

Univerzita Palackého v Olomouci  
Lékařská fakulta

**Monitorování specifické alergenové imunoterapie pomocí  
rekombinantních alergenů u pacientů v první fázi léčby  
alergenem**

**Jaroslava Braunová**

Školitel: doc. MUDr. Evžen Weigl, CSc.  
Školící pracoviště: Ústav imunologie LF UP Olomouc

Olomouc 2011

Prohlašuji, že jsem předloženou dizerační práci vypracovala samostatně pod vedením školitele doc. MUDr. E. Weigla, CSc. a s pomocí literárních zdrojů, jejichž seznam je uveden na konci práce

V Olomouci dne .....

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Evženu Weiglovi za trvalý zájem o mou práci a všestrannou podporu.

Rovněž chci poděkovat všem pracovníkům Ústavu imunologie LF UP Olomouc za pomoc při realizaci některých dílčích úkolů.

## OBSAH

Cíle dizertační práce.....	5
Úvod.....	7
1. Přehled současného stavu problematiky .....	9
1.1. Alergie a alergická onemocnění.....	9
1.2 Historie IgE.....	17
1.3 Syntéza IgE.....	19
1.4 Receptory pro IgE.....	22
1.4 Role genetických faktorů.....	24
1.5 Role antigenu.....	25
1.6. Alergický zánět.....	25
1.7 Regulace činnosti efektorových buček imunitního systému.....	33
1.8 Klinické koreláty alergického zánětu.....	34
1.9 Sezónní alergická rýma.....	35
1.10 Specifická alergenová imunoterapie.....	39
1.10.1 Princip specifické alergenové imunoterapie.....	39
1.10.2 Standardizace a nomenklatura alergenů.....	43
1.10.3 Nomenklatura alergenů.....	44
1.10.4 Mechanismy účinku SIT.....	44
1. 10. 5 Indikace SIT:.....	45
1. 10. 6 Kontraindikace SIT:.....	46
1. 10. 7 Výběr pacientů vhodných pro SIT.....	47
1.10.8 Současné cesty aplikace SIT.....	47
2 Metodika .....	50
2.1 Výběr pacientů.....	50
2.2 Použité vakcíny.....	50
2.3 Aplikační schéma.....	52
2.4 Odběr a zpracování vzorků.....	53
2.5 Příprava rekombinantních antigenů.....	53
2.6 Stanovení IgG4 protilátek.....	55
2.7 Prick test.....	56
2.8 Metody statistického hodnocení dat.....	56
3 Výsledky .....	57
4 Diskuse.....	69
5 Abstrakt.....	75
6 Summary.....	78
7 Přehled použité literatury.....	81

## Cíle dizertační práce

Specifická alergenová imunoterapie (SIT) se dnes při léčbě pylových alergií oprávněně řadí ke standardním terapeutickým postupům. Na českém trhu je k dispozici celá řada přípravků obsahujících alergenové extrakty představující směs antigenních komponent extrahovaných z pylových zrn. Ve výjimečných případech pocházejí tyto extrakty z pylových zrn jednoho rostlinného druhu, daleko častěji se však používají směsi alergenů různých rostlinných druhů. Tyto extrakty, představující biologický materiál, mohou vykazovat rozdílnou míru antigenní, respektive alergenní, specifiky, která je přirozeným odrazem biologické variability. Z tohoto důvodu není možné k přípravkům určeným pro SIT přistupovat stejným způsobem jako ke klastickým léčivým přípravkům, což se týká zejména jejich standardizace.

Kvantitativní charakteristika alergenů metodami proteinové chemie umožňuje popsat s relativně vysokou přesností např. obsah proteinového dusíku. Neumožňuje však stanovit zastoupení jednotlivých hlavních nebo vedlejších alergenů extrahovaných z použitého pylu. Spektrum hlavních a vedlejších alergenů tak v dodávaných přípravcích není známo a není tak známá ani jejich specifická reaktivita. Tento nedostatek je obcházen tím, že jednotlivé firmy charakterizují své přípravky pomocí relativních údajů vyjádřených např. „Indexem reaktivity“.

Tyto skutečnosti vedou k obtížnému srovnání účinnosti použití různých přípravků pro SIT v rutinní klinické praxi. To se týká například posouzení nezbytné délky iniciační fáze terapie či dosažené hladiny specifických blokujících protilátek proti jednotlivým alergenům, které jsou hodnoceny často pouze na základě klinické odezvy a nejsou často podloženy relevantními laboratorními nálezy.

Teprve v posledních letech uvádějí někteří výrobci, že jejich dodávané preparáty jsou standardizovány pomocí rekombinantních alergenů. Prakticky to znamená, že koncentrace alergenů v dodávaném přípravku je proměřena nejen metodami standardní chemie např. stanovením proteinového dusíku (PNU) na ml, ale také imunologicky, kvantitativním hodnocením zastoupení jednotlivých alergenů specifických pro konkrétní rostlinný alergen, (např. Bet v 1, Lol p 2 apod). K takovéto analýze se používá tzv. rekombinantních alergenů připravených molekulárně

biologickými postupy. Metoda je používána jak vnitřní firemní kontrolou, tak státními institucemi, které hodnotí kvalitu přípravků uváděných na trh.

V klinickolaboratorní praxi alergologa je možno využít modifikace těchto postupů k zodpovězení některých významných otázek, na které se snaží nalézt odpověď také předložená disertační práce.

1. Budou mít terapeutické alergeny standardizované imunologickými postupy s využitím rekombinantních alergenů lepší terapeutické efekt než preparáty nestandardizované?

2. Vede iniciační vakcinace, tj. podávání alergenního extraktu s postupně rostoucí koncentrací účinné látky k paralelnímu vzestupu IgG4 jako blokujících protilátek?

3. Je hladina IgG4 protilátek nastavená terapeutickým podáváním SIT konstantní v období přerušení antigenní stimulace?

Obecným cílem této práce je dále využít experimentálního potenciálu Ústavu imunologie Lékařské fakulty UP v Olomouci a v určité aproximaci dané pracovními možnostmi porovnat klinické a laboratorní výsledky u pacientů léčených dvěma preparáty rozdílné provenience dodávanými na český trh.

## Úvod

K základním charakteristikám imunitního systému patří schopnost rozlišovat mezi vlastním a cizím a mezi nebezpečným a neškodným. Rozpoznávání těchto signálů a schopnost reagovat na ně odovídajícím způsobem je součástí homeostázy organismu, zajišťované imunologickými mechanizmy. Porušení této rovnováhy vede k patologickým projevům pod obrazem autoimunity nebo alergie. Alergické nebo hypersenzitivní reakce jsou tak výsledkem patologické imunitní odpovědi k cizím molekulám, které nenesou znaky nebezpečí. Tyto molekuly jsou označovány jako alergeny. Na rozdíl od jiných hypersenzitivních reakcí jsou imunologickým mediátorem alergických reakcí IgE protilátky specifické vůči alergenní molekule.

V r. 1921 popsali Prausnitz a Küstner sérovou cirkulující substancí schopnou pasivního přenosu časně alergické odpovědi z jednoho individua na druhé. Označili ji jako reagin. Soustředili tak pozornost odborného světa na fenomén, který, jak se ukázalo, má svou medicínskou historii, klinickou symptomatologii, specifické patogenetické mechanismy a tím i terapeutické postupy. Prausnitz a Küstner tak položili základy novodobé alergologie.

Ishizaka a Johansson v polovině 60. let 20. století nezávisle na sobě identifikovali tento reagin jako IgE a tím poskytli materiální substrát ke studiu etiopatologických mechanismů chorob, jako je rhinitida, astma a potravinová alergie, a logický cíl jejich léčby. Uběhlo téměř 25 let, než bylo jasně ukázáno, že monoklonální protilátka nasměřovaná proti té části IgE molekuly, která je identifikována vysoce- a nízkoafinními IgE receptory na efektorových buňkách, může dramaticky snížit hladinu cirkulujících a tkáňových IgE tvorbou malých komplexů. Komplex IgE a monoklonálních protilátek vytvářejí řetězky kolem efektorových buněk a selhávají proto jako mediátor při indukci anafylaktické odpovědi.

V roce 1911 pak Noon a Freeman poprvé použili pro léčbu alergického onemocnění hyposenzibilizační léčbu, která spočívá v opakované aplikaci alergenu vyvolávajícího onemocnění v postupně se zvyšujících dávkách, a položili tak základ pro specifickou alergenovou imunoterapii. Od té doby byla publikována celá řada prací, které přesvědčivě dokládají jak krátkodobou tak dlouhodobou účinnost této léčebné strategie, která našla pevné místo v léčebných protokolech řady alergických

onemocnění. Celý koncept této léčby vychází ze skutečnosti, doložené řadou experimentálních prací, že při opakovaném podání zvyšující se dávky příslušného alergenu dochází k indukci tvorby tzv. blokujících protilátek třídy IgG, zejména pak IgG<sub>1</sub> a IgG<sub>4</sub>. Tyto protilátky mají schopnost specificky vázat alergenní determinanty a vystupovat tak jako kompetitivní inhibitory protilátek třídy IgE.

Předložená disertační práce, která sumarizuje výsledky sledování provedených v letech 2004 až 2009 a která navazuje na dřívější práce Ústavu imunologie LF UP Olomouc řešící typizaci pylových alergenů pomocí inhibiční ELISA, si klade za cíl shrnout dosavadní poznatky studované problematiky, srovnat klinickou účinnost dvou rutinně používaných standardizovaných vakcín dostupných na českém trhu a přispět alespoň malou měrou k pochopení základních mechanismů specifické alergenové imunoterapie



# 1. Přehled současného stavu problematiky

## 1.1. Alergie a alergická onemocnění

Alergické příznaky byly popsány již před více než 3.000 lety před Kristem., když faraona Menese, vládce Egypta, bodl sršeň. Řeční učenci popsali klinické symptomy astmatu, do kterých však zahrnuli různé typy dechových obtíží. V roce 1552 doktor Carden, italský lékař, zbavil astmatických potíží arcibiskupa ze St. Andrew z astmatu, když odstranil z jeho okolí deky a polštáře obsahující peří. V 1586 německý učenec Macello Donati popsal šlechtice, u něhož došlo k otoku rtů po požití vajec.

První kožní prick test pod lékařským dozorem byl zřejmě proveden již v roce 1656 Pierrem Borelem. V průběhu 17. století němečtí autoři popsali slabost, mdloby a astmatické příznaky u lidí vystavených expozici koček, myši, psů a koní. Doktor Bostock, který trpěl očními příznaky a dechovými potížemi, popsal sennou rýmu. Teprve experiment provedený v roce 1873 Charlesem Blackleyem poskytl důkaz, že příčinou senné rýmy je pyl trav.

V roce 1839 francouzský fyziolog Magendie popsal anafylaktický šok a smrt u psů, kterým byla podána injekce cizorodého proteinu. Von Behring zavedl termín hypersenzitivita k popisu vystupňované odpovědi, vedoucí případně až k úmrtí, po podání druhé dávky difterického toxinu u zvířat. Portier a Richet poprvé použili termín anafylaxe v roce 1902, když popsali klinický šokový syndrom u psů, kteří byli již dříve v rámci experimentu senzibilizováni toxinem a setkali se stejnou látkou podruhé.

Termín alergie, ve smyslu „změněné reaktivity“, byl původně definován Clemensem von Priquetem v roce 1906 jako pozměněná schopnost organismu reagovat na cizorodé substance. V pozdějších letech byly mechanismy anafylaktické reakce dále podrobněji popsány v pokusech Schulze a Daleho, prováděných na hladké svalovině trávicího a močového traktu.

V současné době je obecně přijímána definice alergie jako nepřiměřené nebo škodlivé imunitní odpovědi na cizorodou substanci, která je jinak pro lidské tělo neškodná. Tyto substance se nazývají alergeny a imunitní odpověď je zprostředkováná hlavně, nicméně ne výlučně, protilátkami třídy IgE. Obvyklé zdroje alergenů zahrnují

domácí prach, vzdušné pyly travin, stromů a plevelů, alergeny domácích zvířat, spory plísní a alergeny potravinové.

IgE zprostředkovaná alergická onemocnění zahrnují alergické astma, alergickou rhinoconjunctivitu, potravinovou alergii, lékovou alergii, alergii na hmyzí jed.

Alergická onemocnění se často rovíjejí v geneticky disponovaném terénu s projevy atopie. Průvodním jevem je pozitivní reakce na kožní prick test. Laboratorně prokazujeme přítomnost IgE protilátek specifických na konkrétní alergeny. Patofyziologickým korelátem prakticky všech alergických onemocnění je eosinofilní zánět.

Alergeny se dostávají do těla přes sliznici respiračního traktu, zažívacího traktu, spojivkou, s výjimkou bodnutí hmyzem nebo při lékové alergii, kdy mohou být injekčně vpravovány do kůže nebo přímo do krve. Počáteční expozice je příčinou senzitivace

a produkce antigen specifických IgE protilátek. Následující expozice mohou vést k imunitní reakci a rozvoji onemocnění. Klinická manifestace této reakce záleží na postižení orgánu či tkáni.

Například v dýchacích cestách tato reakce zapříčiňuje astma, zatímco na sliznici nosní či spojivkové je příčinou rhinoconjunctivitidy.

Alergická onemocnění (sezónní alergická rýma, celoroční alergická rýma, atopická dermatitida a alergické astma) postihují celosvětově až 400 miliónů lidí (Tawankar et al., 2009, Barman, 2006). Nejvyšších hodnot dosahuje prevalence astmatu a alergické rýmy ve vyspělých zemích (Velká Británie, Austrálie, Nový Zéland, Irsko, země Severní, Střední a Jižní Ameriky). Naopak nejnižší prevalenci nacházíme v některých východoevropských zemích, Indonésii, Řecku, Číně, Taiwanu, Uzbekistánu, Indii a etiopii (Stipič-Markovič et al., 2003). Například ve Velké Británii vrostla incidence alergické rýmy z 5,57 případů na 1000 obyvatel v roce 2001 na 7,41 případů na 1000 obyvatel v roce 2005 (Ghouri et al. 2008). Prevalence v této studii vzrostla z 46,35 % v roce 2001 na 66,37 % v roce 2005. Ve Spojených státech Amerických je uváděno kolem 60 miliónů lidí trpících alergickou rýmou

a její prevalence se pohybuje v rozmezí 10 – 30 % u dospělých a kolem 40 % u dětí (Natthan, 2007, Berger, 2004, Settiane 2003).

Nárůst prevalence bronchiálního astmatu a alergické rýmy v různých částech světa dokládají četné další studie (Dosna et al. 2001, Sonuhauser et al. 2005 a Craig et al. 2010).

Obdobná situace nárůstu počtu pacientů je také v České republice (viz následující tabulka):

Tab. 1: Vývoj dispenzarizovaných pacientů pro vybranou diagnózu v České republice (podle ÚZIS 2010).

Rok	Počet dispenzarizovaných osob pro vybranou diagnózu na 10 tisíc obyvatel					
	Atopická dermatitis	Polinosis	Stálá alergická rýma	Astma bronchiale	Astma alergické	Astma <sup>1)</sup>
2000	55,53	249,87	110,93	79,39	96,38	-
2001	56,17	264,35	118,91	85,98	106,86	-
2002	61,89	282,23	131,44	93,20	124,14	-
2003	67,21	296,55	140,41	104,50	137,75	-
2004	71,92	306,71	140,76	117,91	146,56	-
2005	79,92	318,25	148,15	180,97	-	-
2006	82,94	332,33	160,14	-	-	243,51
2007	80,22	344,37	155,82	-	-	254,80
2008	75,44	323,54	155,92	-	-	256,45
2009	77,26	323,70	158,48	-	-	266,50

1( Od roku 2006 se sledují oba typy (astma alergické a astma bronchiale) dohromady jako astma.

Sánchez-Lerma et al. (2009) poukazuje na rozdíly v prevalenci alergické rhinitidy u dětí ve věku 6 – 7 let v různých oblastech Španělska. Podobné výsledky získali také Stipič-Markovič et al. (2003) a Lee et al. (2001), podle kterého dosahuje v Koreji prevalence alergické rhinitidy u dětí ve věku 6 – 12 let hodnoty 28,8 % a u dětí ve věku 12 – 15 lety hodnoty 29,1 %. Zjištěné rozdíly v prevalenci astmatu, alergické rinokonjunktivitidy a příznaků atopického ekzému naznačují kritickou úlohu prostředí v rozvoji těchto onemocnění v dětském věku.

Cetinhaya et al. (2009) prokázali, že prevalence astmatu, alergické rýmy a atopické dermatitidy je podobná u dětí narozených po IVF (in vitro fertilization) a u dětí narozených po spontánním otěhotnění.

Významná je korelace prevalence alergické rýmy a bronchiálního astmatu. Navaro et al. (2008) prokázali, že 89,5 % dospělých pacientů s bronchiálním astmatem trpí také alergickou rýmou. Podobnou korelaci ukazují Yamauchi et al. (2009), v jejichž studii 61 % pacientů s bronchiálním astmatem vykazovalo symptomy alergické rýmy, a Castillo Vizúete & Mullo Miret (2008), v jejichž studii trpělo alergickou rýmou 71 % pacientů s bronchiálním astmatem. De Andrade et al. (2008) prokázali komorbiditu astmatu a alergické rýmy také u dětí ve věku 13 – 14 let.

Tyto výsledky naznačují, že bronchiální astma a alergická rýma mají podobný imunopatologický původ. (Navaro et al., 2008 a Castillo Vizúeta & Mullo Miret, 2008).

Nárůst atopických a alergických reakcí, zejména v průmyslově vyspělých zemích světa, se pokouší vysvětlit tzv. hygienická teorie. Podle tohoto konceptu je zdravý rozvoj imunitního systému u člověka určován množstvím stimulů, které jsou pro rozvoj funkcí imunitního systému nutné, dále zdravotnickou péčí, hygienou, životním stylem a stravovacími návyky. To vše se v posledních desetiletích, díky změnám ve společnosti, industrializaci, pokrokům ve vědě a výzkumu, změnám životního stylu obecně, velmi změnilo. Jedním ze zásadních vlivů je i výrazné zlepšení zdravotní péče a hygieny.

Nedostatek všech těchto stimulů vede k evidentnímu nárůstu počtu a spektra alergických chorob – zvýšení četnosti dětí i dospělých s manifestní atopickou dermatitidou, nárůst počtu pacientů trpících různými typy alergické rhinitidy, tj. chorobami, které jsou přímým rizikovým faktorem bronchiálního astmatu ( Natthan, 2007, Berger, 2004, Settípane 2003, Dosna et al. 2001, Sonuhauser et al. 2005 a Craig et al. 2010). Stoupá počet pacientů s potravinovou a lékovou alergií, což přináší komplikace do všech medicínských oborů a jejich ambulancí. Stoupá počet alergických reakcí na hmyzí bodnutí, včetně nejzávažnějšího projevu – anafylaktického šoku.

Epidemiologické studie jednoznačně dokazují, že např. s velikostí rodiny a větším počtem dětí dochází ke snížení výskytu atopických chorob u dětí takových rodin. Podobný efekt má i to, jak brzy a v jakém věku dítě prodělá infekční exantémové choroby, kontakt s infekty obecně – mateřské školky. Děti, absolvující v předškolním období pobyty v těchto zařízeních, jsou výrazně méně nemocné po nástupu do školy.

Stejně tak se řada teorií zamýšlí nad možným pozitivním vlivem kontaktu se zvířecími alergeny.

Obecně se zdá, že městské děti jsou vystaveny působení i jiných alergenů než děti žijící na venkově (smog, exhalace, typ stravování, pohyb v přírodě).

Světové statistiky významně dokazují nárůst alergií v ekonomicky vyspělých zemích na základě preferenční diferenciaci Th2 lymfocytů jako následek nízké stimulace zánětlivých Th1 reakcí v důsledku nedostatečného infekčního vlivu.

Díky zlepšené zdravotní péči a hygienickým normám máme před sebou děti, které jsou důkladně proočkovány, při jakýchkoliv infektech ihned přeléčeny podáváním antibiotik, což vede sice zřetelně ke snížení výskytu infekčních chorob, ale naopak k evidentnímu nárůstu chorob alergických.

Necílené podávání antibiotik v jakémkoliv věku nepříznivě mění střevní mikroflóru, což usnadňuje vniknutí cizorodých látek do organismu. Děje-li se tak v dětském věku, vede to k abnormálnímu vývoji imunologické tolerance (neodpovídavosti) na potravinové a inhalační alergeny.

K rizikovým faktorům vzniku atopických chorob (podle „hygienické hypotézy“) patří:

1. Prostředí bez mikroorganismů (hlavně těch, které vyvolávají dětské infekční choroby).
2. Očkování.
3. Necílené, opakované podávání antibiotik.
4. Nedostatek nebo chybění probiotických bakterií ve střevním traktu.
5. Konzumace potravin upravených různými přídatnými látkami – chuťová korigencia, barviva, konzervancia, stabilizátory, emulgátory, enzymy atd.

6. Stres jako významný faktor – daň, kterou platí naše moderní, uspěchaná společnost za své zdokonalování.

Mnohé z těchto faktorů se kombinují a vzájemně ovlivňují ve smyslu potenciace nechtěných účinků.

Až do dospělého věku se promítají terapeutické chyby v dětském věku. Především razantní, necílená, naslepo ordinovaná a často plošná léčba antibiotiky při objevení se čtenějších infekcí dýchacích cest (období po nástupu dětí po prázdninách do školek a škol, podzimní období aj). Díky tomuto léčebnému zásahu dochází velmi často minimálně k dysbalanci, častěji k naprostému rozvratu osídlení střeva chtěnou, žádoucí bakteriální mikroflórou. Chybí zdravotně prospěšné bakterie mléčného kvašení (hlavně bifidobakterie a laktobacily), objevují se bakterie hnilobné, velmi pomalu a nenápadně zaplavující organismus amoniakem, sirovodíkem a dalšími toxickými produkty.

Výsledkem těchto procesů je to, že nedojde ke vzniku dostatečně efektivně navozené imunologické toleranci vůči antigenům, především potravinovým. Důsledkem jsou stále čteněji se manifestující alergie potravinové, záludností zkřížených alergií potravin a inhalačních alergenů (hlavně pylových) pak i alergie respirační.

Hygienická torie vzniku alergických onemocnění má v současné době oporu v některých nálezech na úrovni celulární a molekulární. Jde o novou formulaci vztahů nespecifické a specifické imunity. Tato dvě ramena imunitní odpovědi byla donedávna chápána jako relativně nezávislé a prakticky nesouvisející evoluční etáže ve vývoji obranyschopnosti savších organismů. Jako dogma byla přijímána skutečnost, že nespecifická imunita není schopna kognitivní diferenciacie cizorodých molekulárních struktur. Tato schopnost byla připisována adaptivní imunitě prostřednictvím imunoglobulinových receptorů T i B lymfocytů. Variabilita terminálních oblastí imunoglobulinů podmiňující rozlišovací potenciál adaptivní imunity byla rozšifrována s poznáním genetické determinace variabilních a konstantních domén na molekule protilátky. U nespecifické imunity se rozlišovací schopnost nepředpokládala.

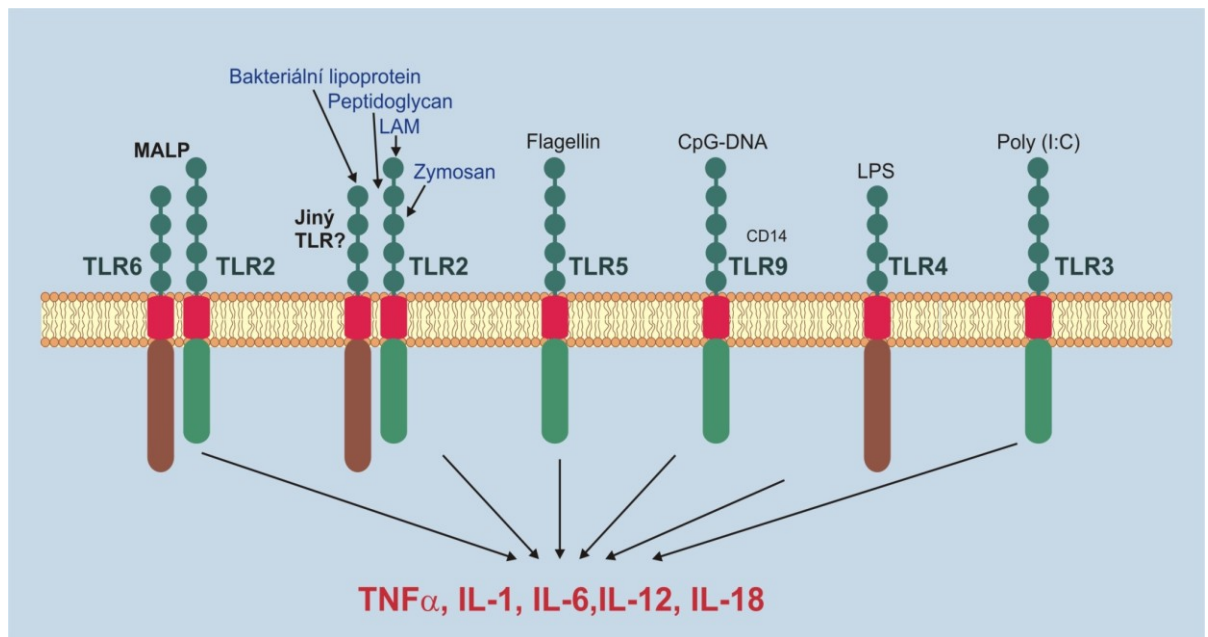
Nicméně už od poloviny 80.let bylo zřejmé, že některé receptory nespecifické imunity jsou schopny rozlišovat jemné molekulární struktury mikroorganismů. Jednalo se zejména o manózoový a lektinový receptor.

Významným podnětem k dalšímu poznání byl pohled evoluční. Tato představa vychází z faktu, že v době, kdy se na zemi objevily první eukryontní organismy, byly zde prokaryotické systémy etablovány téměř tři miliardy let. Pro přežití eukryontních systémů, které měly ve srovnání s prokaryoty menší adaptační potenciál a tudíž i fitness, bylo nezbytné vyvinout schopnost rozlišení nebezpečného a ne-nebezpečného. Předpokládá se, že pod tímto selekčním tlakem se vyvinuly receptory schopné jemného rozlišení mezi prokaryotickými organismy, které jsou tolerovány a představují možnost koevoluce nebo dokonce symbiózy s prokaryoty, které jsou existenčně nebezpečné. Receptory schopné tohoto rozlišení byly natolik vitálně významné, že se v evoluci zakonzervovaly a můžeme je s dnešní technikou zachytit napříč vývojovým spektrem, od rostlin po savčí organismy. S ohledem na jejich stáří jsou označovány jako ancestrální nebo ancientní receptory. Shora zmíněné receptory (manózoový a lektinový) představují příklady ancestrálních receptorů.

Mimořádný význam pro rozvoj našich poznatků v tomto směru měl objev tzv. Toll receptoru. Toll receptor byl popsán v polovině 80. let (1985) skupinou paní Nüsslein-Volhardtové u octomilky (Nüsslein-Volhard et al. 1985) a izolován a sekvenován v roce 1988 (Hashimoto et al. 1988). Objev toll receptoru nebyl původně v žádné souvislosti s imunitním systémem. Toll receptor byl popsán jako homeoboxový gen, který u octomilky kontroluje dorzoventrální diferenciaci hrudníku. Také Nobelova cena udělená paní Nuslein Vohardtové v roce 1995 neměla bezprostřední souvislost s obranyschopností, ale s genetikou drozofily a rozklíčováním diferenciaci. Genetické studie prokazující funkčnost a různé vlastnosti genu Toll byly založeny především na mutacích tohoto genu. Ukázalo se, že poškození tohoto genu bylo u drozofily asociováno se zvýšenou citlivostí na houbové (kvasinkové) patogeny, zatímco citlivost ke gram- pozitivním a gram- negativním mikroorganismům dotčena nebyla.

Tento fenomén popsáný u drozofily, tedy bezobratlého organismu, kde není vyvinuta specifická imunita byl tedy minimálně pozoruhodný a inicioval další studie. Ty potvrdily skutečnost, že obrané (celulární) systémy nespecifické imunity rozlišují

na povrchích prokaryotických buněk molekulární charakteristiky, které jsou specifické pro celé skupiny mikroorganismů a znamenají signál nebezpečí. Jde o molekulární struktury jako je lipopolysacharid (endotoxin) , nemetylovanou jedno nebo dvouprovazcovou nukleovou kyselinu apod (Kaisho & Akira, Janeway & Medzhittov 2002).



