



Masarykova univerzita
Přírodovědecká fakulta
Ústav experimentální biologie
Oddělení fyziologie živočichů a imunologie

**Antigeny krevního systému AB0 ve tkáních a možnosti
jejich určování**

Bakalářská práce

Obsah

1. Úvod.....	6
2. AB0 systém	7
2. 1. Historie AB0 systému.....	7
2. 2. Krevní skupiny AB0 systému.....	9
2. 2. 1. Skupina 0.....	10
2. 2. 2. Skupina A a její podskupiny	11
2. 2. 3. Skupina B a její podskupiny.....	11
2. 2. 4. Skupina AB	11
2. 2. 5. Antigen H.....	12
2. 2. 6. Vylučovatelství (sekretorství)	12
2. 3. Dědičnost	13
2. 4. Zastoupení krevních skupin	15
2. 4. 1. Zastoupení krevních skupin ve světě.....	15
2. 4. 2. Zastoupení krevních skupin v České republice	17
3. Složky AB0 systému	18
3. 1. Erytrocyty	18
3. 2. Antigeny.....	19
3. 3. Protilátky.....	20
3. 4. Aglutinace	22
4. Antigeny krevního systému AB0 ve tkáních a možnosti jejich určování	23
4. 1. Úvod.....	23
4. 2. Metody určování AB0 antigenů.....	24
4. 2. 1. Molekulárně biologické metody určování AB0 antigenů ve tkáních.....	24
4. 2. 2. Serologické metody určování AB0 antigenů ve tkáních	27
4. 3. Antigeny AB0 systému v kostech.....	30
4. 4. Antigeny AB0 systému ve vlasech	31
4. 5. Antigeny AB0 systému v nehtech	32
4. 6. Antigeny AB0 systému v zubech.....	32
5. Krevní transfuze a transplantace	33
6. Závěr	35
Internetové zdroje.....	36
Seznam zkratk	36

Seznam obrázků	37
Seznam tabulek	37
Použitá literatura	38

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím literatury uvedené v seznamu literatury. Chtěla bych poděkovat za spolupráci Mgr. Janě Kamarýtové a panu profesorovi RNDr. Vladimírovi Šimkovi, CSc.

Abstrakt

AB0 systém byl prvním krevním systémem nalezeným u člověka a to již v roce 1901. Později se ukázalo, že tento krevní systém se nenachází pouze v krvi, ale jeho antigeny se vyskytují v podstatě ve všech buňkách v těle, v tělních tekutinách i v mezibuněčné hmotě. Krevně skupinové antigeny byly z počátku identifikovány jako povrchové antigeny erytrocytů a jejich funkce byla hlavně serologická. Později se ukázalo, že tyto antigeny jsou široce rozšířeny i v ostatních buňkách a tkáních. Metody, které se uplatňují k zjišťování antigenů v těchto tkáních, mohou být serologické a v poslední době především molekulárně biologické. Serologické metody jsou nejčastěji využívány k identifikaci pozůstatků jedince, mohou to být např. kosti, vlasy nebo zuby. Molekulárně biologické metody slouží k identifikaci DNA jedince. Pomocí znalostí o AB0 systému lze studovat migraci obyvatelstva a jeho mísení nebo na základě zjišťování antigenů z tkání vyšetřit kriminalistické případy, kde nejsou k dispozici otisky prstů. Tyto poznatky se mohou využívat v lékařství (např. při transfuzích nebo transplantacích), v genetice, v antropologii nebo již zmiňované kriminalistice.

Abstract

AB0 system was the first blood system found in humans already in 1901. Later showed that the blood system is not only in the blood, but its antigens are presented practically in all the cells in the body, body fluids and intercellular mass. Blood group antigens were initially identified as surface antigens erythrocytes and their function was mainly serological. Later it turned out that these antigens are widely distributed in other cells and tissues. Methods that apply to the discovery of antigens in these tissues may be serological and recently in molecular biology. Serological methods are most frequently used to identify the remains of the individual, this can be for example: bones, hair and teeth. Molecular biological methods are used to identify the DNA of the individual. Using of knowledges of the AB0 system can be studied migration of human population and its mixing or based on surveys of antigens from the tissues to investigate forensic science cases where no fingerprints are. Such knowledge may use in medicine (e.g. transfusions or transplantations), in genetics, in anthropology or in criminalistics.

1. Úvod

Krev je životadárná tekutina, která zajímala vědce již od starověku a byla vždy považována za důležitou a vzácnou tekutinu. Vznikaly o ní i různá přísloví, např. v určitých okamžicích by se v člověku „krve nedořezal“, nejsilnější je „krevní pouto“ a o někom říkáme, že nám „pije krev“, o jiném, že je „horkokrevný“ nebo naopak „chladnokrevný“.

Hned z počátku měl objev AB0 systému, jako prvního krevního systému u člověka, velký význam při transfuzích, kde docházelo k mnoha úmrtím. Po tomto objevu mohla být tato úmrtí částečně objasněna a další výzkumy systému AB0 i objevy nových krevních systémů vedly k lepším možnostem při transfuzích i transplantacích. Později byla objasněna i otázka dědičnosti krevně-skupinových vlastností systému AB0. Tyto vlastnosti se dědí z rodičů na děti podle Mendlových zákonů dědičnosti.

AB0 systém je charakterizován antigeny na erythrocytech a protilátkami v séru. Antigeny tohoto systému se nenacházejí pouze v krvi, ale také i na ostatních tkáních. Antigenům AB0 systému se věnují různá odvětví antropologie. Může to být historická antropologie, která se zabývá vznikem a vývojem lidských populací i člověka samotného, nebo forenzní antropologie, která je úzce spjata s kriminalistikou. Aby se antigeny AB0 systému daly dále studovat, byly k tomuto účelu vytvořeny různé metody. Většina z nich je serologických, ale i molekulárně biologické, hematologické nebo genetické.

2. AB0 systém

2. 1. Historie AB0 systému

Objev krevních skupin AB0 systému je všeobecně připisován vídeňskému vědci Karlu Landsteinerovi, který v roce 1901 objevil tři krevní skupiny A, B a C (dnešní A, B a 0). Za tento objev dostal roku 1930 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. Landsteiner provedl jednoduchý pokus se sérem a krvinkami šesti kolegů. Všechny vzorky pocházely ze zdravých jedinců, čímž vyloučil, že reakce je patologického původu či následek bakteriální infekce. Na základě dalších pokusů klasifikoval populaci do tří skupin. Landsteiner předpokládal, že vlastnosti krve jsou založeny na přítomnosti či nepřítomnosti dvou aglutinogenů A a B a dvou protilátek – aglutininů anti-A a anti-B. Dokázal, že séra neobsahují protilátky proti svým vlastním antigenům. Skupinu, která má protilátky anti-A i anti-B pojmenoval C (později 0) (Daniels, 2002).

Obrázek č. 1: Karl Landsteiner (URL 1) a Jan Janský (URL 2)



Roku 1902 popsali rakouští vědci Alfred van Descatello a Adriano Sturli krevní skupinu AB jako „výjimku z Landsteinerova pravidla“. Skupina AB je ze všech skupin nejvzácnější a nevlastní žádnou protilátku (Daniels, 2002).

Roku 1907 nezávisle na nich popsal tři známé krevní skupiny český psychiatr Jan Janský a navíc i čtvrtou krevní skupinu, která obsahuje znaky A i B. Janský používal označení skupin I, II, III a IV. Tento zásadní objev však nebyl oceněn - Janský se sám výzkumu krve dále nevěnoval (Malaska, 1957).

Nezávisle na Janském popsal roku 1910 také čtyři krevní skupiny Američan William Lorenzo Moss. Použil také označení římskými číslicemi I–IV, ale v opačném pořadí než Janský (Malaska, 1957).

Označení krevních skupin jako A, B, AB a 0 bylo zavedeno až ve třicátých letech 20. století (Malaska, 1957).

Stacy Epstein a Larry Ottenberg předpokládali, že krevní skupiny jsou děděny. V roce 1910 Emil Freiherr von Dungern a Ludwig Hirschfeld to potvrdili a zjistili, že pro ně platí Mendlovy zákony dědičnosti (Daniels 2002).

V roce 1924 Bernstein popsal teorii, ve které říká, že pouze tři alely na jednom lokusu jsou nezbytné pro vyjádření AB0 dědičnosti. Později se zjistilo, že někteří lidé s krevní skupinou A produkují protilátku, která aglutinuje erythrocyty skupiny A u jiných lidí. Z toho to důvodu byla skupina A rozdělena na dvě podskupiny – A_1 a A_2 . Bernsteinova teorie tří alel byla díky Thomsenovi a kol. rozšířena o čtvrtou alelu. Byly to tedy alely A_1 , A_2 , B a 0. Dnes už víme, že existují i další podskupiny skupin A a B (Daniels 2002).

V padesátých letech dvacátého století se začaly studovat vztahy mezi antigeny A, B a H a jejich sacharidových jednotek. Později byla potvrzena jako primární genový produkt glykosyltransferáza a byla objasněna cesta biosyntézy antigenů na povrchu erythrocytů nebo v tělních tekutinách (Daniels, 1999).

V roce 1970 byla probádána biochemická podstata.

V roce 1990 se přišlo na nukleotidovou sekvenci genu AB0, později byla objasněna i jeho organizace (Daniels, 1999).

2. 2. Krevní skupiny AB0 systému

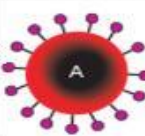
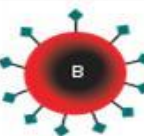
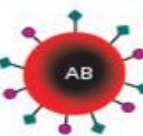









Krevní skupina nebo přesněji krevní typ je popis vlastností erytrocytů jedince, respektive sacharidů a bílkovin na jejich buněčné membráně. Dvě nejdůležitější klasifikace pro popis lidských krevních skupin jsou systém AB0 a Rh faktor. V současné době je známo dalších zhruba 50 systémů krevních typů. Většina z nich jsou mnohem méně obvyklé než AB0 a Rh. Rh faktor je krvinkový aglutinogen. Osoby, u kterých se vyskytuje (85 % populace) jsou Rh pozitivní (Rh+), ostatní jsou Rh negativní (Rh-) (Pecka, 2002 a Klener, 2003).

