



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

DIAGNOSTIKA REVMATICKÝCH CHOROB POMOCÍ METOD MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: [LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA](#)

Autor: Petr Doležal

Vedoucí práce: Ing. Aneta Zlámalová

České Budějovice 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem *Diagnostika revmatických chorob pomocí metod molekulární biologie* jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne . . 2024

Podpis

Poděkování

Tímto bych velice rád poděkoval své vedoucí bakalářské práce paní Ing. Anetě Zlámalové za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a čas, který se mnou trávila v laboratoři při plnění metodické části mé práce. Dále bych rád poděkoval Klubu Bechtěreviků za vstřícné jednání a pomoc při získávání probandů, kteří byli ochotní poskytnout mi vzorky. Rád bych poděkoval také paní Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za konzultaci. V neposlední řadě bych rád poděkoval rodině a přátelům, protože bez jejich nekonečné podpory bych se neobešel.

Diagnostika revmatických chorob pomocí metod molekulární biologie

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá diagnostikou Bechtěrevovy choroby u jedinců projevujících příznaky tohoto onemocnění nebo vykazujících predispozici k němu. Bechtěrevova choroba je chronické zánětlivé revmatické onemocnění, které postihuje především páteř a klouby, s možnými mimokloubními projevy. Jedním z klíčových predispozičních znaků je přítomnost alely HLA-B27.

Tato práce se zaměřuje na využití molekulárně genetické metody real-time PCR k diagnostice Bechtěrevovy choroby. Real-time PCR umožňuje měřit množství DNA v průběhu každého cyklu amplifikace, což zvyšuje rychlost a efektivitu diagnostiky.

Probandi zahrnutí do studie byli buď jedinci s diagnostikovanou Bechtěrevovou chorobou, jedinci vykazující predispoziční znaky, nebo zdraví jedinci. Stanovení přítomnosti antigenu HLA-B27 bylo provedeno pomocí real-time PCR.

Výsledky této studie přispívají k lepšímu pochopení využití real-time PCR v diagnostice Bechtěrevovy choroby a mohou posloužit jako podklad pro další výzkum v oblasti revmatologie a genetiky.

Klíčová slova

Revmatické onemocnění; Bechtěrevova choroba; HLA-B27; real-time PCR; DNA

Diagnosis of rheumatic diseases using molecular biology methods

Abstract

This bachelor thesis deals with the diagnosis of Bechterew's disease in individuals showing symptoms of the disease or showing a predisposition to it. Bechterew's disease is a chronic inflammatory rheumatic disease that primarily affects the spine and joints, with possible extra-articular manifestations. One of the key predisposing features is the presence of the HLA-B27 allele.

This paper focuses on the use of molecular genetic real-time PCR for the diagnosis of Bechterew's disease. Real-time PCR allows measuring the amount of DNA during each amplification cycle, which increases the speed and efficiency of diagnosis.

The probands included in the study were either individuals diagnosed with Bechterew's disease, individuals showing predisposing features, or healthy individuals. Determination of the presence of HLA-B27 antigen was performed by real-time PCR.

The results of this study contribute to a better understanding of the use of real-time PCR in the diagnosis of Bechterew's disease and may serve as a basis for further research in rheumatology and genetics.

Key words

Rheumatic disease; Bechterew's disease; HLA-B27; real-time PCR; DNA

Obsah

1	Úvod	9
2	Revmatická onemocnění	11
2.1	Funkční anatomie pohybového aparátu	12
2.1.1	Kosti	12
2.1.2	Klouby	12
2.1.3	Šlachy	13
2.1.4	Vazy	13
2.1.5	Svalová povázka	13
2.1.6	Svaly	14
3	Revmatoidní artritida	15
3.1	Patofyziologie	15
3.2	Imunopatogeneze	16
3.2.1	Antigen	16
3.2.2	Imunitní reakce, buňky a molekuly, které se jí účastní	16
3.3	Epidemiologie	17
3.4	Etiologie	17
3.5	Klinický obraz	18
3.6	Kritéria diagnostiky revmatoidní artritidy	19
3.7	Diagnostické testy a metody	20
3.7.1	Laboratorní testy	20
3.7.2	Zobrazovací metody	23
3.8	Léčba	24
3.8.1	Režimová opatření	24
3.8.2	Pohybová léčba	24
3.8.3	Fyzikální léčba	24
3.8.4	Farmakoterapie	25
3.8.5	Chirurgická léčba	26
4	Bechtěrevova choroba	27
4.1	Epidemiologie	27
4.2	Etiologie	27
4.3	Hlavní histokompatibilní systém	28
4.3.1	HLA-B27	29
4.4	Patofyziologie	29

4.4.1	Prezentace artritogenních peptidů	30
4.4.2	Expresse volných forem těžkého řetězce HLA-B27, včetně homodimerů, na povrchu buněk a jejich rozpoznávání imunoreceptory rodiny NK.....	30
4.4.3	HLA-B27, reakce na nesložené proteiny a reakce endoplazmatického retikula na stres	31
4.5	Klinický obraz	31
4.5.1	Mimokloubní projevy	32
4.6	Kritéria diagnostiky	33
4.7	Diagnostika	34
4.7.1	Klinické vyšetření.....	34
4.7.2	Zobrazovací metody	35
4.7.3	Laboratorní metody.....	37
4.8	Léčba	37
4.8.1	Farmakologická léčba	38
4.8.2	Biologická léčba	38
4.8.3	Rázová vlna.....	38
4.8.4	Fyzioterapie	39
4.8.5	Chirurgická léčba	39
5	Cíle práce.....	40
6	Metodika práce	41
6.1	Vyšetřování probandi	41
6.2	Izolace DNA.....	42
6.2.1	Izolace DNA z bukalního stěru sliznice	43
6.2.2	Izolace DNA z periferní krve	44
6.2.3	Měření koncentrace DNA.....	45
6.3	Real-time PCR	45
6.4	Komparace.....	47
6.4.1	Komparace real-time PCR.....	47
6.4.2	Komparační měření koncentrace a nečistot DNA	49
7	Vyhodnocení výsledků.....	50
7.1	Měření koncentrací izolovaných vzorků	50
7.2	Real-time PCR	51
7.3	Komparační real-time PCR.....	54
7.4	Komparační měření koncentrací izolovaných vzorků a nečistot	56
8	Diskuze.....	58

9	Závěr	60
10	Literární přehled	61
	Seznam obrázků	70
	Seznam tabulek	71
	Seznam zkratek	72

1 Úvod

Revmatická onemocnění jsou známa hlavně kvůli jejich schopnosti postihovat pohybový aparát. Ale u těchto onemocnění jsou známy i mimokloubní projevy u srdce, plic, ledvin a dalších orgánů. Základní klasifikace revmatických onemocnění je do šesti velkých skupin: zánětlivá, degenerativní, revmatické syndromy vázané na přítomnost infekčního agens, metabolické a endokrinní choroby spojené s revmatickými stavy, mimokloubní revmatismus a poslední skupinou nádory, neurovaskulární projevy, amyloidózy nebo sarkoidóza.

Pro teoretický přehled revmatických onemocnění jsem vybral dvě onemocnění, která spadají do velké skupiny zánětlivých revmatických onemocnění. Tato skupina je však rozdělena do dalších podskupin, přičemž onemocnění revmatoidní artritida spadá do podskupiny difúzní choroby pojivové tkáně. Druhé onemocnění, zvané Bechtěrevova choroba, však patří mezi spondylartritidy.