Obr. 1: Různé vyrianty Toll receptoru 1 – 13.

Intenzivní studie Toll receptoru a jeho analogů vedl k popisu tzv. Toll like receptorů popisovaných u člověka. Jde jednoznačně o receptory nespecifické imunity. Na podkladě jejich fungování byly v posledních letech přeformulovány vztahy specifické a nespecifické imunity. Obsazení Toll like receptorů ligandou znamenající signál nebezpečí vede u člověka a zvířat k aktivaci genů konrolujících syntézu prozánětlivých cytokinů a tím k významnému ovlivnění reakce specifické imunity. Prozánětlivé cytokiny orientují diferenciaci T-helper lymfocytů k Th-1 odpovědi včetně produkce interferonu gama. Interferon gama je přirozeným antagonistou IL-4 a IL-13, tedy cytokinů zásadních pro rozvoj Th2 odpovědi, s níž je spojena i alergické reakce. Chronické chybění signálu nebezpečí znamená útlum této regulační cesty a zvýšenou možnost pro indukci Th2 odpovědi (Takeda & Akira 2001).



Je pozoruhodné, jak v tomto směru konvergují poznatky empirické (klinické) a rozvoj poznatků na molekulárně biologické a celulární úrovni.

## 1.2 Historie IgE

Kauzální vztah mezi solubilním sérovým faktorem a manifestací kožní hypersenzitivní reakce byl popsán již v první polovině 20. století jako tzv. Prausnitz-Küstnerova reakce. Autoři – Otto Carl W. Prausnitz (1876 – 1963) a Heinz Küstner (1897 – 1963) provedli experiment s následujícím uspořádáním: Použili sérum od H. Küstnera, který byl alergický na ryby a aplikovali ho do kůže O. Prausnitze. Do téhož místa pak byl Prausnitzovi aplikován antigen izolovaný z ryb. Autoři publikovali výsledky svého experimentu v roce 1921. Jejich postup vstoupil do literatury jako tzv. Prausnitz-Küstnerova reakce (PK) (Prausnitz ad Küstner 1921). Jejich zjištění bylo posléze verifikováno v mnoha experimentálních modifikacích na zvířatech. K nejznámějším patřil průkaz pasivní kožní anafylaxe (PCA): zvířatům bylo lokálně intrakutánně aplikováno antisérum proti vybranému antigenu a následně byl antigen podán intravenózně. Sérový faktor zodpovědný za transfer okamžité hypersenzitivní reakce jak u PK, tak i u PCA, byl označen jako „reagin“.

Teprve v roce 1967 Johansson a Bennich identifikovali reagující protilátku. Získali sérum od alergického pacienta a imunizovali králíky s cílem získat antiizotypové antisérum. Králičí antisérum bylo potom schopno reagovat s každou třídou lidským protilátek, v té době již rozlišovaných na IgG, IgA, IgM a IgD. Touto cestou byla každá z rozpoznávaných antiizotypových protilátek precipitována a odstraněna z králičího antiséra. Jedna, která zůstala, byla antiizotypová protilátka specifická pro v té době neznámou třídu protilátky.

Tato antiizotypová protilátka vedla k úplnému zablokování Prausnitz-Küstnerovy reakce (Stanworth et al. 1967) a byl prokázán její vztah ke kožním protilátkám (Reaganům) a byla potvrzena její antigenní identita s  $\gamma$ E-globulinem (Ishizaka et al. 1966). Byla nazvána gama E (erythema) globulin – imunoglobulin E.

V roce 1968 bylo na mezinárodní konferenci WHO dohodnuto, že tato nová třída imunoglobulinů, IgE, je skutečným nositelem biologických a imunologických rysů dříve připisovaných „reaginovým“ protilátkám.

IgE protilátka je tvořena dvěma stejnými lehkými a dvěma stejnými těžkými řetězci, tvořenými 110 aminokyselinami. Tyto řetězce jsou označovány jako imunoglobulinové domény a jsou kovalentně spojeny disulfidickými můstky. IgE má molekulovou hmotnost 190 000 a velmi nízkou sérovou koncentraci ( $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Biologický poločas volného sérového IgE je kolem dvou až tří dnů. Po navázání na své receptory na mastocytech a bazofilech jsou IgE protilátky stabilní až několik týdnů.

IgE je hlavní imunoglobulin odpovědný za odpověď organismu na alergen. Senzitivizace na alergen je předpokladem pro rozvoj IgE mediováných odpovědí u alergických onemocnění. Důkazy pro a proti roli IgE v alergickém zánětu jsou shrnuty následně.

#### Důkazy pro roli IgE

Rozvoj IgE mediované alergické reakce je spojený s vysokou hladinou sérového IgE, které hraje zásadní roli v alergické imunitní odpovědi. Pro syntézu této třídy protilátek jsou rozhodující některé cytokiny, zejména IL-4 a IL-13, kódované na geny nacházejícími se na krátkém raménku 5. chromozomu. Mimo to se v lidském genomu nacházejí další genové oblasti mající spojitost se zvýšenou atopickou reaktivitou. Jde např. o chromozomy 2q, 6p, 12q, 13q a 20p (Krejsek & Kopecký 2004).

Většina buněk účastnících se alergické odpovědi nese receptory pro IgE a může být aktivována přemostěním navázaného IgE, což vede k rozvoji časně fáze alergické odpovědi. Závažnost časně fáze souvisí se stupněm senzitivity na alergen. IgE je rovněž zapojeno do pozdní fáze alergické odpovědi. Pozdní fáze alergické odpovědi vede k alergickému zánětu dýchacích cest a hyperreaktivě na specifické (alergen) a nespecifické (irritanty) podněty.

Atopie je provázána přítomností IgE specifických na obvyklé alergeny nebo pozitivním skin prick testem a je asociována s rozvojem astmatu nebo alergické rýmy. Epidemiologická sledování podporující roli celkového IgE u astmatu a rýmy zahrnuje korelaci zvýšených sérových hladin IgE se subjektivním hodnocením symptomů astmatu a hyperreaktivitu dýchacích cest.

Vysoké hladiny IgE nemusejí být asociovány pouze s atopií. In vitro studie naznačují, že specifické IgE je určující pro odpověď na alergen, ale neovlivňuje nespecifickou bronchiální odpověď, která je více svázána s celkovým IgE. Dokonce neatopičtí astmatici, mající vyšší hladiny celkového IgE, ve srovnání s neatopickými a neastmatickými jedinci, vykazují zvýšenou lokální produkci IgE v dýchacích cestách. Poslední studie naznačují, že u neatopických jedinců je astma nebo alergická rýma častější, jsou-li u nich hladiny celkového sérového IgE vysoké.

#### Důkazy proti

Někteří autoři nejsou schopni najít spojitost mezi celkovým a specifickým IgE a typem alergické odpovědi která následuje po inhalaci alergenu, a předpokládají, že role non-IgE (T-buňkami řízená) procesů může být důležitá, především u pozdní alergické odpovědi. Recentní metaanalýzy naznačují, že méně jak 40 % populace s odpovídajícím rizikem rozvoje astmatu je možno počítat mezi atopiky. Mimo to, v africké populaci byly pozorovány vyšší hladiny IgE u neastmatických pacientů než u astmatiků.

### 1.3 Syntéza IgE

Hladina sérového IgE velmi dobře koreluje s alergickým onemocněním dýchacích cest. Genetické analýzy v rodinách alergiků ukázaly na bronchiální hyperreaktivitu odpovídající sérové hladině IgE. IgE se odlišuje od ostatních imunoglobulinů velmi nízkou plazmatickou koncentrací a možností zvýšit svou hladinu více jak stokrát. Kontrolou sérových hladin IgE můžeme předejít potencionálně letálnímu účinku zánětu vyvolanému působením IgE.

V regulaci IgE odpovědi hrají úlohu pomocné T-lymfocyty, genetické faktory, působení antigenu a interleukiny.

V roce 1986 popsali u myši Mossman a spol., že Th 4 buněčné linie mohou vytvářet dva ozdílne subsety definované cytokinovým profilem. T-lymfocytární subsety byly označeny jako Th1 a Th2. V nedávné době byl popsán další subret pomocných T-lymfocytů, Th17 buňky.

Buňky Th1 produkují především interleukin 2 (IL-2), IL-12, interferon gama, TNF- $\beta$  a GM-CSF. Buňky Th2 produkují IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 a IL-13. Oba subsety produkují dále IL-3, IL-6, granulocyty a monocyty kolonie stimulující faktor (GM-CSF) a TNF- $\alpha$ .

Funkce Th1 a Th2 buněk odpovídá odlišnému spektru produkovaných cytokinů. Cytokiny produkované Th1 buněk aktivují cytotoxické a zánětlivé funkce a hrají roli v imunitních reakcích zprostředkovaných buňkami, zatímco cytokiny produkované Th2 buňkami podporují produkci protilátek, především pak IgE odpověď. IL-4 hraje zásadní roli při produkci IgE B-lymfocyty.

Produkce IgE vyžaduje nejméně dva odlišné signály. Tím prvním signálem je působení IL-4 a IL-13. IL-4 je produkován B-lymfocyty, ačkoli mastocyty, bazofily a eozinofily mohou IL-4 produkovat. IL-13 je produkován Th2 lymfocyty. Druhý signálem je dodán spoluprací CD40L na povrchu T-lymfocytů s CD40, kostimulační molekulou na membráně B-lymfocytu.

Syntéze IgE protilátek, stejně jako syntéza dalších protilátkových izotopů jiných než IgM, vyžaduje významnou změnu na úrovni transkripce exonů kontrolujících syntézu jednotlivých izotopů těžkých řetězců. Tato změna zahrnuje přepojení transkripce z exonu kontroujícího syntézu IgM na genovou oblast kódující příslušný izotop těžkého řetězce jiné třídy než třídy IgM. Cytokiny sekretované buněčným subtypem Th-2 poskytují základní pomocné funkce pro přepojení (switch) syntézy těžkých řetězců na těžké řetězce IgG-1 a IgE.

Klíčovými mediátory pro indukci syntézy těžkých řetězců IgE a nastartování syntézy těchto protilátek jsou cytokiny IL-4 a IL-13. Současná představa o mechanismu indukce syntézy těžkých řetězců IgE reflektuje poznatky o buněčných subpopulacích pomocných lymfocytů a využívá poznatků získaných při studiu INF- $\alpha$ .

Obsazení receptorového místa cytokinem IL-4 vede k oligomeraci receptorových proteinů za vzniku homo nebo heterodimerů. Oligomerizace receptorových proteinů rezultuje v aktivaci transfosforylace mezi tzv. Janusovými kinázami, které jsou asociovány s cytoplazmatickým koncem receptorové struktury. Receptorová transdukcce signálu je zakončena aktivací cytoplazmatických proteinů, které přenášejí signál až na úroveň transkripce. Jejich označení STAT – signální transduktory a aktivátory transkripce je proto přiléhavé. Aktivátory transkripce

penetrují do jádra a interagují se specifickými sekvencemi v promotorové oblasti genů obsahujících tyto specifické vazebné sekvence. Výsledkem je aktivace transkripce příslušného exonu s následnou syntézou cílového proteinu. STAT faktorů bylo popsáno několik (zatím sedm). Pro transdukční signalizaci prostřednictvím IL-4 nebo IL-13 je specifický STAT-6 (Kelly-Welch et al. 2003, Kaplan et al. 1996). Tento protein byl purifikován a klonován, což umožnilo jeho další studium. Bylo zjištěno, že jde o polypeptid s molekulovou hmotností 100 kD. Jeho akční aktivita je vázána na dimerické uspořádání. Homodimer je transdukován do jádra, kde se selektivně váže na sekvence TTC nebo CAA. Tyto sekvence nereagují s jinými STAT. Uvedené vazebné sekvence jsou obsaženy v promotorové oblasti genu kontrolujícího syntézu těžkého řetězce IgE. Dokladů pro potvrzení popsaného mechanismu stále přibývá. Jedním z nejmarkantnějších je zjištění, že myši deficitní v syntéze STAT-6 nejsou schopny produkce IgE protilátek po indukci parazitárními antigeny (Jankovic et al. 2000, Campbell et al. 1998).

STAT-6 participuje na Th-2 diferenciaci také zvýšením exprese hlavního regulátoru Th-2 diferenciaci – GATA-3 (Zheng and Flavell 1997). STAT-6 a GATA-3 spolu s IL-2 zprostředkovanou aktivací STAT-5 indukují sekreci vysokého množství IL-4, IL-5 a IL-13 aktivovanými Th-2 buňkami (Zhu et al. 2003).

Signalizace prostřednictvím IL-4 je dostatečná pro iniciaci transkripce exonu těžkého řetězce. Pro syntézu celé protilátky, včetně variabilní oblasti, je nicméně vyžadován další signál, který se do B lymfocytu dostává prostřednictvím interakce molekul CD-40 a CD-154. Předpokládá se, že úloha tohoto signálu je komplexní a ovlivňuje jak vlastní DNA rekombinaci, tak i optimalizaci syntézy komplexní protilátky.

Existují i další faktory, které se uplatňují v regulaci IgE hladiny. Například CD23, nízkofinální receptor, hraje pravděpodobně roli v negativní regulaci syntézy IgE. Obdobně interferon gama hraje negativní roli v syntéze IgE efektivní inhibicí v přesmyku tříd směrem na IgE.

## 1.4 Receptory pro IgE

IgE jsou cytofilní protilátky. Z cirkulace jsou vychytávány na povrchy kompetentních buněk prostřednictvím receptorů pro Fc fragment IgE protilátky. Na buněčných membránách jsou popisovány dva typy receptorů pro Fc fragmenty IgE – vysokoafinitní receptor FcεRI (bez CD označení) a nízkoafinitní IgE receptor FcεRII (s CD označením 23). Vysokoafinitní receptor je exprimován na mastocytech a bazofilních buňkách, jeho exprese byla popsána také na dendritických buňkách a Langerhansových buňkách kůže. Nízkoafinitní receptory FcεRII jsou exprimovány na monocytech a B buňkách.

IgE protilátky jsou na povrchy buněk vychytávány tak, že se svým Fc fragmentem zakotví do Fcε-receptoru. Při přemostění zakotvených protilátek prostřednictvím multivalentního alergenu je do nitra buňky transdukován signál vedoucí u mastocytů a bazofilů k degranulaci vnitřních struktur a ke spuštění alergické reakce. Četnost receptorů FcεRI je u mastocytů a bazofilů regulována hladinou cirkulujících IgE protilátek. Pokles cirkulujícího IgE vede k poklesu exprimovaných receptorů. Této úměrnosti může být využito terapeuticky. Humanizované anti-IgE protilátky aplikované atopickým jedincům snižují četnost exprimovaných FcεRI na površích cirkulujících bazofilů a mastocytů dostupných v kožních biopsiích, nebo získaných z bronchiálních laváží. Tím je snížena reaktivita těchto buněk.

Fc receptory obecně představují skupinu (family) molekul, které se vážou k Fc části imunoglobulinové molekuly. Každý Fc receptor rozpoznává jediný izotyp nebo skupinu blízké příbuzných izotypů. Různé Fc receptory mají rozdílný počet základních řetězců.

Receptor FcεRI sestává ze tří řetězců. Každý z nich má charakteri imunoglobulinové molekuly. A-řetězec je rozpoznávací částí receptorové struktury. K izotopu se IgE váže dvěma extracelulárními doménami. Následuje transmembránový segment a krátký úsek intracelulární. B-(beta)-řetězec je alternující součástí receptoru. Je přítomen v receptorech u mastocytů a bazofilů, nebyl však nalezen u Fc receptorů na dendritických buňkách a Langerhansových buňkách. Beta-řetězci je připisována role v procesu signální transakce. Obsahuje doménu ITAM (imunotyrosin aktivující motiv). Gama podjednotky jsou u FcεRII receptoru dvě a jsou

spojeny disulfidickou vazbou. Prakticky celá gama podjednotka je tvořena tandemově uspořádanými ITAM doménami. Předpokládá se, že gama podjednotka zajišťuje masivní fosforylaci při signální transdukci po agregaci Fc receptorů alergenem.

Aktivita IgE závisí na jejich schopnosti vázat se na specifický receptor na Fc fragmentu těžkého řetězce. Jsou známy dvě třídy Fcε receptorů, označovaných jako FcεRI (vysoceafinní receptor) a FcεRII (nebo CD23, nízkoafinní receptor).

### **Vysoceafinní receptor FcεRI**

Je hlavně exprimován na mastocytech, bazofilech a antigen-prezentujících buňkách (APC buňky), ne však na jejich cirkulujících prekurzorech. Vysoká afinita těchto receptorů umožňuje vazbu IgE protilátek navzdory jejich nízké sérové koncentraci. Při přemostění dvou sousedních (na FcεRI receptory navázaných) IgE protilátek alergenem, dochází k rychlé fosforylaci tyroxinu, která zahajuje proces degranulace mastocytů.

Receptorový komplex FcεRI se skládá z podjednotky alfa, která váže Fc část molekuly IgE, a řetězců beta a gamma, které zajišťují spojení s intracelulárními signalizačními molekulami. Tento receptor je exprimován i na mikrofázích a dendritických buňkách. Na ně se mohou vázat antigeny v komplexu s IgE. Stimulace Fc receptoru vede ke zvýšené antigenní prezentaci, zvýšené sekreci metabolitů kyseliny arachidonové, lyzozomálních enzymů, kyslíkových radikálů i prozánětlivých cytokinů. V případě parazitárních infekcí se tím potencuje antiparazitární imunita, ale při alergické reakci se tímto mechanismem amplifikuje a udržuje alergický zánět v místech expozice alergenu.

### **Nízkoafinní receptor FcεRII (dříve též CD23)**

Při alergenem zprostředkovaném přemostění IgE protilátek vázaných na FcεRII receptory dochází k aktivaci B-lymfocytů, eozinofilů a alveolárních makrofágů. Blokáda tohoto receptoru monoklonální protilátkou vede k poklesu sekrece IgE protilátek B-lymfocyty. CD23 zjevně hraje roli v obou cestách regulace syntézy IgE, ve smyslu jak zvýšené tak snížené syntézy. Atopičtí jedinci mají vyšší hladinu CD23 na svých lymfocytech a makrofázích. CD23-IgE interakce představuje

důležitý mechanismus, kterým alergen-specifické IgE mohou zvýšit buněčnou a humorální imunitní odpověď při opakované alergenové expozici.

FcεRII je jediný známý Fc receptor, který patří do C-lektinové strukturní rodiny, ne do imunoglobulinové.

Vazba IgE, resp. imunokomplexů obsahujících IgE, na FcεRII vyvolává signály potlačující produkci protilátek třídy IgE. Rozpustná forma FcεRII (CD 23) vznikající proteolytickým odštěpováním z membránové formy naopak stimuluje B lymfocyty. CD 23 působí také jako adhezivní molekula.

Alergenem zprostředkované přemostění vázaných IgE protilátek na svém vysoceafinním FcεRI receptoru na povrchu mastocytů a bazofilů vede k degranulaci těchto buněk a uvolnění mediátorů zánětu. Primárně uvolněné mediátory, např. histamin, proteázy, eozinofilní a neutrofilní chemotaktické faktory a heparin, vedou ke klinické manifestaci časně fáze alergické reakce. Sekundární mediátory, včetně destičky-aktivujícího faktoru, cytokinů, leukotrienů, prostaglandinů a bradykininů, vedou k pozdní fázi alergické reakce. Uvolnění těchto mediátorů a jejich působení v různých orgánech a tkáních vede k odlišné klinické manifestaci.

## 1.4 Role genetických faktorů

Dědičnost alergických chorob je polygenní, multifaktoriální. V klinickém fenotypu se tudíž uplatňuje vliv několik genů nebo jejich skupin spolu s negenetickými faktory (např. vliv prostředí).

U alergických stavů se předpokládá existence více typů genetické heterogenity. Různé skupiny genů mohou být spojeny s různou expresí IgE, intenzitou zánětlivé odpovědi nebo klinickou manifestací. Vzhledem k této heterogenitě nelze přesně stanovit typ dědičnosti. Pro některé geny se však udává přenos autozomálně recesivní. Proto také není možná genetická predikce alergie u vyvíjejícího se plodu.

V současné době je známa, nebo alespoň se předpokládá, existence několika oblastí na 5., 6., 7., 11, 12, 13. 14. 16. 17. a 19. chromozomu, které jsou zodpovědné za přenos genetické informace pro navození určitého typu imunitní odpovědi, jejímž



výsledkem je vznik alergických projevů. Můžeme tak vytvořit následující skupiny genů kodujících expresi atopického fenotypu:

Byly popsány geny kódující generalizovanou hyper-IgE odpověď ovlivňující schopnost zvýšené produkce celkového IgE. Do této skupiny patří geny pro cytokiny a receptory Th2.

Geny kódující specifickou IgE odpověď, jako např. geny pro HLA nebo T-buněčný receptor.

Geny kódující expresi klinických projevů, tj. orgánové postižení a stupeň zánětlivé odpovědi. Radíme se geny pro mediátory, chemokiny, prozánětlivé cytokiny nebo transkripční faktory.

Geny kódující cytokiny. Tento defekt u lidí zatím identifikován nebyl, ale u experimentálních zvířat může deficit nebo nadbytek určitého cytokinu imunopatologické onemocnění vyvolat. Velmi pravděpodobně dojde k poruše regulace Th1-Th2. V souvislosti s atopií je uváděn polymorfismus IL-4, IL-12 a jejich receptorů jako jedna z genetických příčin.

## **1.5 Role antigenu**

Biochemické vlastnosti antigenu mají signifikantní vliv na směr imunitní odpovědi (Th1 nebo Th2). Alergeny zahrnující produkty některých infekčních organismů vedou k převaze Th2 odpovědi a zvýšení sérových hladin IgE. Mnohé alergeny jsou enzymaticky aktivní. IgE odpověď je závislá také na dávce antigenu. Průnik antigenu sliznicí již v malých dávkách velmi efektivně indukuje Th2 odpověď, vedoucí ke tvorbě IgE protilátek. Cesta podání alergenu významně ovlivňuje IgE odpověď. Prostup antigenů sliznicí respiračního traktu je vysoce imunogenní na rozdíl od vstupu antigenů jinými cestami.

## **1.6. Alergický zánět**

Histopatologickým korelátem alergických onemocnění je eozinofilní zánět, obvykle chronický, u něhož v zánětlivé celulizaci převažují eozinofily, mastocyty ,T

lymfocyty, dendritické buňky a neutrofilů. Zánětlivá reakce je spouštěna, pokud antigen, na nějž je organismus senzitivní, pronikne mechanickými povrchovými bariérami a interaguje s protilátkami IgE navázanými na buněčné afinitní nebo vysoceafinitní receptory pro Fc/IgE. Výsledkem je cytologická degranulace zejména žírných buněk s extracelulární produkcí vasoaktivních mediátorů. Paralelně jsou uvolněny lipidové mediátory vznikající štěpením membránových fosfolipidů aktivitou fosfolipázy A. Dominantními mediátory tohoto typu jsou prostaglandiny a leukotrieny. Patofyziologickým důsledkem je mohutná vazodilatace a edém jako projev cévní permeability.

Na buňkách cévního endotelu jsou exprimovány adheziny např. ICAM -1 nebo VCAM-1 , které zachycují buňky zánětu. Na zánětlivých buňkách, včetně eozinofilů, jsou naproti tomu exprimovány některé integrity. Tak je zajištěna integrace zánětlivých buněk do cévní stěny a posléze jejich transdukce do místa zánětu.

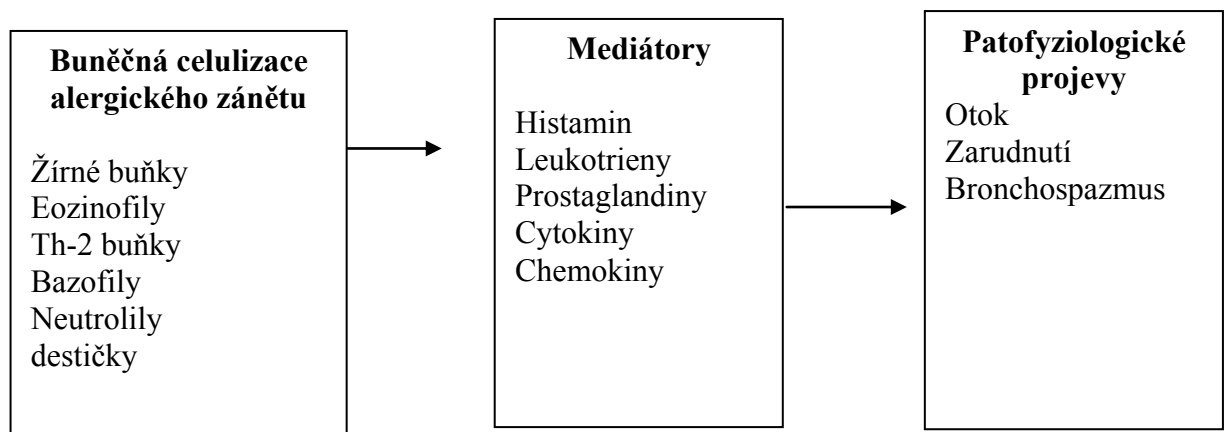
Ke vzniku alergického zánětu je nutná souhra a vzájemné působení buněk zánětu a chemických mediátorů. První expozice alergenu vede k senzitivizaci a produkci specifických IgE protilátek. V průběhu následné expozice je alergická reakce iniciována IgE protilátkami a řízena T-lymfocyty. Dominantními buňkami v zánětlivé celulizaci alergického zánětu jsou mastocyty a eozinofily. Alergický zánět byl intenzivně studován na zvířecích i lidských modelech.

### **Mastocyty**

Mastocyty představují významnou skupinu buněk, které jsou odpovědné jak za přirozenou tak získanou imunitu. Paul Ehrlich popsal v roce 1878 ve své disertační práci mastocyty jako granulární buňky naslézané v pojivových tkáních barvitelné anilínovými barvivy. Dnes víme, že jde o buňky, které funkčně diferencují z pluripotentních CD34+ kmenových buněk krvetvorby, které nacházíme v blízkosti cév, nervů a především v místech, kde přichází organismus do kontaktu s vnějšími podněty, jako je prostor mezi epitelovým povrchem a parenchymem kůže, střeva a respiračního traktu. Mastocyty patří k dlouho žijícím buňkám, na jejichž povrchu jsou lokalizovány četné receptory vztahující se k jejich imunobiologickým funkcím. Z pohledu zánětlivé reakce jsou to zejména vysokoafinní receptory FcεRI (viz výše). Mastocyty lokalizované v kůži nesou na svém povrchu ve velké hustotě také receptory

FcεRII (céž CD32) pro Fc fragment IgG protilátek, které se však neexprimují na povrchu mastocytů lokalizovaných v plicích.

Funkčně hrají mastocyty klíčovou roli v symptomatologii alergických onemocnění spojených s IgE. Jsou významné v iniciaci některých alergických hypereaktivit, např. akutní bronchokonstrikce jako odpověď na alergen, stejně tak iniciují hypereaktivní reakce u rinokonjunktivitidy po expozici alergenem. V cytoplazmě mastocytů se nacházejí četná granula, jejichž obsah se po stimulaci uvolňuje do extracelulárního prostoru. Tyto sekrety jsou buď preformovány a uloženy v granulích (histamin, proteoglykany, heparin) nebo jsou po podnětu syntetizovány de novo (LTC<sub>4</sub>, PDG<sub>2</sub>, PAF). Mastocyty produkují také celou řadu cytokinů (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, TNFα a další), které se uplatňují v časně fázi zánětlivé reakce.