Krevní skupina je určena antigeny na povrchu erytrocytů. Některé z antigenů jsou čisté bílkoviny, jiné jsou tvořeny bílkoviny s polysacharidy (Malaska, 1957).

Systém AB0 se dělí na čtyři základní skupiny, které jsou charakterizovány antigeny na erythrocytech a tvorbou protilátek v séru. Jednotlivé skupiny AB0 systému se také dělí podle toho, zda se jejich erythrocyty shlukují nebo neshlukují s krevní plazmou nebo sérem jiných lidí. Antigeny na erythrocytech jsou látky shlukovatelné a označují se velkými písmeny A nebo B. V krevní plazmě jsou látky shlukující, označované jako protilátky anti-A nebo anti-B. Setká-li se antigen A s protilátkou anti-A nebo antigen B s protilátkou anti-B dojde ke shluknutí erythrocytů (Malaska, 1957).

Rozlišujeme 4 základní krevní skupiny: A, B, AB a 0.

Tabulka č. 1: Krevní skupiny systému AB0 (URL 3).

	Skupina A	Skupina B	Skupina AB	Skupina 0
Erythrocyty				
Protilátky	 Anti-B	 Anti-A	neobsahuje protilátky	  Anti-A Anti-B
Antigeny	A antigen 	B antigen 	A antigen B antigen  	neobsahuje antigeny

Z tabulky vyplývá, že skupina A má na erytrocytech antigen A a v séru je pouze protilátka anti- B. Krevní skupina B má na erytrocytech antigen B a v séru protilátku anti-A. Skupina AB na erytrocytech má antigen A i B, ale v séru nejsou žádné protilátky. Skupina 0 nemá na erytrocytech žádné antigeny, zato v séru jsou protilátky anti-A i anti-B.

Za normálního stavu jsou v krvi přítomny pouze ty protilátky, které nejsou namířené proti přítomným antigenům na erytrocytech, jinak by docházelo k lýzi erytrocytů. Tento fakt je velmi důležitý při krevních transfúzích. Např. pacient s krevní skupinou A v žádném případě nesmí dostat krev skupiny B, protože pacientova krev obsahuje protilátky anti-B, které by způsobily lýzi erytrocytů dárčovy krve, což by velmi poškodilo zdraví pacienta (může nastat i smrt). Lidé s krevní skupinou AB, jsou univerzální příjemci všech krevních skupin, protože jejich krevní plazma neobsahuje žádné protilátky. Lidé s krevní skupinou 0, jsou univerzální dárči pro všechny krevní skupiny, protože jejich erytrocyty neobsahují žádné antigeny (Pecka, 2002 a Klener, 2003).

Na světě je nejčastější krevní skupina 0, ale v některých oblastech (například ve Švédsku a v Norsku, ale také v České republice) je nejběžnější skupina A. Skupina AB je nejméně častá. Jsou popsána určitá regionální a rasová rozdělení lidské krve podle přítomnosti antigenů AB0. Podíl krevních skupin ve světě je následovný: 60 % populace má skupinu 0, 21% skupinu A, 15 % skupinu B a 4% populace má krevní skupinu AB (URL 4).

2. 2. 1. Skupina 0

Skupina 0 je nejběžnější ve světové populaci a je považována za původní skupinu, ze které se vyvinuly ostatní skupiny (D'Adamo, 2002). Na erytrocytech nemá antigeny A ani antigeny B, ale pouze antigen H, který je prekurzorem antigenu A a B. V krevním séru se nacházejí protilátky anti-A i anti-B. Někdy se souhrnně označují jako anti-A, B, protože tyto protilátky mají křížovou reaktivitu (Daniels 2002).

2. 2. 2. Skupina A a její podskupiny

Krevní skupina A je druhá nejběžnější skupina na světě. Na jejich erytrocytech se nachází antigen A. V krevním séru je protilátka anti-B. Erytrocyty skupiny A jsou aglutinovány protilátkou anti-A, která se nachází v krevním séru skupiny B a 0. A antigeny jsou cukerné determinanty glykoproteinů. Terminálním imunodominantním monosacharidem glykoproteinu antigenu A je N -acetylgalaktosamin (Daniels 2002).

Skupina A byla rozdělena na dvě podskupiny – A₁ a A₂. A₁ většinou neobsahuje žádný H-antigen, zatímco A₂ podskupina tento antigen obsahuje. Oba tyto geny (gen pro A₁ i gen pro A₂) kódují glykosyltransferázu A, ale A₂ glykosyltransferáza je při přeměně prekursorního H antigenu na A antigen méně efektivní než A₁ glykosyltransferáza (URL 5). Do dnešní doby byly objeveny další podskupiny, z nichž některé aglutinují s anti-A (A₃) a některé většinou neaglutinují s anti-A (A_x, A_{end}, A_m) (Daniels 2002).

2. 2. 3. Skupina B a její podskupiny

Gen pro krevní skupinu B se objevil na konci neolitu v Himalájích, dnešní Pákistán a Indie. Byl reakcí na změny životního prostředí a nové typy infekcí (D'Adamo, 2002).

Skupina B má na svých erytrocytech antigen B a v krevním séru protilátku anti-A. Tyto erytrocyty jsou aglutinovány protilátkou anti-B, tzn. skupiny A a 0. Na rozdíl od antigenu A je zde cukernou determinantou galaktosa (Daniels, 2002).

I tato skupina má své podskupiny, ale jsou mnohem vzácnější než u skupiny A. Jsou to např. podskupiny B₃, B_x, B_m nebo B_{el} (Daniels, 2002).

2. 2. 4. Skupina AB

Na rozdíl od skupiny 0 je tato skupina považována za nejmladší a za nejvzácnější. Vznikla nejspíše prolínáním skupiny A od kavkazských lidí a skupiny B od mongolské populace (D'Adamo, 2002). Na erytrocytech nacházíme dva typy antigenů a to jak antigen A, tak i antigen B. Ale v krevním séru nejsou obsaženy žádné protilátky. I skupina AB má své podskupiny, nejdůležitější z nich jsou A₁B a A₂B (Daniels 2002).

2. 2. 5. Antigen H

Antigen H se skládá z glykanových jednotek obsahujících cukr fukózu. Tyto jednotky se nacházejí na glykolipidech a glykoproteinech membrán erytrocytů nebo na mucinových glykoproteinech ve slinách. H antigen je prekursorem pro ostatní typy antigenů (URL 6).

Pokud je v buňce přítomen gen pro glykosyltransferázu A, který preferenčně rozeznává N-acetylgalaktosamin a připojí jej na H antigen, vzniká krevní skupina A. Glykosyltransferáza B preferenčně rozeznává D-galaktózu a připojuje ji na H antigen a tím tvoří antigen B., z toho také vyplývá určení skupin A a B. Skupina AB obsahuje obě transferázy, skupina 0 neobsahuje transferázu žádnou (Daniels, 2002).

2. 2. 6. Vylučovatelství (sekretorství)

V roce 1925 bylo objeveno tzv. vylučovatelství. Jedná se o rozdělení lidské populace na dvě pomyslné skupiny: sekretory (asi 80% populace), kteří mají genotyp SeSe nebo Sese a nonsekretory, kteří mají genotyp sese. Antigeny A, B, H sekretorů nejsou přítomny pouze v krvi, ale jsou vylučovány i do ostatních tělních tekutin. (př. moč, slzy, sliny, ...). Nonsekretoři mají specifické látky pouze v buňkách, ty jsou na rozdíl od sekretorů rozpustné ve vodě (Daniels 2002).

2. 3. Dědičnost

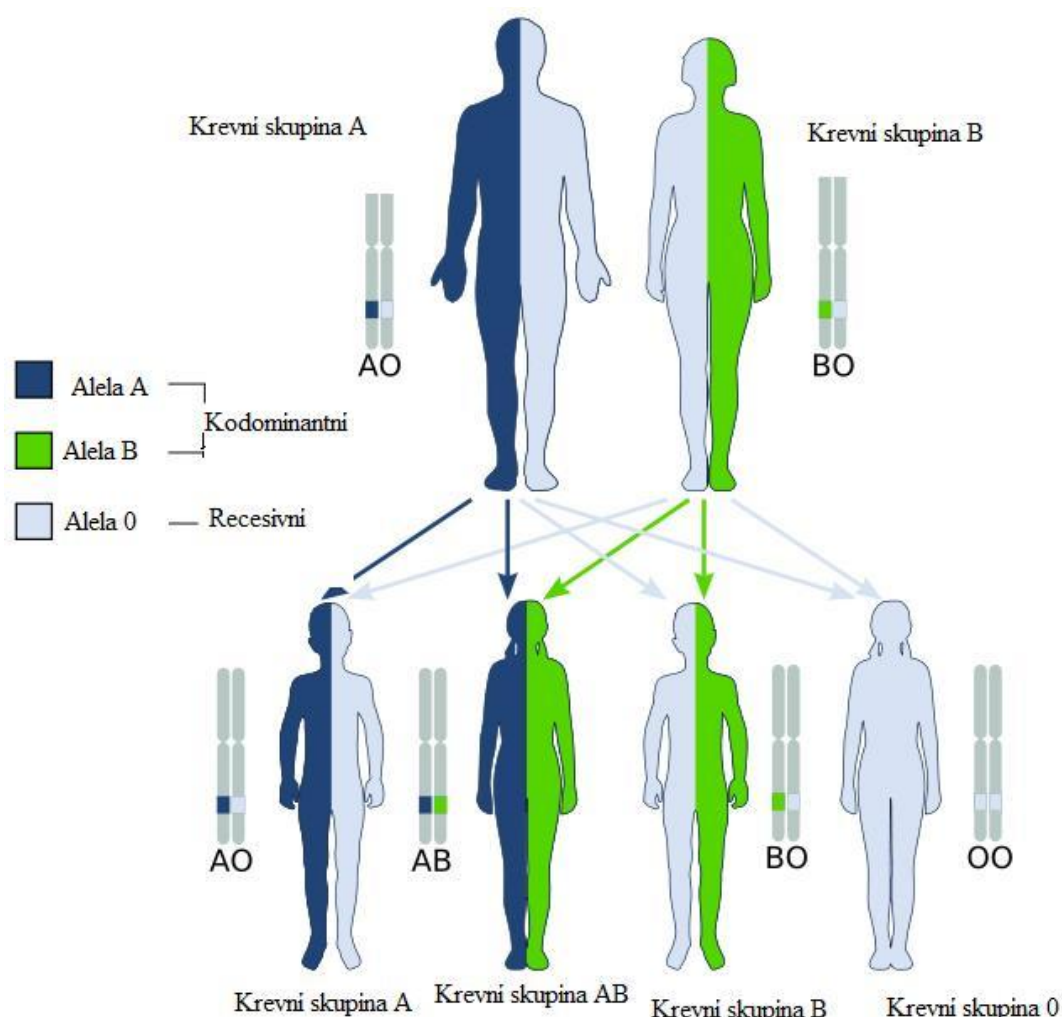
Krevně-skupinové vlastnosti se dědí podle Mendlových zákonů dědičnosti a přecházejí z rodičů na děti. Krevně-skupinové vlastnosti jsou pro člověka geneticky determinovány a po celý život se nemění (Malaska, 1957).