Revmatoidní artritida je systémové autoimunitní a zánětlivé onemocnění, které postihuje pohybový aparát a mohou se u něho vyskytnout mimokloubní projevy. Jedná se o nejčastější revmatické onemocnění, kterým trpí 1 % světové populace.

Bechtěrevova choroba je chronické zánětlivé revmatické onemocnění, které postihuje především páteř a klouby, ale může mít též mimokloubní projevy, kdy zánět duhovky je jedním z nejčastějších. Toto onemocnění je velmi známé hlavně pro výslednou ztuhlou postavu nemocných zapříčiněnou srostlými obratli páteře. Neméně známá je jeho asociace s alelou HLA-B27, která je jedním z predispozičních znaků tohoto onemocnění a vysoce zvyšuje riziko propuknutí onemocnění, U Bechtěrevovy choroby však není pravidlem, že tato nemoc propukne, pokud je alela HLA-B27 zastoupena v genetické výbavě jedince.

Alela HLA-B27 je jednou z alel lidského leukocytárního systému, která představuje antigenní peptidy odvozené od vlastních i cizích antigenů pro T-lymfocyty. Hlavní funkcí této alely je prezentace endogenních peptidů T-lymfocytům, převážně T buněčnému receptoru pro antigen cytotoxických T-lymfocytů. Jsou známy různé hypotézy, jak tato alela ovlivňuje vznik onemocnění. Mezi nejznámější patří tyto tři: Prezentace artritogenních peptidů, Exprese volných forem těžkého řetězce HLA-B27, včetně homodimerů, na povrchu buněk a jejich rozpoznávání imunoreceptory rodiny

NK a HLA-B27, reakce na nesložené proteiny a reakce endoplazmatického retikula na stres.

Stanovení alely HLA-B27 se používá čím dál méně v diagnostice tohoto onemocnění, jelikož je jednodušší a finančně méně náročnější stanovení antigenu HLA-B27 průtokovou cytometrií. Antigen HLA-B27 je tvořen na základě genetické informace této alely. Nejčastější používanou molekulárně genetickou metodou k potvrzení nálezu antigenu je real-time PCR. Jedná se o polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase, pomocí které je možné měřit množství DNA v reakci v průběhu každého cyklu, díky fluorescenci. Ta je zaznamenána po každém cyklu a odpovídá množství amplifikované DNA, což nám pomáhá k rychlejší a efektivnější práci při diagnostice Bechtěrevovy choroby

Předmětem této bakalářské práce je diagnostika Bechtěrevovy choroby pomocí real-time PCR u probandů, kteří tímto onemocněním trpí, nebo mají predispoziční znaky naznačující, že by mohlo jít o tuto chorobu. Někteří probandi byli i zdraví jedinci.

2 Revmatická onemocnění

Mezi jedny z nejstarších uznávaných chorob patří revmatická onemocnění. (Tabulka 1) Tyto onemocnění jsou charakterizována zánětem kloubů, vazů, šlach kostí nebo svalů a v některých případech mohou postihovat i jiné orgány. Klasifikace revmatických onemocnění je někdy obtížná vzhledem k neznámé etiologii a heterogenitě jejich klinického obrazu. (Scherer et al., 2020)

Tabulka 1, Klasifikace revmatických onemocnění dle Pavelky

Zánětlivá revmatická onemocnění	a) revmatoidní artritida	
	b) systémová onemocnění pojiva	systemový lupus erythematoses
		systemová skleróza
		polymyozitida
		dermatomyozitida
		vaskulitidy
		Sjögrenův syndrom
	c) spondylartritidy	ankylozující spondylitida
		psoriatická spondylitida
		reaktivní artritida
		enteropatické artritidy
		nediferencovaná spondylartritida
	Degenerativní onemocnění kloubů	osteoartróza
generalizovaná		
Metabolická kostně – kloubní onemocnění		a) krystalická artropatie
		b) osteoporóza, osteomalacie
Mimokloubní revmatismus	a) lokální	juxtaartikulární (léze šlach)
		diskopatie
	b) celkový	idiopatická bolest v zádech
		celkový (fibromyalgie)
Septické artritidy		bakteriální
		virové
		mykotické
		parazitární
Další		nádory a paraneoplastické syndromy
		kloubní projevy při endokrinopatiích
		neurovaskulární projevy (útlakové syndromy atd.)
		avaskulární osteonekróza
		kloubní projevy při krvácivých onemocněních
		amyloidóza
		sarkoidóza

Zdroj: (Pavelka et al., 2018)

Mezi nejčastější revmatická onemocnění patří osteoartritida a revmatoidní artritida, avšak jednou z nejnámějších revmatických chorob je ankylozující spondylitida, známá také jako Bechtěrevova choroba. Jednou z výzev při studiu revmatických onemocnění je získávání epidemiologických údajů, které lze využít k lepšímu pochopení faktorů, jež přispívají k iniciaci a progresi těchto onemocnění. Pouze s takovým porozuměním lze dosáhnout významného pokroku v diagnostice a léčbě pacientů. (Pincus et al., 2006)

2.1 Funkční anatomie pohybového aparátu

Z hlediska revmatologie hraje anatomie a fyziologie pohybového aparátu obrovskou roli. Ať už se může jednat o onemocnění z jednostranné zátěže, které postihuje IT pracovníky nebo zánětlivá revmatická onemocnění, je nezbytné se seznámit se základními anatomickými a fyziologickými vědomostmi. Základem pohybového aparátu jsou kosti, klouby, vazy, šlachy a svaly, kdy celý tento systém je ovládán centrální nervovou soustavou. (Bínovský, 2003).

2.1.1 Kostí

Každá kost se skládá ze tří stavebních komponent – okostice, kostní tkáň a kostní dřevě. Okostice neboli periosteum, je silný, tuhý, vazivový list, který pokrývá povrch kostí s výjimkou kloubních konců, je bohatě prokrvena a obsahuje senzitivní nervy pro vedení kostní bolesti. Krevní cévy okostice mají význam pro výživu kostí. Kostní tkáň je metabolicky velmi aktivní a pro pevnost a odolnost kostí je nezbytná pro ukládání vápníku a pohyb. Hlavním zdrojem vápníku pro lidský organismus je mléko a mléčné výrobky, avšak k ukládání vápníku do kostí je nezbytný také pohyb, který stimuluje kosti k posilování ukládáním vápníku. (Kachlík, 2018)

2.1.2 Klouby

Každý kloub se skládá ze dvou kloubních ploch, kloubního pouzdra a nitrokloubních chrupavčitých destiček. Kloubní pouzdro má vazivovou vrstvu, která tvoří pevný vnější obal, a synoviální vrstvu, která vystýlá kloubní dutinu a produkuje synovium. Kloubní hlavice a jamka jsou kryty sklovitou kloubní chrupavkou, která je mechanicky odolná a zajišťuje ochranu kloubu. Chrupavka získává výživu ze synoviální tekutiny a je ideální, pokud je střídavě zatěžována a uvolňována, což jí umožňuje regenerovat a nasáknout výživné látky. (Čihák, 2011)

Kloubní pouzdro slouží k udržení stability při extrémním pohybu v kloubu a předává informace do centrálního nervového systému prostřednictvím nespočetných receptorů v kloubním pouzdru. Tyto receptory předávají informace směrem do centrálního nervového systému, což je důležité pro správnou funkci kloubů. Vyvážená činnost svalových skupin, které kloub obklopují, je nezbytná pro udržení funkčně centrované polohy kloubu, což minimalizuje zvýšené opotřebení kloubu a zajišťuje rovnoměrné rozložení zátěže po celé ploše kloubu. (Fiala et al., 2015)

2.1.3 Šlachy

Šlachy jsou vláknité spojovací tkáně, které propojují svaly s kostmi a umožňují přenos síly ze svalu na kost. Jsou tvořeny kolagenními vlákny a obsahují malé množství elastických vláken. Šlachy jsou silné, avšak mají omezené zásobování krví. Některé šlachy, jako například šlachy v dlani a zápěstí, se pohybují v obalu obsahujícím synoviální tekutinu, což umožňuje klouzání šlach při pohybu prstů. (Dylevský et al., 2000).

