v průběhu AIT pozmeněna a vykazuje spojitost s klinickou účinností této léčby. Zvýšené množství regulačních T a B lymfocytů podporuje uvolňování IL-10, což vede k utlumení Th2 odpovědi ve prospěch Th1 odpovědi. Další snahy o nalezení vhodných cytokinových indikátorů úspěšnosti AIT by se tedy mohly orientovat tímto směrem. (Zhang et al. 2022)

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala sledováním hladin IFN γ , IL-4 a IL-5 u pacientů léčených alergenovou imunoterapií a u kontrolních jedinců. Součástí práce bylo také porovnání těchto nálezů s výsledky hodnocení průběhu alergenové imunoterapie pomocí vizuální analogové škály. V současnosti patří mezi primární klinické ukazatele účinnosti alergenové imunoterapie především skórovací systémy pro hodnocení závažnosti symptomů onemocnění nebo případná nutnost použití záchranné medikace. Tyto ukazatele jsou ovšem zatíženy značnou mírou subjektivity, a proto je vyvíjena snaha o nalezení biomarkerů vhodných pro kvantitativní měření, které by byly objektivními ukazateli účinnosti AIT. Naším cílem bylo tedy zjistit, zda by IFN γ , IL-4 a IL-5 mohly sloužit jako biomarkery pro hodnocení účinnosti alergenové imunoterapie.

I přes to, že u skupiny léčených pacientů byl v průběhu léčby pozorován pokles koncentrací IL-4 a IL-5, což by bylo v souladu s tezí o potlačení Th2 odpovědi ve prospěch Th1 odpovědi, koncentrace IFN γ u léčených pacientů vykazovala pokles, který je s touto tezí v rozporu. Dále také mezi pacienty léčenými přípravkem Oralair a kontrolními jedinci nebyly v průběhu léčby nalezeny významné rozdíly hodnot těchto cytokinů. Co se týká hodnocení výsledků vizuální analogové škály, u souboru léčených pacientů byl v průběhu léčby zaznamenán výrazný pokles tíže symptomů jejich alergického onemocnění v porovnání s kontrolním souborem, u kterého k žádným významným změnám nedošlo. Z těchto skutečností lze vyvodit, že i přesto, že změny v hladinách námi sledovaných cytokinů nebyly zcela přesvědčivé, u pacientů, kteří podstoupili alergenovou imunoterapii došlo v průběhu léčby k výraznému zlepšení jejich stavu. Sérové hladiny cytokinů IFN γ , IL-4 a IL-5 tak dle našich výsledků nejsou ideálními biomarkery pro sledování účinnosti alergenové imunoterapie.

SEZNAM LITERATURY

ADKINSON, Newton Franklin, et al., 2009. *Middleton`s Allergy: Principles and Practice*. 7. vydání. USA: Mosby, Elsevier Inc. Seventh edition. ISBN: 978-0-323-05659-5

AKDIS, Mübeccel, BLASER, Kurt, AKDIS, Cezmi A., 2005. T regulatory cells in allergy: Novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. Davos (Switzerland): Mosby, 116(5), s. 961-968 [cit. 29. 11. 2022]. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.09.004

AKHOURI, Shweta, HOUSE, Steven A., 2022. Allergic Rhinitis. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (Florida): StatPearls Publishing [cit. 27. 11. 2022]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538186/#_NBK538186_pubdet_

ANSOTEGUI, Ignacio J., et al., 2020. IgE allergy diagnostics and other relevant tests in allergy, a World Allergy Organization position paper. *The World Allergy Organization Journal* [online]. Spain: Elsevier Inc., 13(2) [cit. 15. 12. 2022]. DOI: 10.1016/j.waojou.2019.100080

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, PAULÍK, Milan, et al., 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, a.s. ISBN: 978-80-247-3533-7

