



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Detekce alely HLA-B27 pomocí komerční soupravy

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/ZDRAVOTNÍ
LABORANT**

Autor: Simona Volková

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Detekce alely HLA-B27 pomocí komerční soupravy“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2022

.....
podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas a poskytnutí cenných rad a znalostí. Děkuji také dobrovolníkům za poskytnutí vzorků pro tuto práci. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

Detekce alely HLA-B27 pomocí komerční soupravy

Abstrakt

HLA (Human Leukocyte Antigens) molekuly jsou součástí téměř všech buněk lidského těla. Celkem existuje přibližně 200 genů, které rozdělujeme do třech hlavních oblastí. Molekula HLA-B27, které se věnuji ve své bakalářské práci, patří do HLA I. třídy. Hlavní funkcí těchto molekul je předkládání cizorodých antigenů buňkám imunitního systému. Výskyt antigenu HLA-B27 bývá spojován s některými onemocněními. Nejznámější je asociace s ankylozující spondylitidou, známou také pod názvem Bechtěrevova choroba. Nemoc je charakterizována jako revmatické onemocnění, postihující nejčastěji měkké tkáně podél páteře a klouby obratlů.

V teoretické části mé práce se společně s popsáním Bechtěrevovy choroby, její historií, příznaky, dědičností a léčbě, zabývám i hlavním histokompatibilním komplexem s důrazem na klíčovou molekulu HLA-B27. Praktická část mé bakalářské práce je zaměřena na sběr vzorků, izolaci DNA (deoxyribonukleová kyselina) a amplifikaci DNA. Následovanou částí samotné laboratorní detekce alely HLA-B27 pomocí komerčního kitu s využitím gelové elektroforézy pro vizualizaci DNA fragmentů. Jednotlivé vzorky, které mi byly poskytnuty od dobrovolníků, jsem anonymizovala, aby nedošlo k přímé identifikaci jedince a odhalení citlivých údajů. Jednalo se o různorodou skupinu lidí. Z 20 mnou vyšetřovaných vzorků, se pozitivita na alelu HLA-B27 prokázala u 6 vzorků dobrovolníků s různými klinickými projevy Bechtěrevovy choroby.

Cílem mé práce bylo osvojení si správné laboratorní praxe v genetické laboratoři a zavedení a zoptimalizování komerčně dodávaného kitu pro detekci alely HLA-B27 od firmy BAG HEALTH CARE. Ačkoli skutečnost výskytu rizikové alely HLA-B27 nemusí znamenat, že jedinec onemocní touto chorobou, lze ji považovat za zvýšené riziko. Díky této asociaci je možné detekci alely HLA-B27 využít jako molekulární marker pro včasnou diagnózu, zmírnění následků a zlepšení průběhu léčby ankylozující spondylitidy.

Klíčová slova

Ankylozující spondylitida; Bechtěrevova choroba; HLA-B27; DNA; Gelová elektroforéza

Detection of the HLA-B27 allele using a commercial kit

Abstract

HLA (Human Leukocyte Antigens) molecules are part of almost every cell in the human body. In total, there are approximately 200 genes, which we divide into three regions. The HLA-B27 molecule, which I deal with in my bachelor's thesis, belongs to HLA class I. The main function of these molecules is to present foreign antigens to cells of the immune system. The occurrence of HLA-B27 antigen is associated with some diseases. The best known is the association with ankylosing spondylitis, also known as Bechterew's disease. The disease is characterized as a rheumatic disease, most often affecting the soft tissues along the spine and vertebral joints.

In the theoretical part of my work, together with the description of Bechterew's disease, its history, symptoms, heredity, and treatment, I also deal with the main histocompatibility complex with emphasis on the key molecule HLA-B27. The practical part of my bachelor thesis is focused on sample collection, DNA (deoxyribonucleic acid) isolation and DNA amplification. This is followed by the laboratory detection of the HLA-B27 allele itself using a commercial kit using gel electrophoresis to visualize DNA fragments. I anonymized the individual samples provided by the volunteers to avoid direct identification of the individual and disclosure of sensitive data. It was a diverse group of people. Of the 20 samples I examined, positivity for the HLA-B27 allele was demonstrated in 6 samples of volunteers with various clinical manifestations of Bechterew's disease.

The aim of my work was to master good laboratory practice in the genetic laboratory and to introduce and optimize a commercially available kit for the detection of the HLA-B27 allele from the company BAG HEALTH CARE. Although the presence of the HLA-B27 risk allele does not necessarily mean that an individual will have the disease, it can be considered an increased risk. Thanks to this association, the detection of the HLA-B27 allele can be used as a molecular marker for early diagnosis, mitigation of consequences and improvement of the course of treatment of ankylosing spondylitis.

Key words

Ankylosing spondylitis; Bechterew's disease; HLA-B27; DNA; Gel electrophoresis

Obsah

Úvod.....	8
1. Teoretická část.....	10
1.1 Autoimunitní onemocnění.....	10
1.1.1 Popis autoimunitního onemocnění.....	10
1.1.2 Příčiny a vznik autoimunitního onemocnění	10
1.2 Bechtěrevova choroba.....	12
1.2.1 Historie Bechtěrevovy choroby	12
1.2.2 Popis Bechtěrevovy choroby	13
1.2.3 Rozdělení spondyloartritid.....	13
1.2.4 Symptomy Bechtěrevovy choroby.....	14
1.2.5 Etiopatogeneze Bechtěrevovy choroby	15
1.2.6 Diagnostika Bechtěrevovy choroby.....	16
1.2.7 Léčba Bechtěrevovy choroby	17
1.3 MHC komplex.....	19
1.3.1 Charakteristika HLA systému.....	19
1.3.2 Funkce HLA systému	20
1.3.3 Rozdělení HLA	20
1.3.4 HLA I. třídy	21
1.3.5 HLA II. třídy	22
1.3.6 HLA III. Třídy	23
1.3.7 Dědičnost HLA systému.....	23
1.3.8 Typizace HLA systému	24
1.4 HLA-B27.....	28
1.4.1 Dědičnost HLA-B27	29
1.4.2 Subtypy HLA-B27	29
1.4.3 Hypotézy účinku HLA-B27.....	29
1.4.4 Faktory	30
2. Cíl práce a výzkumné otázky	32
2.1 Cíl práce	32
2.2 Výzkumné otázky.....	32
2.2.1 Výzkumná otázka 1	32
2.2.2 Výzkumná otázka 2	32
3. Praktická část.....	33

3.1	Metodika	33
3.2	Preanalytická fáze vyšetření.....	33
3.3	Analytická část vyšetření	34
3.3.1	Izolace DNA	34
3.3.2	Měření koncentrace DNA.....	38
3.3.3	Komerční souprava HISTO TYPE B27.....	40
4.	Výsledky.....	45
4.1	Výzkumné otázky.....	53
4.1.1	Výzkumná otázka 1	53
4.1.2	Výzkumná otázka 2	53
5.	Diskuse	54
6.	Závěr.....	58
7.	Seznam použité literatury	59
8.	Seznam obrázků a tabulek	65
9.	Seznam zkratk.....	66

Úvod

Ankylozující spondylitida (AS) je celoživotní onemocnění, které lze charakterizovat zánětlivou reakcí hlavně v místě obratlů páteře a velkých kloubů jako kyčle, ramena a kolena. Nemoc můžeme najít i pod pojmem Bechtěrevova choroba. Tento název získala po ruském lékaři a neurologovi Vladimíru Michajloviči Bechtěrevovi, který jako jeden z prvních popsal toto onemocnění. Můžeme se také setkat s označením Marieho-Strümpellova nemoc, což je spojení jmen dvou neurologů – Pierra Marieho a Adolfa Strümpella, kteří také významně přispěli k popsání této nemoci (Levitová, Hušáková, 2018).

Lze říct, že se jedná o nemoc mladých lidí. Manifestace projevů onemocnění se objevuje zpravidla okolo 26. věku jedince (Braun, Sieper, 2007). Mnohdy je včasná diagnóza Bechtěrevovy choroby obtížná, jelikož kromě řady nespecifických příznaků se jako první objevuje bolest zad. S problémy se zády se může však jednou za čas potýkat i zcela zdravý jedinec v důsledku například natržení svalu, prochladnutím nebo vlivem nesprávných sedacích návyků. Od tohoto klasického mechanického poškození se však ankylozující spondylitida liší v tom, že se nejedná o akutní bolest, u které je pacientům doporučován klidový režim (Vencovský, 2020).

U ankylozující spondylitidy je bolest chronická a spojena právě s klidem. Častým případem pak bývá, že bolest probouzí jedince ze spánku, a právě rozcvičení a protažení pomáhá k úlevě (Klener, Pavelka, 2002). Základ léčby tak tvoří hlavně pravidelné cvičení, které podporuje pohyblivost kloubů. Kromě nesteroidních antirevmatik, dosahuje v posledních letech dobrých výsledků i biologická léčba, která zasahuje hluboko do zánětlivého procesu a potlačuje ho, ale ani zde nedochází k úplnému uzdravení, jelikož po vysazení léku se můžou u pacienta objevit stejné obtíže jako dříve (Levitová, Hušáková, 2018).

I když je etiologie a patogeneze u ankylozující spondylitidy stále nejasná, u většiny pacientů se objevuje spojitost s molekulou HLA-B27. Na vznik a průběh však působí celá řada faktorů a ani negativita na tento antigen nemusí znamenat, že pacient netrpí Bechtěrevovou chorobou (Braun, Sieper, 2007). Při diagnostice ankylozující spondylitidy

se tak využívají i zobrazovací metody jako rentgenové vyšetření nebo magnetická rezonance (Levitová, Hušáková, 2018).

Dědičnost v tomto onemocnění hraje také nespornou roli. HLA-B27 je antigen nacházející se na lidských buňkách a účastní se imunitních reakcí. Sestava antigenů je u každého jedince jiná, ale stejně jako u krevních skupin je vyšší šance podobných struktur v rodině. Protože symptomy nastupují plíživě, je při diagnostice nemoci nutné věnovat pozornost právě rodinné anamnéze (Vencovský, 2020).

Zjištění antigenu HLA-B27 u pacienta však představuje jen kvalitativní vyšetření a nijak nevypovídá o prognóze onemocnění. Jak uvádí Levitová a Hušáková (2018) je důležitá spolupráce mezi pacientem a lékařem a dodržování režimových opatření.

Teoretická část mé práce představuje rešerši o ankylozující spondylitidě a o její asociaci s hlavním histokompatibilním komplexem a molekulou HLA-B27. V praktické části této práce jsem se zabývala metodami správné laboratorní praxe a postupy spojené se sběrem vzorků, a jejich testováním na přítomnost zmiňované alely HLA-B27 a její možnou úlohu s ankylozující spondylitidou.

1. Teoretická část

1.1 Autoimunitní onemocnění

1.1.1 *Popis autoimunitního onemocnění*

K udržení homeostázi lidského těla je zapotřebí kromě jiného správné fungování imunitního systému. Ten dokáže rozpoznávat struktury těla vlastní nacházející se na povrchu buněk (antigeny) a interagovat s nimi. Pokud je buňka například nádorově změněna, stará nebo jinak poškozená, je imunitním systémem odstraněna, jinak ale imunitní systém udržuje vůči vlastním antigenům toleranci. Pokud dojde k prolomení imunitní tolerance hovoříme o autoimunitních chorobách (Stříteský, 2001).

V případě humorálního typu autoimunity jsou za spouštěče považovány tzv. autoprotilátky, jedná se o protilátky namířené proti antigenu těla vlastní. V případě buněčného typu autoimunity se do reakce zapojují specifické molekuly imunitního systému tzv. T-lymfocyty a rozvíjí zánět. Ve většině případů dochází ke vzájemné kombinaci těchto reakcí (Shoenfeld et al., 2007).

1.1.2 *Příčiny a vznik autoimunitního onemocnění*

Autoimunitní choroby jsou multifaktoriální. Na manifestaci onemocnění se podílí celá řada mechanismů zahrnující faktory zevního a vnitřního prostředí, jak potvrzují případy sledování experimentálních zvířat, kdy se v závislosti na vnějších podmínkách onemocnění u jedné části zvířat objevilo a u druhé části ne. Proto stejné onemocnění se v závislosti na jedinci může lišit v příčině a spouštěči klinického projevu (Hořejší et al., 2017).

a) Faktory vnitřní

Hlavním rizikovým vnitřním faktorem je již zmíněná souvislost s HLA systémem I. a II. třídy. Největšího relativní riziko vyskytujícího se u jedinců s danou alelou dle Hořejšího et al. (2017) dosahuje právě asociace HLA-B27 s Bechtěrevovou chorobou.

Dále to jsou různé polymorfismy genů kódující specifické buňky imunitního systému, ale i vlivy hormonální. Většina autoimunitních onemocnění je pak častějších u žen především v reprodukčním věku (Lukešová, 2016).

b) Faktory vnější

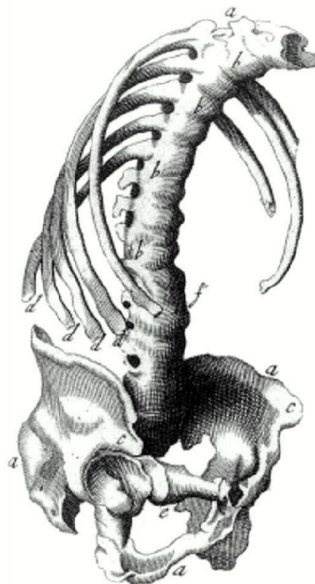
Mezi spouštěče z vnějšího prostředí, které mohou vyvolat autoimunitu řadíme zejména infekce. Ty vyvolají silnou imunitní odpověď, která má za účel potlačit infekci. Zároveň však v některých případech může dojít k selhání regulace této imunitní odpovědi. Dochází tak pak například k odkrytí doposud imunitnímu systému skrytému autoantigenu nebo vzniku autoreaktivních lymfocytů. Dále do této kategorie lze zařadit stres, léky, UV záření (ultrafialové záření) a jiné chemikálie (Lukešová, 2016).

1.2 Bechtěrevova choroba

1.2.1 Historie Bechtěrevovy choroby

Je uváděno, že první zmínky o AS lze díky rentgenovým snímkům některých dochovaných mumii zobrazující tzv. bambusovou páteř, najít už ve starověku. AS měli údajně trpět faraonové Amenhotep II., Ramses II. a Mezenptah (Levitová, Hušáková, 2018). Studie Saleem a Hawass (2014) však naznačuje, že Ramses II. a jeho syn Mezenptah měli spíše onemocnění zvané difuzní idiopatická skeletální hyperostóza (DISH), projevující se osifikací a kalcifikací páteře.

Napříč historií se objevují i další známky o AS. Má se za to, že irský lékař Bernar Connor byl první, který nepochybně popsal stav odkazující na AS (Gran, Husby, 1993). Jeho anatomický náčrt kostry zemřelého pacienta s Bechtěrevovou chorobou můžeme vidět na *Obrázce 1*. Nemoc je však známá díky ruskému lékaři a neurologovi Vladimíru Michajloviči Bechtěrevovi, který v 19. století popsal několik jejích nových forem (Bozhkova, 2017). Onemocnění bývá někdy i nazýváno Marieho-Strümpellova nemoc. Název vyplývá ze spojení jmen francouzského neurologa P. Mariea a německého neurologa A. Struempella, kteří společně s V. M. Bechtěrevem na konci 19. století AS nozologicky charakterizovali (Levitová, Hušáková, 2018).