2.1.4 Vazy

Vazy jsou důležitou součástí pohybového systému, která zajišťuje stabilitu kloubů a brání jim v nadměrném pohybu. Jsou tvořeny kolagenními vlákny s různým podílem elastických vláken a nemohou se stahovat. Vazy obsahují mnoho receptorů, které předávají informace do centrálního nervového systému. Jejich správná funkce je zásadní pro udržení vyvážené činnosti svalových skupin, které obklopují kloub, což minimalizuje zvýšené opotřebení kloubu a zajišťuje rovnoměrné rozložení zátěže po celé ploše kloubu (Dylevský, 2009)

2.1.5 Svalová povázka

Svalové povázky jsou vazivové blány, které obalují jednotlivé svaly a svalové skupiny. Tyto blány nemají schopnost se stahovat, ale při déle trvajícím zkrácení svalu se zkrátí a mohou vést k poruše výživy svalu, což omezuje pohyb. Fascie oddělují jednotlivé svaly a umožňují klouzání svalů při pohybu těla. Jsou to vazivové struktury, které obalují svaly, orgány, cévy a nervy a mají různou tloušťku a funkci pro danou oblast, ve které se nacházejí. (Grim & Druga, 2019)

2.1.6 Svaly

Svaly jsou jediné stažitelné části lidského těla, které umožňují aktivní pohyb a představují přibližně 40 % tělesné hmotnosti. Jsou složeny z různých tkání, včetně svalové, vazivové, nervové a cévní tkáně. Svalová tkáň v kosterním svalu je tvořena svalovými vlákny, která se skládají do svazků svalového bříška a mají schopnost aktivního smršťování. (Dylevský, 2009) Šlachy přenášejí svalové kontrakce a upevňují svaly do periostu a kompaktní kosti. Kontrakce svalu je vyvolána nervovými podněty, a informace ze svalů a šlach vycházejí ze svalových vřetének a šlachových tělísek uložených uvnitř svalového vlákna. (Čihák, 2011)

Svalové vřetenko je senzorický orgán umístěný ve svalech, který slouží k monitorování délky svalu a rychlosti změn jeho délky. Tvoří ho modifikovaná svalová vlákna, která jsou vazivově spojena s okolními svalovými vlákny. Svalové vřetenko je inervováno dvěma způsoby: senzoricky prostřednictvím reflexní dráhy a motoricky prostřednictvím nastavovacího systému gama. (Fiala et al., 2015) Jeho hlavní funkcí je sledovat délku svalu a reagovat na změny napětí ve svalu prostřednictvím intrafuzálních kontraktálních vláken, která jsou inervována motorickými vlákny nastavovacího systému gama. Tímto způsobem poskytuje informace o statických a dynamických parametrech svalové funkce, jako je změna délky svalu a rychlost změny délky svalu. (Kachlík, 2018)

3 Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida (RA) je systémové autoimunitní a zánětlivé onemocnění, které způsobuje záněty a bolesti kloubů infiltrací kloubní dutiny. Iniciuje se zvýšená tvorba proteinů imunitní reakce včetně protilátek napadající kloubní struktury. (Fraenkel et al., 2021) Zánětlivé reakce v synovii vedou k přílivu periferních zánětlivých buněk i k aktivaci lokálních buněk. Podrobněji se jedná o zánět charakterizovaný synoviální hypertrofií s infiltrací zánětlivými buňkami, destrukcí kloubní chrupavky a dekalifikací kostí. (Neumann et al., 2018)

Pro toto onemocnění je charakteristická destrukce chrupavky a kostní hmoty lokálními tkáňovými buňkami, synoviálními fibroblasty a osteoklasty. Neléčené lokální zánětlivé a destruktivní procesy i systémové zánětlivé faktory vedou k progresivní a nevratné destrukci kloubu. (Neumann et al., 2018)

3.1 Patofyziologie

První změny se objevují v synovii, následně v synoviální tekutině, chrupavce, a nakonec v paraartikulární oblasti. Nejprve vzniká sebefibrinózní nitrokloubní zánět, který se později může vyvinout do panusu. (Olejárová & Filková 2008) Panus je zbytnělá synoviální membrána, ve které nadměrně proliferuje vazivo a cévy, a pokrývá kloubní chrupavku, čímž ji odděluje od vyživující synoviální tekutiny. B-lymfocyty a polymorfonukleáry, které jsou přítomné v místě zánětu, produkují proteolytické protilátky a enzymy (stromelyzin, elastázy, kolagenázy aj.). (Navrátil, 2017) Vzniklé radikály kyslíku a dusíku narušují kloubní chrupavku, kostní tkáň, šlachy a další kloubní struktury. Tento proces vede k postupné erozi subchondrální kostní hmoty. Pokud se spojí panus prorůstající z protilehlých stran kloubu, může se dále fibroticky měnit, osifikovat, a nakonec dojde k ankylóze. (Suchý, 2003)

Můžeme sledovat další morfologické projevy jako jsou revmatické uzlíky, které vznikají zejména v podkoží. Histologicky se skládají ze tří vrstev. V první vrstvě se nachází centrálně nekrotická tkáň. Kolem ní je vrstva palisádových fibroblastů a mnohojaderných buněk. Za to periférně můžeme pozorovat vrstvu chronického zánětu. (Bečvář & Pavelka, 2009)

3.2 *Imunopatogeneze*

3.2.1 *Antigen*

Jedná se o makromolekulární strukturu (patogen, buňka, molekula), kterou imunitní systém rozpozná svými povrchovými receptory buněk imunitního systému a vyhodnotí ho jako škodlivou nežádoucí částici. Když receptory rozpoznají antigen, stimuluje imunitní systém ke spuštění obraných reakcí vedoucí k eliminaci daného antigenu. Může to být cizorodá částice, jako jsou mikroorganismy nebo jejich produkty. Tyto produkty nabývají jakékoli chemické struktury, jako jsou proteiny, polysacharidy nebo nukleové kyseliny. (Jílek, 2019)

Z hlediska původu rozeznáváme exoantigeny a endoantigeny. Naše tělo se častěji potýká s exoantigeny, které pocházejí z vnějšího prostředí. Ve většině případech se jedná o bakterie, či viry. Naopak endoantigeny jsou autoantigeny, které pocházejí z organismu samostatného. Fyziologicky jsou organismem tolerovány, ale za určitých patologických podmínek mohou vyvolat imunitní reakci, což vede ke tvorbě autoprotilátek a autoreaktivních buněk. (Hořejší & Bartůňková, 2009)