BIEBER, Thomas, 2014. Atopic dermatitis. In: *Global Atlas of Allergy*. Zürich (Switzerland): European Academy of Allergy and Clinical Immunology, s. 203-205. www.eaaci.org

BRAUNSTAHL, Gert Jan, 2014. In vivo allergy diagnosis – nasal and bronchial provocation tests. In: *Global Atlas of Allergy*. Zürich (Switzerland): European Academy of Allergy and Clinical Immunology, s. 153-155. www.eaaci.org

BRAZA, F., et al., 2014. Regulatory functions of B cells in allergic diseases. *Allergy*. European Journal of Allergy and Clinical Immunology [online]. Nantes (France): Wiley-Blackwell Publishing Ltd., 69, s. 1454-1463 [cit. 29. 11. 2022]. DOI: 10.1111/all.12490

CALDERÓN, Moisés A., et al., 2012. Sublingual allergen immunotherapy: mode of action and its relationship with the safety profile. *Allergy*. European Journal of Allergy and Clinical Immunology [online]. United Kingdom: Wiley-Blackwell Publishing Ltd., 67, s. 302-311 [cit. 7. 2. 2023]. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02761.x

DRANITSARIS, George, ELLIS, Anne K., 2014. Sublingual or subcutaneous immunotherapy for seasonal allergic rhinitis: an indirect analysis of efficacy, safety and cost. *Journal of Evaluation in Clinical Practice* [online]. Canada: John Wiley & Sons, Ltd., 20, s. 225-238 [cit. 7. 2. 2023]. DOI: 10.1111/jep.12112

DRAZDAUSKAITĖ, Gabija, LAYHADI, Janice A., SHAMJI, Mohamed H., 2021. Mechanisms of Allergen Immunotherapy in Allergic Rhinitis. *Current Allergy and Asthma Reports* [online]. London: Springer, 21(2) [cit. 27. 11. 2022]. DOI: 10.1007/s11882-020-00977-7

FERNANDEZ, James, 2022. Overview of Allergic and Atopic Disorders. In: *MSD Manuals* [online]. Rahway, New Jersey (USA): Merck & Co, Inc. [cit. 18. 11. 2022]. Dostupné z: <https://www.msdmanuals.com/professional/immunology-allergic-disorders/allergic,-autoimmune,-and-other-hypersensitivity-disorders/overview-of-allergic-and-atopic-disorders#top>

FREW, Anthony J., 2010. Allergen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. United Kingdom: Mosby, 125(2), s. 306-313 [cit. 7. 2. 2023]. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.10.064

FRITZSCHING, Benedikt, CONTOLI, Marco, PORSEBJERG, Celeste, et al., 2021. Long-term real-world effectiveness of allergy immunotherapy in patients with allergic rhinitis and asthma: Results from the *REACT study, a retrospective cohort study*. *The Lancet Regional Health – Europe* [online]. Germany: Elsevier Ltd., 13 [cit. 14. 4. 2023]. DOI: 10.1016/j.lanepe.2021.100275

GALLI, Stephen J., 2014. Mast cells. In: *Global Atlas of Allergy*. Zürich (Switzerland): European Academy of Allergy and Clinical Immunology, s. 53-55. www.eaaci.org

GALLI, Stephen J., TSAI, Mindy, 2012. IgE and mast cells in allergic disease. *Nature medicine* [online]. Stanford: Nature Publishing Group, 18(5), s. 693-704 [cit. 1. 12. 2022]. DOI: 10.1038/nm.2755

GALLI, Stephen J., TSAI, Mindy, PILIPONSKY, Adrian M., 2008. The development of allergic inflammation. *Nature* [online]. Stanford (USA): Macmillan Publishers Limited, 454(7203), s. 445-454 [cit. 20. 11. 2022]. DOI: 10.1038/nature07204

