

Některé aspekty molekulární biologie kriticky nemocných v kontextu současné laboratorní medicíny

Průcha M., Peková S., Sedláčková L.

Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie, Nemocnice Na Homolce, Praha

Souhrn

Biomarkery jsou charakterizovány jako indikátory normálních biologických procesů, patologických procesů nebo odpovědi na terapii. Sepsis je příkladem multifaktoriálního onemocnění, charakterizovaného nedostatkem *in vitro* diagnostických testů (biomarkerů).

Nové biomarkery umožňují lepší pochopení patogeneze onemocnění, lepší stratifikaci pacientů, s návazností na klinické rozhodování o diagnóze a léčbě. Nové technologie – genomika a proteomika dnes nalézají a umožňují multiplexovou analýzu těchto biomarkerů. Cílem současné diagnostiky je převedení přístupů a technologií experimentálních do klinické praxe s důrazem na terapeutické konsekvence umožňující personalizovanou medicínu.

Klíčová slova: biomarkery – genomika – molekulární biologie – proteomika – sepsis

Abstract

Some aspects of molecular biology in critically ill patients in the context of current laboratory medicine

Biomarkers are recognized as objective indicators of normal biological processes, pathogenic processes or pharmacological responses to a therapeutic intervention.

Sepsis is a multifactorial disease distinguished by the paucity of diagnostic tests (biomarkers) available. New biomarkers allow for a better understanding of the pathogenesis of diseases and better stratification of patients in connection with improved clinical decision making, diagnosis and treatment. New technologies – genomics and proteomics – enable multiplex detection and evaluation of biomarkers. The goal of the diagnostics at present is the implementation of new technologies and molecular approaches into routine clinical practice with emphasis on therapeutic consequences that could make “personalized medicine” a real option.

Keywords: biomarkers – genomics – molecular biology – proteomics – sepsis

Anest. intenziv. Med., 19, 2008, č. 1, s. 5–8.

Současná medicína je více než kdykoli předtím determinována rozvojem technologií. Kardiologie, radio-diagnostika, neurologie, chirurgie, gastroenterologie a další jsou typickými představiteli z řady profitujících klinických oborů. Právě zde v důsledku nových technologií – s využitím nových zobrazovacích metod, nových technologických přístupů k provedení diagnostických a terapeutických výkonů – došlo k významné pozitivní změně ve včasnosti diagnostiky i efektivnosti prováděné terapie. Do druhé skupiny můžeme zařadit laboratorní medicínu. Termín „laboratorní medicína“ není příliš známý ani u odborné veřejnosti, ale nejlépe vystihuje komplexnost diagnostiky, o kterou se dnes stará klinická biochemie, klinická hematologie, klinická imunologie, klinická farmakologie, klinická mikrobiologie a molekulární diagnostika. Úmyslně zdůrazňuji klinická, neboť právě tento přívlastek charakterizuje všechny dílčí obory, které ještě do nedávné doby vystupovaly samostatně a jejich činnost je vnímána především jako činnost laboratorní. V posledních desetiletích se ale změnila náplň jednotlivých oborů s jasným posunem k lůžku nemocného,

s pochopením nutnosti posouzení souvislosti mezi laboratorními výsledky a klinickým stavem pacienta.

Na poli diagnostiky a terapie u kriticky nemocných je to zvlášť důležité. Nejen pacienti se sepsí, ale také pacienti kardiologičtí, pacienti se systémovými autoimunitními onemocněními vyžadují urgentní diagnostiku, která podstatným způsobem zasahuje do výsledků terapie. Hledáme nové biomarkery, které zpřesní a urychlí diagnostiku, přispějí k dalšímu objasnění patogeneze chorob. Jaký by měl být ideální biomarker? Jeho vyšetření by mělo být levné, dostupné (technologicko-metodologicky), měl by mít „jasnou“ vypovídací hodnotu, jeho vyšetření musí být reprodukovatelné. Metodologie současné laboratorní medicíny je velice různorodá. Technické platformy využívají různé systémy s větší nebo menší reprodukovatelností, s větším nebo menším rizikem chybných výsledků. Musíme si uvědomit, že biologická variabilita systému (člověka) je obrovská a při měření parametrů v množství 10^{-6} až 10^{-12} je dosažení reprodukovatelnosti měření mnohdy velice složité.

