

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2020**

**Eliška Frantová**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

**Eliška Frantová**

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**MOŽNOSTI ANALÝZY VÝSLEDKŮ MULTIPLOVÝCH  
METOD PRO STANOVENÍ SPECIFICKÝCH IgE**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: Ing. et Bc. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2020

# ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Eliška FRANTOVÁ**  
Osobní číslo: **Z17B0081P**  
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Možnosti analýzy výsledků multiplových metod pro stanovení specifických IgE**  
Zadávací katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

### Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury na vybrané téma;
- Stanovit cíl kvalifikační práce;
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS;
- Popsat metodiku praktické části;
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce;
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS;
- Dodržet citační normu

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

### Seznam doporučené literatury:

- ŠTERZL, Ivan a kolektiv. Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékařství. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-0972-0;
- FUCHS, Martin et al. Potravinová alergie a intolerance. 1. vyd. Praha: Mladá fronta, 2016. ISBN 978-80-204-3757-0;
- JÍLEK, Petr. Imunologie: stručně, jasně, přehledně. 2., doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2019. ISBN 978-80-271-0595-3;
- HOŘEJŠÍ, Václav. Základy imunologie. 6., aktualizované vyd. V Praze: Stanislav Juhaňák – Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3;
- PUNT, Jenni. Kuby immunology. 8. edition. New York: Macmillan Education, 2019. ISBN 978-319-11470-1

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Bc. Tomáš Vlas**

Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **18. června 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2020**



---

**PhDr. Lukáš Štich**  
děkan



---

**Mgr. Stanislava Reichertová**  
vedoucí katedry

## **Prohlášení**

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

V Plzni dne 20. 3. 2020

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Frantová Eliška

Katedra: Teoretických oborů

Název práce: Možnosti analýzy výsledků multiplových metod pro stanovení specifických IgE

Vedoucí práce: Ing. et Bc. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 38

Počet stran – nečíslované: 31

Počet příloh: 4

Počet titulů použité literatury: 49

Klíčová slova: Multiplexové metody, ImmunoCAP ISAC, strojové učení, alergie, alergen

### Souhrn:

Trendem v diagnostice alergických onemocnění jsou především multiplexové metody, které umožňují vyšetřit široký panel alergenů z malého množství patientského séra. Interpretace výsledků je ovšem velice náročná. Aplikací procesů strojové analýzy na rozsáhlou databázi výsledků testu ImmunoCAP ISAC byla zjištěna korelace mezi alergeny, u nichž jsem následně našla i značnou homologii, která byla důsledkem náležitosti alergenů ke stejným proteinovým rodinám. V případech, kdy alergeny nenáležely do stejné proteinové rodiny a nezjistila jsem u nich homologii, ale přesto byla naměřena korelace, jsem zjistila, že cross-reaktivita mezi těmito alergeny se uskutečňuje přes cukernou složku CCD. Lze předpokládat, že implementace strojového učení ulehčí interpretaci výsledků získaných pomocí multiplexových metod.

## **Abstract**

Surname and name: Frantová Eliška

Department: of Theoretical Fields

Title of thesis: Possibilities of Analysis of Results of Multiple Methods for Determination of Specific IgE

Consultant: Ing. et Bc. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 38

Number of pages – unnumbered: 31

Number of appendices: 4

Number of literature items used: 49

Keywords: Multiplex methods, ImmunoCAP ISAC, machine learning, allergy, allergens

### Summary:

Trending in the diagnosis of allergic diseases are mainly multiplex methods, which allow examination of a wide panel of allergens from a small amount of patient serum. However, interpreting the results is very difficult. By applying machine analysis processes to the extensive ImmunoCAP ISAC assay results database, a correlation was found between allergens, in which I also found significant homology as a result of allergens belonging to the same protein families. In cases where the allergens did not belong to the same protein family and I did not find any homology, but the correlation was measured, I found that the cross-reactivity between these allergens takes place via the CCD sugar component. It can be assumed that the implementation of machine learning will facilitate the interpretation of results obtained by using multiplex methods.

## **Předmluva**

Tato bakalářská práce pojednává o možnostech aplikování procesů strojového učení na rozsáhlou databázi výsledků stanovení specifických IgE. Specifické IgE bylo měřeno ze sér pacientů za použití multiplexové metody ImmunoCAP ISAC. Cílem práce je porovnat zjištěné závislosti na základě homologie alergenů a posoudit, zda by strojová analýza mohla být přínosem a zefektivněním hodnocení velkého souboru dat získaném při použití multiplexových metod.



## **Poděkování**

Děkuji Ing. Tomáši Vlasovi za odborné vedení práce, trpělivost, poskytování rad a materiálních podkladů. Dále děkuji Ing. Janu Švecovi z Výzkumného centra NTIS Fakulty aplikovaných věd Západočeské univerzity v Plzni za poskytnutí výsledků strojové analýzy a dalších materiálních podkladů.

# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ .....	12
SEZNAM TABULEK .....	13
SEZNAM ZKRATEK .....	14
ÚVOD .....	16
TEORETICKÁ ČÁST .....	17
1 ALERGIE .....	17
1.1 Genetická podstata alergií .....	18
1.2 Hygienická hypotéza .....	19
1.3 Typy hypersenzitivních reakcí .....	20
1.3.1 Typ I .....	21
1.3.2 Typ II .....	21
1.3.3 Typ III .....	21
1.3.4 Typ IV .....	22
1.4 Mechanismus vzniku alergií .....	22
1.5 Druhy a příznaky alergických chorob .....	23
1.6 Buňky alergické reakce .....	24
1.6.1 Bazofilní granulocyty, mastocyty .....	24
1.6.2 Eosinofilní granulocyty .....	24
1.6.3 Th2 lymfocyty .....	25
1.6.4 Imunoglobuliny, specifické IgE .....	25
1.7 Monoklonální protilátky .....	26
1.8 Léčba alergií .....	26
2 ALERGENY .....	27
2.1 Nomenklatura .....	28
2.2 Respirační alergeny .....	29
2.2.1 Pyly .....	29
2.2.2 Plísně .....	29
2.2.3 Roztoči .....	29
2.3 Alergeny jedu hmyzu .....	29
2.4 Zvířecí alergeny .....	30
2.5 Potravinové alergeny .....	30
2.6 Zkříženě reagující alergeny .....	31
2.7 Alergenové extrakty .....	31
3 REKOMBINANTNÍ ALERGENY .....	32
4 DIAGNOSTIKA ALERGICKÝCH CHOROB .....	33

4.1	Kožní „prick“ testy.....	33
4.2	Laboratorní diagnostika.....	33
5	MULTIPLOVÉ METODY .....	34
5.1	ImmunoCAP ISAC .....	34
6	STROJOVÉ UČENÍ .....	35
	PRAKTICKÁ ČÁST .....	36
7	CÍL A ÚKOLY PRÁCE.....	36
8	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY .....	37
9	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU .....	38
10	METODIKA PRÁCE .....	40
10.1	ImmunoCAP ISAC .....	40
10.2	Metoda strojového učení .....	41
11	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	42
11.1	Rodina PR-10 proteinů.....	43
11.2	Profily.....	44
11.3	Pektátová lyasa .....	45
11.4	Polkalcin.....	46
11.5	Beta-expansin .....	47
11.6	Sérový albumin.....	48
11.7	CCD cukerná složka.....	49
11.8	Ostatní .....	50
	DISKUZE .....	51
	ZÁVĚR.....	53
	SEZNAM LITERATURY .....	54
	SEZNAM PŘÍLOH .....	61
	PŘÍLOHY .....	62
	Příloha A – Výsledek ImmunoCAP ISAC analýzy v programu MIA .....	62
	Příloha B – Výsledek kontroly ImmunoCAP ISAC analýzy .....	63
	Příloha C – Seznam nejčastějších alergenů .....	66
	Příloha D – Souhlas s poskytováním informací.....	69

## **SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Pracovní plocha pro přípravu ImmunoCAP ISAC čipů .....	40
Obrázek 2: ImmunoCAP ISAC sklíčko /čip/.....	41
Obrázek 3: Skenovací zařízení a počítač s příslušným programem.....	41

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Alergeny testované ImmunoCAP ISAC I.....	38
Tabulka 2: Alergeny testované ImmunoCAP ISAC II.....	38
Tabulka 3: Alergeny testované ImmunoCAP ISAC III.....	39
Tabulka 4: Srovnání homologie a korelace alergenů komponentové rodiny PR-10 proteinů .....	43
Tabulka 5: Srovnání homologie a korelace alergenů komponentové rodiny Profilinů.....	44
Tabulka 6: Srovnání homologie a korelace alergenů komponentové rodiny Pektátové lyasy .....	45
Tabulka 7: Srovnání homologie a korelace alergenů komponentové rodiny Polkalcinu....	46
Tabulka 8: Srovnání homologie a korelace alergenů komponentové rodiny Beta-expansinu .....	47
Tabulka 9: Srovnání homologie a korelace alergenů komponentové rodiny Sérového albuminu .....	48
Tabulka 10: Srovnání homologie a korelace alergenů přes cukernou složku CCD.....	49
Tabulka 11: Srovnání homologie a korelace alergenů ostatních komponentových rodin...	50

## SEZNAM ZKRATEK

ADCC .....	Buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
AI .....	Artificial Intelligence
APC .....	Antigen prezentující buňky
BB enzym.....	Berberine Bridge enzyme
Bet v 1.....	Alergen pylu břízy z lat. <i>Betula verrucosa</i>
cDNA.....	Deoxyribonukleová kyselina DNA získaná umělým přepisem z mRNA reverzní transkripcí
DTH.....	Z angl. Delayed Type Hypersensitivity
ELISA.....	Z angl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fc .....	Receptor některých buněk imunitního systému
FcεR.....	Vysoko-afinitní IgE receptor
HLA .....	Z angl. Human Leucocyte Antigen
IgA.....	Imunoglobulin třídy A
IgD.....	Imunoglobulin třídy D
IgE .....	Imunoglobulin třídy E
IgG.....	Imunoglobulin třídy G
IgM.....	Imunoglobulin třídy M
IL .....	Interleukin
ISAC .....	Z angl. Immuno Solid-Phase Allergen Chip
ISAAC .....	The International Study of Asthma and Allergies in Child- hood
MHC .....	Hlavní histokompatibilní komplex
PA.....	Potravinová alergie

rDer p 1 .....Rekombinantní alergen roztočů z lat. *Dermatophagoides pteronyssinus*

sIgE..... Specifický imunoglobulin E

TCR .....T-buněčný receptor

Th lymfocyt.....Pomocný helper T-lymfocyt

## ÚVOD

Alergická onemocnění jsou v dnešní době širokým tématem, stále větší procento populace trpí některou z klinických forem tohoto onemocnění, ať už je to alergická rýma, bronchiální astma, ekzém, zažívací obtíže či jiné. S tím se pojí i velký zájem o jejich účinnou diagnostiku a především léčbu, která na diagnostiku navazuje. Trendem v diagnostice, a to nejen v oblasti imunologie a alergologie, je její zefektivnění, respektive snaha poskytnout kvalitní výsledky vyšetření co nejvíce pacientů v co nejkratším čase. V mé bakalářské práci se zabývám zhodnocením a ověřením, zda aplikování matematické strojové analýzy na rozsáhlý soubor výsledků stanovení specifických IgE, v řádech statisíců, získaných ve Fakultní nemocnici Plzeň na Ústavu imunologie a alergologie, přináší směřodatné výsledky, které souhlasí s dostupnými informacemi z odborných zdrojů.

Teoretická část seznamuje čtenáře se základní problematikou tématu alergie a atopie, jejich podstaty a léčby, dále pak s alergeny a to zejména jejich rozdělením a nomenklaturou. V neposlední řadě v této části práce zmiňuji základní informace o použité multiplexové metodě ImmunoCAP ISAC a také stručně popisují techniku strojového učení. Praktická část obsahuje detailnější popis zmíněných metod a technik, výsledky mého ověřování a také shrnutí, zda je možné aplikovat procesy strojové analýzy na dané výsledky či nikoli.

Hlavním zdrojem informací pro tuto práci byla zejména doporučená literatura, odborné webové články a v neposlední řadě informace z Výzkumného centra NTIS Fakulty aplikovaných věd Západočeské univerzity v Plzni a z Ústavu imunologie a alergologie FN Plzeň. Výsledky analýzy multiplexovou metodou ImmunoCAP ISAC ve Fakultní nemocnici Plzeň mi byly poskytnuty na základě řádně vyplněné žádosti o poskytnutí informací.



# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 ALERGIE

Ačkoli by se mohlo zdát, že alergie jsou problémovým onemocněním dnešní moderní doby, není tomu zcela tak. Zmínky o nich máme již z dob starého Egypta, kdy byla popsána smrt jistého faraona na následky bodnutí sršněm, nebo z dob středověku, kdy císař Augustus trpěl sezónní rýmou a dušností. Hippokrates zmínil termíny *asthma* a *eczema* už okolo 4. století př.n.l. (Šterzl, 2007).

Pojem alergie byl poprvé užit vídeňským pediatrem Clementem von Pirquetem na počátku 20. století a byl původně názvem pro obecnou reaktivitu v lidském těle. Časem ale došlo k zúžení významu pojmu a to na imunologickou přecitlivělost, resp. hypersenzitivitu. V současné době postihuje toto onemocnění značnou část populace a pozorujeme u něj vzestupnou tendenci výskytu, z toho důvodu se věnuje stále větší úsilí tomuto onemocnění porozumět, jak na výzkumné, tak na klinické úrovni (Krejsek, a další, 2016) (Fuchs, 2016).

Je nezbytné od sebe odlišit dva pojmy *alergie* a *atopie*. Atopie je stav poškozené imunity, je dána především genetickými predispozicemi k přecitlivělé odpovědi na extrémně nízké dávky běžných antigenů (alergenů) produkcí specifických protilátek IgE, hovoří se o imunopatologické hypersenzitivitě časného typu (typu I). Při atopii se prosazují zejména Th2 lymfocyty, které aktivují složky buněčné imunity pomocí různých cytokinů (Hořejší, a další, 2017) (Šterzl, 2007).

