



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

**Stanovení výskytu alely HLA-B\*27 v české populaci a její význam pro diagnostiku Bechtěrevovy choroby**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program:

**SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ**

**Autor:** Veronika Sailerová

**Vedoucí práce:** Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D.

České Budějovice 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Stanovení výskytu alely HLA-B\*27 v české populaci a její význam pro diagnostiku Bechtěrevovy choroby“ jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 28.05.2020

.....

podpis

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za odborné vedení, čas a rovněž umožnění provedení mé praktické části bakalářské práce v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině, která mi byla po celou délku studia oporou.

# **Stanovení výskytu alely HLA-B\*27 v české populaci a její význam pro diagnostiku Bechtěrevovy choroby**

## **Abstrakt**

Bechtěrevova choroba, nebo také ankylozující spondylitida, je chronické a celoživotní onemocnění, kterým trpí třikrát častěji muži než ženy. První příznaky se většinou objeví mezi 15 a 30 lety. Postiženy jsou vazy, kloubní pouzdra, šlachy, spoje mezi obratli, žebry apod. Toto onemocnění je s postupem času provázeno záněty, které omezují hybnost páteře, hrudníku a snižováním dechové kapacity plic. Bechtěrevova choroba byla popisována již v historii, ale svůj název získala roku 1893 po ruském neurologovi Vladimíru Bechtěrevovi. Přesná příčina této nemoci není dosud zcela objasněna. V praktické části mé bakalářské práce, která byla prováděna v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích pod vedením Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D, bylo cílem především zvládnutí správné laboratorní praxe a základních metod molekulární biologie zahrnujících izolaci DNA, metodu PCR a gelovou elektroforézu. Pro stanovení rizikové alely HLA-B\*27 byl použit diagnostický komerční kit HISTO TYPE B27 low (BAG Health Care GmbH) využívající metodu end-point PCR

Má bakalářská práce obsahuje informace o Bechtěrevově chorobě (BC), její historii, symptomech, patogenезi, dědičnosti apod. Dále jsou shrnuty informace o HLA molekulách a zejména alele HLA-B\*27, která zásadně souvisí s tímto onemocněním a ovlivňuje tedy i jeho výskyt v populaci. U osob s alelou HLA-B\*27 je pravděpodobnost onemocnění až 300krát vyšší ve srovnání s jedinci, u kterých se tato alela nevyskytuje. Prokázaná přítomnost alely HLA-B\*27 však neznamená, že bude jedinec Bechtěrevovou nemocí postižen, jedná se pouze o zvýšené riziko. Existují totiž i subtypy jako jsou HLA-B\*27:06 a HLA-B\*27:09, které pravděpodobně vůbec s touto nemocí nesouvisejí.

## **Klíčová slova**

Bechtěrevova choroba /AS; HLA molekuly; alela HLA-B\*27; PCR reakce

# **Determination of HLA-B\*27 allelen in the Cyeck population and its importace for the diagnosis of Bechterew's dinase**

## **Abstract**

Bechterew's disease, also known as the ankylosing spondylitis, is a chronic lifelong disease, which is three times more likely to affect men than women. The first symptoms usually appear between 15 and 30 year of age. It affects ligaments, joint capsules, tendons, joints between the vertebrae and ribs, etc. With time, inflammations reduce the spinal and thoracic motions and decrease the respiratory capacity of the lungs. The disease was observed early in the history, but only got its name in 1893. It was named after the Russian neurologist Vladimir Bechterev. The exact cause of this disease is still not clear, but the association between AS and the presence of allele HLA-B\*27 is well-known. The practical part of my thesis was conducted in the genetic laboratory GENLABS s.r.o. in Ceske Budejovice under the supervision of Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D. The aim was to isolate the DNA from the buccal swab and peripheral blood and the subsequent preparation and execution of PCR reaction with the following steps; checking the PCR reaction products by gel electrophoresis, their visualization using a detection system and their substraction.

This bachelor thesis contains information about the Bechterew's disease, its history, symptoms, pathogenesis, heredity, etc. It also summarizes information about the HLA molecules, especially the HLA-B\*27 allele, which is crucially/essentially associated with this disease, and influences its occurrence across the population. People with the HLA-B\*27 allele are 300 times more likely to suffer from this disorder than those without it. The presence of this allele does not (necessarily) guarantee affection by the Bechterew's disease, however, those with the HLA-B\*27 allele are at higher risk of developing the disease. Some of the existing subtypes of the HLA-B\*27, such as HLA-B \* 27: 06 and HLA-B \* 27: 09, are presumably not associated with this disease in any way.

## **Key words**

Bechterew's disease / AS; HLA molecules; HLA-B\*27 allele; PCR reaction

## Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>10</b>
2.2	AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ	10
2.2.1	<i>Popis a vznik onemocnění</i>	10
2.2.2	<i>Rozdělení onemocnění</i>	10
2.3	BECHTĚREVOVA CHOROBA	12
2.3.1	<i>Popis onemocnění</i>	12
2.3.2	<i>Historie ankylozující spondylitidy</i>	12
2.3.3	<i>Rozdělení spondyloartritid</i>	13
2.3.4	<i>Symptomy</i>	14
2.3.5	<i>Patogeneze</i>	16
2.3.6	<i>Léčba a průběh</i>	18
2.4	MHC GLYKOPROTEINY	19
2.4.1	<i>Charakteristika HLA systému</i>	19
2.4.2	<i>Funkce</i>	20
2.4.3	<i>Rozdělení</i>	20
2.4.4	<i>Struktura molekul HLA I. a II. třídy</i>	21
2.4.5	<i>Genetika HLA systému</i>	21
2.4.6	<i>Typizace HLA systému</i>	22
2.5	HLA-B*27	27
2.5.1	<i>Hypotézy</i>	27
2.5.2	<i>Struktura HLA-B*27</i>	28

2.5.3	<i>Subtypy HLA-B*27</i> .....	29
2.5.4	<i>Pohlaví</i> .....	30
2.5.5	<i>Věk</i> .....	31
2.5.6	<i>Klinické projevy</i> .....	31
2.5.7	<i>Genetika HLA-B27</i> .....	32
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>34</b>
4.1	<b>METODIKA</b> .....	34
4.2	<b>PREANALYTICKÁ FÁZE VYŠETŘENÍ</b> .....	34
4.3	<b>ANALYTICKÁ FÁZE</b> .....	36
4.3.1	<i>Izolace DNA</i> .....	36
4.3.2	<i>Měření koncentrace DNA</i> .....	39
4.3.3	<i>Příprava PCR reakce</i> .....	40
4.3.4	<i>PCR reakce</i> .....	41
4.3.5	<i>Kontrola PCR reakce</i> .....	42
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>64</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>66</b>
<b>11</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>67</b>

# 1 Úvod

Bechtěrevova/Marieho-Strümpellova nemoc nazývaná také ankylozující spondylitida (AS) patří do skupiny autoimunitních onemocnění. Tyto choroby mohou postihnout v podstatě jakýkoliv orgán nebo tkáň. Vznikají, pokud imunitní systém není schopen rozeznat buňky těla vlastní a cizí. Následně imunitní systém napadá a ničí své vlastní buňky.

Hlavní roli zde hrají především transplantační tkáňové antigeny (HLA). Jedná se o genetický systém, který je zodpovědný za rozeznávání vlastního od cizího. Sada HLA genů na jednom chromozomu tvoří haplotyp. Každý jedinec má dva haplotypy, které zdědil od svých rodičů (od každého jeden). Jejich význam v autoimunitě je důležitý, protože je prokázána silná asociace autoimunitních onemocnění s HLA systémem.

Jednoznačnou asociaci s HLA systémem má právě onemocnění nazývané Bechtěrevova choroba. Ačkoli přesná příčina tohoto onemocnění není dosud známa, existuje jistá genetická predispozice asociovaná s HLA systémem. Téměř 98 % postižených touto chorobou nese znak HLA-B\*27. Ovšem ne všichni nositelé rizikové alely HLA-B\*27 musí onemocnět Bechtěrevovou chorobou. Onemocněním trpí také jedinci, kteří jsou pro tento genetický marker negativní. (Braun a Sieper, 2007)

AS je formou artritidy, která postihuje nejen páteř, ale i sakroiliakální a periferní klouby. Primárně způsobuje zánět meziobratlových kloubů, jenž může vést k těžké až chronické bolesti. Nemoc mohou doprovázet i mimokloubní manifestace jako například záněty oka, záněty Achillovy paty, lupénka a další. Dlouhodobé zkušenosti s Bechtěrevovou chorobou ukazují, že příznaky nastupují již 9 let předtím, než lze onemocnění rozpoznat rentgenovým vyšetřením nebo magnetickou rezonancí. (Nossent et al., 2013) Léčení této nemoci bylo ještě před 20 lety velmi obtížné, protože byly k dispozici pouze omezené možnosti farmakologické léčby. Ovšem v roce 2003 nastal zlom, díky mezinárodní organizaci ASAS (Assessment of SpondyloArthritis international Society), která zveřejnila dlouhodobé studie pro léčbu Bechtěrevovy choroby. Jednalo se o použití léků biologické povahy - inhibitorů pro tumor nekrotizující faktor alfa. A právě tato léčiva změnila život několika nemocným, jejichž dosavadní léčba nebyla zcela účinná. (Kim et al., 2016)



Léčba ankylozující spondylitidy je každoročně upravována mezinárodní organizací – Evropskou ligou proti revmatismu. Nejlepší výsledky mají ti pacienti, kteří navštěvují alespoň 1x týdně skupinové cvičení s fyzioterapeutem a zároveň doma provozují každodenní domácí cvičení.

Cílem mé bakalářské práce bylo sepsání odborné rešerše zabývající se Bechtěrevovou chorobou (historií, symptomy a patogenezí) a zejména alelou HLA-B\*27, která má největší asociaci s tímto onemocněním. V praktické části bylo mým úkolem seznámení se s metodami, jejich postupy a následná obsluha strojů, jež umožňují detekci alely HLA-B\*27. Vzorky, které jsem k tomuto vyšetření použila, byly některé získány od mé rodiny a další mi byly poskytnuty genetickou laboratoří GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích. Pomocí komerčního kitu a metody end-point PCR jsem zjišťovala přítomnost alely HLA-B\*27 v testovaných vzorcích a v některých případech jsem hodnotila její možnou asociaci s výskytem AS u vyšetřovaných jedinců.

## **2 Teoretická část**

### ***2.2 Autoimunitní onemocnění***

#### ***2.2.1 Popis a vznik onemocnění***

Autoimunitní onemocnění vzniká z důvodu nadměrné tvorby autoprotilátek nebo autoreaktivních klonů T – lymfocytů, které poškozují vlastní tkáň a jejich struktury. (Rovenský, 2006)

Teorie vzniku autoimunit spočívá v tzv. mozaice autoimunity. Tato mozaika vysvětluje, proč se u jednoho jedince dané onemocnění vyskytne a u druhého nikoliv. Autoimunitní onemocnění je možné rozdělit do dalších dvou velkých skupin podle mechanismu postižení, jednou takovou skupinou je poškození buněčnými složkami imunitního systému a druhou skupinou je poškození protilátkami. A právě do druhé skupiny se řadí revmatoidní artritida, kde jsou detekovány autoprotilátky proti Fc částem imunoglobulinů. (Shoenfeld et al., 2007)

#### ***2.2.2 Rozdělení onemocnění***

Onemocnění může postihnout více orgánů, v případě systémové autoimunity, nebo napadá pouze určitý orgán. Mezi systémová autoimunitní onemocnění se řadí revmatoidní artritida.

##### **a) Systémové autoimunitní choroby**

Systémové autoimunitní choroby vznikají kombinací několika faktorů a následně dochází k selhání mechanismů tolerance a k rozvoji imunopatologické reakce vůči vlastním antigenům. U systémových autoimunit hraje hlavní úlohu imunokomplexová patogeneze poškození. Do této skupiny patří právě revmatoidní artritida, ale také systémový lupus erythematoses, některé vaskulitidy apod.

##### **b) Orgánově lokalizované autoimunitní choroby**

Mezi systémovými a orgánově specifickými autoimunitami leží skupina onemocnění nazývaná orgánově lokalizované autoimunitní choroby, které postihují určitý orgánový systém, vyskytují se u nich orgánově nespecifické autoprotilátky a řada poškození

probíhá mimo cílový orgán. Do této skupiny se řadí především nespecifické střevní záněty (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida)

c) Orgánově specifické autoimunitní choroby

U orgánově specifických autoimunitních chorob se vyskytují orgánově specifické autoprotilátky, které poškozují pouze jediný orgán nebo tkáň. Řadí se sem například Addisonova choroba, myasthenia gravis, roztroušená skleróza apod. (Bartůňková a Paulík, 2011)

## **2.3 Bechtěrevova choroba**

### **2.3.1 Popis onemocnění**

Bechtěrevova choroba je systémové, zánětlivé, revmatické onemocnění, které ovlivňuje zejména axiální skelet, sakroilijakální, apofyzeální a kostovertebrální klouby páteře. (Forejtová, 2009) Onemocnění se projevuje zánětlivou bolestí zad, která je spojena především s ranní ztuhlostí. V pokročilých případech může nemoc vyústit do těžkých posturálních deformit páteře, jako je ankylóza (nová tvorba kostí v páteři), což způsobí, že část páteře se stane pevnou a nepohyblivou, a právě toto přispívá k výraznému zhoršení kvality života. (Pavelka et al., 2017)

Téměř v polovině případů bývají zasaženy ramenní a kyčelní klouby. Onemocnění bývá provázeno také extraspinálními projevy, u některých pacientů může docházet jednou nebo i opakovaně během života k jiným zánětům. (Edavalath, 2010)

Během posledních několika let se podstatně změnil přístup k této nemoci, zejména díky novým zobrazovacím technikám a terapiím. Diagnóza Bechtěrevovy nemoci se v praxi ve většině případů opoždí. Než lékař stanoví konečnou diagnózu, může to trvat v průměru až deset let od prvních symptomů. (Pavelka et al., 2017) I přes to léčba nesteroidními protizánětlivými činidly a fyzioterapie zůstává důležitým přístupem k dlouhodobé léčbě pacientů s tímto onemocněním. (Braun a Sieper, 2007)

### **2.3.2 Historie ankylozující spondylitidy**

Již první zmínky o Bechtěrevově nemoci jsou datovány do starověku, konkrétně do starověkého Egypta, kde bylo nalezeno několik důkazů o její existenci. Rentgen páteře později odhalil typickou „bambusovou páteř“. (Brophy et al., 2002)

První záznam o Bechtěrevově chorobě se v literatuře objevil roku 1559, kde byl zveřejněn anatomický popis dvou koster, které měly abnormality spojené s touto chorobou. Ovšem přesný popis nemoci uvedl až v 19. století ruský neurofyziolog Vladimír Michajlovič Bechtěrev. Zároveň Adolph Strümpell v Berlíně taktéž v 19. století popsal onemocnění, které nazval ankylozující zánět páteře a kyčelních kloubů. Dále, nezávisle na Bechtěrevovi a Strümpellovi, popsal Pierre Marie v roce 1898 v Paříži podobné změny, které se projevovaly v oblasti páteře a nazval je rizomelickou

spondylózou. Dnešní název tedy plyne z prací V. Bechtěreva z r. 1893, ale někdy se onemocnění nazývá po všech třech jeho objevitelích Strümpellova-Marieho-Bechtěrevova choroba. (Pavelka a Rovenský, 2003)



Obrázek 1 Vzhled bambusové páteře

Zdroj: (Bickle a Gaillard, 2019) dostupné z: <https://radiopaedia.org/articles/bamboo-spine-ankylosing-spondylitis?lang=us>

### 2.3.3 Rozdělení spondyloartritid

Spondyloartritidy se rozdělují do několika skupin lišící se nejen místem postižení, ale i dalšími faktory, které je ovlivňují. Jednotlivé podskupiny jsou geneticky asociovány s molekulou MHC I. třídy HLA-B\*27. (Braun a Sieper, 2007)

Tabulka 1 Klinické rozdělení spondyloartritid do podskupin

Skupina	Zasažení
Ankylozující spondylitida	Zánětlivé onemocnění páteře, kloubů či šlachových úponů (viditelné na rentgenu).
Periferní spondyloartritida	Zánět kloubů či šlachových úponů nejčastěji na dolních končetinách, někdy přítomna i daktylitida nebo dokonce vývin v jinou spondyloartritidu.
Reaktivní artritida	Zánět jednoho kloubu, který se objeví po močové, pohlavní či střevní infekci.