3.2.2 *Imunitní reakce, buňky a molekuly, které se jí účastní*

Počáteční imunitní reakce se spouští neznámým antigenem, což aktivuje T-lymfocyty. Ty se hromadí a infiltrují synoviální membránou kloubu, kde produkují prozánětlivé cytokiny a aktivují makrofágy k sekreci cytokinů a chemokinů. (Jílek, 2019)

Uvolněné růstové faktory, chemokiny a zejména cytokiny hrají v chronických zánětlivých reakcích klíčovou roli. Cytokiny zapojené do progresu poškození kloubů jsou například IL-1 β , TNF- α a IL-17. Synoviální tekutina pacientů s časnou a etablovanou formou RA obsahuje odlišné spektrum cytokinů. TNF- α hraje roli při časně formě RA, zatímco IL-1 β je důležitý v průběhu etablované RA. (Lochmanová, 2014) Kromě centrálních lymfocytů, T a B lymfocytů a jejich subpopulací jsou zánětlivým prostředím aktivovány i lokálně rezidentní buňky, jako jsou neutrofilové makrofágy a fibroblasty. Také buňky kostního metabolismu, které přispívají k zánětu a poškození tkání a jsou jeho hybnou silou. (Hořejší & Bartůňková, 2009)

V kloubním mazu mohou vznikat struktury nazývané folikuly, jež obsahují B- a T-lymfocyty spolu s folikulárními dendritickými buňkami. Tyto folikuly mohou

interagovat s fibroblasty prostřednictvím lymfotoxinu- β , což vede k uvolňování enzymů, jako jsou matrixové metaloproteinázy, a dalších zánětlivých mediátorů. Tato interakce vytváří destruktivní zánětlivé prostředí v kloubu, které má schopnost samo udržovat svou aktivitu. (Behrens et al., 2015) Trombocyty generují zánětlivé prostacyklin a uvolňují mikročástice s prozánětlivým účinkem, které vzájemně interagují s leukocyty a přispívají k rozvoji celkového zánětu. (Mitchell et al., 2014)

V synoviální tekutině jsou neutrofilní granulocyty aktivovány revmatoidním faktorem a autoprotilátkami zaměřenými proti citrulinovaným peptidům. Tato aktivace vede k jejich degranulaci, uvolňování reaktivních forem kyslíku (ROS), kyseliny chlorné a proteáz. (Wu et al., 2021) Důsledkem je degradace hyaluronové kyseliny a aktivace cytokinů. Neutrofilní granulocyty samy produkují citrulinované peptidy, proti nimž se tvoří autoprotilátky, a to prostřednictvím mechanismu známého jako neutrofilní extracelulární past (NETóza). (McInnes & Schett, 2011)

3.3 Epidemiologie

Onemocnění označované jako RA postihuje 1 % světové populace. Toto revmatologické onemocnění se může vyskytnout v kterémkoli věku a může postihnout muže i ženy. Avšak RA se objevuje dvakrát až třikrát častěji u žen. Příznaky se vykytují u žen nejčastěji mezi třicátým až padesátým rokem života. Na rozdíl u mužů se toto onemocnění objevuje až později ve stáří. (Imboden et al., 2013) RA obvykle postihuje ruce, kolena nebo ankylózy, a obvykle se vyskytuje na stejné části těla, jako jsou obě ruce nebo obě kolena. Nicméně, RA může způsobit problémy i v jiných částech těla, jako jsou oči, srdce a krevní soustava nebo plíce. (Kubíček et al., 2022)

3.4 Etiologie

Etiologie RA je komplexní a multifaktoriální, zahrnující genetické a environmentální faktory. Nejdůležitějším genetickým faktorem pro vývoj RA jsou sdílené epitopové alely, které se nacházejí v oblasti MHC II. třídy. Konkrétně se jedná o geny HLA-DRB1 a HLA-DRB4, který kódují β řetězec molekuly HLA-DR systému II. třídy. (Scherer et al., 2020) Tyto glykoproteiny se přímo podílejí na vystavení antigenů pro T-lymfocyty a začátku imunitní odpovědi. Nejdůležitějším environmentálním rizikovým faktorem RA je kouření, ale je možné, že zánětlivou imunitní odpověď může začít i bakteriální nebo virová infekce. (Platzer et al., 2019).

Abnormality v buněčné a humorální imunitní odpovědi vedou k výskytu autoprotilátek, zejména revmatoidních faktorů (RF) a protilátek proti posttranslačně modifikovaným proteinům (AMPA – Anti-modified protein antibodies), které zahrnují protilátky proti různým modifikacím, jako je citrulinace (ACPA), karbamylace (aCarP) a acetylace (AAPA), a také k imigraci T a B-lymfocytů do synovie. (Scherer et al., 2020)

3.5 Klinický obraz

Klinický obraz revmatoidní artritidy je velmi různorodý. Nástup tohoto onemocnění je často plíživý a bývá doprovázen celkovými příznaky, které mohou být: únava, malátnost, subfebrilie, nechutenství nebo změna psychiky. Méně častěji je začátek onemocnění akutní. U části pacientů můžeme sledovat mírné onemocnění se spontánními remisemi, u jiných chorob s častými relapsy, s trvalou aktivitou a rychlým vývojem strukturálních změn. (Klener et al., 1997)

Nejčastější manifestací RA je symetrická polyartritida doprovázená bolestí a otokem kloubů a ranní ztuhlostí, která trvá déle než hodinu. Dalšími možnostmi projevu RA je monoartritida nebo oligoartritida, které se však objevují vzácněji. Onemocnění nejčastěji postihuje drobné klouby rukou, mezi které patří především zápěstí, metakarpofalangeální, proximální interfalangeální klouby a na nohou se jedná o metatarzofalangeální klouby. Postihnout však může libovolný kloub v těle včetně krční páteře na úrovni C1-C2, kde toto označení představuje atlas a axis. (Souček & Svačina, 2019)

U skupiny pacientů, kteří jsou postiženi tímto onemocněním, a z pravidla mají pozitivní autoprotilátky, se setkáváme s extraartikulárními projevy onemocnění. U již pokročilého onemocnění se nad burzami a šlachovými pochvami se v místech působení tlaku vyskytují revmatoidní uzly. Může se tedy jednat o olekranon, extenzorovou plochu předloktí, nad šlachami prstů rukou, či nad Achillovou šlachou. (Rovenský, 2008)

Významné komorbidity doprovázející RA je např. únava, malátnost, anémie, osteoporóza, kardiovaskulární onemocnění, infekce nebo malignity. U tohoto onemocnění se také zvyšuje morbidita, tedy se zkracuje délka života až o 10 let. (Jenšovský, 2018)

Mimokloubní projevy mohou zahrnovat revmatické uzly, tendosynovitidu, osteoporózu, sekundární amyloidózu, hematologické abnormality, oční postižení, postižení kůže, srdce, cév, nervů a plic. (Jenšovský, 2018)

3.6 Kritéria diagnostiky revmatoidní artritidy

Diagnostika revmatoidní artritidy není založena na jednom konkrétním diagnostickém testu, ale spíše na kombinaci anamnézy, fyzikálního vyšetření a výsledků pomocných vyšetření. K dispozici jsou klasifikační kritéria (Tabulka 2), která se používají k usnadnění diagnózy a rozlišení revmatoidní artritidy od jiných zánětlivých onemocnění. (Müllerová, 2019).

