

Bílkoviny a alergie

MUDr. Martin Fuchs, Immunoflow Praha

Potravinové alergen

Potravinové alergen jsou proteiny, resp. větší glykoproteiny. Označují se dle mezinárodní nomenklatury zkratkou vycházející z latinského názvu a očíslování dle pořadí identifikace.

Proto hlavní alergen vajíčka ovalbumin se označuje Gal d 2 (slepice = *Gallus domesticus*), hlavní alergen arašidu konglutin se označuje Ara h 2 (arašíd = *Arachis hypogaea*), hovězí kasein Bos d 8 (kráva = *Bos domesticus*) a lískooříškový legumin Cor a 9 (*Corylus avellana*).

Molekulová hmotnost (MW) bílkovin-alergenů se pohybuje v širokém rozmezí od 10 až po 90 kDaltonů. Pro srovnání - jedna aminokyselina má v průměru okolo 0,1 kDa, syrovátkové bílkoviny kravského mléka (BKM) se pohybují mezi 14-18 kDa, kaseinové BKM najdeme v rozmezí mezi 22-32 kDa, 2S-albuminy ořechů mají MW kolem 12 kDa, hlavní alergen jablka má 17-18 kDa a gliadiny mohou mít 30 až 70 kDa.

Jen některé proteiny jsou schopné senzibilizovat, tj. vyvolat imunologickou odpověď bez klinicky patrné přecitlivělosti (imunogenicita). Některé proteiny dokážou vyvolat reálnou alergickou reakci (alergenicita). V drtivé většině však exogenně nabízené bílkoviny žádnou senzibilizaci nespustí. Příroda nabízí, lépe řečeno moderní věda dosud popsala **16.230** bílkovinných rodin, skupin, domén (*Proteins families database* - Pfam 28,0, květen 2015). Mezi rodiny s alergenním potenciálem bylo dosud zařazeno **286** rodin, rodin dělených dle totožné či naopak rozdílné biologické funkce (Allergome Platform, červen 2015). To vychází přepočtem na **1,76 %** ze všech bílkovinných rodin. Příklady nejznámějších proteinových domén, které za převahy perorálního příjmu mohou vyvolat imunologickou odpověď:

- **gliadiny** (prolaminy obilovin, resp. lepkové proteiny)
- **lipid transfer proteiny** (rizikové prolaminy zeleniny a ovoce)
- **kaseiny** (bílkoviny živočišných mlék)
- **beta-globuliny** (bílkoviny živočišných mlék)
- **ribonukleázy** (významné alergen y jarních stromů, ovoce, zeleniny i ořechů)
- **profiliny** (méně významné alergen y ovoce a zeleniny)
- **2S-albuminy** (hlavní alergen y sezamu, máku, některých ořechů)
- **viciliny, leguminy** (hlavní alergen y některých semen, ořechů a luštěnin)
- **konglutiny** (hlavní alergen arašidu a lupiny)
- **kalcium-vázající proteiny** (např.: parvalbumin - hlavní panalergen všech ryb)

- **tropomyosiny** (hlavní panalergen všech korýšů a měkkýšů)

Rodiny se srovnatelnou biologickou aktivitou mají obvykle podobnou aminokyselinovou sekvenci i obdobné 3D uspořádání - tzv. strukturální homologii. A to je příčinou fenoménu možných zkřížených reaktivit (*cross reactivity*, CR) - viz dále.

Rodina je zjednodušeně řečeno zdrojem příbuzných alergenů. Naproti tomu samotný arašíd, celer, kiwi nebo kreveta nejsou alergeny, jsou jen pouhými extraktem, resp. směsí hned několika potenciálních alergenů. Zatímco kreveta a celer jsou extrakty 5, resp. 6 dosud popsanych alergenů, tak kiwi dnes může nabídnout alergenů minimálně 12 a arašíd je bez přehánění alergenní třaskavina, která obsahuje minimálně 20 alergenů s naprosto odlišnou chemickou specifikací. Některé alergeny jsou hlavní (více než 70 % alergiků k jednomu druhu potravy reaguje na tuto konkrétní molekulu), některé vedlejší - na ty může reagovat třeba jen 1 z tisíce konkrétně definovaných jednodruhových alergiků. Alergické protilátky proti extraktům známe jako specifické protilátky (sIgE), protilátky proti samotným alergenním molekulám (komponentám) si osvojují název protilátky proti rekombinantní alergenům (rIgE). Metoda, která si osvojila rekombinantní techniky pro výrobu 100 % čistých bílkovin-alergenů, se rozšířila pod názvem komponentová, lépe **molekulární diagnostika** (*Component resolved diagnosis*, CRD).

