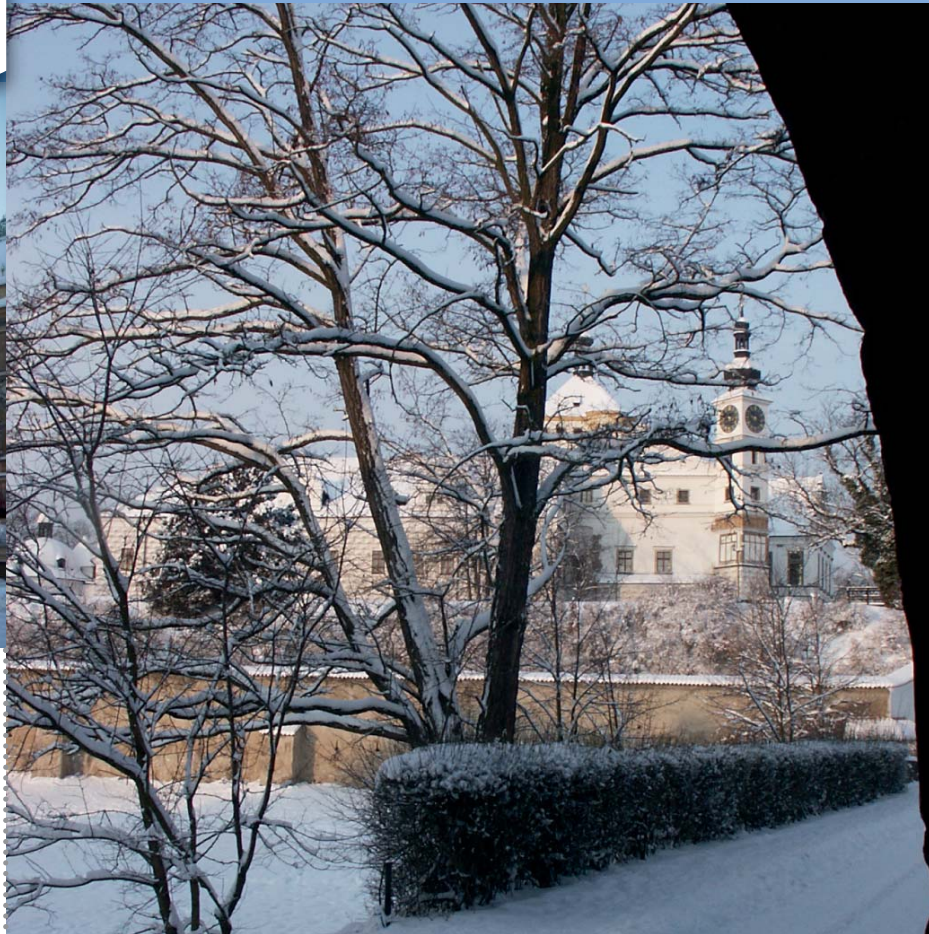


Ad informandum

Informační občasník laboratoře Interimun Pardubice

PROSINEC / 2011



V tomto čísle naleznete:

Zamyšlení nad postvakcinačními protilátkami

ANCA PR3 nově a lépe
Burst test inovován

Kvíz: Poznejte obraz ANF

Letošní Nobelova cena zamířila do imunologie

Tip na výlet: Vraclav

Vánoční inspirace z kuchyně M. D. Rettigové

Rok se s rokem sešel

Úvodní slovo MUDr. Tomáše Sýkory:

Rok se s rokem sešel a opětovně budeme vyhlížet nový rok a bilancovat ten starý. Mnozí budou v obavách, co následující rok plný očekávaných změn přinese. Bude horší nebo lepší než ten současný? Ustojíme všechny změny? Máme se tím zabývat, když nám v konci následujícího roku slibují konec světa? Nyní, v době předvánoční, chcete-li adventní, máme opět příležitost se ztišit, zamýšlet se a očekávat velké vánoční tajemství, tak jak to dělaly po stovky let generace před námi. Máme i možnost toulat se po rozzářených obrovských obchodních centrech, nakupovat věci, které vlastně nepotřebujeme a ze kterých nikdo už ani nemá radost a nebo ji má jen malou chvíli.

My nyní zase po roce přicházíme za vámi s občasníkem laboratoře Interimun. Rádi bychom, aby vám udělal alespoň malou radost a na malou chvíli vám přinesl úlevu od předvánočního shonu. Proto nepřinášíme pouze informace z oboru imunologie a alergologie, ale i něco navíc... Přejeme požehnané Vánoce a v novém roce 2012 zdraví, spokojenost v osobním i pracovním životě. Máme i hodně neskromné přání, abychom vám pro vaše pacienty vždy platně mohli pomáhat poznávat tajemství jejich choroby a naší prací vám umožňovali úspěšně plnit vaše poslání.

MUDr. Tomáš Sýkora

Prostor pro hosta: Postvakcinační protilátky

Úskalí ověření účinnosti vakcinace pomocí stanovení protilátek

V praxi používané očkování spolehlivě vyvolává u většiny očkovaných dostatečnou imunitní odpověď, jejímž snadno měřitelným obrazem je zvýšení hladin specifických protilátek.

U některých očkování, jako je očkování proti tetanu, záškrtu, klíšťové encefalitidě, virové hepatitidě typu B, zarděnkám či spalničkám, existuje vztah mezi hladinami protilátek a funkční postvakcinační ochranou. Tato korelace dosud nebyla prokázána - a možná tomu bude i v budoucnu - u očkování proti dávivému kašli, příušnicím, choleře nebo papilomavírovým nálezům. Příčinou je skutečnost, že protilátková odpověď se na postvakcinační ochraně podílí jen zčásti. Zatím schází dostatek poznatků o buněčné imunitě stimulované očkováním. Příkladem může být nejnovější průkaz paměťových B lymfocytů tvořících IgA protilátky specifické vůči dávivému kašli, které jsou stimulované buď přirozenou infekcí nebo očkováním celobuněčnou vakcínou, avšak schází po očkování acelulární vakcínou. To by napomáhalo vysvětlit horší protektivní účinek po očkování acelulární vakcínou, přestože specifických IgG protilátek tento typ vakcíny indukuje dostatek.