Alergii lze definovat jako klinický projev atopie. Jedná se o soubor zánětlivých změn v různých tkáních a orgánech navozených expozicí antigenům (alergenům) vnějšího prostředí. Zde se uplatňují specifické IgE imunoglobuliny či senzibilizované T-lymfocyty. Při alergických chorobách dochází ve tkáních a orgánech k poruchám jak jejich struktury, tak i funkce. Alergii nelze chápat jako onemocnění jednoho orgánu, ale je třeba se na ni dívat jako na systémové onemocnění s místními projevy. Porušený je celý imunitní systém, záleží ovšem na konkrétním jedinci, jak a kde se alergie projeví. Rozlišujeme tedy alergie lokalizované a nebo systémové – systémová anafylaxe (Chapel, a další, 2018) (Šterzl, 2007) (Hořejší, a další, 2017) (Helbert, 2017).

Jak už bylo řečeno, u alergie imunitní systém člověka přecitlivěle reaguje na látky v životním prostředí, které jsou pro většinu lidí neškodné, snaží se s nimi bojovat, avšak neúčelně. Tyto látky jsou známé jako alergeny a nacházejí se např. v roztočích, pylu, plísniích, potravinách a některých lécích, hmyzu a na domácích zvířatech. Jinými slovy, lze je nalézt prakticky kdekoli. Je-li alergická osoba vystavena alergenu (například pylu), dochází, po kontaktu alergenu se sliznicí, k protilátkové odpovědi. Protilátky se váží na speciální buňky nazývané žírné buňky (=mastocyty, tkáňová forma bazofilů). Po kontaktu alergenu s protilátkami, reagují žírné buňky uvolněním určitých látek, *mediátorů alergické reakce*, z nichž jedna se nazývá histamin. V důsledku celé alergické reakce vzniká dráždivý zánět doprovázený otoky, svěděním, nevolnostmi apod. (ASCIA, 2019) (Šterzl, 2007).

## 1.1 Genetická podstata alergií

Bylo opětovně prokázáno, že riziko vzniku alergických onemocnění má jistý základ v genetice. Byly nalezeny stovky genů, které mají s alergickým zánětem úzký vztah, což tuto teorii jen potvrdilo, nelze však tvrdit, že za predispozici k atopii mohou konkrétní majoritní geny, jedná se hlavně o kombinaci genetických poruch, o tzv. genový polymorfismus. Autoři Krejsek, a další (2016), Hořejší, a další (2017) a Jílek (2014) se shodují, že genový polymorfismus by mohl být jednou z možných příčin dědičnosti těchto onemocnění, zejména pak geneticky kódované rozdíly v receptorech pro Interleukin 4 a Interleukin 13.

Zkoumané geny lze rozdělit podle autora Krejska, a dalších (2016) do dvou hlavních tříd a to na ty geny, které se aktivně účastní vzniku alergického zánětu a na geny, které by se měly podílet na ochraně před touto reakcí. Tyto skupiny tvoří jakýsi celek, kde jedna skupina doplňuje druhou a naopak, převažuje-li některá z těchto skupin, důsledky se projevují vznikem alergického onemocnění a nebo naopak rezistence. Autor Hořejší, a další (2017) uvádějí rozdělení genů do tří základních kategorií a to na geny určující proces rozpoznávání a zpracování antigenu (geny pro MHC II. třídy a receptory T lymfocytů TCR), dále na geny zapříčiňující přílišnou tvorbu IgE (polymorfismy genů pro cytokiny, interleukiny, jejich receptory a další...) a nakonec geny, které ovlivní, jaký orgán bude atopií poškozen (receptory v průduškách apod.). Výzkum se zaměřil zejména na geny HLA systému, což jsou geny přímo vztažené jak k imunitní odpovědi, tak i k fyziologii orgánů, které jsou patologií zasaženy. Výsledky však nejsou jednotné a ve většině případů z nich vyplývá, že

žádný gen není specifický pro danou genovou oblast, totéž bylo zjištěno i v případě autoimunitních chorob (Krejsek, a další, 2016).

Obecné genetické závislosti s imunopatologickými reakcemi je pravděpodobně třeba hledat již na úrovni transkripce, posttranskripčních úprav a zejména v souvislostech s epigenetickými mechanismy, kam se promítají vlivy vnějšího prostředí, výživy, prodělaných infekčních onemocnění a další. Je důležité zmínit, že změny genomu, které byly vyvolány právě těmito mechanismy se mohou předávat do dalších generací a výrazně tak zvyšovat riziko vzniku imunopatologických onemocnění u potomků. Pan doktor Jílek (2019) zmiňuje ve své knize studii, která byla prováděna ve 2. polovině 90. let v Německu, výsledky studie poukazují na dědičnost genů, které mohou způsobovat hypersenzitivitu k některým alergenům. V případě, že oba rodiče byli alergici, trpělo atopií každé 3. dítě, pokud mělo jednoho alergického rodiče postihovala atopie 1 dítě z 5 a v případě, že ani jeden z rodičů alergikem nebyl, každé 7. dítě bylo atopikem. Atopik je pojmenování pro jedince, který má dědičný sklon k produkci IgE protilátek, které jsou reakcí na nízké dávky alergenu, má také zvýšený počet žírných buněk na sliznicích a receptorů pro IgE na jejich povrchu, které mají tendenci přílišně produkovat mediátory alergické odpovědi. Dědičnost alergických onemocnění nezávisí na jednom faktoru, je polygenní, není možné určit typ dědičnosti a nelze ji předpovědět u vyvíjejícího se plodu, avšak je prokázáno, že jsou-li rodiče atopici, pak má dítě vyšší pravděpodobnost postižení alergií, zvláště, trpí-li onemocněním právě matka (Šterzl, 2007) (Krejsek, a další, 2016).

Naproti tomu pan doktor Jílek (2019) nesouhlasí, že příčinou alergie jsou v první řadě alergeny, nýbrž odlišná reaktivita atopiků, což znamená právě rozdílné hladiny IgE v séru různých jedinců, avšak proč k tomuto rozdílu dochází, není zatím plně objasněno.

## 1.2 Hygienická hypotéza

Pan profesor Krejsek, a další (2016) označuje hygienickou hypotézu mezi alergology za velmi rozporuplné téma, zatím nebyla vyvrácena, ale ani spolehlivě potvrzena. Poprvé byla zformulována v roce 1989 Davidem Strachanem do odborného článku pro *British Medical Journal*. Martin Fuchs, et al. (2016) a Petr Jílek (2014) se shodují, že ve vývoji jedince existuje období nazývané „*zvykací okno*“. Jedná se o období do 2. až 3. roku života dítěte, kdy přijímá antigeny, potenciální alergeny, do svého těla výhradně ústy (ať už se jedná o

potravu nebo olizuje náhodné předměty). Imunologická odpověď vzniká především v typu Th1-buněk, čímž se tvoří jakási budoucí tolerance na tyto antigeny. S tím se pojí názor, že přehnaná čistota a sterilita domácností a celkově míst, kde se dítě pohybuje, zabraňuje dítěti setkat se s těmito antigeny, tudíž si na ně nevytvoří toleranci a až se s nimi v pozdějším věku setká, tělo na ně bude reagovat jako na potencionálně patogenní, stanou se z nich alergenů. Na tomto se také mimo jiné podílí i vymýcení parazitárních nákaz, které zásadně podněcovaly odpovědi typu Th2. Oba autoři uvádějí studii prováděnou ke konci minulého století v Bavorsku, která srovnávala výskyt atopie a alergie u dětí dle bydliště. Nejméně atopiků pocházelo z vesnického prostředí či z farem, nejvíce naopak z měst (Hořejší, a další, 2017).

Pan Šterzl (2007) ve své knize uvádí, že částice unikající ze spalování diesellových motorů, mohou podněcovat produkci IgE a expresi genů pro cytokiny typu Th2. Rovněž cigaretový kouř podněcuje tvorbu IgE a eosinofilii v určitém orgánu, zároveň tvrdí, že znečištění ovzduší nemá žádný vliv na rozvoj astmatu u dětí, dle studie ISAAC. Naopak zmiňuje, že mnozí činitelé zevního prostředí mají ochrannou povahu, například děti, vyrůstající ve venkovském prostředí se záplavou zvířecího prachu, mají daleko menší podíl výskytu alergií.

### 1.3 Typy hypersenzitivních reakcí

Stejná imunologická reakce, která nás chrání před škodlivými patogeny a vznikem infekcí, může také způsobit velké škody na našich vlastních buňkách a tkáních. Imunitní systém používá několik strategií ke snížení rizika poškození sebe sama, například tak, že jakmile je organismus zbaven nežádoucích antigenů, imunologické reakce jsou vypnuty, aby nedošlo k záměně a napadání vlastních buněk organismu. Tyto kontroly rovnováhy se však mohou poškodit, což vede k imunitně zprostředkovaným reakcím, které mají často mnohem škodlivější následky než ochranné funkce, ke kterým jsou určeny. Nazýváme je autoimunitní reakce či autoagrese (Punt, a další, 2019) (Jílek, 2014).

Dnes je známo, že existuje více typů imunopatologických, hypersenzitivních, reakcí, které se liší hlavně rychlostí nástupu klinických příznaků. Jedná-li se o nepatříčnou, neadekvátní odpověď na obvyklé antigeny ze zevního prostředí, lze hovořit o alergické reakci – alergii, jedná-li se o reakci, která stojí za poškozováním vlastních buněk, jde o reakci

autoimunitní, nicméně v rozvoji alergické reakce lze sledovat podíl všech reakcí přecitlivělosti (Jílek, 2014) (Hořejší, a další, 2017).

Jako celek zmíním všechny čtyři reakce, podrobně se však zaměřím pouze na první – alergickou reakci.

### **1.3.1 Typ I**

Lze ji nazvat též alergickou reakcí. Okamžitá hypersenzitivní reakce je charakterizována velmi rychlým projevem symptomů po stimulaci alergenem, známá je též jako reakce atopická. Mechanismy hypersenzitivní reakce prvního typu jsou zprostředkované protilátkami třídy IgE, které se váží na mastocyty (žírné buňky) nebo bazofilní granulocyty a indukují uvolnění vazoaktivního mediátoru. Při prvním setkání alergenu s náchylným jedincem, dojde k senzibilizaci daného jedince, tato reakce je uskutečněna sekrecí protilátek IgE plazmatickými buňkami pod vlivem cytokinů produkovaných lymfocyty Th2. Tyto reakce bývají nejběžnější odpovědí na respirační (dýchací) alergeny, jako jsou pyl nebo roztoči a také na potravinové alergeny, jako jsou burské ořechy a mořské plody. Indikují systémovou anafylaxi (antigen se dostane do krevního oběhu již senzibilizovaného jedince) či lokální anafylaxi, jejím projevem jsou pak senná rýma, astma, ekzém apod.... (Punt, a další, 2019) (Jílek, 2014).

### **1.3.2 Typ II**

Druhý typ hypersenzitivní reakce je výsledkem navázání protilátek z třídy IgG nebo IgM na povrch antigenních buněk, tato vazba může zapříčinit aktivaci komplementu či protilátkově dependentní buněčně zprostředkovanou cytotoxickou reakci (ADCC). Tento typ reakce může nastat například při transfuzi krve mezi pacienty s rozdílnou krevní skupinou, kdy dochází ke zničení dárcovských červených krvinek - hemolýze (Punt, a další, 2019).

### **1.3.3 Typ III**

Během třetího typu hypersenzitivní reakce vznikají imunokomplexy antigen-protilátka, jsou uloženy v různých tkáních a indukují aktivaci komplementu a následný vznik zánětlivé odpovědi zprostředkované masivní infiltrací neutrofilních granulocytů do příslušné tkáně (Punt, a další, 2019).

### 1.3.4 Typ IV

Čtvrtý typ hypersenzitivní reakce se nazývá také reakcí oddáleného typu (DTH). Je výsledkem nadměrné a někdy i nevhodné aktivace T-buněk, které vystupují jako mediátory této reakce. Senzibilizované T-buňky (Th1, Th2, ...) uvolňují cytokiny, které aktivují makrofágy nebo cytotoxické T-lymfocyty. Ty poté zprostředkují přímé buněčné poškození. Běžnými případy jsou kožní reakce způsobené jedovatým dubem či jinou jedovatou rostlinou nebo třeba roztroušená skleróza (Punt, a další, 2019).

## 1.4 Mechanismus vzniku alergií

Za vznikem alergické reakce nestojí primárně alergeny, s nimi se setkávají všichni lidé a mnozí na antigen (alergen) nijak nereagují, naproti tomu atopici, na rozdíl od zdravých jedinců, reagují odlišně a přehnaně, mají také výrazně vyšší hladinu imunoglobulinu IgE v séru, toto rozdílné zvýšení v populaci zatím není zcela vysvětleno (Jílek, 2014).

Elementárním mechanismem, kterým vznikají alergie, je defekt rovnováhy mezi T-pomocnými lymfocyty 1 (Th1), pomocí nichž zdraví jedinci reagují (pokud vůbec) na alergeny a větví imunity T-pomocných lymfocytů 2 (Th2), kterou reagují na alergeny atopici, přičemž tyto lymfocyty jsou primárně určeny k ochraně před mimobuněčnými parazity. Hovoříme o Th-zprostředkovaném onemocnění. Dále dochází k izotypovému přesmyku, změně genu pro těžké řetězce imunoglobulinů, díky kterému se syntetizují imunoglobuliny všech tříd (nejvíce IgG a IgA). U neatopických osob přesmyk IgE nenastává tak často, nejspíše proto jsou hladiny IgE v séru neatopických osob nízké (Jílek, 2014) (Šterzl, 2007).

První fázi alergické reakce lze označit jako fázi tzv. senzibilizace, při níž dochází k identifikování alergenu antigen prezentujícími buňkami (APC) a ke spuštění specifické T buněčné reakce. Senzibilizace se nejčastěji uskutečňuje na sliznicích, kde má alergen možnost proniknout hlenem do dýchacího či trávicího systému a tam se setkat s epitelovými buňkami a buňkami APC, které zajišťují zásadní krok – antigenní prezentaci nezbytnou pro vznik patologické reakce (zde I. typu), odtud je také možný transport alergenu do lymfatických uzlin (Hořejší, a další, 2017).

Při imunopatologické reakci I. typu podněcují dendritické buňky reakci typu Th2, což má za následek tvorbu imunoglobulinu IgE plazmatickými buňkami. Molekuly

imunoglobulinu IgE se váží na receptory mastocytů a bazofilů nebo také na receptory ostatních imunokompetentních, jako jsou neutrofilů, eozinofilů atd... Může dojít i k reakci typu Th1, s tou se lze setkat při kontaktních alergiích např. na těžké kovy či anorganické sloučeniny, důsledkem toho je poté produkce specifických T lymfocytů (Hořejší , a další, 2017).