Tabulka č. 2: Dědičnost krevních skupin (Malaska, 1957)

Matka		Otec		Dítě	
Fenotyp	Genotyp	Fenotyp	Genotyp	Genotyp	Fenotyp
A ₁	A ¹ A ¹ A ¹ A ² A ¹ 0	A ₁	A ¹ A ¹ A ¹ A ² A ¹ 0	A ¹ A ¹ A ¹ A ² A ² A ² A ¹ 0 00	A ₁ A ₂ 0
A ₂	A ² A ² A ² 0	A ₁	A ¹ A ¹ A ¹ A ² A ¹ 0	A ¹ A ² A ¹ 0, A ² A ² 00, A ² 0	A ₁ A ₂ 0
A ₂	A ² A ² A ² 0	A ₂	A ² A ² A ² 0	A ² A ² A ² 0 00	A ₂ 0
B	BB B0	A ₁	A ¹ A ¹ A ¹ A ² A ¹ 0	A ¹ B A ² B A ¹ 0 A ² 0 B0 00	A ₁ B A ₂ B A ₁ A ₂ B 0
B	BB B0	A ₂	A ² A ² A ² 0	A ² B A ² 0 B0, 00	A ₂ B A ₂ B,0

Krevně-skupinový systém AB0 je určen lokusem na dlouhém raménku 9. chromozomu. Většina lidských genů, včetně těch pro AB0 systém, jsou geny polymorfní, to znamená, že obsahují více než 2 alely. Typický lidský gen kóduje enzym, který připojuje molekuly sacharidu k molekulám lipidů na povrch erytrocytů. Tento sacharid je antigenem a je rozeznáván imunitním systémem. Gen kóduje enzym, který označujeme písmenem I. Gen I obsahuje 3 možné alely; alelu I^A (připojuje modifikovanou formu cukru galaktosamin), alelu I^B (připojuje disacharid galaktózu) a alelu I^0 , která k sobě nepojí žádný sacharid. Alely A a B jsou dominantní, alela 0 je recesivní. Alely A a B jsou k sobě navzájem kodominantní, protože každá působí v organismu svým vlastním efektem (URL 6).

Obrázek č. 2: Dědičnost AB0 skupin (URL 7)

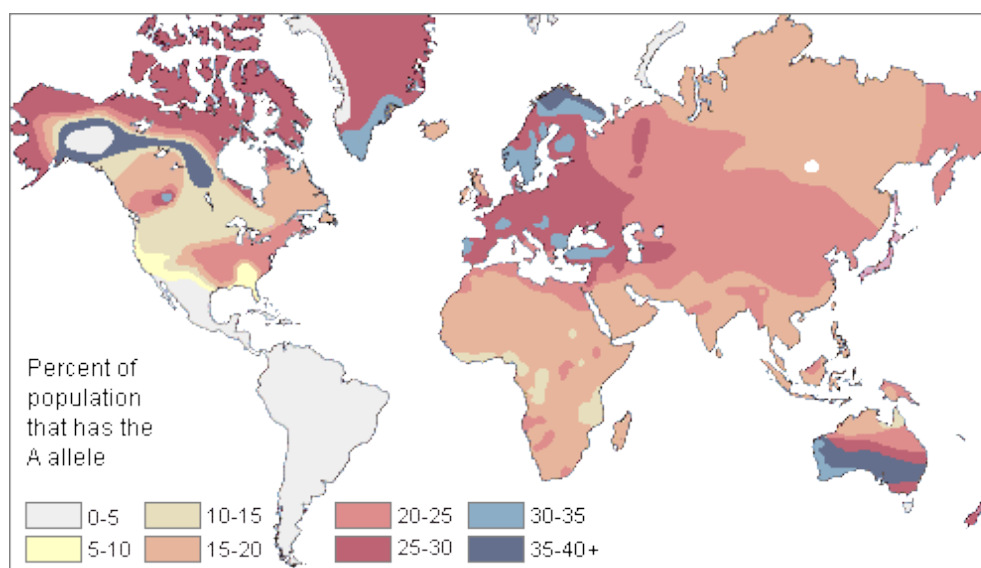


2. 4. Zastoupení krevních skupin

2. 4. 1. Zastoupení krevních skupin ve světě

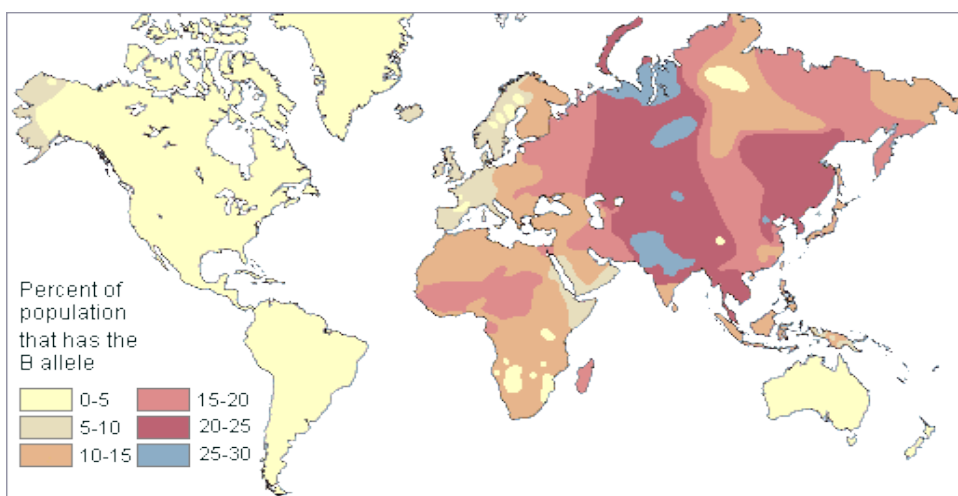
Krevní skupinu A sdílí asi 21% lidí ve světě. Nejvyšší četnost skupiny A nalzáme u různých nesouvislých národů, zvláště u indiánů z Montany (30-35%), u australských domorodců (40-53%), Laponců a v severní Skandinávii (50-90%). Skupina A má několik podskupin. Nejznámější jsou A_1 a A_2 . A_1 má asi 95% nositelů krevní skupiny A. A_2 se nejčastěji nachází na Islandu a ve Skandinávii (D'Adamo, 2002).

Obrázek č. 3: Zastoupení krevní skupiny A ve světě (URL 4)



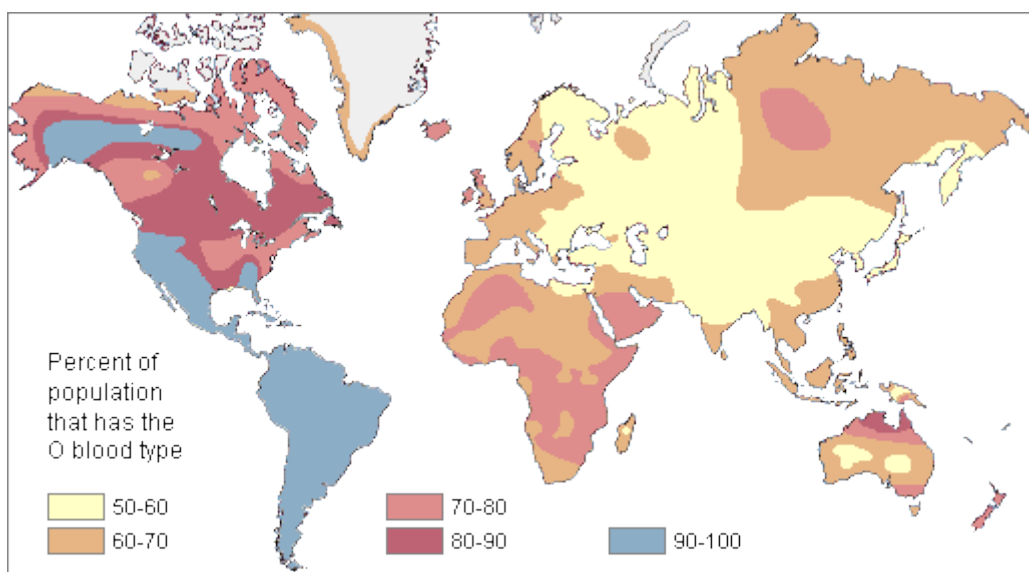
Krevní typ B je nejvíce zastoupen ve střední Asii a nejméně se nachází v Austrálii a v Americe. Tento typ je poměrně vzácný, má ho pouze 15% obyvatel (D'Adamo, 2002).

Obrázek č. 4: Zastoupení krevní skupiny B ve světě (URL 4)



Skupina 0 je velmi běžná, má ji asi 60% lidí ze světové populace. 0 je nejčastější mezi původními obyvateli Střední a Jižní Ameriky (téměř 100%), ale také mezi australskými Aboriginesy a v západní Evropě (zvláště v obyvatelstvu s keltskými předky). Nejnížší četnost 0 by se našla ve východní Evropě a Střední Asii, kde je běžný typ B (D'Adamo, 2002).

