



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

**Laboratorní metody používané v diagnostice  
Bechtěrevovy choroby**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:  
**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Veronika Farová

**Vedoucí práce:** prof. MUDr. Jiřina Bartůňková, DrSc., MBA,  
Ústav imunologie 2. LF a FN Motol, Praha

České Budějovice 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – 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 kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 20. 4. 2018

.....

Veronika Farová

### **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí mé bakalářské práce prof. MUDr. Jiřině Bartůňkové, DrSc., MBA za odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat Pracovišti imunologie v Nemocnici v Českých Budějovicích, a to především RNDr. Pavlíně Tinavské, Ph.D. za odbornou pomoc a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině, která mi při studiu byla vždy oporou.

## **Laboratorní metody používané v diagnostice Bechtěrevovy choroby**

### **Abstrakt**

Cílem mé bakalářské práce bylo seznámit se s laboratorními metodami, které se používají při diagnostice Bechtěrevovy choroby. Pro diagnostiku Bechtěrevovy choroby je velmi důležitým markerem HLA-B27, který se screeningově určuje pomocí průtokového cytometru a poté se jeho přítomnost potvrdí nebo vyvrátí pomocí molekulárně-biologických metod. Dalším laboratorním vyšetřením, které je podstatné při záchytu a sledování aktivity Bechtěrevovy choroby, je stanovení hladiny C-reaktivního proteinu, který je ukazatel zánětlivé reakce v těle pacienta. Posledním vyšetřením, se kterým jsem se seznámila, bylo stanovení rychlosti sedimentace erytrocytů, které se používá též jako ukazatel probíhajícího zánětu v těle.

V teoretické části jsem se věnovala především definici Bechtěrevovy choroby. Zabývala jsem se tím, jaké jsou příznaky choroby, dále podle jakých kritérií je nemoc diagnostikována a jaká léčba se používá. V druhém okruhu teoretické části jsem se zaměřila především na HLA-komplex, který je vysoce spjatý s Bechtěrevovou chorobou. Zabývala jsem se především strukturou a prezentací antigenů pomocí HLA molekul I. třídy. Dále jsem se zmínila o stavbě a funkci C-reaktivního proteinu.

V praktické části jsem popsala laboratorní metody, které se používají při diagnostice Bechtěrevovy choroby. První metodou, kterou jsem si vyzkoušela, bylo screeningové vyšetření markeru HLA-B27 pomocí průtokové cytometrie. Uvedla jsem, jak má vypadat odběr biologického materiálu, postup přípravy vzorku a postup při analýze na průtokovém cytometru. Na závěr této části jsem vložila ukázkou výsledků analýzy, jak vypadá výsledek negativní, výsledek pozitivní a výsledek, který se nachází v šedé zóně. Jako druhou metodu jsem uvedla genetické typizování molekuly HLA-B27, které se provádí pomocí real time PCR. Uvedla jsem preanalytickou část a postup přípravy. Dále jsem se zabývala měřením hladiny C-reaktivního proteinu pomocí nefelometrie a poté jsem uvedla vyšetření pomocí testovacího proužku. Poslední metodou, kterou jsem si vyzkoušela, bylo měření rychlosti sedimentace erytrocytů, kde jsem uvedla princip metody, dále postup měření a na závěr referenční hodnoty.

V poslední části mé bakalářské práce jsem zpracovala data získaná z Fakultní nemocnici v Motole z Ústavu imunologie 2. LF UK a FN Motol. Za rok 2017 bylo vyšetřeno na marker HLA- B27 celkem 452 pacientů a z toho bylo 75 pozitivních. Dále jsem pracovala

pouze s HLA-B27 pozitivními pacienty. Zkoumala jsem rozložení pohlaví, jaký je věk HLA-B27 pozitivních pacientů a jejich diagnóza.

### **Klíčová slova**

Bechtěrevova choroba; ankylozující spondylitida; HLA-B27; CRP; průtoková cytometrie; Real time PCR; rychlost sedimentace erytrocytů; nefelometrie

## **Laboratory methods using in diagnostic morbus Bechterew**

### **Abstract**

The aim of my bachelor thesis was to get familiar with laboratory methods, which are used in the diagnostics of morbus Bechterew. Very important for the diagnostics of morbus Bechterew is the marker HLA-B27, which is identified by screening, with the help of flow cytometer and then is the presence confirmed or refuted with the help of molecular-biological methods. Other laboratory examination, which is essential when it comes to interception and observation of the activities of morbus Bechterew, is the determination of the C-reactive protein level, which is an indicator of inflammatory reaction in the body of the patient. The last examination I got familiar with was the determination of the sedimentation speed of erythrocytes, which is used as an indicator of ongoing inflammation in the body.

In the theoretical part of the thesis I focused primarily on the definition of morbus Bechterew. I dealt with the question what are the symptoms of the disease, then also according to which criteria is the disease diagnosed and what treatment is applied. In the second part of the theoretical part I focused primarily on the major histocompatibility complex, which is highly connected with morbus Bechterew. I dealt mostly with the structure and presentation of antigens by the means of MHC molecules of class I. I also mentioned the structure and the function of C-reactive protein.

In the practical part I described laboratory methods used in diagnostics of morbus Bechterew. The first method I tried was screening examination of HLA-B27 marker by the means of flow cytometry. I introduced how the following processes should look like: collection of biological material, preparation of the sample and the analysis made on the flow cytometer. At the end of this part I put an example of the analysis results, how do the results look like when they are positive, negative, or in the grey zone. As a second method I introduced genetic typing of HLA-B27 molecule, which is made by the means of real time PCR. I mentioned the preanalytical part and the process of preparation. Moreover I dealt with the measuring of C-reactive protein by the means of nephelometry and then I also mentioned examination with the help of a test strip. The last method I tried was measuring the sedimentation speed of erythrocytes, I mentioned the principle of method, the process of measuring and the measured results as well.

In the last part of my bachelor thesis I worked with the data I got from Motol University Hospital, more precisely from the Department of Immunology, 2<sup>nd</sup> Faculty of Medicine of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital. During the year 2017, overall 452 patients were tested on the presence of HLA-B27 marker and 75 of them tested positive. Then I worked only with HLA-B27 positive patients. I researched how much is the disease represented in both sexes, what age do the HLA-B27 positive patients have and what is their diagnosis.

**Key words**

morbus Bechterew; ankylosing spondylitis; HLA-B27; CRP; flow cytometrics; Real time PCR; sedimentation speed of erythrocytes; nephelometry

# Obsah

Úvod.....	10
Teoretická část .....	12
1 Bechtěrevova choroba .....	12
1.1 Definice onemocnění .....	12
1.2 Klasifikace spondylartritid .....	12
1.3 Historie .....	12
1.4 Příčina nemoci.....	13
1.5 Epidemiologie .....	14
1.6 Klinické projevy nemoci .....	14
1.6.1 Axiální projevy .....	14
1.6.2 Periferní projevy .....	15
1.6.3 Mimokloubní projevy .....	15
1.7 Diagnostika AS .....	15
1.7.1 Klinická kritéria.....	16
1.7.2 Radiologická kritéria .....	16
1.8 Stádia AS.....	17
1.9 Průběh a prognóza.....	17
1.10 Léčba AS .....	18
1.10.1 Historie léčby .....	19
1.10.2 Léčba AS v současnosti .....	19
1.11 Laboratorní nálezy .....	22
2 MHC komplex .....	23
2.1 HLA komplex.....	23
2.2 Polymorfismus HLA-systému.....	24
2.2.1 Frekvence a výskyt HLA-alel .....	24
2.2.2 Příčiny a mechanismy vzniku polymorfismu .....	25
2.3 HLA-molekuly a geny I. třídy.....	26
2.4 Struktura klasických antigenů HLA I. třídy .....	27
2.5 Molekulová genetika a biosyntéza HLA-molekul I. třídy .....	27
2.6 Prezentace antigenu molekulami I. třídy.....	28
2.7 HLA-B27.....	30
3 Reaktanty akutní fáze .....	31
3.1 C-reaktivní protein .....	31
3.2 Sedimentace erytrocytů .....	32
Metodika .....	34
4 Typizace HLA .....	34



4.1	Screening HLA-B27 pomocí průtokové cytometrie .....	34
4.1.1	Princip metody .....	34
4.1.2	Grafické znázornění .....	34
4.1.3	Preanalytická fáze .....	35
4.1.4	Analytické fáze .....	35
4.1.5	Nález .....	38
4.2	Molekulárně-biologické metody .....	43
4.2.1	Stanovení rizikových alel HLA-B27 pomocí real-time PCR .....	43
5	Stanovení hladiny CRP .....	45
5.1	Turbidimetrie .....	45
5.2	Nefelometrie .....	45
5.3	Preanalytická fáze .....	45
5.4	Analytická fáze .....	45
5.5	CRP-test od firmy DOT®diagnostics .....	46
5.6	Nález .....	47
6	Rychlost sedimentace erytrocytů FW .....	48
6.1	Preanalytická fáze .....	48
6.2	Analytická fáze .....	48
6.3	Nález .....	50
	Výsledky .....	51
7	Zpracování dat .....	51
7.1	Pohlaví HLA-B27 pozitivních pacientů .....	51
7.2	Věk HLA-B27 pozitivních pacientů .....	51
7.3	Diagnózy pacientů .....	53
7.3.1	Diagnózy u pacientů do věku 18 let .....	56
7.3.2	Pacienti s diagnózou z kapitoly XIII .....	56
	Diskuze .....	60
	Závěr .....	63
	Použité zdroje .....	64
	Seznam obrázků .....	68
	Seznam tabulek .....	69
	Seznam použitých zkratk .....	70

## Úvod

Bechtěrevova choroba neboli ankylozující spondylitida (AS) se řadí mezi jednu z mnoha autoimunitních chorob. Autoimunitní choroby vznikají příčinou špatně fungujícího imunitního systému, který nedokáže rozlišit co je tělu „vlastní“ a co „cizí“. Následek takového chování imunitního systému je poškození vlastních buněk a tkání. Autoimunitními chorobami trpí 5 % populace celého světa.

Bechtěrevova choroba je chronické zánětlivé onemocnění především axiálního skeletu. Dále postihuje bedrokyčelní, apofyzeální a kostovertebrální klouby páteře. V nových studiích se uvádí, že touto chorobou je postiženo 0,5 % mužů a 0,05 % žen: z toho vyplývá, že u mužů je výskyt onemocnění až desetkrát vyšší.

Mými cíli bakalářské práce jsou vypracování rešerše na téma Bechtěrevova choroba, dále seznámení s metodami, které se používají při diagnostice Bechtěrevovy choroby a na závěr vypracovat statistiku z dat získaných z Fakultní nemocnice v Motole z Ústavu imunologie 2. LF UK a FN Motol.

Hlavními metodami, které se používají při diagnostice AS, jsou screening molekuly HLA B27 pomocí průtokové cytometrie, typizace alel HLA-B27 pomocí molekulárně-biologických metod, určení hladiny C-reaktivního proteinu (CRP) a rychlost sedimentace erytrocytů.

V teoretické části jsem se zaměřila na popis AS. Uvedla jsem, jak se nemoc projevuje a čím je způsobena z imunologického hlediska. Dále jsem se zaměřila na jednotlivé typy AS a diagnostiku choroby. V závěru první části rešerše jsem se podrobněji zabývala léčbou AS. V druhé části rešerše jsem popsala HLA- komplex, a to především molekuly HLA I.třídy, které souvisí s AS. Dále jsem se zabývala reaktanty akutní fáze, a to především CRP a rychlostí sedimentace erytrocytů, která také souvisí s AS.

V praktické části jsem se soustředila na vyšetřovací metody, které se používají při diagnostice AS. První a nejdůležitější metodou používané k diagnostice je screening HLA-B27 pomocí průtokové cytometrie. Druhá metoda je typizace alel HLA-B27

pomocí molekulárně-biologické metody real-time PCR. Další metodou jsem určila hladinu CRP pomocí nefelometrie a testovacího proužku a poslední metodou je stanovení rychlosti sedimentace erytrocytů. Na závěr jsem sestavila statistiku z dat z Fakultní nemocnici v Motole z Ústavu imunologie 2. LF UK a FN Motol.

## **Teoretická část**

### **1 Bechtěrevova choroba**

#### ***1.1 Definice onemocnění***

Bechtěrevova choroba neboli ankylozující spondylitida (AS) je chronické zánětlivé onemocnění, které postihuje především axiální skelet (páteř). Dále postihuje bedrokyčelní, apofyzeální a kostovertebrální klouby páteře. V důsledku sekundární metaplázie předních a bočních okrajů těl obratlů dochází k osifikaci periferních částí vazivového prstence meziobratlové ploténky a okolních vazů (Forejtová, 2009).

#### ***1.2 Klasifikace spondylartritid***

AS se řadí mezi skupinu onemocnění zvaných seronegativní spondylartritidy. Tuto skupinu onemocnění charakterizuje to, že se jedná o zánětlivé revmatické choroby s nepřítomností revmatoidních faktorů, a objevuje se u nich artritida, entezopatie, sarkoilitida, spondylartritida. Často jsou s nimi spojeny i komplikace, které nezasahují klouby, jako například postižení očí, gastrointestinálního traktu, poruchy srdeční činnosti a kožní projevy. Dále je typický rodinný výskyt a asociace s HLA-B27 (Pavelka, 2003). Spondylartritidy se dělí podle dvou hledisek. V první skupině jsou spondylartritidy rozdělené podle definovaných klinických jednotek. Do této skupiny patří ankylozující spondylitida, psoriatická artritida, reaktivní artritida, enteropatická artritida (artritida při ulcerózní kolitidě, Crohnově nemoci, Whippleově chorobě a jejunoileálním bypassu), Reiterův syndrom, Behcetova choroba, juvenilní ankylozující spondylitida a ediferenciovaná spondylitida. Z druhého hlediska se spondylartritidy dělí podle převažujícího poškození na formu axiální a periferní. U axiální formy převažuje postižení páteře a u periferní jsou postiženy periferní klouby (Češka, 2010)

#### ***1.3 Historie***

AS se v populaci vyskytuje již od starověku, což dokazují nálezy na egyptských mumiích, které byly stejné jako nálezy u AS. První záznam o AS je v knize De Re Anatomica, kde Realdo Colombo popisuje dvě kostry, které odpovídají popisu AS. Tato zmínka je z roku

1559. Více než 100 let po Colombově popisu, roku 1693 irský lékař Bernard Connor popsal lidskou páteř, která byla výrazně zdeformována. Popisuje, že kost kyčelní a křížová, pět bederních a deset hrudních obratlů, pět pravých a tři levá žebra byla spojena v jednu kontinuální kost. Connor dále popsal, jaký mohla mít dopad tato deformace na kvalitu života. Další popisy choroby se objevují až od poloviny 18. století. Mezi nejvýznamnější osobnosti, které se spojují s objevením AS, patří v Rusku Wladimir von Bechterew, podle něhož je choroba pojmenovaná, v Německu Adolph Strümpell a ve Francii Pierre Marie. Další přínos pro diagnostiku měl vynález rentgenu, vytvořený roku 1895 německým fyzikem Wilhelmem Conradem Roentgenem. Rentgenový snímek se ale pro diagnostiku AS začal používat až na počátku dvacátých let dvacátého století. Rentgenové projevy AS, jako jsou sarkoilitida a syndesmofyty, popsali Krebs, Scott, Forestier a Robert ve třicátých letech dvacátého století. Tato radiologická kritéria se používají dodnes v diagnostice AS. V první polovině dvacátého století se zjistila souvislost AS s mnoha ostatními nemocemi jako např. s určitými formami artritidy, včetně Reiterovy choroby, psoriatické artritidy a s artropatií, která je spojená se střevními chorobami. Moll zavedl název skupiny onemocnění spondylartritidy, které mají společné klinické a genetické znaky odlišné od revmatoidní artritidy. Dalším důležitým mezníkem je objevení HLA v letech 1940-50, který pomohl k porozumění spondylartritid. Zjistilo se, že je vzájemná korelace mezi AS a Reiterovým syndromem, protože měly podobné klinické příznaky. Tato teorie se později potvrdila, a to v roce 1973, kdy se našla přítomnost antigenu HLA-B27 u pacientů s oběma chorobami (Sieper, 2002)

#### ***1.4 Příčina nemoci***

Příčina AS nebyla dosud zcela objasněna. Jako jedna z příčin Bechtěrevovy choroby je přítomnost antigenu HLA-B27. Až 90% nemocných vlastní tento antigen, a na druhou stranu 20% lidí nesoucí antigen HLA-B27 onemocní AS. Jelikož je onemocnění dědičné, přihlíží se při diagnostice k rodinné anamnéze. U HLA-molekuly nacházející se na buněčném povrchu je navázaný ve vazebném žlábků imunogenní peptid. Každá molekula HLA váže různé peptidy, a to podle tvaru žlábků. Pokud je peptid z nepozměněného antigenu vlastního těla, tak na něj imunitní systém nereaguje a nastavuje vůči němu

toleranci. Pokud peptid pochází z vlastního antigenu, který je ale pozměněný, nebo pochází z cizího antigenu, imunitní systém navodí vůči němu imunitní reakci. Poslední možností je to, když peptid pochází z antigenu, který je specifický pro určitou chorobu. Takový peptid označujeme jako patognostický peptid, který může pocházet z endogenního i exogenního antigenu (Ferenčík, 2004). U pacientů s AS se nachází molekula HLA-B27, která má schopnost vázat tento patognostický peptid. Takto predisponovaní jedinci mají až 88x vyšší riziko, že onemocní AS. V souvislosti s antigenem HLA-B27 existuje teorie zkřížené reakce, která objasňuje patogenezi onemocnění. Podle této teorie onemocnění propuká tehdy, když se pacient vlastníci antigen HLA-B27 nakazí bakterií (především střevní bakterií), která na svém povrchu nese antigeny blízce podobné antigenu HLA-B27. Imunitní systém nastartuje imunitní odpověď proti bakteriím, ale zároveň i vůči svým zdravým buňkám, jelikož nesou antigen podobný antigenu bakterie. Z toho důvodu jsou ničeny i zdravé buňky těla a dochází k zánětu. Tomuto jevu se říká molekulární mimikry (Pavelka, 2003) Hlavním mechanismem spouštějící reakci mohou být T-lymfocyty, které reagují na bakteriální peptidy prezentované molekulou HLA-B27 (Shoenfeld, 2007).