Jedním z typických příkladů komplexnosti diagnos-

tiky je seps. Na jedné straně poznání, že neexistuje parametr, který by spolehlivě sepsi diagnostikoval, na druhé straně poznání, že potřebujeme lepší a robustnější parametry, které by dokázaly pacienty se sepsí stratifikovat a podle stupně závažnosti onemocnění i efektivnějším způsobem léčit [1]. Stanovení nových diagnostických markerů má pochopitelně i terapeutickou ambici. Uvedme příklad Toll-like receptorů (TLR). Vrozený systém imunity disponuje rozsáhlou skupinou rozpoznávacích mechanismů – PPR (Pathogen Pattern Receptors), mezi které patří i TLR. Tyto receptory jsou schopny rozpoznávat tzv. PAMP (Pathogen associated Molecular Patterns) – bakteriální, virové a mykotické „motivy“ charakteristické pro jednotlivé druhy mikroorganismů, které se kauzálně u sepsy uplatňují. Důsledkem je pak spuštění kaskády funkční aktivity buněk přirozené imunity, jejímž výsledkem by mělo být ohraničení zánětu, eliminace zdroje infekce, zhojení *ad integrum*. Pro rozpoznávání např. lipopolysacharidu, jako hlavního stavebního kamene gramnegativních bakterií, je určen TLR 4, pro další stavební součásti infekčních agens jsou pak určeny další TLR. Kvantitativní stanovení TLR se aktuálně v diagnostice sepsy neuplatňuje, ale detekce jeho kvality – přítomnost genetických polymorfismů a jejich vazba na jednotlivá onemocnění, má velice důležitou úlohu [2]. Poznání patogenese sepsy, objev nových biomarkerů jako jsou TLR, má také terapeutickou ambici. Na experimentálním modelu sepsy se totiž prokázalo, že blokování tohoto receptoru podstatným způsobem snížilo mortalitu. Klinická studie s blokováním TLR 4 u pacientů se sepsí je jednou z právě pobíhajících studií. V této souvislosti je nutné vyzvednout důležitou charakteristiku sepsy a patofyziologické souvislosti. Seps představuje stav sekundární imunodeficiency, který je komplexní co do postižení obou systémů imunity – humorálního i buňkami zprostředkovaného. Je snížena produkce antigen specifických protilátek (terapeutickou konsekvencí je indikace intravenózních imunoglobulinů při hypogamaglobulinémii), je snížena koncentrace jednotlivých komponent komplementového systému v důsledku jejich utilizace při likvidaci infekčního agens, naproti tomu aktivita komplementu vyúsťuje do poškození tkání (opět terapeutické použití monoklonálních protilátek blokuujících aktivní složky komplementového systému). V buňkami zprostředkované imunitě je snížena exprese HLA molekul II. třídy, která přímo ovlivňuje (negativně) funkční schopnost imunokompetentních buněk – monocytů i leukocytů. Stav známe pod označením imunoparalýza [3, 4]. Po stránce funkční je seps charakterizována přesmykem Th1 do Th2 odpovědi s odpovídající změnou v produkci jednotlivých cytokinů. Je charakterizována apoptózou imunokompetentních buněk, které mají imunosupresivní efekt [5]. Víme již, že TLR jsou zodpovědné nejen za rozpoznávání motivů bakteriálních agens, nýbrž představují obecný rozpoznávací systém u člověka. Genetický polymorfismus TLR byl zjištěn u řady onemocnění spojených se zánetem – např. zánetlivá onemocnění GIT, nebo i autoimunitních onemocnění [6, 7]. S TLR je spojena

také nová koncepce syndromu systémové zánetlivé odpovědi (SIRS), kdy vyvolávajícím faktorem není infekce, nýbrž trauma, hypoxie a další neinfekční příčiny [8].

