

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Afinita specifických protilátek IgE a IgG při alergiích

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Aneta Šnédarová**  
Osobní číslo: **C21229**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Afinita specifických protilátek IgE a IgG při alergiích**  
Téma práce anglicky: **Affinity of Specific IgE and IgG Antibodies in Allergies**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

Vypracujte rešerši z odborné literatury zaměřenou na protilátky ve třídě IgE a IgG které vznikají při alergických a jiných imunopatologických stavech. Zaměřte se na kvalitu těchto protilátek – na afinitu (případně aviditu), a jak je tento parametr v diagnostice významný.

Recentní literatura dostupná v databázi WoS, MEDLINE, Science direct; odborné knihy.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v.r.  
děkan

L.S.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Afinita specifických protilátek IgE a IgG při alergiích jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 26. 6. 2024

Aneta Šnědarová v.r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce Mgr. Marcele Slovákové Ph.D. za odborné vedení, ochotu, vstřícnost a cenné rady, které mi věnovala během psaní bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě podporovali v průběhu celého studia.

## **ANOTACE**

Tato práce se zabývá posouzením afinity specifických imunoglobulinů IgE a IgG vznikajících v důsledku alergií. Úvodní kapitoly objasňují mechanismy imunitního systému, procesy spojené s alergiemi a vznik, strukturu a funkci protilátek IgE a IgG. Stěžejní kapitola práce se zaměřila na afinitu a aviditu specifických protilátek, s detailním popisem interakce alergenu a protilátky a afinitního zrání. Tato kapitola dále obsahuje přehled metod používaných k měření afinity protilátek. Na závěr je zmíněna možnost léčby alergií prostřednictvím alergenové imunoterapie, která využívá specifické protilátky a jejich vazebnou schopnost k terapeutickému účelu.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

afinita, avidita, imunoglobulin, alergie, metody, léčba

## **TITLE**

Affinity of specific IgE and IgG antibodies in allergies

## **ANNOTATION**

This work focuses on the affinity of specific immunoglobulins IgE and IgG arising as a result of allergies. The introductory chapters clarify the mechanisms of the immune system, processes associated with allergies, as well as describing the origin, structure, and function of IgE and IgG antibodies. The main chapter focuses on the affinity and avidity of specific antibodies with a detailed description of the interaction between allergen and antibody and affinity maturation. This chapter also includes an overview of the methods used to measure antibody affinity. In the final chapter, the possibility of treating allergies through allergen immunotherapy is mentioned, using specific antibodies and their binding ability for therapeutic purposes.

## **KEYWORDS**

affinity, avidity, immunoglobulins, allergies, methods, treatment

# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ.....	9
SEZNAM ZKRATEK .....	10
ÚVOD.....	11
1 Alergické imunopatologické onemocnění .....	12
1.1 Imunitní odpověď .....	12
1.2 Rozčlenění imunopatologických reakcí.....	13
1.3 Zařazení alergické reakce a její fáze.....	14
1.3.1 Fáze senzibilizace .....	14
1.3.2 Časná fáze alergické reakce.....	15
1.3.3 Pozdní fáze alergické reakce.....	15
1.4 O alergenu.....	15
2 Imunoglobuliny.....	19
2.1 Protilátka IgE .....	21
2.1.1 Vznik IgE.....	22
2.1.2 Struktura a receptory IgE.....	23
2.2 Protilátka IgG.....	25
2.2.1 Vznik IgG a jejich podtříd .....	26
2.2.2 Struktura IgG .....	27
2.2.3 Receptory IgG.....	29
2.2.4 Podtřídy IgG a jejich biologický význam.....	29
3 Afinita a avidita protilátek .....	31
3.1 Afinitní zrání.....	32
3.2 Interakce mezi alergenem a protilátkou.....	33
3.3 Studium afinity protilátek pomocí různých metod .....	34
3.3.1 Metoda ELISA.....	34

3.3.2	ImmunoCAP .....	35
3.3.3	Povrchová plasmonová rezonance (SPR) .....	36
3.3.4	DOT-ELISA.....	38
3.3.5	Metoda microarray pro simultánní kvantitativní detekci sIgE a sIgG <sub>4</sub> .....	39
4	Role specifických IgG protilátek při alergiích.....	40
4.1	IgG <sub>4</sub> a jeho role v alergických reakcích.....	40
4.1.1	Inhibice protizánětlivých reakcí.....	40
4.1.2	Blokování vazby IgE na alergen pomocí IgG <sub>4</sub> a indukce alergenové tolerance 41	
4.2	Alergenová imunoterapie.....	41
	ZÁVĚR .....	44
	POUŽITÁ LITERATURA .....	45



## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Rozpoznání epitopu imunoglobulinem E a vazba na B lymfocyt .....	18
<b>Obrázek 2:</b> Produkce IgE B lymfocyty pomocí Th2 lymfocytů aktivovaných APC .....	23
<b>Obrázek 3:</b> Struktura IgE .....	24
<b>Obrázek 4:</b> IgE ve vazbě na receptory .....	25
<b>Obrázek 5:</b> Struktura IgG .....	26
<b>Obrázek 6:</b> Struktura IgG podtříd se zaměřením na rozdíly v pantové oblasti .....	28

## SEZNAM ZKRATEK

APC	Antigen-prezentující buňka
CD23	Receptor IgE s nízkou afinitou
DOT-ELISA	Bodový enzymově vázaný imunosorbentní test
ELISA	Enzymově vázaný imunosorbentní test
Fab	Frakce protilátky vázající antigen
Fc	Frakce konstantní oblasti protilátky
FcγR	Fc receptor pro IgG
FcεRI	Vysokoafinitní IgE receptor
HC	Těžký řetězec imunoglobulinu
IgE	Imunoglobulin E
IgG	Imunoglobulin G
Kd	Disociační konstanta
LC	Lehký řetězec imunoglobulinu
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex
MHC II	Hlavní histokompatibilní komplex třídy II
sIgE	Specifický imunoglobulin E
SPR	Povrchová plasmonová rezonance
SPRi	Zobrazovací povrchová plasmonová rezonance
Th2	Pomocné lymfocyty Th 2
tIgE	Celkový imunoglobulin E

## ÚVOD

Alergie jsou rozšířeným zdravotním problémem, který postihuje miliony lidí po celém světě, v procentuálním měřítku se hodnota pohybuje okolo více než 30 %. Obecně se řadí mezi imunopatologické stavy. Principiálně se jedná o přehnanou imunitní reakci těla na látky, které jsou pro většinu lidí jinak neškodné. K alergické reakci dochází v případě, že imunitní systém mylně identifikuje alergen jako hrozbu a spustí obrannou reakci. Organismus je tedy vůči alergenům hypersenzitivní. Alergeny jsou schopné po průniku do tkání či orgánů navodit zánětlivé změny, které mohou vyústit až v poruchy struktury a funkce jednotlivých orgánů. Tělo tvoří protilátky třídy IgE v reakci na alergen [1, 2].

Objevení alergického onemocnění způsobeného imunoglobulinem E bylo zaznamenáno v historii lékařství díky Johnu Bostockovi, který popsal sennou rýmu, známou také jako alergickou rýmu, poprvé v roce 1819. Bostock sám trpěl tímto onemocněním a nazval ho "*catarrhus aestivus*" neboli letní katar, protože v zimních měsících nebyly jeho příznaky přítomné. V tomto období bylo onemocnění vzácné a Bostockovi trvalo více než devět let, než našel dalších 28 případů, aby mohl publikovat další odborný článek [3].

Na počátku 20. století byly alergenové toxiny považovány za toxiny, ale později, s objevením IgE protilátek, se ukázalo, že specifické protilátky na alergenové jsou skutečným mechanismem neadekvátní reakce těla na pyl a další alergenové. Tím byl otevřen nový pohled na mechanismy alergických reakcí a jejich spojení s imunitním systémem [3].

Hlavním cílem této práce je analyzovat afinitu a aviditu specifických protilátek IgE a IgG v kontextu alergií. Tato práce se bude zabývat rolí těchto protilátek v mechanismu patologické reakce a jejich afinitou k alergenové. Dále budou zahrnuté metody, kterými lze afinitu specifických protilátek měřit. Práce se bude také zabývat možností využití afinity protilátek v léčbě alergií pomocí alergenové imunoterapie. Téma své práce jsem si vybrala z osobních důvodů, protože sama trpím alergií a o toto téma se přirozeně zajímám. Chtěla jsem se dozvědět více informací o mechanismech alergií a jakou roli v nich hrají protilátky IgE a IgG.

# 1 Alergické imunopatologické onemocnění

## 1.1 Imunitní odpověď

Imunitní systém se stará o udržení stálého vnitřního prostředí, tedy homeostázy v organismu. Můžeme jej brát jako „detektor“ tělu škodlivých a neškodlivých látek, které se mohou různými cestami dostat do organismu. Mezi škodlivé látky se řadí patogeny, jako jsou viry a bakterie. Toto můžeme považovat za první hlavní úlohu imunitního systému označovanou jako obranyschopnost. Dále musí být organismus schopný rozpoznat tělu vlastní tkáň. Imunitní systém učí své protilátky, aby vůči vlastním tkáním nebojovaly, ale navzájem se tolerovaly a ani při ochraně vlastních orgánů jim neubližovaly. V neposlední řadě imunitní systém dohlíží na buňky v organismu, pokud se objeví nějaké abnormální buňky, jakkoliv mutované, nádorové nebo nějak poškozené, chová se k nim stejně jako k cizorodým a zahubí je [1, 4].

Pokud se do organismu dostane nějaký patogen, imunitní systém okamžitě zahájí imunitní odpověď a snaží se daný patogen zneškodnit. Existují dva druhy imunitní odpovědi: nespecifická čili neadaptivní, jinak také vrozená a specifická čili adaptivní. S nespecifickou imunitou se každý organismus již narodí, je již zapsána v našich genech. Jsou to přirozené bariéry těla, které zabraňují průniku patogenů. Velkou nevýhodou nespecifické imunity je, že na každý patogen reaguje stejně, jelikož nedisponuje imunologickou pamětí. Hlavními obrannými bariérami nespecifické imunity je kůže, pot, sliny a žaludeční šťáva. Specifická imunita je imunita, kterou organismus získává v průběhu života. Buňky již disponují imunologickou pamětí, díky které jsou schopné zapamatovat si, jakým způsobem bojovaly vůči určitému patogenu a při dalším setkání s tímto patogenem mohou rychleji a efektivněji zaútočit a patogen tak účinněji zneškodnit. Specifickou imunitu tvoří B a T lymfocyty [1, 4].

Mechanismus imunitní odpovědi lze popsat několika hlavními kroky. Na počátku imunitní systém rozpozná cizorodé antigeny (mohou se nacházet na povrchu patogenů či infikovaných buněk). Jako první dojde k aktivaci nespecifické imunitní odpovědi. Následně dochází k aktivaci antigen-prezentujících buněk (APC) jako jsou dendritické buňky a makrofágy, které zpracují informace o antigenu a prezentují je pomocí molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC). Na základě MHC molekul jsou aktivovány T lymfocyty, které antigenní fragmenty rozpoznávají a zahajují specifickou odpověď těla na antigen. Dále dochází také k aktivaci B lymfocytů pomocí MHC buněk či T pomocných

lymfocytů. B lymfocyty pak produkují protilátky, které bojují s antigeny spolu s ostatními aktivovanými částmi imunitního systému. Poslední neméně podstatnou částí imunitní odpovědi je vytvoření imunologické paměti v podobě plazmatických buněk [1, 4, 5].

Objevují se také případy, kdy se imunitní systém nezaměří na zcela správný antigen. V těchto případech dochází k tzv. hypersenzitivitě imunitního systému. Jde o nadměrnou reakci imunitního systému na jinak v podstatě neškodné antigeny. Imunitní systém se v podstatě omylem aktivuje a reaguje proti běžným látkám v okolí. Obecně tuto reakci označujeme jako imunopatologie typu alergie. Tento proces opět začíná aktivací T lymfocytů na základě reakce s APC. Následně dojde k aktivaci B lymfocytů, které produkují specifické protilátky. Tato imunitní odpověď je nepřiměřená a vede k uvolnění velkého množství histaminu, který způsobí zánět a symptomy alergie [4, 6].

Hlavní buňky, které se účastní zánětlivého procesu jsou granulocyty, jako jsou neutrofilové, eozinofily a bazofily, které mají schopnost se rychle přesunout do postižené oblasti a pomáhají v boji proti patogenům. Dále makrofágy, jejichž úkolem je fagocytovat a trávit patogeny a poškozené buňky. Tyto procesy jsou doprovázené uvolněním protizánětlivých cytokinů, jako je např. TNF- $\alpha$ , který povolává další imunitní buňky jako jsou monocyty a cytokiny IL-1 a IL-6 [1, 4].

Může také docházet k imunopatologickým reakcím, kdy imunitním systémem bojuje vůči vlastním antigenům, známé jako autoimunitní onemocnění. U tohoto onemocnění jsou různé typy reakcí od vyrážky přes poškození orgánů až k anafylaktickému šoku. Může naopak dojít až k imunodeficienci, která se vyznačuje nedostatečnou funkcí či dokonce absencí některých složek imunitního systému. Důsledkem je potom snížená obranyschopnost imunitního systému a zvýšená náchylnost k infekcím. Primární (vrozené) imunodeficiencie bývají způsobené genetickými poruchami. Sekundární (získané) imunodeficiencie mohou být následkem infekcí nebo léčby, která ovlivňuje funkci imunitního systému [1, 4, 7].

## **1.2 Rozčlenění imunopatologických reakcí**

Poruchy vrozené či adaptivní imunity mohou způsobit onemocnění, které vznikají především z důvodu přehnané reakce imunitního systému na patogen. Hypersenzitivní reakce jsou čtyř typů a popisují nepříznivý vliv na imunitní systém [4].

Hypersenzitivita typu I je nejběžnější formou alergické reakce, jedná se o okamžitou přecitlivělost. Tělo na alergeny reaguje přehnaně. Při opakovaném setkání s těmito alergeny

se specifické protilátky IgE vážou na buňky v těle. Tato vazba způsobuje pochody podrobněji popsané v kapitole Fáze alergické reakce. Typickými alergeny jsou peří, pyl z rostlin, roztoči a některé potraviny. Léčba zahrnuje vyhýbání se alergenům a užívání léků, které zmírňují příznaky [1, 4].

Hypersenzitivita typu II se označuje jako cytotoxická na protilátkách nezávislá přecitlivělost. Je vzácná a trvá přibližně 2–24 hodin. V této reakci se protilátky IgG a IgM vážou na vlastní buňky těla, tím aktivují komplement a způsobují aglutinaci a lýzu buněk. To může vést k různým onemocněním, jako je autoimunitní anémie nebo poškození ledvin. Léčba se liší podle konkrétního onemocnění [1, 4].

Hypersenzitivita typu III je onemocněním imunitního komplexu. Objevuje se v případě, kdy se protilátky IgG a IgM vážou na rozpustné proteiny a tvoří s nimi imunokomplexy, které se ukládají v tkáních. Opět se aktivuje komplement, vytváří se zánět a dochází k degranulaci žírných buněk. Tento proces podmiňuje vznik onemocněním, jako je systémový lupus erythematosus a reaktivní artritida. Léčba probíhá pomocí protizánětlivých léků a kortikosteroidů [1, 4].

