

UNIVERZITA KARLOVA
FAKULTA FARMACEUTICKÁ
Katedra farmakologie a toxikologie

**Význam rekombinantních alergenů pro diagnostiku a
monitorování terapie alergie 1. typu**

(Rigorózní práce)

Hradec Králové, 2009

Mgr. Petra Eiglerová

OBSAH

1. ÚVOD	4
2. CÍL PRÁCE	5
3. IMUNOLOGICKÉ ZÁKLADY ALERGICKÉ REAKCE	6
3.1. ADAPTIVNÍ IMUNITA A TVORBA PROTILÁTEK	6
3.2. PORUCHY IMUNITNÍHO SYSTÉMU	8
3.3. IMUNOPATOLOGICKÁ REAKCE I. TYPU, ATOPIE	9
3.3.1. Alergie, atopie – vysvětlení pojmů	9
3.3.2. Úloha IgE v atopii	10
3.3.3. Alergická reakce	10
3.3.4. Regulace specifické imunitní odpovědi (T_H1 nebo T_H2)	14
3.3.5. Klinické projevy, nomenklatura nemocí (2004 WHO a WAO)	15
4. ALERGENY	18
4.1. PŘIROZENÉ ALERGENY A ALERGENOVÉ EXTRAKTY	20
4.1.1. Pylové alergeny	20
4.1.1. Zvířecí alergeny	23
4.1.1. Domácí alergeny	24
4.1.1. Potravinové alergeny	25
4.1.2. Jedy blanokřídlých	25
4.1.1. Využití alergenových extraktů	25
4.2. REKOMBINANTNÍ ALERGENY	26
4.2.1. Rekombinantní technologie	26
4.2.2. Využití rekombinantních alergenů ve výzkumu	27
4.2.3. Využití rekombinantních alergenů v diagnostice	28
4.2.4. Využití rekombinantních alergenů v terapii	30
4.2.5. Využití rekombinantních alergenů při monitorování průběhu terapie	31
5. DIAGNOSTIKA ATOPIE	32
5.1. <i>IN VIVO</i> DIAGNOSTIKA	32
5.1.1. Kožní testy	33
5.1.2. Provokační testy	33
5.1.3. Diagnostická eliminační dieta	34
5.2. <i>IN VITRO</i> DIAGNOSTIKA	34
5.2.1. Stanovení eozinofilie	34

5.2.2.	Stanovení celkového IgE	35
5.2.3.	Stanovení specifického IgE	35
5.2.4.	Další metody.....	37
5.3.	POROVNÁNÍ KOŽNÍCH TESTŮ A <i>IN VITRO</i> METOD	38
6.	TERAPIE ALERGICKÝCH CHOROB	40
6.1.	REŽIMOVÁ OPATŘENÍ A PODPŮRNÁ TERAPIE	40
6.2.	FARMAKOLOGICKÁ LÉČBA	41
6.2.1.	Preventivní terapie.....	41
6.2.2.	Úlevová, rychle účinná léčba.....	43
6.3.	KAUZÁLNÍ TERAPEUTICKÉ POSTUPY	44
6.3.1.	Specifická alergenová imunoterapie.....	44
6.3.2.	Další metody.....	47
7.	PRAKTICKÁ ČÁST	49
7.1.	METODICKÁ ČÁST	50
7.1.1.	Stanovení pozitivivity vybraných sér proti alergenům pylu břízy a bojínku metodou Pharmacia CAP SYSTEM™ Specific IgE FEIA	50
7.1.2.	Stanovení pozitivivity vybraných sér proti rekombinantním alergenům pomocí UniCAP® Specific IgE (Pharmacia Diagnostics)	52
7.1.3.	Charakterizace specifických protilátek IgE proti alergenům břízy a bojínku ve vybraných sérech metodou Immunoblottingu.....	54
7.2.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	55
7.2.1.	Stanovení hladin specifického IgE sér pacientů proti alergenům pylu řízy (t3) a bojínku lučního (g6).....	55
7.2.2.	Stanovení hladin specifického IgE proti rekombinantním alergenům Bet v 1, Bet v 2 a 4, Phl p 1 a 5, Phl p 7 a 12.....	57
7.2.3.	Charakterizace specifických protilátek IgE proti alergenům břízy a bojínku ve vybraných sérech.....	57
7.3.	VÝSLEDKY	59
7.3.1.	Porovnání hladin specifického IgE proti alergenům pylu břízy a bojínku s výsledky stanovení specifického IgE proti jednotlivým rekombinantním alergenům.....	59
7.3.1.	Charakterizace specifických protilátek v séru proti vybraným alergenům metodou imunoblotu.	66
8.	KLINICKÁ ČÁST	68
8.1.	METODIKA	68
8.2.	VÝSLEDKY (KAZUISTIKY)	73

8.2.1. Průběh hladin specifického IgE, IgG a IgG4 proti alergenům pylu břízy – pacienti skupiny A.	75
8.2.2. Průběh hladin specifického IgE, IgG a IgG4 proti alergenům pylu bojínku – pacienti skupiny B.....	83
9. DISKUZE	91
9.1. DISKUZE K DIAGNOSTICE	91
9.2. DISKUZE K MONITOROVÁNÍ PRŮBĚHU SIT	95
10. ZÁVĚR	103
11. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	104
12. LITERATURA	106

1. ÚVOD

Alergologie tvoří spolu s klinickou imunologií obor „Alergologie a klinická imunologie“, jehož úkolem je studium, diagnostika, léčba a prevence nemocí vyvolaných poruchami imunitních mechanismů nebo nemocí, na jejichž vzniku se imunologické mechanismy podílejí. Jedná se především o choroby z přecitlivělosti – alergie, ale patří sem také nejrůznější imunodeficiency a autoimunitní poruchy.

Výskyt alergických onemocnění má v posledních letech vzestupný charakter a dosahuje výskytu kolem 25 % v populaci vyspělých zemí.⁽¹⁾ Proto lze alergii bez nadsázky označit jako civilizační chorobu. Nárůst alergie má význam jak medicínský, tak sociální a ekonomický. Proto je důležitý rozvoj moderních postupů v diagnostice, léčbě i prevenci těchto chorob. Výzkum na tomto poli je velice rozsáhlý, složitý, nicméně důležitý jak pro pochopení patogenese alergické reakce, tak pro cílené farmakologické ovlivnění alergického zánětu a rozvoje nových rýsujících se směrů terapie pro budoucnost.

Stejně jako v mnoha jiných odvětvích biologie a medicíny se i v alergologii začínají uplatňovat rekombinantní technologie. Na molekulární úrovni jsou již definovány některé spouštěcí alergenové epitopy, což má velký význam pro výzkum i praxi.

Tyto nové metody umožňují další pokrok v diagnostice alergických onemocnění, kdy pomocí rekombinantních alergenů můžeme zpřesnit diagnostiku jak kvantitativně, tak i kvalitativně, měřit tedy hladiny IgE proti konkrétním antigenům, popř. odhalovat zkřížené reaktivity.

Nové možnosti se ukazují následně v terapii, kde by se mohly uplatňovat konkrétní, rekombinantní technologií získané, definované alergeny, které budou vhodnější například pro specifickou alergenovou imunoterapii než dosud používané alergenové extrakty. V popředí zájmu je i navrhování nových terapeutických postupů.

Další oblastí, kde se rekombinantní alergeny mohou uplatňovat, je monitorování průběhu specifické alergenové imunoterapie.

V této práci se zabývám právě využitím rekombinantních alergenů v diagnostice atopických chorob a jejím významem pro následné určení vhodné a racionální terapie, jakožto jejich užitím při monitorování efektivity této terapie.

2. CÍL PRÁCE

Problematika alergických onemocnění patří mezi zdravotnická témata s celospolečenskou působností. Prevalence atopie v současné lidské populaci neustále narůstá, současné odhady jsou okolo 25-30%. Klinických projevů atopie – alergických onemocnění – rovněž neustále přibývá a postihují populaci v celém věkovém spektru. Diagnostikou a léčbou alergických chorob v České republice se zabývá lékařský obor alergologie a klinická imunologie.

Svoji rigorózní práci jsem vypracovala na Centru imunologie a mikrobiologie Zdravotního ústavu se sídlem v Ústí nad Labem, kde se tento obor v celostátním měřítku před 35-ti lety zakládal.

Cílem rigorózní práce je podat základní informaci o diagnostice alergických onemocnění metodami *in vivo* a *in vitro* se zaměřením na význam vyšetření hladin specifických protilátek IgE, IgG resp. IgG4 u atopických pacientů proti rekombinantním formám alergenů. Tyto postupy do rutinní praxe teprve pronikají a měly by pomoci k přesnějšímu určení zdrojů senzibilizace atopického pacienta a stanovení diagnózy. Dále pak k zavedení cílené alergenové imunoterapie a jejímu monitorování.

V praktické části budou zpracovány výsledky vyšetření specifického IgE proti některým rekombinantním alergenům pylu břízy (rBet v 1, 2 a 4) a bojínku lučního (rPhl p 1, 5 a 7, 12) u sér pacientů pozitivních na alergeny pylu břízy (t3) a bojínku (g6) shromažďovaných v roce 2003-2006. Séra budou vybrána na základě positivity ke směsi trav gx1 (srha, kostřava, jílek, bojínek, lipnice), gx3 (tomka vonná, troskut prstnatý, jílek, bojínek, širok halepský) a směsi alergenů stromů tx9 (olše, bříza, líska obecná, buk lesní, dub, jilm, platan, vrba bílá, jasan).

Vybraná séra pak budou vyšetřena na přítomnost specifického IgE metodou imunoblotu k porovnání reaktivity vyšetřovaných sér v testu s rekombinantními alergeny.

V klinické části práce bude zhodnoceno využití rekombinantních alergenů pro monitorování specifické imunoterapie pacientů z běžné alergologické ambulance, kterým byla v roce 2001-2009 aplikována specifická alergenová imunoterapie. Na podkladě sledování hladin alergen specifických protilátek izotypů IgE, IgG resp. IgG4 lze předpokládat, že analýza atopické reaktivity *in vitro* těchto pacientů (pomocí rekombinantních alergenů) může i dodatečně přinést údaje o pravděpodobnosti, s jakou nasazená SIT mohla příznivě ovlivnit regulaci atopické imunologické reakce.

3. IMUNOLOGICKÉ ZÁKLADY ALERGICKÉ REAKCE

Imunitní systém člověka je tvořen složkou přirozené (nespecifické) obranyschopnosti, která zabezpečuje první, rychlou odpověď na cizorodé struktury. Podílejí se na ní především buňky jako monocyty, žírné buňky a bazofily, neutrofilní a eozinofilní granulocyty, NK buňky a humorální složky jako je komplementový systém, interferony, cytokiny a další. V druhé linii pak nastupují mechanismy adaptivní (specifické) imunity, jejímiž hlavními představiteli jsou lymfocyty.

Komunikaci a regulaci mezi složkami imunity zajišťují adhezivní molekuly (selektiny, integriny) a různé cytokiny a buňky. Vzájemná provázanost a koordinovanost tohoto systému zajišťuje adekvátní reakci na škodliviny vnitřního i vnějšího původu a zároveň toleranci k neškodnému.

Pro tuto práci se v následujících kapitolách jen zmíním o protilátkové odpovědi a především o imunoglobulinu E, který má zásadní význam pro diagnostiku, kterou se v rigorózní práci zabývám. Dále uvedu základní regulační pochody uplatňující se při vzniku atopie.

3.1. ADAPTIVNÍ IMUNITA A TVORBA PROTILÁTEK

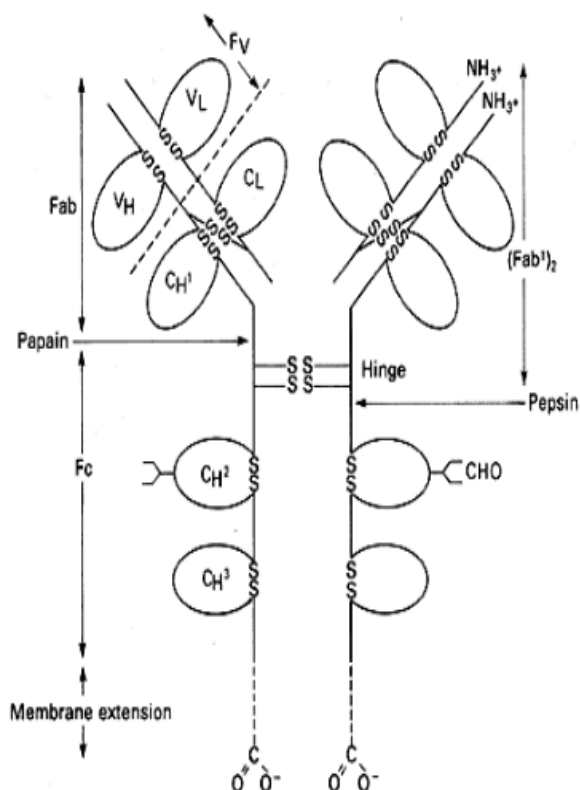
Specifickou imunitní odezvu organismu zprostředkovávají dva typy buněk: B lymfocyty a T lymfocyty. Zatímco T buňky zodpovídají za regulační funkce a cytotoxické reakce imunitního systému, B lymfocyty jsou zodpovědné za syntézu protilátek – imunoglobulinů (tzv. humorální imunita).

Než může lymfocyt tvořit protilátky, musí být nejdříve aktivován navázáním antigenu na specifický receptor na jeho povrchu a pod vlivem IL-2 a dalších cytokinů vyvrát v plazmatickou buňku. Pro stimulaci B lymfocytu k tvorbě protilátek je pak nezbytná spolupráce několika buněk a kostimulačních faktorů – tzv. vícesignálová teorie. Uplatňuje se zde přímý kontakt aktivovaného T lymfocytu s B lymfocylem prostřednictvím adhezivních a kostimulačních molekul a cytokinů. Navázání kostimulačního receptoru CD40 (povrch B lymfocytu) s jeho ligandem CD40L na povrchu TH lymfocytu je signálem pro započetí buněčného dělení a vzniku paměťových buněk a/nebo právě přepisu genů pro imunoglobulin.

Imunoglobuliny dělíme dle struktury jejich těžkých řetězců do pěti tříd – IgG, IgA, IgM, IgD a IgE.

Základní jednotka všech imunoglobulinů je složena z dvou lehkých a dvou těžkých řetězců, které jsou spojeny disulfidickými můstky. Tyto můstky se objevují také v rámci jednoho řetězce a stáčí tak molekulu do kruhové smyčky – tzv. domény. Dva kratší, lehké řetězce (L) mají jednu doménu v konstantní (CL) a jednu ve variabilní oblasti (VL). Dva delší, těžké řetězce (H) obsahují také variabilní oblast (VH) s jednou doménou a konstantní oblast (CH) je tvořena třemi doménami. (viz Obr. 1)

Variabilní oblasti jsou umístěny na amino-koncích, zatímco konstantní části na karboxy-koncích peptidů. Variabilní domény se svou globulární strukturou jsou zodpovědné za vazbu specifického antigenu. Tedy na molekule můžeme rozlišit tzv. Fc (krystalizující) fragment, který je tvořen konstantními oblastmi těžkých řetězců a je zodpovědný za efektorové funkce jako například vstup placentou pro IgG, vazba na povrchy buněk imunitního systému, aktivace komplementu apod. Zbytek molekuly je schopen vázat specifický antigen – jsou to dva Fab (antigen binding) fragmenty. Oblast, která spojuje tyto tři části, se nazývá pantová (hinge oblast).⁽²⁾



Obrázek 1. Struktura molekuly imunoglobulinu⁽⁷¹⁾

Jak bylo řečeno výše, třídu imunoglobulinu určuje typ těžkého řetězce, takže IgA má v molekule řetězec α , IgG řetězec γ atd. Rozlišujeme je dále na podtřídy (např. $\gamma 1 - \gamma 4$ odpovídá IgG1 – IgG4). Lehké řetězce se vyskytují pouze ve dvou typech – κ nebo λ (a subtypy $\lambda 1 - \lambda 4$), přičemž v jedné molekule protilátky nejsou tyto dva nikdy smíšené, vždy se vyskytují oba řetězce téže sekvence.

Tabulka 1 uvádí uspořádání řetězců a některé vlastnosti jednotlivých imunoglobulinů.

Tabulka 1. Imunoglobuliny

<i>Třída</i>	<i>Vyskytuje se jako:</i>	<i>Vlastnosti</i>	<i>Funkce</i>
IgG	monomer	hlavní Ig séra, extravaskulárních prostor, jediný prochází placentou, podtřídy se liší počtem disulfidických můstků a	opsonizace, aktivace komplementu, sekundární protilátková reakce
IgM	spojen v pentamer J řetězcem, vzácně i jako monomer	první Ig tvořený plodem a buňkami po stimulaci antigenem, exprimován na membráně B	aktivace komplementu, primární protilátková reakce
IgA	v séru monomer, v sekretech dimer se spojujícím	druhý nejčastější, Ig slz, slin, na povrchu sliznic, kolostrum	slizniční imunita, opsonizace
IgD	monomer	v séru, na povrchu B lymfocytů	receptor pro antigen na B lymfocytu
IgE	monomer s extra doménou v konstantním těžkém řetězci	obvyčně velmi nízké hladiny, stoupají při alergických onemocněních	ochrana proti parazitům, zvýšené hladiny při parazitárních onemocněních-aktivace eosinofilů

Po stimulaci tvoří lymfocyt nejdříve především imunoglobuliny třídy IgM, až pak, v průběhu tzv. izotypového přesmyku, se tvoří ostatní protilátky (reagující s tímtož antigenem, kterým byl lymfocyt stimulován). Obvykle se v této fázi tvorby protilátek, která je založená na obměně genu nesoucího informaci pro vznik molekuly imunoglobulinu, tvoří nejvíce IgG a IgA protilátek. Avšak nastane-li převaha regulačního působení TH2 buněk, dochází pak k navýšení syntézy IgE.⁽³⁾

Tato dysregulace mezi TH1 a TH2 aktivitou bývá nalézána u atopiků, kde je koncentrace IgE protilátek průměrně 10krát – 100krát vyšší oproti neatopické populaci. Proto také jednou z metod diagnostiky imunopatologické reakce 1. typu (atopické reakce) bývá stanovení koncentrace IgE, případně specifického IgE v krevním séru pacienta.

3.2. PORUCHY IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Z hlediska povahy poruch imunity rozlišujeme choroby autoimunitní, imunodeficiencie a choroby alergické.

O **autoimunitních chorobách** hovoříme tehdy, když imunitní systém tvoří kontinuálně protilátky proti antigenům vlastního těla, popř. aktivuje T lymfocyty. Manifestně se pak projevují buď jako systémové nemoci (postihují v organismu více orgánových systémů) jako je systémový lupus erythematosus nebo revmatoidní artritida a další nemoci postihující jednotlivé orgány, například Basedowova choroba, myasthenia gravis, perniciózní anemie.

Jako *imunodeficiencie* označujeme řadu defektů imunitního systému, kdy je poškozena schopnost organismu bránit se i banálními infekcemi a určitým nádorovým onemocněním, ať už na podkladě genetickém nebo na základě získaného onemocnění (např. AIDS).

Specifické nadměrné reakce imunitního systému na cizorodé antigeny označujeme jako stav *přecitlivělosti – alergie*.

Z hlediska patogenetického je možné rozlišit čtyři (podle některých autorů pět) základní typy imunopatologických reakcí, označovaných běžně v učebnicích jako dělení podle Coombsa a Gella, které se uplatňují u různých druhů alergických nemocí, ale také v případě chorob autoimunitních (upraveno dle⁽⁴⁾):

- Imunopatologická reakce **I. typu** – neboli časná, protilátkami IgE zprostředkovaná přecitlivělost vyvolává anafylaxi nebo alergii v užším slova smyslu (viz kap. 3.3.)
- Imunopatologická reakce **II. typu** – neboli cytotoxická, kdy antigen (např. hapten - molekula léku) vázaný na povrchu buňky (např. krevních elementů) reaguje s protilátkami a tím dochází k opsonizaci buňky a následné aktivaci komplementu a cytolýze (NK buňky). Vyskytuje se u některých hemolytických anemií (polékový typ), dále jako Goodpasterův syndrom, rychle progredující glomerulonefritida a další.
- Imunopatologická reakce **III. typu** – imunokomplexová, při které se imunokomplexy ukládají v různých tkáních (glomeruly, klouby, kůže...) a následně dochází k poškození těchto tkání aktivovanými neutrofily (SLE, glomerulonefritida).
- Imunopatologická reakce **IV. typu** – tzv. reakce oddáleného typu, pozdní přecitlivělost, kdy antigen je nejprve fagocytován makrofágy a prezentován TH buňkám. Tato senzitivace trvá přes pět dní. Při druhém kontaktu dochází pak k silné zánětlivé reakci, při níž může být zničena vlastní (nebo transplantovaná) tkáň ve velkém rozsahu (např. primární odvržení transplantátu).
- Imunopatologická reakce **V. typu** – tzv. receptorová reakce, kde autoprottilátky reagují s receptorovými molekulami v membránách buněk, čímž je stimulují či blokují. Jedná se o receptory pro neurotransmitery nebo hormony.

3.3. IMUNOPATOLOGICKÁ REAKCE I. TYPU, ATOPIE

3.3.1. Alergie, atopie – vysvětlení pojmů

Alergologické názvosloví rozlišuje v současné době pojmy ATOPIE a ALERGIE:

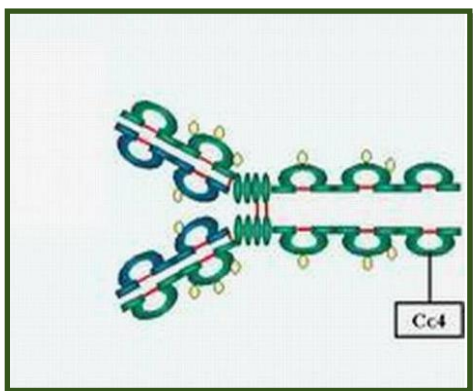
- **Atopie** vyjadřuje genetickou predispozici pro vznik senzibilizace a následné alergické reakce. Atopie⁽⁵⁾ je geneticky předurčený sklon k zvýšené tvorbě protilátek IgE jako odpověď již na nízké dávky alergenů, které u normální populace tuto nežádoucí odezvu nedávají.
- Pojem **alergie** označuje již vzniklý klinický projev alergického onemocnění.

Člověk, který je atopický, nemusí mít nutně klinicky vyjádřené alergické onemocnění.

Nositelů genů pro alergii (=atopiků) je v populaci kolem 35 %, na rozdíl od klinicky se projevujících alergiků, kterých je kolem 25 % v populaci vyspělých zemí.(1 =Špičák, 2005) (1)

3.3.2. Úloha IgE v atopii

Alergická reakce časného typu bývá nazývána reakcí závislou na IgE, protože protilátky IgE hrají významnou roli při atopických onemocněních, kdy nalézáme jejich vyšší hladiny v krevním séru. Na první pohled se IgE od ostatních imunoglobulinů odlišuje tím, že jeho těžký řetězec obsahuje 5 domén, na rozdíl od ostatních imunoglobulinů, které mají v tomto řetězci domény 4. V konstantní části těžkého řetězce nalezneme tedy u IgE jednu doménu navíc (Obr. 2). Molekula IgE je homocytotropní, což znamená, že se svým Fc fragmentem váže na Fc receptory na vlastních buňkách. Významná je zejména vazba na vysokoafinitní receptory FcεRI, které se nacházejí na mastocytech a bazofílech a přímo zprostředkovávají degranulaci těchto buněk v případě, že se dvě takto navázané molekuly IgE přemostí alergenem, který právě tvorbu IgE vyvolal.⁽⁶⁾ Při degranulaci pak dochází k uvolnění histaminu, serotoninu a dalších mediátorů a cytokinů.



Obrázek 2. Molekula IgE⁽⁷²⁾

Imunoglobulin E však není jediným ani primárním faktorem podílejícím se na alergické reakci, nicméně hraje ústřední roli, která je pro tuto reakci typická, a proto má svůj význam diagnostický.⁽⁶⁾

3.3.3. Alergická reakce

Do mechanismu rozvoje alergické zánětlivé odpovědi je zapojena řada buněk (žírné buňky, eozinofily, bazofily, fibroblasty, buňky endotelové a další), které spolu komunikují prostřednictvím cytokinů, enzymů, adhezivních molekul a neuropeptidů.

Hlavní buňky a mediátory alergické odpovědi

Hlavní mediátorovou buňkou alergické reakce I. typu je *mastocyt*, žírná buňka, která uvolňuje mediátory zánětu svou degranulací záhy po navázání molekul IgE na svůj Fc receptor a jejich přemostění alergenem. K dalším důležitým buňkám patří:

- *Makrofágy*
- *T lymfocyty*
- *Eozinofily* (důležité především pro pozdní fázi)
- *Bazofily*

Z uvolněných mediátorů jsou nejvýznamnější *histamin*, *serotonin* a *proteázy* jako mediátory časně fáze a metabolity kyseliny arachidonové (*prostaglandiny*, *tromboxan A2* a *leukotrieny*), cytokiny (*IL-3*, *IL-4*, *IL-5*, *TNF α* , *PAF*) jako mediátory pozdní odpovědi.

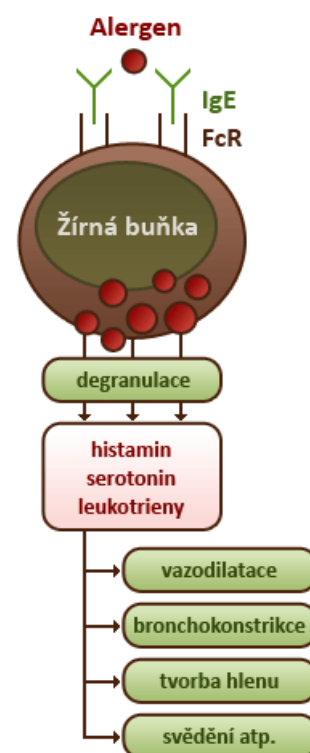
Histamin je silný mediátor alergických reakcí, který:

- působí jako vazoaktivní látka
- působí jako spazmogenní látka
- působí prozánětlivě
- má přímý vliv na TH2 buňky

Pod jeho vlivem dochází ke kontrakci hladké svaloviny bronchů, střeva a dělohy, ke zvýšení permeability kapilár (erytém, edém, pokles tlaku krve), zvýšení tvorby hlenu na nosní sliznici; vyvolává kopřivku, exantém, alergickou rýmu, zánět spojivky. Při systémovém postižení více orgánů může dojít až k život ohrožujícímu anafylaktickému šoku.

Fáze alergické odpovědi

Potenciál patologické odpovědi se rozvíjí při počátečním kontaktu – senzibilizaci, kdy dochází ke stimulaci diferenciace řady buněk a k jejich akumulaci. Při opakované expozici pak dojde během několika vteřin až minut (časná fáze, fáze histaminová) k rychlému uvolnění a novotvoření vazoaktiv-

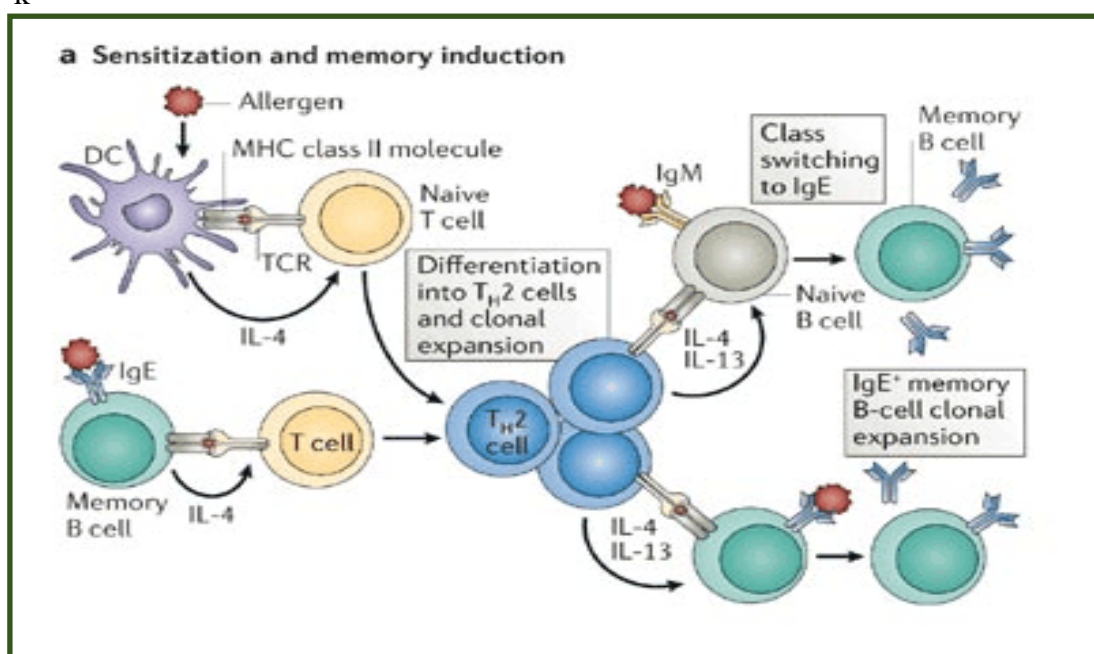


Obrázek 3. Přemostění dvou IgE protilátek alergenem⁽⁷³⁾

ních mediátorů zánětu ze žírných buněk obsazených IgE - viz Kap. 3.3.2. a Obr. 3.

Na tuto fázi pak navazuje fáze pozdní, která vzniká během několika hodin (3 - 11). Při ní dochází k uvolňování dalších de novo syntetizovaných mediátorů (prostaglandiny, tromboxan A2, leukotrieny, cytokiny IL-3, IL-4, TNF α , PAF...). Dalším důsledkem je také migrace „přilákaných“ prozánětlivých eozinofilů a neutrofilů do cílové tkáně. Dochází k rozvoji eozinofilního zánětu a následně ke strukturálním změnám ve sliznicích i v kůži. Podrobněji zachycují jednotlivé fáze Obrázky 4-6⁽⁷⁾, popis v textu.

- a) **Senzitizace** k danému alergenu a vývoj specifické paměti B buněk a T buněk. Diferenciace a klonální expanze alergenu specifických TH2 buněk vede k produkci cytokinů

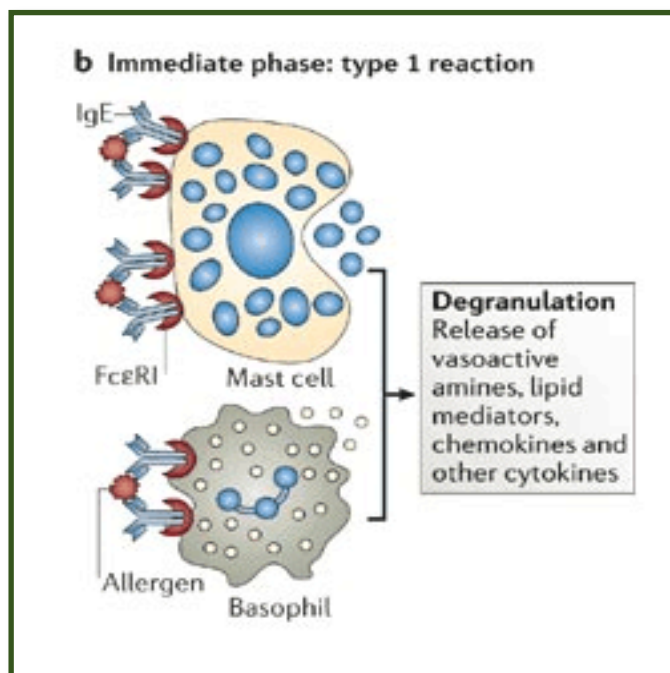


.Obrázek 4. Fáze alergické odpovědi a)⁽⁷⁾

4

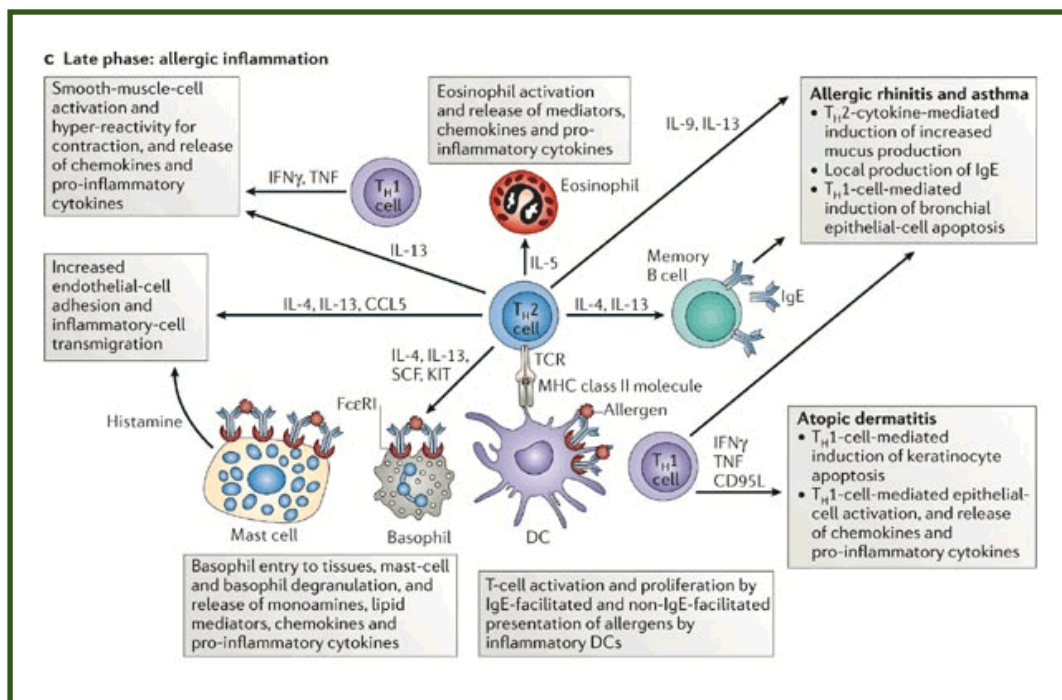
a IL-13), které navozují přesun imunoglobulinové řady k IgE a k množení populace naivních IgE+ paměťových B buněk. IgE na povrchu takovéto IgE+ specifické B buňky a dalších IgE-citlivých antigen prezentujících buněk usnadňují prezentaci antigenu.