Naštěstí u těch očkování, kde známe korelaci či vztah mezi ochrannou a minimální séroprotektivní hladinou protilátek, lze využívat sérologické vyšetření pro hodnocení kvality bezprostřední či dlouhodobé postvakcinační imunity. V takovém případě se obvykle průkaz specifických protilátek v séru provádí minimálně 4 týdny po očkování. Lepší výsledek lze očekávat až 2 měsíce po něm. Ověření se relativně často používá u očkování proti tetanu nebo klíšťové encefalitidě, provedeného v minulosti.

Pokud došlo k překročení časového limitu pro aplikaci posilující dávky, běžně se v praxi stává, že lékař před očkováním nechá provést sérologické ověření množství protilátek, na základě něhož se následně rozhoduje pro podání jedné posilující (tzv. booster) dávky nebo kompletního očko-

vání od počátku vícero dávkami. Tento postup je možný, nicméně není ekonomický a někdy se může stát až nebezpečným. Sérologické výsledky před očkováním mohou totiž potvrzovat nízké hladiny protilátek, což vede k opakování celého očkování od počátku. Díky první dávce, kterou očkovanec dobře toleruje, může dojít k masivní obnově protilátkové odpovědi v důsledku stále přetrvávající imunologické paměti. Každé další následné očkování v rámci opakované primovakcinace může vést ke vzniku imunokomplexů z obnovených protilátek s nově podaným vakcinačním antigenem. Tím se zvyšuje riziko reakcí přecitlivělosti 2. a 3. typu. Relativně častým pozorovaným jevem se tak stává snížená tolerance následného očkování. Tomu lze předejít vhodnější volbou načasování sérologického vyšetření, jeho provedením nikoli před očkováním, ale naopak po něm.

Bylo-li nové posilující očkování promeškáno o více než 10 let než je řádné doporučení (legislativa či výrobce), stává se dokonce nutné sérologické ověření provadět déle než 6 měsíců po novém posilujícím očkování. Důvodem je to, že časná sérologie neprozradí, zda nové očkování se chová jako první dávka opakované primovakcinace nebo jako posilující dávka. Je-li výsledek takového

pozdní sérologie pozitivní, je zcela jisté, že v minulosti indukovaná imunologická paměť bohatě přetrvala do aktuální doby a provedenou imunizaci lze bezpečně hodnotit jako řádné posilující očkování. V opačném případě je třeba dokončit opakovanou primovakcinaci podáním zbývajících dávek.

Sérologické vyšetření specifických protilátek před očkováním lze vhodně využívat u těch osob, pro které je zamýšlené očkování hůře tolerované (osobní anamnéza předešlého očkování), nebo existuje předpoklad, že by na něj nemuseli dostatečně odpovídat (obvykle aktuální imunosupresivní léčba, či imunodeficiencie). Výsledky předvakcinační sérologie pomáhají v praxi pro plánované odložení očkování o několik měsíců až rok v kontextu aktuálního zdravotního stavu jednotlivce, či určení jeho vnímavosti k příslušné infekci.

Sérologické vyšetření specifických protilátek lze využívat nejen pro ověření postvakcinační imunity, ale také pro zhodnocení vhodnosti voleného očkování, nebo ke zodpovězení otázky, zda aktuální očkování působilo jako posilující dávka nebo opakovaná primovakcinace.

Materiál byl vyžádán od RNDr. Marka Petráše.

Změny v laboratorních metodách

Provádíme stanovení ANCA protilátek proti PR3 testem nové generace

V první polovině roku 2011 jsme v laboratoři Interimun Pardubice začali pro stanovení ANCA protilátek proti proteináze 3 (PR3) používat ELISA test nové generace. Obsahuje antigen PR3 vázaný na destičku přes kotvící molekulu. Díky ní je proteináza 3 v testu prezentována v nativní konformaci. Navýšila se tak citlivost testu, protože nyní test detekuje i diagnosticky významné protilátky proti konformačním

epitopům proteinázy. Kotvící protein navíc proteinázu udržuje v prostoru tak, aby všechny relevantní epitopy byly maximálně přístupné vazbě ANCA protilátek z testovaného séra.

Protilátky proti proteináze 3 jsou vysoce specifické (>95%) pro Wegenerovu granulomatózu. Méně často jsou nacházeny u jiných systémových vaskulitid (mikrosko-

pická polyangiitida, syndrom Churg-Strausové). Byly popsány i u osob s poškozením nosní přepážky v důsledku užívání kokainu, vzácně i u pacientů s infekčními onemocněními. Citlivost stanovení protilátek proti PR3 v diagnostice vaskulitid závisí na stadiu a aktivitě onemocnění.

Vyšetření je indikováno:

- jako součást algoritmu ANCA imuno-fluorescence/ ANCA ELISA* u pacientů s podezřením na systémovou vaskulitidu
- jako součást algoritmu ANCA imuno-fluorescence/ ANCA ELISA* v diferenciální diagnostice příčin akutního renálního selhání

• k monitorování pacientů s ANCA PR3 pozitivní vaskulitidou (sledování odpovědi na terapii, časná předpověď relapsu)

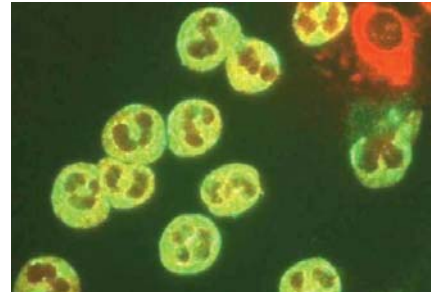
* Protilátky proti PR3 obvykle dávají obraz cytoplazmatické (c-ANCA) fluorescence. Mohou být ale nalezeny i u pacientů s atypickou nebo perinukleární (p-ANCA) imuno-fluorescencí a u pacientů s negativitou ANCA imunofluorescenčního testu.

ANCA PR3 ELISA má výsledky vyjádřené kvantitativně. Hranice positivity se s přechodem na test nové generace posunula z původních 5 U/ml na 10 U/ml.

Pozn.: Optimální algoritmus použití jednotlivých metod stanovení ANCA protilátek je v současné době celosvětově diskutováno.

Metodické doporučení Sekce laboratorní imunologie ČSAKI pro Českou republiku bude publikováno v prvním čísle časopisu Alergie 2012.