	Pouze někdy se vyvine v chronickou.
Enteropatická spondyloartritida	Zánět kloubů či páteře, jenž je u některých případů doprovázen Crohnovou chorobou nebo ulcerózní kolitidou.
Psoriatická artritida	Zánět kloubů a páteře může být někdy doprovázen lupénkou, jedná se o trvalé a chronické onemocnění.
Nediferencovaná spondyloartritida	Zánět jednoho či více kloubů především na dolních končetinách. Také je zde možnost rozvinutí do jiné spondyloartritidy.
Neradiografická forma axiální spondyloartritidy	Zánětlivé onemocnění SI kloubů, páteře, periferních kloubů a šlachových úponů. Opět se může v některých případech vyvinout v ankylozující spondylitidu.

(Klener, 2006)

#### 2.3.4 *Symptomy*

Bylo zjištěno, že pokud se jedná o Bechtěrevovu chorobu, tak je vždy přítomna hlavní zánětlivá bolest zad a další rysy, jako jsou věk, zákeřný nástup bolesti a ranní ztuhlost, kterou lze zlepšit cvičením. (Braun a Sieper, 2007) Mimo jiné se u většiny spondyloartritid mohou objevit některé z těchto klinických příznaků:

##### a) Zánět v oblasti páteře

Jestliže jsou postiženy klouby a šlachové úpony na páteři v oblasti SI kloubů, jedná se o tzv. axiální příznaky, v případě zánětů končetin mluvíme o periferních příznacích. (Garcia-Montoya et al., 2018)

Bechtěrevova choroba se projevuje typickou bolestí zad a pocitem ztuhlosti, nemocný má největší problémy, když je v klidu a po následném protažení a rozcvičení dochází k úlevě. Také se nemocným často stává, že se nemoc projevuje zejména v noci a po ránu je provázena ranní ztuhlostí. Úlevou od bolesti bývá lehké rozcvičení nebo aplikace tepla na ztuhlou část. Ovšem bolest může vzniknout na různých úsecích páteře. Nemoc ve většině případů začíná v dolní části páteře a postupuje směrem vzhůru (ascendentní typ), ale jsou známy případy, kdy postupuje opačným směrem (descendentní typ), to znamená, že začíná v oblasti krční páteře. Není to obvyklé, existují spíše ojedinělé případy. (Klener, 2006)

Při tuhnutí páteře postupně dochází ke zvětšování hrudní kyfózy a také je možný vznik kyfózy krční nebo bederní, tím je omezen pohyb hrudníku. Na rentgenovém snímku lze pozorovat typický obraz „bambusové hole“ v krčním, hrudním i bederním úseku, zapříčiněný právě tuhnutím páteře. Ta ale může ztuhnout i ve vzpřímeném postavení a takto postižení pacienti mají potíže například s oblékáním kalhot, obouváním, nebo nevidí, kam šlapou. (Pavelka a Rovenský, 2003)

#### b) Zánět v oblasti křížokyčelních kloubů (sakroiliakální)

Typickým příznakem zánětu v oblasti křížokyčelních kloubů je bolest v oblasti dolních zad a následný pocit, že se bolest šíří až do hýždí. (Levitová, 2018)

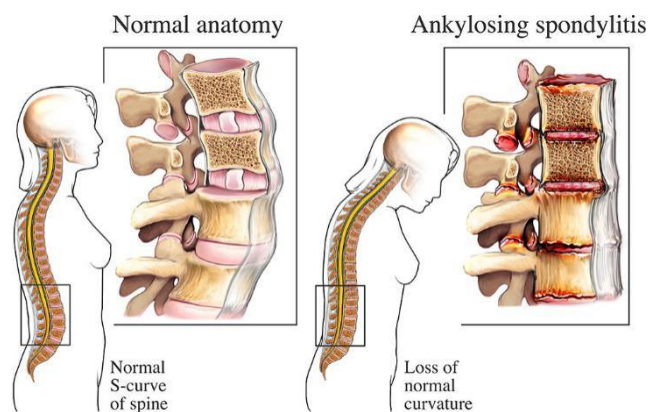
#### c) Zánět kloubů a šlachových úponů (artritida a entezitida)

Zánět kloubů a šlachových úponů se projevuje bolestí, ztuhlostí a otokem kloubů jak na horních, tak i dolních končetinách. Entezitidy jsou nejčastěji pozorovány v oblasti úponu Achillovy šlachy, plantární facie, úponů na pánevní kosti, na trochanter major i minor, v oblasti ramene apod. Projevují se především citlivostí na tlak a prudkou bolestí při určitých pohybech.

Všechny tyto příznaky jsou ve většině případů horší ráno a po procvičení mohou ustupovat. (McVeigh a Cairns, 2006)

#### d) Záněty nesouvisející s pohybovým aparátem

Z extraspinálních projevů se většinou jedná konkrétně o uveitidu nebo o iridocyklitidu (zánět větší oblasti oka). Příznaky se projevují bolestí oka a zčervenáním bělma. V tomto případě by měl pacient téměř okamžitě vyhledat lékaře, aby se zabránilo trvalému poškození oka. Pacienti mohou mít jednostrannou bolest, fotofobii či zvýšené slzení. (Braun a Sieper, 2007) U některých pacientů se mohou objevit i jiné komplikace, ovšem to bývá pouze v ojedinělých případech, které postihnou jednoho pacienta ze sta. Jedná se o obtíže zasahující srdce, plíce nebo centrální nervovou soustavu. (Forejtová, 2009). Dalšími projevy, které se mohou vyvinout spolu s Bechtěrevovou chorobou, jsou kardiální postižení (aortitida, poruchy vedení). Mezi méně časté problémy patří lupénka nebo záněty střeva (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida). (Levitová, 2018)



Obrázek 2 Normální vzhled páteře x AS

Zdroj: (Healthdirect, 2019) dostupné z: <https://www.healthdirect.gov.au/ankylosing-spondylitis>

### 2.3.5 Patogeneze AS

Přestože je etiologie Bechtěrevovy choroby stále ještě neznámá, hrají zde roli faktory infekční, genetické i imunogenetické. Mezi nejdůležitější neovlivnitelné faktory tedy patří vrozené dispozice, pohlaví a některé zevní faktory. (Forejtová, 2009)

#### a) Vrozené dispozice

Protože pro Bechtěrevovu chorobu je častý rodinný výskyt a jednovaječná dvojčata většinou onemocní obě, existuje zřejmě významný podíl genetických dispozic pro rozvoj tohoto onemocnění. Geny přispívající k rozvoji onemocnění jsou studovány v rámci rozsáhlých genetických asociačních studií, které sledují možné vrozené rizikové



varianty u nemocných s Bechtěrevovou chorobou a v celých rodinách a srovnávají jejich výskyt s výskytem v kontrolních skupinách. (Borra et al., 2000)

Na základě těchto studií byl prokázán vysoký stupeň asociace mezi genem kódujícím antigen HLA-B\*27 a Bechtěrevovou chorobou. Přestože HLA-B\*27 je sám o sobě nejdůležitějším predispozičním genetickým markerem pro dané onemocnění, existují důkazy o vlivu dalších asociovaných genů s tímto onemocněním. Přítomnost alely HLA-B\*27 představuje asi 20–30 % celkového genetického rizika, zatímco celá skupina MHC genů přispívá k rozvoji onemocnění 40–50 %. (Stafford a Yousseff, 2008)

Nemocní s Bechtěrevovou chorobou jsou pozitivní na alelu HLA-B\*27 v 80–95 % případů, zdraví lidé pak v 5–8 % případů. To ovšem neznamená, že nositelé této rizikové alely vždy onemocní touto chorobou. Pravidlem je, že pokud jedinec onemocní a je HLA-B\*27 pozitivní a jeho příbuzní (děti, rodiče, sourozenci) jsou rovněž pozitivní pro danou alelu, vzrůstá u nich riziko vzniku Bechtěrevovy choroby 5-16krát ve srovnání se zdravou populací.

K dalším genům, které se zřejmě podílejí na rozvoji tohoto onemocnění, patří i jiné geny HLA systému, například HLA-B\*60, ale také geny mimo tento systém. V některých studiích byly zjištěny četné kandidátní geny (geny pro interleukiny, geny pro cytokiny, pro nitrobuněčné molekuly atd.). S největší pravděpodobností se tyto geny podílejí na vzniku Bechtěrevovy choroby, ovšem běžně se netestují. (Jah et al., 2020)

#### **b) Vliv pohlaví**

Pohlaví představuje jeden z neovlivnitelných faktorů pro rozvoj Bechtěrevovy choroby, objevuje se totiž dvakrát až třikrát častěji u mužů, u kterých se se navíc mohou rychleji vyvinout kostní změny v SI kloubech a páteři. Nejčastěji se projevují u mladých mužů zejména ve druhém, nebo třetím decenniu. Propuknutí nemoci po 40. roce je nepravděpodobné. (Forejtová, 2009) Muži mají z větší části zasaženou páteř, pánev, hrudní stěnu, boky, ramena a nohy. Naproti tomu ženy mají méně zasaženou páteř, ovšem o to větší záněty v kolenou, zápěstí a v kotnících. Zároveň je u žen pozorován i vyšší dopad na psychiku, pravděpodobnost vzniku deprese je u nich dvakrát vyšší než u mužů. (Braun a Sieper, 2007)

### c) Zevní faktory

Zatím nebyl zjištěn žádný konkrétní zevní faktor spojený s rozvojem tohoto onemocnění, ale předpokládá se, že některé střevní infekce mohou podpořit jeho rozvoj. Dále při dlouhodobém sledování nemocných s Bechtěrevovou chorobou bylo zjištěno, že kouření a mechanické přetěžování pohybového ústrojí mohou způsobit zhoršování onemocnění. (Chou, 2001)

#### 2.3.6 Léčba a průběh

Bechtěrevova choroba se v české populaci objevuje přibližně u 7 % obyvatel. Toto onemocnění je dlouhodobé a celoživotní. První příznaky se mohou projevit již v dětství (před 16. rokem), ale většinou nastupují v rané dospělosti (do 30 let). Někteří pacienti, u kterých se na onemocnění přijde včas a dodržují všechny lékařské postupy, mohou mít mírný průběh a onemocnění je nijak zvlášť neomezuje. Proto je velmi důležité akceptovat všechna doporučení od lékařů či fyzioterapeutů hned od samého začátku. (Forejtová, 2009)

Nefarmakologická terapie sestává z lázeňské léčby, vzdělávání a již zmíněné fyzioterapie. Ovšem do jaké míry je fyzická terapie a cvičení prospěšná pro všechna stadia nemoci, není známo. Významným posunem v léčbě AS v posledních několika letech bylo zavedení anti-TNF injekcí. Anti-TNF (anti-tumor nekrotizující faktor) je chemická látka, která je součástí léčiv používaných k léčbě zánětlivých onemocnění, jako je AS. Díky němu se daří úspěšně potlačovat projevy choroby v kloubech. Léčba však není úplně jednoduchá, má mnoho vedlejších účinků a je poměrně drahá. (Gorman et al., 2002)

Přes všechny léčebné procesy, které jsou v dnešní době dostupné, nelze onemocnění zcela vyléčit. Změny postihující páteř či klouby značně ztěžují pohyblivost a důvody jejich vzniku zatím nejsou zcela objasněny. U většiny nemocných lze pozorovat střídající se období, kdy jsou obtíže výraznější, s klidnějšími obdobími. Nemocní s Bechtěrevovou chorobou mají navíc přidružené záněty, které probíhají v celém těle. Proto je důležité, aby byl nemocný stále sledován revmatologem, který možné komplikace zachytí včas. (Calin et al., 1977)

## **2.4 MHC glykoproteiny**

MHC (major histocompatibility complex) je komplex glykoproteinů, jejichž hlavní funkcí je rozeznat cizorodé struktury v těle organismů. MHC představuje genetický systém, který určuje charakter histokompatibilních antigenů a zahrnuje v sobě histokompatibilní systémy všech živočišných druhů. MHC má společné tyto vlastnosti:

- Jedná se o systém genů, které produkují silné transplantační antigeny. A pokud je neshoda v antigenech MHC mezi dárce a příjemcem, vyvolá to akutní rejekci.
- MHC je systémem komplexní a polymorfní.
- Tyto molekuly se zároveň podílejí na regulaci imunitní odpovědi a řadí se mezi imunoglobuliny. (Penka a Lavíčková, 2012)

Lidské MHC molekuly se označují jako HLA (human leukocyte antigens). (Hořejší et al., 2017)

### **2.4.1 Charakteristika HLA systému**

Komplex HLA genů je umístěn na krátkém rameni chromozomu 6. V tomto systému je lokalizováno přes 200 genů. Hlavní rolí molekul HLA I. a II. třídy je prezentovat peptidové antigeny, vystavovat je na svém povrchu T lymfocytům. Jak již bylo řečeno, z pohledu populační genetiky je tento systém vysoce polymorfní, to znamená, že každý člověk má na povrchu svých buněk unikátní sestavu molekul I. a II. třídy. (Penka a Lavíčková, 2012) Molekulární typizace alel HLA se rutinně provádí za účelem zajištění alely HLA I. a II. třídy při transplantaci krvetvorných buněk dárce. Dokonce pouze jediná aminokyselinová substituce mezi HLA alelami může změnit spektrum prezentovaných peptidů na buněčném povrchu, což představuje kritický bod při transplantacích orgánů. Stačí pouze malé rozdíly v jediné HLA alele mezi dárce a příjemcem, které mohou vést k odlišnosti antigenního složení povrchu prezentujících buněk. T lymfocyty příjemce nejsou připraveny tolerovat takové množství cizích antigenů, a tudíž dochází k tomu, že transplantát považují za vetřelce a dojde k jeho odmítnutí. (Hatina a Sykes, 1999)

Zároveň je tento systém spojován s určitými chorobami, ale jeho základní mechanismy dosud nejsou zcela vysvětleny. Frekvence HLA antigenů se mezi různými etnickými skupinami velmi liší. (Choo, 2007)

#### **2.4.2 Funkce HLA**

Nejdůležitější funkcí HLA molekul je indukce a regulace imunitních odpovědí. Molekuly HLA mají ve své struktuře vazebná místa, na která se vážou antigenní peptidy, které vznikly z endogenních nebo exogenních cizorodých částic. Antigenní fragmenty, které jsou navázané na vlastní molekuly HLA, rozpoznávají T lymfocyty. Při imunitní reakci je cizí antigen zpracováván a prezentován na povrchu buňky. Přesný způsob působení antigenů HLA I. a II. třídy se v tomto procesu liší. Antigenní fragmenty z endogenních cizorodých částic jsou po vazbě na molekuly HLA I. třídy rozpoznávány subpopulací CD8<sup>+</sup> T lymfocytů. Ovšem cizorodé exogenní částice jsou zpracovávány APC buňkami, které vzniklé antigenní fragmenty prezentují molekulami HLA II. třídy a tyto fragmenty jsou rozpoznávány pomocnými CD4<sup>+</sup> T lymfocyty. (Penka a Lavíčková, 2012) Po aktivaci se T lymfocyty množí a uvolněním cytokinů jsou schopny vytvořit imunitní odpověď, která bude rozpoznávat a ničit další buňky s tímto stejným komplexem cizího antigenu. (Mosaad, 2015)

#### **2.4.3 Rozdělení**

HLA systém je rozdělen do tří tříd:

- a) Do první třídy se řadí okolo 20 genů, přičemž ty nejdůležitější jsou umístěny na lokusech HLA-A, HLA-B a HLA-C. (Choo, 2007) Geny, které jsou v této třídě, jsou nazývány klasickými a jsou vysoce polymorfní, umístěny jsou co nejdál od centromery a jejich antigeny bývají klasické či transplantační. Nejvíce jsou v lymfatické tkáni, slezině a thymu. Dále se zde nacházejí také další lokusy a to HLA-E, HLA-F, HLA-G a právě produkty těchto genů nejsou již tolik polymorfní a nazývají se neklasickými HLA antigeny. Molekuly HLA-G se například nacházejí na trofoblastových strukturách embryonálního původu. A společným působením HLA-G a HLA-E molekul se chrání plod před napadením T a NK buňkami. Lokusy HLA-H, -J, -K, -L a -X jsou obsazeny nefunkčními geny, tzv. pseudogeny a právě tyto pseudogeny obsahují ve svých kódujících oblastech mutaci, jež zamezuje tvorbě původního genového produktu.