- b) **Časná fáze** - přecitlivělostní reakce 1. typu. Přemostění Fc ϵ RI (vysokoafinitní receptor pro IgE) a navázané IgE protilátky alergeny na povrchu mastocytu a bazofilu vede k degranulaci a uvolnění vazoaktivních aminů (histamin), metabolitů kyseliny arachidonové (PGD, PAF, LTC $_4$, LTD $_4$ a LTE $_4$), a cytokinů (IL-4, IL-5, IL13) a dalších chemokinů. Tato fáze je nazývána časnou nebo také histaminovou fází.



Obrázek 5. Fáze alergické odpovědi b) ⁽⁷⁾

- c) **Pozdní fáze** alergické odpovědi – alergický zánět. Pod vlivem chemokinů a dalších cytokinů následuje migrace prozánětlivých buněk k místu expozice alergenem. Aktivují se alergen specifické T buňky a začínají se dělit. Místní produkci IgE nalézáme u alergické rinitidy a astma, ne však při alergickém zánětu kůže (atopická dermatitida). Eozinofily jsou jedny z hlavních zánětlivých buněk (až 50% zánětlivého infiltrátu) v plicích astmatika, ale ne v kůži při atopické dermatidě (pouze 1-2% infiltrátu). TH1 buňky, které produkují IFN γ a TNF, přispívají k aktivaci a apoptóze keratinocytů (v kůži), bronchiálních epiteliálních buněk a buněk hladké plicní svaloviny (hyperreaktivita). Aktivace mastocytů a bazofilů, které uvolňují histamin, chemokiny a další cytokiny také dále přispívají k pozdní fázi alergické reakce.⁽⁷⁾



Obrázek 6. Fáze alergické odpovědi c) ⁽⁷⁾

3.3.4. Regulace specifické imunitní odpovědi (T_H1 nebo T_H2)

Hlavní regulační buňkou specifické imunitní odpovědi je T_H (helper) lymfocyt. Jeho regulační funkce se uskutečňuje prostřednictvím různých cytokinů nebo i přímo. Do primární imunitní reakce vstupují naivní $TH0$ lymfocyty a pod vlivem cytokinů z makrofágů, NK buněk, žírných buněk, bazofilů nastává jejich diferenciace.

Zjednodušeně, vlivem cytokinů z $TH1$ buněk (IFN γ) nebo NK buněk (IL-12) vznikají $TH1$ lymfocyty, pod vlivem cytokinů z $TH2$ buněk (IL-4) nebo žírných buněk (IL-4) se mění v $TH2$ lymfocyty. Navzájem pak cytokiny $TH1$ lymfocytů potlačují vznik $TH2$ buněk a naopak, což je jeden z významných regulačních mechanismů imunitního systému. Podrobný mechanismus regulace je však mnohem složitější, a naše dosavadní znalosti nejsou zcela úplné. ⁽⁸⁾

U zdravého dospělého jedince je fyziologická mírná převaha $TH1$ lymfocytů. Pokud však nedojde k vyváženému rozvoji obou základních subpopulací TH buněk, převáží-li subpopulace $Th2$, která nasměrovává imunitní odpověď k tvorbě protilátek, dochází ke vzniku atopie.

TH2 odpověď je spojena se zvýšenou produkcí IL-4 a IL-5, což směřuje k protilátkové odpovědi – tvoří se specifické IgE protilátky, aktivují se žírné buňky, nalézáme větší hladiny eozinofilů. ⁽⁹⁾

Naproti tomu převaha TH1 je charakteristická produkcí INF γ a IL-12, které aktivují makrofágy a NK buňky a vedou tak k buněčné odpovědi. Vedle toho (v souvislosti se zaváděním SIT) dochází k potlačení tvorby alergen specifických IgE protilátek a ke zvýšené tvorbě IgG (především IgG4) a IgA. Tyto jsou považovány za tzv. „blokuující“ protilátky, které kompetitivně brání interakci alergenu s IgE na povrchu žírných buněk a tím i aktivaci komplementu. Zabraňují takto spuštění alergické reakce (nedojde k uvolnění histaminu). ⁽¹⁰⁾

Významnou roli v regulaci imunitní odpovědi TH1/ TH2 směrem hrají také další regulační buňky – především tzv. Treg a TH3 lymfocyty. Tvorbou cytokinů (např. IL-10, TGF β) s regulačními a protizánětlivými účinky působí supresivně na TH2 subpopulaci a směřují odpověď TH1 cestou a tak potlačují rozvoj alergických typů imunitní odpovědi a udržují imunologickou toleranci. Pod vlivem cytokinů uvolňovaných Treg lymfocyty nastává také zvýšená syntéza blokujících IgG4 protilátek a redukce IgE. Toto je možné sledovat například v průběhu SIT.

U atopických osob nalézáme sníženou aktivitu těchto regulačních buněk.

3.3.5. Klinické projevy, nomenklatura nemocí (2004 WHO a WAO)

Alergická reakce má nejrůznější projevy, které se mohou objevit na různých místech těla, orgánech a s různou intenzitou. Dochází k zánětu, jehož výsledkem je tvorba hlenu, otok, zarudnutí či spasmus hladkých svalů, a který má často chronický, vleklý charakter. Orgánový příznak, který považujeme za projev alergie, není jen místní orgánovou patologií, ale vyjádřením systémové reakce. V návaznosti na genotyp se projeví klinickým fenotypem na kůži, na spojivce, v nose nebo v bronších. ⁽¹¹⁾

Nomenklatura a projevy nemocí (upraveno dle ⁽¹¹⁾):

Alergická rinitida je nejběžnějším klinickým projevem atopické přecitlivělosti. Reakce je lokalizovaná v nosní sliznici a spojivce (proto někdy hovoříme o rinokonjunktivitidě). Spouštěcím faktorem jsou vzdušné alergeny jako pyly, plísňe, zvířecí srst apod. Jedná se o chronické, obtěžující onemocnění, které je charakteristické svými záchvaty kýchání, svěděním a vodnatou rýmou a/nebo blokádou nosních průduchů. Dělí se dle trvání příznaků na intermitentní a perzistující, (případně ještě na sezónní a celoroční). Často alergická rinitida předchází pozdějšímu rozvoji astmatu.

Astma (podle definice GINA) je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, na němž se účastní mnoho buněk, zvláště žírné buňky, eozinofily a T lymfocyty. U citlivých jedinců je zánět příčinou opakovaných stavů hvízdavého dýchání, zkráceného dechu, dechové tísně a kašle zvláště v noci a/nebo časně ráno. Příznaky jsou většinou spojeny s variabilní obstrukcí dýchacích cest, která je alespoň částečně reverzibilní spontánně nebo po léčbě. Zánět je také příčinou zvýšení bronchiální hyperreaktivity na řadu podnětů.

Alergické astma základní pojem pro astma zprostředkované imunologickými mechanismy. Pojem „IgE zprostředkované astma“ je doporučován tehdy, když je skutečně prokázán IgE zprostředkovaný mechanismus. IgE protilátky mohou navodit okamžitou i pozdní astmatickou reakci. Podobně jako u jiných alergických chorob se ovšem reakce spojené s T lymfocyty jeví důležité u pozdních a opožděných reakcí. Podle trvání příznaků se astma označuje jako intermitentní nebo perzistující.

Nealergické astma – tento pojem se přednostně používá pro ne-imunologické typy astmatu. Staré pojmy „extrinsic“, „intrinsic“, „exogenní“ a „endogenní“ by neměly být už dále používány k odlišení alergického a nealergického astmatu.

Konjunktivitida - IgE zprostředkovaná alergická konjunktivitida většinou provází alergickou rýmu. Vedle tohoto typu se vyskytuje alergická kontaktní konjunktivitida, imunologicky založená na TH1 mechanismu.

Rinokonjunktivitida - příznaky imunologicky zprostředkované reakce přecitlivělosti v nose a očních spojivkách mají být označovány jako alergická rinokonjunktivitida. Většina případů je IgE zprostředkovaná. Opět se rozlišuje podle trvání příznaků na intermitentní a perzistující formu.

Dermatitida - všeobecný pojem pro místní kožní zánět. To, co je všeobecně známé jako „atopický ekzém/dermatitida“, není jedno onemocnění, ale spíše spojení několika nemocí s některými společnými charakteristikami. Mnohem vhodnějším je pojem ekzém. Atopická dermatitida může vzniknout buď lokálním drážděním pokožky, nebo být aktivována hematogenní cestou po požití vyvolávajícího alergenu. Podskupina s vazbou na alergické astma a rinokonjunktivitidu, tedy ekzém u jedince atopické konstituce, by měl být označen jako atopický ekzém. Těsný kontakt s nízkomolekulárními chemickými látkami (nikl, chrom, formaldehyd) může vyvolat alergickou kontaktní dermatitidu zprostředkovanou především TH1 lymfocyty. Nealergická varianta může být označena jako iritační/toxická kontaktní dermatitida.

Na závěr bych zmínila akutní celkovou hypersenzitivní reakci I. typu, kdy mluvíme o anafylaxi, která může být extrémním vyústěním kontaktu s větším množstvím alergenu nebo po kontaktu s alergenem nefyziologickou cestou (kontakt krevní cestou) a včas neřešená se může projevovat snížením základních životních funkcí a tudíž ohrozit pacienta na životě – ***anafylaktický šok***.

Klinické příznaky alergických chorob se někdy nemusí lišit od postižení neatopické povahy, kde nelze prokázat imunologický mechanismus. Je proto úkolem alergologa a klinického imunologa potvrdit nebo vyvrátit alergii, případně určit typ specifického imunologického mechanismu, odhalit spouštěče reakce.

4. ALERGENY

Alergická reakce je nepřiměřenou reakcí imunitního systému na nejrůznější látky – alergeny, které u zdravého člověka tuto poruchu nevyvolají. Alergeny mohou být glykoproteiny (většinou o molekulové hmotnosti 5 až 100 kD), ale také některé jednoduché chemické látky. Mezi nejčastější alergeny patří pyly, součásti těl živočichů a jejich produkty, bakterie či plísně. Podle vstupu alergenu do organismu může alergie probíhat buď lokálně, nebo systémově - od lehké vyrážky, rinitidy, až po závažný anafylaktický šok.

Aby byl alergen schopen vyvolat alergickou reakci, musí obsahovat epitop pro B lymfocyt, na který se může navázat IgE, a epitop schopný navodit TH2 lymfocytární odpověď.⁽¹²⁾

Základní nomenklatura alergenů se dnes opírá o následující pravidla (WHO/IUIS): jméno se skládá z prvních tří písmen latinského rodu, pak následuje první písmeno druhu a číslo, které vyjadřuje, v jakém pořadí došlo k purifikaci.

Hlavní a vedlejší alergeny

Obvykle první objevené alergeny patří mezi tzv. hlavní – majoritní. Majoritní alergen je taková složka extraktu, která představuje více než 50 % biologické aktivity pro více než 50 % reagujících pacientů.

U podstatné většiny alergiků (asi přes 90%) nalézáme právě specifické IgE proti hlavním alergenům příslušného biologického druhu. Tyto alergeny bývají zastoupeny s největší pravděpodobností v testovacích i laboratorních standardech.

Ostatní (minoritní) alergeny nemusí být přítomny v komerčních testovacích látkách, ale mohou být příčinou například zkřížené alergie v rámci stejné třídy nebo i mezi biologicky velmi odlišnými druhy. Většinou proti těmto minoritním alergenům reaguje pouze 5 – 20% pacientů alergických na daný biologický druh.

Panalergeny

V souvislosti se vznikem zkřížených alergií mluvíme o panalergenech. Zkřížená alergie může vznikat u alergenů, u kterých nalézáme podobnost (homologii) v bílkovinné sekvenci a to minimálně 50%. Objevuje se u alergenů hlavních i vedlejších a to v rámci jednotlivých druhů nebo napříč druhovými spektry.

V případě homologií s víc jak 80% překrytím již hovoříme o panalergenech. V současné době jsou definovány panalergeny:

Profilin (viz dále), vápník vázající protein (odpovídá vedlejšímu alergenu bojínku Phl p 7 a břízy Bet v 4), tropomyozin (zkřížená alergie mezi korýši, měkkýši, hmyzem a roztoči), lipid transfer protein (mezi ovocem, stromovými ořechy, zeleninou), parvalbuminy a další.⁽⁶⁾

Profilin je asi nejvýznamnější panalergen a je zodpovědný za zkříženou alergii mezi břízovitými a potravinovými alergeny. U břízy odpovídá minoritnímu alergenu Bet v 2, u burského oříšku Ara h 5, celeru Api g 4, hrušky Pyr c 4, třešně Pru a 4 a u bojínku lučního Phl p 12. Oproti hlavnímu alergenu břízy Bet v 1 vyvolává Bet v 2 (profilin) často příznaky celkové požití. Dle některých autorů je to dáno především vyšší stabilitou, odolností k proteolýze při trávení.⁽¹³⁾

Jeho molekulová váha je kolem 14,5 kDa a u alergiků na břízu a na rostlinné potraviny prokazujeme specifické IgE protilátky proti profilinu až ve 20%.

Zkřížená alergie

Znalosti o možnostech zkřížené reaktivity mezi nejrůznějšími druhy rostlin i živočichů nabývají stále většího významu. Napomáhá tomu také rozvoj v odhalování alergicko-imunologických pochodů na molekulární úrovni v několika posledních desetiletích. Dnešními technologiemi dovedeme rozložit alergeny až na jednotlivé aminokyseliny a objevit kritická místa vazby (epitopy) s IgE protilátkou. To umožnilo mimo jiné objasnit podstatu zkřížených alergií.

Zkřížená alergie vzniká na základě podobnosti – homologii alergenů. To znamená, že musí být významná shoda (většinou víc než 70%) v sekvenci aminokyselin alergenů třeba i různých biologických druhů. V důsledku toho protilátky IgE namířené proti jednomu alergenu reagují také s druhým alergenem, který je obsažen v jiném, druhově příbuzném nebo i vzdáleném zdroji. Například nejčastější zkřížená alergie mezi potravinami a inhalačním alergenem je zkřížená alergie s pylem, u které dochází primárně k tvorbě IgE protilátek proti pylu a ke klinickým projevům pylové alergie a často až po letech se začne objevovat zkřížená potravinová alergie.⁽¹⁴⁾

Dnes, díky genovému inženýrství dovedeme do epitopů mutageně vstupovat a ovlivnit tak původní alergenicitu a imunogenitu antigenu. Tento pokrok má velký význam pro pochopení vztahů nazývaných zkříženou alergií, které jsou častou příčinou diagnostických i léčebných omylů.

4.1. PŘIROZENÉ ALERGENY A ALERGENOVÉ EXTRAKTY

4.1.1. Pylové alergen

Pyly patří k nejvýznamnějším alergenům vnějšího prostředí. Příčinou obtíží jsou pylová zrna z prašníků samčích rostlin. Ta jsou velice snadno roznášena větrem na velké vzdálenosti a vyvolávají postižení horních cest dýchacích, očních spojivek, u některých pacientů i dolních cest dýchacích – „pylové astma“. Objevit se také může exantém, angioedém, urtikarie, ekzém, projevy gastrointestinální, orální alergický syndrom, pseudorevmatické obtíže.

V patogenezi polinózy (pylové alergie) se uplatňují následující fáze:

pylový alergen je zpracován po vstupu do organismu makrofágy a dendritickými buňkami.

nadprodukované specifické IgE protilátky se váží na Fcε receptor na povrchu žírných buněk a bazofilů.

aktivace buňky v případě, že dojde k přemostění dvou sousedících molekul alergenem a tím modifikaci Fc receptorů.

degranulace s uvolněním mediátorů (nejdříve histamin, tryptáza, bradykinin, poté novotvořené leukotrieny, prostaglandiny a PAF).

vlivem uvolněných mediátorů dochází k bronchospasmu, vazodilataci, zvýšení tvorby hlenu, slizničnímu edému a k další chemotaxi.

projevy orgánového nebo systémového postižení (časná fáze za 5 - 20 minut, reakce opožděná po 3 - 11ti hodinách a reakce pozdní za 24 - 48 hodin). V časně fázi se z mediátorů uplatňuje především histamin, dále leukotrieny, prostaglandiny, PAF a další chemotaktické faktory. Tato fáze je zcela reverzibilní. Pozdní fáze je pak provázena zvýšenou aktivitou eozinofilů a narušením slizniční integrity proteolytickými enzymy. Následkem je pak hyperreaktivita takto postižených tkání. ⁽¹⁵⁾

Alergenní potenciál je vyšší u pylů anemofilních rostlin, které jsou lehké a rostliny jich produkují velké množství. Jsou to pyly stromů, keřů, trav, obilí, plevelů a bylin.

Hmyzosprašné rostliny produkují malá množství těžkých pylů, které se vzduchem nešíří na velké vzdálenosti, a proto je menší pravděpodobnost, že ulpí na sliznicích člověka. Z toho tedy vyplývají kritéria, podle kterých můžeme posoudit schopnost pyly vyvolat

senzibilizaci a následně alergickou reakci: musí jít o pyl větrosprašné rostliny, který je produkován ve velkém množství, je dostatečně lehký pro přenos větrem na velké vzdálenosti a musí obsahovat antigenní složku, která je schopná vyvolat senzibilizaci.

Některé pylové alergeny jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2. Některé pylové alergeny⁽⁶⁾

<i>Vybrané pylové alergeny</i>	
<i>Alnus glutinosa</i>	<i>Aln g 1</i>
<i>Corylus avellana</i>	<i>Cor a 1</i>
<i>Betula verrucosa</i>	<i>Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4</i>
<i>Olea europaea</i>	<i>Ole e 1, Ole e 2</i>
<i>Phleum pratense</i>	<i>Phl p 1, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 12</i>
<i>Ambrosia trifida</i>	<i>Amb t 5</i>
<i>Artemisia vulgaris</i>	<i>Art v 1, Art v 2, Art v 3</i>

Pylový kalendář

Pylovou sezónu rozdělujeme v našich podmínkách na tři hlavní období (Obr. 7). V jarním období dominují pyly stromů, v letním jsou to pyly trav a na podzim pyly plevelů.

Jedním z nejvýznamnějších alergenů jara je pyl břízy, který se často podílí na četných zkřížených reakcích. Bříza kvete od března do poloviny května.

V letním období jsou nejrozšířenější pyly trav (bojínek, jílek, srha, lipnice...) a obilovin (hl. žito, kukuřice). Tato sezóna bývá velmi dlouhá a alergie na pyl trav je u nás nejčastějším druhem pylové alergie. Zkřížená reaktivita v rámci skupiny trav nebývá výjimkou.

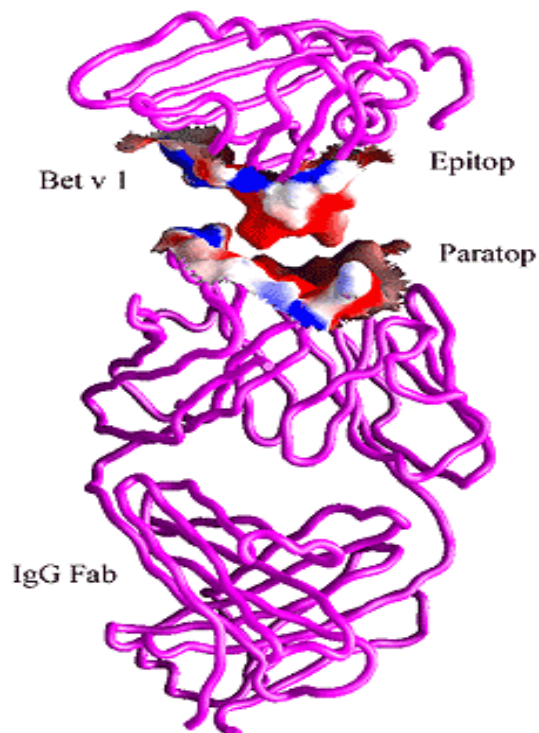
Koncem léta se pak začínají objevovat hojné pyly plevelů (pelyněk, jitrocel, šťovík, ambrózie...)

		leden	únor	březen	duben	květen	červen	červenec	srpen	září	říjen	listopad	prosinec
D	líška												
	Ř	olše											
javor													
E	jilm												
	topol												
V	dub												
	jasan												
I	bříza												
	habr												
N	cypřiš												
	ořešák												
Y	jírovec												
	lípa												
T	pýr												
R	psárka												
	bojínek												
Á	jílek												
	lipnice												
V	žito												
	kukuřice												
Y	medyněk												
	psineček												
B	sedmikráska												
	pampeliška												
Y	řepka												
	jitrocel												
L	kopřiva												
	merlík												
I	lebeda												
	šťovík												
N	zlatobýl												
	pelyněk												
Y	ambrosie												

Obrázek 7. Pylový kalendář

Zkřížená reaktivita pylových alergenů

U pylových alergenů se při zkřížených reakcích v rámci příbuzných druhů uplatňují uvolňované enzymy, u nepříbuzných jsou to pak takzvané panalergeny. Zkříženě reagují



Obrázek 8. Struktura vazby Bet v 1 s molekulou imunoglobulinu⁽⁷⁴⁾

4.1.2. Zvířecí alergen

Ve velké části českých domácností se setkáme s domácími zvířaty. Proto také zvířecí alergen patří mezi jedny z nejvýznamnějších. Nejsou jen kontaktními alergeny, ale díky své snadné přilnavosti k nejrůznějším povrchům, prachovým částicím apod. působí také inhalační potíže.

K nejagresivnějším patří alergen kočičích kožních šupin a slin. Tyto také přetrvávají velmi dlouhou dobu v prostředí. Častá je v populaci i pozitivita na alergeny psa. Setkáváme se s reakcemi na myši, potkany, morčata, koně atd.

Vybrané alergen

Uvolňované enzymy, u nepříbuzných jsou to pak takzvané panalergeny. Zkříženě reagují také některé alergen

Kromě významných panalergenů (profilin, tropomyozin apod.) může být pro vznik zkřížené alergie také významná homologie majoritních alergenů v případě, že dojde k 50% (lépe 70 - 80%) shodě v aminokyselinových sekvencích. Zkřížené reakce se pak objevují mezi pylovými, zvířecími, potravinovými i hmyzími alergeny. Častý je syndrom „bříza (Bet v 1) – ovoce (Mal d 1, Pru p 1, Pyr c 1) – ořechy (Ara h 1)“ a syndrom „celer – mrkev – pelyněk – bříza – koření“.

Obrázek 8 ukazuje strukturu hlavního alergen

Tabulka 3. Některé zvířecí alergen⁽⁶⁾

<i>Některé zvířecí alergen</i>	
<i>Druh</i>	<i>Hlavní alergen</i>
Kočka domácí (<i>Felis domestica</i>)	<i>Fel d 1</i>
Pes domácí (<i>Canis familiaris</i>)	<i>Can f 1, Can f 2</i>
Potkan (<i>Rattus norvegicus</i>)	<i>Rat n 1</i>

4.1.3. Domácí alergen

V minulosti se alergenové extrakty připravovaly ze sesbíraného domovního prachu. Těmito byly prováděny kožní testy a množství alergenu bylo udáváno jen poměrem jeho ředění. Bylo však jasné, že se jedná o velice heterogenní směs nejrůznějších antigenů. Později se ukázalo, že nejvýznamnější složku bytového prachu tvoří roztoči a plísňe.

Alergeny roztočů se dělí dle biochemické charakteristiky, aminokyselinových sekvencí a molekulové hmotnosti do několika skupin⁽¹⁶⁾ a i pro ně se uplatňují principy zkřížené reaktivity.

Plísňovou alergii mohou způsobovat buď spóry plísni, které jsou díky své velikosti (10 µm) snadno inhalovány, nebo jejich enzymy.

Některé vybrané alergen uvádím v Tabulce 4.

Tabulka 4. Některé alergen roztočů a plísni⁽⁶⁾

<i>Skupiny roztočových alergenů</i>	
<i>Skupina</i>	<i>Hlavní alergen</i>
Skupina 1	<i>Der f 1, Der p 1, Eur m 1, Der m 1</i>
Skupina 2	<i>Der f 2, Der p 2, Eur m 2, Tyr p 2</i>
<i>Některé alergen plísni</i>	
<i>Zdroj alergenů</i>	<i>Hlavní alergen</i>
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alt a 1</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Asp f 1</i>

4.1.4. Potravinové alergeny

Hlavními potravinovými alergeny jsou proteiny (či glykoproteiny), většinou kyselého pH a molekulové hmotnosti 5 – 100 kD.⁽⁶⁾

Nejčastěji tvoří problémy bílkoviny kravského mléka, slepičího vejce, luštěnin, stromové ořechy, obiloviny, ovoce, zelenina, ryby, korýši a nejrůznější potravinová aditiva. U ovoce a zeleniny nalézáme často zkříženou alergii s břízou, ambrózií a latexem.

4.1.5. Jedy blanokřídých

Jedná se o směs proteinů, peptidů, biogenních aminů a nízkomolekulárních látek (především histamin, dále například melittin, apamin...). Řada těchto látek může vyvolávat alergickou reakci a nezdědka anafylaktický záchvat.

Ukázka alergenů viz Tabulka 5.

Tabulka 5. Některé alergeny jedy blanokřídých⁽⁶⁾

<i>Některé alergeny jedy blanokřídých</i>	
<i>Zdroj alergenů</i>	<i>Hlavní alergen</i>
Apis mellifera	Api m 1, Api m 2, Api m 3
Vespula germanica	Ves g 1, Ves g 2

4.1.6. Využití alergenových extraktů

Alergologie využívala nejprve alergenní extrakty v surovém stavu, které obsahovaly spektrum různých alergenních látek spolu se spoustou neaktivních substancí. Obsah účinných látek v nich obsažených nebyl zpočátku tedy vůbec sledován a přípravky byly definovány jen zředěním základního extraktu. Pro lepší specifikaci byly pak zavedeny tzv. Noonovy jednotky určující množství alergenu v extraktu z určitého množství suroviny v daném objemu extrakční tekutiny. Později se začalo používat hodnocení pomocí obsahu proteinového dusíku (PNU).

Tyto metody však neumožňovaly stanovit alergenní účinnost takto připravených extraktů. Toho se dosáhlo až díky moderním imunologickým a imunochemickým metodám, které umožňují sledovat skutečnou biologickou aktivitu extraktu reakcí se specifickými IgE.⁽¹⁷⁾

K určení aktivity se používají metody jako je RAST či ELISA a pomocí monoklonálních protilátek můžeme určit i množství hlavních alergenů. Takto vyšetřované extrakty musí již být zbavené balastních látek.

Alergenové extrakty mají široké využití v diagnostických intradermálních a především prick testech a zatím také při specifické alergenové imunoterapii. V dnešní době nalézá SIT uplatnění zejména u pacientů postižených alergickou rinitidou a u alergií na hmyzí jedy. Nevýhodou SIT prováděné nativními alergenovými extrakty je ale možnost vzniku nežádoucích reakcí (až po anafylaxi), možnosti navození další senzitivace, případně zhoršení potíží.

Proto se objevují snahy využívat do budoucna spíše modifikovaných nebo genovým inženýrstvím připravených alergenů, aby se těmto nežádoucím reakcím zabránilo.

4.2. REKOMBINANTNÍ ALERGENY

Počátkem devadesátých let se začaly v mnoha sférách uplatňovat rekombinantní technologie. V oblasti alergologie mohly být na molekulární úrovni determinovány spouštěcí alergenové epitopy a extrakty surových alergenů se ukázaly jako směsi mnoha majoritních a minoritních alergenů. Tyto technologie umožnily také první produkci samostatných alergenových molekul za pomoci bakterie *Escherichia coli*.

Dalším pokrokem je tvorba modifikovaných alergenů s mírnými obměnami v řetězci. Tímto je pak dosaženo snížené alergenicity při zachování imunogenicity alergenů. Ukazuje se, především pro budoucnost, velký význam rekombinantních alergenů pro výzkumné účely, pro diagnostiku a terapii alergických chorob, stejně tak i následné monitorování jejího průběhu.

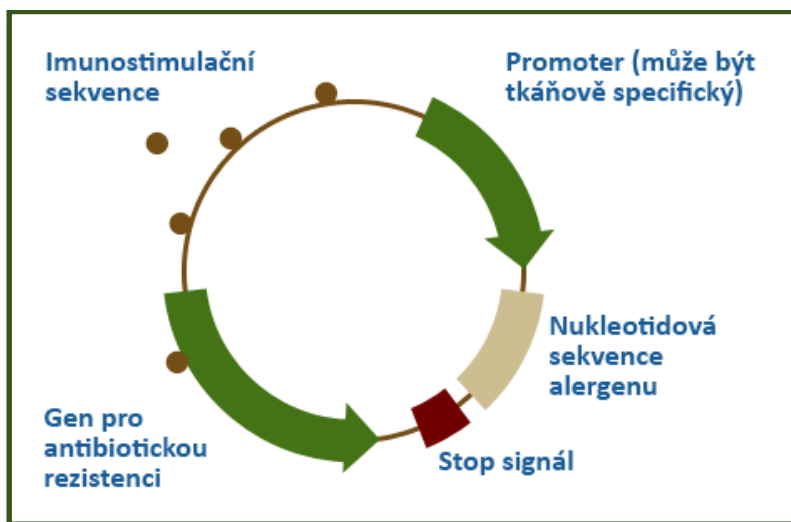
4.2.1. Rekombinantní technologie

Rekombinantní technologie jsou souborem metodik, které využívají rekombinantní DNA buď k produkci bílkovin jinými než původními organismy nebo k produkci genetiky modifikovaných bílkovin, popřípadě organismů.

Rekombinantní technologie umožňují komerčně produkovat velké množství rekombinantních proteinů, podobných proteinům nativním. Je možné exprimovat přirozeně se vyskytující izoformy méně reagující s IgE, měnit IgE epitopy místní mutageneze, pomocí exprese velkých polypeptidů nebo fragmentů molekuly s uchováním epitopů, a tedy schopností stimulovat T lymfocyty.⁽¹⁸⁾

Základní metodou je umělé vložení genu, který kóduje požadovanou bílkovinu (alergen) do genomu producenta (bakterie, kvasinky). Nejdříve je nutné vytvořit rekombinantní

DNA, která obsahuje klonovaný fragment a tzv. klonovací vektor (je schopen autonomní replikace v hostitelském organismu). Následně se tato DNA vnese do hostitelské buňky, nejčastěji E. coli. Pro klonování krátkých úseků (do 30 000 pb) lze využít bakteriofágy či bakteriální plazmidy - viz Obrázek 9.



Obrázek 9. Plazmid pro DNA vakcinaci ⁽¹⁹⁾

V dnešní době se začínají uplatňovat nebo zkoušet také další způsoby „úpravy“ alergenů. Můžeme zmínit například využití fragmentace alergenů, produkce izotopů se sníženou kapacitou vázat IgE, vznik různých derivátů rekombinantních alergenů, užití adjuvans (tyrozín, aluminium – ke zpomalení systémové absorpce) a další. ⁽²⁰⁾

Jednou z novějších technologií je například tzv. „mimotop“ technologie. Mimotopy jsou peptidy podobné haptenům, napodobují vazebná místa pouze pro jeden druh IgE a zaměřují se na blokuující protilátky proti IgE epitopům. Zamýšlí se jejich aplikace v generaci alergen specifických vakcín. ⁽²¹⁾

Díky nově zaváděným technologiím se s největší pravděpodobností bude rozšiřovat a zdokonalovat uplatňování takto vzniklých struktur v široké praxi.

4.2.2. Využití rekombinantních alergenů ve výzkumu

V rámci výzkumu nalézají rekombinantní alergeny a technologie uplatnění například při odhalování zkřížených reaktivit. Séra se preadsorbují s daným rekombinantním alergenem a na základě snížení navázání IgE můžeme odhadnout IgE epitopy společné extraktu a

rekombinantnímu alergenu. Takto můžeme také identifikovat molekulu (alergen), která byla prvotním senzitivizujícím faktorem u pacientů s polyvalentní alergií.

Dále se výzkum zaměřuje na bližší charakteristiku oblastí alergenu zodpovědných za interakci s protilátkami za pomoci trojrozměrné struktury alergenů a na přesnou strukturální analýzu interakcí alergen-protilátka (IgE). Toto může být zvláště užitečné pro navržení aktivní (indukce produkce blokujících protilátek) i pasivní (saturace IgE protilátek ještě před vystavením alergenu) terapie.⁽²²⁾

V posledních letech se výzkum soustředí především na zvyšování bezpečnosti a specifity alergénové imunoterapie. Děje se tak například redukcí alergenní aktivity tvorbou derivátů rekombinantních alergenů, fragmentací rekombinantních alergenů, objevováním izoform s redukovanou kapacitou vázat IgE protilátky.⁽²¹⁾

4.2.3. Využití rekombinantních alergenů v diagnostice

Dříve se diagnostika přecitlivělosti I. typu opírala jen o alergénové extrakty, které dovedly pouze prokázat senzitivizaci na daný alergénový zdroj, neobjasňovaly však, která molekula alergenu je za tuto reakci zodpovědná. Rekombinantní DNA technologie, pomocí kterých dovedeme syntetizovat individuálně definované alergeny, umožnily rozpoznávat tyto alergenní molekuly a díky tomu následně vybírat optimální terapii.⁽²³⁾

Rekombinantní alergeny nám v mnoha aspektech mohou pomoci upřesnit diagnostiku alergických onemocnění: je možné přesněji kvantifikovat specifické IgE protilátky, zvýšit citlivost testů, použít alergeny různých zdrojů v jednom testu a identifikovat konkrétní alergen spouštějící alergickou reakci. Používají se jak v diagnostice *in vivo* (mezi lety 1994–1995 byly poprvé rekombinantní alergeny úspěšně použity v kožních testech⁽²¹⁾), a především při uplatnění *in vitro* metod.

Zvýšená hladina celkového IgE nás může nasměrovat k IgE-zprostředkované alergii, a přitom mohou být tyto protilátky zvýšené z jiného důvodu. Na druhou stranu se také můžeme setkat se situací, kdy celkové IgE není výrazně zvýšeno, ale prokážeme vysokou hladinu specifických IgE protilátek v séru.⁽²⁴⁾

Diagnostika alergie by proto měla začít zjištěním zdroje, který potíže vyvolává (alergénovým extraktem nebo směsí rekombinantních alergenů) a pro upřesnění být doplněna měřením hladin specifického IgE proti individuálním antigenům pomocí rekombinantních alergenů.⁽²²⁾

Používání rekombinantních alergenů v diagnostice má přínos především u pacientů, kteří jsou citliví jen na malé množství alergenů. U polysenzitivních pacientů se musí jednat o ty, kteří reagují na imunologicky nepříbuzné alergeny, jinak může dojít ke zkreslení výsledků.⁽²⁵⁾

Těmito metodami lze tedy určit, zda je pacient mono-, oligo- či polyvalentní a na základě toho pak volit vhodný postup terapie (viz dále v textu).