Ve fázi senzibilizace nedochází ke klinickým projevům alergie, ty nastávají až při opětovném setkání s alergenem, tato fáze se pak nazývá „časná fáze alergické reakce“. Dochází k uvolňování mediátorů alergické reakce z mastocytů i samostatné tvorbě primárních mediátorů, jsou jimi zejména histamin a heparin. Je třeba zmínit, že tyto mediátory tkáně a orgány nijak zásadně nenarušují (Hořejší , a další, 2017).

Následuje „fáze pozdní“, kterou lze pozorovat obvykle až za více než 8 hodin po fázi časně. V této fázi jsou produkovány sekundární mediátory, zvláště tromboxany a leukotrieny, které lákají do místa zánětu ostatní buňky imunitního systému, které začnou produkovat mediátory s cytotoxickým účinkem ve snaze zbavit se „antigenů způsobujících zánět“. Právě tyto cytotoxické mediátory způsobují někdy i nevratné poškození tkání (Hořejší , a další, 2017).

## **1.5 Druhy a příznaky alergických chorob**

Při časně fázi alergické reakce dochází k uvolňování a novotvorbě mediátorů, hlavně histaminu a heparinu. Ty mají schopnost zejména uvolňovat cévy a působit stahy hladkých svalů průdušek, přispívají ke tvorbě hlenu a v neposlední řadě stimulují nervová zakončení kůže, což vede obvykle ke svědění (Hořejší , a další, 2017) (Abbas, a další, 2013).

Mezi nejčastější příznaky alergických chorob, z důvodu přímého styku sliznic s alergeny z vnějšího prostředí, patří alergická rinitida (rýma), bronchiální astma a poškození spojivky oka. Kožními problémy mohou být atopický ekzém, kontaktní dermatitida a kopřivka. Objevují se i příznaky jako migréna a gastrointestinální obtíže (Hořejší , a další, 2017) (Šterzl, 2007).

Systémová anafylaxe vzniká mnohdy v souvislosti s proniknutím alergenu do organismu skrze trávicí ústrojí či přímo do krevního oběhu. Anafylaxe vzniká nejčastěji v důsledku požití určitých potravin (nejčastěji burské ořechy, mořské plody a některé druhy zeleniny), léčiv (penicilin) či po bodnutí hmyzem (včela, vosa, sršeň). Při anafylaktickém šoku

se náhle roztáhnou cévy, čímž se sníží krevní tlak a zrychlí tep, hladké svalstvo v průduškách se stáhne. Nežřídká dochází k bezvědomí (Hořejší , a další, 2017) (Šterzl, 2007).

## 1.6 Buňky alergické reakce

### 1.6.1 Bazofilní granulocyty, mastocyty

Žírné buňky, neboli *mastocyty*, jsou častým označením pro tkáňovou formu bazofilních granulocytů a mají snad největší význam ve vztahu k alergickým reakcím. Sídlí zejména v oblasti sliznic a kůže (Jílek, 2014).

Tak důležitou roli v alergických zánětech hrají proto, že mají na svém povrchu (mimo jiné) 2 typy stěžejních receptorů. Jeden pro Fc fragment imunoglobulinu IgE, který produkují B lymfocyty, tento receptor se nazývá FcεR. Druhý receptor slouží k rozpoznávání složek komplementu C3a a C5a, což jsou známé anafylatoxiny (=způsobují anafylaxi). Zmíněné receptory umožňují aktivaci žírné buňky. Fragmenty komplementu působí aktivaci přímo, zatímco v druhém případě aktivace přes FcεR je třeba, aby na receptoru byly navázány 2 molekuly IgE a současně, aby je „přemostil“ alergen. Z toho vyplývá, že alergen musí být přítomný, aby došlo k aktivaci buněk přes FcεR receptor. Pokud nemůže dojít k přemostění z důvodu absence alergenu, nedochází k alergické reakci atopika, třebaže koncentrace IgE v séru je vysoká (Jílek, 2014) (Hořejší , a další, 2017).

Charakteristickým rysem pro mastocyty je přítomnost specifických granul v cytoplazmě, jež se mohou po přemostění IgE či navázání fragmentů komplementu velmi rychle uvolňovat, dochází k tzv. degranulaci. Hlavním aktérem je mediátor histamin, který způsobuje klinické projevy alergické reakce (Jílek, 2014).

### 1.6.2 Eosinofilní granulocyty

Eosinofily jsou velmi podobné mastocytům, avšak dva faktory je činí unikátními. Během probíhajícího zánětu jsou do tkání specificky doplňovány a jejich granula obsahují zejména toxické substance (Helbert, 2017).

Eosinofily vyžívají z prekursoru, který je pro ně společný s neutrofily a bazofily. Jejich diferenciaci a produkci je stimulována IL-3 a IL-5, které sekretují Th2 lymfocyty a mastocyty. V normálních případech se v krvi objevují v malém zastoupení, asi 1-5 % všech



leukocytů. K jejich aktivaci dochází pomocí cytokinů, chemokinů či navázáním IgE na FcεRI. Aktivované eozinofily uvolňují stejné mediátory jako mastocyty (kromě histaminu). Právě eozinofilie je velmi běžným nálezem jak u alergie, tak u napadení mimobuněčnými parazity (Jílek, 2019) (Helbert, 2017).

### 1.6.3 Th2 lymfocyty

Th2 lymfocyty (T-pomocné lymfocyty 2) mají za úkol stimulovat B buňky k aktivaci do podob plazmatických buněk a následně je stimulovat k tvorbě protilátek. Hlavním stimulantem je IL-4. Tato reakce je v normálních případech užita k obraně proti extracelulárním patogenům, ovšem může k ní dojít i v přítomnosti neškodného alergenu, který tělo vyhodnotí jako potenciálně nebezpečný (Doan, a další, 2013).

### 1.6.4 Imunoglobuliny, specifické IgE

Protilátky jsou složky imunitního systému schopné rozeznávat antigeny a následně je navázat na svoji strukturu. Jsou velice variabilní a mají vysokou rozlišovací schopnost. Protilátky jsou generovány aktivovanými B lymfocyty, plazmatickými buňkami, a mají za úkol chránit organismus proti patogenům různými mechanismy účinku. Epidemiologické a experimentální důkazy naznačují, že IgE protilátky mohou mít také prospěšnou funkci při inhibici parazitů, jako jsou červi, protozoa a jiní (Gould, a další, 2004) (Punt, a další, 2019) (Jílek, 2014).

Specifita protilátek je dána jejich složením respektive jejich strukturou, která je tvořena lehkými (kappa/lambda) a těžkými (alfa, delta, gama, epsilon, mí) řetězci. Imunoglobuliny lze rozdělit do pěti tříd podle jejich struktury a funkce a to na IgA, IgD, IgE, IgG a IgM. To, jaký imunoglobulin bude syntetizován v dané situaci, závisí na typu T lymfocytů, které pomohly aktivovat B lymfocyty a také na cytokinech, kterými byl B lymfocyt před aktivací vystaven (Punt, a další, 2019) (Jílek, 2014).

IgE (imunoglobulin E), poslední objevený imunoglobulin, nebývá v lidském organismu hojně zastoupen, avšak ve vztahu k alergickým onemocněním je jeho role velmi důležitá. Má velký efekt například na degranulaci eozinofilů a basofilů a uvolnění mediátoru histaminu. U normálních jedinců je koncentrace IgE v séru asi 10 000krát nižší než koncentrace IgG. Zvýšená je u alergických jedinců, při výskytu některých parazitárních chorob a u syndrom „hyper-IgE“. Jedinci s abnormálně vysokými koncentracemi IgE v séru jsou považováni za atopiky (Punt, a další, 2019) (Sutton, a další, 2019) (Gould, a další, 2004).

IgE je nezbytný pro hypersenzitivní reakci I. typu. B buňky začnou produkovat IgE poté, co jsou kostimulovány IL-4, který je sekretován Th2 lymfocyty. Jakmile je IgE produkován, naváže se na vysokoafinitní receptor FcεRI exprimovaný na mastocytech (sídlících ve tkáních) a eozinofilech, které byly aktivovány a migrovaly do tkáně. IgE se váže na FcεRI s tak vysokou afinitou, že i přes to, že je koncentrace IgE v séru tisíckrát nižší než koncentrace IgG, mastocyty jsou neustále „potaženy“ IgE. Stupeň specifity IgE je dán diversitou těžkých řetězců. Specifitu IgE lze určit buď kožními testy v ordinaci lékaře či metodou ELISA v laboratořích alergologie (Helbert, 2017) (Gadermaier, a další, 2015).

## 1.7 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky jsou označovány také jako specifické monoklonální protilátky s přesně definovanou strukturou. To znamená, že se váží pouze na dané antigeny, v tomto případě na alergeny, s odpovídající strukturou epitopu. Tím lze odhalit přesný popis epitopu a takto charakterizovaný alergen dále může sloužit k diagnostice i léčbě alergických onemocnění (Krejsek, a další, 2016) (Jílek, 2014).

Vznikají klonováním jedné buňky, kdy v dceřiných buňkách vznikají stále totožné geny pro imunoglobuliny. Mateřská buňka časem odumírá, avšak byla snaha o vytvoření tzv. hybridomu, který by byl v podstatě nesmrtelným, což se podařilo u buněk myelomu. Pro laboratorní účely byly vytvořeny více než tisíce různých monoklonálních protilátek, které lze využít k terapii (Jílek, 2014) (Gadermaier, a další, 2015).

## 1.8 Léčba alergií

V první řadě je nejdůležitější eliminace alergenu. Pokud je to možné, pacient by se měl striktně vyhýbat spouštěcí reakce, ať už se jedná o potraviny, či zvířecí srst apod. U nemocných s alergickou rýmou je doporučováno omývat sliznici vhodnými roztoky, které by měly přinést úlevu od svědění, pálení a otoku (Krejsek, a další, 2016) (Delves, a další, 2017).

Nejrozšířenější léčbou alergických projevů jsou farmakologické preparáty a to zejména antihistaminika, antileukotrieny, metylxantiny apod. V těžších případech lze zvolit i glukokortikoidy tlumící zánět a inhibující syntézu histaminu, kromoglykát zabraňující

degranulaci mastocytů či biologickou léčbu. Antihistaminika působí jako blokátory receptoru histaminu, který je, jako jeden z hlavních mediátorů, odpovědný za vznik nežádoucích klinických projevů v průběhu alergické reakce. Histamin se za přítomnosti antihistaminik nemůže navázat na určité receptory na sliznicích a kůži a nedojde tak ke vzniku svědění, otoků apod.. Nevýhodou užívání antihistaminik může být zejména navození ospalosti, avšak tento vedlejší negativní účinek preparátů byl u novějších typů léčiv úspěšně eliminován (Petrů, a další, 2011) (Hořejší , a další, 2017)(Krejsek, a další, 2016).

Velký průlom zaznamenala léčba astmatu pomocí inhalačních kortikoidů, které mají velkou výhodu v tom, že působí na cílový orgán okamžitě a tlumí zánětlivou reakci s minimálními vedlejšími účinky, stejně tak lokální léčiva ke kožnímu podání – masti apod. (Krejsek, a další, 2016) (Hořejší , a další, 2017).

Velmi přínosná je léčba specifickou alergenovou imunoterapií, která má za úkol přivyknout organismus na alergen zvyšujícími se dávkami podávaného alergenu vakcínami a tím snížit intenzitu alergické reakce na daný antigen. Působí na principu stimulace konkurenční Th1 odpovědi, která tlumí alergenní Th2 odpověď a zamezuje tak syntéze imunoglobulinu IgE, namísto kterého se produkují jiné izotypy imunoglobulinů (Krejsek, a další, 2016) (Hořejší , a další, 2017).

## **2 ALERGENY**

Alergenům je pochopitelně věnována značná pozornost, protože právě tyto vnější antigeny jsou spouštěči imunopatologické reakce a odpovídají za vznik alergického zánětu. Alergeny tzv. přemostí (překlenou) IgE protilátky, které se nacházejí navázané na receptorech pro IgE mastocytů nebo eozinofilů a tím zajistí impuls pro vylití (degranulaci) mediátorů alergické reakce z těchto efektorových buněk. Existence látek, které tuto reakci iniciují, alergenů, je známa už několik desítek let a postupně se tvoří jasná představa o jejich molekulární stavbě i schopnosti vyvolávat dané patologické reakce (Krejsek, a další, 2016).

Aby antigen mohl být zařazen mezi alergeny, musí vyhovovat značnému množství kritérií. Vzhledem k tomu, že se ve většině případech jedná o proteiny, je nutné znát jejich strukturu primární, sekundární i terciární, stěžejní je také znalost glykosylací, obsah

nukleotidů, lipidů atd. V neposlední řadě je nutné prokázat alergenní reakci s protilátkami IgE u pacientů alergických na daný biologický druh (Krejsek, a další, 2016).

## 2.1 Nomenklatura

Označení alergenů má specifická a pevná pravidla, seznam alergenových molekul a normy pro zařazení látky mezi alergeny se začal utvářet v 80. letech minulého století a principiálně stojí na molekulové charakteristice antigenu. Alergeny byly identifikovány na základě jejich chování při elektroforéze, chromatografii a reaktivity na sdílená antiséra (Krejsek, a další, 2016) (Wayne, 2011).

Alergen Bet v 1 z rostliny *Betula verrucosa* neboli břízy lze použít jako příklad pro vysvětlení základního nomenklaturního principu. Prvá 3 písmena odrážejí rod rostliny (Bet), následující písmeno je označením druhu rostliny, ze které byl alergen izolován (v), číslice udává pořadí, v jakém byl alergen purifikován z jednoho zdroje (1). Stejný princip lze aplikovat jak na alergeny izolované z rostlin, tak i na alergeny pocházející od živočichů, mikrobů apod. (Krejsek, a další, 2016).

Systematické pojmenování rekombinantních alergenů je založeno také na prvních třech písmenech (ačkoli občas se používají písmena čtyři, aby se zabránilo záměně, jako u Cand a Can pro *Candida* a *Canis*) v kombinaci s prvním nebo dvěma prvními písmeny názvu druhu (např. *pteronissinus*) a nakonec arabská číslice odrážející buď pořadí, ve kterém byl alergen izolován, nebo jeho klinický význam, nebo obojí. K odlišení rekombinantní formy od nativní se používají předpony *r* a *n* (např. rDer p 1, nDer p 1) (Stewart, a další, 2013).