- b) Antigeny druhé třídy mají omezenou tkáňovou distribuci, nacházejí se pouze na B lymfocytech, monocytech, makrofázích, dendritických a Langerhansových buňkách, tudíž na APC buňkách. (Bodmer, 1987) Nejbliže u centromery je oblast HLA-D, kde jsou umístěny lokusy HLA-DR, - DQ, - DP.
- c) Třetí třída se nachází mezi I. a II. Třídou. Tato třída obsahuje geny pro některé složky komplementu (C2, C4, faktor B), 21 – hydroxylázu, tumor nekrozující faktor alfa, lymfotoxin, stresové proteiny Hsp. Tento komplex obsahuje téměř 50 genů. (Penka a Lavíčková, 2012)

#### **2.4.4 Struktura molekul HLA I. a II. třídy**

- a) Molekula HLA I. třídy představuje transmembránový glykoprotein a jedná se o heterodimer, který je tvořen těžkým řetězcem  $\alpha$  a lehkým řetězcem  $\beta$ . Přičemž řetězec  $\alpha$  lze rozdělit na 3 oblasti – extracelulární, transmembránovou a cytoplazmatickou. Extracelulární oblast je tvořena třemi doménami –  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , a  $\alpha_3$ . Řetězec  $\beta$  je tvořený  $\beta_2$  – mikroglobulinem, který není transmembránovým proteinem a na těžký řetězec  $\alpha$  se váže nekovalentními vazbami. Vzájemnou interakcí domén  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  těžkého řetězce  $\alpha$  vzniká žlábek, kam se váže antigenní peptid. Vazebné místo pro peptidy je u molekul HLA I. třídy na obou koncích uzavřeno a díky tomu se na tyto molekuly váží pouze peptidy o délce 8–10 AMK.
- b) Molekuly HLA II. třídy jsou tvořeny heterodimerem, který je stejně jako u I. třídy tvořen těžkým řetězcem  $\alpha$  a lehkým řetězcem  $\beta$ , které jsou vázány nekovalentně. Extracelulární část obou řetězců je tvořena dvěma doménami  $\alpha_1$  a  $\alpha_2/\beta_1$ ,  $\beta_2$ . A právě interakcí domén  $\alpha_1$   $\beta_1$  vzniká žlábek, který váže antigenní fragmenty. Vazebné místo pro antigen je u molekul HLA II. třídy otevřené, nikoliv uzavřené, jak tomu bylo u I. třídy. A zároveň je umožněno vkládání antigenních fragmentů obvykle o délce 15–35 AMK. (Ebringer a Wilson, 2000)

#### **2.4.5 Genetika HLA systému**

HLA systém je přenášen na potomstvo jako tzv. haplotyp. Jelikož se chromozomy nacházejí v párech, nese každý jedinec na každém 6. chromozomu určitou vazebnou sestavu HLA alel (haplotyp), kterou zdědil od každého z rodičů. Haplotyp je tedy soubor vázaných genů, které se dědí společně. Každý jedinec nese 2 haplotypy, jeden,

který zdědil po otci a druhý, jenž má od matky. A právě unikátní spojení HLA genů tvoří specifický HLA genotyp jedince. (Penka a Lavičková, 2012)

V jednom lokusu může daný jedinec nést maximálně 2 alely. A tyto alely jsou kodominantní, což znamená, že na povrchu buňky jsou exprimovány obě alely každého HLA lokusu současně. Pomocí sérologických metod pak dokážeme určit fenotyp jedince. (Thompson et al., 2004)

Když jedinec zdědí od každého z rodičů identické alely, je v daném lokusu homozygotní a pokud jsou zděděny alely rozdílné, je v daném lokusu heterozygotní. V rodinách se vyskytují dva mateřské a dva otcovské haplotypy, které jsou schopny vytvářet 4 různé kombinace haplotypů u potomstva a jsou děděny podle Mendlových zákonů takto:

- 25 % potomků je HLA identických – to znamená, že zdědil stejný haplotyp od otce a stejný haplotyp od matky
- 50 % potomků se shodne pouze v jednom haplotypu – buďto zdědil stejný haplotyp od matky a rozdílný od otce anebo stejný od otce a rozdílný od matky
- 25 % potomků je HLA rozdílných – od matky i od otce zdědil rozdílný haplotyp

Bylo zjištěno, že rekombinantní genotyp se vyskytuje v rodinách asi ve 2 % a vzniká v důsledku crossing – overu. Jedná se o výměnu genetického materiálu mezi dvěma homologními chromozomy v průběhu prvního meiotického dělení. Záleží především na fyzické vzdálenosti daných lokusů. Čím větší je tato vzdálenost, tím je také pravděpodobnost rekombinace větší. (Penka a Lavičková, 2012)

#### **2.4.6 Typizace HLA systému**

Existují dva způsoby typizace HLA molekul:

##### **a) Sérologické metody HLA typizace**

Sérologické metody určují molekuly HLA I., ale i II. třídy na základě antigenních rozdílů podmíněných aminokyselinovým složením polymorfních částí molekul HLA. Tato sérologická typizace je založena na typizačních sérech. Zdrojem typizačních sér bývá:

- Krev matek, které byly alespoň dvakrát těhotné, jelikož v jejich séru jsou ve vysoké koncentraci anti-HLA protilátky, které jsou namířené proti HLA antigenům plodu zděděných po otci. (Penka a Lavíčková, 2012) HLA protilátky se vyskytují až u 20 % žen po několikátém těhotenství, ve většině případů se jedná o protilátky třídy IgG. (Krejsek et al., 2016)
- Produkce monoklonálních protilátek pomocí somatické hybridizace buněk. Typizační sérum, které je ve všech případech ideální, by mělo být monospecifické (reaguje pouze s jedním antigenem HLA systému). Ovšem tato séra jsou vzácná a bývají ve většině případů polyspecifická, takže reagují s více HLA antigeny. (Penka a Lavíčková, 2012)

Vlastní typizace se provádí lymfocytotoxickým testem (LCT) na Terasakiho destičkách, které obsahují předkapaná typizační séra tvořící testovací panel anti-HLA protilátek proti většině známých HLA antigenům. Celkově se jedná o reakci, při které se smísí izolované lymfocyty testovaných pacientů (u I. třídy jde o směs T a B lymfocytů a u II. třídy pouze o směs B lymfocytů) s typizačním sérem a po inkubaci se přidá komplement. (Penka a Lavíčková, 2012) K pozitivní reakci dojde tehdy, když se protilátky ze séra naváží na buňky pacienta a po přidání komplementu následně dojde k lýze buněk. Výsledek může být pozorován pod fluorescenčním mikroskopem až po navázání vitálního barviva (eozin/trypanová modř) na DNA rozpadlých buněk. (Krejsek et al., 2016) Po přidání barviva se obarví pouze buňky usmrcené, které mají barvu pod mikroskopem buď žlutou nebo modrou. Buňky živé se neobarví. Tato metoda není zcela přesná, protože některé antigeny určitého lokusu vykazují skříženou reaktivitu. Například právě antigen HLA-B\*27 reaguje také kromě séra anti-HLA-B\*27 s dalšími jako jsou anti-B\*22, anti-B\*27, anti-B\*40. Právě tyto zkříženě reagující skupiny mohou mít za příčinu falešně pozitivní výsledky. Další nevýhodou dané metody je obtížná typizace u buněk s pozměněnou morfologií (nádorové buňky) nebo sníženou životností. To je důvod, proč se využívají jiné metody více. (Penka a Lavíčková, 2012)

## b) Molekulárně-genetické metody

Pro HLA typizaci se používají také molekulárně-genetické metody založené na principu PCR (polymerase chain reaction). Pomocí PCR lze specificky namnožit požadovaný úsek DNA. Metoda PCR vyžaduje:

- Specifické primery, jedná se o krátké syntetické úseky DNA, které mají specifické sekvence ohraničující amplifikovaný úsek. (Jorde, 2015)
- DNA polymerázu, což je enzym, zajišťující syntézu DNA na principu komplementarity bází, kdy podle templátu vytvoří nové komplementární vlákno.
- Deoxyribonukleotidy, které jsou DNA polymerázou zařazovány na konec primeru do nově syntetizovaného vlákna. Jedná se o čtyři nukleotidy: deoxadenozintrifosfát (dATP), deoxytymidintrifosfát (dTTP), deoxyguanozintrifosfát (dGTP), deoxycytozintrifosfát (dCTP).

Jedná se o metodu umožňující rychlou amplifikaci nukleových kyselin *in vitro*. PCR se účinně používá v molekulární biologii. Reakce vede k replikaci vybraných úseků DNA pomocí enzymu DNA polymerázy. Amplifikovaný úsek je ohraničen primery, které jsou rozpoznávány DNA polymerázou, a právě od nich se zahajuje syntéza DNA. Celá reakce probíhá v přístroji, který se nazývá thermocycler, v němž dochází k udržování naprogramované teploty. (Šmarda a Suchardová, 2010)

V přístroji dochází ke střídání teplot během několika desítek cyklů. Nejprve se zahřeje výchozí DNA na teplotu, která je dostatečně vysoká, aby přerušila vodíkové vazby, které drží dva vzájemně se doplňující řetězce DNA. Tato fáze se nazývá denaturace. Výsledkem je, že se řetězce oddělují, čímž se získá jednořetězová DNA. Pro lidskou DNA se reakční směs obvykle zahřívá na 93 až 95 ° C. (Strachan a Read, 2010)

Poté dochází k ochlazení vzorku na 50-60 °C, následně nasednou primery na komplementární 3' konce DNA. Tato fáze se nazývá annealing. Syntéza nových vláken, zvaná elongace, probíhá pomocí DNA polymerázy. Nejčastěji se využívá polymeráza izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v horkých pramenech, a proto je velmi odolná vůči vysokým teplotám. Označuje se jako *Taq* polymeráza. Jejím úkolem je prodlužování vláken DNA směrem od obou primerů ve směru od 5' konce k 3' konci při teplotě 72°C. Když syntéza vláken skončí, tak je zkumavka s PCR reakcí opět



zahřátá na 95 °C a celý cyklus začíná znovu. Po každém cyklu se zdvojnásobí počet kopií amplifikovaných úseků. (Bartůňková a Paulík, 2011)

Existují různé modifikace PCR:

#### **a) PCR – SSP**

PCR – SSP využívá sady párových primerů a záleží na tom, zda jsou zcela komplementární k dané DNA sekvenci, pokud ano, PCR reakce proběhne. Při použití elektroforézy se rozdělí DNA fragmenty a reakci lze sledovat pod UV zářením.

#### **b) PCR – SSO**

PCR – SSO využívá pouze jeden pár primerů, díky kterým dojde k amplifikaci požadované části genomu. Rozlišení alel proběhne následně díky reverzní hybridizaci se sekvenčně specifickými DNA oligosondami. Zda došlo k vazbě mezi produktem amplifikace a sondou se zvýrazní barevnou enzymatickou reakcí či fluorescencí.

#### **c) SBT**

Přímé sekvenování slouží k tomu, aby se určilo pořadí nukleotidů a identifikovaly se nové HLA alely. Když skončí amplifikace, tak se využijí fluorochromem značené dideoxyribonukleotidy (ddNTP), které když se navážou na úsek DNA, jsou schopny zastavit jeho další množení. Úseky, které vzniknou jsou různě dlouhé, ale vždy zakončené ddNTP. (Penka a Lavíčková, 2012)

#### **d) Metoda mikročipu**

Metoda mikročipu představuje revoluční postup, kdy je možné detekovat tisíce genetických polymorfismů na daném mikročipu v rámci jednoho experimentu. Po přidání fluorescenčně naznačené DNA na čip s imobilizovanými specifickými sondami, dojde k hybridizaci, která se vyhodnotí pomocí speciálního analyzátoru (skeneru). Tato metoda se běžně v praxi pro HLA typizaci spíše nevyužívá.

#### **e) HLA typizace pomocí průtokového analyzátoru**

HLA typizace pomocí průtokového analyzátoru využívá mikročástice, které jsou barevně odlišené díky směsi fluorochromů. Mikročástice mohou být konjugovány s protilátkou či DNA sondou, která je určena k zachytu cílových molekul. DNA je nejdříve amplifikována pomocí PCR a hybridizována s DNA sondami navázanými na barevně značené mikročástice. A právě fluorescenční signály každé mikročástice jsou snímány pomocí laserových paprsků v průtokovém analyzátoru. Vše se zpracuje a vyhodnotí. (Penka a Lavičková, 2012)

## 2.5 HLA-B\*27

Alela HLA-B\*27 je součástí MHC komplexu, konkrétně HLA I. třídy a taktéž leží na 6. chromozomu. Roku 1973 byla poprvé objevena asociace mezi HLA-B\*27 a Bechtěrevovou chorobou. V Evropě nemoc postihuje cca 0,5 – 1 % populace, celkově ve světě se jedná o 21 %. Studie alely HLA-B\*27 prokázaly její vyšší výskyt u rodin, kde se již toto onemocnění projevilo. Nejedná se pouze o Bechtěrevovu chorobu, ale o mnoho dalších, jako jsou reaktivní artritida, uveitida, psoriatická artritida atd. (McMichael a Bowness, 2002)

Je možné, že alela HLA-B\*27 může ovlivnit pouze klinické projevy nemoci nebo její závažnost, aniž by byla důležitá pro vlastní vývoj nemoci. Důkazy upřednostňující přímou roli B\*27 v patogenezi onemocnění jsou následující:

- V rodinách s více případy Bechtěrevovy choroby je pozorována skutečnost, že B\*27 vždy segreguje s tímto onemocněním, pokud netrpí někteří členové rodiny psoriázou nebo chronickým zánětlivým onemocněním střev.
- Kdyby byl za všechny případy tohoto onemocnění odpovědný pouze jediný gen jiný než B\*27, dalo by se očekávat, že B\*27 pozitivní a B\*27 negativní pacienti budou vykazovat podobné klinické příznaky i podobnou familiární segregaci. Současné důkazy naznačují, že B\*27 negativní pacienti mají poněkud pozdější věk nástupu onemocnění a že méně často trpí uveitidou. (Khan, 1988)

Hlavní přirozenou funkcí HLA-B\*27 je vytvoření komplexu s  $\beta_2$  mikroglobulinem, který může vázat krátké antigenní peptidy, jakož jsou většinou peptidy z intracelulárních mikroorganismů. Není ale prokázáno, že by infekce způsobené některými organismy mohly vyvolat Bechtěrevovu chorobu. Jediné, co bylo zaznamenáno je, že HLA-B\*27 zvyšuje invazi salmonel do střevních epitelálních buněk. (Ahvonen a Sievers, 1969)

### 2.5.1 Hypotézy

Existuje několik hypotéz o vzniku asociace alely HLA-B\*27 s Bechtěrevovou chorobou.

Jednou z nich je hypotéza o artritogenním peptidu, která tvrdí, že je molekula HLA-B\*27 schopna vázat unikátní soubor peptidů. Ty mohou být bakteriálního původu a vyznačují se vzájemnou podobností, jedná se o tzv. molekulárními mimikry. Díky této podobnosti může docházet k autoimunitní reakci a ke vzniku zánětu. Za důkaz bylo považováno nalezení CD8<sup>+</sup> T lymfocytů se specifitou pro bakteriální i vlastní peptidy v synoviální tekutině pacientů s reaktivní artritidou a Bechtěrevovou chorobou. (Hermann et al., 1993)

Ukázalo se však, že organismy, které dokáží spustit reaktivní artritidu, jakož jsou především *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, obvykle přežívají intracelulárně. Dále studie objevily, že je obtížné, dokonce nemožné najít živé bakterie nebo DNA v kloubu, ačkoli u některých pacientů byly občas nalezeny fragmenty *Chlamydie*, *Yersinie* nebo *Salmonelly*. (Zhao, 2017)

Taktéž se předpokládá, že CD4<sup>+</sup> T buňky mohou rozpoznávat samotnou HLA-B\*27 molekulu jako autoantigenní peptid. Poté může být jako autoantigen prezentována na HLA II. třídy, CD4<sup>+</sup> T lymfocytům a spustí se imunitní reakce. Avšak tento jev se může podílet na výskytu nemoci, ale je nepravděpodobné, že by se jednalo o hlavní mechanismus, protože jen malé procento pacientů s HLA-B\*27 onemocní Bechtěrevovou chorobou. (Reveille, 2006)

HLA-B\*27 je také spojována i s jinými chorobami. U nositelů této alely bylo objeveno také zvýšené riziko rozvoje akutní leukémie a tuberkulózy. (Sonkar et al., 2008) HLA-B\*27 nemá pouze negativní vliv, může mít taktéž pozitivní účinek na průběh některých virových onemocnění. Patří například mezi alely, kde byla prokázána asociace s pomalejším nástupem infekce HIV či spontánní eliminací viru hepatitidy C. (McKiernan et al., 2004)

### 2.5.2 *Struktura HLA-B\*27*

Molekula HLA-B\*27 se řadí mezi HLA I. třídy. Jedná se o heterodimer, který obsahuje HLA-B  $\alpha$  těžký řetězec membránového glykoproteinu, nekovalentně vázaný na lehký řetězec  $\beta_2$ -mikroglobulin. Těžký řetězec má tři rozdílné strukturní regiony - vysoce hydrofilní intracytoplazmatický konec (cca 30 AMK), hydrofóbní transmembránový region (cca 25 AMK) a extracelulární region, který obsahuje žlábek.