### ***1.5 Epidemiologie***

Pacienti s AS jsou především muži, a to až desetkrát častěji než ženy. Celkový výskyt AS v populaci je 0,1 % do 1 %. V České republice se výskyt choroby pohybuje okolo 0,1 %, kam spadají pouze pacienti, kteří splnili kritéria pro definitivní AS. Pokud bychom zahrnuli i časné a nediferenciované AS, prevalence vystoupá až na 0,5 %. Dále jsou geografické rozdíly ve výskytu onemocnění - na severu je vyšší výskyt AS než na rovníku (Češka, 2010).

### ***1.6 Klinické projevy nemoci***

#### ***1.6.1 Axiální projevy***

AS se začíná projevovat mezi 18. a 40. rokem života, po 40. roce se projevuje pouze ojediněle. Onemocnění se zprvu projevuje pozvolně, ve většině případech mírnou bolestí v křížobederní oblasti. Bolest má zánětlivý charakter, to znamená, že pacienti mají největší bolesti v klidovém režimu a pohyb přináší úlevu. Často se pacienti s AS v noci

budí bolestí, a to především v druhé polovině noci, a po ránu cítí ztuhlost. Dále si pacienti stěžují na bolest v hýžd'ové oblasti. V dalším stádiu se začíná projevovat bolest hrudi, jejíž příčinou je artritida kostoklavikulárních kloubů. Dalšími klouby, které jsou postiženy artritidou, jsou klouby ramenní a kyčelní. Při deformacích páteře dochází ke vzniku větší hrudní kyfózy a také ke zmenšení expanze hrudníku při nádechu a výdechu (Forejtová, 2009).

### ***1.6.2 Periferní projevy***

Z periferních projevů je třeba zmínit oligoartritidu především dolních končetin, která bývá asymetrická. Dalším z periferních projevů artritidy je daktylitida a entezitidy. Entezitidy se klinicky projevují citlivostí na tlak, při určitých pohybech se objevuje prudká bolest. Bolest se může objevovat i v klidu. Jedná se především o záněty v úponu Achillovy šlachy, plantární fascie, úponů na pánevní kosti, malého a velkého výběžku stehenní kosti, v oblasti lokte a ramene (Češka, 2010).

### ***1.6.3 Mimokloubní projevy***

Mezi mimokloubní projevy AS se řadí akutní přední uveitida, která se vyskytuje zhruba u 40% postižených AS. Jedná se o postižení živnatky oka, která se skládá ze třech částí – cévnatky, řasnatého tělíska a duhovky. U přední uveitidy je postižené řasnaté tělísko s duhovkou a obvykle za určitou dobu odezní. Hlavní příznakem uveitidy je tupá bolest oka se zhoršením viděním. Dále dochází ke kardiálním komplikacím přibližně u 9% pacientů. Mezi tyto projevy patří aortitida a aortální insuficience. Mezi další mimokloubní projevy řadíme gastrointestinální příznaky, které se podle studií objevují téměř u 50% postižených AS. Ve většině případů se jedná o záněty střevní sliznice. Poměrně častá je také osteoporóza obratlových těl. Osteoporóza u AS je odlišná od primární osteoporózy. Často se projevuje u mladých mužů, a to především v oblasti krční a bederní oblasti páteře a poměrně rychle se rozvíjí (Češka, 2010).

## ***1.7 Diagnostika AS***

AS se doposud diagnostikovala pomocí Newyorských kritérií z roku 1984, do kterých jsou zahrnuta radiologická a klinická kritéria. Pacient pro potvrzení diagnózy musí

splňovat alespoň jedno ze tří klinických kritérií a jedno radiologické kritérium. Dále se při diagnostice AS přihlíží k rodinné anamnéze (Forejtová, 2009).

### **1.7.1 Klinická kritéria**

- 1 současná nebo anamnestická páteřní bolest, která má zánětlivý charakter a přetrvává více než 3 měsíce*
- 2 omezení hybnosti bederní páteře ve třech rovinách – dorzální, ventrální a laterální*
- 3 omezení dýchacích pohybů hrudníku na 2,5 cm nebo méně – měřeno v IV. mezižebří (Forejtová, 2009, s.31)*

Při vyšetření sarkoiliakálních kloubů se používá test nazývaný Mennelův manévr. K dalšímu vyšetření se používá Schoberův test, kterým se zjišťuje rozvíjení páteře ve třech rovinách. Tímto testem se měří vzdálenost týlní kosti od kolmé stěny. Tato vzdálenost by měla fyziologicky být maximálně 2 cm. Dále se měří expanze hrudníku, která by měla být minimálně 5 cm a hodnota pod 2,5 cm je patologická (Češka, 2010).

### **1.7.2 Radiologická kritéria**

Prvním rentgenovým nálezem AS je sarkoileitida. Nález je obvykle oboustranný a symetrický. Dalším charakteristickým nálezem je kostní eroze a ve většině případů se objevuje i nepravidelná kloubní štěrbina, která se zužuje nebo rozšiřuje. Erozivní změny v předních rozích obratlů páteře vedou k tzv. zečtvrcovatění obratlů neboli spondylitis anterior. Dále dochází ke kostnatění úponů ligament a vzniku syndesmofytů, které způsobují ankylózu části anebo celé páteře, tento stav se označuje bambusová páteř. Kostnaté výběžky (syndesmofyty) vznikají ve většině případů nejdříve v oblasti křížobederní páteře a dále směrem vzhůru až ke krční páteři. Jsou známé i případy, kdy dochází k přeskočení určité části páteře. AS doprovázejí i další erozivní změny, a to především apofyzeálních kloubů, zánět meziobratlové ploténky a obratle, atlantoaxiální subluxeace a osteoporóza. Další postiženou oblastí může být kyčelní kloub, který má zúženou kloubní štěrbinu, a tím dochází k destrukci (Češka, 2010).



Ve většině případů se AS diagnostikuje se zpožděním, a to v rozmezí 7 až 9 let od prvních příznaků. Jelikož k potvrzení diagnózy je potřeba splnit radiologické kritérium, které většinou ukazuje již na probíhající erozivní změny, vytvořila se nová kritéria, která by měla zachytit i časná stádia AS. Pro tato kritéria se používá zobrazovací metoda s názvem magnetická rezonance (MR). Touto zobrazovací metodou se dají zachytit zánětlivé změny sarkoiliakálních kloubů a páteře, např. výpotek, edém kostní dřevě (Češka, 2010).

Při diferenciální diagnóze je potřeba odlišit zánětlivou bolest zad od bolesti při prolapsu meziobratlové ploténky, která na rozdíl od AS se zhoršuje při pohybu a v klidu se zmírní. Dále se musí odlišit změny na sakroiliakálních kloubech, které mohou mít degenerativní původ např. osteoporóza nebo osteoartróza. V případě AS je sakroileitida většinou asymetrická a bývá doprovázena syndesmofyty. Pozor si musíme dát i v případě difúzní idiopatické skeletární hyperostózy. Toto onemocnění vzniká u pacientů starších 50 let a typický nálezn na rentgenovém snímku jsou nově vytvořené kosti v oblasti meziobratlové ploténky, které mají polevovitý tvar. Rentgenový nálezn AS musíme dále odlišit od deformační osteoartrózy, která postihuje především starší pacienty a nejsou pro ni typické sakroileitidy (Forejtová, 2009).

### **1.8 Stádia AS**

Podle radiologického nálezu rozlišujeme 5 stádií AS.

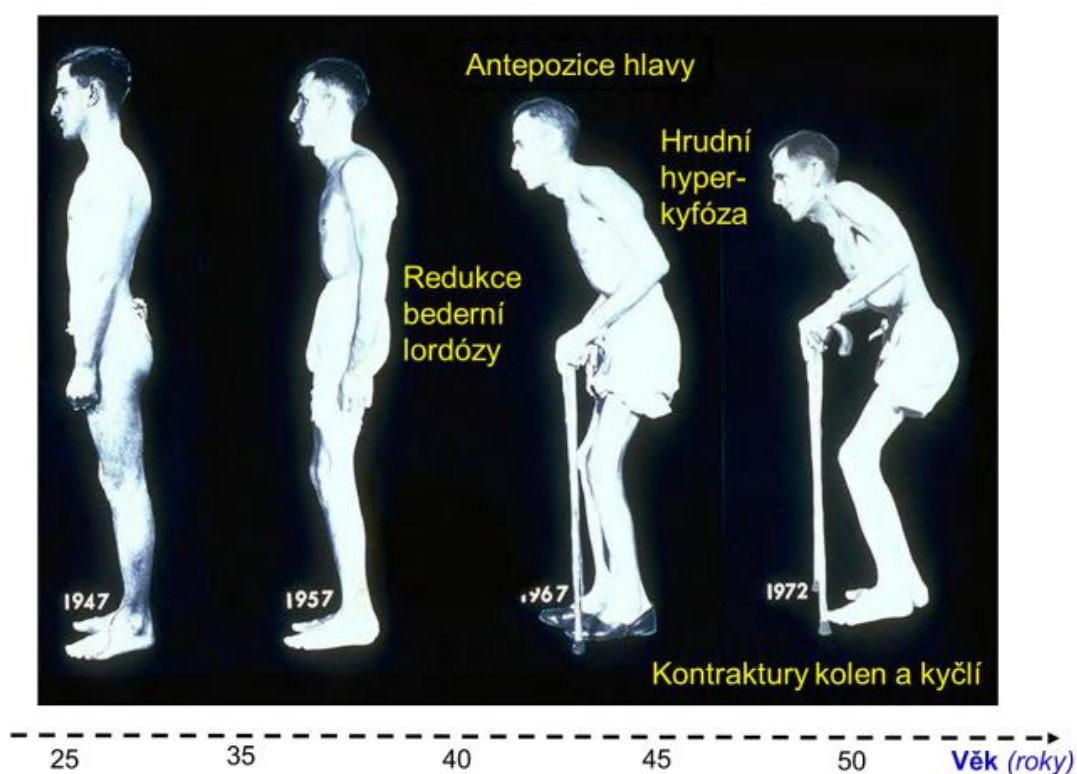
0. *normální nálezn*
1. *podezření na sakroileitidu, nepravidelné a neostré kontury subchondrální kosti a zdánlivé rozšíření štěrbiny*
2. *eroze, skleróza, ohraničené kapsulární osifikace*
3. *rozsáhlejší eroze, jednoznačná skleróza, parciální ankylóza štěrbin*
4. *synostóza – ankylóza (Pavelka, 2003, s. h352)*

### **1.9 Průběh a prognóza**

U každého pacienta je průběh AS jiný. U některých má rychlý nástup s velkými bolestmi a páteř se deformuje během krátkého časového úseku. V jiných případech může být nástup pomalý bez výrazných bolestí (Forejtová, 2009). U části pacientů se onemocnění

objevuje po určitých časových úsecích, kdy se zhorší celkový zdravotní stav pacienta (Klener, 2002).

U žen probíhá onemocnění odlišným způsobem než u mužů. Většinou trpí mírnější formou AS, a především jsou u nich postiženy periferní klouby a krční páteř. Komplikace nastávají při těhotenství, kdy na rozdíl od revmatoidní artritidy nemá gravidita pozitivní vliv a často se AS zhoršuje. AS je onemocnění na celý život, ale pokud se zachytí včas a nastaví se správná léčba, tak většina lidí žije normální aktivním životem (Forejtová, 2009).



Obr. 1 Průběh AS během 26 let (zdroj: Kryštůfková, 2017)

### 1.10 Léčba AS

Největším kamenem úrazu je včasná diagnóza AS. Jak už jsem dříve zmínila, prodleva mezi prvními příznaky a diagnostikováním této nemoci je v některých případech až 9 let. Při první návštěvě lékaře po stanovení diagnózy by měl být pacient seznámen s tím, že

musí dlouhodobě cvičit doma a měl by být i k tomu motivován. Správně by pacient měl cvičit každý den, a to celoživotně. Dále se využívá speciální rehabilitace, která je jedinou prevencí před zatuhnutím páteře, a farmakologické prostředky. Důležitou součástí terapie AS je fyzioterapie a lázeňská léčba (Forejtová, 2009).

### ***1.10.1 Historie léčby***

Několik desetiletí, přibližně od dvacátých let 20. století, se bolest zad u AS léčila pomocí rentgenového záření. Tato léčba měla dobré výsledky a pacientům přinášela krátkodobé zlepšení, a díky tomu se mohly snížit dávky antirevmatických a analgetických léků. Nicméně se muselo od léčby rentgenovým zářením ustoupit, jelikož měla vedlejší účinky. Mezi ně patří především účinky na kostní dřeň a řada pacientů takto léčená zemřela na leukémii nebo jinou rakovinu. První léky nabízené pacientům s AS byly ze skupiny salicylátů a opiátů, díky jejich analgetickým vlastnostem. V roce 1838 byla kyselina salicylová izolována ze salicinu a potvrzeny její analgetické a antipyretické účinky. Roku 1899 byl vyvinut Aspirin (salicylát se sníženou toxicitou), který u AS účinný není, na rozdíl od RA, kde se k léčbě používá. Následně v roce 1949 se začala AS léčit Fenybutazonem, který je prvním léčivem spadajícím do skupiny nesteroidních protizánětlivých léčiv (NSA). U tohoto léčiva se zjistily nežádoucí účinky jako například aplastická anémie nebo poškození jater. Roku 1965 se vyvinula druhá generace NSA s hlavním představitelem Indometacinem, které měly velmi dobré výsledky (Sieper, 2002).

### ***1.10.2 Léčba AS v současnosti***

Choroba není zcela vyléčitelná, ale zavedly se různé prostředky v léčbě, které zmírňují příznaky a zpomalují průběh nemoci. Tyto léčebné opatření můžeme rozřadit do několika skupin. První skupinou je pohybová terapie, do které řadíme rehabilitaci, fyzioterapii a lázeňskou léčbu. Dalšími skupinami terapií AS jsou farmakoterapie, revmatochirurgické výkony, rentgenová terapie a biologická léčba (Pavelka, 2003).

### ***Pohybová terapie***

Je to jeden z nejdůležitějších článků v léčbě AS. Pacient musí být dostatečně motivován, aby dodržoval cvičební plán, a to je v mnoha případech kámen úrazu. Cílem této léčby je posílení svalů, které jsou potřeba pro správné držení páteře a zabránit páteřním deformacím. Mezi tyto svaly patří především musculus erector spinae neboli vzpřimovač páteře. Další důležitou složkou jsou dechová cvičení, která slouží k tomu, aby si hrudník udržel svoji pohyblivost, které se s průběhem onemocnění zhoršuje, a zároveň napomáhá lepšímu bráničnímu dýchání. Dalším problémem, ke kterému dochází při AS, je kyfotizace, které pacient zabráni díky vzpřímenému postoji při běžných každodenních činnostech. K dalším způsobům, jak si nemocný může pomoci sám, se řadí cvičení krční páteře pomocí flekčních a extenčních pohybů, které slouží k udržení hybnosti krční páteře. Dále je potřeba, aby si pacient obstaral pevné a tvrdé lůžko a hlavu při spánku měl podloženou pouze nízkou podložkou. Během spánku je také potřeba střídat spánek na zádech a na břiše, aby se zabránilo flekčním deformacím kyčelních kloubů. Význam má i hydrokinezioterapie, která by se měla provádět denně. Pacienti s AS mají v ČR na výběr z několika specializovaných lázeňských míst, kam patří např. lázně Bohdaneč, Jáchymov, Třeboň a Poděbrady (Pavelka, 2003).