Hypersenzitivita typu IV je hypersenzitivita opožděného typu. Je zprostředkována buňkami a není závislá na protilátkách. Tyto reakce jsou způsobeny nadměrnou aktivitou určitých buněk imunitního systému a mohou trvat více dní. Při těchto reakcích dochází k přehnané stimulaci T lymfocytů a monocytů, popřípadě makrofágů a uvolní se cytokiny. Výsledkem je vznik zánětu a buněčná smrt. Typickým příkladem je reakce kůže na jedovatý břečťan. Léčba obvykle zahrnuje vyhýbání se spouštěcím faktorům a použití kortikosteroidních mastí [1, 4].

### **1.3 Zařazení alergické reakce a její fáze**

Alergická reakce se řadí do imunopatologických reakcí, jedná se o hypersenzitivní reakci těla na určitý alergen. Konkrétně se alergická reakce řadí mezi hypersenzitivní reakce typu I, jak již bylo popsáno v předchozí kapitole. Následující podkapitoly se budou konkrétněji věnovat fázím alergické reakce [4].

#### **1.3.1 Fáze senzibilizace**

Jedná se o počáteční fázi alergické reakce, při které dojde k nastartování imunitního systému a rozvoje zvýšené citlivosti na konkrétní alergen. Díky senzibilizaci je imunitní systém schopen rychleji vyvolat alergickou reakci po opakovaném styku s alergenem.

K prvnímu styku s alergenem dochází například inhalací, kontaktem s kůží či bodnutím, jak bylo popsáno v úvodu k alergiím. Imunitní systém vyhodnotí alergen jako tělu nevlastní a zahájí tvorbu specifických protilátek IgE. Vytvořené protilátky IgE se mohou volně pohybovat v plazmě nebo se navazují na specifické receptory zejména na povrchu žírných buněk a bazofilů. Tyto buňky s navázanými protilátkami se často vyskytují ve tkáních, kde je větší pravděpodobnost kontaktu s antigenem, tedy kůže, dýchací cesty a trávicí systém. Senzibilizace je také označována jako inaparentní fáze, jelikož k alergické reakci dochází až po opakovaném setkání s alergenem [1, 3].

### **1.3.2 Časná fáze alergické reakce**

Časná fáze alergické reakce se také označuje jako okamžitá reakce a nastává rychle po vniknutí alergenu do těla. Dochází k aktivaci imunitní odpovědi a uvolnění různých chemických mediátorů primárně z žírných buněk, zejména histamin, popřípadě heparin. Tyto látky mají vazodilatační účinky a mohou způsobit kontrakce hladkého svalstva. Kombinace těchto projevů vede ke kožní reakci, ta se projevuje zarudnutím, svěděním, kopřivkou a otoky. Dále respirační příznaky, kde tyto látky podporují sekreci hlenu, což má za následek rýmu, kašel, kýchání a dušnost [1, 3].

### **1.3.3 Pozdní fáze alergické reakce**

Nastupuje v odstavu několika hodin na časnou fázi, přibližně v intervalu 8–12 hodin. Pozdní fáze se také označuje jako opožděná reakce. Tato fáze bývá často spojována s respiračními alergiemi, zejména astmatem. Ve tkáních, které byly vystaveny alergenem přetrvává zánět. Žírné buňky, eozinofily a lymfocyty dále produkují cytotoxické mediátory, které mohou způsobit až trvalé změny tkání. Pozdní fáze je obvykle delší než časná fáze, může přetrvávat hodiny až dny [1].

## **1.4 O alergenů**

Alergen je jakýkoliv antigen, který je schopný vyvolat alergickou odpověď. Alergeny jsou většinou proteiny nebo glykoproteiny, které mohou být enzymaticky aktivní. Jedná se o látky z okolního prostředí, na které si jedinec s genetickou predispozicí může vytvořit alergickou reakci. Za protilátkovou odpověď většinou stojí látky organické povahy, naopak anorganické látky, jako jsou kovy, způsobují buněčnou odpověď. Alergeny označované jako hlavní jsou ty, na které reaguje specifickou IgE odpovědí až 90 % alergiků, zatímco ostatní jsou považovány za vedlejší [1, 7].

Alergeny lze rozdělit podle jejich účinků na lidský organismus. Existují inhalační alergeny, které vedou k respiračním alergickým reakcím, jako jsou alergická rýma a astma. Tyto alergeny se dále dělí na alergeny z venkovního prostředí a z vnitřního prostředí, nebo na sezónní a celoroční alergeny. Mezi nejvýznamnější sezónní inhalační alergeny patří pyly rostlin, které způsobují alergické reakce především na jaře (od února do dubna). Nejčastějšími pylovými alergeny v našich podmínkách jsou pyly trav, následované pylovými alergeny bříz. Alergie na pyl je častým zdravotním problémem, jehož prevalence se neustále zvyšuje. Podle Světové alergologické organizace (WAO) trpí pylovými alergiemi 21–32 % populace, přičemž počet pacientů se každých deset let zvyšuje o 50 %. Tento nárůst je částečně způsoben klimatickými změnami, které ovlivňují délku a intenzitu pylových sezón, stejně jako migrací alergenních rostlin do nových oblastí. Pylové alergeny často obsahují panalergeny, což jsou proteiny, které se nacházejí nejen v pylu, ale také v některých potravinách. Z toho důvodu mohou být osoby alergické na pyl také citlivé na určité potraviny, což vede k potravinovým alergiím. Mezi nejčastější symptomy alergií patří rýma, kýchání a svědění očí a nosu [7, 8].

Zvířecí alergeny jsou proteiny nacházející se v kožních buňkách, slinách a moči zvířat, do lidského těla se dostávají několika způsoby. Nejčastěji se šíří vzduchem, kde jsou obsaženy v prachových částicích nebo v drobných částech kůže a srsti, které se uvolňují ze zvířat. Při dýchání se tyto částice dostávají do dýchacích cest a mohou vyvolat alergické reakce. Alergeny se také mohou přenášet prostřednictvím oděvů a vlasů, kde ulpívají a při kontaktu s kůží nebo sliznicemi se mohou snadno dostat do těla. Navíc, přímý kontakt se zvířaty, jako je hlazení nebo péče o ně, může vést k přenosu alergenů na pokožku, což může způsobit lokální reakce. Hlavními zdroji těchto alergenů jsou savci, jako jsou kočky a psi. Studie ukazují, že i nepřímý kontakt se zvířaty, například prostřednictvím alergenů přenesených vzduchem, oblečením nebo vlasy, může vést k významné expozici alergenům a následným alergickým reakcím u citlivých jedinců [7, 9].

Potravinové alergeny jsou látky, které se nacházejí v některých potravinách, které mohou u citlivých jedinců vyvolat alergickou reakci. Nejčastější potravinové alergeny jsou také někdy označované jako „velká osmička“, řadí se mezi ně mléko, vejce, ryby, korýši, pšenice, arašídy, sója a skořápkové plody (mandle, vlašské ořechy, lískové oříšky, pistácie a další). Potravinová alergie obvykle začíná v prvních dvou letech života. Zatímco alergie na kravské mléko a vejce často mizí během dětství, alergie na arašídy a stromové ořechy přetrvávají často do dospělosti. Potravinové alergie postihují 2–5 % dospělých, což je méně



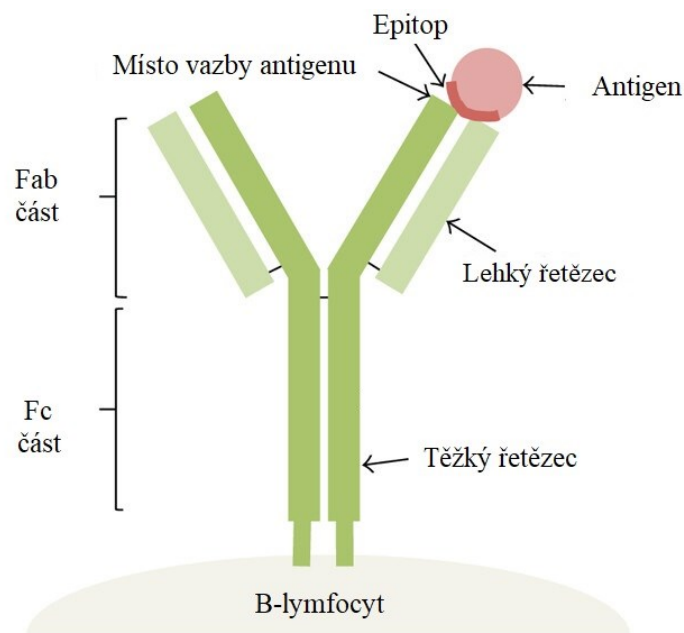
než u dětí. U přibližně 15 % dospělých se alergie vyvine v dospělosti, první reakce se objevují okolo třicátého roku života. Reakce na potravinové alergenů mohou zahrnovat vyrážky, otoky, zažívací potíže, dýchací obtíže a v extrémních případech anafylaxi, což je závažná, život ohrožující reakce [7, 10].

Alergie mohou být také vyvolené reakcí na léky či štípnutí hmyzem, tyto látky se mohou do těla dostat jinou cestou než perorálně. Alergie na jed blanokřídlých může mít potenciálně smrtelné následky. Alergeny pocházejí z bodnutí nebo kousnutí hmyzem, jako jsou včely, vosy, sršni a mravenci. Příznaky alergie na jed blanokřídlých se mohou značně lišit. Mohou zahrnovat velké lokální reakce v místě bodnutí nebo se mohou rozvinout do systémových reakcí různé závažnosti. Mírné reakce se projevují kožními příznaky, jako je zrudnutí a kopřivka. Středně závažné reakce mohou zahrnovat závratě, dušnost a nevolnost. Nejzávažnější formou alergické reakce je anafylaktický šok, který může vést k astmatu, ztrátě vědomí a srdeční nebo dechové zástavě. Riziko anafylaktických reakcí, které mohou být život ohrožující, je vyšší u dospělých ve srovnání s dětmi. To je způsobeno zvýšenou expozicí bodnutím a přítomností dalších zdravotních problémů [7, 11].

Diagnóza lékové alergie je často komplikovaná kvůli různorodým symptomům, které tento stav provázejí. Nežádoucí lékové reakce jsou škodlivé nebo nezamýšlené reakce na léky při dávkách používaných pro prevenci, diagnostiku nebo léčbu, a jsou běžné v klinické praxi, postihující 15 až 25 % pacientů, přičemž závažné reakce se vyskytují u 7 až 13 % pacientů. Lékové alergie se dělí na předvídatelné reakce, které jsou závislé na dávce a souvisejí se známými farmakologickými účinky léku, a nepředvídatelné reakce, které se vyskytují u vnímavých jedinců a tvoří přibližně 20 až 25 % všech lékových alergií. Velká část lékových alergií není zprostředkována IgE, což komplikuje diagnostiku a odlišení těchto reakcí od jiných nežádoucích reakcí. Nejčastějšími léky způsobujícími alergie jsou penicilinová antibiotika, lokální anestetika, nesteroidní protizánětlivé léky a kontrastní látky. Imunopatologické reakce jiných typů nebo neimunologické reakce jsou často klinicky nerozeznatelné od alergických reakcí [7, 12].

Na povrchu alergenu se nachází místo označované jako epitop. Je to specifická molekulární část alergenu, díky které mohou buňky imunitního systému jako jsou B a T lymfocyty rozpoznat daný alergen a zahájit imunitní odpověď (**Obrázek 1**). Epitopy tedy slouží jako hlavní místa, která umožňují alergenu navázat se na specifický receptor na povrchu B a T lymfocytů. Rozpoznání epitopu pomocí T a B lymfocytů je důležité pro jejich

aktivaci, která zahájí následnou imunitní odpověď. Výsledkem je produkce specifických imunoglobulinů třídy IgE, které jsou schopné vázat se na epitopy a vykonávat tak specifickou imunitní funkci. Protilátky typu IgG a IgA jsou namířené proti odlišným epitopům na povrchu alergenů než protilátky třídy IgE. Z toho důvodu nejsou schopné zabránit vyvolání zánětu způsobeného alergenem. Tyto specifické protilátky IgG a IgA mohou být vyvolány alergen-specifickou imunoterapií nebo pasivní imunizací. Protilátky pak soutěží s IgE o vázání na alergen a brání tak vzniku alergických reakcí. Podobně to dělá i léčba anti-IgE, která zabráňuje vázání IgE na jeho receptor na žírných buňkách a bazofilech [13, 14].



**Obrázek 1:** Rozpoznání epitopu imunoglobulinem E a vazba na B lymfocyt (upraveno) [14]

Významnou roli pro rozvoj alergie hraje genetická predispozice. Pokud je alespoň jeden rodič alergik, je riziko pro přenos alergie na potomky vyšší o 20–30 %. Toto riziko se zvyšuje na 50–60 %, pokud jsou oba rodiče alergici. Pokud oba rodiče trpí stejným typem alergie, pak riziko, že jejich dítě bude mít alergii na pyly, stoupá až na 80 %. Nejde ale o přenos konkrétní alergie na konkrétní látku. Pokud by byl rodič alergický na pyl neznamena to, že tuto alergii jeho potomek zdědí, může se u něj rozvinout jiný typ alergie. Nejčastějším obdobím života pro rozvoj alergie je dětství, ale může se objevit v jakémkoli věku. K tomu, aby se alergie klinicky projevila, nestačí pouze genetická predispozice, ale jsou zapotřebí také vnější faktory, které tuto predispozici aktivují. Současné studie ukazují, že genetickou predispozici k alergiím má přibližně 60 % populace. Zda se tato predispozice skutečně projeví jako alergie, závisí na vlivech prostředí. Bohužel, v posledních desetiletích se naše životní

prostředí výrazně zhoršilo kvůli nárůstu průmyslových znečišťujících látek, automobilových emisí, urbanizaci, stresujícímu životnímu stylu, chemikáliím v potravinách a zvýšené frekvenci mírných infekcí, které narušují slizniční bariéry. Tyto změny vedou ke zvýšení výskytu alergických onemocnění, zejména přecitlivělosti na inhalační alergeny, ale také na potravinové, lékové a kontaktní alergeny [1, 15].

## 2 Imunoglobuliny

Imunoglobuliny jsou také jinak označovány jako protilátky. Hrají důležitou roli v obraně těla proti patogenům, jako jsou bakterie, viry a další cizorodé látky. Strukturně se jedná o glykoproteiny, které jsou produkovány plazmatickými buňkami. Po vniknutí patogenu do těla dochází ke kontaktu receptorů na povrchu B lymfocytů s antigeny na povrchu patogenu. Důsledkem toho se z původního B lymfocytu diferencují plazmatické buňky, které produkují protilátky a paměťové buňky, které jsou schopné zapamatovat si antigen, který vyvolal imunitní reakci. Paměťové buňky jsou významné při opakovaném setkání B lymfocytů se stejným antigenem, jsou schopné konkrétní antigen rozpoznat a díky tomu rychleji zahájit imunitní reakci [16].

