

Ad informandum

Informační občasník laboratoře Interimun Pardubice

V tomto čísle naleznete:

Výživa a imunita:
Víte, čím se zabývá
epigenetika?

Nový trend v alergologii:
Molekulární
diagnostika

WebLIMS:
Databáze laboratoře
na internetu

Kvíz:
Poznáte, co tady svítí?



Vážení kolegové, milí přátelé,

uplynul další rok naší spolupráce a my si opět dovoluujeme nabídnout Vám další vydání našeho občasníku. Všichni již jistě netrpělivě očekáváme jaro a vnímáme první známky probouzející se přírody. Nicméně doufáme, že si i tak najdete chvíli na prolistování tohoto čísla.

Připravili jsme pro Vás krátké informace týkající se novinek z naší laboratoře, k nimž patří například možnost rychlého nahlížení do laboratorních výsledků cestou software WebLIMS. V alergologické laboratorní diagnostice nabývá na významu přesné určení cílů specifických IgE protilátek pacienta ve formě tzv. komponentové diagnostiky. Naše laboratoř nechce zůstat stranou a nabízíme významné rozšíření spektra rekombinantních i nativních alergenních komponent. V tomto čísle občasníku najdete i krátké shrnutí této problematiky. Je zde i další malý kvíz pro zvědavé čtenáře.

Hlavním tématem je letos vliv výživy a okolního prostředí na organismus a imunitní systém s důrazem na epigenetické mechanismy. Je úžasné sledovat myšlenkový posun od deterministického pojetí genetiky, kdy za celou řadu patologických stavů měly být zodpovědné „defektní, mutované“ geny, k netušeným možnostem (ale i hrozbám), které před námi otevírá poznání epigenetických principů. Nejen výživa a expozice různým látkám, ale také vliv psychických faktorů, stres, radost, žal, může ovlivnit nejen náš organismus, ale i biologii našich dětí a možná i vnoučat. Snad Vás toto téma zaujme a podnítlí Vaši zvědavost.

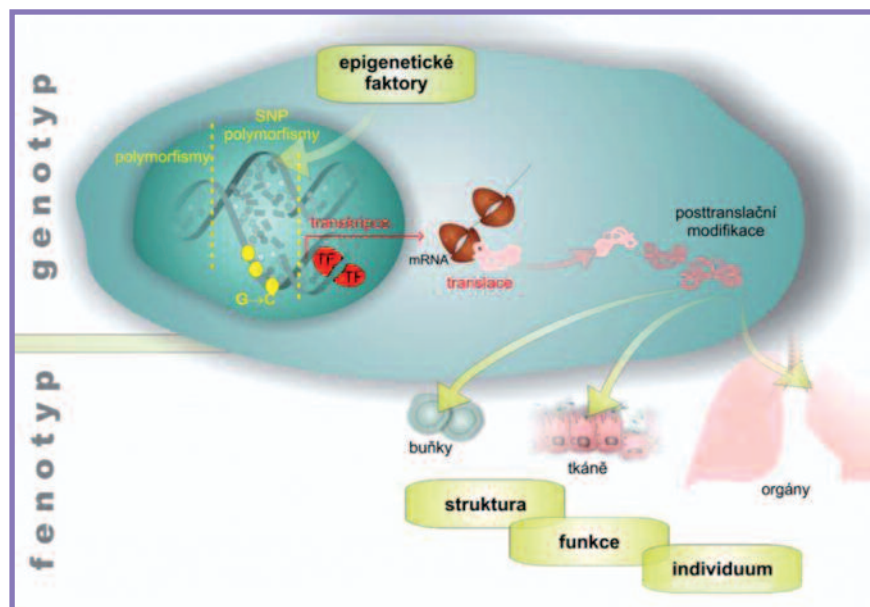
Doufáme, že si v tomto čísle našeho občasníku najdete nějaké zajímavé informace, které jsou jen malým poděkováním za řadu let fungující výbornou spoluprací.

doc. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.