PharmDr. Jana Havlasová, PhD.



c-ANCA fluorescence na lidských granulocytech (fixace etanolem)

Kvíz

Na obou fotografiích mikroskopického preparátu vidíte výsledek imunofluorescenčního vyšetření protilátek proti jádru buňky (ANF, ANA). Stanovení těchto autoprotilátek je možné provést v séru, plazmě a jiných materiálech, např. ve výpotku. Jako substrát pro jejich stanovení je užívána lidská buněčná kultura buněk karcinomu hrtanu „HEP-2“. Tyto buňky se vyznačují svou velikostí a schopností porůstat mikroskopické podložní sklíčko jednou vrstvou. Díky jejich velikosti, resp. velikosti jádra, lze pozorovat nejen jádro, ale i struktury uvnitř jádra a celou řadu organel v cytoplasmě. Fluorescenční obraz je velmi rozmanitý, nález může být asociován s konkrétním onemocněním. Výsledky jsou vyjádřeny kvalitativně pomocí křížů, lze však na požádání stanovit titr. Test patří mezi základní screeningová vyšetření při podezření na systémové autoimunitní onemocnění.

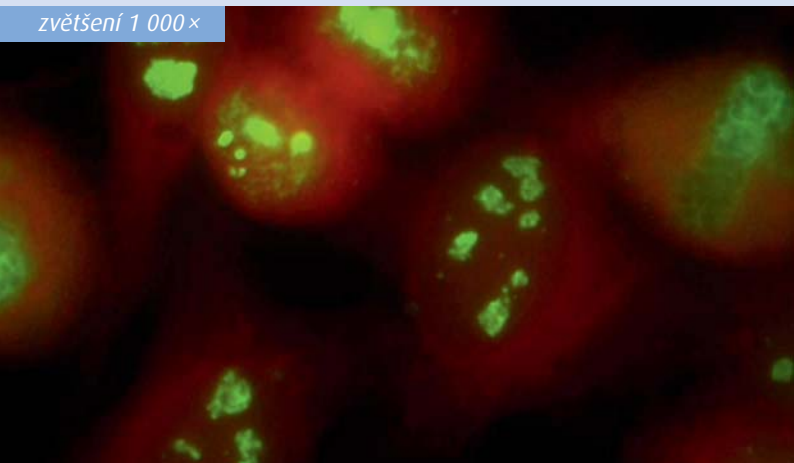
ANA protilátky mohou předcházet klinické manifestaci, mohou ji doprovázet (i u neautoimunitních onemocnění, např. infekcí), mohou přetrvávat po klinicky manifestním onemocnění (i u neautoimunitních chorob) a mohou existovat i u zdravých osob.

Imunofluorescenční nález na obou obrázcích (zvětšení 1 000× a 400×) odpovídá:

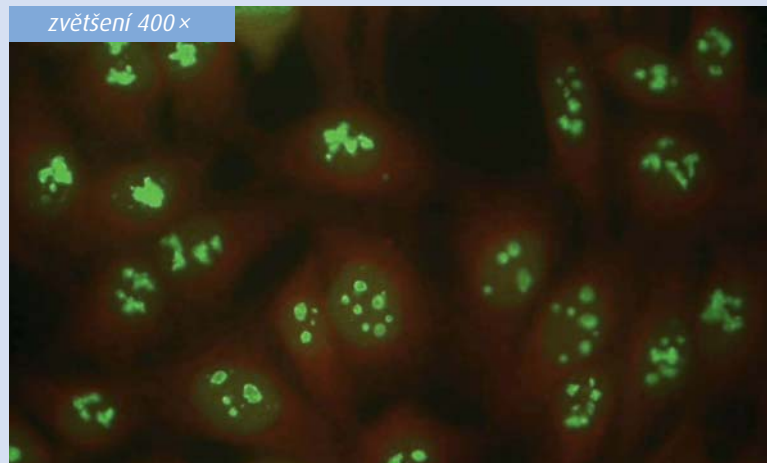
1. přítomnosti protilátek proti jádru, typ „homogenní jádro“
2. přítomnosti protilátek proti jádru, typ „zrnité jádro“
3. přítomnosti protilátek proti centromerovým antigenům

(Správnou odpověď najdete na str. 6)

zvětšení 1 000×



zvětšení 400×



Zaujalo nás v odborném světě

Signály nebezpečí, jejich identifikace a iniciace zánětové odpovědi

Nobelova cena za lékařství letos opět udělena za objevy v oblasti imunologie

Pokud by bylo možné poměřovat význam vědních oborů pouze počtem Nobelových cen, které byly uděleny za objevy v dané oblasti, patřila by imunologie nepochybně mezi nejpřednější. Není bez zajímavosti, že již první Nobelova cena za fyziologii nebo lékařství byla udělena v roce 1901 Emilu von Behringovi za objevy v protilátkové imunitě. Výčet dalších Nobelových cen pro imunologii je impozantní. Každá z nich představuje ocenění práce, která znamenala fundamentální přínos nejen pro imunologii, ale i pro vědu o živé přírodě jako celku. Nepochybně stejně lze hodnotit letošní rozhodnutí Nobelova výboru při Karolinske Institute ve švédském Stockholmu. Ten se rozhodl udělit letošní Nobelovu cenu za fyziologii nebo lékařství třem vědcům, kteří zásadním způsobem přispěli k vytvoření nového paradigmatu, který velmi pravděpodobně bude na dlouhou dobu určovat naše chápání, jak obranné reakce organismu fungují.

Je pozoruhodné, jak letošní nobelisté postupně naplnili vize vědců, kteří se koncem 80. a začátkem 90. let nespokojili s tehdejšími popisy fungování imunitního systému, který zdůrazňoval především úlohu specifické imunity. Zde stojí zato připomenout americkou imunoložku Polly Matzinger, která formulovala hypotézu, že v těle člověka vznikají nebezpečné situace, na které musí tělo reagovat. Je velmi pravděpodobné, že pouze předčasná smrt zneškodnila Charlesovi Janewayovi stát po boku letošních laureátů. Byl to právě on, který počátkem 90. let vyjádřil názor, že musí existovat receptory, které budou schopny identifikovat signály nebezpečí, tj. všechny situace, které narušují homeostázu, a odlišit je od bezpečných signálů (vzorů), které homeostázu nenaruší. Přítomnost signálů nebezpečí je pak důvodem pro rozvoj komplexní zánětové reakce. Prof. Hoffmann, první z letošních laureátů, prokázal při experimentální práci na modelu *Drosophila melanogaster*, že receptory označované Toll, původně objevené jako struktury, které regulují embryonální vývoj drozofil, sehrávají ještě zá-

sadnější úlohu jako senzory mikrobiálních nebezpečných vzorů. Existenci receptorů, které jsou strukturně prakticky identické s receptory Toll drozofil, našel na savcím myším modelu další laureát, prof. Beutler, a označil je jako receptory TLR. Brzy se ukázalo, že receptory nebezpečných vzorů označované obecně jako receptory PRR, jsou typicky vyjádřeny na buňkách vrozené imunity i u člověka.