Lidské imunoglobuliny jsou tvaru písmene Y, tvořené čtyřmi řetězci, dva totožné lehké (LC) a dva totožné těžké (HC). Těžké a lehké řetězce se v uspořádání střídají a jsou vzájemně svázané disulfidickými můstky. U jednotlivých typů imunoglobulinů se těžké řetězce liší na základě složení a velikosti. Imunoglobuliny se skládají z Fc oblasti, která je pro všechny typy stejná a z Fab oblasti, která umožňuje navázání antigenů díky vazebným místům. Lehké řetězce se nacházejí pouze v oblasti Fab, tedy v krátké oblasti imunoglobulinu. Polovina lehkého řetězce je tvořena variabilní doménou (VL), vyskytuje se na konci raménka a obsahuje místo pro vazbu antigenu. Druhou polovinu tvoří konstantní doména (CL). Těžké řetězce samostatně tvoří Fc oblast, kde jsou pouze konstantní domény a dále spolu s lehkými řetězci oblast Fab. Jedna doména je vždy variabilní (VH) a dle typu imunoglobulinu jsou tři (pro IgA, IgD, IgG), popřípadě čtyři (pro IgE, IgM) domény konstantní. Typ těžkého řetězce dále udává rozdělení imunoglobulinů do jednotlivých tříd, kterých je pět a jsou označeny písmeny řecké abecedy  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ . Propojení mezi Fab a Fc oblastí se označuje jako pantová oblast, která umožňuje změnu úhlu mezi těžkými řetězci. Těžké řetězce  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  obsahují pantové propojení, které umožňuje ohyb krátkých Fab ramének, a tím usnadňuje navázání antigenu. Naopak obtížnější je navázání antigenu u řetězců  $\epsilon$  a  $\mu$ , které pantové propojení neobsahují [16, 17, 18].

Imunitní systém lidského těla je schopen produkovat různé třídy protilátek v reakci na setkání s různými druhy alergenů. Mezi hlavní třídy protilátek patří IgE, IgG a IgA. Každá z těchto tříd má svou specifickou roli v imunitní obraně a reakcích proti alergenům. Tvorba IgE, IgG a IgA protilátek je regulována specifickými typy imunitních buněk a jejich produkty. Rozlišení mezi tvorbou těchto tříd protilátek je důležité pro pochopení různých typů imunitních reakcí, včetně alergických reakcí a blokujících imunitních mechanismů. Interakce mezi antigeny a T lymfocyty aktivuje B lymfocyty k diferenciaci a produkci protilátek. Každou třídu protilátek ovlivňují specifické cytokiny a faktory růstu produkované T lymfocyty [13].

IgE protilátky jsou důležité při alergických reakcích. B-lymfocyty, stimulované Th2 lymfocyty, produkují IgE protilátky po expozici specifickému alergenů. IgE se váží na receptory na povrchu specifických buněk nazývaných mastocyty a bazofily. Při opakovaném setkání s alergenem dochází k vazbě IgE na tyto buňky, což vede k uvolňování zánětlivých mediátorů, jako je histamin, způsobující symptomy alergie [13, 19].

Naopak, IgG protilátky jsou důležité při blokujících imunitních reakcích. Tyto protilátky mohou vázat na alergeny a zabránit jejich vazbě na IgE, což zabraňuje uvolňování zánětlivých mediátorů a potlačuje alergické reakce. Zatímco IgE protilátky jsou spojeny s alergickými reakcemi, IgG protilátky mohou být využity k blokování těchto reakcí a omezování nepřiměřené imunitní odpovědi [13, 20].

Specifické IgE protilátky jsou tradičně považovány za hlavní cíl diagnostických testů alergií kvůli jejich úzkému spojení s alergickými reakcemi. Nicméně, v poslední době roste zájem o roli specifických IgG protilátek v alergických reakcích a terapii alergií. Tyto protilátky mohou mít jak proalergické, tak antialergické účinky, a jejich hodnota v diagnostice a terapii alergií je stále předmětem výzkumu [20].

Studie prokázaly, že B lymfocyty, které jsou již zralé a jsou stimulovány určitými signály, produkují nejprve obrannou látku IgG<sub>1</sub> a teprve potom přecházejí k produkci IgE. Naopak B lymfocyty, které zatím nejsou plně vyztřelé, mohou začít přímo produkovat IgE. Přechod většiny B lymfocytů k produkci IgE probíhá obvykle postupně, kdy dochází nejdříve k produkci IgG<sub>1</sub> nebo IgG<sub>3</sub> a teprve potom se přechází k produkci IgE. Tento proces má zásadní vliv na afinitu protilátek vůči alergenům. B lymfocytu, které nepřímo přecházejí k produkci IgE, prošly změnami jako somatická hypermutace, při které mutují variabilní části

genů kódující imunoglobuliny a afinitní selekcí během fáze, ve které produkují IgG, což má za následek produkci IgE s vyšší afinitou [20, 21].

Trvání IgE odpovědi při alergii není zapříčiněno paměťovými buňkami IgE, ale je prodlouženo díky dlouhé životnosti plazmatických buněk v kostní dřeni. Poločas rozpadu IgE, které je připojeno k senzibilizovaným žírným buňkám, je mnohem delší, než u volných IgG nebo IgE. To znamená, že klinická reaktivita přetrvává po celou dobu existence protilátek na senzibilizovaných buňkách [20].

Za přepínání tvorby protilátek B lymfocyty ze třídy IgE na IgG<sub>4</sub> je zodpovědný IL-10. k jeho stimulaci dochází po navázání protilátky IgG<sub>4</sub> na FcγRIIb receptor makrofágů. Ovlivňuje také poměr mezi tvorbou IgG<sub>4</sub> a IgE při terapiích alergie a předpokládá se, že ovlivňuje vytváření tolerance vůči alergenům [20].

IgA protilátky jsou důležité pro ochranu sliznic. Tyto protilátky se nacházejí ve vysokých koncentracích v trávicím a dýchacím traktu a brání přístupu alergenů a patogenů do těla tím, že je vážou a neutralizují [13].

## 2.1 Protilátka IgE

Jedná se o monomerní protilátky. Typickým charakteristickým znakem pro tuto skupinu protilátek je vaznost na vysokoafinitní receptory na povrchu žírných buněk a bazofilů. Vazba je zprostředkovaná přes Fc část imunoglobulinu, která se nachází na opačném konci molekuly, než je vazebná oblast pro antigen. Fc část IgE je důležitá pro interakci s FcεRI a FcεRII receptory. Tato vazba je významná pro rychlou imunitní odpověď na alergeny a vyvolává alergické reakce. Fc část IgE je bohatě glykosylována, jsou na ní připojeny oligosacharidové řetězce. Glykosylace má významný vliv na stabilitu, může protilátku chránit před rozpadem. Dále je důležitá pro správné rozpoznání a schopnost vázat se na FcεRI a následnou aktivaci buněk imunitního systému. IgE se dále uplatňují při ochraně těla před parazitárními infekcemi. Jeho koncentrace v séru se pohybuje okolo  $5 \cdot 10^{-5}$  mg/ml, což je ze všech imunoglobulinů nejméně, procentuální zastoupení činí <0,25 %. Biologický poločas je také nejkratší, pohybuje se okolo 2 dnů [16, 19, 22].

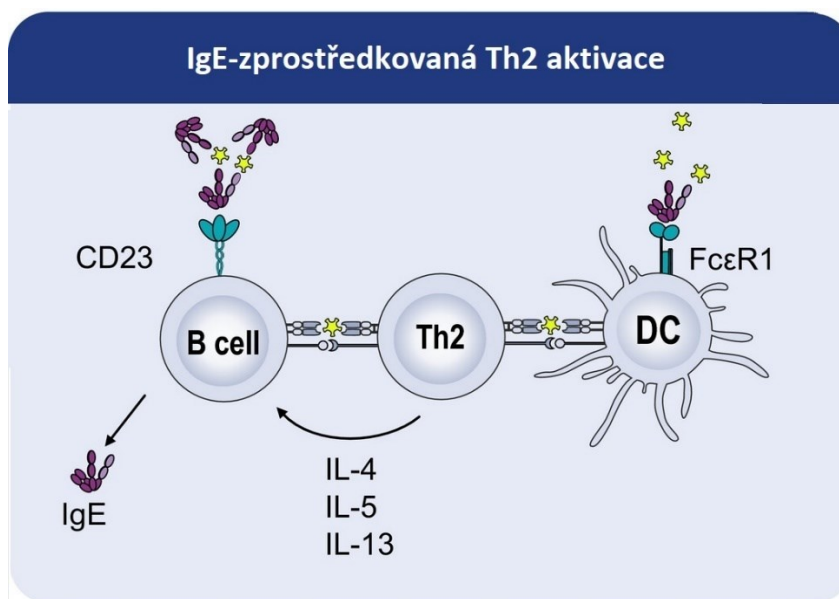
IgE tělo vytváří proti respiračním virům. Odpověď těla na virovou infekci může způsobit zesíťování antivirového IgE a může být důvodem rozvoje astmatu. Proč je tedy IgE výhodné pro tělo, pokud jej do určité míry poškozují vyvoláním onemocnění? Bylo prokázáno, že IgE může být tělu prospěšné v mnoha ohledech, a nejen negativním vyvoláním

alergických onemocnění. V první řadě IgE zajišťuje obranyschopnost organismu vůči parazitárním chorobám. Dále bylo také prokázáno, že krevní destičky a eozinofily bojují proti parazitům pomocí IgE a FcεRI receptorů. Proces odstranění parazitů může být urychlen prostřednictvím toxických granul z efektorových buněk jako mají např. eozinofily. Naopak špatně se odstraňují parazitární choroby v případech při nedostatku IgE [22].

Předpokládá se, že by mohly mít IgE protilátky významnou roli v imunitní odpovědi na toxiny, jako je například jed po včelím bodnutí. Tělo tedy vylučuje specifické protilátky, aby rychle odstranilo škodlivé látky. Hypotenze při reakci snižuje rychlost proudění krve, díky tomu toxiny v krvi cirkulují pomaleji a k cílovým orgánům se dostanou později [22].

### 2.1.1 Vznik IgE

IgE protilátky jsou produkovány B lymfocyty a plazmatickými buňkami v reakci na antigeny, které proniknou do těla a jsou prezentovány antigen-prezentujícími buňkami (APC), jako jsou dendritické buňky, makrofágy nebo B lymfocyty (**Obrázek 2**). Tyto APC fagocytují antigeny a prezentují jejich fragmenty na povrchu pomocí molekul hlavního histokompatibilního komplexu třídy II (MHC II). Tento komplex je rozpoznán pomocí Th2 lymfocytů. Tato imunitní odpověď je součástí adaptivního imunitního systému a specializuje se na obranu proti parazitárním infekcím a alergickým reakcím. Klíčovou roli zde hrají cytokiny IL-4 a IL-13, které iniciují signální kaskádu interakcí s receptory na povrchu B lymfocytů. Tato kaskáda, zprostředkovaná Janus kinázou 3 (JAK3) a signálním převodníkem a aktivátorem transkripce 6 (STAT6), je nezbytná pro přeměnu třídy imunoglobulinů na IgE. K tomu také přispívá interakce mezi CD40 receptorem na B lymfocytu a CD40 ligandem na T lymfocytu. IL-4, který může být produkován jak Be2 buňkami, tak bazofily a dalšími non-T lymfocyty, podporuje diferenciaci naivních T lymfocytů na Th2 pomocné lymfocyty, které pak dále podporují přechod imunoglobulinů na IgE. Jakmile B buňky začnou exprimovat IgE, mohou se rychle diferencovat na plazmatické buňky, které produkují specifické protilátky. Tento komplexní proces zahrnuje genetické přeuspořádání nazývané rekombinantní přepínání tříd, které umožňuje protilátkám měnit jejich způsob působení a poločasy setrvání v séru, přičemž si zachovávají schopnost vázat antigen [5, 13, 22].



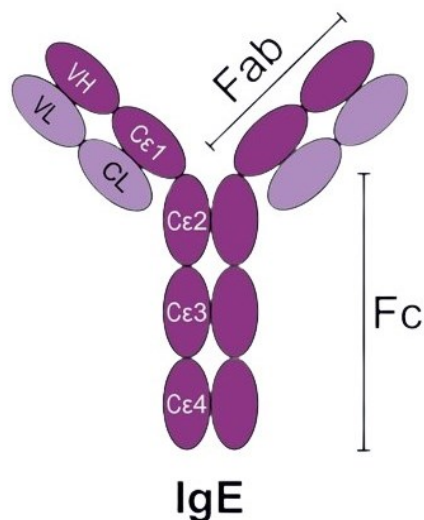
**Obrázek 2:** *Produkce IgE B lymfocyty pomocí Th2 lymfocytů aktivovaných APC (upraveno)*  
[13]

Rekombinantní přepínání tříd je nevratný proces, při kterém dochází k delecí genových segmentů kódujících původní třídy protilátek před dosažením cílové třídy. Lidské B lymfocyty, které jsou IgM/IgD, IgA nebo IgG<sub>4</sub> mohou přepnout na IgE, tento proces však není reverzibilní. Přejít může být buď přímý z IgM/IgD na IgE, nebo sekvenční, kdy dochází ke změně třídy z IgA nebo IgG<sub>4</sub> na IgE. Sekvenční přechod zahrnuje postupné přepínání skrze ostatní třídy imunoglobulinů. Rekombinantní přepínání tříd na IgE může probíhat jak v sekundárních lymfatických tkáních, tak i lokálně v oblastech jako je nosní dutina, žaludek a dvanáctník. Charakteristiky indukovaných protilátek mohou silně ovlivnit vznik a potlačení alergických reakcí [5, 13, 22].

### 2.1.2 Struktura a receptory IgE

Imunoglobulin E je tvořen dvěma těžkými a dvěma lehkými řetězci, jak již bylo řečeno v úvodní kapitole k imunoglobulinům (**Obrázek 3**). Každý řetězec (LC a HC) tvoří 110 aminokyselin, které jsou spojeny disulfidickými můstky. Hlavní oblastí, kterou se od sebe jednotlivé molekuly imunoglobulinů liší je Fc-oblast. IgE dále postrádá pantovou oblast v  $\epsilon$ -řetězci. Strukturně je IgE v Fc-oblasti tvořena šesti doménami C $\epsilon$ 2-C $\epsilon$ 3-C $\epsilon$ 4 vyskytujícími se v dimerní podobě, každá doména se tedy vyskytuje dvakrát. Hlavním znakem, který pomáhá odlišit protilátku IgE od IgG je doména C $\epsilon$ 2, vývojem pravděpodobně pantová oblast u protilátky IgG nahradila doménu C $\epsilon$ 2. Protilátka IgE mění svoji konformaci při navázání

receptoru FcεRI. Dochází k jejímu asymetrickému ohybu mezi doménami Cε2-Cε3. Doména Cε2 se přibližuje k Cε4 doméně a může se jí částečně dotýkat [13, 19].