Interakce exogenní bílkoviny a imunitní systém

Předmětem zájmu alergologů posledních 30 let je odkrývání všech možných interakcí mezi exogenně přijímanými bílkovinami a imunitním systémem. Identifikace charakteristik, které některým bílkovinám udělují privilegium imunogenicity či přímo alergenicity, je klíčem k pochopení alergie i boje s ní. Představme si biologicky aktivní bílkovinu jako sloučeninu vytvořenou několika sty aminokyselinami. A tento aminokyselinový řetěz má svou sekundární (2D) i terciární strukturu (3D). Řetěz konkrétní bílkoviny je v prostoru poměrně stabilně "pokroucen", a tak na svém povrchu odhaluje antigenní místa pro případný zájem ze strany variabilních částí protilátek. V alergologii nás přednostně zajímá vazba imunoglobulinů E (IgE). Tato protilátka se navazuje na bílkovinu jen v určitých malých peptidových úsecích, kterým říkáme **epitopy**. Klasický epitop alergických reakcí se skládá pouze ze 3-8 aminokyselin, jen výjimečně se můžeme setkat s aktivními epitopy o sekvenci 12 až 20 aminokyselin (regiony).

Stačí přítomnost osudového epitopu v bílkovině k tomu, aby došlo v případě předchozí senzibilizace k imunologické interakci? Nestačí. O tom, zda k reakci dojde a zda tato reakce spustí kaskádu biochemických dějů s cílem alergické odpovědi, rozhoduje celá řada dalších faktorů. Výslednou reakci modifikuje

- afinita a avidita IgE protilátek k antigenu, k epitopu
- druhová specifická alergenů (epitopu) a naopak možnosti zkřížené reaktivity
- prostorové uspořádání epitopů
- odolnost bílkoviny vyšším teplotám i proteolýze

- stabilita bílkoviny v kyselém prostředí
- enzymatická aktivita samotné bílkoviny
- posttranslační glykosylace (navazování polysacharidů, tj. cukerných komponent na již hotové bílkoviny) za vzniku glykoproteinů
- přítomnost kofaktorů
- a pochopitelně předchozí, ale i aktuální imunologická připravenost příjemce

Afinita je síla interakce jednoho epitopu s jediným vazebným místem protilátky. Avidita je síla interakce více epitopů s polyvalentní protilátkou (event. protilátkami). Avidita tak upozorňuje na důležitý poznatek, že epitopů může být v jedné alergenní bílkovině (molekule, komponentě) hned několik a obvykle tomu tak i bývá. Některé epitopy jsou méně významné s nižší afinitou, některé významnější s vysokou aviditou. Dokonce se ukazuje, že u některých klíčových epitopů hraje roli jediná klíčová aminokyselina. Například u hlavního alergenu jablka (dle mezinárodní nomenklatury značené jako Mal d 1 = *Mallus domesticus*) došlo na pozici 111 genovou mutací serinu na prolin k významnému snížení afinity specifického IgE k celé Mal d 1 molekule.

Pro alergeny se zkříženou reaktivitou (*cross reactivity*, CR) je příznačné, že krom nutné homologie obsahují aspoň jeden shodný nebo téměř shodný epitop, obvykle s klíčovou aminokyselinou.

Nositelům možné CR je považuje shoda ve více než 50 % biochemického složení příbuzných bílkovin. Z principu ale nikdy nemůže jít 100 % shodu, kdyby za to mohla jen jedna jediná aminokyselina ze sta přítomných. Proto nemůže jít nikdy o 100 % výskyt zkřížených reaktivit mezi příbuznou faunou či florou, byť od jediné čeledi. Příklad: homologní bílkovinou ke zmíněné Mal d 1 je taxonomicky příbuzný broskvový Pru p 1 (*Prunus persica*), ale také botanicky zcela odlišný sójový Gly m 4 (*Glycine max*). Broskvová ribonukleáza je s jablečnou shodná více než v 90 % aminokyselinových sekvencí a proto u alergika k jablku nepřekvapí více než 80 % pravděpodobnost reakce i po požití broskve. Naproti tomu sójová bílkovina je podobná homologní jablečné bílkovině sotva v 60 % a proto bude klinická reakce jablko-sója nepoměrně vzácnější. Vhodné je také vědět, čemu že osudová bílkovina-alergen v té či oné potravíně vlastně slouží. Pak je snadné pochopit, proč alergik k samotnému jablku nemusí reagovat stejnými obtížemi, pokud vystřídá různé druhy jablek. Jednak se obsah příčinného alergenu v jablcích značně geograficky liší, jednak se nepatrně liší i chemie alergenů jablek stejného druhu, ale jiného stromu, a jednak může být obsah citované ribonukleázy dán předcházejícím jablečným stresem. Na možnou nadprodukcii ochranné ribonukleázy může totiž významně zapůsobit vliv ranních mrazíků, doba i prostředí skladování a také možné napadení parazity. Také je vhodné vědět o reálném výskytu, popřípadě chování té či oné bílkoviny v tom či onom plodu, druhu či produktu. Příklad z nejznámějších - hlavní syrovátkový beta-laktoglobulin se - za vysoké míry homologie přesahující 95 % - vyskytuje v mléce kravském, kozím i ovčím. V mléce velbloudím a lidském jej ale nenajdeme. Ovšem jen pokud kojící matka nekonzumuje živočišná mléka, odkud se ve formě syrovátkových, ale i kaseinových polypeptidových fragmentů mohou dostat i se svými potenciálně alergenními epitopy do mléka mateřského (MM). Kvalitativně půjde o sekvenci do 50