Obrázek 1 Kostra nemocného podle Bernarda Connora

Zdroj: (*Rheumatology*, 2002) dostupné z: <https://academic.oup.com/rheumatology/article/41/8/942/1778655>

1.2.2 Popis Bechtěrevovy choroby

Jedná se o chronické zánětlivé revmatické onemocnění páteře a křížovo-kyčelního skloubení. Vlivem toho dochází k fibrotizaci a osifikaci kloubních pouzder a vazů a v některých případech může tento stav vyústit až k ankylóze celé páteře. Vznik nového vazivového nebo kloubního spojení v oblasti páteře tak vede k tuhnutí a celkovému omezení pohyblivosti této části. Nemoc se projevuje v mladém věku, nejčastěji ve třetí dekádě života. Nemoc převažuje více u mužů než u žen, a to v poměru 7-9:1 (Dítě, 2007).

Nemoc je často doprovázena i komplikacemi jiných orgánů. Časté bývají nitrooční záněty, záněty osrdečníku, zánět aortální stěny nebo zjizvení plicní tkáně. Mohou se vyskytnout záněty střeva, které poté přechází k tzv. enteropatickým spondylartritidám (EspA) doprovázenými ulcerózní kolitidou nebo Crohnovou chorobou (Klener, Pavelka, 2002).

1.2.3 Rozdělení spondyloartritid

Jako séronegativní spondylartropatie/spondylartritida je označována skupina autoimunitních zánětlivých onemocnění, které sdílejí určité podobné klinické a laboratorní znaky. Pojmenování „séronegativní“ odkazuje na skutečnost, že v séru chybí revmatoidní faktor a označení „spondylartritida“ zas naznačuje, že se jedná o postižení jak kloubů, tak páteře (Ebrahimiadib, Berijani et al., 2021).

Patří mezi ně:

- a) ankylozující spondylitida (AS)
- b) reaktivní artritida (ReA)
- c) psoriatická artritida (PsA)
- d) juvenilní spondylartritida/entezopatická juvenilní idiopatická artritida (SpA/ERA)
- e) enteropatická spondylitida spojená s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou
- f) nediferencovaná spondyloartritida
- g) neradografická forma axiální spondyloartritidy

(Levitová, Hušáková, 2018)

Jednotlivé rozdělení a popis spondyloartritid ukazuje *Tabulka 1*.

Tabulka 1 Spondyloartritidy – charakteristika

Název	Popis
Ankylozující spondylitida	Zánětlivé onemocnění s typickým poškozením páteře a SI kloubů (sakroiliakální skloubení), viditelného na rentgenovém snímku.
Reaktivní artritida	Zánět jednoho či více kloubů objevující se po infekci urogenitálního nebo gastrointestinálního traktu.
Psoriatická artritida	Zánět kloubů a páteře spojený s kožní psoriázou.
Juvenilní spondylartritida/entezopatická juvenilní idiopatická artritida	Systémové zánětlivé kloubní onemocnění, postihující děti a dospívající (před 16. rokem věku). Přechází do dospělosti a může se vyvinout do AS.
Enteropatická spondylitida	Spondylartritida objevující se u pacientů s Crohnovou nemocí nebo ulcerózní kolitidou.
Nediferencovaná spondyloartritida	Zánět kloubů nejčastěji na dolních končetinách. Onemocnění může po celý život probíhat nediferencovaně nebo se může vyvinout do jiné spondyloartritidy.
Neradografická forma axiální spondyloartritida	Zánětlivé onemocnění SI kloubů, páteře, šlachových úponů s problémy i mimo pohybový systém. Může přejít do AS.

Zdroj: (Levitová, Hušáková, 2018)

1.2.4 *Symptomy Bechtěrevovy choroby*

a) Bolest zad

Mezi první a ústřední symptom AS řadíme bolest zad. Bolest zad je však velmi rozšířeným příznakem spousty dalších onemocnění a často k ní může docházet vlivem mechanického poškození. Mechanická bolest se může projevit ale v jakémkoli věku, zatímco bolest zad spojená s AS se zpravidla projeví před 40. rokem jedince. Rozdíl dále můžeme pozorovat i v tom, že u mechanické bolesti je doporučován klid a zlepšuje se s odpočinkem, avšak u AS je tomu naopak (Wenker, Quint, 2021). Bolest dosahuje svého maxima v nočních a brzkých ranních hodinách a ke zlepšení a úlevě dochází až po rozcvičení a protažení (Levitová, Hušáková, 2018).

b) Tuhnutí a omezení hybnosti

Dalším prvotním znakem je omezení rozsahu pohybu. Dále pak tuhnutí a kyfóza v oblasti krční a bederní páteře. Na rentgenovém snímku nemocného tak můžeme pozorovat tzv. obraz „bambusové páteře“ (Pavelka, Rovenský, 2003). Dále může dojít k postižení hrudní páteře, což se u pacienta při předklonu projeví jako „obraz dvojhrbu“. Postižení v oblasti hrudníku vede ke zmenšení expanze hrudníku (Dítě, 2007). I když mohou být zasaženy všechny klouby zánětem, nejčastěji to bývají klouby na dolních končetinách (Levitová, Hušáková, 2018). Kyčelní klouby se vlivem osteolýzy zužují a objevují se i kostěné můstky mezi kyčelní a křížovou kostí, až nakonec vzniká kostěná ankylóza, což může činit chůzi velmi obtížnou (Dítě, 2007).

c) Mímokloubní projevy

Mimo pohybový systém jsou také časté zánětlivé onemocnění střev (50 %), akutní přední uveitida (25 % až 35 %) a psoriáza (přibližně 10 %). Předpokládá se, že vlivem systémového zánětu jsou pacienti více ohroženi kardiovaskulárními chorobami. V důsledku zmenšené expanze hrudní stěny a snížené pohyblivosti páteře se objevují i plicní komplikace. V neposlední řadě mají pacienti až dvakrát větší predispozici k výskytu zlomenin obratlů (Wenker, Quint, 2021).

1.2.5 Etiopatogeneze Bechtěrevovy choroby

Etiologie ani patogeneze Bechtěrevovy nemoci není doposud známá. Existují však určité předpoklady pro rozvoj choroby.

a) Vrozená dispozice

Díky studiím, které potvrzují, že AS se objevuje častěji v některých rodinách můžeme usuzovat, že genetické predispozice mají na rozvoj choroby nemalý vliv. Až 90–95 % pacientů s ankylozující spondylitidou mají pozitivní nález na alelu HLA-B27 (Braun, Sieper, 2007).

Bechtěrevova choroba má silnou genetickou vazbu na hlavní histokompatibilní komplex (MHC). Nejsilnější spojení mezi antigenem MHC a AS lze jednoznačně připsat HLA-B27. Existují návrhy, že zvyšovat citlivost na AS mohou dle dosavadního výzkumu zřejmě i jiné MHC alely kromě výše zmíněné HLA-B27 (Said-Nahal et al., 2002).

Podle některých hypotéz má HLA-B27 inhibovat obranu proti bakteriím a umožňovat tak přetrvávání mikrobiálních agens, které tak napomáhají k pokračování kloubního zánětu. Možnou spojitost mezi bakteriemi a HLA-B27 podporují okolnosti vzniku reaktivní artritidy. Ta se objevuje po urogenitální infekci způsobenou bakterií *Chlamydia trachomatis* nebo gastrointestinální infekci zapříčiněnou bakteriemi rodu *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia* nebo *Campylobacter*. Další kauzální souvislosti s infekcí jako spouštěčem je však v ostatních spondylartritidách nepatrná (Braun, Sieper, 2007).

b) Pohlaví

Pohlaví je jeden z neovlivnitelných aspektů každého onemocnění. Bechtěrevova choroba se objevuje častěji u mužů než u žen. U mužů také rozvoj poškození na SI kloubech a páteři postupuje rychleji (Forejtová, 2009).

„Základní patogenese rozdílů mezi muži a ženami s AS není známa. Prevalence HLA B27 u žen s AS je stejná jako u mužů, a nebyla nalezena žádná vazba chromozomu X s náchylností k AS.“ (Lee et al., 2007, s. 637).

c) Zevní faktor

Zatím nebyl prokázán žádný určitý vnější faktor, který by měl přímou souvislost s rozvojem Bechtěrevovy choroby. Jak již bylo zmíněno, neurčité spojení můžeme pozorovat u bakteriálních infekcích. U dlouhodobě sledovaných pacientů bylo zjištěno, že kouření a mechanické přetěžování pohybového ústrojí způsobilo akceleraci poškození. Uvádí se, že určitou roli hraje i psychický stres (Levitová, Hušáková, 2018).

1.2.6 Diagnostika Bechtěrevovy choroby

Diagnostika AS vychází z anamnézy pacienta a přítomnosti typických příznaků AS jako bolesti zad, snížená pohyblivost páteře a omezení dýchacích pohybů hrudníku.

Při laboratorním vyšetření můžeme pozorovat u nemocných zvýšené hodnoty specifických ukazatelů zánětu - FW (sedimentace erytrocytů) a CRP (C-reaktivní protein). Hodnoty ale neodrážejí aktivitu onemocnění, u některých stabilizovaných pacientů vysoké hodnoty přetrvávají po celý život.

Dále jsou využívány zobrazovací metody jako rentgenové vyšetření, které odhaluje typické charakteristiky změny páteře a SI skloubení. Typické jsou na páteři tzv. syndesmofyty – srůsty obratlů (Olejárová, Prokeš, 2005).

1.2.7 Léčba Bechtěrevovy choroby

Léčby AS se zaměřuje na zmírnění bolesti a ztuhlosti, zlepšení funkční schopnosti, prevenci komplikací páteře a zmírnění zánětlivé aktivity (Wenker, Quint, 2021).

Onemocnění je však celoživotní a ani všechny doposud známé léčebné metody nedokáží AS naplno vyléčit. U většiny nemocných můžeme pozorovat střídání zdánlivého období klidu s obdobím vzplanutí. Terapie spočívá v kombinaci farmakologických a nefarmakologických léčebných prostředků. Soubor doporučeních postupů pro farmakologickou péči je vydáván Evropskou ligou proti revmatismu (EULAR – European League Against Rheumatism) a Českou revmatologickou společností (ČRS), která ve svých dokumentech také odkazuje na nová doporučení EULAR (Levitová, Hušáková, 2018).

Ústřední roli v terapii AS hrají nesteroidní antirevmatika (NSA). Díky jejich rychlému účinku s nimi bývá zahájena léčba. Po zlepšení, kterého je dosahováno zhruba u 80 % pacientů během 2–4 týdnů se může dávka NSA snižovat nebo podávat pouze při bolestech tzv. on demand. Výrazný posun v léčbě AS byl v posledních několika letech zaznamenán díky biologické léčbě. Nejúčinnější formou léčby je tzv. anti-TNF (anti-tumor nekrotizující faktor), u kterého můžeme pozorovat výrazné snížení reaktantů akutní fáze. Přestože anti-TNF léčba funguje i u pokročilejších stádií nemoci, lepších výsledků se dosahuje u časnějších forem AS (Pavelka, 2012).

Další možností u opakujících se zánětů a těžkých deformit je revmatochirurgie, kdy se nejčastěji provádí náhrady kloubů (Klener, Pavelka, 2002).

Léčba by měla být komplexní a v důsledku mimokloubních projevů AS jako například uveitida nebo psoriáza, by se o pacienta měl starat tým specialistů v čele s revmatologem. V doporučených postupech léčby EULAR z roku 2016 van der Heijde et al. jasně uvádí, že hlavní roli by zde mělo mít sdílené rozhodování pacienta a lékaře a kolektivní rozhodnutí o možném nejlepším vedení této léčby.

Nedílnou součástí léčby AS tvoří nefarmakologická terapie v podobě edukace pacienta, lázeňská léčba či fyzioterapie. Pohybová léčba napomáhá udržení hybnosti a předchází deformacím páteře. Pravidelné cvičení pacientům přináší také symptomatickou úlevu (Olejárová, Prokeš, 2005).

1.3 MHC komplex

MHC (Major Histokompatibility Complex) je obecný pojem pro histokompatibilní systémy jednotlivých živočišných druhů. Jedná se o systém genů, jejichž produkty hrají zásadní roli při imunitní odpovědi organismu.

Napříč živočišnými druhy pozorujeme u MHC komplexu jisté společné znaky, a to že se jedná o vysoce komplexní a polymorfní systém genů. Dále že MHC komplex je zodpovědný za histokompatibilitu, tedy slučitelnost tkání. Komplex produkuje silné transplantační antigeny kůže, tkáně a orgánů a při sebemenším rozdílu MHC antigenů mezi dárcem a příjemcem dochází k rejekci (Buc, 2012).

U člověka označujeme MHC komplex jako HLA systém (Human Leukocyte Antigens).

1.3.1 Charakteristika HLA systému

HLA molekuly mají za úkol prezentovat endogenní či exogenní cizí antigeny imunokompetentním buňkám – T-lymfocytům. T-lymfocyty rozpoznávají antigenní peptidy, nezbytné pro spuštění či regulaci imunitní reakce.

Genová oblast pro HLA systém se nachází na krátkém raménku 6. chromozomu v oblasti 6p21. V tomto úseku je lokalizováno 224 genů, kdy 128 je funkčních a 96 jsou tzv. pseudogeny (Buc, 2012). Jak již bylo řečeno výše, jedná se o systém genů, který je velmi polymorfní, tedy že kombinace HLA molekul je unikátní u každého jedince. Příklad shody HLA molekul tak představují jediné jednovaječná dvojčata. Kvůli této vysoké úrovni polymorfismu mezi geny je typizace HLA klíčovým úkolem při transplantaci hematopoetických kmenových buněk, orgánových transplantacích, imunitních poruchách i v onkologické imunoterapii (Yu et al., 2021). Díky lepšímu pochopení HLA systému se tak například zlepšila i dostupnost transplantace hematopoetických buněk při terapii krevních poruch, kdy byl po mnoho let sourozenec se shodným lidským leukocytárním antigenem jediným běžně používaným dárcem. V dnešní době je transplantace od dárců s omezeným stupněm neshody HLA v mnoha případech spojena s přijatelnými výsledky (Ruggeri et al., 2016).

HLA systém je také spojen s mnoha imunitními poruchami, jako je například AIDS, narkolepsie a celiakie (Yu et al., 2021).

Stanovení molekul HLA se uplatňuje nejen při transplantacích a jako pomocný marker při autoimunitních onemocnění, ale může být využito i ve forenzní medicíně při identifikaci pachatele nebo paternitních sporech, kde je však v posledních letech nahrazováno DNA analýzou (Bartůňková, Paulík, 2011).

1.3.2 Funkce HLA systému

HLA molekuly hrají důležitou roli v imunitním systému člověka, kdy prostřednictvím prezentace antigenů uskutečňují první předpoklad pro rozvoj specifické imunitní reakce a obrany organismu. Hlavní funkce HLA molekul tak spočívá v předkládání cizorodých antigenů buňkám imunitního systému a to T-lymfocytům (Vrajová, 2020).

Molekuly HLA pohlcují peptidové fragmenty endogenních či exogenních cizích částic a vystavují je na svém povrchu, tak aby T-lymfocyty pomocí jejich buněčného receptoru (TCR) tento komplex rozpoznali. Tento fenomén je označován jako HLA restrikce (Hořejší et al., 2017).

Interakce mezi T-lymfocyty a HLA molekulami při rozpoznávání cizorodého antigenu předloženého ve žlábků molekuly HLA se v rámci tříd liší. Subpopulace tzv. pomocných T-lymfocytů CD4⁺ rozeznávají antigen ve vazbě na HLA molekulu druhé třídy a tzv. cytotoxické T-lymfocyty CD8⁺ zas rozeznávají antigen předložený HLA molekulami první třídy. Každá z HLA molekul může na svém povrchu prezentovat jen určitý počet antigenních částic. Díky jednotlivým alelickým formám a jejich záměnách v jedné či vícero aminokyselin by měli být HLA molekuly schopny prezentovat peptidy z každého existujícího mikroba. Je proto pravděpodobné, že i v případě objevení obzvláště rafinovaného patogenu bude v populaci aspoň část jedinců opatřena HLA molekulami, které budou schopny vázat patogenní peptidy (Jílek, 2019).