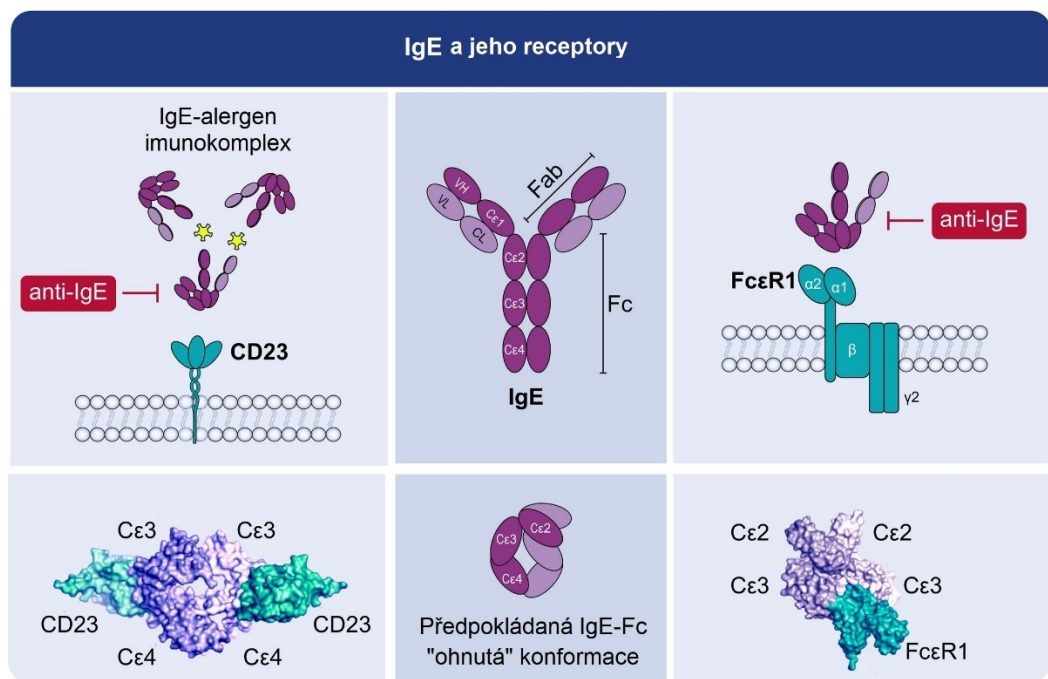


**Obrázek 3:** *Struktura IgE (upraveno) [13]*

Mezi hlavní dva receptory pro IgE se řadí FcεRI (vysokoafinitní IgE receptor) a FcεRII, také nazývané CD23 (nízkoafinitní IgE receptor). Vysokoafinitní receptor FcεRI je složen z tetrameru  $\alpha\beta\gamma_2$  na žírných buňkách a bazofilech. Strukturně se jedná o čtyři polypeptidové řetězce, jeden  $\alpha$  řetězec, jeden  $\beta$  řetězec a dva  $\gamma$  řetězce, kterou jsou vázány pomocí disulfidických vazeb. Jako trimer  $\alpha\gamma_2$  se objevuje na buňkách, jako jsou monocyty, dendritické buňky, eosinofily, krevní destičky a buňky hladkého svalstva, složený z jednoho  $\alpha$  řetězce a dvou  $\gamma$  řetězců. Za okamžitou hypersenzitivní reakci je zodpovědná tetramerní forma. Hlavní úlohou řetězce  $\alpha$  FcεRI receptoru je vázat IgE protilátku. K zesílení signalizace po aktivaci povrchového FcεRI na počátku reakce slouží  $\beta$  řetězec. Při reakcích může dojít na různých buňkách k variabilním expresím tohoto receptoru, což může být způsobené úplnou absencí  $\beta$  řetězce. Signalizační schopnost tohoto receptoru pak zajišťují dva homodimerní  $\gamma$  řetězce. Aktivace buňky je dosaženo pomocí zesíťování tetramerního FcεRI, jejímž následkem je její degranulace, dále se uvolní předem vytvořené mediátory, dochází k syntéze lipidových mediátorů, jako jsou leukotrieny (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) a prostaglandiny (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>), které zesilují a udržují zánětlivou odpověď. Dále dojde k uvolnění zánětlivých cytokinů, jako je TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 a IL-6. Tyto kroky vedou k mobilizaci leukocytů, které zhoršují průběh alergické reakce. IgE mají k receptoru FcεRI vysokou afinitu a jsou schopné v této vazbě přetrvávat týdny až měsíce. Receptor FcεRI $\alpha$  je tedy plně nasycený [13, 22].



Druhým receptorem je  $Fc\epsilon RII$ , jinak také CD23, které se značně liší strukturou a funkcí v porovnání s  $Fc\epsilon RI$  (**Obrázek 4**). Jedná se o integrální membránový protein typu II s lektinovou doménou typu C. CD23 se na IgE váže s mnohonásobně nižší afinitou než receptor  $Fc\epsilon RI$ , což může naznačovat, že pro CD23 nemusí být IgE primárním ligandem. CD23 se řadí mezi významné regulátory B lymfocytů produkující IgE, dále přispívá k transportu antigenu dovnitř buňky, kde jsou antigeny zpracovány a mohou být prezentovány na buněčném povrchu prostřednictvím MHC molekul. Strukturou CD23 jsou lektinové „koncové“ domény, které obsahují C-koncovou sekvenci, její význam je účast ve vazbě pro CD21, což je koreceptor pro CD23, jehož zapojením dochází k aktivaci B lymfocytů. Vazba CD23 na IgE probíhá na spojnici domén  $C\epsilon 3$ - $C\epsilon 4$ , kde alostericky soupeří o vazbu s  $Fc\epsilon RI$ . Existují dvě izoformy: CD23a a CD23b. CD23a se vyskytuje výhradně na B lymfocytech, naopak CD23b se může objevovat na různých buňkách, jako jsou T lymfocyty, monocyty, dendritické buňky, neutrofilové a další [13, 19, 22].

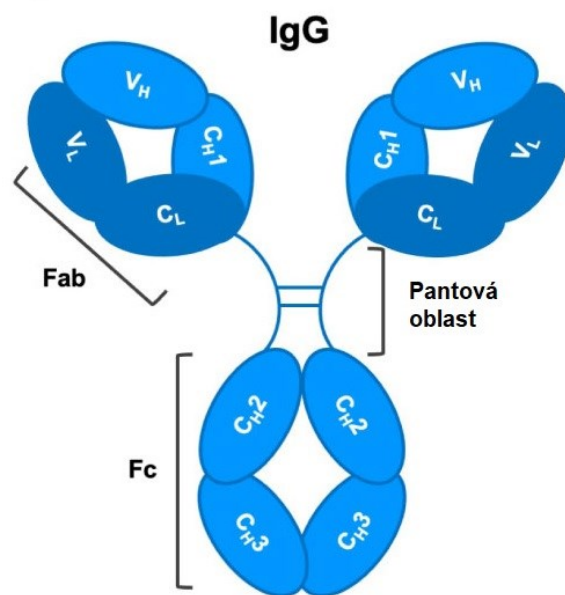


**Obrázek 4:** *IgE ve vazbě na receptory (upraveno) [13]*

## 2.2 Protilátka IgG

IgG je strukturně monomerní protilátka (**Obrázek 5**). Její koncentrace v séru se pohybuje okolo 9 mg/ml, což je ze všech imunoglobulinů nejvíce a to okolo 70–85 %, jedná se tedy o nejhojněji se vyskytující protilátku lidského těla. Biologický poločas rozpadu se pohybuje okolo 21 dnů, záleží na typu podtřídy. Primární imunitní odpověď může vést

k tvorbě IgG, avšak typicky je výrazně zvýšena až v rámci sekundární imunitní odpovědi při opakovaném kontaktu s patogenem. V sekundární odpovědi je velká produkce IgG, což je žádoucí z několika důvodů, včetně vyšší afinity pro antigen, širší biologické roli protilátek, jako je neutralizace patogenů, opsonizace, či regulace imunitní odpovědi. IgG má dále ochrannou funkci a je schopný aktivovat klasickou dráhu systému komplementu. Skupinu IgG tvoří čtyři podtřídy tohoto imunoglobulinu, a to IgG<sub>1</sub>, který tvoří 65 % z celku, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> a IgG<sub>4</sub>. Významnou úlohu v obraně zastupují IgG<sub>2</sub>, které chrání hostitele před zapouzdřenými bakteriemi. IgG jsou dále unikátní tím, že jsou schopné procházet přes placentu, tuto schopnost žádný jiný imunoglobulin nemá. Tohoto procesu jsou schopné díky Fc části imunoglobulinu, která se váže na specifické receptory umístěné na povrchu placenty. Významné jsou při obraně novorozenců, u kterých se vyskytují v největším zastoupení a chrání je před infekčními chorobami [16, 23, 24].



**Obrázek 5:** *Struktura IgG (upraveno) [25]*

### 2.2.1 Vznik IgG a jejich podtříd

Antigeny vstupují do našeho těla různými cestami, stojí za vyvoláním imunitní odpovědi a tvorby protilátek. Jejich chemické složení a struktura má vliv na způsob, jakým náš imunitní systém reaguje. Hlavním spouštěčem tvorby protilátek je antigen, který aktivuje B lymfocyty. Tato aktivace může být buď přímá, kdy antigen přímo interaguje s B lymfocitem, popřípadě buňkou prezentující antigen, nebo nepřímá, prostřednictvím

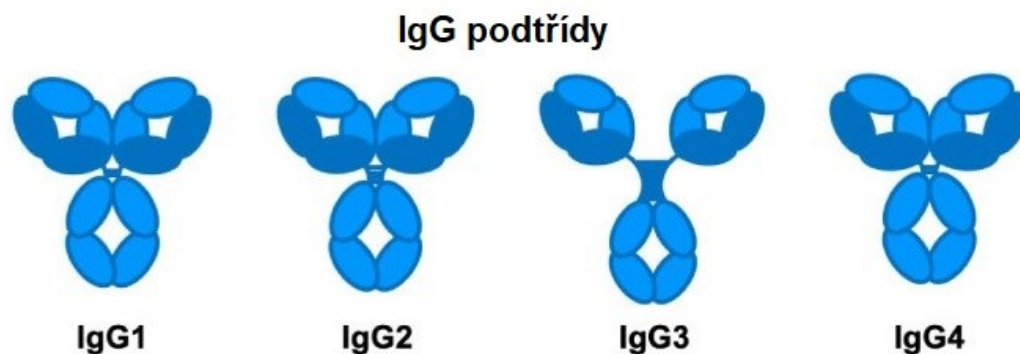
sekundárních signálů, jako jsou cytokiny nebo receptory, například Toll-like receptory, které jsou součástí vrozené imunity. Vznik IgG a jeho přepínání mezi jednotlivými podtřídami je závislé na typu antigenu a prostředí, ve kterém imunitní reakce probíhá. To dále ovlivňuje imunitní reakci tak, že řídí přepínání tříd imunoglobulinů, tedy IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> a IgG<sub>4</sub>, z nichž každá má specifickou úlohu v obraně organismu [23, 25].

Různé typy antigenů mohou vést k odlišnému přepínání tříd IgG. Například proteinové antigeny spouštějí reakci B lymfocytů, které pak primárně přepínají na třídy IgG<sub>1</sub> nebo IgG<sub>3</sub>, často za pomoci T lymfocytů prostřednictvím MHC-II komplexů. Naopak polysacharidové antigeny mohou vést k přepínání na IgG<sub>2</sub>, zvláště pokud není dostupná pomoc T lymfocytů. B lymfocyty, které prošly změnou třídy v primární nebo sekundární reakci, mohou podstoupit další změnu třídy, ale tento proces je omezen dostupností genů, které nebyly již vyříznuty v předchozím přepínání [23].

Alergen-specifické IgG je na rozdíl od běžného IgG schopné vázat se pouze na konkrétní alergen, ke kterému mají vysokou afinitu. Tento typ protilátek vzniká při dlouhodobé expozici alergenu a opakovaných alergických reakcích. Tvorba alergen-specifického IgG je indukována aktivací specifických B lymfocytů, které jsou schopné rozpoznat a vázat se na konkrétní alergeny. Aktivované B lymfocyty se pak diferencují na plazmatické buňky, které produkují konkrétní IgG proti danému antigenu [26, 27].

### 2.2.2 Struktura IgG

IgG protilátky se skládají ze dvou hlavních částí: Fab oblasti, zodpovědné za vazbu na antigeny, a Fc oblasti, která interaguje s ostatními částmi imunitního systému (**Obrázek 6**). Každá molekula IgG se skládá ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců, spojených disulfidovými vazbami. Těžké řetězce mají jednu variabilní doménu (VH) a konstantní (CH1, CH2, CH3) domény, lehké řetězce jsou složeny z jedné variabilní (VL) a jedné konstantní (CL) domény. Tyto domény se spojují a vytvářejí Fab oblast, kde je lokalizováno místo vázajícího antigen. Genové přeuspořádání a mutace vytvářejí rozmanitost v oblastech vázajícího antigen, jsou známy jako oblasti určující komplementaritu (CDR). Fc oblast, umístěná v dolním pantu a doménách CH2/CH3, interaguje s imunitními buňkami a efektorovými molekulami a ovlivňuje funkce, jako je fagocytóza a aktivace komplementu [25].



**Obrázek 6:** *Struktura IgG podtříd se zaměřením na rozdíly v pantové oblasti (upraveno) [13]*

Existují také různé varianty těchto IgG, nazývané alotypy, které se liší v určitých oblastech proteinů. Struktura čtyř typů lidských IgG je velmi podobná až v 90 % aminokyselinových sekvencích, ale s odlišnostmi v pantových oblastech a CH2 doménách. Tyto odlišnosti ovlivňují jejich schopnost vázat se na různé molekuly a receptory, což ovlivňuje jejich funkci. Rozdíly jsou nejvíce patrné v oblasti CH2 a CH3, které jsou důležité pro vazbu na různé molekuly. V blízkosti oblasti CH2 je místo, které je klíčové pro účinky IgG na imunitní buňky, protože se zde vážou na receptory imunitního systému, a díky tomu jsou schopné odstraňovat infikované buňky. Existuje také místo pro glykosylaci, což je proces přidání cukrů k proteinům, který může ovlivnit schopnost IgG vázat se na jiné molekuly. Rozhraní mezi CH2 a CH3 obsahuje místo, kde se IgG váže na FcRn receptor, což ovlivňuje, jak dlouho zůstávají IgG v těle a jak se přenášejí do různých částí těla, jako je placenta nebo sliznice. Tato oblast má malé rozdíly mezi různými typy IgG. Tyto rozdíly mezi IgG se projevují v jejich schopnosti připojovat se k různým molekulám, jako je komplement nebo receptory na buňkách imunitního systému, což ovlivňuje jejich účinnost při ochraně těla [18, 23, 25].

Pantová oblast hraje klíčovou roli ve struktuře a funkci protilátky IgG. Tvoří flexibilní linker mezi rameny Fab a Fc částí. Její délka a flexibilita jsou však proměnlivé mezi jednotlivými podtřídami IgG, což má důsledky pro konformace a interakce s dalšími molekulami. U IgG<sub>1</sub> vykazuje pantová oblast vysokou flexibilitu. Naopak IgG<sub>2</sub> má kratší pant, což mu poskytuje menší flexibilitu. Navíc IgG<sub>2</sub> má pevnější strukturu díky extra disulfidovým můstkům, což ještě více limituje jeho flexibilitu. IgG<sub>4</sub> má také kratší pant než IgG<sub>1</sub>, ale jeho flexibilita je mezi IgG<sub>1</sub> a IgG<sub>2</sub>. Největší odlišnost v délce a struktuře pantu vykazuje IgG<sub>3</sub>, která má až čtyřikrát delší pant než ostatní podtřídy. Jeho délka výrazně ovlivňuje flexibilitu molekuly IgG<sub>3</sub> a umožňuje větší oddálení Fab a Fc částí. Rozdíly ve

flexibilitě pantové oblasti se promítají do schopností podtříd IgG vázat se na receptory Fc $\gamma$ R. Tato variabilita dále ovlivňuje schopnost protilátek vázat antigen a formovat imunitní komplexy. Celkově tedy strukturní vlastnosti pantové oblasti IgG hrají významnou roli v biologických funkcích protilátek a jejich interakcích s dalšími složkami imunitního systému [23, 25].