Mezi funkčně nejvýznamnější buňky, které jsou strategicky rozmístěny ve všech tkáních člověka, patří tzv. dendritické buňky. Za objev dendritických buněk a poznání jejich funkce je odměněn jako třetí laureát profesor Ralph Steinman. Dendritické buňky jsou schopny identifikovat nebezpečné vzory a vytvořením prozáněťových podmínek iniciovat obrannou reakci organismu. Mají však zásadní vlastnost, která spojuje vrozenou imunitu se specifickou T lymfocytární větví imunitní soustavy. Dendritické buňky totiž nebezpečné vzory zpracovávají a prezentují je T lymfocytům. Komplexy antigenických fragmentů odvozených od nebezpečných vzorů navázané na molekuly HLA I. nebo II. třídy jsou potom rozpoznávány T lymfocyty. Zde se celý příběh uzavírá. Je zřejmé, že objevy, za které byla letos udělena Nobelova cena, fantastickým způsobem kompletují naše představy, jak imunitní systém, jako součást komplexní zánětové odpovědi iniciuje a reguluje obrannou reakci.

Imunitní systém – základní charakteristiky

Imunitní systém lze charakterizovat jako soustavu, která ve spolupráci s dalšími tělními systémy, zvláště neuroendokrinní soustavou, je schopna identifikovat nežádoucí změny ve vnějším i vnitřním prostředí a reagovat na ně. Hlavním cílem fungování imunitní soustavy je udržení podmínek stálého vnitřního prostředí, tj. homeostázy. Každý jedinec je v průběhu svého ontogenetického vývoje vystaven nescíselnému množství nežádoucích podnětů, které se

od sebe odlišují kvalitou i kvantitativními parametry. Potenciálně poškozující podněty jsou rozmanité a zahrnují změny jak chemických ukazatelů prostředí, tak fyzikálních parametrů a samozřejmě také vliv patogenních mikroorganismů. Imunitní systém je co do obrany vůči infekčním agens tradičně považován za rozhodující. Imunitní odpověď je součástí vysoce komplexní reakce těla na nepříznivé podněty, kterou označujeme jako zánět. Některé součásti zánětu jsou fylogeneticky velmi staré. Na jejich příkladě lze doložit evoluční konzervovanost imunitní reakce, která je příznačná pro vrozenou imunitu.

Pro fungování imunitního systému je typickým rysem účelovost jednotlivých reakcí. Rozumíme tím regulační principy uplatňované v imunitním systému, které zajistí, že imunitní odpověď bude uskutečněna pouze v případě nezbytné potřeby. Kvalita i intenzita a rozměr imunitní odpovědi musí být vždy adekvátní podnětu, na který imunitní odpověď vznikla. Nežádoucím působením imunitní odpovědi je bráněno řadou regulačních, terminačních a reparačních mechanismů. Je velký rozdíl v charakteru imunitní reakce v různých tělních kompartmentech. Velké rozdíly můžeme vidět i v charakteru imunitní odpovědi na tělním povrchu, zvláště slizničním, v porovnání s imunitní odpovědí v podslizničních strukturách.

Závěrem je třeba zdůraznit, že je bezpodmínečně nutné opustit starý koncept, který imunitní odpověď omezoval více méně na buňky hematopoetického původu. Je jasně prokázáno, že větší či menší potenciál zapojit se do imunitní odpovědi v rámci komplexní zánětové reakce mají veškeré buněčné elementy těla.

Vrozená imunita

Vrozená imunita je evolučně konzervována a předává se do dalších generací jako málo proměnná složka našeho genomu. V této

složce každý jedinec získává evoluční zkušenosti předchozích generací lidí. Vrozenou imunitu můžeme členit na složku buněčnou a složku humorální. Buněčné složky vrozené imunity jsou představovány především dendritickými buňkami, makrofágy, granulocytárními elementy a mastocyty. Teprve před krátkou dobou jsme pochopili, že vrozená imunita je fundamentem imunitní reaktivity člověka. Pouze složky vrozené imunity jsou schopny identifikovat v nesčetném množství podnětů, kterým je člověk vystaven ve svém vnějším i vnitřním prostředí, ty podněty, které pro jedince představují exogenní či endogenní „signály nebezpečí“. Přítomnost takových „signálů nebezpečí“ ukazuje na nežádoucí změny, které by mohly vést k narušení homeostázy. Nebezpečné podněty jsou identifikovány receptory, které jsou vyjádřeny především na membránách buněk vrozené imunity, ale i jiných buněčných typů (endotel, epitel) nebo jsou jejich humorálními složkami.

Receptory pro nebezpečné vzory jsou označovány jako receptory PRR (Pattern Recognition Receptors). Zahrnují v současnosti již několik desítek plně charakterizovaných receptorů. Na základě strukturních charakteristik se člení na několik rodin. Významnou skupinou těchto receptorů jsou tzv. TLR receptory (Toll-Like Receptors). Tyto receptory jsou vyjádřeny především na buňkách vrozené imunity, tj. dendritických buňkách, monocyto-makrofágových elementech, ale v menší míře se nacházejí i na dalších buněčných typech s původem v imunitní soustavě i mimo ni. Vyjádřeny jsou i na buňkách epitelových a endotelových. Některé z TLR receptorů slouží k identifikaci nebezpečných vzorů uvnitř buněk v endosomálním kompartmentu či v cytoplazmě. Toll-