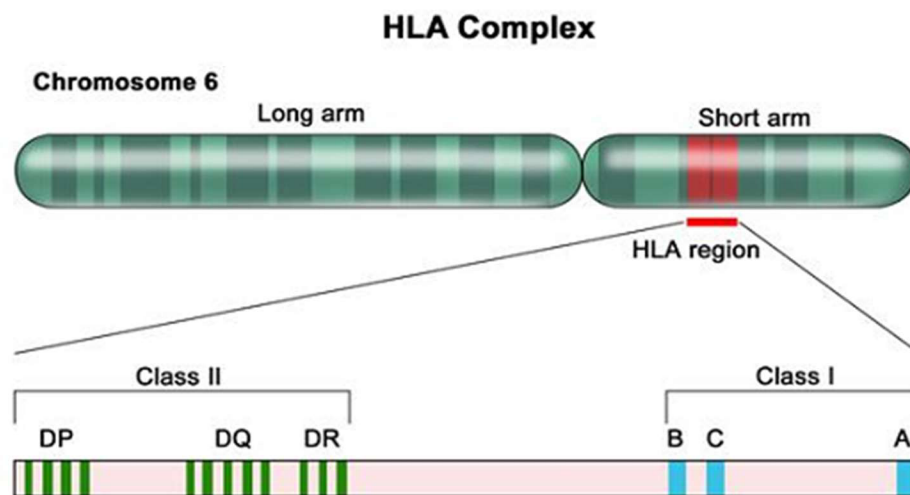
Polymorfismus histokompatibilního komplexu má tedy ochranný význam jak pro jedince, tak pro populaci a k zachování druhu (Hořejší et al., 2017).

1.3.3 Rozdělení HLA

HLA geny můžeme rozdělit do tří tříd:

- a) HLA I. třídy – lokalizovány na krátkém rameni chromatidy nejdále od centromery
- b) HLA II. třídy – lokalizovány na krátkém rameni chromatidy nejbliže centromery

- c) HLA III. Třídy – lokalizovány na krátkém rameni chromatidy v úseku mezi geny HLA I. třídy a HLA II. třídy



Obrázek 2 Lokalizace HLA genů na chromozomu

Zdroj: (National Cancer Institute, 2012) dostupné z: <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=10431>

1.3.4 HLA I. třídy

Molekuly HLA I. třídy jsou transmembránové glykoproteiny, které najdeme na všech jaderných buňkách. Molekuly se skládají z jednoho těžkého řetězce α a jednoho lehkého řetězce β . Těžký řetězec α se rozděluje na 3 části: extracelulární, transmembránovou a cytoplazmatickou. Obdobně jako imunoglobuliny mají HLA molekuly doménovou stavbu. Extracelulární úsek je tvořen třemi doménami – α_1 , α_2 , a α_3 . Řetězec β je tvořený β_2 -mikroglobulinem (Buc, 2012).

Terciární struktura HLA molekul I. třídy je kombinací alfa a beta struktury: α_3 doména a β_2 -mikroglobulin mají formu skládaného listu (beta struktura), přičemž za vzájemné interakce domény α_1 a α_2 vzniká žlábek ve formě skládaného listů, který přechází do spirálovité formy (alfa struktura) a vytváří boční stěny žlábků. Toto prostorové uspořádání umožňuje HLA molekulám přijmout ve vazebném místě antigenní peptidy pouze o délce 8–10 aminokyselin (AMK) (Penka, Slavičková, 2012).

Mezi HLA molekulami I. třídy jsou nejvíce zmiňované ty, jež jsou výrazně polymorfní, což jsou molekuly HLA-A (68 variant), HLA-B (125 variant) a HLA-C (44 variant). Jelikož byly jako první objeveny, označujeme je jako tzv. klasické HLA antigeny, které nacházíme nejvíce v thymu, slezině a lymfatické tkáni. Jako tzv. neklasické, které byli objeveny později označujeme molekuly HLA-E, HLA-F a HLA-G, o jejichž funkci není dosud moc známo. Uvádí se, že hrají podstatnou roli při toleranci plodu v děloze (Jílek, 2019).

Do této skupiny řadíme také geny MIC (MHC class I polypeptide-related sequence), konkrétně MICB (MHC class I polypeptide-related sequence B) MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A). Tyto glykoproteiny mají podobnou strukturu jako MHC glykoproteiny I. třídy. Molekuly MIC se exprimují při stresových situacích buňky například při infekci. Na rozdíl od HLA antigenů lokalizovaných na lymfocytech, se nacházejí na epitelových buňkách a hrají důležitou roli ve slizniční imunitě (Buc, 2012).

V lokusech HLA-H, HLA-J, HLA-K, HLA-L a HLA-X se nacházejí nefunkční geny, které označujeme jako pseudogeny. Ty obsahují ve svých kódujících oblastech mutaci, jež zamezuje tvorbě původního produktu, tj. antigenu (Penka, Slavíčková, 2012).

1.3.5 HLA II. třídy

Distribuce HLA molekul II. třídy je omezena na buňky prezentující antigen (APC), tj. na monocytech a makrofázích, dendritických buňkách, B-lymfocytech a můžeme je najít i na aktivovaných T-lymfocytech (Jílek, 2019). Po aktivaci imunomodulačními látkami můžeme tyto molekuly najít i na specializovaných epitelových buňkách (keratinocyty, epitelové buňky thymu) ale i na některých neepitelových buňkách (astrocyty, melanocyty) (Buc, 2012).

Antigeny II. třídy jsou tvořeny dvěma dvojdomenovými řetězci α a β , z nichž každý je zakotven v membráně. Terciální struktura HLA II. třídy je obdobná jako u HLA I. třídy. Domény α_1 a α_2 mají podobu skládaného listu (beta struktura) a domény β_1 , β_2 mají spirálovitou strukturu (alfa struktura). Za vzájemné interakce vytvářejí žlábek, který je otevřený na rozdíl od uzavřeného žlábků HLA I. třídy. HLA molekuly II. třídy přijmou ve vazebním místě antigenní fragmenty o délce 15–35 AMK (Buc, 2012).

Nejvýznamnější molekuly II. třídy jsou HLA-DR (95 variant), HLA-DP (46 variant) a HLA-DQ (37 variant) (Jílek, 2019).

1.3.6 HLA III. Třídy

HLA III. třídy se nachází mezi genovou oblastí HLA I. a II. třídy. Tato třída od předešlých dvou nesouvisí přímo s aktivitou HLA systému. Geny třetí třídy kódují různorodou skupinu proteinů, souvisejících s imunitním systémem, tj. C2 a C4 složka komplementu, TNF (tumor nekrotizující faktor), receptory NK buněk a další (Krejsek et al., 2016).

1.3.7 Dědičnost HLA systému

Geny HLA systému se nachází na krátkém raménku 6. chromozomu. Hovoříme zde o genech autozomálně kodominantních, tedy dědičnost znaků není vázána na pohlaví a vyjadřují se současně tj. exprimovány jsou geny jak od otce, tak od matky (Tumer et al., 2020).

Kombinace alel je na potomky přenášena ve formě tzv. haplotypu. Celá genetická oblast, která je ve vzájemné vazbě se tak přenáší z rodičů na potomstvo vcelku. Výsledná sada HLA znaků u jedince je tedy tvořena dvěma haplotypy (jeden zděděný od matky a druhý od otce) (Staňková, 2020).

HLA geny se řídí Mendelovými zákony a v rámci rodiny se tak mohou vyskytnou 4 různé kombinace rodičovských haplotypů. Sourozenci tak mohou být v HLA:

- shodní – 25 % (byl zděděn stejný haplotyp od otce a stejný haplotyp od matky)
- zcela odlišní – 25 % (byl zděděn rozdílný haplotyp od matky a od otce)
- shoda v jednom haplotypu – 50 % (tzv. haploidentičtí - byl zděděn stejný haplotyp od matky ale rozdílný od otce nebo stejný haplotyp od otce ale rozdílný od matky)

Rodiče jsou vůči potomkům vždy haploidentičtí (Buc, 2012).

Uvádí se, že 1–2 % potomků nese rekombinantní genotyp jako důsledek crossing-overu. Jedná se o proces výměny části genetické informace pouze mezi dvěma ze čtyř chromatid určitého chromozomového páru v průběhu meiotické tetrády. Vznik crossing-overu mezi dvěma lokusy je ovlivněn jejich vzdáleností od sebe. Obecně lze říci, že čím blíže leží oba lokusy na chromosomu, tím spíše se budou dědit společně a tím menší bude riziko rekombinantních genů (Otová, 2006).

1.3.8 Typizace HLA systému

Starší základ HLA typizace tvoří sérologické metody založené na specifických anti-sérech, pomocí nichž se určují HLA antigeny přítomné na vyšetřovaných lymfocytech. Moderní genetická metoda typizace HLA molekul využívá polymerázovou řetězovou reakci (PCR) (Staňková, 2020).

a) Sérologické metody

Vlastní HLA typizace pomocí serologické metody se provádí tzv. lymfocytotoxickým testem (LCT). Jedná se o vyšetření lymfocytů pacienta pomocí typizačních sér, což je panel lidských anti-HLA protilátek získaných ze sér aloimunizovaných dárců. Nejčastějším zdrojem je tak krev matek, u kterých se fyziologicky vytváří po opakovaných graviditách anti-HLA protilátka namířené proti HLA antigenům dítěte, zděděné od otce (Krejsek et al., 2016). Dalším možným zdrojem typizačních sér je hybridom („nesmrtelná“ buněčná linie), vytvořený fúzí lymfocytů imunizované myši a myelomových buněk, který produkuje monoklonální protilátky žádané specifity. Tato séra jsou ale z důvodu časové a finanční náročnosti vzácná (Penka, Slavičková, 2012).

Principem testu je, že se protilátka se známou specifitou inkubují s lymfocyty s neznámými HLA antigeny v přítomnosti komplementu. V praxi se tak ke specifickým anti-sérům v jamkách mikrotitračních (Terasakiho) destiček přidávají testované lymfocyty pacienta. Při inkubaci dojde k navázání specifické protilátky v případě, že odpovídá HLA antigenu na povrchu buňky, pokud neodpovídá, k vazbě nedojde. K zviditelnění se do reakce přidává králičí komplement. Při následující inkubaci dochází k lýze buněk s navázanými protilátkami – jedná se o pozitivní reakci. Buňky, na které se protilátka nenašly, zůstávají neporušené – jedná se tak o negativní reakci. Odečet po vitálním barvení se provádí pod optickým mikroskopem (Staňková, 2020).

Vitální lymfocyty se jeví jako světlé a luminizující (negativní reakce), lyzované lymfocyty se jeví jako větší a tmavě zbarvené (pozitivní reakce). Z kombinací specifických antisér, u kterých byla zaznamenána pozitivní reakce, jsou určeny HLA antigeny vyšetřovaného jedince (Staňková, 2020).

V některých případech však může docházet k falešně pozitivním výsledkům, kdy například antigen HLA-B7 reaguje s vícero typizačními séry, konkrétně se séry anti-B22, anti-B27 a anti-B40. U některých jedinců pak naopak kvůli slabé expresi HLA molekul na buňkách může docházet k falešně negativním reakcím. Dalšími hraničními limity pro tuto typizaci je pozměněná morfologie nebo snížená životnost buněk. Z těchto důvodů se v dnešní době spíše využívají molekulárně genetické metody (Penka, Slavíčková, 2012).

a) Molekulárně biologické metody

Molekulární genetické metody pro specifickou typizaci HLA systému využívají PCR reakci. Jde o široce používanou techniku pro specifickou detekci a produkci velkého množství DNA. Jako zdroj DNA pro PCR vyšetření můžeme využít široké spektrum biologického materiálu jako jsou vzorky periferní krve, kůže, vlasů, slin atd. Výhodou je i citlivost tohoto testu, jelikož stačí i nepatrné množství DNA, které lze amplifikovat do více kopií (Garibyan, Avashia, 2014).

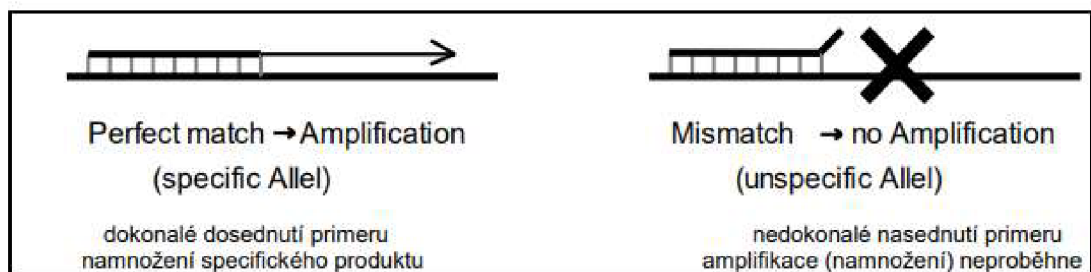
Každá PCR reakce vyžaduje přítomnost templátové DNA, primerů, nukleotidů a DNA polymerázy. Velmi rozšířené je použití Tag polymerázy, izolované z bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v horkých pramenech a je tak odolná vůči vysokým teplotám. DNA polymeráza je enzymem, který spojuje jednotlivé nukleotidy dohromady za vzniku amplifikačních produktů. Nukleotidy Adenin, Thymin, Cytosin a Guanin (A, T, C, G), které se nacházejí v DNA, fungují jako stavební bloky, které využívá DNA polymeráza k vytvoření výsledného PCR produktu (Bartůňková, Paulík, 2011).

Celý proces se odehrává v přístroji zvaném termocyklér. V něm se cyklicky opakuje denaturace, obvykle při teplotě okolo 95 °C, při níž dochází k rozpadu dvouvláknové DNA na samostatné řetězce, a replikace při teplotě 70 °C, kdy vzniklé jednotlivé řetězce DNA slouží jako templáty pro DNA polymerázu. Pro iniciaci replikace musí být nejdříve ve fázi okolo 50 °C připojeny primery. Jejich struktura rozhoduje o tom, kde replikace začne a specifikují přesný produkt DNA, který má být amplifikován. Po každém cyklu se počet kopií PCR produktů zdvojnásobí (Kodíček, 2007).

Existuje mnoho obměn PCR metody. Já jsem při své práci využila tzv. SSP-PCR (Sequence Specific Primers-polymerase chain reaction).

- SSP-PCR

Jedná se o polymerázovou řetězcovou reakci se sekvenčně specifickými primery. Jak název napovídá při této reakci se využívají krátké deoxyribonukleotidové řetězce, které jsou komplementární ke konkrétní alele. K pozitivní reakci dojde tedy pouze po absolutní shodě a přesném usazení obou primerů na cílovou sekvenci, jak můžeme vidět na *Obrázku 3*. Amplifikační produkty lze hodnotit na agarózovém gelu po proběhnutí elektroforézy (Penka, Slavičková, 2012).



Obrázek 3 SSP-PCR – komplementarita primerů k dané DNA sekvenci

Zdroj: (BAG Health Care Návod k použití HISTO TYPE SSP Kits, 2017)

Modernější přístup pro HLA typizaci představují také imunoanalytické techniky jako je ELISA a průtoková cytometrie (Staňková, 2020).

- ELISA (Enzym linked immuno sorbent assay)

ELISA je enzymová imunoanalýza, kdy komplex antigenu a protilátky je vázán na pevné fázi – imunosorbent. Vazba antigen-protilátka (imunokomplex) je detekována pomocí konjugátu, což je anti-lidská protilátka značená enzymem nebo fluorochromem. Výsledná detekce intenzity barevného produktu je fotometrická.