GARCÍA-MOZO, Herminia, 2017. Poaceae pollen as the leading aeroallergen worldwide: A review. *Allergy. European journal of allergy and clinical immunology* [online]. Córdoba (Spain): John Wiley & Sons Ltd, 72, s. 1849-1858 [cit. 20. 11. 2022]. DOI: 10.1111/all.13210

GENSER, Katharina Julia, SCHMID-GRENDELMEIER, Peter, 2014. In vivo allergy diagnosis – skin tests. In: *Global Atlas of Allergy*. Zürich (Switzerland): European Academy of Allergy and Clinical Immunology, s. 150-152. www.eaaci.org

HASHMI, Muhammad F., TARIQ, Maryam, CATALETTO, Mary E., 2022. Asthma. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (Florida): StatPearls Publishing [cit. 27. 11. 2022]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430901/#_NBK430901_pubdet_

HOSTOFFER, Robert W., JOSEPH, Nancy, 2022. Immunoglobulin E. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (Florida): StatPearls Publishing [cit. 1. 12. 2022]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482212/#_NBK482212_pubdet_

HUMLOVÁ, Zuzana, 2010. Alergická rinitida, její diagnostika a terapie. *Interní medicína pro praxi* [online]. Olomouc: Solen s.r.o., 12(3), s. 131-135 [cit. 27. 11. 2022]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2010/03/04.pdf>

IGEA, J. M., 2013. The history of the idea of allergy. *Allergy. European journal of allergy and clinical immunology* [online]. Salamanca (Spain): Wiley-Blackwell Publishing Ltd., 68, s. 966-973 [cit. 18. 11. 2022]. DOI: 10.1111/all.12174

INAGAKI, Naoki, NAGAI, Hiroichi, 2001. Drugs for the Treatment of Allergic Diseases. *The Japanese Journal of Pharmacology* [online]. Japan: Japanese Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 86, s. 275-280 [cit. 7. 2. 2023]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1254/jjp.86.275>

IWANOWYCZ, Stephen, NGOI, Soo, LI, Yingqi, et al., 2021. Type 2 dendritic cells mediate control of cytotoxic T cell resistant tumors. *JCI Insight* [online]. USA: The American Society for Clinical Investigation, 6(17) [cit. 20. 3. 2023]. DOI: 10.1172/jci.insight.145885

JAKOB, Thilo, et al., 2015. Molecular allergy diagnostics using multiplex assays: methodological and practical considerations for use in research and clinical routine. *Allergo Journal International* [online]. Germany: Springer Medizin, 24, s. 320-332 [cit. 15. 12. 2022]. DOI: 10.1007/s40629-015-0056-2

JUSTIZ VAILLANT, Angel A., MODI, Pranav, JAN, Arif., 2022. Atopy. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (Florida): StatPearls Publishing [cit. 18. 11. 2022]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542187/#_NBK542187_pubdet_

JUTEL, M., PICHLER, W. J., SKRBIC, D., et al., 1995. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *The Journal of Immunology* [online]. Switzerland: The American Association of Immunologists, Inc., 154(8), s. 4187-4194 [cit. 14. 4. 2023]. PMID: 7706753

KARASUYAMA, Hajime, 2014. Basophils. In: *Global Atlas of Allergy*. Zürich (Switzerland): European Academy of Allergy and Clinical Immunology, s. 56-57. www.eaaci.org

KESKIN, G., INAL, A., SARI, R. Ali, et al., 1999. Serum IFN-gamma and IL-10 levels before and after specific immunotherapy in patients with allergic rhinitis. *Allergologia et Immunopathologia* [online]. Spain: Codon Publications, 27(5), s. 261-264 [cit. 14. 4. 2023]. PMID: 10568876

KLEINE-TEBBE, Jörg, DAVIES, Janet, 2014. Grass pollen allergens. In: *Global Atlas of Allergy*. Zürich (Switzerland): European Academy of Allergy and Clinical Immunology, s. 22-26. www.eaaci.org