### ***Farmakoterapie***

Účelem této terapie je útlum zánětlivé aktivity, zmírnění bolesti a ztuhlosti (Pavelka, 2003).

- Nesteroidní antirevmatika (NSA) - První skupinou a neúčinnější skupinou jsou nesteroidní antirevmatika, do které řadíme pyrazolonové deriváty. Mezi tyto deriváty patří např. fenylobutazon a kebumon, které se ovšem používají pouze jednorázově nebo krátkodobě vzhledem k jejich vedlejším účinkům při dlouhodobé léčbě. Dalším krátkodobým lékem je indometacin, který se podává v dávce 50-75 mg per os denně nebo 100 mg čípku večer před spaním. Tento přípravek účinkuje především přes noc, kdy pacientům utlumí noční bolest a ranní ztuhlost. Ovšem k dlouhodobému podávání se musela vyvinout nová farmaka. Pyrazolony byly nahrazeny diklofenakovými přípravky, jejichž účinnost je velmi

dobrá a jejich dávka se v průběhu léčby snižuje. Diklofenakové přípravky se pro snížení gastroduodenálních komplikací kombinují s inhibitory protonové pumpy (např. omeprazol). Dalšími přípravky, které se řadí mezi NSA, jsou například deriváty kyseliny propionové. Nejmenší gastroduodenální komplikace jsou při užívání selektivních inhibitorů COX-2 (Pavelka, 2003).

- Modifikující léky - Tato skupina léků se používá v případech, kdy je již zánětlivá aktivita vysoká a NSA již nezabírají nebo jejich působení není dostatečné. Dále se používají u periferních forem AS. Nejvíce používaným farmakem je sulfasalazin, který se používá v dávce 2 g denně, a je možno jej po několika měsících vysadit při snížení aktivity. Je celkem dobře tolerován, pouze u určitého procenta pacientů dochází k úbytku krevních elementů nebo ke kožním projevům. Dále se užívá metotrexát, který se podává v dávce 7,5 mg jednou týdně (Pavelka, 2003).
- Kortikosteroidy – Tato skupina léčiv se používá jen v ojedinělých případech a denní dávka by neměla přesáhnout 10 mg, což je v porovnání s RA podstatně menší dávka. Užívají se ve většině případu u periferní formy AS nebo se mohou použít lokálně k opichům kloubů a úponů šlach. Kortikoidy se však mohou aplikovat jen krátkodobě, ale i přesto mají velmi dobré účinky (Pavelka, 2003).

### ***Rentgenová terapie***

Jak je výše zmíněno, první léčba AS byla terapie pomocí rentgenových paprsků, která se ale záhy zavrhl kvůli závažným vedlejším účinkům zejména na kostní dřeň. V současnosti se využívá jen výjimečně, a to pouze v případech, u nichž ostatní terapie selhala nebo ji pacienti nesnesou. Pacienti indikovaní k rentgenové terapii trpí většinou agresivní formou AS s těžkým průběhem nemoci. Dávka rentgenovým zářením nesmí překročit 0,15 až 0,18 mC/kg použitá na osový skelet páteře. Většinou se aplikuje pouze v místě nelepších se zánětů úponů šlach (Pavelka, 2003).

### ***Revmatochirurgické výkony***

Důvodem k chirurgickému zákroku je většinou poškození kyčelního kloubu při formě AS, která postihuje periferní klouby. Takto poškozený kloub se nahrazuje endoprotézou kyčelního kloubu s delším krčkem, jelikož po operaci často dochází k sekundární ektopické osifikaci. Díky léčebným možnostem se v současnosti setkáváme jen zřídka s pacienty, kteří trpí těžkou kyfózou. Problém nastává v případě, kdy pacient trpí osteoporózou a AS zároveň. Při této kombinaci se doporučují kalcitové přípravky. Naopak fluoridové přípravky se nepoužívají z toho důvodu, že by mohly podpořit osifikaci (Pavelka, 2003).

### ***Biologická léčba***

Tento typ léčby se začal využívat k terapii AS před nedávnou dobou a přes to již přináší pozitivní výsledky. Zjistilo se, že při této léčbě se snížila hodnota proteinů akutní fáze a rychlost sedimentace erytrocytů a dále se snížila i agresivita choroby. U velmi zánětlivé reakce u AS se standardně podávají blokátory TNF $\alpha$ , což mohou být protilátky proti TNF $\alpha$  nebo solubilní receptor pro TNF $\alpha$  (Forejtová, 2009).

#### ***1.11 Laboratorní nálezy***

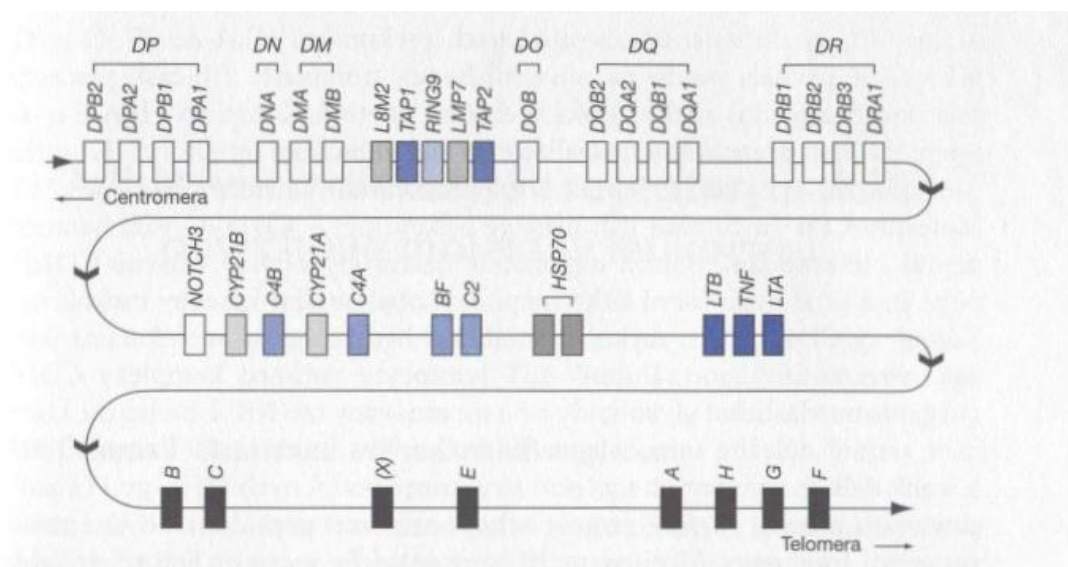
Hlavním diagnostickým laboratorním nálezem je přítomnost molekuly HLA-B27, která se vyskytuje zhruba u 90 % pacientů s AS. Dále se objevují zvýšené hodnoty proteinů akutní fáze, a to především C-reaktivního proteinu (CRP) a zvýšená rychlost sedimentace erytrocytů. U těžkých forem AS může být zvýšená hodnota alkalické fosfatázy a IgA (Pavelka, 2003).

## 2 MHC komplex

Hlavní histokompatibilní komplex MHC (Major Histocompatibility Complex) se u každého živočišného druhu nazývá jinak. U člověka se jmenuje HLA systém, například u myši H-2, u krávy BoLa a u koně ELA (Mateička, 2004).

### 2.1 HLA komplex

HLA systém (Human Leukocyte Antigen) je tvořen molekulami, které jsou produkty genetického komplexu, mezi jehož hlavní úlohy patří rozeznávat, co je tělu vlastní a co je cizí. Tato funkce systému je zodpovědná i za odhojování transplantátu orgánu. HLA komplex se dělí podle funkce, struktury, tkáňové distribuce a genetické determinace na tři třídy: HLA I. třídy, HLA II. třídy a HLA III. třídy (Krejsek, 2004). Molekuly HLA komplexu jsou vystaveny na buněčném povrchu, kde je rozpoznávají T-lymfocyty. Molekuly HLA I. třídy předkládají antigenní peptid cytotoxickým T-lymfocytům (Tc, CD8+) zatímco molekuly HLA II. třídy rozpoznávají pomocné T-lymfocyty (Th, CD4+) (Fučíková, 1997). HLA-antigeny jsou kódované mnoha geny, které se nacházejí na krátkém raménku 6. chromozomu člověka. Podle cytogenetické nomenklatury se tato oblast nazývá jako 6p21.31., kde 6p se označuje krátké raménko 6. chromozomu a čísla 21.31 označují pozici proužku, které vznikají při speciálních cytogenetických metodách a jsou pro daný chromozom specifické. Kompletní genová mapa HLA-komplexu je známá od roku 1999 a zjistilo se, že se zde nachází 224 genů, z nichž 128 je funkčních a 96 pseudogenů, které nekódují žádný peptid. Genetická oblast HLA se skládá přibližně z 3 600 000 párů bází DNA, což se rovná 0,1 % genomu člověka (Mateička, 2004).



Obr. 2 Genový komplex HLA (zdroj: Bartůňková, 2011)

## 2.2 Polymorfismus HLA-systému

Jednou z nejdůležitějších vlastností HLA systému je polymorfismus a také se řadí k nejpolymorfnějším genetickým komplexům člověka. Znamená to, že geny kódující HLA-systém se vyskytují ve více variantách neboli alelách, čímž je zabezpečena adekvátní imunitní odpověď organismu. HLA-polymorfismus se detekuje pomocí dvou vyšetřovacích metod a každá má různou senzitivitu detekce. Pomocí serologické metody se podařilo určit přibližně 160 antigenů, resp. antigenních specifit. Druhou skupinou vyšetřovaných metod jsou DNA-metody, které pomohly k odhalení více než 1200 alel kódujících klasické HLA-antigeny (Mateička, 2004).

### 2.2.1 Frekvence a výskyt HLA-alel

Výskyt a frekvence jednotlivých HLA-alel je odlišná. Liší se především mezi etnickými skupinami, rasami i mezi jednotlivými populacemi, a proto se HLA-systém využívá ve výzkumu evoluční genetiky a antropologie. Tímto způsobem se například dokázalo to, že lidská populace pochází z Afriky, z níž jedna část odešla do Evropy a severní Asie a druhá na území jižní Asie a Pacifiku. Je dokázáno, že některé alely se ve všech populacích vyskytují se stejnou frekvencí např. HLA-A2 se vyskytuje u 48-49 % lidské populace. Existují i alely, které se vyskytují u různých populací s různou frekvencí: např.



HLA-A1 se vyskytuje u 26 % bělochů, ale jen u 2 % orientálců. Dále se vyskytují také alely, které se u určité skupiny populace nevyskytují nikdy, jako např. HLA-A25 se vyskytuje u 5 % bělochů, ale u černochů je frekvence nulová (Mateička, 2004). V ČR mají největší frekvenci výskytu alely HLA-A1, -A2, -A3, -B7, -B35, -B44, -Cw3, -Cw4 a -Cw7 (Kralovicová, 2000).

Další významnou charakteristikou HLA-systému je vazbová nerovnováha. Rovnovážný stav, kdy se frekvence haplotypu rovná součinu frekvencí obou genů, nastává v tom případě, když leží dva geny vedle sebe na stejném chromozómu. Takto ležící geny jsou ve vazbě a dochází mezi nimi ke crossing-overu, takže za určitý počet generací nelze zjistit, zda geny jsou nebo nejsou ve vazbě. K rovnovážnému stavu v některých případech nedochází a z toho důvodu se některé haplotypy vyskytují v populaci častěji, než se předpokládalo. Tato skutečnost je právě typická pro HLA-systém. Například ve slovenské populaci je frekvence alely HLA-B8 0,109 a alely HLA-DR3 0,104. Kdyby mezi geny byl rovnovážný stav, tak by výskyt haplotypu HLA-B8, HLA-DR3 byl 1,1 %. Ovšem skutečnost je jiná, protože výskyt tohoto haplotypu ve slovenské populaci je 7,3 %, což je téměř 7x více, a to právě kvůli vazbové nerovnováze (Mateička, 2004).

### **2.2.2 Příčiny a mechanismy vzniku polymorfismu**

K HLA-polymorfismu může docházet různými způsoby, jako jsou například mutace, genové konverze, sestřih po přepisu DNA a posttranslační úpravy proteinů. HLA-polymorfismus vznikl nejpravděpodobněji kvůli jeho biologické výhodnosti. Díky tomu, že existuje velký počet HLA-antigenů s různými žlábkami vážícími peptidy, tak se může prezentovat a vázat široké spektrum cizích antigenů, a tím se zabezpečí imunitní odpověď organismu. Tato skutečnost umožňuje jednotlivci i celému druhu se bránit vůči cizorodým antigenům. Jedna z teorií hovoří o tom, že nejdůležitější selekční faktor je přítomnost mikroorganismů v organismu. V tomto případě by HLA-polymorfismus byl určený polymorfismem výskytu různých patogenů. Tuto teorii potvrzuje případ ze západní Afriky, kde je vysoký výskyt alely HLA-A3, která se v ostatních populacích v takové míře nevyskytuje. Antigen HLA-A3 chrání lidskou populaci před rozvojem mozkové formy malárie, která se vyskytuje právě na území západní Afriky. Na druhou

stranu existují i izolované kmeny v Austrálii a na jihu Ameriky, u kterých je polymorfismus výrazně menší, ale z imunologického hlediska nejsou znevýhodněni. Také velké epidemie cholery, moru a tyfu neměly výrazný vliv na HLA-polymorfismus (Mateička, 2004).

Další teorií vzniku polymorfismu HLA-systému je selekce upřednostňující heterozygoty. Geny jsou lokalizované na chromozómu, které jsou v párech a díky tomu se vyskytují ve dvou formách neboli alelách. Heterozygot má každou alelu jinou na rozdíl od homozygota, který má obě alely stejné. Díky tomu je heterozygot z hlediska imunologické variability výhodnější. Například v populaci, kde se vyskytuje 10 alel určitého genu, bude podíl homozygotů 10 %. Při navýšení alel na 30 se počet homozygotů sníží na 3 % a většina populace jsou heterozygoti. Na druhou stranu existuje izolovaný kmen lidské populace Taurégov, u kterého se vyskytuje jen 21 HLA-alel a dochází k příbuzenským svazkům, a proto by měl být počet homozygotů v kmeni vysoký. Ve skutečnosti je tomu jinak, homozygoti se v kmeni téměř nevyskytují, takže zvýšená frekvence heterozygotů má i jiné příčiny (Mateička, 2004).

### ***2.3 HLA-molekuly a geny I. třídy***

Molekuly HLA I. třídy jsou exprimovány na všech jaderných buňkách, na rozdíl od molekul HLA II. třídy, které se vyskytují pouze na antigen prezentujících buňkách APC. HLA I. třídy se dělí na dvě skupiny. První skupina zahrnuje klasické antigeny HLA-A, HLA-B a HLA-C a druhá skupina obsahuje neklasické antigeny HLA-E, HLA-F, HLA-G. Klasické antigeny se vyskytují na membránách většiny jaderných buněk, ale jejich exprese je rozdílná. Nejvíce exprimované jsou v lymfatické tkáni, slezině, thymu a lymfocytech, kde jeden lymfocyt nese přibližně půl milionu HLA molekul. Menší exprese je na ledvinách, svalových buňkách, fibroblastech, myokardu, endokrinní tkáni, hepatocytech a rohovce. Na neuronech, spermích, buňkách placenty, extravilózním trofoblastu a erytrocytech se HLA-molekuly nevyskytují. Antigen HLA-C se vyskytuje v menší míře (exprese asi 2%) než antigeny HLA-A a HLA-B. Expresivita antigenů se zvyšuje při působení některých lymfokinů a snižuje při přítomnosti virů např. adenovirů (Mateička, 2004).