### **Eozinofilní leukocyty**

Krevní a tkáňové eozinofily jsou derivovány z kmenových buněk kostní dřeně, konkrétně z myelocytových progenitorů. Eozinofily představují přibližně tři procenta všech buněk derivovaných z kostní dřeně. Asi 37 % těchto buněk plně diferencuje, zatímco zbytek zůstává na úrovni promyelocytů. Životní poločas eozinofilů je přibližně 18 hodin. Produkce eozinofilů z kostní dřeně je ovlivňována řadou

mediátorů, především IL-3, IL-5 a GM-CSF. Tyto tři cytokiny jsou produkovány také CD-4 buňkami i CD-8 lymfocyty v periferní krvi, zejména však v místěš lergického zánětu. Eozinofily migrují do místa alergického zánětu skrze vaskulární endotel obvykle na úrovni postkapilárních venul. Každý z těchto kroků je kontrolován komplexní sítí chemotaktických faktorů a expresí adhezivních molekul, které dohromady ovlivňují transport eozinofilů do tkání. Eozinofilní zánětlivá celulizace byla popsána především ve vztahu k parazitárním infekcím. V sedmdesátých letech bylo potvrzeno, že eozinofily hrají při parazitární infekci imunoprotektivní roli. Význam eozinofilie a infiltrace zánětlivé tkáně při alergických onemocněních zůstává stále méně srozumitelná a pro některé autory dokonce kontroverzní.

Ústřední roli v budoucí orientaci adaptivní imunitní odpovědi u savců hrají pomocné T buňky (Th buňky). Jak již bylo uvedeno výše, známe několik efektorových podskupin těchto buněk, jako jsou Th1, Th2, Th17, Th22. Samostatnou postavou pak mají Treg buňky. Každá z těchto subsetů Th buněk hraje spolu s Treg buňkami specifickou roli v obraně před patogeny a v regulaci imunitní odpovědi.

Vznik Th1, Th2, Th17 a Th 22 buněk z naivních T buněk je závislý na prezentaci antigenu prostřednictvím antigen prezentujících buněk, ko-stimulaci a na specifickém cytokinovém prostředí. Pro diferenciaci Th1 buněk je důležitý interleukin IL-12. Aktivaci naivních T buněk směrem k Th2 řídí interleukin IL-4. Vývoj Th17 buněk je indukován cytokiny TGF $\beta$ , IL-6 a IL1 $\beta$  (Locksley 2009). Pro udržení Th17 buněk je pak velmi významný IL-23 (Langris et al. 2005, Weaver et al. 2006 a McGreachy & Cua 2008).

Buňky Th1 produkují především interleukin 2 (IL-2), IL-12, interferon gama, TNF- $\beta$  a GM-CSF. Cytokiny produkované Th1 buněk aktivují cytotoxické a zánětlivé funkce a hrají roli v imunitních reakcích zprostředkovaných buňkami

Když antigen vstupuje do organismu slizničními povrchy nebo kůží, antigenprezentující buňky (např. dendritické buňky) antigen pohltní. Antigen je následně předložen naivnímu Th0 lymfocytu. V prostředí IL-4 dochází k diferenciaci směrem k Th2 lymfocytu. Buňky Th2 produkují zejména IL-4, IL-5 a IL-13. dále pak byla prokázána produkce IL-6, IL-9 a IL-10 (Zhu & Paul 2008).

Tyto cytokiny způsobují proliferaci a přesmyk směrem k produkci IgE B-lymfocyty a plazmatickými buňkami.

Vznik alergen specifických IgE protilátek probíhá v B lymfocytech procesem přeskupování genových segmentů a tzv. izotypovým přepnutím, při kterém dochází k dalšímu přeskupování genových segmentů po rozpoznání antigenu. Izotypové přepnutí je odpovědné za produkci protilátek různých tříd se stejnou strukturou variabilního řetězce pro vazbu antigenu. Tyto variabilní oblasti molekul IgE protilátek jsou kódovány oblastmi, označovanými jako V, D a J. Konstantní části řetězce IgE protilátek jsou pak kódovány genovými sekvencemi, označovanými jako C. Z genové oblasti V a J jsou kódovány aminokyseliny lehkých řetězců protilátek. Z genové oblasti V je kódováno přibližně 95 – 101 aminokyselin variabilní oblasti a dalších asi 13 aminokyselin je kódováno z genové oblasti J. Z genové oblasti D jsou kódovány variabilní oblasti těžkých řetězců IgE protilátek. Genové oblasti V, J, D a C se nacházejí na 2., 14. a 22. chromozomu (Krejsek & Kopecký 2004).

K úpravě vazebného místa IgE protilátek pro rozpoznání antigenu dochází v periferních lymfatických orgánech. Pro tuto úpravu, označovanou jako somatická hypermutace, je nezbytná kooperace B a T lymfocytů. Podstatou somatické hypermutace jsou četné bodové mutace v přeskupených genových segmentech V, které vedou ke zvýšení afinity syntetizovaných protilátek pro daný antigen (Krejsek & Kopecký 2004).

Je obecně známo, že v průběhu protilátkové odpovědi na antigenní podnět, jsou nejdříve produkovány IgM protilátky. Pro izotypové přepnutí, které vede k terminální diferenciaci B lymfocytu vedoucí k syntéze IgE protilátek, je významné cytokinové prostředí vytvářené Th2 lymfocyty. Významným signálem pro izotypové přepnutí představují Th2 lymfocyty produkované interleukiny IL-4 a IL-13. IL-13 je produkován také mastocyty. Oba tyto interleukiny aktivují v B lymfocytech proskripční faktor STAT-6, který iniciuje transkripci segmentů I $\epsilon$ , S $\epsilon$  a C $\epsilon$  těžkých řetězců  $\epsilon$ . Pro finalizaci celého procesu je nezbytná také interakce molekuly CD40 a CD40L na povrchu aktivovaných T lymfocytů. Tato interakce vede k aktivaci nitrobuněčných proteinů ze skupiny TRAF, konkrétně TRAF-2, TRAF-5 a TRAF-6. Proteiny TRAF aktivují transkripční faktor NF $\kappa$ B, který proniká do buněčného jádra, kdy působí synergicky s transkripčním faktorem STAT-6. Výsledkem působení obou

těchto transkripčních faktorů je dalece úseku molekuly DNA mezi oblastí S $\mu$  a S $\epsilon$ . Díky tomu se při transkripci a vzniku mRNA do blízkosti genových segmentů V, D a J dostává genová oblast C $\epsilon$ , což vede k syntéze těžkého řetězce molekuly IgE protilátky (Krejsek & Kopecký 2004).

Cirkulující IgE krevní cestou prostupuje do tkání, včetně sliznice dýchacích cest a kůže, kde se váže na vysoce afinní receptory Fc $\epsilon$ RI na povrchu mastocytů a nízko afinní receptory Fc $\epsilon$ RII na eozinofilech, makrofázích a krevních destičkách. Vazba IgE protilátky na specifické receptory na mastocytech vede k akutní zánětlivé odpovědi při následující expozici antigenu.

Po průniku alergenu epitelem nebo kůží senzitivovaného jedince pozorujeme časnou fázi odpovědi. Tato fáze je iniciována „přemostěním“ Fab fragmentů dvou sousedních IgE protilátek navázaných na povrchu mastocytu s následnou degranulací a uvolněním preformovaných mediátorů (histamin, heparin) a nově syntetizovaných mediátorů (prostaglandiny, leukotrieny, destičky aktivující faktor a bradykinin). Tyto mediátory vedou ke zvýšení cévního prokrvení, vazodilataci a zvýšené sekreci hlenu. Výsledkem je rozvoj edému a kongesce typické pro akutní fázi reakce. Histamin a některé leukotrieny jsou silnými bronchokonstriktory. Klinická manifestace těchto procesů je kašel a sípání, erytém, prosáknutí a svědění kůže, kýčání a vodnatá rýma (nos) a svědění a slzení (oči).

Mastocyty uvolňují cytokiny, IL-3, IL-4 a IL-5, granulocyty-makrofágy colony-stimulující faktor (GM-CSF) a TGF- $\alpha$ , který aktivuje T a B lymfocyty, stimuluje mastocyty a přitahuje eozinofily.

Th17 buňky produkují rovněž specifický cytokinový profil. Jde o IL17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (známý také jako IL-25 a IL-17F (Moseley et al. 2003). IL-17A a IL-17F jsou produkovány především relativně nově popisovanou supopulací CD4<sup>+</sup>T buněk (Th17 buňky). Fyziologické funkce těchto buněk a s nimi spojených cytokinů jsou v současné době předmětem intenzivní studia. V patofyziologických souvislostech jsou spojovány s patogenezi různých autoimunitních onemocnění, jako jsou roztroušená skleróza, revmatoidní artritida, autoimunitní encefalomyelitida a psoriáza (Ouyang et al 2008, Cua et al. 2003, Murphy et al. 2003, Zheng et al. 2007, McGeachy & Cua 2008, Korn et al. 2009). IL-17A a IL-17F jsou rovněž důležité pro

mobilizaci eozinofilů a hostitelskou odpověď proti extracelulárním bakteriím a houbám (Park et al. 2005).

Mobilizace a vstup neutrofilů do dýchacích cest bya pozorována také u pacientů s těžkým astmatem (Jatakanon et al. 1999, Louis et al. 2000). Dále bylo prokázáno, že IL-17 je produkován v dýchacích cestách pacientů s astmatem (Molet et al. 2001) a jeho exprese souvisí s tíží astmatu (Chakir et al. 2003, Li et al. 2010). Pokusy prováděné na myších modelech naznačily, že IL-17A a IL-17F indukují v dýchacích cestách antigenem indukovanou neutrofilní infiltraci (Hellings et al. 2003, Oda et al. 2005).

Iwakura et al. (2008) prokázali, že IL-17A rovněž stimuluje bronchiální fibroblasty, epitelální buňky a buňky hladké svaloviny a indukuje expresi různých cytokinů a chemokinů, které jsou významné pro granulopoézu a neutrofilní rekrutment. Schopnost IL-17A navozovat neutrofilní rekrutment vystupuje do popředí zejména u těžkého astmatu, pro které je neutrofilní infiltrace jedním z typických rysů (Molet et al. 2001, Jatakanon et al. 1999, Louis et al. 2000). Th17 buňkami zprostředkovaný zánět je rezistentní ke kortikosteroidům (McKinley et al. 2008).

Pro činnost Th17 buněk je významné působení interleukinu 23 (IL-23). Jde o heterodimerický interleukin, který se skládá z podjednotky p19, která je specifická pro IL-23, a podjednotky p40, která je typická pro IL-12 (Oppmann et al. 2000).

Wakashin et al. (2008) prokázali, že IL-23 mRNA je exprimována v plicích senzitivovaných myší při inhalaci antigenu a neutralizace IL-23 zmírňuje antigenem indukovaný rekrutment eozinofilů a produkci cytokinů Th2 buňkami. Je tedy vysoce pravděpodobné, že IL-23 posiluje antigenem indukovanou aktivaci Th2 buněk v průběhu ejektorové fáze alergického zánětu dýchacích cest a tím zvyšuje Th2 buňkami zprostředkovaný rekrutment eozinofilů a Th17 mediovaný rekrutment neutrofilů do dýchacích cest. Je tedy zřejmé, že osa IL-23-Th17 zasahuje do regulace alergického zánětu dýchacích cest, ve kterém hrají kritickou roli Th2 buňky.

Do vývoje IgE zprostředkovaných alergických reakcí se může zapojovat také interleukin 1 (IL-1), který posiluje IgE zprostředkovanou aktivaci mastocytů (Stasse et al. 2000, Hültner et al. 2000, Kandere-Grzybowska et al. 2003, Lee et al. 2004, Ho et al. 2007, Iikura et al. 2007). IL-1 je produkován alveolárními makrofágy (Oghiso &

Kubota 1986, Becker et al. 1989) a indukuje produkci prozánětlivých mediátorů INF, IL-6 a IL-8, indukuje adhezi molekul v buňkách hladké svaloviny dýchacích cest, v epitelálních a endotelálních buňkách. U pacientů s astmatem byla prokázána spojitost mezi stupněm náchylnosti k onemocnění a polymorfizmem v IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-1Ra (Karjalainen et al. 2002a, Karjalainen et al. 2002b, Adjers et al. 2004, Zeyrek et al. 2008).

Podobná závislost byla zaznamenána rovněž u pacientů s alergickou rhinitidou (Joki-Erkkila et al. 2003). IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$  jsou produkovány u pacientů s alergickou rýmou nasálními epitelálními buňkami (Kenney et al. 1994) jako odpověď na vystavení působení alergenu (Gosset et al. 1993, Sim et al. 1994). IL-1 může zvyšovat produkci vaskulárního endotelálního faktoru (VEGF), který se zapojuje do angiogeneze posílením růstu cévních endotelálních buněk a lidských fibroblastů spojivky (Asano-Kato et al. 2005). IL-1 tedy zasahuje do patogeneze alergické rhinitidy a konjunktivitidy (Nambu & Nakae 2010).

Interleukin 6 (IL-6), dlouho považovaný za jeden z prozánětlivých faktorů, je produkován nejen aktivovanými makrofágy dýchacích cest, ale rovněž epitelálními buňkami (Cromwell et al. 1992, King et al. 1998). Produkce IL-6 plicními epitelálními buňkami je u astmatických pacientů vyšší ve srovnání se zdravými pacienty (Marini et al. 1992, Kicic et al. 2006). Recentní studie naznačují, že IL-6 hraje důležitou úlohu v určení typu adaptivní imunitní odpovědi, primárně pak v diferenciaci efektoru CD4<sup>+</sup> T buněk (Dienz & Rincon 2009). Podle Pasare & medzhitova (2003) a Neveua (2010) může IL-6 ovlivňovat také regulaci intenzity imunitní odpovědi inhibicí vývoje T regulačních buněk a tím významně zasahovat do patofyziologie astmatu. Tomu napovídají také výsledky studií Quiho et al. (2004), Kuhna et al. (2000), Deho et al. (1995) a Ammita et al. (2007), podle nichž IL-6 podporuje zesilování stěn dýchacích cest, subepitelální fibrózy, hypertrofii a proliferaci hladké svaloviny.



## 1.7 Regulace činnosti efektorových buněk imunitního systému

T regulační buňky (Treg), které představují unikátní subpopulaci T lymfocytů, hrají zásadní roli v řízení funkčních projevů efektorových buněk imunitního systému. Regulace efektorové funkce T lymfocytů v periférii je zprostředkována převážně  $CD4^+CD25^{hi}FOXP3^+$  Treg lymfocyty (Sakaguchi et al. 1995, Hori et al. 2003, Fontenot et al. 2003, Khattri et al. 2003, Kaspruwicz et al. 2003, Bloustone & Abbas 2003, Ziegler 2006, Zheng & Rudensky 2007, Sakaguchi et al. 2008, Shevach 2009, Josefowicz & Rudensky 2009, Workman et al. 2009, Bettini & Vignali 2009), které způsobují potlačení efektorové funkce lymfocytů s cílem udržet imunitní toleranci k vlastním antigenům a zabránit příliš prudkým reakcím na cizí antigenní podněty.

Známý jsou dvě základní třídy Treg lymfocytů:

1. nTreg a iTreg lymfocyty. nTreg lymfocyty vznikají v thymu a jsou z něj uvolňovány do periferních tkání po thymus pozitivní selekci (Fujishima et al. 2005). nTreg rozpoznávají vlastní antigeny a potlačují efektorovou funkci patogenních autoreaktivních T buněk, které unikly negativní selekci a vstoupily do periferní tkáně (Fujishima et al. 2005, Hsieh et al. 2006, Nomura & Sakaguchi 2007).

2. iTreg buňky vznikají cestou periferní konverze (po antigen-specifické stimulaci) z dospělých, naivních  $CD4^+$  T buněk nebo ze „zachráněných“ autoreaktivních efektorových T buněk (Workman et al. 2009). Tyto regulační buňky můžeme rozlišit na dva podtypy -  $Foxp3^+$  a  $Foxp3^-$ .  $Foxp3^+$  iTreg buňky prodělávají diferenciaci z  $CD4^+CD25^-Foxp3^-$  T buněk po stimulaci TGF- $\beta$  (Yamagiwa et al. 2001).  $Foxp3^-$  je známa zejména in vitro a skládá se z Tr1 buněk, které produkují velké množství IL-10, a Tr3 buněk, které produkují velké množství TGF- $\beta$  (Umetsu et al. 2003).  $Foxp3$  patří mezi významné transkripční faktory (Zheng & Rudensky 2007, Josefowicz & Rudensky 2009) s helikální strukturou a rozvětvenou doménou, která je nezbytná pro navázání na DNA (Buckner & Ziegler 2008). Může působit transkripční aktivátor nebo represor, zasahuje do regulace transkripce cytokinových genů v efektorových a regulačních T lymfocytech.

Do exprese  $Foxp3$  zasahuje podle současných vědomostí 5 transkripčních faktorů. TIEG1 (známý též jako Klf 10), NFAT a SMAD3 řadíme mezi pozitivní regulátory transkripce  $Foxp3$  (Tone et al. 2008, Venupresad et al. 2008), GATA3

a STAT6 považujeme za negativní regulátory exprese Foxp3 (Mantel et al. 2007, Takaki et al., 2008).

V zásadě mohou Treg lymfocyty potlačovat efektorovou funkci ostatních T buněk třemi cestami. První supresivní mechanismus vyžaduje kontakt buněk a je zprostředkován molekulami navázanými na povrchové membrány, jakými jsou galectin1 nebo TGF- $\beta$  (Scheffold et al. 2007). Druhou cestou ovlivnění efektorových T buněk je produkce regulačních cytokinů, které inhibují funkci efektorů. Jako regulační cytokiny jsou známy IL-10, TGF- $\beta$  a IL-35 (Bettini & Vignali 2009). Třetí cesta regulační činnosti Treg lymfocytů vede přes spotřebu limitujících růstových faktorů, jako je IL-2 (Scheffold et al. 2007). V nedávné době bylo prokázáno, že schopnost Treg lymfocytů potlačovat Th2 efektorů závisí specificky na expresi transkripčního faktoru IRF4. Mechanismus této cesty regulace není doposud spolehlivě vysvětlena (Zheng et al. 2009).

## 1.8 Klinické koreláty alergického zánětu

Při časně fázi se z granul v žírných buňkách uvolní zánětlivé látky (histamin, prostaglandin 2, leukotrieny aj.). Tomu odpovídají také klinické příznaky, jako je svědění, otok, zvýšené prokrvení atp. Klinické příznaky časně fáze alergické zánětlivé odpovědi odeznívají po 30 minutách. Jsou následovány relativně asymptomatickým obdobím, v průběhu kterého cytokiny a mediátory vzniklé v průběhu časně fáze zprostředkovávají vstup leukocytů do tkání. IL-5 sekretovaný mastocyty, lymfocyty a eozinofily je nejdůležitějším cytokinem pro eozinofily. Mimo to IL-5 způsobuje jejich proliferaci a aktivaci. Další eozinofilické cytokiny jsou IL-3, GM-CSF a chemikiny. Při aktivaci uvolňují eozinofily mediátory, jako jsou eozinofilní kationický protein (ECP), MBP (major basic protein), leukotrieny a prostaglandiny. Jsou to další mediátory, které prohlubují zánět a zapříčiňují poškození epitelu. V pozdní fázi odpovědi se také zvyšuje počet neutrofilů, bazofilů a lymfocytů.

Pozdní fázi elergické odpovědi pozorujeme za 2 – 6 hodin později u 50 – 60 % pacientů s astmatem a alergickou rýmou a klinicky se manifestuje kongescí, zvýšenou produkcí hlenu a bronchokonstrikcí. Je zvýšená odpověď dýchacích cest na specifické

a nespecifické podněty, zřejmě jako výsledek působení na nervová zakončení v dýchacích cestách při poškození epitelu.

S pokračující nebo opakovanou expozicí alergenu dochází k rozvoji chronického zánětu, provázeného zvýšeným počtem aktivovaných Th2 lymfocytů, expresí mRNA pro sekreci IL-3, IL-4, IL-5 a GM-CSF. Tyto cytokiny jsou důležité pro pokračování zánětlivých změn a atrakci mastocytů a eozinofilů. Tyto buňky zapříčiňují další zvýšení hladiny histaminu, prostaglandinů a četných cytokinů. Podobně, aktivované eozinofily nacházející se ve sliznicích paralelně zvyšují uvolňování svých toxických produktů vedoucí k poškození epitelu. Další produkty eozinofilů, jako je transformující růstový faktor alfa a beta, zprostředkují lokální změny v tkáních a přispívají k remodelaci dýchacích cest. Zvýšená permeabilita a celulární infiltrace zapříčiňují otok sliznic. Další změnou je hyperplazie žláz se zvýšenou sekrecí. Celkově souhrn všech těchto změn a uvolněných mediátorů ústí v klinické symptomy astmatu a rýmy. Tyto procesy také vysvětlují hyperreaktivitu, kterou pozorujeme v horních a dolních dýchacích cestách.

## **1.9 Sezónní alergická rýma.**

Sezónní alergická rýma (SAR), známa rovněž jako polinóza nebo senná rýma, je vyvolána inhalací pylových zrn. Velikost většiny pylových zrn se pohybuje od 15 do 60  $\mu\text{m}$ , v některých případech až do 200  $\mu\text{m}$ . Pylové alergie vyvolávají převážně menší pylová zrna. Pylové alergeny vyvolávají u dříve senzitizedovaného jedince klinické symptomy po kontaktu se sliznicí dýchacích cest a spojivkového vaku. Prvním, kdo potvrdil spojení mezi pylem a polinózou byl Charles Blackley v roce 1873 (Knox 1979).

Typický pro pylovou alergii je její sezónní výskyt a příznaky, které pacienta provázejí po celé vegetační období rostliny, na kterou je pacient příčinně přecitlivělý. Mimo vegetační období rostliny, na kterou je příčinně přecitlivělý, pacient obvykle potíže nemá. . Senzitivace vyvolaná pylovými alergeny se může vyskytovat samostatně nebo může být asociována s dalšími celoročními alergeny, jakou jsou alergeny plísni (zejména venkovních plísni), roztočů a dalších živočichů. Pylová

alergie se však nemusí manifestovat typickými klinickými projevy a může být maskována jinými zánětlivými procesy vedoucími v jednotlivých případech k rozmanitým klinickým příznakům (Vieira 1995).

Alergický pacient může vytvářet protilátky proti alergenům, které jsou buď vlastní pouze pylu určité rostliny (příčinou jsou druhově specifické klíčové rozpoznávací látky) nebo jsou společné pro pyly příbuzných rostlinných druhů (příčinou jsou enzymy, uvolňované na počátku oplodnění, jejichž molekulární struktura je u příbuzných druhů, rodů nebo dokonce čeledí velmi podobná).

Klinický průběh sezonní alergické rýmy závisí na množství pylových zrn v ovzduší a na stupni senzibilizace pacienta.

Klinicky se polinóza manifestuje rinokonjunktivitidou a/nebo bronchiálním astmatem. U pacientů se objevuje oční pruritus s překrvením spojivkové sliznice, rýma, kýchání, svědění nosní a pharyngeální sliznice a obstrukce horních dýchacích cest s následnou jejich nedostatečností. Bronchiální hyperreaktivita a následné bronchiální astma se objevuje u 15 až 20 % pacientů. Překrvení a svědění sliznice spojivkového vaku jsou u polinózy téměř vždy přítomny, což umožňuje její diferenciální diagnostiku od běžného nachlazení. Pozorování sliznice dýchacích cest potvrdila její zánětlivé změny, včetně otoku sliznice a výrazná produkce hlenu, který obsahuje více jak 10 % eozinofilů (Vieira 1995). Doprovodnými příznaky jsou zvýšená únavnost, poruchy soustředění, bolesti hlavy, někdy i subfebrilie, předrážděnost, pokles výkonnosti, u dětí zhoršení prospěchu ve škole. Například v USA byly v roce 1996 přímé náklady spojené s alergickou rýmou 1,9 miliard dolarů (Reed et al., 2004). Podle Nashe et al. (2000) dosáhly škody v souvislosti s alergickou rýmou více jak 3 miliardy dolarů a další 4 miliardy dolarů si vyžádal léčba komorbidit spojených s alergickou rýmou.

Opakování klasických příznaků rinokonjunktivitidy spojené nebo nespojené s bronchiálním astmatem ve dvou nebo více letech po sobě jednoznačně hovoří pro diagnózu polinózy. Pro potvrzení této diagnózy je doporučováno provedení testu s extraktem obsahujícím pyl různých trav. Takový test umožňuje odhalení zkřížené reaktivity (Weber 2003).

Diagnostika polinózy probíhá ve spolupráci jak praktických lékařů, tak specialistů - především alergologa.

Základními kameny jsou anamnéza, kožní testy alergenem, laboratorní vyšetření, které zahrnuje i vyšetření specifických IgE protilátek.

Hlavními pylovými alergeny u nás jsou pyly jarních stromů a keřů, travin, plevelů. Jedním z hlavních zdrojů pylových alergenů jsou trávy z čeledi lipnicovitých (Poaceae) a to díky jejich celosvětovému rozšíření a schopnosti produkovat obrovská množství pylu (Freidhoff et al. 1986). Z hlediska pylových alergií jsou nejvýznamnějšími producenty pylových alergenů jílky vytrvalý (*Lolium perenne* L., 1758.), lipnice luční (*Poa pratensis* L., 1758), srha říznačka (*Dactylis glomerata* L., 1758), troskut prstnatý (*Cynodon dactylon* L., 1758) a bojínek luční (*Phleum pratense* L., 1758) (Davies et al. 2005, Weber 2003, Wutrich 1989). V podmínkách mírného klimatického pásma Severní Ameriky, Evropy, Asie a části Austrálie patří k nejvýznamnějším zdrojům pylových alergenů bojínek luční a jemu příbuzné druhy, jako je např. bojínek mnohokvětý (*Lolium multiflorum* L., 1758) (Freidhoff et al. 1986, Smart et al. 1979, Wüthrich et al. 1995).

Pylové alergeny trav mohou obsahovat společné epitopy. Zkřížená reaktivita a strukturální homologie umožnily klasifikaci alergenů do skupin v souladu s IUIS (International Union of Immunological Society – Allergen Nomenclature Subcommittee) (King et al. 1995). V současné době je popsáno 13 skupin pylových alergenů. Systém jejich označování je podrobně rozebrán v kapitole „Standardizace a nomenklatura alergenů“. Z nich jsou klinicky nejvýznamnější alergeny skupiny 1 a 5. Alergeny skupiny 1 jsou rozpoznávány přibližně 95 % pacientů vnímavých k pylovým alergenům, alergeny skupiny 5 jsou pak rozpoznávány až 85 % těchto pacientů (Weber 2003). Ostatní klinicky relevantní alergeny patří do skupiny 2, 3, 4 a 13, které jsou rozpoznávány více jak 50 % pacientů alergických na pyly (Fahlbusch et al. 1998).

Pyl jílky vytrvalého obsahuje nejméně 17 alergenů s molekulovou hmotností od 12 kDa do 89 kDa (Ford & Baldo 1986), které jsou klasifikovány na základě jejich elektroforetické pohyblivosti. Hlavní identifikované alergeny patří do skupiny 1, 2, 3 a 5 a vyskytují se v různých izoformách. Tyto proteiny byly purifikovány a analyzovány v různých detailech a některé z nich byly produkovány jako rekombinantní, *nun-fusin* alergeny. Mezi těmito, protein skupiny 2 (Lol p 2), ke kterému je citlivých kolem 45 % pacientů (Freidhoff et al. 1986), byl produkován

bakterií *Escherichia coli* ve vysokých výnosech (Sidoli et al. 1993, Tamborini et al. 1995) a tento vykazuje imunologické vlastnosti analogické přírodnímu alergenu.

Lol p 1 a Lol p 5, nejvíce klonované a sekvenované alergeny *L. perenne* ze skupiny 1 a 5 (Griffith et al. 1991, Ong et al. 1993, Singh et al. 1991), jsou lokalizovány na různých místech pylového zrna. Lol p 1 se nachází v cytoplazmě, v exině i intině a v kutikule prášniku (Singh et al. 1990, Staff et al. 1990, Vithanage et al. 1982). Lol p 5 je lokalizován v amyloplastech (Singh et al. 1991, Suphioglu et al. 1992, Taylor et al. 1994).