KLIMEK, Ludger, et al., 2022. Update about Oralair[®] as a treatment for grass pollen allergic rhinitis. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. Germany: Taylor & Francis, 18(5) [cit. 5. 2. 2023]. DOI: 10.1080/21645515.2022.2066424

KOLB, Logan, FERRER-BRUKER, Sarah J., 2022. Atopic Dermatitis. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (Florida): StatPearls Publishing [cit. 27. 11. 2022]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448071/#_NBK448071_pubdet_

KRČMOVÁ, Irena, 2007. Alergický zánět a možnosti jeho terapeutického ovlivnění. *Sanquis* [online]. Praha: Audabiac, o. s., 49, s. 10 [cit. 20. 11. 2022]. Dostupné z: <https://www.sanquis.cz/index1.php?linkID=art161>

KREJSEK, Jan, ANDRÝS, Ctirad, KRČMOVÁ, Irena, 2016. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon. 496 s. ISBN: 978-80-86472-74-4

LAMBRECHT, Bart N., 2014. Dendritic cells. In: *Global Atlas of Allergy*. Zürich (Switzerland): European Academy of Allergy and Clinical Immunology, s. 45-47. www.eaaci.org

LOKAS, Sandra Bulat, et al., 2017. Allergen-Specific IgE Measurement: Intermethod Comparison of Two Assay Systems in Diagnosing Clinical Allergy. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. Croatia: Wiley Periodicals Inc., 31(3) [cit. 15. 12. 2022]. DOI: 10.1002/jcla.22047

MOOTE, William, KIM, Harold, ELLIS, Anne K., 2018. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* [online]. Canada: BioMed Central Ltd., 14(2), s. 53-62 [cit. 7. 2. 2023]. DOI: 10.1186/s13223-018-0282-5

ORALAIR [příbalová informace]. Francie: Stallergenes, 2010 (první registrace), 2013 (poslední prodloužení registrace)

PERSAUD, Yudy, MEMON, Ruba J., SAVLIWALA, Mohammedi N., 2022. Allergy Immunotherapy. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (Florida): StatPearls Publishing [cit. 7. 2. 2023]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535367/#_NBK535367_pubdet_

PITSIOS, Constantinos, 2021. Allergen Immunotherapy: Biomarkers and Clinical Outcome Measures. *Journal of Asthma and Allergy* [online]. Cyprus: Dove Medical Press, 14, s. 141-148 [cit. 4. 4. 2023]. DOI: 10.2147/JAA.S267522

POINTNER, Lisa, et al., 2020. Initiating pollen sensitization – complex source, complex mechanisms. *Clinical and Translational Allergy* [online]. Austria: John Wiley & Sons Ltd, 10:36, [cit. 26. 11. 2022]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13601-020-00341-y>

Quantikine[®] HS ELISA Human IFN- γ Immunoassay [příbalový leták]. USA: R&D Systems, Inc.

Quantikine[®] HS ELISA Human IL-4 Immunoassay [příbalový leták]. USA: R&D Systems, Inc.

Quantikine[®] ELISA Human IL-5 Immunoassay [příbalový leták]. USA: R&D Systems, Inc.

RING, Johannes, 2014. What is allergy. In: *Global Atlas of Allergy*. Zürich (Switzerland): European Academy of Allergy and Clinical Immunology, s. 2-3. www.eaaci.org

SÁNCHEZ-BORGES, Mario, et al., 2018. The importance of allergic disease in public health: an iCAALL statement. *World Allergy Organization Journal* [online]. Caracas (Venezuela): Springer Nature, 11(1) [cit. 23. 11. 2022]. DOI: 10.1186/s40413-018-0187-2

SCADDING, G. W., EIFAN, A. O., LAO-ARAYA, M., et al., 2015. Effect of grass pollen immunotherapy on clinical and local immune response to nasal allergen challenge. *Allergy. European Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd., 70, s. 689-696 [cit. 14. 4. 2023]. DOI: 10.1111/all.12608