Klinická pozorování jsou východiskem pro další studie s použitím tzv. biologické léčby. Opět příklad sepsy. Metaanalýza experimentálních i klinických studií Eichackerem et al. prokázala rozdílnou účinnost biologické léčby sepsy v závislosti na intenzitě zánetu, který byl přítomen. Čím vyšší byla intenzita zánetu, tím lepší byly výsledky protizánetlivé biologické léčby. S klesající intenzitou zánetu se terapie stávala méně účinnou, nebo se dokonce stala škodlivou [9]. Aplikace těchto poznatků do klinické praxe se uplatňují již v současnosti – nasazování biologické protizánetlivé terapie v závislosti na závažnosti stavu ohodnoceném pomocí APACHE II skóre. Tyto závěry podpořilo i hodnocení studie PROWESS. Pokud měli pacienti nízké koncentrace IL-6, chirurgická sanace ložiska neměla vliv na konečný klinický výsledek. Naopak, u pacientů s vysokou koncentrací IL-6 chirurgické odstranění infekčního fokusu příznivě ovlivnilo konečný klinický výsledek (Marshall – osobní sdělení, Weimar 2005).

Jaké máme možnosti u stanovení intenzity zánetu? Ačkoli známe dnes již stovky cytokinů, mediátorů, adhezivních molekul, stále to není dost k zodpovězení této otázky. Je přitom nepochybné, že změny imunologické reaktivity – jako odpověď na působení exo- a endotoxinů mikrobiologických agens – jsou nesmírně dynamické a mohou být ve stejném časovém okamžiku u různých pacientů diametrálně odlišné [10]. Nicméně máme některé parametry, které dokáží poskytnout cenné informace jak k diagnostice, tak k některým terapeutickým aspektům. Intravenózní imunoglobuliny jsou z hlediska jejich účinnosti v terapii sepsy stále kontroverzní záležitostí. Nicméně v současné době přibývá pacientů komorbidních, na dlouhodobé imunosupresivní terapii v důsledku transplantací nebo autoimunitních onemocnění. Tyto okolnosti mohou významným způsobem tento parametr ovlivnit, a je jasné, že hypogamaglobulinémie u pacienta se sepsí je významným rizikovým faktorem a měla by být korigována. V naší databázi máme přibližně 7000 měření koncentrace imunoglobulinů, která jsme prováděli u pacientů s prokázanou sepsí nebo podezřením na ni. Incidence hypogamaglobulinémie ve třídě IgG se pohybuje kolem 15 %. V těchto případech je indikace intravenózních imunoglobulinů racionální. Aktivitu zánetlivého procesu můžeme posoudit také z dynamiky koncentrace imunoglobulinů a složek komplementového systému. Výrazná snížení C3 a C4 složky komplementu jsou charakteristická pro pacienty s vysokou zánetlivou aktivitou. Kromě prosté substituce s dodáním specifických imunoglobulinových izotypů v IVIG se uplatňuje při podání vyšších dávek (400 mg/kg/den), jejichž imunomodulační působení – právě u pacientů s hyperzánetlivou odpovědí na infekční či neinfekční agens – může mít velmi prospěšný účinek. Příběh prokalcitoninu je starý již téměř dvě desetiletí a studie dokazují, že jde v současnosti o nejvíce senzitivní a specifický ukazatel bakteriální infekce krevního řečiště [11]. Měření koncentrace IL-6

a IL-10 charakterizuje funkční stav imunitního systému, a to jak humorální, tak buňkami zprostředkovaný. Již řada prací prokázala, že vysoké koncentrace těchto cytokinů jsou nezávislým nepříznivým prediktivním faktorem pro prognózu pacienta [12]. Přitom jejich měření můžeme provést ve „statimovém“ režimu s dostupností výsledku do 2 hodin. Z funkčního hlediska jsou užitečnými markery měření exprese HLA-DR na monocitech (znak imunoparalýzy) a *ex vivo* produkce TNF po stimulaci lipopolysacharidem z plné krve. Rovněž zde jsou výsledky dostupné do 5 hodin po odběru krve. Z hlediska rozlišení infekčního a neinfekčního zánětu je užitečným znakem měření exprese CD64 na neutrofilech [4, 13]. Jedná se o vysokoafinitní Fcγ receptor na neutrofilech, jehož exprese je u infekčního zánětu významným způsobem zvýšena. Otázka terapeutických konsekvencí je zde složitější, protože terapie, která by dokázala některé z těchto parametrů korigovat, není zatím známa. Nicméně je zde znovu doložen požadavek na lepší stratifikaci pacientů v závislosti na funkčním stavu imunitního systému, protože to dává informaci o intenzitě zánětu. Terapeutické důsledky detekce imunoparalýzy u sepse jsou rovněž známy. Pokud jsou pacienti na imunosupresivní terapii, je nutné ji významným způsobem snížit nebo vysadit. Ve vztahu k novým klinickým studiím je možné položit si otázku: Proč aplikovat monoklonální protilátku proti TNF u pacientů, kteří *in vitro* nejsou schopni tento cytokin tvořit? Na druhé straně víme, že byla prokázána účinnost podání monoklonální protilátky proti TNF u pacientů s gramnegativní sepsí [3]. V současné době probíhá 3. fáze klinické studie s podáním polyklonální protilátky proti TNF.