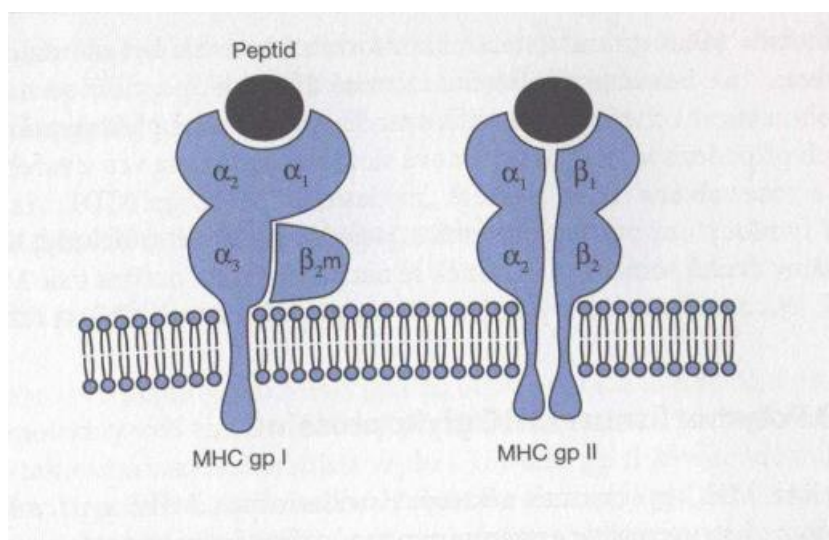
#### **2.4 Struktura klasických antigenů HLA I. třídy**

Biochemickou strukturu molekuly antigenu tvoří dva nekovalentně vázané řetězce  $\alpha$  a  $\beta$ . Větší a těžší řetězec  $\alpha$  je transmembránový glykoprotein s molekulovou hmotností 45 kilodaltonů, který je tvořený z 350 aminokyselin. Řetězec  $\alpha$  se skládá ze tří částí, které se nazývají extracelulární, transmembránová a cytoplazmatická. Extracelulární část obsahuje tři domény  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ . Klasické antigeny HLA-A, HLA-B a HLA-C se od sebe liší v dlouhé cytoplazmatické části. Řetězec  $\beta$  je  $\beta 2$ -mikroglobulin, který má molekulovou hmotnost 12 kD a je složený z 99 aminokyselin.  $\beta$  řetězec není transmembránový a nekovalentně se váže na  $\alpha$  řetězec v doméně  $\alpha 3$ . Ve všech typech antigenů je stejný, takže není polymorfní. Pomocí rentgenové krystalografické studie se zjistilo, jak vypadá prostorová struktura antigenů HLA-A, HLA-B a HLA-C.  $\beta 2$ -mikroglobulin a  $\alpha 3$  doména mají strukturu skládaného listu neboli  $\beta$ -strukturu, spodní část domén  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  mají též  $\beta$ -strukturu a horní část je spirálovitá struktura neboli  $\alpha$ -struktura. Toto prostorové uspořádání je z hlediska funkce HLA molekul velice důležité, protože se mezi  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  vytváří žlábek, kam se později váže peptid.  $\alpha$  řetězec je na rozdíl od  $\beta$ -řetězce polymorfní, a to především domény  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$ . Jednotlivé antigeny se od sebe liší v primární struktuře, což znamená v pořadí aminokyselin. V nomenklatuře se proto používá číselné značení jako v tomto příkladu HLA-B27, kde B určuje, že se jedná o antigen HLA-B a číslo 27 označuje konkrétní antigen dané skupiny. Zatímco řetězec  $\alpha$  je kódován na 6. chromozomu, řetězec  $\beta$  lokalizujeme na 15. chromozomu. Klasické antigeny se dědí kodominantně, což znamená, že u heterozygota můžeme určit oba geny, které determinují daný antigen (Mateička, 2004).

#### **2.5 Molekulová genetika a biosyntéza HLA-molekul I. třídy**

Geny kódující molekuly HLA I. třídy jsou složené geny, takže mají podobnou stavbu jako ostatní geny eukaryot. Skládají se z nekódujících úseků DNA (intronů) a kódujících úseků (exonů). Primární struktura, tak jako u většiny jiných genů, je zapsaná v pořadí bází DNA. V průběhu transkripce, která probíhá v jádře, se přepíše do premediátorové RNA, která je poté upravena posttranskripční modifikací. Při tomto procesu dochází k vystřihání nekódujících částí DNA a vzniká mediátorová RNA (mRNA), která obsahuje

pouze exony. Takto vytvořená mRNA postupuje k dalšímu zpracování v procesu translace, při které se již vytvoří na ribozomu nový protein. Geny I. třídy jsou složeny ze 7 nekódujících a 8 kódujících úseků. V 1. kódujícím úseku je zapsán vodící peptid LP (Leader Peptide), 2.-7. exon kódují jednotlivé části  $\alpha$ -řetězce a 8. exon nepodléhá translaci (UT-untranslated). Protein vytvořený při proteosyntéze se skládá z  $\alpha$ -řetězce a LP a přesouvá se do endoplazmatického retikula (ER). Tento transport je zprostředkován LP, který se po přesunu enzymaticky odštěpí. V ER vzniká glykoprotein, poté co se k proteinu naváží oligosacharidové zbytky při procesu glykosylace. Takto se vytvoří  $\alpha$ -řetězec molekuly I. třídy. Podobně se do ER dostane i  $\beta$ -řetězec. Nekovalentní vazba  $\alpha$  a  $\beta$ -řetězce vzniká pomocí chaperonu kalnexinu a vzniká kompletní molekula I. třídy. Stabilitu této molekuly udržují další dva chaperony kalretikulin a tapasin (Mateička, 2004).



Obr. 3 Porovnání struktury HLA I. a HLA II. Třídy (zdroj: Bartůňková, 2011)

## 2.6 Prezentace antigenu molekulami I. třídy

Molekuly HLA I. třídy prezentují peptidy z antigenů, které se nacházejí uvnitř buňky (endogenní antigeny). Tyto antigeny jsou produkovány zhoubnými buňkami, viry, vnitrobuněčnými organismy nebo vlastní degradované bílkoviny nacházející se v cytosolu. Proces prezentace endogenních antigenů začíná tím, že se prezentovaný protein naváže v cytoplasmě nejprve na chaperon ubikvitin, který ho dovede k proteazomu. Proteazom je útvar, který se skládá z několika enzymů (proteáz), má

soudkovitý tvar a skládá se z 28 podjednotek například LMP2 a LMP7. Ve středu tohoto útvaru se nachází otvor, který slouží k zasunutí ubiquitinu s navázaným peptidem. Protein se rozštěpí na kratší úseky o 8-9 aminokyselinách, které jsou pro prezentaci antigenu optimální. Po tomto procesu se ubiquitin vrátí do cytosolu a vzniklý úsek aminokyselin se naváže na membránu ER, kde se nacházejí membránové kanálky (TAP1 a TAP2), které transportují antigenní peptidy do ER. V ER se v tuto chvíli nachází antigenní zbytek a kompletní molekula HLA I. třídy s chaperony kalretikulinem a tapasinem. Tapasin zprostředkuje vazbu peptidu na HLA molekulu a současně s kalretikulinem se od molekuly oddělí. Tímto celým procesem vzniká komplex, který zahrnuje  $\alpha$ -řetězec,  $\beta$ -řetězec a antigenní peptid. Imunogenní peptid se váže s HLA-molekulou ve žlábků, který vzniká v důsledku prostorového uspořádání. Na molekuly HLA I. třídy se váží peptidy o 8-9 aminokyselinách. Nejdůležitější z hlediska funkce je to, aby se variabilní úseky antigenů vázaly zejména do oblasti žlábků. Polymorfismus zajišťuje vazbu širokého spektra antigenních peptidů, a tím zabezpečuje adekvátní imunitní odpověď proti nim. HLA-antigen spolu s navázaným peptidem přechází do buněčné membrány přes Golgiho a trans-Golgiho aparát pomocí exocytózy. V tuto chvíli nastává vlastní prezentace antigenu. Imunogenní peptid navázaný na HLA-molekulu I. třídy rozpoznávají T lymfocyty (CD8+) pomocí receptorů TCR  $\alpha,\beta$ . Zároveň dochází k vazbě koreceptoru CD8 na  $\alpha 3$  doménu, což vede k aktivaci cytotoxických T-lymfocytů, které pak ničí tyto terčové buňky. Celý proces prezentace antigenů se uskutečňuje ve všech jaderných somatických buňkách. HLA-antigeny se do buněčné membrány dostanou během 30-45 minut a aktivace cytotoxických T-lymfocytů 24 hodin (Mateička, 2004).

## **2.7 HLA-B27**

HLA-B27 je asociovaná s AS, a dokazuje to, že až 90 % pacientů s HLA-B27 mají diagnostikovanou AS. Každá HLA-molekula váže peptidy, které mají podobnou strukturu neboli vazebný motiv. U HLA-B27 je vazebný motiv xArgxxxxxxLys(Arg), na druhém místě se nachází aminokyselina arginin a na devátém místě lysin nebo arginin. Místo písmene x může být jakákoliv aminokyselina (Bartůňková,2017). Do dnes je známo 132 alelových variant molekuly HLA-B27 (Novota, 2016) a v české populaci se vyskytují především alely B\*2705 a B\*2702, které jsou asociované s AS (Tesařová, 2012).

### 3 Reaktanty akutní fáze

Mezi hlavní reaktanty akutní fáze, které ukazují aktivitu AS, se řadí především C-reaktivní protein. Odrazem změn v sérových proteinech je pak zvýšená rychlost sedimentace erytrocytů.

#### 3.1 C-reaktivní protein

C-reaktivní protein neboli CRP se řadí mezi pozitivní proteiny akutní fáze, což znamená, že jeho hladina stoupá při probíhajícím zánětu. Patří do fylogeneticky starobylé vysoce konzervované skupiny pentraxinů. CRP je složený z pěti nekovalentně vázaných podjednotek, které jsou rozloženy kolem póru uprostřed. Na každou pentamerní podjednotku se váže podjednotka komplementového systému C1q v daném vazebném místě. Na druhé straně této oblasti je vazebné místo pro fosforylcholin, což je hlavní ligand pro CRP. Fosforylcholin je složkou kyseliny teichoové, obalových sacharidů a lipopolysacharidů bakterií a jiných mikroorganismů. Dále se nachází na vnější straně biomembrán. Pro vazbu CRP s fosforylcholinem musí být přítomny ionty  $Ca^{2+}$ . Tvorba CRP probíhá v jaterních buňkách a během 1-2 dní od propuknutí zánětu se hladina CRP zvýší téměř tisíckrát. Na druhou stranu se po odeznění zánětlivé reakce normalizuje přibližně se stejnou rychlostí. CRP je kódován genem nacházejícím se na 1. chromozomu v oblasti 1q21 až q23. Hlavním signálem pro transkripci genu pro CRP je přítomnost IL-6, a opačný účinek mají molekuly IL-1 a složky komplementu. Hladina CRP stoupá rychle při zánětu díky tomu, že jeho posttranslační úprava v ER je z 18 hodin zkrácená pouze na 75 minut. CRP je také jeden ze solubilních receptorů pro nebezpečné vzory (PRR), takže rozpoznává patogeny, tělu vlastní změněné nebo poškozené buňky, které dokáže zničit pomocí komplementu a fagocytů. CRP umí ničit též apoptotické buňky, které se vyznačují tím, že fosfolipidy přesouvají z vnitřní strany membrány na vnější stranu, čímž se odlišují od zdravých buněk. Tento proces nazývaný flip-flop vede k tomu, že fosfatidylserin a fosfatidyletanolamin se nacházejí místo uvnitř buňky na jejím povrchu. Ty jsou pak pomocí sekreční fosfolipázy  $A_2$  štěpeny při procesu zvaným hydrolýza na lysofosfolipidy, které poté váže CRP. CRP dále může aktivovat komplement, k čemuž je potřeba navázání podjednotky C1q, která aktivuje klasickou

cestu komplementu až do bodu aktivace fagocytů a tvorby opsoninů. Při aktivaci pomocí CRP se nevytváří komplex MAC, který zajišťuje perforaci buňky a následně její lýzu. Dále jsou nepřímé důkazy, že CRP váže Fc fragment IgG, což má vliv na opsonizační aktivitu makrofágů a neutrofilů. Zatímco u makrofágů tato vazba nastartuje aktivitu, u neutrofilů je aktivita potlačena tím, že utlumuje odpověď na signály od IL-8, fMLP a složku komplementu C5a. Dále znemožňuje adhezi neutrofilních granulocytů a jejich následnou diapedézu do tkání. Makrofágy po styku s apoptotickou buňkou působí spíše protizánětlivě pomocí sekrece cytokinů IL-10 a TGF $\beta$ , čímž zároveň omezují aktivitu subsetu Th1, který je hlavním činitelem destrukce tkáně při zánětu. Tímto mechanismem se CRP podílí na regulaci zánětlivé reakce. Hladina CRP se stanovuje pomocí nefelometrických a turbidimetrických metod (Krejsek, 2004).

### ***3.2 Sedimentace erytrocytů***

Rychlost sedimentace erytrocytů (FW) je jedna z nejzákladnějších hematologických metod a patří mezi skupinu nespecifických zánětlivých markerů. Krev se skládá z krevní plazmy a krevních elementů, které jsou v krevním oběhu člověka stejnoměrně rozptýleny. Ale pokud nesrážlivou krev necháme stát delší dobu ve zkumavce, komponenty se rozdělí podle hustoty (Trojan, 2003). Rychlost usazování je závislá na vzájemném působení erytrocytů: jelikož mají stejný náboj, tak se odpuzují. Dále také závisí na vlastnostech plazmy, a především na obsahu proteinů (Rokyta, 2000). FW se zrychluje při zánětlivých stavech, jako jsou například infekce a autoimunitní onemocnění (Trojan, 2003).



### ***Cíle práce***

1. Vypracovat rešerši na téma Bechtěrevova choroba
2. Seznámení s metodami, které se používají při diagnostice Bechtěrevovy choroby
3. Vypracovat statistiku ze získaných dat

### ***Hypotézy***

1. Mezi pacienty s diagnostikovanou Bechtěrevovou chorobou budou převažovat muži
2. Věk pacientů s Bechtěrevovou chorobou se bude pohybovat v rozmezí od 20 do 40 let

## **Metodika**

### **4 Typizace HLA**

Typizování znaků leukocytů se dříve využívalo především v transplantační medicíně. Dnes má však určování těchto znaků větší uplatnění jako pomocný diagnostický marker. Využívá se například při diagnostice některých autoimunitních chorob, a to i v diagnostice AS (Bartůňková, 2011).

#### ***4.1 Screening HLA-B27 pomocí průtokové cytometrie***

##### ***4.1.1 Princip metody***

Průtoková cytometrie je jednou ze základních metod, které se používají k analýze buněk. K analýze vzorku nejprve musíme vzorek označit monoklonální protilátkou, na které je navázaná fluorescenční molekula neboli fluorochrom. Takto značené monoklonální protilátky se váží specificky na antigeny na povrchu buňky. Takto připravený vzorek se poté analyzuje v průtokovém cytometru. Uvnitř cytometru je vzorek pod tlakem stříkán skrz trysku a je unášen nosnou kapalinou. Tímto mechanismem se docílí toho, že buňky jsou unášeny jedna za druhou jako korálky na niti k laseru. Laserový paprsek se od každé částice odrazí a rozptýlí. Částice značené fluorochromy vyřazují excitované světlo, které se vytvoří pomocí laserového paprsku. Pomocí excitovaného světla se získávají doty. Použitím různých monoklonálních protilátek s odlišnými fluorochromy se současně může vyšetřit přítomnost více antigenů. Každá buňka má dva optické parametry, které se měří pomocí dvou detektorů a nejméně dva parametry vyjadřující fluorescenci. Prvním detektorem měřící optické parametry je Side scatter, který měří odražené světlo, a druhý je Forward scatter, který měří rozptyl světla. Výsledné parametry se zaznamenávají ve formě matrice do počítače, který je pomocí softwaru převede do grafické formy (Bartůňková, 2011).

##### ***4.1.2 Grafické znázornění***

První formou zobrazení dat získaných z průtokového cytometru je histogram. Pomocí histogramu můžeme určit to jaké procento buněk je pozitivních pro určitý znak nebo jak

velká je intenzita fluorescence dané subpopulace. Druhou formou zobrazení jsou dvourozměrné grafy. Obvykle se používají bodové grafy neboli dot plot, kde je každá buňka zobrazena jedním bodem. Tento typ grafu se používá pro zkoumání interakce dvou znaků. Posledním typem používaným při analýze je trojrozměrné zobrazení. Užívá se při analýze tří a více parametrů, kdy si označíme vybranou skupinu buněk pomocí gatu. Poté se z gatu vytvoří další graf, který ukazuje ostatní znaky (Bartůňková, 2011).

#### ***4.1.3 Preanalytická fáze***

K analýze se používá celá krev odebraná do zkumavky s činidlem  $K_3EDTA$ . Vzorek by měl být dodán do laboratoře nejlépe do 5 hodin od odběru a stabilita vzorku při 20-25 °C jsou dva dny. Ke vzorku musí být přiložena řádně vyplněná žádanka pro průtokovou cytometrii s požadavkem pro vyšetření HLA-B27.

#### ***4.1.4 Analytické fáze***

##### ***DuraClone B27***

K přípravě vzorku pro HLA-B27 screening pomocí průtokové cytometrie jsem použila komerčně dodávaný set The DuraClone B27 a pro vlastní analýzu jsem používala průtokový cytometr od firmy Beckman Coulter typ Navios, který je na obrázku č.4.