Zaujalo nás v odborném světě

Výživa moduluje imunitu epigenetickými mechanismy

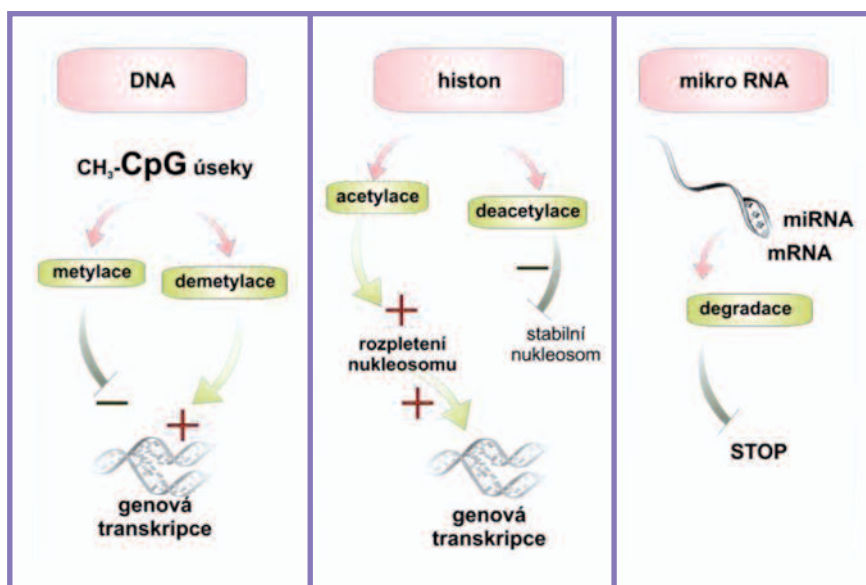


O některých z nich chceme v tomto přehledném sdělení informovat, především v kontextu ovlivnění imunity složkami výživy. Počet funkčních genů člověka je cca 30 000. To je překvapivě málo v porovnání s např. modelovou bakterií *E. coli*, jejíž genom obsahuje cca 3000 genů. Základní zákon genetiky říká, že každý gen kóduje jednu bílkovinu nebo RNA. Bílkoviny však procházejí mnoha posttranslačními modifikacemi, které nakonec zajistí jejich obrovskou funkční flexibilitu nutnou pro fungování člověka. Geny mohou být proměněny nezvratnými změnami, které vedou ke změně nukleotidů (mutace). Tyto změny jsou nezvratné a vedou k funkčním proměnám genových produktů. Epigenetické mechanismy naproti tomu nepůsobí nevratné změny genů. Rozhodují o skutečnosti, zda konkrétní gen bude nebo nebude přepsán. Obě možnosti mohou být pro organismus někdy negativní, jindy pozitivní. Je popsáno mnoho konkrétních molekulárně biologických epigenetických mechanismů. Z nich vybereme pouze tři zásadní.

Ještě donedávna převládal obecný názor, že individuální osud člověka je v největší míře určen jeho genetickou výbavou. Tento názor byl opřen o poznatky klasické genetiky. Malá pozornost byla věnována informacím, že každý jedinec je kromě genetické dispozice významně určován také prostředím, ve kterém se vyvíjí. Po určité době byly představy o jednoznačné genetické danosti do jisté míry i ideologické. V současné době dochází k rychlé změně stávajícího paradigmatu o dominanci genetické dispozice. Vědecké poznatky současnosti totiž umožňují objektivizovat vliv životních podmínek na přepis genů. Vznikl a prudce se rozvíjí nový vědní obor, který označujeme jako epigenetika.

Ze základního výzkumu se poznatky o epigenetice rychle přenášejí do medicíny. Se znalostí epigenetiky můžeme v současnosti vysvětlit řadu jevů, které ovlivňují zdraví člověka a které lékaři v minulosti pozorovali. Jsou spojeny s dobře známými negativními vlivy chemických škodlivin přítomných v tabákovém kouří, ale i ve znečištěném životním prostředí. Možná nejvíce konkrétních informací máme k dispozici v oblasti výživy, která přímo nebo zprostředkovaně epigenetickými mechanismy zásadně ovlivňuje

každého člověka. Vývojově se projevuje v nezvratných krocích, které souvisí s vpečetovacími a programovacími vývojovými uzly. Jsou důkazy, že epigenetické změny jsou přenášeny transgeneračně.



Základní epigenetické mechanismy

Dobře známé fenomény tzv. zdraví podporující výživy nyní můžeme vysvětlit konkrétními epigenetickými mechanismy.

Pro úspěšný přepis genu je nutná demethylace nukleotidů cytosinu a guanosinu v promotorových oblastech genů. Úroveň

metylace/demethylace je enzymaticky regulována a ovlivněna faktory vnějšího světa. Druhým epigenetickým mechanismem je regulováno prostorové uspořádání dvoušroubovice DNA, která je v komplexu s histony. Pro přepis konkrétního genu je nutné, aby se rozvolnily interakce mezi vlákny DNA a histony a vytvořilo se tak místo pro RNA polymerázy přepisující gen do mRNA. Pro rozvolnění je nutná chemická modifikace histonů, která spočívá v acetylaci zajištěné opět enzymaticky a regulované epigeneticky. Konečně třetím epigenetickým mechanismem je tvorba tzv. mikro RNA. Ty jsou komplementární již přepsanému řetězci mRNA. Po vazbě mikro RNA na mRNA jsou vzniklé komplexy degradovány a je tak zabráněno translaci mRNA na ribosomech.

Člověk je ve svém životě počínaje od splnutí pohlavních buněk a vývoje in utero vystaven nespočetnému množství vlivů, které působí kvantitativně a které se navíc kombinují. Tyto vlivy vycházejí z vnějšího i vnitřního prostředí. Ve vnitřním prostředí můžeme připomenout vliv obecně metabolismu, neuroendokrinních regulací, oxidačního stresu, abnormální buněčné smrti, zánětu. Ve vnějším světě zdůrazníme mikrobiální podněty a jejich produkty, xenobiotika, psychický stres. To vše přes převodní páku epigenetických mechanismů ovlivňuje přepis genů.