Dřívější studie ukázaly, že alergeny skupiny 1 obsahují glykosylované proteiny s relativní molekulovou hmotností od 28 do 35 kDa (Freidhoff et al. 1986), které jsou hlavními komponentami, na které se váží IgE protilátky (Marsch et al. 1966). Zvýšené hladiny IgE protilátek proti alergenům skupiny 1 bojíku vytrvalého byly nalezeny v séru 95 % pacientů alergických na pyl bojínku (Kahn & Marsch 1986). Později bylo prokázáno, že tato skupina obsahuje dva hlavní alergeny: Lol p 1 s molekulovou hmotností 35 kDa (Perez et al. 1990, Criffith et al. 1991), dříve označovanou jako Lol p 1a, a Lol p 5 s molekulovou hmotností 31 kDa (Ong et al. 1993), dříve označovaný jako Lol p1b (Singh et al. 1991 nebo Lol p 9 (Suphioglu et al. 1992). Lol p 5 byl, podobně jako Lol p 2, expresován v *E. coli* (fusion protein – smíšený protein) a jeho vlastnosti se jeví být podobné přirozenému alergenu (Ong et al. 1995).

Mnohé komponenty antigenů pylu trav jsou známy v různých izoformách, které mají stejnou molekulovou hmotnost. U Lol p 1 byly pomocí klonování cDNA a sekvenování rozpoznány 4 takové izoformy lišící se nejméně na osmi místech aminokyslinové sekvence (Perez et al. 1990, Griffith et al. 1991). U Lol p 5 známe dokonce 8 izoform (Smith et al. 1994).

U trav jsou izoformy alergenových proteinů rovnou měrou rozpoznávány IgE protilátkami pacienta, obzvláště mají-li stejnou molekulovou hmotnost bez ohledu na rozdílný izoelektrický bod (Ong et al. 1993, Singh et al. 1991), který může být ovlivněn posttranslačními nebo postranskripčními úpravami, jako např. glykosylace, hydroxylace a výskyt cyteinových zbytků.

Přírodní Lol p 1 je glykosylovaný protein s molekulovou hmotností 35 kDa obsahující intramolekulární disulfidický můstek (Singh et al. 1991, Johnson & March 1965). Oblast vážící IgE protilátky pokrývající 29 C-terminálních aminokyselin

alergenu byl identifikován omocí fragmentace proteinu (Esch & Klapper 1989a, b) a IgG protilátky působící na syntetický peptid stejné C-terminální oblasti inhibují Lol p 1 vyvolané uvolnění histaminu z bazofilů senzitizedovaných jedinců (van Ree & Aalberse 1995).

Polinóza je velmi významným rizikovým faktorem pro vznik bronchiálního astmatu, představuje významný společenský, sociální a ekonomický problém.

Možnosti, jak ovlivnit polinózu, jsou v zásadě následující postupy:

- režimová opatření a edukace pacienta
- specifická alergenová imunoterapie
- farmakoterapie

## **1.10 Specifická alergenová imunoterapie.**

Specifická alergenová imunoterapie (SIT) patří k celosvětově přijatým léčebným metodám. Její užívání a indikování je v různých zemích světa odlišné.

Základním principem je indikovat SIT pouze tam, kde je její užívání vhodné a kde lze jednoznačně očekávat její výrazný přínos, zamezit jejímu nadužívání v neindikovaných případech a stanovit jasná pravidla pro její bezpečné a efektivní využití.

### **1.10.1 Princip specifické alergenové imunoterapie**

Specifická alergenová imunoterapie (SIT) je efektivní profylaktický léčebný postup pro léčbu alergických onemocnění, při němž se do organismu alergika v pravidelných časových intervalech vpravují definované dávky terapeutického alergenu, na který je daný pacient přecitlivělý (Bousquet et al. 1998a,b, Malling 1998, Durham et al. 1999, Walker et al. 2001).

Cílem SIT je snížit reaktivitu organismu na konkrétní alergen zásahem do regulačního působení T-lymfocytů.

SIT není jen léčbou konkrétního alergického onemocnění, ale je léčbou podstaty imunopatologického procesu, tedy přecitlivělosti I.imunologického typu. U většiny pacientů je tato léčba kombinována s léčbou symptomatickou, tedy s účelnou a racionální farmakoterapií.

Terapeutický přínos SIT je individuální v závislosti na základní diagnóze, tíži a délce trvání onemocnění, celkovému stavu pacienta a dalším eventuálním komorbiditám, na druhu kauzálního alergenu, monovalentní nebo polyvalentní přecitlivělosti. Velmi významnou roli hraje i volba terapeutického alergenu a spolupráce pacient – lékař při jejím provádění.

Účinnost SIT byla jednoznačně prokázána při léčbě alergické rhinokonjunktivitidy, u některých forem bronchiálního astmatu s výraznou dominancí atopické složky a u pacientů s přecitlivělostí na jed blanokřídleho hmyzu. Metoda SIT při léčbě polinózy byla popsána už v r. 1911 Noonem a Freemanem a stala se léčbou první volby pro léčbu alergických onemocnění, zejména respiračního traktu (Cretison 1997).

Ortolani et al. (1984) vybrali z 200 pacientů s polinózou 15 astmatických pacientů citlivých na pyl. Studie byla provedena jako dvojitě zaslepená studie, ve které jedné skupině byla po dobu jednoho roku aplikována směs tří pylů trav (psineček, tomka vonná a bojínek) druhé skupině pak placebo. Po roce byl ve skupině ošetřené specifickou imunoterapií zjištěn pokles symptomskóre ve srovnání s placebem. Nebyl však pozorován vliv na hladinu specifických IgE protilátek proti bojínku. Vliv specifické alergenové imunoterapie na FEV1, jako jeden z možných ukazatelů plicních funkcí, nebyl v této studii prokázán.

Dolz et al. (1996) randomizovali třicet pacientů ve věku od 15 do 35 let s astmatem a/nebo alergickou rýmou způsobenou pylem trav do dvou skupin. Pacienti jedné skupiny byli ošetřováni po dobu tří po sobě jdoucích let extraktem pylových alergenů trav Alutar, pacientům druhé skupiny, kteří sloužili jako kontrolní skupina, byl aplikován histamin. Jako kritérium hodnocení účinnosti byl použit kožní test, konjunktivální provokační test, bronchiální provokační test, symptom skóre a medikační skóre. Ve všech uvedených parametrech autoři zaznamenali u léčené skupiny po třech letech léčby statisticky signifikantní zlepšení ve srovnání se stavem před započítím léčby. Rovněž mezi oběma sledovanými skupinami byl zjištěn



statisticky významný rozdíl ve všech sledovaných parametrech. Autoři této studie neprokázali vztah mezi klinickým zlepšením a hladinou IgE protilátek. Pouze v iniciační fázi léčby, kdy docházelo k postupnému zvyšování aplikované dávky alergenu, zaznamenali autoři mírné nežádoucí účinky, které byly v dalším průběhu léčby dobře kontrolovatelné. Výsledky předložené studie při použití vakcíny Phostal odpovídají v zásadě výsledkům získaným Dolzem et al. Rovněž v předložené studii došlo u sledovaných pacientů po třech letech specifické alergenové imunoterapie ke statisticky významnému zlepšení symptomskóre a k redukci nutné medikace.

Jutel et al (2005) provedli dvojité zaslepenou, placebem kontrolovanou studii účinnosti podávání vakcíny obsahující 5 rekombinantních alergenů trav (Phlp1, Phlp2, Phlp5a, Phlp5b a Phlp6) pacientům trpícím rhinokonjunktivitidou s nebo bez astmatu. Pacientům (n = 24) byla vakcína podávána subkutánně před započatím pylové sezóny ve zvyšující se dávce v sedmidenních intervalech. Počáteční aplikovaná dávka byla 0,02 µg celkového množství proteinu, následovala dávka 0,16 µg celkového množství proteinu a 0,40 µg celkového množství proteinu (0,8 ml). 25 pacientům bylo podáváno placebo. Primárním cílem bylo sledování klinické odezvy prostřednictvím symptom-medikace skóre. Ve srovnání s placebem došlo u skupiny pacientů ošetřených rekombinantní vakcínou k statisticky významnému zlepšení samotného symptom skóre a tomu odpovídajícímu snížení nutnosti medikace. U všech pacientů ošetřených rekombinantní vakcínou bylo zaznamenán silný nárůst specifické protilátkové odpovědi v třídách IgG1 a IgG4, která byla provázena poklesem specifických IgE protilátek a odpovídajícím nárůstem počtu regulačních Th lymfocytů produkujících interleukin IL-10.

Výrazné snížení počtu pacientů s alergickou rhinitidou léčených specifickou alergenovou terapií uvádějí také Reha & Ubru (2007). V této studii, ve které bylo SIT léčeno 13 pacientů s alergickou rhinitidou, nebyla u 10 pacientů (76,92 %) zaznamenána v průběhu léčby žádná následná senzitivace, která se naopak objevila 39,21 % pacientů (20 osob z 51) z kontrolní skupiny.

Eng et al. (2002) prokázali dlouhodobě přetrvávající účinek subkutánní imunoterapie u 28 dětí v prospektivní kontrolované follow-up studii.. První skupina (14 dětí) byla po dobu tří po sobě jdoucích let léčena specifickou alergenovou imunoterapií pomocí přípravku Alergovit depot., druhá skupina 14 dětí sloužila jako

kontrola. Děti obou skupin měly nejméně dva roky prokázanou těžkou sennou rýmu a IgE reaktivitu na sezónní alergen. U 13 dětí první skupiny a u 10 dětí kontrolní skupiny bylo 6 let po ukončení specifické imunoterapie provedena kontrola stavu onemocnění. U dětí ošetřených specifickou imunoterapií Eng et al. prokázali ve srovnání s kontrolní skupinou statisticky významně nižší četnost příznaků onemocnění a nižší nutnost léčby. Jako sekundární cíl byla sledována nová senzitivace. Osm let po ukončení specifické imunoterapie byla v této studii zjištěna nová senzitivace u 61 % dětí ve srovnání se 100 % dětí kontrolní skupiny. Příznivý vliv prodělané tříleté léčby specifickou alergenovou imunoterapií alergenem trav a břízy prokázali 6 let po skončení léčby také Mosbech & Østerballe (1988) a Jacobsen et al (1997).

Jacobsen et al. (2007) studovali klinický vliv a preventivní vliv subkutánní specifické imunoterapie u dětí se sezónní alergickou rhinokonjunktivitidou na riziko vzniku astmatu v průběhu léčby a 7 let po skončení léčby. Do studie zařadili celkem 205 pacientů ve věku 6 – 14 let. (při zařazení do studie), kteří byli randomizováni do dvou skupin. Pacienti první skupiny (n = 103) byli léčeni po dobu tří let standardizovaným travním alergenovým extraktem (*Phleum pratense*) a/nebo alergenem břízy (*Betula verrucosa*). Zbývající skupina 102 dětí tvořila kontrolu. Po deseti letech od započetí léčby byla provedena kontrola u celkem 147 pacientů ve věku 16 – 25 let (79 pacientů léčené skupiny, 68 pacientů kontrolní skupiny). Tato kontrola prokázala dlouhodobý příznivý vliv na symptomy rhinokonjunktivitidy a konjunktivální senzitivitu a preventivní vliv na rozvoj bronchiálního astmatu. Ve skupině pacientů léčených specifickou alergenovou terapií se astma 7 let po skončené léčbě rozvinulo u 16 osob, v kontrolní skupině u 24 osob.

Eng et al. (2006) prodloužili sledování publikované v roce 2002 (Eng et al. 2002) o dalších 6 let a ještě po 12 letech od ukončení specifické alergenové imunoterapie prokázali u léčených pacientů nižší symptom skóre, nižší potřebu užívání medikace a kombinované symptom-medikační skóre ve srovnání s kontrolní skupinou. Rovněž procento nových senzitivací bylo nižší u léčené skupiny (58 %) ve srovnání s kontrolní skupinou (100 %). Podobně jako Jacobsen et al. (2007) pozorovali Eng et al. (2006) ve skupině pacientů ošetřených standardní alergenovou imunoterapií tendenci k nižší prevalenci sezónního bronchiálního astmatu. Tento vliv však na rozdíl od studie Jacobsena et al. (2007) nebyl statisticky významný ( $P = 0,08$ ).

Preventivní vliv na novou senzitivaci prokázali také De-Roches et al. (1999) a Panjo et al. (2001) při vakcinaci dětí extraktem *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Jen správná indikace a včasné zahájení SIT zvyšuje preventivní účinek léčby se snahou zabránit progresi onemocnění a vzniku komplikací.

### **1.10.2 Standardizace a nomenklatura alergenů.**

Standardizace alergenů – má zabezpečit definovanou kvalitu a účinnost alergenů, udržení konzistence mezi jednotlivými výrobními šaržemi a tudíž zajistit stabilitu výsledného produktu.

Plně standardizovaný alergenový extrakt má přesně definované složení jednotlivých komponent a má stanovenou biologickou účinnost.

Stanovení potence alergenové vakcíny v biologických jednotkách se provádí in vivo měřením kožní reakce u skupiny lidských dobrovolníků vysoce reagujících na daný alergen, a in vitro – schopností alergenové vakcíny inhibovat vazebnou kapacitu specifických IgE protilátek. Velmi zde záleží na charakteristice použitých sér alergických osob a na alergenové vakcíně použité výrobcem jako referenční standard.

Standardizace je také dána vyjádřením množství hlavního alergenu ve hmotnostních jednotkách (ug/ml).

Alergenový extrakt je vždy směsí různých komponent s různou mírou alergenicity. Jeho obsahem může být jeden nebo více tzv. hlavních alergenů. Jako hlavní alergen označujeme alergen, na který reaguje tvorbou specifické IgE protilátky více jak 50 % jedinců přecitlivělých na daný alergenový druh. Standardizovaný alergenový extrakt by měl obsahovat nadpoloviční množství těchto hlavních alergenů. Jen takové alergenové extrakty mají být používány k diagnostice a imunoterapii.

Největším problémem současnosti je nejednotnost výrobních i standardizačních postupů.

### 1.10.3 Nomenklatura alergenů.

Současné značení alergenů : první tři písmena rodu, mezera, první písmeno druhu, mezera, arabská číslice, vyjadřující pořadí, kdy bylo dosaženo purifikace (pořadí stanovení alergenů). Např. Bet v 1 (Betula verrucosa – alergen břízy).

### 1.10.4 Mechanismy účinku SIT.

Mechanismy účinku alergenové imunoterapie nejsou dosud zcela objasněny. Je však jisté, že se jedná o komplexní proces ovlivněný mnoha faktory – typem alergenů, cestou jeho podání použitým adjuvans, dávkou a trváním SIT. Velmi důležitou roli má i samotný pacient – jeho genetická dispozice, typ alergického onemocnění, expozice alergenů v prostředí, ve kterém se pacient vyskytuje -jak z hlediska profesionální expozice v pracovním procesu, tak v prostředí domácím.

Základním předpokladem je zásah do rovnováhy Th1 a Th2 lymfocytů. U alergiků převládá směr aktivace přes Th2 lymfocyty, doprovázený sekrecí cytokinů IL-4, IL-5, IL-13, následnou stimulací tvorby IgE a aktivací mastocytů, bazofilů a hlavně eozinofilů ( zřejmě inhibicí jejich apoptozy ).

SIT napomáhá vyrovnat tuto dysbalanci, posiluje odpověď Th1, s produkcí např. IL-2, IFN gama, a stimuluje tvorbu IgG. Redukuje hladiny IL-3, IL-4, IL-5 a IL-13, čímž dochází ke snížení aktivace mastocytů a eosinofilů. Stoupá hladina IFN-gama, TNF, IL-10, IL-12 a IL-8. Vede také k poklesu hladiny faktorů uvolňujících histamin (HRF) a snižuje expresi receptorů Fc epsilon RI. Dalším faktem je i snížení exprese adhezivních molekul VCAM-1, ICAM-1 a pokles ECP (Kimura et al. 1985, Van Ree et al. 1997, Akoum et al. 1996, Akdis et al. 1998, Bellinghause et al. 1997).

Výsledkem všech těchto procesů je snížení produkce mediátorů, zmenšení intenzity alergického zánětu, snížená bronchiální hyperreaktivita a omezení tkáňového poškození. SIT také inhibuje pozdní fázi alergické reakce (eozinofilní zánět).

Změny v oblasti buněčné, které vznikají působením SIT, ovlivňují i produkci faktorů humorálních.

Změny hladin cirkulujících alergen – specifických IgE protilátek jsou nejvýznamnějším ovlivněným faktorem. V počátku podávání SIT jejich hladina stoupá, po několika měsících dochází k jejich poklesu.

Od počátku SIT dochází také k postupnému snižování uvolňování histaminu bazofily po expozici alergenu.

Úloha IgG protilátek není ještě dostatečně zřejmá. Při SIT dochází k vzestupu hladiny alergen – specifických IgG- protilátek ( především IgG1 a IgG4 ) (Ahlstedt & Eriksson 1977, Devey et al. 1976, Aalberse et al. 1983, Gehlhar et al. 1999). Označují se jako alergen – blokující protilátky.

SIT má také přímý vliv na efektorové buňky. Po provokaci alergenem bylo prokázáno snížení počtu tkáňových mastocytů a eozinofilů, a tím i snížení množství uvolňovaných mediátorů ( histaminu, prostaglandinů a leukotrienů ).

Působením SIT na efektorové buňky zánětu dochází i k potlačení klinických symptomů alergické reakce.

V průběhu pylové sezony zjišťujeme obvykle inhibici sezonního nárůstu specifických IgE protilátek. Pylová SIT inhibuje sezonní zvýšenou bronchiální reaktivitu na histamin a koncentraci eozinofilů a eozinofilního kationického proteinu v bronchoaleveolární laváži v období pylové sezony.

Indikace a kontraindikace SIT.

SIT je léčba ekonomicky i časově náročná, je doprovázena určitým rizikem nežádoucích reakcí. Její podávání a indikace patří výhradně do rukou alergologa.

Jejími hlavními indikace jsou t.č. alergická rhinokonjunktivitida, průduškové asthma s přecitlivělostí I.imunologického typu a s prokázanou souvislostí s aeroalergeny, a alergie na jed blanokřídlého hmyzu s těžkými celkovými projevy.

### **1. 10. 5 Indikace SIT:**

1. přítomnost klinických projevů alergického onemocnění ve stadiu bez komplikací a ireverzibilních změn
2. potvrzení přecitlivělosti I.imunologického typu na konkrétní alergen pomocí kožních testů a/nebo vyšetřením specifických IgE protilátek

3. alergen se v rozhodující míře podílí na klinických potížích, pacient je alergický na jeden, maximálně několik málo alergenů
4. alergen není možno účinně eliminovat z prostředí pacienta
5. je k dispozici kvalitní alergenová vakcína pro SIT, tj. Vakcína standardizovaná nebo vakcína se spolehlivě prokázanou a literárně dokumentovanou účinností.
6. nejsou přítomny zdravotní kontraindikace léčby
7. pacient přijme zásady a rizika podávání SIT, musí být předpoklad dobré, dlouhodobé spolupráce pacient – alergolog.
8. pacient musí být seznámen a souhlasit s ekonomickou zátěží související s dlouhodobým podáváním SIT

### **1. 10. 6 Kontraindikace SIT:**

Kontraindikace jsou spíše relativní, je nutno postupovat individuálně a zvážit přínos a riziko. Gravidita není kontraindikací v pokračování zavedené SIT, ale obecně platí, že v graviditě SIT nezahajujeme.

Relativní kontraindikace SIT:

1. klinicky závažné imunopatologické stavy jiné než atopie
2. maligní onemocnění
3. závažnější psychické poruchy (nutno posoudit individuálně)
4. léčba beta-blokátory, jak injekčními, perorálními, tak topickými (např. oční kapky)
5. nedostatečná spolupráce pacienta
6. těžká forma bronchiálního astmatu, nedostatečně pod kontrolou, špatně farmakologicky zvládnutelná, ev. ireverzibilní obstrukce dýchacích cest. Výjimkou je přecitlivělost na hmyzí jed.
7. závažné kardiovaskulární choroby, které zvyšují riziko nežádoucích reakcí po podání adrenalinu. Výjimkou je opět přecitlivělost na hmyzí jed.
8. závažné těžké celkové onemocnění (např. renální, hepatální, endokrinní), při kterém by SIT představovala neadekvátní zátěž a je předpoklad obtížného zvládnutí nežádoucí reakce

9. věková kritéria – děti pod 5 let věku a dospělí nad 60 let věku. Výjimkou je opět přecitlivělost na hmyzí jed.

U alergií na hmyzí bodnutí je nutno postupovat přísně individuálně – srovnat míru rizika SIT s mírou rizika systémové reakce u pacienta při bodnutí hmyzem.

### **1. 10. 7 Výběr pacientů vhodných pro SIT**

SIT má za úkol preventivně ovlivňovat reaktivitu pacienta ve smyslu zabránit progresi alergického onemocnění, minimalizovat rizika dalšího zhoršování základního onemocnění a minimalizovat rizika další senzibilizace.

Je nutné ji zahájit co nejdříve, v časně fázi alergického onemocnění.

Pro SIT jsou vhodné zvláště pacienti a přecitlivělostí na aeroalergeny, které nemohou být dostatečně účinně eliminovány. Především jsou to nemocní s alergickou rhinitidou, ať už sezonní nebo perzistující.

U pylových rým bývá problém s polyvalentní přecitlivělostí. Účinnost SIT klesá s šíří polyvalentnosti.

Větší účinnost a efektivita je u osob mladšího věku.

### **1.10.8 Současné cesty aplikace SIT.**

1. Subkutánní: dosud nejlépe dokumentována účinnost subkutánní formy, k dispozici je největší počet studií (Walker et al. 2001, Crimi et al. 2004, Frew et al. 2006, Roberts et al. 2006, Powell et al. 2007). Nevýhodou jsou někdy značně zkreslené závěry. Je to dáno nejednotností v použitých alergenech, nejednotností ve srovnávaných parametrech, Přes tyto potíže a někdy i určité rozpory v publikovaných datech je jednoznačná účinnost SIT prokázána v léčbě alergické rýmy, včetně očních symptomů, a v léčbě bronchiálního astmatu alergického typu ( jak u dětí, tak dospělých) s přecitlivělostí na alergeny pylové, roztočové, zvířecí. Některé studie poukazují na závislost klinického efektu na dávce alergenu. Je prokázán dlouhodobý efekt SIT i po jejím skončení, který vede ke snížení rizika rozvoje astmatických potíží

u pacientů s alergickou rýmou. Podle některých literárních údajů je SIT klinicky tolerována u více jak 90 % pacientů s hypersenzitivitou k jedu bodavého hmyzu a pouze u 30 – 50 % u pacientů s alergickou rýmou (Creticos 1997, Tankersley et al. 2002, Møller et al. 2000, Winther et al. 2000). S ohledem na vyšší úspěšnost SIT v indukci tolerance k jedu bodavého hmyzu ve srovnání s indukcí tolerance k aeroalergenům bylo zjištěno, že imunizace prostřednictvím SIT vede k mohutné imunitní odpovědi na systémové úrovni, zatímco imunitní odpověď na úrovni sliznic je obecně velmi slabá (Czerkinsky et al. 1999, Horner & Raz 2000, Horner et al. 2001). Nouri-Aria et al. (2004) však ukázali, že při SIT dochází k indukci mukosální a periferní IL-10 odpovědi a k blokování aktivity IgG protilátek.

## 2. Sublinguální specifická alergenová imunoterapie – SLIT:

V posledních letech celosvětově velmi rozšířená, jde o neinjekční formu aplikace, alergen je podáván v podobě sublinguálních kapek.

V počátcích velmi málo zdokumentována účinnost této formy podávání alergenové imunoterapie, první studie se opíraly pouze o subjektivní hodnocení, velmi často pomocí tzv. symptom-skore příznaků, možnosti redukce dosavadní léčby farmakologické a dotazníků týkajících se hodnocení kvality života pacientů. Před 4 lety se objevily výsledky rozsáhlé metaanalýzy týkající se účinku SLIT na alergickou rýmu. Tato metaanalýza hodnotí SLIT jako účinnou a bezpečnou. Od té doby narůstá počet prací, které hodnotí účinnost SLIT s použitím různých alergenů (Durham et al. 2006, Dahl et al. 2006a, b, Penagos et al. 2006).

Poslední dva roky se objevují první hodnocení týkající se použití sublinguálních tablet. Tato forma podávání se jeví jako velmi perspektivní, GRAZAX byl studován v rámci rozsáhlého klinického programu jako další možnost specifické imunoterapie. Koncem září 2006 byl GRAZAX uveden simultánně ve 27 zemích

ORALAIR obsahuje extrakt z pěti trav – srha laločnatá (*Dactylis glomerata*), tomka vonná (*Anthoxanthum odoratum*), jílek vytrvalý (*Lolium perenne*), lipnice luční (*Poa pratensis*) a bojínek luční (*Phleum pratense*). Je dostupný



v koncentracích 100 a 300 IR. Je určen pro léčbu alergické rýmy a rinokonjunktivitidy s průkazem alergie na pyly trav u dospělých a dětí starších pěti let s klinicky relevantními symptomy a potvrzené pozitivním kožním testem a/nebo pozitivním titrem IgE specifickým pro pyly trav.

## 2 Metodika

### 2.1 Výběr pacientů

Do studie byli vybráni pacienti obou pohlaví s prokázanou sezónní alergickou rhinitidou. U pacientů zařazených do studie byla stanovena na začátku studie hladina celkových IgE protilátek a byl vyhodnocen jejich klinický stav. V průběhu sledování byly pravidelně hodnoceny změny ve zdravotním stavu pacienta a v závislosti na nich doporučována další klinická léčba. Před započítáním aplikace vakcíny a následně jednou ročně bylo vyhodnoceno symptomskóre a to dle následujícího schématu.

Symptomskóre	Klinický obraz pacienta
0	Pacient zcela bez klinických příznaků, není nutná další terapie.
1	Pacient pouze s mírnými klinickými příznaky bez nutnosti další terapie.
2	Pacient s mírnými klinickými příznaky onemocnění s nutností monokomponentní terapie.
3	Pacient se středně těžkými příznaky onemocnění s nutností kombinované terapie
4	Pacient s těžkými příznaky onemocnění s nutností léčby nepotními kortikosteroidy.

### 2.2 Použité vakcíny

Vybraní pacienti byli rozděleni do dvou skupin. Pacientům první skupiny byla aplikována vakcína Phostal, pacientům druhé skupiny vakcína společnosti Sevapharma.

Phostal

Jde o extractum allergeni purificatum adsorptum ad calcii phosphas v koncentraci 0,01, 0,1, 1, 10 IR/ml (standardizované alergeny). Držitelem

registračního rozhodnutí v České republice je společnost Stallergenes S.A. se sídlem Rue Alexis de Toqueville, F-92160 Antony, Francie. Léčivý přípravek je registrován pod registračním číslem /9759/039-C.

IR (Index reaktivity): Alergenový extrakt má hodnotu 100 IR/ml, jestliže při kožním testu provedeném pomocí Stallerpointu u 30 pokusných osob senzibilizovaných vůči danému alergenů vyvolá vznik pupenu o průměru 7 mm (geometrický průměr). Kožní reaktivita u těchto subjektů se nezávisle ověřuje mírou jejich pozitivní odpovědi na prick test provedený kodeinfosfátem (9%).

Individuální extrakty obsahují pyly následujících trav - bojínek luční (*Phleum pratense*), jílek vytrvalý (*Lolium perenne*), lipnice luční (*Poa pratensis*), srha laločnatá (*Dactylis glomerata*), tomka vonná (*Anthoxanthum odoratum*), troskut prstnatý (*Cynodon dactylon*), žito seté (*Secale cereale*)

#### H-AL depot. Injekční suspenze

Jde o nestandardizovaný formolizovaný extrakt směsi pylů pro specifickou alergenovou imunoterapii. Tato směs obsahuje pyl následujících druhů trav - *Agrostis* sp. (psineček), *Alopecurus pratensis* (psárka luční), *Anthoxanthum odoratum* (tomka vonná), *Apera spica venti* (chundelka metlice), *Arrhenatherum elatius* (ovsík vyvýšený), *Avenastrum* sp. (ovsík), *Dactylis glomerata* (srha říznačka), *Festuca* sp. (kostřava), *Holcus lanatus* (medyněk vlnatý), *Lolium* sp. (jílek), *Phleum pratense* (bojínek luční), *Plantago lanceolata* (jitrocel kopinatý), *Poa pratensis* (lipnice luční), *Secale cereale* (žito seté), *Trisetum flavescens* (trojštět žlutavý).

