

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**ÚSTAV IMUNOLOGIE**

## **DIZERTAČNÍ PRÁCE**

### **Imunologické laboratorní testy u systémových autoimunitních onemocnění**

**Vypracovala: MUDr. Zuzana Heřmanová**

**Školitel: prof. MUDr. Pavel Horák, CSc.**

**Studijní obor: lékařská imunologie**

**Olomouc, duben 2014**

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně pod vedením prof. MUDr. Pavla Horáka, CSc. a v seznamu literatury jsem uvedla všechny použité literární a odborné zdroje.

V Olomouci dne

MUDr. Zuzana Heřmanová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji prof. MUDr. Pavlu Horákovi, CSc. za odborné vedení, připomínky, cenné rady a vstřícnost při zpracování dizertační práce.

V Olomouci dne

MUDr. Zuzana Heřmanová

# **OBSAH**

Seznam zkratk

## **1. Přehled současného stavu problematiky**

### 1.1 Úvod

#### 1.2 Imunitní systém a autoimunita

##### 1.2.1 Základní charakteristika imunitního systému

##### 1.2.2 Historické milníky pohledu na autoimunitu

##### 1.2.3 Fyziologická a patologická autoimunitní reakce

##### 1.2.4 Indukce tolerance

##### 1.2.5 Etiologie autoimunitních onemocnění

#### 1.3 Autoimunitní choroby

##### 1.3.1 Fáze autoimunitního onemocnění

##### 1.3.2 Orgánově specifická a nespecifická autoimunitní onemocnění

##### 1.3.3 Revmatoidní artritida jako nejčastější systémové autoimunitní onemocnění

##### 1.3.4 Systémový lupus erythematoses jako prototyp autoimunitního orgánově nespecifického onemocnění

## **2. Cíle práce**

## **3. Vlastní práce**

### 3.1 Význam stanovení anticitrulinových protilátek v diagnostice RA

#### 3.1.1 Úvod

#### 3.1.2. Materiál a metodika

#### 3.1.3. Výsledky

#### 3.1.4. Diskuze

### 3.2 Význam stanovení protilátek proti mutovanému citrulinovanému vimentinu u pacientů s RA

#### 3.2.1 Úvod

#### 3.2.2. Materiál a metodika

#### 3.2.3. Výsledky

- 3.2.4. Diskuze
- 3.3 Posouzení přínosu stanovení sérové hladiny matrixové metaloproteinázy 3 v kontextu ostatních nálezů pro identifikaci pacientů ve větším riziku rozvoje destruktivní polyartritidy u RA
  - 3.3.1 Úvod
  - 3.3.2. Materiál a metodika
  - 3.3.3. Výsledky
  - 3.3.4. Diskuze
- 3.4 Posouzení přínosu stanovení hladin vybraných složek komplementu (C3, C4, C1q) a anti-C1q protilátek pro zhodnocení aktivity SLE a přítomnosti lupusové nefritidy
  - 3.4.1 Úvod
  - 3.4.2. Materiál a metodika
  - 3.4.3. Výsledky
  - 3.4.4. Diskuze
- 3.5 Posouzení přínosu vyšetření antinukleozomálních protilátek, neopterinu, trombomodulinu a dalších markerů včetně tradičních testů jako indikátorů klinické aktivity SLE a nástrojů k monitoraci průběhu choroby
  - 3.5.1 Úvod
  - 3.5.2. Materiál a metodika
  - 3.5.3. Výsledky
  - 3.5.4. Diskuze
- 3.6 Posouzení přínosu vyšetření molekul sCD30 a sCD40L jako potenciálních indikátorů aktivity SLE
  - 3.6.1 Úvod
  - 3.6.2. Materiál a metodika
  - 3.6.3. Výsledky
  - 3.6.4. Diskuze

#### **4. Závěrečné shrnutí**

#### **5. Seznam literatury**

#### **6. Seznam přednášek, abstrakt a publikací se vztahem k problematice dizertační práce**

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ab	protilátka
ACR	American College of Rheumatology
ACLA	antikardiolipinové protilátky
ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)
AIDS	syndrom získané imunodeficiencie
Ag	antigen
AIRE	autoimunitní regulátor (autoimmune regulator)
ALPS	autoimunitní lymfoproliferativní syndrom (autoimmune lymphoproliferation syndrome)
ANA	antinukleární protilátky
anti-CCP	protilátky proti cyklickému citrulinovanému peptidu
anti-dsDNA	protilátky proti dvoušroubovici deoxyribonukleové kyseliny
anti-La	protilátky anti-La (anti-SSB)
anti-MCV	protilátky proti mutovanému citrulinovanému vimentinu
anti-Ro	protilátky anti-Ro (anti-SSA)
anti-Sm	protilátky anti-Sm
anti-U1RNP	protilátky proti ribonukleoproteinu
APC	antigen prezentující buňky
APECED	autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy
APS-1	autoimmune polyglandular syndrome – type I
ARA	American Rheumatism Association
ASIA	autoimmune/autoinflammatory syndrome induced by adjuvants
C1q	C1q složka komplementu
C3	C3 složka komplementu
C4	C4 složka komplementu
CD	povrchový znak buněk (cluster of differentiation)
CMV	cytomegalovirus
CNS	centrální nervový systém
CRP	C-reaktivní protein
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen

CVID	běžný variabilní imunodeficit
DAS28	skóre aktivity choroby hodnotící 28 kloubů (disease activity score 28)
DC	dendritická buňka
DFS70	obraz fluorescence na HEp2 buňkách (dense fine speckled)
DM	diabetes mellitus
EBV	virus Epstein-Barrové
ECLAM	skórovací systém aktivity (European consensus lupus activity measurement)
ELISA	laboratorní metoda (enzyme linked immunosorbent assay)
ENA	protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům
EULAR	European League Against Rheumatism
Fas a FasL	dvojice transmembránových glykoproteinů uplatňujících se v procesu apoptózy
F <sub>c</sub>	fragment imunoglobulinu, koncová část obou dvou těžkých řetězců
FOXP3	transkripční protein pro vývoj a funkci regulačních T lymfocytů
FW	sedimentace erytrocytů (podle A. Fahraeuse a A. Westergrena)
GM-CSF	granulocyty-monocyty kolonie stimulující faktor
HEp2 buňky	lidské epiteliální buňky
HLA	lidský histokompatibilní systém (human leukocyte antigen)
HSP	protein tepelného šoku
HSV	herpes simplex virus
ICAM-1	intercelulární adhezivní molekula
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IK	imunokomplex
IL	interleukin
IPEX	immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy
MCTD	smíšená choroba pojiva
MMP	matrixová metaloproteináze
NFκB	nukleární transkripční faktor κ B
NK	přirození zabíječi (natural killers)
OR	odds ratio
p	hladina významnosti
PAD	peptidylarginindeimináza

PMN	polymorfonukleáry
r	korelační koeficient
RA	revmatoidní artritida
RF	revmatoidní faktor
RR	relativní riziko
SLE	systemový lupus erythematoses
SLEDAI	skórovací systém aktivity (SLE disease activity index)
SLICC	index poškození (systemic lupus international collaborating clinics)
TGF $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ )
Th1, Th2	subpopulace pomocných T lymfocytů
Treg	regulační T lymfocyty
TIMP	tkáňový inhibitor matrixové metaloproteinázy (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase)
TLR	Toll like receptor
TM	trombomodulin
TNF	tumor nekrotizující faktor
VCAM-1	vaskulární celulární adhezivní molekula

# 1. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

## 1.1 Úvod

Autoimunitní choroby postihují nezanedbatelný počet obyvatelstva ve vyspělých zemích. Často se jedná o chronická postižení, která tak představují závažný medicínský problém. U autoimunitního onemocnění dochází k nadměrné a nežádoucí reakci imunitního systému vůči vlastním buňkám a tkáním s následným rozvojem zánětu. V konečné fázi onemocnění se mohou objevit závažné poruchy funkce řady orgánů. Diagnostika těchto stavů nebývá, zejména v počátečním období, jednoduchá. Laboratorní diagnostika spolu se zobrazovacími metodami napomáhá stanovení správné diagnózy.

## 1.2 Imunitní systém a autoimunita

### 1.2.1 Základní charakteristika imunitního systému

Imunitní systém představuje významný regulační nástroj lidského organismu, který se podílí na udržování identity a integrity jedince. Účastní se udržování homeostázy, což je stav dynamické rovnováhy organismu. Rozpoznává vlastní a cizí struktury. Rozlišuje, co je pro organismus prospěšné a naopak škodlivé; prospěšné je tolerováno, škodlivé faktory jsou eliminovány. Imunitní systém zajišťuje optimální existenci organismu v daných podmínkách. Velmi úzce spolupracuje s nervovým, endokrinním a hematopoetickým systémem. Vzájemná komunikace mezi buňkami se uskutečňuje prostřednictvím humorálních mediátorů (cytokinů) nebo vzájemným kontaktem molekul na povrchu buněk. Strukturální úrovně imunitního systému zahrnují molekuly (např. imunoglobuliny, molekuly HLA, receptory T a B lymfocytů), buňky (např. T a B lymfocyty, fagocytující buňky, APC – antigen prezentující buňky, NK buňky – přirození zabíječi) a lymfatické tkáně a orgány (primární – kostní dřeň, thymus; sekundární – slezina, lymfatické uzliny).

Imunitní reakce dělíme na specifické a nespecifické, obě složky spolu úzce spolupracují. Nespecifická imunita je vývojově starší a je připravena řádově v minutách uniformně zareagovat na přítomnost jakékoliv noxy. Řadíme k ní komplementový systém, fagocytující buňky a NK buňky. Tato část imunitního systému nemá specifické receptory pro jednotlivé antigeny, reaktivita není ovlivněna předchozím setkáním s antigenem.



Specifická reaktivita se objevuje řádově v hodinách či dnech, je zajišťována T lymfocyty a imunoglobuliny. Reakce jsou přísně specifické, antigen zapadá do odpovídajícího receptoru jako klíč do zámku. Při reakci s příslušným antigenem vznikají i paměťové dlouhožijící buňky, které zajišťují specifickou imunologickou paměť. Při opakovaném setkání s daným antigenem je sekundární reakce imunitního systému rychlejší a účinnější. Tento fenomén se využívá např. u očkování.

Funkce imunitního systému spočívá mimo jiné v ochraně organismu před infekcí, v zajištění průběžného odstraňování vlastních nevhodných buněk (starých, poškozených, nádorově změněných) a v ustavení tolerance vůči vlastním buňkám a tkáním (Fučíková 1994, Stites 1994, Lochmanová 2006).

Při poruchách imunitního systému se setkáváme jednak s imunodeficitními stavy, které jsou charakterizovány sníženou celkovou reaktivitou imunitního systému jako celku nebo jeho jednotlivých etází. Základním příznakem u imunodeficiencí může být zvýšená náchylnost k infekcím. Na druhé straně u predisponovaných jedinců se objevují nepřiměřené, nadměrné reakce na zevní antigeny (alergeny) u alergických pacientů. Při neadekvátní reakci na antigeny vlastních buněk vznikají autoimunitní onemocnění.

### **1.2.2 Historické milníky pohledu na autoimunitu**

Na přelomu 19. a 20. století byl pohled na autoimunitu výrazně ovlivněn Paulem Ehrlichem, nositelem Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu, a autorem pojmu autoimunita. Na základě řady pokusů a sledování usoudil, že v těle existuje nějaký mechanismus, který zabraňuje reakcím proti vlastním buňkám a tkáním. Avšak poruchou tohoto mechanismu by existence organismu byla silně ohrožena. Tento stav nazval „horror autotoxicus“. Na dlouhou dobu byly teorie o autoimunitě zakonzervovány. Až v roce 1945 Coombs jednoznačně popsal a dokázal existenci autoprotilátek proti erytrocytům, které jsou zodpovědné za jejich rozpad a vznik hemolytické anémie. Autoprotilátky byly prokázány použitím nepřímého aglutinačního testu. Následovaly důkazy o přímé souvislosti mezi přítomností autoprotilátek a zánětlivým onemocněním štítné žlázy. V roce 1948 popsal Hargraves LE buňky. Představují leukocyty pohlcující jádro druhého leukocytu. Pozitivní nález LE buněk byl dlouhodobě laboratorně využíván pro diagnostiku systémového lupus erythematoses (SLE). V roce 1950 si Harrington aplikoval sérum pacienta s idiopatickou trombocytopenickou purpurou a onemocněl touto nemocí. Podal tím důkaz o možnosti přenosu onemocnění krví z jedné osoby na druhou a také to, že

v séru se musí vyskytovat určitý faktor, který ničí krevní destičky. To vede k trombocytopenii a následnému krvácení. Až později byly tyto faktory označeny za protilátky. V roce 1959 byly představeny první myší modely s autoimunitní chorobou. Kmeny myší označené NZB (New Zealand Black) spontánně onemocněly hemolytickou anémií a staly se modelem pro studium mechanismů působení autoprotilátek. Zkřížení s kmenem myší NZW (New Zealand White) vedlo k potomstvu, které onemocnělo SLE. V roce 1960 byly popsány autoprotilátky u myasthenia gravis. Teorie o existenci autoprotilátek jako příčiny autoimunitních nemocí byla přijata jako první. Autoreaktivní T lymfocyty byly prokázány až o půl století později (Shoenfeld 2007, Stites 1994).

Současně s důkazem autoimunitní příčiny řady onemocnění se objevovaly otázky po způsobu, jakým organismus navozuje toleranci vůči vlastním antigenům a proč dochází k jejím poruchám. V roce 1949 F. M. Burnet a další vyslovili hypotézu, že pokud se vpraví do organismu antigen během jeho embryonálního vývoje ještě před maturací imunitního systému, nevzniká imunitní odpověď, ale naopak, specifická neodpovídavost. Byl zaveden pojem imunitní tolerance. Hypotéza byla později potvrzena zásluhou např. R. Billingham, P. B. Medawara a M. Haška.

V následujícím období byla provedena řada experimentů, která pomáhala objasnit patogenezi řady onemocnění a odhalila jejich autoimunitní původ. Postupně se rozšiřuje počet onemocnění, kde se předpokládá porucha imunitního systému nebo alespoň jeho částečná dysregulace. Jedná se o některé formy alopecie, aterosklerózu, autizmus, endometriózu, epilepsii, hypertenzi, narkolepsii, některé formy hluchoty, schizofrenii a další. Při předpokladu poruchy imunitního systému a vyloučení jiných příčin potíží, by pacienti u těchto stavů mohli profitovat z imunomodulační léčby.

### **1.2.3 Fyziologická a patologická autoimunitní reakce**

Autoimunitní reakce je charakterizována jako imunitní reakce vůči vlastním antigenům realizovaná buď autoprotilátkami nebo autoreaktivními klony T lymfocytů. Pokud dochází k odstraňování vlastních starých, apoptotických či jinak pozměněných buněk, ale bez následného poškození tkání, jsou tyto reakce fyziologické a žádoucí, neboť se podílí na udržování homeostázy. Jsou to reakce úklidové, obranné a regulační a představují fyziologickou autoimunitu. Přirozené protilátky jsou zejména v isotypu IgM, méně IgG a IgA, jsou polyreaktivní – díky širší reaktivitě slouží jako první obranná linie proti infekci, než se vytvoří specifické protilátky. Vůči autoantigenům jsou nízkoafinní a

jejich koncentrace je nízká, ale s věkem stoupá. Fyziologická autoimunita je součástí přirozené imunity. Pokud se autoreaktivní reakce vymkne regulaci, dochází k autoagresivnímu poškození tkání, pak se jedná o patologickou autoimunitní reakci. Autoprotilátky jsou ve vysokých koncentracích a převažují vysoce afinitní izotypy IgG a IgA. Autoreaktivní T lymfocyty zúčastněné v patologickém procesu nelze zatím jednoznačně od těch fyziologických odlišit.

K teoretickým kritériím autoimunitního onemocnění patří (1) charakterizace autoantigenů (někdy je však cílů více a je napadena celá řada orgánů), (2) průkaz autoprotilátek (jsou přísně specifické, s vysokou afinitou) nebo autoreaktivních T lymfocytů a (3) reprodukce patologického procesu na zvířeti (přenesením autoantigenů s adjuvans se zvíře imunizuje a vznikne analogické autoimunitní onemocnění jako u člověka). Posledním kritériem (4) je vznik autoimunity u zdravého zvířete přenosem protilátek nebo lymfocytů z nemocného zvířete.

Mechanismy imunopatologických reakcí jsou v zásadě obdobné těm, které probíhají u fyziologických, obranných reakcí v antiinfekční imunitě. Pod vlivem různých vnitřních a zevních faktorů dochází k poruchám homeostázy a k rozvoji chronického zánětu. Z klasické klasifikace Coombsa a Gella se u autoimunitních onemocnění uplatňuje reakce II., III. a IV. typu. U reakce II. typu (cytotoxická reakce; řadíme sem i působení antireceptorových protilátek) se uplatňují protilátky IgG a IgM, které mohou způsobit reakci ADCC (Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity = buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách) nebo se na buněčném poškození může podílet aktivovaný komplement. Na Fc část protilátek navázaných na povrchu buněk se pomocí Fc receptorů váží fagocyty a NK buňky, které svými cytotoxickými mechanismy ničí buňky. Příkladem takového postižení je hemolytická anémie nebo idiopatická trombocytopenická purpura. Antireceptorové protilátky působí na různé receptorové struktury, a to buď stimulačně (např. u Gravesovy-Basedowovy choroby) nebo mají blokující efekt (např. u myasthenia gravis).

Za imunopatologickou reakci III. typu jsou odpovědné protilátky IgG tvořící s antigenem imunokomplexy. Pokud nejsou imunokomplexy eliminovány fagocytujícími buňkami, mohou se ukládat v tkáních (např. v cévách, ledvinách, kůži či kloubech). Dochází k aktivaci kaskády komplementu, uvolnění řady aktivních fragmentů a zánětlivých buněk a zahájení zánětlivého procesu. U autoimunitních onemocnění není výskyt autoantigenů časově limitován, přetrvává v těle a dochází k chronicitě procesu (Stites 1994). Typickým představitelem imunokomplexové choroby je SLE.

IV. typ imunopatologické reakce je buněčně zprostředkovaný. U oddálené přecitlivělosti jsou efektorovými buňkami Th1 lymfocyty a makrofágy. Th1 pomocí interferonu  $\gamma$  aktivují makrofágy, při dlouhodobé stimulaci se makrofágy mění na mnohojaderná syncytia. Morfologickým rezultátem této reakce je tvorba granulomů. Při buněčné cytotoxické reakci jsou aktivovány CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, nebo další prozánětlivé buňky, např. Th17 produkující řadu prozánětlivých cytokinů. Tento typ reakce se uplatňuje např. u autoimunitních tyreoiditid, diabetes mellitus I. typu nebo u revmatoidní artritidy (Ferenčík 2005).

### 1.2.4 Indukce tolerance

V roce 1947 F. M. Burnet představil hypotézu o mechanismech vedoucích k toleranci vlastních antigenů ve vyvíjejícím se organismu. Použil pojem zakázané klony buněk. Tyto klony buněk reagující s vlastním organismem během vývoje zanikají. Burnetovu představu však bylo třeba rozšířit a doplnit, neboť ve zdravém organismu musí fungovat i procesy fyziologické autoimunity, která podporuje udržování homeostázy. Během vývoje embrya se v primárních lymfatických orgánech, tj. v kostní dřeni a v thymu, nastavuje centrální tolerance, čili neodpovídavost na vlastní antigeny. Proces je označován jako pozitivní selekce, při které T lymfocyty rozpoznávající vhodným způsobem komplex HLA/peptid na APC (antigen prezentující buňka) jsou zachovány. Při negativní selekci se vyřazují klony lymfocytů, které neexprimují receptor pro vlastní HLA molekuly (jsou pro organismus nevyužitelné) a lymfocyty rozpoznávající HLA molekuly s vysokou afinitou, které by se mohly potencionálně stát autoreaktivními. Pokud přesto část autoreaktivních lymfocytů pronikne do krevního oběhu, nastupují mechanismy periferní autotolerance. K eliminaci lymfocytů zde může docházet klonální delecí, klonální anergií (chybění kostimulačních signálů na APC nezbytných k aktivaci), klonální ignorancí (neschopnost rozpoznání autoantigenů) nebo supresivním účinkem T regulačních lymfocytů (Treg), které mají řadu membránových znaků (např. CD4, CD25, CD5, CD38, CD45RO, CD103, znaky z rodiny TNF receptorů aj.). Treg se významně podílí na udržování tolerance, rozpoznávají vlastní molekuly s vysokou afinitou, svůj imunopresivní účinek mohou projevit i při nízké koncentraci antigenu a prosazují ho prostřednictvím syntézy TGF- $\beta$  a IL-10. Treg se mohou dostat rychle do místa poškození a tam kontrolovat případné autoreaktivní lymfocyty. Tím by bránily rozvoji autoimunitního procesu. Porucha funkce Treg je popisována u RA, autoimunitním polyglandulárním syndromu, myasthenia gravis,

sclerosis multiplex a snížené počty Treg u DM, SLE a Kawasakiho chorobě. Pro diferenciaci Treg je nezbytný specifický gen FOXP3. Při jeho mutaci vzniká IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy), choroba, která je neslučitelná s životem. Treg představují 10 % CD4+ lymfocytů na periférii, výrazně tlumí aktivitu jiných lymfocytů prostřednictvím přímé interakce s efektorovou buňkou. Molekuly účastníci se vazby nejsou úplně přesně popsány. Diskutuje se o vazbě CTLA-4 v membráně Treg a CD80 na aktivovaných T lymfocytech, čímž se zabrání vazbě na CD28 a následné aktivaci (Buc 2005).

Podobnými mechanizmy, jakými se nastavuje tolerance T lymfocytů v thymu, dochází i k uspořádání repertoáru B lymfocytů. Za určitých okolností může dojít k aktivaci autoreaktivních klonů B lymfocytů, které unikly negativní selekci a představují tak další možný mechanismus spuštění autoimunitního zánětu. K polyklonálním aktivátorům B lymfocytů řadíme EB viry, cytomegaloviry, ale i mykobaktérie a bordetely.

### **1.2.5 Etiologie autoimunitních onemocnění**

Etiologie autoimunitních onemocnění nebyla dosud plně objasněna. Neví se přesně, proč se u některých jedinců původní, přirozená, prospěšná a žádoucí reakce mění na poškozující proces. Předpokládá se multifaktoriální mozaika různých aspektů, které v kombinaci způsobí nastartování imunopatologického zánětu. Předpokládá se ale, že bez genetické predispozice nevznikne žádné autoimunitní onemocnění. Podmínkou je prolomení autotolerance a přerod fyziologické autoimunity v patologickou. Sklon k autoimunitním chorobám je v některých rodinách větší, což svědčí pro existenci dědičné dispozice. Pro vznik onemocnění je však nutná současná přítomnost více rizikových faktorů. Obecně jsou vymezeny dva hlavní etiologické okruhy – vnitřní predispozice a zevní spouštěcí faktory.

K vnitřním faktorům ovlivňujícím vzplanutí autoimunitního zánětu řadíme především genetickou predispozici, sníženou koncentraci některých parametrů imunitního systému a vliv hormonů. Na genetickou predispozici ke vzniku autoimunitního onemocnění poukazují studie rodinného výskytu autoimunit (i když třeba rozdílných klinických jednotek), asociace HLA molekul s autoimunitními chorobami a studie molekulárně-genetických vyšetření jednovaječných a dvouvaječných dvojčat. U jednovaječných dvojčat se shodné autoimunitní onemocnění vyskytuje asi ve 20–50 %. Vyplývá z toho, že genetický faktor se podílí jen částečně na vzniku onemocnění, a že na

fenotypový projev (to je klinické rozvinutí) je nezbytný i další spouštěcí environmentální faktor. I u zdravých příslušníků těchto rodin se dají laboratorně prokázat autoprotilátky v krvi nebo hypergamaglobulinémie. Je možné, že nikdy nebudou mít potíže, ale jsou ve zvýšeném riziku rozvoje autoimunity a měli by být sledováni. Z rodinných a experimentálních studií vyplývá, že autoimunitní choroby mají polygenní charakter. Možný vznik a rozvoj autoimunitní choroby může ovlivnit řada genů, což komplikuje výzkum genetického pozadí těchto stavů, jakož i možnost budoucí genové terapie. Většina autoimunitních chorob je asociována s HLA molekulami II. třídy, kterým se připisuje 40–50% podíl na patogenezi. Odhaduje se, že v lidském organizmu se může tvořit asi 105 různých proteinů o velikosti 300 aminokyselin, z tohoto množství může vzniknout asi 3.107 rozdílných imunogenních peptidů. Ale příslušné HLA molekuly dokáží prezentovat méně než 1000 rozdílných peptidů. Většina autologních peptidů tedy nevede k indukcii autoimunitní odpovědi vzhledem k nedostatečné prezentaci. Z uvedeného vyplývá, že jedinci s příslušnou autoimunitní chorobou rozpoznávají stejný antigen, který je v dostatečném množství prezentován a vede k aktivaci specifických T lymfocytů (Buc 2005). APC (antigen prezentující buňky; nejčastěji dendritické buňky a makrofágy) pohltí antigeny proteinového charakteru, zpracují je na imunogenní peptidové fragmenty, které se zabudují do žlábků HLA molekul. Jejich prostřednictvím se fragmenty antigenu dostávají do membrány APC a tam jsou v kontextu s HLA molekulami předkládány T lymfocytům. Receptory T lymfocytů rozpoznávají peptidy současně s vlastními HLA molekulami, tento jev se nazývá imunologická restrikce. HLA molekuly I. třídy váží endogenní peptidy (antigeny virů nebo nádorových buněk) a prezentují je cytotoxickým T lymfocytům. HLA molekuly II. třídy váží exogenní antigeny, které předkládají pomocným T lymfocytům, které jsou ústředními buňkami imunitní (včetně autoimunitní) odpovědi. HLA molekuly II. třídy se vyskytují běžně jen na APC. Avšak vlivem cytokinů IFN- $\gamma$ , IL-2 a TNF uvolňovaných při infekcích dochází k jejich expresi i na dalších buňkách, což zvýší prezentaci antigenů, včetně vlastních. Např. u pacientů se SLE je v plazmě detekována zvýšená koncentrace IFN- $\gamma$ , který může indukovat expresi HLA II. třídy na různých buňkách a výsledkem je aktivace T lymfocytů proti početným autoantigenům (Buc 2005, Krejssek 2004, Ferenčík 2005).

Existuje asociace HLA molekul s určitým onemocněním, čehož se využívá i v diagnostice. V této souvislosti mluvíme o relativním riziku (RR) vzniku choroby, které vyjadřuje, kolikrát je větší riziko vzniku onemocnění u osoby nesoucí danou alelickou formu HLA než u jedinců, kteří nejsou nositeli této alely. Například RR vzniku

ankylozující spondylartritidy je u nosičů HLA B27 87,4 (Shoenfeld 2005). Nositelé znaku HLA-DR3 mají sice výkonnější imunitní systém, lépe odolávají infekcím, ale rubem této skutečnosti je vyšší sklon k autoimunitním nemocem, k SLE (RR 5,8) nebo Gravesově-Basedowově chorobě (RR 3,7). Kromě HLA molekul se v etiologii autoimunitních chorob mohou také uplatňovat polymorfismy genů pro receptory na T, B lymfocytech, polymorfismus genů pro cytokiny, pro apoptózu, polymorfismus genů pro proteiny ovlivňující metabolismus léků, polymorfismus genů kódujících molekuly tlumící imunitní odpověď (např. CTLA-4) atd. Autoimunitní lymfoproliferativní syndrom (Canaleova-Smithova choroba) je způsobený mutací genu pro Fas molekulu, která za normálního stavu indukuje apoptózu. Změna struktury genu se odráží v defektu apoptózy lymfocytů a tím v rozšířeném antigenovém repertoáru lymfocytů s možností indukce autoimunity. Gen AIRE (autoimmune regulator) produkuje protein, který významně napomáhá T lymfocytům odlišit vlastní a cizí proteiny. Gen AIRE je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 21 na pozici 22.3.