Tabulka 2, Klasifikační kritéria ACR/EULAR z roku 2010

Klouby (0-5 bodů)	1 velký
	2-10 velkých
	1-3 malých (s nebo bez postižení velkých)
	4-10 malých (s nebo bez postižení velkých)
	>10 (alespoň 1 malý kloub)
Sérologie (0-3 body)	RF a ACPA obojí negativní
	Alespoň jeden z RF a ACPA nízkce pozitivní
	Alespoň jeden z RF a ACPA vysoce pozitivní
Trvání příznaků (0-1 bod)	<6 týdnů
	≥6 týdnů
Reaktanty akutní fáze (0-1 bod)	Normální hodnota CRP a FW
	Zvýšená hodnota CRP nebo FW

Zdroj: (Šenolt, Mann, 2021)

Původní kritéria vydaná Americkou revmatologickou společností v roce 1987 měla spíše charakter odlišovacího nástroje než přesného diagnostického ukazatele pro počínající formy nemoci. V roce 2010 byla publikována nová klasifikace, která měla za cíl urychlit stanovení diagnózy a umožnit rychlejší zahájení účinné léčby. (de Hair et al., 2010) Tato nová kritéria jsou zaměřena na identifikaci příznaků a znaků, které jsou typické pro revmatoidní artritidu v počátečních stádiích onemocnění. (Šenolt & Mann, 2021)

3.7 Diagnostické testy a metody

Při diagnostice RA lékaři obvykle vyhodnocují přítomnost typických příznaků, jako jsou bolest a otok kloubů, ranní ztuhlost, únava a další znaky zánětu. Fyzikální vyšetření může odhalit charakteristické změny v postižených kloubech, jako je otok, zarudnutí a omezená pohyblivost. (Jenšovský, 2018)

Kromě toho se využívají laboratorní testy, jako je měření hladiny C-reaktivního proteinu (CRP) a hladiny revmatoidního faktoru (RF), a obrazové vyšetření, například rentgenové snímky kloubů nebo magnetická rezonance, aby se posoudil rozsah a stupeň postižení kloubů. (Kessler & Musil, 1993)

3.7.1 Laboratorní testy

Biochemická vyšetření

Biochemická vyšetření v revmatismu se specializují na stanovení reaktantů akutní fáze. Používají se také k diagnostice a monitorování akutních a chronických zánětů, infekcí, malignit nebo nekróz. Jako pozitivní nález označujeme zvýšenou hladinu zánětlivých cytokinů, kterým je např. interleukin-6, a plazmatických bílkovin C-reaktivního proteinu a fibrinogenu. Jako běžné biochemické stanovení zánětlivých markerů se používá CRP a FW. (Racek, 2006)

CRP – Celým názvem C-reaktivní protein je hlavní bílkovina reaktantů akutní fáze. Hlavními funkcemi CRP jsou opsonizace, která pracuje na vazbě CRP a fosfatidylcholin, který je součástí bakteriálních stěn. CRP je také schopen aktivovat komplement a stimulovat fagocytující buňky. A jeho poslední z hlavních funkcí je schopnost vázat C polysacharid buněčné stěny *Streptococcus pneumoniae*. (Kessler & Musil, 1993)

Je to biochemické stanovení C-reaktivního proteinu. Tento test se používá hlavně k monitorování aktivity zánětu a sledování účinnosti léčby. Je to tedy hlavní ukazatel aktivity onemocnění, kdy při akutním zánětu rapidně vzrůstá a poté zase klesá. Naopak dlouhodobě zvýšená hladina CRP signalizuje, že se jedná o chronický zánět. Fyziologicky bývá plazmatická koncentrace do 8-10 mg/l. (Zima, 2007)

FW – Stanovení sedimentace erytrocytů dle Fahrause a Westergrena je běžné biochemické laboratorní vyšetření, jenž nám ukazuje rychlost klesání erytrocytů ve

vzorku nesrážlivé krve pacienta. Rychlost sedimentace erytrocytů závisí hlavně na velikosti sedimentujících částic. (Rosina, 2022)

U sedimentace musíme dbát ohled věk, jelikož fyziologicky se nám zvyšuje rychlost sedimentace erytrocytů. Nesmíme také zapomenout na ženské pohlaví, a to především v těhotenství, protože mají menší počet erytrocytů a zvýšenou koncentraci fibrinogenu. FW nám vypovídá o přítomnosti zánětu v těle, kdy typicky pozitivní nález se vyskytuje u artritid. (Zima, 2007)

Imunologická vyšetření

RF – Jedná se o autoprotílátku s názvem revmatoidní faktor, která je cílená proti Fc-fragmentu vlastních imunoglobulinů třídy IgG. Samostatný RF může být přítomen ve všech třídách imunoglobulinů: IgG, IgA, IgM, IgE a IgD. Detekce RF je založena na nefelometrii a latex fixačním testu. (Hořejší & Bartůňková, 2001)

Latex fixační test nebo také latex aglutinační test je založen na imunologickém principu imunitní odpovědi pacienta antigen – protílátka. Při provádění testu se smíchá pacientův vzorek moči, mozkomíšního moku anebo séra s potaženými latexovými částicemi v sériových ředěních normálním fyziologickým roztokem. Potažené latexové částice obsahují specifickou protílátku RF. Po průběhu reakce se pozoruje aglutinace, kdy jako pozitivní výsledek je považována aglutinace v kterémkoli ředění. (Bartůňková & Paulík, 2011)

Avšak běžným způsobem stanovení RF je nefelometrie, která preferenčně detekuje RF ve třídě IgM. Technika nefelometrie spočívá v měření intenzity světla rozptýleného vzorkem pod určitým úhlem. (Hořejší & Bartůňková, 2001)

Anti-CCP – Protílátky proti cyklickým citrulovaným peptidům jsou typem autoprotílátky, která působí proti protilátkám našeho těla. Konkrétně tyto anti-CCP spouští reakci, kdy jsou poškozovány zdravé tkáně ve výstelce kloubů a způsobují zánět, což vede k bolesti, otokům, a nakonec jejich poškození. Fyziologická mez anti-CCP je nižší než 20 EU/ml. (Zima, 2007)

HLA-DR – Je to povrchový buněčný receptor MHC II. třídy kódovaný komplexem lidských leukocytárních antigenů na chromozomu. Molekuly HLA-DR jsou regulovány v reakci na signalizaci. V případě infekce se peptid naváže do molekuly DR a je

prezentován několika především T-lymfocytárních receptorů, které se nacházejí na T-pomocných lymfocytech. Tyto buňky se pak vážou na antigeny na povrchu B-lymfocytů a stimulují proliferaci B-lymfocytů. (Hořejší & Bartůňková, 2001)