Formolizované extrakty jsou precipitovány chloridem zinečnatým a taninem. Jako nosič je použit hydroxid hlinitý a jako protimikrobní konzervační látka fenol. Ředícím roztokem je Sørensenův roztok. Použitý přípravek obsahuje dále následující pomocné látky - chlorid sodný, dihydrogenfosforečnan draselný, hydrogenfosforečnan sodný, chlorid zinečnatý, tanin, fenol (max. 5,0 mg/ml), formaldehyd (max. 0,2 mg/ml), hydroxid hlinitý (max. 1,25 mg/ml), polysorbát 80 a voda na injekci.

Obsah léčivých látek se udává v jednotkách proteinového dusíku (PNU).  
1 PNU = 0,00001 mg proteinového dusíku v 1 ml alergenů.

Držitelem rozhodnutí o registraci použitého léčivého přípravku je SEVAPHARMA a.s., se sídlem v Praze 10, Průmyslová 1472/11.

## 2.3 Aplikační schéma

### Phostal

Přípravek byl aplikován hluboko podkožně, v postupně se zvyšujících dávkách až do maximální tolerované dávky dle následujícího schématu:

Den	Injekce	Lahvička	Objem (ml)	Frekvence aplikací
0	1	0,01 IR/ml	0,1	1 injekce týdně
7	2		0,2	
14	3		0,4	
21	4		0,8	
28	6	0,1 IR/ml	0,2	1 injekce týdně
35	7		0,4	
42	8		0,8	
49				
49	10	1 IR/ml	0,2	1 injekce týdně
56	11		0,4	
63	12		0,8	
70	14	10 IR/ml	0,2	1 injekce týdně
77	15		0,4	
84	16		0,8	

V rámci udržovací léčby byla vakcína s obsahem účinných látek 10 IR/ml aplikována pacientům jednou měsíčně a to individuálně podle klinických příznaků onemocnění. Obvykle byla aplikovaná dávka 0,8 ml před započítáním pylové sezóny a 0,1 ml v průběhu pylové sezóny..

### H-AL depot. Injekční suspenze

Aplikace vakcíny probíhala u všech pacientů podle doporučení výrobce uvedeného v souhrnu údajů o přípravku. Postupně bylo pacientům aplikováno 0,2 - 0,4 - 0,8 ml vakcíny 1x za 14 dní. Léčba byla vždy zahájena aplikací 0,8 ml vakcíny

s koncentrací 250 PNU, následovala aplikace vakcíny s koncentrací 2 500 PNU v dávkách 0,2ml, 0,4 ml a 0,8 ml jednou za 14 dní. Jako udržovací byla vyfiltrována vakcína s koncentrací 25 000 PNU. Tato byla zpočátku aplikována v dávkách 0,2ml, 0,4 ml a 0,8 ml jednou za 14 dní, následně pak v intervalech jednou za měsíc. V období před začátkem pylové sezóny byla vakcína této koncentrace aplikována v dávce 0,8 ml, v průběhu pylové sezóny v dávce 0,1 ml.

## **2.4 Odběr a zpracování vzorků**

Všem pacientům zařazeným do studie bylo před každou aplikací vakcíny odebráno venepunkcí 2 x 8 ml nesrážlivé krve, která byla bezprostředně po odběru a řádném označení odeslána do laboratoře. Každý odebraný vzorek byl označen jménem pacienta a pořadovým číslem odběru. V laboratoři byly vzorky zamraženy a před zpracováním udržovány při teplotě – 80 °C.

U pacientů, kterým byla aplikována vakcína Phostal, byly sledovány hladiny IgG4 protilátek u odběrů číslo 1 – 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 73 a 76. V závislosti na ukončení terapie mohl být poslední odběr individuálně posunut mimo uvedené schéma.

U pacientů, kterým byla aplikována H-AL depot. injekční suspenze, byly sledovány hladiny IgG4 protilátek s odběrů číslo 1 – 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64 a 67. V závislosti na ukončení terapie mohl být poslední odběr individuálně posunut mimo uvedené schéma.

## **2.5 Příprava rekombinantních antigenů**

Molekulárně biologická metoda pro přípravu rekombinantních antigenů byla vypracována na ústavu imunologie Lékařské fakulty UP v letech 1998 až 2004 a sumárně byla prezentována například v rámci dozertáční práce (Hradilová 2003).

Metoda je založena na izolaci příslušné genové sekvence z jaderného materiálu pylových zrn jílku a bojínku. S využitím plazmidové technologie byly tyto

sekvence přeneseny do produkčních kmenů *Escherichia coli*, které se tak staly producentem požadovaných alergenů. Pro purifikaci takto připravených rekombinantních alergenů bylo použito metalochelatační techniky: genová sekvence byly při plazmidových manipulacích obohacena o šest termiálních histidinů (HisTag technika). Při finální purifikaci proteinu bylo využito skutečnosti, že histidin má vysokou afinitu k niklovým iontům a tvoří s nimi nerozpustný metalochelatační komplex. Pokud jsou tedy niklové ionty navázány na agarózu v koloně, pak požadovaná molekula zůstává zakotvena v agaróze. Kolonou projde balastní materiál a žádaná molekula je uvolněna až následně, změnou iontových sil promývacího roztoku. V předkládané práci je uváděn postup počínající kultivací již připravených produkčních kmenů *E. coli*. Postupem uvedeným dále byly připraveny rekombinantní alergeny Ph1 p 5.

#### Kultivace biomasy *E.coli*

1. Zamražená kultura *E.coli* BL21 DE3 nesoucí plasmid pET28 s vloženým genem alergenu PhlpV byla pomnožena v 250 ml LB media s kanamycinem přes noc na temperované třepačce (37°C, 175 RPM)
2. Touto startovací kulturou byly inokulovány 4 l stejného média a za stejných podmínek kultivovány do dosažení  $O.D._{600}=0,6$ . Následně byla indukována exprese proteinu pomocí 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosidu. Po indukci byly bakterie kultivovány další 4 hodiny.
3. Biomasa byla získána centrifugací 10 min při 7000 rpm.

#### Izolace rekombinantního proteinu

1. Bakteriální peleta byla suspendována v denaturačním lyzačním pufru obsahujícím 8 M ureu, pH =8 a sonikována 10 x 10 sekund
2. Nerozpustné složky lyzátu byly odstraněny centrifugací 15 min při 10.000 RPM
3. K lyzátu byla přidána Ni-NTA agaróza v množství 1 ml suspenze v 25% etanolu (1:1) na 8 ml lyzátu a směs byla za stálého míchání inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě.

4. Lyzát s agarózou byl aplikován na chromatografickou kolonu, kde mobilní fáze protekla a na fritě zůstal zachycen gel s navázanými proteiny
5. Usazený gel byl promyt denaturačním pufrem o pH=6,3 a následně ještě jednou pufrem o pH=5,9, množství promývacích frakcí se rovnalo množství lyzátu.
6. Cílový protein byl z kolony eluován denaturačním pufrem o pH=4,9
7. Eluční frakce byly analyzovány pomocí SDS PAGE a frakce s nejvyšší čistotou proteinu byly použity k denaturaci

#### Renaturace rekombinantního proteinu

1. Eluční frakce byly dialyzovány do renaturačního pufru (50 mM Tris, 9 % NaCl, 0,5 M arginin, pH=7,5). Dialýza probíhala po dobu 16 hodin ve 250 násobném objemu za stálého míchání.
2. Dialyzát byl centrifugován 10 min, 10.000 rpm, 4°C a supernatant byl opět dialýzou převeden do uchovávacího pufru (50 mM Tris, 9% NaCl, pH=7,5). Koncentrace proteinu byla stanovena pomocí komerčně dostupné sady.

## 2.6 Stanovení IgG4 protilátek

### ELISA

1. Navázání antigenu – rekombinantní protein PhlpV byl naředěn v karbonát/bikarbonátovém pufru na koncentraci 2 µg/ml. Do 96 jamkové destičky bylo do každé jamky nepipetováno 100 µl roztoku a desky byly inkubovány přes noc při pokojové teplotě
2. Desky byly promyty 3x v PBS s 0,05 % Tweenem 20
3. Blokování bylo provedeno pomocí 5% mléka v 1x PBS s 0,05 % Tweenem 20 po dobu dvou hodin při laboratorní teplotě. Na jednu jamku bylo použito 300 µl roztoku.
4. Desky byly znovu promyty 2x v PBS s Tweenem 20
5. Byly aplikovány patientská séra v ředění 1:100 v PBS s Tweenem a 0,05% NaN<sub>3</sub> a množství 100 µl na jamku. Každý vzorek byl nanesen v dubletu. Desky byly inkubovány při pokojově teplotě přes noc.

6. Desky byly promyty 3x v PBS s Tweenem
7. Byla přidána sekundární protilátka anti-IgG4 HRP konjugát v ředění 1:1000 v PBS s Tweenem v množství 100  $\mu$ l na jamku a desky byly inkubovány při pokojové teplotě 3 hodiny
8. Příprava chromogenního substrátu – 1 OPD tableta byla rozpuštěna v 20 ml OPD pufru s 20  $\mu$ L 30 %  $H_2O_2$ . Do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu$ l substrátu
9. Po zbarvení byla reakce zastavena 100  $\mu$ l 0,4M  $H_2SO_4$  a byla změřena absorbance jednotlivých jamek.

## 2.7 Prick test

Prick test byl proveden u každého pacienta zařazeného do studie před započítím specifické alergenové imunoterapie a po jejím skončení. K provedení testu byla použita standardně dodávaná diagnostická sada ALYOSTAL společnosti Stallergenes pro jílek s koncentrací alergenu 100 IR/ml, pro bojínek s koncentrací rovněž 100 IR/ml. Dále byla jako pozitivní kontrola použita komerčně dodávaná součást setu s obsahem histamindihydrogenchloridu sodného, NaCl,  $NaHCO_3$ , glycerolu a vody pro injekci. Jako negativní kontrola byla použita rovněž komerčně dodávaná součást setu s obsahem NaCl, fenolu (12 mg/3ml), glycerolu, manitolu a vody pro injekce.

Postup provedení prick testu byl u všech pacientů jednotný. Po dezinfekci pokožky předloktí 70% roztokem ethanolu byla na kůži nanесena kapka každého z testovaných alergenů, kapka pozitivní kontroly a kapka negativní kontroly. Každá aplikovaná kapka byla řádně označena fixou. Následně byl sterilní lancetou porušen povrch kůže tak, aby došlo k průniku alergenu do podkoží. Vzniklá ranka nesměla nikdy krvácet. Po 2 minutách působení byly jednotlivé testované kapky setřeny. Po dalších 20 minutách byl odečítán výsledek jako velikost pupenu vyvýšeného nad povrch kůže v milimetrech.

## 2.8 Metody statistického hodnocení dat

Pro statistické zhodnocení byly použity metody analýzy variance a neparametrický párový t-test.



### 3 Výsledky

Do studie bylo zařazeno celkem 27 pacientů, z toho 13 mužů a 14 žen. Průměrný věk mužů v době zařazení do studie byl  $27,73 \pm 5,02$  roku, průměrný věk žen v době zařazení do studie byl  $32,00 \pm 9,54$  roku.

Patnácti pacientům (7 mužů ve věku 20 – 33 let, průměrný věk  $25,80 \pm 5,36$  roku, a 8 žen ve věku 22 – 56 let, průměrný věk  $34,20 \pm 13,20$  roku) byla aplikována v souladu s aplikačním schématem vakcína Phostal. Dvanácti pacientům (6 mužů ve věku 22 – 35 let, průměrný věk  $29,33 \pm 4,55$  roku, a 6 žen ve věku od 24 do 41 let, průměrný věk  $31,00 \pm 7,62$  roku) byla aplikována v souladu s aplikačním schématem vakcína H-AL depot společnosti Sevapharma..

U všech pacientů zařazených do studie byly při zařazení do studie provedeny kožní testy a byla stanovena hladina celkových a specifických IgE protilátek (viz tabulka 2).

Tab. 2: Výsledky kožních testů a stanovení celkových a specifických IgE protilátek u pacientů zařazených do studie.

Charakteristika		Phostal	H-AL
Kožní testy (mm)	Jílek	$9,78 \pm 3,70$	$12,64 \pm 4,81$
	Bojínek	$12,33 \pm 3,67$	$10,79 \pm 3,09$
Celkové IgE (IU/ml)		$256,22 \pm 158,59$	$397,11 \pm 354,06$
Specifické IgE (IU/ml)	Jílek	$35,154 \pm 28,51$	$39,040 \pm 35,3$
	Bojínek	$34,125 \pm 28,66$	$38,264 \pm 35,85$

U pacientů, kteří dokončili celou léčbu specifickou alergenovou imunoterapií, byly stanoveny hodnoty celkových IgE protilátek a specifických IgE protilátek po ukončení léčby. Tyto výsledky ukazuje tabulka 3.

Tab. 3: Hodnoty celkových IgE protilátek a specifických IgE protilátek po ukončení léčby.

Charakteristika		Phostal	H-AL
Celkové IgE (IU/ml)		238,52 ± 189,65	171,31 ± 163,60
Specifické IgE (IU/ml)	Jílek	14,653 ± 14,91	22,947 ± 34,41
	Bojínek	17,615 ± 13,91	20,825 ± 34,01

U pacientů léčených vakcínou Phostal byla hladina specifických IgE protilátek proti bojínku na začátku léčby  $34,125 \pm 28,66$  ( $n = 15$ ), na konci léčby  $17,615 \pm 13,91$  ( $n = 15$ ) ( $F = 4,265$ ,  $P < 0,05$ ). Hladina specifických IgE protilátek proti jítku byla u pacientů léčených vakcínou Phostal na začátku léčby  $35,154 \pm 28,51$  ( $n = 15$ ), po ukončení léčby  $14,653 \pm 14,91$  ( $n = 15$ ) ( $F = 1,085$ ,  $P > 0,05$ ).

U pacientů léčených vakcínou H-AL depot společnosti Sevapharma byla hladina specifických IgE protilátek proti bojínku na začátku léčby  $38,264 \pm 35,85$  ( $n = 12$ ), po ukončení léčby  $20,825 \pm 34,01$  ( $n = 12$ ) ( $F = 1,111$ ,  $P \gg 0,05$ ). Hladina specifických IgE protilátek proti jítku byla u pacientů léčených vakcínou H-AL depot společnosti Sevapharma na začátku léčby  $39,040 \pm 35,3$  ( $n = 12$ ), po skončení léčby  $22,947 \pm 34,41$  ( $n = 12$ ) ( $F = 1,052$ ,  $P \gg 0,05$ ).

V průběhu léčby nedošlo ke změnám v hladinách celkových IgE protilátek u žádné ze sledovaných dvou skupin pacientů.

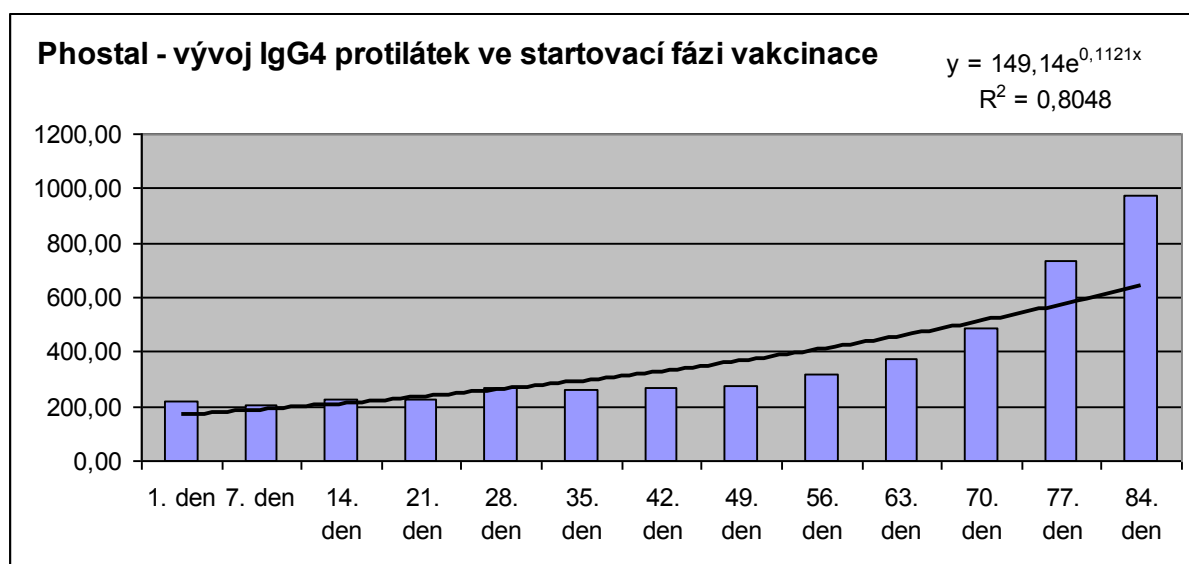
V tabulce 4 a 5 jsou sumarizovány výsledky stanovení hladiny IgG4 protilátek u pacientů ošetřených vakcínou Phostal. Hladina IgG4 protilátek byla stanovována jako vývoj absorpance jednotlivých vzorků při vlnové délce 292 nm. Na obrázku 1 je následně graficky znázorněn vývoj trendu průměrné hodnoty hladiny IgG4 protilátek v průběhu titrace vakcinační dávky. Na obrázku 2 je znázorněn vývoj protilátkové odpovědi v pravidelných měsíčních intervalech po dosažení udržovací dávky vakcíny.

Na počátku vakcinace byla po první aplikované dávce zjištěna hladina protilátkové odpovědi IgG4  $219,60 \pm 79,07$ . Na konci titrace vakcinační dávky

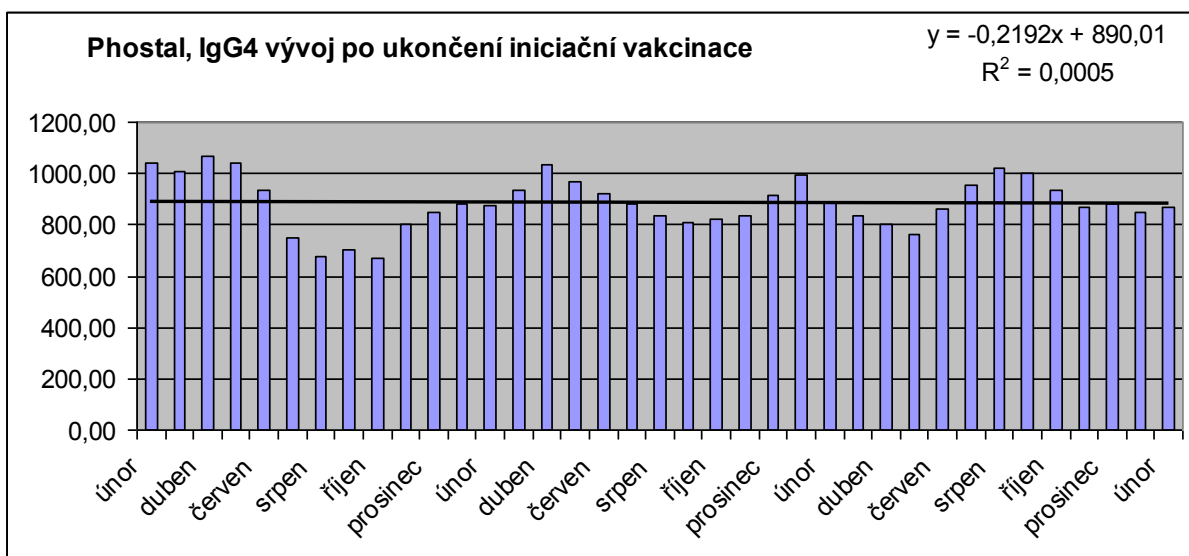
dosáhla protilátková IgG4 odezva hodnoty  $972,23 \pm 82,56$  (viz též obrázek 3). V průběhu titrace vakcinační dávky došlo k signifikantnímu zvýšení protilátkové odpovědi ( $t = 23,738$ ,  $P < 0,001$ ).

V dalším průběhu léčby bylo pozorováno mírné kolísání v hladině protilátkové odezvy. Jak je patrné z obrázku bylo toto kolísání hladin nejvýraznější v prvním roce po iniciační fázi vakcinace. V následujících letech byly již výkyvy hladiny IgG4 odpovědi mírnější a jejich frekvence s zkracovala.

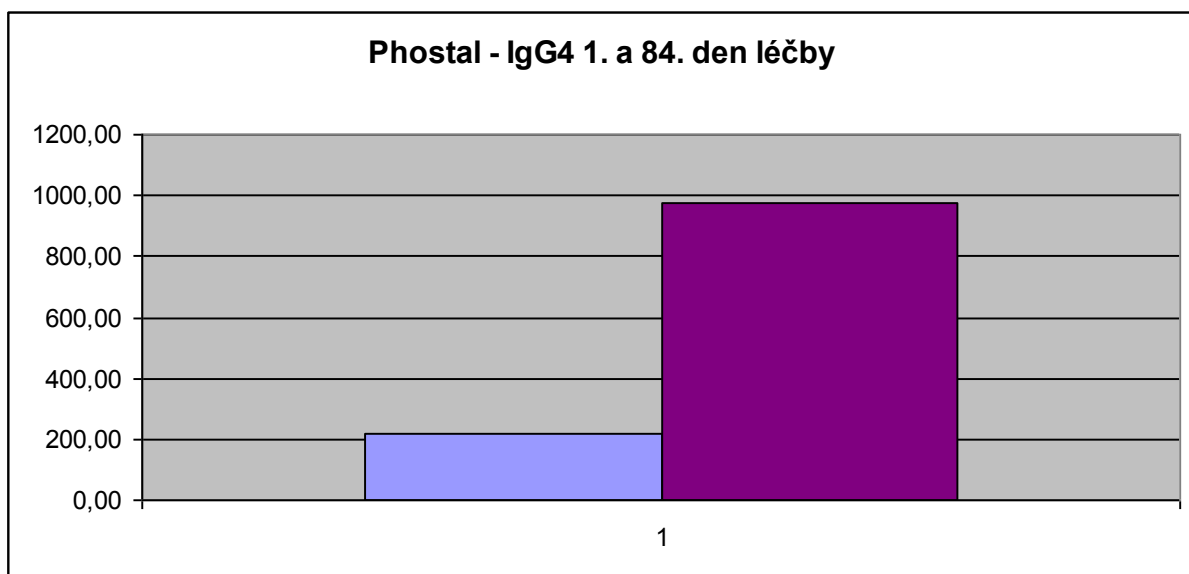
Celkově výsledky naznačují, že v průměru nedocházelo k signifikantní změně v hladině IgG4 odpovědi při aplikaci udržovacího schématu vakcinace.



Obr. 1: Trend vývoje hladiny IgG4 protilátek u pacientů ošetřených vakcínou Phostal při titraci vakcinační dávky.



Obr. 2: Trend vývoje hladiny IgG4 protilátek u pacientů ošetřených vakcínou Phostal po dosažení udržovací dávky



Obr. 3: Hladina IgG4 protilátkové odpovědi na počátku a na konci titrace vakcinační dávky.

Tab.4: Hladiny IgG4 protilátek u pacientů ošetřených vakcínou Phostal v průběhu titrace vakcinační dávky. Hladina IgG4 protilátek byla stanovována jako absorbance při vlnové délce 292 nm.

<b>Den terapie</b>	<b>Průměrná hodnota absorbance při 292 nm</b>	<b>Směrodatná odchylka</b>
1. den	219,60	79,07324814
7. den	202,20	70,37699502
14. den	223,63	75,11430971
21. den	226,77	75,13793665
28. den	266,73	84,67245012
35. den	262,03	86,20148049
42. den	268,13	83,42157709
49. den	277,13	60,41448108
56. den	318,57	61,48718411
63. den	376,30	64,48222346
70. den	485,77	75,78184542
77. den	732,37	97,03542554
84. den	972,23	82,55514751

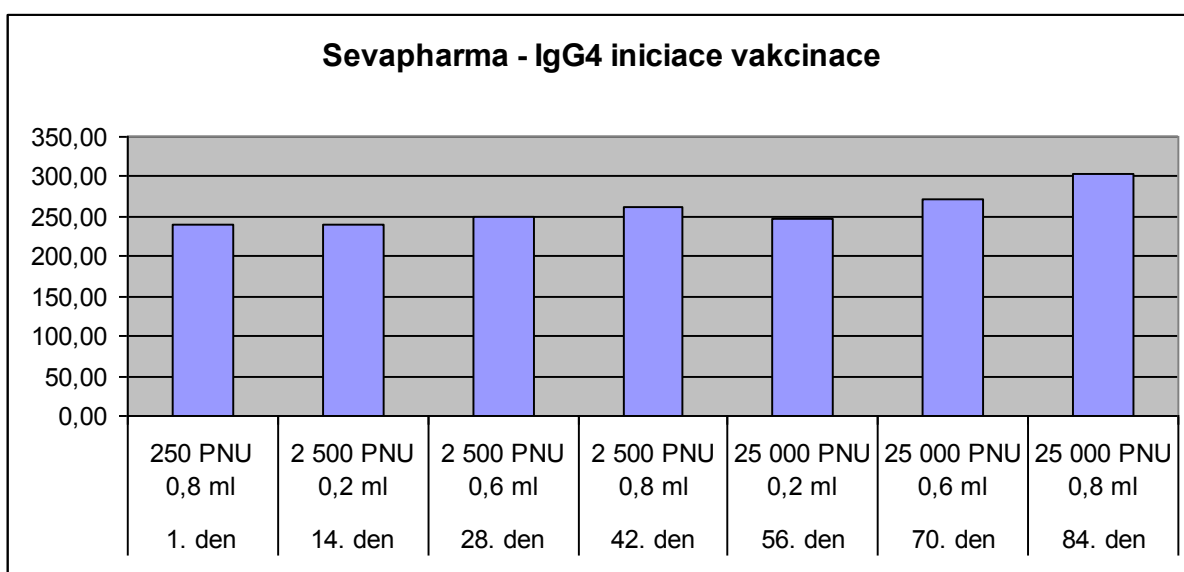
Tab.5: Hladiny IgG4 protilátek u pacientů ošetřených vakcínou Phostal při udržovací léčbě. Hladina IgG4 protilátek byla stanovována jako absorbance při vlnové délce 292 nm.

<b>Měsíc terapie po ukončení iniciace</b>	<b>Průměrná hodnota absorbance při 292 nm</b>	<b>Směrodatná odchylka</b>
únor	1042,13	93,06861268
březen	1005,80	67,96422378
duben	1067,10	87,12474636
květen	1038,33	87,20433039
červen	932,33	96,25536472
červenec	752,20	90,03507253
srpen	675,07	75,66299026
září	700,93	77,95508475
říjen	668,93	78,25413423
listopad	799,63	71,41990185
prosinec	851,03	45,95512822
leden	878,87	84,1750868
únor	874,97	76,68196535
březen	935,43	76,37638628
duben	1037,57	90,94383405
květen	969,87	89,6796813
červen	921,80	73,24928084
červenec	878,60	87,78834124
srpen	834,07	75,60254783
září	809,43	51,27338027
říjen	822,70	94,10419757
listopad	835,77	88,21075952
prosinec	915,50	72,9454297
leden	993,22	91,47808637
únor	885,77	43,47941494
březen	837,30	70,50653465
duben	803,40	69,78594824
květen	761,70	58,1066753
červen	862,87	45,10284544
červenec	957,10	63,87744963
srpen	1022,67	83,76767759
září	1002,40	81,74157886
říjen	935,33	57,85501172
listopad	871,47	49,78255097
prosinec	878,77	53,26479227
leden	848,33	50,34972928
únor	867,87	76,31126735

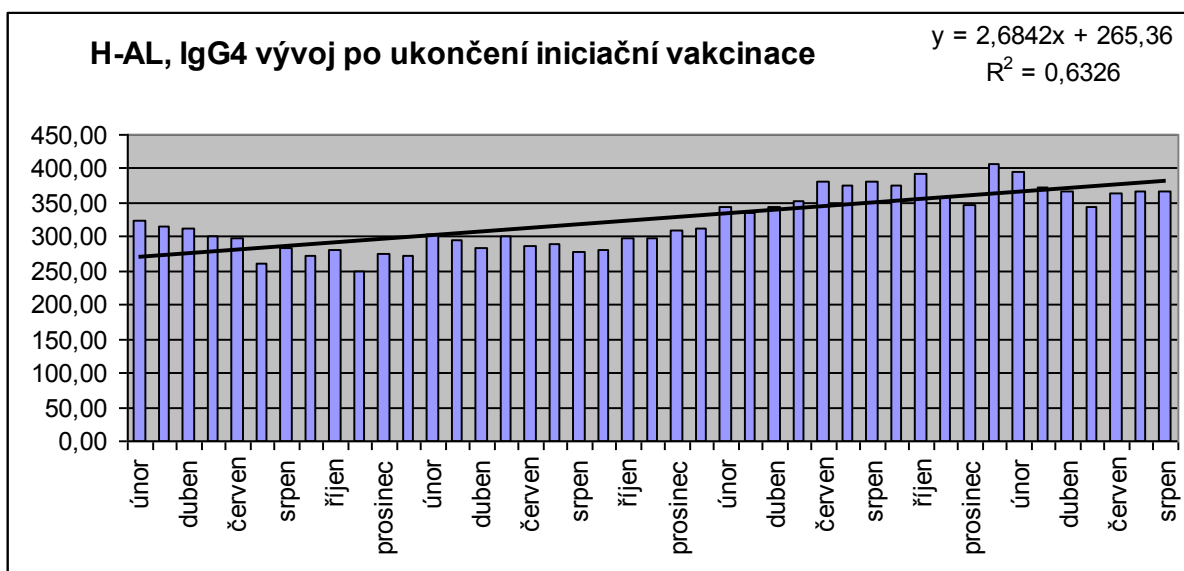
Výsledky u pacientů ošetřených vakcínou H-AL depot společnosti Sevapharma je stejným způsobem shrnut na obrázku 4, 5 a v tabulce 6, 8.