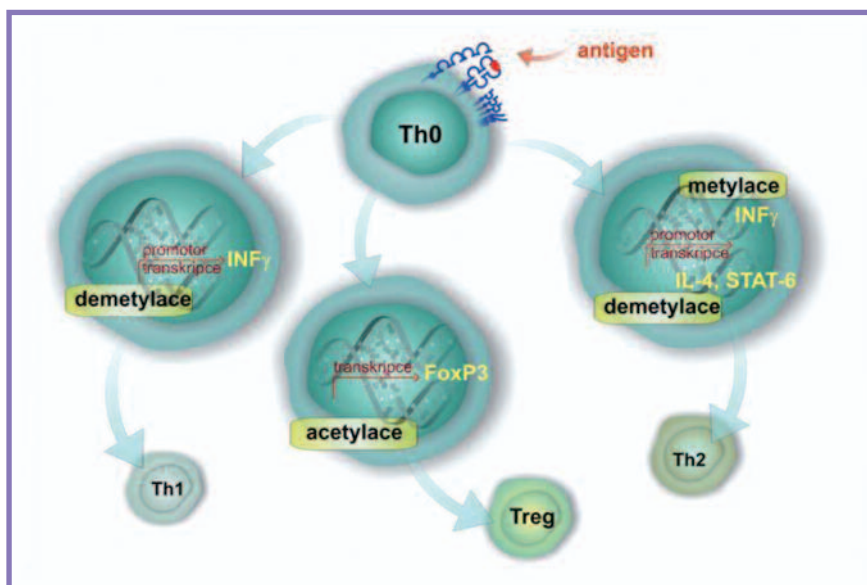
Pro naše úvahy záměrně vybíráme výživu, která podstatnou měrou určuje každého jedince. Jakákoliv nerovnováha ve výživě, ať již kvalitativní nebo kvantitativní, působí epigeneticky. Podstatné informace jsou k dispozici zvláště pro časně ontogenetické období člověka. Pozitivní vliv kojení je obecně akceptován nejenom odbornou veřejností. Až donedávna bylo zdůrazňováno, že v mateřském mléce obsažené prebiotické oligosacharidy jsou nutnou podmínkou pro rozvoj fyziologické střevní mikroflóry. Ta pozitivně moduluje slizniční a systémovou imunitu a do velké míry určuje fyziologickou imunitní reaktivitu jedince. Složitý ekosystém střevní mikrobioty však prokazatelně působí epigenetickými mechanismy a reguluje tak přepis genů, zvláště v epitelových buňkách, ale také v buňkách imunity. Střevní mikrobiota totiž produkuje nepřeberné množství chemických látek a enzymů, které se mohou uplatnit v epigenetických regulacích. Je zdrojem vitamínů (kyselina listová, B2, B6), které se zapojují do metabolismu za

vzniku metylové skupiny, uplatňující se v procesech metylace nukleotidů. Mikrobiální produkty ovlivňují úroveň acetylace histonů, která je významným epigenetickým faktorem rozhodujícím o přepisu genů. Máme k dispozici již dostatek důkazů, které nás opravňují k tvrzení, že střevní mikrobiota zásadně určuje epigenetickými mechanismy individuální charakteristiky každého člověka. Mikrobiota těhotné ženy ovlivňuje programovací procesy plodu s dopady na metabolismus, kognitivní funkce a imunitní reaktivitu. Na místě jsou již úvahy, jak prostřednictvím výživových doporučení pozitivně ovlivnit střevní mikrobiotu těhotných žen a v důsledku pozitivně modulovat vývoj plodu.

Je obecně přijímaným faktem, že střevní mikrobiota kojených dětí pozitivně ovlivňuje jejich individuální imunitní reaktivitu a brání rozvoji alergického zánětu. Alergický zánět je mimo jiné důsledkem nerovnováhy mezi subsety Th1, Th2 a Treg T lymfocytů. Byla publikována studie, která ukazuje, že konzumace nepasterizovaného mléka kojícími ženami vede k demethylaci genu pro FoxP3, který je kritickým transkripčním faktorem nutným pro vyzrání regulačních Treg. Střevní mikrobiota a probiotické mikroorganismy zesilují aktivitu enzymů odpovědných za acetylaci a demethylaci genových oblastí kódujících interferon γ . Tak je zesílena aktivita subsetu Th1, který tlumí Th2 T lymfocyty odpovědné za rozvoj alergického zánětu.

zitivním vlivům vitamínů na člověka jsou nyní popisovány konkrétní epigenetické mechanismy jejich působení. Již jsme zmínili zapojení vitamínů B2, B6 a kyseliny listové do procesů metylace a demethylace genů. Kyselina listová (B9) epigeneticky ovlivňuje subset Treg. V přítomnosti vitamínu B9 jsou aktivovány dráhy nutné pro přežívání a aktivaci Treg. Absence B9 vede k apoptóze Treg T lymfocytů s negativními důsledky na homeostatické regulace zánětu. Zatím málo známý je fakt, že migrace buněk imunitního systému z lymfatických uzlin je významněji než působením chemokinů regulována prostřednictvím gradientu sfingosin fosfátu. Sfinosin fosfát vzniká biotransformací ceramidů prostřednictvím ceramidasy. Gradient sfingosin fosfátu je dynamicky regulován také enzymatickou degradací sfingosin fosfátu působením S1P lyasy a S1P hydrolasy. Právě S1P lyasa vyžaduje pro svoji funkci přítomnost vitamínu B6. Z uvedeného je zřetelné, že vitamín B6 zasahuje významně i do migračních aktivit imunitních buněk a může být proto považován za regulátor imunitní odpovědi.

Zcela unikátní postavení v regulaci zánětu přísluší vitamínu D, dihydroxikalcitriolu. Epigenetickými mechanismy zesiluje bariérové funkce epitelových povrchů, podílí se na tvorbě antibakteriálních peptidů. Významně reguluje obrannou reakci proti intracelulárně parazitickým bakteriím, která je



Epigenetické ovlivnění imunoregulačních subsetů T lymfocytů

Mnoho informací se za desítky let výzkumu nahromadilo v oblasti vlivu vitamínů přijímaných s potravou. K obecně známým po-

určena aktivitou subsetu Th1 T lymfocytů. Jeho relativní nedostatek v potravě, který nemá podstatný vliv na kostní metabolismus,

vede ke ztrátě homeostatických regulací, které mohou ústít v poškozující zánět. V současnosti je tato skutečnost diskutována především v souvislosti s poškozujícím zánětem u nemocných s roztroušenou sklerózou. Dihydrokalciatriol se po průniku do buňky váže na nukleární receptor VDR. Tento komplex slouží jako transkripční faktor. Prokazatelně reguluje expresi 913 genů, které ovlivňují nejenom metabolismus vápníku, ale zasahují do proliferace buněk a významně homeostaticky regulují zánět.