Podobné alergeny z příbuzných druhů používají stejnou nomenklaturu. Například alergeny cysteinové proteázy z domácího prachu z druhů *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Euroglyphus maynei* a *Blomia tropicalis* se jednotlivě označují jako Der p 1, Der f 1, Eur m 1 a Blo t 1, nebo společně jako alergeny roztočů skupiny 1. U izoalergenů odvozených od stejných druhů, které vykazují více než 67% sekvenční identitu, se používá přípona (např. Amb a 1.01, Amb a 1.02). U izoalergenů, které se liší o několik zbytků, se přidají další dvě číslice (např. Amb a 1.0101) pro jejich identifikaci. Bylo charakterizováno mnoho izoalergenů a studie naznačují, že tyto jemné rozdíly mohou mít hluboké imunologické účinky (Stewart, a další, 2013).

## 2.2 Respirační alergen

### 2.2.1 Pyly

Pylové alergie jsou považovány za jedny z nejrozšířenějších respiračních alergií v populaci. Jsou způsobeny pylovými zrny, samčími pohlavními buňkami (gametami) rostlin, které se v sezónním výskytu roznášejí vzduchem z luk, lesů a dalších ekosystémů do desítek až stovek kilometrů vzdálených oblastí. Mezi nejčastější jarní pylové alergen

### 2.2.2 Plísně

Dalšími významnými činiteli v oblasti respiračních alergenů jsou plísně a jejich spóry. Vyskytují se de facto všude za předpokladu vlhkého a teplého prostředí, což jsou optimální podmínky pro růst mycelia. V České Republice jsou nejčastěji alergenem v bytových jednotkách spóry z rodu *Penicillium*, ve venkovním prostředí nejčastěji spóry z rodu *Alternaria*, avšak záleží na ročním období a klimatu (Krejsek, a další, 2016).

### 2.2.3 Roztoči

Roztoči jsou mikroskopičtí členovci, kteří způsobují závažné alergické reakce. Vyskytují se nejčastěji v koberecích a postelích, kde se živí šupinkami kůže člověka. Alergické reakce jsou způsobeny jejich výměšky či tělesnými pozůstatky, které jsou složeny zejména z enzymaticky aktivních látek, které reagují s proteinázovými receptory v epitelech a mohou je narušovat. Významnými zástupci roztočů jsou *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) a *Dermatophagoides farinae* (Der f 1). Také švába lze zařadit do této skupiny, jeho exkrementy vážící se na prach, způsobují nemalé respirační obtíže *Blattell germanica* (Bla g 1) (Krejsek, a další, 2016).

## 2.3 Alergeny jedu hmyzu

Alergie na bodnutí hmyzem se může objevit v jakémkoli věku, často se tak děje po několika obdrženích bodnutí. Aby došlo k senzibilizaci jednice, musí být jedinec bodnutý hmyzem alespoň jednou. Nejtěžší reakce jsou pozorovány po bodnutí zástupci z rodu včel (*Apis mellifera*), vos (*Vespa vulgaris/ Vespa germanica*) a sršňů. Jed tohoto hmyzu je pro alergiky nebezpečný, protože obsahuje velké množství látek, na které alergik může reagovat

současně, je to především fosfolipáza (Api m 1; Ves v 1), hyaluronidáza (Api m 2; Ves v 2), kyselá fosfatáza a další. Nežádka jsou pozorovány zkřížené reakce s potravinovými alergeny či alergeny respiračními, což velmi znesnadňuje diagnostiku (Krejsek, a další, 2016) (Heddle, a další, 2019) (Mittermann, a další, 2010) (Golden, 2016).

## 2.4 Zvířecí alergeny

Zvířecí srst nepředstavuje alergen jako takový. Hlavním zdrojem problémů jsou v tomto případě sliny a jiné výměšky, šupinky kůže a epitelie zvířete. Ty se vážou na srst a spolu s ní se stávají součástí prachu, který se volně roznáší místností. Alergik je tedy vystaven nejen přímému kontaktu kůže se srstí zvířete, ale navíc také vstupu alergenu do těla přes respirační ústrojí. Alergen kočky domácí, uteroglobin (Fel d 1), je jednoznačně nejagresivnější a také nejrozšířenější, vysoce koncentrovaný jej lze nalézt ve slinách koček a na kůži. Psí alergen, lipokalin (Can f 1), nepředstavuje už tak významné riziko, přesto je velmi rozšířený (Krejsek, a další, 2016).

## 2.5 Potravinové alergeny

Alergenová senzibilizace na dané potraviny se vyvíjí již v raném dětství, postihuje přibližně 3% populace a má velký vliv na každodenní život pacientů. Potravinové alergie se projevují nejen v gastrointestinálním traktu, ale ovlivňují i jiné orgánové soustavy, například kůži (Valenta, a další, 2015).

Martin Fuchs, et al. (2016) tvrdí, že existuje mnoho faktorů ovlivňující prevalenci. Například, že ženy mají vyšší riziko PA než muži, nebo že bílá rasa má mírně vyšší protekci než Hispánci a černoši. Důležitý význam má i střevní mikroflóra ve vztahu s vývojem orální tolerance. Jedinci, kteří žijí v aseptickém prostředí orální toleranci nevyvinou a tím se u nich zvyšuje tendence mít alergii.

Alergeny v potravě by se daly pomyslně rozdělit do několika skupin a to na: alergeny živočišné, alergeny rostlinné a alergeny z přidaných komponent, které představují zejména látky prodlužující trvanlivost produktů apod.. Jednou ze základních potravin u nás, v České Republice, je kravské mléko a právě na bílkovinu v něm obsaženou, kasein (Bos d 8), jsou známi velmi významné alergické reakce. Rovněž na slepičí vejce, konkrétně na bílkoviny

bílku zást. ovomukoid (Gal d 1) či mořské živočichy, je alergická významná část populace (Krejsek, a další, 2016).

## 2.6 Zkříženě reagující alergeny

Zkříženě reagujícími alergeny jsou nejčastěji alergeny pocházející z mnohých druhů rostlin. Tyto alergeny si jsou buď strukturně podobné nebo obsahují tzv. *panalergeny*, což jsou vývojově vysoce konzervované bílkoviny s všestrannými funkcemi v biologii rostlin. Panalergeny způsobují zkříženou reaktivitu na základě shodného výskytu napříč mnohými rostlinnými druhy (Krejsek, a další, 2016) (Barre, a další, 2018).

Zkřížená reaktivita se uvádí nejčastěji mezi čeledí lipnicovitých, břízovitých, lískovitých, hvězdnicovitých a několika dalších, ovšem zkřížené reakce nemusí probíhat pouze mezi příbuznými rostlinami, ale také mezi rostlinami nepříbuznými. Příkladem by mohla být zkřížená reaktivita mezi pylem břízy a kořenovou zeleninou, třešněmi, kiwi atd. Z oblasti roztočů je významná podobnost, způsobující zkříženou reaktivitu, mezi alergeny švába *Blattella germanica* a roztoče *Dermatophagoides pteronyssinus* Der p 8. Z potravinových alergenů stojí za zmínku alergen tresky (Gad c 1), který se kříží s dalšími alergeny mořských ryb a živočichů, například s tuňákem, sleděm atd. Hojně vyskytující se v této oblasti je panalergen tropomyosin, lze jej nalézt jak u mořských korýšů a měkkýšů, tak i u suchozemského hmyzu a roztočů, což má za následek silnou zkříženou reaktivitu mezi těmito druhy (Krejsek, a další, 2016).

## 2.7 Alergenové extrakty

Můžeme říci, že alergenové extrakty jsou v podstatě směsí alergenů získané z přírodních zdrojů alergenů. Lze je využít mimo jiné v diagnostice alergií *in vivo/in vitro*, ale i k alergenově specifické imunoterapii. Problémy můžeme hledat v jejich kvalitě, protože obvykle vykazují vysokou kontaminaci nealergenními materiály, které ovlivňují především biologickou aktivitu jednotlivých alergenů. Tato záležitost se do jisté míry vyřešila se zavedením rekombinantních „alergenmolekul“, které lze využít především v již zmíněné specifické imunoterapii. Ovšem pro přípravu alergenů pro *in vivo* diagnostiku a terapii nebyly učiněny žádné významné pokroky (Valenta, 2018).

### 3 REKOMBINANTNÍ ALERGENY

Historie rekombinantní technologie začala v 80. letech 20. století, vzestup byl zaznamenán hlavně na počátku 90. let 20. století, a to prvními publikacemi o klonování alergenů (Wayne, 2011) (Gadermaier, a další, 2015).

Jako první byla popsána kompletní alergenová cDNA sekvence kódující hlavní alergen roztočů Der p 1, následovalo popsání cDNA sekvence a klonování hlavního alergenu sršně Dol m 5, další rok byla objevena cDNA sekvence hlavního pylového alergenu břízy Bet v 1. Tyto tři alergeny byly společně biotechnologicky exprimovány v bakterii *E. Coli*, po jejím vystavení infekci fágů. Lze je nazývat prvními rekombinantními alergeny (Tschepe, a další, 2017) (Wayne, 2011).

Testováním rekombinantních alergenů byla zjištěna jejich IgE vazebná kapacita a jejich schopnost indukovat specifickou aktivaci T buněk a bazofilů. Většina rekombinantních alergenů vykazuje imunologické vlastnosti odpovídající přírodním alergenům. Téměř všechny krystalové a roztokové struktury alergenů byly získány právě až z rekombinantních alergenů, do té doby byly částečně charakterizovány pouze nejběžnější alergeny protein-chemickými technikami. Existují pro to 2 důvody: Za prvé, většina alergenů se vyskytuje ve zdroji alergenů jako směs několika izoform, které se velmi obtížně oddělují, a za druhé, některé alergeny jsou přítomny ve velmi nízkých koncentracích, což znemožňuje získat dostatečné množství čištěného alergenu (Tschepe, a další, 2017) (Valenta, a další, 2002) (Chapman, 2004).

Na rozdíl od diagnostiky pomocí alergenových extraktů, kde je stanovení rušeno interferenčními molekulami či nízkou koncentrací alergenu, je diagnostika pomocí rekombinantních alergenů daleko přesnější. Pomocí biotechnologicky připravených rekombinantních alergenů lze definovat přesné molekuly, které alergické onemocnění vyvolávají a tím i rozlišit zkřížené reakce například potravin a pylů. Právě tyto čisté specifické alergeny lze užít v alergenově specifické imunoterapii či diagnostice. V roce 2002 byl zaveden první alergenový čip používající rekombinantní alergeny v tzv. multialergenových testech (Wayne, 2011) (Valenta, 2018).



## 4 DIAGNOSTIKA ALERGICKÝCH CHOROB

### 4.1 Kožní „prick“ testy

Kožní testy by měly být prováděny vždy na základě předchozí klinické anamnézy a jsou považovány za prostředek ke stanovení senzibilizace na daný alergen. Principem testu je aplikování alergenových extraktů do epidermis na předloktí pacienta za použití jednorázové jehly nebo tzv. lancety. Zdroje uvádí, že nyní je k dispozici kolem 10 – 50 alergenových extraktů, avšak od jejich výroby se upouští s příchodem modernějších automatizovaných metod. Nevýhoda těchto testů může být především v existenci falešně pozitivních výsledků při testování senzibilizace na potravinové alergeny, naopak u alergenů respiračních jsou kožní testy spolehlivým diagnostickým nástrojem. Výsledky by vždy měli být hodnoceny ve vztahu k aplikovanému kontrolnímu derivátu histaminu (Jensen-Jarolim, a další, 2019) (Kowalski, a další, 2019).

### 4.2 Laboratorní diagnostika

Za laboratorní diagnostiku alergických onemocnění lze považovat především testy *in vitro*, při kterých je měřena hladina IgE protilátek v krvi, těmto vyšetřením by ovšem měla předcházet vyšetření klinická či kožní testy, pokud je to možné (Honzová, 2009).

Typickým laboratorním vyšetřením je měření hladiny specifických IgE, které má základy v metodě ELISA a měří hladinu cirkulujících protilátek. Tuto metodu lze užít v případech, kdy není možné vyšetřit kožní „prick“ testy, například, nejsou-li dostupné vhodné alergeny na kožní vyšetření nebo pacient musí pravidelně užívat léčiva, která kožní testy interferují. Další metodou laboratorní diagnostiky jsou tzv. buněčné testy, které sledují aktivaci bazofilů pomocí detekce histaminu, jako mediátoru hypersenzitivní reakce, nebo měření určitých typických znaků pro aktivaci bazofilů na průtokovém cytometru (Honzová, 2009).

Velkou nevýhodou měření specifických IgE je především náročnost na objem vzorku, což je problém zejména u malých dětí či u pacientů, kterým z nějakého důvodu není možné odebrat požadované množství materiálu na stanovení (Melioli, a další, 2011).

## 5 MULTIPLOVÉ METODY

V dnešní době jsou k dispozici „singleplexové“ (1 test / vzorek séra) a „multiplexové“ (několik testů / vzorek séra) metody pro měření protilátek IgE proti alergenům. Jednostranné testy umožňují testování na přítomnost specifických IgE pouze pro alergeny, které jsou indikovány v klinické anamnéze pacienta. Na rozdíl od toho, multiplexní platforma umožňuje definování IgE odezvy jednotlivce na celé spektrum alergenů uspořádaných na čipu. Multiplexní mikročipový přístup tedy často měří přítomnost specifických IgE na alergeny neuvedené v anamnéze pacienta. Výsledkem je generování údajů o protilátkách IgE, které mohou být v rozporu s anamnézou pacienta a mohou být pacientovi obtížně vysvětlitelné (Tscheppe, a další, 2017).

### 5.1 ImmunoCAP ISAC

Mikro-technologie, která usnadnila měření specifického IgE k velkému množství alergenních bílkovin pomocí malého objemu séra, byla poprvé představena v roce 2002. Společnost VBC Genomics vyvinula alergenovou mikročipovou technologii, která byla přeměněna na komerční produkt ImmunoCAP Immuno Solid-Phase Allergen Chip (ISAC) od společnosti ThermoFisher Scientific. V současné době je touto metodou možno měřit až 176 alergenů, z nichž 127 je rekombinantních (Tscheppe, a další, 2017) (Hage, a další, 2017).