Obr. 4 Průtokový cytometr Beckman Coulter typ Navios (zdroj: vlastní)

DuraClone B27 je určen k detekci HLA-B27 v lýzované krvi, proto se nedá použít k detekci HLA-B27 v tkáňové formě. Reakční směs DuraClone B27 obsahuje R- fykoerythrin (PE) značené protilátky proti lidskému HLA-B27, neznačené protilátky proti lidskému HLA-B7 a PE-Dyomics 649 značené protilátky proti lidskému CD3. Pomocí protilátek proti CD3 si označíme T-lymfocyty, protože bylo dokázáno, že tento předvýběr T-lymfocytů zvyšuje specifitu testu odstraněním pozadí od ostatních leukocytů. Protilátka proti HLA-B7 soutěží s protilátkou proti HLA-B27 o vazebné místo na antigenu HLA-B7. Pokud by v reakční směsi chyběla protilátka proti B7, mohlo by dojít k falešně pozitivnímu výsledku HLA-B27, protože dochází ke zkřížené reaktivitě HLA-B7 a HLA-B27.

- Materiály v setu DuraClone B27
- Sada reagensů DuraClone B27, reagenční činidlo DuraClone B27, DuraLyse
- Materiály mimo set DuraClone B27

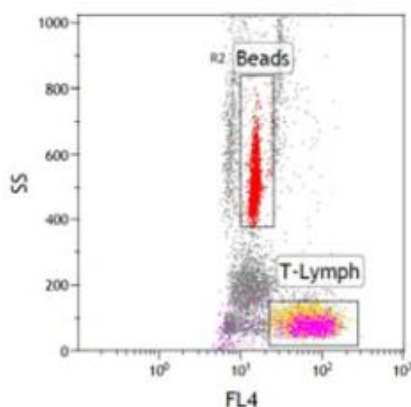
Zkumavka pro odběr krve s K<sub>3</sub>EDTA, kalibrované pipety, vortex, nosná tekutina, kalibrátory

### ***Postup přípravy***

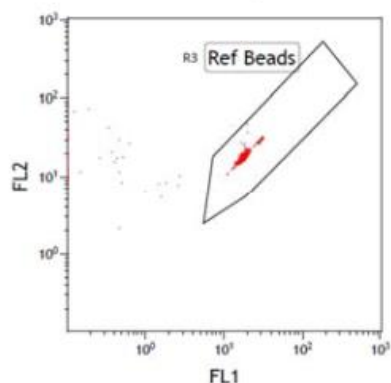
Vzorek krve ve zkumavce řádně promícháme a odebereme pipetou 25 µl krve a přidáme do jednorázové zkumavky s reagensů DuraClone B27. Zkumavku jemně promícháme, necháme inkubovat 25-30 minut při teplotě mezi 20-30 °C chráněnou před světlem. Poté do zkumavky přidáme 500 µl roztoku DuraLyse, vzorek protřepeme na laboratorní třepačce Vortex a necháme inkubovat ve tmě po dobu nejméně 15 minut. Takto připravený vzorek musíme analyzovat do 24 hodin a před vložením do průtokového cytometru musíme vzorek protřepat. Poté vzorky vložíme do karuselu a s ním do průtokového cytometru.

Na počítači otevřeme software určený pro cytometr Navios a spojíme s průtokovým cytometrem. Optické filtry jsou nastaveny na určitou vlnovou délku, a to u FL1 na 530 ±

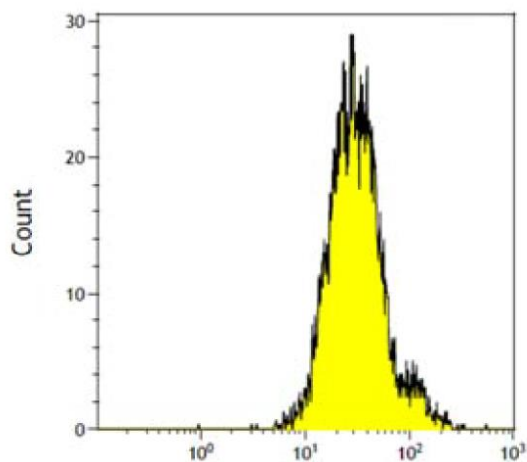
30 nm, FL2 na  $575 \pm 25$  nm, FL3 na  $620 \pm 25$  nm a FL4 na  $675 \pm 25$  nm. Dále musíme nastavit napětí FL1, FL2 a FL4. U FL1 a FL2 se mediánová fluorescenční intenzita (MdFI) nastaví na  $19 \pm 0,5$  a u FL4 se MdFI nastaví na  $15 \pm 0,5$ . Na obrázku č. 5 si prvním gatem označíme kontrolní kuličky a druhým gatem si označíme T-lymfocyty. Na obrázku č. 6 máme zagatované kontrolní kuličky. Na obrázku č. 7 vidíme histogram, kde je vyobrazena populace T-lymfocytů, která je HLA-B27 pozitivní. Obrázek č. 8 zobrazuje histogramy, kde jsou zagatované kalibrační kuličky na FL1, FL2 a FL4. Pro získání výsledku potřebujeme analyzovat nejméně 3000 kontrolních kuliček.



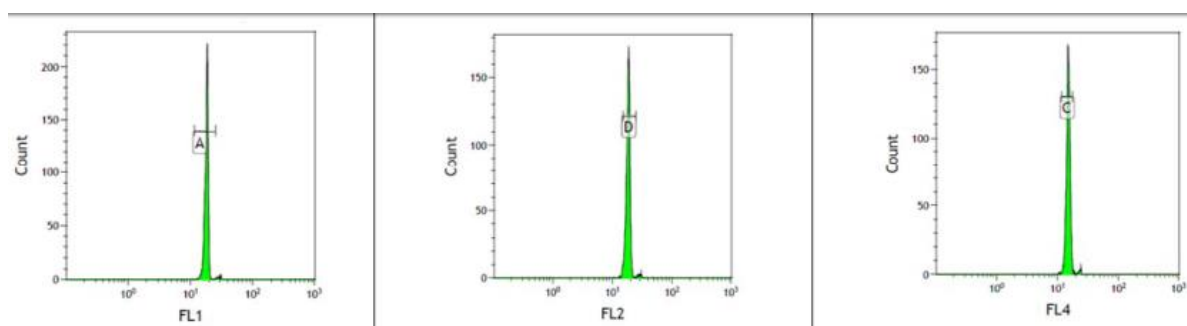
Obr. 5 FL4 vs. SS - zagatované T-lymfocyty a referenční kuličky (zdroj: příbalový leták DuraClone B27)



Obr. 6 FL1 vs. FL2 -zagatované referenční kuličky (zdroj: příbalový leták DuraClone B27)



Obr. 7 Histogram HLA-B27 pozitivních T-lymfocytů (zdroj: příbalový leták DuraClone B27)



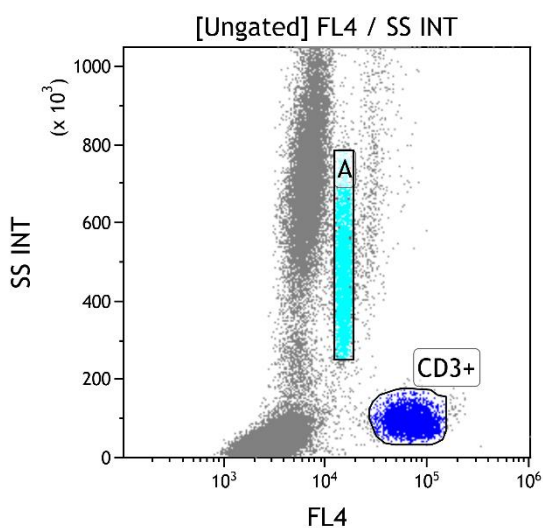
Obr. 8 Histogramy napětí na FL1, FL2 A FL4 (zdroj: příbalový leták DuraClone B27)

#### 4.1.5 Nález

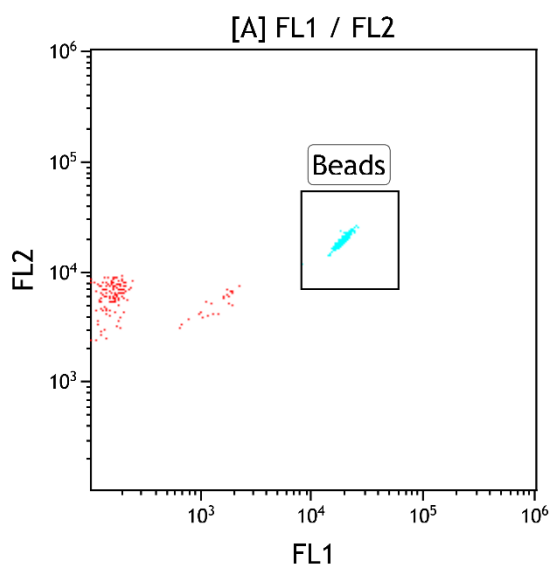
K vyhodnocení výsledku je nejdůležitější hodnota  $x$  – mediánu, podle které se hodnotí, zda je výsledek HLA-B27 pozitivní či negativní. Po analýze můžeme získat tři výsledky. Vzorek je HLA-B27 negativní, když hodnota  $x$ -mediánu je do 14. Druhou možností je, že vzorek se nachází v šedé zóně, což znamená, že výsledek není jednoznačný a hodnota  $x$ -mediánu se pohybuje mezi 15 a 23. Poslední možností je pozitivní výsledek, u kterého

se hodnota x-mediánu pohybuje nad 24. Jelikož se jedná pouze o screening, tak vzorky, které jsou pozitivní nebo se nachází v šedé zóně, se dále posílají k molekulárně – biologické analýze.

Na obrázcích č. 9, 10, 11 můžete vidět, jak vypadá negativní výsledek.

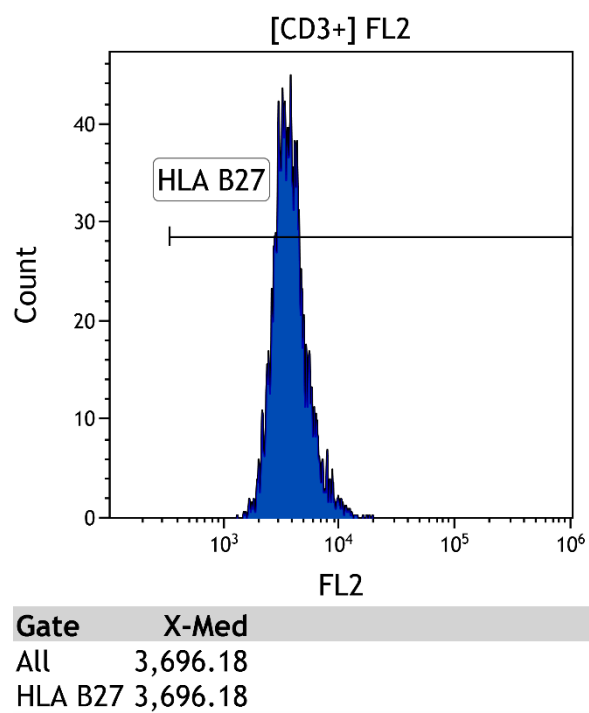


Obr. 9 FL4 vs. SS - negativní výsledek (zdroj: Imunologie ČB)



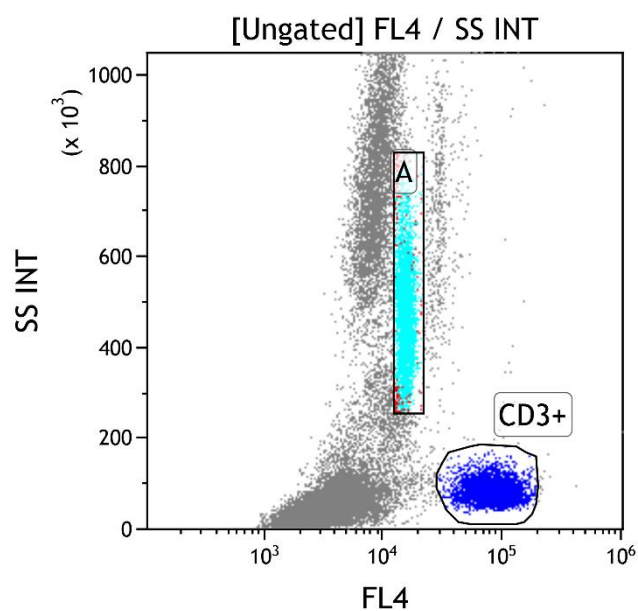
Gate	Number
All	3,366
Beads	3,223

Obr. 10 FL1 vs. FL2 - negativní výsledek (zdroj: Imunologie ČB)



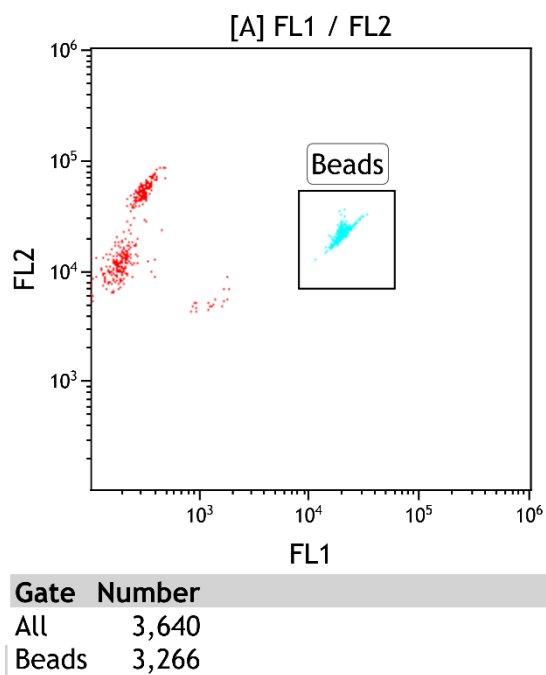
Obr. 11 HLA-B27 pozitivní T-ly-negativní výsledek (zdroj: Imunologie ČB)

Na obrázcích č. 12, 13,14 je výsledek, který je nejednoznačný.

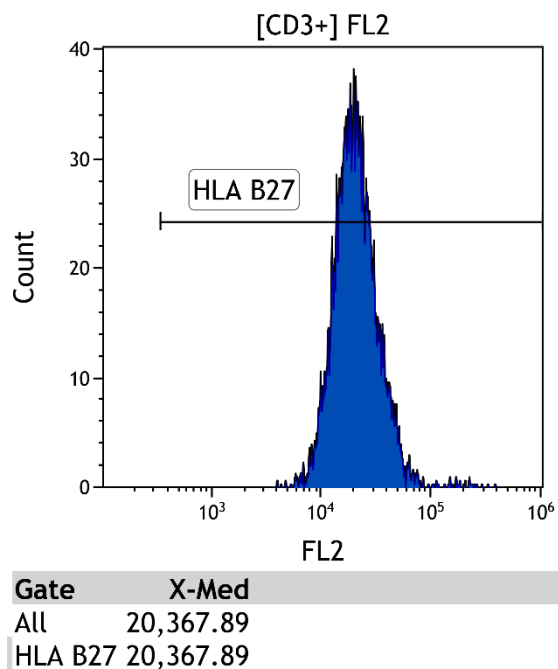




Obr. 12 FL4 vs. SS-nejednoznačný výsledek (zdroj: Imunologie ČB)

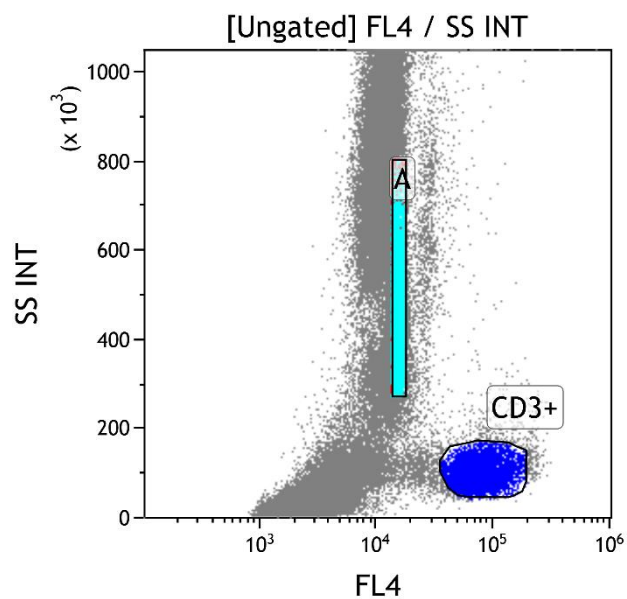


Obr. 13 FL1 vs. FL2-nejednoznačný výsledek (zdroj: Imunologie ČB)

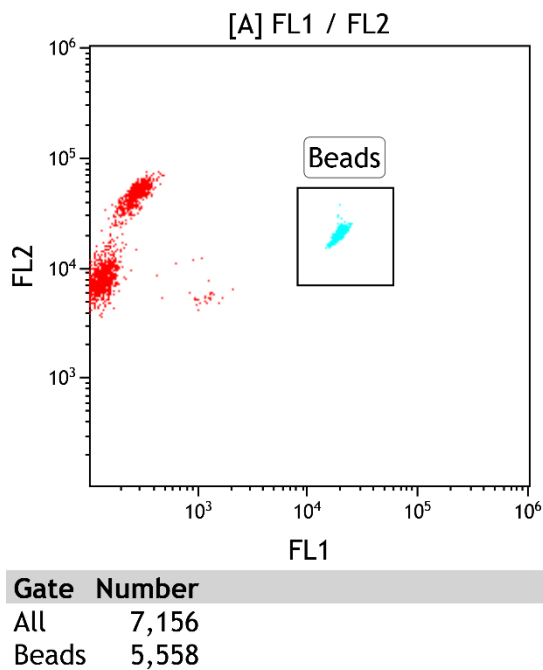


Obr. 14 HLA-B27 pozitivní T-ly-nejednoznačný výsledek (zdroj: Imunologie ČB)

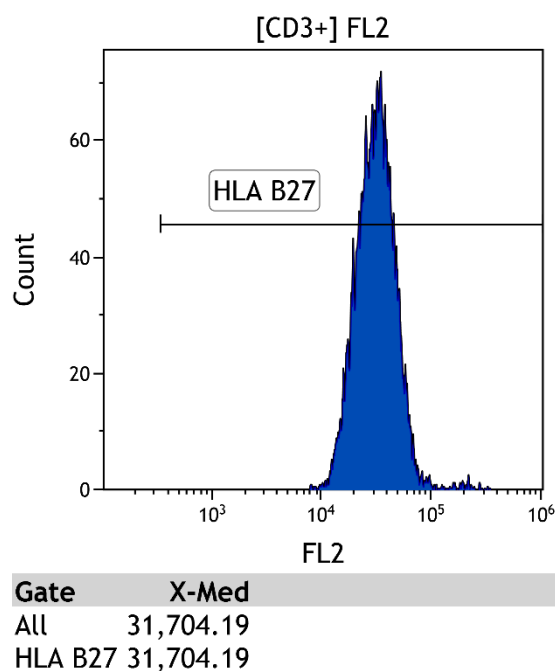
Na obrázcích č. 15,16,17 můžete vidět pozitivní výsledek.