Žlábek vytváří 6 kapes, které jsou značeny písmeny A-F. Do těchto kapes zasahují některé postranní aminokyselinové řetězce vázaného peptidu. Peptid se většinou skládá z devíti aminokyselin a jejich pozici značíme P1-P9, kde P1 je na N-konci peptidu a P9 na jeho C-konci. (Madden et al, 1991)

Tento peptid, aby se mohl na molekulu HLA-B\*27 navázat, musí mít určitý vazebný motiv. Ten je nejvíce omezen v pozici P2. Aminokyselinové zbytky v pozicích P3, P7 a P9 směřují do kapes, zatímco v pozicích P4 a P8 vyčnívají ze žlábků ven a pravděpodobně interagují s receptorem CD8+ T lymfocytu.

Různé subtypy HLA-B\*27 mají odlišné aminokyselinové složení vazebného žlábků, tudíž mohou vázat rozdílné soubory peptidů. Ovšem tyto záměny v aminokyselinách však nemusí měnit pouze účinnost vazby peptidů, ale také mohou ovlivňovat rozpoznávání molekul T lymfocytu. (Madden et al., 1991)

### **2.5.3 Subtypy HLA-B\*27**

Alela HLA-B\*27 vykazuje vysoký polymorfismus a může ovlivnit nejen specifitu vazebných antigenních peptidů, ale může také hrát roli v patogenezi a vnímavosti Bechtěrevovy choroby. Do roku 2018 bylo identifikováno celkem 223 alel zahrnujících 167 subtypů HLA-B\*27. (Dashti et al., 2018) Tyto subtypy se od sebe liší pouze jednou či více AMK, které modifikují peptidovou vazebnou specifitu molekuly. Ovšem většina z nich není dostatečně zastoupena a nemůže být použita pro genetické asociační studie. (Khan, 2017)

Některé studie objevily různé sekvence kódujících genů, které vedou ke strukturálním a funkčním rozdílům mezi různými podtypy HLA-B\*27. Jako příklad může být uveden jediný rozdíl AMK zbytků (Asp a His) mezi HLA-B\*27: 09 a HLA-B\*27: 05, a to vede k rozdílným haplotypům a zcela jinému fenotypovému projevu souvisejícímu s Bechtěrevovou chorobou. Zatímco subtypy HLA-B\*27: 04 a HLA-B\*27: 05 se liší také pouze v jedné pozici (Val a Glu) a tento rozdíl nemá žádný vliv na jeho spojení s Bechtěrevovou chorobou. (Khan, 2013)



Obrázek 3 Porovnání aminokyselinových zbytků běžných subtypů nesouvisejících s onemocněním se subtypy asociovanými s nemocí

Zdroj: (Dashti et al., 2018)

Nejběžnějšími subtypy spojovanými s tímto onemocněním jsou uvedeny v tabulce číslo 2:

Tabulka 2 Subtypy alely HLA-B\*27

Subtyp	Etnická skupina	Asociace s onemocněním
HLA-B*27: 05	Kavkazané (přítomný téměř ve všech populacích)	Velmi vysoká asociace s Bechtěrevovou chorobou
HLA-B*27: 04	Asiaté	Asociace s Bech. chor.
HLA-B*27: 02	Populace ve Středozeší	Asociace s Bech. chor.
HLA-B*27:07	Řekové	Protektivní charakter před Bechtěrevovou chorobou
HLA-B*27:06	Smíšené skupiny	Žádná asociace
HLA-B*27:09	Smíšené skupiny	Žádná asociace

(Sheehan, 2004)

#### 2.5.4 Pohlaví

Studie srovnávající pohlaví u pacientů s Bechtěrevovou chorobou odhalila, že ve převažují muži, kteří jsou HLA-B\*27 pozitivní a současně trpí touto nemocí. Muži jsou postiženi Bechtěrevovou chorobou až třikrát častěji než ženy. Pro vysvětlení vztahu

mezi pohlavím a HLA-B\*27 studie poukazuje na spojení antigenu HLA-B\*27 s vysokou koncentrací testosteronu u mužů. Pokud je toto tvrzení správné, lze očekávat, že HLA-B\*27 bude sloužit jako diagnostický a prognostický marker Bechtěrevovy choroby u mužů.

Studie provedená na čínských pacientech s AS ukázala, že až 80,2 % vyšetřených mužských pacientů s AS byli pozitivní na alelu HLA-B\*27, kdežto u žen to bylo až třikrát méně. (Akassou a Bakri, 2017)

Další odlišnosti v pohlaví jsou rozdíly v nástupu onemocnění. Ženy s alelou HLA-B\*27 mají symptomy přítomny dříve než muži, u kterých se nástup nemoci projevuje mnohem později. (Xiong et al., 2014)

### **2.5.5 Věk**

Dalším faktorem, který je nutný zmínit a ovlivňuje vztah mezi HLA-B\*27 a AS, je věk. Klinický obraz Bechtěrevovy choroby s časným nástupem se liší od obrazu u dospělých, což je důležitým poznatkem pro fenotyp nemoci. Pokud jde o vztah mezi HLA-B\*27 a věkem nástupu toho onemocnění, mnoho studií ukázalo, že pacienti s HLA-B\*27 mají nástup onemocnění dříve než pacienti bez této alely. Souvislost mezi věkem nástupu a pozitivitou HLA-B\*27 je zajímavý rys Bechtěrevovy choroby, který může hrát důležitou roli pro hodnocení vývoje a prognózy onemocnění.

Dalším faktorem, který je stejně důležitý jako věk nástupu, je prodleva mezi prvními spondyloarthritickými symptomy a diagnózou. Studie Feldtkellera (Feldtkeller et al., 2003) ukázaly, že průměrné zpoždění je významně delší u pacientů negativních na HLA-B\*27 než u HLA-B\*27 pozitivních. (Akassou a Bakri, 2017)

### **2.5.6 Klinické projevy**

Pacienti, kteří mají alelu HLA-B\*27, mají zároveň i horší klinické projevy. Mnoho studií odhalilo, že pozitivní pacienti mají více příznaků postižení páteře (bederní a hrudní páteře), postižení kyčelního kloubu a také periferního postižení. Jedná se také o uveitidu, která se taktéž projevuje spíše u pacientů s HLA-B\*27. (Sheehan, 2004)

Přesná úloha HLA-B\*27 v patogenezi AS zůstává nejasná, ovšem faktory, které onemocnění spojují, jakož jsou věk nástupu, pohlaví a rodinná historie, jsou ovlivněné HLA-B\*27. Zároveň znaky, které jej odlišují od jiných genů, a rozdíly mezi jeho mnoha podtypy, tvoří základ pro několik hypotéz, jak by mohla tato alela predisponovat a zprostředkovávat daná onemocnění. Je pravděpodobné, že budou identifikovány další geny nebo kombinace genů, které ovlivňují přenos a fenotypovou expresi HLA-B\*27. Tyto a další faktory mohou také objasnit chápání toho, jak přítomnost HLA-B\*27 chrání před určitými infekcemi, a případně zvyšuje náchylnost k jiným. (Sheehan, 2004)

### **2.5.7 Genetika HLA-B27**

Starší teorie vypovídaly o silném dědičném faktoru pro vznik onemocnění, byly podpořeny několika studiemi, u kterých se ukázalo zvýšené riziko vzniku onemocnění pro sourozence 50x oproti všeobecnému populačnímu riziku. (Carter et al., 2000)

V několika dalších studiích bylo zjištěno, že například bratr, který byl HLA-B\*27 pozitivní a trpěl Bechtěrevovou chorobou, měl sestru, která byla HLA-B\*27 negativní, ale trpěla akutní přední uveitidou, i přes to, že u ní nebyla alela HLA-B\*27 detekována. Toto je jeden z mála příkladů, kdy se setkáváme se dvěma příbuznými, z nichž jeden je HLA-B\*27 pozitivní a druhý negativní. (Woodrow a Eastmond, 1978)

Souvislost mezi Bechtěrevovou chorobou a HLA-B\*27 vyvolává dvě základní otázky. První z nich je, zda hlavním genem, který způsobuje Bechtěrevovu chorobu, je sám HLA-B\*27, nebo zda se jedná o jiný gen, který leží v blízkosti lokusu HLA-B a současně je ve velmi silné vazebné nerovnováze s HLA-B\*27. Druhou a související otázkou je, zda spondylitida u HLA-B\*27 negativních jedinců je z genetického, ale i z klinického hlediska stejná jako u HLA-B\*27 pozitivních pacientů.

Z toho plyne, že gen HLA-B\*27 se ve většině případů dědí a může být zděděn od všech možných členů rodiny. Pokud je u jedince s Bechtěrevovou chorobou prokázána přítomnost alely HLA-B\*27, existuje šance, že by mohl gen předat všem svým dětem se stejnou pravděpodobností. Odhaduje se, že u 5–20 % dětí s tímto genem se bude dále rozvíjet Bechtěrevova choroba. (Woodrow a Eastmond, 1978)



### 3 Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce bylo:

- Sepsání odborné rešerše na téma Bechtěrevova choroba a význam molekuly HLA-B\*27 pro její diagnostiku na základě informací získaných z recentních odborných publikací.
- Detekce alely HLA-B\*27 u vybraných jedinců. Zvládnutí laboratorních metod jako je izolace DNA a SSP PCR analýza za použití komerčního kitu HISTO TYPE B\*27 od firmy BAG Health Care, zakreslení rodokmenu na základě odebrané rodinné anamnézy a statistické zhodnocení výsledků získaných v genetické laboratoři během testování alely HLA-B27\*.

## **4 Praktická část**

### **4.1 Metodika**

Praktická část mé bakalářské práce byla provedena v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích pod vedením Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D., přičemž vlastní práci předcházelo řádné proškolení a seznámení s bezpečnostním a provozním řádem laboratoře.

Stanovení alely HLA-B\*27 se provádí pomocí komerčního kitu HISTO TYPE B\*27 od firmy BAG Health Care. Při práci s touto soupravou se využívá metoda SSP (Sequence Specific Primers) PCR. BAG Diagnostics GmbH je nositelem CE certifikace pro veškerou in vitro diagnostiku. Tento kit sice detekuje alelu HLA-B\*27 avšak nerozeznává její subtypy přímo asociované s onemocněním od subtypů HLA-B\*27:06 a HLAB\*27:09, které s Bechtěrevovou chorobou asociovány nejsou. Pro zjištění těchto subtypů je možné použít komerční soupravu HISTO TYPE B\*27 Q taktéž od firmy BAG Health Care, která je komerčně dostupná teprve od minulého roku (2019) a pro tuto bakalářskou práci nemohla být použita, protože genetická laboratoř ji zatím nepoužívá.

Vyšetření HLA-B\*27 jsem prováděla celkem u 22 pacientů. 6 pacientů bylo z mé rodiny, kde se vyskytuje Bechtěrevova choroba. Dále byly vyšetřeny kontrolní vzorky se známým genotypem, které pocházely z jiné spřátelené laboratoře. Jako primární vzorek pro izolaci DNA byl použit bukální stěr, který si může kdekoli odebrat pacient sám za splnění určitých podmínek, a nebo periferní krev, kterou může odebrat pouze kvalifikovaný pracovník v odběrové laboratoři. Následně jsem provedla izolaci DNA, změřila její koncentraci a postupně vyšetřila HLA-B\*27 u vybraných vzorků metodou založenou na SSP PCR a gelové elektroforéze dle instrukcí výrobce výše zmíněného komerčního kitu. Získané výsledky jsem zpracovala a následně rozebrala v rámci diskuze.

### **4.2 Preanalytická fáze vyšetření**

Jako každé laboratorní vyšetření, tak i toto obsahovalo preanalytickou fázi. Jedná se o postupy, které předcházejí samotnému vyšetření vzorku. V této fázi došlo k odběru

biologického materiálu, konkrétně bukálního stěru a krve. Ještě před odběrem byli pacienti seznámeni s laboratorním vyšetřením a poučení o provedení správného odběru.

- Odběr bukálního stěru

Odběr bukálního stěru je prováděn pomocí odběrové sady, která obsahuje sterilní vatové tyčinky uzavřené v plastové zkumavce. Součástí odběru je také průvodní dokumentace, která se sestává z informovaného souhlasu a laboratorní žádanky. Pokud by byly vzorky bez této dokumentace, nemohou být dále zpracovány. Pro správnost výsledků vyšetření je důležité, aby byl odběr proveden správně a důkladně. K odběrové sadě jsou přiloženy instrukce pro správný postup, takže pacient si stěr může provést sám v pohodlí domova, nejlépe ihned po probuzení před provedením ústní hygieny. Pokud je odběr prováděn v průběhu dne, dotyčný by neměl minimálně 60 minut nic konzumovat, aby na sliznici bylo co nejvíce materiálu. Stěr se provádí ze zadní strany dutiny ústní po dobu minimálně 3 minut. Vatová tyčinka se během odběru otáčí a po odběru se vloží do originální sterilní plastové zkumavky, která se řádně uzavře. Velmi důležité je, aby se nikdo jiný než pacient, nedotýkal vatové tyčinky, jinak by mohlo dojít ke kontaminaci odebíraného vzorku a výsledky by pak byly znehodnocené. Po odběru se vzorek co nejdříve dopraví do laboratoře společně se všemi potřebnými dokumenty. Bukální stěr by měl být zpracován do 48 hodin.

- Odběr periferní krve

Periferní krev se nejčastěji odebírá ze žíly v loketní jamce nebo ze žíly předloktí. Důležité je vybrat správnou zkumavku pro odběr. Pro analýzu DNA/ RNA to musí být zkumavka s protisrážlivým roztokem K3EDTA. Během odběru musí pacient obvykle sedět. Než se samotný odběr provede, je nutné zkontrolovat veškeré údaje, které jsou na žádance, a písemný souhlas pacienta s laboratorním vyšetřením. Zdravotník, který odběr provádí, by měl mít předem připravené pomůcky, které zahrnují tácek, dezinfekci, buničinové čtverečky, jednorázové rukavice, škrtidlo, injekční jehlu a stříkačku. Před odběrem se musí ruka zaškrtnit nad místem vpichu pomocí škrtidla, které zajistí přeplnění žíly. Zaškrtení by nemělo trvat déle než 1 minutu a je nutno uvolnit ho po úspěšném píchnutí do žíly, tím se získá volně proudící krev. Při delším škrtení by mohlo dojít k přesunu krve z cévy do mezibuněčného prostoru. Před odběrem se ještě zdezinfikuje místo vpichu, nejlépe postříkem na kůži, nebo pomocí tamponu. Samotný

vpich se provádí tak, že se palcem vypne kůže pro lepší viditelnost žíly a pod úhlem 30-45° zkoseným hrotem jehly se vnikne pod kůži. Po tomto úkonu se táhne pístem stříkačky a pokud je přítomna krev, uvolní se škrtilo a nechá krev volně téct po stěnách stříkačky. Nakonec se buničtinové čtverečky přiloží na místo vpichu a jehla se vytáhne ve směru žíly, aby nebyla poraněna kožní struktura. Pro zástavu krvácení a zamezení vzniku hematomu by si měl pacient v místě vpichu držet tampony nebo čtverečky po dobu 2-3 minut. Po odběru se musí zkumavka lehce promíchat, aby nedošlo ke sražení. Takto odebraný vzorek se může být uchován v lednici maximálně po dobu 14 dnů nebo v mrazícím boxu neomezeně, dokud není použit k danému vyšetření. Zkumavka musí být čitelně popsána, dopravena společně s řádně vyplněnou žádankou a informovaným souhlasem s molekulárně genetickým vyšetřením.