Princip testu je založen na vazbě specifických IgE protilátek, z dostatečného množství séra (pouze 40  $\mu$ L) nebo jiných tělních tekutin, na směs molekul alergenů umístěných v malém množství v tripletech na polymerem potažené skličko, které představuje pevnou fázi, tzv. microarray. Vazba alergen- sIgE, komplex, se detekují pomocí značené „anti-lidské“ IgE protilátky. Fluorescence je měřena laserovým skenerem, čím vyšší je fluorescence, tím více specifických IgE protilátek je přítomno ve vzorku (Hage, a další, 2017).

Hlavní výhodou použití testu založeném na mikročipu je spotřeba mnohem menšího množství alergenu (přibližně 1000krát), což je důležitý faktor, protože některé alergeny je obtížné exprimovat, čistit nebo obojí. Tato multiplexová metoda je výhodná zvláště u pacientů s potravinovými či respiračními alergiemi či při odhalování důvodu, proč pacient neuspokojivě reaguje na příslušnou léčbu. Velké využití má i při volbě náležitých alergenů pro specifickou alergenovou imunoterapii (Hage, a další, 2017) (Jensen-Jarolim, a další, 2019) (Shreffler, 2011).

## 6 STROJOVÉ UČENÍ

Strojové učení patří mezi podskupiny umělé inteligence (AI). Tato technika umožňuje počítači „se učit“ a předvídat s poskytnutými daty bez důkladného a explicitního naprogramování. V modelu strojového učení není žádoucí definovat přesná pravidla a algoritmy, která vykazují rozhodnutí přímo, na místo toho je snaha o učení počítačových systémů dělat rozhodnutí na základě učení se (přizpůsobení se změnám okolností) z velkých množin dat a objevování vzorců v datech. Strojové učení bylo definováno jako „učení zahrnující konstrukci algoritmů, které se učí z již získaných dat a na základě těchto dat vytvářejí předpovědi“, to znamená, že jde o typ sebe-posíleného učení „s větší zkušeností“. Ovšem, stejně jako v případě jiných souvisejících statistických technik, jako je lineární regrese, jsou pro zdokonalení modelu požadována další „zpracovaná“ data, nikoli pouze „poučení se ze zkušenosti“ samo o sobě. Počítače proto zůstávají mnohem méně efektivní než lidé při učení a zobecňování konceptů z relativně malého souboru dat. (Tong Meng, a další, 2019) (Chan, a další, 2018) (Hurwitz, a další, 2018).

Hlavním algoritmem pro strojové učení je tzv. neuronová síť, což je v podstatě systém navzájem propojených uzlů, které jsou schopny dobře rozpoznávat vzorce z dat, které jimi protékají. Analogicky si je lze do jisté míry představit jako vzájemně propojené buňky lidského nervového systému. Tzv. hluboké učení je poté podmnožinou strojového učení, kde jsou neuronové sítě uspořádány do mnoha vrstev se sadou mnoha algoritmů, přes které probíhá modelování abstrakce na vysoké úrovni. Výsledek učení lze pak použít pro odhad, predikci (výpočet pravděpodobnosti událostí nebo prognózy výsledků) a klasifikaci (vyhledávání souvislostí v datech a rozřazování dat do skupin) známých dat (Tong Meng, a další, 2019) (Chan, a další, 2018) (Hurwitz, a další, 2018).

# PRAKTICKÁ ČÁST

## 7 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

Cílem práce je aplikovat procesy strojové analýzy na databázi výsledků multiplexového stanovení specifických IgE metodou ImmunoCAP ISAC. Zjištěné závislosti porovnat na základě homologie alergenů.

## **8 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY**

Výzkumný problém číslo 1: Ověřit závislosti zjištěné matematickým hodnocením na základě porovnávání homologie alergenů.

Výzkumný problém číslo 2: Ověřit závislosti zjištěné matematickým hodnocením na základě rozdělení do proteinových skupin alergenů.

## 9 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Ke strojové analýze byl poskytnut soubor výsledků měření alergenů metodou ImmunoCAP ISAC získaných ve Fakultní nemocnici Plzeň v letech 2010 až 2018. Za tuto dobu se podařilo nashromáždit výsledky multiplexového testu 1766 ambulantních pacientů, kteří docházeli na Ústav alergologie a imunologie. Z vyšetřovaných pacientů bylo 1081 žen a 685 mužů, přičemž věkový průměr pacientů byl 30,8 let. Získaná data měření metodou ImmunoCAP ISAC jsou uvedena v tabulce ve speciálních arbitrárních jednotkách ISU-E /ISAC Standardized Units for IgE/, tato data byla následně poskytnuta Výzkumnému centru NTIS Fakulty aplikovaných věd Západočeské univerzity v Plzni ke strojovému zpracování.

Pacienti byli testováni na 125 alergenů, které ImmunoCAP ISAC nabízí, což znamená, že celkově bylo k dispozici 220750 jednotlivých výsledků.

*Tabulka 1: Alergeny testované ImmunoCAP ISAC I.*

Act d 1	Act d 2	Act d 5	Act d 8	Aln g 1
Alt a 1	Alt a 6	Amb a 1	Ana c 2	Ana o 2
Ani s 1	Ani s 3	Api g 1	Api m 1	Api m 4
Ara h 1	Ara h 2	Ara h 3	Ara h 8	Art v 1
Art v 3	Asp f 1	Asp f 2	Asp f 3	Asp f 4
Asp f 6	Ber e 1	Bet v 1	Bet v 2	Bet v 4
Bla g 1	Bla g 2	Bla g 4	Bla g 5	Bla g 7
Bos d 4	Bos d 5	Bos d 6	Bos d 8	Bos d lactoferrin

*Tabulka 2: Alergeny testované ImmunoCAP ISAC II.*

Can f 1	Can f 2	Can f 3	Cla h 8	Cor a 1.0101
Cor a 1.0401	Cor a 8	Cor a 9	Cry j 1	Cup a 1
Cyn d 1	Cyp c 1	Dau c 1	Der f 1	Der f 2
Der p 1	Der p 10	Der p 2	Equ c 3	Eur m 2
Fel d 1	Fel d 2	Fel d 4	Gad c 1	Gal d 1
Gal d 2	Gal d 3	Gal d 5	Gly m 4	Gly m 5
Gly m 6	Hev b 1	Hev b 3	Hev b 5	Hev b 6
Hev b 8	Mal d 1	Mer a 1	Mus m 1	Ole e 1

*Tabulka 3: Alergeny testované ImmunoCAP ISAC III.*

Ole e 2	Par j 2	Pen a 1	Pen i 1	Pen m 1
Phl p 1	Phl p 11	Phl p 12	Phl p 2	Phl p 4
Phl p 5	Phl p 6	Phl p 7	Pla a 1	Pla a 2
Pru p 1	Pru p 3	Sal k 1	Ses i 1	Tri a 18
Tri a Gliadin	Tri a 19.0101	Tri a aA_TI	Ara h 6	Ara h 9
Blo t 5	Can f 5	Che a 1	Equ c 1	Fag e 2
Hev b 6.01	Jug r 1	Jug r 2	Jug r 3	Lep d 2
MUXF3	Ole e 7	Ole e 9	Pen m 2	Pen m 4
Pla a 3	Pla l 1	Pol d 5	Tri a 14	Ves v 5

## 10 METODIKA PRÁCE

### 10.1 ImmunoCAP ISAC

Materiálem pro ImmunoCAP ISAC stanovení může být heparinizovaný vzorek séra nebo plazmy z žilní či kapilární krve, přičemž hemolýza stanovení nijak neinterferuje. Před samotným začátkem analýzy by vzorky měly být vytemperovány na laboratorní teplotu a měly by být dostatečně homogenní (Phadia AB, 2019).

*Obrázek 1: Pracovní plocha pro přípravu ImmunoCAP ISAC čipů*

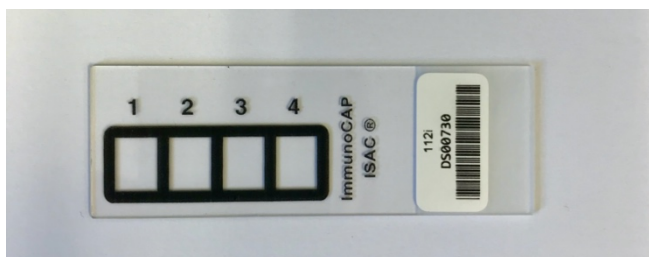


*Zdroj: vlastní*

Máme-li připravené vzorky patientského séra nebo plazmy, vyjmeme příslušný počet sklíčků z obalu od výrobce a umístíme je do vlhké komůrky reakční stranou nahoru, tato sklíčka jsou zároveň reakčními čipy, které mají na svém povrchu čtyři reakční jamky, do kterých následně budeme aplikovat reagenty. V dalším kroku napipetujeme 30  $\mu$ l séra nebo plazmy do reakční jamky na sklíčku tak, abychom se nedotkli špičkou pipety reakční plochy a také, aby byla naznačená výseč na sklíčku zcela pokryta vzorkem. Sklíčka inkubujeme dvě hodiny při laboratorní teplotě ve tmě. Po uplynutí doby inkubace sklíčka umístíme do nádoby s promývacím roztokem na míchačku na cca deset minut a následně do nádoby s destilovanou vodou na míchačku na cca třicet sekund. Po promytí necháme sklíčka řádně oschnout (Phadia AB, 2019).



Obrázek 2: ImmunoCAP ISAC sklíčko /čip/



Zdroj: vlastní

V dalším kroku umístíme suchá sklíčka zpět do vlhké komůrky a napipetujeme do reakčních jamek 30  $\mu$ l konjugátu s detekčními IgE protilátkami, takto inkubujeme půl hodiny při laboratorní teplotě ve tmě. Po uplynutí inkubace sklíčka opět umístíme do promývacího roztoku na míchačku a poté do destilované vody. Kompletně oschnuté čipy jsou připraveny k odečítání na skenovacím zařízení LuxScan-10K/A (Phadia AB, 2019).

Obrázek 3: Skenovací zařízení a počítač s příslušným programem



Zdroj: vlastní

## 10.2 Metoda strojového učení

Na základě poskytnutých dat byl natrénován jednoduchý model logistické regrese, který se snažil predikovat hodnoty v jednotlivých sloupcích (tj. pro jednotlivé alergeny) na základě hodnot v ostatních sloupcích. Jelikož logistická regrese je binární klasifikace, bylo predikováno pouze do tříd nulová / nenulová hodnota alergenu. Pro získání váhy dané závislosti bylo použito nejprve L1 regularizace pro výběr příznaků. S vybranými příznaky byl natrénován klasifikátor a váhy jednotlivých závislostí byly vyhodnoceny jako (F1-přesnost klasifikace \* váha daného alergenu).

## 11 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledná data z měření pacientů metodou ImmunoCAP ISAC byla zpracována do přehledné tabulky a následně poskytnuta Výzkumnému centru NTIS Fakulty aplikovaných věd Západočeské univerzity v Plzni. Výzkumné centrum NTIS poté předalo výsledky strojové analýzy zpět na Ústav alergologie a imunologie Fakultní nemocnice Plzeň, kde jsem zjišťovala a ověřovala, zda jsou výsledky strojové analýzy věrohodné a zda jsou získané závislosti mezi alergeny správné.

V následujících oddílech jsou členěny do tabulek výsledky měření korelací alergenů pomocí metody strojového učení ve srovnání s homologii jednotlivých proteinů alergenu, které jsem zjišťovala z dostupných odborných zdrojů a to konkrétně z webu [www.allergome.org](http://www.allergome.org).

## 11.1 Rodina PR-10 proteinů

Tabulka 4: Srovnání homologie a korelace alergenů komponentové rodiny PR-10 proteinů

Alergen 1 [A1]	Alergen 2 [A2]	Homologie [%]	Korelace	Rodina A1	Rodina A2
<b>Aln g1</b>	Cor a1.010	76	29,12	PR-10	PR-10
<b>Aln g1</b>	Cor a1.040	66	21,57	PR-10	PR-10
<b>Aln g1</b>	Bet v1	80	13,00	PR-10	PR-10
<b>Ara h8</b>	Cor a1.010	45	11,82	PR-10	PR-10
<b>Ara h8</b>	Bet v1	46	11,78	PR-10	PR-10
<b>Ara h8</b>	Mal d1	47	10,55	PR-10	PR-10
<b>Bet v1</b>	Cor a1.040	65	88,71	PR-10	PR-10
<b>Bet v1</b>	Mal d1	60	47,43	PR-10	PR-10
<b>Bet v1</b>	Pru p1	58	18,94	PR-10	PR-10
<b>Cor a1.010</b>	Bet v1	72	26,66	PR-10	PR-10
<b>Cor a1.010</b>	Aln g1	73	25,73	PR-10	PR-10
<b>Cor a1.040</b>	Bet v1	70	38,19	PR-10	PR-10
<b>Cor a1.040</b>	Mal d1	63	21,37	PR-10	PR-10
<b>Mal d1</b>	Bet v1	60	38,44	PR-10	PR-10
<b>Mal d1</b>	Pru p1	73	26,08	PR-10	PR-10
<b>Mal d1</b>	Cor a1.040	56	11,50	PR-10	PR-10
<b>Pru p1</b>	Mal d1	75	43,49	PR-10	PR-10
<b>Pru p1</b>	Cor a1.040	64	14,58	PR-10	PR-10

Výsledky porovnání změřené korelace a nalezené homologie alergenů si odpovídají, protože alergen v prvním sloupci (Alergen 1) patří do stejné komponentové rodiny PR-10 proteinů jako alergen v druhém sloupci (Alergen 2). Ve všech případech byla nalezena mezi alergeny homologie z dostupných zdrojů.

## 11.2 Profiliny

Tabulka 5: Srovnání homologie a korelace alergenů komponentové rodiny Profilinů

Alergen 1 [A1]	Alergen 2 [A2]	Homologie [%]	Korelace	Rodina A1	Rodina A2
<b>Bet v2</b>	Hev b8	NE	23,22	Profiliny	Profiliny
<b>Bet v2</b>	Mer a1	NE	13,27	Profiliny	Profiliny
<b>Hev b8</b>	Bet v2	75	35,88	Profiliny	Profiliny
<b>Hev b8</b>	Mer a1	NE	14,31	Profiliny	Profiliny
<b>Mer a1</b>	Hev b8	73	25,66	Profiliny	Profiliny
<b>Mer a1</b>	Bet v2	81	22,73	Profiliny	Profiliny

Výsledky změřené korelace a nalezené homologie můžeme pokládat za odpovídající, protože všechny uvedené alergeny patří do komponentové rodiny Profilinů. Důvodem, proč nebyla nalezena homologie v určitých kombinacích alergenů je pouze nedostatečnost v dostupných zdrojích informací, protože při zadání alergenů v obráceném pořadí shoda nalezena byla.