### 2.2.3 Receptory IgG

Fc receptory (FcR) jsou důležité pro funkce protilátek v imunitních buňkách, jako je ochrana před bakteriemi a fagocytóza. Lidé mají několik typů Fc receptorů, včetně aktivujících receptorů Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIc, Fc $\gamma$ RIIIa a inhibičního receptoru Fc $\gamma$ RIIb. Receptor Fc $\gamma$ RI (CD64) má vysokou afinitu k imunoglobulinu G (IgG) a nachází se na různých typech buněk, jako jsou monocyty, makrofágy, eozinofily, dendritické buňky a neutrofile po aktivaci. Jeho role v imunitní odpovědi zůstává nejasná, ale studie naznačují účast v zánětu a autoimunitních reakcích. Fc $\gamma$ RI může také zvýšit prezentaci antigenů MHC II. Mechanismus, jakým cytokiny mění vazebnou kapacitu Fc $\gamma$ RI, není zcela jasný, ale může zahrnovat změny v jeho konformaci, dynamice a organizaci v membráně. Fc $\gamma$ RI se nachází na makrofázích, neutrofilech, eozinofilech a dendritických buňkách. Fc $\gamma$ RIIa (CD32) je exprimován na stejných buňkách, plus na krevních destičkách a Langerhansových buňkách. Fc $\gamma$ RIII (CD16) má dva typy, Fc $\gamma$ RIIIa je přítomen na buňkách přirozených zabíječů a makrofázích. Inhibiční Fc gama receptor Fc $\gamma$ RIIb se vyskytuje na B lymfocytech, žírných buňkách, makrofázích, neutrofilech a eozinofilech, a také na konvenčních dendritických buňkách a má nízkou afinitu k IgG [24, 28, 29].

Studie také ukázaly, že IgG<sub>1</sub> a IgG<sub>4</sub> se výhradně vážou na Fc $\gamma$ RI jako monomery, zatímco IgG<sub>2</sub> neprojevuje afinitu k žádnému Fc $\gamma$ R. IgG<sub>3</sub> se váže na Fc $\gamma$ RI a také na Fc $\gamma$ RIIIa. Navíc, IgG-IC (imunokomplexy) mají schopnost interagovat s různými Fc $\gamma$ R, s preferencí k nízkoafinitním receptorům Fc $\gamma$ RIIa, IIIa a I Ib, které jsou považovány za hlavní efekторы Fc $\gamma$ R na imunitních buňkách. Velikost IgG-IC je také důležitá, přičemž větší komplexy vykazují silnější interakci s nízkoafinitními lidskými Fc $\gamma$ R než menší komplexy [28, 29].

### 2.2.4 Podtřídy IgG a jejich biologický význam

Rozdíly se projevují v opsonizačních vlastnostech, vazbě na komplement a délce jejich aktivity. Jediné významné odlišnosti mezi jednotlivými podtřídami se nacházejí v oblasti pantu a N-terminální doméně. Podtřídy, nazývané izotypy, mohou mít různé varianty

nazývané alotypy, které se obvykle nacházejí v konstantních oblastech těžkých a lehkých řetězců [18].

Nejhojněji se ve třídě imunoglobulinu G vyskytuje IgG<sub>1</sub>, jehož zastoupení v plazmě činí 60–70 %. Tato podtřída protilátek indukuje imunitní odpověď proti rozpustným proteinovým antigenům a membránovým proteinům, účastní se při obraně proti virovým infekcím. Jelikož IgG<sub>1</sub> je v plazmě v největším zastoupení, její nedostatek vede k celkové snížené koncentraci IgG, tento stav se označuje jako hypogamaglobulinémie. Celková snížení koncentrace IgG spojená s deficitem IgG<sub>1</sub> v kombinaci s jinými podtřídami může být zdůvodněna recidivujícími infekcemi [23, 25].

Zastoupení podtřídy IgG<sub>2</sub> v plazmě se pohybuje okolo 20–30 %. Jejich primární rolí je ochrana těla před bakteriálními infekcemi. Reagují především s bakteriálními kapsulárními polysacharidovými antigeny. Nedostatek IgG<sub>2</sub> je tedy spojován s vyšší náchylností k těmto onemocněním [23, 25].

IgG<sub>3</sub> je podtřída protilátek s krátkým biologickým poločasem, která se v těle vyskytuje při vzniku zánětu. Dále se spolu s IgG<sub>1</sub> účastní obrany před virovými infekcemi, kdy se sekretují dříve. Snížené hladiny IgG<sub>3</sub> jsou spíše spojeny s deficitem jiných podtříd IgG. Celkové zastoupení v plazmě je 5–8 % [23, 25].

K tvorbě IgG<sub>4</sub> často dochází při opakovaném nebo dlouhodobém vystavení alergenu. Jejich zastoupení v plazmě je nejmenší, a to 1–3 %. Avšak u jedinců, kteří podstoupili imunoterapii může dojít ke zvýšené tvorbě IgG<sub>4</sub>, což může vést ke zvýšení procentuálního zastoupení. Dále infekce hlísty a vláknitými parazity ovlivňuje jejich tvorbu [23, 25].

Alergen-specifické IgG má blokující a neutralizační funkci, které ovlivňují interakce s alergenem a umožňují tlumení alergických reakcí. Alergen-specifické IgG, zejména IgG<sub>4</sub>, může bránit vazbě alergenů na IgE receptory na povrchu senzibilizovaných buněk, jako jsou žírné buňky a bazofily. Vazbou alergen-specifického IgG na alergen dochází k jeho neutralizaci. Tímto způsobem mohou IgG<sub>4</sub> protilátky snižovat alergické reakce tak, že blokují interakce mezi alergenem a IgE, což je důležitý krok při spouštění alergických reakcí. Vysoké hladiny alergen-specifického IgG<sub>4</sub> byly spojovány s tolerancí vůči alergenům u některých jedinců, což naznačuje možnou roli těchto protilátek v regulaci alergických reakcí [26, 27].

V praxi se využívá alergenové imunoterapie označované také jako alergen-specifická imunoterapie (AIT), která může vést ke zvýšení hladin alergen-specifického IgG a IgG<sub>4</sub> a tím pomáhat ke snížení citlivost na alergeny [26].

### 3 Afinita a avidita protilátek

Afinita a avidita jsou pojmy, které popisují sílu vazby mezi protilátkou a antigenem. Každý z nich se však zaměřuje na jiný aspekt této interakce. Afinita protilátky, také známá jako vazebná afinita, je síla interakce mezi vazebným místem na protilátce a specifickým epitopem na antigenu. Jedná se o monovalentní vazbu, což znamená, že se zkoumá vazba jednoho vazebného místa na jeden epitop. Stručně řečeno se afinita týká síly jedné vazby mezi protilátkou a jedním epitopem antigenu. Afinita se vyjadřuje rovnovážnou konstantou, která kvantifikuje tuto vazebnou sílu [30].

Avidita protilátky představuje celkovou sílu všech interakcí mezi protilátkou a antigenem. Avidita je ovlivněna několika faktory, zejména multivalentní vazbou, což je schopnost protilátky vázat se na více epitopů antigenu najednou. Čím větší je počet vazebných míst pro antigen na imunoglobulinu, tím větší je potenciální avidita, protože může současně vázat více epitopů na jednom antigenu, pokud je antigen multivalentní. V souhrnu se tedy avidita týká celkové síly všech vazeb mezi protilátkou a antigenem, přičemž zohledňuje možnost multivalentní vazby [30].

Afinita lze popsat rovnovážnou konstantou ( $K_d$ ), pomocí které se měří afinita protilátek k antigenům. Charakteristická je pro ni schopnost reverzibilní vazby protilátky na antigenní determinantu na antigenu. Tento parametr poskytuje důležité informace o stabilitě a síle vazby mezi protilátkou a antigenem. Nižší hodnota  $K_d$  indikuje vyšší afinitu, tedy těsnější a stabilnější vazbu mezi protilátkou a antigenem. Naopak vyšší hodnota  $K_d$  naznačuje slabší vazbu, kde protilátka a antigen snadněji disociují. Hodnota  $K_d$  v nanomolárním nebo pikomolárním rozsahu naznačuje silnou afinitu, zatímco vyšší hodnoty v mikromolárním nebo vyšším rozsahu naznačují slabší afinitu. Pro většinu aplikací jsou ideální  $K_d$  hodnoty v nízkém nanomolárním ( $10^{-9}$  M) nebo dokonce pikomolárním ( $10^{-12}$  M) rozsahu. Protilátky s těmito hodnotami mají vysokou afinitu a jsou schopné tvořit stabilní komplexy s antigeny.  $K_d$  hodnoty pro IgE-alergen interakce se typicky pohybují v rozmezí koncentrací  $10^{-12}$  –  $10^{-9}$  M.  $K_d$  hodnoty pro IgG protilátky se rovněž pohybují v rozmezí koncentrací  $10^{-12}$  –  $10^{-9}$  M. Hodnoty  $K_d$  se mohou lišit v závislosti na konkrétních antigenech v reakci. IgE

protilátky mají obvykle afinitu v podobném rozsahu jako IgG protilátky, ale často s nižší afinitou, což odpovídá jejich úloze v okamžité alergické reakci [31, 32, 33]

Každá protilátka má více vazebných míst, na které se mohou antigeny vázat. Například nejčastější typ protilátka IgG má dvě vazebná místa na jednu molekulu antigenu. Rovnovážná konstanta může tedy udávat vztah mezi tvorbou monovalentního komplexu antigen-protilátka, který se označuje jako vnitřní afinita. Dále mohou vznikat také komplexy vyššího řádu, kdy se mohou na jednu protilátku vázat dva i více antigenů. Označují se pak divalenty nebo multivalenty. Při multivalentních interakcích je používáno označení pro rovnovážnou konstantu avidita, která obvykle převyšuje odpovídající vnitřní afinitu, někdy i výrazně. Nicméně tyto interakce nejsou vždy jednotné a mohou se lišit z několika důvodů. Prvním důvodem je možnost opakovaného vzniku vazeb mezi protilátkou a antigenem. Dalším faktorem je rozdílnost síly vazeb mezi první a každou následující vazbou v komplexech. Důležitá je tedy vnitřní afinita, a ne avidita, která poskytuje jednoznačný základ pro porovnání protilátek produkovaných v různých fázích imunitní odpovědi [31, 34].

### **3.1 Afinitní zrání**

Afinitní zrání neboli maturace je proces, který probíhá během adaptivní imunitní odpovědi a vede k vývoji protilátek s vyšší afinitou a specifitou k antigenu. Na počátku imunitní reakce jsou produkovány nízkoafinitní protilátky třídy IgM, postupně se však vyvíjejí protilátky s vyšší afinitou třídy IgG a IgA. Proces mutace probíhá hlavně v lymfatických uzlinách a slezině, kde dochází k selekci a evoluci B lymfocytů, která vede ke změně třídy imunoglobulinů a produkci protilátek s vyšší afinitou [31, 34].

Afinitní zrání začíná aktivací B lymfocytů, k čemuž dochází, pokud B-buněčné receptory rozpoznají a naváží specifický antigen. Po této reakci vstupují B lymfocyty do germinálních center v lymfatických uzlinách, kde podléhají dvěma hlavními procesům, a to somatické hypermutaci a afinitní selekci. Při somatické hypermutaci se zavádí náhodné genetické mutace do genů kódujících protilátku, tyto oblasti kódují vazebná místa pro antigen a jsou známá jako oblasti určující komplementaritu. Tento proces vede k produkci variant protilátek s různou afinitou k antigenu. Následně tyto mutované buňky vystavují na svém povrchu upravené B-buněčné receptory a soutěží o přežití na základě jejich vazebné afinity k antigenu. Buňky s nejvyšší afinitou jsou vybrány a mohou proces opakovat, zatímco ty s nižší afinitou podléhají apoptóze. Tyto procesy mohou trvat až několik týdnů po vystavení organismu infekci či vakcinaci. Protilátky vznikající v reakci na infekci nebo vakcinaci mají



na počátku nízkou afinitu k antigenu, který reakci vyvolal. Naopak protilátky, které vznikají později, mají ke stejnému antigenu vyšší afinitu. Touto změnou v síle afinity se začnou tvořit protilátky, které jsou afinitně zralé. Tento cyklický proces vede k produkci B lymfocytů s optimální afinitou k antigenu, které se pak mohou diferencovat na plazmatické buňky produkující protilátky nebo paměťové B buňky [31, 35].

Afinitní zrání je důležité pro efektivní fungování imunitního systému a má široké uplatnění v medicíně a biotechnologii. Tento základní proces umožňuje adaptivnímu imunitnímu systému účinně se přizpůsobit a bojovat proti patogenům, čímž zvyšuje schopnost imunitního systému neutralizovat infekce. Přírodní afinitní zrání se využívá při vývoji vakcín a protilátkových terapeutik, což umožňuje vytváření protilátek s vysokou afinitou pro specifické antigeny. Moderní technologie umožňují replikovat tento proces *in vitro* pomocí genetických mutací a selekce, což vede k vývoji vysoce účinných protilátek pro použití v léčbě rakoviny, autoimunitních onemocnění a infekčních chorob. Tento proces poskytuje základ pro vývoj nových terapeutických a diagnostických nástrojů [34, 35].

### **3.2 Interakce mezi alergenem a protilátkou**

Reakce alergen-protilátka je základním procesem imunitní odpovědi. Tato reakce může být organismu prospěšná v podobě imunitní reakce, nebo škodlivá při imunopatologických reakcích. Interakce je založena na vložení antigenního epitopu do štěrbiny tvořené svinutým těžkým a lehkým řetězcem imunoglobulinu v místě, kde se váže antigen na protilátku. Tato oblast je velmi specifická a umožňuje přesné vazby. Některé epitopy dokonale zapadají do této štěrbiny, což se označuje jako interakce „zámek a klíč“. Tyto epitopy se vážou na protilátku s vysokou afinitou, což znamená, že jsou vázány velmi pevně a stabilně. Jiné epitopy mohou být vázány pouze volně, což vede k interakci s nízkou afinitou [36, 37].

Některé interakce antigen-protilátka lze přímo vizualizovat, pokud je antigen dostatečně velký, aby byl viditelný pouhým okem nebo pod mikroskopem. Vazba mezi antigenem a protilátkou může vést k tvorbě viditelných sraženin nebo aglutinátů. Většina interakcí antigen-protilátka je však neviditelná pouhým okem a k jejich detekci se používají sekundární „systémy indikátorů“ v sérologických testech [37].

Technika rentgenové krystalografie je často využívána k vytvoření experimentálních modelů komplexů alergen-protilátka, což umožňuje detailní popis epitopů, paratopů a jejich

chemických interakcí. Provedení této techniky může být náročné, poskytuje však nejpřesnější popis interakcí mezi alergeny a protilátkami. Analýza těchto struktur ukázala, že protilátky mají šest oblastí určujících komplementaritu, které tvoří paratop, tedy část protilátky, která rozpoznává a váže se na epitop alergenu. Epitopy interagují s paratopy prostřednictvím různých chemických vazeb, včetně kovalentních (vodíkové vazby) a nekovalentních vazeb (hydrofobní, van der Waalsovy a elektrostatické interakce). Van der Waalsovy síly a vodíkové vazby jsou důležité pro počáteční kontakt mezi alergenem a protilátkou. Těžké řetězce protilátek jsou zodpovědné za většinu vodíkových vazeb při těchto interakcích, což poukazuje na jejich důležitost v rozpoznání alergenů [36, 38].

Flexibilita protilátek má důležitou roli v jejich schopnosti rozpoznávat a vázat se na různé antigeny. Konformační změny v oblastech určujících komplementaritu umožňují nezralým protilátkám rozpoznat širší spektrum antigenů. Zralé protilátky se stávají specifitějšími, ale méně flexibilními [36].

### **3.3 Studium afinity protilátek pomocí různých metod**

#### **3.3.1 Metoda ELISA**

Metoda ELISA (enzymově vázaný imunisorbentní test) je široce rozšířená metoda v imunologickém výzkumu, která umožňuje detekci a kvantifikaci specifických interakcí mezi antigeny a protilátkami. Aviditní ELISA rozšiřuje základní princip této techniky o hodnocení stability imunokomplexů [39].