### **4.3 Analytická fáze**

V analytické fázi máme již odebraný biologický materiál a může dojít k samotnému vyšetření vzorků, pomocí příslušných přístrojů. Analytická fáze probíhá v několika krocích a v souladu s postupy správné laboratorní praxe. Zahrnuje vnitřní i vnější kontrolu kvality, které slouží k minimalizaci chyb analytického měření.

#### **4.3.1 Izolace DNA**

Izolace DNA je prvním krokem molekulárně genetické analýzy. Provádí se několika různými způsoby s různými biologickými materiály, kterými mohou být periferní krev, bukalní stěr, kostní dřeň apod. Já jsem ve své praktické části prováděla izolaci DNA pouze z bukalních stěrů a periferní krve.

- Izolace DNA z bukalního stěru

K izolaci DNA z bukalních stěrů byl použit kit GeneAll ExGene™ Clinic SV Mini (GeneAll). Jedná se o jednoduchou a rychlou metodu, jak získat nukleovou kyselinu. Všechny potřebné informace byly popsány v příloženém manuálu. Potřebné množství jednotlivých reagensů je uvedeno v tabulce číslo 3.

*Tabulka 3 Reagencie a jejich objemy použité při izolaci DNA z bukalního stěru*

Reagencie	Objem (μl)
BL buffer	400

PBS buffer 400	400
Proteináza K	40
BW buffer	600
AE buffer	50
TW buffer	700
Etanol 100%	400

Spotřební materiál:

- 1,5ml mikrokumavky
- Pipety
- Špičky s filtrem
- Rukavice

Před vlastní izolací, musí být řádně označeny všechny potřebné mikrokumavky laboratorním informačním číslem (LIČ) pacienta, připraveny potřebné reagentie a předeřhřata suchá lázeň, na 56 °C (TDB-120, Dry block thermostat, Biosan). Poté začíná samotná izolace podle instrukcí výrobce izolačního kitu.

Do zkumavky s buklálním stěrem se napipetuje 400 µl PBS pufru, přidá se 40 µl proteinázy K a 400 µl BL pufru. Aby se vzorek dobře promíchal, je třeba jej zvortexovat. Následuje inkubace 10 minut i při 56 °C. Pro odstranění kapek z vnitřní strany víčka zkumavky, je třeba vzorek krátce stočit. Následně se přidá 400 µl 100% etanolu, směs se řádně zvortexuje v pulzech a krátce stočí. Poté se směs přenesse na kolonku (nabrat lze maximálně 700 µl, tudíž ve dvou krocích) a centrifuguje 1 minutu při 6000 x g. Sběrná zkumavka se nahradí novou sběrnou zkumavkou a přidá se 600 µl BW pufru. Vzorek se znovu centrifuguje stejným způsobem (1 minutu při 6000 x g) jako v předchozím kroku a sběrná zkumavka se nahradí čistou. Na kolonku se napipetuje 700 µl TW pufru a opět se centrifuguje 1 minutu při 6000 x g. Následně se odstraní supernatant ze sběrné zkumavky a kolonka se vrátí zpět. Tentokrát se vzorek centrifuguje při nejvyšších otáčkách po dobu 1 minuty, aby došlo k odstranění zbytkového promývacího pufru. Nakonec se kolonka umístí do nové popsané 1,5ml mikrokumavky s víčkem. Přidá se 50 µl AE pufru přímo na střed filtru kolonky, inkubace s elučním pufem trvá 5 minut při RT a následuje centrifugace při nejvyšších otáčkách 1 minutu. Poslední tři kroky se znovu zopakují, to znamená přidá se znovu 50

μl AE pufru, který byl získán při poslední centrifugaci a již obsahuje izolovanou DNA, následuje inkubace 5 minut při RT a centrifugace 1 min. při maximálních otáčkách. Tímto způsobem jsem získala nukleovou kyselinu, jejíž koncentraci jsem mohla následně změřit pomocí fluorometru.

- Izolace periferní krve

Izolace periferní krve probíhá obdobně jako u bukalního stěru. K izolaci byl použit kit GeneAll ExGene™ Clinic SV Mini (GeneAll). Všechny potřebné informace jsou uvedeny v příloženém manuálu. Nejprve se připraví označené zkumavky laboratorním informačním číslem pacienta (LIČ), zapne se suchá lázeň na 56 °C (TDB-120, Dry block thermostat, bioSan), z mrazícího boxu se vyjme proteináza K a ostatní reagentie, uvedené i s použitými objemy v tabulce číslo 4.

*Tabulka 4 Reagentie a jejich objem při izolaci DNA z periferní krve*

Reagentie	Objem (μl)
Proteináza K	20
BL buffer	200
100% ethanol	200
BW buffer	600
TW buffer	700
AE buffer	50

Spotřební materiál:

- GD Column (kolonka)
- 2ml sběrná zkumavka
- 1,5ml mikrozukavky
- Pipety
- Špičky s filtrem
- Rukavice

V tomto případě je postup následující. Do čisté 1,5ml mikrozukavky se napipetuje 20 μl proteinázy K. Dále se přidá 200 μl vzorku a 200 μl BL bufferu. Směs se řádně zvortexuje a stočí a zkumavky se inkubují v připravené suché lázni při 56 °C na 10

minut. Během inkubace se připraví a řádně označí kolonky. Po inkubaci se mikrozkušavky krátce stočí, aby se odstranily kapky z vnitřní strany víčka. Poté se přidá 200 µl 100% ethanolu, mikrozkušavka se důkladně zvertexuje a krátce stočí. Následně se přenese všechna směs na kolonku, kolonka se centrifuguje po dobu 1 minuty při 8 200 x g. Připraví se nová sběrná zkušavka a po výměně sběrných zkušavek se přidá 600 µl BW bufferu. Tento krok se opakuje, dokud supernatant není čirý. Po výměně sběrných zkušavek se přidá 700 µl TW bufferu a vzorek se opět znovu zcentrifuguje po dobu 1 minuty při 8 200 x g. Supernatant je třeba ze sběrné zkušavky odstranit a kolonku zpět vrátit do té samé sběrné zkušavky. Aby došlo k úplnému odstranění zbytkového promývacího roztoku, je důležité mikrozkušavku zcentrifugovat při nejvyšších otáčkách po dobu jedné minuty. Dalším krokem je příprava nové 1,5ml mikrozkušavky s víčkem, která se řádně popíše číslem vzorku. Do ní se vloží suchá kolonka. Přímo na střed kolonky, ale opatrně, aby nedošlo k poškození filtru, se přidá 50 µl AE bufferu a mikrozkušavka s kolonkou se nechá inkubovat 5 minut při pokojové teplotě a centrifuguje 1 min. při maximálních otáčkách. Po uplynutí inkubační doby se znovu přidá 50 µl AE bufferu, který byl získán předešlou centrifugací a vzorek se opět inkubuje 5 min. při pokojové teplotě. Následně se mikrozkušavka stočí při nejvyšších otáčkách po dobu 1 minuty. Poté následuje změření koncentrace izolované DNA.

#### **4.3.2 Měření koncentrace DNA**

- Po provedení izolace DNA je důležité zjistit její koncentraci a čistotu. Koncentraci DNA jsem měřila pomocí komerčního kitu AccuGreen™ Broad Range dsDNA Quantitation Solution (Biotum).

. Celé měření probíhalo s informačním manuálem, který jsem měla stále po ruce.

Pomůcky a reagenty:

- Qubit® 2.0 fluorometr
- AccuGreen™ Broad Range dsDNA Quantitation Solution (Biotum)
- Qubit™ assay 0,5ml mikrozkušavky
- DNA

Koncentrace DNA se měří pomocí Qubit® 2.0 fluorometru a potřebného kitu AccuGreen™ Broad Range dsDNA Quantitation Solution (Biotum), který se nejdříve musí vytemperovat na pokojovou teplotu (RT). Proto se vyjmul již během izolace z lednice, aby nedocházelo ke zbytečnému zdržování při měření. Před samotným měřením se připravily Qubit™ assay 0,5ml mikrozkušavky, do kterých se napipetovalo 198 µl roztoku a 2 µl izolované DNA vzorku. Stejným způsobem se připravily všechny vzorky, krátce se zvortexovaly, stočily a 2 minuty inkubovaly při pokojové teplotě. Následně mohla být změřena jejich koncentrace pomocí již zmiňovaného fluorometru, na kterém bylo zvoleno vhodné měření DNA (dsDNA BR Assay). Vzorky byly postupně vkládány do přístroje a pro každé měření bylo nutné stisknout Read. Na displeji objeví se objevila kalibrační křivka obsahující bod s příslušnou koncentrací. Pro zjištění skutečné koncentrace je nutné zmáčknout Calculate Stock Conc a vybere se použité množství izolátu. Přístroj pak kalkuluje skutečnou koncentraci v požadovaných jednotkách. Hodnotu koncentrace jsem si zapsala do sešitu a stiskla Read next sample. Naměřené koncentrace jsou uvedeny v tabulce číslo 5.

*Tabulka 5 Koncentrace izolované DNA získané z bukálních stěrů*

<b>Pacient</b>	<b>Koncentrace DNA</b>
153/19	54,2
154/19	26,6
144/19	100
147/19	77,6
148/19	96,4
149/19	29,4

### **4.3.3 Příprava PCR reakce**

Abych mohla odizolovanou DNA správně vyšetřit, bylo třeba si připravit příslušný master – mix pro PCR reakci. Master - mix se připravil pomocí soupravy HISTO TYPE B27 low (výrobce BAG Health Care GmbH). Součástí tohoto kitu jsou 0,2ml mikrozkušavky, obsahující prealiquotované a vysušené reakční směsi obsahující také vnitřní amplifikační kontrolu.

Před samotným provedením je třeba mít připravené potřebné pomůcky a reagentie. Samozřejmě jsou jednorázové rukavice, špičky s filtrem a vyhrazené pracovní místo,



kterým byl laminární box. Ten se před použitím vysvícen UV zářením. Reagencie použité v master - mixu jsou popsány v tabulce číslo 6. Složení master – mixu odpovídá potřebnému počtu reakčních směsí. V návodu na přípravu reakce bylo doporučeno použít 0,08 µl Happy Taq DNA polymerázy o koncentraci (5 U/µl), tedy pouze 0,4 U polymerázy, my jsme si množství upravili na 0,12 µl.

Tabulka 6 Reagencie master-mixu na 1 reakci

Reagencie	Objem (µl)
Happy Taq (5 U/µl)	0,12
10 x PCR pufr	1
H <sub>2</sub> O	7,0

Nejdříve je třeba vyjmout z mrazicího boxu vzorky s izoláty DNA a reagencie, protože se musí rozmrazit při pokojové teplotě. Poté jsem všechny vzorky i reagencie zcentrifugovala a stočila. Happy Taq DNA polymerázu jsem pouze stočila, jelikož by se po zvortexování mohla rozbít, a vložila ji do laminárního boxu spolu v chladícím stojánku. Dále jsem si připravila a popsala mikrozkušavky s primery, plus dvě další pro kontroly. Součástí každé analýzy musí být alespoň jeden kontrolní vzorek, u kterého známe genotyp, a negativní kontrola bez přidaného templátu.

Do 1,5ml mikrozkušavky jsem napipetovala reakční mix pro příslušný počet reakcí dle návodu uvedeného v tabulce 6. Zkušavku jsem řádně uzavřela, zcentrifugovala a stočila. Následně jsem mohla reakční mix rozpipetovat, do každé reakční zkušavky přišlo 8 µl směsi a doplnilo se 2 µl DNA příslušného vzorku. Do negativní kontroly jsem místo DNA napipetovala 2 µl vody. Do pozitivní kontroly jsem napipetovala 2 µl vzorku se známým genotypem. Všechny mikrozkušavky jsem řádně uzavřela, stočila a dala do thermocycleru, kde jsem nastavila dle doporučení výrobce definovaný PCR profil.

#### 4.3.4 PCR reakce

Dalším krokem analytické fáze byla PCR reakce (polymerázová řetězová reakce), která probíhala dle doporučení výrobce.

Tabulka 7 Parametry SSP PCR

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

Po skončení amplifikační reakce jsem PCR produkty zkontrolovala pomocí gelové elektroforézy a 4% agarózového gelu.

#### 4.3.5 Kontrola PCR reakce

Separaci amplifikačních produktů jsem prováděla pomocí gelové elektroforézy na 4% agarózovém gelu.

Použitými reagensy byly:

- Crystal 10x TBE buffer
- 10x TBE-zásobní roztok
- 1x TBE-pracovní roztok
- 100bp DNA LADDER H3RTU
- Agarózové tablety
- Midori Green Advanced DNA stain

Před provedením elektroforézy jsem si musela připravit agarózový gel. Ten se připravuje následujícím způsobem:

V 50ml plastové kádince jsem rozpustila požadovaný počet agarózových tabletek o hmotnosti 0,5 g v příslušném objemu 1x TBE pufru, pro 1% gel byla použita 1 tableta a 50 ml pufru, pro 4% gel 4 tablety a 50 ml pufru apod. Po úplném rozpuštění tablet jsem kádinku vložila do mikrovlnné trouby a nechala lehce prohřát na maximální ohřev po dobu 2-3 minuty, po celou dobu jsem kádinku pozorovala, aby nedošlo k úniku gelu z kádinky a zároveň aby se agaróza zcela uvařila. Poté, jsem gel vyjmula z mikrovlnné trouby, napipetovala 6  $\mu$ l fluorescenční barvy Midroi Green Advanced DNA Stain a důkladně promíchala. Následně jsem mohla gel nalít do předem připravené elektroforetické podložky s hřebínky, odstranila jsem vzniklé bublinky a gel následně během 15 minut ztuhl.

Po ztuhnutí gelu jsem mohla hřebeny vyjmout a vložit gel do elektroforetické vany, která obsahovala 1x TBE pufr. Hladina pufru by měla být ideálně 3 mm nad gelem. Následně jsem mohla pipetovat do jamek gelu jednotlivé PCR produkty. Do první jamky bylo napipetováno 5  $\mu$ l 100 bp DNA LADDER H3RTU pro relativní posouzení velikosti amplifikovaných fragmentů. Pipetovala jsem vždy celý obsah mikrozkuvek, tedy 10  $\mu$ l PCR produktu a následně nechala elektroforézu běžet po dobu 20 minut při napětí 135 V. Principem této metody je pohyb záporně nabitých molekul DNA v elektrickém poli směrem k anodě.

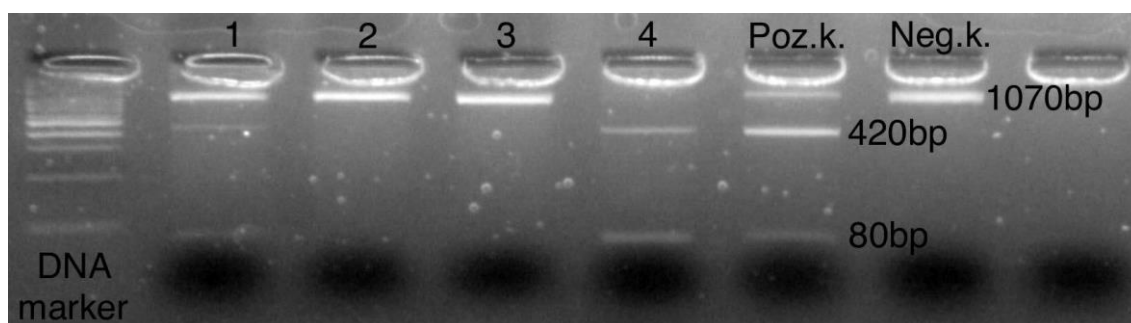
Po proběhnutí elektroforézy jsem gel vyjmula z elektroforetické vany a přenesla na dokumentační systém FastGene® Gelpic LED Box, který umožňuje gel vyfotit. Fotografie gelu byly uloženy na paměťovou SD kartu a následně upraveny a uloženy v PC. Výsledky byly hodnoceny dle pokynů v manuálu.