Bylo identifikováno více než 60 mutací genu AIRE. Homozygotní mutace v genu AIRE způsobuje těžkou autoimunitní chorobu APECED (autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy) nebo APS-1 (autoimmune polyglandular syndrome – type I).

V poslední době se také studuje polymorfismus mikrosatelitů (= repetitivní sekvence dinukleotidů o 10–300 párech bazí náhodně rozptýlené po genomu a včleňující se do DNA) a jejich podíl na vzniku autoimunit.

K vnitřním faktorům, které mohou přispívat ke vzniku některých orgánových imunopatologických stavů, patří i poruchy v imunitním systému samotném. Jedná se o imunodeficitní stavy, zejména imunoglobulinu IgA, běžný variabilní imunodeficit (CVID), hyper IgM syndrom, defekty složek komplementu C1q, C2, C4 a kombinované poruchy T a B buněčné imunity (Fučíková 1994). Imunoglobulin IgA představuje účinnou část imunitní ochrany na sliznicích. Při jeho deficitu může docházet ke snadnějšímu průniku různých agens přes sliznice a následně dochází k aktivaci imunitního systému. Obecně platí, že při snížené hladině IgA se mohou objevovat častější nejen infekce, ale také autoimunitní onemocnění, alergie a možná i nádorová onemocnění. Také poruchy komplementového systému jsou spojeny s vyšším výskytem autoimunit. Komplement je soustava krevních bílkovin, které se kaskádovitě postupně aktivují. Jednotlivé složky se enzymaticky štěpí, uvolněné fragmenty aktivují následující složku. Konečný komplex (C5-C9) představuje membránu atakující komplex, který lyzuje membránu buněk. Při snížené

koncentraci složek komplementu (zejména C1q, C2 a C4) nedochází k odstraňování imunokomplexů, které se následně ukládají v tkáních a spouští zánětlivou reakci.

V etiologii autoimunitních onemocnění se uplatňují i pohlavní hormony. Většina autoimunitních onemocnění postihuje ženy častěji (např. SLE, primární biliární cirhóza, tyreoiditidy, Sjögrenův syndrom, revmatoidní artritida nebo systémová skleróza), a to zvláště v reprodukčním období. Estrogeny přispívají jak ke vzniku, tak k exacerbaci onemocnění. V těhotenství dochází u žen většinou k útlumu autoimunitních projevů (ne však vždy, příkladem může být SLE). Existuje riziko, že dojde k pasivnímu přenosu protilátek z nemocné matky na plod a po dobu asi 3 týdnů po porodu (než vymizí mateřské protilátky) může mít novorozenec autoimunitní projevy. Po porodu dochází téměř u všech postižených žen k exacerbaci onemocnění. Účinky estrogenů na imunitní systém jsou komplexní, výsledkem je aktivnější imunitní systém s vyšší hladinou přirozených autoprotilátek. Ženy mají intenzivnější reakci na antigen, jsou náchylnější k odvržení transplantovaného orgánu. Estrogeny zvyšují protilátkovou imunitu, zvyšují syntézu IL-1 a tím podporují zánětlivou reakci. Zvyšují i expresi adhezivních molekul a tím podporují přechod buněk z krevního řečiště do tkání. Vztah mezi hormony a autoimunitou ilustruje např. revmatoidní artritida (RA). Výskyt RA není před pubertou častý, v reprodukčním období počet postižených žen převažuje nad muži, v postmenopauzálním období se počet vyrovnává. Příznaky RA v době gravidity se většinou zmírňují, po porodu se opět zvýrazní. Antikoncepční preparáty s vysokým obsahem estrogenů mohou vést k exacerbaci SLE. Existují i nemoci, kde neplatí pravidlo, že ženy jsou častějšími pacientkami. Diabetes mellitus I. typu postihuje obě pohlaví přibližně ve stejné míře a axiální forma ankylozující spondylitidy se vyskytuje více u mužů (Shoenfeld 2007).

K zevním spouštěčům autoimunitního zánětu patří především infekce, u vnímavých jedinců se mohou uplatnit i některé léky, chemické látky, UV záření, stresová událost nebo i geografické vlivy. Z infekčních činitelů to jsou bakterie, viry a paraziti. Je popisováno několik možných mechanismů, pomocí kterých infekční agens působí na imunitní systém. Může se jednat o fenomén nazvaný molekulární mimikry. Původně antiinfekční reaktivita se změní na reakci vůči vlastním tkáním, a to na základě podobnosti struktury mikroorganismu a vlastních buněk.

Mechanismem molekulárních mimikrů mohou působit i proteiny tepelného šoku (hsp – heat shock proteins). Jsou to molekuly, které jsou tvořeny a uvolňovány z buněk během různé zátěže, např. tepelné nebo infekční. Struktura hsp se během fylogenetického vývoje příliš neměnila, proto jsou lidské a mikrobiální hsp velmi podobné. Hsp se zapojují do dějů



potřebných na obnovu buněk po nejrůznějším poškození. U původců infekčních onemocnění jsou imunologicky významné hsp 60, hsp 70 a hsp 90, které mohou stimulovat protilátkovou i buněčnou odpověď.

Mikroorganismy mohou působit jako polyklonální aktivátory B lymfocytů (např. EB virus nebo různé superantigeny), kdy může dojít k aktivaci i autoreaktivních klonů buněk. Mohou indukovat expresi kostimulačních molekul i posun spektra cytokinů. Infekční agens může prostřednictvím nastartovaného uvolňování IFN- $\gamma$  indukovat expresi HLA molekul II. třídy na buňkách, kde se v klidovém stavu nevyskytují, a tím přispívat k aktivaci imunitního systému. Při vážném zánětu či traumatu může dojít k narušení bariér imunologicky privilegovaných orgánů (např. CNS, testes, oko) a ke spuštění reakce vůči těmto tkáním. Infekce viry hepatitidy C a B, Ebsteina-Barrové viry, cytomegaloviry jsou asociovány s řadou autoimunitních chorob. Streptokoková infekce je zcela nepochybně spouštěčem revmatické horečky. Vytvořené protilátky proti streptokokovému M proteinu reagují nejen s baktériemi, ale i se srdeční a nervovou tkání a s tkání kloubů.

V podstatě každý lék může potenciálně zapříčinit autoimunitní reakci. Léky mohou způsobit rozpad buněk nebo se na ně váží a tím je modifikují. Nejčastější autoimunitní chorobou vyvolanou užíváním léků (např. penicilamin) je léky indukovaný lupus erythematosus. U formy onemocnění vyvolané léky se většinou nevyskytuje poškození ledvin nebo mozku. Na jeho rozvoji se podílí zřejmě jiné genetické faktory než u klasického typu choroby. Lupus indukovaný léky obvykle vymizí po vysazení léku, zatímco systémový lupus je celoživotní onemocnění (Shoenfeld 2007). I chemické látky a UV záření mohou ovlivnit tvorbu neoantigenů, které se stávají terčem pro imunitní systém. Kouření je zmiňováno jako rizikový faktor v souvislosti se vznikem Goodpastureova syndromu, tyreotoxikózy a revmatoidní artritidy. Tendence k autoimunitním nemocem je u kuřáků spojována s poškozením tkání a uvolněním antigenů, které jsou rozpoznávány imunitním systémem s navazující autoimunitní reakcí.

Vzhledem k úzkému propojení mezi imunitním a nervovým systémem se předpokládá i podíl psychického stresu na vzplanutí autoimunitní reakce, i když předložit jednoznačné důkazy je složité. Ukazuje se, že nezanedbatelným faktorem je také chemické znečištění životního prostředí a potravinového řetězce. V souvislosti s autoimunitním onemocněním se také hovoří o bezpečnosti očkovacích látek. Zvažuje se možný podíl vakcinace a především vliv adjuvancií na spuštění autoimunitní reakce. Poruchy podmíněné adjuvancií jsou zahrnuty v ASIA syndromu (Autoimmune/autoinflammatory Syndrome Induced by Adjuvants). Možné vedlejší účinky nijak nesnižují všeobecnou

prospěšnost vakcinačních programů, ale vyžadují pečlivé sledování a další výzkum. U jedinců, pro které by očkování mohlo znamenat zvýšené riziko, se vyžaduje individuální přístup.

Obecně můžeme říci, že imunitní odpověď je jemně regulována. Regulační mechanismy zahrnují působení antiidiotypových interakcí, rovnováhu mezi jednotlivými druhy cytokinů a vzájemnou kooperaci buněk nejen v rámci vlastního imunitního systému. Porucha v rovnováze regulačních a efektorových systémů může přispět ke vzplanutí autoimunitního onemocnění. Nerovnováha syntézy cytokinů je významným rysem u autoimunitních chorob. Zvýšenou aktivitu Th1 lymfocytů (s produkcí IL-2 a IFN- $\gamma$ ) sledujeme u Hashimotovy tyreoiditidy, m. Crohn, myasthenia gravis, zatímco např. u SLE a ulcerózní kolitidy převažuje aktivita Th2 lymfocytů (s produkcí IL-4, IL-5, IL-6, IL-13) (Buc 2005).

Jednotlivých faktorů ovlivňujících vznik autoimunitního onemocnění je tedy celá řada, jejich vzájemná kombinace je také důvodem, proč se v rodinách, kde předpokládáme genetickou predispozici, mohou vyskytovat různé typy autoimunitního onemocnění.

### **1.3 Autoimunitní choroby**

Výskyt autoimunitních chorob se ve vyspělých zemích odhaduje na 5–7 % populace. Autoimunitním zánětem může být postižen kterýkoliv orgán nebo tkáň. Klasifikace nemocí se může opírat o mechanismy poškození, které je realizováno buď autoprotilátkami (jako např. u idiopatické trombocytopenické purpury, u Gravesovy-Basedowovy choroby a u myasthenia gravis) nebo T lymfocyty (např. u diabetes mellitus I. typu či revmatoidní artritidy), nebo vychází z rozsahu postižení. Pokud je zasažen pouze jeden orgán, mluvíme o orgánově specifických autoimunitních chorobách. Další tkáň bývají v tomto případě málokdy dotčeny patologickým procesem. Příkladem může být opět diabetes mellitus I. typu nebo velmi časté autoimunitní poruchy štítné žlázy. Je-li zánět rozšířen na celou řadu orgánů a tkání, mluvíme o systémových (orgánově nespecifických) autoimunitních chorobách. Prototypem takového onemocnění je systémový lupus erythematosus, jehož název přímo odráží multisystémové postižení. Tato klasifikace je částečně zjednodušená, onemocnění se vyvíjí a může přecházet v různé typy, popřípadě se dále rozšiřovat na další orgány. Autoimunitní choroby mohou proběhnout jednorázově (např. revmatická horečka, postinfekční glomerulonefritidy, parainfekční vaskulitidy), ale většinou probíhají

celoživotně, kdy se střídá období exacerbací a remisí (např. SLE). V období vzplanutí jsou zvýrazněné klinické příznaky, v krvi lze detekovat zvýšené koncentrace autoprotilátek. Onemocnění může postupně progredovat, vede k invaliditě a někde ohrožuje i život pacienta. Úkolem terapie je zvládnutí aktivní fáze nemoci, udržení remise onemocnění, zabránění vzniku závažného orgánového postižení, prevence vzniku druhotných komplikací či jejich zvládnutí. Léčba vyžaduje správný výklad řady klinických symptomů, laboratorních nálezů, systematickou prevenci a medikamentózní intervenci při relapsu onemocnění a komplikací, jakož i efektivní tlumení vedlejších účinků terapie a chronického zánětlivého procesu. Autoimunitní choroby se objevují častěji u jedinců mladšího a středního věku. Ve stáří, i přes zvýšenou tvorbu orgánově nespecifických autoprotilátek (průkaz autoprotilátek až v 60 %), se nezvyšuje výskyt autoimunit. Tento paradox se dá částečně vysvětlit změnami v zastoupení Th1 a Th2 lymfocytů. Zvýšená aktivita Th2 lymfocytů (s produkcí IL-4 a IL-6) stimuluje tvorbu autoprotilátek, ale nemá za následek rozvoj poškozujícího zánětu, protože ten by podporovaly Th1 lymfocyty (prostřednictvím INF- $\gamma$  a IL-2), ale jejich počet je ve stáří snížený (Ferenčík 2005).

### **1.3.1 Fáze autoimunitního onemocnění**

Autoimunitní choroba nevznikne najednou, její vývoj prochází postupně několika fázemi. (1) Fáze vnímavosti souvisí s genetickou predispozicí. V tomto období je stanovení diagnózy nemožné, neboť jedinec nemá žádné klinické projevy nemoci. Je třeba se zaměřit na získání údajů z rodinné anamnézy. Možné je vyšetření HLA systému, popř. polymorfismu různých genů, což je však finančně náročné a v běžné praxi se v současné době rutinně neuplatňuje. (2) Ve fázi iniciace je jedinec stále ještě bez klinických symptomů, nejsou známky zánětlivého poškození tkání, ale v séru je možné detekovat autoprotilátky. Stav označujeme za „autoimunitní laboratorní syndrom“, pacient není léčen, je pouze dispenzarizován a pravidelně vyšetřován. (3) Pokud jsou již patrné klinické projevy specifické zánětlivé reakce a dochází k objektivnímu poškození tkání, mluvíme o fázi propagace. Při laboratorním vyšetřování můžeme u řady nemocí prokázat specifické autoprotilátky. Je nutné zahájit adekvátní léčbu včas, aby se předešlo ireverzibilním změnám. Současně s touto fází nastupuje i (4) fáze regulace. Pojistné mechanismy se snaží vyrovnat narušenou rovnováhu. (5) Ve fázi rezoluce se nemoc může dostat do remise (zklidnění procesu) nebo naopak do progresu, kdy se poškození dále šíří v rámci orgánu nebo zasahuje více orgánů. U části pacientů dochází k trvalému poškození orgánů, které

může vyústit do selhání orgánů vedoucího až k ohrožení života. Pokud autoimunitní proces vyhasíná, zdravá tkáň je nahrazena nefunkčním vazivem – fibrotickou tkání. Jde o konečnou fázi ireverzibilního poškození (Ferenčík 2005).

### **1.3.2 Orgánově specifická a nespecifická autoimunitní onemocnění**

U orgánově specifických autoimunitních onemocnění dochází k poškození jednoho orgánu, popř. skupiny orgánů se stejnou základní funkcí. Mohou se uplatňovat různé mechanismy poškození. Základní charakteristikou je chronický zánět. Diagnóza se opírá o klinickou symptomatologii, která zejména v počátku nemusí být nápadná. Onemocnění se manifestuje až při poruše funkce orgánu. V séru se imunologickými metodami prokazují orgánově specifické autoprotilátky a při imunohistochemickém vyšetření jsou patrné změny v biopsovaném vzorku tkáně. Většinou je onemocnění odhaleno až ve fázi, kdy léčbou můžeme pouze zastavit další progresi, popřípadě je nutná substituční celoživotní léčba.

K nejčastějším orgánově specifickým autoimunitním onemocněním patří autoimunitní endokrinopatie (např. autoimunitní tyreoiditida, Gravesova-Basedowova choroba, Hashimotova choroba, diabetes mellitus I. typu, Addisonova choroba). Příkladem autoimunitní nemoci gastrointestinálního traktu je celiakie, primární biliární cirhóza, autoimunitní hepatitida, Crohnova choroba, ulcerózní kolitida. Goodpastureův syndrom je autoimunitní onemocnění s progresivní vaskulitidou zejména malých cév vedoucí k plicnímu krvácení a akutní membránoproliferační glomerulonefritidě. Pemphigus a pemphigoid představují puchýřnatá kožní onemocnění. Příkladem autoimunitního onemocnění nervového systému je myasthenia gravis, roztroušená skleróza, Guillainův-Barrého syndrom. U orgánově specifických autoimunitních nemocí, stejně jako u systémových imunopatologických stavů, je důležité posoudit komplexně laboratorní výsledky v souvislosti s klinickým obrazem.

U systémových orgánově nespecifických onemocnění dochází k postižení více orgánů, v séru jsou přítomny orgánově nespecifické autoprotilátky. Nejčastěji se vyskytují antinukleární protilátky, protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům a revmatoidní faktor. Klinické projevy jsou velmi variabilní. Zpočátku mohou převládat nespecifické příznaky, jako je únava, nechutenství, myalgie, artralgie, subfebrilie, spavost a bolesti hlavy. Teprve později se objeví jasnější příznaky a poškození různých orgánů. K systémovým imunopatologickým stavům řadíme revmatoidní artritidu, systémový lupus

erytematodes, Sjögrenův syndrom, dermatomyozitidu, systémovou sklerodermii, vaskulitidy, smíšenou chorobu pojiva, overlap syndrom, ankylozující spondylitidu a některá další méně častá onemocnění. Stanovení diagnózy vychází z anamnestických údajů, z klinického vyšetření a opírá se o laboratorní a další pomocná vyšetření. V rodinné anamnéze se pátrá po výskytu imunopatologického onemocnění, neboť se dědí predispozice k onemocnění. Nemusí se ale jednat o klinickou manifestaci stejné choroby. V osobní anamnéze se dá někdy odhalit spouštěcí faktor, jako je infekce nebo stresové stavy, které mohou předcházet i delší dobu před vzplanutím vlastního autoimunitního onemocnění. Je třeba přihlídnout i k věku, pohlaví a přidruženým chorobám ovlivňující klinický obraz a průběh nemoci. K pomocným diagnostickým metodám patří imunologické laboratorní vyšetření, sérologické (mikrobiologické) a hematologické vyšetření (vyšetření sedimentace, krevního obrazu a koagulace), histologické vyšetření bioptického materiálu a zobrazovací metody. U pacientů bývá zvýšená sedimentace erytrocytů, objevuje se hypochromní anémie, pro SLE je charakteristická leukopenie, pro vaskulitidy leukocytóza. U většiny systémových autoimunitních onemocnění bývá zvýšená koncentrace protilátek proti řadě mikroorganismů (např. EBV, HSV, CMV) v důsledku polyklonální aktivace lymfocytů B. Na druhou stranu bývají infekce provázeny někdy autoimunitními fenomény (reaktivní imunokomplexové artritidy a myalgie), které po adekvátní terapii vymizí. Při imunologickém laboratorním vyšetření lze prokázat různé orgánově nespecifické autoprotilátky, může být přítomna hypergamaglobulinémie (IgG, IgM, méně často IgA). Na druhou stranu se může vyskytnout rovněž deficiencie IgA. Cirkulující imunokomplexy mohou být zvýšené, stejně jako proteiny akutní fáze při aktivitě zánětu. Složky komplementu bývají u imunokomplexových chorob typu SLE sniženy. Vyšetření buněčné imunity z periferní krve nemá diagnostický význam, slouží však k monitorování imunosupresivní či biologické léčby.

### **1.3.3 Revmatoidní artritida jako nejčastější systémové autoimunitní onemocnění**

Revmatoidní artritida (RA) patří k nejčastějším systémovým autoimunitním onemocněním. První úplný popis provedl v roce 1800 pařížský lékař A. Landre-Beauvais (Ferenčík 2005). RA se projevuje chronickým zánětem synoviální membrány a kloubním výpotkem. Výsledkem je destruktivní poškození kloubů, ireverzibilní deformity a funkční omezení. U pacientů se může vyskytovat i řada mimokloubních poškození. Prevalence v evropských zemích se udává mezi 1–2 % dospělé populace. Roční incidence je do 50

nových případů na 100 000 obyvatel. Onemocnění je častější u žen než u mužů (3:1), k manifestaci projevů dochází nejčastěji mezi 35.–50. rokem života, vyskytuje se však i u mladších či starších jedinců. V posledních 10 letech je patrný určitý pokles incidence, který se přisuzuje zlepšení diagnostiky choroby, lepšímu zařazení dosud nediferencovaných artritid a snad také protektivnímu působení antikoncepce. Na druhou stranu je dokumentován negativní vliv kouření či chronických zánětů dásní jako významných rizikových faktorů rozvoje choroby. Nejsou známy oblasti či etnické skupiny, kde by se RA nevyskytovala. Prevalence se v globálním měřítku signifikantně neliší, existují však izolované skupiny obyvatel, mezi kterými je prevalence choroby velmi vysoká. U pacientů dochází ke zkrácení života cca o 5–10 let a nemoc má významný dopad na zhoršení jeho kvality. Až polovina nemocných se po 10 letech trvání nemoci stává invalidní. Hlavním cílem terapie je omezit bolest, zmírnit zánět, zachovat funkci kloubů a umožnit nemocnému plnohodnotný život.

V roce 2010 byla publikována nová klasifikační kritéria pro stanovení RA, která znázorňuje tabulka 1.3.1. Pro jednoznačnou diagnózu RA je nutné, aby dosažené skóre u pacienta bylo  $\geq 6$ , případně aby byla dokumentována artritida nejméně jednoho kloubu a přítomnost klasické marginální eroze při radiografickém vyšetření (Aletaha 2010).

**Tab. 1.3.1** Klasifikační kritéria pro dg RA (Aletaha 2010).

Kategorie	Skóre
<b>A. Postižení kloubů</b>	
1 velký kloub	0
2–10 velkých kloubů	1
1–3 malé klouby (s nebo bez postižení velkých kloubů)	2
4–10 malých kloubů (s nebo bez postižení velkých kloubů)	3
>10 kloubů (přínejmenším jeden malý kloub)	5
<b>B. Sérologie</b>	
negativní RF a negativní anti-CCP	0
slabě pozitivní RF nebo slabě pozitivní anti-CCP	2
vysoce pozitivní RF nebo vysoce pozitivní anti-CCP	3
<b>C. Reaktanty akutní fáze</b>	
CRP a sedimentace v normě	0
CRP nebo sedimentace zvýšeny	1
<b>D. Trvání symptomů</b>	
<6 týdnů	0
$\geq 6$ týdnů	1

## Klinický obraz RA

K prvním příznakům patří plíživé symetrické postižení drobných kloubů prstů obou rukou. Změny mohou být patrné i na drobných kloubech prstů dolních končetin. U části nemocných RA začíná atypicky jako mono- nebo oligoartritida. Klouby jsou oteklé, vřetenovitého tvaru, bolestivé, po ránu ztuhlé, ztrácí sílu a pohyblivost. Nemocní si stěžují na celkové příznaky – únavu, subfebrilie, ochablost svalů, někdy i úbytek hmotnosti. Malá část pacientů po prvních příznacích přechází do spontánní remise. Pokud onemocnění pokračuje, vede k destrukci chrupavek a následně je postižena i kost. Objevují se ireverzibilní deformity kloubů (obr. 1.3.1). Při těžkém průběhu mohou vznikat podkožní revmatické uzlíky na extenzorových stranách kloubů a postižení různých orgánů. Přidružuje se vaskulitida, postižení svalů, nervů, srdce, plic a očí. Častá je kombinace se Sjögrenovým syndromem. Průběh choroby je charakterizován kolísáním aktivity a střídáním období remise a zhoršení. Za časnou artritidu se nejčastěji označuje onemocnění do 2 let po nástupu symptomů.



**Obr. 1.3.1** Obraz postižených drobných kloubů na ruce u pacientky s RA hospitalizované na III. interní klinice FN Olomouc.

## Patogeneze RA

Příčina vzniku revmatoidní artritidy není dosud zcela objasněna. Patogeneticky se nemoc vyvíjí ve třech 3 stádiích. V iniciační (spouštěcí) fázi dochází u vnímavých jedinců působením mechanických vlivů nebo v důsledku bakteriální či virové infekce, kouřením cigaret a jiných podnětů k poškození synoviální výstelky spojené s uvolněním autoantigenů. Ty jsou pohlceny antigen prezentujícími buňkami (makrofágy a dendritickými buňkami), jejichž schopnost autoantigeny zachycovat je zvýšena lokálně produkovanými prozánětlivými cytokiny v synoviální výstelce. V další fázi dendritické buňky migrují do sekundárních lymfatických orgánů, kde prezentují zpracované antigeny T lymfocytům. Klonálně expandované T a B lymfocyty se vrací do kloubu a zde spolu s produkovanými protilátkami a komplementovým systémem amplifikují zánět. Ke

klíčovým cytokinům patří TNF- $\alpha$ , který spolu s IL-1, IL-6, chemokiny, růstovými faktory a adhezivními molekulami odpovídá za lokální příznaky. Po vstupu do krevního řečiště jsou prozánětlivé cytokiny distribuovány po celém organismu a jsou zodpovědné za systémové příznaky onemocnění. TNF- $\alpha$  je produkován fibroblasty, aktivovanými monocyty a makrofágy a má široké spektrum účinku. Indukuje vazodilataci, zvyšuje cévní permeabilitu, aktivuje trombocyty, indukuje v játrech syntézu proteinů akutní fáze, hraje významnou roli v genezi horečky, anemie a kachexie. Zvýšené hladiny TNF- $\alpha$  byly nalezeny v synovii i v séru u pacientů s revmatoidní artritidou i u nemocných se sepsí. Také adipocytokiny (např. adiponektin), nacházející se v synoviální tkáni, mají prozánětlivé a destruktivní působení na synoviální matrix (Galarza 2008). Ve fázi chronického zánětu dochází k proliferaci synoviální výstelky, která se přeměňuje na tzv. pannus. Th1 lymfocyty podporují neovaskularizaci vlivem na fibroblasty a endotelové buňky, působením na osteoklasty dochází k destrukci kostní hmoty a tvorbě erozí. Aktivované makrofágy jsou odpovědné za akumulaci granulocytů, syntézu metaloproteináz a produkci dusíkových mediátorů. B lymfocyty se diferencují do plasmatických buněk, které produkují autoprotilátky. Ty po vazbě se svými autoantigeny tvoří imunokomplexy, které se ukládají v tkáních a aktivují komplement, fagocytózu a tak amplifikují vznikající zánět (Krejsek 2004).

Poškození kloubů u RA je tedy způsobeno několika mechanismy: (a) eroze chrupavčité výstelky i kostní hmoty kloubu u nemocných s RA je spojena s tvorbou proliferujícího pannu, (b) mezi pannem a chrupavkou se nalézají aktivované makrofágy a synoviální fibroblasty tvořící matrixové metaloproteinázy (MMPs) schopné degradovat pojivovou tkáň, (c) do tkání vcestovalé neutrofilní granulocyty uvolňují řadu proteolyticky aktivních enzymů narušujících chrupavčitou výstelku, což dále poškozuje kloubní struktury, (d) revmatoidní faktory, produkované plasmatickými buňkami v místě zánětem poškozených synoviálních tkání, vytvářejí komplexy s autologními molekulami IgG, což vede k aktivaci komplementu klasickou cestou. To opět aktivuje makrofágy, které uvolňují prozánětlivé cytokiny poškozující kloubní struktury.