Všechny buněčné struktury těla i makromolekuly jsou permanentně vystaveny oxidačnímu stresu. Hlavním zdrojem oxidačního stresu na úrovni buňky jsou mitochondrie. Procesy oxidační fosforylace, nezbytné pro tvorbu ATP jsou neoddelitelně spojeny s oxidační zátěží. Pokud dojde k narušení fyziologické funkce mitochondrií, oxidační stres je dále akcentován. Samotný oxidační stres je příčinou vzniku a rozvoje zánětové reakce prostřednictvím sestavení inflammasomu a následně tvorby pluripotentních prozánětových cytokinů IL-1 β a IL-18. Oxidační stres je typickým rysem obranné imunitní odpovědi, protože vysoce reaktivní produkty kyslíku vznikají rovněž ve fagocytujících buňkách působením NADPH oxidázy. Evolučně bylo vytvořeno několik systémů, které buňky a struktury těla chrání před negativními dopady oxidačního stresu. Oxidační stres tlumí chemicky různorodé látky, které přijímáme se „zdraví prospěšnou stravou“. V tomto

ohledu nemusíme zdůrazňovat úlohu vitamínu C, ale i dalších vitamínů. Až v nedávné době však byla na molekulární úrovni vysvětlena pozitivní úloha rostlinných látek charakteru polyfenolů v ochraně proti oxidačnímu stresu. Nikdo nepochybuje o zdravotní prospěšnosti polyfenolů přítomných např. v zeleném čaji (katechiny, epigalaktokatechiny), v červeném víně (resveratroly), kurkumě a mnoha dalších, především zbarvených druhích ovoce a zeleniny.

Zásadní úlohu v ochraně buňky před oxidačním stresem sehrává transkripční faktor Nrf2. Ten je v nepřítomnosti oxidačního stresu v komplexu s další cytoplazmatickou bílkovinou, označovanou jako Kelch. Komplex Nrf2-Kelch je ubiquitinován a následně degradován v proteasomu. Úroveň ubiquitinace proteinů obecně je opět regulována epigenetickými mechanismy a slouží tedy jako výrazný regulační faktor. Pokud je v buňce přítomen oxidační stres, transkripční faktor Nrf2 se uvolní z vazby na Kelch a je translokován do jádra buněk. Zde spolu s dalšími regulačními bílkoviny ovládá přepis cca 600 genů, které mají obecně antioxidační, detoxikační, protizáněťové a cytoprotektivní účinky. Transkripční faktor Nrf2 je k této funkci stimulován prostřednictvím jednoduché molekuly dimetylfumarátu, která je v současnosti schválena jako mimořádně účinný lék pro léčbu psoriázy a roztroušené sklerózy. Je velkým překvapením, jak významnou úlohu v poškozujícím zánětu

schrávají faktory související s oxidačním stresem jako příčinou vzniku endogenních signálů poškozování DAMP. Oxidační stres už nemůže být chápán jenom jako následek zánětu. Z uvedeného je zřejmé, že kořeny záněťové reakce budeme muset hledat v samotné patologii buňky, v tomto specifickém případě v patologii mitochondrií.

Právě imunobiologie transkripčního faktoru Nrf2 přinesla konkrétní důkazy, jak působí zdraví prospěšné polyfenoly rostlinného původu přijímané v potravě. Tyto polyfenoly stimulují Nrf2, brání jeho degradaci v proteasomu a zajišťují jeho aktivitu jako transkripčního faktoru s výše naznačenými pozitivními účinky na funkci buňky a také s pozitivními dopady na regulaci záněťové odpovědi.

Je zřejmé, že nyní již máme v medicíně dostatek konkrétních informací, kterými můžeme vysvětlit empiricky odvozená doporučení, spojená především se zdraví prospěšnou stravou. Podrobné poznání, jak vnější i vnitřní svět prostřednictvím epigenetických mechanismů určuje individuální zdraví, jistě již v blízké budoucnosti umožní vypracování takových doporučení a postupů, které budou působit významně preventivně proti vzniku nemocí. Možná již nastává doba, kdy se lékař více než diagnostice a léčbě nemocí bude už moci efektivně věnovat jejich prevenci.

prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.

Ilustrace: Hana Kotlandová

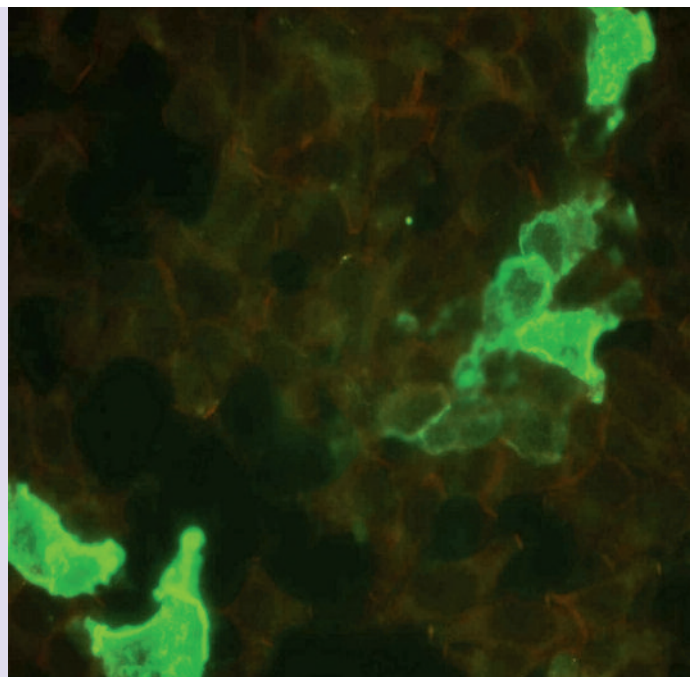
Kvíz

Na fotografii preparátu vidíte výsledek imunofluorescenčního stanovení autoprotilátek třídy IgG.