## 5 Výsledky

Tato kapitola zahrnuje výsledky, které jsem získala po proběhnutí SSP PCR reakce a gelové elektroforézy. Jak jsem již zmínila, vyšetřovala jsem dohromady 22 vzorků, z toho 6 bylo z mé rodiny, a dále kontrolní vzorky, které pocházely z jiné laboratoře a znali jsme jejich výsledky, nikoliv však jejich zdravotní stav.

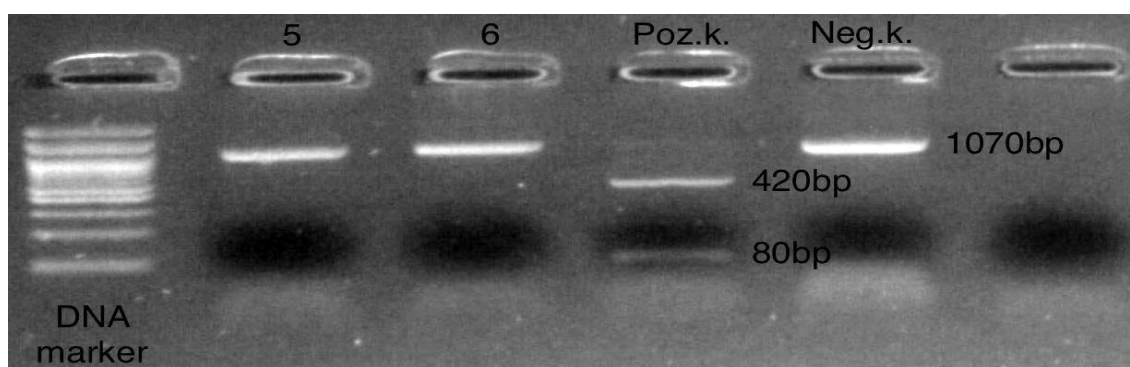
Alela HLA-B\*27, kterou jsem vyšetřovala pomocí soupravy HISTO TYPE B\*27, je zviditelněna jako specifický proužek o délce 420bp a/nebo 85bp. Při nepřítomnosti specifického proužku reprezentujícího HLA-B\*27 musí být viditelná vnitřní kontrola o velikosti 1070bp. Jedná se o amplifikační produkt odpovídající lidskému genu G3PDH. V přítomnosti pozitivního HLA-B\*27 PCR produktu o velikosti 420 a/nebo 85 bp je PCR produkt vnitřní kontroly (1070 pb) viditelný pouze slabě nebo zcela chybí. V kontaminační kontrole by neměl být patrný žádný pruh. Pokud by došlo ke kontaminaci negativní kontroly genomickou DNA, byl by přítomen pruh o délce 282bp nebo 78bp, 104bp, 176bp a 580bp.

V případě detekce PCR produktů o velikosti 420bp a/nebo 85bp, se jednalo o pozitivního pacienta pro alelu HLA-B\*27. Pokud byl detekován pouze pruh o velikosti 1070 pb (vnitřní kontrola), pacient byl negativní. Během každého experimentu byla vyšetřena také pozitivní kontrola (vzorek se známým genotypem) a negativní kontrola (vzorek bez přidané DNA).



Obrázek 4 Fotografie elektroforetického gelu 1. SSP PCR reakce na 4% agarózovém gelu. První jamka gelu obsahuje hmotnostní marker 100 bp DNA LADDER H3RTU. V dalších jamkách jsou přítomny PCR produkty, vyjádřeny v bp (páru bází) a poslední jamky obsahují pozitivní a negativní kontrolu.

Zdroj: Vlastní



Obrázek 5 Fotografie elektroforetického gelu 2. SSP PCR reakce na 4% agarózovém gelu. První jamka gelu obsahuje hmotnostní marker 100 bp DNA LADDER H3RTU. V dalších jamkách jsou přítomny PCR produkty, vyjádřeny v bp (páru bází) a poslední jamky obsahují pozitivní a negativní kontrolu.

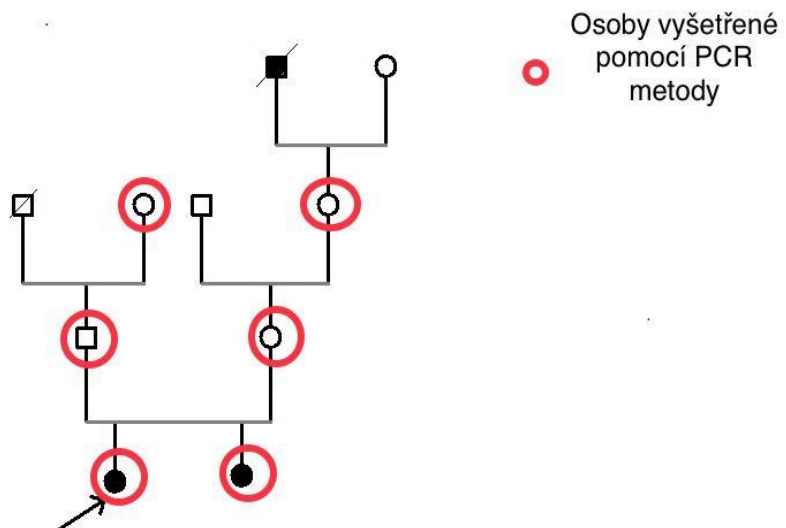
Zdroj: Vlastní

Výsledky gelové elektroforézy je možné vidět na konkrétních obrázcích, kde první jamka vždy obsahuje hmotnostní marker 100 bp DNA LADDER H3RTU. V dalších jamkách jsou přítomny PCR produkty, vyjádřeny v bp (páru bází) a poslední jamky jsou zaměřené na pozitivní a negativní kontrolu.

Na čtvrtém a pátém obrázku jsou virtualizovány výsledky PCR reakce, označeny čísly 1–6. Jedná se o vzorky DNA, které byly získány od mé rodiny včetně mne samotné. Všechny tyto vzorky byly získány z bukálních stěrů. Na obrázku č. 4 je viditelný pruh o velikosti 420 bp u vzorku 1 a 4. U 4. vzorku je navíc přítomen i pruh o velikosti 80 bp, který je u 1. vzorku méně viditelný a naopak u vzorku 4 není viditelný pruh 1070 bp odpovídající vnitřní kontrole a tento je zřetelně viditelný u vzorku č. 1. To znamená, že vzorek 1 a 4 je pozitivní pro alelu HLA-B\*27 a všechny ostatní vzorky z této vyšetřované skupiny byly pozitivní pouze v případě amplifikace vnitřní kontroly (1070 bp) a jsou proto hodnoceny jako negativní. Pozitivní kontrola i negativní kontrola vyšla dle předpokladů. V případě pozitivní kontroly byl detekován PCR produkt o velikosti 420 a 80 bp a v případě negativní kontroly nebyl přítomný žádný PCR produkt.

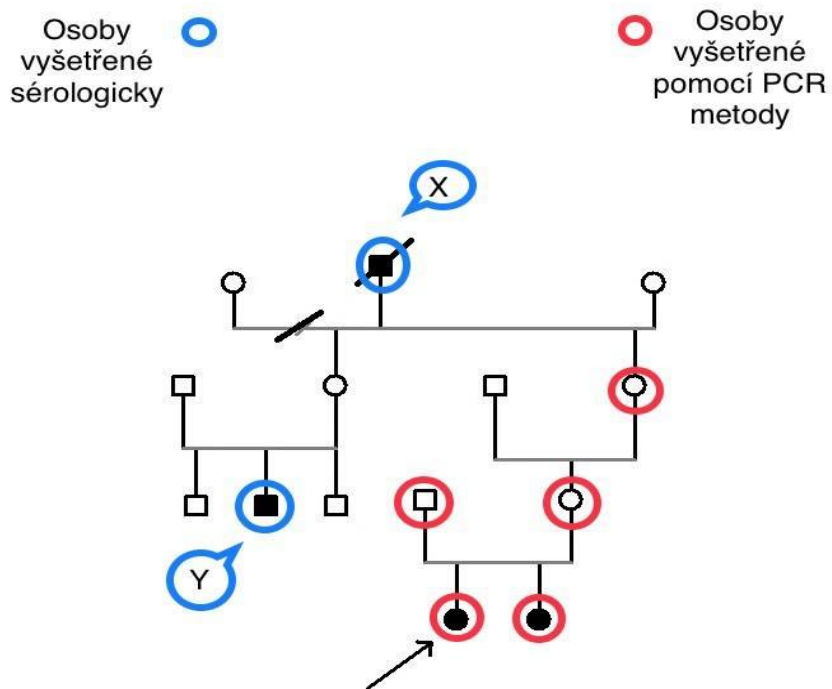
Na základě znalosti rodinné anamnézy, kdy byla Bechtěrevova choroba diagnostikována v předchozí generaci, jsem zjišťovala výskyt alely HLA-B\*27 u členů rodiny, kteří mi mohli poskytnout vzorek DNA. Nejprve jsem vyšetřila mateřskou větev, o které jsem věděla, že se zde nemoc vyskytovala, a poté i otcovskou větev,

abych zjistila, zda nejsou postižené obě dvě větve. Následně jsem vytvořila dva rodokmeny, které znázorňují dědičnost této alely v rámci mé rodiny. Na obrázku č. 6 jsou obě vyšetřované větve a jak lze vidět, v té jedné se postižená alela nevyskytuje. Na obrázku č. 7 je znázorněn rodokmen mateřské větve, v níž se sledovaná alela opakovaně vyskytuje. Z rodokmenů je patrné, že jako první byli diagnostikováni na Bechtěrevovu chorobu dva muži, kteří ale nikdy nebyli vyšetřeni pomocí genetického testu. V rámci mého experimentu byly naopak pozitivní dvě ženy.



Obrázek 7 Rodokmen 1., 2. a 3. generace, mateřská větev.

Zdroj: Vlastní



Obrázek 6 Rodokmen 1., 2. a 3. generace + další větve

Zdroj: Vlastní

Pacientky označené čísly 1 a 4, které vyšly jako pozitivní pro alelu HLA-B\*27, vykazují rozdílné symptomy onemocnění. Pacientce číslo 1 je 22 let, prvotní symptomy se projevily okolo 18. roku. Jednalo se o bolest krční páteře a ramenních kloubů. Ovšem tato bolest není dlouhodobá a nevyžaduje pravidelné návštěvy fyzioterapeuta. Ačkoli po prodělané fyzioterapii je patrná známka zlepšení či vymizení symptomů téměř až na půl roku. Pacientce číslo 4 bude v nejbližší době 15 let a symptomy má zcela odlišné. Nastaly poměrně brzy ve 13 letech. Projevují se bolestí kolenou, a to především při sportu či zvýšené fyzické námaze. Na fyzioterapie pacientka nedochází a pokud se kolena ošetří a zatepují, dojde k zpevnění a tím i k vymizení bolesti. Jinými symptomy tyto dvě pacientky netrpí ani nijak zvlášť nevyhledávají pomoc fyzioterapeutů.

Šest členů mé rodiny, které jsem vyšetřovala pomocí metody SSP PCR, je označeno v rodokmenech na obrázku 6 a 7 červeným kruhem a výsledky testu jsou uvedeny v tabulce číslo 8. Ostatní členy rodiny nebylo možné z technických důvodů vyšetřit, proto jsem musela vycházet z jejich předešlých ústně sdělených diagnóz. Pozitivní muži, které jsem pomocí genetického testu nevyšetřovala, a u kterých se Bechtěrevova choroba jistě projevila, byli vyšetřeni pouze sérologicky. Jedná se o dva pacienty znázorněné v rodokmenu na obrázku číslo 7, kde jsou označeni písmeny X a Y.

*Tabulka 8 Pacienti, kteří byli vyšetřováni mnou a pomocí metody PCR*

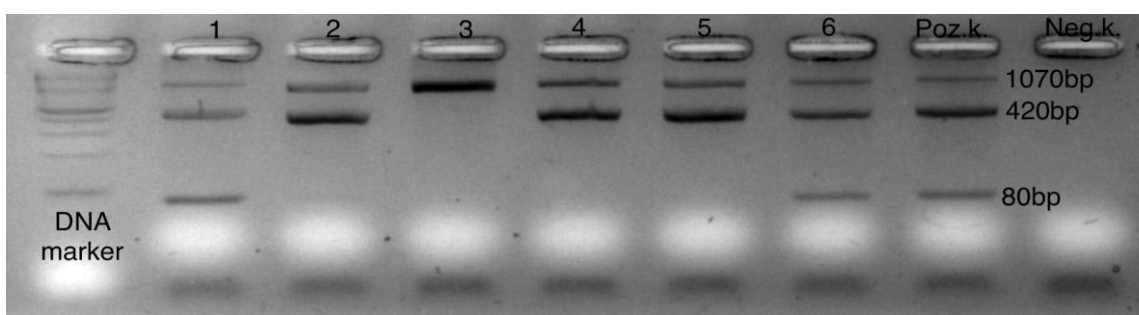
<b>Pacienti</b>	<b>Typ vyšetření</b>	<b>Výsledek</b>
1	Molekulárně-genetické	Pozitivní
2	Molekulárně-genetické	Negativní
3	Molekulárně-genetické	Negativní
4	Molekulárně-genetické	Pozitivní
5	Molekulárně-genetické	Negativní
6	Molekulárně-genetické	Negativní



Tabulka 9 Pacienti vyšetřovaní již v minulosti sérologicky

Pacienti	Typ vyšetření	Výsledek
X	Sérologické	Pozitivní
Y	Sérologické	Pozitivní

Dalšími vyšetřovanými vzorky byly pacienské vzorky získané od pacientů z jiné spřátelené laboratoře. Nepocházely tedy přímo z laboratoře GENLABS, ale díky jejich testování jsem si prakticky osvojila metodu SSP PCR pro stanovení HLA-B\*27.



Obrázek 8 Fotografie elektroforetického gelu 3. SSP PCR reakce na 4% agarózovém gelu. První jamka gelu obsahuje hmotnostní marker 100 bp DNA LADDER H3RTU. V dalších jamkách jsou přítomny PCR produkty, vyjádřeny v bp (páru bázi) a poslední jamky obsahují pozitivní a negativní kontrolu.

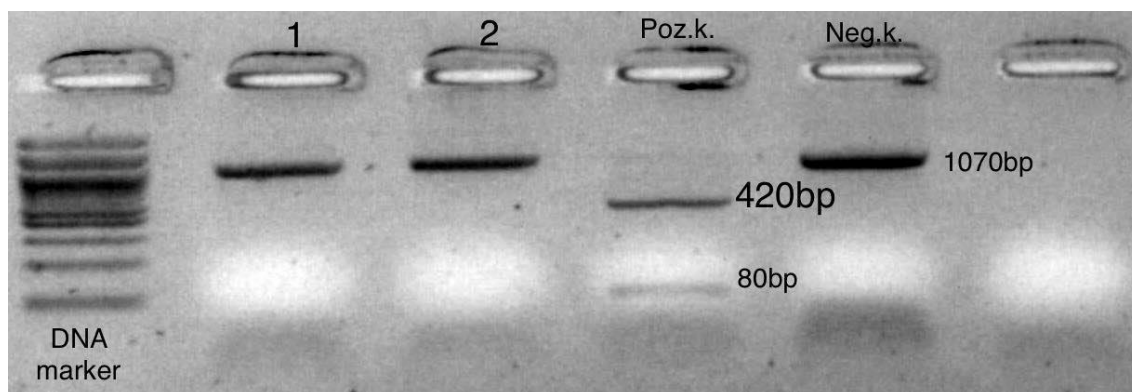
Zdroj: Vlastní

Tabulka 10 Výsledky 3. SSP PCR reakce

Pacienti	Výsledný produkt získaný pomocí SSP PCR (bp)	Výsledky
1	1070bp, 420bp, 80bp	Pozitivní
2	1070bp, 420bp	Pozitivní
3	1070bp	Negativní
4	1070bp, 420bp	Pozitivní
5	1070bp, 420bp	Pozitivní
6	1070bp, 420bp, 80bp	Pozitivní
Pozitivní kontrola	1070bp, 420bp, 80bp	Pozitivní

Negativní kontrola	-	Negativní
--------------------	---	-----------

Obrázek 8 znázorňuje výsledky vyšetření vzorků, kdy byla DNA izolována z periferní krve. V tomto případě je negativní pouze 3. vzorek. Ostatní vzorky vykazují amplifikaci pouze pro pozitivní a vnitřní kontrolu (1070 bp).