Z tabulky 6 a obrázku 4 je patrné, že v průběhu iniciální fáze vakcinačního schématu použitou vakcínou H-AL depot. se hladina protilátkové IgG4 odpovědi výrazně neměnila. Po první aplikované dávce byla zjištěna hladina IgG4 odpovědi  $239,17 \pm 133,770722$ , po ukončení iniciálního vakcinačního schématu, tj. 84. den po začátku vakcinace,  $302,46 \pm 219,0666626$ . Tyto zjištěné hladiny se statisticky významně nelišily.

V průběhu udržovací léčby byl zaznamenán postupný mírný nárůst hladiny IgG4 odpovědi (viz tabulka 8 a obrázek 5). Zjištěný nárůst však nebyl statisticky významný.



Obr. 4: Trend vývoj protilátkové IgG4 odpovědi u pacientů léčených vakcínou H-AL depot. v průběhu titrace udržovací vakcinační dávky.



Obr. 5: Trend vývoje protilátkové IgG4 odpovědi u pacientů léčených vakcínou H-AL depot po dosažení udržovací dávky

Tab.6: Hladiny IgG4 protilátek u pacientů ošetřených vakcínou H-AL depot. v průběhu titrace vakcinační dávky. Hladina IgG4 protilátek byla stanovována jako absorbance při vlnové délce 292 nm.

Den terapie	Průměrná hodnota absorbance při 292 nm	Směrodatná odchylka
1. den	239,17	133,770722
14. den	240,42	130,2317573
28. den	250,79	135,0904509
42. den	261,29	123,0948375
56. den	246,08	116,6431686
70. den	271,42	151,4668931
84. den	302,46	219,0666626

V průběhu experimentu byl sledován také vývoj symptom skóre u pacientů zařazených do studie. Jak ukazuje tabulka 7, u pacientů léčených vakcínou Phostal došlo k signifikantnímu zlepšení příznaků onemocnění, u pacientů léčených vakcínou H-AL depot. takového zlepšení klinických příznaků pozorováno nebylo.



U pacientů zařazených do studie byla vyhodnocena také odpověď na léčbu. U pacientů léčených vakcínou Phostal byla úplná reakce na léčbu zaznamenána u 47 % pacientů, částečná reakce u 53 % pacientů a u všech ošetřených pacientů bylo onemocnění po celou dobu léčby pod kontrolou. U pacientů léčených vakcínou H-AL depot. byla úplná reakce zaznamenána u 18 % pacientů, částečná reakce u 27 % pacientů a kontrola nad onemocněním byla získána u 73 % pacientů. 26 % pacientů ošetřených vakcínou H-AL depot. na léčbu vůbec nereagovala (viz tabulka 9).

Tab. 7: Vývoj symptom skóre u pacientů zařazených do studie.

	Počátek léčby	1. rok léčby	2. rok léčby	3. rok léčby	4. rok léčby
<b>Phostal</b>	2,647059	2,352941	1,823529	1,470588	1,117647
<b>H-AL depot.</b>	2,727273	2,636364	2,272727	2,363636	2,272727

Tab. 9: Klinická odpověď na léčbu použitými vakcínami.

Použitá vakcína	n	Úplná reakce	Částečná reakce	ÚR + ČR	Kontrola nad onemocněním
H-AL depot.	11	2 (18 %)	3 (27 %)	5 (45 %)	8 (73 %)
Phostal	17	8 (47 %)	9 (53 %)	17 (100 %)	17 (100 %)

Dalším z ukazatelů klinické odezvy léčby, který byl sledován na počátku léčby, dále pak v pravidelných ročních intervalech, byl prick test.

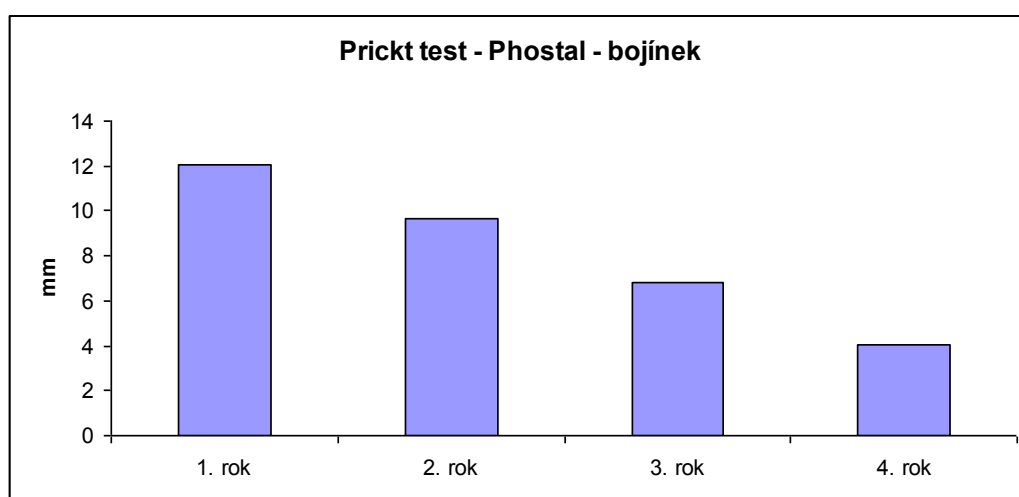
U pacientů léčených vakcínou Phostal byl na počátku léčby výsledek prick testu proti bojínku  $12,07 \pm 4,28$  mm a na konci léčby  $4,07 \pm 2,28$  mm. Zjištěný rozdíl se ukázal jako statisticky významný ( $P < 0,001$ ). Obdobné výsledky byly u pacientů léčených vakcínou Phostal zaznamenány také proti jílků. Na počátku léčby dosáhl prick test hodnoty  $11,87 \pm 2,88$ , respektive na konci léčby  $3,27 \pm 1,67$  mm. Také v tomto případě byl rozdíl hodnot prick testu na začátku a na konci léčby statisticky významný ( $P < 0,001$ ).

Tab. 10: Zjištěné hodnoty prick testů (mm) proti bojínku a jítku u jednotlivých skupin pacientů v průběhu imunoterapie.

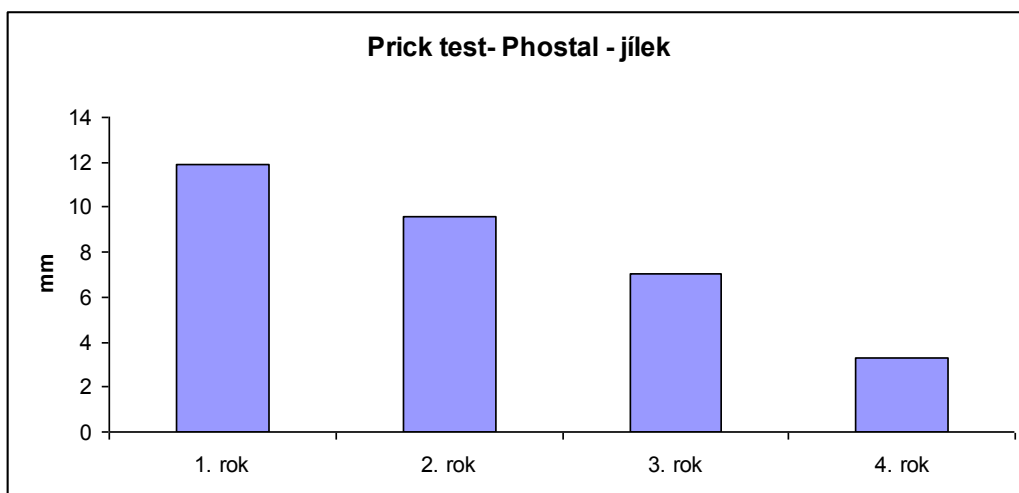
		Počátek léčby	1. rok léčby	2. rok léčby	3. rok léčby
<b>Phostal</b>	Bojínek	12,07	9,67	6,80	4,07
	Jílek	11,87	9,60	7,07	3,27
<b>H-AL depot.</b>	Bojínek	10,75	9,58	8,92	7,67
	Jílek	10,25	9,17	7,25	5,67

Ve skupině pacientů, kterým byla aplikována vakcína H-AL depot byly hodnoty prick testu proti bojínku na začátku léčby  $10,75 \text{ mm} \pm 2,26 \text{ mm}$  a nakonci léčby  $7,67 \pm 2,15 \text{ mm}$ . Rozdíl mezi těmito hodnotami nebyl statisticky významný. Hodnota prick testu proti jítku byla u této skupiny pacientů na počátku léčby  $10,25 \text{ mm} \pm 2,53 \text{ mm}$  a na konci léčby  $5,67 \text{ mm} \pm 2,15 \text{ mm}$ . Tyto dvě hodnoty se ukázaly jako statisticky významné ( $P < 0,01$ ).

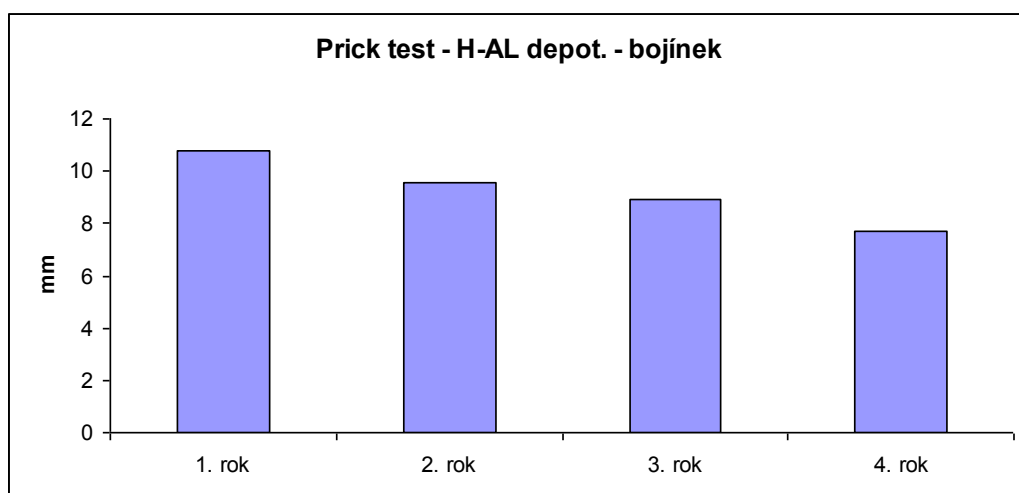
Výsledky u jednotlivých použitých vakcín jsou sumarizovány v tabulce 10 a na obrázcích 6 – 9.



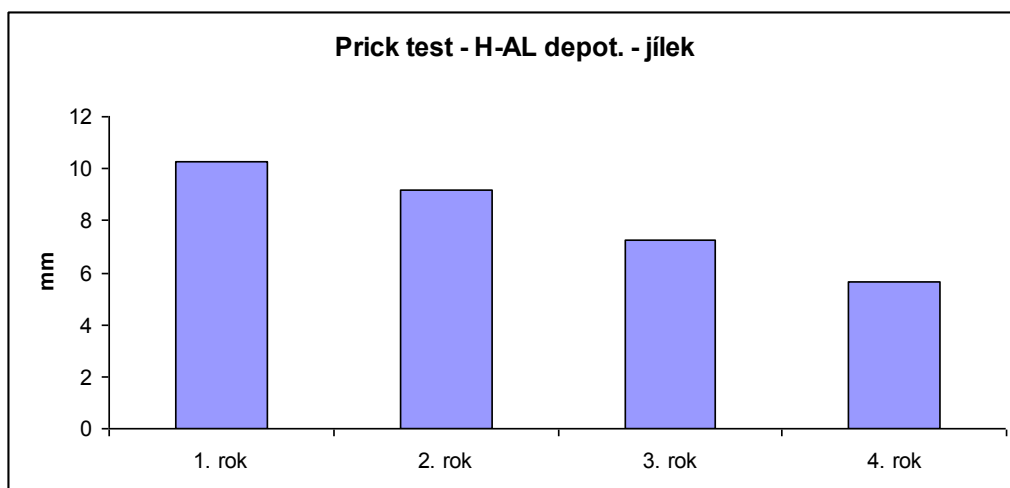
Obr. 6: Výsledky Prick testů proti bojínku v jednotlivých letech terapie vakcínou Phostal.



Obr. 7: Výsledky Prick testů proti jílku v jednotlivých letech terapie vakcínou Phostal.



Obr. 8: Výsledky Prick testů proti bojínku v jednotlivých letech terapie vakcínou H-AL depot.



Obr. 9: Výsledky Prick testů proti jílku v jednotlivých letech terapie vakcínou H-AL depot.

Tab.8: Hladiny IgG4 protilátek u pacientů ošetřených vakcínou H-AL depot. při udržovací léčbě. Hladina IgG4 protilátek byla stanovována jako absorbance při vlnové délce 292 nm.

Měsíc terapie po ukončení iniciace	Průměrná hodnota absorbance při 292 nm	Směrodatná odchylka
únor	322,54	199,6359708
březen	315,08	178,7192864
duben	311,67	163,621283
květen	300,17	147,0399348
červen	298,54	149,20021
červenec	261,88	143,7029963
srpen	282,79	151,4329222
září	273,25	149,6595379
říjen	279,88	150,1146219
listopad	249,21	116,1397
prosinec	275,54	102,0865182
leden	272,79	130,7162886
únor	303,79	164,9599756
březen	296,63	180,9447586
duben	284,25	142,0128835
květen	301,67	161,4958954
červen	286,25	165,8348713
červenec	288,71	170,5726263
srpen	277,25	145,1598649
září	281,83	154,9047117
říjen	297,33	160,7287853
listopad	297,63	143,1652137
prosinec	308,13	158,7657115
leden	313,63	171,5989146
únor	343,29	183,1656551
březen	335,88	166,108005
duben	344,96	163,8213354
květen	352,75	173,0015108
červen	381,58	167,596354
červenec	374,38	172,05775
srpen	381,63	201,2859934
září	375,32	156,5762231
říjen	391,68	213,9370553
listopad	358,10	208,8517284
prosinec	346,85	173,1515152
leden	408,40	216,6630513
únor	394,44	187,4994074
březen	371,29	194,9741131
duben	367,29	185,1852354
květen	344,07	167,884243
červen	363,21	159,0544606
červenec	365,86	167,9153344
srpen	368,17	161,4938595

## 4 Diskuse

Alergická onemocnění (sezónní alergická rýma, celoroční alergická rýma, atopická dermatitida a alergické astma) postihují celosvětově až 400 miliónů lidí (Tawankar et al., 2009, Barman, 2006). Jak dokládají mnohé studie, počet pacientů s alergickým onemocněním neustále narůstá a to zejména v průmyslově vyspělých zemích, jako jsou například Velká Británie, Austrálie, Nový Zéland, Irsko, země Severní, Střední a Jižní Ameriky (Stipič-Markovič et al. 2003, Ghouri et al. 2008, Natthan, 2007, Berger, 2004, Settipane 2003, Dosna et al. 2001, Sonuhauser et al. 2005 a Craig et al. 2010). Tento celosvětový trend je kopírován také situací v České republice (ÚZIS 2010).

Léčba alergických onemocnění je komplexní proces zahrnující jak režimová opatření tak vlastní symptomatologickou nebo kauzální léčbu. Jednou z možností kauzální léčby, která ovlivňuje reaktivitu organismu na vybraný alergen cestou ovlivnění regulační aktivity T lymfocytů, je specifická alergenová imunoterapie. Její účinnost je dokládána celou řadou klinických studií, které prokazují jak její okamžitý terapeutický dopad, tak také dlouhodobý vliv na imunitní systém ošetřených pacientů, projevující se ve výrazném snížení rizika zhoršení vlastního onemocnění, tak následných senzitivací (Ortolani et al. 1984, Mosbech & Østerballe 1988, Dolz et al. 1996, De Roches et al 1999, Panjo et al. 2001, Jutel et al. 2005, Reha & Ubru 2007, Eng et al. 2002, 2006, Jacobsen et al 1997, 2007)

Alergenová imunoterapie dnes patří k celosvětově uznávaným léčebným postupům u pacientů s projevy sezónní alergické rýmy. V povědomí alergologů se upevňuje názor, že specifická alergenová imunoterapie funguje skutečně na principu klasické vakcinace, tj. indukce protilátkové odpovědi po aplikaci antigenu. V současné době je k dispozici celá řada přípravků pro subkutánní či sublingvální aplikaci příslušných alergenů a objevují se stále nové přípravky. Pro standardní léčbu polinózy je v České republice používáno několik vakcín různých výrobců, mimo jiné jsou to vakcíny Phostal společnosti Stallergenes a H-AL depotní injekční suspenze společnosti Sevapharma.

Jak ukazují výsledky této studie, existuje významný rozdíl v klinické odpovědi pacientů na léčbu oběma těmito vakcínami. U pacientů léčených vakcínou Phostal došlo v průběhu sledování k signifikantnímu zmírnění příznaku jejich onemocnění, což dokládá snížení jejich symptomskóre z hodnoty 2,65 na počátku léčby na hodnotu 1,12.

U pacientů léčených vakcínou H-AL depot. nebyla klinická odezva prakticky zaznamenána (symptomatické na počátku i na konci léčby dosahovalo průměrné hodnoty 2,73).

Tomuto trendu odpovídá také hodnocení klinické odezvy na léčbu, kdy při použití vakcíny Phostal byla získána kontrola nad onemocněním, tedy nedošlo ke zhoršování stavu onemocnění, u všech ošetřených pacientů, zatímco při použití vakcíny H-AL depot. byla kontrola nad onemocněním získána pouze u 73 % pacientů. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky předchozích publikovaných studií Creticos 1997 a Winthera et al. (200).

Léčba oběma vakcínami byla zahajována vždy v zimním období tak, aby iniciační fáze léčby, v jejímž průběhu byla postupně, v souladu s doporučeným aplikačním schématem, navyšována koncentrace alergenu v aplikované vakcíně, byla ukončena před začátkem pylové sezóny. Dále byla vakcína aplikována v udržovací dávce po dobu následujících tří let. U pacientů ošetřených vakcínou Phostal došlo po roce pravidelné aplikace udržovací léčby k výraznému poklesu symptomatické a tedy k redukci příznaků jejich onemocnění. Tomuto poklesu odpovídá také skutečnost, že 5 pacientů (29,4 %) bylo již po prvním roce léčby bez nutnosti farmakoterapie. V následujících letech docházelo pak k další redukci klinických příznaků onemocnění a u 13 ze 17 pacientů (76,5 %) bylo možné v posledním roce sledování zcela vyloučit farmakoterapii. Rychlost nástupu účinku subkutánní alergenové terapie u sledovaného souboru polinotiků je srovnatelný s výsledky, které publikovali Krčmová et al. (2009).

U pacientů ošetřených vakcínou H-AL depot byla odezva na léčbu výrazně slabší. K poklesu symptomatické sice došlo, tento pokles však nebyl statisticky významný a pouze u 3 pacientů z 11 (27,3 %) bylo onemocnění zcela pod kontrolou a bez nutnosti farmakoterapie. Po prvním roce pravidelné léčby bylo takové zlepšení příznaků onemocnění pozorováno pouze u jediného pacienta (9,1 %).

Aplikační schéma použité u vakcíny H-AL depot je plně srovnatelné s postupem vakcinace provedeným ve studii Jutela et al. (2005), kteří pacientům trpícím rhinokonjunktivitidou aplikovali subkutánně vakcínu s obsahem pěti rekombinantních alergenů trav ve zvyšující se dávce v sedmidenních intervalech. Počáteční aplikovaná dávka ve studii Jutela et al. byla 0,02 µg celkového množství proteinu, následovala dávka 0,16 µg celkového množství proteinu a 0,40 µg celkového množství proteinu (0,8 ml). Při použití vakcíny H-AL depot byla léčba započata rovněž před začátkem pylové sezóny dávkou odpovídající 2 µg proteinového dusíku (0,8 ml vakcíny o 250 PNU) a nejvyšší

dávka, která byla aplikována před startem pylové sezóny odpovídala 200 µg proteinového dusíku (0,8 ml vakcíny o 25 000 PNU).

Výsledky získané v předložené práci neprokázaly u sledovaných pacientů, na rozdíl od studie Jutela et al. (2005) pozitivní vliv léčby touto vakcínou na symptom skóre a následně také na potřebu další kauzální či symptomatologické léčby.

Ve studii Jutela et al (2005) byla počáteční dávka zvýšena dvacetkrát, v případě předložené studie pak stokrát. V případě Jutela et al bylo však množství alergenu udáváno v obsahu celkového proteinu, zatímco u vakcíny H-AL depot. je množství uváděno v ekvivalentu obsahu dusíku. Srovnání výsledků dosažených léčbou v obou srovnávaných studiích je proto značně obtížné pro nepřesné porovnání celkového množství aplikovaného alergenu.

V současné době existuje několik pohledů na možný mechanismus působení specifické alergenové imunoterapie.

Jeden z předpokládaných mechanismů vychází z Th2/Th1 paradigmatu formulovaného Mosmannem et al. (1986) a dále pak rozpracovaného Romagnanim (1997). Podle tohoto paradigmatu jsou za rozvoj imunitní reakce typu I zodpovědné cytokiny produkované Th2 buňkami, ne však Th1 buňkami, které reagují produkcí specifických cytokinů na produkci bakteriálních, virových či parazitárních antigenů. Romagnani dále předpokládal, že Th0 lymfocyty nejsou schopny primárně syntetizovat ani interferon gama typický pro Th1 buňky, ani IL-4 typický pro Th2 buňky. Podle Romagnaniho pak musí dojít k ovlivnění Th0 lymfocytu jinými buněčnými populacemi, které jsou schopny primárně tyto cytokiny (interferon gama a IL-4) produkovat a ovlivnit tak vývoj Th0 buňky buď směrem k Th1 nebo Th2. Takovými buňkami mohou být podle Romagnaniho NK buňky a mastocyty.

V souladu s tímto paradigmatem je předpokládáno, že by bylo vhodné změnit alergen-specifickou imunitní odpověď u alergických pacientů z dominantní Th2 odpovědi směrem k výhodnější Th1 odpovědi. Podpora pro předpoklad, že specifická alergenová imunoterapie může být skutečně schopna vyvolat takovou změnu vychází z pozorování, že se mezi klony alergen specifických T buněk izolovaných z periferní krve alergických pacientů po imunoterapii zvyšuje počet Th1 klonů a stejně tak dochází ke zvýšení produkce Th1 cytokinů (Ebner et al. 1997, Jutel et al. 1995, McHugh et al. 1995, Secrist et al. 1993). Za další důkaz podporující tuto teorii byla zjištěna, že po prodělané imunoterapii dochází k redukcí eozinofilie a produkce interleukinu IL-5 (Rak et al. 2001, Wilson et al. 2001). Někteří autoři však prokázali, že alergen specifické odpovědi T

buněk nejsou tak striktně polarizovány, jak předpokládala teorie Th1/Th2 paradigmatu a navíc, že Th1 buňky mohou být zodpovědné také na patogenezi některých forem atopie (Byron et al. 1994, Looney et al. 1994, Oldfield et al. 2001, van Neerven et al. 1994a, 1994b).

Proti této teorii, snažící se vysvětlit mechanismus působení specifické alergenové imunoterapie, hovoří také skutečnost, že v průběhu léčby nebylo u léčených osob pozorováno zvýšení hladin IgG2 a IgG3 protilátek, které jsou typické pro Th1 odpověď.

Dalším z předpokládaných mechanismů působení specifické alergenové imunoterapie je vzestup „alergen-blokujících“ IgG protilátek (IgG1 a IgG4 protilátek) při současném poklesu specifických IgE protilátek. Ahlstedt & Eriksson (1977), Devey et al. (1976), Aalberse et al. (1983), Gehlhar et al. (1999) a Rossi & Monasterolo (2004) prokázali u pacientů léčených specifickou alergenovou terapií vzestup hladin protilátek IgG1 a IgG4. Těmto výsledkům odpovídá také vzestup IgG4 protilátek zjištěný u pacientů zařazených do této studie.

Významný rozdíl byl zaznamenán u sledovaných pacientů v odpovědi na jednotlivé použité vakcíny. Zatímco u pacientů ošetřených vakcínou Phostal došlo v průběhu iniciační fáze imunizace k signifikantnímu nárůstu hladiny IgG4 protilátek (po první vakcinační dávce byla zaznamenána absorbance IgG4 protilátek  $219,60 \pm 79,07$ , po 84 dnech léčby  $972,23 \pm 82,56$ ), u pacientů léčených vakcínou H-AL depot nebyl statisticky významný vzestup protilátkové odezvy zaznamenán (po první vakcinační dávce byla zaznamenána absorbance IgG4 protilátek  $239,17 \pm 133,77$ , po 84 dnech léčby  $302,46 \pm 219,07$ ). Po první aplikované dávce příslušné vakcíny nebyl v protilátkové odezvě u obou skupin zaznamenán žádný signifikantní rozdíl. Po 84 dnech léčby však byla protilátková odezva u srovnávaných vakcín signifikantně odlišná.

Rossi & Monasterolo (2004) aplikovali celkem 33 pacientům citlivým na pyl bojínku vakcínu Alutard SQ po dobu 15 týdnů v postupně se zvyšující dávce. Výsledky jejich studie ukázaly, že IgG4 specifická protilátková odpověď byla velmi nízká proti hlavním (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 11) a minoritním (Ph p 12) alergenům. Tuto skutečnost Rossi & A Monasterolo vysvětlují nízkým zastoupením těchto alergenů a použité vakcíně. Jinými slovy řečeno, kvalitativní složení aplikované vakcíny významným způsobem ovlivňuje tvorbu specifických IgG4 protilátek.

Odlišným obsahem alergenů v použitých vakcínách Phostal a H-AL depot mohou být vysvětleny také rozdíly v IgG4 protilátkové odpovědi zjištěné v předložené studii.



Produkce IgG4 protilátek však může být ovlivněna také genetickými faktory a dalšími vlivy prostředí, které nemohly být v průběhu sledování postihnuty.

V následující udržovací fázi léčby nedocházelo u pacientů ošetřených vakcínou Phostal k statisticky významné změně hladiny IgG4 protilátek. Jak ukazuje obrázek 2, docházelo se změnou množství aplikované vakcíny k mírnému kolísání hladiny protilátkové odpovědi. Ve sledovaném období se interval těchto změn postupně snižoval, což naznačuje stabilizaci hladiny protilátkové odpovědi na léčbu v souladu s vakcinačním schématem v průběhu vegetačního období a tedy s vývojem produkce pylu bojínku a jílku. Pozorovaný trend vývoje protilátkové odpovědi na léčbu vakcínou Phostal koresponduje s pozitivní klinickou odezvou u sledovaných pacientů.