Při hledání nových biomarkerů se významným způsobem uplatňuje genomika a proteomika. Zmapování lidského genomu a technologie umožňující detekovat genetické predispozice k jednotlivým chorobám přinesly řadu změn. Dokážeme dnes vyšetřovat mutace, respektive genetické polymorfismy, zodpovědné za vznik onemocnění. U pacientů se sepsí je tato problematika naneštěstí daleko složitější [15]. Vedle makroorganismu je zde také mikroorganismus, přičemž genetické predispozice k různým infekčním agens jsou různé [14]. Nicméně metodiky DNA microarray nesou možnost mapování genové exprese u obou hráčů infekčního příběhu [15]. Dnes již také víme, že u makroorganismu jsou některé orgány privilegované z hlediska mechanismů, které je chrání před hyperzánětlivou odpovědí (mozek). Naproti tomu existuje rozdílná schopnost mikrobiologických agens, která je determinována geneticky – unikat „z dozoru“ imunitního systému a umožnit jejich další množení. Některé mikroorganismy mají schopnost se v časově velice krátkém úseku přizpůsobit změněným životním podmínkám (vysoká produkce prozánětlivých cytokinů), které je mají zahubit, a naopak z nich dokážou profitovat.

Vysoce aktuální se stala detekce extrahumánního genomu v biologickém materiálu. V praxi to znamená uplatnění metod polymerázové řetězové reakce k detekci bakteriálních, virových a mykotických antigenů. Klinické zadání je jasné. Studie prokázaly, že 20–35 % nasazené

antibiotické empirické terapie je nasazeno nesprávně, což má přímý negativní důsledek pro prognózu pacienta [16]. Cílem je tedy urychlit diagnostiku (do 6 hodin). Je vhodné podotknout, že toto vyšetření nenahrazuje standardní mikrobiologické vyšetření se stanovením citlivosti, respektive rezistence k antibiotikům.

Technologie přináší nové multiplexové analýzy, které dokážou rozlišit infekční a neinfekční zánět, mapovat markery rezistence mikroorganismů k antibiotikům a další. Naprosto nové možnosti nabízí proteomika jak v oblasti diagnostiky, tak terapie [17]. Její uplatnění v klinické praxi již dnes můžeme pozorovat v oblasti onkologie a onkohematologie. Lepší poznání patogeneze chorob je spjata právě s tímto vědním oborem. Navíc tyto poznatky umožňují i efektivnější terapii nemocných. „Mnohostupňová“ terapie u onkologicky nemocných je dnes daleko účinnější. A podobný přístup je, podle našeho názoru, nezbytný i v terapii sepse. Seps je nesmírně komplexní syndrom s postižením všech systémů – neuroendokrinního, hematopoetického, imunitního. Tomu by měla odpovídat i terapie. Léčba dysregulací v oblasti hemokoagulace (rekombinantní aktivovaný protein C), v oblastech endokrinních (systémové kortikosteroidy), imunitních (biologická léčba – blokování TLR, NO syntázy a další) by se měly uplatnit nezávisle, ale na základě aktuálního stavu pacienta. Samozřejmě i zde platí: „Venienti occurrere morbo“. A proto je naše schopnost, diagnostikovat sepsi už v těch nejčasnějších stádiích, klíčová. Aktuálně jsou již v klinických zkouškách microarrays RNA nebo DNA, které by měly s předstihem desítek hodin proti standardním mikrobiologickým metodám pacienty s diagnózou sepse identifikovat, a tak ovlivnit jejich terapii.