Stanovení probíhá pomocí průtokové cytometrie, která zkoumá lidský leukocytární antigen HLA-DR včetně HLA-DRB1. Princip průtokové cytometrie funguje na suspendování buněk v tekutině, které jsou označeny pomocí monoklonálních protilátek s navázaným fluorochromem. Ty se vážou specificky na povrch vyšetřovaných buněk. Suspenze se vloží do průtokového cytometru, kde je poté přetlakem vstříkován tenký proud suspenze. Buňky prochází jednotlivě za sebou, kde jsou protínány laserovým paprskem. (Bartůňková & Paulík, 2011) Pracuje zde Tyndallův jev, který nám vypovídá o granulaci buňky. Čím více se světla odrazí tím více je buňka granulovaná. Naopak čím více se paprsek rozptýlí, tím více je částice větší. Tyto optické parametry jsou snímány dvěma detektory, side scatterem a forward scatterem. Side scatter zachycuje odražené světlo, tím pádem granulaci. Forward scatter zachycuje rozptýlené světlo, čímž nám zobrazuje velikost buněk. (Beneš et al., 2015) Navázaný fluorochrom se laserem excituje a vyzáří se. Vyšetření se provádí z nesrážlivé krve, kdy nesrážlivé činidlo je EDTA nebo heparin. (Bartůňková & Paulík, 2011)

Vyšetření synoviální tekutiny

Provedení vyšetření synoviální tekutiny probíhá za přísně aseptických podmínkou, jelikož se jedná o invazivní analýzu. Odběr probíhá v pozici s nejvyšším nitrokloubním tlakem, tzn. maximální flexe nebo extenze. Poté dochází k doplňujícímu vyšetření leukocytů v laboratoři. Fyziologický nález synoviální tekutiny má vzhled vazké čiré tekutiny s nažloutlou barvou. Laboratorní rozbor by měl fyziologicky obsahovat 200 leukocytů na 1 μ l tekutiny. (Imboden et al., 2013)

Genetické vyšetření

HLA-DR – Genetické vyšetření HLA-DR je možné pomocí stanovení alely HLA-DR, díky které je naše tělo schopno vytvářet antigeny HLA-DR. Stanovení je nejčastěji prováděno pomocí real-time PCR. (Dorak, 2007)

Abychom pochopili princip real-time PCR, je nutné zmínit základní princip PCR. Princip polymerázové řetězové reakce (PCR) spočívá v exponenciálním množení specifického úseku DNA v laboratorních podmínkách. Tento proces zahrnuje

opakované cykly denaturace, po které následuje příčná hybridizace a elongace DNA fragmentu za použití DNA polymerázy. Výsledkem je vytvoření milionů kopií daného úseku DNA, což umožňuje detekci a analýzu i velmi malých množství vstupního materiálu. (Domingues, 2023)

Real-time PCR je varianta klasické PCR, která umožňuje přesně měřit množství DNA či RNA v reakci v průběhu každého cyklu amplifikace. Tato metoda využívá speciálního zařízení nazývaného cycler, který kontinuálně monitoruje úroveň fluorescence, jež je generována fluorescenčními substráty vázanými na DNA. Tato fluorescence je zaznamenávána po každém cyklu a odpovídá množství amplifikované DNA. Real-time PCR umožňuje detekci i kvantifikaci cílové DNA či RNA s vysokou citlivostí a specificitou. (Dorak, 2007)

3.7.2 Zobrazovací metody

Hlavní zobrazovací diagnostickou metodou pro stanovení RA je rentgenová skiografie, zkráceně označováno RTG. Při RTG se zobrazují tvrdé a měkké lidské tkáně. Funkční princip RTG je, že procházející svazky RTG záření mají v různých tkáních různé hodnoty pohlcení. Konečný RTG obraz je zachycen na rentgenový film, či jiný detekční systém přístroje. (Buřval et al., 2015)

Tuto diagnostickou metodu je možné lépe provést s použitím kontrastní látky, která umožní dokonalé zobrazení zkoumané tkáně. Kontrastní látka je schopná změnit velikost absorpce záření v těle. Díky tomu vyvolává v RTG obraze větší rozdíly v transparenzi vyšetřované tkáně nebo orgánu oproti okolí. Máme dva typy kontrastních látek: pozitivní a negativní. Je možné použít i metodu dvojího kontrastu, kdy se používají současně jak pozitivní a negativní kontrastní látky. (Malíková, 2022)

Negativní kontrastní látky

Tyto kontrastní látky jsou uzpůsobeny k projasnění rentgenových snímků. Negativní kontrastní látky pohlcují záření méně než vyšetřovaný orgán, což způsobuje cílené projasnění. Používanými látkami jsou např. vzduch, CO₂, NO, ... (Nekula, 2005)

Pozitivní kontrastní látky

Naopak pozitivní kontrastní látky jsou používány pro svou vysokou absorpční schopnost, což vede k sytému stínu na snímcích. Tyto používané látky mají vysoké

protonové číslo a dělí se do dvou skupin na jodové a baryové. (Navrátil & Rosina, 2005)

3.8 Léčba

Léčba revmatoidní artritidy zahrnuje různé možnosti. Mezi ně patří režimová opatření, fyzikální léčba, pohybová léčba, farmakoterapie a chirurgická léčba. Základem léčby je farmakoterapie, kdy jejich užívání zpomaluje postižení kloubů, zlepšuje funkční schopnosti a zvyšuje kvalitu života. (Jenšovský, 2018)

3.8.1 Režimová opatření

Nejdůležitější je držet se zdravého životního stylu. Zdravý životní styl zahrnuje vyváženou stravu, která je bohatá na vlákninu z ovoce a celozrnných potravin. Vysoký by měl být i příjem vitamínů (C, D, B, E) a minerály (Ca, Mg, Se, Zn). Měli bychom se vyvarovat konzumaci průmyslově vyráběných a balených potravin, a to zejména s vysokým podílem tuku, soli a cukru. V případě obezity či nadváhy by měl pacient pod dohledem odborníku zhubnout. V neposlední řadě by neměl být zanedbáván pohyb. Naopak pokud je pacient již v akutním stádiu, měl by být zachován klid na lůžku. (Machová & Kubátová, 2015)

3.8.2 Pohybová léčba

Pro většinu lidí je cvičení velmi bezpečné a jedná se také o vynikající způsob, jak upevnit své zdraví. Pohybová léčba má různé zásady. Podle REVMA ligy je důležité, aby pohybová léčba byla vykonávána dlouhodobě, měla by být progresivní, ale zároveň by neměla zvyšovat bolest a únavu. Je důležité zmínit, že pohybová léčba není vhodná při náhlém zhoršení zánětlivého procesu, u závažných kloubních změn, při závažném postižení vnitřních orgánů a při hořčnatých stavech. Cílem pohybové léčby je zlepšit hybnost, stabilitu kloubů, zvýšit svalovou sílu, omezit ranní ztuhlost a zvyšovat snášenlivost zátěže. (Müllerová, 2019).