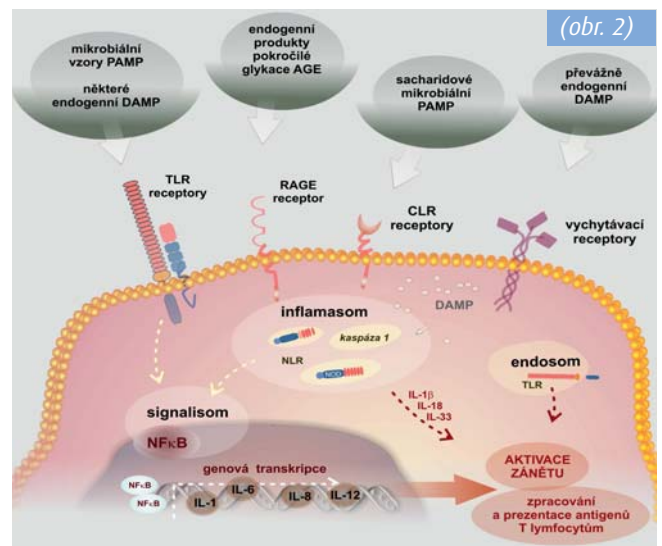
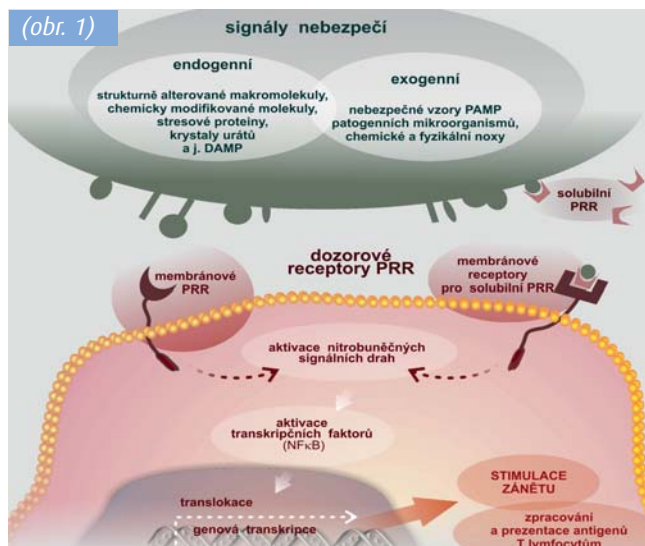
like receptory jsou schopny identifikovat mimořádně rozmanité nebezpečné vzory především mikrobiálního původu PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns). Identifikují ale i rozmanité endogenní nebezpečné vzory DAMP (Danger Associated Molecular Patterns). Významnou úlohu sehraávají tzv. C-lektinové receptory (CLR) pro cukerné nebezpečné vzory. Z dalších membránových receptorů pro nebezpečné vzory uvedeme receptory pro produkty pokročilé glykace a heterogenní skupinu tzv. vychytávacích receptorů (scavenger receptors). Tyto receptory identifikují především endogenní signály nebezpečí, představované např. chemicky modifikovanými lipoproteiny. Ze solubilních receptorů pro nebezpečné vzory uvedeme manózu vázající lektin (MBL) komplementového systému a molekuly patřící do rodiny pentraxinů. Klasickým příkladem je C-reaktivní protein. Nově je studován imunobiologický význam pentraxinu PTX-3. (Obr. 1)

Identifikace nebezpečných vzorů, ať již mají původ v patogenních mikroorganismech nebo jsou zprostředkovány nebezpečnými mozaikami cizorodých podnětů, vede k aktivaci nitrobuňkových signálních drah. Jsou sestavovány velmi složité multimolekulové signální komplexy – tzv. signalisomy. Na konci složité kaskády dějů je rozvoj zánětlivé odpovědi. Podrobně prozkoumány jsou nitrobuňkové signální dráhy vedoucí k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B. Ten je ve své aktivní formě translokován do jádra, kde se váže na regulační sekvence řady genů. Jsou to geny, které kódují cytokiny s převážně prozánětlivou aktivitou, např. TNF α , IL-1 β , dále geny kódující adhezní molekuly a geny regulující buněčný cyklus. Na konci složité kaskády dějů je rozvoj zánětlivé odpovědi.

Nebezpečné vzory se nacházejí také uvnitř buněk. Proto elementy vrozené imunity, ale i jiné buněčné typy, musí být schopny efektivně identifikovat signály nebezpečí i v nitrobuňkových kompartmentech. V modelové situaci vznikají endogenní nebezpečné vzory cizorodého původu v průběhu virové infekce, kdy jsou lokalizovány v endosomálním kompartmentu buněk.

K mimořádnému poznání dochází v současnosti v oblasti senzorů nebezpečí, které jsou lokalizovány v cytoplazmě. Z komplikované mozaiky signálních molekul zde zmíníme pouze receptory podobné NOD receptorům, tj. NLR receptory. Receptory NLR jsou schopny identifikovat rozmanité nebezpečné vzory exo (mikrobiálního) i endogenního původu. Po jejich identifikaci je za účasti adaptorových proteinů sestaven komplikovaný multimolekulární komplex, který je označován jako inflamasom. Působením inflamasomu je přeměněna latentní prokaspáza 1 na enzymaticky aktivní kaspázu 1. V dalším kroku odštěpuje kaspáza 1 z latentních proIL-1 β a proIL-18 (a snad také proIL-33) bílkovinou podjednotku. Výsledkem je vznik biologicky plně aktivních forem mimořádně účinných pluripotentních prozánětlivých cytokinů IL1 β a IL18. Vybrané receptory CLR se regulačně podílejí i na procesu autofagie.