Ukazuje se, že test ELISA je citlivější než LCT, avšak ani tato metoda nedosahuje kvalit testů pomocí průtokové cytometrie (Kao et al., 1993).

- Screening protilátek HLA průtokovou cytometrií

Jde o velmi citlivé stanovení, které využívá fluorochromem barevně odlišené mikročástice. Jednotlivé sady jsou potaženy buď jediným HLA antigenem nebo fenotypem a sady mikročástic jsou spojeny do jedné zkumavky pro multiplexní testování. Vyšetřované sérum pacienta je inkubováno s mikročásticemi potaženými HLA specifitami pro navázání protilátek. Reakce antigen-protilátka se detekuje pomocí antiglobulinových činidel značených fluorochromem. Fluorescence jednotlivých mikročástic je analyzována laserovým paprskem v průtokovém cytometru (Bontadini, 2012).

1.4 HLA-B27

Korelace mezi přítomností alely HLA-B27 a AS je známá již od počátku 70. let 20. století. Ačkoli se tato alela běžně nachází v populaci, její přítomnost u jedince silně přispívá k náchylnosti a rozvoji zánětlivých revmatologických stavů (Parameswaran, Lucke, 2021).

S určitostí byla do dnešní doby potvrzena pouze souvislost AS a alely HLA-B27 jako genetického faktoru pro toto onemocnění. Studie zabývající se AS však naznačují, že se na vzniku onemocnění podílejí i další genetické faktory odlišné od oblasti HLA systému. Je to například gen pro receptor IL-23 (interleukin 23) u kterého bylo prokázáno, že má patogenní účinek u spondyloartropatie (Chatzikiyriakidou et al., 2011).

Četné studie se již dříve také pokoušely identifikovat i jiné geny v HLA systému kromě HLA-B27, které by přímo přispívaly k citlivosti AS. S ohledem však na vysoce polymorfní lokusy HLA systému je stanovení velmi náročné (Said-Nahal et al., 2002).

Jisté studie uvádějí spojitost mezi HLA-B27 a HLA-B51, které mohou účinně aktivovat imunoglobulinový receptor NK buněk (KIR) a spouštět tak destruktivní proces, který může hrát důležitou roli u AS (Liu et al., 2021). Nález HLA-B51 ale zatím nebyl nijak prokázán s klinickými projevy nebo aktivitou onemocnění AS (Jung et al., 2019).

Ve studii z roku 2002, která se soustředila na vyšetření 70 francouzských rodin, byla prokázána souvislost faktoru predisponujícího k revmatoidní artritidě (RA) HLA-DR4 s určitou náchylností k AS, což podporuje hypotézu, že alely HLA-B27 a HLA-DR4 přispívají k chronickému zánětlivému onemocnění kloubů a že RA a AS sdílí určitý patogenní mechanismus (Said-Nahal et al., 2002).

Ačkoli existuje mnoho studií týkajících se HLA systému a predispozice k autoimunitním onemocněním, mechanismus HLA-B27, který má vliv na rozvoj AS, zůstává nevyřešený a samotný nález HLA-B27 u pacienta, tak nevysvětluje veškerou predispozici k AS (Parameswaran, Lucke, 2021).

1.4.1 Dědičnost HLA-B27

Bechtěrevova choroba je z velké části známá jako vysoce familiární, přičemž platí, že sourozenec pacienta s AS může mít až padesátkrát vyšší riziko rozvoje onemocnění ve srovnání s běžnou populací. Geny hlavního histokompatibilního komplexu udělují 40–50 % genetické vnímavosti k AS, přičemž gen HLA-B27 tvoří přibližně 30 % celkové genetické vnímavosti k AS (Chatzikyriakidou et al., 2011).

Podle studií bývá rodinná anamnéza AS významně častější u žen než u mužů (Lee et al., 2007).

1.4.2 Subtypy HLA-B27

Konkrétně se podtypy HLA-B27 odlišují záměnou jedné nebo více aminokyselin ve vazebném místě pro peptidy nebo v jeho blízkosti (Hořejší et al., 2017).

Většina subtypů HLA-B27 byla spojena s AS. Některé subtypy jsou však vzácné a výsledky u nich nejsou jednoznačné. Nejsilnější asociaci s AS vykazuje subtyp HLA-B27:04. Další velmi frekventovaná souvislost je pozorována u subtypů HLA-B27:05, HLA-B27:02 a HLA-B27:07. Nejslabší asociaci s onemocněním mají subtypy HLA-B27:06 a HLA-B27:09 (Chatzikyriakidou et al., 2011).

1.4.3 Hypotézy účinku HLA-B27

Ačkoli se mechanismus, kterým HLA-B27 způsobuje onemocnění, nepodařilo doposud objasnit, bylo navrženo několik hypotéz.

Jednou z nich je hypotéza tzv. artritogenního peptidu. Podle ní HLA-B27 vytvoří vazbu s peptidem mikrobiálního původu. Tím dojde k aktivaci CD8+ T-lymfocytů a spuštění buněčné odpovědi na vlastní peptid s podobnou strukturou jako má mikrobiální peptid. Hovoříme zde o tzv. molekulárních mimikrách. Jako potvrzení této teorie má sloužit nález CD8+ T-lymfocytů u pacientů, u kterých se vyvinula reaktivní artritida po infekci, způsobenou bakteriemi druhu *Salmonella* nebo *Chlamydia a* která měla spustit ničivou specifickou odpověď (Parameswaran, Lucke, 2021).

Jako další důkaz této teorie účinku HLA-B27 můžeme brát i konzistentní nálezy bakterie *Klebsiella pneumoniae* v gastrointestinálním traktu HLA-B27 pozitivních pacientů (Zhang et al., 2018). Nebo studii z roku 2021 prováděnou v oblasti Tožské republiky, kdy kolem 40 % vyšetřených pacientů s AS mělo subklinický střevní zánět (Houzou et al., 2021).

Další často zmiňovanou teorií mechanismu HLA-B27 je hypotéza chybného skládání. Ta naznačuje, že dojde k chybné vazbě peptidů HLA-B27, která probíhá v endoplazmatickém retikulu. Chybná struktura pak způsobuje funkční změny v populacích a funkci dendritických buněk, zvýšenou tvorbu osteoklastů a také zvýšenou produkci IL-23. Byl proveden výzkum této teorie na zvířecích modelech, ale studie u lidí chybí, a ne vždy tyto studie podporují výše zmíněný mechanismus fungování HLA-B27 (Parameswaran, Lucke, 2021).

1.4.4 Faktory

Bechtěrevova choroba je chronické zánětlivé onemocnění neznámé etiologie. Na rozvoji se podílí imunogenetické a environmentální faktory (Forejtová, 2009).

Kromě těchto faktorů ale nacházíme odlišnosti i podle geografické oblasti, kdy přítomnost alely HLA-B27 má větší prevalenci v severních zeměpisných šířkách (Parameswaran, Lucke, 2021).

Z hlediska etniky je velmi rozšířený podtyp HLA-B27:05 běžný u bělochů a amerických Indiánů. Podtyp HLA-B27:04 nejčastěji nacházíme u Asiatů, zatímco subtyp HLA-B27:02 bývá stanoven u středomořské populace (Chatzikyriakidou et al., 2011).

V subsaharské Africe je tak podle tohoto geografického rozložení výskyt AS poměrně vzácný, na rozdíl od Severní Afriky. Tuto raritu si ale z části můžeme vysvětlit nedostatečnou diagnózou a banální povahou hlavního příznaku AS, kdy bolest v kříži, která střídavě ustupuje, dostatečně nemotivuje k rozsáhlejšímu revmatologickému vyšetření. Nízký výskyt a neobvyklost AS v tropické Africe koreluje s vzácností HLA-B27 obecně mezi černou populací Afriky. I v případě positivity AS bývá klinický obraz onemocnění obecně mírnější bez mimokloubních projevů ve srovnání se situací v západní Evropě a Severní Americe (Houzou et al., 2021).

Odlišnost projevů AS pozorujeme i z hlediska pohlaví, kdy u pacientů s AS mají muži závažnější radiografické změny a u žen jsou více zastoupeny periferní artritidy (Lee et al., 2007).

Do faktorů ovlivňující dynamiku onemocnění AS můžeme také zařadit klasické rizikové faktory související s úbytkem kostní hmoty v obecné populaci, jako je tabák a alkohol. U pacientů s pozitivním nálezem HLA-B27 byla pozorována vyšší konzumace tabáku a nadměrného příjmu alkoholu ve srovnání s HLA-B27 negativními jedinci (Arévalo et al., 2020).

2. Cíl práce a výzkumné otázky

2.1 Cíl práce

V první části této práce bylo mým cílem sepsání odborné rešerše na Bechtěrevovu chorobu a její spojitosti s molekulou HLA-B27 podle odborné literatury a na základě informací ze současných vědeckých publikací.

V druhé části mé bakalářské práce bylo mým cílem osvojit si správnou laboratorní praxi v genetické laboratoři stejně jako laboratorní metody zaměřené na izolaci, kvantifikaci a amplifikaci DNA a detekci alely HLA-B27 za použití komerčního kitu metodou PCR a gelovou elektroforézou. Také zavést a zoptimalizovat komerčně dodávaný kit pro detekci alely HLA-B27 od firmy BAG HEALTH CARE.

2.2 Výzkumné otázky

2.2.1 Výzkumná otázka 1

Je komerčně dodávaný kit vhodný pro detekci alely HLA-B27 (přesnost, časová a finanční náročnost)?

2.2.2 Výzkumná otázka 2

Nejvyšší výskyt HLA-B27 je u pacientů trpící ankylozující spondylitidou?

3. Praktická část

3.1 Metodika

Praktická část mé bakalářské práce probíhala na Ústavu laboratorní diagnostiky a veřejného zdraví Jihočeské univerzity pod vedením Ing. Tomáše Nixe, Ph.D. Před začátkem samotné práce jsem nejdříve byla poučena o laboratorním řádě a seznámena s pravidly bezpečnosti práce v genetické laboratoři. Vyšetřovala jsem celkem 20 vzorků, pocházejících od dobrovolníků. Pro ochranu citlivých dat jsem všechny vzorky anonymizovala a pro rozlišení vzorků zvolila jednoduché číselné označení, aby nedošlo k přímé identifikaci konkrétní osoby. Jednalo se o různorodou skupinu lidí a od každého vyšetřovaného dobrovolníka jsem měla 2 bukální stěry pro zvýšení koncentrace DNA.

Stanovení alely HLA-B27 jsem prováděla pomocí komerčně dodávaného kitu HISTO TYPE B27 od firmy BAG Health Care, která vlastní CE certifikaci pro in vitro diagnostiku. Firma se od 1.6. 2019 přejmenovala na BAG Diagnostics GmbH, já však pracovala se soupravou, kde byl uveden ještě starý název firmy, a proto i toto staré označení v následujících stránkách ponechávám. Základním vzorkem pro izolaci DNA byl bukální stěr, který si díky své neinvazivitě může odebrat každý testovaný sám, ovšem za předpokladu splnění hlavních zásad pro tento odběr. Následovala izolace DNA a vyšetření alely HLA-B27 u vzorků metodou SSP-PCR a gelové elektroforézy podle návodů výrobců, které byli součástí balení kitů, a které jsem podrobně sepsala v pracovních návodech každé jednotlivé fáze stanovení.

3.2 Preanalytická fáze vyšetření

Z hlediska ovlivnění výsledků lze říci, že je preanalytická fáze nejdůležitější. Chyby způsobené v této části vyšetření se dají velmi těžko odhalit systémem laboratorní kontroly. Rozhodujícím faktorem je nejen edukace pacienta a jeho důslednost, ale i samotný odběr a následný transport a uchovávání vzorku před analýzou. Testování dobrovolníci si mohli odběr provést sami po předchozím poučení o správném odběru bukálního stěru a následné názorné ukázce nebo byl odběr proveden mnou samotnou.

- Bukální stěr

Bukálním stěrem získáváme molekuly DNA, která je nositelkou genetické informace a je u každého jedince jedinečná (výjimku tvoří jednovaječná dvojčata) (Veselá, 2009).

DNA můžeme získat prakticky z jakékoli tkáně. DNA získaná bukálním stěrem bude z hlediska informací stejná jako DNA získaná z krve. Jelikož se jedná o odběr z dutiny ústní hrozí nebezpečí kontaminace vzorku jídlem, proto je doporučováno stěr provést buďto hned ráno po probuzení před ústní hygienou, nebo alespoň hodinu před odběrem nejíst a před zahájením stěru si vypláchnout ústa čistou vodou (Veselá, 2009).

Bukální stěr je neinvazivní metoda, která se provádí pomocí sterilní vatové tyčinky uložené ve sterilní zkumavce. Vatovou tyčinkou vyvíjíme tlak na sliznici v zádni části dutiny ústní a otáčíme ji během tohoto procesu ze strany na stranu po dobu nejméně 1 minuty. Při vkládání vatové tyčinky zpět do původní zkumavky si musíme dát pozor, aby nedošlo k znehodnocení vzorku nesprávnou manipulací a porušení sterility hlavičky tyčinky například dotknutím se jí prsty nebo jejím otřením o pracovní plochu. Bukální stěr by se měl zpracovat do 48 hodin. Materiál je možno uchovávat v lednici při teplotě 4–8 °C (Bystřická, 2020).

3.3 Analytická část vyšetření

Po odebrání biologického materiálu a přípravě vzorku dochází k vlastnímu analytickému zpracování. Pro snížení rizika výskytu chyb v analytickém procesu jsou dodržovány postupy správné laboratorní praxe, kdy pomocí vnitřní a vnější kontroly kvality zjišťujeme výskyt a velikost systematických a náhodných chyb. Správnost a spolehlivost analytické části je tedy už v plné míře závislá na laboratoři. Aby během pracovního postupu nedošlo ke kontaminaci a tím i chybným výsledkům, měla jsem oddělená pracovní místa pro pre-amplifikační část procesu (izolace DNA, příprava reakcí) a post-amplifikační část procesu (elektroforéza, dokumentace). Práce probíhala ve sterilním prostředí laminárního boxu. Samozřejmostí bylo také používání ochranných prostředků a rukavic během celého procesu.

3.3.1 *Izolace DNA*

Prvním potřebným krokem při stanovení alely HLA-B27 bylo získání čisté genomové DNA ze vzorků. Jelikož DNA z bukálních stěrů bývá obsažena v poměrně malém množství, byly odebrány vždy 2 vzorky od jedné osoby pro zvýšení její koncentrace. DNA z biologického materiálu je možno získat po předchozím rozrušení cytoplazmatické membrány buňky. Při izolaci DNA tedy nejprve dochází k lýze buněk, aby se uvolnil jejich obsah.

Vzniklý lyzát obsahuje však kromě DNA řadu dalších kontaminujících látek, které jsou odstraněny následnou extrakcí a purifikací DNA. Výtěžek a čistota DNA se liší v závislosti na typu zvolené metody. Já jsem pro izolaci DNA z bukalních stěrů zvolila kit pro izolaci DNA z tkání od firmy Generi Biotech. Během celého procesu izolace DNA ze vzorků jsem se řídila pokyny v manuálu od výrobce, který byl součástí balení. Celý postup je podrobně sepsán z návodu k použití od firmy Generi Biotech níže.

3.3.1.1 Izolace DNA z tkání – návod k použití od firmy Generi Biotech

Tento kit umožňuje získat vysoce čistou genomovou DNA z různých typů lidských tkání a buněčných kultur (poměr A_{260}/A_{280} : 1,70 až 1,90).

- Princip izolačního kitu

Lýzy buněk je dosaženo inkubací daného vzorku v prostředí Proteinasy K a roztoku s vyšším obsahem chaotropních iontů. Izolace DNA probíhá na koloně se silikagelovou membránou. Pro zajištění specifických podmínek pro navázání DNA na membránu je do lyzátu přidáván ethanol. Postupným promýváním dvěma různými pufrů jsou nejprve odstraněny nečistoty a následně je pomocí elučního pufru získána čistá genomová DNA.