Pomocí alergenových extraktů můžeme vlastně jenom potvrdit/zjistit, zda pacient reaguje na některý z alergenů obsažený v určitém zdroji. Užitím rekombinantů diagnostikujeme přímo konkrétní alergenovou molekulu, která alergickou reakci spouští – tzv. CRD (komponent-resolved diagnosis)⁽²⁶⁾. Výhodou CRD také je, že můžeme determinovat, zda je pacient „kosenzitivizovaný“ k různým alergenům z různých zdrojů a nebo tzv. z angl. „cross-senzitivizovaný“, tj. reagující s jedinou alergenní determinantou obsaženou ve více zdrojích. To má pak samozřejmě dopad pro následnou zvolenou terapii.

4.2.4. Využití rekombinantních alergenů v terapii

Specifická imunoterapie je založena na systémovém podávání vzrůstajících dávek alergenů, na které je pacient přecitlivělý. Je indikována u nemocných s prokázanými specifickými IgE protilátkami ke klinicky závažným alergenům, u kterých alergické příznaky opravňují k časové náročnosti a riziku této léčby. Záměrem je navodit u pacienta dlouhodobou toleranci.

Běžně se provádí surovými alergenovými extrakty, které mimo směsi alergenů obsahují také nealergenní složky. Takováto imunoterapie může však v některých případech navodit další senzitivizaci (alergeny obsaženými ve směsi, na které předtím pacient nereagoval) a zhoršení potíží.⁽²⁷⁾

Historická zkušenost ukázala, že očištění alergenového extraktu od balastních látek vede ke zvýšení aktivity extraktu a terapeutického potenciálu látky. Je to však provázeno zvýšením rizika léčby a výskytu nežádoucích účinků. Proto by se měl tento druh terapie provádět pouze jednotlivými konkrétními alergeny, které vyvolávají u pacienta obtíže, tedy až po předchozím stanovení kompletního profilu IgE reaktivity pacienta rekombinantními alergeny.

Při zavádění léčby SIT v případě polysenzitivních pacientů pak je potřeba pro klinickou praxi rozlišovat, zda jde o kosenzitivizaci nebo o zkříženou reaktivitu. Tzv. kosenzitivní pacient je přecitlivělý na několik alergenů z různých zdrojů a potřebuje tedy SIT pro každý z nich, na rozdíl od zkříženě reagujícího pacienta, který je alergický na více zdrojů právě kvůli zkřížené reakci proti stejné bílkovinné komponentě (panalergenu), obsažené v těchto zdrojích.⁽²⁸⁾ Z tohoto pohledu je pak pochopitelně velice důležitá správná diagnostika, ke které nám mohou dopomoci opět rekombinantní alergeny.

Pomocí rekombinantních technologií můžeme vyrobit vakcíny, které přesně „padnou“ konkrétnímu pacientovi, čehož alergenovým extraktem nikdy nedosáhneme.⁽²⁹⁾

Vedle specifické alergenové terapie se začínají objevovat studie navrhuující nové způsoby léčby či dokonce prevence alergických chorob založené na determinaci a úpravách alergenových struktur. Modifikované alergeny jsou charakterizovány sníženou alergenicitou a zachovanou imunogenicitou alergenů, proto by teoreticky bylo možno tyto proteiny podávat ve vysokých dávkách bez rizika degranulace mastocytů a se zachovanou aktivací T lymfocytů^{(31) (30) (20)}

Zkouší se postupy založené na navození tolerance T lymfocytů nebo aplikace alergenových vakcín jako prevence vývinu alergie.

Rekombinantní technologií je možno získat IgE vázající hapteny, které mohou vyvázat receptory na efektorových buňkách, popřípadě blokovat tvorbu IgE protilátek nebo různých cytokinů.⁽²²⁾

Zkoumá se také vakcinace pomocí DNA kódující alergen (bylo prokázáno, že vakcinace alergen-kódující DNA může navodit alergen specifickou TH1 imunitní odpověď a předejít tak vzniku alergie).⁽³¹⁾

Další strategií je vakcinace tzv. „mimotopem“, který díky své struktuře indukuje vznik blokujících protilátek.

Do budoucna má tedy stále větší význam možnost produkce alergenových derivátů se sníženou alergenicitou (ale zachovanou imunogenicitou) a tudíž minimalizace pravděpodobnosti nežádoucích účinků v podobě anafylaktických reakcí.

4.2.5. Využití rekombinantních alergenů při monitorování průběhu terapie

Další možnost využití rekombinantních alergenů se ukazuje v oblasti monitorování průběhu terapie.⁽²⁴⁾

Při opakované dlouhodobé antigenní stimulaci T-dependentním antigenem (jako při SIT) dochází k výrazné IgG4 protilátkové odpovědi.⁽³²⁾

Rekombinantní alergeny se zde uplatňují při sledování průběhu změn hladin jak IgE, tak IgG protilátek a tedy monitorování imunologické odezvy na danou terapii. Obecně bývá pozorován pokles specifických IgE protilátek a vzestup hladin specifických IgG (zejména IgG4) protilátek v průběhu SIT, ale definitivní korelace při pozorování tohoto jevu nebyla ještě prokázána.⁽²¹⁾

5. DIAGNOSTIKA ATOPIE

Z hlediska diagnostiky atopie nepostačí pouze pozitivita kožních - prick testů či průkaz IgE protilátek v krvi, je třeba komplexnější přístup: znalost anamnézy, klinického obrazu pacienta a tyto uvádět do souvislosti s výsledky kožních či různých provokačních testů a také mnoha dnes dostupných laboratorních vyšetření.

Dříve se v praxi používaly výhradně různé typy kožních testů. Naproti tomu se v dnešní době stále více rozšiřují možnosti laboratorní diagnostiky alergických onemocnění, i když některé kožní testy mají stále v rutinní praxi své opodstatnění, a to především díky své jednoduchosti a nižší ceně.

Prioritou by měla být vždy správná indikace vyšetření, důležité je správné provedení odběru a následné zpracování vzorku a na závěr, samozřejmě, správná interpretace výsledků.

5.1. IN VIVO DIAGNOSTIKA

Diagnostika „*in vivo*“ má velký význam při zjišťování poruch imunitního systému pacientů jak v ordinacích, tak i na specializovaných pracovištích. Jedná se o metody, z nichž některé se v lékařské praxi používají již desítky let. Výpovědní hodnota je však v mnoha případech ovlivněna použitou technikou, zkušeností osoby provádějící test, možností vzniku falešně negativních reakcí, falešnou pozitivitou vlivem zkřížených reakcí, a nebo dokonce i placebo efektem. V budoucnu by mohly být některé z těchto nedostatků eliminovány požíváním epitopů alergenů vyrobených rekombinantní technologií a zvýšit tak diagnostickou hodnotu těchto metod.

V Tabulce 6 a textu je uveden základní přehled používaných metod se stručnou charakteristikou.

Tabulka 6. Přehled *in vivo* diagnostiky alergického onemocnění.

Kožní testy:
Prick testy
Intradermální
Epikutánní
Provokační testy:
Nazální
Bronchoprovokační
Spojivkové
Potravinové expoziční testy

5.1.1. Kožní testy

Kožní testy jsou založeny na posuzování vzniku lokálního edému, erytému či pruritu. Tyto vznikají vlivem vazoaktivních mediátorů, které jsou po aktivaci mastocytů rychle uvolňovány. Kožní projevy začínají asi 5 minut po aplikaci alergenu, maxima pak dosahují mezi 10 – 20 minutami ⁽³³⁾ po té, co se malé množství standardizovaného alergenového extraktu zavede do epidermis.

Principem této metody je aktivace kožních mastocytů zkoumaným alergenem tehdy, jsou-li na jejich povrchu přítomny specifické IgE protilátky, na které se tento alergen váže. Výhodou je možnost otestování mnoha alergenů současně, což například nelze v případě provokačních testů.

Nejčastěji užívaným a základním testem v této kategorii je tzv. prick test, kdy se malé množství alergenu zavádí do epidermis vpichem. Ostatní testy nevykazují ve výpovědní kvalitě vůči tomuto větší výhody. Velmi vhodné jsou prick testy pro inhalační alergeny, hmyzí jedy, případně také pro potravinové alergeny.

Test je poměrně rychlý a nenáročný, senzitivita a specifita (důležité je použití standardizovaných alergenových extraktů!) celkem vysoká (80 – 90 %³³ (33)). Stále však platí, že pozitivní výsledek neznamena potvrzení alergie.

Epikutánní testy jsou dosud nepřekonanou metodou v diagnostice kontaktní alergie. Jedná se o mikroexpozici v alergologické neirritativní koncentraci látky. Interpretace těchto testů vyžaduje značnou zkušenost.⁽⁶⁾

5.1.2. Provokační testy

Provokační testy v podobě orálních expozičních a eliminačních testů se používají v diagnostice potravinových a lékových alergií často, naproti tomu testy s inhalačními alergeny spíše zřídka – z důvodů bezpečnosti, míry senzitivity a specifity, a především výhodnosti kožních testů a laboratorních vyšetření. Větší význam tedy mají, jak již bylo řečeno, při zjišťování potravinové alergie, kdy je za „zlatý standard“ považován dvojité slepý, placebem kontrolovaný test a cílem je odhalit provokující potravinu či její složku. Je však nutno brát v úvahu možnost náhlé nebezpečné systémové reakce a dodržovat proto u těchto testů určitá opatření a postupy (překračují však rámec této práce a tudíž je nebudu zmiňovat). Z dalších provokačních testů se používají oční (spojivkový), nosní a takzvané nespecifické provokační testy inhalací histaminu, acetylcholinu nebo metacholinu.

5.1.3. Diagnostická eliminační dieta

Zajímavým postupem je diagnostická eliminační dieta, ke které přistupujeme na základě podezření vyplývajícího z anamnézy či kožních testů. Vyloučíme nejvíce alergizující potraviny a také ty, které jsou bohaté na potravinářská aditiva nebo farmakologicky účinné látky. Po 10-ti až 14-ti dnech takové diety lze přistoupit k expozičním testům. V případech, kdy ani po těchto dvou týdnech nedošlo ke zklidnění obtíží, je nutné zvážit, zda se nejedná o příznaky způsobené například inhalačními alergeny nebo dokonce o příznaky zcela odlišného onemocnění. ⁽³⁴⁾

5.2. IN VITRO DIAGNOSTIKA

Diagnostika *in vitro* umožňuje prokazovat buňky a/nebo mediátory alergického zánětu. Pro jednotlivá stanovení je k dispozici celá řada metod, které ovšem mohou mít různou výpovědní hodnotu a to i dnes, kdy již máme nejrůznější moderní technologie pro zajištění co nejpřesnějších a nejspolehlivějších výsledků. Bohužel, zatím stav, kdy by byly výsledky všech laboratoří zaměnitelné, správné a spolehlivé, neexistuje.

Tabulka 7 ukazuje přehled laboratorních diagnostických metod, z nichž některé budou následně přiblíženy v textu.

Tabulka 7. Přehled *in vitro* diagnostiky atopických onemocnění.

Stanovení hladiny protilátek:
Celkové IgE
Alergen-specifické IgE
Detekce uvolnění mediátorů po expozici alergenu:
Uvolnění histaminu
CAST (Cellular Alergen Stimulation Test)
Stanovení mediátorů v tělesných tekutinách:
ECP
Aktivace buněk po expozici alergenu:
Aktivace bazofilů

5.2.1. Stanovení eozinofilie

Stanovení eozinofilie může být prvním ukazatelem na alergické onemocnění, neboť při převaze TH2 odpovědi je zvýšená produkce IL-5, který ovlivňuje diferenciaci a efektorové funkce eozinofilů a prodlužuje jejich přežívání.

Eosinofily tedy vznikají z kostní dřeně pod vlivem GM-CSF, IL-3 a zmiňovaného IL-5. Mají většinou dvoulaločnaté jádro a velikost okolo 8 μm . Jsou efektorovými buňkami zánětu, které uvolňují různé mediátory a cytotoxické proteiny ze svých granul. Jejich poločas života u zdravých lidí je asi 18 – 20 hodin a hladiny by se měly pohybovat pod 350/mm³. Vyšší hladiny jsou již považovány za lehkou eozinofilii, 1500 – 5000/mm³ za střední eozinofilii a hodnoty nad 5000/mm³ za závažnou.

Eozinofilii můžeme stanovovat optickými metodami ať už analyzátořem nebo manuálním diferenciacím.

5.2.2. Stanovení celkového IgE

Určit hladinu celkového IgE je dnes možno pomocí několika laboratorních technik. Jen u několika nejkvalitnějších je však dosažena prahová citlivost kolem 0,5 kU/l s optimální přesností v rozsahu 7,5 – 50 kU/l. Toto nesmíme opomenout při vyšetřování novorozenců a malých dětí (normální jsou hladiny novorozenců do 0,7 kU/l), naopak u dospělých je ještě nutno séra ředit.⁽³³⁾

Obecně, velmi vysoké hladiny mají osoby, které jsou postiženy polyvalentní alergií proti více alergenům a mají různorodé alergické symptomy, na rozdíl od pacientů alergických jen proti jednomu alergenu a navíc s pouze jednoorgánovým postižením. Dále musíme brát v úvahu to, že pokud byla stanovena normální hladina celkového IgE, nemůžeme ještě toto posuzovat jako vyloučení alergického onemocnění.

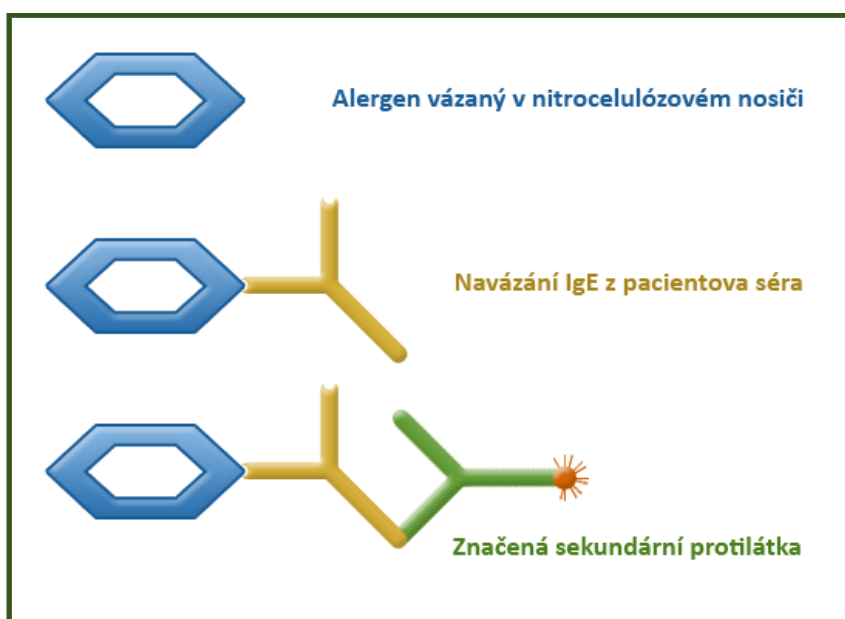
Co se týče metod, používají se imunoenzymatické postupy jako je EIA (Enzymo Immuno Assay), jejímž základem je navázání komplexu protilátky a molekuly enzymu (křesová peroxidáza, případně alkalická fosfatáza) na IgE vyšetřovaného séra. Pomocí substrátu, který je pak přidán a enzymem štěpen na barevné produkty, reakci detekujeme a kvantifikujeme měřením absorbance s porovnáním k standardnímu vzorku.

Jinou možností je FEIA (Fluoroenzymoimunoanalýza). Zde jsou protilátky konjugovány s enzymem β -galaktozidázou. Enzym pak opět přeměňuje fluorescenční substrát na detekovatelný fluorescenční produkt.

5.2.3. Stanovení specifického IgE

Stanovení hladiny specifického IgE (sIgE) je jednou z dnes nejpoužívanějších metod v diagnostice přecitlivělosti I. typu. Můžeme tak stanovit pravděpodobný konkrétní alergen, který vyvolává u pacienta obtíže, a prokázat přítomnost nebo nepřítomnost alergen specifických IgE je významnou součástí diferenciací diagnostiky alergického onemocnění.

Dnes používané testy vycházejí z metody RAST (RadioAlergenoSorbent Test) vyvinuté v roce 1967 Widem, Bennichem a Johanssonem, jejíž princip je následující: Alergen vázaný v nitrocelulózovém nosiči je inkubován s vyšetřovaným sérem a dojde tak k vazbě specifického IgE ze séra na papírovou pevnou fázi. Poté následuje promytí a provede se druhá inkubace s protilátkou proti IgE. Ta je značena izotopem jódu I^{125} . Měříme pak radioaktivitu navázanou na nosič, která je tedy přímoúměrná množství specifického IgE ve vyšetřovaném séru. Schematické znázornění ukazuje Obrázek 10.



Obrázek 10. RAST metoda

Dnešní techniky jsou spíše založené na neizotopovém značení sekundární protilátky. Používají různé alergeny, značící enzymy, substráty i systémy detekce. Mají tedy svá vlastní kritéria pro hodnocení a interpretaci výsledků. Další inovací oproti RAST testu je použití trojrozměrné struktury pevné fáze, kdy je vazba alergenu na nosič daleko mohutnější. Tento systém používá technologie uvedená na trh v roce 1992 - ImmunoCAP firmy Pharmacia - a později zavedená metoda UniCAPTM, která je dnes považována za „zlatý standard“ ve stanovení specifického IgE.⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾

Poskytuje dostatečnou citlivost pro stanovení i velmi nízké koncentrace IgE protilátek – rozsah měření je od 0,35 kU/l do 100 kU/l ve vztahu ke standardizaci vůči referenčnímu vzorku WHO 75/502 pro IgE. Specifické IgE z vyšetřovaného séra se naváží na anti-IgE v celulósovém polymeru. Pak se přidají monoklonální IgE protilátky značené β -galaktozidázou a dojde k jejich vazbě na IgE séra. Přidáním fluorescenčního substrátu dochází

k jeho enzymatické přeměně a následně detekujeme a hodnotíme fluorescenci vzniklého produktu. Tato metoda byla použita právě pro testování v této práci. Také stanovení sIgG (resp. IgG4) pro klinickou část rigorózní práce bylo provedeno touto metodou.

Z dalších metod pro stanovení IgE můžeme zmínit například systém EUROLINE EUROIMMUN AG, který používá stripky, které se po reakci s enzymem (zde alkalická fosfatáza) zabarví, přičemž intenzita odpovídá hladině specifického IgE.

RISA (Ring-Immuno-Sorbent-Assay) DYNEX je technologie využívající mikrotitrační destičku, jako substrát p-nitrophenylphosphate a fotometrické vyhodnocení.

AlaSTAT je metoda, kde se alergen s IgE váže v roztoku a až tento komplex se váže pomocí avidinu na pevnou fázi. V tomto případě stanovujeme specifické IgE kolorimetricky.

Na podobném principu je založen také systém IMMULITE® 2000 DPC, vyhodnocení je chemiluminiscenční.

Tyto příklady potvrzují různorodost postupů, činidel a metod detekce a tedy i různá kritéria pro hodnocení výsledků. Z toho vyplývá, že konečná čísla hladin specifického IgE mají spíše relativní než absolutní charakter. Proto byla také provedena spousta studií na validaci těchto postupů a určení tak onoho „zlatého standardu“.

5.2.4. Další metody

Mezi další metody patří test uvolnění histaminu, který se řadí spíše mezi metody druhé volby či metody pro výzkumné účely a to vzhledem k vysoké ceně a nárokům na vybavení laboratoře. Provádí se ELISA nebo RIA technikou s využitím monoklonální protilátky proti histaminu.

Eozinofilní kationický protein (ECP) je využíván v diagnostice bronchiálního astmatu, alergické rýmy a rovněž u atopické dermatitidy. Při tomto stanovení je potřeba dodržet zvláštní podmínky odběru (podle⁽³⁰⁾). Stanovení se pak provádí metodou RIA, FEIA či chemiluminiscenčně.

Test aktivace bazofilů po stimulaci antigenem - používá se průtoková cytometrie (nejčastěji BASOTEST®). Tato metoda je založena na stanovení exprese CD63 na bazofitech nesoucích IgE, jejíž míra koreluje právě s jejich degranulací.

Z dalších metod druhé volby a metod, u kterých převažuje výzkumné využití, stojí za zmínku stanovení hypodenzních eozinofilů, jež má význam u pacientů s asthma bronchiale a alergickou rýmou, dále stanovení specifického IgG4 u pacientů s atopickou dermatitidou a k monitorování průběhu specifické alergenové imunoterapie.

Jak již bylo naznačeno, obecně platí, že je nutné laboratorní metody vždy posuzovat komplexně s ohledem na výsledky dalších vyšetření a klinický stav pacienta, výsledek porovnávat s klinickým nálezem a brát v úvahu možnost vlivu zkříženě reagujících alergenů a mnoha dalších faktorů, které by mohly konečnou diagnózu ovlivnit.

5.3. POROVNÁNÍ KOŽNÍCH TESTŮ A *IN VITRO* METOD

Na příkladu protilátky IgE, která byla poslední objevenou a definovanou třídou rodiny imunoglobulinů, můžeme ukázat, jak se medicína posledních 40ti až 50ti let stále více opírá o poznatky základního biomedicínckého výzkumu. Před objevem této molekuly již používali lékaři surové alergeny z rostlin či zvířat pro diagnostické a léčebné postupy, ačkoli ještě neznali podstatu mechanismu jejich biologického účinku.⁽³⁷⁾

V minulosti bylo tedy možné demonstrovat působení IgE protilátek pouze kožními testy, a ne je izolovat ze séra a určitými postupy prokázat jejich přítomnost. Jednou z prvních metod, která umožnila prokazovat hladiny IgE v séru (a ze které vycházejí i dnešní používané metodické přístupy pro stanovení IgE), byla radioimunoanalýza (metoda RAST - viz výše). Senzitivita této metody ve srovnání s diagnózou pomocí kožních testů byla vysoká, ale ztrácela na specifitě.⁽³⁸⁾

Současné metody jsou však v tomto ohledu a mnoha dalších podstatně vylepšené: Zvyšuje se kapacita pro množství vázané protilátky, zlepšují se používaná detekční činidla, zkracuje se inkubační doba, získáváme kvantitativní a ne pouze kvalitativní výsledky. Také je v případě *in vitro* diagnostiky znemožněn falešně pozitivní výsledek v důsledku placebo efektu, který mnohokrát zkresluje *in vivo* testy. Moderní metody mají vysoký stupeň automatizace a pro detekci již nevyužívají radioaktivní izotopy jako metoda RAST, nýbrž jsou založeny na reakci enzym-substrát. Naproti těmto výhodám stojí však vysoká cena vyšetření a vysoké finanční nároky na přístrojové vybavení.

Z pohledu kožních testů je zase důležité, aby byly prováděny a správně vyhodnocovány erudovanou osobou, ale náklady na jejich provedení nejsou tak finančně náročné. Dalo by se tedy říci, že tvoří jakousi první linii, která je pak, je-li třeba, na základě jejich výsledků doplňována a zpřesňována laboratorními technikami a neměla by se jejich informační hodnota podceňovat.

Z výše uvedeného vyplývá následující obecný postup. Na základě výsledků *in vivo* testů se doplňuje a zpřesňuje pacientův imunologický profil pomocí *in vitro* prostředků, přičemž je důležitá senzitivita a specifita používaných metod, jejich dosažitelnost a použitel-

nost v praxi a bezpečnost pro pacienta v souladu s vysokou výpovědní hodnotou a rovněž zohledněním ekonomických aspektů.

6. TERAPIE ALERGICKÝCH CHOROB

Imunopatologickou podstatu alergických onemocnění nebylo možno až donedávna terapeuticky ovlivnit. Pomocí léků a úpravou životního stylu (eliminací kontaktů se spouštějícím alergenem) je možné udržet onemocnění v klidovém stavu, kdy je pacient bez příznaků. V posledních letech do terapie proniká tzv. specifická alergenová imunoterapie (SIT), kterou, jak se ukazuje, je možné navodit u pacienta trvalou toleranci k danému alergenu. Znamená však spolupráci lékaře a pacienta po několik let.

Velký význam pro dosažení dobrého výsledku má kvalitní, včasná a správná diagnostika, zahájení adekvátní terapie a spolupráce pacienta při léčbě a dodržování podpůrných opatření.⁽⁶⁾

Zde je uveden souhrn základních principů léčby alergických onemocnění (upraveno dle⁽⁶⁾⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾)

6.1. REŽIMOVÁ OPATŘENÍ A PODPŮRNÁ TERAPIE

Zamezení kontaktu s alergenem

- Je možné u potravinových a lékových alergií, u kontaktních alergických ekzémů.
- U pylových alergií je vhodná klimatická léčba v době potíží na horách nebo u moře (posunutě vegetační období), sledování pylové informační služby.
- Patří sem také zákaz kouření nebo eliminace domácích zvířat a dalších zdrojů alergenů v domácnosti alergika.

Podpůrná léčba

- Úprava denního režimu
- Thalasoterapie
- Speleoterapie

6.2. FARMAKOLOGICKÁ LÉČBA

6.2.1. Preventivní terapie

Preventivní terapie zahrnuje léky, které jsou podávány každodenně a dlouhodobě s cílem dosáhnout kontroly alergického stavu. Jsou to látky potlačující alergický zánět, tlumící hyperreaktivitu bronchů, případně bronchodilatancia a další pomocné léky.

Kortikoidy pro inhalační, dermální a nazální podání

/beklometazon, budesonid, flutikazon, flunizolid, mometazon/

Kortikosteroidy jsou v současné době nejpreferovanějšími protizánětlivými léky pro léčbu perzistujícího astmatu všech stupňů závažnosti. S výhodou je používáme v lokálních formách u terapie středně těžké a těžké alergické rýmy. Studiemi byla demonstrována jejich účinnost na zlepšení plicní funkce, snížení bronchiální hyperreakivity, redukci příznaků, redukci frekvence a tíže exacerbací a zlepšení kvality života. Vzhledem k lokální aplikaci jsou jejich systémové a nežádoucí účinky minimální.

Systémové kortikoidy

/prednison, methylprednisolon, prednisolon/

V některých případech je nutná dlouhodobá léčba perorálními kortikosteroidy pro dosažení plné kontroly těžkého perzistujícího astmatu, ale její použití je omezeno rizikem významných nežádoucích účinků. Kdykoliv je to možné, měla by být dlouhodobá léčba perorálními kortikosteroidy podávána v jedné ranní dávce každý den nebo obden. Tím je obecně umožněno dosáhnout dostatečné kontroly astmatu a minimalizovat nežádoucí systémové účinky.

Kromony

/kromoglykát sodný, nedokromil/

Přesný mechanismus účinku není plně objasněn. Tyto nesteroidní protizánětlivé léky inhibují uvolnění mediátorů zprostředkované IgE z lidských žírných buněk a mají buněčně selektivní a mediátorově selektivní supresivní účinek na ostatní buňky zánětu (makrofágy, eozinofily, monocyty). Využívají se nejčastěji v topické formě k léčbě alergické konjunktivitidy a alergické rýmy s výhodou u dětí, případně preventivně u lehkého perzistujícího astmatu.

Methylxantiny

/ theofylin, aminofylin/

Retardované formy teofylinu a aminofylin podávané dlouhodobě mohou být účinné v kontrole příznaků astmatu a zlepšení plicní funkce. Dochází k odstranění nočních příznaků astmatu, které přetrvávaly i přes pravidelnou protizánětlivou léčbu. Teofyliny jsou též používány jako aditivní bronchodilatancia u pacientů s těžkým astmatem.

Inhalační beta 2- sympatomimetika s dlouhodobým účinkem

/klenbuterol, salmeterol, formoterol, prokaterol/

Inhalační β 2-mimetika s dlouhodobým účinkem jsou bronchodilatační léky, relaxují hladké svalstvo dýchacích cest, zlepšují mukociliární clearance, snižují vaskulární permeabilitu a mohou modulovat uvolnění mediátorů z žírných buněk a bazofilů. Jejich účinek trvá nejméně 12 hodin. Protože dlouhodobá léčba inhalačními β 2-mimetiky s prodlouženým účinkem nemá vliv na perzistující zánětlivé změny u astmatu, měly by být tyto léky vždy kombinovány s inhalačními kortikosteroidy. Proto se s výhodou využívají fixní kombinace těchto léků (flutikason propionát + salmeterol, budesonid + formoterol). Další využití nalézají jako prevence před námahou indukovaným bronchospazmem, kdy přinášejí delší ochranu než β 2-mimetika s krátkodobým účinkem.

Perorální beta 2- sympatomimetika s dlouhodobým účinkem

/salbutamol, terbutalin a bambuterol/

Perorální β 2-mimetika s dlouhodobým účinkem zahrnují pomalu se uvolňující lékové formy, které nepřinášejí oproti inhalačně podávaným formám výrazné výhody ani vyšší účinnost.

Antileukotrieny

/montelukast, zafirlukast, zileuton, tenidap/

Mezi antileukotrieny řadíme antagonisty receptoru pro cysteinylové leukotrieny (montelukast, zafirlukast) a inhibitory 5-lipoxygenázy (zileuton).

Inhibitory 5-lipoxygenázy blokují syntézu všech leukotrienů, zatímco antagonisté leukotrienového receptoru blokují receptor pro cysteinylové leukotrieny hladkých svalů dýchacích cest a ostatních buněk, a tím inhibují účinky těchto leukotrienů uvolňovaných z žírných buněk a eozinofilů.

Výsledkem tohoto mechanismu je malý bronchodilatační účinek a redukce broncho-konstrikce indukované alergenem nebo námahou. Existují také doklady o určitém protizánětlivém účinku.

Jsou vhodné k současné léčbě alergické rinitidy a bronchiálního astmatu.

Antagonisté H1 - receptorů

Původní léky s antihistaminovým účinkem (první generace) vykazují kromě protialergického účinku ještě silný účinek sedativní /*bisulepin, klemastin, dimetinden, ketotifen*/. Druhá generace /*cetirizin, loratadin*/ tento vedlejší účinek nemá a generace třetí vykazuje navíc protizánětlivé a imunomodulační působení /*levocetirizin, desloratadin*/. Zvláštní postavení má antihistaminikum první generace ketotifen, který má také slabé imunoproliferační účinky.

Antihistaminika podáváme intermitentně symptomaticky nebo dlouhodobě profylakticky například u pacientů se sezónní nebo celoroční rýmou.

6.2.2. Úlevová, rychle účinná léčba

Inhalační beta 2- sympatomimetika s rychlým nástupem účinku

/salbutamol, fenoterol, terbutalin/

Inhalační β_2 -mimetika s rychlým nástupem účinku jsou léky volby pro léčbu akutní exacerbace astmatu nebo jako preventivní léčba před námahovou dušností. Zvýšené užívání nebo dokonce každodenní užívání inhalačních β_2 -mimetik s rychlým nástupem účinku je varovným znamením zhoršení astmatu a ukazuje na potřebu nasazení nebo zintenzivnění pravidelné protizánětlivé léčby.

Anticholinergika

/ipratropium bromid, oxitropium bromid/

Antagonisté muskarinových receptorů, které používáme jako inhalační bronchodilancia; blokují účinek acetylcholinu uvolňovaného z cholinergních nervů v dýchacích cestách. Blokují také bronchokonstrikční reflex vyvolaný inhalačními iritancii. Nepotlačují však časnou ani pozdní alergickou odpověď a nemají žádný účinek na zánět dýchacích cest. U astmatu mají inhalační anticholinergika menší bronchodilatační účinek než inhalační β_2 -mimetika a všeobecně mají pomalejší nástup účinku.

Používají se buď v kombinacích, nebo jako alternativa pro nemocné, kteří zažili výskyt nežádoucích účinků β 2-mimetik s rychlým nástupem účinku (tachykardie, arytmie a tremor).

Ostatní

Kortikoidy ke zvládnutí akutních stavů p.o., i.v.

Neselektivní sympatomimetika – akutní stavy /adrenalin, efedrin/

6.3. KAUZÁLNÍ TERAPEUTICKÉ POSTUPY

6.3.1. Specifická alergenová imunoterapie

Specifická alergenová imunoterapie (SIT) je postup, při kterém se do organismu alergika vpravují v pravidelných časových intervalech předem definované dávky terapeutického alergenu, na který je tento pacient přecitlivělý. Cílem je snížit reaktivitu organismu na konkrétní alergen zásahem do regulačního působení T lymfocytů.⁽⁴¹⁾ SIT je jediným léčebným postupem zasahujícím do imunologické podstaty atopie^{(42),(43)} a měla by být užitá vždy, když jsou splněna indikační kritéria a nejsou přítomny kontraindikace. U některých pacientů má schopnost zabránit následnému rozvoji astmatu. Často je kombinována s ostatními léčebnými postupy (viz výše).

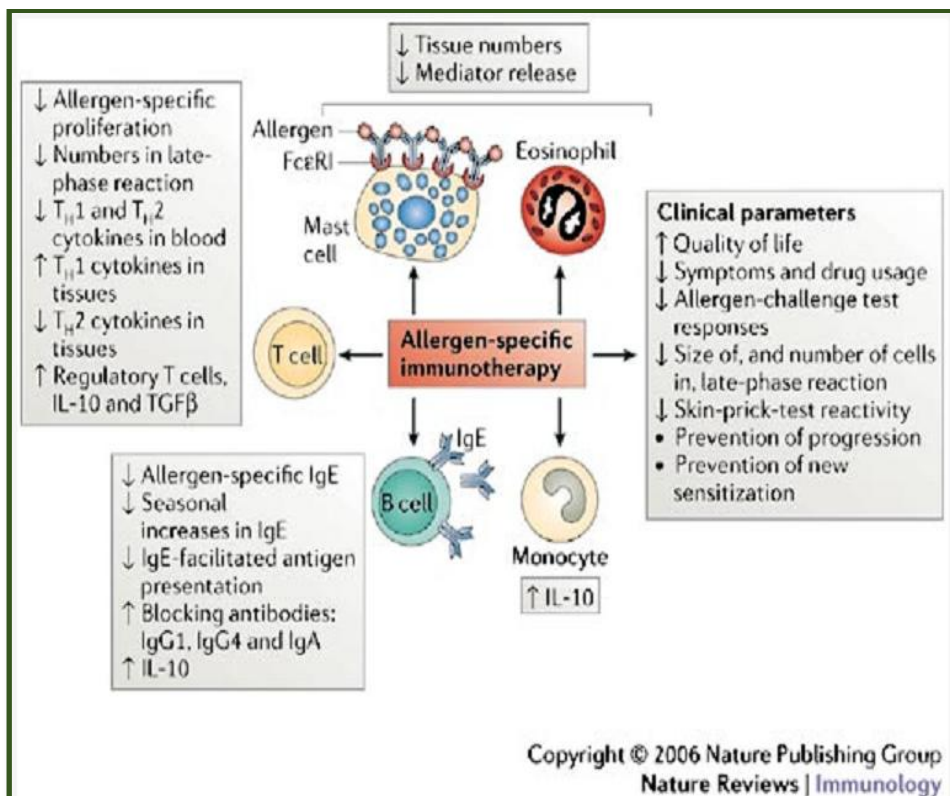
Princip

SIT zasahuje do imunopatologického procesu na úrovni regulačních TH lymfocytů a produkce různých cytokinů a jak se ukazuje, působí také přímo na antigen-prezentující buňky.⁽⁴⁴⁾ Modifikuje se buněčná i látková odpověď na alergen, roste poměr TH1/ TH2 a jsou indukovány alergen specifické regulační T lymfocyty (Treg).