K mimořádnému posunu v možnostech pochopení vzniku a rozvoje zánětlivé reakce přispívá v současné době poznání v oblasti endogenních nebezpečných vzorů DAMP. Endogenní signály nebezpečí vysílají vlastní struktury těla pod vlivem nejrůznějších podnětů. Může to být důsledek infekce patogenními organismy. Mohou to však být také produkty endogenních procesů, které jsou spojeny s metabolismem



buňky nebo s různými způsoby smrti buňky (nekróza, apoptóza, autofagie, aj.). Například eflux iontů draslíku, zvýšené koncentrace ATP mimo buňku, translokace molekul z normální lokalizace např. v jádře do jiného kompartmentu, to vše představuje signály nebezpečí, na které tělo reaguje zánětem. Buňky jsou vystaveny iminentnímu oxidativnímu stresu, který je indukován kyslíkovými radikály vznikajícími v procesu oxidativní fosforylace. Podobně jsou chemicky modifikovány ať již proteiny, lipidy či sacharidy i účinkem vysoce reaktivních produktů dusíkového metabolismu. Jako endogenní signály nebezpečí působí rovněž stresové proteiny, které

jsou v buňkách člověka indukovány opět vlivem nesmírně pestrého spektra podnětů, které souvisejí se suboptimálními životními podmínkami buněk. Nebezpečným vzorem se stane i konformačně změněná bílkovina, např. amyloid. Zvláštní postavení zaujímají nebezpečné vzory, které jsou generovány v procesu tvorby pokročilých produktů glykace (AGE). K těmto procesům dochází za patofyziologických podmínek např. u nemocných trpících diabetem. Endogenní nebezpečné vzory jsou identifikovány příslušnými receptory. Jejich identifikace vede k monotónní reakci ústící nakonec k rozvoji zánětové odpovědi. (Obr. 2)

Dendritické buňky, které patrolují v tkáních, jsou schopny identifikované signály nebezpečí nitrobuněčně zpracovat a jejich fragmenty po vazbě na molekuly HLA prezentovat T lymfocytům, které je rozpoznávají receptory TCR. Je tedy zřejmé, že vrozená imunita určuje fungování specifické imunity. Úplný pohled na fungování imunitní soustavy jako podstatné části komplexní zánětové reakce těla na signály nebezpečí dostaneme pouze tehdy, pokud spojíme znalosti o specifické i vrozené imunitě do integrálního celku. Pokusit se o takový pohled můžeme v příštím čísle Ad informandum.

prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.

Ilustrace Hana Kotlandová

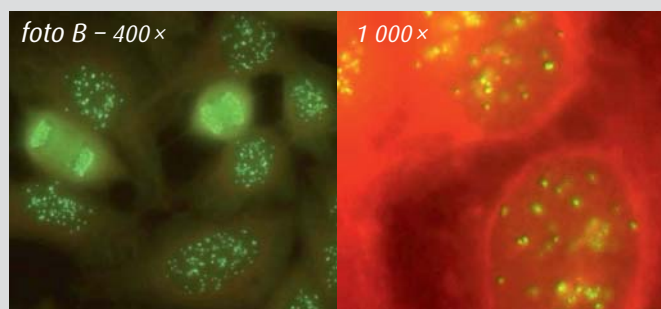
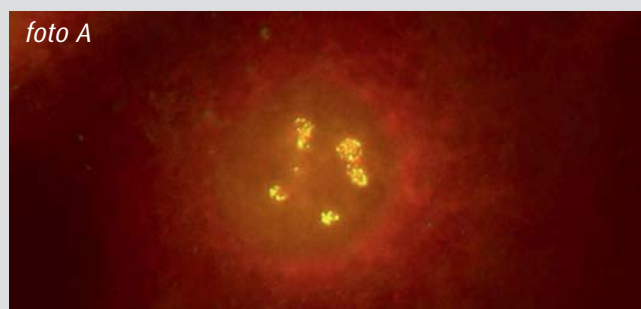
Řešení kvízu ze str. 3

Správná odpověď zní: 1. protilátky proti jadérku „homogenní typ“

Obraz vykazuje homogenní fluorescence celého jadérka u jader buněk v interfázi. Cílovým antigenem jádra pro autoprotilátku pacienta je komplex PM-Scl. Je složen nejméně z 11-16 polypeptidů, lokalizovaných v jadérku, nukleoplasmě i cytoplasmě. Funkce PM-Scl: předpokládá

se jeho účast v ribosomální biosyntéze (exoribonukleáza). Autoprotilátky jsou diagnostickým markerem pro onemocnění pojivové tkáně, a to overlap syndrom myositis/sklerodermie (50-70%), polymyositis/dermatomyositis (8-12%) a pro systémovou sklerózu (1-16%). Autoimu-

nitní odpověď PM-Scl je významně asociována s HLA II. třídy (HLA-DR3). Tento fakt pravděpodobně vysvětluje i etnické rozdíly v jejich incidenci. Vyskytují se exkluzivně u kavkazské populace. Alela HLA-DR3 je v asijské populaci raritní, stejně jako myositida nebo overlap syndrom.



Protilátky proti jadérku „zrnitý typ fluorescence“ – foto A

Obraz vykazuje zrnitou fluorescence celého jadérka u jader buněk v interfázi. Často bývá nalézána i fluorescence jemných zrn v cytoplasmě. Cílovým antigenem jádra pro autoprotilátku pacienta je RNA polymeráza I. RNA polymerázový komplex je lokalizován v jadérku a přepisuje geny pro prekurzorovou ribozomální molekulu RNA.

Nález těchto autoprotilátek je velmi specifický pro pacienty se systémovou sklerózou

(4-20%), částečně je asociován s difúzní kožní formou onemocnění a s postižením orgánů (srdce, ledviny, játra). Z tohoto důvodu je nález těchto protilátek spojován s horší prognózou onemocnění. Anti-RNA-polymerázové protilátky je možno nalézt rovněž u SLE, RA a MCTD.

Protilátky proti „centromerovým antigenům“ – foto B

Obraz vykazuje fluorescence stejnoměrných oddělených zrn (tečky) rozprostřených po celém jádře (46-92). Buňky v telofázi a metafázi vždy vykazují zrna v kondenzovaném chromozomálním materiálu

na „rovníku“. Útvar připomíná zip. Anti-centromerové protilátky rozpoznávají 5 centromerových proteinů (CENP-A, B, C, D, E). Tyto proteiny reagují s vlákny mitotického aparátu během mitózy. Autoprotilátky se primárně nalézají u pacientů s CREST syndromem (kalcinózy, Raynaudův fenomén, ezofagiální dysmotilita, sklerodaktylie a telangiektázie) a u mírných forem progresivní systémové sklerózy. V menší míře se vyskytují rovněž u pacientů s PBC a Sjögrenovým syndromem. V séru pacienta lze tyto autoprotilátky detekovat i několik let před nástupem specifických příznaků sklerodermie.