RA je polygenně podmíněné onemocnění, 40 % z genetické predispozice připadá na HLA molekuly. V kavkazské populaci je RA asociována zejména s molekulou HLA-DR4 (determinuje ji alela HLA-DRB1\*0401 nebo HLA-DRB1\*0404) nebo s molekulou HLA-DR1 (alela HLA-DRB1\*0101). Relativní riziko vzniku onemocnění se u HLA-DR4 udává 6. Na druhé straně se u revmatiků nevyskytují alely HLA-DRB1\*0402 a HLA-DRB1\*0403, které představují spíš faktor resistance. K zvýšené vnímavosti přispívá i



polymorfismus genu pro TNF- $\alpha$  (Nemec 2008). U RA se uplatňuje i epistatické působení genů, stav, kdy specifická kombinace genů modifikuje původní riziko vnímavosti k chorobě, které určuje základní predispoziční gen. K zevním spouštěcím faktorům patří zejména infekce mikroorganismy. U pacientů s RA se nacházejí zvýšené hladiny specifických protilátek proti gram-negativní anaerobní bakterii *Porphyromonas gingivalis* a s tím související zvýšený výskyt parodontitidy. *Porphyromonas gingivalis* osídluje ústní dutinu, kde patří k významným parodontálním patogenům. Může pronikat do gingiválních fibroblastů, kde odolává i ATB léčbě. Faktory virulence této bakterie (např. gingipain) ovlivňují celou řadu imunitních reakcí hostitele (např. štěpí IgG1 a IgG3, prozánětlivé cytokiny – IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , ovlivňují apoptózu, populaci Th17) (Ogrendik 2005, Marchesan 2013). Bakterie navíc obsahuje enzym peptidylarginindeiminázu (PAD), enzym umožňující citrulinaci proteinů. Proces citrulinace, klíčový prvek v patogenezi RA, představuje posttranslační úpravy argininových zbytků na citrulinové. Obecně platí, že při porušení buněčné stěny dochází k průniku Ca iontů do nitra buněk a k aktivaci PAD. PAD difunduje vně buňky a umožňuje citrulinaci extracelulárních proteinů (např. filagrinu, vimentinu, histonů, fibronektinu, kolagenu, fibrinu, fibrinogenu). Citrulinací vznikají nové epitopy, které spouští imunitní odpověď s rozvojem zánětu.

Řetězce kódované alelami HLA-DRB1\*0401, HLA-DRB1\*0404, HLA-DRB1\*0101 sdílejí společný epitop tvořený sekvencí aminokyselin Glu-Lys-Arg-Ala-Ala nebo Glu-Arg-Arg-Ala-Ala. Přítomnost uvedeného úseku je asociována jak s rozvojem RA, tak také s přítomností revmatoidních faktorů a agresivnějším průběhem onemocnění. Sekvenční podobnost mezi molekulou HLA DR a glykoproteinem viru Epstein-Barrové poukazuje na možnou významnou úlohu molekulových mimiker v etiopatogenezi onemocnění. Podobné homologie byly prokázány i pro hemolysin bakterie *Proteus mirabilis* (Ferenčík 2005), pro stresový protein *E. coli* a dalších bakterií. Zajímavým genem mimo oblast HLA systému je gen PADI4 na chromozomu 1p36, který patří do rodiny “padi“ genů kódujících enzymy (peptidyl arginin deiminasy) účastníci se posttranslační přeměny argininových zbytků na citrulin. Jde o jednu ze základních reakcí při rozpoznávání autoantigenů autoprotilátkami u RA a některé polymorfizmy v genu pro tento enzym byly v řadě populací asociovány se vznikem RA. Tyto varianty vedou k produkci stabilnějšího transkriptu než ostatní alely, tj. zvyšují produkci PADI4, který byl také ve zvýšené míře detekován v synoviálních tkáních u pacientů s RA.

## Laboratorní testy u RA

Patologické změny v časně fázi RA se manifestují hyperplázií buněk synoviální výstelky, otokem, vaskulární proliferací a lymfocytární infiltrací. U asymptomatické formy nacházíme opět hyperplázii buněk synoviální výstelky s infiltrací CD4+ T lymfocytů, B lymfocyty jsou vzácné a vaskulární proliferace a depozita fibrinu nejsou časté. U symptomatické RA histologie synoviální tkáně odhalí vaskulární proliferaci, infiltraci PMN a depozita fibrinu. Vaskulární proliferaci lze změřit produkcí vaskulárních a fibroblastických růstových faktorů, IL-8, monocytárního chemotaktického proteinu (MMP-1).

K vyšetření aktivity RA se používá stanovení sedimentace a CRP. U pacientů se postupně vyvíjí anémie, na kterou jsou však často adaptováni. Při imunologickém vyšetření se zjišťuje u většiny případů pozitivní revmatoidní faktor, anticitrulinové protilátky, mohou být zvýšené cirkulující imunokomplexy a imunoglobuliny všech tříd. Častá je pozitivita antinukleárních protilátek, hodnoty složek komplementu C3 a C4 bývají u relapsu onemocnění mírně snížené.

Revmatoidní faktor (RF) patří k nejčastějším autoprotiátkám detekovatelným v krvi nebo v synoviální tekutině. RF reaguje s modifikovanou konfigurací Fc fragmentu IgG molekuly. Příčina změny struktury IgG není přesně známa. Zvažuje se, že k ní dochází buď vazbou Ig na antigen, vlivem tepelné denaturace, působením kyslíkatých radikálů uvolňovaných z aktivovaných polymorfonukleárů nebo stimulací prekurzorů revmatoidních B lymfocytů infekčním agens. RF vytváří s vlastními imunoglobuliny imunokomplexy, které se ukládají do kloubů, kde vyvolávají poškozující chronický zánět. RF se vyskytuje nejběžněji ve třídě IgM, ale i v dalších izotypech. Senzitivita se udává 66 % a specificita 87 % (Galarza 2008). RF se vyskytuje i u dalších stavů: u juvenilní revmatoidní artritidy (15 %), psoriatické artropatie (15 %), SLE (15–35 %), Sjögrenova syndromu (75–90 %), systémové sklerózy (20–30 %), smíšené choroby pojiva (50–60 %), ankylozující spondylitidy a reaktivní artritidy (6 %). RF se může dále objevit u nerevmatických stavů, např. u chronické hepatopatie (20 %), idiopatické intersticiální plicní fibrózy, lues, TBC plic, sarkoidózy, neoplazií, artritidy u borreliózy, subakutní bakteriální endokarditidy nebo Waldenströmovy makroglobulinémie. Přechodný výskyt může být zaznamenán u akutní infekce, ojediněle po vakcinaci, u příjemců alotransplantátů ledviny nebo u pacientů v chronickém hemodialyzačním programu. Může se vyskytnout u zcela zdravých jedinců, a to ve vzestupné frekvenci s narůstajícím věkem. Ve věku 0–30 let je přítomen u 2 %, v období 30–60 let ve 4 % a u osob nad 60 let až ve 24 %.

K vyšetření se v minulosti používaly semikvantitativní hemaglutinační testy a latex fixační test. V současné době převládají kvantitativní testy s využitím analyzátorů využívajících principů nefelometrie nebo turbidimetrie. Obě metody jsou založené na měření množství imunitních komplexů vytvořených interakcí specifických protilátek s antigenem. Koncentrace příslušného antigenu je úměrná rychlosti tvorby zákalu. U nefelometrů detekční systém měří světlo odražené od imunokomplexů (Tyndalův efekt), turbidimetrie vyhodnocuje úbytek intenzity světla, které prošlo kyvetou. Detektory převádí záření na elektrický signál. Koncentrace proteinu v měřeném vzorku je stanovena pomocí porovnání signálu před průběhem reakce a signálu po proběhnutí reakce, a následně odečtem z kalibrační křivky.

Jednotlivé izotypy RF lze vyšetřit pomocí ELISA testů. Protilátky ze séra pacienta se během první inkubační doby váží na příslušný antigen, který je navázán v jamkách mikrotitrační plotničky. Po promytí se přidá antisérum konjugované s enzymem, které se během další inkubační doby naváže na komplex antigenu s protilátkou. Po přidání substrátu se v případě pozitivity séra vytváří barevná reakce, jejíž intenzita je přímo úměrná množství prokazované protilátky.

Stanovení protilátek proti perinukleárnímu faktoru a antikeratinové protilátky nezískaly zatím širšího rutinního uplatnění, a to vzhledem k obtížnější standardizaci a menší výtěžnosti vyšetření. Cílovým antigenem těchto protilátek je filagrin. Je to epidermální protein, který váže vzájemně keratinová filamenta a tím je chráněn před proteolýzou. Filagrinové podjednotky vznikají vyžíváním profilagrinu během defosforylace, citrulinace a proteolýzy. Tyto mechanismy jsou příkladem posttranslační modifikace proteinů, která se může objevit kdykoliv během doby jejich existence. Modifikací získávají proteiny nové vlastnosti, stabilizuje se jejich konformace, je regulována jejich funkce. Na vznikající neoantigeny ovšem reaguje imunitní systém. S citrulinací se setkáváme obecně u zánětů, včetně RA. Při porušení buněčné stěny dojde k difuzi Ca iontů dovnitř buněk a k aktivaci enzymu peptidylarginindeiminázy (PAD). PAD difunduje vně buněk a katalyzuje citrulinaci extracelulárních proteinů. Až 20 % argininu je nahrazeno aminokyselinou citrulinem, což se stává základem neoantigenů, který spouští tvorbu autoprotilátek. Příkladem dalších proteinů, které podléhají citrulinaci a mají asociaci s RA, jsou histony, vimentin (Sa antigen), fibronectin, kolagen (typ I, II), fibrin, fibrinogen a myelinový bazický protein. V současné době se široce využívá stanovení anticitrulinových protilátek (anti-CCP) metodou ELISA při diagnostice RA (Coenen 2007, Dubucquoi 2004, van Venrooij 2006). Anti-CCP protilátky se nacházejí

v séru i v kloubním výpotku a existuje korelace mezi sérovými a synoviálními hladinami (Šedová 2005). Protilátky se mohou u pacientů vyskytovat i řadu let před vzplanutím onemocnění. Počty se pohybují od 1 % u 15 let až cca 45 % 1 rok před objevením se prvních příznaků (Nielen 2004). U pacientů, kde v průběhu sledování došlo k závažné progresi onemocnění, byla výchozí koncentrace anti-CCP protilátek signifikantně vyšší než u pacientů s neprogredující formou RA (Vencovský 2003). V práci van Gaalena bylo sledováno 318 pacientů s nediferencovanou artritidou pod dobu 3 let. Progrese do RA byla zaznamenána u 43 % pacientů. Z tohoto počtu 93 % pacientů s pozitivními anti-CCP protilátkami vyvinulo RA, zatímco s negativními anti-CCP protilátkami pouze 25 %; OR je 37,8 (van Gaalen 2004). Anti-CCP protilátky představují významný diagnostický i prognostický nástroj.

V roce 1989 Hassfeld popsal v séru pacientů s RA protilátky proti jadernému extraktu z HeLa buněk. Protilátky byly označeny anti-RA 33. Jsou namířené proti heterogennímu nukleárnímu ribonukleoproteinu (hn RNP A2) o molekulové hmotnosti 33 kDa. Jde o multifunkční všudypřítomný protein zapojený do transportu a translace mRNA. Nejvyšší koncentrace je popisována v kůži, v lymfoidní tkáni, mozku a reprodukčních orgánech. Zvýšená exprese je rovněž v zánětlivé synoviální tkáni. Zvažuje se funkce ve stimulaci či ovlivnění přítomných zánětlivých buněk. Výskyt protilátek anti-RA 33 se udává 30–35 % u RA, 20–25 % u SLE, 35–40 % u MCTD a <5 % u jiných revmatických onemocnění.

V roce 1994 byly popsány anti-Sa protilátky u pacientů s RA. Byly vyšetřovány metodou western blotu. Jejich specificita je srovnatelná s anti-CCP protilátkami, ale senzitivita je pouze 20–45 %. Následně byl tento antigen využit ve stanovení protilátek proti mutovanému citrulinovanému vimentinu (anti-MCV) a metodou k jejich vyšetření se stala ELISA. Vimentin je protein cytoskeletu mesenchymálních buněk, fibroblastů, chondrocytů a osteocytů. Vysoká koncentrace se nachází v monocytech a aktivovaných makrofázích. Jeho sekrece je pod vlivem prozánětlivých i protizánětlivých cytokinů. Samotná citrulinace vimentinu nezvyší senzitivitu protilátek, ale expozice reaktivnímu kyslíku a dusíku v zánětlivém prostředí vede navíc k mutaci a vzniku neoantigenů. Tím se výrazně zvyšuje senzitivita vyšetření. Anti-MCV signifikantně korelují s aktivitou nemoci (Zahran 2013). Titry protilátek jsou ovlivňovány terapeutickými zásahy u pacienta.

Na degradaci hyalinní chrupavky a vystupňované angiogenezi se u RA podílí i proteolytické enzymy – matrixové metaloproteinázy (MMPs) štěpící peptidovou vazbu uvnitř proteinu (patří tudíž do skupiny endopeptidáz). MMP-3 díky širokému spektru

substrátů a možnosti aktivace dalších MMP se stává klíčovou MMP při remodelaci tkáně. Koncentrace MMP-3 je u RA zvýšená v séru i v synoviální tekutině. MMP-3 je uvolňována z buněk pojivové tkáně – chondrocytů; z polymorfonukleárů nebo makrofágů se uvolňuje u druhotného zánětu při artróze. V samotném názvu je obsažena hlavní funkce MMPs – degradace komponent extracelulární matrix. MMPs vážou ve svém aktivním místě zinek, který je nezbytný pro správnou funkci a aktivitu enzymu. Mohou ale vázat i jiné ionty, např. Ca, který je důležitý pro optimální konformaci molekuly. MMPs jsou většinou sekretovány ve formě proenzymů a aktivovány zinkem, který je transportován např. metallothioneinem. Substrátem MMP může být např. kolagen, elastin, želatina, kasein nebo laminin. Nověji i receptory růstových faktorů, molekuly buněčné adheze, chemokiny, cytokiny, apoptotické ligandy, angiogenní faktory aj. První MMP byla popsána v 1962 J. Grossem a Ch. Lapiérem, byla označena jako „kolagenáza“ a byla objevena při studiu degradace kolagenu během metamorfózy ocásku žabího pulce. V roce 1968 proběhla izolace z lidské kůže a od roku 1989 byl přidělen těmto enzymům termín matrixové metaloproteinázy. Je popisováno více jak 20 typů různých MMPs, které se rozlišují podle presyntetického úseku na chromozomech a specifity k substrátu. Struktura MMPs je poměrně konzervativní, nejsou výrazné rozdíly mezi živočišnými druhy a vyskytují se i u rostlin. Zjednodušeně se dá říci, že v dospělých „klidových“ tkáních se často nevyskytují. „Aktivní jsou tam, kde se něco děje“. Jsou produkovány stromálními buňkami, např. fibroblasty, endoteliemi v přítomnosti induktorů (např. IL-1, TNF $\alpha$ ), ale i nádorovými buňkami. Proteolýza je za fyziologických okolností kontrolovaným dějem, existuje rovnováha mezi expresí MMPs a jejich přirozenými inhibitory (TIMPs,  $\alpha$ 2 makroglobulin). TIMPs se váží na katalytické místo aktivních MMPs, které tím ztrácí proteolytickou aktivitu. MMPs mají vliv na řadu fyziologických pochodů (např. embryonální vývoj, tkáňová morfogeneze, implantace zárodku do děložní sliznice, morfogeneze prsní žlázy v pubertálním věku, diferenciaci adipocytů, účast v hojení ran), uplatňují se i u patologických stavů (např. nádorová onemocnění, šíření metastáz, záněty, ateroskleróza, aneurysmata, nefritidy, tkáňové vředy, fibrózy, emfyzém, neurodegenerace). Tím, že MMPs degradují i biologicky aktivní molekuly (např. cytokiny, chemokiny, receptory růstových faktorů) současně zánět také potlačují či regulují. IL-1, TNF- $\alpha$  současně se stimulací syntézy MMP inhibují produkci TIMP-1 a tím dochází k převaze katabolických pochodů. Polymorfismus genů pro MMPs může ovlivňovat vnímavost ke vzniku a/nebo závažnost průběhu RA (Nemec 2007).

### **1.3.4 Systémový lupus erytematoses jako prototyp autoimunitního orgánově nespecifického onemocnění**

Systémový lupus erytematoses (SLE) je typickým představitelem systémové autoimunitní imunokomplexové choroby. Je to chronické, z hlediska klinického obrazu heterogenní onemocnění, které probíhá v periodách exacerbací a remisí. SLE je charakterizován hyperaktivitou B lymfocytů a nadprodukcí orgánově nespecifických autoprotilátek, které jsou namířeny proti nukleárním, cytoplasmatickým a povrchovým antigenům vlastních buněk. Tkáňová a cévní depozita imunokomplexů vedou k zánětlivému poškození řady orgánů. Označení „lupus“ vychází z typických změn na kůži, které připomínají vzhledem jizvy po pokousání vlkem. Narůžovělá až červená vyrážka se objevuje nejen na tvářích a nosu, ale může být přítomna i na jiných místech těla. Od toho se odvíjí pojem erytematoses – zarudlý. Původní představy o tom, že by se mohlo jednat o druh nádorového či infekčního onemocnění, byly v 50. letech minulého století opuštěny a SLE se začal vnímat jako choroba pojivové tkáně (tehdy označení kolagenóza) na autoimunitním podkladu. „LE fenomén“, popsáný v roce 1948 Hargravesem, byl využíván řadu let jako diagnostický marker pro SLE. LE buňky jsou bílé krvinky, které pohltnou jádro jiného leukocyty. Autoprotilátky proti různým složkám buněčných jader jsou jedním z hlavních diagnostických znaků SLE. Pro rozvoj SLE je opět nutná nejen genetická predispozice, ale i zevní spouštěč. U jednovaječných dvojčat je 20–40% pravděpodobnost, že onemocní i druhé dvojče pacienta se SLE (Shoenfeld 2007). Onemocnění se vyskytuje celosvětově, je běžnější v černošské a žluté rase než v bílé rase. Také u Afro-Američanů je vážnější průběh nemoci než u Asiatů (Lau 2006). Incidence se pohybuje mezi 2–7,6 případy na 100 000 obyvatel za rok (Bertolaccini 2008). Prevalence se udává 20–150 případů na 100 000 obyvatel, ženy jsou postiženy desetkrát častěji než muži. Nejvyšší výskyt je mezi 15.–40. rokem života, 10–15 % případů je po 50. roce věku a 20 % případů před 18. rokem. V České republice se odhaduje prevalence choroby na 6 000–10 000 pacientů. Přežívání nemocných se SLE se výrazně prodloužilo díky poznatkům o nemoci a její diagnostice a účinnější terapii. V roce 1950 5letého přežívání dosahovalo pouze 50 % nemocných, v roce 1990 10leté přežívání činilo 90 % a 20leté 70 %.

#### **Klinický obraz SLE**

Klinický obraz onemocnění je velmi variabilní. Poruchy jednotlivých systémů se mohou různě prolínat. Akutní vzplanutí je provázáno systémovými příznaky, jako je

horečka, únava, lymfadenopatie a hubnutí. Symetrická artralgie se vyskytují v 90 % případů. Artritida není, na rozdíl od RA, erozivní. Klouby jsou oteklé, bolestivé a v pohybu omezené. Kůže nad nimi bývá teplejší, začervenalá, citlivá. Zvýšená teplota u pacientů je známkou zánětlivého procesu. Mírná forma lupusu probíhá pouze jako kožně-kloubní onemocnění. Změny na kůži jsou mnohotvárné a objevují se až v 85 % případů. Známým příznakem je motýlovitý exantém na obličeji. Pokud se objevují červená šupinatá ložiska na těle, jedná se o diskoidní lupus. Vyskytuje se rovněž fotosenzitivita kůže vystavené slunečním paprskům. Ultrafialové záření poškozuje DNA buněk kůže, které se stávají terčem pro autoprotilátky. Mezi další kožní příznaky patří vypadávání vlasů až jejich úplná ztráta a Raynaudův fenomén. Při výrazně zmenšeném krevním průtoku prsty mohou vzniknout drobné defekty na konečcích prstů. U 30–50 % pacientů se objevují myopatie, které ale mohou být způsobeny i terapií kortikoidy či antimalarickou léčbou. Může se vyvinout perikarditida, myokarditida nebo Libmanova-Sacksova endokarditida. Při zasažení plic (bývá u 18 % nemocných) se objevuje kašel, dušnost, bolest na hrudníku, rozvíjí se pleuritida, intersticiální fibróza či plicní vaskulitida. V krvi se často zjistí cytopenie postihující všechny složky; charakteristická pro SLE je zejména leukopenie, trombocytopenie či hemolytická anemie. Mohou se objevit i poruchy koagulace. Nemocní trpí také defekty sliznice dutiny ústní. Prognosticky nejzávažnější je postižení ledvin a centrálního nervového systému, které ohrožuje pacienta na životě. Ledviny bývají zasaženy až u 70 % pacientů; stupeň postižení ledvin ovlivňuje další prognózu pacientů. Postižení CNS se projevuje bolestmi hlavy, záchvaty podobnými epilepsii nebo se může manifestovat jako psychiatrické onemocnění. U některých nemocných se SLE se můžeme setkat s dalším autoimunitním onemocněním jako je Sjögrenův syndrom nebo antifosfolipidový syndrom. Původní klasifikační kritéria byla revidována v roce 1997. Pro diagnózu je nezbytný výskyt 4 kritérií a více z 11 stanovených parametrů kdykoli v průběhu nemoci (Tan 1982, Hochberg 1997). Ke kritériím patří:

1. Motýlovitá vyrážka na tvářích a kořenu nosu.
2. Fotosenzitivita – vysoká citlivost na slunce, je spojená se vznikem vyrážky na místech těla vystavených světlu.
3. Diskoidní lupus je vyvýšená, červená, šupící se vyrážka okrouhlého tvaru, která se může hojit jizvením.
4. Slizniční vředy se objevují hlavně v ústech a nose i na dásních. Bývají nebolestivé, ale mohou působit krvácení z nosu a bolesti v ústní dutině hlavně při konzumaci kořeněných nebo silně kyselých anebo sladkých jídel.

5. Artritida nebo artralgie je přítomna u většiny nemocných se SLE. Bolest se může stěhovat, někdy však má trvalejší charakter. Poškození kloubů vzniká méně často než u jiných nemocí provázených artritidou a nemá erozivní charakter.
6. Pleuritida, perikarditida. V obou případech dochází k nadměrné tvorbě zánětlivé tekutiny v okolí plic nebo srdce, působící bolest na hrudi zejména při dýchání a kašli.
7. Postižení ledvin se v průběhu choroby projeví u většiny pacientů. Jejich závažnost je velmi různorodá od mírných projevů s malými nálezy krve a bílkoviny v moči až po selhání funkce ledvin s otoky a hypertenzí.
8. Postižení centrálního nervového systému CNS se projevuje bolestmi hlavy, křečemi, cévní mozkovou příhodou a různými neuropsychiatrickými příznaky, jakými jsou vážné poruchy nálad a chování, koncentrace a paměti.
9. Postižení krve je způsobeno autoprotilátkami namířenými proti krevním buňkám. Objeví se hemolytická anémie, leukopenie a tromocytopenie.
10. Přítomnost určitých autoprotilátek v krvi: a) protilátky proti dvouvláknové DNA (anti-dsDNA), b) protilátky anti-Sm, c) antifosfolipidové protilátky (ACLA).
11. Antinukleární protilátky (ANA) jsou namířeny proti buněčnému jádru a jsou přítomny téměř u všech pacientů se SLE. Jejich samotná přítomnost však zdaleka nemoc nepotvrzuje, protože se mohou nacházet i u jiných chorob stejně jako asi u 5 % zcela zdravých lidí.

V poslední době se užívají pro klasifikaci systémového lupus erythematoses i kritéria Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) (Petri 2012), která jsou založena na hodnocení klinických a laboratorních projevů. Definitivní diagnóza choroby se opírá o přítomnost 4 a více kritérií, z nichž musí být alespoň jedno klinické a laboratorní nebo pacient musí mít biopticky prokázanou lupusovou nefritidu se současnou přítomností ANA či anti-dsDNA protilátek. Kritéria jsou kumulativní a nemusí se vyskytovat současně.

*Klinická kritéria:*

1. Akutní/subakutní kožní lupus
2. Chronický kožní lupus
3. Orální/nazální ulcerace
4. Nejizvící se alopecie
5. Zánětlivá synovitida s otokem dvou a více prstů popsaná lékařem či citlivost kloubů s ranní ztuhlostí



6. Serozitida
7. Ledvinné manifestace: poměr proteinu/kreatininu (či CB/24 hodin) odpovídající ztrátám bílkovin 500 mg/24 hodin či přítomnost erytrocytů v sedimentu
8. Neurologie: křeče, psychóza, mononeuritis multiplex, myelitida, periferní či kraniální neuropatie, cerebritida (akutní stavy zmatenosti)
9. Hemolytická anemie
10. Leukopenie ( $<4000/\text{mm}^3$  zachycená alespoň jedenkrát) nebo lymfopenie ( $<1000/\text{mm}^3$  zachycená alespoň jedenkrát)
11. Trombocytopenie ( $<100\ 000/\text{mm}^3$  zachycená alespoň jedenkrát)

*Imunologická kritéria:*

1. ANA v koncentraci nad referenční mezi dané laboratoře
2. Anti-dsDNA nad horní laboratorní mezi (v případě ELISA testů požadován dvojnásobek horní laboratorní meze)
3. Anti-Sm protilátky
4. Antifosfolipidové protilátky
  - lupus antikoagulans
  - falešně pozitivní test na lues
  - antikardiolipinové protilátky – alespoň dvojnásobek horní hranice normy či středně až vysoké titry
  - protilátky proti  $\beta 2$ -glykoproteinu
5. Nízké hladiny komplementu
  - nízká C3
  - nízká C4
  - nízká CH50
6. Pozitivní přímý Coombsův test při absenci hemolytické anemie

V těhotenství se u části nemocných žen průběh onemocnění zlepšuje, v dalších případech může dojít i ke zhoršení příznaků a existuje i skupina žen, kdy během gravidity se projevy onemocnění nemění (Shoenfeld 2007). Během gravidity je zvýšené riziko eklampsie nebo preeklampsie zejména u nemocných s antifosfolipidovými protilátkami. Po porodu v důsledku hormonálních změn, vlivem opětovného zvýšeného působení estrogenů může dojít ke vzplanutí choroby. Děti nemocných žen se rodí obvykle zdravé. Může se však vyvinout neonatální lupus, způsobený transplacentárním přenosem anti-SSA/Ro a

anti-SSB/La protilátek okolo 12. týdne těhotenství. Nejzávažnější komplikací je vrozený srdeční blok. U dětí se mohou objevit také kožní změny. Při zjištění patologických změn na echokardiografu plodu je třeba terapeuticky zasáhnout (Yildirim 2013). Antifosfolipidové protilátky způsobují u žen trombózy placenty a následně potrat či úmrtí plodu. U pacientů se SLE a výskytem antifosfolipidových protilátek hovoříme o sekundárním antifosfolipidovém syndromu. Primární antifosfolipidový (antikardiolipinový) syndrom je charakterizován zvýšenou srážlivostí krve, opakovanými potraty, mrtvorozenými plody a trombocytopenií. Dříve se ženám nedoporučovalo těhotenství vzhledem ke zvýšené morbiditě a mortalitě matek i novorozence. V současné době při úzké spolupráci revmatologů a gynekologů jsou rizika často zvladatelná a těhotenství může proběhnout úspěšně (Barbhaiya 2013).