Při pravidelné a dlouhodobé aplikaci alergenu dochází k jeho zpracování buňkami prezentujícími antigen (monocyto-makrofágová řada) a jeho předkládání T buňkám. Monocyty, makrofágy, B i T lymfocyty produkují ve zvýšené míře především IL-10, který spolu s TNF β indukuje větší hladiny Treg lymfocytů a přesmyk imunoglobulinové podtřídy k IgA, IgG1 a IgG4.⁽⁷⁾ Schéma uvádí Obrázek 11.

Vzestup IL-10 rovněž inhibuje prozánětlivé cytokiny a svým supresivním účinkem se výrazně podílí na navození tolerance vůči příčinnému alergenu.⁽⁴⁵⁾

Dochází přitom k potlačení tvorby alergen-specifických IgE protilátek a ke zvýšení produkce především subpopulace IgG4.⁽⁴⁶⁾ Tyto „blokující“ protilátky brání interakci alergenů s IgE na povrchu žírných buněk a tím spuštění alergické reakce.^{(10) (32)}



Obrázek 11. Specifická alergenová terapie – schéma⁽⁷⁾

Aplikační formy

Alergenovou imunoterapii je možno podávat v injekční subkutánní formě nebo sublinguálně, přičemž injekční aplikaci dáváme zatím vždy přednost tam, kde je to možné. Nasální forma u nás není užívána.

Nežádoucí účinky

Při dodržení postupů lege artis je SIT standardizovaným alergenem obecně považována za bezpečnou. Závažné nežádoucí reakce bývají zaviněny chybným postupem při vedení a aplikaci. Základním pravidlem je 30 minutové pozorování pacienta po s.c. aplikaci vakcíny.

Nežádoucí reakce se může vyskytnout kdykoliv, častější je však v iniciální fázi, v případě používání vodných extraktů, po s.c. aplikaci nebo pokud jsou používána alternativní zrychlená schémata (rush, clustery).⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾

Místní reakcí bývá lokální zarudnutí, otok a bolestivost v místě vpichu, u sublinguální aplikace svědění orální sliznice, pocit oteklého jazyka.

Případné celkové reakce se většinou dostaví během několika minut a zahrnují nespecifické obtíže jako bolesti hlavy, svalů, únava, a dále potíže specifické od rinokonjunktivitidy, přes různou míru astmatických záchvatů až po angioedém, a anafylaktickou reakci (hypotenze, exantém, bronchospasmus, alterace vědomí).⁽⁴⁹⁾

Účinnost a hodnocení průběhu SIT

Účinnost SIT byla prokázána při léčbě alergické rinitidy, konjunktivitidy a osvědčila se při léčbě závažné celkové alergické reakce na jed blanokřídlého hmyzu.⁽⁴¹⁾

Hodnotí se většinou 1x ročně, ve stejném období. Sledujeme klinický stav a spotřebu úlevové medikace, měříme skóré symptomů.

Možným nástrojem pro sledování účinku SIT se ukazuje být monitorování jejího průběhu pomocí moderních laboratorních technik a stanovení specifických protilátek. Při léčbě pozorujeme *in vitro* zpočátku nárůst sIgE, dále pak jeho následný pokles. 1-2 roky po zahájení terapie dochází k nárůstu sIgG (především podtřídy IgG4).⁽⁴⁹⁾

Alergenovou terapii lze považovat za úspěšnou, pokud dojde k 10-100násobnému zvýšení specifických IgG4.⁽⁵⁰⁾

Pro zhodnocení je třeba u pacienta samozřejmě sledovat současně klinický efekt, protože se zde nevyskytuje jasná korelace mezi klinikou a laboratorním nálezem.

Pokud nedojde ke klinickému zlepšení do 2 let od zahájení aplikace, SIT se ukončuje jako neúčinná.

Terapeutický efekt je variabilní a závisí na diagnóze, druhu vyvolávajícího alergenu, délce trvání nemoci a její tíži, celkovém stavu pacienta a také na volbě terapeutického alergenu, kvalitě provedení a spolupráci pacienta. Aplikace SIT se tedy doporučuje jen v některých případech, velký vliv hraje, zda je pacient mono nebo polyvalentní alergik.

Výhodou bývá včasné zahájení alergenové imunoterapie, kdy tak často můžeme zabránit dalšímu rozvoji onemocnění a vzniku komplikací.

Vakcíny

Alergenovou imunoterapii vždy indikuje a řídí alergolog. Léčba by měla být celoroční a to i pro sezónní alergeny. Podmínkou je dostatečná doba léčby (3-5 let) a dostatečná koncentrace alergenu k dosažení účinné celkové dávky alergenu. K zajištění optimální účinnosti

nosti je vhodné omezit užívání směsí alergenů v jedné vakcíně, zásadně nemíchat nepříbuzné alergeny a u příbuzných alergenů minimalizovat počet složek ve směsi.

Také by se měl dodržovat postup, aby byla terapie prováděna vakcínami téže firmy, kterou byla provedena diagnostika. Produkty různých společností se liší, dokonce ani různé šarže stejného výrobce nemusí být srovnatelné alergenové extrakty.⁽²⁹⁾

Modernější vakcíny užívají buď rekombinantní alergeny, které odpovídají alergenům přirozeným, nebo modifikované molekuly alergenů se sníženou alergenicitou a zachovanou imunogenicitou. Můžeme tak dosáhnout snížení vedlejších reakcí oproti imunoterapii prováděné přirozenými alergenovými extrakty, které mohou být navíc kontaminovány alergeny z jiných zdrojů a navozovat novou IgE reaktivitu. Kromě toho některé studie dokazují vyvolání dokonce silnější IgG4 odpovědi při aplikaci vakcín takovýchto derivátů rekombinantních alergenů oproti použití pylového extraktu.⁽⁵¹⁾

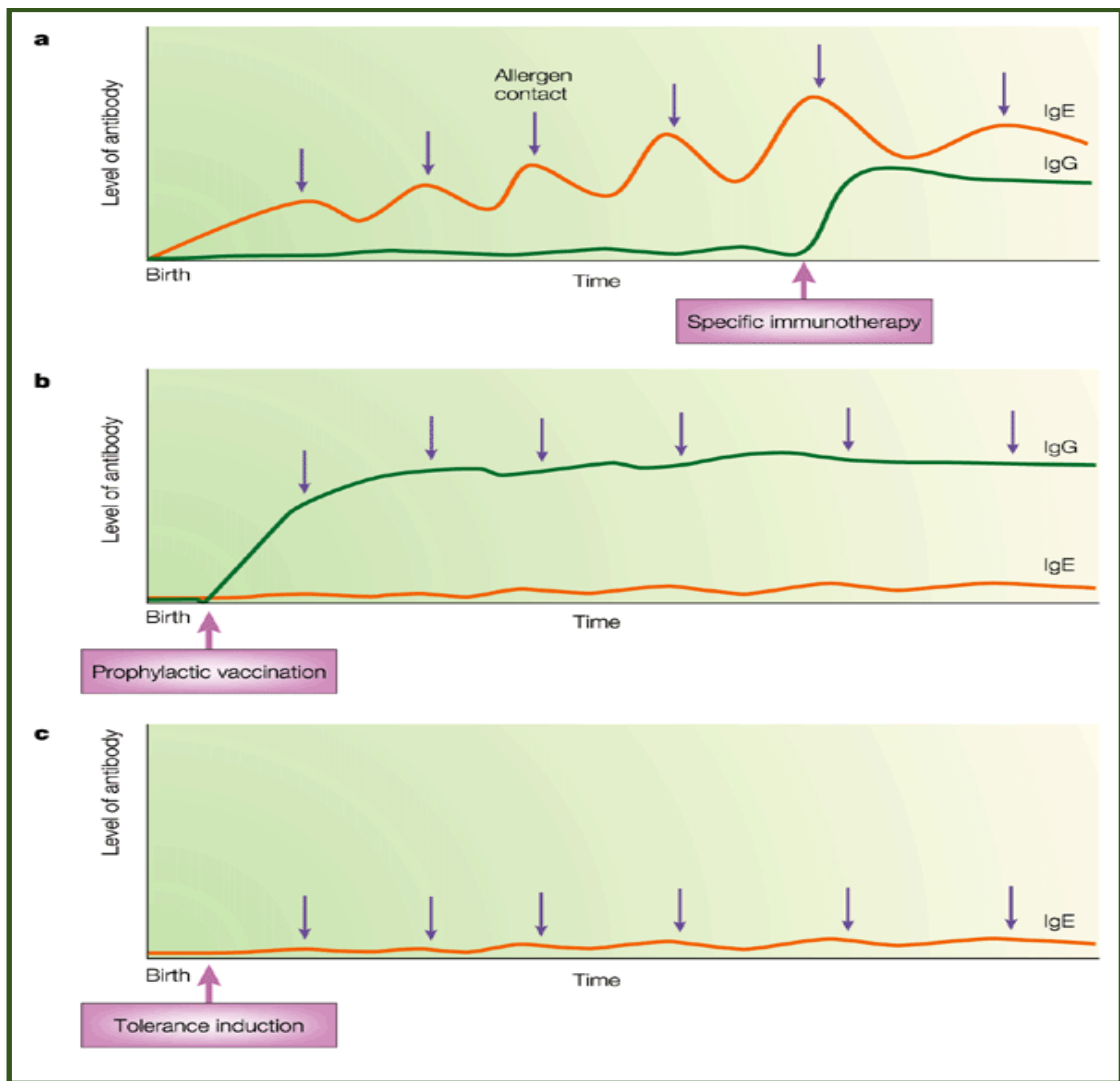
6.3.2. Další metody

Zatím komerčně nedostupnou možností pro léčbu nebo spíše prevenci vzniku alergického onemocnění, jsou některé další postupy založené na principu antigen specifické imunoterapie.

Některé studie se zabývají například chemicky modifikovanými alergeny (tzv. alergoidem), které by umožňovaly bezpečné podávání vysokých dávek alergenu. Zatím je ve fázi výzkumných studií, zda bude tato forma přínosem.⁽⁵²⁾⁽²⁹⁾

Ve výzkumu (viz Obrázek 12) je také podávání profylaktických vakcín u predisponovaných dětí ještě před iničiální senzitivací k některému z alergenů a tak možnost zabránění pozdějšímu vývinu alergie.⁽⁵³⁾

Dále se studuje možnost navození tolerance T lymfocytů za použití rekombinantních hypoalergenních derivátů kritických alergenů.⁽⁵³⁾



Obrázek 12 Schéma některých metod⁽⁵³⁾

Obrázek schématicky zachycuje⁽⁵³⁾:

- a) Specifická alergenová imunoterapie
- b) Profylaktická vakcína
- c) Navození tolerance T lymfocytů

Všechny tyto metody jsou závislé na identifikaci relevantní alergenové molekuly/epitopu, tedy poznání co nejpřesnějšího alergologického profilu pacienta. Stejně tak jejich realizace se bude opírat o postupy genového inženýrství a tvorbu čistých, případně modifikovaných terapeutických extraktů.⁽⁵³⁾

7. PRAKTICKÁ ČÁST

V praktické části se zabývám stanovením specifického IgE proti alergenům pylu břízy a bojínku lučního v krevním séru postupně metodou FEIA - Pharmacia CAP SYSTEMTM Specific IgE a pomocí některých rekombinantních alergenů břízy a bojínku metodou Uni-CAP[®] Specific IgE (Pharmacia Diagnostics). V závěru pak charakterizují specifické IgE ve vybraných sérech pomocí imunoblotu.

Testování je prováděno na půdě Centra imunologie a mikrobiologie Zdravotního ústavu se sídlem v Ústí nad Labem (CIM ZÚ).

Použila jsem séra 57 pacientů (39 žen a 18 mužů), která jsem vybírala dle databáze počítačového programu LisNet, který CIM ZÚ používá, a tedy podle výsledků vyšetření provedených na žádost lékařů prostřednictvím autorizované žádanky. Séra jsem vybírala na základě positivity ke směsi alergenů pylu trav (gx1 - srha, kostřava, jílek, bojínek, lipnice; gx3 - tomka vonná, troskut prstnatý, jílek, bojínek luční, čirok halepský) a směsi alergenů stromů (tx9 - olše, bříza, líska obecná, buk lesní, dub, jilm, platan, vrba bílá, jasan). Výsledky testů, které jsem měla v databázi CIM ZÚ k dispozici, se standardně vyjadřují semikvantitativně – tj. bývá pouze uvedeno, zda pacient reagoval pozitivně či negativně. Školící zařízení má však zavedeno své speciální vyhodnocování, které ještě rozlišuje míru positivity sér dle hodnot hladin IgE. Výsledky jsou tak vyjádřeny jako slabě pozitivní (hladiny 0,35 – 0,7 kU/l), pozitivní (hladiny 0,7 – 17,5 kU/l) a silně pozitivní (hladiny nad 17,5 kU/l).

Pro své účely jsem vybírala séra tak, aby byly zastoupeny všechny tři pozitivní kategorie, tedy séra těch pacientů, kteří měli hladinu specifického IgE proti směsi pylového extraktu tx9 a gx1, 3 větší než 0,35 kU/l.

Pacienty jsem dále rozdělila v návaznosti na jejich profily vnímavosti do čtyř pracovních skupin:

- První skupina (15 pacientů) byla z testovaných směsí alergenů senzitivní pouze ke směsi pylů stromů (tx9).
- Skupina druhá (15 pacientů) byla z testovaných směsí alergenů senzitivní pouze ke směsi pylů trav (gx1 a gx3).
- Do třetí skupiny (15 pacientů) jsem zařadila séra, která dávala pozitivní reakci tx9 a zároveň gx1 či gx3.
- Skupinu čtvrtou (12 pacientů) pak tvořila séra s pozitivní reakcí na tx9 a zároveň na další alergeny a jejich směsi (wx1, d1, h1).

Směsi tx9, gx1 a gx3 byly vybrány proto, že obsahují alergeny pylu břízy (tx9) a bojínku lučního (gx1, gx3), na něž jsem séra dále testovala. Čtvrtá skupina – pacienti s polyvalentní alergií – byla vybrána se záměrem posouzení významu zkřížených reakcí.

Vybraná séra jsem rozdělila po stejných částech do tří zkumavek pro následná stanovení a nechala zamrazit v mrazícím boxu při -20 °C.

7.1. METODICKÁ ČÁST

7.1.1. Stanovení positivity vybraných sér proti alergenům pylu břízy a bojínku metodou Pharmacia CAP SYSTEM™ Specific IgE FEIA

Princip metody

Fluoroenzymoimunoanalýza

Alergen, proti kterému zjišťujeme protilátky je kovalentně navázán v ImmunoCAPu a reaguje se specif. IgE protilátkami pacientova séra. Po přidání protilátky proti IgE značené enzymem se tato na IgE naváže a komplex se nechá inkubovat s vyvíjecím roztokem za vzniku fluorescenčních produktů, které detekujeme. Přístroj si sám vytvoří kalibrační křivku na základě použitých standardů a na základě této pak vzorky vyhodnotí.

Biologický materiál

- Krevní séra pacientů

Diagnostické reagensy

- Enzym-Anti-IgE (enzymem značená protilátka; obsahuje β -galaktozidázu, uchovávat při 2 – 8 °C do dne expirace, nesmí zmraznout)
- Vyvíjecí roztok (4-Methylumbelliferyl- β -D-galaktozid, uchovávat při 2 – 8 °C do dne expirace)
- Stop roztok (uhličitan sodný, uchovávat při 2 – 8 °C do dne expirace)
- Anti-IgE ImmunoCAP standard (immunoCAP s navázanou protilátkou v celulózovém nosiči, uchovávat při 2 – 8 °C do dne expirace)
- IgE Standardy (standardy s koncentrací lidského IgE 0,35; 0,7; 3,5; 17,5; 50,0 a 100,0 kU/l, kalibrováno podle 2. IRP (International Reference Preparation) 75/502 IgE lidského séra WHO, uchovávat při 2 – 8 °C 2 měsíce nebo -20 °C do dne expirace)

- Allergen ImmunoCAP (obsahují testované alergeny pylového extraktu t3 a g6 v zásobnících po 16-ti kusech, uchovávat při 2 – 8 °C do dne expirace)
- Promývací roztok (=17,2 ml Přísady do Promývacího roztoku, 80 ml Koncentrátu Promývacího roztoku v litru čištěné vody, obě složky uchovávat při 2 – 8 °C do dne expirace)
- Čištěná voda

Pomůcky

- Mikrotitrační destičky (Assay Microplates)
- Čtecí destičky (Reading Microplates)
- Dávkovač ImmunoCAPů
- Pipety, jednorázové špičky (50 µl)
- Gumové rukavice
- Stopky
- Zkumavky
- Odměrný válec 1000 ml

Přístrojové vybavení

- Promývačka ImmunoCAPů - Assay Washer 96 (Kabi Pharmacia Diagnostics)
- Navigační přístroj pro umístění ImmunoCAPů - Positioning Guide 96 (Pharmacia)
- Přístroj pro vyhodnocení fluorescence - FluoroCount 96 spojený s počítačovým softwarem MasterCAP 5.1 s možností tisku výsledků
- Třepačka - MS2 Minishaker (IKA®)

Měřitelný rozsah

- 0,35 až 100 kU/l u neředěného séra
- V jednom cyklu lze vyšetřit 84 pozic

Interpretace výsledků

Pro vyhodnocení hladiny specifického IgE (kU/l) se používá následné členění do tzv. RAST tříd:

- $\leq 0,35$...absence protilátek nebo nedetekovatelná hladina (třída 0)
- $0,35 - 0,7$...nízká hladina alergen specifických protilátek (třída 1)
- $0,7 - 3,5$...střední hladina alergen specifických protilátek (třída 2)
- $3,5 - 17,5$...vysoká hladina alergen specifických protilátek (třída 3)
- $17,5 - 50$...velmi vysoká hladina alergen specif. protilátek (třída 4)
- $50 - 100$...velmi vysoká hadina alergen specifických protilátek (třída 5)
- ≥ 100 ...velmi vysoká hladina alergen specifických protilátek (třída 6)

7.1.2.Stanovení positivity vybraných sér proti rekombinantním alergenům pomocí UniCAP® Specific IgE (Pharmacia Diagnostics)

Princip metody

Principem metody je opět FEIA. Není zde však zapotřebí standardů pro každé použití, přístroj má software pro uchování kalibračních křivek a kontrol v paměti po určitou dobu (nastaven 1 měsíc).

Biologický materiál

- Krevní séra pacientů

Diagnostické reagensy

- Konjugát Specifického IgE (azid sodný, β -galaktozidáza-anti-IgE $1 \mu\text{g/ml}$, použita myší monoklonální protilátka, uchovávat při $2 - 8^\circ\text{C}$ do dne expirace, nesmí zmraznout)
- Kontrola 1 – “Specific IgE Curve Control 1“ /CC-1/ (lidské IgE v pufru, uchovávat při $2 - 8^\circ\text{C}$ do dne expirace)
- Kontrola 2 – “Specific IgE Curve Control 2“ /CC-2/ (lidské IgE v pufru, uchovávat při $2 - 8^\circ\text{C}$ do dne expirace)
- Anti-IgE ImmunoCAP /a_IgE/ (myší monoklonální protilátky v pufru, v zásobnících po 16-ti kusech, uchovávat při $2 - 8^\circ\text{C}$ do dne expirace)
- Alergen ImmunoCAP (obsahují testované rekombinantní alergeny rBet v 1 a společně rBet v 2, 4 a rPhl p 1, 5 a rPhl p 7, 12 v zásobnících po 16-ti kusech, uchovávat $2 - 8^\circ\text{C}$ do dne expirace)

- Vyvíjecí roztok (4-Methylumbelliferyl- β -D-galaktozid 0,01% v pufru, uchovávat při 2 – 8 °C do dne expirace)
- Stop roztok (uhličitan sodný 4%, uchovávat při 2 – 8 °C do dne expirace)
- Promývací roztok (=17,2 ml Přísady do Promývacího roztoku, 80 ml Koncentrátu Promývacího roztoku v litru čištěné vody, obě složky uchovávat při 2 – 8 °C do dne expirace).
- Čištěná voda

Pomůcky

- Gumové rukavice
- Zkumavky na séra
- Odměrný válec 1000 ml

Přístrojové vybavení

- Přístroj UniCAP® Specific IgE (Pharmacia Diagnostics)

Měřitelný rozsah

- 0,35 až 100 kU/l
- Až 96 pozic v jednom cyklu

Interpretace výsledků

Pro vyhodnocení hladiny specifického IgE (kU/l) se používá následné členění do tzv. RAST tříd:

- $\leq 0,35$...absence protilátek nebo nedetekovatelná hladina (třída 0)
- 0,35 – 0,7...nízká hladina alergen specifických protilátek (třída 1)
- 0,7 – 3,5...střední hladina alergen specifických protilátek (třída 2)
- 3,5 – 17,5...vysoká hladina alergen specifických protilátek (třída 3)
- 17,5 – 50...velmi vysoká hladina alergen specif. protilátek (třída 4)
- 50 – 100...velmi vysoká hadina alergen specifických protilátek (třída 5)
- ≥ 100 ...velmi vysoká hladina alergen specifických protilátek (třída 6)

7.1.3. Charakterizace specifických protilátek IgE proti alergenům břízy a bojínku ve vybraných sérech metodou Immunoblottingu.

Princip metody

Metoda používá nitrocelulózkové stripy, do nichž byly při elektroforéze v polyakrylamidovém gelu zaneseny a navázány disociované podjednotky proteinů alergenového extraktu. Na tyto se při první inkubaci váže pro ně specifická primární protilátka přítomná v lidském séru. Při druhé inkubaci se pak přidává sekundární protilátka značená enzymem (zde alkalickou fosfatázou) a váže se na v membráně navázané IgE séra. Po přidání chromogenního substrátu se tento štěpí a my celou reakci vizualizujeme. Na základě vzdálenosti skvrn od čela stripu pak můžeme vypočítat molekulové hmotnosti složek alergenového extraktu, se kterými séra reagovala.

Biologický materiál

- 50 µl séra (séra byla vybraná z původních skupin na základě výsledků předchozích testů tak, aby byla zastoupena séra s kvantitativně i kvalitativně různorodou aktivitou)

Diagnostické reagensy

- Enzymem značená Anti-IgE protilátka (alkalickou fosfatázou značená myší monoklonální protilátka, uchovávat při 2 – 8 °C do dne expirace nebo 30 dní po otevření)
- Roztok na ředění vzorků (pufrovaný roztok bílkovin, uchovávat při 2 – 8 °C do dne expirace nebo 30 dní po otevření)
- Roztok substrátu (5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát a NBT v pufru, uchovávat při 2 – 8 °C do dne expirace)
- Koncentrát promývacího roztoku (30 ml naředit na 300 ml destilovanou vodou, uchovávat při 2 – 8 °C do dne expirace nebo 6 měsíců po zředění)
- “Allergen Strip Modules” (po osmi balené stripy se specifickými alergeny břízy a bojínku, uchovávat při 2 – 8 °C do dne expirace)
- Pozitivní/Negativní kontroly (pozitivní kontrolu uchovávat při -20 °C dva měsíce, negativní kontrolu při 2 – 8 °C do dne expirace nebo 30 dní po otevření)
- Destilovaná voda

Přístrojové vybavení

- Blotovací automat AUTOBLOT 2000 medTEC (Biolab Equipment)
- třepačka - MS2 Minishaker (IKA®)

Pomůcky

- Reakční vaničky (v balení po 5-ti kusech, každá s 10-ti drážkami pro provedení testu)
- Mikropipety a špičky
- Odměrný válec
- Pinzeta

Interpretace výsledků – výpočet molekulové hmotnosti

- Pro břízu: $\log MH = 0,28 \times d + 0,82$
- Pro bojíněk: $\log MH = 0,29 \times d + 0,84$
- (d = vzdálenost středu skvrny od červené obarvené zóny)

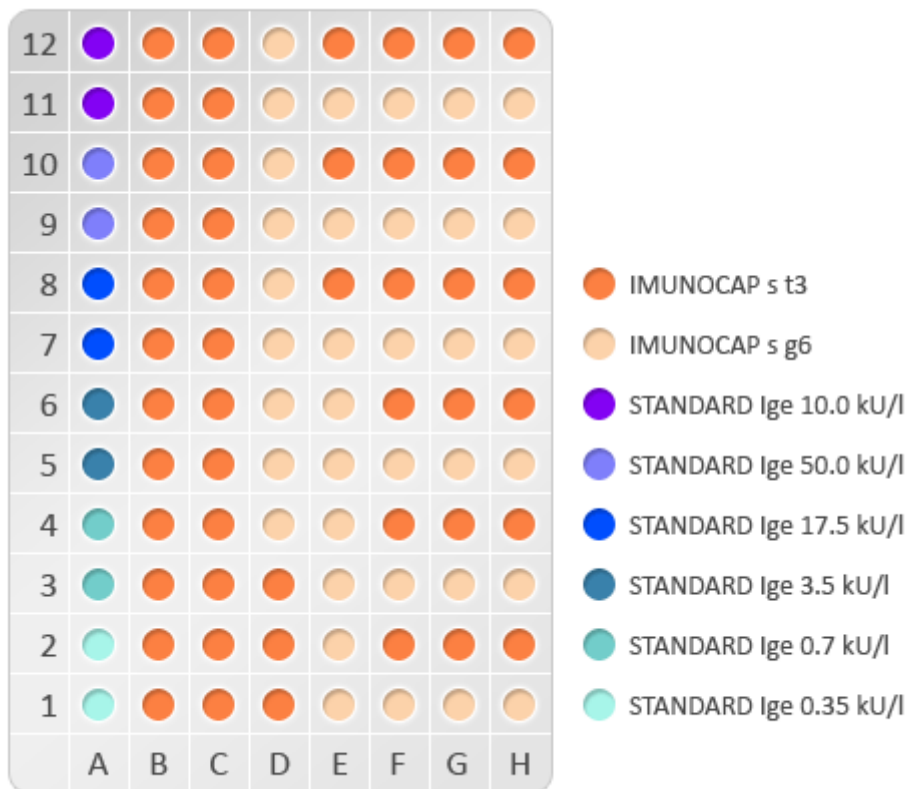
7.2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.2.1. Stanovení hladin specifického IgE sér pacientů proti alergenům pylu řízy (t3) a bojínku lučního (g6)

Postup při určení specifického IgE metodou Pharmacia CAP RAST FEIA:

1. Na prostřední zkušební mikrodestičku (Assay Microplates) – (viz Obr. 13) jsem rozmístila za navigační pomoci přístroje “Positioning Guide 96, Pharmacia“ Anti-IgE ImmunoCAPy pro standardy a také ImmunoCAPy obsahující zjišťovaný alergen v celulózovém nosiči pro zkoušená séra (t3 u skupin 1, 4, g6 u skupiny 2 a oboje u skupiny 3).
2. Tuto celou zkušební destičku jsem přenesla na promývačku (Assay Washer 96, Kabi Pharmacia Diagnostics) a nechala ImmunoCAPy provlhčit.
3. Do jamek další zkušební destičky jsem podle „průvodce“ rozpipetovala po 50 µl standardy (IgE Standardy) a séra pacientů, která jsem předtím protřepala na třepačce - MS2 Minishaker (IKA®)

4. Provlhčené ImmunoCAPy jsem přemístila do jamek se standardy a séry a nechala inkubovat 30 minut při pokojové teplotě (18 – 32 °C). *Zkoušený alergen kovalentně navázaný v ImmunoCAPu v tento moment reaguje se specifickým IgE ve vzorku pacientova séra (a standardu).*
5. Poté jsem nechala CAPy znovu promýt. *V tomto kroku se odstraní přebytečné nespecifické IgE.*
6. Přenesla jsem ImmunoCAPy na další destičku, do jejichž jamek jsem předem napipetovala 50 µl Enzyme-Anti-IgE a nechala inkubovat 150 minut při pokojové teplotě. *Enzymem značené protilátky Anti-IgE vytvoří se specif. IgE komplex.*
7. Opět jsem nechala CAPy s mikrodestičkou promýt. *Odstráním tak nenavázaný Enzym-Anti-IgE.*
8. Připravila jsem si destičku s 50 µl Vyvíjecího roztoku v každé jamce.
9. ImmunoCAPy jsem do destičky s vyvíjecím roztokem přenášela po řádcích v přesných, patnáctivteřinových intervalech. Nechala jsem 10 minut inkubovat při pokojové teplotě. *Komplex Enzym-Anti-IgE-IgE, který jsme získali v bodě č. 6, nyní reaguje s vyvíjecím činidlem.*
10. Destičku jsem přenesla do promývačky Assay Washer 96 tak, aby promývání Stop roztokem začalo přesně po deseti minutách inkubace. *Tímto roztokem zastavíme další průběh reakce.*
11. Eluát po promytí zůstal ve čtecí destičce (Reading Microplate), kterou vsunu do měřicího přístroje FluoroCount 96, který vyhodnotí fluorescenci jednotlivých eluátů.
12. Pomocí počítačového programu MasterCAP 5.1 se porovnáním s naměřenými hodnotami standardů vyhodnotí výsledky vzorků sér pacientů., které jsem pak zaznamenala do tabulky.



Obrázek 13 Schéma mikrotitrační destičky

7.2.2. Stanovení hladin specifického IgE proti rekombinantním alergenům Bet v 1, Bet v 2 a 4, Phl p 1 a 5, Phl p 7 a 12.

Postup při určení specifického IgE systémem UniCAP® Specific IgE (Pharmacia Diagnostics):

1. Krevní séra pacientů jsem nechala roztát.
2. Do přístroje UniCAP 100ε jsem zadala požadovaná vyšetření.
3. Poté jsem podle pokynů na displeji rozmístila reagentie, testované vzorky a ImmunoCAPy do předepsaných pozic.
4. Spustila jsem pracovní proces.
5. Asi po 150-ti minutách procesu mi přístroj vytiskl pásku s výsledky, které jsem zpracovala do tabulky.

7.2.3. Charakterizace specifických protilátek IgE proti alergenům břízy a bojínku ve vybraných sérech

Postup při určení specifického IgE metodou AlaBLOT:

1. Testovací proužky – stripy (“Allergen Strip Modules”) – jsem nechala 5 – 10 minut provlhčit (Promývacím roztokem) v blotovacím automatu AUTOBLOT 2000 medTEC.
2. V průběhu vlhčení jsem si naředila séra a kontroly ředícím roztokem (50 μ l séra + 450 μ l Ředícího roztoku) a řádně promíchala na třepače.
3. Přebytečný Promývací roztok jsem nechala odsát a do blotovacích vaniček (Reaction Trays) jsem ke stripům přenesla naředěná séra a kontroly. Nechala jsem inkubovat 2 hodiny při pokojové teplotě. *Na nitrocelulóзовé membráně se na ukotvené podjednotky peptidů naváží alergen specifické protilátky IgE vyšetřovaného séra.*
4. Poté jsem sérum odsála a třikrát jsem stripy promývala 5 minut (Promývacím roztokem).
5. Stripy jsem nechala po odsátí promývacího roztoku vysušit.
6. Do každé drážky blotovací vaničky jsem ke stripům napipetovala 0,5 ml Enzymem značeného konjugátu a nechala 30 minut inkubovat při pokojové teplotě. *Při této inkubaci se na primární protilátku, IgE lidského séra, naváže sekundární protilátka, myší monoklonální IgE, značená enzymem, alkalickou fosfatázou.*
7. Konjugát jsem odsála a opět třikrát promývala stripy 5 minut Promývacím roztokem.
8. Poté jsem přidala 0,5 ml Roztoku substrátu a nechala 15 minut inkubovat, dokud se neobjevily barevné proužky. *Chromogenní substrát alkalické fosfatázy je v tento moment štěpen enzymem za vzniku modrých produktů, které detekujeme.*
9. Substrát jsem odsála, stripy jsem promyla třikrát destilovanou vodou a nechala je uschnout na filtračním papíru.
10. Skvrny na stripech jsem následně vyhodnotila – změřila vzdálenost středu každé skvrny od čela stripu (růžová skvrna) a z naměřených hodnot jsem dosazením do vzorce (viz kap. 7.1.3.) pro výpočet logaritmu molekulové hmotnosti (MH) získala hodnoty MH složek alergenového extraktu, proti kterým byly přítomny specifické IgE v sérech. Výsledné hodnoty MH jsem zpracovala do tabulky.

8. VÝSLEDKY

8.1.1. Porovnání hladin specifického IgE proti alergenům pylu břízy a bojínku s výsledky stanovení specifického IgE proti jednotlivým rekombinantním alergenům.

Hladiny specifického IgE proti pylu břízy a bojínku a proti jednotlivým rekombinantním alergenům u zjišťovaných sér jsou uvedeny v tabulkách 8 – 11. V sloupci tx9, gx1 a 3 je uváděna míra pozitivivity sér získaná z počítačové databáze LisNet, na jejímž podkladě jsem séra vybírala. Další sloupce udávají hodnoty a odpovídající RAST třídy naměřených hodnot specif. IgE proti alergenům pylového extraktu břízy (t3), bojínku (g6) a proti rekombinantním alergenům pylu těchto rostlin. Rekombinantní alergeny rBet v 2 a 4, rPhl p 1 a 5, rPhl p 7 a 12 byly stanovovány po dvojicích. Červeně jsou zvýrazněna séra, která byla použita také pro následující metodu – imunoblot.

a) Výsledky vyšetření specifického IgE v sérech pacientů **SKUPINY 1** proti alergenům pylu břízy t3 a proti rekombinantním alergenům (Tabulka 8).