Jak je patrné z obrázku 5 a tabulky 8, došlo u pacientů ošetřených vakcínou H-AL depot. v průběhu udržovací léčby k mírnému nárůstu hladiny IgG4 protilátek. Tento vzestup však není statisticky významný a tomu odpovídá také pozorovaná klinická odezva. V této skupině pacientů na léčbu zareagovalo pozitivně pouze 45 % pacientů (počítáno úplnou a částečnou reakcí na léčbu) a pouze u 73 % pacientů bylo získáno onemocnění pod kontrolu, kdy nedocházelo k dalšímu zhoršování klinického stavu při zachování komplexní medikace.

Pozorované odlišnosti v klinické a protilátkové odezvě u pacientů ošetřených použitými vakcínami Phostal a H-AL depot. mohou být podmíněny odlišnou čistotou použitých vakcín, způsobem jejich purifikace a také výsledným obsahem alergenů. S ohledem na odlišnost udávání obsahu alergenů v obou typech vakcíny není však takové srovnání možné. Získané výsledky však naznačují, že způsob získávání alergenů, jejich purifikace a kvantifikace ve vakcíně H-AL depot se jeví jako nedostačující pro klinickou praxi.

Některé z dřívějších prací uvádějí jako předpokládaný imunologický mechanismus účinku specifické alergenové imunoterapie potlačení produkce IgE protilátek (Levy et al. 1971, Sadan et al. 1969, Osler et al 1968). Tomuto předpokladu odpovídá také nález poklesu hladiny specifických IgE protilátek proti bojínku u pacientů ošetřených vakcínou Phostal. U pacientů ošetřených vakcínou Phostal byl pozorován byl také pokles hladiny specifických IgE protilátek proti jílku. Tento pokles se však neukázal být statisticky významný. Statisticky nevýznamný pokles hladiny specifických IgE protilátek proti oběma pylům trav byl pozorován také u pacientů ošetřených vakcínou H-AL depot. Tyto výsledky jsou v souladu s nálezy Yougingera a Gleicha (1973) a Rossiho

& Monasterola (2004), kteří rovněž neprokázali souvislost s prodělanou specifickou alergenovou imunoterapií a změnami hladin IgE protilátek.

Naproti tomu, Mauro et al. (2007), kteří srovnávali účinek subkutánní a sublinguální specifické alergenové imunoterapie u 47 pacientů s přecitlivělostí k pylu břízovitých rostlin, prokázali, že při subkutánní aplikaci pylových alergenů nedošlo po proběhlé pylové sezóně ke zvýšení hladiny specifických IgE protilátek, zatímco při sublinguální aplikaci pylových alergenů došlo po proběhlé sezóně k mírnému, statisticky nevýznamnému zvýšení hladiny IgE protilátek. Tento výsledek může být zapříčiněn pravděpodobně odlišným mechanismem působení subkutánní a sublinguální imunoterapie.

Na základě získaných výsledků není proto možné jednoznačně potvrdit vliv „blokujících“ IgG4 protilátek na hladinu specifických IgE protilátek a jejich změny v průběhu specifické alergenové imunoterapie.

Nicméně některé výsledky této studie a také práce dalších autorů naznačují, že imunoterapií indukované alergen specifické IgG protilátky mohou potlačovat také nárůst produkce alergen specifických IgE protilátek v paměťových buňkách indukovaný expozicí alergenů.

## 5 Abstrakt

Alergická onemocnění, jako jsou sezónní alergická rýma či astma, představují v současné době významný medicínský problém, který má závažné socio-ekonomické dopady. Proto se stále větší pozornost věnuje možnostem kauzální léčby těchto onemocnění, ke kterým je možné zařadit také specifickou alergenovou imunoterapii.

Předložená práce si klade za cíl porovnat klinickou účinnost dvou rutinně používaných vakcín na českém trhu, a to vakcíny Phostal společnosti Stallergen a vakcíny H-AL depot. společnosti Sevapharma.

Do studie byli zařazeni pacienti obou pohlaví s prokázanou sezónní alergickou rhinitidou. U pacientů zařazených do studie byla stanovena na začátku studie hladina celkových IgE protilátek, byl proveden kožní prick test a byl vyhodnocen jejich celkový klinický stav pomocí symptomskóre. V průběhu sledování byly pravidelně hodnoceny změny ve zdravotním stavu pacienta, jednou ročně proveden kontrolní kožní prick test a v závislosti na zjištěných skutečnostech doporučována další klinická léčba. V průběhu celé léčby byl u všech pacientů sledován vývoj hladiny IgG4 protilátek. Pro stanovení IgG4 protilátek byla použita metoda ELISA za použití rekombinantního alergenu Phl p 5. Pro statistické zhodnocení byly použity metody analýzy variance a neparametrický párový t-test.

Do studie bylo zařazeno celkem 27 pacientů, z toho 13 mužů a 14 žen. Průměrný věk mužů v době zařazení do studie byl  $27,73 \pm 5,02$  roku, průměrný věk žen v době zařazení do studie byl  $32,00 \pm 9,54$  roku. Patnácti pacientům (7 mužů ve věku 20 – 33 let, průměrný věk  $25,80 \pm 5,36$  roku, a 8 žen ve věku 22 – 56 let, průměrný věk  $34,20 \pm 13,20$  roku) byla aplikována v souladu s aplikačním schématem vakcína Phostal. Dvanácti pacientům (6 mužů ve věku 22 – 35 let, průměrný věk  $29,33 \pm 4,55$  roku, a 6 žen ve věku od 24 do 41 let, průměrný věk  $31,00 \pm 7,62$  roku) byla aplikována v souladu s aplikačním schématem vakcína H-AL depot společnosti Sevapharma..

U pacientů léčených vakcínou Phostal byla hladina specifických IgE protilátek proti bojínku na začátku léčby  $34,125 \pm 28,66$  ( $n = 15$ ), na konci léčby  $17,615 \pm 13,91$  ( $n = 15$ ) ( $F = 4,265$ ,  $P < 0,05$ ). Hladina specifických IgE protilátek proti jílku byla u pacientů léčených vakcínou Phostal na začátku léčby  $35,154 \pm 28,51$  ( $n = 15$ ), po ukončení léčby  $14,653 \pm 14,91$  ( $n = 15$ ) ( $F = 1,085$ ,  $P > 0,05$ ).

U pacientů léčených vakcínou H-AL depot společnosti Sevapharma byla hladina specifických IgE protilátek proti bojínku na začátku léčby  $38,264 \pm 35,85$  ( $n = 12$ ), po ukončení léčby  $20,825 \pm 34,01$  ( $n = 12$ ) ( $F = 1,111$ ,  $P \gg 0,05$ ). Hladina specifických IgE protilátek proti jílku byla u pacientů léčených vakcínou H-AL depot společnosti Sevapharma na začátku léčby  $39,040 \pm 35,3$  ( $n = 12$ ), po skončení léčby  $22,947 \pm 34,41$  ( $n = 12$ ) ( $F = 1,052$ ,  $P \gg 0,05$ ).

V průběhu léčby nedošlo ke změnám v hladinách celkových IgE protilátek u žádné ze sledovaných dvou skupin pacientů.

V průběhu titrace vakcinační dávky vakcíny Phostal došlo k signifikantnímu zvýšení protilátkové IgG4 odpovědi z počáteční hladiny  $219,60 \pm 79,07$  na hladinu  $972,23 \pm 82,56$  ( $t = 23,738$ ,  $P < 0,001$ ). V následujícím průběhu léčby již k statisticky významnému zvyšování IgG4 protilátkové odpovědi nedocházelo.

Při použití vakcíny H-AL depot se protilátková IgG4 odpověď v průběhu titrace vakcinační dávky prakticky neměnila. Po aplikaci první dávky dosáhla úrovně  $239,17 \pm 133,77$ , po skončení titrace dávky  $302,46 \pm 219,07$ .

U pacientů léčených vakcínou Phostal byla úplná reakce na léčbu zaznamenána u 47 % pacientů, částečná reakce u 53 % pacientů a u všech ošetřených pacientů bylo onemocnění po celou dobu léčby pod kontrolou. U pacientů léčených vakcínou H-AL depot. byla úplná reakce zaznamenána u 18 % pacientů, částečná reakce u 27 % pacientů a kontrola nad onemocněním byla získána u 73 % pacientů. 26 % pacientů ošetřených vakcínou H-AL depot. na léčbu vůbec nereagovala. Těmto výsledkům odpovídal také vývoj symptomskóre, které u pacientů ošetřených vakcínou Phostal kleslo z hodnoty 2,65 na 1,12, zatímco u pacientů ošetřených vakcínou H-AL depot se prakticky nezměnilo (2,73 na začátku léčby, 2,27 na konci léčby).

U pacientů léčených vakcínou Phostal byl na počátku léčby výsledek prick testu proti bojínku  $12,07 \pm 4,28$  mm a na konci léčby  $4,07 \pm 2,28$  mm. Zjištěný rozdíl se ukázal jako statisticky významný ( $P < 0,001$ ). Obdobné výsledky byly u pacientů léčených vakcínou Phostal zaznamenány také proti jílku. Na počátku léčby dosáhl prick test hodnoty  $11,87 \pm 2,88$ , respektive na konci léčby  $3,27 \pm 1,67$  mm. Také v tomto případě byl rozdíl hodnot prick testu na začátku a na konci léčby statisticky významný ( $P < 0,001$ ).

Ve skupině pacientů, kterým byla aplikována vakcína H-AL depot byly hodnoty prick testu proti bojínku na začátku léčby  $10,75 \text{ mm} \pm 2,26 \text{ mm}$  a na konci léčby  $7,67 \pm 2,15 \text{ mm}$ . Rozdíl mezi těmito hodnotami nebyl statisticky významný. Hodnota prick testu

proti jílku byla u této skupiny pacientů na počátku léčby  $10,25 \text{ mm} \pm 2,53 \text{ mm}$  a na konci léčby  $5,67 \text{ mm} \pm 2,15 \text{ mm}$ . Tyto dvě hodnoty se ukázaly jako statisticky významné ( $P < 0,01$ ).

Ze získaných výsledků vyplývá, že při použití vakcíny Phostal společnosti Stallergens bylo ve srovnání s vakcínou H-AL společnosti Sevapharma dosaženo prokazatelně příznivější klinické odezvy, která byla podložena také vývojem IgG4 protilátkové odpovědi.

## 6 Summary

Allergic diseases such as seasonal allergic rhinitis or asthma currently represent major medical problem with serious socio-economic effects. Therefore still greater attention is being paid to the possibilities of causal treatment of these diseases; and specific allergen immunotherapy can be categorized among these possibilities. This paper aims to compare the clinical effectivity of two routinely used vaccines on the Czech market, the Phostal vaccine from Stallergen and the Sevapharma's H-AL vaccine.

Patients with seasonal allergic rhinitis of both genders were included in the study. The IgE antibody level of patients included in the study was determined at the beginning, their skin prick test was taken and their overall clinical status was assessed using Symptom Score. Throughout the monitoring all changes in health state of the patients were regularly evaluated, once a year a control skin prick test was taken and subsequent clinical treatment was recommended accordingly to ascertained findings. During the whole treatment the development of IgG4 antibody level of every patient was being monitored. For the assessment of the IgG4 level the ELISA method with the use of recombinant allergen Phl p 5 was utilized. For statistical evaluation methods of analysis of variance and non-parametric methods of paired sample t-test were used.

Overall 27 patients were included in the study, of which 13 were men and 14 women. In the time of entering the study the mean age of men was  $27,73 \pm 5,02$  years and the mean age of women was  $32,00 \pm 9,54$  years. Fifteen patients (7 men from 20 to 33 years of age, mean age  $25,80 \pm 5,36$ , 8 women from 22 to 56 years old, mean  $34,20 \pm 13,20$  roku) were applied the Phostal vaccine in accordance with the application scheme. Twelve patients (6 men from 22 to 35 years of age, mean age  $29,33 \pm 4,55$  and 6 women from 24 to 41 years of age, mean age  $31,00 \pm 7,62$ ) were applied the Sevapharma's H-AL vaccine in accordance with the application scheme.

The specific IgE antibody level to *Phleum pratense* allergens of patients treated with the Phostal vaccine was  $34,125 \pm 28,66$  ( $n = 15$ ) at the beginning of the treatment and  $17,615 \pm 13,91$  ( $n = 15$ ) ( $F = 4,265$ ,  $P < 0,05$ ) at the end of the treatment. The specific IgE antibody level to *Lolium sp.* allergens of patients treated with the Phostal vaccine was  $35,154 \pm 28,51$  ( $n = 15$ ) at the beginning of the treatment and  $14,653 \pm 14,91$  ( $n = 15$ ) ( $F = 1,085$ ,  $P > 0,05$ ) after the treatment.

The specific IgE antibody level to *Phleum pratense* allergens of patients treated with the Sevapharma's H-AL vaccine was  $38,264 \pm 35,85$  (n = 12) at the beginning of the treatment and  $20,825 \pm 34,01$  (n = 12) ( $F = 1,111$ ,  $P \gg 0,05$ ) at the end of the treatment. The specific IgE antibody level to *Lolium sp.* allergens of patients treated with the Sevapharma's H-AL vaccine was  $39,040 \pm 35,3$  (n = 12) at the beginning of the treatment and  $22,947 \pm 34,41$  (n = 12) ( $F = 1,052$ ,  $P \gg 0,05$ ) after the treatment. During the course of the treatment no change in the overall IgE antibody level occurred for any of these two monitored groups of patients.

During the titration of vaccine dosage of the Phostal vaccine significant increase in IgG4 antibody response occurred, from the beginning level of  $219,60 \pm 79,07$  to  $972,23 \pm 82,56$  ( $t = 23,738$ ,  $P < 0,001$ ) level. During the subsequent course of the treatment no other statistically significant increase in IgG4 antibody response took place.

When the H-AL vaccine was used the IgG4 antibody response practically did not change during the titration of vaccine dosage. After the application of the first dosage it reached the level of  $239,17 \pm 133,77$  and after the titration of the dosage the level of  $302,46 \pm 219,07$ .

Among the patients treated with the Phostal vaccine complete response to treatment was registered among 47 % of patients and partial response among 53 % of patients, with the disease being under control for the whole course of the treatment among all the patients. Among the patients treated with the H-AL vaccine complete response to treatment was registered among 18 % of patients and partial response among 27 % of patients and the disease was being under control among 73 % of patients. 26 % of patients medicated with H-AL vaccine did not react to the treatment at all. The development of the Symptom Score also corresponded with these findings, for the patients treated with the Phostal vaccine it decreased from the value of 2,65 to the value of 1,12, whilst for the patients treated with the H-AL vaccine practically nothing changed (2,73 at the beginning of the treatment, 2,27 at the end of the treatment).

The score of the skin prick test for *Phleum pratense* allergens was  $12,07 \pm 4,28$  mm at the beginning of the treatment and  $4,07 \pm 2,28$  mm at the end of the treatment for patients medicated with the Phostal vaccine. The ascertained difference proved to be statistically significant ( $P < 0,001$ ). Similar scores for patients medicated with the Phostal vaccine were also recorded for *Lolium sp.* allergens. At the beginning of the treatment the score of the skin prick test reached the value of  $11,87 \pm 2,88$ , at the end of the treatment  $3,27 \pm 1,67$  mm. In this case the difference in the scores of the skin prick test at

the beginning and at the end of the treatment test was statistically significant as well ( $P < 0,001$ ).

In the group of the patients who were applied the H-AL vaccine the scores of the skin prick test for *Phleum pratense* allergens was  $10,75 \text{ mm} \pm 2,26 \text{ mm}$  at the beginning of the treatment and  $7,67 \pm 2,15 \text{ mm}$  at the end of the treatment. The difference between these scores was not statistically significant. The score of the skin prick test for *Lolium sp.* allergens of this group of patients was  $10,25 \text{ mm} \pm 2,53 \text{ mm}$  at the beginning of the treatment and  $5,67 \text{ mm} \pm 2,15$  at the end of the treatment. These two scores showed to be statistically significant ( $P < 0,01$ ).

The ascertained results indicate that the clinical response to the use of Phostal vaccine from Stallergens in comparison to Sevapharma's H-AL vaccine showed to be more promising and it was preceded by the development of the IgG4 antibody response as well.



## 7 Přehled použité literatury

Aalberse R. C., van der Gaag R., van Leeuwen J., 1983: Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4 restricted response. *J. Immunol*, 130: 722-726.

Adjers K., Pessi T., Karjalainen J., Huhtala H., Hurme M., 2004: Epistatic effect of IL1A and IL4RA genes on the risk of atopy. *J Allergy Clin Immunol*; **113**: 445-7.

Ahlstedt S., Eriksson. N. E., 1977: Immunotherapy in atopic allergy-antibody titre and avidities during hyposensitization with birth and timothy pollen allergens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 55: 400–411.

Akdis C. A., Blesken T., Akdis M., Wuthrich B., Blaser K., 1998: Role of interleukin-10 in specific immunotherapy. *J. Clin. Invest.*, 102: 98–106.

Akoum, H., Tscopoulos A., Vornig H., Wallaert B., Dessaint J. P., Joseph M., Hamid Q., Tonnel A. B., 1996: Venom immunotherapy modulates interleukin-4 and interferon-messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes. *Immunology*, 87: 593–598.

Ambit A. J., Moir L. M., Olivek B. G., Hughes J. M., Alkhouri H., Ge Q., Burgess J. K., Blaf J. L., Roth M., 2007: Effect of IL-6 trans-signaling on the pro-remodeling phenotype of airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 292: 199-206.

Asano-Kato N., Fukagawa K., Okada N., Kawakita T., Takano Y., Dogru M., Tsubota K., Fujishima H., 2005: TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , and Th2 cytokines stimulate vascular endothelial growth factor production from conjunctival fibroblasts. *Exp Eye Res*; **80**: 555-60.

Barman S. S., 2006: The global burden of asthma. *Chest*, 130: 4-12.

Becker S, Devlin RB, Haskill JS. Differential production of tumor necrosis factor, macrophage colony stimulating factor, and interleukin 1 by human alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 1989; **45**: 353-61.

Bellinghause I., Metz G., Enk A. H., Christmann S., Knop J., Saloga J., 1997: Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th-2 to Th-1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur. J. Immunol.*, 27: 1131–1139.

Berger W. E., 2004: Allergic rhinitis in children: diagnosis and management strategie. *Paediatr. Druha*, 6: 233-250.

Bettini M., Vignali D. A. A., 2009: Regulatory T-cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol*, 21: 612-618.

Bluestone J. A., Abbas A. K., 2003: Natural versus adaptive regulatory T-cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 3: 253-257.

- Bousquet J. R., Lockey H. J., Malling E., Alvarez-Cuesta G. W., Canonica M. D., Chapman P. J., Creticos J. M., Dayer S. R., Durham P., Demoly et al., 1998a: Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 81: 401–415.
- Bousquet J., Lockey R., Malling H. J., 1998b: Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases: a WHO position paper. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 102:558-562.
- Buckner J. H., Ziegler S. F., 2008: Functional analysis of FOXP3. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1143: 151-169.
- Byron K. A., O'Brien R. M., Varigos G. A., Wootton A. M., 1994: Dermatophagoides pteronyssinus II-induced interleukin-4 and interferon-gamma expression by freshly isolated lymphocytes of atopic individuals. *Clin Exp Allergy*, 24: 878-83.
- Campbell E. M., Kunkel S. L., Strieter R. M., Lukacs N. W., 1998: Temporal role of chemokines in a murine model of cockroach allergen-induced airway hyperreactivity and eosinophilia. *J. Immunol.*, 161: 7047-53.
- Castillo Vizuite J. A., Mullol Miret J., 2008: Rhinitis and asthma comorbidity in Spain: the RINAIR study. *Arch. Bronconeumol.*, 44(11): 597-603.
- Cetinkaya F., Gelen S. A., Kervancioglu E., Oral E., 2009: Prevalence of asthma and other allergic diseases in children born after in vitro fertilisation. *Allergol. Immunopathol. (Madrid)*, 37(1): 11-13.
- Craig T. J., Sherkat A., Safae S., 2010: Congestion and sleep impairment in allergic rhinitis. *Curr. Allergy. Asthma Rep.*, 10(2): 113-121.
- Creticos P. S., 1997: Immunotherapy, 2nd Ed. In *Allergy*. A. P. Kaplan, ed. Saunders, Philadelphia, p. 726.
- Crimi N., Li Gotti F., Mangano G., Paolino G., Mastruzzo C., Vancheri C., Lisitano N., Polosa R., 2004. A randomized, controlled study of specific immunotherapy in monosensitized subjects with seasonal rhinitis: effect on bronchial hyperresponsiveness, sputum inflammatory markers and development of asthma symptoms. *Ann. Ital. Med. Int.*, 19(2): 98-108).
- Cromwell O., Hamid Q., Corrigan C. J., Barkans J., Meng Q., Collins P. D., Kay A. B., 1992: Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. *Immunol.*, 77: 330-337.
- Cua D. J., Sherlock J., Chen Y., Murphy C. A., Joyce B., Seymour B, Lucian L, To W., Kwan S, chudáková T et al., 2003: Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421: 744-748.

- Czerkinsky C., Anjuere F., McGhee J. R., George-Chandy A., Holmgren J., Kiény M. P., Fujiyashi K., Mestecky J. F., Pierrefite-Carle V., Rask C., Sun J. B., 1999: Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. *Immunol. Rev.*, 170:197-222.
- Dahl R., Kapp A., Colombo G., de Monchy J. G., Rak S., Emminger W., Rivas M. F., Ribel M., Durham S. R., 2006a: Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol*, 118(2): 434-440.
- Dahl R., Stender A., Rak S., 2006b: Specific immunotherapy with SQ standardized grass allergen tablets in asthmatics with rhinoconjunctivitis. *Allergy*, 61(2): 185-190.
- Davies J. M., Bright M. L., Rolland J. M., O'Hehir R. E., 2005: Bahia grass pollen specific IgE is common in seasonal rhinitis patients but has limited cross-reactivity with ryegrass. *Allergy*, 60(2): 251-255.
- De Andrade C. R., da Cunha Ibiapina C., Conçalves Alvim C., Fernandes Fontes M. J., de Lima Belizário Facury Iasmar L. M., Moreira Camargos P. A., 2008: Asthma and allergic rhinitis co-morbidity: a cross-regional questionnaire study on adolescents aged 13-14 years. *Prim. Care Respir.*, 17(4): 222-225.
- De S., Zelazny E. T., Souhrada J. F., Souhrada M., 1995: IL-1 beta and IL-6 induce hyperplasia and hypertrophy of cultured guinea pig airway smooth muscle cells. *J. Appl. Physiol.*, 78: 1555-1563.
- Des-Roches A., Paradox L., Menardo J. L., Bouges S., Daures J. P., Bousquet J., 1997: Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 99: 450-453.
- Devey M. E., Wilson D. V., Wheeler A. W., 1976: The IgG subclasses of antibodies to grass pollen allergens produced in hay fever patients during hyposensitization. *Clin. Allergy*, 6(3): 227-236.
- Dienz O., Rincon M., 2009: the effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clin. Immunol.*, 130: 27-33.
- Dolz I., Marínez-Cócerca C., Batolíme J. M., Cimarra M., 1996: A double-blind, placebo-controlled study of immunotherapy with grass-pollen extract Alutard SQ during a 3-year period with initial rush immunotherapy. *Allergy*, 51: 489-500.
- Dosna S. H., Marks G. B., Sporik R., Belosouva E. G., Car N. G., Peat J. K., 2001: Continued increase in the prevalence of asthma and hay fever. *Arch. Dis. Child.*, 84: 20-23.
- Durham S. R., Walker S. M., Varga E. M., Jacobson M. R., O'Brien F., Noble W., Till S. J., Hamid Q. A., Nouri-Aria K. T., 1999: Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N. Engl. J. Med.* 341(7): 468-475.

- Durham S. R., Yang W. H., Pedersen M. R., Johansen N., Rak S., 2006: Sublingual immunotherapy with once-daily grass allergen tablets: a randomized controlled trial in seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 117(4): 802-809.
- Eng P. A., Borer-Reinhold M., Heijnen I. A., Gnehm H. P., 2006: Twelve-year follow-up after discontinuation of preseasonal grass pollen immunotherapy in childhood. *Allergy*, 61: 198-201.
- Eng P. A., Reinhold M., Gnehm H. P. E., 2002: Long-term efficacy of preseasonal grass pollen immunotherapy in children. *Allergy*, 57: 306-312.
- Esch R. E., Klapper D. G., 1989a: Isolation and characterization of a major cross-reactive grass group-1 antigenic determinant. *Mol. Immunol.*, 26: 557-561.
- Esch R. E., Klapper D. G., 1989b: Identification and localization of allergenic determinants on grass group-1 antigens using monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 142: 179-184.
- Ebner C., Siemann U., Bohle B., Willheim M., Wiedermann U., Schenk S., Klotz F., Ebner H., Kraft D., Scheiner O., 1997: Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy*, 27:1007-15.
- Fahlbusch B., Müller W-D., Rudeschko O., Jäger L., Cromwell O., Fiebig H., 1998: Detection and quantification of group 4 allergens in grass pollen extracts using monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Allergy*, 28(7): 799-807.
- Fontenot J. D., Gavin M. A., Rudensky A. Y., 2003: Foxp3 programs the development and functions of CD4+CD25+ regulatory T-cells. *Nat. Immunol.*, 4: 330-336.
- Ford D., Baldo B. A., 1986: A re-examination of rey-grass (*Lolium perenne*) pollen allergens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol*, 81: 193-203.
- Freidhoff L. R., Ehrlich-Kautzky E, Grant J. H., Meyers D. A., Marsch D. G., 1986: A study of the human immune response to *Lolium perenne* (rye) pollen and its componets, Lol p I a Lol p II (rye I a rye II) I. Prevalence of reactivity to the allergens and correlations among skin test, IgE antibody, and IgG antibody data. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 78(6): 1190-1201.
- Frew A. J., Powell R. J., Corrigan C. J., Durham S. R., UK Immunotherapy Study Group, 2006: Efficacy and safety of specific immunotherapy with SQ allergen extract in treatment-resistant seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J. Allergy. Clin. Immunol*, 117(2): 319-325.
- Fujishima M., Hirokawa M., Fujishima N., Sawada K., 2005: TCR $\alpha\beta$  repertoire diversity of human naturally occurring CD4+CD25a regulatory T cells. *Immunol. Lett.*, 99: 193-197.

Gehlhar K., Schlaak M., Becker W., Bufe A., 1999: Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. *Clin. Exp. Allergy*, 29(4): 497-506.

Ghouri N., Hippisley-Cox J., Newton J., Sheikr A., 2008: Trends in the epidemiology and prescribing of medication for allergic rhinitis in England. *J. R. Soc. Med.*, 101(9): 466-472.

Gosset P., Malaquin F., Delneste Y., Wallaert B., Capron A., Joseph M., Tonnel A. B., 1993: Interleukin-6 and interleukin-1 $\alpha$  production is associated with antigen-induced late nasal response. *J Allergy Clin Immunol*; **92**: 878-90.

Griffith I. J., Smith P. M., Pollock J., Theerakulpisut P., Avjioglu A., Davies S., Hough T., Singh M. B., Simpson R. J., Ward L. D., Know R. B., 1991: Cloning and sequencing of Lol p I, the major allergenic protein of rye-grass pollen. *FEBS Lett.*, 297(2): 210-215.

Hashimoto C., Hudson K. L., Anderson K. V., 1988: The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52: 269-279.

Hellings P. W., Kasran A., Liu Z., Vnadekerckhove P., Wuyts A., Overgergh L., Mathieu C., ceuppens J. L., 2003: Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 28: 42-50.

Ho L. H., Ohno T., Oboki K., Kajiwara N., Suto H., Iikura M., Okayama Y., Akira S., Saito H., Galli S. J., Nakae S., 2007: IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-Fc $\epsilon$ RI signals. *J Leukoc Biol*; **82**: 1481-90.

Hori S., Nomura T., Sakaguchi S., 2003: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299: 1057-1061.

Horner A. A., Raz E., 2000: Immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotide: a novel mucosal adjuvant. *Clin. Immunol.*, 95:S19-29.