Imunofluorescenční nález odpovídá:

1. přítomnosti autoprotilátek proti bazální membráně glomerulů (GBM)
2. přítomnosti autoprotilátek proti parietálním buňkám žaludku (APCA)
3. přítomnosti autoprotilátek proti receptoru pro fosfolipázu A2 (PLA2R)

(Správnou odpověď najdete na str. 7-8)



Nabízíme nová vyšetření

Alergenní molekuly – nový trend v diagnostice alergií

Tradiční diagnostické testy, jako je skin prick test nebo *in vitro* stanovení specifického IgE (sIgE), využívají alergenové extrakty. Ty obsahují směs alergenních i nealergenních molekul získaných extrakcí z alergenového zdroje, kterým mohou být různé biologické materiály např. potraviny, pyl, roztoči.

Molekulární diagnostika alergií (MA), používá se také termín komponentová diagnostika, mapuje senzibilizaci pacientů na molekulární úrovni. Komponentová diagnostika pro stanovení sIgE využívá rekombinantní nebo nativní, purifikované alergenní molekuly (alergenní komponenty), jedná se o proteiny nebo glykoproteiny. V současné době je pro *in vitro* testování specifických IgE komerčně dostupných více než 100 alergenních komponent. Rozsáhlá databáze známých alergenních komponent je dostupná na www.allergen.org, jejich označení pochází z latinského názvu alergenového zdroje např. **Phl p1** je odvozeno od *Phleum pratense* (bojínek luční). Číslo je k názvu přidáno pro odlišení různých alergenních komponent jednoho druhu.

Komponentová diagnostika může poskytnout alergologům relevantní informace, které nelze získat z tradičních diagnostických testů. Hraje důležitou roli ve třech aspektech diagnózy alergie: 1) vysvětlení křížové reaktivity (rozlišení skutečné senzibilizace na určitý alergenový zdroj od senzibilizace způsobené křížově reagujícími IgE protilátkami), 2) výběr pacientů a vhodných alergenů pro alergenovou imunoterapii (AIT) a 3) odhad rizika systémové reakce.

1) Vysvětlení křížové reaktivity

MA má možnost rozlišit skutečnou senzibilizaci na určitý alergenový zdroj od senzibilizace v důsledku křížové reaktivity. Alergenní molekuly jsou

podle své struktury a biologické funkce zařazeny do proteinových rodin. Proteiny v rámci jedné proteinové rodiny sdílejí společné epitopy



a stejné IgE protilátky se mohou tedy vázat na podobné struktury přítomné v alergenech z různých alergenních zdrojů, příbuzných i nepříbuzných druhů. Mezi běžně se vyskytující rodiny křížově reagujících proteinů patří: zásobní proteiny, LTP (lipid transfer proteins), tropomyosiny, lipocaliny, parvalbuminy, sérové albuminy, PR-10 proteiny (pathogenesis-related 10 proteins), polcalciny a profiliny. Členové některých proteinových rodin vykazují vysoký stupeň křížové reaktivity, v rámci některých rodin je křížová reaktivita variabilní. Tyto křížově reagující alergenní molekuly dávají hodnotnou informaci o možné senzibilizaci a klinické reakci na různé alergenové zdroje. Příkladem křížově reagujících molekul pylů trav jsou komponenty Phl p7 (polcalciny) a Phl p12 (profiliny). Členové obou rodin se vyskytují v pylech trav, stromů a plevelů. Profiliny se navíc objevují v potravinách rostlinného původu a v latexu. Jedná se o vedlejší alergeny pylů trav, senzibilizace na tyto molekuly se vyskytuje u méně než 20% pacientů senzibilizovaných na pyl trav. Pozitivní IgE odpověď pouze na tyto křížově reagující komponenty ukazuje, že primární senzibilizace není způsobena pyly trav. Je potřebné další testování

specifických komponent pylů a potravin, které identifikuje skutečný zdroj senzibilizace. MA má tedy možnost vysvětlit křížovou reaktivitu IgE protilátek způsobenou sekvenční homologii proteinů, rovněž tak má potenciál vysvětlit křížovou reaktivitu v důsledku přítomnosti CCD determinant (křížově reagující sacharidové determinanty glykoproteinů). Dvojitá pozitivita na včelí a vosí jed při testování alergenních extraktů může být způsobena skutečnou senzibilizací na oba jedy nebo se může objevit v důsledku křížové reaktivity IgE protilátek s CCD determinanty. Použití komponent (bez CCD determinant) specifických pro včelu a vosu rozliší, zda se jedná o skutečnou dvojitou pozitivitu na včelí a vosí jed nebo zda jde o projev křížové reaktivity způsobené CCD determinanty.

2) Alergenová imunoterapie

Vzhledem k tomu, že AIT je nákladnou léčbou, léčba trvá většinou 3-5 let, správná diagnóza, výběr vhodných pacientů a identifikace skutečného senzibilizujícího alergenu jsou důležité pro optimální a finančně efektivní léčbu. MA poskytuje užitečný nástroj pro rozlišení druhově specifických alergenních molekul od křížově reagujících. Může tedy zlepšit výběr vhodných pacientů a specifických alergenů pro AIT inhalačních alergií a alergií na jedy blanokřídlého hmyzu. V současné době jsou stanoveny specifické alergenní komponenty pro různé alergenové zdroje. Příkladem specifických komponent pylu *Phleum pratense* (bojíneku lučního) a dalších trav jsou molekuly Phl p1 a Phl p5b, způsobují tzv. skutečnou senzibilizaci na pyl trav. Jedná se o hlavní alergeny pylů trav, více než 90% pacientů senzibilizovaných na pyl trav má protilátky proti Phl p1 a/nebo Phl p5b. Zvýšené hladiny IgE protilátek proti těmto komponentám ukazují na skutečnou

senzibilizaci na pyl trav. AIT pylem trav je v tomto případě vhodná. Pacienti senzibilizovaní na specifické alergenní komponenty mají příznivější výsledek AIT, než pacienti senzibilizovaní pouze na křížově reagující komponenty.