Tabulka 8. Výsledky vyšetření sér pacientů skupiny 1.

sérum č.	M/Z	věk	tx9	t3		rBet v 1		rBet v 2, 4	
				(kU/l)	třída	(kU/l)	třída	(kU/l)	třída
1	Z	40	++	39,1	4	28,6	4	< 0,35	0
2	Z	55	++	1,35	2	1,21	2	< 0,35	0
3	M	44	++	13,5	3	13,2	3	< 0,35	0
4	Z	26	+++	33,9	4	31,4	4	< 0,35	0
5	Z	27	++	1,77	2	0,99	2	< 0,35	0
6	M	33	+++	61,1	5	50,6	5	< 0,35	0
7	Z	22	++	34,7	4	30,4	4	< 0,35	0
8	M	47	+++	56,1	5	64,1	5	< 0,35	0
9	Z	17	+	0,93	2	< 0,35	0	1,46	2
10	Z	32	++	11,1	3	10,8	3	< 0,35	0
11	Z	42	++	10,5	3	9,3	3	< 0,35	0
12	Z	53	++	10,3	3	8,12	3	< 0,35	0
13	Z	56	++	1,35	2	1,21	2	< 0,35	0
14	Z	31	++	2,92	2	2,9	2	< 0,35	0
15	Z	49	++	11,1	3	10,2	3	< 0,35	0

Vysvětlivky:

Semikvantitativní hodnocení výsledků hladin sIgE proti směsi tx9:

<0,35kU/l (negativní) 0,7-17,5kU/l (pozitivní;++)
 0,35-0,7kU/l (slabě pozitivní;+) >17,5kU/l (silně pozitivní;+++)

Hodnocení výsledků hladin sIgE proti rekombin. alergenům (RAST třída):

≤0,35 (třída 0) 17,5–50 (třída 4)
 0,35–0,7 (třída 1) 50–100 (třída 5)
 0,7–3,5 (třída 2) ≥100 (třída 6)
 3,5–17,5 (třída 3)

Po rozdělení sér pozitivních ke směsi pylu stromů tx9 alergeny břízy t3 se ukázalo, že reakce na pyl břízy - t3 (obsažen také v tx9) odpovídala intenzitě reakce ke směsi – viz graf Obr. 12.

Při testování rekombinantními alergeny břízy rBet v 1, rBet v 2 a rBet v 4 je vidět, že za většinu hypersenzitivních reakcí odpovídá hlavní alergen břízy rBet v 1 a i konkrétní hodnoty hladin specif. IgE spolu korelují - viz graf Obr. 16. V tomto souboru 15 pacientů

c) Výsledky vyšetření specifického IgE v sérech pacientů **SKUPINY 3** proti alergenům pylu břízy t3 a bojínku g6 a proti rekombinantním alergenům. (Tabulky 10a, 10b)

Tabulka 10a. Výsledky vyšetření sér pacientů skupiny 3 - bříza.

č. séra	M/ Z	věk	tx9	t3		rBet v 1		rBet v 2, rBet v 4	
				(kU/l)	třída	(kU/l)	třída	(kU/l)	třída
31	Z	7	+++	99,6	5	68,8	5	<0,35	0
32	Z	16	++	27,5	4	21,3	4	<0,35	0
33	M	17	++	23,4	4	18,1	4	<0,35	0
34	Z	12	++	1,74	2	1,34	2	<0,35	0
35	M	17	++	7,62	3	3,16	2	2,58	2
36	Z	37	++	2,76	2	2,04	2	<0,35	0
37	M	10	+++	83,9	5	67,6	5	<0,35	0
38	M	39	++	2,74	2	2,52	2	<0,35	0
39	Z	45	++	11	3	8,89	3	<0,35	0
40	M	8	+++	> 100	6	>100	6	<0,35	0
41	Z	59	++	30,1	4	23,3	4	<0,35	0
42	Z	15	+	1,72	2	0,84	2	<0,35	0
43	Z	31	+	0,69	1	0,48	1	<0,35	0
44	M	7	+	1,28	2	0,85	2	<0,35	0
45	Z	31	++	8,32	3	7,21	3	<0,35	0

Tabulka 10b. Výsledky vyšetření sér pacientů skupiny 3 - bojínek.

č. séra	M/ Z	věk	gx1	gx3	g6		rPhl p 1, rPhl p 5		rPhl p 7, rPhl p 12	
					(kU/l)	třída	(kU/l)	třída	(kU/l)	třída
31	Z	7		+++	44,5	4	29,5	4	<0,35	0
32	Z	16		++	1,43	2	0,98	2	<0,35	0
33	M	17		++	1,37	2	0,91	2	<0,35	0
34	Z	12		+++	53,5	5	19,9	4	<0,35	0
35	M	17		+++	>100	6	58,6	5	10,2	3
36	Z	37		++	15,4	3	10,5	3	<0,35	0
37	M	10		++	11,8	3	10,7	3	<0,35	0
38	M	39		++	2,88	2	2,76	2	<0,35	0
39	Z	45		+	0,38	1	0,79	2	<0,35	0
40	M	8		++	0,63	1	0,74	2	<0,35	0
41	Z	59	++	++	5,5	3	3,3	2	<0,35	0
42	Z	15		+++	41,2	4	15,8	3	<0,35	0
43	Z	31		+++	22,4	4	17,9	4	<0,35	0
44	M	7		++	2,38	2	2,91	2	<0,35	0
45	Z	31	++	++	11,1	3	9,73	3	<0,35	0

Vysvětlivky viz Tabulky 8 a 9

Testy proti alergenovým extraktům pylů t3 a g6 v této skupině také odpovídaly výsledkům testů proti směsím tx9 a gx1, 3 a 4 - grafy Obr. 14 a 15.

Rekombinantními alergeny jsem prokázala, že i v těchto skupinách zodpovídají za reaktivitu pacientů především hlavní alergeny daných pylů (rBet v 1, rPhl p 1 a rPhl p 5). Pouze jeden pacient (č. 35) měl specifické IgE protilátky i proti vedlejším alergenům břízy i bojínku. U ostatních odpovídaly hladiny specif. IgE proti hlavním alergenům předchozímu stanovení proti alergenovému extraktu - viz grafy Obr. 16 a 17.

d) Výsledky vyšetření specifického IgE v sérech pacientů SKUPINY 4 proti alergenům pylu břízy t3 a proti rekombinantním alergenům. (Tabulka 11)

(Hodnocení pozitivitý sér ke směsím wx1, wx3, d1, h1 pro přehlednost neuvádím.)

Tabulka 11. Výsledky vyšetření sér pacientů skupiny 4

č. séra	M/Z	věk	tx9	t3		rBet v 1		rBet v 2, rBet v 4	
				(kU/l)	třída	(kU/l)	třída	(kU/l)	třída
46	Z	49	+++	47,3	4	43,6	4	< 0,35	0
47	M	41	++	4,78	3	5,67	3	< 0,35	0
48	Z	31	++	13,2	3	16,7	3	< 0,35	0
49	Z	60	++	1,85	2	1,56	2	< 0,35	0
50	Z	26	++	1,89	2	1,65	2	< 0,35	0
51	Z	22	++	1,81	2	1,6	2	< 0,35	0
52	M	34	++	1,35	2	1,1	2	< 0,35	0
53	M	31	++	2,41	2	2,39	2	< 0,35	0
54	Z	21	+	0,93	2	0,83	2	< 0,35	0
55	Z	44	++	14,1	3	13,3	3	< 0,35	0
56	M	4	++	2,89	2	2,32	2	< 0,35	0
57	Z	32	+++	>100	6	91,5	5	< 0,35	0

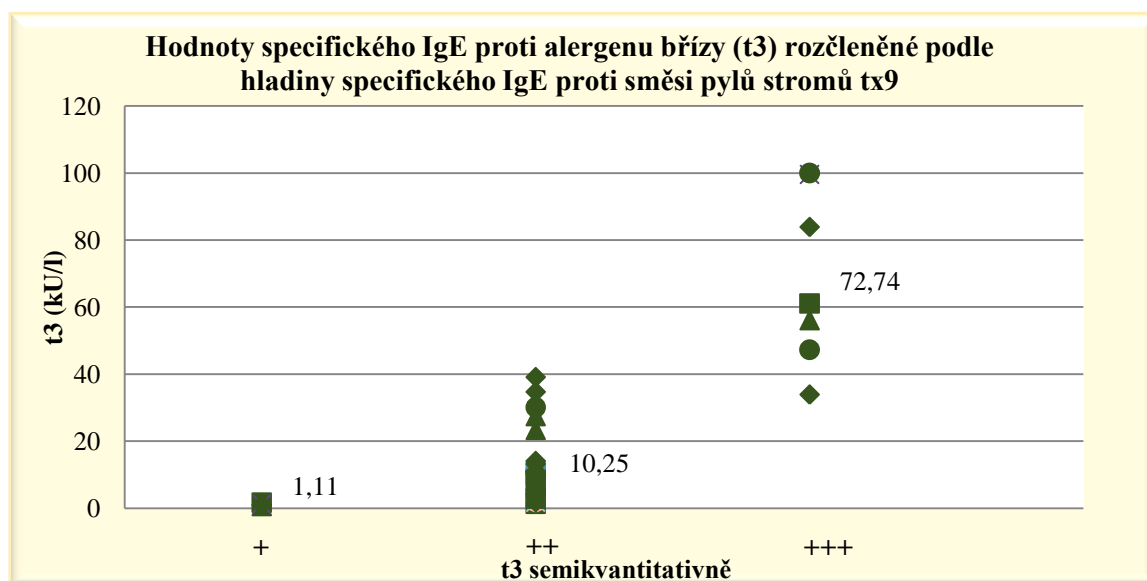
Vysvětlivky viz Tabulka 8

Výsledky stanovení reaktivity proti alergenům břízy t3 odpovídaly výsledkům stanovení reaktivity proti tx9 – viz graf Obr. 14.

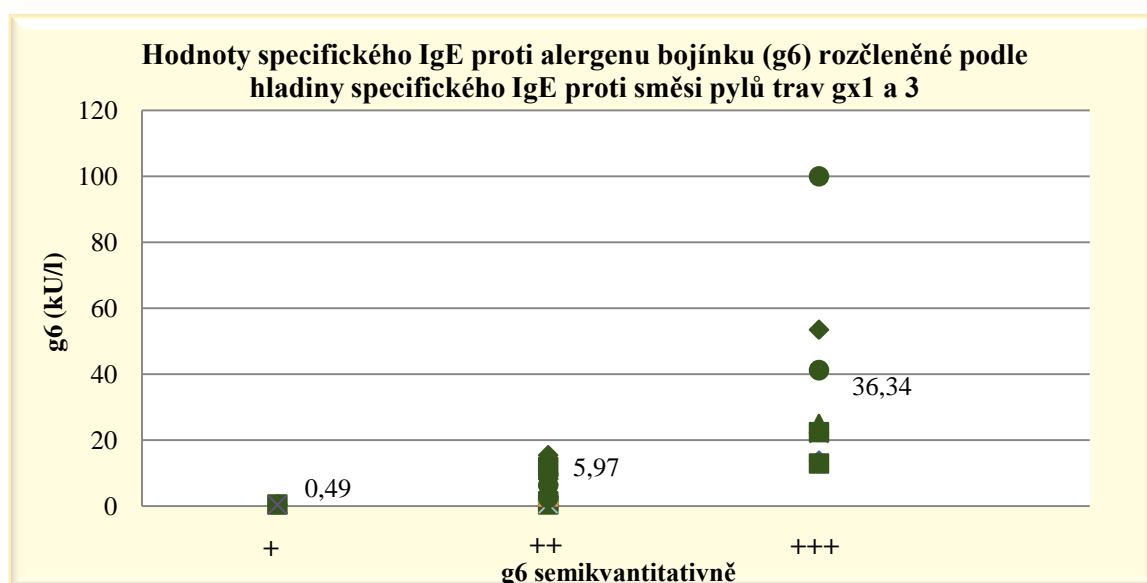
Ve skupině reagovala všechna séra pozitivní k alergenu t3 s hlavním alergenem břízy rBet v 1 a odpovídaly si i konkrétní hladiny specif. IgE - viz graf Obr. 16.

Žádný pacient nebyl reaktivní k vedlejším alergenům.

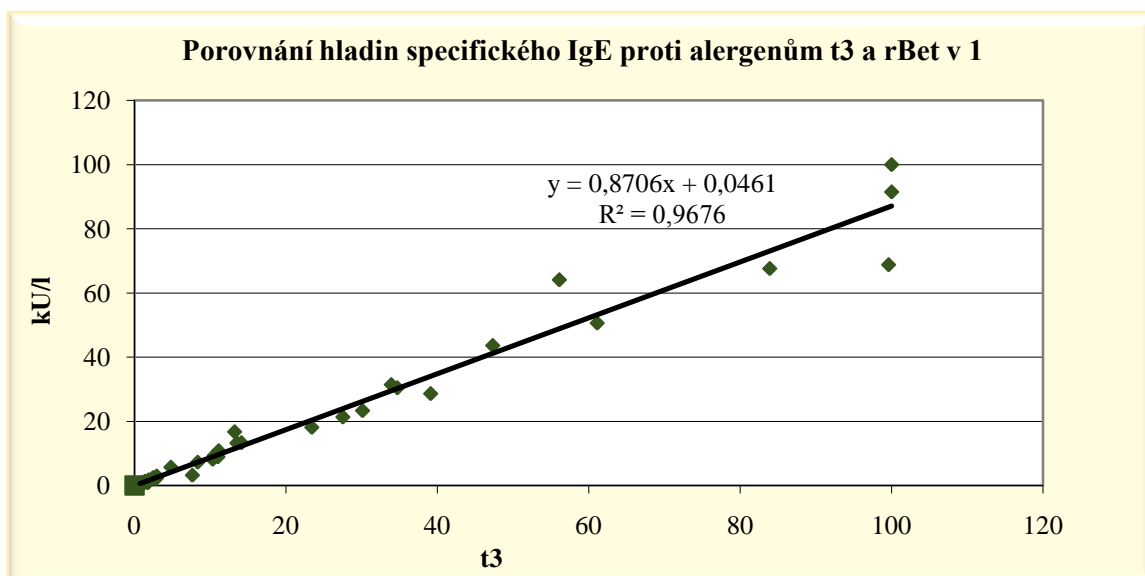
e) Grafické znázornění:



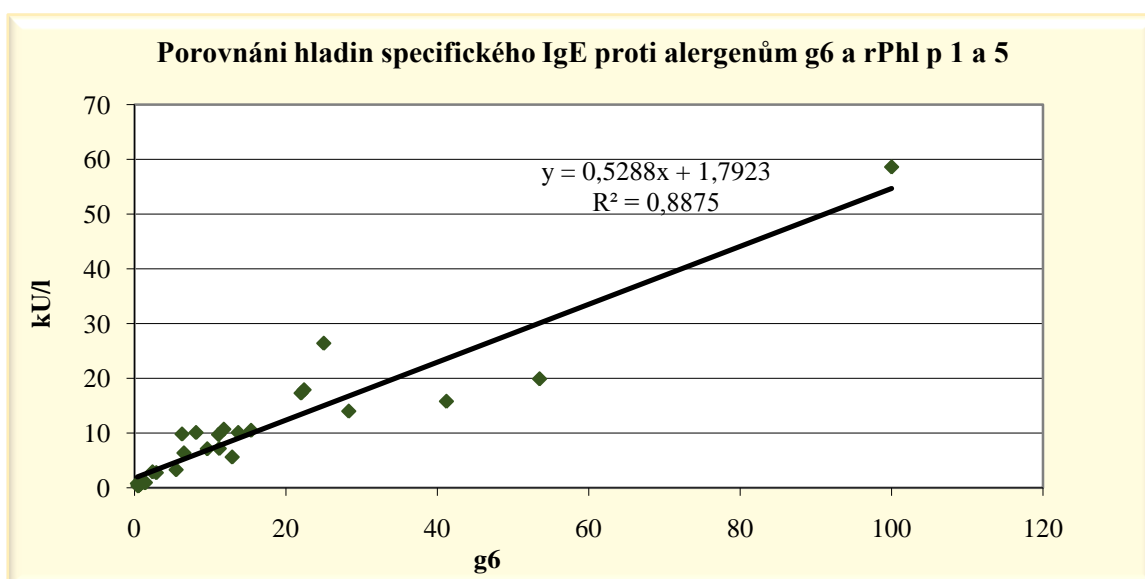
Obrázek 14. Porovnání reaktivity proti směsi pylů stromů a proti alerginovému extraktu břízy u celého souboru vyšetřovaných sér.



Obrázek 15. Porovnání reaktivity proti směsi pylů stromů a proti alerginovému extraktu bojínku u celého souboru vyšetřovaných sér.



Obrázek 16. Grafické znázornění vztahu hladin sIgE proti alergenovému extraktu a hlavnímu rekombinantnímu alergenů u celého souboru vyšetřovaných sér-bříza.



Obrázek 17. Grafické znázornění vztahu hladin sIgE proti alergenovému extraktu a hlavnímu rekombinantnímu alergenům u celého souboru vyšetřovaných sér-bojinek.

8.1.2. Charakterizace specifických protilátek v séru proti vybraným alergenům metodou imunoblotu.

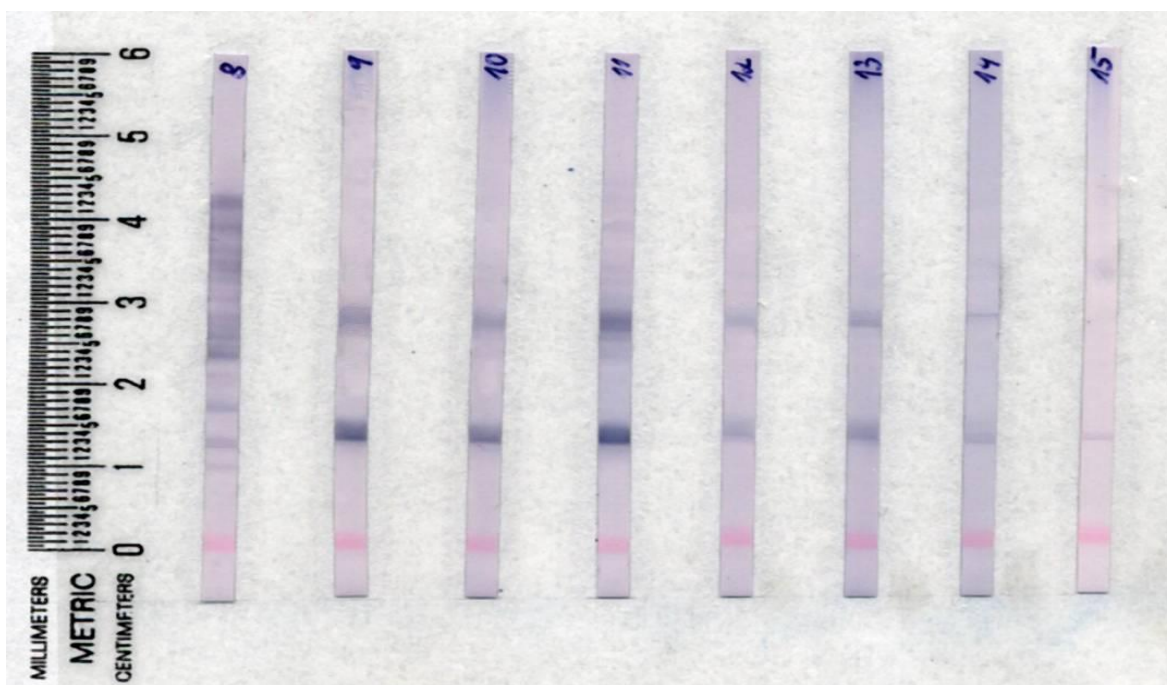
U 15-ti sér jsem prokázala přítomnost specifického IgE proti složkám pylového extraktu břízy a bojínku. Zaokrouhlené vypočítané molekulové hmotnosti složek extraktů, se kterými reagovalo specif. IgE v sérech uvádí tabulky 12 a 13. Pro dokreslení uvádím i výsledné obrázky blotů (Obr. 18 a 19).

a) Stanovení přítomnosti specifických IgE proti alergenům pylu **břízy** bělokoré:

Tabulka 12. Výsledné MH alergenů pylu břízy, se kterými séra reagovala

strip	č. séra	MH (kDa) - bříza							
		12,5	14,5	16,0	19	24,5	29,0	36,5	91,0
8	35								
9	37			16			29	36,5	
10	31			16,0			29	36,5	
11	40			16,0			29	36,5	
12	32			16,0				36,5	
13	6			16,0				36,5	
14	11			16,0				36,5	
15	13			16,0					

U všech sér byla potvrzena reaktivita proti některé ze složek pylového extraktu břízy.



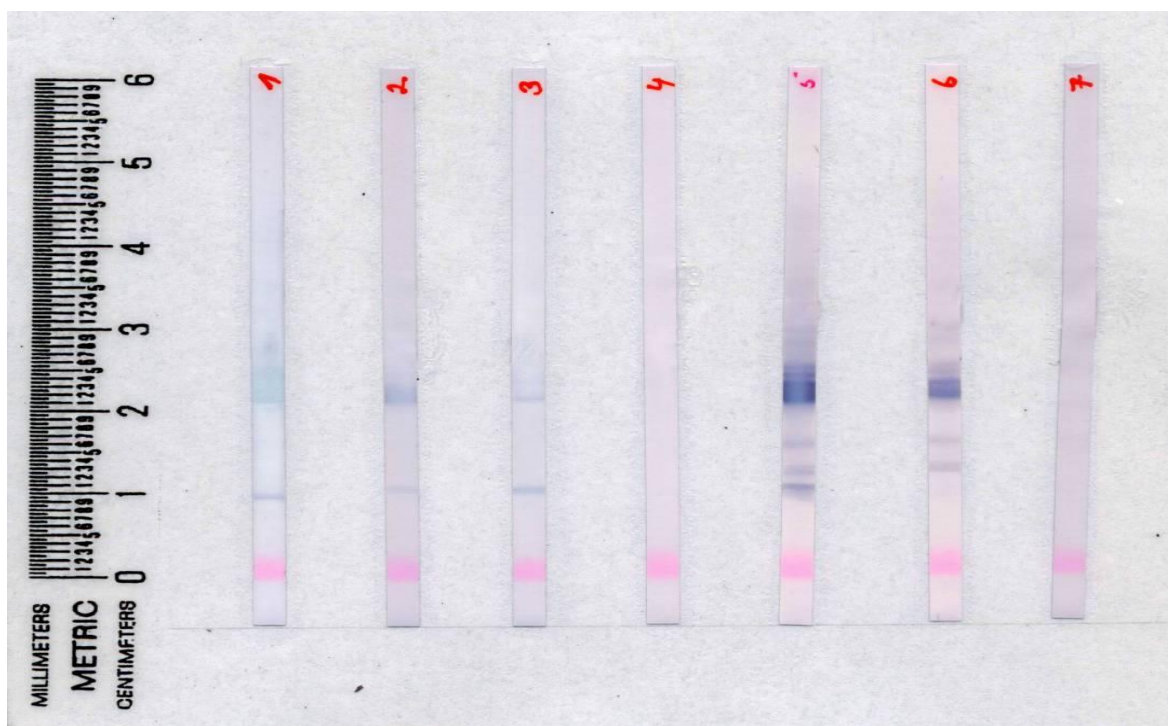
Obrázek 18. Výsledek imunoblotu - bříza

b) Stanovení přítomnosti specifických IgE proti alergenům pylu **bojínku** lučního:

Tabulka 13. Výsledné MH alergenů pylu bojínku, se kterými séra reagovala

strip	č. séra	MH (kDa) - bojínek					
1	35	13			19,5	30	
2	37		14		19,5	30	
3	31		14			30	
4	40						
5	22		14	16	19,5	30	33,0-36,5
6	23			16	19,5	30	33,0-36,5
7	24						

Dvě séra (č. 40 a 24) neobsahovala žádné specif. IgE protilátky proti složkám pylového extraktu bojínku.



Obrázek 19. Výsledek imunoblotu - bojínek

9. KLINICKÁ ČÁST

V klinické části se zabývám sledováním hladin specifického IgE, IgG a IgG4 u pacientů, kterým je aplikována specifická alergenová imunoterapie (SIT).

Zvýšení hladin specifických IgG, a především IgG4 protilátek podle některých autorů indikuje efektivní odpověď imunitního systému na vhodnou terapii.⁽⁵⁴⁾

Hladina specifického IgE proti danému alergenu by naopak měla (po počátečním vzrůstu) v průběhu SIT klesat.⁽³²⁾

Vybráni byli pacienti na základě pozitivitu prick testů, případně vyšetření specifického IgE, kterým byla v roce 2001-2004 nasazena SIT v ambulanci klinického alergologa v Ústí nad Labem.

Testování jsem prováděla na půdě Centra imunologie a mikrobiologie Zdravotního ústavu se sídlem v Ústí nad Labem (CIM ZÚ).

Cílem bylo zjistit odezvu alergen specifických protilátek v jednotlivých fázích imunoterapie a doložit tak její účinnost.

Pro stanovení hladin specifických protilátek proti směsi pylu břízy (t3) a bojínku (g6) byly použity metody popsané v Praktické části – metoda FEIA – pomocí přístroje Pharmacia CAP SYSTEMTM Specific IgE (kap. 7. 1. 1).

Stejná metoda byla použita pro stanovení za použití rekombinantních alergenů břízy a bojínku na přístroji UniCAP[®] Specific IgE (Pharmacia Diagnostics) - nyní nově ImmunoCAP[®] 100 (Phadia)- (kap. 7. 1. 2.).

9.1. METODIKA

Pacienti

Do experimentu bylo zařazeno celkem 10 pacientů (6 žen a 4 muži) ve věku 28-41 let, kterým byla v roce 2001-2004 zavedena SIT v ambulanci klinického alergologa v Ústí nad Labem.

Před zavedením terapie pacienti udávali většinou sezónní, případně i celoroční potíže jako rýma, ucpaný nos, svědění sliznic, slzení a pálení očí, kýchání, dráždivý kašel atd.

SIT byla indikována na základě výsledků kožních testů a/nebo vyšetření sérových hladin specifického IgE proti směsím alergenů. U šesti pacientů byla potvrzena pylová alergie vůči směsi pylu trav (tx3), u čtyř pacientů pak proti směsi pylu stromů (gx6).

U všech pacientů byla použita depotní injekční forma léčby a standardní protokol podávání.

SIT byla prováděna preparáty firmy Stallergenes – Phostal depotní injekce (konkrétní poměr alergenů dle ošetřujícího alergologa v Tabulce 14). Dalším pacientům byla aplikována depotní vakcína firmy Sevapharma – 2 pacienti H-AL DEPOT (Pollens) časná jarní směs, 6 pacientů H-AL DEPOT (Pollens) tráva I. Tabulka 14 uvádí přehled vakcín.

Pacientům byla po dobu léčby povolena medikace (antihistaminika, lokální kortikoidy, bronchodilatancia, nosní dekonescens).

Dva pacienti (P-9 a P-10) v průběhu prvního půlroku léčbu ukončili (1 pacient se k dalším kontrolám nedostavil, u 1 pacientky se objevila asi dva dny po aplikaci nežádoucí reakce a odmítla dále pokračovat) a do konečného testování jsem je tedy nezahrnula.

Pacienti před zařazením do studie podepsali informovaný souhlas – viz Obr. 20
Tabulka 14 uvádí přehled vakcín.

Tabulka 14. Přehled použitých vakcín

Pacient	Vakcína	Výrobce	Forma	Alergen	Standardizace
					jednotky
P-1	PHOSTAL	Stallergenes	depot. Inj.	701(20%), 605(40%), 615(40%)	ANO/ IR
P-2	H-AL	Sevapharma	depot. Inj.	Jarní časná směs	NE/ PNU
P-3	PHOSTAL	Stallergenes	depot. Inj.	671(10%), 605(10%), 615(80%)	ANO/ IR
P-4	H-AL	Sevapharma	depot. Inj.	Jarní časná směs	NE/ PNU
P-5	H-AL	Sevapharma	depot. Inj.	Trávy I.	ANO/ JSK
P-6	H-AL	Sevapharma	depot. Inj.	Trávy I.	ANO/ JSK
P-7	H-AL	Sevapharma	depot. Inj.	Trávy I.	ANO/ JSK
P-8	H-AL	Sevapharma	depot. Inj.	Trávy I.	ANO/ JSK
P-9	H-AL	Sevapharma	depot. Inj.	Trávy I.	ANO/ JSK
P-10	H-AL	Sevapharma	depot. Inj.	Trávy I.	ANO/ JSK

Vysvětlivky: Jarní časná směs (olše, bříza, habr, líska, jasan, vrba)

Trávy I.(ovsík, srha, kostřava, jílek, bojínek,žito)

701(směs 3trav), 605(pelyněk), 615(bříza), 671(žito), 605(pelyněk)

Sevapharma = Sevapharma a.s.,Praha

Stallergenes = Stallergenes S.A, Antony Cedex, Francie

H-AL= H-AL DEPOT (POLLENS)

Zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem

Imunologický odbor

Moskevská 15, 400 01 Ústí n. L.

telefon: 472 772 645; e-mail: imunologie@khsulbukov.cz

fax: 472 770 156

Informovaný souhlas

Příjmení a jméno:

Rodné číslo:/.....

Vaše onemocnění, pro které jste ošetřován a léčen v ordinaci alergologie a klinické imunologie u MUDr. [REDAKCE], je charakterizováno nálezem zvýšené hladiny protilátky typu IgE specifické pro bojínku luční, břízu bradavičnatou nebo roztoče.

V současnosti jste léčen(a) nebo uvažujete o zahájení léčby alergie vakcínou. V souladu s pokrokem vyšetřovacích metod se v současnosti nabízí nová možnost sledování účinnosti specifické imunoterapie (SIT, léčby alergie vakcínou). Jedná se o laboratorní vyšetření specifické protilátky typu IgE proti konkrétním alergenům břízy, bojínku nebo roztoče (každý obsahuje několik hlavních molekul, které jsou zodpovědné za vznik alergie). Dalším vyšetřovaným parametrem jsou specifické protilátky typu IgG proti těmto alergenům, které mají ochranný charakter a jejich vzestup v průběhu terapie je žádoucí.

Cílem studie, do níž je Vám zařazení nabízeno, je monitorování účinnosti léčby po dobu podávání vakcíny. Z tohoto důvodu jsou ve studii zařazena vyšetření krve, která se při léčbě alergie běžně neprovádí. Výsledky těchto vyšetření mohou přispět k výzkumu účinnosti prováděné SIT. Důsledky zařazení pacienta do studie:

- zařazení do studie znamená opakovaný odběr vzorku žilní krve v množství 5-10ml opakovaně po dobu SIT v rozmezí 6 měsíců (tj. max. 2x ročně). Odběr bude probíhat v ambulanci MUDr. [REDAKCE] při pravidelné návštěvě.
- využití údajů o věku, pohlaví, o průběhu onemocnění a výsledcích dalších již v minulosti provedených vyšetření pro vyhodnocení výsledků (údaje jsou zpracovávány pod kódem tzn. anonymně – jméno pacienta není používáno).
- účast ve studii nebude mít vliv na zvolenou léčbu a další péči.
- náklady spojené s provedením vyšetření nebudou účtovány zdravotním pojišťovám.

Prohlašuji, že jsem prostudoval(a) cíl studie a souhlasím se svou účastí. Při návštěvě svého ošetřujícího lékaře mohu obdržet další doplňující informace. Odebrání vzorku krve pro účely studie nebude mít žádný vliv na způsob léčby.

V.....dne.....

.....
podpis pacienta

Obrázek 20. Informovaný souhlas

Metody

Pro českou lokalitu je typické vysoké procento výskytu senzitivace na pyl břízy a pylu trav. Proto byli zvoleni pacienti s dominující vazbou na pyl jarních stromů (soubor A) a pylu trav (soubor B).

Tvorba protilátek proti směsi pylů břízy nebo bojínku a hlavním a vedlejším rekombinantním alergenům těchto zdrojů byly zvoleny jako parametry monitorování laboratorní odezvy specifické alergenové imunoterapie.

Skupina A (4 pacienti) - sledováno specifické IgE, IgG, IgG4 proti pylovému extraktu a některým rekombinantním alergenům břízy

Skupina B (4 pacienti) - sledováno specifické IgE, IgG, IgG4 proti pylovému extraktu a některým rekombinantním alergenům bojínku

Séra pacientů byla odebírána v průběhu SIT v přibližně půlročních intervalech, pro účely následných stanovení byla uchovávána při -20 °C a poté testována na CIM ZÚ.

Pomocí metod popisovaných v předchozí Praktické části (kap. 7. 1. 1. a 7. 1. 2.) jsem stanovila hladiny specifických IgE, IgG a IgG4 proti přirozeným alergenovým extraktům a některým rekombinantním alergenům pylu břízy nebo bojínku.

Toto vyšetření se zatím v klinické praxi běžně neprovádí a je předmětem klinického výzkumu.

Několik studií ukázalo, že úspěšnost alergenové imunoterapie odráží zvýšená tvorba alergen specifických IgG/IgG4 protilátek. ^{(46) (54) (55)}

Proto bylo pro monitorování odezvy terapie provedeno stanovení specifických protilátek IgG a IgG4 proti alergenům pylu břízy a bojínku a proti rekombinantním formám hlavních a některých vedlejších alergenů. Některé literární odkazy naopak popisují, že se tato korelace jasně nepotvrdila a tudíž se toto stanovení pro praktické hodnocení SIT nedoporučuje. ⁽⁴⁴⁾⁽⁵⁶⁾

V rutinní praxi je lépe dostupné stanovení specifického IgE, které bylo provedeno proti alergenům pylu břízy (resp. bojínku) i proti hlavním a některým vedlejším rekombinantním alergenům. V iniciační fázi terapie bývá často pozorován vzestup sIgE jako reakce na dávky alergenu, poté by se měla hladina těchto imunoglobulinů snižovat pod vlivem modulace imunitní odpovědi a „blokujících protilátek“. ⁽³²⁾

V praxi však zatím nebyla prokázána korelace mezi hladinou specifického IgE a klinickým efektem SIT. ⁽⁴⁴⁾

SKUPINA A (Bříza)

Metodou FEIA na přístroji ImmunoCAP® 100 (Phadia) byly u 4 pacientů (2 ženy a 2 muži) stanoveny pomocí rekombinantních alergenů hladiny specifického IgE proti hlavnímu alergenu pylu břízy Bet v 1 a proti vedlejším alergenům Bet v 2 a Bet v 4 (Tab. 15).

Specifické IgG bylo stanoveno stejnou metodou pomocí přístroje Pharmacia CAP SYSTEM™ proti pylu břízy (Tab. 15). Pro stanovení proti hlavním a vedlejším rekombinantním alergenům pylu břízy byl použit přístroj ImmunoCAP® 100 (Phadia). Tam, kde to bylo vhodné na základě získaných výsledků, bylo stejnými metodami dovyšetřeno specifické IgG4.