Tabulka 2 Složení kitu Generi Biotech pro izolaci DNA z tkání

Složení kitu	
Buffer BLO	20 ml
Buffer BL1	15 ml
Wash Buffer BL2	30 ml
Wash Buffer BL3	12 ml
Elution Buffer BL4	13 ml
Proteinase K (lyophilized)	30 mg
Proteinase K Buffer PKB	1,8 ml
GB Tissue Columns (light green rings)	50 ks
Collection Tubes (2 ml)	100 ks

Další potřebné reagenty a vybavení:

- 96–100% ethanol
- 1,5ml zkumavky pro lyzační a eluční krok
- Nastavitelné automatické pipety (10–1000 μ l)

- Jednorázové sterilní pipetovací špičky s filtrem
- Ochranné pomůcky (laboratorní oděv, ochranné rukavice)
- Vortex mixér
- Centrifuga na 1,5ml–2ml zkumavky
- Blokovaný termostat (suché teplo)

Všechny pracovní roztoky se před použitím musí vždy řádně promíchat.

- Příprava pracovních roztoků

Před zahájením práce s izolačním kitem je nutné si připravit následující reagenty:

- **Wash Buffer BL3:** Přidá se 48 ml ethanolu (96–100%) do Wash Buffer BL3 před jeho prvním použitím. Připravený roztok se promíchá a na lahvičce se označí, že byl přidán ethanol. Roztok je stabilní minimálně 1 rok při laboratorní teplotě.
- **Proteinase K:** Pro rozpuštění lyofilizované Proteinasy K se přidá 1,35 ml pufru Proteinase K Buffer (PKB) a řádně se promíchá. Vzniklý roztok je stabilní minimálně 6 měsíců při -20 °C.
- Izolační protokol – Izolace DNA ze stěru bukalní sliznice

Dříve než jsem začala, jsem si nejprve zkontrolovala, zda byly pracovní roztoky Wash Buffer BL3 a Proteinase K připraveny podle výše uvedeného návodu. Dále jsem musela nastavit blokovaný termostat na 70 °C a předeřhřát Elution Buffer BL4 na 70 °C. Zkontrolovala, abych měla k dispozici 200 µl vyváženého solného roztoku DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) na každý vzorek (v původním příloženém manuálu výrobce uvádí použití deionizované vody, ale při mé laboratorní praxi jsem měla lepší zkušenost právě s roztokem Dulbecco's phosphate buffered saline od firmy Sigma Chemical CO).

- Lýza vzorku

Stěrový materiál se vzorkem z bukální sliznice jsem umístila do 2ml zkumavky a přidala jsem 200 μ l DPBS, 200 μ l Buffer BL1 a 25 μ l Proteinasy K. Vzorek jsem řádně promíchala na vortexu (20 s) a inkubovala ho 15 min v blokovém termostatu OP60 BIOTECH při 70 °C. Před otevřením jsem vzorek opět promíchala a krátce stočila (max. 3000 x g, 5 s) pomocí stolní centrifugy PRISM MINI. Vzorek jsem následně přenesla do nové 1,5ml zkumavky a stěrový materiál odstranila.

- Přidání ethanolu

Přidala jsem 210 μ l ethanolu (96–100%), promíchala vzorek na vortexu a krátce stočila (max. 3000 x g, 5 s).

- Navázání DNA

Pro každý vzorek jsem si z izolačního kitu připravila jednu kolonku a dvě sběrné zkumavky pro promývací kroky. Na kolonku, která byla umístěna ve 2ml sběrné zkumavce jsem přepipetovala 600 μ l vzorku a zcentrifugovala po dobu 1 min/11 000 x g. Sběrnou zkumavku s filtrátem jsem poté odstranila a kolonku vložila do nové sběrné zkumavky.

- Promývací krok

Na kolonku jsem napipetovala 500 μ l Buffer BL2 a zcentrifugovala 1 min/11 000 x g. Následně jsem tekutinu ze sběrné zkumavky vylila a kolonku vložila zpět do sběrné zkumavky. Na kolonku jsem napipetovala 600 μ l Wash Buffer BL3 a zcentrifugovala 2 min/11 000 x g. (Jelikož během procesu byl přidáván etanol a roztoky BL1 a BL2 obsahují chaotropní sole, provedla jsem při tomto kroku centrifugaci 2x pro snížení rizika inhibice následné PCR a falešných reakcí. I když v manuálu od výrobce toto není zmíněno, při mé laboratorní práci se tento přidáný krok osvědčil.) Sběrnou zkumavku s filtrátem jsem poté odstranila a kolonku vložila do nové označené 1,5ml zkumavky.

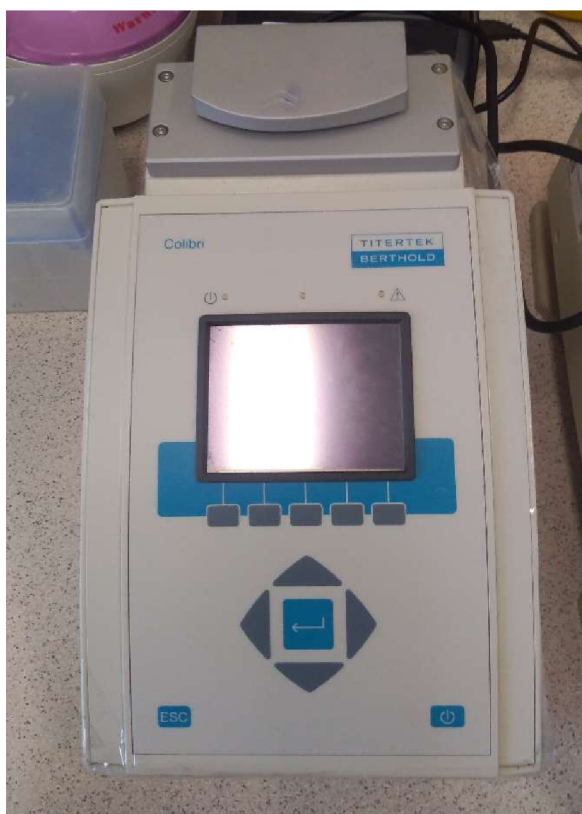
- Eluční krok

Přímo na střed kolonky jsem napipetovala 30 μ l přehřátého roztoku Buffer BL4 (70 °C). (V původním návodu je předepsáno 100 μ l roztoku Buffer BL4, ale sám výrobce zde uvádí možnost objem snížit za účelem zvýšení koncentrace DNA.) Potom následovala inkubace zkumavky 1 min při laboratorní teplotě a centrifugace 1 min/11 000 x g. Nakonec jsem odstranila kolonku a výsledkem byla čistá genomová DNA, která zůstala v 1,5ml zkumavce a byla připravena pro další použití.

3.3.2 Měření koncentrace DNA

Po provedené izolaci DNA bylo nutné zjistit její koncentraci, pro určení, zda máme dostatečné množství DNA v každém jednotlivém vzorku a zda je vyizolovaná DNA čistá. Stanovení koncentrace DNA jsem prováděla pomocí spektrofotometru Colibri Titertek-Berthold zobrazeném na *Obraze 4*. Jedná se o mikroobjemový spektrofotometr pro měření nejmenších objemů DNA, RNA (ribonukleová kyselina) a proteinů. Přístroj stanovuje koncentrace nukleových kyselin a čistoty vzorků nukleových kyselin bez nutnosti jejich ředění. Nukleové kyseliny absorbují nejintenzivněji světlo o vlnové délce (λ) = 260 nm a platí, že hodnota absorbance je přímo úměrná koncentraci DNA. Roztok s nukleovými kyselinami se spektrofotometriky měří ještě při vlnové délce 280 nm, kdy tato hodnota odráží míru přítomnosti proteinů a výsledná čistota DNA se pak určuje jako poměr absorbancí 260 a 280 nm. Hodnoty poměru A_{260}/A_{280} čisté DNA se pohybují přibližně okolo 1,8 a čím je hodnota poměru vyšší, tím je DNA čistší.

Pomocí dotykové obrazovky jsem na přístroji zvolila údaj pro měření DNA, označený jako dsDNA 50 (při vlnové délce 260 nm je absorbance roztoku rovna 1, pokud měřený roztok obsahuje dvouřetězcovou DNA o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$). Měřicí čočku přístroje jsem nejprve očistila od případných nečistot destilovanou vodou, aby nedošlo ke kontaminaci měřených vzorků. Dále jsem provedla referenční měření, tj. změření vlastností blanku neboli slepého vzorku. Jako blank byl použit Elotion Buffer BL4, kdy pomocí tohoto změření zařízení nastavilo hodnoty absorpčního pozadí na nulu. Pomocí automatické pipety jsem poté přenesla 1 μl vyzolované DNA na měřicí čočku přístroje a do 5 sekund se zobrazil výsledek koncentrace a čistoty DNA na obrazovce spektrofotometru. Měření koncentrace u každého vzorku jsem provedla 2x, přičemž před každým novým měřením jsem očistila čočku přístroje. Výsledné hodnoty koncentrace jsem pak zprůměrovala.



Obrázek 4 Mikroobjemový spektrofotometr Colibri Titertek-Berthold pro změření koncentrace a čistoty DNA

Zdroj: vlastní

3.3.3 Komerční souprava HISTO TYPE B27

Odizolovanou čistou DNA se známou koncentrací jsem vyšetřovala na přítomnost alely HLA-B27 pomocí komerčně dodávané testovací soupravy HISTO TYPE B27 od firmy BAG Health Care. Po celou dobu stanovení jsem se řídila kroky popsány v návodu od výrobce, který byl součástí kitu. Celý postup a jednotlivé kroky jsem podle tohoto návodu sepsala níže.

3.3.3.1 Stanovení alely HLA-B27 – návod k použití HISTO TYPE B27 od firmy BAG Health Care

Soupravy HISTO TYPE Kits jsou určeny na typizaci HLA na molekulárně genetickém základě. Základním materiálem pro práci s HISTO TYPE SSP soupravami je purifikovaná DNA. Při práci s těmito soupravami se využívá metoda SSP-PCR. Ta je založena na poznatku, že prodlužování primerů, a tím i úspěšná PCR, je závislé na přesné shodě 3' konců obou primerů s templátovou DNA. A tedy pouze přesné usazení obou primerů na cílovou sekvenci vede k získání produktu, který je pak identifikován při gelové elektroforéze.

Složení jednotlivých směsí primerů umožňuje jasnou HLA typizaci. Každá typizace je prováděna pomocí určitého množství prealiquotovaných a vysušených reakčních směsí obsahujících také vnitřní amplifikační kontrolu, přičemž celkový objem reakce je 10 µl.

- Obsah soupravy HISTO TYPE B27:
 - HISTO TYPE mikrozkušavky pro HLA typizaci. Předkapané, prealiquotované reakční směsi obsahují specifické primery, vnitřní kontrolu (specifickou pro lidský gen G3PDH) a směs nukleotidů.
 - 10xPCR pufr

Další potřebné vybavení a reagentie:

- Happy Taq
- Pipety (0,5–250 µl)
- Sterilní špičky s integrovaným filtrem

- DNA cyklér

Veškeré prealiquotované a vysušené reakční směsi již obsahují primery specifické pro danou alelu, stejně jako kontrolní primery a nukleotidy. Dodávány jsou vysušené na dně reakční zkumavky. Amplifikační parametry jsou nastaveny na celkový objem reakce 10 μ l.

- Amplifikace

Nejdříve jsem vyjmula z mrazicího boxu vzorky s izolovanou DNA a reagentie a nechala je rozmrazit při pokojové teplotě. Poté jsem všechny vzorky i reagentie zvortexovala a stočila (kromě Happy Taq DNA polymerázy, kterou jsem jen stočila, aby při zvortexování nedošlo k jejímu rozbití.) Vyjmula jsem si a popsala odpovídající počet mikrozkuvek s primery, 10xPCR pufr z krabice a připravila si Master-Mix, který jsem důkladně promíchala. Master-Mix se skládal z 10xPCR pufru, Taq-polymerázy a čisté PCR vody. Složení Master-Mixu odpovídá potřebnému počtu reakčních směsí a reagentie master-mixu na 1 reakci jsou popsány v *Tabulce 3*.

Tabulka 3 Reagentie master-mixu na 1 reakci

Reagentie	Objem
Happy Taq (5 U/ μ l)	0,08 μ l
10 x PCR pufr	1 μ l
PCR H ₂ O	7,0 μ l

Součástí analýzy byl jeden kontrolní vzorek od dobrovolníka, u kterého jsem měla potvrzenou pozitivitu na alelu HLA-B27 (vz. 3) a negativní kontrola bez obsahu DNA.

Po pečlivém promíchání směsi jsem přidala 8 μ l do každé reakční zkumavky a doplnila 2 μ l roztoku DNA (minimální koncentrace 12,5 ng/ μ l). Množství DNA bylo u dvou vzorků v závislosti na jejich nízké koncentraci upraveno. Do negativní kontroly jsem místo DNA napipetovala 2 μ l vody. Pozitivní kontrola obsahovala 2 μ l vzorku DNA od dobrovolníka s potvrzenou pozitivitou HLA-B27. Při aplikaci jsem si dávala pozor, abych se nedotkla vnitřní strany víček a horních okrajů mikrozkuvek prsty a nekontaminovala tak vzorky. Zkontrolovala jsem, zda jsou mikrozkuvky řádně dovřené a zda jsou veškeré PCR reagentie na dně a poté je stočila. Po stočení jsem reakční mikrozkuvku vložila do termocykléru MJ Mini Bio-Rad na *Obraze 5*, kde jsem nastavila a spustila PCR program dle doporučení výrobce, jak je uvedeno v *Tabulce 4*.

Tabulka 4 Parametry amplifikace

Krok programu	Teplota	Čas	Počet cyklů
První denaturace	96 °C	5 min.	1
Denaturace Annealing + extenze	96 °C 68 °C	20 sec. 1 min.	5
Denaturace Annealing Extenze	96 °C 64 °C 72 °C	20 sec. 50 sec. 45 sec.	10
Denaturace Annealing Extenze	96 °C 61 °C 72 °C	20 sec. 50 sec. 45 sec.	15
Závěrečná extenze	72 °C	5 min.	1



Obrázek 5 Termocyklér MJ Mini Bio-Rad, ve kterém probíhala amplifikace PCR produktů podle nastaveného programu.

Zdroj: vlastní

- Gelová elektroforéza

Dalším krokem v analytické fázi byla separace amplifikačních produktů pomocí gelové elektroforézy, při níž se fragmenty DNA v agarózovém gelu pohybují vlivem elektrického náboje.

- Vybavení pro gelovou elektroforézu:
 - Agaróza pro separaci DNA
 - 0,5xTBE pufr (45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 0,5 mM EDTA)
 - Ethidium bromid
 - Jednotka na gelovou elektroforézu DNA
 - Zdroj napětí
 - DNA délkový standard

Před samotnou elektroforézou jsem si nejdříve musela připravit agarózový gel. Postupovala jsem opět podle pokynů výrobce, podle nichž je doporučený pufr pro elektroforézu 0,5 x TBE (45 mM tris, 45 mM kyselina boritá, 0,5 mM EDTA) a koncentrace gelu by měla být 2,5% agarózy. Mnou užitá elektroforetická podložka měla objem 150 ml, proto jsem odvážíla 3,75 g agarózy do kádinky a přidala 150 ml pufru. Kádinku se směsí jsem vložila do mikrovlnné trouby a nechala ji rozehtát, dokud roztok nebyl čirý. Po celou dobu zahřívání v mikrovlnné troubě jsem dávala pozor, aby gel nevyvřel. Po zchladnutí roztoku (asi 70 °C) jsem přidala 10 µl Ethidium bromidu pro vizualizaci amplifikačních produktů. Jelikož se jedná o silný mutagen zacházela jsem s ním velmi opatrně a dbala zvýšený zřetel na bezpečnost práce. Roztok jsem důkladně promíchala do rozpuštění Ethidium bromidu. Takto připravený gel jsem nalila do elektroforetické vaničky s hřebínky, vzniklé bublinky odstranila a gel nechala po dobu minimálně 30 min. tuhnout.