Obrázek č. 5: Zastoupení krevní skupiny 0 ve světě (URL 4)



Z toho to vyplývá, že od západu k východu ubývá A a přibývá B. Nejvíce A mají Eskymáci a Laponci, nejvíce B mají Korejci a 0 je nejčastější u Španělů a indiánů z Jižní Ameriky – ti mají někteří dokonce až 100% (D'Adamo, 2002)

Určitý typ krevní skupiny je také náchylný k různým nemocem. Infekční choroby jsou podobné antigenům A, B, H, to znamená, že k určitým chorobám jsme náchylnější nebo naopak jsme odolnější. V minulosti byli lidé nuceni stěhovat se z místa na místo. Museli se přizpůsobit různým přírodním podmínkám a i jejich imunitní systém se měnil. Každá krevní skupina může být náchylnější k jiným virům a bakteriím (D'Adamo, 2002).

V roce 1953 se našlo spojení mezi krevními skupinami a chorobami. Např. rakovinou trpí častěji lidé s krevní skupinou A, problémy s trávicím traktem a s vředy je spojen se skupinou 0. Cholera nejvíce postihuje krevní skupinu 0 (patří sem i průjmová onemocnění). Na druhou stranu je 0 odolná vůči syfilitýdě, má silnější imunitní reakci než A, B a AB. Původcem je trypanosoma. *Jersinia pestis*, původce moru, má antigeny podobné antigenu H. Je tedy známo, že lidé se skupinou 0 měli vyšší úmrtnost na mor než u ostatních skupin. Neštovicemi trpí nejvíce nosiči krevních skupin A a AB (nemají protilátku anti – A). Kde byly nákazy moru a neštovic přežívala skupina B – Indie, Čína. Malárie nejčastěji postihuje skupinu 0, protože komáři zřejmě preferují 0 (ústní projev doc. Drozdová).

2. 4. 2. Zastoupení krevních skupin v České republice

Tabulka č. 3: Zastoupení krevních skupin v České republice (URL 8)

A – 41%	B – 18%	AB – 9%	0 – 32%
---------	---------	---------	---------

3. Složky AB0 systému

3. 1. Erytrocyty

Erytrocyty neboli červené krvinky jsou nejběžnější buňky v krvi. Jejich hlavní funkcí je přenos kyslíku a oxidu uhličitého v organismu. Tyto buňky u savců neobsahují jádro (nemohou se tedy dělit) a mají bikonkávní tvar. Obsahují krevní barvivo hemoglobin. Hemoglobin obsahuje železo, které je schopno na sebe vázat kyslík a oxid uhličitý (Pecka, 2002 a Klener, 2003).

V embryonálním období, až do poloviny zárodečného života, erytrocyty vznikají v játrech, později se přidává slezina a kostní dřev. Erytrocyty se v dospělosti vyvíjí v kostní dřeví dlouhých kostí procesem zvaným erytropoéza. Erytropoéza začíná hemopoetickou kmenovou buňkou, ze které později vzniká progenitorová myeloidní buňka. Ve fázi erytoblastů dochází ke ztrátě jádra. Erytropoéza je stimulována hormonem erythropoetinem (EPO), který vzniká v ledvinách (Dean, 2005).

Membránové molekuly na povrchu erytrocýtů mají rozmanitou funkci. Podílí se na přenosu iontů a molekul přes buněčnou membránu. Mají adhezní funkci, která jim umožňuje prostupovat cévními vlasečnicemi. Takto zabraňují prostupu leukocytů z postižené tkáně a díky tomu může dojít k jejich aktivaci. Dále se na povrchu erytrocýtů nacházejí i receptory pro chemokinové molekuly. Pomocí membránových molekul mohou do erytrocýtů vstupovat různá infekční agens (Dean, 2005).

Proteiny v membráně jsou zodpovědné za deformovatelnost, pružnost a trvanlivost erytrocýtů. Na povrchu se také nacházejí sacharidové epitopy – antigenní struktury, které určují krevně – skupinovou charakteristiku. Antigeny na povrchu jsou rozeznávány protilátkami jiných krevních skupin a tím se podílí na imunitě organismu. Při transfusích může tento mechanismus způsobovat řadu problémů (Dean, 2005).

3. 2. Antigeny

Antigeny vyvolávají imunitní odpověď, méně často bývají označovány jako imunogeny. Imunogen je kompletní antigen složený z nosiče, haptenu a epitopu. Vždy se jedná o makromolekuly, většinou bílkoviny. Na povrchu buněk a mikroorganismů se vyskytují nejčastěji jako glykoproteiny, někdy i jako polysacharidové struktury. Samotné lipidy tuto funkci nemají, mohou však zesilovat imunitní odpověď na antigen bílkovinný a působit tak coby adjuvans. Jako antigen mohou dokonce vystupovat deoxyribonukleová kyselina a jiné polynukleotidy (Mayer, 2006).

Molekuly A, B a H jsou z imunologického hlediska antigeny, které stimulují u cizího organismu imunitní systém k tvorbě protilátek (Daniels, 2002).

Tabulka č. 4: Struktura antigenů A, B a H na povrchu erytrocytů (URL 6)

Antigen	Struktura	Minimální určující skupina
H		Fuc- α 1 \rightarrow 2-Gal- β 1-R
B		Gal- α 1 \rightarrow 3-Gal- β 1-R Fuc- α 1 \rightarrow 2
A		GalNAc- α 1 \rightarrow 3-Gal- β 1-R Fuc- α 1 \rightarrow 2

Na reakci antigenu s protilátkou se neúčastní celá molekula antigenu, ale jen některé její části, tzv. determinantní skupiny, neboli epitopy. Jimi mohou být už zmiňované hapteny (Mayer, 2006). Hapten je nosič. Epitop je zodpovědný za vlastní imunogenitu antigenu. Nekompletní antigeny neobsahují epitopy a jsou tedy neimunogenní (Daniels, 2002). Antigeny můžeme podle původu dělit do pěti skupin. Allogenní antigeny pocházejí od jiného jedince stejného druhu. Autologní mají původ v jednom jedinci. Isogenní jsou od jiného jedince se stejnou genetickou výbavou (př. jednovaječná dvojčata). Syngenní pocházejí z inbredních linií. Xenogenní jsou od jiného jedince jiného druhu (Daniels, 2002).

3. 3. Protilátky

Protilátky neboli imunoglobuliny (zkráceně Ig) jsou globuliny, které se nacházejí v krevní plazmě, někdy se vyskytují i v jiných tělních tekutinách. Jsou součástí imunitního systému, kde se podílí na identifikaci a neutralizaci cizích antigenů (Daniels, 2002).

Ig mají stejnou základní strukturu, skládají se minimálně ze dvou těžkých řetězců a dvou lehkých řetězců. Každý řetězec má dvě oblasti, konstantní a variabilní. Ačkoli základní struktura protilátek je stejná, ve variabilní oblasti se liší. Tím vznikají Ig s odlišnými strukturami a různými vazebnými místy pro antigen. Antigen se navazuje na úseky těžkých a lehkých řetězců protilátek. Bezprostřední kontakt umožňují hypervariabilní úseky (Mayer, 2006).

Lehké řetězce mají dva typy – κ a λ . Ig s tímto typem řetězců mají stejné konstantní C úseky a liší se pouze v úsecích variabilních V. Úseky lehkých řetězců se značí $V_{\kappa}C_{\kappa}$ a $V_{\lambda}C_{\lambda}$.

Těžké řetězce se dělí na pět typů – γ , α , μ , δ a ϵ . Opět Ig s tímto typem řetězců mají stejné konstantní C úseky a liší se v úsecích variabilních V. Podle typů těžkých řetězců se Ig dělí do pěti tříd – IgA s typem $V_H C_{\alpha}$, IgD s typem $V_H C_{\delta}$, IgE s typem $V_H C_{\epsilon}$, IgG s typem $V_H C_{\gamma}$ a IgM s typem $V_H C_{\mu}$ (Mayer, 2006).

Lidé mají tedy pět typů protilátek známé jako IgA, IgD, IgE, IgG a IgM.

IgA je dimer a je to hlavní aktér slizniční imunity (např. ve střevě, dýchacích cestách), ale také v slzách, slinách a mateřském mléce.

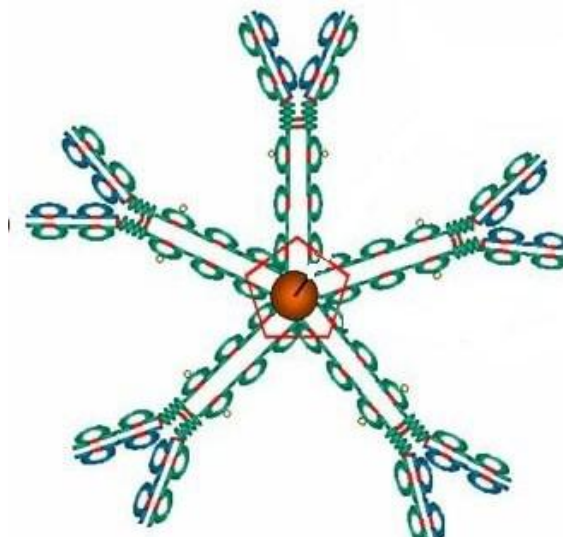
IgD je strukturně monomer, monomery jsou i IgE a IgG. IgD se nachází v nízké hladině v séru. Dále se nachází na B-lymfocytech, kde funguje jako receptor pro antigen.

IgE se velmi pevně váže k Fc receptorům na bazofilech a žírných buňkách. Podílí se na alergických reakcích.

IgG je hlavní imunoglobulin v séru, je také nejvšestrannější, jako jediný imunoglobulin dokáže procházet placentou. Má čtyři podtřídy, které se liší v počtu disulfidických můstků.

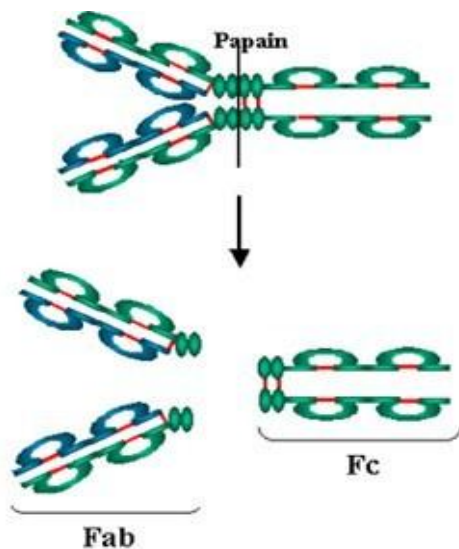
IgM je v séru pentamer, je také prvním imunoglobulinem v plodu. Jsou to velmi efektivní protilátky, které vedou k lýzi mikroorganismů. Váže se na buňky přes Fc receptor. Na B-lymfocyty se váže jako monomer, kde slouží (podobně jako IgD) jako receptor (Mayer, 2006).