### **Patogeneze SLE**

Tak jako u jiných autoimunitních chorob ani u systémového lupus erythematoses není etiopatogeneze plně objasněna. Velmi pravděpodobně je zapotřebí časová koincidence vnitřních a zevních faktorů, které vedou ke ztrátě tolerance vůči vlastním buňkám a nastartování expanze imunitní odpovědi. U geneticky disponovaných jedinců navodí zevní spouštěče sled reakcí, které vedou k uvolnění jaderných autoantigenů. Je potvrzeno, že i aberovaný průběh apoptózy má podobný výsledek. Jaderné autoantigeny jsou rozpoznávány Th2 a B lymfocyty s následnou tvorbou autoprotilátek. Následně vznikají imunokomplexy ukládající se v tkáních a orgánech. Dochází k aktivaci komplementového systému a výsledkem je vznik poškozující zánětlivé reakce. Tento typ poškození představuje podle Coombsa a Gella III. typ imunopatologické reakce (Gell 1963). Antinukleární autoprotilátky mohou vstupovat i do buněk, kde vazba na odpovídající nitrobuněčné cíle vede k indukci apoptózy a deregulaci buněčné fyziologie (Krejsek 2004). Bylo nalezeno propojení mezi SLE a plazmacytoidními dendritickými buňkami (pDC), které představují odlišnou populaci dendritických buněk (DC) než "klasické" myeloidní DC (mDC). Na rozdíl od mDC, které fungují především jako antigen prezentující buňky, pDC vystupují jako buňky produkující zánětlivé cytokiny – interferony I typu (zahrnující IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$ ). Není zcela jasné, zda pDC pocházejí z myeloidní či lymfoidní linie buněk kostní dřeně. Lidské pDC exprimují kromě jiných i znaky CD4, CD45RA a zejména CD123 (= IL-3R $\alpha$ ), což je hlavní znak pro identifikaci pDC. Skutečnost, že neexprimují CD11c a CD14 je odlišuje od konvenčních mDC a monocytů. Produkce IFN I typu pDC je indukována detekcí virové RNA nebo DNA pomocí TLR7 a TLR9 přítomných

v membráně. Signalizace od těchto receptorů je vedena až k transkripčnímu faktoru NFκB, tedy hlavnímu transkripčnímu faktoru podílejícím se na regulaci imunitních odpovědí. Plasmacytoidní DC produkcí cytokinů regulují zánět a propojují vrozenou a adaptivní imunitu. IFN I aktivuje cytotoxickou aktivitu NK buněk, zároveň chrání neinfikované buňky od lýzy; IFN I spolu s IL-6 ovlivňují B lymfocyty a jejich diferenciaci v plasmatické buňky produkující imunoglobuliny. U SLE jsou počty pDC v periferní krvi sniženy, což je ale v tomto případě vlivem infiltrace aktivovaných pDC do kožních lézí, kde produkují velká množství IFN-α. pDC jsou nejspíše aktivovány imunokomplexy protilátek a jejich ligandu dsDNA z apoptotických buněk. Zvýšené koncentrace IFN-α následně pravděpodobně aktivují mDC, které podporují vznik T-buněčné autoimunity (Hořejší 2009, Seitzl 2010).

SLE patří mezi nemoci s výraznou hereditární dispozicí. Na genetickou predispozici ukazují rodinné studie, kdy relativní riziko choroby pro sourozence nemocných je přibližně 20. Výskyt onemocnění u jednovaječných dvojčat se popisuje ve 24–58 % a u dvojvaječných dvojčat ve 2–3 %. Také se uvádí asociace SLE s výskytem určitých genů (zejména HLA II. třídy – HLA DR2, HLA DR3 a HLA DQ) nebo s polymorfismem genů pro složky komplementu – C4, C1q, C1r, C1s a pro receptor pro Fc fragment IgG.

Objevují se údaje, že významnou roli v patogenezi SLE má i abnormální průběh apoptózy. Apoptóza je programovaná smrt buňky, kdy buňka vlastní aktivitou přispívá ke svému zániku. Je to fyziologický proces, který na rozdíl od nekrózy není doprovázen okolní zánětlivou infiltrací, ztrátou struktury tkáně či tvorbou jizev. Obnova např. lymfocytů je obrovská – během 24 hodin zahyne a znovu se vytvoří  $10^{10}$  B lymfocytů, 95 % prekurzorů T lymfocytů hyne v thymu a jen asi 5 % dozrává a dostává se do sekundárních lymfatických orgánů. Nezahynou jen ty buňky, které najdou odpovídající antigen a spustí se proces diferenciaci na efektorové buňky. Apoptózou se vyřazují i ty lymfocyty, které již splnily svoji úlohu (Buc 2005). Apoptóza je regulována soustavou povrchových a nitrobuněčných proteinů. Proces apoptózy tlumí např. FLIP a mezi molekuly vyvolávající apoptózu patří Fas (CD95/Apo-1), TNFR1 a Apo-3. Způsobují aktivaci endonukleáz a fragmentaci DNA. U experimentálních zvířat jsou vadná funkce Fas molekuly nebo bodové mutace pro Fas ligand spojovány s autoimunitními projevy. Defektní exprese Fas molekuly vede k selhání apoptózy a k perzistenci autoreaktivních T lymfocytů. Aktivované Th1 lymfocyty exprimují CD40 ligand a mohou aktivovat B lymfocyty po spárování molekul CD40-CD40L. U Fas deficientních zvířat B lymfocyty přežívají a produkují protilátky. Roli mají rovněž Th2 lymfocyty podporující autoimunitní

proces tím, že produkují IL-4, který způsobuje rezistenci buněk vůči Fas zprostředkované apoptóze. FasL může být vyvázan i solubilní Fas molekulou, jejíž sérová hladina je výrazně zvýšena u pacientů se SLE, při remisi onemocnění dochází k jejímu poklesu. U SLE se popisuje i zvýšená exprese Bcl-2 proteinu, který záporně ovlivňuje apoptózu. Tato skutečnost se může promítnout do vývoje B lymfocytů. Pozměněný a zpomalený proces apoptózy může vést k nahromadění mutací v DNA a následně k syntéze defektních proteinů, které se stávají cílem pro různé autoprotilátky. U pacientů se SLE byly v séru prokázány nukleozomy představující základní jednotky chromatinu, který je uvolňován po fragmentaci DNA. Nukleozom se skládá z oktameru histonů, kolem kterých je ovinuta dvoušroubovicová DNA. V apoptotických tělíscích jsou přítomny nukleosomy společně s jadernými nebo cytoplazmatickými ribonukleoproteiny SSA/Ro, SSB/La a RNP. Přítomnost autoprotilátek proti dsDNA je vysoce specifická pro SLE a předpokládá se, že anti-dsDNA protilátky se podílí na patogenezi onemocnění. Vytváří se imunokomplexy dsDNA – anti-dsDNA, které se deponují v predilekčních místech, např. v glomerulech či cévách. Zvažuje se také, že v některých případech je apoptóza spíše vystupňovaná a vede k hromadění buněčného materiálu, který není efektivně odstraňován fagocytujícími buňkami a může aktivovat T a B lymfocyty. Apoptotické buňky exprimují na svém povrchu fosfatidylserin, který má prokoagulační vlastnosti. Tím se může spolupodílet na hyperkoagulačních stavech u SLE a být příčinou tvorby antifosfolipidových protilátek.

Také dysfunkce ve vzájemných vztazích mezi neuroendokrinním a imunitním systémem může být jedním z důvodů vnímavosti jedince k rozvoji autoimunitních chorob. Vzhledem k častějšímu výskytu SLE u žen mladšího a středního věku je vysoce pravděpodobný vliv ženských pohlavních hormonů. Nemocné ženy mají výraznější estrogenní aktivitu a urychlený metabolismus testosteronu (Lahita 1982). Tento stav vede ke zvýšené aktivitě imunitního systému. K látkám schopným reagovat na neuroendokrinní i imunitní podněty patří i polypeptidový hormon prolaktin (Lahita 1999, Moszkorzová 2000). Kromě stimulace růstu prsní žlázy, řízení tvorby mléka v době kojení, ovlivnění vodní a minerálové rovnováhy, reguluje prolaktin i imunitní reakce. Prolaktin zasahuje do syntézy proteinů akutní fáze v játrech, stimuluje T lymfocyty k tvorbě prozánětlivých cytokinů (např. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2) a účastní se dozrávání a diferenciaci B a T lymfocytů (Gala 1991, Peeva 2003, Dostál 2007). Teprve nedávno se zjistilo, že prolaktin je produkován nejen hypofýzou, ale také periferními T lymfocyty (Ben-Jonathan 1996). U části nemocných se SLE byla popsána asociace zvýšených hodnot prolaktinu v tělních

tekutinách při postižení CNS a ledvin, podle některých prací koreluje hladina prolaktinu s aktivitou choroby (Leanos-Miranda 2006).

K vnějším spouštěcím faktorům autoimunitního pochodu řadíme zejména infekce, a to zejména vliv superantigenů a virových agens. Superantigeny mohou pocházet z bakterií, virů i mykoplasmat a jsou schopné ovlivnit širší spektrum buněk. Aktivují normální T lymfocyty a přemostí je s B lymfocyty produkujícími autoprotilátky, dále mohou podpořit aktivaci autoreaktivních T lymfocytárních klonů nebo přímo aktivaci B lymfocytů. V patogenezi SLE se virová infekce může uplatnit prostřednictvím INF- $\gamma$  ovlivňující hyperexpresi HLA molekul II. třídy na různých buňkách, odkrytím privilegovaných epitopů, indukci patogenních antiidiotypových protilátek nebo mechanismem známým pod názvem molekulární mimikry. Pozornost je věnována retrovirům pro jejich schopnost integrace do hostitelského genomu a ovlivnění fungování imunitního systému.

Ultrafialové světlo, léky a chemikálie mohou rovněž přispívat u vnímavých jedinců k rozvoji SLE. UV světlo přispívá k povrchové expresi buněčných autoantigenů, zvyšuje antigenicitu DNA, vede k uvolňování cytokinů kožními buňkami. Také u léků není zcela jasný mechanismus. Zvažuje se zkřížená reakce, reakce proti konjugátu lék-nukleární protein, ztráta tolerance nebo aktivace imunitních buněk. Léky indukují tvorbu antihistonových protilátek, antifosfolipidových protilátek či protilátek proti erytrocytům, leukocytům a trombocytům. Hydralazin, prokainamid, isoniazid, chlorpromazin, metyldopa, D-penicilamin jsou příkladem léků, které mohou vyvolat léky indukovaný lupus.

Výsledkem vzájemného působení vnitřních a zevních činitelů je nežádoucí nadměrná aktivita B i T lymfocytů a porucha regulačních tlumících mechanismů. U SLE lze často detekovat zvýšené počty B lymfocytů i plasmatických buněk v cirkulaci, z toho vyplývá i vysoká hladina imunoglobulinů. Autoprotilátky jsou většinou namířeny proti několika antigenním determinantám. B lymfocyty jsou snadněji aktivovatelné cytokiny IL-6 a IL-10, jejichž hladiny jsou u SLE zvýšené. Na začátku onemocnění je charakteristická polyklonální aktivace B lymfocytů, v pozdějších stádiích převládá aktivace autoantigenem. SLE B lymfocyty mají změněné pochody přenosu signálu v buňce. Také T lymfocyty vykazují určité abnormality u pacientů se SLE. Jejich celkový počet bývá poněkud snížen. Lze pozorovat i snížení proliferační odpovědi na mitogeny, specifické antigeny a autologní buňky, což je způsobeno nižší hladinou IL-2 a IL-2R u SLE. Autoreaktivní T lymfocyty se mohou objevit při poruchách nastavení centrální tolerance v thymu (nedojde k delecii

potenciálně autoreaktivních klonů), při existenci kostimulačních signálů nutných k aktivaci a při nedostatečném působení supresorových T buněk. Autoimunitní stav může být odrazem i skutečnosti, že organismus není schopen neutralizovat antigenní podněty v důsledku určité deficiencie. Tak může, např. infekční agens, perzistovat v organismu a trvale stimulovat imunitní systém. U aktivního SLE koreluje zvýšená exprese adhezivních molekul (selektiny, VCAM-1, ICAM-1) na endoteliálních buňkách cév s aktivitou nemoci (Dostál 1997).

Poruchy imunitního systému jsou u SLE poměrně složité a komplexní, problematicky se definuje co je primární defekt a co vzniká až následkem nemoci.

### **Laboratorní testy u SLE**

Vzhledem k pestrosti klinického obrazu není diagnostika SLE snadná. Vychází se z klinického vyšetření a laboratorní nálezy jsou podpůrnými činiteli. Z laboratorních stanovení je důležité vyšetření spektra autoprotilátek.

Antinukleární protilátky patří k častým nálezům u SLE, i když tyto protilátky nejsou specifické pouze pro toto onemocnění. Můžeme je detekovat i u jiných systémových nemocí, chronických jaterních nemocí, chronických infekcí či u starších jedinců. V signifikantním titru se vyskytují u SLE až v 95 % případů (Bertolaccini 2008). V některých případech je můžeme zjistit ještě před vzplanutím SLE. Metodou volby pro jejich stanovení je v současné době nepřímá imunofluorescence na linii HEp-2 buněk. Metoda nepřímé imunofluorescence byla poprvé popsána v roce 1958 G. J. Friou (Friou 1958). Pro detekci ANA protilátek byly používány řezy krysích jater, popř. i jiné hlodavčí tkáň. V roce 1952 Alice E. Moore vytvořila buněčnou linii HEp-2 buněk, která později nahradila původní substráty pro vyšetřování ANA a nyní je široce využívána (Moore 1955). HEp-2 buňky obsahují 100–150 různých autoantigenů, přičemž řada z nich nebyla ještě definována. Jsou umístěné jak v jádře, tak také v cytoplasmě. Z tohoto důvodu můžeme získat rozdílné obrazy fluorescence. K nejčastějším typům fluorescence u SLE patří homogenní typ (protilátky jsou namířeny proti dsDNA a histonům), zrnitý typ (protilátky proti U1-RNP, Sm, SSA/Ro, SSB/La) a cytoplasmatický typ fluorescence (antiribozomální protilátky). V poslední době jsou pro diagnostiku autoprotilátek nabízeny také multiplexové metody, které dovolují stanovovat až několik desítek analytů na jedné reakční ploše (Lochman 2013). I přes snahy o nahrazení subjektivního odečítání ve fluorescenčním mikroskopu multiplexovými metodami jako metodami první volby, zůstává nepřímá imunofluorescence i nadále základním screeningovým testem pro

vyšetřování ANA (Mahler 2012). Pozitivní séra je třeba dále testovat a určit specifickost protilátek (např. anti-dsDNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La). Senzitivita nepřímé imunofluorescence je u SLE udávána 90–95 %, ale specifickost je nízká. V poslední době jsou popisovány protilátky proti hustě jemně zrnitému antigenu s molekulovou hmotností 70 (dense fine speckled 70, DFS70), které se vyskytují až v 20 % u zdravých jedinců, dále u chronických zánětlivých stavů, tumorů (Mahler 2012). DFS70 typ fluorescence byl zaznamenán u 33,1 % ANA pozitivních zdravých jedinců, zatímco v 0 % u pacientů se systémovým onemocněním ( $p < 0,0001$ ). Během 4letého sledování se u žádného ze 40 anti-DFS70 pozitivních zdravých jedinců nevyvinulo systémové autoimunitní onemocnění (Mahler 2012). Přítomnost autoprotilátek anti-dsDNA je vysoce specifická pro SLE, zejména při vysoké koncentraci těchto protilátek. Výskyt těchto protilátek se pohybuje mezi 40–70 % nemocných. Autoprotilátky se vyšetřují metodou nepřímé imunofluorescence s využitím prvoka *Crithidia luciliae*. Pro longitudinální sledování vývoje hladin se používá ELISA test. Protilátky anti-dsDNA reagují také s antigeny bazální membrány glomerulů a vyvolávají nefritidu. Některé studie popisují korelaci mezi hladinou protilátek a tíží nemoci, zejména při postižení ledvin. Z komplexu protilátek proti ENA (extrahovatelné nukleární antigeny) se u SLE vyskytují protilátky proti Sm antigenu, a to asi u 25 % nemocných. Anti-dsDNA a anti-Sm protilátky se jen výjimečně nacházejí u jiných stavů, proto mají vysokou specifickost pro SLE a jsou zavazaty do klasifikačních kritérií. Zatímco titry anti-dsDNA se během doby a v závislosti na aktivitě choroby mohou měnit, anti-Sm protilátky jsou obvykle konstantní. Protilátky anti-SSA/Ro a anti-SSB/La detekujeme v 20–60 %, respektive 15–40 %, pozitivita ukazuje na sekundární Sjögrenův syndrom při SLE (Dostál 1997). Jsou také spojovány s neonatálním lupusem. Stanovují se metodou ELISA nebo protisměrnou elektroforézou. U akutní lupusové psychózy se v 10–15 % mohou objevit protilátky proti ribozomálnímu P proteinu. U léky indukovaného SLE se vyskytují antihistonové protilátky a protilátky anti-ssDNA a také antinukleozomální protilátky, které jsou senzitivním a specifickým vyšetřením i pro klasický lupus. Vysoké titry antinukleozomálních protilátek jsou hlášeny u 60–80 % případů. Jsou detekovány i u některých pacientů s negativním vyšetřením na anti-dsDNA a proto se jeví jako lepší prediktivní faktor (Su 2007). Řada studií se také věnuje výskytu anti-C1q a jejich korelaci s lupusovou nefritidou (Potlukova 2008, Tsirogianni 2009). Stanovení těchto protilátek je přínosné k identifikaci pacientů s nebezpečím vzniku ledvinového postižení. Protilátky anti-C1q se však nevyšetřují rutinně ve všech laboratořích.

Zvýšená míra apoptózy u SLE se projevuje v séru nejen přítomností nukleozomálních fragmentů, ale i ve zvýšené koncentraci proapoptotické molekuly sApo/Fas. Exprese membránové formy se zvyšuje v přítomnosti prozánětlivých cytokinů, např. TNF $\alpha$ . Do plazmy jsou tyto molekuly uvolňovány proteolytickým štěpením membránových molekul. Potvrzením úlohy apoptózy v patogenezi SLE jsou lpr kmeny myši s defektním genem pro Apo/Fas, které vykazují onemocnění s rysy SLE (Krejsek 2004). Stanovení koncentrací Fas molekul se rutinně neprovádí.

U jedné třetiny nemocných se SLE jsou přítomny antifosfolipidové protilátky třídy IgG a IgM namířené proti fosfolipidům buněčných membrán. Ve funkčních testech krevní koagulace se přítomnost antifosfolipidových protilátek projevuje jako tzv. lupus antikoagulant. Inhibují hemokoagulaci závislou na fosfolipidech. I další proteiny se stávají terčem protilátek:  $\beta$ 2-glykoprotein, protrombin, protein C, annexin V a další. Přítomnost antifosfolipidových protilátek je spojována s arteriální nebo venózní trombozou a potraty. Pacienti dále mohou mít falešně pozitivní testy na *Treponema pallidum* a protilátky proti borreliím. Antifosfolipidové protilátky nejsou specifické jen pro lupus nebo antifosfolipidový syndrom, mohou se tvořit i u některých osob s nádory nebo přecitlivělostí na některé léky, či u pacientů s AIDS a oportunními infekcemi (Ferenčík 2005). U 25 % případů SLE nacházíme v séru revmatoidní faktory. Vyšetřují se také složky komplementu, rutinně C3 a C4 složka, jejichž hladiny bývají u aktivního stavu snižené, neboť se váží na imunokomplexy (IK) antigenu a protilátky (Martínek 2013). Složky komplementu se stanovují v současné době většinou metodou nefelometrie. Vazba komplementu na IK má vliv na udržení solubility těchto struktur a brání tak ukládání IK do tkání. Při snížené hladině komplementu nedochází k odstraňování IK, které se stávají spouštěčem zánětlivého procesu.

U pacientů nalzáme také řadu hematologických abnormalit – hemolytickou anémii s retikulocytózou, leukopenii, lymfopenii, trombocytopenii. K objektivizaci diagnózy a k posouzení aktivity choroby slouží klinické skórovací systémy, jako např. SLICC nebo SLEDAI.



## 2. CÍLE PRÁCE

Obecným cílem práce bylo posouzení výpovědní hodnoty vybraných laboratorních metod u revmatoidní artritidy a systémového lupus erytematodes.

Dílčí cíle byly následující:

- Posoudit přínos stanovení anti-CCP protilátek u pacientů s RA pro stratifikaci nemocných vyžadujících intenzivnější léčbu.
- Posoudit přínos stanovení protilátek proti mutovanému citrulinovanému vimentinu u pacientů s RA v aktivním stádiu choroby.
- Posoudit přínos stanovení sérové hladiny matrixové metaloproteinázy 3 v kontextu ostatních nálezů pro identifikaci pacientů ve větším riziku rozvoje destruktivní polyartritidy u RA.
- Posoudit přínos stanovení hladin vybraných složek komplementu (C3, C4, C1q) a anti-C1q pro zhodnocení aktivity SLE a přítomnosti lupusové nefritidy.
- Posoudit přínos vyšetření antinukleozomálních protilátek, neopterinu, trombomodulinu a dalších markerů včetně tradičních testů jako indikátorů klinické aktivity SLE a nástrojů k monitoraci průběhu choroby.
- Posoudit přínos vyšetření molekul sCD30 a sCD40L jako potencionální indikátory aktivity SLE.

Vzhledem k tomu, že ke splnění cílů práce byly využity různé soubory pacientů vyšetřených v různých časových obdobích, jsou výsledky uváděny jednotlivě. Během doby se některá vyšetření stala rutinní součástí diagnostiky, zatímco jiná stanovení jsou určena spíše k doplnění laboratorního obrazu odezvy imunitního systému u pacientů s RA a SLE.

### 3. VLASTNÍ PRÁCE

#### 3.1 Význam stanovení anticitrulinových protilátek v diagnostice RA

##### 3.1.1 Úvod

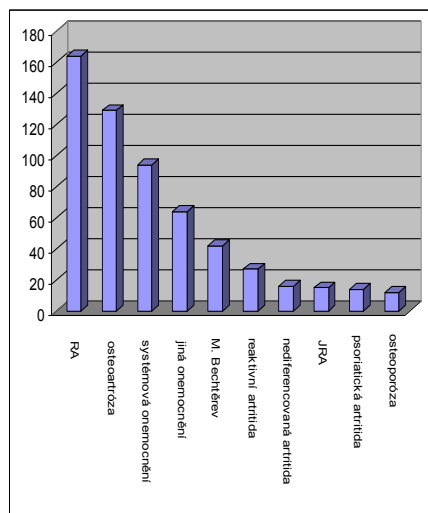
Pomocným imunologickým laboratorním vyšetřením u pacientů s revmatoidní artritidou bylo řadu let stanovení revmatoidního faktoru, ale výskyt tohoto parametru není příliš specifický pro dané onemocnění. Po doplnění vyšetřování anticitrulinových protilátek (anti-CCP) se předpokládalo výrazné zpřesnění laboratorní diagnostiky u RA a zhodnocení přínosu anti-CCP protilátek bylo cílem práce.

##### 3.1.2 Materiál a metodika

K hodnocení bylo použito výsledků RF a anti-CCP protilátek v souboru 577 pacientů z revmatologické poradny III. interní kliniky FN Olomouc. Byly použity výsledky prvního stanovení u každého pacienta vyšetřeného během roku 2007; (celkový počet vyšetřených sér byl 1 023, neboť někteří pacienti byli vyšetřeni opakovaně). Soubor pacientů byl rozdělen po jednotlivých diagnózách. Početní zastoupení uvádí tabulka 3.1.1 a sloupcový graf 3.1.1. RF byl stanoven nefelometricky na analyzátoru BN II s použitím standard a antisér firmy |Siemens, anti-CCP protilátky byly vyšetřeny ELISA testem pomocí soupravy CCPLUS Immunoscan firmy EuroDiagnostica. Jako pozitivní byly hodnoceny hodnoty RF nad 20 IU/ml, u anti-CCP hodnoty nad 25 IU/ml.

**Tab. 3.1.1, graf 3.1.1** Počty vyšetřených pacientů podle diagnóz.

RA	164
osteoartróza	129
systémová onemocnění	94
jiná onemocnění	64
m. Bechtěrev	42
reaktivní artritida	27
nediferencovaná artritida	16
JRA	15
psoriatic. artritida	14
osteoporóza	12

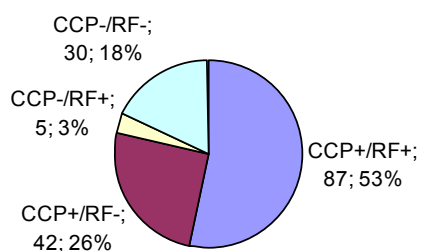


### 3.1.3 Výsledky

Výsledky vyšetření anti-CCP protilátek a RF u jednotlivých diagnóz uvádí tabulka 3.1.2. U pacientů s RA (n=164) byly pozitivní anti-CCP protilátky a RF detekovány současně u 87 pacientů, v 42 případech byly pozitivní pouze anti-CCP, u 5 pacientů byly anti-CCP-/RF+ a u 30 vzorků byly anti-CCP-/RF-. Pozitivní výsledky anti-CCP protilátek byly u pacientů s RA zjištěny celkem ve 129 případech. Senzitivita vyšetření anti-CCP u RA dosáhla 78,7%. Při kombinaci vyšetření anti-CCP protilátek a RF je senzitivita 82 %. Výsledky vyšetření spolu s procentuálním vyjádřením u pacientů s RA jsou znázorněny v grafu 3.1.2. Anti-CCP protilátky se detekovaly spolu s RF také ve třech případech JRA, samostatně pak u osteoartrózy a systémového onemocnění, ale v těchto případech pouze kolem 2 %. Výskyt anti-CCP u nediferencované artritidy jsme zaznamenali ve třech případech.