aminokyselin, spíše méně a to v podobě peptidů tvořených jen několika málo aminokyselinami. Kvantitativně půjde jen o několik desítek (maximálně stovek) nanogramů na 1 ml MM. I to však může způsobit u citlivých jedinců s genetickým rizikem němou či klinicky patrnou senzibilizaci. Alergie k bílkovinám opravdu není o množství, ale právě o té alergické dispozici.

Mléko

Pokud byla zmíněna mléka, je potřeba upozornit na možnost homologie MM a mléka bovinního. Je nutné s ní počítat? Nepochybně ano a může být i poměrně vysoká. V případě sérového albuminu přes 90 % a v případě syrovátkového alfa-laktalbuminu kolem 70 %. To teoreticky může znamenat i existenci CR mezi mlékem hovězím a mlékem lidským. Důkazů reálné CR je málo, nelze však tuto skutečnost podceňovat (Valenta, 2008).

Epitopy

Prostorové uspořádání epitopů si lze představit z obrázku č.1. Původně **konformační** epitop se zásahem (např. změna pH, tepelná denaturace) poruší se zachováním primární struktury a příslušná protilátka se s ním pak nemůže identifikovat. To je známe například u ribonukleáz, které tepelným zpracováním i běžnou orální proteolýzou ztrácí alergenicitu a v některých případech i imunogenicitu. Naproti tomu kaseiny či gliadiny mají pevné, zakonzervované sekvenční (**lineární**) uspořádání a tak jsou teplu i jiným fyzikálním vlivům včetně vysokého tlaku odolnější. Pro ovlivnění odolných lineárních epitopů může být účinnější proteolýza. V případě štěpení uvnitř samotného epitopu ztrácí protilátka schopnost vazby na rozpadlé pořadí, resp. rozpadlou antigenní sekvenci aminokyselin - viz obrázek č.2. Proteolytický zásah je v zásadě každé trávení, můžeme k němu přiřadit i některé technologie štěpení bílkovin za účelem výroby hypoantigenní (částečná proteolýza) či hypoalergenní (vysoká proteolýza) náhradní stravy.

Složitější vztahy nastávají v případě, kdy nositelem alergenní vazby k bílkovinám nejsou specifické IgE protilátky, ale senzibilizované antigen-specifické nebo epitop-specifické lymfocyty. Těmto dosud ne zcela zmapovaným reakcím dochází u jedinců bez atopické povahy alergie, označované jsou jako **non-IgE reakce**. V případě potravinové alergie budou non-IgE reakce stoupat s nižším věkem potravinového alergika a naopak. U kojenců s alergií na bílkoviny kravského mléka (ABKM) mohou non-IgE mechanismy převládnout dokonce v poměru 9 : 1 a to zvláště u gastrointestinální manifestace ABKM, jakými jsou eozinofilní enterokolitidy a proktokolitidy. Co je poněkud matoucí, tak epitopy pro antigen-specifické lymfocyty nemusí být shodné s epitopy pro IgE vazby. Obsahují zřejmě vyšší počet aminokyselin, fyzikálním či chemickým zásahem opět snadno ztrácí alergenicitu, ale pozoruhodně pevně si zachovávají imunogenicitu. Tento velmi zajímavý jev se využívá v podávání pečené bílkoviny k navození tolerance u původně senzibilizovaného dítěte. Bílkovina, která projde 180 st. C po dobu 20-30 minut, se značně denaturuje a obvykle ztratí schopnost vyvolat alergickou reakci. Na druhé straně si před r. 2009 lékaři z Mount Sinai Univerzity v New Yorku (Nowak-