Obrázek č. 6: Pentamer IgM (Mayer, 2006).



Imunoglobuliny se dají rozštěpit pomocí enzymu papainu na dva fragmenty. Fab fragment má schopnost vazby s antigenem a Fc fragment, který obsahuje dva zbývající řetězce. Při štěpení pepsinem vznikají F (ab)₂ fragmenty. Jsou to Fab fragmenty, které jsou spojené, protože pepsin štěpí pod místem disulfidické vazby mezi oběma řetězci (Mayer, 2006).

Obrázek č. 7: Štěpení imunoglobulinů papainem (Mayer, 2006)



3. 4. Aglutinace

Podstata spočívá v reakci protilátky s korpuskulárním antigenem, která vede ke vzniku aglutinátu. Korpuskulární antigen musí na svém povrchu nést větší počet antigenních determinant. Tyto antigeny se nacházejí na povrchu bakteriálních buněk nebo erytrocytů a s protilátkou aglutinují (Ferenčík, 1989).

Při aglutinaci dochází k provázání antigenních determinant a tím i antigenních částic přes Fab fragmenty protilátek. Nejlépe aglutinují protilátky IgM (díky tomu, že je pentamer). Důležitou roli má vzájemný poměr reagujících složek. V přebytku antigenu aglutinát nevzniká, protože není dostatek protilátek na provázání molekul antigenu. Stejně tak nevzniká aglutinát při přebytku protilátky, protože hodně vazebných míst na protilátkách zůstává volných a nemůže dojít k provázání molekul antigenu (Ferenčík, 1989).

Rozlišuje se aglutinace přímá (výše popsany proces) a nepřímá, kdy se reakce účastní tzv. inkompletní neboli nekompletní protilátky. Tyto protilátky sice obsadí vazebná místa na antigenu, ale nedojde k aglutinaci. Na průkaz inkompletních protilátek bylo vyvinuto několik metod. Nejčastější je tzv. Coombsův test: inkompletní protilátky navázané na povrchu antigenních částic (např. erytrocytů) se prokazují pomocí antiglobulinového séra, tedy protilátek proti protilátkám. Přídavek tohoto antiglobulinového séra způsobí aglutinaci, pokud jsou ve vzorku inkompletní protilátky přítomny (Ferenčík, 1989).

Někdy se při aglutinaci používají latexové částice, na jejichž povrch se váže původně solubilní antigen a výsledná aglutinace je potom dobře pozorovatelná (Ferenčík, 1989).

Další modifikací je tzv. hemaglutinace, kdy korpuskulárním antigenem jsou erytrocyty. Výsledný shluk erytrocytů je dobře pozorovatelný pouhým okem a je dostatečně pevný při standardním způsobu třepání. Nevýhodou hemaglutinace je nízká citlivost a omezená životnost erytrocytů (Mayer, 2006).

Podobný princip jako při aglutinaci se uplatňuje také při precipitaci. Rozdíl mezi aglutinací a precipitací spočívá v tom, že při precipitaci není antigen korpuskulární, ale solubilní a výsledkem je vznik precipitátu, tedy zákalu. Solubilní antigen se váže na rozpustné molekuly. Stejně jako při aglutinaci vzniká precipitát pouze při optimálním vzájemném poměru reagujících složek (Ferenčík, 1989).

Komplexy antigen-protilátka mají různou velikost. Malé komplexy mají krátký poločas, neváží komplement a nejsou patogenní. To však neplatí o komplexech střední velikosti: ty se ukládají do tkání a pro různé choroby mohou být charakteristickým rysem (Mayer, 2006).

4. Antigeny krevního systému AB0 ve tkáních a možnosti jejich určování

4. 1. Úvod

Krevně skupinové antigeny byly z počátku identifikovány jako povrchové antigeny erytrocytů a jejich funkce byla hlavně serologická. Později se ukázalo, že tyto antigeny jsou široce rozšířeny i v ostatních buňkách a tkáních. Fylogenetické studie zjistily, že erytrocyty tyto antigeny v minulosti získaly. Přesto zůstávají erytrocyty hlavními nositeli krevně skupinových antigenů. Předchůdce antigenních struktur lze nalézt i na neutrofilech, lymfocytech a monocytech. Antigeny se vyskytují v podstatě ve všech buňkách v těle, v tělních tekutinách i v mezibuněčné hmotě. Krevně skupinové antigeny, které se nacházejí na jiných buňkách než na erytrocytech, se nazývají tkáňově-krevní skupinové antigeny (Ravn a Dabelsteen, 2000).

Studie prokázaly, že tkáňově-krevní skupinové antigeny se nacházejí i v nádorech. Znalost a distribuce těchto antigenů mají důležitý význam pro hodnocení nádorů a jejich změn. Techniky, které se uplatňují při zjišťování antigenů ve tkáních, jsou serologické a v poslední době především molekulárně biologické (Nishi, 2005).

Krevně skupinové antigeny představují terminální část oligosacharidového řetězce spojeného s lipidy nebo proteiny. Hlavním zdrojem tkáňově-krevních skupinových antigenů jsou epiteliální tkáň a jejich sekrety. Epitely ekto-, mezo- i endodermálního původu vykazují tyto antigeny, pouze na neuroektodermu jich je malé množství. Tkáňově-krevní skupinové antigeny se vyskytují i v ústrojí trávicím (jícen, jazyk, vrstevnatý epitel ústní dutiny, žaludek, střevo, slinné žlázy, játra), dýchacím (plíce), rozmnožovacím (děloha, pochva, prostata, varlata, semenné vajíčky, sperma), vylučovacím (uroteliální buňky, ledviny, moč), v kůži a v potních a mazových žlázách. Dále se nacházejí v kostech, vlasech, nehtech a zubech. (Ravn a Dabelsteen, 2000).

4. 2. Metody určování AB0 antigenů

4. 2. 1. Molekulárně biologické metody určování AB0 antigenů ve tkáních

Molekulárně biologické metody jsou založeny na analýze DNA, která se od roku 1983 neustále rozvíjí. Již ve svých počátcích byla analýza DNA prohlášena za nejspolehlivější metodu při identifikaci lidského jedince, zjišťování otcovství, rodokmenu a do konce i při zkoumání prehistorických nálezů. Analýza DNA nepotřebuje k identifikaci velkou část tkáně nebo velké množství krve, ale vystačí jen s několika tělesnými buňkami (Musil, Konrád a Suchánek, 2004).

Molekula DNA kóduje genetický materiál všech buněk těla obsahujících jádro – tkáně, kosti, kořínky vlasů, kořene nebo dřeně zubů, spermatu, bílých krvinek a mnoha buněk ve slinách a moči. V dvouřetězcové molekule DNA je uložena veškerá genetická informace jedince (část také v mitochondriích). Gen je úsek chromozomu se specifickou sekvencí nukleotidu. Geny se nacházejí na lokusech, což jsou typická místa na chromozomech. Dnes už je lidský genom zmapován a jsou známa konkrétní místa výskytu potřebné informace. Jsou tedy známa i místa, která jsou specifická pro rozluštění genotypu krevních skupin. Na rozdíl od sérologických metod není metoda analýzy DNA ovlivněna kontaminací a vlivem vnějšího prostředí (Innes, 2001).

4. 2. 1. 1. PCR (polymerase chain reaction) metoda

PCR je molekulárně genetická metoda, která se používá při stanovení AB0 systému. Díky této technice se může namnožit určitá část DNA bez pomoci buněk. Pomocí PCR můžeme určovat systém AB0 nejen z vlasů a nehtů, ale také z mumifikované tkáně, například se zjistila DNA analýza lidských tkání u starých egyptských mumií (Lee a Chang, 1992), namnožení DNA ze 40 000 let starého srstnatého mamuta, mDNA u neandrtálců, namnožení nepatrného množství DNA z místa činu, kde stačí nepatrné množství krve, tkáně nebo spermatu. Dále se tato metoda využívá, pokud je DNA malé množství nebo je znečištěna (Innes, 2001). Metoda PCR se skládá ze tří kroků, při kterých množství DNA roste exponenciálně. Klíčovým enzymem je DNA – polymeráza z *Thermus aquaticus* (aerobní

gramnegativní bakterie z kmene *Deinococcus - Thermus* žijící v horkých pramenech Yellowstonského parku). Tato polymeráza nese název Taq polymeráza a je odolná vůči vysokým teplotám a zůstává aktivní přes mnoho cyklů. PCR je velice rychlá metoda. Jestli jsou známy určité sekvence DNA, PCR je schopna vybrat z dlouhé molekuly DNA oblast, která má být namnožena, například konkrétní gen. Tuto metodu objevil v roce 1983 Kally Muris a dostal za ni o 10 let později Nobelovu cenu (URL 9).

Jak již bylo zmíněno, tato metoda má tři kroky. Prvním krokem je krátké zahřátí celé směsi na 94°C - 96°C. Teplem se poruší vodíkové vazby a oba řetězce DNA se oddělí. Druhým krokem je ochlazení směsi na 50°C - 65°C. Ochlazení umožní primerům navázat se na cílovou DNA vodíkovými můstky podle pravidel komplementarity. Primery jsou krátké, synteticky vyrobené molekuly jednořetězcové DNA (20-30 nukleotidů), které jsou komplementární ke koncům DNA, která má být amplifikována. Primery tak determinují místo na DNA, které má být zmnoženo. Ve třetím kroku DNA-polymeráza může přidávat nukleotidy k 3' koncům primerů, jako při obvyklé replikaci. Směs je zahřátá na 72°C. Začíná nové kolo cyklu. Každé kolo trvá pouze asi 5 minut. Výsledkem je dvojnásobné množství cílové DNA, dlouhé i stovky párů bází. Tento tříkrokový cyklus je následně opakován znovu a znovu. Za třicet cyklů je možno teoreticky obdržet i miliardu kopií. Vizualizací je provedena na agarozových nebo polyakrylamidových gelech (Ringel, 2000).