### 11.3 Pektátová lyasa

Tabulka 6: Srovnání homologie a korelace alergenů komponentové rodiny Pektátové lyasy

Alergen 1 [A1]	Alergen 2 [A2]	Homologie [%]	Korelace	Rodina A1	Rodina A2
<b>Cry j1</b>	Cup a1	78	18,09	Pektátová lyasa	Pektátová lyasa
<b>Cup a1</b>	Cry j1	78	37,06	Pektátová lyasa	Pektátová lyasa

Alergenům v této tabulce byla naměřena jednak vysoká korelace a zároveň jsem nalezena i značnou homologii, což vzhledem k zařazení obou alergenů do alergenové rodiny Pektátové lyasy, odpovídá.

## 11.4 Polkalcin

*Tabulka 7: Srovnání homologie a korelace alergenů komponentové rodiny Polkalcinu*

Alergen 1 [A1]	Alergen 2 [A2]	Homologie [%]	Korelace	Rodina A1	Rodina A2
<b>Bet v4</b>	Phl p7	67	25,82	Polkalcin	Polkalcin
<b>Phl p7</b>	Bet v4	67	28,87	Polkalcin	Polkalcin

U těchto dvou alergenů z alergenové rodiny Polkalcinu byly naměřeny relativně vysoké korelace strojovou metodou a zároveň jsem našla i vysokou homologie.

## 11.5 Beta-expansin

Tabulka 8: Srovnání homologie a korelace alergenů komponentové rodiny Beta-expansinu

Alergen 1 [A1]	Alergen 2 [A2]	Homologie [%]	Korelace	Rodina A1	Rodina A2
<b>Cyn d1</b>	Phl p1	70	36,53	Beta-expansin	Beta-expansin
<b>Phl p1</b>	Cyn d1	67	73,41	Beta-expansin	Beta-expansin

Alergeny Cyn d 1 a Phl p 1 mají vysokou procentuální homologii, které odpovídá i změřená korelace. Oba tyto alergenů patří do jedné skupiny Beta-expansinu.

## 11.6 Sérový albumin

Tabulka 9: Srovnání homologie a korelace alergenů komponentové rodiny Sérového albuminu

Alergen 1 [A1]	Alergen 2 [A2]	Homologie [%]	Korelace	Rodina A1	Rodina A2
<b>Can f3</b>	Fel d2	83	23,69	Sérový albumin	Sérový albumin
<b>Fel d2</b>	Can f3	85	22,88	Sérový albumin	Sérový albumin

Změřená korelace těchto dvou alergenů je relativně vysoká, odpovídá jí i vysoká nalezená homologie, příčinou této shody je přítomnost proteinů Sérového albuminu u obou zmíněných alergenů.



## 11.7 CCD cukerná složka

Tabulka 10: Srovnání homologie a korelace alergenů přes cukernou složku CCD

Alergen 1 [A1]	Alergen 2 [A2]	Homologie [%]	Korelace	Rodina A1	Rodina A2
<b>Cyn d1</b>	Jug r2	NE	16,28	Beta-expansin (CCD)	7/8S Globulin (CCD)
<b>Cyn d1</b>	Pla a2	NE	12,11	Beta-expansin (CCD)	Polygalakturonasa (CCD)
<b>Phl p1</b>	Pla a2	NE	14,18	Beta-expansin (CCD)	Polygalakturonasa (CCD)
<b>Phl p4</b>	Jug r2	NE	20,96	CCD	7/8S Globulin (CCD)
<b>Phl p4</b>	Cyn d1	70	16,43	CCD	Beta-expansin (CCD)
<b>Pla a2</b>	Jug r2	NE	22,96	Polygalakturonasa (CCD)	7/8S Globulin (CCD)
<b>Pla a2</b>	Cry j1	NE	14,16	Polygalakturonasa (CCD)	Pektátová lyasa (CCD)

V případě těchto alergenů byla změřena relativně vysoká korelace, ale homologii komponentových rodin proteinů jsem nenalezla. Důvodem je, že homologie se neuskutečňuje přes složku proteinu, ale naopak přes cukernou složku CCD, která se vyskytuje u všech zmíněných alergenů.

## 11.8 Ostatní

*Tabulka 11: Srovnání homologie a korelace alergenů ostatních komponentových rodin*

Alergen 1 [A1]	Alergen 2 [A2]	Homologie [%]	Korelace	Rodina A1	Rodina A2
<b>Alt a1</b>	Act d2	NE	14,73	Alt a 1 rodina	TLP
<b>Phl p5</b>	Cyn d1	NE	11,10	Skupina trav 5/6	Beta-expansin (CCD)

V případě těchto alergenů jsem nenalezla homologii v dostupných zdrojích, alergeny nepatří do stejných komponentových rodin a ani nereagují přes cukernou složku.

## DISKUZE

Homologie, nebo-li shoda určitého znaku dvou rozdílných alergenů, je dána především shodností v sekvenci aminokyselin v proteinových rodinách, kterými je alergen tvořen. Ze souboru dat, které jsem zkoumala, bylo nejvíce zástupců z rodiny PR-10 proteinů (alergen burského ořechu Ara h 8, břízy Bet v 1, lískového ořechu Cor a 1.0401, jablka Mal d 1 a další...). Homologii 45,9 % v aminokyselinové sekvenci mezi Ara h 8 a Bet v 1 potvrzuje například Mittag, a další (2004), kteří v článku poukazují na vysokou četnost kombinované alergie na pyl břízy a burského ořechu právě díky náležitosti alergenů do stejné alergenové rodiny PR-10 proteinu. Výsledky mého hodnocení jsou také ve shodě s tvrzením Savazzini, a dalších (2019), kteří v článku zmiňují hlavní rekombinantní alergen jablka Mal d 1 ve shodě s alergenem pylu břízy Bet v 1 a zároveň i s alergenem broskve Pru p 1. Tyto alergeny vyvolávají IgE cross-reaktivní reakci opět na základě homologie souhlasné rodiny PR-10 proteinu. Kombinovaná pyl-potravinová alergie vznikající na základě cross-reaktivity a homologie mezi alergenem pylu břízy Bet v 1 a lískovým ořechem Cor a 1 je zmíněna Hofmann, a dalšími (2012), kteří ji uvádějí jako nejrozšířenější kombinovanou alergii u dospělých v Evropě.

U zástupců rodiny Profilinů (bříza Bet v 2, latex Hev b 8, bažanka roční Mer a 1) jsem zjistila taktéž vysokou homologii. Konkrétní případ cross-reaktivity z rodiny Profilinů zmiňuje například Cabanos, a další (2010) a to mezi alergenem břízy Bet v 2 a alergeny burského ořechu nebo mezi Bet v 2 a bojínkem lučním Phl p 12. Vallverdú, a další (2005) uvádějí že přibližně 20 % vyšetřovaných pacientů s prokázanou alergií na bažanku roční Mar a 1 má zároveň alergii na pyl břízy.

Další skupinou, u které jsem zjistila vysokou homologii, byly alergeny z rodiny Pektátové lyasy a to konkrétně kryptomerie japonská Cry j 1 a cypřiš Cup a 1. Srovnání a shodu v aminokyselinové sekvenci potvrzují ve svém článku kupříkladu Midoro-Horiuti, a další (2003). I u alergenů břízy Bet v 4 a bojínku lučního Phl p 7 z proteinové rodiny Polkalcinu jsem našla homologii odpovídající změřené korelaci, což potvrzují mimo jiné Neudecker, a další (2004), kteří přímo zmiňují pozoruhodnou strukturální podobnost těchto dvou alergenů. Velmi často způsobují IgE cross-reaktivitu polysenzitizovaných pacientů. Homologii troskut prstnatého Cyn d 1 a bojínku lučního Phl p 1 z proteinové rodiny Beta-expansinu popisují Niederberger, a další (2005). Alergeny rodiny Sérového albuminu Can f 3 psa domácího a Fel d 2 kočky domácí jsou u těchto zvířat spíše minoritní, vykazovaly ale velmi

vysokou korelaci a taktéž i nalezenou homologii, kterou zmiňuje například Asarnoj, a další (2015).

Velkou skupinou korelujících alergenů byly ty, které reagovaly přes cukernou složku CCD. U nich jsem ve většině případů homologii nezjistila, nepatří totiž do stejných proteinových rodin. Westman, a další (2020) uvádějí, že průměrně u 50 % dětí senzitivizovaných na bojínek luční Phl p 4 se ve věku 4, 8 a 16 let vytváří IgE reaktivita na další alergeny právě přes molekuly obsahující CCD složku. Konkrétně na cypřiš Cup a 1, kryptomerii japonskou Cry j 1, platan Pla a 2, troskut prstnatý Cyn d 1 a ořešák vlašský Jug r 2, což jsou právě ty alergeny, u kterých jsem ověřovala korelaci.

Poslední skupinou byly alergeny, u kterých byla změřena korelace a přesto nepatří do stejných proteinových rodin a ani neobsahují CCD složku. Interakci alergenů plísně černě střídavé (*Alternarie*) Alt a 1 a dužiny kiwi Act d 2 zmiňují Barre, a další (2016). Podle nich je tato kosenzibilizace velmi častá, přesto není zcela známo, jakým mechanismem k ní dochází. Teorie je taková, že pokud roste *Alternarie* na povrchu plodu kiwi, mohou se z ní dostat její výtrusy, potažmo alergeny Alt a 1, až do dužiny ovoce, kde proteiny Alt a 1 asociují s Act d 2 pomocí elektrostatických a hydrofilních či hydrofobních sil.

Neobjasněnou zůstává korelace mezi alergenem troskutu prstnatého Cyn d 1 a bojínku lučního Phl p 5. Velmi zajímavý je fakt, že na Cyn d 1 je alergické vysoké procento pacientů, přestože se tato rostlina v našich přírodních podmínkách spíše nevyskytuje. Cross-reaktivita mezi zmíněnými alergeny by se mohla dít na základě travních rodin, přičemž podobnou shodu pozoroval již prof. Panzner, a další (2014), kteří v článku tvrdí, že kosenzibilizace může být dána reakcí s molekulami jiných trav, například právě s Phl 1.

## ZÁVĚR

Cílem práce bylo zjistit, zda lze aplikovat procesy strojové analýzy na databázi výsledků stanovení specifických IgE. Hodnocení pomocí matematické analýzy je v tomto případě možné, zejména pak pro hodnocení míry korelace alergenů stejných proteinových rodin jako jsou PR-10 proteiny, Profiliny, Pektátová lyasa, Polkalcin, Beta-expansin a Sérový albumin či pro alergeny, které reagují přes cukernou složku CCD. U všech těchto zmíněných alergenů (s výjimkou CCD) jsem našla v dostupných zdrojích značnou míru homologie (shodu v sekvenci aminokyselin). U všech dvojic alergenů jsem také potvrdila korelaci a možnou cross-reaktivitu z dostupných odborných článků.

## SEZNAM LITERATURY

1. ASCIA. What is allergy? Australasian Society of Clinical Immunology and Allergy [online]. May 2019 [cit. 2020-05-01]. Dostupné z: <https://www.allergy.org.au/patients/about-allergy/what-is-allergy>
2. ABBAS, Abdul, Andrew LICHTMAN a Shiv PILLAI, a další. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. 4. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013. ISBN 978-1-4557-0707-2.
3. ASARNOJ, Anna, Carl HAMSTEN a Konrad WADÉN, et al. Sensitization to cat and dog allergen molecules in childhood and prediction of symptoms of cat and dog allergy in adolescence: A BAMSE/MeDALL study. Journal of Allergy and Clinical Immunology [online]. Mosby, 10 December 2015, 137(3), 813-821.e7 [cit. 2020-03-04]. ISSN 0091-6749. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674915015742>
4. BARRE, A., F. BIENVENU a S. CAZE-SUBRA, et al. L'association Alt a 1 (Alternaria)–Act d 2 (kiwi) : origine et pertinence clinique possible. Revue Française d'Allergologie [online]. Elsevier Masson SAS, 23 February 2016, 56(2), 84-89 [cit. 2020-03-04]. ISSN 1877-0320. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877032015004698#!>
5. BARRE, A., M. SIMPLICIEN a G. CASSAN, et al. Food allergen families common to different arthropods (mites, insects, crustaceans), mollusks and nematods: Cross-reactivity and potential cross-allergenicity. Revue Française d'Allergologie [online]. Elsevier Masson SAS, 23 November 2018, 58(8), 581-593 [cit. 2020-03-10]. ISSN 1877-0320. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877032018304147>
6. CABANOS, Cerrone, Mary Rose TANDANG-SILVAS a Van ODIJK, et al. Expression, purification, cross-reactivity and homology modeling of peanut profilin. Protein Expression and Purification [online]. 15 March 2010, 73(1), 36-45 [cit. 2020-03-03]. ISSN 1046-5928. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592810000689>
7. CHAN, Stephen a Eliot SIEGEL. Will machine learning end the viability of radiology as a thriving medical specialty? Br J Radiol. [online]. 2018 Oct 30, 92(1094) [cit. 2020-

- 03-03]. ISSN 20180416. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6404816/>
8. CHAPEL, Helen, Mansel HAENEY, Siraj MISBACH a Neil SNOWDEN. Základy klinické imunologie. Praha: Triton, 2018. ISBN 978-80-7553-396-8.
  9. CHAPMAN, Martin. Allergens. Encyclopedia of Immunology [online]. Second. London: Elsevier, 1998, s. 64-70 [cit. 2020-02-05]. ISBN 9780122267659. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122267656000219>
  10. DELVES, Peter, Seamus MARTIN, Dennis BURTON a Ivan ROITT. Roitt's Essential Immunology. Chichester: Wiley, 2017. ISBN 9781118415771.
  11. DOAN, Thao, Roger MELVOLD, Susan VISELLI a Carl WALTENBAUGH. Immunology. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2013. ISBN 978-1-4511-1154-5.
  12. FUCHS, Martin, et al. Potravinová alergie a intolerance. Praha: Mladá fronta, 2016. ISBN 978-80-204-3757-0.
  13. GADERMAIER, E., M. LEVIN, S. FLICKER a M. OHLIN. The Human IgE Repertoire. Int Arch Allergy Immunol [online]. 2015 Jul 9, 163(2), 77-91 [cit. 2020-02-05]. DOI: 10.1159/000355947. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4497803/>
  14. GOLDEN, David. Chapter 15 - Insect Allergy. Middleton's Allergy Essentials[online]. Elsevier, 2016, s. 377-393 [cit. 2020-02-04]. ISBN 978-0-323-37579-5. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323375795000155>
  15. GOULD, Hannah a Rebecca BAVIL. IgE. Encyclopedia of Immunology[online]. Second. Elsevier, 2004, s. 1202-1208 [cit. 2020-03-13]. ISBN 9780122267659. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122267656003248>
  16. HAGE, Marianne, Carl HAMSTEN a Rudolf VALENTA. ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. Journal of Allergy and Clinical Immunology [online]. 25 May 2017, 140(4), 974-977 [cit. 2020-02-05]. ISSN 0091-6749. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674917308448>
  17. HEDDLE, Robert, A. SMITH a R. WOODMAN, et al. Randomized controlled trial demonstrating the benefits of delta inulin adjuvanted immunotherapy in patients with