Postup začíná přípravou mikrotitračních destiček, které jsou chemicky modifikovány glutaraldehydem pro stabilizaci proteinů. Poté jsou jednotlivé jamky naplněny roztokem antigenu, který se inkubuje s protilátkami při nízké teplotě po dobu 20 hodin. Destičky jsou poté důkladně promyty PBS-T pufrem a následně blokovány blokovacím roztokem, aby se zabránilo nespecifické vazbě. Samotná analýza avidity začíná aplikací různých koncentrací chaotropního činidla ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ ) do jednotlivých jamek. Tato činidla ruší slabé vazby mezi antigenem a protilátkami, zatímco silné vazby zůstávají nedotčeny. Po krátké inkubaci jsou destičky opět promyty a následně se přidává sekundární protilátka značená křenovou peroxidázou, která se váže na primární protilátku. Další promývání destiček je následováno přidáním substrátu pro peroxidázu, který začíná reagovat a vytváří barevnou reakci. Tato reakce je po určité době zastavena přidáním kyseliny sírové a měřením absorbance u každé

jamky pomocí spektrofotometru. Naměřená data jsou poté vyhodnocena a zpracována graficky [39, 40].

Aviditní ELISA je osvědčená metoda pro hodnocení avidity protilátek, známá svou spolehlivostí a přesností a poskytuje informace o stabilitě a pevnosti interakce mezi antigeny a protilátkami. Tato technika je nejen relativně jednoduchá a cenově dostupná, ale také umožňuje přesné měření avidity díky použití různých chaotropních činidel a jejich koncentrací. Výsledky získané pomocí ELISA jsou srovnatelné s výsledky z jiných metod, jako je dot blot, s vysokou korelací. Hlavní výhodou ELISA je její dostupnost a snadná aplikace ve většině laboratoří, na rozdíl od složitějších a dražších technik, jako je povrchová plasmonová rezonance [39, 40].

### **3.3.2 ImmunoCAP**

ImmunoCAP je metoda označovaná za zlatý standard v detekci alergenů. Jedná se o fluorescenční enzymový imunotest (FEIA), který se vyznačuje vysokou detekční citlivostí a není ovlivněn přítomností specifických protilátek IgG, které by mohly ovlivnit výsledky testu, což zajišťuje přesnost a spolehlivost měření i v jejich přítomnosti [41].

Jednou z hlavních výhod metody ImmunoCAP je její vysoká citlivost a specifita. Díky tomu dokáže detekovat alergen-specifické IgE protilátky s velkou přesností. Test je schopen identifikovat jak protilátky s vysokou, tak s nízkou afinitou, což z něj činí univerzální nástroj pro různé diagnostické potřeby. ImmunoCAP dále umožňuje kvantitativní měření hladin IgE protilátek, což je důležité pro monitorování pacientů a hodnocení účinnosti léčby. Navzdory svým výhodám má ImmunoCAP i několik nevýhod. Jednou z nich je vysoká cena testu, která může omezovat jeho dostupnost, zejména v rozvojových zemích. Další nevýhodou je nutná delší doba pro vyhodnocení, což může být problém v akutních případech, kde je třeba rychlá diagnostika. V některých případech mohou být výsledky testu ovlivněny přítomností specifických IgG protilátek, což může vést k falešně pozitivním nebo negativním výsledkům. Ačkoli ImmunoCAP minimalizuje tyto interference, úplné odstranění tohoto problému není možné [42, 43].

Test začíná odběrem krve, který je součástí rutinního vyšetření. Sérum z těchto vzorků se následně používá pro analýzu. ImmunoCAP využívá technologii chemiluminiscence, kde specifické IgE protilátky v séru pacienta reagují s alergenem navázaným na pevnou fázi. Po navázání IgE se přidá enzym značená protilátka proti lidskému IgE, která po přidání substrátu produkuje světlo. Intenzita světla je přímo úměrná množství specifických IgE protilátek

přítomných v séru. Hodnoty sIgE mimo měřitelné rozmezí analyzátoru (0,10-100 kU/L) byly upraveny tak, aby byly použitelné pro statistickou analýzu. Výsledky měření jsou kvantifikovány v jednotkách kUA/L (kilo jednotek alergen-specifického IgE na litr). Stanovené hraniční hodnoty umožňují klasifikovat pacienty na senzibilizované a nesenzibilizované na daný alergen. Podle protokolu ImmunoCAP jsou výsledky interpretovány následujícím způsobem: hodnoty v rozmezí 0-0,34 kUA/L jsou považovány za negativní, což znamená, že pacient není senzibilizován na daný alergen. Hodnoty vyšší než 0,35 kUA/L jsou považovány za pozitivní, což indikuje senzibilizaci na daný alergen [42, 44].

V klinické praxi se ImmunoCAP používá především pro diagnostiku potravinových alergií, alergií na pyly, jedy hmyzu a dalších specifických alergií. Například v případě pacientů s anafylaxí způsobenou alergií na pšenici byla míra detekce ImmunoCAP 100 %. ImmunoCAP je také užitečný pro monitorování průběhu alergických onemocnění a účinnosti alergen-specifické imunoterapie (AIT) [42, 43].

### **3.3.3 Povrchová plasmonová rezonance**

Povrchová plasmonová rezonance (SPR) je pokročilá technika, která umožňuje studium intermolekulárních interakcí a měření jejich afinity, avšak není efektivní pro molekuly s velmi vysokou afinitou (v rozsahu nízkých pikomolárních až femtomolárních koncentrací). Od svého vzniku našla široké uplatnění v různých vědeckých a lékařských oborech, včetně biochemie, imunologie a diagnostiky. Hojně se využívá k detekci a charakterizaci intermolekulárních interakcí. Je ideálním nástrojem pro měření afinity mezi molekulami, což je velmi důležité pro pochopení jejich biologické funkce. Tato technika umožňuje nejen identifikaci interakcí, ale také kvantifikaci jejich síly a kinetiky bez nutnosti označování analyzovaných látek. Jednou z hlavních aplikací SPR je studium interakcí mezi antigeny a protilátkami. Dále je také efektivním nástrojem pro sledování produkce protilátek, detekci specifických protilátek a měření jejich afinity k antigenům [40, 45].

Senzory SPR jsou pokročilé nástroje schopné detekovat změny v indexu lomu v detekční oblasti na SPR sensorovém čipu, který je pokrytý zlatým filmem o tloušťce přibližně 50 nm. Proces SPR začíná imobilizací první složky, např. antigenu, na povrch SPR čipu. Následně je tento čip vystaven druhé složce, např. protilátce, ve vzorku. Při interakci protilátky s antigenem dochází ke změně refrakčního indexu na povrchu čipu. Tato změna je detekována jako odchylka v odraženém světle. Výsledné změny jsou analyzovány a kvantifikovány pomocí specializovaného softwaru, který generuje senzogramy.

Senzorgramy jsou grafy zobrazující změnu signálu v čase, což umožňuje podrobnou analýzu kinetiky a síly interakce mezi analyzovanými molekulami [45].

V rámci analýzy pomocí metody Zobrazovací povrchová plasmonová rezonance (SPRi) byl proveden výzkum s použitím přístroje SPRi-Plex vyvinutého společností Horiba, který monitoruje změny odrazu v jediném úhlu dopadu. Biočip byl nasycen PBS-PVP-Tw puftrem a následně na něj byly aplikovány protilátky v různých koncentracích. Pro každou analýzu byly specifické protilátky aplikovány na biočip, kde byly jednotlivé alergénové skvrny vybrány a identifikovány. Po injekci a reakci protilátek byl biočip promyt běžícím puftrem a následně regenerován 0,1 M glycin HCl pro další analýzy. Negativní kontroly byly provedeny pomocí skvrn Bet v1 (alergen pylu břízy) a lidského sérového albuminu (HSA). Minimální potřebná koncentrace protilátek pro detekci u SPRi se pohybovala mezi 80-100 ng/ml. SPRi nabízí rychlejší detekci bez nutnosti značení protilátkou s nižší spotřebou biologických činidel. Zatímco klasická SPR je zaměřena na kvantitativní měření kinetiky a afinit protilátek, SPRi poskytuje navíc schopnost vizualizace a zobrazování interakcí na povrchu senzoru [40].

SPR našla významné uplatnění i v oblasti alergologie. V různých studiích byla použita například k charakterizaci anti-IgE protilátek, nebo k detekci volného sérového IgE a sledování aktivace bazofilů u alergických pacientů. Tyto studie ukazují, že SPR může poskytovat cenné informace o imunitních reakcích a pomáhat při vývoji nových diagnostických a terapeutických metod. SPR je rovněž užitečná při sledování změn v afinitě protilátek během imunoterapie a poskytuje důležité informace pro hodnocení její účinnosti [40, 45].

Studie zabývající se měřením afinity protilátek při diagnostice alergií porovnávala využití metody ELISA a SPRi. Metoda ELISA byla považována za referenční metodu. Test ukázal, že SPRi může selektivně vázat antigeny bez zkřížených reakcí s jinými proteiny. Intenzita signálu v SPRi odpovídala množství navázaných protilátek. Byla také zkoumána kinetika vazby, která ukázala, že vazba mezi antigeny a protilátkami je silná a specifická s minimální nescifickou vazbou na jiné proteiny. Pro detekci bylo v ELISA potřeba minimálně 10 ng/ml protilátek, zatímco v SPRi bylo potřeba 80–100 ng/ml. To znamená, že citlivost SPRi je přibližně 8–10krát nižší než u ELISA. SPRi je tedy užitečná metoda pro vizualizaci a analýzu specifických vazeb mezi antigeny a protilátkami, ale není tak citlivá

jako ELISA. Citlivost metody je však závislá na afinitě protilátek, přičemž ELISA lépe funguje pro protilátky s vyšší afinitou [40, 46].

### 3.3.4 DOT-ELISA

DOT-ELISA je varianta klasické ELISA metody. Jedná se o semikvantitativní metodu, která umožňuje současnou detekci více alergenů pomocí nitrocelulózové membrány potažené různými alergeny. Tato metoda není finančně náročná, je rychlá, citlivá, vyžaduje malé množství vzorku a je vhodná pro časný klinický screening. Její hlavní nevýhody zahrnují dlouhé trvání testu a nemožnost přesného kvantitativního měření. Při porovnání, klasická metoda ELISA poskytuje kvantitativní měření sIgE a umožňuje zesílení signálu pomocí avidinu a biotinu, čímž zlepšuje analytickou citlivost. Nicméně, omezená plocha potahu destičky ELISA a možnost interference tIgE mohou ovlivnit výsledky [41, 47].

Principem metody je pipetování alergenů na nitrocelulózovou membránu v malých bodech, tzv. „dotech“, odtud také pochází název metody. Membrána se následně vysuší, čímž se alergeny pevně přichytí k jejímu povrchu. Membrána se dále inkubuje se vzorkem obsahujícím protilátku. Následuje promytí promývacím puftrem a inkubace se sekundární protilátkou značenou enzymem. Po opětovné promytí se přidá substrát, který je katalyzován enzymem, tato reakce vede ke změně barvy, která je vizuálním indikátorem. Intenzita barvy je úměrná množství vázaných protilátek, což umožňuje kvantitativní analýzu [41, 47].

Afinita testovaných monoklonálních protilátek v této studii byla hodnocena metodou DOT-ELISA pomocí afinitního indexu. Afinitní index je koncentrace chaotropního činidla ( $\text{NH}_4\text{SCN}$  – thiokyanatan amonný), při které se signál imunitního komplexu sníží na 50 % původní hodnoty. Chaotropní činidlo je látka, která je schopná uvolnit specifické vazby mezi alergenem a protilátkou. Rozsah měření je od 0 M do 2 M  $\text{NH}_4\text{SCN}$ . Protilátky s vysokou afinitou ( $> 10^{-9}$  M) zůstávají pevně vázané k antigenu i při vysoké koncentraci chaotropního činidla (2 M  $\text{NH}_4\text{SCN}$ ). Signál se významně nesníží, což znamená, že komplex je velmi stabilní. Protilátky se střední afinitou ( $10^{-9} - 10^{-6}$  M) odolají nižší koncentraci chaotropního činidla (1 M  $\text{NH}_4\text{SCN}$ ), ale jejich vazba je narušena při vyšší koncentraci (2 M  $\text{NH}_4\text{SCN}$ ). Signál se sníží při vyšší koncentraci, což ukazuje na střední stabilitu komplexu. Protilátky s nízkou afinitou ( $< 10^{-6}$  M) nejsou schopné odolat ani nižší koncentraci chaotropního činidla (1 M  $\text{NH}_4\text{SCN}$ ). Signál se výrazně sníží, což znamená, že komplex je méně stabilní [47].

### 3.3.5 Metoda microarray pro simultánní kvantitativní detekci sIgE a sIgG<sub>4</sub>

Tradiční diagnostické metody se zaměřují na měření specifického IgE (sIgE) proti různým alergenům. Nicméně, současný výzkum zdůrazňuje roli imunoglobulinu G<sub>4</sub> (IgG<sub>4</sub>). Metoda založená na microarray byla vyvinuta v Engelhardtově institutu molekulární biologie Ruské akademie věd. Tato technologie využívá hydrogelové mikročipy s imobilizovanými alergeny a umožňuje současnou detekci sIgE a sIgG<sub>4</sub> pomocí fluorescenčních barviv Cy5 a Cy3. Imunologické testy na mikročipech mohou identifikovat až 31 různých alergenů z jednoho vzorku krevního séra [47, 49].

Hydrogelové mikročipy pro analýzu pomocí této metody byly vyrobeny podle přesně definovaných protokolů pro účely této studie. Každý mikročip obsahoval gelové polštářky o průměru 80 mikronů, na které byly imobilizovány různé alergeny a směsi protilátek. Tyto polštářky byly uspořádány tak, aby zahrnovaly hlavní skupiny alergenů: pyl, domácnost, epidermální, potravinové, houbové a hmyzí jedy. Pro analýzu byly mikročipy inkubovány se vzorky krevního séra při 37 °C po dobu 20 hodin. Po promytí byly mikročipy ošetřeny vyvíjecím roztokem obsahujícím fluoroforem značené protilátky anti-IgE-Cy5 a anti-IgG<sub>4</sub>-Cy3. Po hodinové inkubaci byly mikročipy opět promyty a následně byla měřena intenzita fluorescence pomocí dvouvlnového mikročipového analyzátoru. Kalibrační křivky byly vytvořeny pomocí standardních vzorků séra s definovanými koncentracemi sIgE a sIgG<sub>4</sub>. Fluorescenční signály získané z mikročipových polštářků byly porovnány s těmito kalibračními křivkami, aby bylo možné přesně určit koncentrace protilátek ve vzorcích. Tento proces zajišťuje vysokou přesnost a spolehlivost měření [48].

Metoda byla testována na 152 vzorcích krevního séra od pacientů s různými alergickými onemocněními a zdravých dárců. Výsledky byly srovnávány s tradičními metodami, jako je ELISA, a vykazovaly vysokou korelaci. Pearsonovy korelační koeficienty, ROC analýza a Passing-Bablokova lineární regrese potvrdily spolehlivost a přesnost nové metody. Detekční limity pro sIgE a sIgG<sub>4</sub> byly nízké, což umožňuje citlivé detekování i malých množství těchto protilátek v séru [48].