Po ztuhnutí gelu jsem hřebeny vyndala a vložila gel do elektroforetické vany, která obsahovala elektroforetický pufr. Po ukončení amplifikace jsem vzorky vyjmula z termocykléru a vnesla jsem celý reakční objem vzorku opatrně do odpovídající jamky v gelu. Dále jsem použila DNA žebřík v lyofilizované formě od firmy Carl Roth. Podle instrukcí od výrobce jsem k 50 μ l 100 bp-DNA-ladder v lyofilizované formě přepipetovala 500 μ l ROTI[®]Load DNA pufru. Do první jamky jsem pak napipetovala 10 μ l tohoto DNA délkového standardu, tak aby bylo možné odečíst délku produktů amplifikace. Elektroforetickou separaci jsem prováděla po dobu 30 minut při napětí 120 V. Záporně nabitě molekuly nukleové kyseliny se v elektrickém poli pohybují směrem od záporného pólu (katody) ke kladnému pólu (anodě), přičemž krátké fragmenty postupují rychle a dlouhé zůstávají nahoře v gelu.

Po proběhnutí elektroforézy jsem gel vyjmula z elektroforetické vany a pro zobrazení výsledků prosvítla gel UV transiluminátorem ($\lambda = 220\text{--}310$ nm) a výsledek vyfotografovala. U souprav HISTO TYPE B27, má alela HLA-B27 specifický proužek o délce 420 bp (base pair – pár bází) anebo 85 bp.

4. Výsledky

V této kapitole jsou sepsány výsledky z jednotlivých fází analytického vyšetření pro detekci alely HLA-B27 u vybraných vzorků. Vyšetřovala jsem celkem 20 vzorků, pocházejících od dobrovolníků. Jednalo se o komplexní skupinu lidí různého věku a pohlaví. Část dobrovolníků vykazovala klinické projevy Bechtěrevovy choroby a tito lidé měli alelu HLA-B27 potvrzenou z dřívějších vyšetření. Část z nich alelu HLA-B27 laboratorně potvrzenou neměli, ale trpěli typickými projevy spondylartritidy, a tak zde bylo podezření na Bechtěrevovu chorobu. Poslední skupinu tvořili lidé, kteří neprojevovali charakteristické známky Bechtěrevovy choroby a klinický profil HLA-B27 byl neznámý.

Před samotnou detekcí alely HLA-B27 pomocí komerčního kitu HISTO TYPE B27, jsem však z odebraných bukalních stěrů musela vyizolovat a purifikovat DNA a následně změřit její koncentraci. Vzorky byly měřeny proti pufru BL4 a pro přesnější stanovení bylo měření koncentrací vzorků opakováno a výsledky byly zprůměrovány, jak uvádí *Tabulka 5*. U vzorků 1 a 2 vyšla nejnižší koncentrace ze všech 20 vzorků, avšak byly dále analyzovány, jelikož těsně splnili hraniční koncentraci doporučovanou komerčním kitem HISTO TYPE B27 tj. 12,5 ng/μl. U těchto vzorků mohlo pravděpodobně dojít k chybě při izolaci DNA anebo už v preanalytické fázi při odběru bukalního stěru, který si dobrovolníci v tomto případě prováděli sami.

Tabulka 5 Koncentrace izolované DNA z bukálních stěrů

Číslo vzorku dobrovolníka	1. měření Koncentrace DNA (ng/μl)	2. měření Koncentrace DNA (ng/μl)	Průměr Koncentrace DNA (ng/μl)
1	12,19	12,81	12,50
2	11,32	13,48	12,40
3	25,70	24,45	25,08
4	45,01	46,20	45,61
5	96,89	98,52	97,71
6	35,60	30,05	32,83
7	15,98	16,12	16,05
8	54,22	53,78	54,00
9	29,65	30,11	29,88
10	76,43	75,79	76,11
11	48,01	50,09	49,05
12	26,55	24,41	25,48
13	42,84	41,93	42,39
14	126,05	124,57	125,31
15	68,79	68,17	68,48
16	17,37	17,79	17,58
17	148,62	146,13	147,38
18	23,88	20,94	22,41
19	21,99	22,08	22,04
20	87,23	88,56	87,90

V *Tabulce 6* jsou zapsány hodnoty poměru absorbance 260 nm a 280 nm neboli čistota DNA u jednotlivých vzorků. Obecně se hodnoty poměru A_{260}/A_{280} čisté DNA pohybují přibližně okolo 1,8 a výrazně nižší hodnoty bývají způsobeny kontaminací proteinů. Výrobce kitu pro izolaci DNA z tkání v manuálu deklaruje výtěžek vysoce čisté DNA v obvyklých hodnotách poměru A_{260}/A_{280} 1,70 až 1,90. Jak je patrné z *Tabulky 6* všechny vzorky se v tomto rozmezí pohybují. Přechištění vzorků DNA od proteinů, které zbyly po předcházející izolaci nukleové kyseliny, tak bylo dostatečně účinné a roztoky mohly být použity pro další stanovení.

Tabulka 6 Hodnoty čistoty izolované DNA

Číslo vzorku dobrovolníka	1. měření Poměr A₂₆₀/A₂₈₀ (Čistota DNA)	2. měření Poměr A₂₆₀/A₂₈₀ (Čistota DNA)	Průměr Poměr A₂₆₀/A₂₈₀ (Čistota DNA)
1	1,89	1,85	1,87
2	1,84	1,84	1,84
3	1,87	1,86	1,87
4	1,97	1,91	1,94
5	1,78	1,73	1,76
6	1,94	1,96	1,95
7	1,89	1,89	1,89
8	2,01	2,04	2,03
9	1,91	1,91	1,91
10	1,82	1,79	1,81
11	2,00	1,95	1,98
12	1,74	1,78	1,76
13	1,91	1,92	1,92
14	1,93	1,90	1,92
15	1,93	1,93	1,93
16	1,85	1,87	1,86
17	1,88	1,89	1,89
18	1,87	1,81	1,84
19	1,79	1,83	1,81
20	2,03	1,99	2,01

Po změření koncentrací a kontrole čistoty DNA se vzorky připravily na metodu SSP-PCR a po ukončení amplifikace následovala elektroforéza.

U soupravy HISTO TYPE B27, kterou jsem použila pro detekci, má alela HLA-B27 specifický proužek o délce 420 bp anebo 85 bp.

Při nepřítomnosti specifického proužku pro alelu HLA-B27 musí být přítomna vnitřní kontrola (amplifikační produkt odpovídající lidskému genu G3PDH) o délce 1070 bp. V přítomnosti specifického proužku o délce 420 bp anebo 85 bp pro alelu HLA-B27 proužek vnitřní kontroly zcela chybí anebo se jeví jako velmi slabý.

Vzorek byl označen za pozitivní, pokud byly na elektroforetickém obraze PCR produkty o specifické velikosti proužků 420 bp anebo 85 bp. Pokud byl při detekci amplifikačních produktů zobrazen pouze proužek vnitřní kontroly o velikosti 1070 bp, vzorek byl označen jako negativní.

Na přiložených elektroforetických obrazech se v první jamce vždy nachází tzv. žebřík (100 bp-DNA-ladder) pro odhad velikostí amplifikačních produktů. Všechny jednotlivé výsledky detekce alely HLA-B27 jsou zapsány v *Tabulce 7*.

Tabulka 7 Výsledky detekce alely HLA-B27

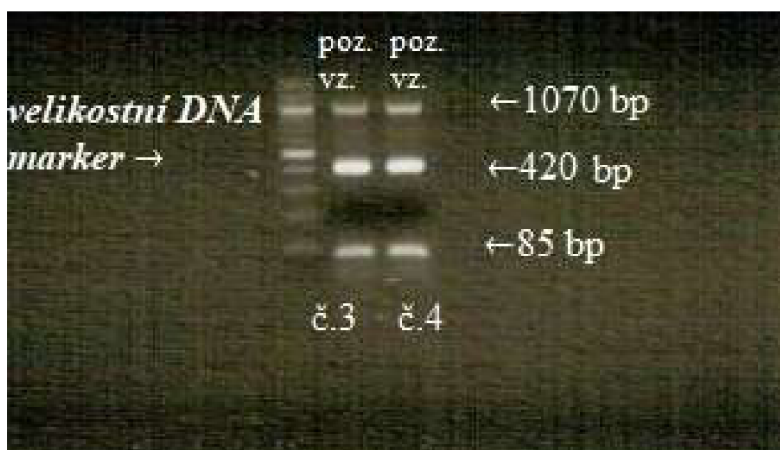
Číslo vzorku dobrovolníka	Výsledek na elektroforetickém obraze	Klinické obtíže	Výsledek
1	-	Ne	Nelze hodnotit
2	-	Ne	Nelze hodnotit
3 + Pozitivní kontrola	1070 bp, 420 bp, 85 bp	Ano	Pozitivní (M)
4	1070 bp, 420 bp, 85 bp	Ne	Pozitivní (D)
5	1070 bp	Ne	Negativní
6	1070 bp	Ne	Negativní
7	1070 bp	Ne	Negativní
8	1070 bp	Ne	Negativní
9	1070 bp, 420 bp, 85 bp	Ano	Pozitivní
10	1070 bp	Ne	Negativní
11	1070 bp	Ne	Negativní
12	1070 bp	Ne	Negativní
13	1070 bp	Ne	Negativní
14	1070 bp	Ne	Negativní
15	1070 bp, 420 bp, 85 bp	Ano	Pozitivní
16	1070 bp	Ne	Negativní
17	1070 bp, 420 bp, 85 bp	Ano	Pozitivní
18	1070 bp	Ne	Negativní
19	1070 bp	Ne	Negativní
20	1070 bp, 420 bp, 85 bp	Ne	Pozitivní

V případě vzorků 3 a 4 se jednalo o familiární případ Bechtěrevovy choroby. Jednalo se o matku s dcerou. Tato situace potvrzuje tvrzení, kdy podle Lee et al. (2007) se rodinná anamnéza AS častěji vyskytuje u žen.

Vzorek 3 (matka) představoval typický příklad klinických projevů a laboratorního nálezu u AS. Jednalo o ženu ve středních letech, která trpí charakteristickými znaky zánětu kloubů. Onemocnění má však mírný průběh a díky pravidelnému fyzioterapeutickému cvičení není pacientka nijak významně omezována v běžném životě. Mnou provedené stanovení alely HLA-B27 jen potvrdilo již dřívější pozitivní detekci této rizikové alely u pacientky.

Vzorek 4 (dcera) však představoval zajímavý příklad. Byla to desetiletá dcera vyšetřované matky, u níž byl stav HLA-B27 neznámý. I když detekce mnou užitým komerčním kitem odhalila pozitivitu alely HLA-B27, dosud se u ní neprojeví žádné klinické projevy Bechtěrevovy choroby. S jistou určitostí můžeme v tomto případě pouze zmínit vyšší riziko oproti běžné populaci, že by se nemoc u dívky v dalších letech mohla manifestovat, z hlediska výskytu AS v její rodině a prokázanému pozitivnímu nálezu alely HLA-B27.

Pro ukázkou jsem přiložila elektroforetický *Obrázek 6*, kde právě tyto vzorky 3 (matka) a 4 (dcera) se nachází vedle sebe. Na obraze vidíme, že po proběhnutí elektroforézy se pruh vnitřní kontroly o délce 1070 bp jeví slaběji v porovnání se specifickým pruhem 420 bp. Jak je uváděno i v příloženém návodu komerčního kitu HISTO TYPE B27 je to zcela obvyklý jev. Dále je zde přítomen i specifický pruh o délce 85 bp. Jednalo se tak o příkladný vzor výsledku pozitivní alely HLA-B27 detekované pomocí komerčního kitu HISTO TYPE B27.

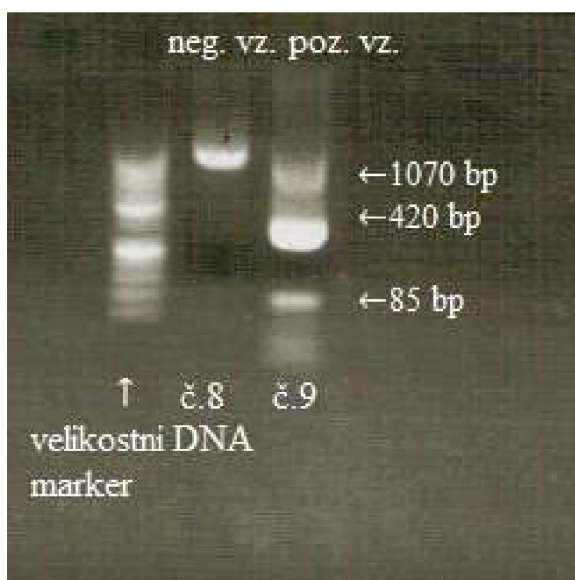


Obrázek 6 Elektroforetický obraz SSP-PCR reakce vzorků 3 a 4 na 2,5% agarózovém gelu. Do první jamky byl napipetován velikostní DNA marker (100 bp-DNA-ladder) pro odhad velikostí amplifikačních produktů. Další jamky obsahují PCR produkty vzorků a jsou vyjádřeny v bp (páru bází).

Zdroj: vlastní

Dalším zajímavým případem byl vzorek 9. Jednalo se o pána v pozdních středních letech, kterého trápili klinické příznaky přisuzované AS, kdy největší bolestivost se u pána projevovala v oblasti kříže a ramenou. Bolest se však projevuje po větší fyzické námaze, což je pro Bechtěrevovu chorobu netypické, jelikož u ní obtíže nastupují spíše v klidové fázi. Bylo zde tedy pouhé podezření na Bechtěrevovu chorobu. Pozitivní detekce alely HLA-B27 však ukázala, že by se opravdu mohlo jednat o toto onemocnění a pánovi byla doporučena další vyšetření a odborná konzultace s lékařem.

Na přiloženém *Obrázce 7* vidíme výše zmiňovaný pozitivní vzorek 9 a vedle se nachází negativní vzorek 8. U negativního vzorku si můžeme povšimnout, že se projevila pouze ostře vnitřní kontrola o velikosti 1070 bp. U pozitivního vzorku si můžeme všimnout velmi zřetelného pruhu 420 bp a je zde přítomen i pruh 85 bp. Vnitřní kontrola se jeví v přítomnosti těchto specifických pruhů slabě a neostře.



Obrázek 7 Elektroforetický obraz SSP-PCR reakce pozitivního vzorku 9 a negativního vzorku na 2,5% agarózovém gelu. Do první jamky byl napipetován velikostní DNA marker (100 bp-DNA-ladder) pro odhad velikostí amplifikačních produktů. Další jamky obsahují PCR produkty vzorků a jsou vyjádřeny v bp (páru bází).