Tabulka 15. Metody stanovení a katalogové kódy alergenů

	Alergen	Kód ImmunoCAP alergenu	Přístroj
sIgE	rBet v 1	t215	ImmunoCAP® 100 (Phadia)
	rBet v 2 + rBet v 4	t221	ImmunoCAP® 100 (Phadia)
sIgG	Extrakt pylu břízy	t3	Pharmacia CAP SYSTEM™
	rBet v 1	t215	ImmunoCAP® 100 (Phadia)
	rBet v 2 + rBet v 4	t221	ImmunoCAP® 100 (Phadia)
sIgG4	Extrakt pylu břízy	t3	Pharmacia CAP SYSTEM™
	rBet v 1	t215	ImmunoCAP® 100 (Phadia)

SKUPINA B (Bojínek)

Metodou FEIA pomocí přístroje ImmunoCAP® 100 (Phadia) byly u 4 pacientů (3ženy a 1 muž) stanoveny pomocí rekombinantních alergenů hladiny specifického IgE proti hlavním alergenům bojínku Phl p 1 a Phl p 5 a proti vedlejším alergenům Phl p 7 a Phl p 12 (Tab. 16).

Celkové specifické IgG a IgG4 proti pylu bojínku bylo stanoveno stejnou metodou na přístroji Pharmacia CAP SYSTEM™ a přístrojem ImmunoCAP® 100 (Phadia) bylo vyšetřeno specifické IgG a IgG4 proti rekombinantním hlavním a vedlejším alergenům (Tab. 16).

Tabulka 16. Metody stanovení a katalogové kódy alergenů

	Alergen	Kód ImmunoCAP alergenu	Přístroj
sIgE	rPhl p 1 + rPhl p 5	g213	ImmunoCAP® 100 (Phadia)
	rPhl p 7 + Phl p 12	g214	ImmunoCAP® 100 (Phadia)
sIgG	Extrakt pylu bojínku	g6	Pharmacia CAP SYSTEM™
	rPhl p 1 + rPhl p 5	g213	ImmunoCAP® 100 (Phadia)
	rPhl p 7 + Phl p 12	g214	ImmunoCAP® 100 (Phadia)
sIgG4	Extrakt pylu bojínku	g6	Pharmacia CAP SYSTEM™
	rPhl p 1 + rPhl p 5	g213	ImmunoCAP® 100 (Phadia)

9.2. VÝSLEDKY (KAZUISTIKY)

Cílem práce bylo sledovat alergen specifické IgE, IgG, případně IgG4 proti definovaným molekulám alergenů a proti pylovým extraktům v průběhu specifické imunoterapie. Vzhledem k tomu, že tato práce měla retrospektivní charakter a skládá se z pacientů alergologické ambulance, nebylo možno dopředu přesně definovat pevná kritéria a dané podmínky (druhy vakcín, kritéria výběru pacientů, délka a počátek terapie...).

Hodnocení klinické odezvy bylo pouze na základě subjektivního hodnocení pacienta, případně lékaře, a sledování potřebné medikace. Získaná data byla také ovlivněna „disciplínou“ pacienta při docházení na pravidelné aplikace vakcíny a na odběry pro následná stanovení. Vyhodnocení klinického efektu SIT provedl na závěr ošetřující lékař a zařadil pacienty do hodnotících kategorií:

- I. výrazný klinický efekt (úspěch)
- II. zlepšení
- III. bez efektu

Z možností alergologické ambulance také vyplývá, že se mi podařilo nasbírat pouze malý počet pacientů a s ohledem na finanční náročnost ne standardně prováděných metod vyšetření bylo nutno omezit se jen na parametry a intervaly stanovení, u kterých byla očekávána výpovědní hodnota (například hladinu specifického IgG4 byla pro orientaci vyšetřena pouze na začátku, poté zhruba po dvou letech a na konci terapie). Proto ani v práci neuvádím grafické zpracování všech údajů, ale pouze tam, kde lze sledovat určité trendy hladin specifických protilátek.

Zpětně jsem z dokumentací pacientů zjistila, že vakcíny byly často indikované na základě někdy i 4 roky starého vyšetření positivity a několik pacientů už v historii před aplikací vakcíny mělo p.o. kapkovou vakcínu (se stejnou nebo i odlišnou směsí alergenů). Hy-

poteticky lze tedy předpokládat, že imunitní mechanismy byly již před zahájením injekční formy SIT nějakým směrem ovlivněny a tudíž nemusíme zachytit literaturou popisovaný klasický průběh vývoje specifických protilátek po zahájení imunoterapie.

Je třeba přihlédnout k tomu, že výběr pacientů pro SIT se s ohledem na rychlý vývoj poznatků v této oblasti nemusel vždy řídit aktuálními guide-line postupy a není tak vyloučeno, že nebyl vždy podchycen přímo vyvolávající alergen, což je někdy obtížné i současnými moderními metodami, zvláště u pacientů, kteří jsou senzitivizováni k více než jednomu zdroji alergenů.⁽²⁸⁾

V souladu s tím, i v případě správně nasazené terapie se na jejím efektu podílí více faktorů, které ani často nejsme schopni ovlivnit: kvalita vakcíny (rozhoduje významně i počet alergenů ve směsi, základním směrem je směsi minimalizovat), dávka alergenu, délka terapie, věk pacienta a stádium jeho potíží, polyvalentnost, případně to, zda je pacient kosenzitivizován nebo reaguje zkříženě. Také hodnocení tíže příznaků je ovlivněno např. tím, jaká byla aktuální pylová sezóna, užitím medikace. V neposlední řadě hraje vliv compliance pacienta, placebo efekt a psychosomatika.

Následující kazuistiky jsou toho příkladem.

9.2.1. Průběh hladin specifického IgE, IgG a IgG4 proti alergenům pylu břízy – pacienti skupiny A.

Pacientům této skupiny byl aplikován buď různý poměr pylových extraktů přípravku PHOSTAL (hlavní zastoupení pyl břízy) nebo ne plně standardizovaná vakcína H-AL Jarní časná směs (PNU).

Hladiny sledovaných specifických imunoglobulinů proti pylu břízy u vyšetřovaných pacientů jsou uvedeny v tabulkách 17 - 24. V horním řádku jsou uváděny měsíce, kdy byl odběr proveden. V prvním sloupci jsou uvedeny jednotlivé zkoumané parametry – hodnoty specifických IgE protilátek proti hlavním a vedlejším alergenům pylu břízy, hodnoty specifických IgG a IgG4.

Další sloupce udávají naměřené hodnoty v daných časových intervalech.

a) Výsledky vyšetření průběhu hladin specifických imunoglobulinů v séru pacientky P-1, léčena H-AL DEPOT (Pollens) JČS, 2003 – 2008

Pacientka P-1, 39 let, byla poprvé v ordinaci v 1998. Udává, že v dětství byla bez potíží, pouze občas po ovoci měla kopřivku. Nyní ale na jaře rýma, svědění sliznic, pálení očí. Po vyšetření specifického IgE potvrzena silná pozitivita na směs tx9; také na směs zvířecích alergenů ex2 pozitivní. V roce 1999 provedeny kožní testy – potvrzena reaktivita na břízovité a na olši. Od r. 99 jí byla doporučena p.o. kapková vakcína (JČS), na jaře 2000 opět rýma, ale oční potíže ustoupily. Užívá občas Flonidan, Beclomet, Spersallerg. V roce 2001 vakcínu již nebrala, udává, že byla v sezóně bez potíží. Další sezóny opět na jaře pylové potíže.

Na podzim 2003 jí byla zavedena SIT Přípravkem H-AL DEPOT (Pollens) Jarní časná směs. Aplikace snášela bez reakcí. Při kontrole 7/2004 udává mírné pylové potíže v sezóně (pouze lokální projevy, stačí oční kapky, nosní Tafen), 8/2005 hodnotí předchozí sezónu bez potíží, léky nebrala, 7/2006 léky nebrala v sezóně údajně vůbec.

V 2/2007 vynechala dávku vakcíny. Na aplikaci nedocházela také v měsících 7/2007-1/2008.

Při návštěvě 1/2008 udává, že sezóna 2006 a 2007 celkem bez potíží, nyní občas svědění (doma pořídila kočku?), nechodila na injekce z pracovních důvodů.

Kontrola v 5/2008: v posledních 3 měsících se zhoršila obstrukce nosu, spreje bez efektu, nasazen Xyzal; přes léto už byla bez potíží.

9/2008 poslední aplikace a na další kontrolu se pacientka nedostavila.

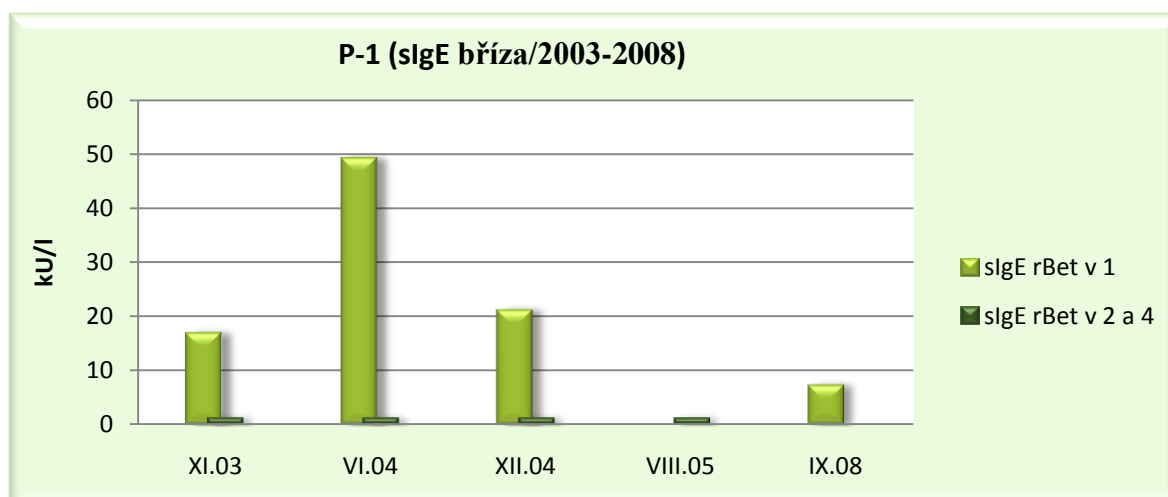
Hodnocení ošetřujícího alergologa: kategorie II.

Tabulka 17. Hodnoty stanovení specifických protilátek P-1

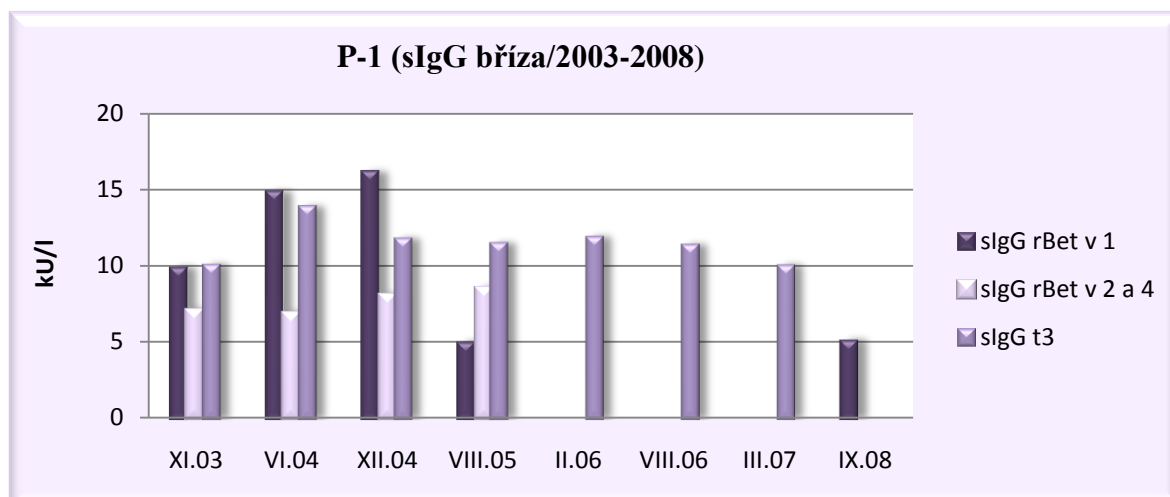
Pacientka P-1	XI.03	VI.04	XII.04	VIII.05	II.06	VIII.06	III.07	IX.08
IgE rBet v1	16,7	49	20,9					7,04
IgE rBet v2, v4	0,35	0,35	0,35	0,35				
IgG rBet v1	9,83	14,8	16,1	4,94				5,07
IgG rBet v2, v4	7,01	6,82	8	8,44				
IgG t3	10	13,8	11,7	11,4	11,8	11,3	9,96	
IgG4 rBet v1	0,53			7,08				0,47
IgG4 t3	0,74			7,72				0,66

Grafické znázornění

Obrázky 21 – 22 znázorňují grafické zpracování průběhu hladin specifického IgE a IgG v průběhu terapie u pacientky P-1.



Obrázek 21. Průběh specifického IgE



Obrázek 22. Průběh specifického IgG

Pacientka reagovala během prvního půlroku terapie zřetelným zvýšením hladiny specifických IgE protilátek proti hlavnímu alergenu břízy, pak dochází k mírnému snižování, což odpovídá běžnému vývoji protilátek při SIT. Proti vedlejším alergenům nebyla pacientka vůbec reaktivní. Tvorba blokujičích protilátek IgG proti Bet v 1 se během prvního roku terapie zvyšovala, s čímž koreluje i mírné zvyšování IgG proti směsi t3.

Hladina IgG4 měřená zhruba 2 roky od zahájení léčby vzrostla jak proti hlavnímu alergenu, tak i proti směsi.

Jak proběhla následující pylová sezóna, nevíme, pacientka, bohužel, nepřišla na kontrolu.

b) Výsledky vyšetření průběhu hladin specifických imunoglobulinů v séru pacientky P-2, léčená PHOSTAL (trávy, pelyněk, bříza), 2003-2008

Pacientka P-2, 42 let, přichází do ordinace v r. 2002. V minulosti byla bez alergie, nyní postupně přibývají reakce na potraviny v podobě slzení očí, rýmy, svědění sliznic, záchvatovitého kašle. Zjištěna výrazná atopická dispozice, inhalační a potravinová alergie. Pacientka má silně pozitivní sIgE proti směsi tx9, a pozitivní proti gx3, dále potvrzeno kiwi, jablko, ořechy, plevele. Užívá Zyrtec, Rhinocort, Allergodil.

Na podzim 2003 byl nasazen PHOSTAL (složení viz tabulka X), aplikace po celou dobu léčby bez reakcí.

Při kontrole 8/2004 udává pacientka v sezóně rýmu menší, bez dušnosti, občas kašel, 8/2005 minimální obtíže, na jaře dokonce bez kašle, užívá občas Rhinocort, Zyrtec; podobně sezóna 2006.

V 4/2007 z důvodu velkých alergických potíží, dráždivého kašle a dechových potíží asi 2 týdny nasazen Buventol, Afonilum, nelze vyloučit vývin asthma bronchiale. Při kontrole 5/2007 dochází ke zlepšení.

11/2008 poslední aplikace vakcíny, 7/2009 pacientka udává, že se cítí dobře, de facto bez potíží, občas aplikuje Zyrtec.

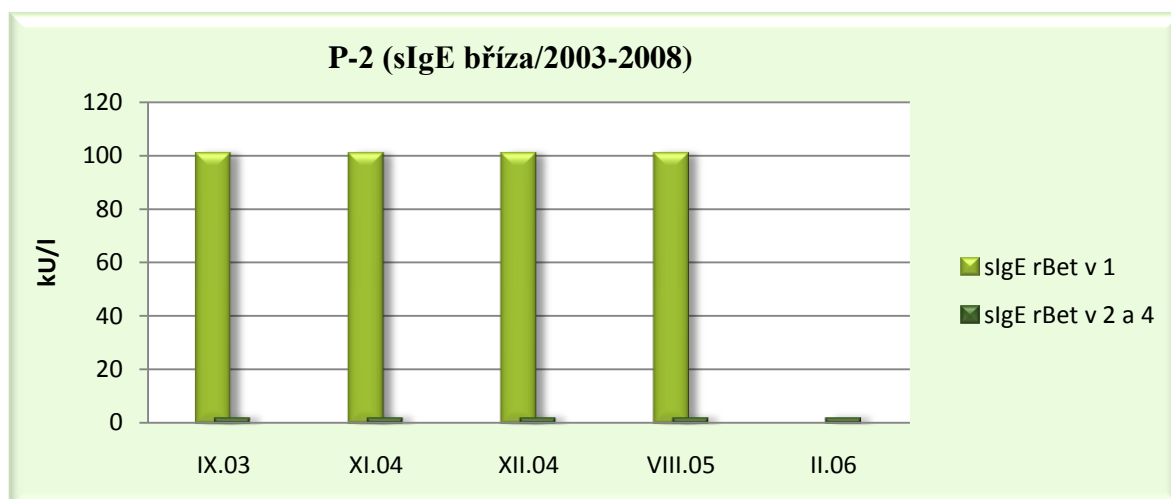
Hodnocení ošetřujícího alergologa: kategorie II.

Tabulka 18. Hodnoty stanovení specifických protilátek P-2

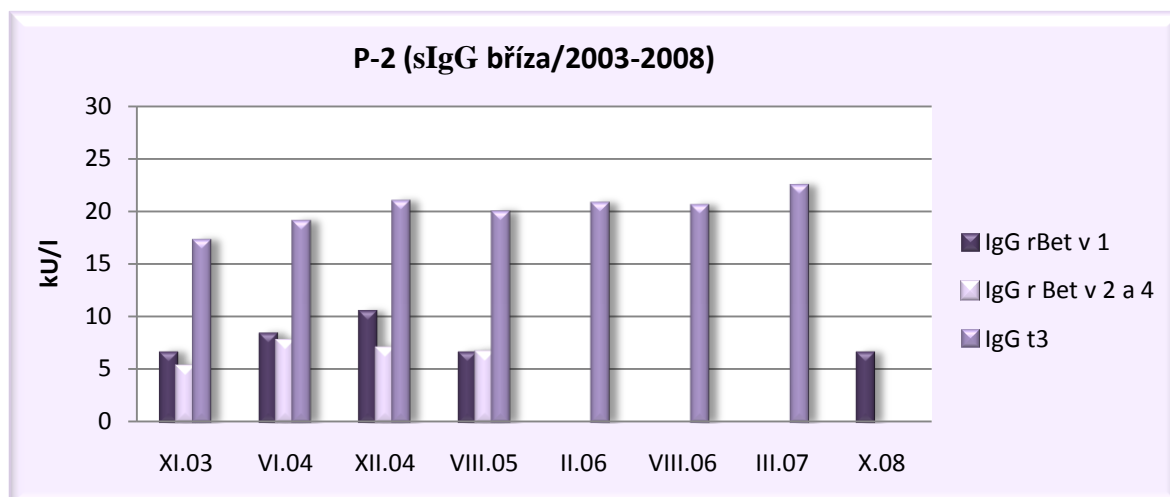
Pacientka P-2	XI.03	VI.04	XII.04	VIII.05	II.06	VIII.06	III.07	X.08
IgE rBet v1	100	100	100	100				
IgE rBet v2, v4	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35			
IgG rBet v1	6,44	8,2	10,3	6,43				6,42
IgG rBet v2, v4	5,12	7,54	6,83	6,47				
IgG t3	17,1	18,9	20,8	19,8	20,6	20,4	22,3	
IgG4 rBet v1	0,1			1,42				1,32
IgG4 t3	0,36			5,78				1,9

Grafické znázornění

Obrázky 23 – 24 znázorňují grafické zpracování průběhu hladin specifického IgE a IgG v průběhu terapie pacientky P-2.



Obrázek 23. Průběh specifického IgE



Obrázek 24. Průběh specifického IgG

Pacientka nebyla senzitivována na vedlejší alergeny břízy, zato specifické IgE proti rBet v 1 se drželo po celou dobu terapie nad hranicí 100 kU/l, takže ani nebylo možné detekovat jeho změny, pokud nastaly.

Hladina IgG proti směsi t3 má jen mírně vzestupný charakter, i podtřída IgG4 protilátek proti směsi t3 v počátku terapie jen mírně stoupá.

Nezdařilo se tedy zachytit korelaci mezi relativním úspěchem dle klinického hodnocení pacienta a lékaře a odezvou ve zvolených laboratorních ukazatelích.

Vzhledem k tomu, že pacientka měla rozvinutou polyvalentní alergii k více alergenním zdrojům, je diskutabilní, zda byla správná indikace k SIT. Hodnocení efektu terapie může být v tomto případě ovlivněno také užíváním úlevové bronchodilatační medikace nebo průběhem pylových sezón v daném období.

c) Výsledky vyšetření průběhu hladin specifických imunoglobulinů v séru pacienta P-3, aplikován PHOSTAL (bříza, žito, pelyněk), 2001 – 2007

Pacient P-3, 41 let, se léčí už od dospívání. Rýma trvá řadu let, v zimě a počátkem jara mívá pálení, svědění a slzení očí. Je zde rodinná atopická zátěž. V r. 1998 dle výsledků kožních testů a testu sIgE (silně pozitivní tx9) je diagnostikována polyvalentní inhalační alergie. Potvrzen pyl stromů, jablko, ořechy, zvířecí alergeny. V letech 1999 – 2001 užíval p.o. kapkovou alergenovou vakcínu.

11/2001 dostává první dávku PHOSTAL (složení viz tab. X), na injekce chodí pravidelně, je bez reakce.

3/2003 začíná sezónní pálení očí, kýchání, rýmu ale nemá, cítí se dobře (občas Spersalerg, Claritine).

V 10/2004 pacient udává v průběhu roku bez větších potíží kromě jarních měsíců.

Při kontrole 9/2005 popisuje na jaře menší obtíže, v dubnu rýma a slzení, v létě bez problémů.

V 4/2006 přichází pro pylové potíže – předepsán Allergodil, Fenistil, vakcína naplánována do léta 2007

Při kontrole 6/2008 udává, že nebyl nemocný, potíže s alergií minimální.

V roce 2009 pacient udává menší reakce na břízu, časné jarní příznaky polevily, ale potíže se přesunuly do pozdního jara a vzniká další senzitivace na ovoce (třešně, broskve,...).

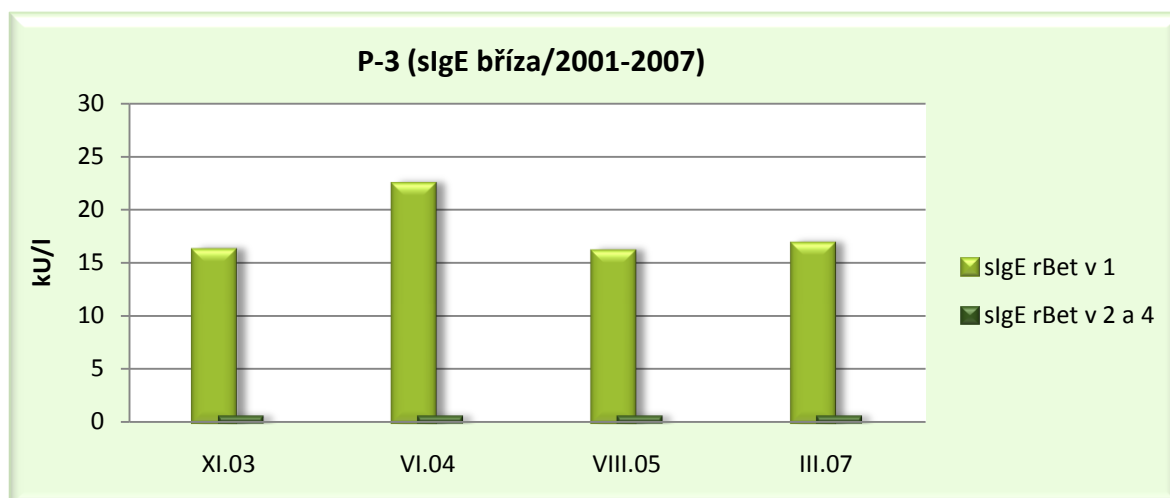
Hodnocení ošetřujícího alergologa: kategorie II.

Tabulka 19. Hodnoty stanovení specifických protilátek P-3

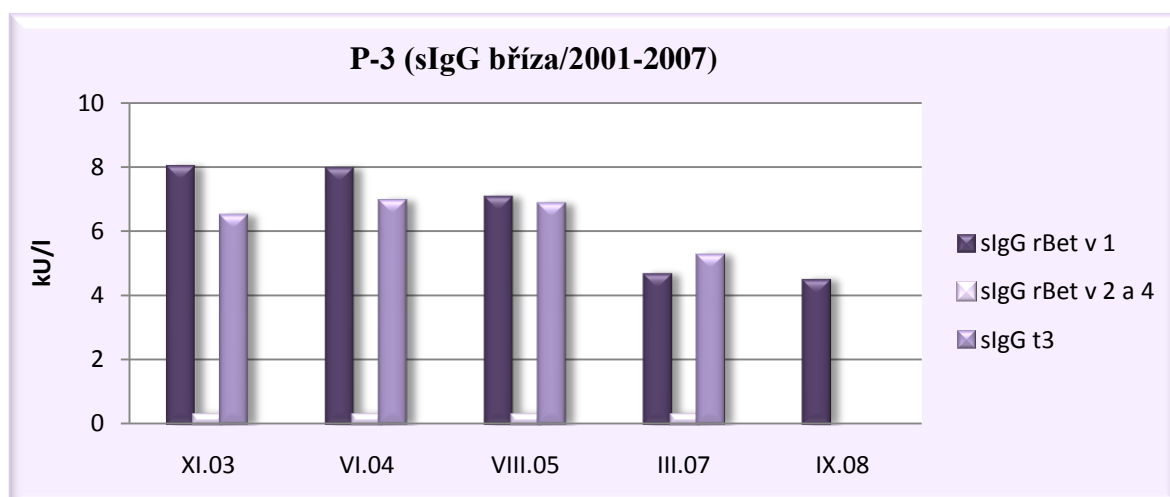
Pacient P-3	XI.03	VI.04	VII.05	X.07	IX.08
IgE rBet v1	16,2	22,4	16,1	16,8	
IgE rBet v2, v4	0,35	0,35	0,35	0,35	
IgG rBet v1	7,96	7,9	7,01	4,62	4,44
IgG rBet v2, v4	0,02	0,02	0,02	0,02	
IgG t3	6,44	6,9	6,8	5,21	
IgG4 rBet v1	6,74				0,7
IgG4 t3	6,78				1,38

Grafické znázornění

Obrázky 25 – 26 znázorňují grafické zpracování průběhu hladin specifického IgE a IgG v průběhu terapie pacienta P-3.



Obrázek 25. Průběh specifického IgE



Obrázek 26. Průběh specifického IgG

Laboratorní pozorování bylo u tohoto pacienta započato až dva roky po zavedení terapie. Takže neznáme počáteční hodnoty. Grafy zachycují pouze sezónní výkyv IgE protilátek, jinak je hladina protilátek proti Bet v 1 i Bet v 2, 4 (necitlivý) bez dynamiky. Ani hladina blokujících protilátek se výrazně nemění, ale proti hlavnímu alergenu a pylovému extraktu je od počátku sledování hladina sIgG daleko vyšší než proti vedlejším alergenům.

Zde je třeba zamyslet se nad tím, zda za polyvalentnost tohoto pacienta zodpovídá to, že je tzv. kosenzitizedovaný nebo naopak zkřížená reaktivita a zda byl vůbec pro takovou terapii vhodný.

Otázkou je, zda v roce 2001 byla terapie nasazena v souladu s dnešními nejnovějšími poznatky, doporučeními a trendy, či jen empiricky. U tohoto pacienta se přesto dle klinických údajů zdá, že došlo k desenzitizaci na pyl břízy. Nenalézáme ani žádný vývoj alergie k vedlejším alergenům. Následné zesílení potravinové alergie můžeme spíše přičítat přirozenému vývinu vlivem okolního prostředí a atopické predispozice.

Pokud tedy v tomto případě SIT specificky zasáhla proti Bet v 1 senzitivaci pacienta, neovlivnila rozvoj atopické dispozice jeho imunitního systému.

d) Výsledky vyšetření průběhu hladin specifických imunoglobulinů v séru pacienta P-4, H-AL DEPOT (POLLENS), Jarní časná směs, 2004-2009

Pacient P-4, 31 let, trpí od 16ti let rýmou, kolem 23 let léčen p.o. kapkovou vakcínou (směs bakteriálních kmenů). V roce 2003 operace polypů.

Má celoročně ucpaný nos, březen až květen ho trápí rýma, pálení a slzení očí, pocit těžšího dechu, je bez medikace. Na základě kožních testů 2003 mu byla diagnostikována alergie na pyl jarních stromů. Od 2004 užívá Euphylin, Ventolin (SOS), probouzí se během noci s pískoty, bývá hodně zahleněn; nelze vyloučit asthma bronchiale. V 9/2004 plánuje vakcínu (provedeny první odběry pro tuto práci), ale první H-AL Jarní časná směs dostal až 7/2005.

Při kontrole 8/2006 udává, že v sezóně ustoupila dušnost a v 10/2007, že v sezóně dušný nebyl, jen na jaře rýma.

5/2009 poslední dávka – poté vakcína nedostupná v distribuci léčiv.

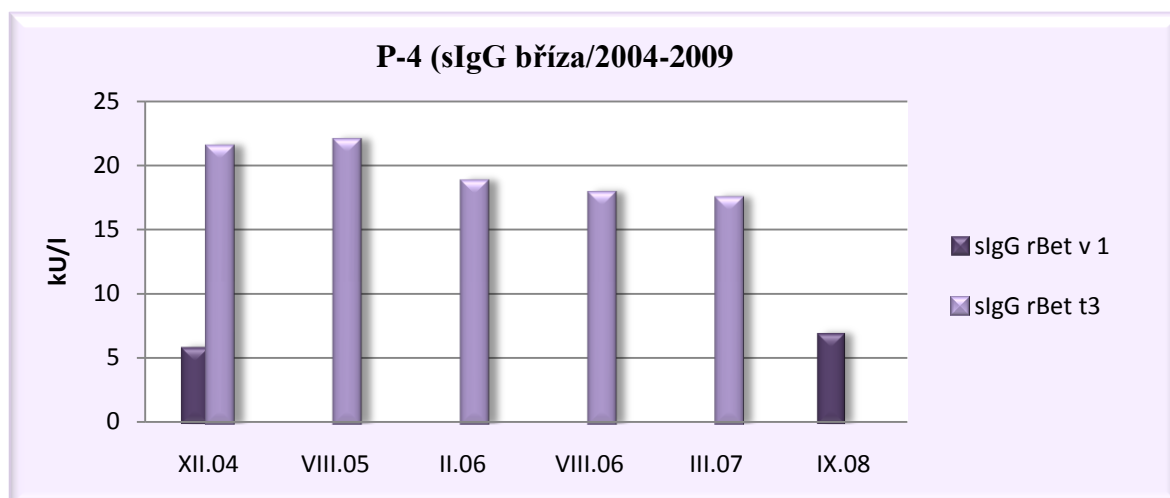
Hodnocení ošetřujícího alergologa: kategorie III.

Tabulka 20. Hodnoty stanovení specifických protilátek P-4

Pacient P-4	XII.04	VIII.05	II.06	VIII.06	III.07	IX.08
IgE rBet v1	13,1					11,7
IgG rBet v1	5,68					6,77
IgG t3	21,4	21,9	18,7	17,8	17,4	
IgG4 rBet v1	4,23					1,4
IgG4 t3	7,98					1,45

Grafické znázornění

Obrázek 27 znázorňuje grafické zpracování průběhu hladin specifického IgG v průběhu terapie pacienta P-4. Hodnoty hladin sIgE uvádí Tabulka 20.



Obrázek 27. Průběh specifického IgG

I přes menší počet stanovených hodnot specifických protilátek, se dá usuzovat, že po zahájení SIT nenastala u tohoto pacienta žádná výrazná změna. Hladina sIgE proti hlavnímu alergenu pylu břízy stanovená na začátku a v závěru terapie nejeví výraznější pokles (viz Tab. X), ani hladina specifických IgG protilátek se výrazněji nemění.

Vysvětlení rozporu mezi udávaným klinickým zlepšením v letech 2006-2007 a nepatrnou odezvou v laboratorním vyšetření lze vidět například v tom, zda pacient neudává úlevu od potíží vlivem bronchodilatační medikace. Tato domněnka by odpovídala i negativnímu hodnocení alergologa (kat. III.)

9.2.2. Průběh hladin specifického IgE, IgG a IgG4 proti alergenům pylu bojínku – pacienti skupiny B.

Pacientům této skupiny byla aplikována vakcína H-AL směs Trávy I. Alergizace na pyl bojínku se vyskytuje často u polyvalentnějších pacientů, což se potvrdilo i na těchto příkladech.

Hladiny sledovaných specifických imunoglobulinů proti pylu bojínku u vyšetřovaných pacientů jsou uvedeny v tabulkách Y-Y. V horním řádku jsou uváděny měsíce, kdy byl odběr proveden. V prvním sloupci jsou uvedeny jednotlivé stanovované parametry – hodnoty specifických IgE protilátek proti hlavním a vedlejším alergenům pylu bojínku, hodnoty specifických IgG a IgG4 proti přirozeným alergenům a proti rekombinantním hlavním a vedlejším alergenům pylu bojínku.

Další sloupce udávají naměřené hodnoty v uvedených časových intervalech.

a) Výsledky vyšetření průběhu hladin specifických imunoglobulinů v séru pacientky P-5, aplikován H-AL DEPOT (Pollens) Trávy I., 2003-2008

Pacientka P-5, 36 let, přichází r. 2001 s pylovými potížemi. Kožními testy zjištěna senzitivace na inhalační alergeny - pyly trav, plevele, jarní směs pozdní, prach i peří.

10/2001 jí byla nasazena kapková p.o. vakcína Trávy I.

V sezóně 2003 udává mírnější potíže, ale přiznává, že vakcínu brala nepravidelně, na konci roku (10/2003) jí je nasazena H-AL DEPOT (Pollens) Trávy I., užívá Zyrtec a Livostin.

Vakcíny snáší bez reakcí, ale vynechala 7/2004 a 9/2004 pro zápal plic. V sezóně 2007 měla potíže menší, léky brala jen podle potřeby. Poslední vakcína byla aplikována 6/2008, pak se již pacientka nedostavila. Lékařka se domnívá, že se jí projevy zmírnily, léky už nepotřebuje, případně předepisuje praktik.