3) Odhad rizika systémové reakce

MA má schopnost odhadnutí závažnosti reakce, zvláště pro potravinové alergie. Různé potraviny obsahují jedinečné alergenní molekuly, které jsou stabilní nebo labilní vůči teplu a trávicím enzymům. Stabilita alergenní molekuly a pacientova anamnéza pomáhají klinikovi vyhodnotit riziko reakce: systémová versus místní. Labilní alergeny jsou spojeny s lokální reakcí (obvykle orální alergický syndrom), vařené jídlo je často tolerováno. Stabilní alergeny bývají spojeny kromě lokální reakce také se systémovou reakcí. Nicméně je potřeba poznamenat, že informace týkající se odhadu typu reakce mohou být využity jen u těch populací, které byly podrobně prostudovány. Je známo, že potravinový a inhalační profil senzibilizace se liší podle geografické oblasti. Příkladem odhadu typu reakce může být senzibilizace pacientů na komponentu Ara h2 (zásobní proteiny). Tato komponenta je považována za znak skutečné senzibilizace na arašíd, může indukovat závažné

systémové reakce. Komponenta Ara h2 (PR-10 proteiny) je znakem křížové



reaktivity mezi potravinovými alergeny a pyly stromů řádu *Fagales* (bukotvaré). Senzibilizace na tuto komponentu je asociována s mírnou orální reakcí. Senzibilizace na LTP nebo zásobní proteiny může vyvolat závažné systémové reakce, zatímco CCD a PR-10 proteiny jsou u potravinové alergie obecně asociovány s mírnou lokální reakcí.

Přítomnost sIgE proti alergenním komponentám může být stanovena singleplexní nebo multiplexní analýzou. Singleplexní analýza umožňuje lékaři vybrat pro stanovení správné diagnózy konkrétní alergenní komponenty na základě anamnézy pacienta. V každém testu této analýzy se vyšetří protilátka proti jedné komponentě. Pro singleplexní přístup stanovení sIgE proti komponentám

je dostupných několik analyzátorů (např. ImmunoCAP). Multiplexní analýza umožňuje charakterizaci sIgE odpovědi proti širokému spektru alergenů umístěných na testovacím čipu, nezávisle na anamnéze pacienta. V současné době je na trhu jeden multiplexní analyzátor ISAC (Immuno-Solid Phase Allergen Chip), který obsahuje více než 100 alergenů z více než 50 alergenních zdrojů. Velký počet alergenů poskytuje rozsáhlé informace o profilu senzibilizace pacienta. V literatuře jsou uvedeny srovnávací data pouze pro ImmunoCAP a ISAC. Výsledky získané ISAC analýzou jsou udávány semikvantitativně na rozdíl od kvantitativního vyjádření výsledků analyzátozem ImmunoCAP. Při nízkých koncentracích sIgE je ImmunoCAP citlivější než ISAC. Výhody a nedostatky obou technik stanovení sIgE jsou shrnuty v tabulce. Záleží na volbě lékaře, zda se rozhodne v rámci komponentové diagnostiky využít singleplexní nebo multiplexní přístup.

Molekulární diagnostika představuje bezesporu vysoký přínos pro klinickou praxi, přesto zůstává ještě řada úkolů, které je nutné v této oblasti řešit. Je potřeba provést multicentrické studie, které definují další kategorie pacientů, pro něž je MA prospěšná. V různých zdrojích alergenů musí být identifikovány a definovány klinicky významné alergenní molekuly. Ekonomické studie by měly zhodnotit

Výhody a nedostatky analýzy ISAC a ImmunoCAP

	výhody	nedostatky
ISAC (multiplex)	<ul style="list-style-type: none"> • 30 ul séra nebo plazmy (kapilární nebo žilní krev) na test • v testu se vyšetří 112 alergenů paralelně • nativní a rekombinantní proteiny • pro test je potřeba menší množství alergenů 	<ul style="list-style-type: none"> • manuální metoda • semikvantitativní test • menší senzitivita • větší variabilita v inter-assay analýze pro určité alergeny • větší variační koeficient • některé zdroje alergenů nejsou zahrnuty • potenciální interference mezi IgE a dalšími izotypy, hlavně IgG
ImmunoCAP (singleplex)	<ul style="list-style-type: none"> • automatická metoda • kvantitativní test • vysoká senzitivita • nižší variační koeficient • nativní a rekombinantní proteiny nebo alergenové extrakty a jejich směsi 	<ul style="list-style-type: none"> • 40 ul séra na alergen • jeden test – jeden alergen • detekuje nízko afinitní protilátka, které mohou mít malý nebo žádný klinický význam

náklady a efektivnost MA. Jsou potřebné vzdělávací programy týkající se použití a interpretace této diagnostiky.

Současné doporučení týkající se diagnostiky v alergologii navrhuje jako první linii přístupu důkladné klinické vyšetření, testy využívající alergenový extrakt (skin prick testy nebo *in vitro* stanovení sIgE) jako druhou linii přístupu a jako třetí krok komponentovou diagnostiku. Pro zkušené uživatele může být molekulární diagnostika zahrnuta do druhé linie. Molekulární diagnostika

alergií je nový a komplexní postup, který bude v blízké budoucnosti představovat standardní nástroj alergologa.