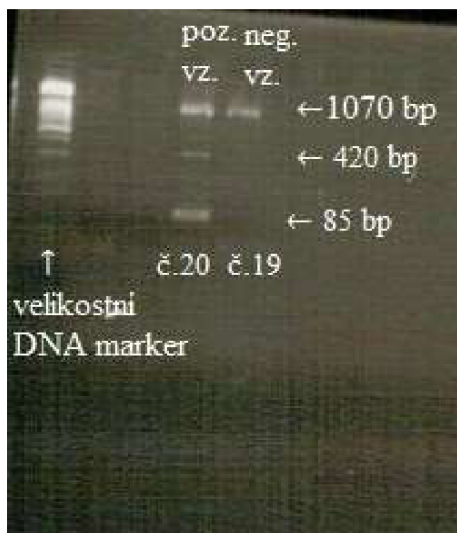
Zdroj: vlastní

Obdobná situace se vyskytla u vzorků 15 a 17. V obou případech se jednalo o mladé muže, u kterých byla diagnostikovaná AS a u kterých se objevili obtíže spojené s Bechtěrevovou chorobou. Přístup k nemoci se však u pacientů lišil. U pacienta 15 se první příznaky objevili ve 23 letech, snaží se pravidelně cvičit fyzioterapeutické cviky a jako lehké cvičení zvolil plavání jednou týdně. Díky cvičení pozoruje výrazné zlepšení oproti začátku nemoci. Pacient 17 kromě občasné bolesti v ramenním kloubu, která je

nejvíce znatelná po zvýšené námaze nepozoruje žádné další obtíže, a proto, jak sám říká, ho nic nemotivuje k pravidelné fyzioterapii. U obou vzorku byla pozitivně detekována alela HLA-B27, která potvrdila správnost diagnostiky AS u obou pacientů.

U vzorku 20 alela HLA-B27 vyšla při mém stanovení pozitivně, ale dobrovolník neměl žádné klinické projevy a sám prohlašoval, že se cítí zcela zdravý a další vyšetření pro vyvrácení nebo potvrzení diagnózy u lékaře nepodstoupí.

Na přiloženém *Obrázku 8* můžeme vidět pozitivní nález u vzorku 20. Specifický proužky 420 bp a 85 bp jsou zde ale málo patrné v porovnání s vnitřní kontrolou 1070 bp, která by se v pozitivním případě alely HLA-B27 měla jevit slaběji. Vzorek 20 jsem stanovovala v závěru své praktické praxe a v tomto bodě analýzy byly už reagentie (primary) prošlé, což může vysvětlovat slabší reakce.



Obrázek 8 Elektroforetický obraz SSP-PCR reakce pozitivního vzorku 20 a negativního vzorku na 2,5% agarózovém gelu. Do první jamky byl napipetován velikostní DNA marker (100 bp-DNA-ladder) pro odhad velikostí amplifikačních produktů. Další jamky obsahují PCR produkty vzorků a jsou vyjádřeny v bp (páru bází).

Zdroj: vlastní

Ostatních 12 vzorků bylo hodnoceno jako negativních a absence klinických příznaků nenaváděla ani k podezření na Bechtěrevovu chorobu u těchto dobrovolníků. Vzorky 1 a 2 nemohly být hodnoceny, jelikož vnitřní kontrola 1070 bp u nich nevyšla. Kromě délkového standardu byly viditelné i nespecifické amplifikační produkty. Pravděpodobně mohlo dojít k chybě při izolaci DNA nebo při odběru bukalního stěru. Problémem mohla být příliš nízká koncentrace DNA u těchto vzorků, která sice splňovala hraniční minimum doporučené výrobcem, ale zřejmě těsné splnění podmínek nebylo dostačující pro kvalitní analýzu.

4.1 Výzkumné otázky

4.1.1 Výzkumná otázka 1

Je komerčně dodávaný kit vhodný pro detekci alely HLA-B27 (přesnost, časová a finanční náročnost)?

Já osobně jsem měla s komerčním kitem HISTO TYPE B27 od firmy BAG Health Care pozitivní zkušenost. S kitem se mi dobře pracovalo a návod přiložený k této soupravě byl dobře strukturovaný a lehce pochopitelný. Kit pro 48 stanovení stál celkem zhruba 4 800 Kč, pro jednoho pacienta tak test vychází na 100 Kč. Cena kitu je tak přijatelná a nepředstavuje výrazné zatížení po finanční stránce pro menší počet analýz. Je třeba však brát v potaz i další výdaje z hlediska zvolené metody pro izolaci DNA. Při celkovém stanovení od izolace k amplifikaci byl u malé skupiny vzorků znám výsledek za necelých 7 hodin. Přesnost kitu potvrzuje i pozitivní stanovení HLA-B27 u dobrovolníků, kterým AS byla už diagnostikována. K pokrytí všech HLA specificit je nutný vysoký počet směsí primerů, které už v této soupravě má uživatel přímo v reakčních zkumavkách a nemusí se tak zabývat samotným navrhováním primerů.

Tento kit je dle mého názoru uživatelsky příznivý a vhodný pro detekci alely HLA-B27 u malého počtu vzorků.

4.1.2 Výzkumná otázka 2

Nejvyšší výskyt HLA-B27 je u pacientů trpící ankylozující spondylitidou?

Alela HLA-B27 je v medicíně považována za obecný marker pro AS. Její častý výskyt u pacientů trpící Bechtěrevovou chorobou je podpořen mnohými studiemi. Při mé praktické části jsem stanovovala alelu HLA-B27 u 20 vzorků. Pozitivní nález alely byl u 6 vzorků. U 2 pozitivních dobrovolníků však zcela chyběli klinické projevy spojené s AS. U 4 zbylých pozitivních dobrovolníků se v různé míře vyskytovaly klinické obtíže Bechtěrevovy choroby.

I při tak malém množství vyšetřovaných vzorků můžeme pozorovat téměř pravidelný výskyt alely HLA-B27 u pacientů trpící AS.

5. Diskuse

Bechtěrevova choroba je chronické zánětlivé revmatoidní onemocnění, u kterého je etiologie stále nejasná. Charakter nástupu nemoci je mnohostranný. Nevysvětlené interakce mezi geny, mikroby, stresem, pohlavím a dalšími faktory životního stylu u AS jsou stále předmětem diskusí a studií.

Kromě typické prvotní bolesti zad a kloubů se u AS postupně objevují i další mimokloubní potíže. Pacienty zejména trápí obtíže související se srdcem, plícemi a centrální nervovou soustavu (Forejtová, 2009).

U dobrovolníků, které jsem vyšetřovala na alelu HLA-B27 jsem pozorovala různé stupně klinických projevů nemoci. U dvou pozitivních vyšetřovaných klinické obtíže zcela chyběly, ostatní pociťovali ve větší či menší míře určitý diskomfort a bolestivost hlavně v oblasti zad a velkých kloubů. Nikdo z vyšetřovaných však netrpěl mimokloubními nepříjemnostmi. Lze si to vysvětlit poměrně nízkým věkem všech zúčastněných, kdy nemoc odhalená v mladém věku nestihla ještě manifestovat do svého úplného potenciálu. Dobrovolníci, kteří trpí většími obtížemi se také snaží předcházet ničivému účinku nemoci dodržováním pravidelného fyzioterapeutického cvičení a domácího cvičení, které jim od bolesti ulevuje a zmírňuje příznaky.

Studie ukazují, že právě nejlepších výsledků dosahují pacienti, kteří minimálně 1x týdně provádějí fyzioterapeutické cvičení nebo se věnují individuálnímu domácímu cvičení a lehkým sportům (například plavání) (Levitová, Hušáková, 2018).

Má bakalářská práce se zabývá malým souborem vzorků tj. 20, nebyl proto brán velký zřetel na sledování korelace Bechtěrevovy choroby s pohlavím a věkem dobrovolníků, jelikož by takovéto statické zhodnocení nedosahovalo potřebné věrohodnosti.

Typizace HLA systému se může provádět buď serologickými technikami, u kterých pomocí specifických antisér určujeme HLA antigeny přítomné na vyšetřovaných lymfocytech, anebo molekulárně biologickými metodami, kdy identifikace probíhá vždy v nejvíce polymorfních místech HLA genů. Já při své praxi využila molekulárně genetickou metodu, která spočívala v izolaci DNA a využití PCR metody. Jako vzorek DNA sloužil bukální stěr, který byl u každého dobrovolníka proveden 2x pro zajištění dostatečné koncentrace DNA. V elučním kroku při izolaci DNA jsem místo původně uváděných 100 µl roztoku Buffer BL4, napipetovala pouze 30 µl přehřátého roztoku Buffer BL4, abych docílila dalšího zvýšení koncentrace DNA. Sám výrobce v návodu tuto možnost uvádí a dle mého názoru je u vzorků bukálních stěrů, kde se dosahuje poměrně často malých koncentrací, tato úprava objemu žádoucí.

Samotná detekce alely HLA-B27 byla provedena pomocí komerčního kitu HISTO TYPE B27 od firmy BAG Health Care. Konkrétně jsem analyzovala vzorky pomocí SSP-PCR metody. Specifické primery nutné pro navázání případné rizikové alely byly již přítomné v reakčních mikrozkušnicích a já se tak při mé práci nemusela zdržovat navrhováním primerů, potřebných k amplifikaci daného úseku. Nemluvě o nižší finanční zátěži pro analýzu. Dobrou kvalitu kitu potvrzuje i fakt, že i po datu expirace jsem byla schopna vzorky 19 a 20 vyhodnotit i přes slabší reakce.

Typizace alely HLA-B27 se u různých rasových a etnických skupin pacientů odlišuje. Nejrozšířenější podtyp HLA-B27:05 údajně pochází od předků, ze kterého postupně vznikly ostatní subtypy (Chatzikyriakidou et al., 2011). Tento fakt má praktická část však nemohla potvrdit, jelikož jsem stanovení rizikové alely HLA-B27 prováděla pouze u bělochů, a i když je kit uživatelsky velmi příznivý nedetekuje jednotlivé subtypy alely HLA-B27. Jednotlivé podtypy alely HLA-B27 u pozitivních dobrovolníků jsou mi tedy neznámy. Pro celkový výzkum a určení výzkumných otázek je u mé bakalářské práce znalost subtypů HLA-B27 u dobrovolníků irelevantní, ale pro úplné vyšetření existují na trhu další komerční soupravy, které umožňují rozlišit tyto podtypy.

Při izolaci DNA a následném měření její koncentrace vyšly nejnižší hodnoty koncentrace u vzorků 1 a 2. Jelikož však byla splněna hraniční koncentrace doporučená komerčním kitem HISTO TYPE B27 tj. 12,5 ng/μl a u dobrovolníků se nález alely HLA-B27 vlivem absence příznaků AS nepředpokládal, byly vzorky vzaty do další analýzy bez dalších metod pro jejich zakoncentrování. Výsledky však nemohly být u těchto vzorků nakonec interpretovány, jelikož po proběhnutí elektroforézy byl patrný pouze velikostní DNA marker a nespecifické proužky. Vnitřní kontrola, která má být u negativních vzorků vždy silně zřetelná a u pozitivních jen slabě, chyběla úplně. Chybu si vysvětlují možným chybným postupem při izolaci DNA anebo také špatně provedeným bukálním stěrem, který si v tomto případě dobrovolníci prováděli sami. Velmi těsné splnění hraniční hodnoty koncentrace DNA, tak zřejmě nebylo dostačující pro kvalitní a hodnotnou analýzu.

Je pozoruhodné, že velmi rozdílné hodnoty koncentrací DNA se objevují napříč všemi 20 vzorky, přičemž byl u všech dodržen stejný postup a reagentie. Tento jev si můžeme vysvětlit důležitostí preanalytické fáze. Ta tvoří důležitou součást celkové kvality každého vyšetření a aby nedošlo k ovlivnění hodnot vzorku doporučuje se, aby jedinec před odběrem nekouřil, nekonzumoval jídlo, kofein a alkohol (Narayanan, 2000). Samozřejmě jsem před odběrem každého dobrovolníka řádně poučila a vysvětlila mu důležitost správně provedeného odběru pro další analýzu. Někteří jedinci si odběr prováděli sami a já tak byla odkázána na jejich pečlivost a důslednost. Proto nemohu s určitostí deklarovat správnost provedení odběru u všech vzorků, jelikož nevím, zda byl odběr prováděn dostatečně dlouho a zda byl odběrovou tyčinkou vyvinut dostatečný tlak na stěnu dutiny ústní, aby se na vatový tampón přichytilo co nejvíce molekul DNA.

Kromě chybně provedeného odběru je při zapracování DNA možné riziko pipetovací chyby. Během mé práce byl však brán velký důraz na správné a přesné pipetování, které pokud není na μl přesné může v obecné rovině laboratorní praxe znehodnotit každou analýzu.

Pro snížení rizika kontaminace DNA způsobené nedostatečným odstraněním nečistot a propláchnutím od etanolu během izolace DNA v promývací fázi, jsem krok s promývacím roztokem Wash Buffer BL3 a centrifugaci prováděla 2x. I když tento krok nebyl výrobcem zmíněn a pro získání čisté DNA, by tak mělo stačit tento krok udělat pouze jednou, myslím si, že mnou provedené opakování pomohlo snížit riziko inhibice následné PCR reakce a falešných reakcí.

Pro vizualizaci amplifikovaných genů jsem využila elektroforézu, což je separační metoda, oddělující látky na základě jejich různé pohyblivosti v elektrickém poli. Kromě základní investice do elektroforetické vany se jedná o poměrně finančně levnou metodu. Nevýhodou může být křehkost agarózového gelu, je proto nutná opatrná manipulace (Bartůňková, Paulík, 2011).

Další nevýhodou je, že kapacita termocykléru a konečný krok gelové elektroforézy není vhodný pro velké množství vzorků nebo pro automatizaci (Bontadini, 2012). Já sama jsem ale vyšetřovala pouze 20 vzorků, takže pro mě metoda elektroforézy byla vyhovující. Metodu bych označila za ideální pro typování malého počtu vzorků v krátké době.

Ohledně pohlaví se Bechtěrevova choroba a alela HLA-B27 objevuje častěji u mužů než u žen (Braun, Sieper, 2007). Z hlediska mého omezení malým počtem vyšetřovaných vzorků nemohu tuto skutečnost nijak potvrdit či vyvrátit, nicméně ze 6 mnou pozitivně prokázaných vzorků na alelu HLA-B27 patřili 4 vzorky mužům. Ze stejného důvodu se tak nemůžu s určitostí vyjádřit ani k tvrzení, že dle Lee et al. (2007) je Bechtěrevova choroba vysoce familiární onemocnění a rodinná anamnéza AS je významně častější u žen než u mužů. V mé práci byl, však zaznamenán jeden případ příbuzenského vztahu, konkrétně se jednalo o matku s dcerou.

Závěrem je nutné dodat, že samotná přítomnost alely HLA-B27 u jedince ještě neznamená jednoznačné určení, že jedinec bude trpět Bechtěrevovou chorobou. Jedná se spíše o zvýšené riziko oproti normální běžné populaci. Mechanismus fungování alely HLA-B27 není zcela znám, existují zatím pouze hypotézy, a tak definitivnímu potvrzení diagnózy AS musí předcházet komplexní vyšetření pacienta s rodinnou a osobní anamnézou, spolu s chronickými klinickými projevy typické pro toto onemocnění.

6. Závěr

Začátek mé bakalářské práce představoval sepsání odborné rešerše na téma Bechtěrevovy choroby jako autoimunitního onemocnění a jeho silné spojitosti s HLA systémem. Dále jsem se v teoretické části této práce zabývala sepsáním poznatků o alele HLA-B27, která představuje zatím jediný známý klíčový faktor u dědičnosti AS.

I když v posledních letech moderní výzkum eskaluje a užívány jsou pokročilé metody analýzy, zatím jsou k dispozici pouze hypotézy o možném mechanismu nástupu tohoto onemocnění. Přesný režim, kterým se AS aktivuje, je multifaktoriální. Věnovala jsem se tak i například popsání genetických a environmentálních vlivů, které jsou s Bechtěrevovou nemocí asociovány.