Wegrzyn, Sampson) všimli, že pečená bílkovina neztrácí schopnost imunogenně kontaktovat četné regulační lymfocyty trávicího traktu. A ty se za pravidelného podávání pečené bílkoviny postarají o dodatečné **navození tolerance**. Dobře je to popsáno u bílkovin kravského mléka i vajíčka a více u IgE zprostředkovaných reakcí. Ve světě alergologie se ujal pojem "muffinová" metoda, podává se okolo 20 ml mléka v jednom upečeném koláčku každý den po dobu několika měsíců. Pochopitelně to předpokládá s prvním muffinem expoziční test, existují totiž jedinci u kterých ani tepelná úprava pečením nezabrání nepříznivým reakcím. Naproti tomu non-IgE reakce u ABKM obvykle takovýto zásah nepotřebují, spontánně ustupují samy a to poměrně rychle od diagnózy se zavedením dietních opatření. Čtyři z pěti non-IgE ABKM vyhasnou do 6 měsíců od nasazení nízkoalergenní diety. Navození tolerance u non-IgE mechanismů pravděpodobně kopíruje podobný mechanismus příznivé imunogenicity, kdy stačí regulačním lymfocytům malý antigenní stimul, například v podobě stop neupravené bílkoviny v preparátech s vysokým štěpením kravské syrovátky.

Kofaktory alergických reakcí

Kofaktorů alergických reakcí způsobené potravinami je známo mnoho, jen u některých je přesně známa i molekulární podstata

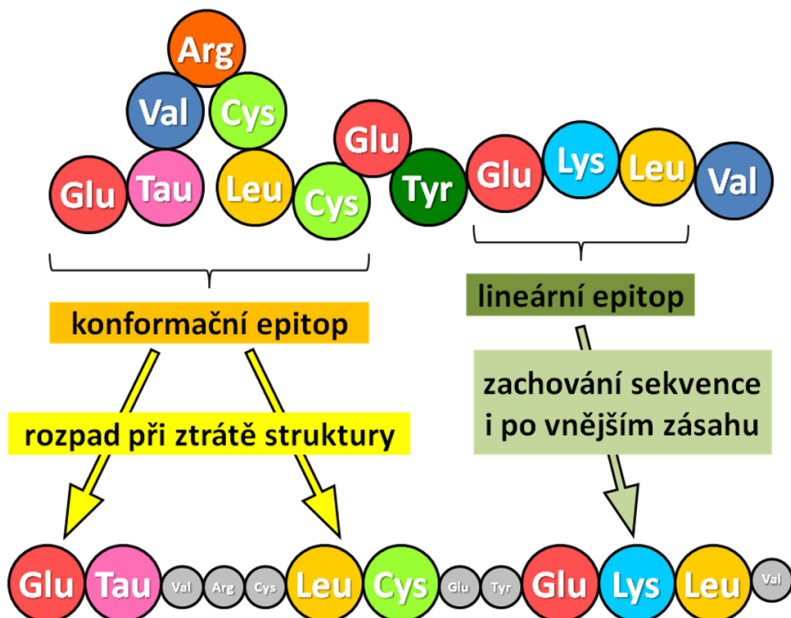
- léky, např. nesteroidní antiflogistika (zvýšení střevní permeability pro bílkoviny, histaminoliberace, ovlivnění prozánětlivých mediátorů - leukotrienů i prostaglandinů)
- námaha (zřejmě toxo-alergický vliv dysbalance hladin meziproduktů energetického metabolismu, popřípadě vliv hormonálně-enzymatické dysbalance a opět negativní ovlivnění střevní bariery)
- alkohol, kofein (přímý farmakologický vliv na prozánětlivé pochody, významná histaminoliberace)
- teplota (také mj. histaminoliberace)
- komorbidity včetně infekcí (léky, teplota, metabolicko-chemické děje včetně nestability imunologické odpovědi, např. komplementového systému)

Glykosylace

A nakonec glykosylace bílkovin. Je známější u endogenně syntetizovaných bílkovin, nicméně přítomnost cukerných komponent na bílkovinách může mnohonásobně zvýšit afinitu alergických protilátek ke glyko-proteinovému komplexu. Pokud k tomu došlo či dochází u exogenně přijímaných bílkovin, pak by mohly být navázané cukry významným kofaktorem nečekaných alergických reakcí, včetně těch velmi závažných. Jeden příklad z poslední doby: opožděné anafylaktické reakce po požití červeného masa savců-neprimátů jsou způsobeny oligosacharidovým epitopem laktózo- α -1,3-galaktózou (**α -gal**). K senzibilizaci přitom dochází po kousnutí klíštětem, u kterých se α -gal nalézá v jejich slinném i trávicím systému. Buď jde o klíšťový α -gal, nebo jde o oligopeptid

původně navázaný na savčí protilátky. Předpokládá to ovšem předchozí přísátí klíštěte například na lesní zvěři a sání jejich krve s bohatstvím α -gal.

Obrázek č.1



Obrázek č.2