PCR metoda má několik variant, podle toho, co je potřeba analyzovat. Různé varianty se od sebe liší primery, přidáním enzymů nebo odlišnou detekcí produktů.

PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) – metoda založena na amplifikaci DNA pomocí PCR a jejím následným štěpením restrikcími enzymy. Ověření PCR produktů probíhá pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Tato metoda je poměrně jednoduchá a rychlá. Touto metodou se určují forenzní tekutiny, kostní, vlasové a nehtové tkáně. (Hummel, 2002).

PCR-APLP (amplified length polymorphism) – tato metoda slouží k identifikaci krevních skupin. Jednotlivé primery jsou navrženy k detekci variant na nukleotidových pozicích. Vše probíhá v jedné PCR reakci, kde dochází k amplifikaci osmi různých produktů o různé délce. Výsledky jsou detekovány při elektroforéze na polyakrylamidovém gelu. Metoda se dá použít i při studiu forenzních tekutin (Watanabe, 2000).

PCR-APP (allele specific primer) – tato metoda je podobná metodě PCR-RFLP, ale po amplifikaci neprobíhá další štěpení restrikcími enzymy, tím se zkracuje čas celého procesu. Používá se dvanáct primerů a každý z nich je kontrolován i slepým vzorkem bez DNA. K této metodě se navíc přidává glycerol a kreolová červeň. Po amplifikaci následuje opět

elektroforéza v agarózovém gelu barveném ethidiu bromidem. Výsledky jsou viditelné pod UV lampou (Hosseini-Maaf, 2007).

PCR-minisequencing – používá se pro stanovení šesti nejběžnějších alel. Připravují se pouze dvě reakční směsi, pro amplifikaci a pro následné sekvencování získaného produktu (Ferri, 2006).

PCR-MS (mutagenically separated) – metoda je založena na navržení primerů, které se liší v páru bází na 261. a 262. nukleotidové pozici. Tímto způsobem se zajistí prevence špatného párování nukleotidů při amplifikaci (Lee, 1996).

PCR-SSCP (single stranded nucleotide polymorphism) – metoda určuje nukleotidové polymorfismy pomocí jednovláknového konformačního polymorfismu. Jednovláknové molekuly DNA se liší svou sekundární konformací na denaturačním polyakrylamidovém gelu v závislosti na své sekvenci. Výhodou této metody je v její rychlosti, je levná a v jediné analýze dokáže určit sedm hlavních alel (Yip, 2000).

4. 2. 2. Serologické metody určování AB0 antigenů ve tkáních

Po objevu, že se antigeny nacházejí i jinde než na erythrocytech, se začalo těchto poznatků využívat, např. ve fyzické antropologii nebo v soudním lékařství. Fyzická antropologie se zabývá historickými vztahy mezi populacemi a populační migrací. Soudní lékařství využívá antigenů AB0 systému k identifikaci kosterních, vlasových nebo zubních pozůstatků, u kterých se nedaly identifikovat otisky prstů (Lee, 1991).

Prvními, kteří se zabývali těmito antigeny, byli Boyd a Boyd v roce 1933, kteří zkoumali egyptské mumifikované tkáně, a Candela v roce 1936 začal s výzkumem u fosilních kostí a pracoval s nejstaršími vzorky. Toto studium má jednu obrovskou nevýhodu, protože správnost výsledků se nedá ověřit (Thieme, 2005).

4. 2. 2. 1. Absorpčně inhibiční metoda (AI)

Na základě praktických zkušeností byly vyvinuty různé varianty absorpčních metod pro stanovování AB0 systému ve forensních i ve fosilních tkáních. Tuto metodu poprvé popsali Boyd a Boyd v roce 1934 (Thieme, 2005).

AI má dvě fáze – absorpční a aglutinačně inhibiční fázi. Tato metoda je založena na vazbě antigenu s protilátkou. Pokud je ve vzorku tkáně přítomen antigen, dojde ve fázi absorpce k navázání protilátky. Množství protilátky, která se nenavázala, hodnotíme na základě titru. Skupinová příslušnost se určuje pomocí antigenů A, B a H na erythrocytech, které se přidávají k protilátce. Tato metoda se používá nejčastěji při určování antigenů AB0 z kostí (Klír, 1999).

Jednou z možných variant je ta následující. Kost se rozdrť a jako rozpouštědlo se přidává 58 ml 5% roztoku kyseliny ethylendiaminotetraacetyl (EDTA). Tím se odloučí látky z kostí a ulehčí se vstup roztoku antigenů. Takto vytvořený roztok se nechá 6 hodin odstát. Částečného vyčištění kostní drti lze dosáhnout s pomocí gelové filtrace procházející kolonou Sephadex G 25. Dojde k vyloučení (eliminaci) solí. Z takto vyčištěného výtažku se provede vypařování za studena. Vypařování probíhá do objemu 22,5 ml. Ke kostní drti se přidávají séra anti-A, anti-B a anti-H a fyziologický roztok. Dojde k navázání dodávané protilátky na antigeny přítomné v kostech. Následuje centrifugace a odsátí suspenze nad usazenou vrstvou kostí. K určení skupiny 0 se vybírá vhodné antisérum, aby nedošlo k chybě v diagnostice, když se ve vzorku stanovuje skupina 0. Dále se nachystají dvě sady zkumavek. Každá sada obsahuje 10

zkumavek pro každou krevní skupinu (A, B i H). Do každé zkumavky se přidá 0,5 ml fyziologického roztoku. Do prvních zkumavek se dodají zreagovaná antiséra (tj. zreagované antisérum označené jako anti-A se přidá do zkumavky v sérii označené skupinou A, totéž platí i pro B a H). Z první zkumavky se odebere 0,5 ml roztoku a přenesse se do druhé zkumavky, promíchá se a opět se nabere 0,5 ml roztoku a přenesse se do třetí zkumavky. Takto se pokračuje až k poslední zkumavce, kde se 0,5 ml roztoku nakonec odstraní. Séra se vstřebávají s výtažkem z kosti. Dále se do zkumavek přidává 3% roztok erytrocytů se souhlasnými skupinami A, B a 0. Následuje 5 minutové protřepávání a centrifugace. V kolorimetru se měří stupeň aglutinace. Je patrné, do jaké míry je roztok vysycen. Tímto se zjistí množství reagujících složek v kosti a také, jakou krevní skupinu kost vykazuje. (Paoli, 1978 a Allison 1978)

4. 2. 2. 2. Absorpčně eluční metoda (AE)

AE metoda se nejčastěji používá při zjišťování krevních vzorků, ze skvrn z lidských sekretů a antigenů AB0 z kostí, vlasů, nehtů a zubů. (Innes, 2001).

Tato metoda stejně jako AI má dvě fáze – absorpční a eluční fázi a je závislá na reakci antigenu s protilátkou. Absorpce protilátek se provádí při teplotě 4°C. Používají se polyklonální protilátky AB0 v ředěném pufovaném fyziologickém roztoku. Dále se používají chlazená antiséra A, B a lektin H pro určení H antigenu (Paoli, 1986).

Při zjišťování antigenů AB0 z kostí je kost rozdrčena na malé části a přidává se 0,3 ml metanolu. Takto připravený roztok se nechá při pokojové teplotě odstát po dobu 15 minut. Po vyjmutí z metanolu je vzorek usušen. Dále se přidává 0,2 ml séra anti-A, anti-B a anti-H. Vzorek je promíchán a reakce probíhá přes noc při 4°C, aby došlo k absorpci protilátek. Následuje promytí vzorku 10 ml PBS (phosphate buffered saline) při 4°C. Promytím se odstraní přebytečná protilátka. Dalším krokem je centrifugace za studena, vzniká sediment na dně zkumavky. Ke kontrolnímu testu bylo použito 0,3 ml 1% PBS. Ten se následně přidá k substrátu po dobu 15 minut při teplotě 4°C. Roztok je následně odebrán a přenesen k suspenzi souhlasných erytrocytů. Následuje další promytí. Tato kontrola byla autory provedena, aby se zabránilo falešné pozitivní reakci. Kontrola je nutná pro správnou interpretaci výsledků (Paoli, 1986).

Druhá fáze je eluční. Ta probíhá při teplotě 56°C s 0,3 ml roztoku PBS po dobu 15 minut. Výsledky eluce byly testovány s 0,08 ml roztoku souhlasných erytrocytů v PBS a sjednoceny v přístroji na propustnost stupeň 2. Po 1 hodině při pokojové teplotě byly vzorky centrifugovány při 1000 otáčkách za minutu. Výsledek aglutinace se přečte s použitím počítáče. Ten vyhodnotí přítomnost či nepřítomnost aglutinace i její intenzitu (Paoli, 1986).

4. 2. 2. 3. Metoda smíšené aglutinace

Tato metoda má absorpční fázi, ve které opět dojde k navázání příslušné protilátky na příslušnou substanci. Dále dochází k promytí chladným fyziologickým roztokem, to má za následek, že se odstraní přebytečná protilátka. Přidávají se homologované (standardizované) erytrocyty, které ověří přítomnost protilátky, která je také schopná aglutinovat přítomné erytrocyty. Aglutinace se hodnotí v různých časových intervalech přímo na zkoumaném vzorku (Klír, 1999).

4. 2. 2. 4. Imunohistochemické vyšetření

Pomocí tohoto vyšetření se dají zjišťovat antigeny téměř ve všech tkáních. Princip spočívá, stejně jako ve všech metodách, v navázání protilátky na antigen. Používá se zde monoklonální protilátka, která bývá obvykle myšičího původu. Takto navázaná protilátka se může dokázat pomocí protilátky proti myšičí bílkovině, např. peroxidázou, která s diaminobenzidinem v přítomnosti substrátu (peroxidu vodíku) se projeví hnědým zbarvením. Výsledkem jsou hnědá místa, ve kterých došlo k reakci s protilátkou (tzv. nepřímá imunoperoxidázová reakce) (Klír, 1999).