V praktické části jsem se pak učila správné laboratorní praxi a samostatné práci v genetické laboratoři. Zjistila jsem také jak podstatnou roli při laboratorním stanovení hraje preanalytická část – správné odebrání vzorků pro analýzu a spolupráce s vyšetřovanými. Velkou část v samotné praxi zabralo seznámení se s řízením jednotlivých přístrojů, potřebných pro izolaci DNA, zpracování DNA a vyšetření DNA na přítomnost alely HLA-B27.

Hlavním cílem mé bakalářské práce byla detekce alely HLA-B27 u 20 vzorků bukalních stěrů od dobrovolníku pomocí komerčně dodávaného kitu. Zároveň jsem měla za cíl zavést a zoptimalizovat tento komerčně dodávaný kit a zhodnotit, zda je vhodný pro stanovení alely HLA-B27. Zvýšený výskyt alely HLA-B27 jsem očekávala u dobrovolníků trpící ankylozující spondylitidou.

Chtěla jsem poukázat i na skutečnost, že detekce alely HLA-B27 funguje jako molekulární marker pro ankylozující spondylitidu. Její klinická užitečnost by se mohla týkat zejména mužů, u kterých se onemocnění vyskytuje častěji než u žen. Poslední částí mé bakalářské práce byla interpretace a vyhodnocení získaných výsledků během mé praxe.

Do dnešní doby je HLA-B27 fascinující molekula v lékařském výzkumu. Její role a patogenese v AS není stále jasná a pro její plné pochopení je potřebný další výzkum.

7. Seznam použité literatury

- 1) ARÉVALO, M., LOPÉZ-MEDINA, C., MARTINEZ-LOSAL, M. M., et al. 2020. Role of HLA-B27 in the comorbidities observed in Axial Spondyloarthritis: Data from COMOSPA. *Joint Bone Spine*. [online]. 87(5), 445–448, [cit.2022-03-03]. ISSN 1297-319X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1297319X20300488>
- 2) BAG Health Care, verze: 15/2017. Návod k použití, *HISTO TYPE SSP Kits*.
- 3) BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada Publishing.
- 4) BONTADINI, A., 2012. HLA techniques: Typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics. *Methods*. [online]. 56(4), 471–476, [cit.2020-01-10]. ISSN 1046-2023. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202312000813>
- 5) BOZHKOVA, E., 2017. Historical profile Vladimir Mikhailovich Bekhterev. *The Lancet neurology*. [online]. 17, 744, [cit.2020-02-06]. Dostupné z: <https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S1474-4422%2817%2930336-8>
- 6) BRAUN, J., SIEPER, J., 2007. Ankylosing spondylitis: an overview. *The Lancet*. [online]. 369(9570), 1379–1390, [cit.2022-01-20]. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60635-7. ISSN 01406736. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0140673607606357>
- 7) BUC, M., 2012. *Základná a klinická imunológia*. ISBN 9788022325790.
- 8) BYSTRICKÁ, D. R., 2020. LABORATORNÍ PŘÍRUČKA GENLABS s.r.o. [online]. [cit. 2022-04-04]. Dostupné z: https://genlabs.cz/wp-content/uploads/2020/01/LP_GL_001_C.pdf

- 9) Carl Roth GmbH + Co.KG, verze: 01/2020, *Instruction for use 100 bp DNA-ladder, extended*.
- 10) DÍTĚ, P., 2007. Vnitřní lékařství. *Učebnice pro lékařské fakulty*. 2. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-496-6.
- 11) EBRAHIMIADIB, N., BERIJANI, S., GHAHARI, M., et al. 2021. Ankylosing Spondylitis. *J Ophthalmic Vis Res*. [online]. 16(3), 462–469, [cit.2020-03-02]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8358754/>
- 12) FOREJTOVÁ, Š., 2009. Diagnostika a léčba spondylartritid. *Medicina pro praxi*. Praha.
- 13) GARIBYAN, L., AVASHIA, N., 2013. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. [online]. 133(3), 1–4, [cit.2020-12-08]. doi:10.1038/jid.2013.1. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23399825/>
- 14) Generi Biotech, verze: 1,4/2015. Návod k použití, *Kit for isolation of DNA from tissues*.
- 15) GRAN, J., HUSBY, G., 1993. The epidemiology of ankylosing spondylitis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. [online]. 22(5), 319–334, [cit.2020-04-17]. ISSN 0049-0172. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049017205800113>
- 16) HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J., BRDIČKA, T., ŠPÍŠEK, R., 2017. *Základy imunologie*. 6. aktualizované vyd. Praha: Stanislav Juhaňák – Triton. ISBN 978-80-7553-250-3.
- 17) HOUZOU, P., KOFFÍ-TESSIO, V. E., ONIANKITAN, S., et al. 2022. Clinical profile of ankylosing spondylitis patients in Togo. *The Egyptian Rheumatologist*. [online]. 44(1), 1-4, [cit.2022-02-03]. ISSN 1110–1164. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110116421000697>

- 18) CHATZIKYRIAKIDOU, A., VOULGARI, P. V., DROSOS, A. A., 2011. What is the role of HLA-B27 in spondyloarthropathies? *Autoimmunity Reviews*. [online]. 10(8), 464–468, [cit.2021-11-17]. ISSN 15689972. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568997211000267>
- 19) JÍLEK, P., 2019. *Imunologie. Stručně, jasně, přehledně*. 2. dopl. vyd. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0595-3.
- 20) JUNG, J.H., BANG, C.H., SEOK, H., et al. 2019. Clinical Findings of Ankylosing Spondylitis With and Without Human Leukocyte Antigen (HLA)-B27 and HLA-B51. *Ann Acad Med Singap*. [online]. 48(10), 321–329, [cit.2022-04-02]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31875469/>
- 21) KAO, K. J., SCORNIK, J. C., SMALL, S. J., 1993. ENZYME-LINKED IMMUNOASSAY FOR ANTI-HLA ANTIBODIES – AN ALTERNATIVE TO PANEL STUDIES BY LYMPHOCYTOTOXICITY. *Transplantation*. [online]. 55(1), 192–196, [cit.2020-01-30]. Dostupné z: https://journals.lww.com/transplantjournal/Abstract/1993/01000/ENZYME_LINKED_IMMUNOASSAY_FOR_ANTI_HLA.36.aspx
- 22) KLENER, P., PAVELKA, K., 2002. *Scripta. Vnitřní lékařství*. Praha: Galén. ISBN 80-7262-145-9.
- 23) KODÍČEK, M., 2007. reakce polymerasová řetězová. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Praha: VŠCHT. [online]. [cit. 2021-01-09]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=reakce_polymerasova_retezova
- 24) KREJSEK, J., ANDRÝS, C., KRČMOVÁ, I., 2016. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon s.r.o.
- 25) LEE, W., REVEILLE, J. D., DAVIS, J. C., et al. 2007. Are there gender differences in severity of ankylosing spondylitis? Results from the PSOAS cohort. *Annals of the Rheumatic Diseases*. [online]. 66, 633–638, [cit.2021-09-21]. Dostupné z: <https://ard.bmj.com/content/66/5/633>

- 26) LEVITOVÁ, A., HUŠÁKOVÁ, M., 2018. Bechtěrevova nemoc. *Návod na aktivní život a průvodce cvičením*. Praha: Grada. ISBN 978-80-271-2008-6.
- 27) LIU, B., SHAO, Y., FU, R., 2021. Current research status of HLA in immune-related diseases. *Immun Inflamm Dis*. [online]. 9(2), 340–350, [cit.2022-03-27]. doi:10.1002/iid3.416. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8127548/>
- 28) LUKEŠOVÁ, Š., 2016. Imunologie, autoimunitní onemocnění *MEDICÍNA PRO PRAXI / Med. Praxi*. [online]. 13(4), 171–174, [cit.2022-01-05]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2016/04/04.pdf>
- 29) NARAYANAN, S., 2000. The Preanalytic Phase: An Important Component of Laboratory Medicine. *American Journal of Clinical Pathology*. [online]. 113(3), 429–452, [cit.2022-03-09]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1309/C0NM-Q7R0-LL2E-B3UY>
- 30) OLEJÁROVÁ, M., PROKEŠ, M., 2005. Praktická revmatologie. *Pro lékaře a farmaceuty*. Praha: Apotex.
- 31) OTOVÁ, B., 2006. *Základy biologie a genetiky*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-1100-7.
- 32) PARAMESWARAN, P., LUCKE, M., 2021. *HLA B27 Syndromes*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC. [online]. [cit.2022-03-11]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31855367/>
- 33) PAVELKA, K., 2012. Doporučení České revmatologické společnosti pro léčbu ankylozující spondylitidy. Revmatologický ústav Praha a Klinika revmatologie 1. LF UK Praha. *Čes. Revmatol*. [online]. 20(1), 4–11, [cit.2021-05-13]. Dostupné z: https://www.revmatologicka-spolecnost.cz/resources/dokumenty/Doporuceni_CRS_ankylozujici_spondylitida.pdf

- 34) PAVELKA, K., ROVENSKÝ, J., 2003. *Klinická revmatologie*. Praha: Galén. ISBN 80-7262-174-2.
- 35) PENKA, M., SLAVÍČKOVÁ, E., 2012. *Hematologie a transfúzní lékařství*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3460-6.
- 36) RUGGERI, A., PAVIGLIANITI, A., GLUCKMAN, E., et al. 2016. Impact of HLA in cord blood transplantation outcomes. *HLA*. [online]. 87, 413–421, [cit.2021-06-21]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/tan.12792>
- 37) SAID-NAHAL, R., MICELI-RICHARD, C., GAUTREAU, C., et al. 2002. The role of HLA genes in familial spondyloarthritis: a comprehensive study of 70 multiplex families. *Annals of the Rheumatic Diseases*. [online]. 61, 201–206, [cit.2021-10-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1754018/>
- 38) SALEEM, S., HAWASS Z., 2014. Ankylosing Spondylitis or Diffuse Idiopathic Skeletal Hyperostosis in Royal Egyptian Mummies of the 18th–20th Dynasties? Computed Tomography and Archaeology Studies. *American College of Rheumatology*. [online]. 66(12), 3311–3316, [cit.2022-02-12]. doi: 10.1002/art.38864. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/art.38864>
- 39) SHOENFELD, Y., FUČÍKOVÁ, T., BARTUŇKOVÁ, J., 2007. *Autoimunita: vnitřní nepřítel*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2044-9.
- 40) STAŇKOVÁ, H., 21.4.2020. IMUNOLOGIE LEUKOCYTŮ [online přednáška].
- 41) STRÍTESKÝ, J., 2001. *Patologie. Učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium*. Olomouc: Epava. ISBN 80-86297-06-3.
- 42) TUMER, G., SIMPSON, B., ROBERTS, T., 2020. *Genetics, Human Major Histocompatibility Complex (MHC)*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC. [online]. [cit.2021-06-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538218/>

- 43) VAN DER HEIJDE, D., RAMIRO, S., LANDEWÉ, R., et al. 2016. Update of the ASAS-EULAR management recommendations for axial spondyloarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. [online]. 76, 978–991, [cit.2021-06-24]. Dostupné z: <https://ard.bmj.com/content/76/6/978.citation-tools>
- 44) VENCOVSKÝ, J., 2020. Bechtěrevova nemoc. [online]. [cit. 2021-01-18]. Dostupné z: <https://www.bechterevoanemoc.cz>
- 45) VESELÁ, H., 2009. Odebírání vzorků, nakládání s nimi a následná identifikace osob. [online]. Parlament České republiky. Kancelář poslanecké sněmovny, Parlamentní institut. Srovnávací studie č. 5.286. [cit.2022-04-01] Dostupné z: <https://www.psp.cz/sqw/ppi.sqw?d=1&t=3>
- 46) VRAJOVÁ, Z., 23.3.2020. Imunologie [online přednáška].
- 47) WENKER, K., QUINT, J., 2021. *Ankylosing Spondylitis*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC. [online]. [cit.2020-04-17]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470173/>
- 48) YU, Y., WANG, K., FAHIRA, A., et al. 2021. Systematic comparative study of computational methods for HLA typing from next-generation sequencing. *HLA*. [online]. 97(6), 481–492, [cit.2021-06-24]. doi: 10.1111/tan.14244. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33655664/>
- 49) ZHANG, L., ZHANG, Y. J., CHEN, J., et al. 2018. The association of HLA-B27 and *Klebsiella pneumoniae* in ankylosing spondylitis: A systematic review. *Microbial Pathogenesis*. [online]. 117, 49–54, [cit.2022-04-07]. ISSN 0882-4010. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401017305727>

8. Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1 Kostra nemocného podle Bernarda Connora.....	12
Obrázek 2 Lokalizace HLA genů na chromozomu.....	21
Obrázek 3 SSP-PCR – komplementarita primerů k dané DNA sekvenci.....	26
Obrázek 4 Mikroobjemový spektrofotometr Colibri Titertek-Berthold pro změření koncentrace a čistoty DNA	39
Obrázek 5 Termocyklér MJ Mini Bio-Rad, ve kterém probíhala amplifikace PCR produktů podle nastaveného programu.	42
Obrázek 6 Elektroforetický obraz SSP-PCR reakce vzorků 3 a 4 na 2,5% agarózovém gelu. Do první jamky byl napipetován velikostní DNA marker (100 bp-DNA-ladder) pro odhad velikostí amplifikačních produktů. Další jamky obsahují PCR produkty vzorků a jsou vyjádřeny v bp (páru bází).....	49
Obrázek 7 Elektroforetický obraz SSP-PCR reakce pozitivního vzorku 9 a negativního vzorku na 2,5% agarózovém gelu. Do první jamky byl napipetován velikostní DNA marker (100 bp-DNA-ladder) pro odhad velikostí amplifikačních produktů. Další jamky obsahují PCR produkty vzorků a jsou vyjádřeny v bp (páru bází).	50
Obrázek 8 Elektroforetický obraz SSP-PCR reakce pozitivního vzorku 20 a negativního vzorku na 2,5% agarózovém gelu. Do první jamky byl napipetován velikostní DNA marker (100 bp-DNA-ladder) pro odhad velikostí amplifikačních produktů. Další jamky obsahují PCR produkty vzorků a jsou vyjádřeny v bp (páru bází).	51
Tabulka 1 Spondyloartritidy – charakteristika.....	14
Tabulka 2 Složení kitu Generi Biotech pro izolaci DNA z tkání.....	35
Tabulka 3 Reagencie master-mixu na 1 reakci	41
Tabulka 4 Parametry amplifikace	42
Tabulka 5 Koncentrace izolované DNA z bukalních stěrů.....	46
Tabulka 6 Hodnoty čistoty izolované DNA.....	47
Tabulka 7 Výsledky detekce alely HLA-B27	48

9. Seznam zkratek

AMK = Aminokyselina

APC = Antigen prezentující buňky

AS = Ankylozující spondylitida

bp = Base pair, pár bází

CRP = C-reaktivní protein

ČRS = Česká revmatologická společnost

DNA = Deoxyribonukleová kyselina

DPBS = Dulbecco's phosphate buffered saline, vyvážený solný roztok používaný pro různé aplikace buněčných kultur

dsDNA = Dvouřetězcová DNA

ELISA = Enzym linked immuno sorbent assay

EULAR = European League Against Rheumatism, Evropská liga proti revmatismu

FW = Sedimentace erytrocytů

HLA = Human leukocyte antigens, lidské leukocytární antigeny

IL-23 = Interleukin 23

KIR = Imunoglobulinový receptor NK buněk

LCT = Lymfocytotoxický test

MHC = Major histokompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex

NSA = Nesteroidní antirevmatika

PCR = Polymerase chain reaction, Polymerázová řetězová reakce

RNA = Ribonukleová kyselina

SI klouby = Sakroiliakální skloubení

SSP-PCR = Sequence Specific Primers-polymerase chain reaction, Polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery

TNF = Tumor nekrotizující faktor

UV = Ultrafialové záření

λ = Vlnová délka