3.8.3 Fyzikální léčba

Další možností léčby je tzv. fyzikální léčba, která má různé možnosti provedení. Můžeme sem zařadit termoterapii, elektroléčbu a vodoléčbu. Termoterapie aplikuje teplo či chlad k léčbě bolesti, otoku a svalových křečí. Zlepšuje hojení tkání a usnadňuje pohyb a funkci. Zatímco elektroléčebné procedury zmírňují bolesti, zlepšují svalové

funkce, ale navíc i snižují zánět. Při této léčbě je nejčastěji využívána elektrická stimulace, laser, ultrazvuk a diatermické krátké vlny. Poslední možností fyzikální léčby je vodoléčba, kterou je vhodné zařadit ve stádiu remise. Možností vodoléčebné procedury jsou vířivé koupele a cvičení v bazénu. (Navrátil, 2019)

3.8.4 Farmakoterapie

Máme mnoho možností farmakoterapie. Jednou z těchto možností jsou nesteroidní protizánětlivé léky (NSAID), kdy tato skupina léků pomáhá snižovat zánět a bolest spojenou s RA. Jako příklad této skupiny si můžeme uvést ibuprofen, naproxen a diklofenak. (Pavelka, 2005)

Skupina léků, které mají podobné vlastnosti funkce v těle jsou kortikosteroidy. Slouží tedy ke snižování bolesti a k úlevě zánětu. Tento typ léků je podáván orálně nebo injekčně do postižených kloubů. Dlouhodobé užívání může mít vedlejší účinky, a proto jsou obvykle používány v krátkodobých cyklech nebo v nižších dávkách. Příkladem této skupiny je prednison. (Pavelka et al., 2014)

Nejzásadnější skupina pro léčbu RA jsou tzv. léky modifikující průběh onemocnění (DMARD). Schopnost této skupiny léků je potlačovat imunitní odpověď a pomáhá snižovat zánět a zpomalit progresi RA. Příkladem této skupiny léků je methotrexát, sulfasalazin a hydroxychlorin. Do DMARD jsou řazeny i léky biologické léčby (např. infliximab, adalimumab, ...). (Ruediger & von Kempis, 2010) Jsou to léky, které jsou vyrobeny z lidských proteinů a cíleně zasahují do imunitního systému a blokují zánětlivé procesy. Infliximab a adalimumab jsou tzv. TNF-alfa inhibitory, naopak tocilizumab je inhibitor IL-6 a rituximab je inhibitorem B-lymfocytů. Tyto léky jsou často rezervovány pro pacienty, u nichž nebyly účinné standardní DMARD. (Acton, 2012)

Novější třídou léků jsou inhibitory Janus kinázy (JAK-inhibitory). Tyto léky blokují určité signální cesty v těle spojené se zánětem. Patří sem léky jako tofacitinib a baricitinib. (Zampeli & Moutsopoulos, 2020)

Mimo výše uvedené léky, můžeme v poslední řadě nasadit léky pro symptomatickou úlevu, jako jsou analgetika a léky proti žaludečním vředům. (Lanas, 2016)

3.8.5 *Chirurgická léčba*

Chirurgické možnosti léčby revmatoidní artritidy jsou obvykle zvažovány, pokud farmakoterapie a jiné nechirurgické postupy nepřinášejí dostatečnou úlevu nebo pokud je postižení kloubů tak pokročilé, že způsobuje závažnou funkční omezenost nebo bolest. Mezi chirurgické možnosti léčby patří: artroskopie, synovektomie, artroplastika, fúze kloubů a opravy deformit. (Němec, 2022)

Artroskopie využívá tenké trubičky s kamerou a malými chirurgickými nástroji k vyšetření nebo opravě poškozeného kloubu. Tato metoda je používána k diagnostice nebo opravě menších poškození kloubů způsobených RA. Při synovektomii dochází k odstranění části synoviální membrány, která je zanícená. Tento zákrok může snížit zánět a bolest v poškozeném kloubu. (Dungl, 2014) Artroplastika, u nás spíše známá jako kloubní náhrada, je zákrok, při kterém se odstraní poškozené části kloubu a nahradí je umělou náhradou. Tento postup se obvykle provádí u pokročilé revmatoidní artritidy, která vážně omezuje pohyb a způsobuje bolest. Další možností chirurgické zásahu do těla je fúze kloubů. Při tomto zákroku se spojí dvě kosti, tak aby se zablokoval pohyb v postiženém kloubu. Tento postup se může provádět u pacientů s pokročilou revmatoidní artritidou, která způsobuje nestabilitu nebo deformity kloubů. Pokud revmatoidní artritida způsobí deformity kloubů, může být nutná chirurgická oprava těchto deformit. To může zahrnovat osteotomii nebo osteosyntézu. Při osteotomii se jedná o řezání do kostí, tak aby se změnila její stávající poloha. K upevnění kostí v nové poloze naopak aplikujeme osteosyntézu za použití šroubů, desek anebo drátů. (Němec, 2022)

4 Bechtěrevova choroba

Bechtěrevova choroba, známá také jako ankylozující spondylitida (AS), je chronické zánětlivé revmatické onemocnění, které postihuje především páteř a klouby. Jedná se o typ spondylartritidy, kdy přesněji je řazena mezi séronegativní spondylartritidy. Séronegativita označuje, že u onemocnění nebude v krevním séru diagnostikován RF. (Mauro et al., 2021) Vyznačuje zánětem páteře a kloubů, což může vést k bolesti, omezení pohybu a v některých případech k postupnému spojování kostí označováno jako ankylóza. Toto onemocnění může postihnout i další klouby, jako jsou klouby kyčlí, ramen, nebo kolenní a může být spojeno s dalšími projevy, jako jsou záněty očí (uveitida) nebo záněty střev (enteritida). Bechtěrovova choroba má genetickou predispozici v antigenu HLA-B27. Objevitelem se stal Vladimír Nikolajevič Bechtěrev, který byl ruským psychiatrem a neurologem. (Hwang et al., 2021)

4.1 Epidemiologie

AS se vyskytuje u 1,1-1,4 % populace Země. Výskyt je spojen s frekvencí výskytu alel HLA-B27 v dané populaci. Jako příklad si můžeme uvést jižní Afriku a Japonsko, kde výskyt HLA-B27 je stejně nízký jako nízký výskyt AS. Naopak v Evropě sledujeme, že ve skandinávských státech (Norsko, Dánsko, Švédsko) je výskyt AS vyšší než v jiných zemích. V roce 2014 byla zjištěna prevalence v EU 23 nemocných na 10 tisíc obyvatel. Nejvíce osob trpících touto chorobou je v arktických a subarktických oblastech Evropy a Ameriky. (Golder & Schachna, 2013) AS se vyskytuje u obou pohlaví, ale u mužů se onemocnění vyskytuje častěji (7-10:1) a jsou tedy ohroženější skupinou. Projev AS je v mladším věku, a to zejména v rozmezí 20-30 let. Vzácny může být projev pozdější než v tomto rozmezí, kdy se choroba diagnostikuje až několik let po svém vypuknutí. Tato nemoc může vypuknout i v adolescentním věku a je pak označována jako juvenilní ankylozující spondylitida. (Hwang et al., 2021)

4.2 Etiologie

U AS není příčina onemocnění zcela objasněna, ale je známo, které faktory jsou schopny ovlivnit vznik této choroby. Mezi tyto faktory řadíme zejména vrozené dispozice. Jako vedlejší faktory můžeme zmínit pohlaví a vnější prostředí. Přesný mechanismus, kterým začíná AS, je s největší pravděpodobností složitý a multifaktoriální. (Mauro et al., 2021)