Naše laboratoř nabízí molekulární diagnostiku od ledna letošního roku. Pro testování jsme zvolili single-plexní analýzu na přístroji Immuno-CAP firmy Thermo Fisher Scientific.

RNDr. Kamila Koupilová, Ph.D.

Literatura

Canonica et. al. A WAO – ARIA – GA2 LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organization Journal* 2013 6: 17
www.waojournal.org/content/6/1/17



Máte zájem o rychlý internetový přístup k výsledkům laboratoře?

Laboratoř Interimun Pardubice nabízí spolupracujícím lékařům přístup do databáze výsledků pomocí programu WebLIMS pardubické firmy Stapro.

Program vám umožní:

- Náhled do kompletní databáze laboratoře od roku 2003
- Přístup přes internet odkudkoli (<https://weblims.interimun.cz/weblims>)
- Uvidíte přehledný kumulativní nález pacienta (změny výsledků v čase)
- Zobrazí se i vyšetření požadovaná jiným lékařem
- Program umožňuje tisk výsledkového listu totožného s výstupem posílaným z laboratoře (ve formátu pdf)
- Výsledky jsou k dispozici rychleji, v okamžiku jejich potvrzení laboratoří
- Lze zde vyplnit elektronickou žádanku o vyšetření, s veškerými výhodami elektronického vyplňování formulářů.

Program má jednoduché intuitivní ovládání. Jeho možnosti vám můžeme předvést přímo na vašem pracovišti.

Používání programu bude pro vás zdarma, náklady jsou na straně laboratoře.

Zájemce prosíme, kontaktujte nás na adrese: interimun@interimun.cz.

Řešení kvízu ze str. 4

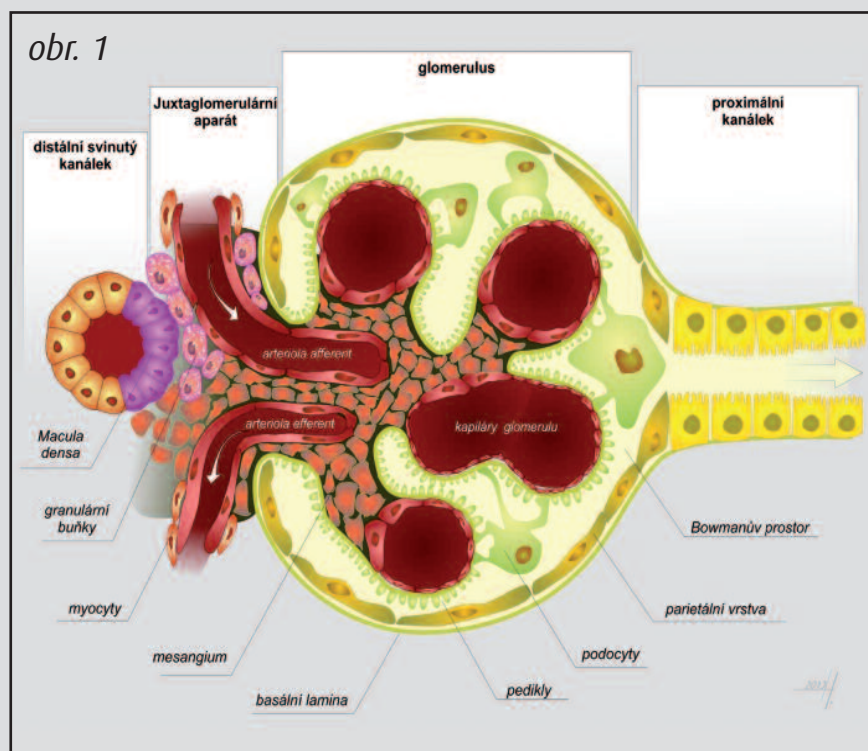
Správná odpověď zní: 3. Protilátky proti receptoru pro fosfolipázu A2 - (obr. 1 na str. 8)

Protilátky proti receptoru pro fosfolipázu A2 představují významný marker idiopatické membranózní nefropatie. Membranózní nefropatie je nejčastější příčinou nefrotického syndromu v dospělém věku. Idiopatická membranózní nefropatie (MN) je definována histologicky ztlustěním glomerulární bazální membrány a depozicí imunokomplexů mezi glomerulární bazální membránou a podocyty. Patogeneze tohoto onemocnění byla dlouho neznámá. Nedávno bylo prokázáno, že hlavním antigenem, proti němuž jsou tvořeny antipodocytární autoprotilátky je M typ receptoru pro fosfolipázu A2. Tento typ protilátek je pro dané onemocnění vysoce specifický.

Jsou nalézány až u 70% pacientů s idiopatickou membranózní nefropatií. Pacienti s vysokými titry protilátek mají horší prognózu.

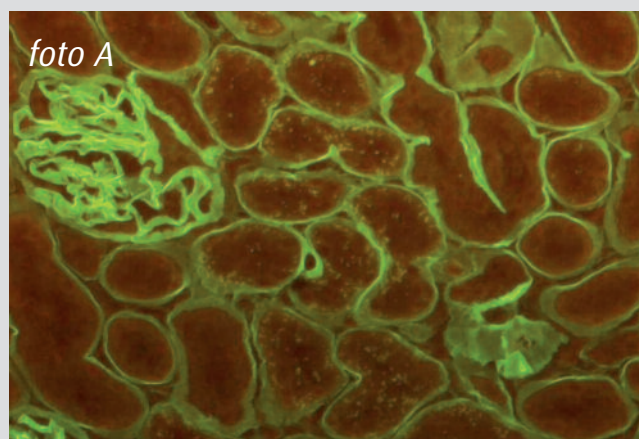
Receptor pro fosfolipázu A2 (PLA2R) je transmembránový protein exprimovaný na lidských podocytech. Podocyty jsou ploché buňky nepravidelných tvarů tvořících výběžky obrůstající stěny kapilár v Bowmanově váčku jako cytoplazmatické výběžky - pedikly. Tvoří tak vnitřní list Bowmanova váčku. Podocyty se vyznačují vysokou anaboličnou a kataboličnou činností, o čemž svědčí vysoká hustota organel v jejich cytoplazmě.