RNDr. Marcela Drahošová

Změny v laboratorních metodách

Test oxidačního vzplanutí granulocytů (Burst test) inovován

V březnu 2011 jsme provedli inovaci ve vyšetřování fagocytární aktivity granulocytů tzv. Burst testem. Původní stanovení, prováděné metodikou postavenou v laboratoři a užívanou řadu let, jsme nahradili standardním, výrobcem validovaným testem firmy Exbio (ČR). Každý vzorek je nyní stimulován nejen pomocí forbolových esterů (PMA), ale i pomocí inaktivovaných bakterií *E. coli*.

PMA (phorbol-myristát-acetát) představuje velmi silný přímý chemický aktivátor oxidačního vzplanutí granulocytů. Aktivuje ústřední enzym oxidačního vzplanutí, komplex NADPH oxidázy. Při stimulaci pomocí *E. coli* předchází respiračnímu vzplanutí ještě opsonizace bakterie, adheze fagocyty na opsonizovanou bakterii a ingesce, tj. musí proběhnout jednotlivé fáze fagocy-

tárního procesu odpovídající stavu in vivo. Test oxidačního vzplanutí granulocytů je založen na průtokové cytometrii. Ke vzorku se v testu jako indikátor oxidačního vzplanutí přidává dihydrorhodamin. Ten je uvnitř aktivovaných buněk oxidován produkty oxidačního vzplanutí na fluoreskující rhodamin. Měříme procento fluoreskujících granulocytů, normální hodnoty se pohybují v rozmezí 75-100 %. Výsledkové listy po přechodu na test firmy Exbio obsahují kromě informace o podílu granulocytů schopných stimulace pomocí PMA a pomocí *E. coli* tzv. stimulační index, který vyjadřuje intenzitu (sílu) oxidačního vzplanutí (viz. tabulka).

Stimulace pomocí *E. coli* je ke granulocytům šetrnější než poměrně agresivní chemikálie PMA, opracování v testu přežívá

větší podíl granulocytů. To je výhodné u vzorků, kde granulocyty nejsou v optimální kondici, třeba i vinou nevhodných podmínek při manipulaci se vzorkem, nebo při delším odstupu mezi odběrem a nasažením vzorku do testu. V takovém případě vidíme u PMA hodnoty těsně u dolní hranice normy, zatímco při stimulaci pomocí *E. coli* jsou naměřené hodnoty bez pochyby normální. Testování oběma stimulačními agens je tedy zdánlivě pracnější (a dražší), v řadě případů ale přináší větší míru jistoty při uzavírání výsledků a snižuje tak potřebu opakování testu pro nejednoznačný výsledek. Abnormálně nízká hodnota testu po stimulaci *E. coli* v kombinaci s normální hodnotou po stimulaci PMA navíc upozorňuje na možnou poruchu fagocytózy ve fázi adheze nebo ingesce.

Přes uvedené rozšíření testu jsme při vykazování pojišťovněm zachovali jeho původní bodové ohodnocení.

Pokyny k odběru: Test se provádí z heparinované krve, stejně jako u předchozí verze. Jiná protisrážlivá činidla než heparin nejsou vhodná. Na základě špatných zkušeností s otevřeným odběrovým systémem, kde pravděpodobně dochází ke kontaminaci vzorku a k aktivaci granulocytů nečistotami v odběrové zkumavce, doporučujeme odběr do vakuových zkumavek. Po odběru se obsah zkumavky promíchá, zkumavka se uchová při pokojové teplotě a ještě týž den dopraví do laboratoře k vyšetření. Test provádíme v pracovní dny denně.

Hodnocení testu oxidačního vzplanutí granulocytů – parametry na výsledkovém listu

Burst/Spontánní	negativní kontrola, tj. procento fluoreskujících granulocytů v kontrolní zkumavce bez stimulace	norma < 1 %
Burst/Stimulace PMA	procento granulocytů, u nichž došlo k oxidačnímu vzplanutí po stimulaci PMA	norma 75-100 %
Burst/Stimulace <i>E. coli</i>	procento granulocytů, u nichž došlo k oxidačnímu vzplanutí po stimulaci bakteriemi <i>E. coli</i>	norma 75-100 %
Stimulační index granulocytů při stimulaci PMA	podíl průměrné intenzity fluorescence (MFI), pozitivních granulocytů po stimulaci PMA a MFI negativních granulocytů kontrolního vzorku bez stimulace	norma >30
Stimulační index granulocytů při stimulaci <i>E. coli</i>	dtto, po stimulaci <i>E. coli</i>	norma >30

Zvýrazněné jsou parametry přidané na výsledkový list v inovované verzi testu.

Oxidační vzplanutí fagocytujících buněk představuje účinný nástroj v obraně organismu proti infekci. Vznikající vysoce reaktivní kyslíkové metabolity působí mikrobiálně na pohlčené mikroorganismy. Mezi primární poruchy oxidačního vzplanutí patří chronická granulomatózní choroba, způsobená vrozenými poruchami v genech kódujících jednotlivé složky komplexu NADPH oxidázy. Důsledkem je abnormálně nízká, případně nulová aktivita tohoto enzymu. Abnormálně nízké hodnoty stimulačního indexu mohou být dány i genetickým defektem myeloperoxidázy, enzymu, který v procesu respiračního vzplanutí navazuje na NADPH oxidázu. Schopnost oxidačního vzplanutí fagocytů může být sni-

žena i sekundárně, např. v důsledku léčby imunosupresivy, cytostatiky, cytokiny a růstovými faktory.

Vyšetření fagocytární aktivity je vhodné u osob:

- s recidivujícími a chronickými infekcemi kůže a sliznic (pyodermie, abscesy, diseminovaná kandidóza, chronická furunkulóza, lokalizované hnisavé záněty)
- se záněty lymfatických uzlin
- s gingivitidou, s aftózní stomatitidou
- s infekcemi dýchacích cest (otitida, sinusitida, bronchitida, pneumonie)
- se záněty v urogenitálním nebo gastro-

intestinálním traktu

- s osteomyelitidou, s meningitidou
- se sepsí
- s BCG-itidou po očkování proti TBC,

a to v případě, že jsou tyto infekce vyvolány stafylokoky (*S. aureus*, *S. epidermidis*), enterobakteriemi (*E. coli*, *Serratia marcescens*, *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*), streptokoky (*S. pneumoniae*), kvasinkami a plísněmi (*Candida* spp., *A. fumigatus*, *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*), parazity (*T. gondii*) a nitro-buněčnými patogeny (*Mycobacterium* spp., *Listeria*).