**Tab. 3.1.2** Výsledky vyšetření anti-CCP a RF u jednotlivých diagnóz onemocnění.

diagnóza	počty	CCP+/RF+	CCP+/RF-	CCP-/RF+	CCP-/RF-
RA	164	87	42	5	30
osteoartróza	129	0	2	18	109
systémová onemocnění	94	0	2	14	78
jiná onemocnění	64	0	1	2	61
m. Bechtěrev	42	0	0	1	41
reaktivní artritida	27	0	0	2	25
nediferencovaná artritida	16	0	3	0	13
JRA	15	3	0	1	11
psoriatická artritida	14	0	0	0	14
osteoporóza	12	0	0	0	12



**Graf 3.1.2** Početní a procentuální vyjádření výskytu anti-CCP protilátek a RF u pacientů s RA.

### 3.1.4 Diskuze

RF byly prvními biologickými markery u RA a stále patří k diagnostickým kritériím pro RA. Mají nižší specifitu a v některých případech nemusí být detekovány v prvních letech onemocnění (Shmerling 1992). Lepší specifitu vykazují u RA anti-CCP protilátky. Anti-CCP jsou převážně třídy IgG, jejich patogenetická role není plně objasněna. Stanovení anti-CCP představuje významný diagnostický nástroj a protilátky mají i prognostický význam. Jejich záchyt s několikaletým předstihem u osob bez příznaků choroby předznamenává rozvoj RA. Zjištění přítomnosti těchto protilátek u pacientů v časném stádiu onemocnění artritidy zvyšuje pravděpodobnost, že dojde k rozvoji agresivní formy choroby. Avšak význam monitorování hladin anti-CCP během terapie není hodnocen jednoznačně (Bobbio 2004, Alessandri 2004, van Gaalen 2004, Rönnelid 2005, Berglin 2006). Syntetické citrulinované peptidy jsou využívány v ELISA testech. Citrulinaci katalyzuje enzym peptidylarginin deimináza (PAD). Citrulin se stává základní složkou antigenního epitopu filagrinu i dalších proteinů. Tvorba citrulinových antigenů je dynamický proces, který probíhá v zanícené synovii za přítomnosti PAD. Pro RA je charakteristická přítomnost exprese izotypu PAD4 se zvýšenou enzymatickou aktivitou (Rovenský 2006). “Citrulinace je malá změna proteinu s velkými důsledky pro revmatoidní artritidu“ (van Venrooij 2000). Citrulinace může probíhat i u jiných proteinů – např. vimentinu, předpokládá se u histonů, kolagenu a fibrinu.

Anti-CCP protilátky mají u RA vysokou specifitu (vyšší než 90 %), senzitivita se pohybuje mezi 56–80 % (Shoenfeld 2007, van Venrooij 2006, Coenen 2007, Dubucquoi 2004), u časně RA 55 % (Grootenboer 2004) a u velmi časně formy RA 40 % (Matsui 2006). U pacientů s primárním Sjögrenovým syndromem a s artritidou je popisován 60 % výskyt RF a 3 % výskyt anti-CCP (van Noord 2005). U SLE pacientů s non-erozivní artritidou se RF vyskytuje u přibližně 20 % a anti-CCP méně jak 0,5 %. U podskupiny SLE pacientů s erozivní formou artritidy byly anti-CCP zachyceny v 20 % (Mediwake 2001). U psoriatické artritidy jsou popisovány anti-CCP ve 12 % (Bogliolo 2005) u pacientů s hepatitidou C nebyly anti-CCP detekovány, zatímco RF byl u 40 % vzorků pozitivní (Wener 2004), u juvenilní idiopatické artritidy nebyl zjištěn významný rozdíl mezi výskytem RF IgM a anti-CCP. Na rozdíl od RF, anti-CCP se neobjevují během stárnutí. Mohou tak ve vyšším věku přispívat k dg RA (Vencovský 2005).

V našem souboru pacientů jsme získali u RF senzitivitu 56,1 % a specifitu 90,1. U anti-CCP byla senzitivita 78,7 % a specifita 97,6 %. I přes skutečnost, že se stále

vyskytují pacienti se séronegativní RA, vyšetření anti citrulinových protilátek se dostalo do diagnostických kritérií pro RA.

Na základě dosažených výsledků bylo vyšetření anti-CCP protilátek zařazeno v roce 2004 na našem pracovišti do rutinní nabídky vyšetření a je klinickými lékaři indikováno při podezření na RA. Další zkušenosti ukázaly, že toto vyšetření přináší lékařům informace i o aktivitě RA a přispělo ke sledování účinku biologické léčby.

## **3.2 Význam stanovení protilátek proti mutovanému citrulinovanému vimentinu u pacientů s RA**

### **3.2.1 Úvod**

Jedním z cílových proteinů pro autoprotilátky u pacientů s revmatoidní artritidou (RA), které podléhají citrulinaci je také vimentin. Je to protein cytoskeletu mesenchymálních buněk, fibroblastů, chondrocytů a osteocytů. Kromě citrulinace vimentinu dochází i k jeho mutaci vlivem reaktivního kyslíku a dusíku, které se uvolňují u zánětlivé reakce. Předpokládá se, že takto vytvořený neoantigen zvyšuje senzitivitu autoprotilátek. Cílem práce bylo zjistit přítomnost protilátek proti mutovanému citrulinovanému vimentinu (anti-MCV) u pacientů z revmatologické poradny, porovnání výsledků vyšetření revmatoidního faktoru (RF), anticitrulinových protilátek (anti-CCP) a anti-MCV u pacientů s RA a vyhodnotit hladiny anti-CCP a anti-MCV vzhledem k různému stupni aktivity RA.

### **3.2.2 Materiál a metodika**

Bylo vyšetřeno 73 krevních vzorků pacientů z revmatologické poradny (54 žen, 19 mužů). Pacientů s RA bylo 44 (diagnóza RA byla stanovena v souladu s ARA), s artrózou 6, se systémovým onemocněním pojiva 6, s nediferencovanou artritidou 4, s autoimunitním laboratorním syndromem 2, pacientů s ostatní diagnózou (např. morbus Bechtěrev, artralgie, myalgie, synovitida, psoriáza) bylo 11. Kontrolní soubor tvořilo 8 vzorků sér z transfúzního oddělení, tyto vzorky byly vyšetřeny pouze na přítomnost anti-MCV protilátek.

RF byl vyšetřován metodou nefelometrie na analyzátoru BN II s využitím komerčních setů N RF Latex (Siemens Healthcare Diagnostics). Hodnoty do 15 IU/ml byly

považovány za negativní, 15–20 IU/ml za hraniční, nad 20 IU/ml za pozitivní. Anti-CCP protilátky byly stanoveny metodou ELISA s využitím soupravy CCPLUS Immunoscan firmy EuroDiagnostica. Titry nad 25 IU/ml byly hodnoceny jako pozitivní. Anti-MCV protilátky byly detekovány metodou ELISA komerčním soupravou Orgentec Diagnostika, Mainz, Germany. Hodnoty nad 20 IU/ml podle doporučení výrobce byly hodnoceny jako pozitivní.

### 3.2.3 Výsledky

Diagnózy pacientů, jejich počet a přehled výsledků vyšetření jsou uvedeny v tabulce 3.2.1. U 4 pacientů s artrózou (n=6) bylo vyšetření protilátek negativní, u 2 jsme prokázali pouze RF. Ve skupině pacientů se systémovým onemocněním pojiva (n=6) byl jeden vzorek pozitivní na všechny 3 protilátky (pacient s diagnózou Sjögrenův syndrom), u 3 vzorků byl pozitivní jen RF, u 2 vzorků (pacienti s diagnózou SLE, Raynaudův syndrom) byly pozitivní pouze anti-CCP protilátky. U pacientů s nediferencovanou artritidou (n=4) byly 3 vzorky negativní ve všech autoprotiátkách, u jednoho vzorku byl pozitivní pouze RF. U 2 pacientů byla stanovena diagnóza autoimunitní laboratorní syndrom, jeden vzorek byl pozitivní na RF a anti-CCP, další vzorek byl pozitivní jen na RF. Ve skupině pacientů s ostatními diagnózami bylo 11 vzorků, z toho 3 vzorky byly pozitivní jen na RF, 7 bylo negativních na všechny autoprotiátky, jeden vzorek měl slabě pozitivní anti-CCP protilátky. Kontrolních vzorků bylo 8, byly testovány jenom autoprotiátky anti-MCV, a to s negativním výsledkem u všech vzorků.

U pacientů s RA (n=44) výsledky vyšetření autoprotiátek (RF, anti-CCP a anti-MCV) znázorňuje tabulka 3.2.2. U 34 pacientů byly všechny 3 autoprotiátky pozitivní, v 5 případech byly uvedené autoprotiátky negativní (u 2 pacientů byla diagnóza JRA), 1 pacient s nízkou aktivitou onemocnění měl pozitivní pouze RF, další jeden pacient měl pozitivní jen anti-CCP a 3 vzorky byly pozitivní v anti-CCP a anti-MCV a negativní v RF.

Dosažená senzitivita testu anti-MCV byla v našem souboru pacientů s RA 84,1 % a specificita 96,6 %. Dosažené výsledky jsou ovlivněny malým počtem vzorků, které byly použity při zavádění metody.

**Tab. 3.2.1** Jednotlivé diagnózy pacientů, jejich počty a shrnutí výsledků vyšetření RF, anti-CCP a anti-MCV.

diagnóza	počet	výsledky vyšetření
RA	44	uvedeno samostatně
artróza	6	4 vzorky: negativní ve všech autoprotilátkách 2 vz.: RF+, anti-CCP–, anti-MCV–
systémové onemocnění pojiva	6	1 vz.: pozitivní ve všech autoprotilátkách – dg. Sjögrenův syndrom (RF +, anti-CCP 81 IU/ml, anti-MCV 25 IU/ml) 3 vz.: RF+, anti-CCP–, anti-MCV– 2 vz.: RF–, anti-CCP+, anti-MCV– dg. SLE (anti-CCP 48 IU/ml), dg Raynaudův syndrom (anti-CCP 42 IU/ml)
nediferencovaná artritida	4	3 vz.: neg ve všech autoprotilátkách 1 vz.: RF+, anti-CCP–, anti-MCV–
autoimunitní laboratorní syndrom	2	1 vz.: RF+, anti-CCP+, anti-MCV– (hodnota anti-CCP 32 IU/ml) 1 vz.: RF+, CCP–, MCV–
ostatní (myalgie, artralgie, m. Bechtěrev, synovitida, psoriáza, CLL)	11	3 vz.: RF+, anti-CCP–, anti-MCV– 7 vz.: RF–, anti-CCP–, anti-MCV– 1 vz.: RF–, anti-CCP+, anti-MCV– (dg. artralgie, anti-CCP 27 IU/ml)
kontrolní vzorky	8	8 vz.: anti-MCV–

**Tab. 3.2.2** Výsledky vyšetření autoprotilátek u pacientů s RA (n=44).

RA	RF+ anti-CCP+ anti-MCV+	RF– anti-CCP– anti-MCV–	RF+ anti-CCP– anti-MCV–	RF– anti-CCP+ anti-MCV–	RF– anti-CCP+ anti-MCV+
n=44	34	5 (2*)	1**	1	3

\* Pacienti s JRA

\*\* Pacient s nízkou aktivitou onemocnění

Na základě dostupných informací jsme porovnali 2 skupiny probandů – s mírnější (DAS28 $\leq$ 3,2) a aktivní formou onemocnění (DAS28 $>$ 3,2) (n=13, resp. n=12). Porovnali jsme hladiny protilátek anti-CCP a anti-MCV u obou skupin. Výsledky shrnuje tabulka 3.2.3. Vzhledem k malému počtu vzorků nebylo provedeno statistické vyhodnocení. Z výsledků je patrné, že hodnoty (medián i průměr) obou protilátek byly u skupiny pacientů s aktivní formou znatelně vyšší než u skupiny pacientů s mírnější formou. U aktivní formy RA byly hodnoty mediánu anti-CCP 1,7 x vyšší než u skupiny s mírnější formou RA. U anti-MCV byly hodnoty mediánu 10,4 x vyšší než u skupiny s mírnější formou RA. Na tomto malém souboru pacientů trend dosažených výsledků odpovídal publikovaným závěrům.

**Tab. 3.2.3** Porovnání hladin anti-CCP a anti-MCV u mírnějších forem RA a aktivní formy onemocnění.

	mírná forma RA (DAS28 $\leq$ 3,2) (n=13)		aktivní forma RA (DAS28 $>$ 3,2) (n=12)	
	anti-CCP (IU/ml)	anti-MCV (IU/ml)	anti-CCP (IU/ml)	anti-MCV (IU/ml)
rozptyl hodnot	98–3200	38–877	137–3184	23–1000
medián	764	85	1287	885
průměr	971	213	1569	670

### 3.2.4 Diskuze

Stanovení protilátek proti mutovanému citrulinovanému vimentinu doplňuje nabídku vyšetření u revmatoidní artritidy. Vimentin je protein cytoskeletu, je široce exprimován mezenchymálními buňkami a makrofágy a je snadno detekován v synovii. K modifikaci proteinu dochází během apoptotických pochodů a autoprotilátky se objeví, pokud není apoptotický materiál adekvátně odstraněn. Prvními protilátkami proti citrulinovanému vimentinu byly anti-SA protilátky, které byly testovány metodou Western blot. Specificita byla srovnatelná s anti-CCP, ale sensitivita byla pouze 20–45% (Despres 1994). Souprava anti-MCV stanovuje protilátky proti mutovanému citrulinovanému vimentinu, kdy antigen je navíc mutovaný. Literární zdroje uvádí, že anti-MCV assay má sice srovnatelnou specificitu (97 %) s anti-CCP protilátkami, ale lepší senzitivitu (82 %). Anti-MCV lépe kopíruje skóre aktivity choroby (DAS28) a lépe stratifikuje mírnou a aktivnější formu RA



(Bartoloni 2012, Qin 2011, Luime 2010, Mutlu 2009). V našem souboru pacientů výskyt anti-MCV protilátek kopíroval přítomnost anti-CCP protilátek, hladiny anti-MCV odrážely v průměru aktivitu onemocnění, ale pro jasné statistické vyhodnocení by bylo třeba větší soubor pacientů.

### **3.3. Posouzení přínosu stanovení sérové hladiny matrixové metaloproteinázy 3 v kontextu ostatních nálezů pro identifikaci pacientů ve větším riziku rozvoje destruktivní polyartritidy u RA**

#### **3.3.1 Úvod**

Jedním faktorů podílejících se na patogenezi RA jsou prozánětlivými cytokiny aktivované matrixové metaloproteinázy (MMP). Podílejí se na degradaci řady proteinů, např. proteoglykanů, lamininů, fibronektinů. MMP-3 hraje klíčovou úlohu v kloubní destrukci. Hladina sérové MMP-3 je signifikantně zvýšená u pacientů s RA ve srovnání s kontrolním souborem zdravých jedinců (Mamehara 2010). Rovněž koncentrace v synoviální tekutině může být u pacientů zvýšená. Vzhledem k tomu, že sérová hladina MMP-3 odráží lokální zánět, může sloužit i jako marker aktivity procesu. Vysoké hladiny mohou předpovídat vážnější destruktivní poškození kloubu již v časném období nemoci (Mamehara 2010).

Cílem práce bylo zjistit, zda sérové koncentrace MMP-3 u pacientů s RA jsou zvýšené oproti hladinám u pacientů s jinými diagnózami a proti kontrolnímu souboru zdravých jedinců. Dalším cílem bylo porovnat MMP-3 s jinými laboratorními parametry, s klinickým skóre DAS28 a RTG nálezy.

#### **3.3.2 Materiál a metodika**

Soubor tvořilo 92 pacientů splňující kritéria RA z roku 2010. 24 vzorků pacientů mělo stanovenou jinou diagnózu, a to s následujícím zastoupením: ankylozující spondylitida (n=4), jiná systémová onemocnění (n=4), reaktivní artritida (n=14), nefritický syndrom (n=1) a autoimunitní laboratorní syndrom (n=1). Jako kontrolní soubor bylo použito 26 vzorků z transfúzního oddělení. MMP-3 byla vyšetřována v séru, metodou ELISA s využitím soupravy Aeskulisa DF MMP3 (Germany). U pacientů s RA byly vyhodnoceny i následující parametry: RF, anti-CCP, CRP, FW, DAS28 a RTG známky postižení. Ke

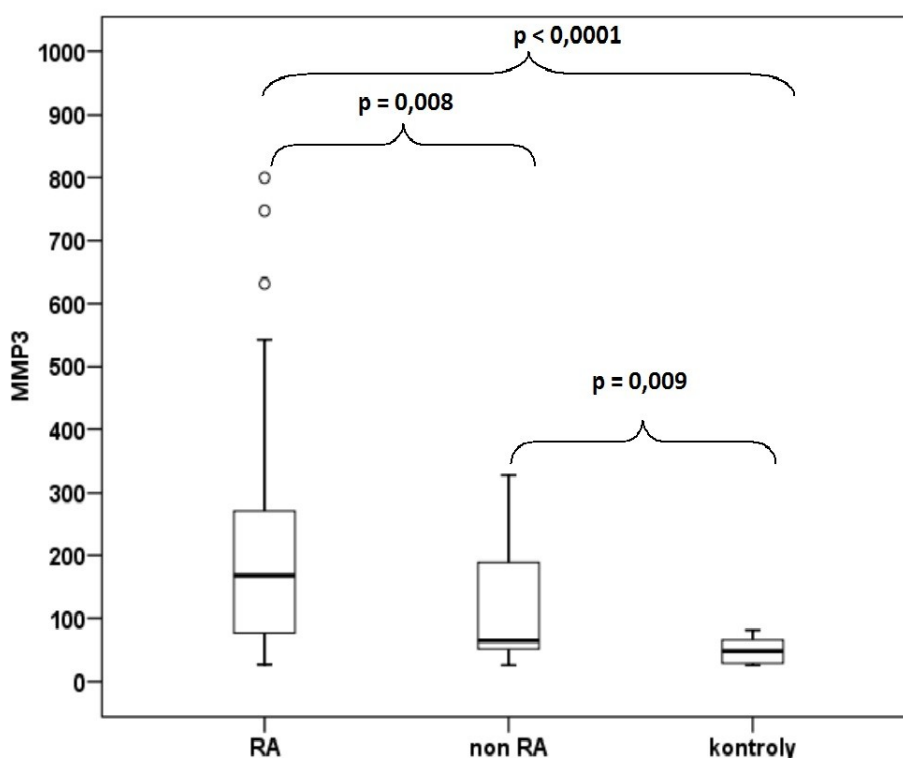
statistickému zhodnocení byly použity Mannův-Whitneyho test a Spearmanův korelační koeficient.

### 3.3.3 Výsledky

Průměrná hodnota MMP-3 u pacientů s RA byla 199,1 ng/ml, u non-RA pacientů 113,9 ng/ml, u kontrolních vzorků 48 ng/ml. Medián hodnot u RA 168 ng/ml, u non-RA pacientů 64 ng/ml, u kontrolních vzorků 47,5 ng/ml. Výsledky ukazuje tabulka 3.3.1. Graf 3.3.1 zachycuje statisticky významný rozdíl v koncentraci MMP-3 mezi skupinou RA a kontrolním souborem ( $p < 0,0001$ ), mezi RA a non-RA skupinou ( $p = 0,008$ ) a non-RA skupinou a kontrolním souborem ( $p = 0,009$ ).

**Tab.3.3.1** Hodnoty MMP-3 u pacientů s RA, u non-RA pacientů a u kontrol.

MMP-3 ng/ml	RA (n=92)	Non RA (n=24)	Kontroly (n=26)
x ( $\pm$ SD)	199,1 $\pm$ 160	113,9 $\pm$ 96,9	48,3 $\pm$ 19,2
M (min–max)	168 (26–800)	64 (25–327)	47,5 (25–81)



**Graf 3.3.1** Znázornění signifikantního rozdílu v koncentracích MMP-3 u pacientů s RA, non-RA a kontrolní skupiny.

Koncentrace MMP-3 u pacientů s RA byla srovnána s výsledky dalších laboratorních testů, s klinickým skórovacím systémem (DAS28) a RTG výsledky. Průměrné hodnoty MMP-3 byly 199,1 ng/ml; RF 79,8 IU/ml; anti-CCP 1479,3 IU/ml; CRP 12,2 mg/l; sedimentace 18,9; DAS28 3,7 a RTG stádium 2,3. Shrnující nálezy ukazuje tabulka 3.3.2.

Tabulka 3.3.3 znázorňuje Spearmanovu korelaci mezi MMP-3 a CRP ( $r=0,304$ ,  $p=0,01$ ), DAS28 ( $r=0,301$ ,  $p=0,01$ ), anti-CCP ( $r=0,251$ ,  $p=0,05$ ), FW ( $r=0,208$ ,  $p=0,05$ ) a RTG vyšetřením ( $r=0,211$ ,  $p=0,05$ ). Korelace nebyla prokázána mezi MMP-3 a RF.

**Tab.3.3.2** Popisná charakteristika laboratorních výsledků, klinického obrazu a RTG výsledků u pacientů s RA.

RA n=92	MMP-3 ng/ml	RF IU/ml	anti-CCP IU/ml	CRP mg/l	FW	DAS 28	RTG stádium
x±	199,1±	179,8±	1479,3±	12,2±	18,9±	3,7±	2,3±
SD	160	242,7	1288,6	16,2	15,5	1,5	0,9
M	168	50,7	1420	4,5	13,9	3,6	2
(min–max)	(26–800)	(10,1–724)	(25–3200)	(0,3–89,9)	(1–62)	(1,1–6,84)	(1–4)

**Tab 3.3.3** Spearmanova korelace MMP-3 s vyšetřením CRP, DAS 28, anti-CCP, FW, RTG.

MMP-3	RF	anti-CCP	CRP	FW	DAS 28	RTG
r	0,008	0,251*	0,304**	0,208*	0,301**	0,211*
p	0,942	0,016	0,003	0,047	0,004	0,044

### 3.3.4 Diskuze

Zjistili jsme, že sérové hladiny MMP-3 byly signifikantně zvýšeny u pacientů s RA ve srovnání s kontrolní skupinou. U non-RA pacientů byla koncentrace signifikantně nižší než u RA pacientů, ale signifikantně vyšší oproti kontrolní skupině. Podobné závěry jsou popisovány autory Keyszer G. et al (Keyszer 1999). Ti se dále zabývali tím, zda markery jako MMP-1, MMP-3, TIMP-1, MT-1 komplex lépe odráží klinickou aktivitu než cytokiny, CRP, FW a RF. Konstatovali, že korelace MT-1 s klinickými daty byla slabší než u MMP-3. MMP-3 také lépe korelovala s aktivitou nemoci než cytokiny. V jejich studii se však neprokázala lepší korelace MMP-3 s klinickou aktivitou než u CRP.

Zjistili jsme korelaci mezi koncentrací MMP-3 a DAS28, CRP, anti-CCP, FW, RTG nálezem, což je konzistentní se studií Ribbense (Ribbense 2000). Autoři uvádí, že časné změny MMP-3 by mohly předpovídat vzplanutí onemocnění. Sérová MMP-3 jako prediktor radiografické progrese u RA je také téma studie Akira Mamehara (Mamehara 2010). Burrage P. S. et al (Burrage 2006) popisují roli MMP-1, MMP-13 v procesu destrukce kolagenu. Autoři zmiňují, že exprese dalších MMPs jako MMP-2, MMP-3 a MMP-9 je také zvýšená u artritid a že tyto enzymy degradují nekolagenní komponenty kloubu. Předpokládají, že ovlivnění exprese genů pro MMP může představovat nový impuls pro hledání nových terapeutických přístupů k prevenci kloubní destrukce.

Vyšetřování MMP je velmi slibným markerem do budoucna, zatím však stanovování zůstává doménou výzkumných prací a není používáno rutinně.

### **3.4 Posouzení přínosu stanovení hladin vybraných složek komplementu (C3, C4, C1q) a anti-C1q protilátek pro zhodnocení aktivity SLE a přítomnosti lupusové nefritidy.**

#### **3.4.1 Úvod**

Nejen u SLE, ale i u dalších systémových autoimunitních chorob, hraje komplement ambivalentní roli. Aktivace komplementových kaskád přispívá k rozvoji zánětlivé reakce, avšak složky komplementu jsou současně důležité pro odstraňování imunokomplexů nebo apoptotického materiálu z cirkulace. Tím omezují množství potencionálních cílů pro autoimunitní reakce. Řada abnormalit komplementového systému je popisována u SLE. Dysfunkce komplementu se podílí významně i na patogenezi nemoci. SLE je charakterizován nadprodukcí více jak 100 různých autoproti látek. Anti-C1q protilátky jsou nejvýznamnějšími protilátkami proti komplementovému systému u SLE, představují významný faktor v patogenezi poškození ledvin a mohou sloužit jako sérologický ukazatel přítomnosti lupusové nefritidy a indikátor aktivity choroby.

Cílem studie bylo potvrdit přítomnost zvýšené hladiny anti-C1q protilátek u pacientů s lupusovou nefritidou; zjistit, zda jejich zvýšená koncentrace odráží aktivitu nemoci a porovnat koncentrace C1q a anti-C1q s ostatními laboratorními a klinickými parametry.

### 3.4.2 Materiál a metodika

Vyšetrovaný soubor tvořilo 65 pacientů, z tohoto počtu byli pouze 3 muži. Průměrný věk byl 37 let (18–65). Pacienti splňovali nejméně 4 kritéria pro diagnózu SLE z navržených kritérií American College of Rheumatology. 33 pacientů mělo klinické symptomy lupusové nefritidy, u 22 z nich byla diagnóza potvrzena biopsií. U 32 pacientů SLE probíhal bez lupusové nefritidy. Z hlediska aktivity choroby byli pacienti rozděleni do skupiny s nízkou aktivitou SLE (ECLAM  $\leq 3$ , n=29) a aktivní formou (ECLAM  $> 3$ , n=36).

Koncentrace anti-C1q protilátek byla měřena ELISA testem (výrobce soupravy Bühlmann Company, Švýcarsko). Referenční mez doporučená výrobcem byla 15 IU/ml. Hladina C1q složky komplementu byla měřena pomocí radiální imunodifuze podle Manciniové (souprava Human Complement C1q, The Binding Site, Velká Británie). Výrobce soupravy stanovil pro ženy rozmezí C1q 118–244 mg/l a u mužů 118–238 mg/l za fyziologické. C3 a C4 složka komplementu byla hodnocena nefelometricky na analyzátoru BN II (s použitím antisér Orion Diagnostica, Finsko). Referenční mez pro C3 byla 0,65–1,3 g/l a pro C4 0,16–0,4 g/l. Protilátky anti-dsDNA a antinukleosomální protilátky byly detekovány ELISA testy (soupravy Orgentec Diagnostika GmbH, Německo). Hodnoty do 20 IU/ml byly v referenčním rozmezí. Renální biopsie byla provedena po informovaném souhlasu pacienta. Pro zhodnocení klinické aktivity SLE byly použity indexy ECLAM, SLEDAI a pro zhodnocení tkáňového poškození SLICC/ACR index.

Ke statistickému zhodnocení výsledků byla použita popisná statistika a Mannův-Whitneyho test.

### 3.4.3 Výsledky

Tabulka 3.4.1 obsahuje zjištěné koncentrace vyšetřovaných imunologických parametrů a hodnoty klinických indexů ve sledovaných skupinách pacientů.

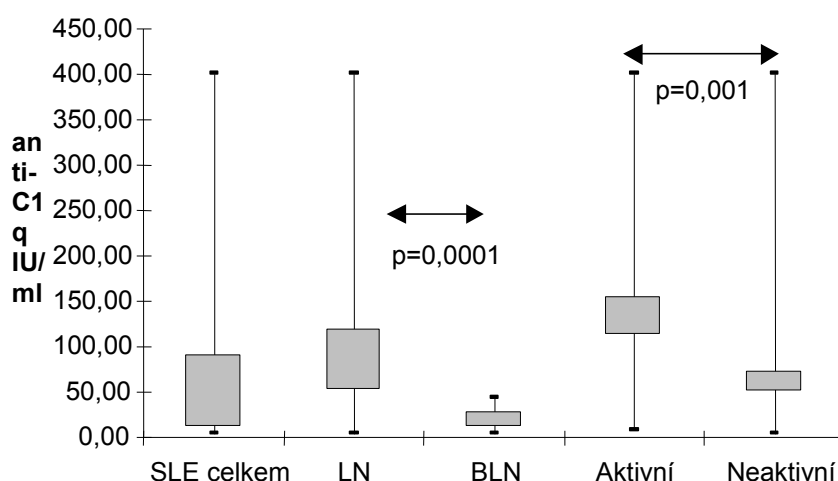
Rozdíl v hladině anti-C1q protilátek byl signifikantní mezi podskupinou s nefritidou a bez ní ( $p=0,0001$ ) a mezi pacienty s aktivní a neaktivní formou SLE ( $p=0,001$ ). Výsledky shrnuje graf 3.4.1.