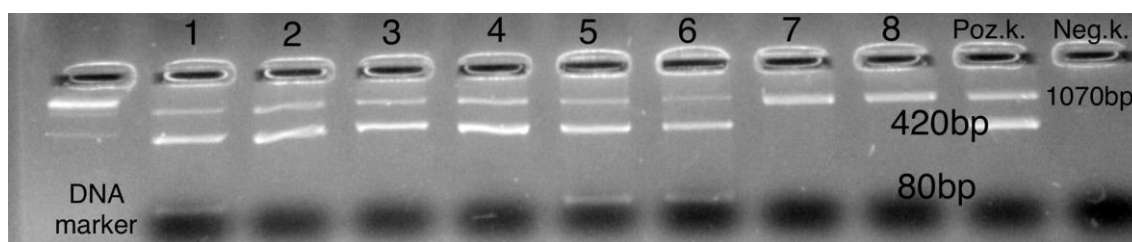
Obrázek 9 Fotografie elektroforetického gelu 4. SSP PCR reakce na 4% agarózovém gelu. První jamka gelu obsahuje hmotnostní marker 100 bp DNA LADDER H3RTU. V dalších jamkách jsou přítomny PCR produkty, vyjádřeny v bp (páru bází) a poslední jamky obsahují pozitivní a negativní kontrolu.

Zdroj: Vlastní

Tabulka 11 Výsledky 4. SSP PCR reakce

Pacienti	Výsledný produkt získaný pomocí SSP PCR (bp)	Výsledky
1	1070bp	negativní
2	1070bp	negativní
<b>Pozitivní kontrola</b>	420bp, 80bp	pozitivní
<b>Negativní kontrola</b>	1070bp	negativní

Na obrázku číslo 9 jsou dva vzorky, které byly získány z buukálních stěrů. V těchto reakcích nebyl viditelný žádný proužek kromě pozitivní kontroly.



Obrázek 10 Fotografie elektroforetického gelu 5. SSP PCR reakce na 4% agarózovém gelu. První jamka gelu obsahuje hmotnostní marker 100 bp DNA LADDER H3RTU. V dalších jamkách jsou přítomny PCR produkty, vyjádřeny v bp (páru bázi) a poslední jamky obsahují pozitivní a negativní kontrolu.

Zdroj: Vlastní

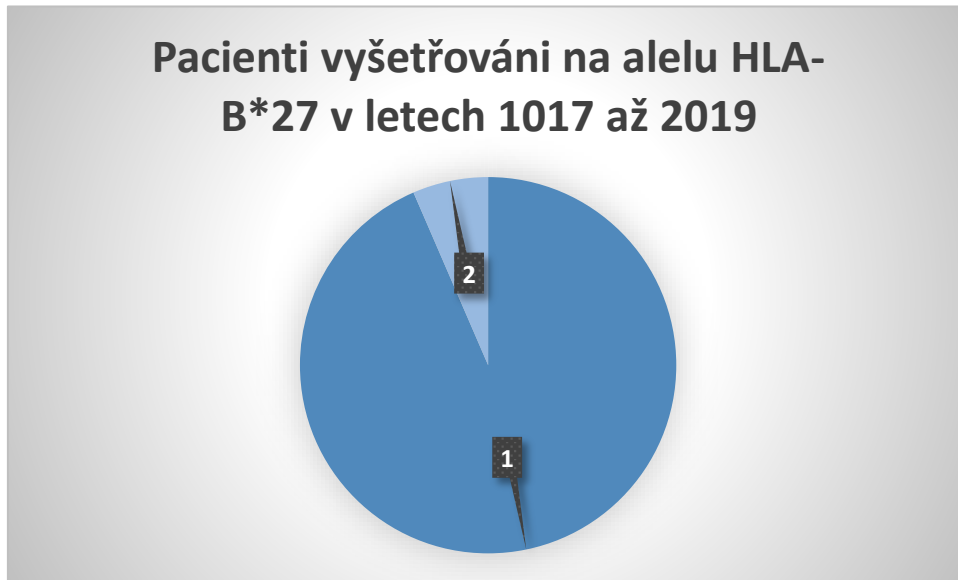
Tabulka 12 Výsledky 5. SSP PCR reakce

Pacienti	Výsledný produkt získaný pomocí SSP PCR (bp)	Výsledky
1	1070bp, 420bp, 80bp	Pozitivní
2	1070bp, 420bp	Pozitivní
3	1070bp, 420bp	Pozitivní
4	1070bp, 420bp	Pozitivní
5	1070bp, 420bp, 80bp	Pozitivní
6	1070bp, 420bp, 80bp	Pozitivní
7	1070bp	Negativní
8	1070bp	Negativní
<b>Pozitivní kontrola</b>	1070bp, 420bp	Pozitivní
<b>Negativní kontrola</b>	-	Negativní

Na obrázku číslo 10 je 8 vzorků, které byly získané z periferní krve. Pouze 7. a 8. pacient vyšel negativní a alelu HLA-B\*27 nemá.

V genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích bylo v období od roku 2017 do března roku 2020 vyšetřeno celkem 77 pacientů s požadavkem na stanovení alely HLA-B\*27. Vyšetřovaný soubor obsahuje pouze občany pocházející z České

republiky. Z celkového počtu testovaných jedinců bylo pozitivních pro HLA-B\*27 pouze 5 pacientů (6%), 72 (94%) pacientů bylo negativních, výsledná data jsou uvedena na obrázku č. 11.



Obrázek 11 Pacienti vyšetřováni v laboratoři GENLABS

Zdroj: Vlastní

V odborné literatuře, jak již zmiňuji v teoretické části této bakalářské práce, se uvádí, že alela HLA-B\*27 se vyskytuje přibližně u 6-8 % obyvatel České republiky a pouze 2 % nositelů v průběhu života Bechtěrevovou chorobou skutečně onemocní.

## 6 Diskuze

Bechtěrevova choroba/AS je celoživotní a chronické onemocnění. Přesná příčina zůstává nejasná, ovšem již dlouho je známá asociace mezi alelou HLA-B\*27 a touto nemocí. Frekvence výskytu alely HLA-B\*27 v populaci je poměrně nízká a pohybuje se v rozmezí 1,1–1,4 % a je velmi rozdílná mezi různými etnickými skupinami. (McMichae a Bowness, 2002) V české populaci se jedná o přibližně 6-8 %. (Forejtová, 2009) Nejrozšířenější alelou je HLA-B\*27:05, která se vyskytuje po celém světě a je považována za původní alelu, ze které se postupně vyvinuly všechny ostatní.

Přítomnost HLA alel u daného jedince je možné zjistit tzv. HLA typizací, a to dvěma různými způsoby, sérologicky nebo molekulárně – biologickými metodami. Sérologicky se detekují vlastnosti molekul přítomných na buněčném povrchu, kdy se využívají především typizační séra, získaná z krve matek po vícečetných těhotenstvích a produkcí monoklonálních protilátek pomocí somatické hybridizace buněk. Genetická vyšetření probíhá pomocí metody PCR a je založeno na vyšetření DNA. Právě touto metodou jsem se zabývala v praktické části své bakalářské práce.

Analýza alely HLA-B\*27 byla v této práci provedena pomocí specifických primerů a PCR reakce (SSP PCR), kdy byl ke stanovování použit komerční kit HISTO TYPE B\*27 od firmy BAG Health Care. Tento kit detekuje alelu HLA-B\*27 obecně, takže nevíme konkrétně, jaké subtypy alely HLA-B\*27 naši pozitivní pacienti mají. Pro hlubší vyšetření je možné použít komerční soupravu HISTO TYPE B\*27 Q taktéž od firmy BAG Health Care. Tato souprava detekuje všechny běžné subtypy HLA-B\*27 a navíc umí rozlišit subtypy skutečně asociované s onemocněním od subtypů HLA-B\*27:06 a HLAB\*27:09, které s Bechtěrevovou chorobou asociovány nejsou.

Hlavním cílem mé bakalářské práce bylo vyšetření mé rodiny na přítomnost alely HLA-B\*27 pomocí metody SSP PCR, přičemž hlavním důvodem byl reálný výskyt Bechtěrevovy choroby v rodinné anamnéze potvrzený pouze na základě sérologického vyšetření a přítomnosti typických příznaků u dvou diagnostikovaných členů rodiny. Genetické vyšetření nebylo předtím provedeno žádnému z členů rodiny. Díky tomuto vyšetření jsem mohla zjistit, kdo z naší rodiny nese k tomuto onemocnění vrozené predispozice a zdědil rizikovou alelu. Dalším úkolem v mé bakalářské práci bylo vyšetření vzorků několika dalších pacientů s neznámým genotypem a také zpracovat

data, které mi poskytla genetická laboratoř. Zde bylo cílem zpracovat data získaná na základě vyšetření alely HLA-B\*27 klientům laboratoře v období od roku 2017 do března roku 2020.

Výsledky, které jsem získala na základě genetické analýzy a současně odebráním rodinné anamnézy mé rodiny, byly překvapující. Genetický přenos onemocnění jsem znázornila pomocí dvou rodokmenů. Výskyt rizikové alely HLA-B\*27 bylo možné testovat bohužel pouze u některých přeživších členů rodiny a pozitivní z genetického hlediska byly nakonec pouze dvě ženy-sestry z nejmladší generace, ačkoli oba jejich rodiče byly HLA-B\*27 negativní a geneticky testován byl pouze jeden muž, otec dívek. V několika odborných studiích, např. (Akassou a Bakri, 2017) nebo (Braun a Sieper, 2007) se hovoří o tom, že muži trpí 3x častěji Bechtěrevovou chorobou a současnou pozitivitou pro HLA-B\*27 než ženy. Z důvodu velmi malého souboru se nemohu k tomuto faktu vyjádřit, ale je možné, že průběh onemocnění u pozitivních žen bude mírnější než u dvou mužů s již dříve diagnostikovanou Bechtěrevovou chorobou.

Další zvláštností je, že dědičnost této alely není nijak pravidelná. Pozitivní pacientky sice zdědily rizikovou alelu HLA-B\*27, ovšem jejich otec ani matka tuto alelu nenesou. Z odborné literatury vyplývá, že přesto, že se alela HLA-B\*27 v rodině již jednou vyskytla, její další dědičnost může být zcela náhodná (WOODROW, 1978). Obě pacientky budou mít zřejmě ve srovnání s negativními pacienty mnohem vyšší riziko rozvoje Bechtěrevovy choroby. To potvrzuje i práce (Sheehan, 2004), který tvrdí, že pacienti s alelou HLA-B\*27 mají až 16x vyšší pravděpodobnost onemocnění Bechtěrevovou chorobou, kterou jim předali příbuzní, než lidé bez této alely.

Z výsledků této studie tedy vyplývá, že alela HLA-B\*27 se v mé rodině skutečně vyskytuje, tudíž lze hovořit o přítomnosti vrozeného rizikového faktoru. Je velmi pravděpodobné, že stejná riziková alela by byla detekována i u dvou příbuzných mužů, u kterých nebylo možné provést genetický test, ale Bechtěrevova choroba u nich byla diagnostikována jinými metodami. Vyšetření výskytu alely HLA-B\*27 v mé rodině, tedy přineslo zajímavé výsledky. Dědičnost této alely není zcela jasná, jak lze vidět v sestavených rodokmenech. Není zde žádná pravidelnost v dědičném přenosu rizikové alely ani příliš velké rozdíly v pohlaví u pozitivních jedinců. Jak jsem již zmiňovala v teoretické části mé bakalářské práce, tuto nemoc ovlivňují i další enviromentální

faktory, různé infekce apod. Proto nezáleží pouze na přítomnosti této alely, ovšem stále představuje nejvíce rizikový gen pro rozvoj tohoto onemocnění.

Další zpracování výsledků dostupných z genetické laboratoře přineslo pouze statistické informace. V genetické laboratoři GENLABS bylo vyšetřeno celkem 77 zřejmě zdravých pacientů bez bližší specifikace možného onemocnění a potvrzeno 6 % pozitivních případů pro alelu HLA-B\*27. Tento výsledek odpovídá výskytu rizikové alely v České republice, který je přibližně 7 %. Tzn. že výskyt této alely není zcela ojedinělý a potvrzuje fakt, že tato alela se v této frekvenci v české populaci skutečně vyskytuje.

Závěrem je nutno podotknout, že přítomnost rizikové alely HLA-B\*27 nelze samostatně interpretovat jako potvrzení Bechtěrevovy choroby, vzhledem k tomu, že se může jednat o subtypy HLA-B\*27:06 nebo HLA-B\*27:09, které s touto nemocí nesouvisí. Dále není zcela potvrzeno, že alela HLA-B\*27 je kauzální pro vznik Bechtěrevovy choroby. Tuto nemoc lze definitivně potvrdit až po několika letech vyskytujících se symptomů a doplněním vyšetření sérologickými testy.

## 7 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala sepsáním odborné rešerše na téma stanovení výskytu alely HLA-B\*27 v české populaci a její význam pro diagnostiku Bechtěrevovy choroby. V rámci teoretické části jsem podrobně popsala HLA systém, který je pro toto onemocnění zásadní. Věnovala jsem se především alele HLA-B\*27, která představuje nejvýznamnější vrozený rizikový faktor pro rozvoj AS ačkoli neméně významné jsou i další genetické a environmentální faktory.

V praktické části bylo hlavním cílem osvojení si správné laboratorní praxe v genetické laboratoři, která může být rozdělena na preanalytickou a analytickou část laboratorního vyšetření. Podstatou této části bakalářské práce bylo zejména seznámení se s obsluhou přístrojů potřebných pro vyšetření alely HLA-B\*27 pomocí komerčního kitu HISTO TYPE B\*27 od firmy BAG Health Care, metodou SSP PCR a také s dalšími běžnými laboratorními postupy zahrnujícími např. izolaci DNA z periferní krve a bukalního stěru, měření koncentrace DNA, gelovou elektroforézu apod. Poslední částí byla analýza a interpretace získaných výsledků.

Na základě dat získaných genetickým testováním příslušníků své rodiny lze tvrdit, že skutečně existuje jistá dědičnost rizikové alely HLA-B\*27 v této rodině. Pokud byla Bechtěrevova choroba v minulosti již dvakrát diagnostikována, je velmi pravděpodobné, že dvě pozitivní pacientky, mají celoživotní reálné riziko vzniku onemocnění Bechtěrevovou chorobou.

Přes 45ti letý výzkum však přesná role alely HLA-B\*27 v patogenezi Bechtěrevovy choroby nebyla zcela definována a není tedy jasné, jaká je její skutečná fyziologická funkce v tomto kontextu. Proto je nezbytné provést další studie, které by mohly zjistit vztah nejen ostatních alel HLA-B\*27, ale i jiných genů, k tomuto onemocnění a pomoci blíže odhalit jejich roli v mechanismu patogeneze Bechtěrevovy choroby.



## 8 Seznam použité literatury

AHVONEN, P., SIEVERS, K., 1969. Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infection. *Acta Rheumatol Scandinavica* [online]. 15(1-4), 232-253 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.3109/rhe1.1969.15.issue-1-4.32. ISSN 0001-6934. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/rhe1.1969.15.issue-1-4.32>

AKASSOU, A., BAKRI, Y., 2017. Does HLA-B27 Status Influence Ankylosing Spondylitis Phenotype?. *Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders* [online]. 11 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1177/1179544117751627. ISSN 1179-5441. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1179544117751627>

BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M., 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii - 2., přepracované a doplněné vydání*. 2. Praha: Grada Publishing a.s. 172 s.