SHAMJI, M. H., KAPPEN, J. H., AKDIS, M., et al., 2017. Biomarkers for monitoring clinical efficacy of allergen immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis and allergic asthma: an EAACI position paper. *Allergy* [online]. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd., 72, s. 1156-1173 [cit. 4. 4. 2023]. DOI: 10.1111/all.13138

SIMON, Hans-Uwe, 2014. Eosinophils. In: *Global Atlas of Allergy*. Zürich (Switzerland): European Academy of Allergy and Clinical Immunology, s. 58-59. www.eaaci.org

SIMONS, F. Estelle R., 2014. Anaphylaxis. In: *Global Atlas of Allergy*. Zürich (Switzerland): European Academy of Allergy and Clinical Immunology, s. 191-196. www.eaaci.org

STONE, Kelly D., PRUSSIN, Calman, METCALFE, Dean D., 2010. IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *The Journal of allergy and clinical immunology* [online]. Bethesda: Mosby Inc., 125(2), s. 73-80 [cit. 1. 12. 2022]. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.11.017

SYBILSKI, Adam J., 2018. Visual analogue scale. A simple tool for daily treatment monitoring in allergic rhinitis. *Pediatrics i Medycyna Rodzinna* [online]. Poland: Medical Communications Sp. z o.o., 14 (3), s. 277-281 [cit. 8. 3. 2023]. DOI: 10.15557/PiMR.2018.0030

THOMSEN, Simon F., 2015. Epidemiology and natural history of atopic diseases. *European Clinical Respiratory Journal* [online]. Copenhagen (Denmark): Taylor & Francis, 2 [cit. 19. 11. 2022]. DOI: 10.3402/ecrj.v2.24642

TOMČALOVÁ, Žaneta, 2014. Alergie – současné terapeutické možnosti. *Pediatric pro praxi* [online]. Olomouc: Solen s.r.o., 15(5), s. 280-286 [cit. 5. 2. 2023]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2014/05/07.pdf>

TUPPER, Jennifer, VISSER, Shaun, 2010. Anaphylaxis. A review and update. *Canadian Family Physician. Emergency Files* [online]. Canada: The College of Family Physicians of Canada, 56(10), s. 1009-1011 [cit. 27. 11. 2022]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2954079/#__ffn__sectitle

VAN REE, Ronald, 2014. Allergens – structure and function. In: *Global Atlas of Allergy*. Zürich (Switzerland): European Academy of Allergy and Clinical Immunology, s. 6-7. www.eaaci.org

VIRCHOW, J. Christian, 2013. What is asthma. In: *Global Atlas of Asthma*. Zürich (Switzerland): European Academy of Allergy and Clinical Immunology, s. 2-3. www.eaaci.org

VON BUBNOFF, Dagmar, GEIGER, Elisabeth, BIEBER, Thomas, 2001. Antigen-presenting cells in allergy. Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. Bonn (Germany): Mosby Inc., 108(3), s. 329-339 [cit. 26. 11. 2022]. DOI: 10.1067/mai.2001.117457

WOODFOLK, Judith A., 2006. T-cell responses to allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. Charlottesville (Virginia): Mosby, 119(2), s. 280-294 [cit. 29. 11. 2022]. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.11.008

ZHANG, Huiyun, et al., 2014. Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *Journal of translational medicine* [online]. Jinzhou (China): BioMed Central, 12:125 [cit. 29. 11. 2022]. Dostupné z: <https://translationalmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-12-125>

ZHANG, Yanni, ZHU, Kang, XIA, Cui, et al., 2022. Multiple-Cytokine Profiling: A Novel Method for Early Prediction of the Efficacy of Sublingual Immunotherapy in Allergic Rhinitis Patients. *Journal of Inflammation Research* [online]. China: Dove Medical Press, 15, s. 603-612 [cit. 14. 4. 2023]. DOI: 10.2147/JIR.S350003