Fosfolipázy hrají roli v procesu uvolnění kyseliny arachidonové z membránových lipidů a její metabolizaci na prostaglandiny. Jsou secernovány do cirkulace, kde modifikují LDL a podílí se na aktivaci systému renin-angiotensin-aldosteron. Jsou považovány za významného činitele v procesu zánětu a aterosklerózy. M typ receptoru působí jako inhibitor jejich funkce. Má tedy účinky protizánětlivé. Autoprotilátky proti tomuto typu receptoru inhibují jeho funkci, dochází k aktivaci zánětu. Význam jejich stanovení spočívá v možnosti stanovit diagnózu MN bez renální biopsie, v odlišení idiopatické



MN od symptomatické MN (SLE, kolagenózy, nádory, hepatitida B apod.).

Diagnostika glomerulonefritidy byla prakticky výhradně založena na histologii, monitorování průběhu choroby spočívalo v hodnocení proteinurie, erytrocyturie a sérového kreatininu. S rozvojem poznatků o patogenezi renálních onemocnění význam imunologického vyšetření stoupá i v oblastech, kde byla sice úloha imunitního systému dlouho předpokládána, ale toto vyšetření donedávna nebylo rutinní součástí péče o nemocné. Zavedení stanovení protilátek proti PLA2R může mít zásadní význam pro diagnostiku, monitorování průběhu choroby a sledování efektivity léčby. Stanovení přítomnosti autoprotilátek v séru se provádí metodou nepřímé imunofluorescence. Jako substrát slouží kultura transfekovaných buněk lidských embryonálních ledvin. V případě pozitivity je přítomna jemná granulární fluorescence cytoplasmy těchto buněk.



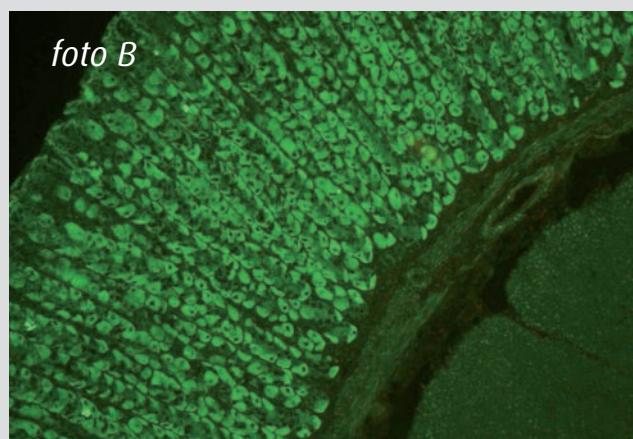
Protilátky proti bazální membráně glomerulů – foto A

Autoprotilátky třídy IgG proti bazální membráně glomerulů (GBM) jsou charakteristickým markerem pro Goodpastureův syndrom. Jde o vzácný syndrom s incidencí 1 nemocný na milion obyvatel za rok. Častěji jsou postiženi muži, hlavně mezi 20. a 30. rokem, další vlna mezi 60. a 70. rokem života. Základními klinickými projevy je rychle postupující glomerulonefritida a u dvou třetin pacientů také krvácení do plic. Onemocnění se může vyvinout perakutně, během několika dnů, nebo pomaleji, v průběhu několika měsíců. V časných fázích je poškození ledvin zjištělné mikroskopickou hematurií a malou proteinurií a obvykle velmi rychle postupuje až do selhání ledvin. U pacientů lze téměř vždy prokázat anti-GBM autoprotilátky typu IgG1, jejich titr souvisí se

závažností nefritidy. Antigenní epitopy se nachází na kolagenu IV. typu, který je složen ze tří řetězců a lobulární domény na C-terminální konci. Kolagen IV je základní strukturální molekulou bazální membrány glomerulů, plicních kapilár, řetězec alfa 3 kolagenu IV se vyskytuje také ve středním uchu, některých částech oka, plexus choroideus. Na imunofluorescenčním preparátu lze v pozitivních případech prokázat lineární homogenní fluorescenci bazální membrány.

Protilátky proti parietálním buňkám žaludku (APCA) – foto B

APCA se váží na struktury parietálních buněk a mohou inhibovat jejich funkci. Tvoří je heterogenní skupina protilátek: APCA reagující s mikrozómy parietálních buněk (klasické APCA - namířené proti gastrické protonové pumpě) a APCA reagující s povrchem parietálních



buněk. Autoprotilátky proti parietálním buňkám jsou především namířeny proti H⁺/K⁺ ATP-ázové pumpě, odpovědné za transport kationtů přes membránu parietálních buněk. Test je využíván v diagnostice perniciózní anémie. Vyznačuje se vysokou senzitivitou. V okamžiku stanovení diagnózy lze tyto protilátky nalézt u 80-90% pacientů. U pacientů s touto diagnózou se často přidružuje výskyt dalších autoprotilátek. Vysoká prevalence APCA je prokázána u pacientů s endokrinními poruchami. APCA se mohou vyskytovat až u 15% zdravých osob starších šedesáti let a u 2% dospělých zdravé populace. K průkazu se využívají řezy opičího žaludku, kde v pozitivních případech sledujeme zrnitou fluorescenci parietálních buněk.

RNDr. Marcela Drahošová,
Ilustrace: Hana Kotlandová