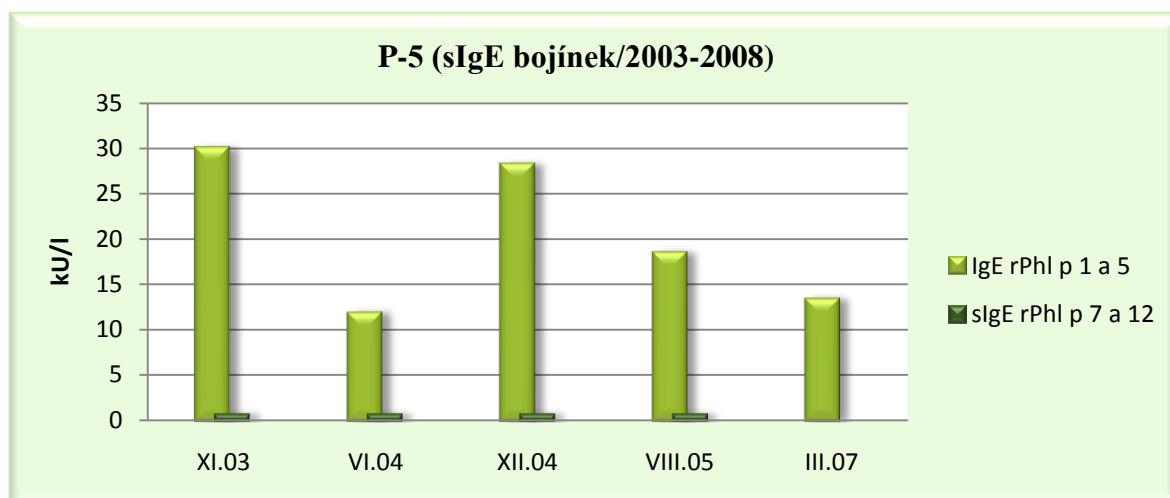
Hodnocení ošetřujícího alergologa: kategorie II.

Tabulka 21 Hodnoty stanovení specifických protilátek P-5

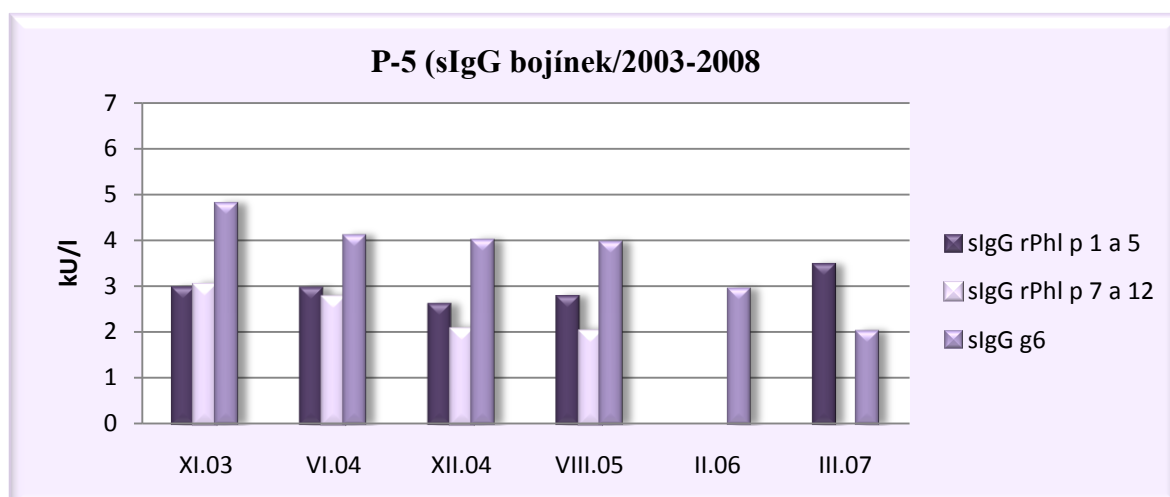
Pacientka P-5	XI.03	VI.04	XII.04	VIII.05	II.06	III.07
IgE rPhl p1, p5	29,9	11,8	28,1	18,4		13,3
IgE rPhl p7, p12	0,35	0,35	0,35	0,35		
IgG rPhl p1, p5	2,94	2,93	2,58	2,75		3,44
IgG rPhl p7, p12	3,01	2,74	2,05	2		
IgG g6	4,78	4,08	3,98	3,94	2,92	2
IgG4 rPhl p1, p5	0,08		0,08			0,09
IgG4 g6	0,25		0,23			0,23

Grafické znázornění

Obrázky 28 – 29 znázorňují grafické zpracování průběhu hladin specifického IgE a IgG v průběhu terapie pacientky P-5.



Obrázek 28. Průběh specifického IgE



Obrázek 29. Průběh specifického IgG

Dynamika specifických IgG protilátek u této pacientky se vlivem aplikace vakcín nemění, hladina IgG4 je na hranici detekovatelnosti. Hladina protilátek IgE proti hlavním alergenům Phl p 1 a 5 se zdá mít sestupnou tendenci.

b) Výsledky vyšetření průběhu hladin specifických imunoglobulinů v séru pacienta P-6, aplikován H-ALL DEPOT (Pillens) Trávy I., 2003-2006

Pacient J. N., 31 let, navštěvuje ordinaci pro pylové potíže. Léčí se již od dětství s alergickou rinitidou (Zyrtec, v dětství vakcíny), mívá velkou reakci na hmyzí bodnutí. Matka také alergička. V 1/2003 dle kožních testů potvrzena inhalační alergie s výraznou atopickou zátěží - přecitlivělost na pyly trav, jarní směs pozdní, roztoče, peří, prach, kočku a morče (má doma). V sezóně 2003 udává velkou rýmu, výraznou vodnatou sekreci, zánět očí, suchý kašel, potíže i v noci a k ránu, Flonidan nestačí.

Od 10/2003 zahájena SIT H-AL DEPOT (Pollens) Trávy I., aplikace snášel bez reakcí. 2005 se cítí dobře i přes sezónu, vakcíny vynechal 7-10/2006 pro zápal plic. 2/2007 poslední aplikace, potíže v předchozí sezóně udává jako minimální, medikace jen symptomaticky a minimálně. Lékař usuzuje, že pacientovi se ulevilo a proto přestal docházet na další aplikace.

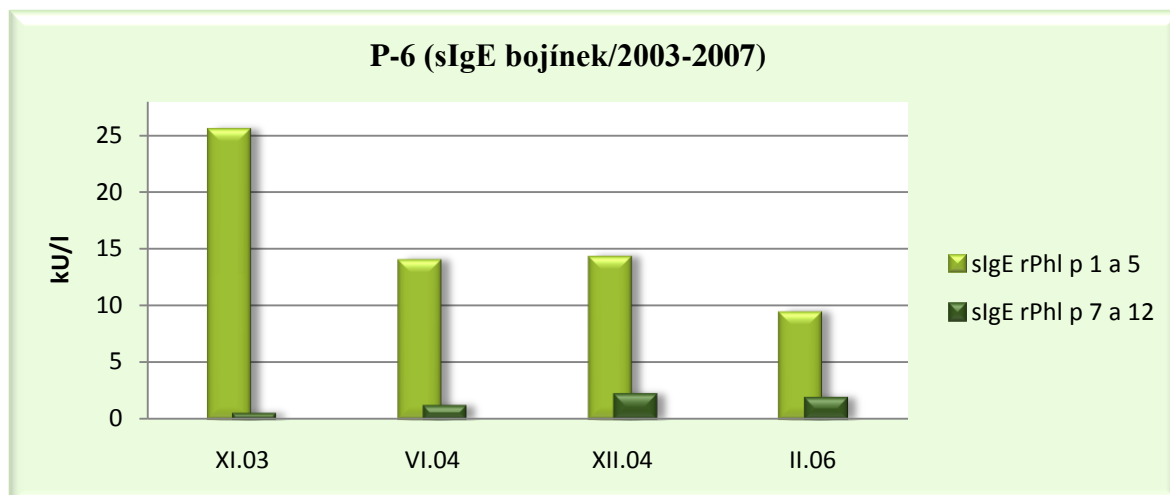
Hodnocení ošetřujícího alergologa: kategorie I.

Tabulka 22 Hodnoty stanovení specifických protilátek P-6

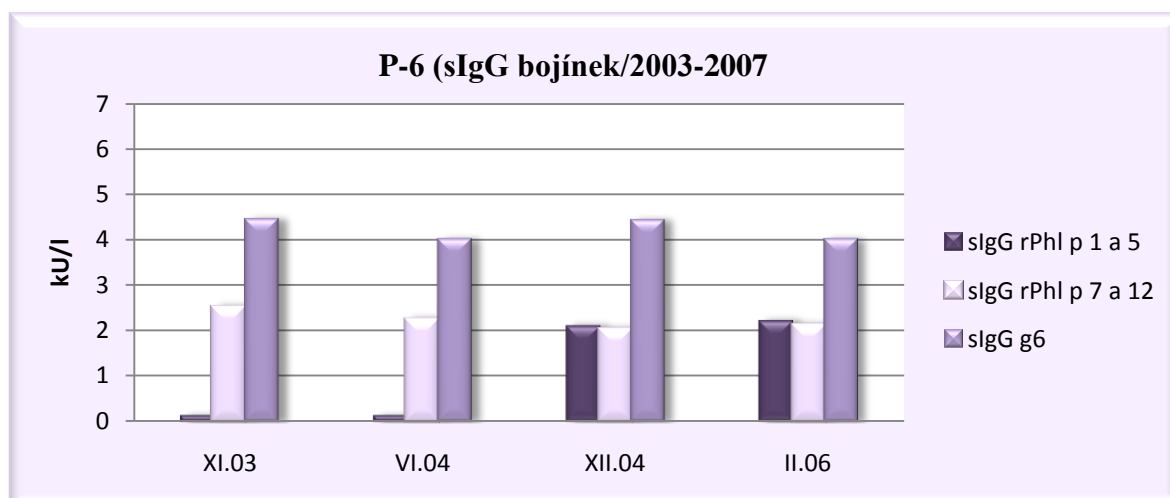
Pacient P-6	XI.03	VI.04	XII.04	II.06
IgE rPhl p1, p5	25,4	13,9	14,2	9,31
IgE rPhl p7, p12	0,35	0,84	1,72	1,4
IgG rPhl p1, p5	0,02	0,02	2,07	2,18
IgG rPhl p7, p12	2,48	2,21	2	2,09
IgG g6	4,43	3,99	4,41	3,99
IgG4 rPhl p1, p5	0,07		0,04	0,05
IgG4 g6	0,4		0,48	0,48

Grafické znázornění

Obrázky 30 – 31 znázorňují grafické zpracování průběhu hladin specifického IgE a IgGv průběhu terapie pacienta P-6.



Obrázek 30. Průběh specifického IgE



Obrázek 31. Průběh specifického IgG

U tohoto pacienta je patrna shoda klinické odezvy a laboratorním nálezem hladin sIgE.

Pod vlivem pravidelné aplikace alergenové vakcíny klesá tvorba sIgE proti hlavním alergenům pylu bojínku. V kategorii specifických IgG jsme nezaznamenali výrazný nárůst protilátek. Ani v hladině specifických IgG4 nejví pacient žádnou odezvu.

Je zde však zaznamenán mírný nárůst specifických protilátek proti vedlejším alergenům pylu bojínku (proti Phl p 7 a 12 pacient před léčbou sIgE netvořil), což může svědčit buď o v literatuře uváděné možné postupné senzitivaci alergenovým extraktem jako nežádoucí účinek SIT nebo jako přirozený vývoj alergie ovlivněný prostředím.

Vzhledem k tomu, že spolupráce s pacientem skončila, nemůžeme posoudit, zda dojde časem k rozvoji zkřížené alergie.

c) Výsledky vyšetření průběhu hladin specifických imunoglobulinů v séru pacienta P-7, aplikován H-AL DEPOT (Pollens) Trávy I., 2003-2008

Pacientka P-7, 36 let, přichází v roce 2003 s potížemi typu pálení, řezání očí, pocit ucpaného nosu v jarních měsících. Kožními testy byla u ní zjištěna citlivost na pyly trav a roztoče, vyšetření specifického IgE bylo silně pozitivní vůči směsi gx1.

11/2003 zahájila SIT H-AL DEPOT (pollens) Trávy I. Aplikace snášela bez potíží, příznaky se po dobu léčby nijak neměnily, 2/2004 vynechala jednu dávku vakcíny, užívá Claritine, Cromo-hexal combi. V sezóně 2007 udává v červnu a červenci velké potíže, pálení očí a po ránu kašel, potíže hlavně při sekání trávy nebo obilí. Vakcína byla pacientce vysazena 6/2008, na kontrolu na jaře 2009 se nedostavila.

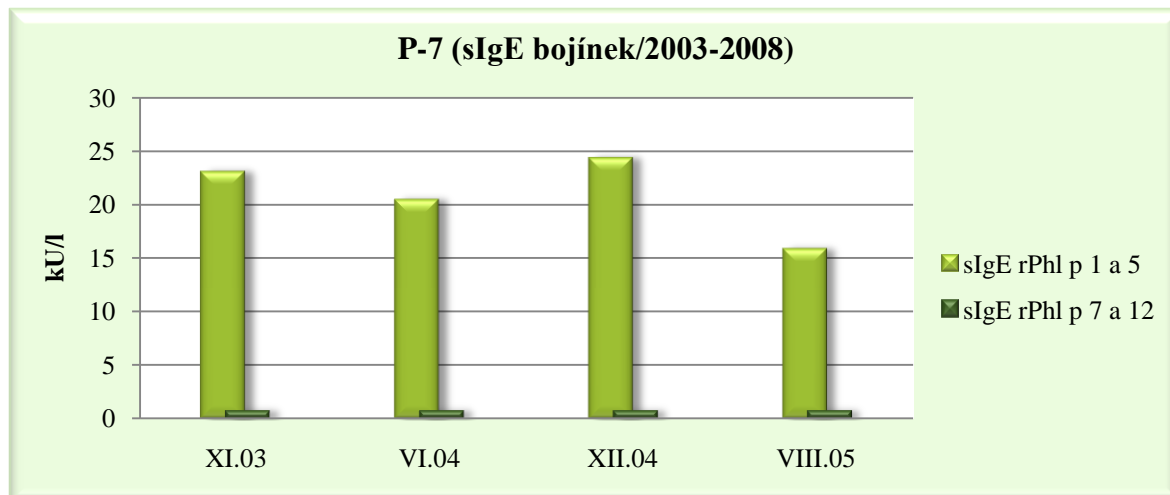
Hodnocení ošetřujícího lékaře: kategorie III.

Tabulka 23 Hodnoty stanovení specifických protilátek P-7

Pacientka P-7	XI.03	VI.04	IX.05	II.06	VIII.06
IgE rPhl p1, p5	22,9	20,3	24,2	15,7	
IgE rPhl p7, p12	0,35	0,35	0,35	0,35	
IgG rPhl p1, p5	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
IgG rPhl p7, p12	0,02	0,02	0,02	0,02	
IgG g6	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02

Grafické znázornění

Obrázek 32 znázorňuje grafické zpracování průběhu hladin specifického IgE v průběhu terapie pacientky P-7. Hladina sIgG zůstala beze změn (viz Tabulka 23).



Obrázek 32. Průběh specifického IgE

Specifické IgE protilátky nejeví sestupný charakter, sIgG pacientka vůbec nevytvořila. Proto zde bylo vypuštěno stanovení podtřídy IgG4. Otázkou u této pacientky je, souzeno dle dostupných klinických příznaků i stanovení protilátek, zda byl odhalen příčinný alergenní zdroj. Pro zhodnocení chybí detailnější údaje o atopickém profilu pacientky.

d) Výsledky vyšetření průběhu hladin specifických imunoglobulinů v séru pacienta P-8, aplikován H-AL DEPOT (Pollens) Trávy I. 2004-2009

Pacientka P-8, 41 let, přichází v 1/2003. V dětství bez alergie, nyní pozoruje asi 2 roky potíže na jaře (svědění sliznic, záchvatovité kýchání), nyní i v zimě. Psa má 10 let. Dcera je polinotička. Provedeny kožní testy – pozitivní trávy, žito, plevele a roztoči, zaléčena Biostimem, na podzim plánována SIT. V 6/2003 se pacientka vrací pro svědění sliznic, řezání očí, předepsán Flonidan. Na podzim měla potíže s kolísáním tlaku, imunoterapie byla o rok odložena.

10/2004 dostává první aplikaci H-AL DEPOT (Pollens) Trávy I.

V sezóně 2005 trvá celoročně svědění nosu, pálení a řezání očí, ráno suchý kašel, v sezóně 2007 se přidává i celoročně zahlenění, svědění sliznic, zhoršení příznaků na jaře. Indikován Aerius, Spersallerg), v roce 2008 pacientka neudává větší potíže.

4/2009 poslední dávka vakcíny a opětovné zhoršení potíží. Pacientka objednána na testy (podzim 2009)

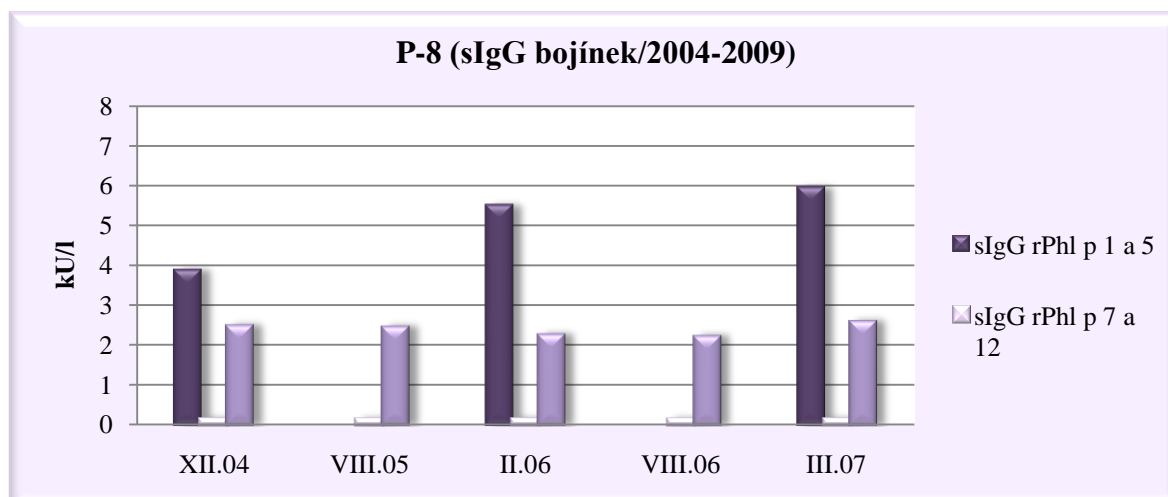
Hodnocení ošetřujícího lékaře: kategorie III.

Tabulka 24. Hodnoty stanovení specifických protilátek P-8

Pacientka P-8	XII.04	VIII.05	II.06	VIII.06	III.07
IgE rPhl p1, p5	0,35				0,35
IgG rPhl p1, p5	3,85		5,47		5,91
IgG rPhl p7, p12	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
IgG g6	2,46	2,43	2,24	2,2	2,57
IgG4 rPhl p1, p5	0,01		0,03		0
IgG4 g6	0,12		0,13		0,19

Grafické znázornění

Obrázek 33 znázorňuje grafické zpracování průběhu hladin specifického IgG v průběhu terapie pacientky P-8. Hodnoty sIgE v Tabulce 24.



Obrázek 33. Průběh specifického IgG

U této pacientky se nám testováním v průběhu terapie neprokázala ani minimální senzitivita na pyl bojínku, ani hladina protilátek IgG neprokazuje větší změnu jako reakci na terapii. U této pacientky se zdá sporné, zda byla imunoterapie nasazena cíleně či jen empiricky dle klinických příznaků. Je chybou, že nebylo s ohledem na prvotní informace od alergologa testováno sIgE proti vedlejším alergenům pylu bojínku. Bohužel poté, co mi bylo umožněno nahlédnout do zdravotní dokumentace pacienta, nebylo možno tento parametr z časových důvodů dotestovat. Případná pozitivita k vedlejším alergenům bojínku nebo naopak nepotvrzení žádných specifických protilátek proti tomuto alergenovému zdroji by mohlo u této pacientky vést k úvahám o vlivu zkřížených reakcí a/nebo špatné diagnostice příčinného alergenu.

10. DISKUZE

V rigorózní práci jsem se věnovala *in vitro* břízy a bojínku.

Pro dokreslení výsledků, porovnání s výsledky získanými pomocí rekombinantních alergenů a pro upřesnění „alergického profilu“ pacientů jsem využila možnosti otestovat několik sér metodou imunoblotu, která slouží v současné době také pouze výzkumným účelům.⁽⁵⁷⁾ Zdařilo se tak další metodou vyšetřit kvalitativní reaktivitu vybraných sér proti celému spektru dílčích alergenů pylu břízy a bojínku.

V klinické části jsem se zabývala monitorováním diagnostice atopických chorob a snažila se ukázat, jak je správná diagnostika důležitá pro zvolení případné specifické alergické imunoterapie.

Snažila jsem se ověřit některé nové laboratorní postupy, které se ještě nevyužívají v rutinní praxi a to ty, v nichž se při stanovení uplatňují alergeny získané technologií molekulárního inženýrství – rekombinantní alergeny. Tyto metody mají své uplatnění v klinickém výzkumu a do diagnostiky atopie začínají teprve pronikat.

Séra byla vyšetřena na zjištění reaktivity specifického IgE proti jednotlivým rekombinantním alergenům a proti alergenům pylového extraktu průběhu SIT. Sledováním hladiny specifických IgE protilátek a tzv. „blokujících protilátek“ IgG a podtřídy IgG4 jsem se chtěla pokusit prokázat význam rekombinantních alergenů i pro monitorování SIT. Využití vhodného souboru hlavních a vedlejších alergenů by mohlo poskytnout exaktnější pohled na zavedenou SIT na základě kožních testů a *in vitro* diagnostiky pomocí přirozených alergenových extraktů.

10.1. DISKUZE K DIAGNOSTICE

Porovnání vyšetření hladin specifického IgE proti alergenovým pylovým extraktům a proti jednotlivým rekombinantním alergenům

Při určování hladin specifického IgE proti alergenům t3 resp. g6 v sérech pacientů reaktivních ke směsím tx9 resp. gx1 a gx3 se ukázalo, že právě alergeny pylu břízy resp. bojínku bývají hlavní příčinou pozitivity sér ke zmiňovaným směsím. Bylo tedy možno všechna prvotně vybraná séra použít pro následující stanovení.

Potvrdila jsem, že hlavní roli při vzniku alergické reakce hrají ve většině případů majoritní alergeny a tedy specifické IgE protilátky proti těmto.⁽⁵⁸⁾

V souboru vzorků se objevilo poměrně málo sér s reaktivitou k vedlejším alergenům. I přes to, že byl vyšetřovaný soubor malý, odpovídají výsledky některým literárním zdrojům, které například uvádějí 90% reaktivitu pacientů na alergen Phl p 1 ve skupině reaktivní ke směsi gx6⁽⁴³⁾, stejně tak odpovídá poměrné zastoupení reaktivit proti alergenům pylu břízy (Bet v 1, 2 a 4).^{(59), (60)}

Našel se pouze jeden pacient, jehož sérum obsahovalo výhradně protilátky proti vedlejším alergenům a nikoli proti alergenům hlavním. S ohledem na velikost souboru byl tento výsledek dle dostupných pramenů očekávatelný.^{(58), (60)}

Metodou FEIA jsem neprokázala reaktivitu k vedlejším rekombinantním alergenům u skupiny 4, což by se vzhledem k tomu, že se jednalo o pacienty s polyvalentní alergií, mohlo zdát zarážející. Je však nutno přihlídnout k faktu, že vzorek byl velmi malý.

Séra 24 a 25 reagovala se směsí alergenů pylu trav i s alergeny g6. Neobjevila jsem ale žádnou reaktivitu vůči zkoušeným rekombinantním alergenům ani metodou imunoblotu se u séra 24 neprojevila žádná reaktivita k alergenům pylového extraktu bojínku.

Pravděpodobně jsou za tento výsledek zodpovědné zkřížené reakce, kdy může v praxi nastat případ, že některá séra neobsahují specif. IgE protilátky proti rekombinantním alergenům, ale reagují s alergenovými extrakty.⁽⁶¹⁾

Tito polysenzitivní pacienti pak mohou být právě alergenovými extrakty naprosto špatně diagnostikováni⁽²⁴⁾ s vyplývajícími následky.

Imunoblot

Obecně mohu říci, že výsledky imunoblotu podpořily specif. IgE profily pozorované metodou UniCAP® Specific IgE pomocí rekombinantních alergenů.⁽⁵⁸⁾

Objevilo se ale i několik výjimek (viz níže), které poukazují na složitost a rozdílnost spekter citlivostních profilů atopiků a diagnostiky atopie vůbec. Toto může mít pak zásadní význam v odpovědi pacienta na terapii.

U některých pacientů neodpovídaly výsledky imunoblotu a FEIA. Například u sér č. 37, 31 a 22 jsem prokázala pozitivitu k panalergenu profilinu – vedlejšímu alergenu bojínku Phl p 12 (MH 14,2 kDa), ale neprokázala jsem reaktivitu těchto sér proti profilinu předchozí metodou – stanovením pomocí rekombinantních alergenů.

Důvodem může být to, že pro metodu přenosu elektroforeticky rozdělené směsi proteinů na nitrocelulózovou membránu (westernblot) není možné dobře standardizovat množství proteinu, jaké je v membráně (stripu) navázáno. To může v některých případech vést k nečekaně rozdílné citlivosti při porovnávání metod imunoblotu a FEIA.⁽⁶²⁾ Dále také to,

že při elektroforéze může docházet k narušení prostorového uspořádání bílkovinné molekuly, což může být příčinou částečné ztráty antigenní specifity v případě, že se jedná o konformační antigenní determinantu. Praktickým důsledkem je pak negativita stanovení imunoblotem.⁽⁶²⁾ Pokud budeme tedy vědět, že pro navázání protilátky má zásadní význam prostorové uspořádání molekuly antigenu, není metoda imunoblotu vhodná.

U skupiny 3 - pacienti pozitivní zároveň na směsi tx9 a gx1, gx3 - se ukázala velká četnost (3 z 5-ti sér vybraných z této skupiny pro imunoblot) sér pozitivních na panalergen profilin, čímž se potvrdil předpoklad zkřížených reakcí v této skupině.⁽¹³⁾ Za úspěch lze považovat, že se výsledná nezaokrouhlená hodnota MH (14,2 kD) naprosto shoduje s hodnotou uváděnou v literatuře.⁶³⁽⁶³⁾

U jediného séra (č. 35) se metodou FEIA prokázala reaktivita s vedlejšími i hlavními alergeny a to jak bojínku, tak i břízy. Odpovídající výsledky dávala i metoda imunoblotu u tohoto séra (MH 16 kD = Bet v 1⁽⁵⁸⁾, MH 14,5 kD = Bet v 2, profilin⁽⁵⁸⁾, MH 30 kD = Phl p 5⁽⁵⁸⁾). Za tak rozmanitou reaktivitu odpovídají zřejmě zkřížené reakce tohoto pacienta.⁽⁶⁴⁾

Alergenový extrakt pylu břízy

U všech testovaných sér jsem potvrdila pozitivitu na hlavní alergen Bet v 1 (dle lit. MH kolem 17 kDa⁽⁵⁸⁾), který odpovídá v tabulce hodnotě 16 kD.

Pouze u jednoho séra (č. 35) se projevila reaktivita (MH 14,5) k vedlejšímu alergenu Bet v 2, profilinu (MH 13-14,4⁽⁵⁸⁾).

Molekulovou hmotnost 24,5 kD považuji za průkaz reaktivity k alergenu Bet v 3 (z lit. MH 24 kD⁽⁵⁸⁾).

Hodnotou 36,5 kD jsem prokázala přítomnost specifických IgE protilátek proti alergenu Bet v 6 (dle lit. kolem 35 kD⁽⁵⁸⁾).

Podařilo se prokázat reaktivitu proti dalším alergenům břízy (např. často se objevující MH 29 kD a oblast od 29 do 90 kD u séra 39), jejichž molekulové hmotnosti nejsou zatím v literatuře definované.

Alergenový extrakt pylu bojínku

Hodnotám MH v tabulce kolem 36 kD odpovídá hlavní alergen bojínku Phl p 1.⁽²⁶⁾

Hlavní alergen Phl p 5 je vyjádřen hodnotami kolem 30 kD^{63 (63)} u pěti ze sedmi testovaných sér.

Alergen Phl p 7 (dle lit 8,6 kD^{(65), (66)}) se u žádného ze sér neprojevil, stejně tak jako frakce 50 – 60 kD (ačkoli literatura uvádí, že asi 70 % populace alergické na bojínek má protilátky proti této frakci⁽⁶³⁾).

Jednoznačně jsem prokázala vedlejší alergen Phl p 12 (profilin) u tří sér o MH 14,2 kD⁽⁶³⁾.

U séra 35 se jako u jediného vyskytl alergen o MH asi 13 kD (podle literatury odpovídá Phl p 2⁽²⁶⁾)

Zajímavý výsledek jsem dostala při testování séra č. 22 metodou imunoblotu. V předchozích testech s rekombinantními alergeny reagovalo sérum pouze s kombinací hlavních alergenů rPhl p 1 a rPhl p 5, za to v imunoblotu se pak ukázala reaktivita tohoto pacienta ještě s dalšími komponentami alergenového extraktu pylu bojínku.

Význam diagnostiky pro specifickou imunoterapii (SIT)

Důležité pro specifickou imunoterapii se zdá být to, aby byla prováděna jen těmi alergeny, proti kterým má skutečně pacient specifické IgE protilátky a bude zřejmě snaha provádět tuto léčbu konkrétními rekombinantními (popř. i hybridními) molekulami alergenů se zachovanou imunogenicitou a přitom sníženou alergenicitou.⁽⁶⁷⁾ Takto získané molekuly alergenů umožní redukovat vedlejší anafylaktické reakce, případně vznik přecitlivělosti proti dalším alergenům.

Protože alergenové extrakty současně používané pro SIT jsou standardizovány podle obsahu majoritních a ne minoritních alergenů, mohou pacienti alergičtí na minoritní alergeny málo profitovat z takovéto terapie. Navíc ti pacienti, kteří jsou reaktivní jen proti minoritním alergenům, nejsou pro takovouto SIT vůbec vhodné.⁽⁶¹⁾

V této práci jsem metodou FEIA ověřila použitelnost a potvrdila přínos rekombinantních alergenů pro stanovení specifického IgE a prokázala dobrou shodu mezi výslednými hladinami specifického IgE proti alergenům t3, g6 a mezi hladinami proti hlavním rekombinantním alergenům. Vyskytlo se však několik sér, která reagovala také s vedlejšími alergeny (2 z 57) a jedno sérum, u kterého za reaktivitu proti alergenům t3 zodpovídal především vedlejší alergen. Z toho vyplývá, že by se měla nasazovat SIT až po potvrzení reaktivity proti konkrétním alergenům (resp. jejich epitopům), protože jinak je zde riziko, že pacientovi uškodíme navozením další senzitivace či možností vzniku anafylaktické reakce.^{(24), (65)}

Právě vyšetření specifického IgE rekombinantními alergeny má velký význam k určení, zda je pacient senzitivní k majoritním a/nebo minoritním alergenům.⁽²⁴⁾

V tomto spatřuji velký význam využití rekombinantních alergenů v oblasti diagnostiky a také pro následné zvolení správné terapie (tzn. doporučit či vyloučit pacienta jako adepta na specifickou alergenovou imunoterapii). Rekombinantní technologie by pak mohly umožnit produkovat definovaná množství čistých alergenů, což znamená pro pacienta efektivní a bezpečnou terapii.⁽²⁶⁾

10.2. DISKUZE K MONITOROVÁNÍ PRŮBĚHU SIT

Kazuistiky pacientů

V klinické části této práce byl na základě vyšetření laboratorních parametrů některých specifických protilátek a lékařských záznamů zdokumentován průběh specifické alergenové imunoterapie. Z důvodu malého získaného souboru bylo přistoupeno k prezentaci výsledků formou kazuistik pacientů.

Skupina A

U všech pacientů jsme potvrdili citlivost k hlavnímu alergenu pylu břízy Bet v 1, žádný z nich nereagoval s alergeny vedlejšími. Dva pacienti této skupiny byly polyvalentní – pacient P-3, u kterého se i přes léčbu rozvíjela další senzitivizace k potravinovým alergenům (pravděpodobně syndrom bříza-ovoce-ořechy), ale příznaky břízy polevily, a pacientka P-2, u které byla potvrzena pozitivita také proti směsi pylu trav gx3. Zde by bylo zajímavé sledovat vedle hladin protilátek proti alergenům břízy také hladiny proti alergenům bojínku. Lékař nám však zařadil pacienta jako senzitivního proti pylu břízy, a při zjištění dalších pozitivit ze zdravotní dokumentace nebylo už možno další parametry z časových důvodů dotestovat. Tato pacientka byla léčena směsí alergenů pylu břízy (40%), pelyňku (40%) a trav (20%). I přes tyto rozpory byla léčba vakcínou s pozitivním klinickým efektem.

P-1: léčena nestandardizovanou alergenovou směsí JČS firmy Sevapharma. Léčba byla provázena mírným snižováním hladin sIgE proti Bet v 1. Druhý rok léčby došlo k vzestupu sIgG i sIgG4 proti hlavním alergenům. Dá se usuzovat, že zvýšení hladiny sIgG (proti Bet v 1) je obrazem zvýšení některých podtříd sIgG (proti Bet v 1), včetně IgG4. Také dochází ke zvýšení hladin sIgG4 proti pylovému extraktu břízy, které je možno vysvětlit jako reakci na nealergenní složky pylového extraktu obsaženého ve směsné vakcíně a které dle některých autorů nemá efekt pro vlastní terapii.⁽⁶⁸⁾

P-2: pozitivní na tx9, gx3, jablko, ořechy, kiwi, léčena směsí alergenů trav, břízy, pe-lyňku.

Nepozorujeme výraznější vzestup sIgG, sIgG4. Nebylo dosaženo klesnutí hladin sIgE pod 100, tudíž není možnost detekovat změny.