Obr. 15 FL4 vs. SS-pozitivní výsledek (zdroj: Imunologie ČB)



Obr. 16 FL1 vs. FL2-pozitivní výsledek (zdroj: Imunologie ČB)



Obr. 17 HLA-B27 pozitivní T-ly-pozitivní výsledek (zdroj: Imunologie ČB)

## 4.2 Molekulárně-biologické metody

### 4.2.1 Stanovení rizikových alel HLA-B27 pomocí real-time PCR

Po screeningovém vyšetření pomocí průtokové cytometrie na Pracovišti imunologie Nemocnice České Budějovice se vzorek posílá do Laboratoře molekulární biologie a genetiky, pouze pokud je výsledek pozitivní anebo se nachází v šedé zóně. Zde se stanovují rizikové alely HLA-B27 metodou na principu real-time PCR.

#### **Odběr materiálu**

Jako materiál pro analýzu se používá nesrážlivá krev odebraná do zkumavek s přípravkem EDTA nebo citrátem. Transport probíhá při teplotě od 4°C do 10°C a nejpozději do tří dnů od odběru se vzorek musí zpracovat.

#### **Příprava vzorku a vyhodnocení**

Naizolovaná DNA přechází do fáze amplifikace. K této fázi si musíme připravit master mix, který se připravuje pro určitý počet vzorků plus jednu negativní a jednu pozitivní kontrolu. Dále vzorek přechází k vlastní amplifikaci, který probíhá na přístroji Light

Cycler® 480. Na přístroji Light Cycler® 480 se pomocí softwaru vyhodnocují i výsledky. Vyhodnocení výsledku se provádí pomocí melting analýzy. Pokud specifický bod tání sond ( $T_m$ ) je 56 °C, tak vzorek je negativní. Pokud je  $T_m$  64 °C, tak je vzorek pozitivní a rizikové alely jsou přítomné.

Mezi další molekulárně-biologické metody, které se používají k typizování HLA-B27, se řadí Sekvenčně-specifické typizování s použitím oligonukleotidových sond a metoda Sekvenčně-specifické primery (Bartůňková, 2011).

## **5 Stanovení hladiny CRP**

Ve většině laboratoří se hladina CRP stanovuje pomocí nefelometrie nebo turbidimetrie. Obě tyto metody jsou založeny na analýze přítomného zákalu. Já jsem při analýze využívala nefelometr, ale pro porovnání se zmíním i o turbidimetru (Bartůňková, 2011).

### ***5.1 Turbidimetrie***

Tato metoda využívá jako zdroj světla diodu a detektor se nachází přímo proti zdroji světla. Měření probíhá tak, že světlo ze zdroje prochází kyvetou se vzorkem a detektor měří úbytek světla, které neprojde kyvetou anebo se odrazí od zákalu (Bartůňková, 2011).

### ***5.2 Nefelometrie***

Jako zdroj světla pro tuto metodu využíváme výbojku nebo laser a detektor není na rozdíl od turbidimetrie naproti zdroji světla. Tento detektor je podle druhu nefelometru v různém úhlu od zdroje světla a měří intenzitu světla, které se odrazí od zákalu v kyvetě. Oproti turbidimetrii je nefelometrie citlivější a přesnější (Bartůňková, 2011)..

### ***5.3 Preanalytická fáze***

Jako primární vzorek se pro tuto metodu využívá srážlivá krev, která je odebraná do zkumavky s koagulačním médiem. Stabilita vzorku je 24 hodin při teplotě 20-25 °C nebo 2-3 dny při teplotě 2-8 °C. Pro vyšetření používáme sérum, které se po centrifugaci oddělí ze sražené krve a odebere se pomocí pipety do jiné zkumavky. Materiál musí být dodán do laboratoře s řádně vyplněnou žádankou.

### ***5.4 Analytická fáze***

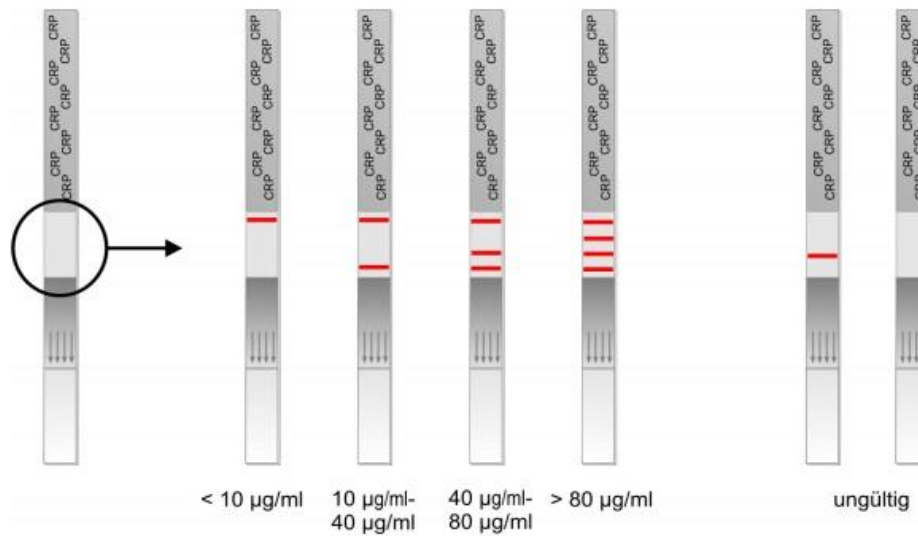
Nejprve musíme zhodnotit vzhled séra pomocí oka, protože odlišnosti mohou ovlivnit následnou analýzu vzorku. Rozlišujeme hemolytické sérum, lipemické sérum a ikterické sérum. Hemolytické sérum se vyznačuje červenou barvou, která vzniká hemolýzou erytrocytů při odběru, transportu nebo může být spojeno s nemocí nebo léčbou. Lipemické sérum neboli chylózní sérum se vyznačuje tím, že je bohaté na tuky, je nehomogenní a může ovlivňovat výsledky nefelometrie. Ikterické sérum se vyznačuje

výraznou žlutozelenou až žlutohnědou barvou, která je způsobena přítomností bilirubinu. Vyskytuje se u pacientů s onemocněním jater, žlučových cest nebo při zvýšeném rozpadu červených krvinek (Marek, 2002).

Po zhodnocení vzhledu vložíme sérum pacienta ve zkumavce do přístroje a přístroj začne měřit množství zákalu na principu nefelometrie.

### **5.5 CRP-test od firmy DOT®diagnostics**

Další metodou pro zjišťování CRP je CRP test od firmy DOT®diagnostics. Při tomto stanovení se využívají monoklonální protilátky proti lidskému CRP, které jsou navázané na červené částičky zlata, a jsou v zónách na membráně vyšetřovacího proužku. Tyto protilátky reagují s CRP v krvi pacienta. Tento test funguje na principu imunochromatografie. Proužek se ponoří do vzorku s pufrem a vzorek proniká skrz reakční zónu a CRP ze vzorku se váže s CRP-protilátkami na proužku za vzniku červených linií. Čím je vyšší hladina CRP v krvi pacienta, tím více červených linií se objeví. Na konci reakční zóny se musí vytvořit kontrolní linie. Pokud se neobjeví, tak je test neplatný. Odběr probíhá tak, že do kapiláry o objemu 10 $\mu$ l odebereme plnou krev z prstu (může se pracovat s plasmou i sérem). Krev z kapiláry se musí ihned přidat do zkumavky s pufrem a nechá se jednu minutu stát. Dále vyjmeme proužek z obalu a ponoříme na 20 s do zkumavky s pufrem a vzorkem. Proužek však nesmí být ponořen hlouběji, než je značka MAX, jinak by se proužek znehodnotil. Pokud je reakční zóna vlhká položíme proužek na vodorovnou podložku a výsledek odečítáme po 2-5 minutách. Kontrolní linie musí být vždy vidět. Na obrázku č. 18 můžeme vidět interpretaci výsledků. Poslední dva proužky jsou neplatné, jelikož se neobjevila kontrolní zóna.



Obr. 18 Interpretace CRP testu (Zdroj: Návod CRP)

## 5.6 Nález

U zdravého pacienta se hladina CRP pohybuje pod hranicí 2 mg/l. Při koncentraci do 8 mg/l předpokládáme, že u pacienta může probíhat nějaký mírný zánět, ať již endogenní nebo infekční – v druhém případě se může jednat např. o virovou infekci. Stejně diagnostické rozvahy platí pro rozmezí mezi 8-39 mg/l, které se nazývá šedá zóna. Pokud je koncentrace nad 40 mg/l, může se jednat o bakteriální infekci nebo o neinfekční chronický zánět (autoimunitní choroby, nádorová onemocnění) (Marek, 2002). U AS se koncentrace CRP pohybuje nad 15 mg/l a většinou je mnohem větší.

## **6 Rychlost sedimentace erytrocytů FW**

Tato metoda je jednou ze základních metod používaných v laboratorní diagnostice. Při určení rychlosti sedimentace erytrocytů se využívá gravitační síly, která v klidu přitahuje erytrocyty ke dnu zkumavky (Bartůňková, 2011).

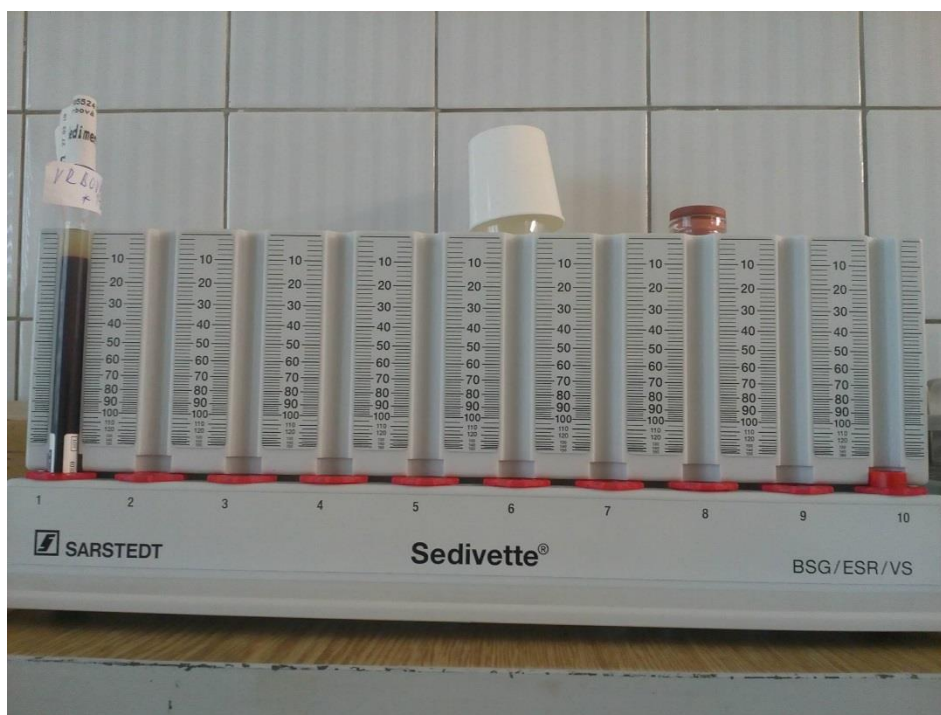
### ***6.1 Preamalytická fáze***

Krev se odebírá do speciální zkumavky S-Sedivette od výrobce Sarstedt s citrátem sodným, který zabrání srážení krve. Po odběru se musí zkumavka řádně promíchat, aby došlo k promíchání vzorku s antikoagulačním činidlem. Poté je potřeba co nejdříve dodat vzorek i s řádně vyplněnou žádankou.

### ***6.2 Analytická fáze***

Zkumavku promícháme a vložíme do připraveného stojanu, tak aby hladina ve zkumavce byla ve stejné úrovni jako první dílek měřítka na stojanu. Každý dílek na měřítku stojanu jsou dva milimetry. Poté necháme stát jednu hodinu. Po hodině zapíšeme počet milimetrů, o který erytrocyty klesly a opět necháme stát hodinu. Po dvou hodinách si zapíšeme opět hodnotu na měřítku. Poté hodnotíme. Stojan se zkumavkou můžeme vidět na obrázku č. 19 a č. 20.





Obr. 19 Stojan na sedimentaci se zkumavkou (zdroj: vlastní)



Obr. 20 Stojan na sedimentaci se zkumavkou a měřítkem (zdroj: vlastní)

### **6.3 Nález**

Hodnotíme obě získané hodnoty. Referenční mez pro ženy do 50 let je 3-8 mm za jednu hodinu a nad 50 let je 7-12 mm za jednu hodinu. U mužů do 50 let se referenční mez pohybuje mezi 2-5 mm za jednu hodinu a nad 50 let je to mezi 3-9 mm za jednu hodinu. Referenční mez pro druhou hodnotu získanou po dvou hodinách je u žen do 50 let 9-15 mm a nad 50 let 14-28 mm. U mužů je to pod 50 let 6-10 mm a nad 50 let 6-20 mm.

Zvýšená rychlost sedimentace erytrocytů odráží nespecificky přítomnost zánětu, a to jak infekčního, tak neinfekčního. U AS jsou hodnoty obvykle středně zvýšené až vysoké, tj. cca nad 20/40.

## Výsledky

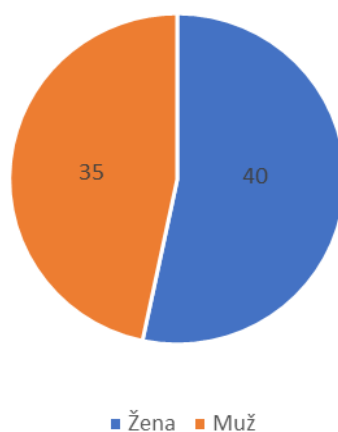
### 7 Zpracování dat

Data použitá v této části bakalářské práce pochází z Fakultní nemocnici v Motole z Ústavu imunologie 2. LF UK a FN Motol.

Za rok 2017 bylo vyšetřeno na marker HLA-B27 452 pacientů a z toho bylo 75 pozitivních, což je 16,6 % ze všech vyšetřených.

#### 7.1 Pohlaví HLA-B27 pozitivních pacientů

Z HLA-B27 pozitivních pacientů bylo 40 žen a 35 mužů, což je vidět na obrázku č. 21. Vyjádřeno procenty to odpovídá 53 % žen a 47 % mužů.