Hlavní výhodou metody microarray je její schopnost současné detekovat sIgE a sIgG<sub>4</sub>, což poskytuje komplexnější informace o imunitní odpovědi pacienta. Měření sIgG<sub>4</sub> je zvláště důležité pro monitorování alergen-specifické imunoterapie (AIT), kde úspěšná terapie vede k nárůstu sIgG<sub>4</sub> a poklesu sIgE. Další výhodou je výrazně menší požadované množství

biomateriálu oproti jiným metodám. Technologie hydrogelových mikročipů také umožňuje rychlejší zpracování vzorků a získání výsledků [48, 49].

## **4 Role specifických IgG protilátek při alergiích**

V cyklu alergie hraje důležitou roli při snižování alergických reakcí, zejména IgG<sub>4</sub> prostřednictvím léčby, jako je alergenová imunoterapie (AIT), jak bude více uvedeno v následujících kapitolách. Alergie začíná tím, že tělo v reakci na alergeny produkuje IgG. Jejich vznik a přechod na IgG<sub>4</sub> byl popsán v předchozích kapitolách.

### **4.1 IgG<sub>4</sub> a jeho role v alergických reakcích**

Podtřídy IgG se liší afinitou k Fc receptorům a tím, jak účinně mohou aktivovat systém komplementu. V porovnání s ostatními podtřídami IgG nemá IgG<sub>4</sub> schopnost spustit efektivní aktivaci komplementu. Na rozdíl od IgG<sub>1</sub> se IgG<sub>4</sub> váže na Fc $\gamma$  receptory s menší afinitou. Celková nízká koncentrace IgG<sub>4</sub> v séru značí, že tyto protilátky mají spíše regulační funkci než funkci odstraňování antigenu, jelikož jsou omezeně schopné vyvolat účinnou imunitní odpověď. Vznikající imunitní komplexy alergen-IgG<sub>4</sub> však nezpůsobují zánět, protože IgG<sub>4</sub> nevyvolává aktivaci komplementu. Samotné odstranění antigenu mají na starosti jiné podtřídy IgG [20, 21, 24].

#### **4.1.1 Inhibice protizánětlivých reakcí**

IgG<sub>4</sub> má schopnost disociace, což znamená, že až polovina molekul IgG<sub>4</sub> může existovat v séru jako monovalentní protilátky s jedním těžkým a jedním lehkým řetězcem. Tyto monovalentní protilátky nemají schopnost vázat se na Fc receptory a aktivovat buňky, ale vážou se na alergeny. Dále mohou podstoupit molekulární výměnu ramen Fab, čímž vznikají nové molekuly IgG<sub>4</sub> s dvěma monovalentními specifitami, ale menší afinitou k antigenu, což jim dává protizánětlivý účinek [20, 50].

I když IgG<sub>4</sub> může vázat antigenní struktury, jeho menší afinita znamená, že vazba na antigen není tak silná jako u jiných tříd protilátek, jako je například IgG<sub>1</sub>. To znamená, že IgG<sub>4</sub> může mít omezenou schopnost efektivně neutralizovat antigenní účinky, protože jeho vazba na antigen je slabší. Navíc, i když IgG<sub>4</sub> může vázat antigenní struktury, jeho hlavním účelem není aktivovat imunitní buňky ani spouštět zánětlivé reakce, ale spíše fungovat jako regulátor imunitní odpovědi. Protože IgG<sub>4</sub> nemá silnou afinitu k antigenu, je méně



pravděpodobné, že spustí zánětlivé reakce, ale zároveň může efektivněji omezovat nadměrné imunitní odpovědi a zánětlivé procesy [20, 50].

Z toho vyplývá, že IgG<sub>4</sub> může potenciálně neutralizovat účinky alergenů tím, že váže a inaktivuje alergeny, aniž by spustil buněčnou odpověď. Tímto způsobem může IgG<sub>4</sub> chránit před alergickými reakcemi, snížit působení alergenů a tím i vyvolání zánětu [20].

#### **4.1.2 Blokování vazby IgE na alergen pomocí IgG<sub>4</sub> a indukce alergenové tolerance**

Pomocí modelových systémů byly provedeny výzkumy mechanismů, skrze které IgG<sub>4</sub> potlačuje přecitlivělost zprostředkovanou IgE. Výsledkem byly dva hlavní předpokládané způsoby působení. První teorie se zabývá tím, že IgG<sub>4</sub> může fungovat jako blokuující protilátka, která zabrání spojení IgE s jejich receptory tím, že se naváže na antigenní struktury. Druhá možnost se soustředí na schopnost IgG<sub>4</sub> interagovat s inhibičním receptorem FcγRIIb, který reguluje signalizaci IgE receptoru. Tímto způsobem může IgG<sub>4</sub> potlačovat aktivaci buněk, které by jinak vyvolaly alergické reakce. Pokud je tedy jedinec vystaven vysoké koncentraci daného alergenu způsobí to vyšší produkci alergen-specifických IgG<sub>4</sub>, díky čemuž se pak stává klinicky tolerantním. Při expozici na daný alergen již nebude hypersenzitivně reagovat [24, 51, 52].

Z toho vyplývá, že rovnováha mezi produkcí IgG<sub>4</sub> a IgE vysoce ovlivňuje rozvoj alergické hypersenzitivity a imunitní tolerance. Této znalosti se využívá především v alergenových imunoterapiích (AIT), které prokazují, že IgG<sub>4</sub> je schopen přímo inhibovat aktivitu IgE [51].

## **4.2 Alergenová imunoterapie**

Alergení imunoterapie (AIT) je léčebná metoda používaná k léčbě onemocnění způsobených imunitní reakcí prostřednictvím protilátek IgE, jako jsou alergie na hmyzí jed, potravinové alergie, alergická rýma a astma. Metoda vznikla na počátku 19. století a doporučuje se k léčbě alergické rýmy a astmatu. AIT je jedinou terapií, která má schopnost navodit dlouhodobou toleranci alergenů po ukončení léčby. Tato terapie funguje na principu postupné desenzibilizace pacienta vůči konkrétním alergenům tak, že jsou konkrétní alergeny opakovaně aplikovány v pravidelných intervalech. Doba trvání léčby je přibližně 3–6 let. Úspěšnost léčby se pohybuje mezi 70–90 %, což se projevuje zmírněním nebo úplným vymizením příznaků a snížením nebo ukončením potřeby léčby. Klasické metody AIT

zahrnují subkutánní (SCIT) a sublingvální alergenní imunoterapii (SLIT). Alergeny spojené s respiračními problémy a jedové alergie jsou léčeny pomocí AIT již mnoho let. AIT se snaží snížit nebo eliminovat příznaky alergií tím, že u pacienta vyvolá toleranci k alergenu. Účinnost AIT může být u každého pacienta odlišná a není možné ji přesně předpovědět [15, 53, 54].

Během AIT dochází k produkci IgG protilátek, které mají schopnost ovlivnit buněčné imunitní reakce. Tyto IgG protilátky narušují interakci mezi IgE a alergenem, čímž brání aktivaci buněk imunitního systému, jako jsou bazofily a žírné buňky, a potlačují uvolňování zánětlivých mediátorů. Tento proces má za následek snížení klinických symptomů spojených s alergiemi [24, 52].

Dřívější studie předpokládaly, že blokace funkce IgE je hlavním úkolem IgG<sub>4</sub> protilátek. Nedávné studie však naznačují, že po 16 týdnech podávání alergen-specifické imunoterapie pod jazyk (sublingvální AIT) jsou protilátky IgG<sub>1</sub> schopny efektivněji blokovat aktivaci bazofilů indukovanou alergenem než IgG<sub>4</sub> protilátky. Dřívější studie rovněž ukázaly, že alergen-specifické IgG<sub>1</sub> dominuje v raných fázích imunitní odpovědi na AIT. To naznačuje, že zpočátku převládá schopnost IgG<sub>1</sub> blokovat IgE, než se projeví ochranný účinek IgG<sub>4</sub> v pozdějších fázích AIT. Přesto bylo při kontrole IgG<sub>4</sub> v séru po dvou letech probíhající AIT zjištěno, že IgG<sub>4</sub> nebylo schopné zcela inhibovat účinky IgE, což ukazuje na dlouhodobou ochrannou roli IgG<sub>1</sub> [52, 54].

Z jiné studie vyplývá, že během AIT dochází k postupnému zvyšování hladin specifických IgG<sub>1</sub> a IgG<sub>4</sub> protilátek u jedinců léčených proti alergii na Bet v 1 (alergen pylu břízy). Během prvního měsíce terapie nedošlo k významnému zvýšení těchto protilátek, až po třech měsících se jejich hladiny začaly významně zvyšovat a setrvaly na vyšší úrovni v porovnání s hladinami před zahájením léčby. Hladiny IgG<sub>1</sub> dosáhly vrcholu po 12 měsících terapie, zatímco hladiny IgG<sub>4</sub> dosáhly vrcholu až po 24 měsících. Tyto výsledky naznačují, že AIT indukuje postupné zvýšení specifických IgG<sub>1</sub> a IgG<sub>4</sub> protilátek, přičemž hladiny IgG<sub>4</sub> dosahují svého vrcholu později než hladiny IgG<sub>1</sub> [52].

Při AIT dochází k výraznému poklesu hladiny blokujících protilátek do jednoho roku po ukončení léčby. Nicméně inhibiční aktivita IgE spojená s IgG trvá dlouhodobě a má vztah k celkové klinické odpovědi na terapii [53].

U potravinové imunoterapie dochází v raných fázích k přechodnému zvýšení hladin IgE specifických pro potraviny, avšak později dochází k jejich poklesu. Nízké počáteční

hladiny IgE specifických pro určité potraviny mohou signalizovat vývoj tolerance, avšak ani snížení těchto hladin pod určitou hranici nezaručuje vždy vznik tolerance. Současně dochází ke zvyšování hladiny IgG<sub>4</sub> specifických pro potraviny během potravinové imunoterapie. Nicméně, zdá se, že změny v těchto hladinách nekorelují s vývojem tolerance. To může být způsobeno tím, že hladiny IgG<sub>4</sub> spíše odrážejí předchozí expozici alergenů než samotnou toleranci, což naznačuje, že IgG<sub>4</sub> nemusí být úzce spojené s vývojem tolerance [53].

Z nedávných studií vyplývá, že profily IgE reaktivity u alergických pacientů jsou stanoveny v raném věku, ale není jasné, jestli je okno pro alergickou senzibilizaci krátké a zahrnuje pouze první měsíce života nebo trvá až do adolescence. Existuje možnost, že senzibilizace IgE na nové alergeny u dětí může probíhat až do věku 8 let, což naznačuje relativně dlouhé časové okno. Nicméně, je také možné, že senzibilizace IgE může začít již dříve, ale není detekovatelná pomocí IgE testů po několik let expozici alergenů. Některé studie naznačují, že k alergické senzibilizaci dochází v prvních měsících života, protože pacienti se sezónními alergiemi jsou často narozeni krátce před obdobím expozice alergenů. Nedávné studie také naznačují, že u dětí narozených matkám s vysokými hladinami alergen-specifického IgG, se nevyvinuly IgE odpovědi na tyto alergeny během 4–5 let sledování. Neoficiální výsledky naznačují, že děti matek podstupujících AIT zvyšující hladinu specifického IgG pro alergeny, nemusí vykazovat alergické reakce na tyto alergeny [2, 54].

## ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit, jakou roli mohou mít specifické protilátky IgE a IgG při alergiích. Úvodní část práce se zabývala mechanismy imunitního systému a jeho odpovědí při alergických imunopatologických reakcích, společně s fázemi alergické reakce. V práci byly také popsány jednotlivé typy alergenů a nejčastější příznaky, které indikují alergickou reakci organismu. Dále se práce zabývala popisem imunoglobulinů IgE a IgG se zaměřením na jejich vznik, strukturu, jednotlivé receptory pro alergen a buňky imunitního systému a biologický význam.

Hlavním tématem práce je afinita a avidita specifických IgE a IgG protilátek, což je důležitý aspekt pro pochopení alergických reakcí a vývoj efektivních terapeutických metod. Aby mohly v těle vzniknout specifické protilátky, musí podstoupit proces afinitního zrání. Díky tomu jsou produkovány specifické protilátky s vyšší afinitou k antigenu. Afinitní zrání je důležité pro správnou funkci imunitního systému a odpovědi na antigeny. Tohoto procesu se využívá především v medicíně. V kontextu této práce bylo využito především v alergenové imunoterapii, kde mohou vznikat specifické blokuující protilátky třídy IgG, které blokují vazbu alergenu na povrchu bazofilů nebo žírných buněk.

Práce je rozšířena o aktuálně používané metody, které jsou schopné měřit afinitu a aviditu protilátek. Mezi klasické metody patří metoda ImmunoCAP, která se označuje jako zlatý standard při detekci alergenů. Další metodou je povrchová plasmonová rezonance, která je rovněž hojně využívána v alergologii. Obě metody se využívají k měření síly afinity protilátek, jsou vhodné jak pro nízkoafinitní, tak vysokoafinitní interakce. Mezi jednu z nejnovějších metod se řadí metoda microarray pro simultánní kvantitativní detekci sIgE a sIgG<sub>4</sub>, jehož role se velmi spojuje s alergiemi a monitorováním alergenové imunoterapie.

Metody byly porovnány s klasickou metodou měření afinity a avidity ELISA. Za poslední řadu let se metody vyšetření od této klasické metody posunuly a umožňují přesnější měření jak kvalitativně, tak kvantitativně. Některé metody umožňují analýzu i více vzorků naráz, jako je například metoda DOT-ELISA, což může usnadnit práci. Díky těmto metodám můžeme diagnostikovat onemocnění a sledovat účinnost léčby.

## POUŽITÁ LITERATURA

[1] HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák – Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-250-3.

[2] VALENTA, Rudolf; KARAULOV, Alexander; NIEDERBERGER, Verena; GATTINGER, Pia; VAN HAGE, Marianne et al. Molecular Aspects of Allergens and Allergy. In: . *Advances in Immunology*. Elsevier, 2018, s. 195-256. ISBN 9780128151884. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2018.03.002>. [cit. 2024-04-11].

[3] BACHMANN, M. F. a KÜNDIG, T. M. Allergen-specific immunotherapy: is it vaccination against toxins after all? *Allergy*. 2017, roč. 72, č. 1, s. 13-23. ISSN 01054538. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/all.12890>. [cit. 2024-05-1].

[4] MARSHALL, Jean S.; WARRINGTON, Richard; WATSON, Wade a KIM, Harold L. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2018, roč. 14, č. S2. ISSN 1710-1492. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>. [cit. 2024-03-04].

[5] UDOYE, Christopher C.; EHLERS, Marc a MANZ, Rudolf A. The B Cell Response and Formation of Allergenic and Anti-Allergenic Antibodies in Food Allergy. *Biology*. 2023, roč. 12, č. 12. ISSN 2079-7737. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biology12121501>. [cit. 2024-06-08].

[6] WOODFOLK, Judith A.; COMMINS, Scott P.; SCHUYLER, Alexander J.; ERWIN, Elizabeth A. a PLATTS-MILLS, Thomas A.E. Allergens, sources, particles, and molecules: Why do we make IgE responses? *Allergology International*. 2015, roč. 64, č. 4, s. 295-303. ISSN 13238930. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.alit.2015.06.001>. [cit. 2024-05-10].

[7] BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a PANZNER, Petr. *Klinická imunologie a alergologie: pro všeobecné praktické lékaře. Ediční řada pro všeobecné praktické lékaře*. Praha: Raabe, [2019]. ISBN 978-80-7496-423-7.

[8] GURYANOVA, Svetlana V.; FINKINA, Ekaterina I.; MELNIKOVA, Daria N.; BOGDANOV, Ivan V.; BOHLE, Barbara et al. How Do Pollen Allergens Sensitize? *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2022, roč. 9. ISSN 2296-889X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.900533>. [cit. 2024-06-06].