Rozdíl v hladině C1q byl signifikantní mezi podskupinou s nefritidou a bez ní ( $p=0,002$ ) a mezi pacienty s aktivní a neaktivní formou SLE ( $p=0,001$ ).

Hladiny anti-C1q protilátek statisticky signifikantně korelovaly ( $p \leq 0,05$ ) s C3, C4 ( $r=-0,27$ ,  $r=-0,42$ ), s hladinou anti-dsDNA a antinukleosomálních protilátek ( $r=0,47$ ;  $r=0,31$ ). Korelace s klinickým indexem ECLAM ( $r=0,52$ ) a SLEDAI ( $r=0,56$ ) byla signifikantní, jen korelace s indexem SLICC byla hraniční ( $p=0,055$ ).

**Tab 3.4.1** Souhrn zjištěných koncentrací laboratorních parametrů a klinických indexů v celém souboru pacientů (SLE celkem, n=65), v podskupině s lupus nefritidou (LN, n=33), bez lupus nefritidy (bez LN, n=32) a dále ve skupině pacientů s aktivní (ECLAM>3) a mírnou formou nemoci (ECLAM≤3).

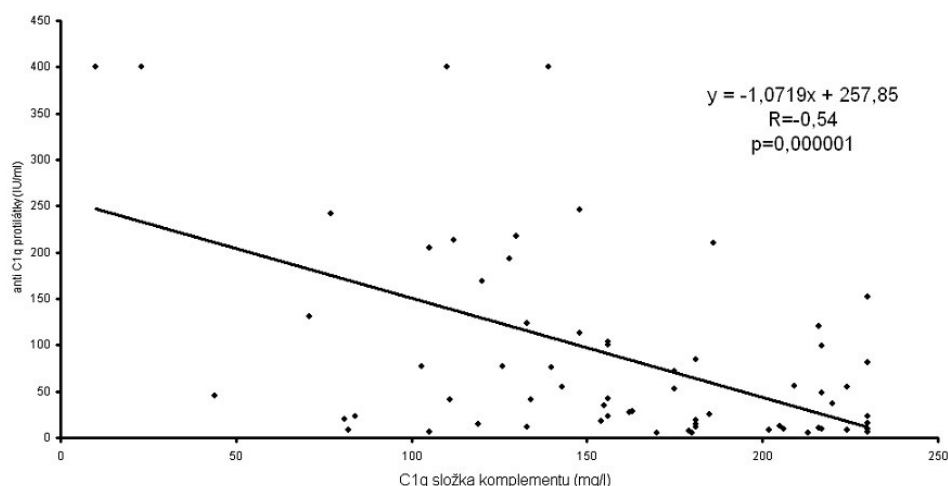
	Anti-C1q (IU/ml)	C1q (mg/l)	C3 (g/l)	C4 (g/l)	Anti- dsDNA (IU/ml)	Anti nukleo (IU/ml)	ECLAM	SLEDAI	SLICC/ ACR
SLE celkem	90,89±13	0,145±0,052	0,63±0,15	0,15±0,11	68±60,3	101±76	2,6±1,6	6,1±5,1	1,3±1,5
LN	117,5±52	0,144±0,031	0,53±0,12	0,12±0,05	77±30,2	102±56	3,8±1,7	9,5±6,5	2,5±1
bez LN	28,2±12,2	0,175±0,050	0,65±0,11	0,16±0,12	48±30	89±65	1,8±1,0	3±1,2	1,1±0,8
aktivní	154,6±115	0,138±0,043	0,59±0,16	0,14±0,12	88±70	118±77	4,4±0,6	10,7±4,0	1,8±1,4
neaktivní	50,6±73	0,202±0,027	0,66±0,15	0,16±0,10	52±47	88±73	1,44±1,0	2,6±2,1	1,0±0,9



**Graf 3.4.1** Hladiny anti-C1q protilátek v celém souboru pacientů, ve skupině pacientů s lupus nefritidou a bez ní a ve skupině pacientů s aktivní a neaktivní formou SLE.

Hladiny C1q korelovaly signifikantně s C3, C4 ( $r=0,31$ ;  $r=0,31$ ), s hladinou anti-dsDNA a antinukleosomálních protilátek ( $r=-0,29$ ;  $r=-0,26$ ). Korelace s klinickým indexem ECLAM ( $r=-0,36$ ) a SLEDAI ( $r=-0,28$ ) byla signifikantní, korelace se SLICC se neprokázala.

Korelace mezi koncentrací C1q a anti-C1q protilátek vykazovala inverzní vztah mezi oběma parametry, což znázorňuje graf 3.4.2.



**Graf 3.4.2** Korelace mezi C1q a anti-C1q protilátkami ukazuje reverzní vztah mezi oběma parametry.

### 3.4.4 Diskuze

Ve studii jsme potvrdili nález zvýšené koncentrace anti-C1q protilátek a současně snížené hladiny C1q složky komplementu u pacientů s lupusovou nefritidou, což odpovídá předchozím zjištěním (Monova 2002, Gladman 1999, Horvath 2001, Horák 2004, Kumar 1999, Oelzner 2003). Zajímavým paradoxem u SLE je, že s deficiencí C1q je spojeno autoimunitní onemocnění, neboť dochází ke snížené eliminaci apoptotického materiálu (Stone 2000), ale současně řada pacientů produkuje protilátky proti C1q. C1q se fyziologicky váže na apoptotická tělíska a tak podporuje jejich clearance. Při selhávání eliminace tohoto materiálu se C1q stává součástí antigenního komplexu na povrchu buňky a terčem pro tvorbu autoprotiátek (Pickering 2000). Výskyt SLE s hereditární C1q deficiencí je velmi vzácný, nicméně připívá k objasnění patogeneze choroby (Berkel 1997, Mitchell 2002). Kromě C1q i další složky komplementu zasahují do rozvoje zánětu. Na imunokomplexech deponovaných v tkáních jsou vychytávány C3, C4 složky a tím následně dochází ke snižování jejich koncentrace v séru. U SLE je obvykle snížená C4 složka, C3 složka se snižuje méně nebo skoro vůbec (Walport 2002, Botto 2002). V naší studii však byla patrna tendence k poklesu obou těchto složek u pacientů s vyšší hladinou anti-C1q. Přítomnost anti-C1q protilátek není vázaná jen na lupus nefritidu, ale byly popsány i u hypokomplementové urtikariální vaskulitidy a kryoglobulinémie (Pickering 2003, Wisnieski 1989).

Korelace anti-C1q a C1q s klinickými indexy ukazuje na možnost využití vyšetření pro posouzení aktivity SLE. Jelikož hladiny nekorelovaly s indexem poškození SLICC nedoporučujeme je použít jako markery orgánového postižení u SLE.

### **3.5 Posouzení přínosu vyšetření antinukleozomálních protilátek, neopterinu, trombomodulinu a dalších sérových markerů jako indikátorů klinické aktivity SLE a nástrojů k monitoraci průběhu choroby**

#### **3.5.1 Úvod**

Pro hodnocení aktivity SLE se stále hledá specifický a senzitivní marker, který by aspoň částečně vycházel z patogenezy onemocnění. Sledování hladin anti-dsDNA protilátek se všeobecně přijímá jako faktor k monitorování aktivity zánětlivého procesu, avšak v řadě případů nereaguje na aktivitu choroby dostatečně senzitivně. Existují také pacienti s hladinami anti-dsDNA v mezích normy, což snižuje jejich výpovědní hodnotu (Boehme 1994, Boehme 2000). Rovněž vyšetřování koncentrace složek komplementu nekopíruje vždy jednoznačně dynamiku choroby.

Cílem práce bylo posoudit, zda další novější dostupné parametry mohou doplnit nabídku vyšetření k posouzení aktivity SLE.

#### **3.5.2 Materiál a metodika**

Soubor tvořilo 52 pacientů ve věku 20–73 let (průměr 39) s délkou trvání onemocnění 0–20 let (průměr 4 roky). Pacienti splňovali nejméně 4 kritéria pro diagnózu SLE dle kritérií American College of Rheumatology (ACR).

Anti-dsDNA protilátky byly vyšetřovány ELISA testem (Ubi-Magiwell, Mountain View, USA) s následujícím hodnocením: <30 IU/ml negativní, 30–40 IU/ml hraniční, >40 IU/ml pozitivní. Hladiny C3 a C4 složek komplementu byly měřeny na nefelometru BN II s využitím antisér firmy Behringer AG (Marburg, Německo) s referenčním rozmezím 0,65–1,45 g/l pro C3 a 0,18–0,50 g/l pro C4. Sérové koncentrace trombomodulinu byly měřeny ELISA testem (Diagnostica Stago, Asnieres, Francie). Antinukleosomální protilátky byly vyšetřeny komerčním kitem Medizym anti-Nucleo (Medipan Diagnostica, Selchow, Německo) s následujícím hodnocením: >25 IU/ml pozitivní, ≤25 IU/ml negativní. Koncentrace neopterinu v séru byla měřena ELISA soupravou (Milenia DPC, USA) s referenčním rozmezím 3–9 nmol/ml. Sérové hladiny Fas ligand molekuly byly měřeny ELISA soupravou (MBL, Nagoya, Japonsko). (V článku byly uvedeny i výsledky stanovení adhezivních molekul a vybraných cytokinů, které byly stanovovány v laboratoři Kliniky nukleární medicíny FN Olomouc).



Všechny laboratorní parametry a index aktivity onemocnění byly hodnoceny u každého pacienta 3x v šestiměsíčním období; na začátku, po třech a šesti měsících. Pacienti byli léčeni podle tíže onemocnění různými kombinacemi léků: kortikoidy, antimalarika, methotrexát, azathioprin, cyklofosamid. Ke klinickému hodnocení aktivity byl použit index ECLAM (European Consensus Lupus Activity Measure), na jehož základě byly vytvořeny tři skupiny pacientů:

A – stabilizované onemocnění (ECLAM index  $\leq 3$  a rozdíl ECLAM indexu během sledování  $\leq 1$ ), 22 pacientů;

B – vysoká/narůstající aktivita onemocnění (ECLAM index  $> 3$  a rozdíl ECLAM indexu během sledování  $> 1$ ), 12 pacientů;

C – snižující se aktivita (ECLAM index  $> 3$  a rozdíl ECLAM indexu během sledování  $\leq -1$ ), 18 pacientů.

Ke statistickému vyhodnocení byly použity následující testy: Pearsonův korelační test pro regresivní analýzu vztahů mezi vyšetřeními a indexem aktivity; ANOVA test pro porovnání 3 skupin pacientů během šestiměsíčního sledování.

### 3.5.3 Výsledky

Průměrné hodnoty ECLAM indexu ve skupině A byly při prvním, druhém a třetím vyhodnocení 1,7, 1,7 a 1,8, ve skupině B 3,7, 4,2 a 4,4, ve skupině C 4,0, 3,0 a 2,4. Výsledky laboratorních testů jsou uvedeny v tabulce 3.5.1.

Anti-dsDNA protilátky vykazaly signifikantní korelaci s indexem ECLAM ( $r=0,33$ ,  $p=0,01$ ), s C3 složkou komplementu ( $r=-0,39$ ,  $p=0,004$ ) a antinukleosomálními protilátkami ( $r=0,55$ ,  $p=0,0002$ ). Sérová hladina anti-dsDNA protilátek byla nejnižší ve skupině A. Při použití analýzy ANOVA byl nalezen signifikantní rozdíl mezi skupinou A a skupinou B ( $p=0,002$ ) během první, druhé i třetí série měření. Skupiny A a C se signifikantně lišily v první a třetí sérii měření ( $p=0,001$ , resp.  $p=0,002$ ).

C3 složka komplementu korelovala s indexem ECLAM ( $r=-0,37$ ,  $p=0,006$ ), anti-dsDNA ( $r=-0,39$ ,  $p=0,004$ ), C4 ( $r=0,57$ ,  $p=0,0001$ ) a trombomodulinem ( $r=-0,34$ ,  $p=0,01$ ). Sérové hladiny C3 byly nejvyšší ve skupině A, ale rozdíly mezi skupinami navzájem ani mezi první a třetí sérií v dané skupině nebyly signifikantní.

C4 složka komplementu korelovala s indexem ECLAM ( $r=-0,31$ ,  $p=0,02$ ). Nejvyšší koncentrace byla ve skupině A se stabilizovaným onemocněním. Rozdíly mezi skupinami navzájem ani mezi první a třetí sérií v dané skupině nebyly signifikantní.

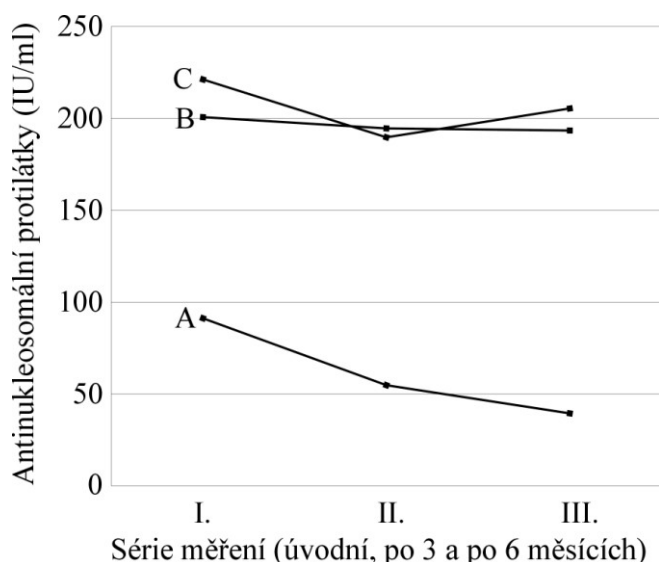
**Tab. 3.5.1** Průměrné sérové hladiny laboratorních markerů u pacientů se SLE ve skupinách A, B, C (A – stabilizované onemocnění, B – narůstající aktivita, C – snižující se aktivita) během I., II. a III. série měření (úvodní, po třech a po šesti měsících).

Parametr	Série vyšetření	Skupina A (průměr ± SD)	Skupina B (průměr ± SD)	Skupina C (průměr ± SD)
Anti-dsDNA (IU/ml)	I.	21,6 ± 41,1	67,5 ± 75,6*	82,3 ± 59,4*
	II.	18,5 ± 29,9	84,3 ± 69,3*	12,4 ± 51,5**
	III.	13,2 ± 10,6	65,6 ± 56,6*	70,1 ± 56,8*
C3 (g/l)	I.	0,70 ± 0,21	0,66 ± 0,15	0,54 ± 0,19
	II.	0,72 ± 0,18	0,64 ± 0,12	0,61 ± 0,14
	III.	0,63 ± 0,15	0,59 ± 0,14	0,61 ± 0,15
C4 (g/l)	I.	0,18 ± 0,07	0,15 ± 0,06	0,14 ± 0,09
	II.	0,15 ± 0,05	0,14 ± 0,04	0,15 ± 0,07
	III.	0,15 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,16 ± 0,07
Antinukleosomální protilátky (IU/ml)	I.	81,0 ± 149,6	200,4 ± 184,5*	223,7 ± 164,5*
	II.	55,6 ± 62,6	192,0 ± 207,7*	185,6 ± 151,2*
	III.	35,7 ± 35,5	188,0 ± 174,0*	207,0 ± 166,5*
Trombomodulin (ng/ml)	I.	32,0 ± 11,5	51,9 ± 49,0*	62,8 ± 49,0*
	II.	37,9 ± 12,0	72,6 ± 44,0*	38,7 ± 21,3**
	III.	36,5 ± 6,8	98,1 ± 71,4*	40,4 ± 17,1*
Neopterin (nmol/ml)	I.	8,6 ± 7,9	12,8 ± 9,0*	14,1 ± 9,5*
	II.	10,0 ± 11,6	12,4 ± 8,0	12,0 ± 7,2
	III.	7,14 ± 3,1	12,9 ± 7,4*	12,5 ± 5,4*
Fas ligand (ng/ml)	I.	0,14 ± 0,05	0,15 ± 0,05	0,14 ± 0,03
	II.	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,15 ± 0,03
	III.	0,16 ± 0,08	0,16 ± 0,04	0,14 ± 0,02

\* Signifikantní rozdíl při srovnání se skupinou A ( $p < 0,05$ )

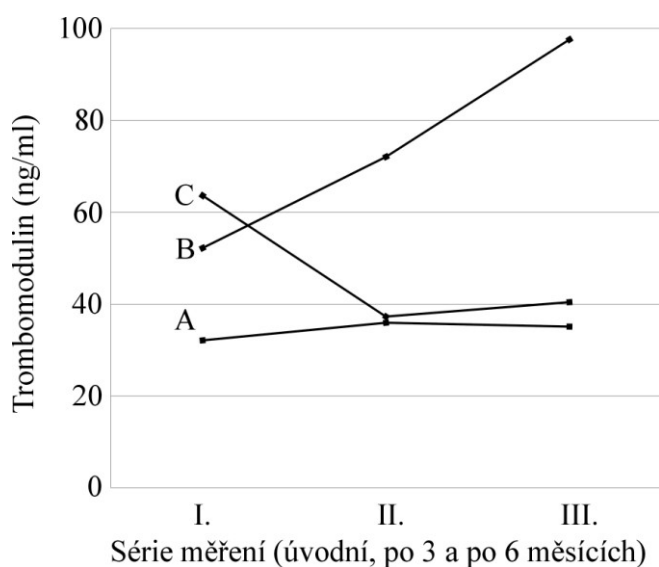
\*\* Signifikantní rozdíl při srovnání se základním měřením ( $p < 0,05$ )

Antinukleosomální protilátky signifikantně korelovaly s indexem ECLAM ( $r=0,35$ ,  $p=0,04$ ), anti-dsDNA ( $r=0,55$ ,  $p=0,0002$ ) a C4 ( $r=-0,31$ ,  $p=0,04$ ). Sérové hladiny antinukleosomálních protilátek byly signifikantně vyšší ve skupině B a C než ve skupině A během všech tří sérií měření ( $p=0,005$ ). V rámci skupin nebyly signifikantní rozdíly mezi sériemi. Vývoj hladin antinukleosomálních protilátek je uveden v grafu 3.5.1.



**Graf 3.5.1** Vývoj hladin antinukleosomálních protilátek během šestiměsíčního sledování u hodnocených skupin pacientů (A – stabilizované onemocnění, B – narůstající aktivita, C – snižující se aktivita).

Trombomodulin vykazoval nejsilnější korelaci s indexem ECLAM ze všech markerů ( $r=0,69$ ,  $p=0,00001$ ) a dále koreloval s C3 ( $r=-0,34$ ,  $p=0,01$ ) a hladinou neopterinu ( $r=0,45$ ,  $p=0,009$ ). Signifikantní rozdíl v jeho hladinách byl nalezen během první série měření mezi skupinou A a B ( $p=0,01$ ) a skupinou A a C ( $p=0,02$ ). Ve druhé sérii měření byl signifikantní rozdíl mezi skupinami A a B ( $p=0,025$ ) a skupinami B a C ( $p=0,01$ ). Ve třetí sérii měření byl statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami A a B ( $p=0,03$ ) a B a C ( $p=0,001$ ). Signifikantní pokles hladiny trombomodulinu byl prokázán mezi první a druhou a první a třetí sérií měření ve skupině C ( $p=0,02$ ). Vývoj hladin trombomodulinu je znázorněn v grafu 3.5.2.



**Graf 3.5.2** Vývoj hladin trombomodulinu během šestiměsíčního sledování u hodnocených skupin pacientů (A – stabilizované onemocnění, B – narůstající aktivita, C – snižující se aktivita).

Hladina neopterinu korelovala s indexem ECLAM ( $r=0,55$ ,  $p=0,00002$ ). Rozdíly v sérové hladině neopterinu byly signifikantní mezi skupinami A a B ( $p=0,01$ ) a A a C ( $p=0,003$ ) během první a třetí série měření.

Sérové hladiny molekuly Fas ligand nekorelovaly signifikantně s žádným sledovaným parametrem.

### 3.5.4 Diskuze

Trombomodulin je glykoprotein umístěný na povrchu intaktních endoteliálních buněk, má antikoagulační aktivitu. Váže trombin, který následně aktivuje peptid C, čímž dochází k inhibici koagulace faktoru V a VIII. (Boehme 1994). Sérový trombomodulin je produkován poškozeným endotelem a předpokládá se, že je těsně spojený s poškozením endoteliálních buněk. V předchozích studiích byl trombomodulin navržen jako možný nový marker aktivity nemoci nebo marker léčebné odpovědi u SLE (Kotajima 1997, Witte 1999). Ze statistické analýzy našich výsledků vyplynulo, že měl nejvyšší korelaci s indexem aktivity nemoci ECLAM ze všech sledovaných parametrů. Trombomodulin také rychle reagoval na změny aktivity onemocnění a odrážel efekt léčby, což bylo patrné ve skupině C. Tento výsledek se shodoval se závěry dalších autorů (Boehme 2000, Boffa 1991).

C3 a C4 složky komplementu jsou tradičními markery aktivity nemoci a odráží ambivalentní roli komplementu v patogenezi SLE. Naše výsledky ukázaly slabší signifikantní korelaci s aktivitou nemoci. Sérové hladiny C3 a C4 nekopírovaly pokles aktivity onemocnění u pacientů ve skupině C dosti rychle. Naše výsledky odpovídají literárním údajům o limitovaném použití C3 a C4 jako spolehlivého markeru aktivity nemoci a terapeutické odpovědi (Boehme 2000).

SLE je charakterizován aktivací B lymfocytů a následnou produkcí orgánově nespecifických protilátek. Vyšetření anti-dsDNA protilátek patří k velmi specifickým testům zejména při stanovení diagnózy (Tan 1982, Boehme 2000). Přesto anti-dsDNA protilátky neodráží vždy aktivitu nemoci a nezanedbatelná část pacientů se SLE je anti-dsDNA negativní. V naší studii byla korelace s indexem aktivity onemocnění slabší než u trombomodulinu. Limitovaný přínos anti-dsDNA protilátek pro predikci relapsu nemoci je uváděn i jinými autory (Swaak 1986, Ter Borg 1990).

Antinukleosomální protilátky namířené proti nativním nukleosomovým částicím se u pacientů se SLE objevují časně a předcházejí tvorbě anti-dsDNA a antihistonových protilátek (Amoura 1999, Kramer 1994). Antinukleosomy byly identifikovány jako

nejvýznamnější imunogen v patogenezi SLE (Amoura 2000, Gilbert 1996). V naší studii měly antinukleosomální protilátky podobnou korelaci s aktivitou choroby jako anti-dsDNA protilátky. Výrazná část anti-dsDNA negativních sér ukázala pozitivitu antinukleosomálních protilátek, ale ne naopak. Tato zjištění podporují použití antinukleosomálních protilátek pro časnou diagnózu SLE (Amoura 2000). Mimo SLE se mohou antinukleosomální protilátky vyskytnout i u smíšené choroby pojiva a systémové sklerodermie (Amoura 2000). Naopak nebývají detekovány u pacientů se zánětlivými myopatiemi, primárním Sjögrenovým syndromem, RA, primárním antifosfolipidovým syndromem, Wegenerovou granulomatosou, velkobuněčnou arteritidou, Takayasovou arteritidou, relabující polychondritidou, sarkoidózou, Behcetovou nemocí a hepatitidou C (Amoura 2000, Brard 1997, Suenaga 1998).

Neopterin, meziprodukt metabolické cesty pteridinu, je uvolňován zejména makrofágy. T lymfocyty prostřednictvím interferonu gama řídí produkci neopterinu (Wachter 1989, Huber 1984). V literatuře je neopterin popisován jako jeden z parametrů aktivity řady nemocí včetně SLE (Samsonov 1995, Lim 1994). V naší skupině pacientů jsme prokázali silnou korelaci mezi sérovými hladinami neopterinu a indexem ECLAM. Neopterin by mohl být užitečný při sledování pacientů s lupusovou nefritidou.

Poslední studie potvrzují, že narušení clearance nukleosomálních komplexů po buněčné apoptóze může iniciovat onemocnění (doplnit citace). O proapoptotické molekule Fas ligand se uvažuje jako o možném markeru k posouzení aktivity onemocnění, který odráží patogenetický aspekt úlohy apoptózy u SLE (Salmon 1999, Bijl 1998). V naší studii se nepodařilo prokázat vztah mezi molekulou Fas ligand a indexem ECLAM nebo jinými parametry. Nicméně sledování markerů apoptózy si zaslouží další výzkum.

Závěrem může konstatovat, že námi získaná data potvrzují úlohu trombomodulinu jako důležitého markeru aktivity onemocnění u SLE. Vzhledem k chybění širšího konsenzu o referenční mezi jeho hladiny se zdá výhodnější sledovat individuální vývoj hladin, které mohou predikovat vaskulární komplikace, nebo monitorovat terapeutickou odpověď. Trombomodulin nelze považovat za jediný parametr ke sledování aktivity onemocnění u SLE – monitoring stále zůstává založený na pečlivém vyhodnocení celého panelu laboratorních testů. Mezi ně patří zejména specifitější markery jako anti-dsDNA a antinukleosomální protilátky.

## **3.6 Posouzení přínosu vyšetření molekul sCD30 a sCD40L jako potenciálních indikátorů aktivity SLE**

### **3.6.1 Úvod**

SLE je autoimunitní onemocnění s řadou imunologických abnormalit, jako jsou např. nadprodukce autoprotilátek, narušený proces apoptózy, defekty v komplementové kaskádě, porucha interakcí mezi T a B lymfocyty (Hermann 2000, Walport 2002). Membránové proteiny CD30 a CD40L patří do skupiny molekul tumor nekrotizujícího faktoru (TNF). Jsou úzce spjaty s interakcí mezi T a B lymfocyty – ovlivňují maturaci, proliferaci i apoptózu těchto buněk.

Molekula CD30 je normálně exprimována na povrchu aktivovaných CD45RO+ T lymfocytů. Její hlavní funkcí je regulace proliferace a apoptózy. Aktivované T lymfocyty uvolňují ze svého povrchu solubilní formy CD30 – sCD30 (Falini 1995). Vysoké hladiny sCD30 přítomny u imunodeficiencí, alergických nemocí a závažných infekcí (Samy 2000, Okamoto 2003). CD40 je transmembránový protein exprimovaný zejména na B lymfocytech. Korespondující ligandou pro tuto molekulu je sCD40L, která se nachází na pomocných T lymfocytech. Interakce mezi těmito dvěma molekulami vede k aktivaci B buněk a ovlivňuje jejich apoptózu.

Naše studie se zaměřila na porovnání sCD30 a sCD40L u pacientů se SLE a u zdravých kontrol a srovnání s dalšími parametry aktivity SLE.