Co říci závěrem? Každá laboratorní metoda má své limity a posouzení klinického stavu pacienta zůstává stále rozhodujícím hlediskem při zvažování diagnózy nebo nasazení terapie. Nicméně, jen robustnější a komplexnější diagnostika umožní účinnější a personalizovanou medicínu.

Literatura

1. **Marshall, J. C.** Such stuff as dreams are made on: mediator – directed therapy in sepsis. *Nature Rev. Drug Discovery*, 2003, 2, p. 391–405.
2. **Beutler, B., Hoebe, K., Du, X., Ulevitch, R. J.** How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers.
3. **Volk, H. D., Reinke, P., Kraus, D. et al.** Monocyte deactivation – rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med.*, 1996, 22, Suppl. 4, p. 474–481.
4. **Sedláčková, L., Průcha, M., Dostál, M.** Immunological monitoring of sepsis using flow cytometry – quantitation of monocyte HLA-DR expression and granulocyte CD64 expression. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 2005, 54, s. 54–61.
5. **Wesche, D. E., Lomar-Neira, J. L., Perl, M. et al.** Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J. Leukocyte Biology*, 2005, 78, p. 1–13.
6. **Hong, J., Lejny, E., Fraser, A. G. et al.** TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2007, 22, 11, p. 1760–1766.

7. **Baccala, R., Hoebe, K., Kono, D. H. et al.** TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat. Med.*, 2007, 13, 5, p. 543–551.
8. **Tang, A. H., Brunn, G. J., Cascalho, M., Platt, J. L.** Pivotal advance: Endogenous pathway to SIRS, sepsis, and related conditions. *J. Leucocyte Biology*, 2007, 82.
9. **Eichacker, P. Q., Parent, C., Kalil, A. et al.** Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2002, 166, p. 1197–1205.
10. **Toft, P.** The effect of surgical stress, endotoxin induced sepsis and extracorporeal circulation on the cell mediated immunity. *Dan. Med. Bull.*, 2002, 49, 4, p. 302–317.
11. **Simon, L., Gauvin, F., Amre, D. K. et al.** Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.*, 2004, 15, 39, 2, p. 206–217.
12. **Oberholzer, A., Sousa, S. M., Tschoeke, S. K. et al.** Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock*, 2005, 23, 6, p. 488–493.
13. **Davis, B. H.** Improved diagnostic approaches to infection/sepsis detection. *Expert. Rev. Mol. Diagn.*, 2005, 5, p. 193–207.
14. **Kellum, J. A., Kong, L., Fink, M. P. et al.** Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis. Results of the genetic and inflammatory markers of sepsis (GenIUS) Study. *Arch. Intern. Med.*, 2007, 35, p. 1061–1067.
15. **Průcha, M., Maťoška, V.** PIRO systém „P“ (predispozice) a sepse. *Anesteziologie a intenzivní medicína*, 2005, 4, s. 203–210.
16. **Sterus, T., Pohlak, N., Echtenacher, B., Mannel, D. N.** Divergence of protection induced by bacterial products and sepsis-induced immune suppression. *Infect. Immun.*, 2005, 43, p. 4905–4912.
17. **Kollef, M. H.** The importance of appropriate initial antibiotic therapy for hospital-acquired infections. *Am. J. Med.*, 2003, 115, 7, p. 582–584.
18. **Chuang, T. P., Laramie, J. M., Meyer, D. J. et al.** Molecular diagnostics in sepsis: from bedside to bench. *J. Am. Coll. Surg.*, 2006, 203, p. 585–598.

Adresa pro korespondenci:
 Prim. MUDr. Miroslav Průcha, Ph.D.
 Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie
 Nemocnice Na Homolce
 Roentgenova 2
 150 00 Praha
 e-mail: miroslav.prucha@homolka.cz

Česká společnost anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny

Generální partner:



Abbott

A Promise for Life

Hlavní partneři:



Bristol-Myers Squibb

Pracujeme pro zdravější svět™



COVIDIEN

positive results for life™

B | BRAUN

SHARING EXPERTISE

Cheirón®

... dýcháme za Vás.

Linde Gas Therapeutics

Linde



novo nordisk®