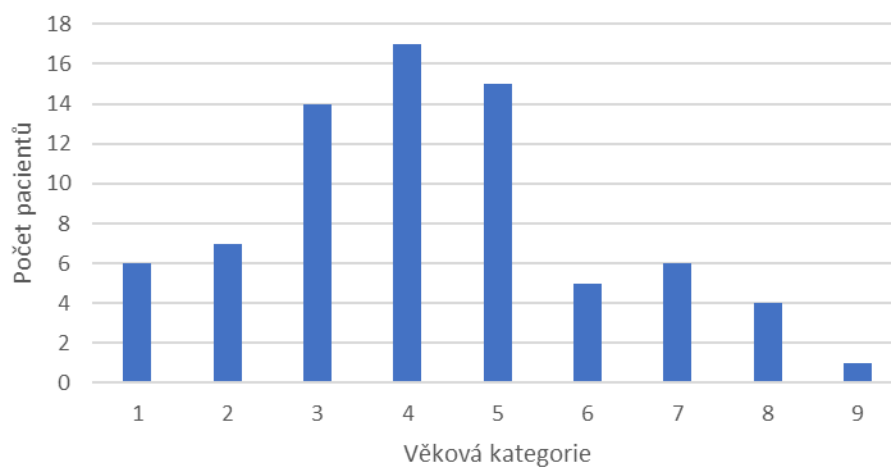
Obr. 21 Pohlaví HLA-B27 pozitivních pacientů (zdroj: vlastní)

#### 7.2 Věk HLA-B27 pozitivních pacientů

Nejmłodším pacientem byla žena ve věku 2 let a nejstarším pacientem byla žena ve věku 86 let. Průměrný věk HLA-B27 pozitivních pacientů je 38 let. HLA-B27 pozitivní pacienty jsem si rozdělila do věkových kategorií a následně vytvořila tabulku (tabulka č.1) a graf s počtem pacientů ve věkové kategorii.

Tab. 1 Počet pacientů ve věkové kategorii (zdroj: vlastní)

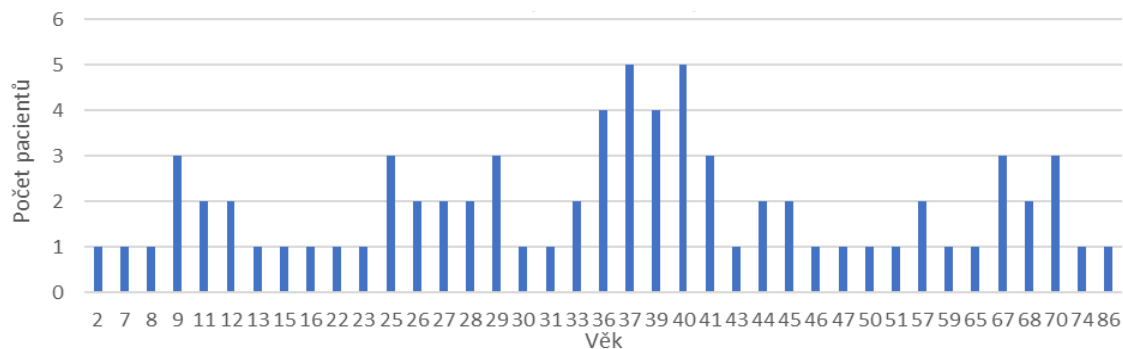
Věková kategorie	Věkové rozmezí	Počet pacientů
1.	0-9	6
2.	10-19	7
3.	20-29	14
4.	30-39	17
5.	40-49	15
6.	50-59	5
7.	60-69	6
8.	70-79	4
9.	80-89	1



Obr. 22 Počet pacientů ve věkové kategorii (zdroj: vlastní)

V tabulce č. 1 i na obrázku č. 22 vidíme, že nejvíce pacientů se nachází ve věkové skupině od 30 do 39 let, kde se nachází 17 pacientů. Dále jsou také početné skupiny ve věku od 20 do 29 a ve věku od 40 do 49 let.

Následující obrázek č. 23 ukazuje přesný počet pacientů v určitém věku.



Obr. 23 Věk HLA-B27 pozitivních pacientů (zdroj: vlastní)

### 7.3 Diagnózy pacientů

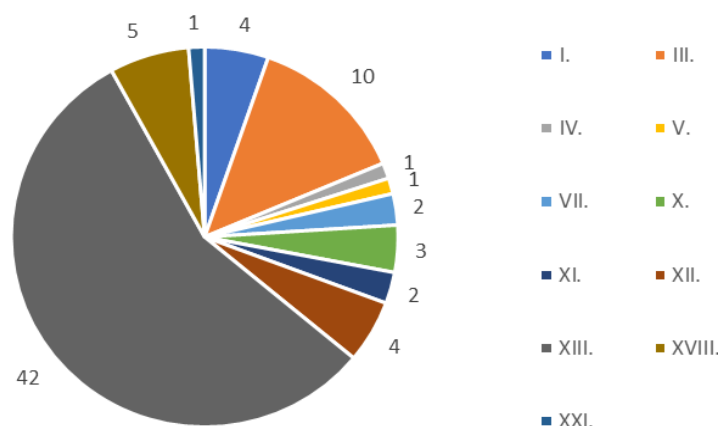
Dále jsem se zabývala diagnózou jednotlivých pacientů. Diagnózy se řadí do 22 skupin podle Mezinárodní klasifikace nemocí. V tabulce č.2 jsou uvedeny k jednotlivým skupinám názvy. Číselné diagnózy byly uvedeny na žádankách k vyšetření a nebyly dále ověřovány.

Tab. 2 Kapitoly diagnóz (zdroj: <http://www.uzis.cz/cz/mkn/index.html>)

I.	A00–B99	Některé infekční a parazitární nemoci
II.	C00–D48	Novotvary
III.	D50–D89	Nemoci krve, krevetvorných orgánů a některé poruchy týkající se mechanismu imunity
IV.	E00–E90	Nemoci endokrinní, výživy a přeměny látek
V.	F00–F99	Poruchy duševní a poruchy chování
VI.	G00–G99	Nemoci nervové soustavy
VII.	H00–H59	Nemoci oka a očních adnex
VIII.	H60–H95	Nemoci ucha a bradavkového výběžku
IX.	I00–I99	Nemoci oběhové soustavy
X.	J00–J99	Nemoci dýchací soustavy
XI.	K00–K93	Nemoci trávicí soustavy
XII.	L00–L99	Nemoci kůže a podkožního vaziva
XIII.	M00–M99	Nemoci svalové a kosterní soustavy a pojivové tkáně
XIV.	N00–N99	Nemoci močové a pohlavní soustavy
XV.	O00–O99	Těhotenství, porod a šestinedělí
XVI.	P00–P96	Některé stavy vzniklé v perinatálním období
XVII.	Q00–Q99	Vrozené vady, deformace a chromozomální abnormality
XVIII.	R00–R99	Příznaky, znaky a abnormální klinické a laboratorní nálezy nezařazené jinde
XIX.	S00–T98	Poranění, otravy a některé jiné následky vnějších příčin
XX.	V01–Y98	Vnější příčiny nemocnosti a úmrtnosti
XXI.	Z00–Z99	Faktory ovlivňující zdravotní stav a kontakt se zdravotnickými službami
XXII.	U00–U99	Kódy pro speciální účely

U HLA-B27 pozitivních pacientů převažovala skupina číslo XIII., do které se zahrnují nemoci svalové a kosterní soustavy a pojivové tkáně. Pacientů s diagnózou skupiny XIII.

bylo 56 %, a budu se jim věnovat až déle. Na obrázku č. 24 můžeme vidět počty pacientů s danou kapitolou diagnózy.



Obr. 24 Počet pacientů s danou skupinou diagnózy (zdroj: vlastní)

Druhou větší skupinou byli pacienti s diagnózami z kapitoly III., kteří trpí poruchami krvetvorby a imunitního systému. Jedním z případů byla devítiletá dvojčata, která byla vyšetřena pro zvýšenou nemocnost a zároveň bylo zjištěno, že v rodině se vyskytují autoimunitní onemocnění psoriáza a revmatoidní artritida. Nakonec byla dvojčatům přiřazena diagnóza jiné poruchy imunitních mechanismů nezařaditelné jinam. Dále pacienti s kapitolou III. měli diagnózy, jako jsou imunodeficience a poruchy mechanismů imunity.

U tří pacientů se bylo postiženo oko, u jednoho případu se objevila konjunktivitida (zánět spojivek), u druhého případu iridocyklitida (zánět duhovky a řasnatého tělíska) a u posledního pacienta byl diagnostikován diabetes mellitus I. typu s očními komplikacemi.

U pěti pacientů byla postižena kůže. U dvou případů byla diagnostikována alopecie, a pak vždy po jednom případě atopická dermatitida, psoriáza a parestezie kůže.

U čtyř pacientů byla postižena trávicí soustava, a to ve dvou případech uvedena neurčitá břišní bolest a ve zbývajících dvou nemoc žaludku a dvanáctníku.

### ***7.3.1 Diagnózy u pacientů do věku 18 let***

Většina dětí a mladistvých do věku 18 let byla vyšetřena na základě rodinné anamnézy a celkem jich bylo pozitivních 13. U 5 pacientů do 18 let byla diagnóza označena jako jiné poruchy mechanismů imunity nezařaditelné jinam. Ve 2 případech se objevila alergie. V prvním případě byla ve formě alergické purpury a ve druhém případě ve formě alergické rýmy způsobené pylem. Dále se také objevila diagnóza juvenilní revmatické artritidy, a to ve dvou případech. U prvního pacienta byl postižen kotník a noha pod ním a druhého pacienta se našly mnohočetné lokalizace. Dále dva pacienti trpěli bolestmi kloubu. Poslední dva případy byly diagnostikovány jako pika kojenců a dětí a neurčitá bolest břicha. Ostatní HLA-B27 pozitivní pacienti se našli náhodně při vyšetření jiných chorob.

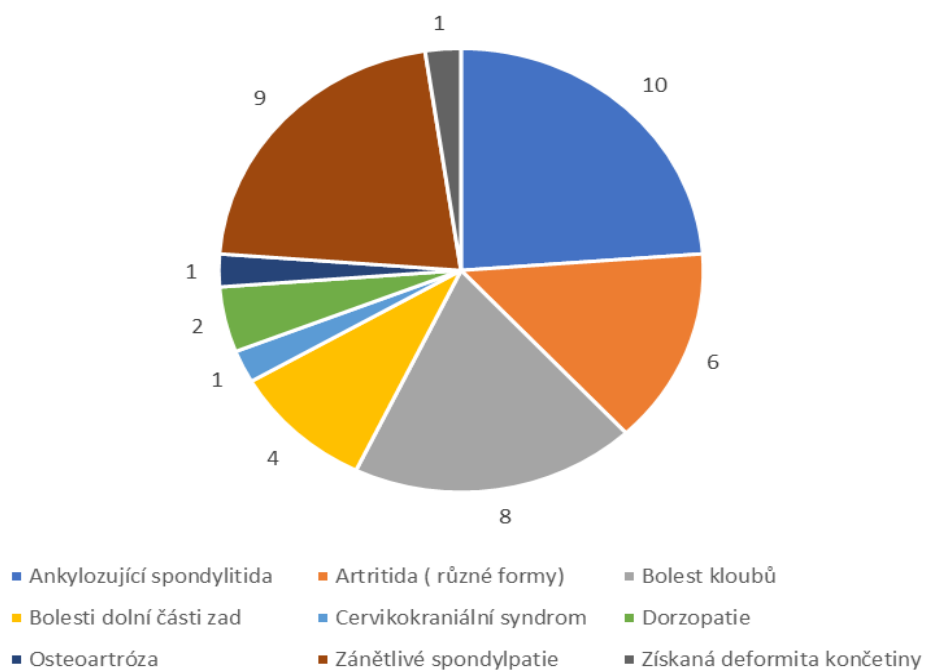
### ***7.3.2 Pacienti s diagnózou z kapitoly XIII.***

Dále jsem zkoumala pouze pacienty s diagnózou z kapitoly XIII. Pacienty jsem zařadila do devíti skupin podle typu diagnózy, které jsou uvedené v tabulce č. 3.



Tab. 3 Počet pacientů s diagnózami z kapitoly XIII. (zdroj: vlastní)

Diagnóza	Počet pacientů
Ankylozující spondylitida	10
Artritida (různé formy)	6
Bolesti dolní části zad	4
Bolest kloubů	8
Cervikokraniální syndrom	1
Dorzopatie	2
Osteoartróza	1
Zánětlivé spondylopatie	9
Získaná deformita končetiny	1



Obr. 25 Počet pacientů s diagnózou z kapitoly XIII. (zdroj: vlastní)

Z tabulky č. 3 a obrázku č. 25 je vidět, že nejvíce pacientů HLA-B27 pozitivních trpí AS. Další početnou skupinou jsou pacienti se zánětlivou spondylitidou a s bolestmi kloubů.

Pacientů s artritidou bylo celkem šest, z toho dva pacienti trpí juvenilní revmatoidní artritidou, a pak vždy po jednom případě se objevují diagnózy jako reakční artropatie, séronegativní revmatická artritida, revmatická artritida a monoartritida.

Celkem osm pacientů trpí bolestmi kloubů, z toho šest pacientů má mnohočetné lokalizace, jeden pacient má bolesti kloubů v oblasti hlavy, krku a trupu a u posledního pacienta lokalizace bolesti není určena. Další skupinou diagnóz jsou zánětlivé spondylopatie, které byly diagnostikovány celkem u devíti pacientů. Z toho pět pacientů mělo mnohočetné lokalizace, u tří pacientů lokalizace nebyla určena a jeden pacient měl zánětlivou spondylopatii v křížové a křížovo-kostrční oblasti páteře.

U čtyř pacientů se vyskytovala bolest dolní části zad, a z toho u dvou případů pacienti měli mnohočetné poškození páteře, v jednom případě byla postižena bederní oblast páteře a v posledním případě byla bolest zad spojena s polymyozitidou.

Ve dvou případech pacienti trpěli dorzopatií, v první případě se jednalo o postižení krčňehrudní oblasti zad a u druhého pacienta bylo postižení v bederní oblasti zad.

Dále se objevily i diagnózy jako je cervikokraniální syndrom, osteoartróza a získaná deformita končetiny.

Poslední a největší skupinou jsou pacienti s ankylozující spondylitidou. Pacientů s touto diagnózou bylo celkem deset. Z tohoto množství bylo u osmi pacientů nalezeno mnohočetné poškození páteře, u jednoho postižení v bederní oblasti páteře a u posledního pacienta nebyla určena lokalizace.

Dále jsem vyhodnotila pohlaví a věk u pacientů s AS. Z deseti pacientů, kteří mají diagnostikovanou AS, je sedm mužů a tři ženy, což potvrzuje, že většina pacientů s AS jsou muži. Dále se věk pacientů pohybuje v rozmezí od 25 do 41 let a jednomu pacientovi je 70 let. Toto věkové rozmezí také potvrzuje tvrzení, že první příznaky se projevují v rozmezí přibližně od 20 do 40 let

Uvedené výsledky potvrzují klasické asociace positivity HLA B27 se známými diagnózami, ale v řadě případů pravděpodobně přispívají k diagnostickému směřování u

dosud nevyhraněných příznaků, jako jsou bolesti zad. U řady pacientů zejména dětských byla nalezena pozitivita na základě rodinné anamnézy, přičemž pacienti zatím netrpěli klasickými chorobami asociovanými s HLA-B27.

## Diskuze

V mé bakalářské práci jsem se věnovala problematice Bechtěrevovy choroby a laboratorním metodám, které slouží k její diagnostice. Při psaní teoretické části jsem se setkala s podstatným problémem, což byl nedostatek literárních zdrojů. Nedohledala jsem žádnou odbornou publikaci, která by se věnovala pouze Bechtěrevově chorobě. Existují pouze publikace, v kterých nalezneme ve většině případů pouze jednu kapitolu, která se zabývá Bechtěrevovou chorobou. I přesto jsem si s tímto problémem dokázala poradit a napsala jsem obsáhlou rešerši na téma Bechtěrevova choroba.

Dalším problémem bylo najít publikaci, kde by byla popsána přímo molekula HLA-B27. Ve většině zdrojů jsem našla pouze obecná fakta o HLA-komplexu.

Při psaní této bakalářské práce mě zaujalo, že i když touto chorobou trpí téměř 0,5 % populace, není mezi lidmi moc známá. Ve většině případů Bechtěrevovu chorobu znají pouze ti, kteří jsou postiženi touto chorobou a nebo mají v příbuzenstvu člověka trpícího touto chorobou.

V praktické části jsem se věnovala laboratorním metodám, které se používají při diagnostice Bechtěrevovy choroby. S metodami jsem se seznámila prakticky a nebo teoreticky.

První metodou byl screeningový test HLA-B27 pomocí průtokové cytometrie, který jsem si vyzkoušela na Pracovišti Imunologie v Nemocnici v Českých Budějovicích. Vyzkoušela jsem si analýzu a následné vyhodnocení výsledků. Dále jsem v práci použila data získaná průtokovým cytometrem. Porovnála jsem tři výsledky z průtokového cytometru, kde jeden byl negativní, druhý se nacházel v šedé zóně a poslední byl pozitivní. Pozitivní vzorek a vzorek, který se nachází v šedé zóně se dále posílají do Laboratoře molekulární biologie a genetiky k dourčení.