Otázkou je, zda u takto polyvalentní pacientky byla terapie vhodná a nebylo potřeba lépe diagnostikovat primární senzibilizující alergen pomocí jiných metod než pouhým stanovením specifického IgE proti komerčním směsím alergenů. V případě potvrzení kosenzitivace, aplikovat dle moderních trendů například paralelně dvě odlišné vakcíny.⁽⁴⁹⁾

P-3: průběhu imunoterapie došlo podle klinických příznaků k desenzitizaci proti hlavnímu alergenů břízy, ale nadále se vyvíjí další senzitivace k potravinovým alergenům. U pacienta lze pozorovat typický vývoj zkřížené alergie, kdy vzniká reaktivita na podkladě homologie hlavního alergenů břízy Bet v 1 s hlavními alergenů jablka, broskve, kiwi, ořechů atd.⁽¹³⁾

Není možno prokázat, zda hladina specifických protilátek IgG u tohoto pacienta po zahájení SIT vzrostla, protože první odběr byl proveden až po dvou letech SIT.

Skupina B

Pacienti s dominující vazbou na pyl travin bývají častěji polyvalentní, to platí i o pacientech této skupiny. Léčba takových pacientů vyžaduje náročnější diagnostiku příčinného alergenů, častá je kosenzibilizace nebo i zkřížená reaktivita. Citace!

U tří pacientů této skupiny byla potvrzena reaktivita proti rekombinantním hlavním alergenům pylu bojínku Phl p 1 a 5. Pacientka P-8 netvořila proti těmto alergenům žádné specifické protilátky, ale bohužel, nebyla testována její citlivost k vedlejším alergenům pylu bojínku. Všem pacientům byla aplikována vakcína firmy Sevapharma – Trávy I.

P-5: není zachycena odezva v protilátkách sIgG, IgG4. Specifické IgE má jen mírně sestupnou tendenci. Lékař popisuje, že došlo ke zlepšení alergických projevů. Pokud tomu tak je, a my nepozorujeme žádné změny laboratorních ukazatelů, můžeme to vysvětlit například tím, že pacientka užívala v předchozím období kapkovou p.o. vakcínu, tudíž její imunitní systém nebyl v kontextu imunomodulačního zásahu neovlivněný a proto se nedařilo zachytit změny ve vývoji hladin specifických protilátek.

P-6: nalézáme shodu mezi laboratorním nálezem a klinickým stavem pacienta, který udává zmírnění klinických projevů a jen sporadické užívání symptomatické medikace.

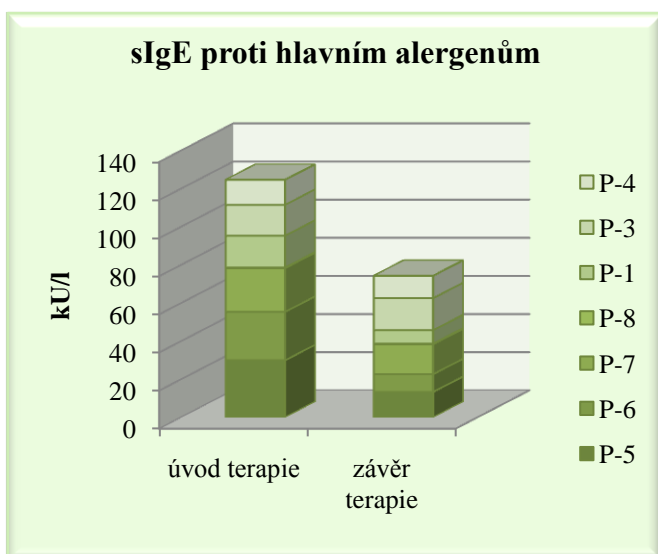
Při pozorování hladiny sIgE proti rekombinantním vedlejším alergenům pylu bojínku ale můžeme zaznamenat mírný vzestup. Otázkou je, zda to může být způsobeno nežádoucí senzitivací vlivem směsné vakcíny nebo zda jde o přirozený vývoj podmíněný atopickou predispozicí u tohoto polyvalentního alergika.

Zde je třeba se zamyslet nad případným přínosem používání léčebných preparátů, které obsahují jen ty složky, proti kterým tvořil pacient před terapií sIgE. Znovu je třeba klást důraz na precizní vyšetření specifických protilátek před zavedením SIT, a tedy na význam rekombinantních alergenů pro *in vitro* diagnostiku

P-8: z anamnézy pacientky a z laboratorního nálezu, kdy bylo vyšetřením pomocí rekombinantních alergenů bojínku zjištěno, že netvořila sIgE protilátky proti rekombinantním hlavním alergenům pylu bojínku, vyplývá, že bojínek není primárním zdrojem senzibilizace.

Je tedy pravděpodobné, že se pacientka nehodila pro SIT pyly trav. V případě, že by se potvrdila senzitivace na vedlejší alergeny (Phl p 7 a/nebo 12), stálo by za to otestovat reaktivitu proti alergenům břízy. V případě positivity proti jejím hlavním i vedlejším alergenům bychom mohli potvrdit zkříženou reaktivitu přes profilin a/nebo kalcium vázající protein, kde prvotním spouštěčem byl pyl břízy. To by také korelovalo s tím, že pacientka udává potíže na jaře. Zůstává otázkou, proč lékař zahájil terapii směsí Trávy I., kde hlavní sezóna výskytu jednotlivých ingrediencí je od května do července.

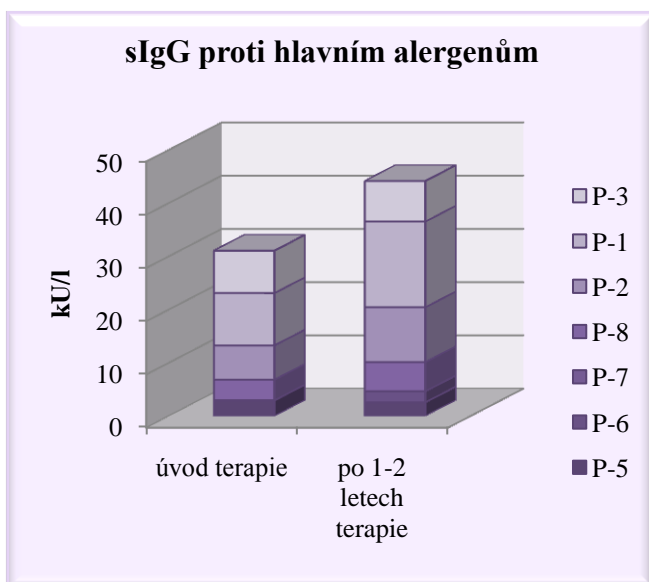
Soubor klinických dat této práce neumožňuje hodnověrnou statistickou analýzu, ale obecně lze hovořit o trendech, které je možné při hodnocení pozorovat. Na prvním místě



lze říci, že hladiny specifického IgE proti sledovaným hlavním rekombinantním alergenům u léčených pacientů měly klesající tendence (viz Obr. 34). U některých pacientů byl zachycen i počáteční dočasný nárůst sIgE, který uvádí literatura⁽³²⁾, jako počáteční reakci na pravidelnou aplikaci alergenu.

Obrázek 34. Grafické znázornění hladin sIgE proti rekombinantním hlavním alergenům na začátku a v závěru terapie (nezahrnuta P-2 pro $IgE \geq 100kU/l$)

Názor na průkaz „blokujících protilátek“ prošel určitým vývojem. Od průkazu blokující aktivity v podtřídě IgG4 přes názory, že pro rutinní monitoraci imunoterapie lze použít



stanovení celkových alergen-specifických IgG protilátek až po současný opětovný příklon ke stanovení specifických IgG4 protilátek.

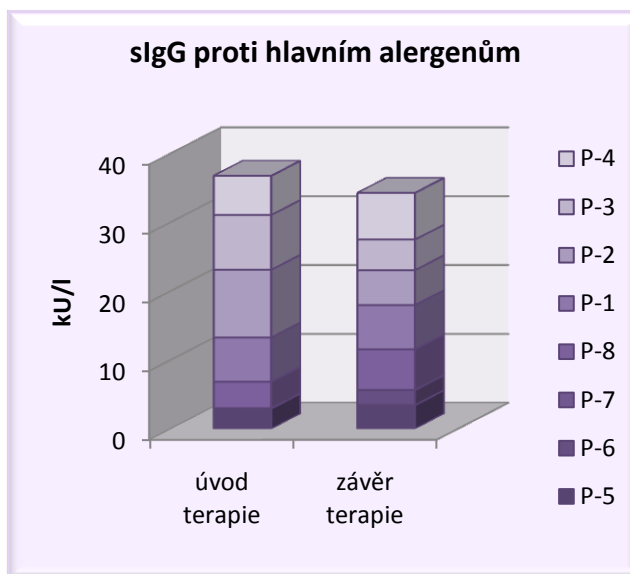
Laboratoř se pro tuto práci rozhodla otestovat zároveň specifické IgG a IgG4, aby bylo možno posoudit vztahy hladin těchto protilátek.

Obrázek 35. Grafické znázornění hladin sIgG proti rekombinantním hlavním alergenům u některých pacientů

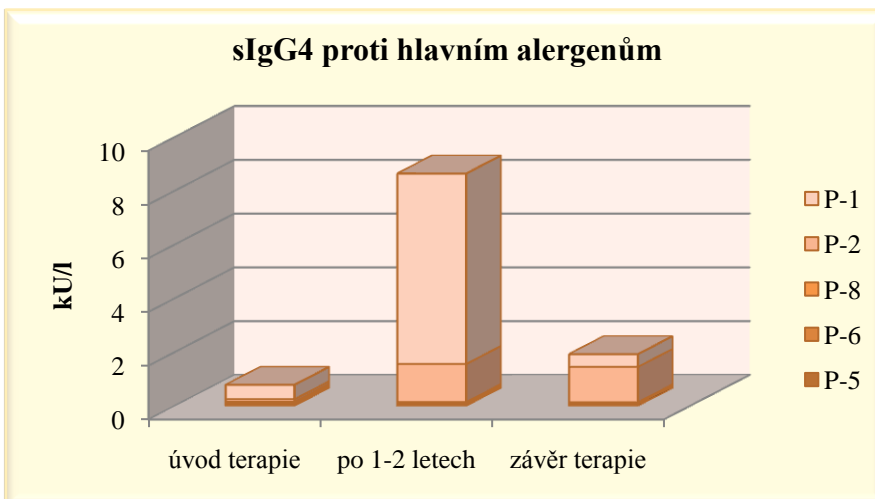
U pacientů, u kterých bylo stanovení celkového specifického IgG provedeno v období 1-2 roky po zahájení SIT byl většinou při tomto odběru zaznamenán mírný vzestup specifických blokujících protilátek (sIgG) proti rekombinantním hlavním alergenům (viz Obr. 35), což je pravděpodobně odrazem vzestupu hladin specifických protilátek v podtřídách IgG – IgG1, IgG3 a IgG4.

Obecně bylo pozorováno výraznější zvýšení tvorby specifických IgG protilátek proti hlavním alergenům v souboru pacientů, kterým byla aplikována vakcína obsahující směs alergenů pylu břízy (viz Tabulky 17- 24, kapitola 8. 2.). To je možné vysvětlit vyšší imunogenicitou antigenů pylu břízy a tedy indukcí mohutnější protilátkové (sIgG) odpovědi ve srovnání s alergeny pylového extraktu bojínku.

Vzestup specifického IgG4 byl pozorován u několika pacientů (Obr.37). Toto poznání souhlasí s údaji uváděnými v literatuře, ale ukazuje se, že není pozorována výraznější korelace mezi hladinou sIgG a sIgG4, právě z důvodu různorodé indukce tvorby těchto protilátek



Obrázek 36. Grafické znázornění sIgG proti rekombinantním hlavním alergenům v úvodu a na konci terapie



Obrázek 37. Grafické znázornění sIgG4 proti hlavním rekombinantním alergenům

v jednotlivých IgG podtřídách (IgG1 a IgG3 tvoří rozhodující podíl v celkovém IgG.⁽²⁹⁾

V závěru terapie nebyla hladina specifických protilátek

IgG ani IgG4 proti rekombi-

nantním hlavním alergenům břízy nebo bojínku ve většině případů vyšší oproti úvodu léčby (Obr. 36 a 37).

V několika případech byl lékařem i pacientem zaznamenán efekt terapie.

S ohledem na laboratorní odezvu imunoterapie nebyla ale pozorována absolutní korelace klinického efektu a hladin protilátek.

U některých pacientů se po zjištění anamnestických a laboratorních údajů domnívám, že nemusela být vždy terapie zvolena vhodně. Vakcíny byly ve všech případech indikovány na základě vyšetření *in vivo* a/nebo *in vitro* reaktivity proti směsím pylu, nebyl tedy odhalen konkrétní dominantní alergen, který potíže vyvolává.

Laboratoř neměla možnost vybrat pacienty pro sledování. Nemohla ovlivnit skutečnost, že některé pacienty lze po detailnější analýze považovat spíše za polyvalentní alergiky. V případě zamýšlené imunoterapie je pak třeba přihlédnout k tomu, zda je takový pacient kosenzibilizován nebo zda za polyvalentnost může zkřížená reaktivita. Jak bylo řečeno dříve, tito pacienti mohou výrazně méně profitovat z léčby alergenovou vakcínou.

Je tedy důležité klást důraz na správnou diagnostiku, abychom docílili přesného poznání pacientova citlivostního profilu a podle toho zvážili přínos a zavedení SIT. Diagnostickými rekombinantními alergeny je dnes možné selektovat pacienty kosenzibilizované a pacienty se zkříženou senzibilizací, která nemusí být vždy provázena skutečnou klinickou reaktivitou, tedy zkříženou alergií, a tak může být hůře odhalitelná.⁽¹⁴⁾

Na kazuistikách uvedených v této práci je vidět, jak je v některých případech zaváděna SIT pacientům bez předchozího stanovení přesného atopického profilu, pouze na empirickém základě. Jak dalece mohou pacienti profitovat z takovéto terapie, je otázkou diskuzí, které se zabývají obecnými aspekty ovlivnění imunitního systému (imunomodulací).

Stejně tak k vakcinaci byly někdy použity nestandardizované alergenové extrakty, dokonce i jejich směsi, které by měly v rámci moderních postupů být spíše na ústupu. Současným trendem je léčit jen jedním konkrétním alergenem. V případě, kdy je potřeba nasadit alergenů více, je dle nových studií zásadou nespojovat je v jedné vakcíně, ale aplikovat například dvě vakcíny současně.⁽⁴⁹⁾

Na druhé straně nutno konstatovat, že často je i u empiricky nasazené terapie pozorován lékařem úspěch. To platí i pro terapii nestandardizovanými vakcínami. Pro vysvětlení takových efektů je potřeba zmínit význam placebo efektu, který je právě při imunomodulaci velmi výrazný – uplatňuje se významně propojení nervového a imunitního systému. Dalším faktorem je také často nespecifická aktivace mechanismů přirozené imunity

v rámci imunomodulace s dopadem na úroveň mechanismů specifické (humorální, buněčné) imunity.⁽⁶⁹⁾ Jakékoliv, i nespecifické, posunutí imunitní reaktivity alergického pacienta ve prospěch Th1 odpovědi se může příznivě odrazit na klinickém stavu pacienta.

To by mohlo vysvětlovat, proč jsou stále v alergologické praxi užívané nestandardizované směsné alergenové vakcíny, charakterizované jen na základě jednotek proteinového dusíku. Navíc i při použití standardizované vakcíny konkrétního extraktu není možné v průběhu terapie zajistit konstantní množství alergenu v alergenovém extraktu v jednotlivých šaržích i v rámci stejné firmy.

Celosvětovým trendem je ovlivňovat imunitní systém cíleně, a to přesně definovanými působky (rekomb. alergeny), s čímž souvisí tendence zavádět vakcíny založené na modifikaci příčinného alergenu nebo na rekombinantních technologiích.

Argumentem pro takto cílené vakcíny je také to, že podle některých autorů⁽⁶⁸⁾ je při desenzitizaci ke konkrétnímu alergenovému zdroji důležitý nárůst sIgG proti jeho hlavním alergenům (odezva t3 znamená nárůst „nepotřebných“ IgG).

Při SIT alergenovým extraktem roste sice celkové IgG vlivem balastu a nealergenních komponent, ale zastoupení potřebného IgG/IgG4 („opravdu blokujícího“) proti konkrétnímu alergenům je pak nižší.⁽⁶⁸⁾

Mechanismus SIT se však zdá být komplexnější, není spojován pouze s aktivitou blokujících protilátek, ale řadou dalších regulačních pochodů.

Další možností posouzení laboratorní odezvy imunoterapie je například monitorování změn hladin Th1/Th2 interleukinů, kdy bylo prokázáno, že při úspěšné SIT lze prokázat změny v hladinách klíčových Th1 (IFN γ) a Th2 (IL-4) cytokinů.⁽⁷⁰⁾

Tyto přístupy jsou ale dosud předmětem spíše klinického výzkumu než klinické praxe.

Obecně se dá konstatovat, že zatím v běžné praxi chybí spolehlivý laboratorní marker, na základě kterého by se dalo s jistotou usoudit na efektivitu SIT a který by korespondoval s klinickou odezvou terapie.⁽⁴⁴⁾

Popisované výrazné změny hladin sIgE, sIgG/IgG4, které se nám v této práci nepodařilo pozorovat, vycházejí ze studií, které byly prováděny při terapii rekombinantními alergeny případně jejich deriváty.⁽⁵¹⁾⁽²⁷⁾⁽³²⁾

Z pohledu „laboratorní medicíny založené na důkazech“ je přínos rekombinantních alergenů pro diagnostiku a monitorování SIT nesporný. Využití rekombinantních alergenů pro terapii je v současnosti ve fázi časného klinického výzkumu, ale již nyní se ukazuje (alespoň v experimentu), že současné velmi široké spektrum terapeutických alergenů bude zúženo na podstatně užší paletu „imunodominantních alergenů“, které dostatečně pokryjí

potřebnou odpovídavost imunitního systému. Nové přístupy v SIT budou také využívat na alergenech nezávislé postupy cílené aktivace Th1 větve imunitní odpovědi, což vychází z pozorování, která našla uplatnění při formulování tzv. „hygienické hypotézy“.

11. ZÁVĚR

Tato rigorózní práce přináší základní literární přehled současné diagnostiky atopických chorob využívané v rutinní praxi. Věnuje se metodám, které mají v současnosti víceméně výzkumný charakter nebo do praxe pronikají formou organizovaných klinických studií. Jejich zavedení do rutinní praxe může být otázkou nejbližších několika let.

Práce se zabývá možnostmi využití alergenů získaných technologií molekulárního inženýrství (rekombinantní alergeny) a je uveden stručný přehled nejvýznamnějších přírodních zdrojů používaných k získávání alergenových extraktů.

Jsou zde zmíněny základní recentní poznatky o alergenové specifické imunoterapii, o mechanismech jejího účinku a o faktorech, které mohou ovlivňovat její úspěšnost.

V praktické části byla na některých rekombinantních alergenech pylu břízy (hlavní alergen Bet v 1, vedlejší alergeny Bet v 2 a 4) a pylu bojínku lučního (hlavní alergeny Phl p 1 a 5, vedlejší alergeny Phl p 7 a 12) potvrzena použitelnost alergenů získaných technologií molekulárního inženýrství v metodách současné rutinní *in vitro* diagnostiky atopie a jejich předpokládaný přínos pro zpřesnění diagnózy alergického onemocnění oproti dosud používaným přírodním alergenovým extraktům (v této práci konkrétně břízy - t3 a bojínku - g6).

Rozpoznání hlavních alergenních determinantů účastnících se na vzniku alergické reakce (a rozvoji alergie jako nemoci) je pak základním předpokladem pro účelnou indikaci specifické alergenové imunoterapie.

V klinické části byly zpracovány kazuistiky pacientů, kteří absolvovali specifickou alergenovou terapii. Bylo poukázáno na různorodost faktorů, které ovlivňují úspěšnost této terapie. Z dostupných výsledků a literatury bylo potvrzeno, že základem pro efektivní terapii je provedení kvalitní diagnostiky k odhalení vyvolávajícího zdroje, a že kromě dalších faktorů záleží především na kvalitě použité vakcíny. K takovéto racionalizaci imunoterapie také směřují obecná doporučení.

Používáním rekombinantních alergenů by nám mělo být umožněno charakterizovat imunologický profil pacienta do větších detailů a v nadcházejících letech nejspíš přispějí rekombinantní technologie k dokonalejší a efektivnější imunoterapii, případně jiným léčebným směrům.

12. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ara h 5, Api g 4, Pyr c 4, ...	Zkratky/značky pro některé definované alergen
Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4	Zkratky/značky pro některé alergen břízy bělokoré
CD znaky	"Cluster of Differentiation" – označení lymfocytárních antigenů
CIM ZÚ	Centrum Imunologie a Mikrobiologie, Zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem
d1	Alergeny roztoče Dermatophagoides pteronyssinus
ECP	Eozinofilní kationický protein
EIA	Enzymoimunoanalýza
ELISA	"Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay"
Fab	Fragment vázající antigen (Antigen Binding)
Fc	Fragment krystalizující (crystallizing)
FEIA	Fluoroenzymoimunoanalýza
GINA	Globální iniciativa pro astma (Global initiative for asthma)
g6	Alergeny pylu bojínku lučního
GM-CSF	Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
gx1	Směs alergenů pylů trav (srha říznačka, kostřava, jílek vytrvalý, bojínek luční, lipnice luční)
gx3	Směs alergenů pylů trav (tomka vonná, troskut prstnatý, jílek, bojínek luční, čirok halepský)
h1	Směs alergenů domácího prachu
IL	Interleukin
IRP	"International Reference Preparation"
IUIS	"International Union of Immunological Societies"

JČS	Jarní časná směs
J-řetězec	Spojovací (Junction) - řetězec
M/Z	Označení v tabulkách výsledků: Muž/Žena
MH	Molekulová Hmotnost
NBT	Nitro blue tetrazolium
NK buňky	Přirození zabíječi (Natural Killers)
PAF	Destičky aktivující faktor (Platelet Activating Factor)
pb	Páry bazí
Phl p 1, Phl p 5, Phl p 7, Phl p 12	Zkratky/značky pro některé alergy bojínu lučního
PNU	Obsah proteinového dusíku
RAST	"RadioAlergenoSorbent Test"
RIA	Radioimunoanalýza
RISA	"Ring-Immuno-Sorbent-Assay"
sIgE	Specifický imunoglobulin E
SIT	Specifická imunoterapie
SLE	Systémový Lupus Erythematodes
t3	Alergy pylu břízy bělokoré
T_H lymfocyt	Pomocný (Helper) T lymfocyt
T_{reg}	T regulační lymfocyt
TNF	Tumor Nekrotizující Faktor
tx9	Směs alergy pylu stromů (olše, bříza, líska obecná, buk lesní, dub, jilm, platan, vrba bílá, jasan)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)
WAO	World Allergy Organisation
wx1	Alergy směsi pylů plevelů

13. LITERATURA

1. Špičák, V.: Definice a současné problémy oboru alergologie a klinická imunologie. Campus Medicorum (Postgraduální měsíčník pro lékaře) 2005; 11: 1 – 6
2. Murray, R.K., Granner, D.K., et al.: Harperova biochemie. 2. české vyd. Praha: H&H, 1998; 872 s.
3. Kopřiva, F.: Chronický eozinofilní zánět a asthma bronchiale. 1. vyd. Maxdorf s.r.o., Praha 2003; 224 s.
4. Silbernagl, S., Lang, F.: Atlas patofyziologie člověka. 1. české vyd. Grada-Avicenum, Praha 2001; 390 s.
5. Johansson, S. G. O., Hourihane, J. O'B., et al.: A Revised Nomenclature for Allergy – EAACI Position Statement. Allergy 2001; 56: 813 - 824
6. Špičák, V., Panzner, P.: Alergologie. 1. vyd. Galen, Praha 2004; 348 s.
7. Larché, M., Akdis, C.A., Valenta, R.: Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Nature Reviews Immunology 2006; 6: 761-771
8. Ohkura N., Sakaguchi S.: A novel modifier of regulatory T cells, Nature immunology 2009; 10(7): 685-686
9. Bartůňková, J., Šedivá, A., Janda, A.: Imunodeficiency, 2. Vydání Grada Publishing, a.s., Praha 2007: 256 + 4 s.
10. <http://www.zdravotnickenoviny.cz/scripts/detail.php?id=174087>. [Online] [Citace: 24. 5 2009.]
11. <http://www.zdravotnickenoviny.cz/scripts/detail.php?id=162231>. [Online] [Citace: 23. 9 2008.]
12. Huby, R. D. J., Dearman, R. J., Kimber, I.: Why are some proteins allergens? Toxicological Science 2000; 55: 235 – 246
13. Fuchs, M.: Zkřížená alergie. Alergie 2000; 4: 258 - 266
14. <http://www.alergie.cz/pro-odborniky/zkrizena-alergie/podstata/>. [Online] [Citace: 24. 9 2008.]
15. Marek, M.: Pylové alergen, Alergologická ambulance, Dětské oddělení, Nemocnice Děčín, 35 - 50
16. Platt-Mills, T. A., Thomas, W. R., et al.: Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. J Allergy Clin Immunol, 1992; 89: 1046-1060
17. http://www.zdrava-rodina.cz/med/med1199/med1199_22.html. [Online] [Citace: 3. 12 2005.]

18. Smith A. M., Chapman M. D.: Reduction in IgE binding to allergen variants generated by site - directed mutagenesis: contribution of disulfide bonds to the antigenic structure of the major house dust mite allergen Der p 2. *Mol Immunol*, 1996; 33: 399 - 405.
19. <http://www.otevrena-veda.cz/ImgPageC1/Biolog/1kotrba.pdf>. [Online] [Citace: 5. 11 2005.]
20. Kučera, P.: Nové směry v imunoterapii alergických chorob. *Alergie* 2001, 2: 138 – 143
21. Valenta, R., Kraft, D.: From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* 2002; 14: 718-727
22. Valenta, R., Vrtala, S. et al.: Recombinant allergens. *Allergy* 1998; 53: 552 – 561
23. Valenta, R.: Recombinant allergen-based concepts for diagnosis and therapy Type I allergy. *Allergy* 2002; 57(71): 66 - 77
24. Valenta, R.: Diagnostic tests based on recombinant allergens: Assistants for the selection of allergy therapies. *New Horizont Allergy* 2002; 1: 1 – 6
25. Pauli, G.: Evolution in the Understanding of Cross-Reactivities of Respiratory Allergens: The Role of recombinant allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 183 - 95
26. Valenta, R., Lidholm, J., et al. : The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clinical and Experimental Allergy* 1999; 29: 896 - 904
27. Moverare, R., Elfman, L., et al.: Development of new IgE specificities to allergenic components in birch pollen extract during specific immunotherapy studied with immunoblotting and Pharmacia CAP System®, *Allergy* 2002; 57: 423 – 430
28. Valenta, R., Twaroch, T., Swoboda, I.: Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the mediterranean area. *J Investing Allergol Clin Immunol* 2007; 17(1): 00-00
29. Valenta R., Niederberger V.: Recombinant allergens for immunotherapy, *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(4): 826-830
30. Přehled laboratorních vyšetření. *Imunologie Ústí nad Labem, Zdravotní Ústav se sídlem v Ústí nad Labem*, 2003
31. Hartl, A., Kiesslich, J., et al.: Immune responses after immunozation with plasmid DNA encoding Bet v 1, the major allergen of birch pollen. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 103: 107-113

32. Niederberger, V., Horak, F., et al.: Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic diseases, PNAS 2004; 101(2): 14677 – 14682
33. Panzner, P.: Možnosti a úskalí diagnostiky alergie s přihlédnutím k imunoterapii. Alergie 2000; 1(2): 91 - 94
34. Ettlerová, K., Kohout, P.: Diagnostické možnosti potravinové alergie a intolerance. Alergie 2000; 3: 190 - 196
35. Humlová, Z.: Laboratorní diagnostika v alergologii. Výběr atestačních prací z alergologie a klinické imunologie, IX, 2005, č. 2, 18 – 45
36. Lochman, I., Kloudová, A., Novák, V.: Stanovení specifického IgE – volba metody, Alergie, 2003; 5: 14-20
37. Dolen, W. K: I tis not yet time to stop skin testing, but...J Allergy Clin Immunol 2000; 105: 1074 - 1076.
38. Williams P. B., Dolen W. K., Koepke J. W et al.: Comparison of skin testing and three *in vitro* assays for specific IgE in the clinical evaluation of immediate hypersensitivity. Ann Allergy 1992; 68: 35 - 45
39. Lincová, D., Farghali, H., et al. : Základní a aplikovaná farmakologie, 1. vyd., Galén, Praha 2002; 601 s.
40. <http://www.safebryo.cz/antiastmatika2.htm#nahoru>. [Online] [Citace: 26. 5 2009.]
41. <http://www.tigis.cz/alergie/alergie402/11.htm> . [Online] [Citace: 21. 6 2009.]
42. Rossi, R. E., Monasterolo, G. : Evaluation of Recombinant and Native Timothy Pollen (r Phl p 1, 2, 5, 6, 7, 11, 12 and nPhl p 4) – Specific IgG4 Antibodies Induced by Subcutaneous Immunotherapy with Timothy Polen Extrakt in Allergic Patients, Allergy and Immunology 2004; 135: 44 - 53
43. Focke, M., Mahler, V. et al.: Nonanaphylactic synthetic peptides derived from B cell epitopes of the major grass pollen allergen, Phl p 1, for allergy Vaccination, The FASEB Journal 2001; 15: 120 - 145
44. Rybníček, O., Seberová, E., et al.: Průvodce specifickou alergenovou imunoterapií (SIT), 2. aktualizované vydání Praha: Tigis spol s r.o. 2009, 52 s.
45. <http://www.anamneza.cz/moduly/clanek.php3?id=836&sekce=1>. [Online] [Citace: 15. 7. 2009.]
46. Reisinger, J., Horak, F., et al.: Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen sensitivity. J Allergy Clin Immunol 2005; 116: 347-354

47. Cox L.: Advantages and disadvantages of accelerated immunotherapy Schedule, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008; 122(2): 432-434
48. Peprníková J., Tyllich J., Bystroň J.: Zrychlené formy alergenové imunoterapie u rizikových pacientů, *Alergie* 2007; 2: 161-166
49. Rohovský T.: Alergie a specifická alergenová imunoterapie, *Practicus* 2009; 4: 18 - 19
50. http://ukb.lf1.cuni.cz/ppt/kia/humlova_alergo.pdf . [Online] [Citace: 12. 7 2009.]
51. Pree I., Reisinger J., et al.: Analysis of epitope-specific Immune responses induced by vaccination with structurally folded and unfolded recombinant Bet v 1 allergen derivatives in man, *The Journal of Immunology* 2007; 179(8): 5309-5316
52. Keskin O., Tuncer A., et al: The effects of grass pollen allergoid immunotherapy on clinical and immunological parameters in children with allergic rhinitis, *Pediatric Allergy and Immunology* 2006; 17(6): 396-407
53. Valenta R.: The future of antigen-specific immunotherapy of Allergy, *Nature Reviews Immunology* 2002; 2: 446-453
54. Jutel, M., Jäger, L., et al.: Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens., *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 608-613
55. Gafvelin, G., Thunberg, S., et al.: Cytokine and antibody responses in birch-pollen-allergic patients treated with genetically modified derivatives of the major birch pollen allergen bet v 1. *Int. Arch Allergy Immunol* 2005; 138: 59-66
56. Jutel, M., Akdis, M., et al.: Are regulatory T cells the target of venom immunotherapy? *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2005; 5: 365-369
57. (alaSTat)AlaBLOT™ Alergen Immunoblotting, firemní materiál, Diagnostic Products Corporation 5700 West 96th Street, Los Angeles 1997, 4 s.
58. Moverare, R., Westritschnig, K. et al.: Different IgE Reactivity Profiles in Birch Pollen-Sensitive Patients from Six European Populations Revealed by Recombinant Allergens: An Imprint of Local Sensitization. *Allergy and Immunology* 2002; 128: 325 - 335
59. De Amici, M., Mosca, M., et al.: Recombinant birch allergens (Bet v 1 and Bet v 2) and the oral allergy syndrome in patients allergic to birch pollen. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 2003; 91(5): 490 - 492
60. Tresch, S., Holzmann, D., et al.: *In vitro* and *in vivo* allergenicity of recombinant Bet v 1 compared to the reactivity of natural birch pollen extract. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1153 - 1158

61. Rossi, R. E., Monasterolo, G., Monasterolo, S.: Detection of specific IgE antibodies in the sera of patients allergic to birch pollen using recombinant allergens Bet v 1, Bet v 2, Bet v 4: evaluation of different IgE reactivity profiles, *Allergy* 2003; 58: 929 - 932
62. Král, V.: Ústní sdělení, Centrum Imunologie a Mikrobiologie, Zdravotní ústav se sídlem v Ústí nad Labem, 2006
63. Ruden, S., Steinman, H.: Grass pollens. Allergy - which allergens? Informační materiál firmy Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala 2004: 79 - 86
64. Anhoj, C., Backer, V., Nolte, H.: Diagnostic evaluation of grass- and birch-allergic patients with oral allergy syndrome. *Allergy* 2001; 56: 548 – 552
65. Niederberger, V., Hayek B., et al.: Calcium-dependent immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound form of a cross-reactive two EF-hand timothy grass pollen allergen, *Phl p 7, The FASEB Journal* 1999; 13: 843 - 856
66. Westritschnig, K., Focke, M., et al.: Generation of an allergy vaccine by disruption of the three dimensional structure of the Cross-reactive calcium-binding allergen, *Phl p 7. The Journal of Immunology* 2004; 172: 5684 - 5692
67. Linhart, B., Jahn-Schmid, B., et al.: Combination vaccines for the treatment of grass pollen allergy consisting of genetically engineered hybrid molecules with increased immunogenicity, *The FASEB Journal* 2002; 16: 1301 – 1303
68. <http://www.meduniwien.ac.at/expatho/immunopatho/buenosaires-diagnosis.ppt> [Online] [Citace: 18.78 2009.]
69. Fudenberg, H., H. & Fudenberg, H., H.: Transfer factor: Past, Present and Future, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 1989; 29: 475 – 516
70. Krčmová, I., Andrýs, C., et al.: Srovnání účinnosti subkutánní a sublinguální specifické alergenové imunoterapie v klinických a laboratorních parametrech, *Alergie* 2009; 1: 16-24
71. <http://www.biodesign.com/tables/bio12b.html>. [Online] [Citace: 25. 8 2005.]
72. http://www.kaau.edu.sa/girls/sc/biochemistry/subjects/types_of_igg.htm. [Online] [Citace: 25. 8 2005.]
73. Jílek, P.: Základy imunologie, 1. vyd., Freeway agency Praha 2002; 76 s.
74. http://www.biokemi.org/biozoom/2002_4/bz_0402n.htm. [Online] [Citace: 4. 11 2005.]