PharmDr. Jana Havlasová, PhD.

Kam na nedělní výlet v Pardubickém kraji?

Vraclav: pozdrav z dávné historie českého státu

Vážení čtenáři, pokud hledáte inspiraci na malý výlet na nedělní odpoledne, nechte se inspirovat naším zastavením. Naše kroky budou směřovat do místa vzdáleného asi 5 km od Vysokého Mýta, do městečka jménem Vraclav. Zde se návštěvníkovi nabízí možnost navštívit barokní areál s kostelem sv. Mikuláše, postavený v letech 1724–1730 pražským architektem Canevallem. Kostel vznikl na místě starší kaple, která byla součástí lázeňského areálu kolem pramene sv. Mikuláše. O tomto prameni se traduje, že má léčivé účinky. První popisované zázračné uzdravení se datuje do 17. století, kdy pramen vyléčil místního nožře, který zde z vděčnosti nechal postavit první kapli. Časem u zázračného pramene vznikly malé lázně, které byly v provozu až do konce 18. století. Nyní je v budově lázni historická expozice. Součástí areálu je i poustevna zvaná Fráterka, kde údajně sídlil poustevník, mnich z řádu sv. Františka. Fráterka sloužila lázním i jako lékárna. Celý malebný areál je vestavěn do hluboce zaříznutého údolí a působí velmi romantickým a uklidňujícím dojmem.

Nejzajímavější zážitek nás ovšem čeká po výstupu strmou stezkou v pravé části barokního areálu na blízký ostroh. Tam je možné nalézt stopy valů přemyslovského hradiště z 11. století. Hradiště mělo rozlohu více než 1 hektar s akropolí oddělenou od předhradí příkopem a valem. Název hradiště Vraclav nebo také Vratislav nás upomíná na pravděpodobného zakladatele hradiště, českého knížete Bětislava I., zvaného „český Achilles“, a jeho syna Vratislava. Hradiště Vraclav bylo budováno jako

součást tzv. hradské soustavy českého státu. Tato soustava tvořila systém opevněných přemyslovských sídlišť – hradišť, ze kterých knížecí rod ovládal území, střežil zemské stezky a hranice státu. Do této soustavy patřily také ve východní části knížectví hradiště Chrudim, Hradec (Králové), Kouřim, Čáslav. Hradiště sloužila jako centra



Památník vyvraždění Vršovců, Vraclav

moci, justice, obchodu a řemesel. Kolem hradišť vznikala často městská centra. Bohužel, hradiště Vraclav zřejmě vzhledem ke své poloze postupně ztrácelo na významu a zvláště po vzniku blízkého města Vysoké Mýto bylo postupně opuštěno. Je zajímavé si představit, že by význam Vraclavi neupadl, a naopak by kolem hradiště vyrostlo centrum celého okolního kraje. Možná by v nynější době krajským městem mohla být Vraclav, a nikoliv Pardubice.

S hradištěm je často spojována i jedna temná a krvavá epocha našich dějin, a to mocenský zápas mezi vládnoucím rodem Přemyslovců a druhým největším šlechtic-

kým rodem, Vršovců. Byl to zápas o hegemonii v mladém českém státě. Po předchozí likvidaci dalšího významného českého rodu Slavníkovců zůstali Vršovci jako poslední konkurenti vládnoucího rodu. Zápas o moc trval s přestávkami celé století a vyvrcholil třemi výraznými kroky přemyslovských knížat, které se označují jako trojí vyvraždění Vršovců. K poslednímu došlo právě na hradišti Vraclav, a to po nezdařené obraně proti polskému vpádu, kdy byl předák Vršovců Mutina obviněn z kolaborace s nepřítelem. To byla záminka pro knížete Svatopluka k masakru celého rodu Vršovců, ke kterému došlo na Vraclavi a následně také na Libici a v Praze v roce 1108. Na paměť této události byl v roce 1908 vztýčen na hradišti Vraclav pomník, který můžete vidět v blízkosti valů hradiště.

Návštěvu barokního areálu ve Vraclavi a zbytků raně středověkého hradiště můžeme všem zájemcům o historii, a nejen jim, vřele doporučit. Místo je poměrně málo navštěvované, a tak se můžeme posadit na lavičku na vrcholu bývalého valu, zasnit se a představit si ruch na hradišti a život našich předků, od jejichž času nás dělí tisíc let.

Literatura:

1. Hledíková Zdena, Janák Jan, Dobeš Jan: *Dějiny správy v českých zemích: Od počátku státu po současnost. Praha. Lidové noviny, 2005.*
2. Kosmova kronika česká
3. Sommer Petr, Třeštlík Dušan: *Přemyslovci – Budování českého státu. Lidové noviny, 2009.*
4. www.obecvraclav.cz

doc. RNDr. Ctirad Andrýs, Ph.D.

Vánoční inspirace z kuchyně M. D. Rettigové

Kapr na černo

Trhni kapra, oškrab ho, vyndej vnitřnosti, krev vylej do hrnku, nalej do ryby dobrého vinného octa, vymej ji jím a přidej to ke kvi; načež kapra nasekej na kusy, narovnej ho do pánve, dej k němu cibuli, mrkev a na koláčky nakrájený celer, několik stroužků česneku, nové koření, pepř, zázvor, hřebíček, všecko celé, několik vyloupaných vlašských

ořechů, nalej na to piva tolik, až se ryba zatopí, dej to toho kousek nového másla, osol to, nech to vařit, oheň musí ale být jen okolo pánve a ne v prostředku, aby se ryba nepřipálila. Když se trochu povaří (asi půl hodiny), ustrouhej kousek perníku. Rybu jím posyp; potom upraž na másle hezky do hněda kus cukru, vlej k němu tu krev s tím

octem a nech to spejchnout, pak to vlej ke kapru, nech to povařit až to zhoustne, dej k tomu kousíček bílého cukru a chceš-li, přidej k tomu sklenku červeného vína; potom vyrovnej rybu na mísu, poklad ji těmi celorovými a cibulovými koláčky, proced na ni omáčku a dej ji na stůl.

MUDr. Tomáš Sýkora dle M. D. Rettigové