Jindy lze použít k detekci navázané monoklonální protilátky biotin - streptavidinového komplexu označeného např. alkalifosfatázou. Ta způsobuje, pokud je zde přítomen substrát Fast red, v místě pozitivního nálezu červené zbarvení (Klír, 1999).

Tato metoda má různé výhody. Např. je vysoce citlivá a odolná vůči posmrtným změnám, možnost archivace výsledků, pozitivní reakce jsou vázány na určité struktury, což umožňuje odlišit falešnou pozitivitu při bakteriální kontaminaci (Klír, 1999).

4. 3. Antigeny AB0 systému v kostech

Zkoumání kosterních pozůstatků je důležité při identifikaci jedince. Od okamžiku smrti se tělo začne rozkládat. Již po několika dnech nelze rozeznat základní rysy obličeje, během několika týdnů se za normálních podmínek začnou rozkládat všechny tkáně. Nakonec z těla zbude hromádka kostí a chomáč vlasů. Výzkumem kostí se můžeme o identifikaci jedince dozvědět různé informace. Např. pohlaví jedince se dá zjistit podle tvarového rozdílu kostí lebky a pánve. Tělesná výška se určuje podle délky dlouhých kostí s využitím antropologických tabulek a výpočtů. Určení stáří osoby je relativně přesné v dětském věku, zejména podle stavu chrupu a kalcifikace kostí. Zjištěné výsledky se musí považovat za orientační. Antigeny AB0 jsou sice velmi stabilní složky, ale přesto může docházet během dlouhé doby uložení k určitým změnám antigenních vlastností. Jde o strukturální i chemické změny kostní tkáně. Na všechny tkáně po smrti působí řada vlivů, např. fyziologické, chemické i biologické. Především vliv některých mikroorganismů může mít za následek změnu chemického složení tkáně i změnu vlastností antigenů krevních skupin AB0. Jedná se především o fakultně anaerobní bakterie se sacharolytickou aktivitou (Musil, Konrád, Suchánek, 2004).

I systém AB0 se dá určit z kostí. K tomuto účelu se nejdříve využívaly serologické metody a později i molekulárně biologické metody. První metody byly založeny na variantách absorpce inhibičního testu. Pro určování AB0 systému z kostí a z krevních skvrn byla později vyvinuta metoda absorpčně elučního testu. K těmto metodám se nejčastěji využívají spongiózní kosti, dále také žebra a bederní obratle. Jako molekulárně biologická metoda se používá metoda PCR (Thieme, 2005).

4. 4. Antigeny AB0 systému ve vlasech

I ve vlasech se nacházejí AB0 antigeny. Opět se těchto poznatků dá využít ve forenzní antropologii nebo v soudním lékařství. Lidské vlasy společně s krví, spermatem a slinami jsou nejčastější biologickou stopou v kriminalistice. Při určování vlasů se dá také použít celá řada metod. Jsou to již zmiňované serologické a molekulárně biologické metody a také mikroskopické metody. Těmito metodami se z vlasu určuje celá řada poznatků o daném jedinci, například pohlaví, etnická příslušnost, krevní skupina, užívání omamných látek a někdy vedou i k identifikaci jedince (Nozawa, 1999). Struktura lidských vlasů a chlupů je velice rozmanitá, dokonce i u jednoho jedince. Vlasy a chlupy se dají rozdělit do šesti typů, které se liší svým příčným průřezem a zakončením. Např. vlasy mají zpravidla kruhový příčný průřez a konečky vlasů jsou často roztřepené v důsledku stříhání (Innes, 2001).

Ve forenzní praxi se nejčastěji využívá mikroskopie. Je to metoda rychlá a levná. Mikroskopie podává stručné informace o vzorku a využívá se k přípravě vzorku pro další metody (Bisbing, 2000).

Určování systému AB0 je znovu postaveno na antigenech, které se ve vlasech nacházejí. K tomuto účelu neslouží pouze kořen vlasu, ale i samotný kmen. Nejčastěji využívaná metoda je již zmiňovaná absorpčně eluční metoda. Dále se dá využít i metoda smíšené aglutinace, absorpčně inhibiční metoda a imunohistochemické vyšetření (Klír, 1999).

U vlasů je důležité i stádium rozkladu. Tuto problematiku zkoumal Ishida a kol. (2000), který se zaměřil na zjišťování genotypů z vlasů a nehtů. Pozdější stádia rozkladu mohou ztížit určování systému AB0, protože může docházet ke změně AB0 antigenů ve vlasech i v kostech. K výzkumu využíval vzorky v různých stádiích rozkladu (2 týdny – 25 let). Tyto vzorky tlely na mnoha místech, například v řece, moři. Používal AE metodu a PCR – RFLP (restriction fragment length polymorphism). Pomocí AE metody určil krevní skupinu u 88,6% vzorků, díky PCR – RFLP pouze 58,6% vzorků. Metody PCR měla horší výsledky kvůli melaninu, který působil jako PCR inhibitor (Ishida a kol. 2000).

4. 5. Antigeny AB0 systému v nehtech

Také nehty mohou posloužit jako důkazní materiál v soudním lékařství, kriminalistice a antropologii. Ať se jedná o kousky nehtů nebo o stopy způsobené nehty (Innes, 2001).

Ishida a kol. k zjišťování antigenů v nehtech používali opět AE metodu a PCR – RFLP metodu. I u nehtů zkoumaly stádium rozkladu materiálu. Rozklad měl i zde vliv na určování systému AB0 (Ishida a kol. 2000).

4. 6. Antigeny AB0 systému v zubech

Stejně jako ostatní tkáň, tak i zubní tkáň obsahuje AB0 antigeny. Využití je také v soudním lékařství a v kriminalistice. Zuby obsahují dentin. Dentinová tkáň je považována za nejtvrďší tkáň v těle, díky ní mohou zuby zůstat nedotčeny i dlouhou dobu po smrti, jsou totiž odolné proti zpopelnění, zmrzačení i proti rozkladu (Ballal, 2006) Zuby také mohou sloužit k identifikaci jedince. Podle zubů se dá určit např. věk. Nejsnadněji se stanovuje u mladých lidí. Hodnotí se podle opotřebení zubů, tloušťky zubní skloviny nebo výskytu třetí stoličky (obvykle se objevuje po dosažení věku 20 let) (Innes, 2001).

AB0 skupinové antigeny se v zubní tkáni nacházejí ve dřeni, která je bohatě prokrvována. Pro určení těchto antigenů se dá použít metoda absorpčně inhibiční a absorpčně eluční metoda. Ballal (2006) zkoumal výskyt systému AB0 v dřeni a v dentinové tkáni zubu. Výzkum prováděl s 30 zuby různé věkové kategorie. Díky AE metodě získal z dřene 90% kladných výsledků (krevní skupina v dřeni byla shodná s krevní skupinou jedince). Z dentinu se nepodařil systém AB0 izolovat nejspíš kvůli vysoké míře zvápnění.

5. Krevní transfuze a transplantace

I v lékařství se uplatňují znalosti AB0 systému i jejich antigenů a to při transfuzích a transplantacích. Transfuze jsou spojeny s krevním systémem AB0. Transplantace se zabývají přenosem tkání a orgánů.

5. 1. Krevní transfuze

Transfuze je převod krve nebo krevních derivátů ze zdravého jedince - dárce, nemocnému příjemci za účelem doplnění chybějící krve nebo jejích složek. Tato léčebná metoda se rozvinula až ve 20. století. Její uplatnění umožnil objev krevních skupin, na kterém se podílel i český psychiatr Jan Janský (1907). Dalším významným mezníkem v rozvoji se stal objev Rh faktoru v roce 1940 (K. Landsteiner a A. Wiener). O něco později se zjistilo, že citrát sodný zabraňuje srážení krve a glukóza prodlužuje životnost červených krvinek. Krev se tak mohla konzervovat a vznikla krevní banka (URL 10).

Dárce krve může být každý člověk od 18 – 60 let a tělesná hmotnost nad 50 kg, jehož celkový zdravotní stav a laboratorní nálezy odběr připouštějí. Z dárcovství jsou vyloučeni dárce, kteří prodělali hepatitidu, TBC, AIDS, s krevními chorobami, celkově zdravotně oslabení jedinci, lidé, kteří užívají trvale léky a zdravotníci (URL 10).

Při transfuzích se přihlíží hlavně k AB0 systému a Rh faktoru. Antigenní vlastnosti leukocytů, trombocytů a plasmatických bílkovin mají pro transfuze menší význam. Skupina AB je univerzální příjemce, skupina 0 je univerzální dárce (URL 10).

5. 2. Transplantace

Transplantace je přenos celého orgánu, jeho části nebo určité tkáně, a to z jednoho těla do druhého nebo z určitého místa těla na jiné. Důvodem tohoto chirurgického zákroku je poškození nebo selhání původního orgánu. Orgány se mohou získat jak z živého, ale někdy i mrtvého organismu. V současné době je možné transplantovat srdce, ledviny, játra, plíce a slinivku břišní. Z tkání se transplantují i kosti, šlachy, rohovka, srdeční chlopně, cévy a kůže (URL 11).

První transplantace proběhla v roce 1905, tehdy šlo o transplantaci rohovky. Od té doby je možné transplantovat i srdce, ledviny, játra, plíce a slinivku břišní. Z tkání se transplantují např. kosti, šlachy, rohovka, srdeční chlopně, cévy a kůže (URL 11).

Při transplantaci orgánu je důležitá kompatibilita HLA systému. Antigeny AB0 systému se nacházejí i v tělních buňkách a mohou se podílet na rejekci (odvržení) transplantovaného orgánu (URL 11).

Rejekce nehrozí u autotransplantace. Autotransplantace je transplantace, u které se jedná o přenos tkáně nebo orgánu na jiné místo téhož jedince. U autotransplantace nehrozí odmítnutí transplantované tkáně imunitním systémem. Obvykle se provádí autotransplantace kůže nebo vlasů (URL 11).

6. Závěr

Antigeny AB0 systému jsou A, B a H antigen. H antigen je prekursorem pro vznik ostatních antigenů pomocí glykosiltransferáz. Tyto antigeny se nacházejí ve všech tkáních. Jejich hlavním zdrojem jsou epiteliální tkáně a jejich sekrety. K jejich určování se nejprve používaly serologické metody a v pozdější době se k nim připojily i molekulárně biologické metody.