- [9] ZAHRADNIK, Eva a RAULF, Monika. Animal Allergens and Their Presence in the Environment. *Frontiers in Immunology*. 2014, roč. 5. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00076>. [cit. 2024-06-06].
- [10] IWEALA, Onyinye I.; CHOUDHARY, Shailesh K. a COMMINS, Scott P. Food Allergy. *Current Gastroenterology Reports*. 2018, roč. 20, č. 5. ISSN 1522-8037. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11894-018-0624-y>. [cit. 2024-06-06].
- [11] DHAMI, Sangeeta; NURMATOV, Ulugbek; VARGA, Eva-Maria; STURM, Gunter; MURARO, Antonella et al. Allergen immunotherapy for insect venom allergy: protocol for a systematic review. *Clinical and Translational Allergy*. 2015, roč. 6, č. 1. ISSN 2045-7022. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13601-016-0095-x>. [cit. 2024-06-06].
- [12] WARRINGTON, Richard; SILVIU-DAN, Fanny a WONG, Tiffany. Drug allergy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2018, roč. 14, č. S2. ISSN 1710-1492. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0289-y>. [cit. 2024-06-07].
- [13] SHAMJI, Mohamed H.; VALENTA, Rudolf; JARDETZKY, Theodore; VERHASSELT, Valerie; DURHAM, Stephen R. et al. The role of allergen-specific IgE, IgG and IgA in allergic disease. *Allergy*. 2021, roč. 76, č. 12, s. 3627-3641. ISSN 0105-4538. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/all.14908>. [cit. 2024-03-06].
- [14] SANCHEZ-TRINCADO, Jose L.; GOMEZ-PEROSANZ, Marta a RECHE, Pedro A. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *Journal of Immunology Research*. 2017, roč. 2017, s. 1-14. ISSN 2314-8861. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2017/2680160>. [cit. 2024-05-08].
- [15] ZULÁK, Martin a Jaromír BYSTRONĚ. Současné možnosti diagnostiky a léčby alergických onemocnění. *MEDICAL TRIBUNE* [online]. 2021. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/archiv/soucasne-moznosti-diagnostiky-a-lecby-alergickyhonemocneni/> [cit. 2024-06-09].
- [16] JUSTIZ VAILLANT A., JAMAL Z., PATEL P. a kol. Imunoglobulin. [Aktualizováno 28. srpna 2023]. In: StatPearls [Internet]. Ostrov pokladů (FL): StatPearls Publishing; leden 2024. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513460/>. [cit. 2024-03-05].
- [17] CHIU, Mark L.; GOULET, Dennis R.; TEPLYAKOV, Alexey a GILLILAND, Gary L. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies*. 2019,

roč. 8, č. 4. ISSN 2073-4468. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antib8040055>. [cit. 2024-03-05].

[18] ŠTERN, P. Struktura protilátek a jejich reaktivita. Klinická biochemie a metabolismus 2016, 4-9. Dostupné z: <https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2016/2016-1/KBM-1-2016-Stern-4.pdf>. [cit. 2024-03-05].

[19] SUTTON, Brian; DAVIES, Anna; BAX, Heather a KARAGIANNIS, Sophia. IgE Antibodies: From Structure to Function and Clinical Translation. *Antibodies*. 2019, roč. 8, č. 1. ISSN 2073-4468. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antib8010019>. [cit. 2024-03-06].

[20] SCOTT-TAYLOR, Timothy H.; AXINIA, Stefan-Claudiu; AMIN, Sumeya a PETTENGELL, Ruth. Immunoglobulin G; structure and functional implications of different subclass modifications in initiation and resolution of allergy. *Immunity, Inflammation and Disease*. 2018, roč. 6, č. 1, s. 13-33. ISSN 2050-4527. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/iid3.192>. [cit. 2024-04-08].

[21] ECKL-DORNA, Julia; VILLAZALA-MERINO, Sergio; LINHART, Birgit; KARAULOV, Alexander V.; ZHERNOV, Yury et al. Allergen-Specific Antibodies Regulate Secondary Allergen-Specific Immune Responses. *Frontiers in Immunology*. 2019, roč. 9. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03131>. [cit. 2024-04-10].

[22] KELLY, Brian T. a GRAYSON, Mitchell H. Immunoglobulin E, what is it good for? *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2016, roč. 116, č. 3, s. 183-187. ISSN 10811206. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.anai.2015.10.026>. [cit. 2024-03-05].

[23] VIDARSSON, Gestur; DEKKERS, Gillian a RISPENS, Theo. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology*. 2014, roč. 5. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>. [cit. 2024-03-15].

[24] BIANCHINI, Rodolfo; KARAGIANNIS, Sophia N.; JORDAKIEVA, Galateja a JENSEN-JAROLIM, Erika. The Role of IgG4 in the Fine Tuning of Tolerance in IgE-Mediated Allergy and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, roč. 21, č. 14. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21145017>. [cit. 2024-06-09].

[25] DAMELANG, Timon; BRINKHAUS, Maximilian; VAN OSCH, Thijs L. J.; SCHUURMAN, Janine; LABRIJN, Aran F. et al. Impact of structural modifications of IgG antibodies on effector functions. *Frontiers in Immunology*. 2024, roč. 14. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1304365>. [cit. 2024-03-15].

- [26] SUGIMOTO, Mayumi; KAMEMURA, Norio; NAGAO, Mizuho; IRAHARA, Makoto; KAGAMI, Shoji et al. Differential response in allergen-specific IgE, IgGs, and IgA levels for predicting outcome of oral immunotherapy. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2016, roč. 27, č. 3, s. 276-282. ISSN 0905-6157. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/pai.12535>. [cit. 2024-05-11].
- [27] WISE, Sarah K.; DAMASK, Cecelia; ROLAND, Lauren T.; EBERT, Charles; LEVY, Joshua M. et al. International consensus statement on allergy and rhinology: Allergic rhinitis – 2023. *International Forum of Allergy & Rhinology*. 2023, roč. 13, č. 4, s. 293-859. ISSN 2042-6976. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/alr.23090>. [cit. 2024-05-11].
- [28] BRANDSMA, Arianne M.; SCHWARTZ, Samantha L.; WESTER, Michael J.; VALLEY, Christopher C.; BLEZER, Gittan L. A. et al. Mechanisms of inside-out signaling of the high-affinity IgG receptor FcγRI. *Science Signaling*. 2018, roč. 11, č. 540. ISSN 1945-0877. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaq0891>. [cit. 2024-03-18].
- [29] JUNKER, Fabian; GORDON, John a QURESHI, Omar. Fc Gamma Receptors and Their Role in Antigen Uptake, Presentation, and T Cell Activation. *Frontiers in Immunology*. 2020, roč. 11. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01393>. [cit. 2024-03-18].
- [30] VOGEL, Monique; BACHMANN, Martin; MOHSEN, Mono O.; KRAMER, Matthias; STARCHENKA, Sviatlana et al. On the role of antibody affinity in the IgE mediated allergic response. *ESS Open Archive* 2023. Dostupné z: <https://doi.org/10.22541/au.167997965.58090746/v1>. [cit. 2024-06-05].
- [31] EISEN, Herman N. Affinity Enhancement of Antibodies: How Low-Affinity Antibodies Produced Early in Immune Responses Are Followed by High-Affinity Antibodies Later and in Memory B-Cell Responses. *Cancer Immunology Research*. 2014, roč. 2, č. 5, s. 381-392. ISSN 2326-6066. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0029>. [cit. 2024-04-28].
- [32] DAËRON, Marc. Fc Receptors as Adaptive Immunoreceptors. Online. In: DAËRON, Marc a NIMMERJAHN, Falk (ed.). *Fc Receptors. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Cham: Springer International Publishing, 2014, s. 131-164. ISBN 978-3-319-07910-3. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-07911-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-07911-0_7). [cit. 2024-06-22].



- [33] CREATIVE DIAGNOSTICS. *Quantitative Antibody Affinity Measurement*. [online]. Dostupné z: <https://www.creative-diagnostics.com/quantitative-antibody-affinity-measurement.htm>. [cit. 2024-06-23].
- [34] CHAN, Denice T.Y. a GROVES, Maria A.T. Affinity maturation in vitro strategies for the directed evolution of antibodies: highlights in the application of in vitro strategies for the directed evolution of antibodies. *Emerging Topics in Life Sciences*. 2021, roč. 5, č. 5, s. 601-608. ISSN 2397-8554. Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/ETLS20200331>. [cit. 2024-04-29].
- [35] LI, Jiaqi; KANG, Guangbo; WANG, Jiewen; YUAN, Haibin; WU, Yili et al. Affinity maturation of antibody fragments: A review encompassing the development from random approaches to computational rational optimization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, roč. 247. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125733>. [cit. 2024-06-09].
- [36] POMÉS, Anna; MUELLER, Geoffrey A. a CHRUSZCZ, Maksymilian. Structural Aspects of the Allergen-Antibody Interaction. *Frontiers in Immunology*. 2020, roč. 11. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02067>. [cit. 2024-06-06].
- [37] DAY, Michael J. Introduction to Antigen and Antibody Assays. *Topics in Companion Animal Medicine*. 2015, roč. 30, č. 4, s. 128-131. ISSN 19389736. Dostupné z: <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2015.12.001>. [cit. 2024-06-06].
- [38] MUELLER, Geoffrey A.; MIN, Jungki; FOO, Alexander C. Y.; POMÉS, Anna a PEDERSEN, Lars C. Structural Analysis of Recent Allergen-Antibody Complexes and Future Directions. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2019, roč. 19, č. 3. ISSN 1529-7322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11882-019-0848-4>. [cit. 2024-06-09].
- [39] SVOBODOVA, Zuzana; NOVOTNY, Jakub; OSPALKOVA, Barbora; SLOVAKOVA, Marcela; BILKOVA, Zuzana et al. Affiblot: a dot blot-based screening device for selection of reliable antibodies. Online. *Analytical Methods*. 2021, roč. 13, č. 35, s. 3874-3884. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D1AY00955A>. [cit. 2024-06-23].
- [40] CHARDIN, Hélène; MERCIER, Karen; FRYDMAN, Chiraz a VOLLMER, Nathalie. Surface Plasmon Resonance imaging: A method to measure the affinity of the antibodies in allergy diagnosis. *Journal of Immunological Methods*. 2014, roč. 405, s. 23-28. ISSN 00221759. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.12.010>. [cit. 2024-05-22].

- [41] TAN, Xin; ZHANG, Bei; ZHENG, Lisheng; SHI, Hongbin; LIU, Dandan et al. Performance evaluation of a laboratory-developed light-initiated chemiluminescence assay for quantification of egg white-specific IgE. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2022, roč. 36, č. 7. ISSN 0887-8013. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jcla.24544>. [cit. 2024-06-04].
- [42] GRIFFITHS, Rebecca L.M.; EL-SHANAWANY, Tariq; JOLLES, Stephen R.A.; SELWOOD, Clive; HEAPS, Adrian G. et al. Comparison of the Performance of Skin Prick, ImmunoCAP, and ISAC Tests in the Diagnosis of Patients with Allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2017, roč. 172, č. 4, s. 215-223. ISSN 1018-2438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000464326>. [cit. 2024-06-05].
- [43] VAN HAGE, Marianne; HAMSTEN, Carl a VALENTA, Rudolf. ImmunoCAP assays: Pros and cons in allergology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2017, roč. 140, č. 4, s. 974-977. ISSN 00916749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.008>. [cit. 2024-06-05].
- [44] TROUCHE-ESTIVAL, Benjamin; VITTE, Joana; MARTIN-BLONDEL, Audrey; MICHELET, Marine; GRUZELLE, Vianney et al. NOVEOS and ImmunoCAP Have Similar Performances for Diagnosing Food Allergies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2024, roč. 12, č. 6, s. 1605-1613.e5. ISSN 22132198. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2024.02.037>. [cit. 2024-06-23].
- [45] YANASE, Yuhki; SAKAMOTO, Kenji; KOBAYASHI, Koichiro a HIDE, Michihiro. Diagnosis of immediate-type allergy using surface plasmon resonance. *Optical Materials Express*. 2016, roč. 6, č. 4. ISSN 2159-3930. Dostupné z: <https://doi.org/10.1364/OME.6.001339>. [cit. 2024-06-04].
- [46] HAMILTON, Robert G.; SAINI, Sarbjit S. a MACGLASHAN, Donald. Surface plasmon resonance analysis of free IgE in allergic patients receiving omalizumab (Xolair). *Journal of Immunological Methods*. 2012, roč. 383, č. 1-2, s. 54-59. ISSN 00221759. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.05.015>. [cit. 2024-06-04].
- [47] Z, Svobodova. Dot-ELISA Affinity Test: An Easy, Low-Cost Method to Estimate Binding Activity of Monoclonal Antibodies. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. 2013, roč. 04, č. 03. ISSN 21559872. Dostupné z: <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000168>. [cit. 2024-06-04].

- [48] FEYZKHANOVA, Guzel; VOLOSHIN, Sergei; SMOLDOVSKAYA, Olga; AREFIEVA, Alla; FILIPPOVA, Marina et al. Development of a microarray-based method for allergen-specific IgE and IgG4 detection. *Clinical Proteomics*. 2017, roč. 14, č. 1. ISSN 1542-6416. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12014-016-9136-7>. [cit. 2024-06-05].
- [49] HAMED, Aljali; TODD, Ian; TIGHE, Patrick J.; POWELL, Richard J.; HARRISON, Tim et al. Array-based measurements of aero-allergen-specific IgE correlate with skin-prick test reactivity in asthma regardless of specific IgG4 or total IgE measurements. *Journal of Immunological Methods*. 2021, roč. 492. ISSN 00221759. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2021.112999>. [cit. 2024-06-05].
- [50] VAN DE VEEN, Willem a AKDIS, Mübeccel. Role of IgG4 in IgE-mediated allergic responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016, roč. 138, č. 5, s. 1434-1435. ISSN 00916749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.07.022>. [cit. 2024-04-08].
- [51] JAMES, Louisa K. a TILL, Stephen J. Potential Mechanisms for IgG4 Inhibition of Immediate Hypersensitivity Reactions. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2016, roč. 16, č. 3. ISSN 1529-7322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0600-2>. [cit. 2024-04-08].
- [52] STROBL, Maria R.; DEMIR, Hilal; SÁNCHEZ ACOSTA, Gabriela; DRESCHER, Anja; KITZMÜLLER, Claudia et al. The role of IgG1 and IgG4 as dominant IgE-blocking antibodies shifts during allergen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2023, roč. 151, č. 5, s. 1371-1378.e5. ISSN 00916749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2023.01.005>. [cit. 2024-04-08].
- [53] SAHINER, Umit M.; GIOVANNINI, Mattia; ESCRIBESE, Maria M.; PAOLETTI, Giovanni; HEFFLER, Enrico et al. Mechanisms of Allergen Immunotherapy and Potential Biomarkers for Clinical Evaluation. *Journal of Personalized Medicine*. 2023, roč. 13, č. 5. ISSN 2075-4426. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jpm13050845>. [cit. 2024-04-08].
- [54] PAVÓN-ROMERO, Gandhi F.; PARRA-VARGAS, Maria Itzel; RAMÍREZ-JIMÉNEZ, Fernando; MELGOZA-RUIZ, Esmeralda; SERRANO-PÉREZ, Nancy H. et al. Allergen Immunotherapy: Current and Future Trends. *Cells*. 2022, roč. 11, č. 2. ISSN 2073-4409. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cells11020212>. [cit. 2024-06-09].