BODMER, W. F., 1987. The HLA system: structure and function. *Journal of Clinical Pathology*. (40), 948-958. DOI: 10.1136/jcp.40.9.948. Dostupné z: <https://jcp.bmj.com/content/jclinpath/40/9/948.full.pdf>

BORRA, J., GONZÁLEZ, S., LARREA, C., 2000. Genetic factors predisposing to spondylarthropathies. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*. American College of Rheumatology, (43), 485-492. DOI: 10.1002/1529-0131(200003)43:3<485::AID-ANR2>3.0.CO;2-0. Dostupné z: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1529-0131\(200003\)43:3%3C485::AID-ANR2%3E3.0.CO;2-0](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1529-0131(200003)43:3%3C485::AID-ANR2%3E3.0.CO;2-0)

BRAUN, J., SIEPER, J., 2007. Ankylosing spondylitis: an overview. *The Lancet*. [online]. 369(9570), 1379-1390 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60635-7. ISSN 01406736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673607606357>

BROPHY, S., TAYLOR, G., CALIN, A., MACKAY, K., 2002. The Natural History of Ankylosing Spondylitis as Defined by Radiological Progression. *The Journal of Rheumatolog*.(6). ISSN 1499-2752. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12064842/>

CALIN, A., PORTA, J., FRIES, JF., 1977. Clinical history as a screening test for ankylosing spondylitis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* [online]. 237(24) 2613-2614 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1001/jama.1977.03270510035017. ISSN 0098-7484. Dostupné z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1977.03270510035017>

CARTER, N., WILLIAMSON, N., KENNEDY, L., BROWN, M., WORDSWORTH, B., 2000. Susceptibility to ankylosing spondylitis. *Rheumatology*. [online]. 39(4), 445-445 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1093/rheumatology/39.4.445. ISSN 14602172. Dostupné z: <https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/39.4.445>

DASHTI, N., MAHMOUDI, M., ASLANI, S., JAMSHIDI, A., 2018. HLA-B\*27 subtypes and their implications in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Gene*. [online]. 670, 15-21 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1016/j.gene.2018.05.092. ISSN 03781119. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111918305894>

EBRINGER, A., WILSON, C., 2000. HLA molecules, bacteria and autoimmunity. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 49(4), 305-311 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1099/0022-1317-49-4-305. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/0022-1317-49-4-305>

EDAVALATH, M., 2010. Ankylosing spondylitis. *Journal of Ayurveda & Integrative Medicine*. [online]. 1(3) [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.4103/0975-9476.72619. ISSN 0975-9476. Dostupné z: <http://www.jaim.in/text.asp?2010/1/3/211/72619>

FELDTKELLER, E., KHAN, M., VAN DER HEIJDE, D., VAN DER LINDEN, S., BRAUN, J.. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology International* [online]. 2003, 23(2), 61-66 [cit. 2020-05-27]. DOI: 10.1007/s00296-002-0237-4. ISSN 0172-8172. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00296-002-0237-4>

FOREJTOVÁ, Š., 2009. Diagnostika a léčba spondylartritid. *Medicína pro praxi*. Praha, 2009(30), 1-4.

GARCIA-MONTOYA, L., GUL, H., EMERY, P., 2018. Recent advances in ankylosing spondylitis: understanding the disease and management. *F1000 Research*. [online]. 7, 1512-1523 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.12688/f1000research.14956.1. ISSN 2046-1402. Dostupné z: <https://f1000research.com/articles/7-1512/v1>

GORMAN, J., SACK, K., DAVIS, J., 2002. Treatment of Ankylosing Spondylitis by Inhibition of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ . *The New England Journal of Medicine*. [online]. 346(18), 1349-1356 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1056/NEJMoa012664. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa012664>

HATINA, J., SYKES, B., 1999. *Lékařská genetika: problémy a přístupy*. Vyd. 1. Praha: Academia. 298 s. ISBN 80-200-0700-8.

HERMANN, E., YU, D., FLEISCHER, B., 1993. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet*. [online]. 342(8872), 646-650 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1016/0140-6736(93)91760-J. ISSN 01406736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014067369391760J>

HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J., BRDIČKA, T., ŠPÍŠEK, R., 2017. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton. 304 s. ISBN 978-80-7553-250-3.

CHOO, S.Y., 2007. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Medical Journal*. [online]. 48(1), 11-23 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.3349/ymj.2007.48.1.11. ISSN 0513-5796. Dostupné z: <https://eymj.org/DOIX.php?id=10.3349/ymj.2007.48.1.11>

CHOU, C.T., 2001. Factors affecting the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Chinese Medical Journal*. [online]. 114(2), Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11780212/>

JAH, N., JOBART-MALFAIT, A., ERMOZA, K., NOTEUIL, A., CHIOCCHIA, G., BREBAN, M., ANDRÉ, C., 2020. HLA-B27 subtypes predisposing to ankylosing spondylitis accumulate in endoplasmic reticulum-derived compartment apart from the peptide-loading complex. *Arthritis Rheumatology*. [online]. [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1002/art.41281. ISSN 23265191. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.41281>

JORDE, L., 2015. *Medical Genetics*. 6. Elsevier Books. 352 s. ISBN 9780323597371.

KHAN, M. A., 1988. Genetics of HLA B27. *Rheumatology* [online]. XXVII(suppl 2), 6-11 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1093/rheumatology/XXVII.suppl\_2.6. ISSN 1462-0324. Dostupné z: [https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/XXVII.suppl\\_2.6](https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/XXVII.suppl_2.6)

KHAN, M.A., 2013. Polymorphism of HLA-B27: 105 subtypes currently known. *Current Rheumatology Reports*. [online]. 15(10), 362-368 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1007/s11926-013-0362-y. ISSN 1523-3774. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11926-013-0362-y>

KHAN, M.A., 2017. An Update on the Genetic Polymorphism of HLA-B\*27 With 213 Alleles Encompassing 160 Subtypes (and Still Counting). *Current Rheumatology Reports*. [online].19(2) [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1007/s11926-017-0640-1. ISSN 1523-3774. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11926-017-0640-1>

KIM, M., WON, J.Y., CHOI, S.Y., JU, Ji.H., PARK, Y.-H.. Anti-TNF $\alpha$  Treatment for HLA-B27-Positive Ankylosing Spondylitis–Related Uveitis. *American Journal of Ophthalmology* [online]. 2016, 170, 32-40 [cit. 2020-05-27]. DOI: 10.1016/j.ajo.2016.07.016. ISSN 00029394. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002939416303609>

KLENER, P., 2006. *Revmatologie. Vnitřní lékařství*. Praha: Galén: Karolinum, 965-1017. 1174 s. ISBN 80-7262-430-X.

KREJSEK, J., ANDRÝS, C., KRČMOVÁ, I., 2016. *Imunologie člověka*. 1. vydání. Hradec Králové: Garamon s.r.o. 495 s. ISBN 978-80-86472-74-4.

LEVITOVÁ, A., HUŠÁKOVÁ, M., 2018. *Bechtěrevova nemoc: návod na aktivní život a průvodce cvičením*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing. 258 s. ISBN 978-80-271-2008-6.

MADDEN, D.R., GORGA, J.C., STROMINGER, J.L., WILEY, D.C, 1991. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature*. [online]. 353(6342), 321-325 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1038/353321a0. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/353321a0>

MCKIERNAN, S.M., HAGAN, R., CURRY, M. et al., 2004. Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology*. [online]. 40(1), 108-114 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1002/hep.20261. ISSN 0270-9139. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.20261>

MCMICHAEL, A., BOWNESS, P., 2002. HLA-B27: natural function and pathogenic role in spondyloarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. [online]. 4(Suppl 3), 153-158 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1186/ar571. ISSN 14659905. Dostupné z: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar571>

MCVEIGH, C., CAIRNS, A., 2006. Diagnosis and management of ankylosing spondylitis. *The BMJ*. [online]. 333(7568), 581-585 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1136/bmj.38954.689583.DE. ISSN 0959-8138. Dostupné z: <http://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.38954.689583.DE>

MOSAAD, Y. M., 2015. Clinical Role of Human Leukocyte Antigen in Health and Disease. *The Foundation for the Scandinavian Journal of Immunology*. [online]. 82(4), 283-306 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1111/sji.12329. ISSN 03009475. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/sji.12329>

NOSENT, J., BAKLAND, G., ALSING, R., SINGH, K., 2013. Assessment of SpondyloArthritis International Society criteria for axial spondyloarthritis in chronic back pain patients with a high prevalence of HLA-B27. *Arthritis Care and Research*. [online]. 65(3), 448-453 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1002/acr.21804. ISSN 2151464X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/acr.21804>

PAVELKA, K., ROVENSKÝ, J., 2003. *Klinická revmatologie*. 1. vyd. Praha: Galén. 952 s. ISBN 80-7262-174-2.

PAVELKA, K., VENCOVSKÝ, J., ŠENOLT, L., HORÁK, P., OLEJÁROVÁ, M., TOMČÍK, M., ZÁVADA, J., ŠTĚPÁN, J., 2017. *Farmakoterapie revmatických onemocnění*. Praha: Maxdorf. Jessenius. 436 s. ISBN 978-80-7345-537-8.

PENKA, M., LAVÍČKOVÁ, E., 2012. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada. 208 s. ISBN 978-80-247-3460-6.

REVEILLE, J. D., 2006. Major histocompatibility genes and ankylosing spondylitis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. [online]. 20(3), 601-609 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1016/j.berh.2006.03.004. ISSN 15216942. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521694206000337>

ROVENSKÝ, J., 2006. *Revmatologický výkladový slovník*. 1. vyd. Praha: Grada. 280 s. ISBN 80-247-1614-3.

SHEEHAN, N. J., 2004. The ramifications of HLA-B27. *Journal of The Royal Society of Medicine J*. [online]. 97(1), 10-14 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1258/jrsm.97.1.10. ISSN 0141-0768. Dostupné z: <http://jrsm.rsmjournals.com/cgi/doi/10.1258/jrsm.97.1.10>

SHOENFELD, Y., FUČÍKOVÁ, T., BARTUŇKOVÁ, J., 2007. *Autoimunita: vnitřní nepřítel*. 1. Praha: Grada. 96 s. ISBN 978-80-247-2044-9.

SONKAR, G.K., USHA, SINGH, S., 2008. Is HLA-B27 a useful test in the diagnosis of juvenile spondyloarthropathies?. *Singapore Medical Journal*. PMID: 18946613. Dostupné z: <http://smj.sma.org.sg/4910/4910a6.pdf>

STAFFORD, L., YOUSSEFF, P.P., 2008. Spondyloarthropathies: an overview. *Internal Medicine Journal*. [online]. 32(1-2), 40-46 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1046/j.1445-5994.2002.00132.x. ISSN 1444-0903. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1445-5994.2002.00132.x>

STRACHAN, T., READ, A., 2010. *Human Molecular Genetics*. 4. New York: Garland Science. 770 s. ISBN 978-0-815-34149-9.

ŠMARDA, J., SUCHARDOVÁ, M., 2010. *Genetika*. Fortuna. 144 s.

THOMPSON, J., THOMPSON, M., WILLARD, H., MCINNES, R., NUSSBAUM, R., 2004. *Klinická genetika*. 6. 492 s. Triton.

WOODROW, J., EASTMOND, C., 1978. HLA B27 and the genetics of ankylosing spondylitis. *From the Department of Medicine*. [online]. 37(6), 504-509 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.1136/ard.37.6.504. ISSN 0003-4967. Dostupné z: <http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/ard.37.6.504>

XIONG, J., CHEN, J., TU, J., 2014. Association of HLA-B27 status and gender with sacroiliitis in patients with ankylosing spondylitis. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. [online]. 30(1), 22-27 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.12669/pjms.301.3896. ISSN 1681-715X. Dostupné z: <http://pjms.com.pk/index.php/pjms/article/view/3896>

ZHAO, Yi., 2017. HLA-B27 Correlates with the Intracellular Elimination, Replication, and Trafficking of Salmonella Enteritidis Collected from Reactive Arthritis Patients. *Medical science monitor*. [online]. 23, 5420-5429 [cit. 2020-05-20]. DOI: 10.12659/MSM.904681. ISSN 1643-3750. Dostupné z: <https://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/904681>

## 9 Seznam obrázků

Obrázek 1 Vzhled bambusové páteře.....	13
Obrázek 2 Normální vzhled páteře x AS.....	16
Obrázek 3 Porovnání aminokyselinových zbytků běžných subtypů nesouvisejících s onemocněním se subtypy asociovanými s nemocí.....	30
Obrázek 4 Fotografie elektroforetického gelu 1. SSP PCR reakce na 4% agarózovém gelu. První jamka gelu obsahuje hmotnostní marker 100 bp DNA LADDER H3RTU. V dalších jamkách jsou přítomny PCR produkty, vyjádřeny v bp (páru bází) a poslední jamky obsahují pozitivní a negativní kontrolu.....	44
Obrázek 5 Fotografie elektroforetického gelu 2. SSP PCR reakce na 4% agarózovém gelu. První jamka gelu obsahuje hmotnostní marker 100 bp DNA LADDER H3RTU. V dalších jamkách jsou přítomny PCR produkty, vyjádřeny v bp (páru bází) a poslední jamky obsahují pozitivní a negativní kontrolu.....	45
Obrázek 7 Rodokmen 1., 2. a 3. generace + další větve.....	47
Obrázek 6 Rodokmen 1., 2. a 3. generace, mateřská větev. ....	47
Obrázek 8 Fotografie elektroforetického gelu 3. SSP PCR reakce na 4% agarózovém gelu. První jamka gelu obsahuje hmotnostní marker 100 bp DNA LADDER H3RTU. V dalších jamkách jsou přítomny PCR produkty, vyjádřeny v bp (páru bází) a poslední jamky obsahují pozitivní a negativní kontrolu.....	49
Obrázek 9 Fotografie elektroforetického gelu 4. SSP PCR reakce na 4% agarózovém gelu. První jamka gelu obsahuje hmotnostní marker 100 bp DNA LADDER H3RTU. V dalších jamkách jsou přítomny PCR produkty, vyjádřeny v bp (páru bází) a poslední jamky obsahují pozitivní a negativní kontrolu.....	50
Obrázek 10 Fotografie elektroforetického gelu 5. SSP PCR reakce na 4% agarózovém gelu. První jamka gelu obsahuje hmotnostní marker 100 bp DNA LADDER H3RTU. V dalších jamkách jsou přítomny PCR produkty, vyjádřeny v bp (páru bází) a poslední jamky obsahují pozitivní a negativní kontrolu.....	51



Obrázek 11 Pacienti vyšetřováni v laboratoři GENLABS .....52

## 10 Seznam tabulek

Tabulka 1 Klinické rozdělení spondyloartritid do podskupin .....	13
Tabulka 2 Subtypy alely HLA-B*27.....	30
Tabulka 3 Reagencie a jejich objemy použité při izolaci DNA z bukalního stěru .....	36
Tabulka 4 Reagencie a jejich objem při izolaci DNA z periferní krve .....	38
Tabulka 5 Koncentrace izolované DNA získané z bukalních stěrů .....	40
Tabulka 6 Reagencie master-mixu na 1 reakci .....	41
Tabulka 7 Parametry SSP PCR.....	42
Tabulka 8 Pacienti, kteří byli vyšetřováni mnou a pomocí metody PCR .....	48
Tabulka 9 Pacienti vyšetřováni již v minulosti sérologicky .....	49
Tabulka 10 Výsledky 3. SSP PCR reakce .....	49
Tabulka 11 Výsledky 4. SSP PCR reakce .....	50
Tabulka 12 Výsledky 5. SSP PCR reakce .....	51

## 11 Seznam zkratek

AMK = Aminokyseliny

AS = Ankylozující spondylitida

ASAS = Assessment of SpondyloArthritis international Society, mezinárodní společnost pro spondyloartritidy

Asp = Kyselina asparagová

BC = Bechtěrevova choroba

CD = Cluster of Differentiation, diferenciační skupina lymfocytů

DNA = Deoxyribonukleová kyselina

dATP = Deoxadenozintrifosfát

dCTP = Deoxycytozintrifosfát

ddNTP = Dideoxyribonukleotidy

dGTP = Deoxyguanozintrifosfát

dTTP = Deoxytymidintrifosfát

Glu = Kyselina glutamová

HLA = Human Leukocyte Antigen, lidské leukocytární antigeny

His = Histidin

IgG = Imunoglobulin G

LCT = Lymfocytotoxický test

MHC = Major Histocompatibility Complex, hlavní histokompatibilní komplex

NK = Natural killers, přirození zabíječi

PCR = Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce

PCR – SSP = Polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery

PCR – SSO = Polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými oligosondami

RNA = Ribonukleová kyselina

RT = Room Temperature, pokojová teplota

SBT = Sequence Based Typing, přímé sekvenování

SI = Sakroiliakální kloub

TNF = Tumor nekrotizující faktor

UV = Ultraviolet, ultrafialové záření

Val = Valin