- bee venom allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 9 July 2019, 144(2), 504-513.e16 [cit. 2020-02-04]. ISSN 0091-6749. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674919306207>
18. HELBERT, Matthew. *Imunology for medical students*. Philadelphia: Elsevier, 2017. ISBN 9780702068010.
19. HOFMANN, Claudia, Stephan SCHEURER a Kathrin ROST, et al. Cor a 1–reactive T cells and IgE are predominantly cross-reactive to Bet v 1 in patients with birch pollen–associated food allergy to hazelnut. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 11 December 2012, 131(5), 1384-1392.e6 [cit. 2020-03-03]. ISSN 0091-6749. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674912017071>
20. HONZOVÁ, Stanislava. Možnosti laboratorní diagnostiky alergie. *Interní medicína pro praxi* [online]. 4. Listopad 2009, 11(4), 168-170 [cit. 2020-02-07]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2009/04/05.pdf>
21. HOŘEJŠÍ, Václav, Bartůňková JIŘINA, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie*. 6. Praha: Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.
22. HURWITZ, Judith a Daniel KIRSCH. *Machine Learning For Dummies*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2018. ISBN 978-1-119-45494-6.
23. JENSEN-JAROLIM, E., A. N. JENSEN a G. W. CANONICA. Debates in allergy medicine: Molecular allergy diagnosis with ISAC will replace screenings by skin prick test in the future. *World Allergy Organization Journal* [online]. 2017, 15 April 2019, (10), 33 [cit. 2020-02-05]. ISSN 1939-4551. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1939455119300304>
24. JÍLEK, Petr. *Imunologie stručně, jasně, přehledně. IV*. Praha: Grada Publishing, 2014. ISBN 978-80-247-4822-1.
25. KOWALSKI, Marek, Ignacio ANSOTEGUI a Werner ABERER, et al. Risk and safety requirements for diagnostic and therapeutic procedures in allergology: World Allergy Organization Statement. *World Allergy Organization Journal* [online]. 2016, 17 April 2019, 9, 33 [cit. 2020-02-09]. ISSN 1939-4551. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1939455119301875>



26. JAN, Krejsek, Ctirad ANDRÝS a Irena KRČMOVÁ. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon, 2016. ISBN 978-80-86472-74-4.
27. MELIOLI, Giovanni, Floriano BONIFAZI a Sergio BONINI, et al. The ImmunoCAP ISAC molecular allergology approach in adult multi-sensitized Italian patients with respiratory symptoms. *Clinical Biochemistry* [online]. 2011, 19 May 2011, **44**(12), 1005-1011 [cit. 2020-02-07]. ISSN 0009-9120. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912011003584>
28. MIDORO-HORIUTI, Terumi, Venkatarajan MATHURA a Cathrine SCHEIN, et al. Major linear IgE epitopes of mountain cedar pollen allergen Jun a 1 map to the pectate lyase catalytic site. *Molecular Immunology*[online]. 2003, 12 September 2003, **40**(8), 555-562 [cit. 2020-03-02]. ISSN 0161-5890. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589003001688>
29. MITTAG, Diana, Jaap Akkerdaas a Barbara BALLMER-WEBER, et al. Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2004, 2 December 2004, **114**(6), 1410-1417 [cit. 2020-03-02]. ISSN 0091-6749. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674904024054>
30. MITTERMANN, I., M. ZIDARN a M. SILAR, et al. Recombinant allergen-based IgE testing to distinguish bee and wasp allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2010, 13 May 2010, **125**(6), 1300-1307.e3 [cit. 2020-02-13]. ISSN 0091-6749. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674910005397>
31. NEUDECKER, P., J. NERKAMP a A. EISENMANN, et al. Solution Structure, Dynamics, and Hydrodynamics of the Calcium-bound Cross-reactive Birch Pollen Allergen Bet v 4 Reveal a Canonical Monomeric Two EF-Hand Assembly with a Regulatory Function. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2004, **336**(5), 1141-1157 [cit. 2020-03-04]. ISSN 0022-2836. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283604000257>
32. NIEDERBERGER, V., S. LAFFER a R. FROSCHL, et al. IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, and Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online].

- 1998, **101**(2), 258-264 [cit. 2020-03-04]. ISSN 0091-6749. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674998703914>
33. PANZNER, P., M. VACHOVÁ a P. VÍTOVCOVÁ, et al. A comprehensive analysis of middle-European molecular sensitization profiles to pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* [online]. 2014, 2014 May 27, **164**(1), 74-82 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1159/000362760. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24903005>
34. PETRŮ, Vít a Irena KRČMOVÁ. *Anafylaxe - život ohrožující alergie*. Praha: MAXDORF, 2011. ISBN 978-80-7345-211-7.
35. PHADIA AB. *ImmunoCAP ISAC: ImmunoCAP™ ISACE112i\_POKYNY K POUŽITÍ*. Uppsala, Sweden: Phadia AB, 2019.
36. PUNT, Jenni, Sharon STRANFORD, Patricia JONES a Judith OWEN. *Kuby Immunology*. New York: W.H. Freeman and Company, 2019. ISBN 978-1-319-11470-1.
37. SAVAZZINI, Federica, Stefano DEL DUCA a Mara VEGRO, et al. Immunological characterization of recombinant Mal d 1, the main allergen from apple (*Malus x domestica* L. Borkh). *Scientia Horticulturae* [online]. 2020, 1 November 2019, **261** [cit. 2020-03-03]. ISSN 0304-4238. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030442381930812X>
38. SHREFFLER, Wayne. Microarrayed recombinant allergens for diagnostic testing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2011, 31 March 2011, **127**(4), 843-849 [cit. 2020-02-05]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674911002739>
39. STEWART, G., J. RICHARDSON a J. ZHANG, et al. 26 - The Structure and Function of Allergens. *Middleton's Allergy* [online]. 8th. Elsevier, 2013, s. 398-429 [cit. 2020-01-06]. ISBN 978-0-323-08593-9. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323085939000279>
40. SUTTON, B., A. DAVIES, H. BAX a S. KARAGIANNIS. IgE Antibodies: From Structure to Function and Clinical Translation. *Antibodies (Basel)* [online]. 2019 Feb 22, **8**(1), 19 [cit. 2020-02-05]. DOI: 10.3390/antib8010019. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6640697/>

41. ŠTERZL, Ivan a kolektiv. *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékařství*. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-0972-0.
42. TONG, Meng, Jing XUYANG, Yan ZHENG a Pedrycz WITOLD. A survey on machine learning for data fusion. *Information Fusion* [online]. 2020, 10 December 2019, **57**, 115-129 [cit. 2020-03-03]. ISSN 1566-2535. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1566253519303902>
43. TSCHEPPE, Angelika a Heimo BREITENEDER. Recombinant Allergens in Structural Biology, Diagnosis, and Immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol.* [online]. 2017, 2017 May 4, **172**(4), 187–202 [cit. 2020-02-05]. DOI: 10.1159/000464104. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5472216/>
44. VALENTA, Rudolf, et al. Allergen Extracts for In Vivo Diagnosis and Treatment of Allergy: Is There a Future? *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* [online]. 2018, online 5 October 2018, **6**(6), 1845-1855.e2 [cit. 2020-02-03]. ISSN 2213-2198. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213219818305695>
45. VALENTA, Rudolf a Dietrich KRAFT. From allergen structure to new forms of allergen-specific immunotherapy. *Current Opinion in Immunology* [online]. 2002, 25 October 2002, **14**(6), 718-727 [cit. 2020-02-05]. ISSN 0952-7915. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791502004028>
46. VALENTA, R., H. HOCHWALLNER, B. LINHART a S. PAHR. Food Allergies: The Basics. *Gastroenterology* [online]. May 2015, **148**(6), 1120–1131.e4 [cit. 2019-12-18]. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.02.006>. Dostupné z: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(15\)00197-3/fulltext](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(15)00197-3/fulltext)
47. VALLVERDÚ, A., J. ASTURIAS a C. ARILLA, et al. Characterization of recombinant *Mercurialis annua* major allergen Mer a 1 (profilin). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 1998, 2 November 2005, **101**(3), 363-370 [cit. 2020-03-02]. ISSN 0091-6749. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674998702490>
48. WAYNE, Thomas. The advent of recombinant allergens and allergen cloning. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2011, 20 January 2011, **127**(4), 855-859

[cit. 2020-02-05]. ISSN 0091-6749. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674910030447>

49. WESTMAN, M., K. ABERG a D. APOSTOLOVIC, et al. Sensitization to grass pollen allergen molecules in a birth cohort—natural Phl p 4 as an early indicator of grass pollen allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 17 January 2020 [cit. 2020-03-04]. ISSN 0091-6749. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674920300403>

## **SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha A – Výsledek ImmunoCAP ISAC analýzy v programu MIA

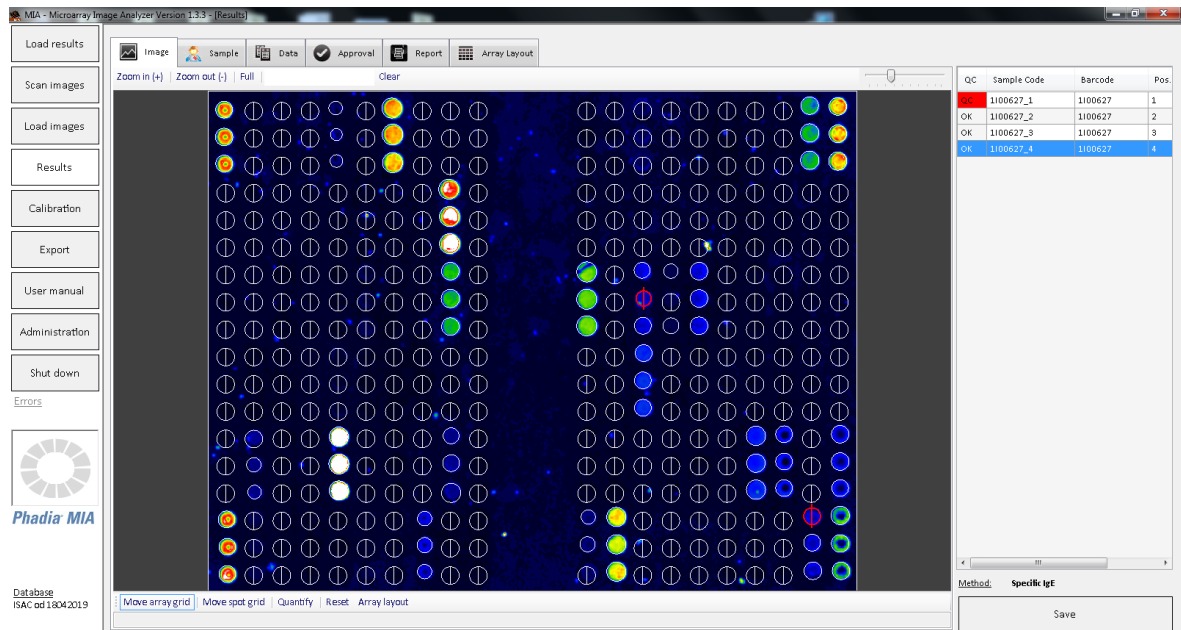
Příloha B – Výsledek kontroly ImmunoCAP ISAC analýzy

Příloha C – Seznam nejčastějších alergenů

Příloha D – Souhlas s poskytováním informací

# PŘÍLOHY

## Příloha A – Výsledek ImmunoCAP ISAC analýzy v programu MIA



Zdroj: Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

## Příloha B – Výsledek kontroly ImmunoCAP ISAC analýzy

**Thermo**  
SCIENTIFIC

**ImmunoCAP**  
ISAC

INFORMACE O VZORKU		INFORMACE O PACIENTOVÍ	
ID vzorku:	<b>CTR03</b>	ID pacienta:	
Datum získání vzorku:	10.1.2020	Jméno:	
Stav schválení:	Měřené	Datum narození:	Věk:
Datum tisku:	10.1.2020	ID/MR#:	Pohlaví:
Kalibrační křivka:	CTR03 10.1.2020 DRN1H30_1		
INFORMACE O OBJEDNÁVAJÍCÍM LÉKAŘI			
Objednávající lékař:	<b>Physician Name</b>		
Adresa:			

### 1. Souhrn pozitivních výsledků IgE

#### Převážně druhově specifické potravinové komponenty

Vaječný bílek	Gal d 1	Ovomukoid	1,4 ISU-E	
	Gal d 2	Ovalbumin	26 ISU-E	

#### Převážně druhově specifické komponenty vzdušných alergenů

<b>Travní pyl</b>				
Bojínek luční	Phl p 5	Tráva, skupina 5	49 ISU-E	
<b>Stromový pyl</b>				
Bříza	Bet v 1	PR-10 protein	0,6 ISU-E	
Pyl olivovníku evropského	Ole e 1	Olivovník evropský, skupina 1	0,5 ISU-E	
<b>Pyl plevelů</b>				
Ambrozie	Amb a 1	Pektát lyáza	24 ISU-E	
Pelyněk černobýl	Art v 1	Defensin	2,2 ISU-E	
<b>Živočich</b>				
Pes	Can f 1	Lipokalin	12 ISU-E	
	Can f 2	Lipokalin	44 ISU-E	
	Can f 5	Arginin esteráza	34 ISU-E	
Kočka	Fel d 1	Uteroglobin	6,7 ISU-E	
<b>Roztoč</b>				
Dermatophagoides farinae (HDM) (roztoc domácí prachový)	Der f 1	Cysteinová proteáza	10 ISU-E	
	Der f 2	Rodina NPC2	0,7 ISU-E	
Dermatophagoides pteronyssinus (HDM) (roztoc domácí prachový)	Der p 1	Cysteinová proteáza	12 ISU-E	
	Der p 2	Rodina NPC2	0,9 ISU-E	