Serologické metody jsou nejčastěji používány ve forenzní antropologii nebo v kriminalistice, kde jsou používány k identifikaci jedince z jeho pozůstatků. Tyto metody odhalují i příbuzenské vlastnosti nebo přispívají k odhalení historického původu lidstva. Serologické metody jsou rozmanité a vyvinuly se u nich i různé modifikace. Dají se jimi testovat téměř veškeré tkáně, včetně tkáně kostní, vlasové, nehtové i zubní. Jsou založeny na reakci mezi antigenem a protilátkou. Nevýhodou u těchto tkání je, že většinou není možnost ověření správných výsledků. Také na ně působí vlivy vnějšího prostředí, které mění antigenní vlastnosti a znesnadňují určení AB0 systému.

Molekulárně biologické metody se používají k zúžení okruhu možných jedinců na základě jejich DNA. Výhodou těchto metod je, že k analýze DNA není zapotřebí velké množství tkáně nebo krve, ale vystačí si jen s několika tělními buňkami. Další výhodou je, že metody analýzy DNA nejsou ovlivněny kontaminací a vlivem vnějšího prostředí.

Internetové zdroje

URL 1: www.galenus.cz/tehotenstvi-rh-faktor.php

URL 2: www.vlastenci.cz

URL 3: www.school-wikipedia.org.

URL 4: www.anthro.palomar.edu/tutorials/

URL 5: [www.zbio.gnotobio.cz/2007/Transfuzní lékařství](http://www.zbio.gnotobio.cz/2007/Transfuzní_lékařství)

URL 6: www.ncbi.nlm.nih.gov

URL 7: commons.wikimedia.org/wiki/File:ABO_system_codominance.svg

URL 8: www.obrazky.cz

URL 9: www.orko.cz/Biologie%202010/PCR.ppt

URL 10: krevni-transfuze.navajo.cz

URL 11: www.medicalnewstoday.com

Seznam zkratek

AE	absorpčně eluční metoda
AI	absorpčně inhibiční metoda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiaminotetraacetyl
EPO	hormon erytropoetin
Fuc	fukosa
Gal	galaktosa
GalNAc	N – acetylgalaktosamin
HLA	major histocompatibility complex
Ig	imunoglobulin
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Rh	rhesus faktor

Seznam obrázků

Obrázek č. 1 : Karl Landsteiner a Jan Janský

Obrázek č. 2: Dědičnost AB0 skupin

Obrázek č. 3: Zastoupení krevní skupiny A ve světě

Obrázek č. 4: Zastoupení krevní skupiny B ve světě

Obrázek č. 5: Zastoupení krevní skupiny 0 ve světě

Obrázek č. 6: Pentamer IgM

Obrázek č. 7: Štěpení imunoglobulinů papainem

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Krevní skupiny systému AB0

Tabulka č. 2: Dědičnost krevních skupin

Tabulka č. 3: Zastoupení krevních skupin v ČR

Tabulka č. 4: Struktura antigenů A, B a H na povrchu erytrocytů

Použitá literatura

- Allison, J., Hossainy, M., Munizaga, A., Fung, J., Rosa: ABO blood groups in Chilean and Peruvian mummies. II. Result of agglutination-inhibition technique. *American Journal of Physical Anthropology*, 1978, roč. 49, s. 139-142.
- Ballal, S.: ABO blood grouping on tooth material, Rajiv Gandhi University of Health Sciences, Karnataka, Bangalore, 2006, 2-69
- Bisbing, R. E.: Hair, comparison: microscopic. *Encyclopedia of Forensic Sciences*, Academic Press, A Harcourt Science and Economic Company, 2000, 1002–1016.
- Cartron, J. P., Colin, Y.: structural and functional diversity of blood group antigens, *Transfus Clinical Biology*, 2001, 8, 163-99
- D'Adamo, P.: Complete blood type encyclopedia, Penguin Putnam Inc, 2002, 583 str.
- Daniels, G.: Functional aspects of red cell antigens, *Transfusion medicine, Blood Reviews*, 1999, 13, 14-35.
- Daniels, G.: Human blood groups. Blackwell Science, 2002, 2. vydání, 560 str.
- Dean, L., : Blood groups and red cell antigens, National Library of Medicine, 2005.
- Drozdová, E.: Antropologie, Přednášky v rámci tohoto předmětu, podzim 2009, Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- Ferenčík, M.: Imunochémia, Alfa, vydavatelství technické a ekonomické literatury, 1989, str. 581
- Ferri, G., Bini, C., Ceccardi, S., Ingravallo, F., Lugaresi, F., Pelloti, S.: Minisequencing-based genotyping of Duffy and ABO blood groups for forensic purposes. *Journal of Forensic Sciences*, 2006, 51(2), 357-360.
- Hosseini-Maaf, B., Hellberk, A., Chester, M. A., Ollson, M. L.: An extensive polymerase chain reaction–allele-specific polymorphism strategy for clinical ABO blood group genotyping that avoids potential errors caused by null, subgroup, and hybrid alleles. *Transfusion*, 2007, 47(11), 2110-2125,
- Hummel, S., Schmidt, D., Kahle, M., Herrmann, B.: ABO blood group genotyping of ancient DNA by PCR-RFLP. *International Journal of Legal Medicine*, 2002, 116, 6, 327-333
- Innes, B.: Dobrodružství kriminalistiky, Stopy zločinu, Svojtka & CO, Praha, 2001, str. 256
- Ishida, K., Zhu, B. - L., Sakoda, S., Quan, L., Oritani, S., Fujita, M., Maeda, H.: Significance of DNA analysis for determination of ABO blood groups from hair and nail of

decomposed human remains: a comparison with phenotyping by the absorption-elution method. *Legal Medicine*, 2000, 2, 212–215.

- King, M.- J.: Blood group antigens on human erythrocytes-distribution, structure and possible functions, *Biochimica et Biophysica Acta* 1197, 1994, 15-44
- Klener, P.: *Vnitřní lékařství, svazek VIII: Hematologie*, 1. vydání. Galén, Praha, 2003, str. 120.
- Klír, P.: *Identifikace stop biologického původu*, Soudní lékařství, Praha, Grada Publishing, 1999, str. 425–456.
- Lee, H. C., Berka K. M., Folk, N. L., Pagliaro, E. M., Carroll-Reho, J., Brubaker, T. L., Gaensslen, R. E.: Genetic markers in human bone: II. Studies on ABO (and IGH) grouping. *Journal of Forensic Science, JFSCA*, 1991, vol. 36, 3, 639-655.
- Lee, H. C., Gaensslen, R. E., Carver, H. W., Pagliaro, E. M., Carroll-Reho, J.: ABH antigen typing in bone tissue. *Journal of Forensic Sciences, JFSCA*, 1989, 34, 1, 7-14
- Lee, J. C., Chang, J. G.: ABO genotyping by polymerase chain reaction. *Journal of Forensic Sciences, JFSCA*, 1992, 37, 5, 1269-1275
- Lee, J. C., Tsai, L., Chen, C., Chány, J.: ABO genotyping by mutagenically separand polymerase chain reaction. *Forensic Science International*, 1996, 82, 227-232.
- Malaska, Z.: *Základy imunohematologie a krevní transfuze (Příručka pro zdravotnické pracovníky)*. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha, 1957, 1. Vydání, 207 str.
- Marion, E.: Blood groups and their function, *Baillière's Clinical Haematology*, 2000, Vol. 13, No. 4, 485-509
- Mayer, G.: *Mikrobiology a imunology*, On-line učebnice, University of south Carolina, 2006, pathmicro.med.sc.edu
- Musil, J., Konrád, Z., Suchánek, J.: *Kriminalistika*, C. H. Beck, Praha, 2004, 2. Vydání, str. 583
- Nishi, K., Rand, S., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Yamasaki, S., Yamamoto, Y., Kobayashi, A., Kane, M., Morimoto, A., Spalthoff, H., Annuss, B.: ABO blood typing from forensic materials - merits and demerits of detection methods utilized in our laboratories, and biological significance of the antigens, *Indian Journals*, 2005, vol. 6, online ISSN 0972 - 8074
- Nozawa, H., Yamamoto, T., Uchihi, R., Yoshimoto, T., Tamaki, K., Havashi, S., Ozawa, T., Katsumata, Y.: Purification of nuclear DNA from single hair shafts for DNA analysis in forensic sciences, *Legal Medicine*, 1999, 61–67.

- Ogasawara, K., Yabe, R., Uchikawa, M., Saitou, N., Bannai, M., Nakata, K., Takenaka, M., Fujisawa, K., Ishikawa, Y., Juji, T., Tokunaga, K.: Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system, *The American Society of Hematology*, 1996, vol. 88, 2732-2737.
- Paoli, G. Cecchi Parenti, S.: Determinazione del grupo sanguigno del sistema ABO negli inumati di Shahri dokuta (Sistan, Iran). *Archivio per l' Antropologie el' Etnologia*, 1978, sv. 108, s. 315321.
- Paoli, G., Francalacci, P., Del Santo, M. T., Borgognini Tarli, S. M.: ABO blood typing in Italian Medieval skeletons : Absorption-Elution and Haemagglutination Inhibition techniques. *Homo*, 1986, 36 (1-2), 88-96
- Pecka, M.: Laboratorní hematologie v přehledu – buňka a krvetvorba. *Finidr, Český Těšín*, 2002, str. 160.
- Ravn, V. a Dabelsteen, E.: Tissue distribution of histo-blood group antigens, *APMIS*, 2000, 108, 1-28.
- Ringel, P. F., Weiler, G., Bein, G.: Errors in ABO typing of blood stains using PCR. *International journal of legal medicine*, 2000, 113, 352-355.
- Thieme, F. P., Otten, C. M.: *The Unreliability Of Blood Typing Aged Bone*, University of Michigan, 2005, 387 – 397.
- Watanabe, G., Umetsu, K., Osawa, M.: Application of the PCR-APLP method to determine ABO genotypes in forensic samples, *Japanese Journal of Legal Medicine*, 2000, vol. 54, 219 – 226.
- Yip, S.P. (2000): Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 common ABO alleles and readily identifies new alleles. *Blood*, 2000, 95(4), 1487-1492.