Druhou metodou, které jsem se věnovala, byla metoda stanovení rizikových alel HLA-B27 pomocí real-time PCR. S touto metodou jsem byla teoreticky seznámena. Pomocí této metody se potvrzuje nebo vyvrací stanovisko pozitivního vzorku a určuje se pozitivita nebo negativita vzorku v šedé zóně po screeningovém testu.

Další metodou bylo stanovení hladiny CRP. Též jsem byla s metodou seznámena teoreticky. Zaujala mě metoda stanovení hladiny CRP pomocí testovacích proužků, jelikož k tomuto stanovení potřebujeme pouze kapku krve.

Poslední metodou, kterou jsem si prakticky vyzkoušela v Nemocnici Tábor, bylo stanovení rychlosti sedimentace erytrocytů.

V závěru mé bakalářské práce jsem zpracovala data, která jsem získala z Fakultní nemocnici v Motole z Ústavu imunologie 2. LF UK a FN Motol. Porovnávala jsem pohlaví, věk a diagnózy pacientů, kteří byli HLA-B27 pozitivní. Překvapilo mě, že se mezi HLA-B27 pozitivními pacienty objevilo mnoho těch, kteří nebyli starší osmnácti let. Jejich vyšetření bylo však indikováno většinou na základě rodinné anamnézy anebo trpěli některými juvenilními formami kloubního postižení.

Moje první hypotéza zněla: Mezi pacienty s diagnostikovanou Bechtěrevovou chorobou budou převažovat muži. Tato hypotéza se potvrdila, jelikož z deseti pacientů bylo sedm mužů a tři ženy. Ovšem je možné, že výsledky mohly být zkreslené, jelikož pacientů s Bechtěrevovou chorobou bylo méně, než jsem původně čekala. To je však dáno tím, že pokud je již pacient jednou diagnostikován jako Bechtěrevova choroba, opakovat vyšetření HLA B27 ztrácí smysl. Proto je častěji na žádankách uvedena diagnóza bolestí zad, kloubů, očních nebo střevních zánětů nebo jiných nezařazených syndromů, neboť v této době právě ošetřující lékaři indikují toto vyšetření, aby se ke správné diagnóze dospělo.

Druhá moje hypotéza zněla: Věk pacientů s Bechtěrevovou chorobou se bude pohybovat v rozmezí od 20 do 40 let. Všichni pacienti kromě jednoho se do této věkové skupiny vešli. Pacientovi, který byl věkově mimo tuto skupinu, bylo 71 let. Jednou z možností je, že pozitivní nález molekuly HLA-B27 byl u tohoto pacienta již dříve a šlo pouze o kontrolní vyšetření.

Cílem mé bakalářské práce bylo napsat rešerši na téma Bechtěrevovy choroby, dále se seznámit s laboratorními metodami, které se používají v diagnostice Bechtěrevovy choroby a na závěr zpracovat a vyhodnotit data získaná z Fakultní nemocnici v Motole z Ústavu imunologie 2. LF UK a FN Motol Domnívám se, že všechny cíle jsem splnila.

## **Závěr**

Bechtěrevova choroba je chronické autoimunitní zánětlivé onemocnění, které propuká u mladých pacientů. Diagnóza této choroby je značně problematická a přihlíží se při ní k různým kritériím. Mezi tyto kritéria patří mimo jiné i přítomnost molekuly HLA-B27, která je nejdůležitějším laboratorním kritériem.

Cílem teoretické části bylo shrnout aktuální poznatky o Bechtěrevově chorobě. Nejprve jsem definovala onemocnění, poté jsem se zmínila o historické vývoji poznatků o AS. Dále jsem podrobně rozebrala projevy nemoci a léčbu, která je i v dnešní době složitá. Druhé části teorie jsem se zaměřila na HLA-komplex, CRP a sedimentaci erytrocytů. V kapitole HLA-systém jsem rozebrala strukturu a prezentaci antigenů pomocí HLA molekul I. třídy. Poté jsem se zaměřila na molekulu HLA-B27. Na závěr teoretické části jsem se zmínila o C-reaktivním proteinu a rychlosti sedimentace erytrocytů.

Cílem praktické části bylo seznámit se s laboratorními metodami, které se používají k diagnostice Bechtěrevovy choroby, a poté vytvořit statistiku z dat získaných z Fakultní nemocnici v Motole z Ústavu imunologie 2. LF UK a FN Motol. Mezi metody, se kterými jsem se seznámila, patří screening molekuly HLA-B27 pomocí průtokové cytometrie, stanovení rizikových alel HLA-B27 pomocí metody real-time PCR, stanovení hladiny CRP a jako poslední rychlost sedimentace erytrocytů. Na závěr mé bakalářské práce jsem vytvořila statistiku, ve které jsem pracovala pouze s HLA-B27 pozitivními pacienty. Vytvořila jsem grafy a tabulky, ve kterých jsem se zabývala pohlavím, věkem a diagnózami pacientů. Výsledky potvrzují ve většině případů asociaci HLA B27 buď přímo s Bechtěrevovou chorobou anebo častěji s příznaky, pro které vzniká podezření na tuto chorobu, a proto jsou pacienti k tomuto vyšetření indikováni.

## Použité zdroje

1. FERENČÍK, Miroslav, J. Rovenský, Y. Shoenfeld, V. Mařha, 2004. *Imunitní systém: Informace pro každého*. Praha: Grada Publishing, 117. ISBN 80-247-1196-6.
2. PAVELKA, Karel a Jozef ROVENSKÝ, 2003. *Klinická revmatologie*. Praha: Galén. ISBN 80-7262-174-2.
3. ČEŠKA, R., TESAŘ, V., DÍTĚ, P., ŠTULC, T. *Interna*. 1. vyd. Praha: Triton, 2010. ISBN 9788073874230.
4. FOREJTOVÁ, Šárka, 2009. Diagnostika a léčba spondylartritid. *Medicína pro praxi*. Olomouc: Solen, 6(1), [30]-33. ISBN - 1803-5310
5. BRAUN, J., SIEPER, J. Ankylosing spondylitis. *The Lancet*, 2007, 369:1379–90. ISSN 0140-6736
6. SIEPER J., BRAUN. J, RUDWALEIT M. 2002. Ankylosing spondylitis: an overview. *Annals of the Rheumatic Diseases*. Vol 61 suppl 3. ISBN - 1468-2060
7. SHOENFELD, Yehuda, Terezie FUČÍKOVÁ a Jiřina BARTŮŇKOVÁ, 2007. *Autoimunita: vnitřní nepřítel*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-2044-9.
8. KLENER, Pavel a Karel PAVELKA, 2002. *Vnitřní lékařství*. Praha: Galén. Scripta. ISBN 80-7262-145-9.
9. ROKYTA, R. 2000. *Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech*. Praha: ISV. 62 p. Lékařství. ISBN 80-85866-45-5.
10. TROJAN, S., LANGMEIER, M., HRACHOVINA, V., KITTNAR, O., KOUDELOVÁ, J., KUTHAN, V., MAREŠ, J., MAREŠOVÁ, D., MOUREK J., POKORNÝ, J., SEDLÁČEK, J., SCHREIBER, M., et al., 2003. *Lékařská fyziologie*. 4. vyd.. Praha: Grada. ISBN 80-247-0512-5.



11. KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ, 2004. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK. ISBN 80-86225-50-X.
12. MATEIČKA, František, S. BLAŽÍČKOVÁ a Vladimír BOŠÁK, 2004. *Imunológia pre posluchačov FZSP*. 1. vyd. Bratislava: Slovak Academic Press. ISBN 80-89104-40-1.
13. FUČÍKOVÁ, Tereza, 1997. *Klinická imunologie v praxi*, 2.vyd. Praha: Galén. ISBN 80-85824-57-4.
14. TESAŘOVÁ, E. PENKA M., 2012. *Hematologie a transfúzní lékařství II*, Praha: Grada, ISBN 978-80-247-3460-6.
15. HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK, 2017. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7553-250-3.
16. MAREK, Jiří, 2002. CRP-Významný pomocník při volbě antibiotik. *Pediatric pro praxi*. Olomouc: Solen, 1, [31]-32. ISSN - 1213-0494
17. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK, 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 9788024735337.
18. DuraClone B27 Reagent Kit – příbalový leták [online] [cit. 2018-23-3] Dostupné z: < <https://www.bc-cytometry.com/PDF/DataSheet/B36862DS.pdf> >
19. Příloha č.3 laboratorní příručky LKCHI, Seznam laboratorních vyšetření PIMU Centrální laboratoře, LKCHI – Pracoviště imunologie [online] [cit. 2018-23-3] Dostupné z: < [http://www.nemcb.cz/upload/files/laboratore/lkchi/NCB\\_LKCHI\\_SME\\_15\\_001\\_Priloha\\_c\\_3\\_C\\_LP\\_Seznam\\_laboratornich\\_vysetreni\\_PIMU.pdf](http://www.nemcb.cz/upload/files/laboratore/lkchi/NCB_LKCHI_SME_15_001_Priloha_c_3_C_LP_Seznam_laboratornich_vysetreni_PIMU.pdf) >
20. KRYŠTŮFKOVÁ, O. *Detekce HLA-B27*, Přednáška 2017

21. Laboratorní příručka Stanice klinické biochemie a hematologie a krevní banky Nemocnice Tábor [online] [cit. 2018-23-3] Dostupné z: < <https://www.nemta.cz/wp-content/uploads/2014/11/Laboratorn%C3%ADp%C5%99%C3%ADru%C4%8Dka-SKBH-a-KB.pdf> >
22. NOVOTA, P. *Detekce HLA-B27 metodou přímého sekvenování DNA*, Přednáška 2016 [online] [cit. 2018-23-3] Dostupné z: < [https://www.uhkt.cz/laboratore/kontroly-kvality/sub\\_article\\_1/peter-novota\\_detekce-hla-b27-metodou-primeho-sekvenovani-dna.pdf/view](https://www.uhkt.cz/laboratore/kontroly-kvality/sub_article_1/peter-novota_detekce-hla-b27-metodou-primeho-sekvenovani-dna.pdf/view) >
23. Mezinárodní statistická klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů [online] [cit. 2018-23-3] Dostupné z: < <http://www.uzis.cz/cz/mkn/index.html> >
24. Stanovení rizikových alel HLA-B27 metodou Real time PCR, Nemocnice České Budějovice, Laboratoř molekulární biologie a genetiky – návod k použití
25. CRP test od firmy DOT@diagnostics – návod k použití [online] [cit. 2018-23-3] Dostupné z: < [http://www.quickseal.eu/img/N\\_\\_vod\\_CRP\\_\\_\\_prou\\_\\_ek.pdf](http://www.quickseal.eu/img/N__vod_CRP___prou__ek.pdf) >
26. Michael T. SEIPP, Maria ERALI, Rae Lynn WIES, Carl WITTEWER, 2005. HLA-B27 Typing: Evaluation of an Allele-Specific PCR Melting Assay and Two Flow Cytometric Antigen Assays. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 63B:10–15. [online] [cit. 2018-23-3] Dostupné z: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cyto.b.20039> >
27. BOULTWOOD J., 1997. *Gene isolation and mapping protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press. ISBN: 0-89603-482-8
28. KRÁLOVÁ B., FUKAL L., RAUCH P., RUML T., 2008. *Bioanalytické metody*. 3.vydání. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha. ISBN: 80-7080-449-1
29. Laboratorní příručka Laboratoře molekulární biologie a genetiky Nemocnice České Budějovice [online] [cit. 2018-23-3] Dostupné z: <

[http://www.nemcb.cz/upload/files/NCB\\_LMBG\\_SME\\_12\\_001\\_F\\_Laboratori\\_p\\_\\_iru\\_\\_ka\\_LMBG.pdf](http://www.nemcb.cz/upload/files/NCB_LMBG_SME_12_001_F_Laboratori_p__iru__ka_LMBG.pdf) >

30. Beth LINGENFELTER, Thomas C. FULLER, L e a h HARTUNG, Jay HUNTER, Carl WITTWER, 1995. HLA-B27 Screening by Flow Cytometry. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 22:146-149 [online] [cit. 2018-23-3] Dostupné z: <  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cyto.990220211>>
31. KRALOVICOVA, J., et al. Frekvencia antigénov HLA-A, -B, -Cw v Slovenskej populácii.. Bratislava: Bratislavské lék. Listy, 2000

## Seznam obrázků

Obr. 1 Průběh AS během 26 let (zdroj: Kryštůfková, 2017).....	18
Obr. 2 Genový komplex HLA (zdroj: Bartůňková, 2011) .....	24
Obr. 3 Porovnání struktury HLA I. a HLA II. Třídy (zdroj: Bartůňková, 2011) .....	28
Obr. 4 Průtokový cytometr Beckman Coulter typ Navios (zdroj: vlastní).....	35
Obr. 5 FL4 vs. SS - zagatované T-lymfocyty a referenční kuličky (zdroj: příbalový leták DuraClone B27) .....	37
Obr. 6 FL1 vs. FL2 -zagatované referenční kuličky (zdroj: příbalový leták DuraClone B27) ...	37
Obr. 7 Histogram HLA-B27 pozitivních T-lymfocytů (zdroj: příbalový leták DuraClone B27)	38
Obr. 8 Histogramy napětí na FL1, FL2 A FL4 (zdroj: příbalový leták DuraClone B27) .....	38
Obr. 9 FL4 vs. SS - negativní výsledek (zdroj: Imunologie ČB).....	39
Obr. 10 FL1 vs. FL2 - negativní výsledek (zdroj: Imunologie ČB).....	40
Obr. 11 HLA-B27 pozitivní T-ly-negativní výsledek (zdroj: Imunologie ČB) .....	40
Obr. 12 FL4 vs. SS-nejednoznačný výsledek (zdroj: Imunologie ČB).....	41
Obr. 13 FL1 vs. FL2-nejednoznačný výsledek (zdroj: Imunologie ČB).....	41
Obr. 14 HLA-B27 pozitivní T-ly-nejednoznačný výsledek (zdroj: Imunologie ČB) .....	41
Obr. 15 FL4 vs. SS-pozitivní výsledek (zdroj: Imunologie ČB) .....	42
Obr. 16 FL1 vs. FL2-pozitivní výsledek (zdroj: Imunologie ČB) .....	42
Obr. 17 HLA-B27 pozitivní T-ly-pozitivní výsledek (zdroj: Imunologie ČB).....	43
Obr. 18 Interpretace CRP testu (Zdroj: Návod CRP).....	47
Obr. 19 Stojan na sedimentaci se zkumavkou (zdroj: vlastní) .....	49
Obr. 20 Stojan na sedimentaci se zkumavkou a měřítkem (zdroj: vlastní) .....	49
Obr. 21 Pohlaví HLA-B27 pozitivních pacientů (zdroj: vlastní) .....	51
Obr. 22 Počet pacientů ve věkové kategorii (zdroj: vlastní) .....	52
Obr. 23 Věk HLA-B27 pozitivních pacientů (zdroj: vlastní).....	53
Obr. 24 Počet pacientů s danou skupinou diagnózy (zdroj: vlastní).....	55
Obr. 25 Počet pacientů s diagnózou z kapitoly XIII. (zdroj: vlastní).....	57

## Seznam tabulek

Tab. 1 Počet pacientů ve věkové kategorii (zdroj: vlastní) .....	52
Tab. 2 Kapitoly diagnóz (zdroj: <a href="http://www.uzis.cz/cz/mkn/index.html">http://www.uzis.cz/cz/mkn/index.html</a> ) .....	54
Tab. 3 Počet pacientů s diagnózami z kapitoly XIII. (zdroj: vlastní).....	57

## Seznam použitých zkratk

AS – Ankylozující spondylitida  
Ca<sup>2+</sup> - vápenaté ionty  
CRP – C-reaktivní protein  
DNA – deoxyribonukleová kyselina  
ER – endoplazmatické retikulum  
fMLP - N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine  
FW – rychlost sedimentace erytrocytů  
HLA - Human Leukocyte Antigen  
IL-10 – interleukin-10  
IL-6 - interleukin-10  
IL-8 - interleukin-8  
LMP2 – Latent Membrane Protein 2  
LMP7 – Latent Membrane Protein 7  
LP – Leader Protein  
MAC – membrane attack *complex*  
MHC – Major Histocompatibility Complex  
MR – Magnetická rezonance  
mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina  
NSA – Nesteroidní antirevmatika  
RA – Revmatoidní artritida  
RNA – ribonukleová kyselina  
TAP1 – Antigen peptide transporter 1  
TAP2 – Antigen peptide transporter 2  
Tc – cytotoxický T-lymfocyt  
TCR  $\alpha$ ,  $\beta$  – T-buněčný receptor  
TGF $\beta$  – *transforming growth factor*  $\beta$   
Th – pomocný T-lymfocyt  
MdFI - Median Fluorescence Intensity

SS – Side Scater