#### Zkříženě reagující komponenty

<b>Protein pro přenos lipidů (nsLTP)</b>				
Vlašský ořech	Jug r 3	Protein pro přenos lipidů (nsLTP)	0,8 ISU-E	
Broskev	Pru p 3	Protein pro přenos lipidů (nsLTP)	47 ISU-E	
Pelyněk černobýl	Art v 3	Protein pro přenos lipidů (nsLTP)	39 ISU-E	
Platan	Pla a 3	Protein pro přenos lipidů (nsLTP)	5,6 ISU-E	

ID VZORKU: **CTR03**

ID PACIENTA:

JMÉNO  
PACIENTA:




10.1.2020

Page 1 / 10

Zdroj: Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

## Zkříženě reagující komponenty

### PR-10 protein

Bříza	Bet v 1	PR-10 protein	0,6 ISU-E	
Jablko	Mal d 1	PR-10 protein	0,7 ISU-E	
Broskev	Pru p 1	PR-10 protein	0,4 ISU-E	

### Standardizované jednotky ISAC (ISU-E)

< 0.3  
0.3 - 0.9  
1 - 14.9  
≥ 15

### Hladina

Nerozpoznatelná  
Nízká  
Střední/vysoká  
Velmi vysoká





INFORMACE O VZORKU		INFORMACE O PACIENTOVI	
ID vzorku:	<b>CTR03</b>	ID pacienta:	
Datum získání vzorku:	10.1.2020	Jméno:	
Stav schválení:	Měřené	Datum narození:	Věk:
Datum tisku:	10.1.2020	ID/MR#:	Pohlaví:
Kalibrační křivka:	CTR03 10.1.2020 DRN1H30_1		

INFORMACE O OBJEDNÁVAJÍCÍM LÉKAŘI	
Objedávající lékař:	<b>Physician Name</b>
Adresa:	

## Phadia Xplain

### SOUHRNNÉ KOMENTÁŘE

Tento pacient má IgE proti druhově specifickým a zkříženě reagujícím komponentám. IgE proti broskvi Pru p 3 a vlašský ořech Jug r 3 je asociován s rizikem systémových alergických reakcí.

### POTRAVINOVÉ KOMPONENTY (převážně druhově specifické)

Detekován IgE proti vaječný bílek.

Vejsce: Vysoké hladiny IgE proti vaječnému Gal d 1 (ovomukoid) jsou asociovány s perzistentní alergií na vejce. Pozření syrového i zcela uvařeného vejce může vyvolat symptomy. IgE proti vaječný bílek Gal d 2 je asociován s reakcemi na syrové nebo málo zahřáté vejce.

Ořechy, semena a luštěniny: Vlašské a pekanové ořechy jsou blízké příbuzné a klinická zkřížená reaktivita je běžná.

### KOMPONENTY VZDUŠNÝCH ALERGENŮ (převážně druhově specifické)

Detekován IgE proti bojíněk luční, pes, ambrozie, dermatophagoides pteronyssinus (HDM) (roztoc domácí prachový), dermatophagoides farinae (HDM) (roztoc domácí prachový), kočka, pelyněk černobýl, bříza a pyl olivovníku evropského (uvedeno sestupně podle hladiny ISU-E).

Pyl: IgE proti komponentám bojíněk lučního může zkříženě reagovat s podobnými proteiny v jiných travinách. IgE proti bříze Bet v 1 může zkříženě reagovat s pylem příbuzných stromů a potravinami rostlinného původu obsahujícími PR-10 proteiny (např. plody růžovitých rostlin, arašídů, sóju, lískové ořechy, mrkev kiwi nebo celer). IgE proti olivovému Ole e 1, hlavní komponentě olivy, je také markerem senzitivace na jasan. IgE proti Art v 3 pelyňku černobýlu může být asociován s alergií na různé potraviny rostlinného původu. Amb a 1 je hlavní komponenta specifická pro ambrozii.

Živočichové: IgE proti pes Can f 2, pes Can f 5, pes Can f 1 a kočka Fel d 1 je asociován s respiračními symptomy. Multisenzitivace může být asociována s těžkými symptomy. Can f 5 je z prostaty odvozený alergen produkovaný psy. sIgE proti Can f 5 může mít spojitost s alergií na lidskou semennou plazmatickou alergii (prostřednictvím zkřížené reaktivity s lidským prostatickým specifickým antigenem (PSA)).

Roztoči: IgE proti dermatophagoides pteronyssinus (HDM) (roztoc domácí prachový) Der p 1, dermatophagoides farinae (HDM) (roztoc domácí prachový) Der f 1, dermatophagoides pteronyssinus (HDM) (roztoc domácí prachový) Der p 2 a dermatophagoides farinae (HDM) (roztoc domácí prachový) Der f 2, hlavnímu alergenu domácích prachových roztočů. Der p 1 a Der f 1 mohou zkříženě reagovat. Der p 2 a Der f 2 mohou zkříženě reagovat.

### POTRAVINOVÉ INHALAČNÍ ZKŘÍŽENÉ REAGUJÍCÍ KOMPONENTY

IgE proti jablko Mal d 1 a broskvi Pru p 1 je asociován s místními alergickými reakcemi (typicky orálním alergickým syndromem) u pacientů s pyl-potravinovým syndromem způsobeným senzitivací na pyl břízy nebo příbuzných stromů.

PR-10: Většina PR-10 proteinů je citlivá na teplo a procesy trávení, vařená strava je často tolerována.

LTP: IgE proti broskvi Pru p 3 a vlašský ořech Jug r 3 může způsobit systémové alergické reakce, obzvláště v oblastech, kde se pěstují broskve a příbuzné ovoce. Potravinové LTP jsou stabilní proteiny přítomné v potravinách rostlinného původu (např. ořechy a ovoce) a jsou asociovány s alergickými reakcemi na vařené i syrové potraviny.

### Odmítnutí odpovědnosti

Přítomnost IgE naznačuje riziko alergického onemocnění a jeho význam musí být vyhodnocen v rámci klinického kontextu. Nepřítomnost IgE automaticky nevylučuje potenciál reakce podobné alergií. Komentáře k výsledkům jsou určeny jako pomůcka pro interpretaci výsledků testu a nepředstavují zdravotní doporučení. Odmítá se veškerá odpovědnost při jejich používání. Zde vytvořené komentáře jsou chráněny autorským právem a mohou se používat pouze společně s výsledky testu ImmunoCAP™ ISAC.

### Znelostní databáze

Phadia Xplain Knowledge Base, verze 1.3.1

ID VZORKU: **CTR03**

ID PACIENTA:

JMÉNO  
PACIENTA:

10.1.2020

Page 3 / 10

## Příloha C – Seznam nejčastějších alergenů

FeatureID	Name	ExpressionHost	Info	Function
1	Act d 1	N	Kiwi	Cysteine protease
2	Act d 2	N	Kiwi	Thaumatin-like protein
3	Act d 5	N	Kiwi	Kiwellin
4	Act d 8	N	Kiwi	PR-10 protein
5	Aln g 1	R	Alder	PR-10 protein
6	Alt a 1	R	Alternaria	Acidic glycoprotein
7	Alt a 6	R	Alternaria	Enolase
8	Amb a 1	N	Ragweed	Pectate lyase
9	Ana c 2	N	Bromelin	CCD marker
10	Ana o 2	R	Cashew nut	Legumin-like protein
11	Ani s 1	R	Anisakis	Serine protease inhibitor
12	Ani s 3	R	Anisakis	Tropomyosin
13	Api g 1	R	Celery	PR-10 protein
14	Api m 1	N	Honey Bee	Phospholipase A2
15	Api m 4	N	Honey Bee	Melittin
16	Ara h 1	N	Peanut	Storage protein, 7S globulin
17	Ara h 2	N	Peanut	Storage protein, Conglutin
18	Ara h 3	N	Peanut	Storage protein, 11S globulin
19	Ara h 8	R	Peanut	PR-10 protein
20	Art v 1	N	Mugwort	Defensin
21	Art v 3	N	Mugwort	Lipid transfer protein (nsLTP)
22	Asp f 1	R	Aspergillus	Mitogillin family
23	Asp f 2	R	Aspergillus	Fibrinogen Binding Protein
24	Asp f 3	R	Aspergillus	Peroxisomal protein
25	Asp f 4	R	Aspergillus	Unknown
26	Asp f 6	R	Aspergillus	Mn superoxide dismutase
27	Ber e 1	R	Brazil nut	Storage protein, 2S albumin
28	Bet v 1	R	Birch	PR-10 protein
29	Bet v 2	R	Birch	Profilin
30	Bet v 4	R	Birch	Calcium binding 2-EF-hand prot.
31	Bla g 1	R	Cockroach	Cockroach group 1
32	Bla g 2	R	Cockroach	Aspartic protease
33	Bla g 4	R	Cockroach	Calycin
34	Bla g 5	R	Cockroach	Glutathione S-transferase
35	Bla g 7	N	Cockroach	Tropomyosin
36	Bos d 4	N	Milk	Alpha-lactalbumin
37	Bos d 5	N	Milk	Beta-lactoglobulin
38	Bos d 6	N	Cow	Serum albumin
39	Bos d 8	N	Milk	Casein
40	Bos d lactoferrin	N	Milk	Transferrin
41	Can f 1	R	Dog	Lipocalin
42	Can f 2	R	Dog	Lipocalin
43	Can f 3	N	Dog	Serum albumin

Zdroj: Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

44	Cla h 8	R	Cladosporium	Mannitol dehydrogenase
45	Cor a 1.0101	R	Hazel pollen	PR-10 protein
46	Cor a 1.0401	R	Hazelnut	PR-10 protein
47	Cor a 8	R	Hazelnut	Lipid transfer protein (nsLTP)
48	Cor a 9	N	Hazel nut	Storage protein, 11S globulin
49	Cry j 1	N	Japanese cedar	Pectate lyase
50	Cup a 1	N	Cypress	Pectate lyase
51	Cyn d 1	N	Bermuda Grass	Grass group 1
52	Cyp c 1	R	Carp	Parvalbumin
53	Dau c 1	R	Carrot	PR-10 protein
54	Der f 1	N	D. farinae (HDM)	Cysteine protease
55	Der f 2	R	D. farinae (HDM)	NPC2 family
56	Der p 1	N	D. pteronyssinus (HDM)	Cysteine protease
57	Der p 10	R	D. pteronyssinus (HDM)	Tropomyosin
58	Der p 2	N	D. pteronyssinus (HDM)	NPC2 family
59	Equ c 3	N	Horse	Serum albumin
60	Eur m 2	R	Storage mite	NPC2 family
61	Fel d 1	R	Cat	Uteroglobin
62	Fel d 2	N	Cat	Serum albumin
63	Fel d 4	R	Cat	Lipocalin
64	Gad c 1	R	Cod	Parvalbumin
65	Gal d 1	N	Egg	Ovomucoid
66	Gal d 2	N	Egg	Ovalbumin
67	Gal d 3	N	Egg	Conalbumin
68	Gal d 5	N	Egg	Serum albumin
69	Gly m 4	R	Soybean	PR-10 protein
70	Gly m 5	N	Soybean	Storage protein, Beta-conglycinin
71	Gly m 6	N	Soybean	Storage protein, Glycinin
72	Hev b 1	R	Latex	Rubber elongation factor
73	Hev b 3	R	Latex	Small rubber particle protein
74	Hev b 5	R	Latex	Acidic protein
75	Hev b 6	R	Latex	Hevein
76	Hev b 8	R	Latex	Profilin
77	Mal d 1	R	Apple	PR-10 protein
78	Mer a 1	R	Annual mercury	Profilin
79	Mus m 1	N	Mouse	Lipocalin
80	Ole e 1	N	Olive	Common olive group 5
81	Ole e 2	N	Olive	Profilin
82	Par j 2	R	Wall pelitory	Lipid transfer protein (nsLTP)

*Zdroj: Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň*

83	Pen a 1	R	Shrimp	Tropomyosin
84	Pen i 1	N	Shrimp	Tropomyosin
85	Pen m 1	N	Shrimp	Tropomyosin
86	Phl p 1	R	Timothy Grass	Grass group 1
87	Phl p 11	R	Timothy Grass	Ole e 1-related protein
88	Phl p 12	R	Timothy grass	Profilin
89	Phl p 2	R	Timothy Grass	Grass group 2
90	Phl p 4	N	Timothy Grass	Berberine bridge enzyme
91	Phl p 5	R	Timothy Grass	Grass group 5
92	Phl p 6	R	Timothy Grass	Grass group 6
93	Phl p 7	R	Timothy grass	Calcium binding 2-EF-hand prot.
94	Pla a 1	R	Plane tree	Putative invertase inhibitor
95	Pla a 2	N	Plane tree	Polygalacturonase
96	Pru p 1	R	Peach	PR-10 protein
97	Pru p 3	N	Peach	Lipid transfer protein (nsLTP)
98	Sal k 1	N	Saltwort	Pectin methylesterase
99	Ses i 1	N	Sesame seed	Storage protein, 2S albumin
100	Tri a 18	N	Wheat	Agglutinin isolectin 1
101	Tri a Gliadin	N	Wheat	Crude gliadin
102	Tri a 19.0101	R	Wheat	Omega-5 gliadin
103	Tri a aA_TI	N	Wheat	Alpha-Amylase / Trypsin Inhibitor

*Zdroj: Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň*

## Příloha D – Souhlas s poskytováním informací



**FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ**

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

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

Vážená paní

Eliška Frantová

Studentka oboru Zdravotní laborant

Fakulta zdravotnických studií, Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví  
Západočeská univerzita v Plzni

### **Povolení sběru informací ve FN Plzeň**

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních metod, používaných v *Ústavu imunologie a alergologie (ÚIA) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Možnosti analýzy výsledků multiplových metod pro stanovení specifických IgE*“.

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

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

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

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

Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

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

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň  
tel.: 377 103 204, 377 402 207  
e-mail: [chabrovas@fnplzen.cz](mailto:chabrovas@fnplzen.cz)

8. 11. 2019