### **3.6.2 Materiál a metodika**

Sérové hladiny sCD30 a sCD40L byly vyšetřeny u 65 pacientů se SLE (62 žen, 3 muži, ve věku 18–65 roků, průměrný věk 37 let). Všichni pacienti splňovali nejméně 4 kritéria pro SLE stanovené American College of Rheumatology (ACR) (Tan 1982). Pacienti byli rozděleni do skupin s lupus nefritidou (n=33) a bez ní (n=32) a podle aktivity onemocnění stanovené na základě indexu ECLAM (Bencivelli 1992). 36 pacientů mělo index ECLAM>3, 29 nemocných mělo nízkou aktivitu nemoci s indexem ECLAM≤3. Dále bylo vyšetřeno 20 kontrolních sér pro sCD30 a 15 pro sCD40L.

Koncentrace sCD30 a sCD40L byly stanovovány metodou ELISA s využitím komerčních souprav Bender MedSystems (USA). Referenční mez pro sCD30 stanovená výrobcem byla 17,5–130,7 IU/ml, pro sCD40L 0,03–3,98 ng/ml. Anti-dsDNA, antinukleosomální protilátky byly detekovány rovněž ELISA testem (Orgentec

Diagnostika, Mainz, Německo) s negativním výsledkem do 20 IU/ml. Hladiny anti-C1q byly měřeny ELISA testem (Bühlmann Company, Švýcarsko) s negativní hodnotou do 15 IU/ml. Hladiny C1q složky komplementu byly měřeny radiální imunodifuzí soupravou Human Complement C1q Bindarid Radial Immunodifusion, The Binding Site, Velká Británie). Referenční meze stanovené výrobcem byly u žen 118–244 mg/l, u mužů 118–238 mg/l. C3 a C4 složky komplementu byly měřeny na nefelometru BNII s diagnostickými antiséry Orion Diagnostica Company (Espoo, Finsko). Referenční limity pro C3 byly 0,65–1,3 g/l, pro C4 0,16–0,4 g/l.

Aktivita nemoci byla hodnocena skórovacími indexy ECLAM a SLEDAI (SLE disease activity index). Pro posouzení poškození tkání byl použit index Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) American College of Rheumatology (ACR) (Bencivelli 1992, Bombardier 1992, Gladman 1999).

Ke statistickému vyhodnocení výsledků byl použit Mannův-Whitneyho test, analýza variance (ANOVA), Studentův t-test a korelační testy.

### 3.6.3 Výsledky

Průměrná hladina sCD30 v celém souboru pacientů se SLE byla  $66,0 \pm 40,2$  IU/ml;  $60,0 \pm 45,2$  IU/ml u pacientů s lupus nefritidou;  $67,1 \pm 38,9$  IU/ml ve skupině bez nefritidy;  $80,2 \pm 51,9$  IU/ml ve skupině s aktivní formou SLE (ECLAM > 3);  $55,4 \pm 24,1$  IU/ml u pacientů s nízkou aktivitou nemoci (ECLAM  $\leq$  3) a  $40,1 \pm 19,2$  IU/ml u kontrolní skupiny. Statisticky významný rozdíl v hladinách sCD30 jsme zjistili mezi celou skupinou pacientů a kontrolním souborem ( $p=0,0001$ ) a mezi skupinou pacientů s aktivní a neaktivní nemocí ( $p=0,002$ ). Koncentrace sCD30 signifikantně korelovaly ( $p \leq 0,05$ ) s indexy ECLAM a SLEDAI ( $r=0,25$  a  $r=0,25$ ); s C1q, C4 ( $r=0,29$  a  $r=0,24$ ). Signifikantní korelace nebyla zjištěna mezi sCD30 a anti-C1q protilátkami, sCD40L, C3, anti-dsDNA, antinukleosomálními protilátkami a SLICC indexem.

Průměrná hladina sCD40L v celém souboru pacientů se SLE byla  $7,4 \pm 6,7$  ng/ml;  $7,0 \pm 8,1$  ng/ml u pacientů s lupus nefritidou;  $8,0 \pm 4,9$  ng/ml ve skupině bez nefritidy;  $7,1 \pm 5,0$  ng/ml ve skupině s aktivní formou SLE;  $7,7 \pm 7,8$  ng/ml u pacientů s nízkou aktivitou nemoci a  $2,96 \pm 1,39$  ng/ml u kontrolní skupiny. Statisticky významný rozdíl v hladinách sCD40L jsme zjistili mezi celou skupinou pacientů a kontrolním souborem ( $p=0,02$ ). Pouze hraniční inverzní korelace byla mezi sCD40L a anti-C1q ( $r=0,21$ ,  $p=0,05$ ). S ostatními parametry a klinickými indexy nebyla zjištěna signifikantní korelace.

Zjištěné hodnoty anti-dsDNA protilátek, antinukleosonálních protilátek, anti-C1q protilátek, C1q, C3 a C4 složky komplementu jsou uvedeny v tab. 3.6.1.

**Tab. 3.6.1** Hodnoty sledovaných laboratorních parametrů v jednotlivých skupinách pacientů.

Parametr	Celý soubor pacientů	Pacienti s nefritidou	Pacienti bez nefritidy	Pacienti s aktivní formou SLE	Pacienti s nízkou aktivitou SLE
sCD30 (IU/ml)	66,0±40,2	60,0±45,2	67,1±38,9	80,2±51,9	55,4±24,1
sCD40L (ng/ml)	7,4±6,7	7,0±8,1	8,0±4,9	7,1±5,0	7,7±7,8
C1q (mg/l)	145±52,9	144±31	175±50	138±28	202±27
anti-C1q (IU/ml)	89,0±13,0	117,5±52,0	28,2±12,2	154,6±115,0	50,6±73,0
C3 (g/l)	0,63±0,15	0,53±0,12	0,65±0,11	0,59±0,16	0,66±0,15
C4 (g/l)	0,15±0,11	0,12±0,05	0,16±0,12	0,14±0,12	0,16±0,10
anti-dsDNA (IU/ml)	68,0±60,3	77,0±30,2	48,0±30,0	88,0±70,0	52,0±47,0
antinukleosomální protilátky (IU/ml)	101,0±76,4	102,0±56,0	89,0±65,0	118,0±77,0	88,0±73,0

### 3.6.4 Diskuze

K nejvýznamnějším změnám imunologických laboratorních parametrů patří u SLE nadprodukce řady autoproti látek a abnormality v komplementovém systému (Hermann 2000). SLE je asociován zejména s nízkou hladinou C1q, C3 a C4 (Cooper 1985, Elliot 1953, Horak 2005). Můžeme také zjistit protilátky proti složkám komplementu, jako např. anti-C1q, které nacházíme ve zvýšené koncentraci u lupusové nefritidy (Elliot 1953, Trouw 2004). U pacientů se SLE je také narušená interakce mezi B a T lymfocyty. Abnormální exprese klíčových signálních molekul a defektní signální transdukční cesty mezi T a B lymfocyty mohou být příčinou přežívání autoimunitních klonů B lymfocytů s nadprodukcí autoproti látek (Hahn 2005, Ramanujam 2006). Porušená apoptóza a clearance apoptotického materiálu mohou spouštět zvýšenou produkci IFN $\alpha$ , způsobovat zánět a nadprodukci protilátek (Hill 1996).



Vyšší hladiny sCD30 signifikantně korelují s aktivitou řady nemocí včetně SLE (Hill 1996, Kato 1999). Sérová hladina sCD30 může být použita jako indikátor počtu CD30+ buněk v organizmu.

V naší studii jsme prokázali vysoce signifikantní rozdíl mezi pacienty se SLE a kontrolním souborem a mezi aktivní a neaktivní formou SLE. Důležitým zjištěním je korelace sCD30 s C4 a C1q. Korelace hladiny sCD30 s klinickými indexy aktivity ECLAM a SLEDAI ukazuje na možnost využití tohoto markeru pro sledování aktivity SLE, ale s určitým omezením vzhledem k nízké specifitě tohoto testu.

V předchozí studii byly popsány zvýšené hladiny sCD40L u pacientů se SLE při srovnání s kontrolním souborem (Goules 2006). Toto zjištění jsme potvrdili i v naší studii. Jiné významné korelace jsme neprokázali. I přes důležitou roli sCD40 ve fyziologii a patologii interakce mezi T a B lymfocyty se zdá, že vyšší sérové hladiny tohoto parametru jsou spojeny pouze s přítomností SLE, ale neodráží aktivitu nemoci.

## 4. ZÁVĚREČNÉ SHRnutí

Vývoj názorů na etiologii, diagnostiku a terapii autoimunitních onemocnění patří k nejdynamičtějším úsekům současné imunologie. Zohledňuje nové poznatky na molekulárně-genetické úrovni v oblasti nespecifické i specifické imunity. Nové informace o senzoričských systémech imunity, jako jsou Toll-like receptory, NOD-receptory a další extracelulární i intracelulární receptorové systémy, rozšiřují naše znalosti o etiologii autoimunitních chorob a zvyšují počet cílových molekul, které mohou být významné při terapeutických zásazích. Tomuto vývoji odpovídá i počet narůstajících diagnostických přístupů, z nichž mnohé jsou ještě na experimentální úrovni. Je přirozená snaha vyhodnotit tyto jednotlivé přístupy a pootevřít tak cestu k přesnější diagnostice, dřívějšímu zachycení onemocnění a tím efektivnější terapii. Příslibem do budoucna jsou rozvíjející se postupy v oblasti sekvenování DNA (např. next-generation sequencing), které umožňují monitorování polymorfizmu relevantních genů ovlivňujících funkci imunitního systému.

Předkládaná práce je založena na výsledcích dlouhodobé spolupráce s revmatology III. interní kliniky FN Olomouc. V průběhu uplynulých let jsme testovali řadu imunologických laboratorních parametrů, z nichž některé se staly součástí rutinní praxe, některá vyšetření si zaslouží další sledování a hodnocení v kontextu nových poznatků, u jiných jsme praktický přínos neprokázali.

Cílem práce bylo posouzení výpovědní hodnoty a přínosu vybraných laboratorních metod u revmatoidní artritidy a systémového lupus erythematoses. Revmatoidní artritida představuje nejčastější systémové autoimunitní onemocnění, kde včasná diagnóza a zahájení terapie zabraňuje kloubnímu postižení a negativnímu ovlivnění kvality života. Diagnostické rozvaze napomáhají i výsledky laboratorních vyšetření. Systémový lupus erythematoses je prototypem imunokomplexové systémové nemoci s variabilním klinickým obrazem, vážnými dopady na řadu orgánů. Monitoring aktivity nemoci je vítaným nástrojem ke zhodnocení účinnosti léčby.

Z výsledků naší práce vyplývají následující závěry:

- Anti-CCP protilátky jsou významným diagnostickým testem pro časnou diagnózu revmatoidní artritidy. Naše práce potvrdila jejich výbornou výpovědní hodnotu pro toto onemocnění. Stanovení těchto protilátek se stalo rutinním a nepostradatelným testem, což se odráží rovněž v jeho zařazení do nových klasifikačních kritérií RA.

- Stanovení protilátek proti mutovanému citrulinovanému vimentinu doplňuje nabídku vyšetření u revmatoidní artritidy. V našem souboru pacientů výskyt anti-MCV protilátek kopíroval přítomnost anti-CCP protilátek, hladiny anti-MCV odrážely v průměru aktivitu onemocnění.
- Zjistili jsme, že sérové hladiny MMP-3 byly signifikantně zvýšeny u pacientů s revmatoidní artritidou ve srovnání s kontrolní skupinou. U non-RA pacientů byla koncentrace signifikantně nižší než u RA pacientů, ale signifikantně vyšší oproti kontrolní skupině. Prokázali jsme korelaci mezi koncentrací MMP-3 a DAS28, CRP, anti-CCP, FW, RTG nálezem. Vyšetřování matrixových metaloproteináz je velmi slibným markerem do budoucna, zatím však stanovování MMP zůstává doménou výzkumných prací a není používáno rutinně.
- Potvrdili jsme nález zvýšené koncentrace anti-C1q protilátek a současně snížené hladiny C1q složky komplementu u pacientů s lupusovou nefritidou. Korelace anti-C1q a C1q s klinickými indexy ukazuje na možnost využití vyšetření pro posouzení aktivity SLE. Jelikož hladiny nekorelovaly s indexem poškození SLICC nedoporučujeme je použít jako markery orgánového postižení u SLE.
- Ze statistické analýzy našich výsledků u pacientů se SLE vyplynulo, že trombomodulin měl nejvyšší korelaci s indexem aktivity nemoci ECLAM ze všech námi sledovaných parametrů. Trombomodulin také rychle reagoval na změny aktivity onemocnění a odrážel efekt léčby. Vyšetření C3 a C4 složky komplementu ukázalo slabší, ale signifikantní korelaci s aktivitou nemoci. Vyšetření anti-dsDNA protilátek je klasickým rutinním vyšetřením při podezření na SLE, i když jsme prokázali slabší korelaci s indexem aktivity onemocnění než u trombomodulinu. Antinukleosomální protilátky měly podobnou korelaci s aktivitou choroby jako anti-dsDNA protilátky a staly se nedílnou součástí standardního laboratorního vyšetření u pacientů se SLE. Prokázali jsme silnou korelaci mezi sérovými hladinami neopterinu a indexem ECLAM. Neopterin by mohl být užitečný při sledování pacientů s lupusovou nefritidou.
- Prokázali jsme vysoce signifikantní rozdíl sérové koncentrace sCD30 mezi pacienty se SLE a kontrolním souborem a mezi aktivní a neaktivní formou SLE. Důležitým zjištěním je korelace sCD30 s C4 a C1q složkami komplementu. Korelace hladiny sCD30 s klinickými indexy aktivity ECLAM a SLEDAI ukazuje na možnost využití tohoto markeru pro sledování aktivity SLE, ale s určitým omezením vzhledem

k nízké specificitě tohoto testu. Potvrdili jsme signifikantně zvýšenou hladinu sCD40L u pacientů se SLE při srovnání s kontrolním souborem. Jiné významné korelace molekuly sCD40L s dalšími vyšetřovanými parametry jsme neprokázali.

## 5. SEZNAM LITERATURY

- Alessandri C., Bombardieri M., Papa N. et al: Decrease of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor following anti-TNF-alpha therapy (infliximab) in rheumatoid arthritis is associated with clinical improvement. *Ann. Rheum. Dis.* 2004, 63, 1218–21.
- Aletaha D., Neogi T., Silman A. J. et al: 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010, 62, 2569–81.
- Amoura Z., Koutouzov S., Chabre H. et al: Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases. *Arthritis Rheum.* 2000, 43, 76–84.
- Amoura Z., Piette J. C., Bach J. F., Koutouzov S.: The key role of nucleosomes in lupus. *Arthritis Rheum.* 1999, 42, 833–43.
- Barbhaiya M., Bermas B. L.: Evaluation and management of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis during pregnancy. *Clin. Immunol.* 2013, 149, 225–35.
- Bartoloni E., Alunno A., Bistoni O. et al: Diagnostic value of anti-mutated citrullinated vimentin in comparison to anti-cyclic citrullinated peptide and anti-viral citrullinated peptide 2 antibodies in rheumatoid arthritis: an Italian multicentric study and review of the literature. *Autoimmun. Rev.* 2012, 11, 815–20.
- Ben-Jonathan N., Mershon J. L., Allen D. L. et al.: Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr. Rev.* 1996, 17, 639–69.
- Bencivelli E., Vitali C., Isenberg D. A. et al, and the European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE: Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. III. Development of a computerised clinical chart and its application to the comparison of different indices of disease activity. *Clin. Exp. Rheum.* 1992, 10, 549–54.
- Berkel A. L., Petry A., Sanal O et al: Development of systemic lupus erythematosus in a patient with selective complement C1q deficiency. *Eur. J. Pediatr.* 1997, 156, 113–5.
- Berglin E., Johansson T., Sundin U. et al: Radiological outcome in rheumatoid arthritis is predicted by presence of antibodies against cyclic citrullinated peptide before and at disease onset, and by IgA-RF at disease onset. *Ann. Rheum. Dis.* 2006, 65, 453–8.
- Bertolaccini M. L., Hughes G. R. V., Khamashta M. A.: Systemic lupus erythematosus. In: Shoenfeld Y., Cervera R., Gershwin M. E. (Eds.): *Diagnostic criteria in autoimmune diseases.* Humana Press, Totowa, NJ 2008, 3–8.
- Bijl M., van Lopik T., Limburg P. C. et al: Do elevated levels of soluble fas contribute to the persistence of activated lymphocytes in systemic lupus erythematosus? *J. Autoimmun.* 1998, 11, 457–63.
- Bobbio-Pallavicini F., Alpini C., Caporali R. et al: Autoantibody profile in rheumatoid arthritis during long-term infliximab treatment. *Arthritis Res. Ther.* 2004, 6, 264–72.
- Boehme M. W., Nawroth P. P., Kling E. et al: Serum thrombomodulin. A novel marker of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1994, 37, 572–7.
- Boehme M. W., Raeth U., Galle P. R. et al: Serum thrombomodulin – a reliable marker of disease activity in systemic lupus erythematosus (SLE): advantage over established serological parameters to indicate disease activity. *Clin. Exp. Immunol.* 2000, 119, 189–95.
- Boffa M. C., Auroseau M. H., Wiesel M. L. et al: Variation of plasma thrombomodulin level due to sex and age. *Blood* 1991, 78, S1, 221 (Abstract).

- Bogliolo L., Alpine C., Caporali R. et al: Antibodies to cyclic citrullinated peptides in psoriatic arthritis. *J. Rheumatol.* 2005, 32, 511–5.
- Bombardier C., Gladman D. D., Urowitz M. B. et al, and The Committee on Prognosis Studies in SLE: derivation of SLEDAI. *Arthritis Rheum.* 1992, 35, 630–40.
- Botto M., Walport M. J.: C1q, autoimmunity and apoptosis. *Immunobiology.* 2002, 205, 395–406.
- Brard F., Gilbert D., Jovelin F., Tron F.: Idiopathic analysis of antinucleosome monoclonal antibodies derived from lupus mice. *J. Autoimmun.* 1997, 10, 425–31.
- Buc M.: Autoimunita a autoimunitné choroby. Veda, Bratislava 2005.
- Burrage P. S., Mix K. S., Brinckerhoff C. E. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front. Biosci.* 2006, 11, 529–43.
- Coenen D., Verschueren P., Westhovens R., Bossuyt X : Technical and diagnostic performance of 6 assays for the measurement of citrullinated protein/peptide antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin. Chem.* 2007, 53, 498–504.
- Cooper N. R.: The classical complement pathway: activation and regulation of first complement component. *Adv. Immunol.* 1985, 37, 151–216.
- Despres N., Boire G., Lopez-Longo F. J., Menard H. A.: The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 1994, 21, 1027–33.
- Dostál C., Fojtíková M., Lacinová Z. et al.: Stresová odezva prolaktinu u nemocných se systémovým lupus erythematoses (SLE), revmatoidní artritidou (RA) a u zdravých kontrol. *Vnitř. Lék.* 2007, 53, 1265–68.
- Dostál C., Vencovský J. a spolupracovníci: Systémový lupus erythematoses. Medprint 1997.
- Dubucquoi S., Solau-Gervais E., Lefranc D. et al: Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 2004, 63, 415–9.
- Elliot J. A., Mathieson D. R.: Complement in disseminated (systemic) lupus erythematosus. *AMA Arch. Derm. Syphilol.* 1953, 68, 119–28.
- Falini B., Pileri S., Pizzolo G. et al: CD30 (Ki-1) molecule a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor super family as a tool for the diagnosis and immunotherapy. *Blood* 1995, 85, 1–14.
- Ferencík M., Rovenský J., Shoenfeld Y., Mat'ha V.: Imunitní systém – informace pro každého. Grada Publishing, Praha 2005.
- Friou G. J.: Clinical Application of a Test for Lupus Globulin-Nucleohistone Interaction Using Fluorescent Antibody. *Yale J. Biol. Med.* 1958; 31, 40–7.
- Fučíková T. a kol.: Základy klinické imunologie. RDI Press a Agentura Krigl, Praha 1994.
- Gala R. R.: Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1991, 198, 513–27.
- Galarza-Maldonado C., Massardo L., Pons-Estel B., Cardiel M. H.: Rheumatoid arthritis. In: Shoenfeld Y., Cervera R., Gershwin M. E. (Eds.): Diagnostic criteria in autoimmune diseases. Humana Press, Totowa, NJ 2008, 15–19.
- Gell P. G. H., Coombs R. R. A.: The classification of allergic reactions underlying disease. In: Coombs R. R. A., Gell P. G. H. (Eds.): Clinical Aspects of Immunology, Blackwell, Oxford 1963.
- Gilbert D., Brard F., Jovelin F., Tron F.: Do naturally occurring autoantibodies participate in the constitution of the pathological B-cell repertoire in systemic lupus erythematosus? *J. Autoimmun.* 1996, 9, 247–57.

- Gladman D. D., Urowitz M. B.: The SLICC/ACR damage index: progress report and experience in the field. *Lupus* 1999, 8, 632–7.
- Goules A., Tzioufas A. G., Manousakis M. N. et al: Elevated levels of soluble CD40 ligand (sCD40L) in serum of patients with systemic autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* 2006, 26, 165–71.
- Grootenboer-Mignot S., Nicaise-Roland P., Delaunay C. et al: Second generation anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP2) Abs can replace other anti-filaggrin Abs and improves RA diagnosis. *Scand. J. Rheumatol.* 2004, 33, 218–20.
- Hahn B. H., Ebling F., Singh R. R.: Cellular and molecular mechanisms of regulation of autoantibody production in lupus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005, 1051, 433–41.
- Hermann M., Voll R. E., Lolowos W. et al: Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Immunologist* 2000, 8, 345–50.
- Hill C. M., Lunec J.: The TNF-ligand and receptor superfamilies: controllers of immunity and the Trojan horses of autoimmune disease? *Mol. Aspects Med.* 1996, 17, 455–509.
- Hochberg M. C.: Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 40, 1725–6.
- Horak P., Hermanova Z., Ciferska H. et al: C1q complement and antibodies reflect SLE activity and kidney involvement. *Clin. Rheum.* 2005, 26, 1–5.
- Horák P., Heřmanová Z., Ordeltová M. et al: C1q složka komplementu a apoptotický index B a T lymfocytů ve skupině nemocných se systémovým lupus erythematoses. *Čes. revmatol.* 2004, 12, 69–75.
- Horvath L., Czirjak L., Fekete B. et al: High level of antibodies against C1q are associated with disease activity and nephritis but not with other organ manifestations in SLE patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2001, 19, 667–72.
- Hořejší V., Bartůňková J.: *Základy imunologie*. 4. vydání. Triton, Praha 2009.
- Huber C., Batchelor J. R., Fuchs D. et al: Immune response associated production of neopterin release from macrophages primary under control of interferon gamma. *J. Exp. Med.* 1984, 160, 310–16.
- Kato K., Santana-Sahagun E., Rassentil L. Z. et al: The soluble ligand CD40 sCD154 in systemic lupus erythematoses. *J. Clin. Invest.* 1999, 104, 947–55.
- Keyszer G., Lambiri I., Nagel R. et al: Circulating levels of matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1), and MMP-1/TIMP-1 complex in rheumatic disease. Correlation with clinical activity of rheumatoid arthritis versus other surrogate markers. *J. Rheumatol.* 1999, 26, 251–8.
- Kotajima L., Otsuka S., Sato T.: Clinical significance of serum thrombomodulin levels in patients with systemic rheumatic disease. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1997, 15, 59–65.
- Kramer C., Hylkama M. N., van Bruggen M. C. et al: Antinucleosome antibodies complexed to nucleosome antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular membrane in vivo. *J. Clin. Invest.* 1994, 94, 568–80.
- Krejsek J., Kopecký O.: *Klinická imunologie*. Nucleus HK 2004.
- Kumar A., Gupta R., Varghese T. et al: Anti-C1q antibody as a marker of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Indian J. Med. Res.* 1999, 10, 190–3.
- Lahita R. G.: The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1999, 11, 352–56.
- Lahita R. G., Bradlow L., Fishman J. et al: Estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus. Patients and family members. *Arthritis Rheum.* 1982, 25, 843–46.
- Lau C. S., Yin G., Mok M. Y.: Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2006, 15, 715–9.

- Leanos-Miranda A., Cardanes-Mondragon G.: Serum free prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with lupus activity. *Rheumatology* 2006, 45, 97–101.
- Lim K. L., Muir K., Powell R. J.: Urine neopterin: a new parameter for serial monitoring of disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 1994, 53, 743–8.
- Lochman I.: Multiplexové metody v diagnostice autoprotilátek. *Klinická imunologie a alergologie*. 2013, 23, 32.
- Lochmanová A.: *Základy imunologie*. Ostravská univerzita, Ostrava 2006.
- Luime J. J., Colin E. M., Hazes J. M., Lubberts E.: Does anti-mutated citrullinated vimentin have additional value as a serological marker in the diagnostic and prognostic investigation of patients with rheumatoid arthritis? A systematic review. *Ann. Rheum. Dis.* 2010, 69, 337–44.
- Mahler M., Fritzler M. J.: The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on HEp-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Clin. Dev. Immunol.* 2012;2012:494356. doi: 10.1155/2012/494356. Epub 2012 Dec 6.
- Mahler M., Parker T., Peebles C. L. et al: Anti-DFS70/LEDGF antibodies are more prevalent in healthy individuals compared to patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *J. Rheumatol.* 2012, 39, 2104–10.
- Mamehara A., Sugimoto T., Sugiyama D. et al: Matrix metalloproteinase-3 as predictor of joint destruction in rheumatoid arthritis, treated with non-biological disease modifying anti-rheumatic drugs. *Kobe J. Med. Sci.* 2010, 56, E98–107.
- Marchesan J. T., Gerow E. A., Schaff R. et al.: Porphyromonas gingivalis oral infection exacerbates the development and severity of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2013, 15, R186. doi: 10.1186/ar4376.
- Martínek J., Lochman I.: Komplementový systém a jeho laboratorní diagnostika. *Alergie* 2013, 15, 55–61.
- Matsui T., Shimada K., Ozawa N. et al: Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies for very early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2006, 33, 2390–7.
- Mediwake R., Isenberg D. A., Schellekens G. A., van Venrooij W. J.: Use of anti-citrullinated peptide and anti-RA33 antibodies in distinguishing erosive arthritis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2001, 60, 67–8.
- Mitchell D. A., Pickering M. C., Warren J. et al: C1q deficiency and autoimmunity: the effects of genetic background on disease expression. *J. Immunol.* 2002, 168, 2538–43.
- Monova D., Monov S., Rosenova K. et al: Autoantibodies against C1q: view on association between systemic lupus erythematosus disease manifestation and C1q autoantibodies. *Ann. Rheum. Dis.* 2002, 61, 563–4.
- Moore A. E., Sabachewsky L., Toolan H. W.: Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Research*, 1955, 15, 598–602.
- Moszkorzová L., Lacinová Z., Mare J. et al.: Hyperprolactinaemia in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2000, 20, 807–12.
- Mutlu N., Bicakcigil M., Tasan D. A. et al: Comparative performance analysis of 4 different anti-citrullinated protein assays in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2009, 36, 491–500.
- Nemeč P., Pavkova-Goldbergova M., Gatterova J. et al.: Association of the 5A/6A promoter polymorphism of the MMP-3 gene with the radiographic progression of rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007; 1110, 166–76.