Horner, A. A., S. K. Datta, K. Takabayashi, I. M. Belyakov, T. Hayashi, N. Cinman, M. D. Nguyen, J. H. Van Uden, J. A. Berzofsky, D. D. Richman, and E. Raz. 2001. Immunostimulatory DNA-based vaccines elicit multifaceted immune responses against HIV at systemic and mucosal sites. *J. Immunol.* 167(3): 1584-1591.

Hsieh C. S., Zheng Y., Liang Y., Fontenot J. D., rudensky A. Y., 2006: An intersection between the self-reactive regulatory and non-regulatory T cell receptor repertoires. *Nat. Immunol.*, 7: 401-410.

Hültner L., Kölsch S., Stassen M., Kaspers U., Kremer J. P., Mailhammer R., Moeller J., Broszeit H., Schmitt E., 2000: In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. *J Immunol*; **164**: 5556-63.

Chakir J., Shannon J., Molet S., Fukakusa M., elias J., Laviolette M., Boulet L. P., Hamid Q., 2003: Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect

of steroids on TGF- $\beta$ , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111: 1293-1298.

Iikura M., Suto H., Kajiwara N., Oboki K., Ohno T., Okayama Y., Saito H., Galli S. J., Nakae S., 2007: IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest*, **87**: 971-8.

Ishizaka K., Ishizaka T., Hornobrook M M., 1966: Physicochemical properties of reaginic antipody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E globulin antipody. *J. Immunol.*, 97: 840-853.

Iwakura Y., Nakae S., Saijo S., Ishigame H., 2008: The roles of IL-17A in inflammatory immune response and host defense against pathogens. *Immunol. Rev.*, 266: 55-79.

Jacobsen L., Niggemann B., Dreborg S., Ferdouši H. A., Hlaken S., Høst A., Koivikko A., Norbert L. A., Valovirta E., Wahn U., Möller C., 2007: Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy*, 62: 943-948.

Jacobsen L., Petersen N. B., Wihl J. A., Løwenstein H., Ipsen H., 1997: Immunotherapy with partially purified and standardized tree pollen extracts. IV. Results from long-term (6-year) follow-up. *Allergy*, 52: 914-920.

Janeway C. A., Medzhitov R., 2002: Innate immune recognition. *Annu Rev. Immunol.*, 20: 197-216.

Jankovic D., Kullbarg M. C., Noben-Trauth N., Caspar P., Paul W. E., Sher A., 2000: Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4<sup>+</sup> lymphocytes with a Th2 cytokine profile. *J. Immunol.*, 164: 3047-3055.

Jatakanon A., Uasuf C., Matiak W., Lim S, Chung K. F., Barnes P. J., 1999: Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 160: 1532-1539.

Johansson S. G., Bennich H., 1967: Immunological studies of an atypical (myeloma) immunoglobulin. *Immunology*, 13: 381-394.

Johnson P., Marsh D. G., 1965: Allergens from common rye grass pollen (*Lolium perenne*). The allergenic determinants and carbohydrate moiety. *Immunochem.*, 3: 101-110.

Joki-Erkila V. P., Karjalainen J., Hulkkonen J., Pessi T., Nieminen M. M., Aromaa A., Klaukka T., Hurme M., 2003: Allergic rhinitis and polymorphisms of the interleukin 1 gene complex. *Ann Allergy Asthma Immunol*; **91**: 275-9.

Josefowicz S. Z., Rudensky A., 2009: Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity*, 30: 616-625.

- Jutel M., Pichler W. J., Skrbic D., Urwyler A., Dahinden C., Müller U. R., 1995: Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol.*, 154(8): 4187-94.
- Jutel M., Jaeger L., Suck R., Meyer H., Fiebig H., Cromwell O., 2005: Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 21: 77-83.
- Kahn C. R., Marsh D. G., 1986: Monoclonal antibodies to the major *Lolium perenne* (fye grass) pollen allergen Lol p 1 (Rye 1). *Mol. Immunol.*, 23: 1281-1288.
- Kaisho T., Akira S., 2002: Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim. Biophys Acta*, 1589: 1-13.
- Kandere-Grzybowska K., Letourneau R., Kempuraj D., Donelan J., Poplawski S., Souher W., Athanassiou A., Theopharides T. C., 2003: IL-1 induces vesicular secretion of IL-6 without degranulation from human mast cells. *J Immunol*; **171**: 4830-6.
- Kaplan M. H., Schindler U., Smiley S. T., Grusby M. J., 1996: Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, 4: 313-319.
- Karjalainen J., Hulkkonen J., Pessi T., Huhtala H., Nieminen M. M., Aromaa A., Klaukka T., Hurme M., 2002a: The IL1A genotype associates with atopy in nonasthmatic adults. *J Allergy Clin Immunol*; **110**: 429-34.
- Karjalainen J., Nieminen M. M., Aromaa A., Klaukka T., Hurme M., 2002b The IL-1b genotype carries asthma susceptibility only in men. *J Allergy Clin Immunol*; **109**: 514-6.
- Kasprowic D. J., Smallwood P. S., Tyznik A. J., Ziegler S. F., 2003: Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune response in vivo through regulation of CD4+ T cell effector function. *J. Immunol.*, 171: 1216-1223.
- Kelly-Welch A. E., Hanson E. M., Boothby M. R., Keegan A. D., 2003: Interleukin 4 (IL-4) and IL-13 signaling connections maps. *Science*, 300: 1527-1528.
- Kenney J. S., Baker C., Welch M.R., Altman L.C., 1994: Synthesis of interleukin-1a, interleukin-6, and interleukin-8 by cultured human nasal epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol*; **93**: 1060-7.
- Khatti R., Cox T., Yasayko S. A., Ramsdell F., 2003: An Essential role for scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.*, 4: 337-342.
- Kicic A., Sutano E. N., Stevens P. T., Knight D. A., Stisk S. M., 2006: Intrinsic biochemical and functional differences in bronchial epithelial cells of children with asthma. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 174: 1110-1118.
- Kimura I., Tanizaki Y., Goda Y., Komagoe H., Kitani H., 1985: Decrease in reactivity of basophils by immunotherapy with house dust extract. *Clin. Exp. Allergy*, 15: 1-7.

- King C., Brennan S., Thompson P. J., Stewart G. A., 1998: Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. *J. Immunol.*, 161: 3645-3651.
- King T. P., Hoffman D., Lowenstein H., Marsh D. G., Platts-Mills T. A., Thomas W., 1995: Allergen Nomenclature. *Allergy*, 50(9): 765-774.
- Knox R. B., 1979: *Pollen and Allergy*. London, Edward Arnold Limited, 60 p.
- Korn T., Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V. K., 2009: IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 27: 485-517.
- Krčmová I, Andrýs C., Hanzálková Y., Chládková J., Krejsek J., 2009: Srovnání účinnosti subkutánní a sublinguální specifické alergenové imunoterapie v klinických a laboratorních parametrech. *Alergie* 1/2009: 16-24.
- Kun C., Homer R. J., Zhu Z., Ward N., Flavell R. A., Geba G. P., Elias J. A., 2000: Airway hyperresponsiveness and airway obstruction in transgenic mice. Morphologic correlates in mice overexpressing interleukin (IL)-11 and IL-6 in the lung. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 22: 289-295.
- Langrish C. L., Chen Y., Blumenschein W. M., Mattson J., Baham B., Sedgwick J. D., McClanahan T., Kastelein R. A., Cua D. J., 2005: IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.*, 201: 233-240.
- Lee S. A., Fitzgerald S. M., Huang S. K., Li C., Chi D. S., Milhorn D. M., Krishnaswamy G., 2004: Molecular regulation of interleukin-13 and monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mast cells by interleukin-1beta. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 31: 283-91.
- Lee S. I., Shin M. H., Lee H. B., Lee J. S., Son B. K., Koh Y. Y., Kim K. E., Ahn Y. O., 2001: Prevalence of symptoms of asthma and other allergic diseases in Korean children: a nationwide questionnaire survey. *J. Korean Med. Sci.*, 16: 155-164.
- Li J., Xiang X., Li J., Li W., Liu S., 2010: Change and significance of peripheral blood Th17 cells in patients with acute asthma. *J. Cent. South Univ (Med. Sci.)*, 35: 129-133.
- Locksley R. M., 2009: Nine lives: plasticity among T helper cell subsets. *J. Exp. Med.*, 206: 1643-1646.
- Looney R. J., Pudiak D., Rosenfeld S. I., 1994: Cytokine production by mite-specific T cells from donors with mild atopic disease. *J Allergy Clin Immunol.*, 93: 476-483.
- Louis R., Lau L. C., Bron A. O., Roldaan A. C., Radermecker M., Djukanovic R., 2000: The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 161: 9-16.
- Louis R., Lau L. C., Bron A. O., Roldaan A. C., Radermecker M., Djukanović R., 2000: The relationship between airways inflammation and asthma severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 161: 9-16.



- Malling H. J., 1998: Immunotherapy as an effective tool in allergy treatment. *Allergy*, 53(5):461-472.
- Mantel P., et al., 2007: GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol.*, 5: e329.
- Marini M., Vittori E., Hollemborg J., Mattoli S., 1992: Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J. Aller. Clin. Immunol.*, 89: 1001-1009.
- Marsh D. G., Milner F. H., Johnson P., 1966: The allergenic activity and stability of purified allergens from the pollen of common rye grass (*Lolium perenne*). *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 29: 521-535.
- Martinó-Cócerca C., Sastre J., Cimarra M., Quirce S., Fernandez-Rivas M., Enriquez-Matas A., Rodríguez-Álvarez M., Martín S., 2010: Immunotherapy with a Phleum pratense allergen extract induces an immune response to a grass-mix allergen extract. *J. Investic. Allergol. Clin. Immunol.*, 20: 13-19.
- McGeachy M. J., Cua D. J., 2008: Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*, 28: 445-453.
- McHugh S. M., Deighton J., Stewart A. G., Lachmann P. J., Ewan P. W., 1995: Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from a TH-2 to a TH-1 dominant pattern: comparison of rush and conventional immunotherapy. *Clin Exp Allergy.*, 25(9): 828-38.
- McKinley L., Alcorn J. F., Peterson A., Dupont R. B., Kapadia S., Logar A., Henry A., Irvin C. G., Piganelli J. D., Ray A., Kolls J. K., 2008: TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J. Immunol.*, 181: 4089-4097.
- Møllerup M. T., Hahn G. W., Poulsen L. K., Malling H., 2000: Safety of allergen-specific immunotherapy: relation between dosage regimen, allergen extract, disease and systemic side-effects during induction treatment. *Clin. Exp. Allergy*, 30(10): 1423-1429.
- Molet S., Hamid Q., Davoine F., Nutku E., Taha R., Page N., Olivenstein R., Elias J., Chakir J., 2001: IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108: 430-438.
- Mosbech H., Østerballe O., 1988: Does the effect of immunotherapy last after termination of treatment? *Allergy*, 43: 523 – 529.
- Moseley T. A., Haudenschild D. R., Rose L., Reddi A. H., 2003: Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 14: 155-174.

- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL., 1986: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.*;136:2348–2357.
- Mouro M., Russello M., Incorvaia C., Gazzola G. B., Di Cara G., Frati F., 2007: Comparison of efficacy, safety and immunologic effects of cubcutaneous and sublingual immunotherapy in biích pollinosis: a rondomized study. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.*, 39: 119-122.
- Murphy C. A., Langrish C. L., Chen Y., Blumenschein W., M.cClanahan T., Kastelein R. A., sedgwick J. D., Cua D. J., 2003: Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in point autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.*, 198: 1951-1957.
- Nambu A., Nakae S., 2010: IL-1 and Allergy. *Allergol. Int.*, 59: 125-135..
- Nash S. D., Sullivan S. D., Mackoiak J., 2000: Optimizing duality of care and cost effectiveness in treating allergic rhinitis in a manager care setting. *Am. J. manag. Care*, 6: S3-15.
- Nathan R. A., 2007: The burden of allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc.*, 28: 3-9.
- Navarro A., Valero A., Juliá B., Quirce S., 2008: Koexistence of asthma and allergic rhinitis in adult patiens attending allergy clinics. ONEAIR study. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 18(4): 233-238.
- Neveu W. A., Allard J. L., Maymond D. M., Mourassa L. M., Burns S. M., Bunn J. Y., Irvin C. G., Gaminsky D. A., Rincon M., 2010: Elevation of IL-6 in the allergic asthmatic airway is independent of inlamination but associates with loss central airway function. *Resp. Res.*, 11: 28-37.
- Nomura T., Sakaguchi S., 2007: Foxp3 and aire in thymus-generated Treg cells: a link in self-tolerance. *Nat. Immunol.*, 8: 333-334.
- Noon L., 1911: Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet*, 1: 1572.
- Nouri-Aria K. T., Wachholz P. A., Francis J. N., Jacobson M. R., Walker S. M., Wilcock L. K., Staple S. Q., Aallberse R. C., Till S. J., Durham S. R., 2004: Grall pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J. Immunol*, 172: 3252-3259.
- Nüsslein-Volhard C., Kluding H., Jürgens G., 1985: Genes affecting the segmental subdivision of the Drosophila embryo. *Cold Spring Harb. Gympl. Quant. Biol.*, 50: 145-154.
- Oda N., Canelos P. B., Essayan D. M., Plunkett B. A., Myers A. C., Juany S. K., 2005: Interleukin-17F induces pulmonary neutrophilia and amplifies antigen-induced allergic response. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 171: 12-18.

- Oghiso Y, Kubota Y. Enhanced interleukin 1 production by alveolar macrophages and increase in Ia-positive lung cells in silica-exposed rats. *Microbiol Immunol* 1986; **30**: 1189-98.
- Oldfield W. L., Kay A. B., Larché M., 2001: Allergen-derived T cell peptide-induced late asthmatic reactions precede the induction of antigen-specific hyporesponsiveness in atopic allergic asthmatic subjects. *J Immunol.*, 167: 1734-1739.
- Ong E. K., Griffith I. J., Knox R. B., Singh M. B., 1993: Cloning of a cDNA encoding a group-V (group-IX) allergen isoform from rye-grass pollen that demonstrates specific antigenic immunoreactivity. *Gene*, 134(2): 235-240.
- Ong E. K., Knox R. B., Singh M. B., 1995: Mapping of the antigenic and allergenic epitopes of Lol p Vb using gene fragmentation. *Mol. Immunol.*, 32: 295-302.
- Oppmann B., Lesley R., Blom B., Timans J. C., Xu Y., Hunte B., Vega F., Yu N., Wang J., Singh K, et al., 2000: Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, 13: 715-725.
- Ortolani C., Pastorelo E., Moss R. B., Hsu Y. P., Restuccia M., Joppolo G., Miadonna A., Connelli U., Halpern G., Zanussi C., 1984: Grass pollen immunotherapy: a single double-blind, placebo-controlled study in patients with grass pollen-induced asthma and rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 73: 283-290.
- Ouyang W., Kolls J. K., Zheng Y., 2008: The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines inflammation. *Immunity*, 28: 454-467.
- Pajno G., Barberio G., De Luca F., Morabito L., Parmiani S., 2001: Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study. *Clin. Exp. Allergy*, 31: 1391-1397.
- Park H., Li Z., Yang X. O., Chány S. H., Nurieva R., Wang Y. H., Wang Y., Hood L., Zhu Z., Tian Q., Dong C., 2005: A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.*, 6: 1133-1141.
- Pasare C., Dedzhitov R., 2003: Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Nat.*, 441: 1033-1036.
- Pawankar R., Bunnag C., Chen Y., Fukuda T., Kim Y. Y., Le L. T., Huong le T. T., O'Hehir R. E., Ohta K., Vichyanond P., Wang D. Y., Zhoní N., Khaltayev N., Bouquet J., 2009: Allergic rhinitis and its impact on asthma update (ARIA 2008) – western and Asian-Pacific perspective. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, 27(4): 237-243.
- Penagos M., Compalati E., Tarantini F., Baena-Caqnani R., Huerta J., Passalacqua G., Canonica G. W., 2006: Efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis in pediatric patients 3 to 18 years of age: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled, double-blind trials. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 97(2): 141-148.

- Perez M., Ishioka G. Y., Walker L. E., Chesnut R. W., 1990: cDNA cloning and immunological characterization of the rye grass allergen Lol p 1. *J. Biol. Chem.*, 265: 16210-16215.
- Powell R. J., Frew A. J., Corrigan C. J., Durham S. R., 2007: Effect of grass pollen immunotherapy with Alutard SQ on quality of life in seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *Allergy*, 62(11): 1335-1338.
- Praunzitz C., Küstner H., 1921: Studien über die Ueberempfindlichkeit. *Zentralbl. Baktriol. Orig.*, 86: 160.
- Qui Z., Fujimura M., Kurashima K., Nakao S., Mukaida N., 2004: Enhanced airway inflammation and decreased subepithelial fibrosis in interleukin 6-deficient mice following chronic exposure to aerosolized antigen. *Clin. Exp. Allergy*, 34: 1321-1328.
- Reed S. D., Lee T. A., McCrory D. C., 2004: The economic burden of allergic rhinitis: a critical evaluation of the literature. *Pharmacoeconom.*, 22: 345-361.
- Reha C. M., Ubru A., 2007: Specific immunotherapy is effective in the prevention of new sensitivities. *Allergol. Immunopathol.*, 35: 44-51.
- Roberts G., Hurley C., Turcanu V, Lack G., 2006: Grass pollen immunotherapy as an effective therapy for childhood seasonal allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol* 117(2): 263-268.
- Rossi R. E., Monasterolo G., 2004: Evaluation of recombinant and native timothy pollen (rPhl p 1, 2, 5, 6, 7, 11, 12 and nPhl p 4)-specific IgG4 antibodies induced by subcutaneous immunotherapy with timothy pollen extract in allergic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 135: 44-53.
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M., 1995: Immunologic self-tolerance maintained by activated T-cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$  chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance cause various autoimmune diseases. *J. Immunol.*, 155: 1151-1164.
- Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T. Ono M., 2008: Regulatory T-cells and immune tolerance. *Cell*, 133: 775-787.
- Sánchez-Lerma B., Morales-Chirivella F. J., Peñuelas I., Guerra C. B., Lugo F. M., Aguinaga-Ontoso I., Cuillén-Grima F., 2009: High Prevalence of Asthma and Allergic Diseases in Children Aged 6 and 7 Years from the Canary Islands: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *J. Investic. Allergol. Clin. Immunol.*, 19(5): 383-390.
- Secrist H., Chelen C. J., Wen Y., Marshall J. D., Umetsu D. T., 1993: Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med.*, 178: 2123-30.
- Settipane R. A., 2003: Rhinitis. A dose of epidemiological reality. *Allergy Asthma Proc.*, 24: 147-154.

Shevach E. M., 2009: Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 30: 636-645.

Scheffold A., Murphy K. M., Hofer T., 2007: Competition for cytokines: T(reg) cells tak all. *Nat. Immunol.*, 8: 1285-1287.

Sidoli A., Tamborini E., Giuntini I., Levis S., Volonte G., Pains C., de Lalla C., Siccardi A. G., Baralle F. E., Galliani S., Arosio P., 1993: Cloning, expression and immunological characterization of recombinant *Lolium perenne* allergen Lol p 2. *J. Biol. Chem.*, 268: 21819-21825.

Sim T. C., Grant J. A., Hilsmeier K. A., Fukuda Y., Alam R., 1994: Proinflammatory cytokines in nasal secretions of allergic subjects after antigen challenge. *Am J Respir Crit Care Med*; **149**: 339-44.

Singh M. B., Hough T., Theerankulpisut P., Avjioglu A., davies S., Smith P. M., Taylor P., Simpson R. J., Ward I. D., McCluckey J., Puy R., Knox R. B., 1991: Isolation of cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: intracellular targeting to the amyloplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88(4): 1384-1388.

Singh M. B., Smith P. M., Knox R. B., 1990: Molecular biology of rye-grass pollen allergens. *Monogr. Allergy*, 28: 101-120.

Smart I. J., Tuddenham W. G., Knox R. B., 1979: Aerobiology of grass pollen in the city atmosphere of Melbourne: effects of weather parameters and pollen sources. *Aust. J. Bot.*, 27: 333-342.

Smith P. M., Ong E. K., Knox R. B., Singh M. B., 1994: Immunological relationships among group I and group V allergens from grass pollen. *Mol. Immunol.*, 31(6): 491-498.

Sonuhauser F. H., Braun-Fahrländer C., Wildhaber J. H., 2005: the burden of asthma in children: a European perspective. *Pediatr. Respir. Rev.*, 6: 2-7.

Staff I. A., Taylor P. E., Smith P., Singh M. B., Konx R. B., 1990: Cellular locatiozation of water soluble, allergenic proteins in rye-grass (*Lolium perenne*) pollen using monoclonal and specific IgE antibodies with immuno-gold probes. *Histochem J.*, 22(5): 276-290.

Stanworth D. R., Humphrey J. H., Bennich H., Johansson S. G., 1967: Specific inhibition of the Prausnitz-Küstner reaction by an atypical human myeloma protein. *Lancet*, 2: 330-332.

Stassen M., Arnold M., Hültner L., Miller C., Neudörfl C., Reineke T., Schmitt E., 2000: Murine bone marrow-derived mast cells as potent producers of IL-9: costimulatory function of IL-10 and kit ligand in the presence of IL-1. *J Immunol*; **164**: 5549-55.

Stipič-Markovič A., Pěvec B, Pěvec M. R., custovič A, 2003: Prevalence of symptom sof asthma, allergic rhinitis, conjunctivitis and atopic sczema: ISAAC (International Study of

Asthma and Allergies in Childhood) in population of schoolchildren in Zagreb. *Acta Med. Croatica*, 57(4): 281-285.

Suphioglu C., Singh M. B., Taylor P., Bellomo R., Homes P., Puy R., Knox R. B., 1992: Mechanism of grass-pollen-induced asthma. *Lancet*, 339: 569-572.

Takaki H., et al., 2008: STAT6 inhibits TGF-beta1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *J. Biol. Chem.*, 283: 14955-14962.

Takeda K., Akira S., 2001: Regulation of innate immune response by Toll-like receptors. *Jpn. J. Infect Dis.*, 54: 209-219.

Tamborini E., Brandazza A., de Lalla C., Musco G., Siccardi A. G., Arosio P., Sidoli A., 1995: recombinant allergen Lol p 2: expression, purification and characterization. *Mol. Immunol.*, 32: 505-513.

Tankersley M. S., Walker R. L., Butler W. K., Hagan L. L., Napoli D. C., Freeman T. M., 2002: Safety and efficacy of an imported fire ant rash immunotherapy protocol with and without prophylactic treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 109(3): 556-562.

Tone Y., et al., 2008: Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.*, 9: 194-202.

Umetsu D. T., Akbari O., Dekruyff R. H., 2003: Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 112: 480-487.

ÚZIS, 2010: Alergologie a klinická imunologie – činnost oboru v Jihomoravském kraji v roce 2009. Brno: 1-9.

van Neerven R. J., van de Pol M. M., Wierenga E. A., Aalberse R. C., Jansen H. M., Kapsenberg M. L., 1991a: Peptide specificity and HLA restriction do not dictate lymphokine production by allergen-specific T-lymphocyte clones. *Immunology.*, 82: 351-356.

van Neerven R. J., van de Pol M. M., van Milligen F. J., Jansen H. M., Aalberse R. C., Kapsenberg M. L., 1994b: Characterization of cat dander-specific T lymphocytes from atopic patients. *J Immunol.*, 152: 4203-4210.

Van Neerven R. J., Wikborg T., Lund G., Jacobsen B., Brich-Nielsen A., Arned J., Ipsen H., 1999: Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. *J. Immunol.*, 163: 2944-2952.

Van Ree R., van Leeuwen W. A., Dieges P. H., 1997: Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy*, 27: 68-74.

Van Ree R., van Leeuwen W. A., van den Berg M., Weller H. H., Aalberse R. C., 1994: IgE and IgG cross-reactivity among Lol p 1 and Lol 2/3. Identification of the C-termini of Lol p 1, 2, and 3 as cross-reactive structures. *Allergy*, 49: 254-261.

Venuprasad K., et al., 2008: The E3 ubiquitin ligase *tich* regulates expression of transcription factor Foxp3 and airway inflammation by enhancing the function of transcription factor TIEG1. *Nat. Immunol.*, 9: 245-253.

Vieira F. A. M., 1995: Polinose no Brasil. In: Negreiros E. B., Ungier C.: *Alergologia clínica*. Sao Paulo, Atheneu: 106-111.

Vithanage H. I., Howlett B. J., Jobson S., Knox R. B., 1982: Immunocytochemical localization of water soluble glycoproteins, including group-1 allergen, in pollen of regrass, *Lolium perenne*, using ferritin labelled antibody. *Histochem. J.*, 14(6): 949-966.

Wachholz P. A., Durham S. R., 2004: Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. *Curr. Opin. Allergy. Clin. Immunol.*, 4: 313-318.

Wakashin H., Virose K., Maezawa Y., Kagami S., Suto A., Watanabe N., Saito Y., Hatano M., Tokuhisa T., Iwakura Y., Puccetti P., Iwamoto I., 2008: IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 178: 1023-1032.

Walker S. M., Pajno G. B., Lima M. T., Wilson D. R., Durham S. R., 2001: Grass pollen immunotherapy for seasonal rhinitis and asthma: a randomized, controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107(1): 87-93.

Weaver C. T., Harrington L. E., Mangan P. R., Gavrieli M., Murény K. M., 2006: Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 24: 677-688.

Wilcock L. K., Francis J. N., Durham S. R., 2006: IgE-facilitated antigen presentation: role in allergy and the influence of allergen immunotherapy. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, 26: 333-347.

Winther L., Malling H. J., Moseholm L., Mosbech H., 2000: Allergenspecific immunotherapy in birch- and grass-pollen-allergic rhinitis. I. Efficacy estimated by a model reducing the bias of annual differences in pollen counts. *Allergy*, 55(9): 818-826.

Workman C. J., Szymczak-Workman A. L., Collison L. W., Pillai M. R., Vignali D. A. A., 2009: The development and function of regulatory T cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66: 2603-2622.

Würtzen P. A., Lund G., Lund K., Arvidsson M., Rak S., Ipsen H., 2008: A double-blind placebo-controlled birch allergy vaccination study II: correlation between inhibition of IgE binding, histamine release and facilitated allergen presentation. *Clin. Exp. Allergy*, 38: 1290-1301.

Wüthrich B., Schindler C., Leuenberger P., Ackermann-Liebrich P., 1995: Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA study). *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 106(2): 149-156.

- Wutrich B., 1989: Epidemiology of the allergic diseases: are they really on the increase? *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 90: 3-10.
- Yamagiwa S., Gray J. D., Hoshimoto S., Horwith D. A., 2001: A role for TGF- $\beta$  in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J. Immunol.*, 166: 7282-7289.
- Yamanchi K., Tamura G., Akasaka T., Chiba T., Honda T., Kishi M., Kuronuma T., Matsubara A., Morikawa T., Ogawa H., Ohta N., Okada M., Sasaki M., Saito J., Sano K., Sahoh M., Shibata Y., Takahashi S., Inoue H., 2009: Analysis of the comorbidity of bronchial asthma and allergic rhinitis by questionnaire in 10 009 patients. *Allegro Int.*, 58(1): 55-61.
- Zeyrek D., Demir E., Alpman A., Ozkinay F., Gulen F., Tanac R., 2008: Association of interleukin-1b and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in Turkish children with atopic asthma. *Allergy Asthma Proc*; **29**: 468-74.
- Zheng W., Flavell R. A., 1997: The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, 89: 587-596.
- Zheng Y., Danilenko D. M., Vladek P., Kasman I., Easthan-Aderson J., Wu J., Ouyang W., 2007: Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*, 445: 648-651.
- Zheng Y., Chaudhry A., Kas A., deRoos P., Kim J. M., Chu T-T., Corcoran L., Treuting P., Klein U., Rudensky A. Y., 2009: Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to kontrol Th2 responses. *Naure*, 458: 351-356.
- Zheng Y., Rudensky A. Y., 2007: Foxp3 in kontrol of the regulatory T-cell lineage. *Nat. Immunol.*, 8: 457-462.
- Zhu J., Cote-Sierra J., Guo L., Paul W. E., 2003: Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity*, 19: 739-748.
- Zhu J., Paul W. E., 2008: CD4 T cells: fates functions and faults. *Blood*, 112: 1557-1568.
- Ziegler S. F., 2006: FOXP3: of mice and men. *Annu. Rev. Immunol.*, 24: 209-226.