- Nemeč P., Pavkova-Goldbergova M., Stouracova M. et al.: Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter is associated with severity of rheumatoid arthritis in the Czech population. *Clin. Rheumatol.* 2008, 27, 59–65.
- Nielen M. M., van Schaardenburg D., Reesink H. W. et al: Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* 2004, 50, 380–6.
- Oelzner P., Deliyska B., Funfstuck R. et al: Anti-C1q antibodies and antiendothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus – relationship with disease activity and renal involvement. *Clin. Rheumatol.* 2003, 22, 271–8.
- Ogrendik M. , Kokino S. , Ozdemir F. et al.: Bird PS, Hamlet S (2005). "Serum Antibodies to Oral Anaerobic Bacteria in Patients With Rheumatoid Arthritis". *Med. Gen. Med.* 2005, 7, PMC 1681585.
- Okamoto A., Yamamura M., Iwahashi M. et al: Pathophysiological functions of CD30+ CD4+ T cells in rheumatoid arthritis. *Acta Med. Okayama* 2003, 57, 267–77.
- Peeva E., Michael D., Cleary J. et al.: Prolactin modulates the naive B cell repertoire. *J. Clin. Invest.* 2003, 111, 275–83.
- Petri M., Orbai A. M., Alarcon G. S. et al.: Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012; 64, 2677–86.
- Pickering M. C., Botto M., Taylor P. R. et al: Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv. Immunol.* 2000, 76, 227–34.
- Pickering M. C., Walport M. J.: The complement system. In Hochberg M. C., Silman A. J., Smolen J. S.: *Rheumatology*. 2003, 3rd ed., Mosby, 1323–36.
- Potlukova E., Kralikova P.: Complement component c1q and anti-c1q antibodies in theory and in clinical practice. *Scand. J. Immunol.* 2008, 67, 423–30.
- Qin X., Deng Y., Xu J. et al: Meta-analysis: diagnostic value of serum anti-mutated citrullinated vimentin antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2011, 31, 785–94.
- Ramanujam M., Wang X., Huang W. et al: Similarities and differences between selective and nonselective BAFF blockade in murine SLE. *J. Clin. Invest.* 2006, 116, 724–34.
- Ribbens C., Andre B., Jaspar J. M. et al: Matrix metalloproteinase-3 serum levels are correlated with disease activity and predict clinical response in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2000, 27, 888–93.
- Rönnelid J., Wick M. C., Lampa J. et al: Longitudinal analysis of citrullinated protein/peptide antibodies (anti-CP) during 5 year follow up in early rheumatoid arthritis: anti-CP status predicts worse disease activity and greater radiological progression. *Ann. Rheum. Dis.* 2005, 64, 1744–9.
- Rovenský J.: *Revmatologický výkladový slovník*, Grada, Praha 2006.
- Salmon M., Gordon C.: The role of apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 1999, 38, 1177–83.
- Samsonov M. Y., Tilz G. P., Egorova O. et al: Serum soluble markers of immune activation and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1995, 4, 29–32.
- Samy S., Bettina W., Richter M. et al: Differential effects of CD30 activation in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin disease cells. *Blood* 2000, 96, 4307–12.
- Seitzl H. M., Matsushima G. K.: Dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Int. Rev. Immunol.* 2010, 29, 184–209.
- Shmerling R. H., Delbanco T. L.: How useful is the rheumatoid factor? An analysis of sensitivity, specificity and predictive value. *Arch. Intern. Med.* 1992, 152, 2417–20.

- Shoenfeld Y., Fučíková T., Bartůňková J.: Autoimunita vnitřní nepřítel. Grada Publishing, Praha 2007.
- Shoenfeld Y., Gershwin M. E., Meroni P. L.: Antibodies. Elsevier. Second Edition. 2007.
- Stites D. P., Terr A. I.: Základní a klinická imunologie. Victoria Publishing. Praha 1994.
- Stone N. M., Williams A., Wilkinson J. D. et al: Systemic lupus erythematosus with C1q deficiency. *Br. J. Dermatol.* 2000, 142, 521–4.
- Su Y., Jia R. L., Han L., Li Z. G.: Role of anti-nucleosome antibody in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* 2007, 122, 115–20.
- Suenaga R., Mitamura K., Abdou N. I.: Isolation of anti-nucleosome antibodies from plasma of lupus nephritis patients. *Clin. Rheumatol.* 1998, 17, 189–94.
- Swaak A. J. G., Groenwald J., Bronsveld W. Predictive value of complement profiles and anti-dsDNA in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 1986, 45, 359–66.
- Šedová L., Šenolt L., Parkmanová P. et al: Protilátky proti cyklickému citrulinovanému peptidu (anti-CCP) v séru a synoviální tekutině pacientů s revmatoidní artritidou a osteoartrózou. *Čes. Revmatol.* 2005, 13, 79–83.
- Tan E. M., Cohen A. S., Fries J. F. et al: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982, 25, 1271–7.
- Ter Borg E. J., Horst G., Limburg P. C. et al: Changes in plasma levels of interleukin-2 receptor in relation to disease exacerbation and levels of anti-dsDNA and complement in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 1990, 82, 21–6.
- Trouw L. A., Groeneveld T. W. L., Seelen M. A. et al: Anti-C1q autoantibodies deposit in glomeruli but are only pathogenic in combination with glomerular C1q-containing immune complexes. *J. Clin. Invest.* 2004, 114, 679–88.
- Tsirogianni A., Pipi E., Soufleros K.: Relevance of anti-C1q autoantibodies to lupus nephritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009, 1173, 243–51.
- van Gaalen F. A., Linn-Rasker S. P., van Venrooij W. J. et al: Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum.* 2004, 50, 709–15.
- van Noord C., Hooijkaas H., Dufour-van den Goorbergh B. C. M. et al: Diagnostic value of anti- cyclic citrullinated peptide antibodies to detect rheumatoid arthritis in patients with Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 2005, 64, 160–2.
- van Venrooij W. J., Pruijn G. J.: Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000, 2, 249–51.
- van Venrooij W. J., Zendman A. J., Pruijn G. J.: Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 2006, 6, 37–41.
- Vencovský J., Macháček S., Šedová L. et al: Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2003, 62, 427–30.
- Vencovský J., Šedová L., Růžičková Š.: Protilátky proti citrulinovaným proteinům u revmatoidní artritidy. *Čes. Revmatol.*, 2005, 13, 164–75.
- Wachter H., Fuchs D., Hausen A. et al: Neopterin as a marker for activation of cellular immunity: immunological basis and clinical application. *Adv. Clin. Chem.* 1989, 27, 81–141.
- Walport M.J.: Complement and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res.* 2002, 4 (Suppl 3), S279–93.

- Wener M. H., Hutchinson K., Morishima C., Lonetch D. R.: Absence of antibodies to cyclic citrullinated peptide in sera of patients with hepatitis C virus infection and cryoglobulinemia. *Arthritis Rheum.* 2004, 50, 2305–8.
- Wisnieski J. J., Naff G. B.: Serum IgG antibodies to C1q in hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome. *Arthritis Rheum.* 1989, 32, 1119–27.
- Witte T., Hartung K., Sachse C. et al: Thrombomodulin in systemic lupus erythematosus: association with clinical and laboratory parameters. *Rheumatol. Int.* 1999, 19, 15–8.
- Yildirim A., Tunaolu F. S., Karaoac A. T.: Neonatal congenital heart block. *Indian Pediatr.* 2013, 50, 483–8.
- Zahran W. E., Mahmoud M. I., Shalaby K. A., Abbas M. H.: Unique correlation between mutated citrullinated vimentine IgG autoantibodies and markers of systemic inflammation in rheumatoid arthritis patients. *Indian. J. Clin. Biochem.* 2013, 28, 272–6.

## 6. SEZNAM PŘEDNÁŠEK, ABSTRAKT A PUBLIKACÍ SE VZTAHEM K PROBLEMATICE DIZERTAČNÍ PRÁCE

### Přednášky:

1. **Heřmanová Z.**, Horák P.: Komplementový systém a SLE. 22. pracovní imunologická konference, Rožnov, 10.–12.6.2005.
2. **Heřmanová Z.**, Ciferská H., Horák P.: Vybrané imunologické parametry u lupusové nefritidy. Uživatelské setkání The Binding Site. Hradec Králové, 18.–20.9.2006.
3. **Heřmanová Z.**, Ciferská H., Horák P.: Nové možnosti laboratorní diagnostiky u autoimunitních onemocnění. Seminář olomoucké pobočky ČIS, 10.10.2006.
4. **Heřmanová Z.**, Ciferská H., Horák P.: MBL u pacientů se systémovým lupus erythematoses. XXIII. sjezd ČSAKI, Hradec Králové, 25.–28.10. 2006.
5. **Heřmanová Z.:** NIF jako screeningová metoda u AIO a klinický pohled na tato onemocnění. Konference imunolog. laborantů, Pardubice 23.4.2007.
6. **Heřmanová Z.:** Imunitní mechanismy v patogenezi revmatoidní artritidy. Konference The Binding Site – Autoimunita, Velké Bílovice, 26.–27.9.2007.
7. **Heřmanová Z.**, Ciferská H., Horák P.: Sérové hladiny lamininu u pacientů se SLE a srovnání s klinickými skórovacími systémy. XXIV. sjezd slovenských a českých alergologů a imunologů, Trnava, 24.–27.10. 2007.
8. **Heřmanová Z.:** Imunitní mechanismy v patogenezi revmatoidní artritidy a jejich praktické diagnostické využití. Seminář III. interní kliniky FNOL, Olomouc, 4.3.2008.
9. **Heřmanová Z.:** Význam anticitrulinových protilátek jako diagnostického markeru u RA. Spolek lékařů v Olomouci, 23.4.2008.
10. **Heřmanová Z.**, Horák P.: Imunologické laboratorní testy v diagnostice a sledování pacientů s revmatoidní artritidou. Pracovní den České společnosti klinické biochemie, Olomouc, 20.5.2009.
11. **Heřmanová Z.:** Imunitní systém a přehled imunologických laboratorních vyšetření. Seminář pro praktické lékaře, Prostějov, 23.9.2009.
12. **Heřmanová Z.**, Horák P., Ciferská H.: Laboratorní screening u pacientů s RA. Seminář olomoucké pobočky ČIS, 10.11.2009.
13. **Heřmanová Z.**, Horák P., Ciferská H., Smržová A.: „Citrulinace – malá změna proteinu s velkými důsledky pro RA“. Seminář III. int. kliniky FNOL, Olomouc, 30.3.2010.
14. **Heřmanová Z.:** Význam proteinu BAFF/BLyS při aktivaci B lymfocytů u různých klinických stavů. Seminář olomoucké pobočky ČIS, 7.12.2011.
15. **Heřmanová Z.:** Význam stanovení matrixových metaloproteináz. Imunologický seminář pořádaný firmou BioVendor, Luka nad Jihlavou, 12.4.2012.
16. **Heřmanová Z.**, Horák P., Skácelová M., Smržová A.: Vyšetření MMP3 u pacientů s RA, imunologický seminář, Zaječí, 7.–8.6. 2012.
17. **Heřmanová Z.**, Horák P., Skácelová M., Smržová A.: Nové možnosti laboratorní diagnostiky v posouzení aktivity zánětu u pacientů s RA. Seminář olomoucké pobočky ČIS, 19.6.2012.
18. **Heřmanová Z.**, Horák P., Skácelová M., Smržová A.: Korelace zvýšené hladiny MMP-3 s aktivitou procesu u pacientů s RA. 56. výroční sjezd českých a slovenských revmatologů, Olomouc, 19.–22.9.2012.

## Abstrakta:

1. Horák P., **Heřmanová Z.**, Faltýnek L., Pospíšil Z., Ščudla V.: Neopterin as a marker of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Il Friuli Medico* 1996, 51, Suppl.1, 57.
2. Horák P., Ščudla V., **Heřmanová Z.**, Pospíšil Z., Faltýnek L.: Serum trombomodulin and prediction of vascular damage and evaluation of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Pol. Arch. Int. Med.* 1998, 99, Suppl., 28–9.
3. Horák P., Ščudla V., **Heřmanová Z.**, Lukeš J., Faltýnek L., Pospíšil Z.: Set of serum tests in measurement of systemic lupus erythematosus activity: evaluation of cross-section study results. *Rheumatologia (Polsko)* 1998, 36, Suppl., 120.
4. Horák P., **Heřmanová Z.**, Pospíšil Z., Faltýnek L., Ščudla V.: Autoantibody profiles, disease activity and clinical subsets of systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1999, 17, 26.
5. Horák P., **Heřmanová Z.**, Pospíšil Z., Faltýnek L.: Thrombomodulin and measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 1999, 58, 170.
6. Horák P., **Heřmanová Z.**, Faltýnek L., Ščudla V.: The clinical Subsets of Systemic Lupus Erythematosus, Their Antibody Profiles and Disease Activity. *Eur. J. Internal Med.* 1999, 10, Suppl.1, 156.
7. Horák P., **Heřmanová Z.**, Faltýnek L., Pospíšil Z., Lukeš J., Ščudla V.: Neopterin jako ukazatel aktivity systémového lupus erythematosus. *Čes. Revmatol.* 1997, 5, 36.
8. Horák P., **Heřmanová Z.**, Faltýnek L., Pospíšil Z., Ščudla V.: Jsou sérové hladiny trombomodulinu spolehlivým ukazatelem aktivity systémového lupus erythematosus? *Čes. Revmatol.* 2000, 8, 179.
9. Horák P., **Heřmanová Z.**, Faltýnek L., Pospíšil Z., Budíková M., Lukeš J., Ščudla V.: Význam vyšetření antinukleosomálních protilátek u systémového lupus erythematosus. *Čes. Revmatol.* 2000, 8, 164.
10. Horák P., Ščudla V., **Heřmanová Z.**, Faltýnek L., Pospíšil Z., Budíková M.: Comparison of selected markers in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 2001, 60, Suppl.I, 71.
11. Horák P., Pospíšil Z., Faltýnek L., **Heřmanová Z.**, Budíková M., Kusá L., Ščudla V.: Porovnání vybraných parametrů aktivity SLE z hlediska jejich praktického využití. *Rheumatológia* 2001, 15, 81.
12. Horák P., **Heřmanová Z.**, Ciferská H., Ordeltová M., Kusá L., Ščudla V.: Hladiny C1q složky komplementu u nemocných se systémovým lupus erythematosus a jejich vztah k apoptotické populaci buněk T a B. *Rheumatologia* 2003, 17, 272.
13. Horák P., **Heřmanová Z.**, Ordeltová M., Kusá L., Opíchalová D., Ciferská H., Žurek M., Vavrdová V., Faltýnek L.: Levels of C1q and anti C1q antibodies in SLE patients – communicating vessels of disease activity? *Ann. Rheum. Dis.* 2004, 63, suppl.1, 214.
14. Horák P., **Heřmanová Z.**, Budíková M., Dostál C., Tesař V., Zdražil J., Rychlík I., Hrnčíř Z., Vlasáková V., Rovenský J.: VCAM-1, thrombomodulin, anti C1q antibodies and antinucleosome antibodies serum levels in lupus nephritis treated with cyclosporine or cyclophosphamide – results from CYCLOFA-LUNE (2002) study. *Ann. Rheum. Dis.* 2005, 64, Suppl. III, 241–2.
15. Ciferská H., Horák P., **Heřmanová Z.**, Zdražil J., Dostál C.: Vybrané ukazatele aktivity choroby v klinickém srovnání cyklosporinu a cyklofosfamidu v terapii lupusové nefritidy. *Vnitř. Lék.* 2005, 51, 625–6.

16. **Heřmanová Z.**, Horák P., Ciferská H.: Vybrané parametry komplementového systému u SLE. Sborník přednášek z XXII. pracovní imunologické konference.
17. Ciferská H., Horák P., **Heřmanová Z.**, Ordeltová M., Kusá L., Tichý M., Zadražil J., Ščudla V.: Anti-C1q protilátky: nový test u lupus nefritidy. *Vnitř. Lék.* 2005, 51, 1198.
18. **Heřmanová Z.**, Horák P.: BAFF (B cell activating factor) u pacientů se SLE – první zkušenosti. *Klinická imunologie a alergologie* 2005, 3, 11.
19. Horák P., Zadražil J., Tichý T., **Heřmanová Z.**, Kusá L.: Diagnostika a léčba ledvinného poškození u systémových chorob pojiva. *Čes. Revmatol.* 2005, 13, 34.
20. Ciferská H., Horák P., **Heřmanová Z.**, Ordeltová M., Zadražil J., Tichý T., Ščudla V.: Anti-C1q protilátky a jejich význam pro sledování lupusové nefritidy. *Aktuality v nefrologii* 2006, 12, suppl.1, 48.
21. Žurek M., Ciferská H., Horák P., **Heřmanová Z.**, Ordeltová M.: Hladiny sCD30 a sCD40L u nemocných se systémovým lupus erythematoses a jejich potencionální význam pro sledování aktivity onemocnění. *Čes. Revmatol.* 2006, 14, suppl.1, 45.
22. Ciferská H., Horák P., **Heřmanová Z.**, Ordeltová M., Žurek M., Pospíšilíková Z.: Vztah apoptotické populace B a T lymfocytů k hladinám sCD30 a sCD40L u nemocných se systémovým lupus erythematoses. *Čes. Revmatol.* 2006, 14, suppl.1, 59.
23. Ciferská H., Horák P., **Heřmanová Z.**, Ordeltová M., Zadražil J.: Serum levels of sCD30 and sCD40L in SLE patients. *Ann. Rheum. Dis.* 2006, 65, Suppl. II, 195.
24. Ciferská H., Horák P., **Heřmanová Z.**, Ordeltová M., Zadražil J.: Hladiny sCD30 a sCD40L ve skupině nemocných se systémovým lupus erythematoses a jejich potencionální význam pro sledování aktivity onemocnění. *Vnitř. Lék.* 2006, 52, 514.
25. Ciferská H., Horák P., **Heřmanová Z.**, Ordeltová M., Kusá L., Tichý M., Zadražil J., Ščudla V.: Anti-C1q protilátky: nový test u lupus nefritidy. *Vnitř. Lék.* 2006, 51, 1102.
26. Ciferská H., Horák P., Tichý M., Zadražil J., **Heřmanová Z.**, Virtanen I., Laine M., Konttinen Y.T.: Strukturální změny lamininu v bazální membráně glomerulů a sérové hladiny lamininu jako výraz poškození extracelulární matrix u nemocných s lupusovou nefritidou. *Vnitř. Lék.* 2007, 53, 609.
27. Ciferská H., Horák P., Konttinen Y. T., Tichý T., **Heřmanová Z.**, Zadražil J.: Toll-like receptors – differences between healthy control and lupus kidneys – preliminary pilot study. *Ann. Rheum. Dis.* 2007, 66, Suppl. II, 489.
28. Horák P., **Heřmanová Z.**, Ciferská H., Zadražil J., Tichý T.: Protilátky proti komplementovému systému a jejich význam v diagnostice SLE. *Rheumatologia* 2007, 21, 169–70.
29. **Heřmanová Z.**, Ciferská H., Horák P.: Sérové hladiny lamininu u pacientů se SLE a srovnání s klinickými skórovacími systémy. *Klinická imunologie a alergologie* 2007, 17, 26–7.
30. Horák P., Ciferská H., **Heřmanová Z.**, Zadražil J., Ordeltová M., Tichý T., Žurek M., Faltýnek L.: Anti-nucleosome antibodies in lupus clinic patients as a routine test for the diagnosis and follow up. *Ann. Rheum. Dis.* 2007, 66, Suppl. 2, 465.
31. Ciferská H., Horák P., **Heřmanová Z.**, Ordeltová M., Langová K., Pospíšilíková Z.: Systémový lupus erythematoses: vztah apoptotických indexů B- a T-lymfocytů k sérovým hladinám sCD30 a sCD40L. *Vnitř. Lék.* 2007, 53, 32.
32. Ciferská H., Horák P., Konttinen Y. T., Tichý T., **Heřmanová Z.**, Zadražil J.: Expres Toll-like receptorů v ledvinné tkáni zdravých kontrol a nemocných s lupusovou nefritidou. *Vnitř. Lék.* 2008, 54, 545–6.
33. Ciferská H., Horák P., Konttinen Y. T., Tichý T., **Heřmanová Z.**, Zadražil J.: Toll-like receptors in healthy control and lupus kidneys. *Čes. Revmatol.* 2008, 16, Suppl. I, 19–20.

34. Horák P., **Heřmanová Z.**, Pešíčková S., Zadražil J. et al.: Anti C1q antibodies and antinucleosome antibodies serum levels in lupus nephritis treated by cyclosporine or cyclophosphamide in Cyclofa-lune (2002) study. *Ann. Rheum. Dis.* 2009, 68, Suppl. III, 454.
35. **Heřmanová Z.**, Horák P., Ciferská H., Bartoňková J.: Autoprotilátky anti-RA 33 v diagnostice RA. *Klinická imunologie a alergologie* 2009, 3, 20.
36. Zahálková L, Horák P., **Heřmanová Z.**, Ingegnoli F et al.: Evaluation of serum profibrotic and proinflammatory cytokines levels in patients with systemic sclerosis interstitial lung disease. *Ann. Rheum. Dis.* 2009, 68, Suppl. III, 465–6.
37. Smržová A., Horák P., Skácelová M., Vaverková H., **Heřmanová Z.**: Akcelerovaná ateroskleróza u pacientů se systérovým lupus erythematoses. *Vnitř. Lék.* 2009, 55, Suppl 1, 183.
38. Smržová A., Horák P., Skácelová M., Ciferská H, Vaverková H., **Heřmanová Z.**: Charakteristika lipidového spektra u pacientů se systérovým lupus erythematoses. *Rheumatologia* 2009, 23, 98.
39. **Heřmanová Z.**, Horák P., Skácelová M., Smržová A.: Sérová hladina MMP-3 u pacientů s RA a jinými diagnózami. *Alergie* 2012, 14, 64.

#### **Publikace:**

1. Horák P., **Heřmanová Z.**, Pospíšil Z., Faltýnek L., Lukeš J., Ščudla V.: Neopterin a sIL-2R v hodnocení aktivity SLE. *Čes. Revmatol.* 1996, 4, 161–5.
2. Ščudla V., Horák P., Faltýnek L., Pospíšil Z., Budíková M., **Heřmanová Z.**: Vaskulární intercelulární adhesivní molekula-1 (VCAM-1) – nový ukazatel aktivity systérového lupus erythematoses? *Vnitř. Lék.* 1997, 43, 307–11.
3. Horák P., **Heřmanová Z.**, Faltýnek L., Pospíšil Z., Ščudla V.: Protilátkový profil a aktivita choroby u nemocných se systérovým lupus erythematoses. *Vnitř. Lék.* 1997, 43, 639–44.
4. Ščudla V., Horák P., Faltýnek L., Pospíšil Z., Budíková M., **Heřmanová Z.**: Význam vyšetření IL-10 v séru nemocných se SLE. *Čas. lék. čes.* 1998, 137, 44–7.
5. Ščudla V., Horák P., Lukeš J., Budíková M., Faltýnek L., Pospíšil Z., **Heřmanová Z.**, Vašíčková J.: Sledování solubilních forem adhesivních molekul VCAM-1 a ICAM-1 u nemocných se systérovým lupus erythematoses. *Čes. Revmatol.* 2000, 8, 119–25.
6. Horák P., **Heřmanová Z.**, Vašíčková J., Pospíšil Z., Faltýnek L., Ščudla V.: Serial follow up of soluble thrombomodulin levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Acta Univ. Palacki. Olomuc, Fac. Med.* 2000, 144, 33–9.
7. Horák P., **Heřmanová Z.**, Ščudla V., Faltýnek L., Pospíšil Z.: Anti-nucleosome antibodies – a novel test in systemic lupus erythematosus. *Acta Univ. Palacki. Olomuc, Fac. Med.* 2000, 144, 27–32.
8. Horák P., Ščudla V., **Heřmanová Z.**, Faltýnek L., Budíková M., Kusá L.: Clinical utility of selected disease activity markers in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol.* 2001, 20, 337–44.
9. Horák P., **Heřmanová Z.**, Ordeltová M., Faltýnek L., Kusá L., Budíková M., Vavrdová V., Opíchalová D., Ciferská H., Ščudla V.: Neopterin a solubilní receptor interleukinu 2 u nemocných se systérovým lupus erythematoses. *Vnitř. Lék.* 2004, 50, 422–7.
10. Horák P., **Heřmanová Z.**, Ordeltová M., Ciferská H., Faltýnek L., Kusá L., Budíková M., Vavrdová V., Opíchalová D., Ščudla V.: C1q složka komplementu a apoptotické indexy B a T lymfocytů ve skupině nemocných se systérovým lupus erythematoses. *Čes. Revmatol.* 2004, 12, 69–75.

11. Ciferská H., Horák P., **Heřmanová Z.**, Zadražil J, Dostál C.: Vybrané ukazatele aktivity choroby v klinickém srovnání cyklosporinu a cyklofosfamidu v terapii lupusové nefritidy. *Vnitř. Lék.* 2005, 51, 625–6.
12. Ciferská H., Horák P., **Heřmanová Z.**, Ordeltová M., Zadražil J.: Sjögrenův syndrom. *Interní medicína pro praxi.* 2006, 10, 423–6.
13. Horák P., **Heřmanová Z.**, Zadražil J., Ciferská H., Ordeltová M., Kusá L., Žurek M., Tichý T., Ščudla V.: C1q complement component and anti C1q antibodies reflect SLE activity and kidney involvement. *Clin. Rheumatol.* 2006, 25, 532–6.
14. Ciferská H., Horák P., **Heřmanová Z.**, Ordeltová M., Zadražil J., Tichý T., Ščudla V.: The levels of sCD30 and of sCD40L in a group of patients with systemic lupus erythematoses and their diagnostic value. *Clin. Rheumatol.* 2007, 26, 723–8.
15. Horák P., Ciferská H., Zadražil J., **Heřmanová Z.**: Protilátky proti složkám komplementového systému a systémový lupus erythematoses. *Čes. Revmatol.* 2008, 16, 16–22.
16. Ciferská H., Horák P., Konttinen Y.T., Krejčí K., Tichý T., **Heřmanová Z.**, Zadražil J.: Expression of nucleid acid binding Toll-like receptors in control, lupus and transplanted kidneys – a preliminary pilot study. *Lupus* 2008, 17, 580–5.
17. Horák P., Zadražil J., Ciferská H., **Heřmanová Z.**: Antibodies against complement system in SLE and their potential diagnostic utility. *Curr. Rheumatol. Rev.* 2009, 5, 58–63.
18. **Heřmanová Z.**, Horák P., Ciferská H.: Imunologické laboratorní testy v diagnostice a sledování pacientů s revmatoidní artritidou. *FONS* 2010, 1, 31–4.
19. Horák P., Skácelová M., Zadražil J., Smržová A., Krejčí K., Ciferská H., **Heřmanová Z.**: Complement System in SLE as a Target for Antibodies. *Curr. Rheumatol. Rev.* 2013, 9, 34–44.
20. Smrzova A., Horak P., Skacelova M., **Hermanova Z.**, Langova K., Zadrzil J., Novotny D.: Intima media thickness measurement as a marker of subclinical atherosclerosis in SLE patient. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 2013, 157, Epub ahead of print, <http://dx.doi.org/10.5507/bp.2013.054>.