Na rozdíl od jiných systémových autoimunitních onemocnění hraje u AS dominantní roli vrozený imunitní systém, který je charakterizován aberantní aktivitou vrozených a vrozené imunitě podobných buněk, včetně γ a δ T lymfocytů, vrozených lymfoidních buněk skupiny 3, neutrofilů, slizničních invariantních T lymfocytů a žírných buněk, v místech predisponovaných k onemocnění. Je známo, že HLA-B27 má silnou asociaci s tímto onemocněním, ale na vzniku onemocnění se podílejí i další geny. (Chen et al., 2017)

Pohlaví je neovlivnitelný faktor, který na AS má určitý vliv. Není známo proč, ale AS se objevuje častěji u mužů než u žen. Avšak na druhou stranu, u žen se vyskytuje častěji neradiografická forma AS, která vyrovnává počet nemocných mezi pohlavími. U mužů se však mohou rychleji vyvinout kostní změny na SI kloubech a páteři. (Mauro et al., 2021)

U AS nebyl žádný zevní faktor jasně prokázán a spojen s tímto onemocněním, ale předpokládá se, že některé střevní infekce může ovlivnit vznik onemocnění. Střevo se podílí na projevech onemocnění, protože je v popředí interakce mezi slizničními imunitními buňkami a střevní mikroflórou. Podobně by se na patogenezi kloubních projevů AS mohly podílet i biomechanické faktory, jako je entezální mikrotrauma, a sentinelové imunitní buňky umístěné v entezích by mohly poskytnout spojení mezi lokálním poškozením, genetickou predispozicí a rozvojem chronického zánětu. (de Castro, 2007)

4.3 Hlavní histokompatibilní systém

Hlavní histokompatibilní systém (MHC) je skupina genů, které kódují proteiny nacházející se na povrchu buněk, které pomáhají imunitnímu systému rozpoznávat cizorodé látky. Proteiny MHC se vyskytují u všech vyšších obratlovců. U člověka se tento komplex nazývá také systém lidských leukocytárních antigenů (HLA). (Howell, et al., 2010)

Existují dva hlavní typy proteinových molekul MHC – třída I. a třída II. Molekuly MHC I. třídy pokrývají membránu každé jaderné buňky v organismu, zatímco molekuly II. třídy jsou omezeny na profesionální buňky prezentující antigen, kde jsou konstitutivně exprimovány, ale mohou být také indukovány na jiných buňkách interferonem γ . U člověka jsou tyto molekuly kódovány několika geny, které jsou

seskupeny ve stejné oblasti na chromozomu 6. (King et al., 2006) Každý gen má neobvykle velký počet alel (alternativních forem genu, které produkují alternativní formy proteinu). V důsledku toho je velmi vzácné, aby dva jedinci měli stejnou sadu molekul MHC, které se souhrnně nazývají tkáňový typ. MHC obsahuje také řadu genů, které kódují další proteiny – například proteiny komplementu, cytokiny a enzymy, které se nazývají molekuly MHC III. třídy. (Dupont et al., 2012)

4.3.1 HLA-B27

Lidský leukocytární antigen (HLA) B27 je povrchová molekula I. třídy kódovaná lokusem B v hlavním histokompatibilním systému (MHC) na chromozomu 6 a představuje antigenní peptidy odvozené od vlastních i cizích antigenů pro T-lymfocyty. Alomorf B27 je jednou z nejčastějších alel B v europoidní populaci. Hlavní přirozenou funkcí HLA-B27 je prezentace endogenních (tj. intracelulárních) peptidů T-lymfocytům, převážně T lymfocytárnímu receptoru pro antigen (TCR) cytotoxických T-lymfocytů. HLA-B27 je silně spojena s AS a dalšími přidruženými zánětlivými onemocněními, jako je psoriatická artritida, zánětlivé onemocnění střev a reaktivní artritida. (Bowness, 2015) Mechanismus, jakým HLA-B27 způsobuje onemocnění, není znám. HLA-B27 může CD 8 pozitivním T lymfocytům předkládat artritogenní peptidy, ale B27 může také nabývat aberantních forem jak v endoplazmatickém retikulu, tak na povrchu buněk, přičemž obě tyto formy mohou stimulovat zánět. (de Castro, 2007)

4.4 Patofyziologie

Spojení HLA-B27 s ankylozující spondylitidou, chronickým zánětlivým onemocněním axiálního skeletu, a dalšími spondyloartropatiemi patří mezi nejsilnější spojení antigenu MHC s jakýmkoli onemocněním. Přesto zůstává základ této asociace neznámý. Jsou známé tři hlavní hypotézy týkající se patogenetické role HLA-B27. Zaměřují se na tři molekulární vlastnosti této molekuly: (1) její peptidovou specifitu, (2) pomalé skládání a tendenci k chybnému skládání a (3) schopnost tvořit kovalentní homodimery těžkých řetězců, které jsou schopny rozpoznávání leukocytárními receptory. (de Castro, 2007) Na základě peptidové specifity by spondyloartropatie byly vyvolány autoimunitou T-buněk proti vlastnímu ligandu HLA-B27 vyvolanému zkříženě reagujícím cizím antigenem. Chybné složení HLA-B27 by vyvolalo onemocnění aktivací zánětlivých drah po indukci stresu endoplazmatického retikula, tedy nezávisle na prezentaci antigenu. (Brown et al., 2016) Rozpoznávání homodimerů těžkých řetězců receptory

leukocytů by se mohlo podílet na onemocnění prostřednictvím imunomodulace vrozených i adaptivních odpovědí na artritogenní patogeny. Žádná z těchto hypotéz zatím nedokáže uspokojivě vysvětlit patogenezi spondyloartritid. Předpokládá se, že patogenetická role HLA-B27 bude nakonec vysvětlena prostřednictvím globálního pochopení její biologie, v němž se předpokládá, že různé vlastnosti této molekuly jsou vzájemně závislé na svém příspěvku k onemocnění. (de Castro, 2007)

4.4.1 Prezentace artritogenních peptidů

Po zjištění, že imunologickou funkcí molekul MHC I. třídy je vázat peptidy pocházející z intracelulárních proteinů, bylo navrženo, že spondyloartritida může být způsobena tím, že HLA-B27 váže peptid pocházející z mikroorganismu a vyvolává odpověď CD8 pozitivních T lymfocytů zkříženě reagující s kombinací B27/peptidu. Dále prokázali, že HLA-B27 je schopna vázat peptidy na povrchu buněk. Tento proces nyní často nazýváme molekulární mimikry, ačkoli, což je poněkud matoucí, termín molekulární mimikry byl dříve zaveden v souvislosti s B27 k popisu procesu, kdy patogenní faktor modifikoval B27 tak, aby se stal antigenním a vyvolal odpověď autoprotilátek. (Schittenhelm et al., 2015)

4.4.2 Exprese volných forem těžkého řetězce HLA-B27, včetně homodimerů, na povrchu buněk a jejich rozpoznávání imunoreceptory rodiny NK

Schopnost HLA-B27 tvořit homodimery bez $\beta 2m$, s disulfidovou vazbou Cys67 (B272) byla poprvé pozorována při přetvoření rekombinantního HLA-B27 *in vitro*. Několik forem volného těžkého řetězce B27 (FHC), včetně B272, je také exprimováno na povrchu buněk po endozomální recyklaci heterotrimerů. Schopnost B27 vytvářet disulfidové vazby prostřednictvím nepárového cysteinu v poloze 67 je pro molekuly HLA 1. třídy velmi neobvyklá a důležitá pro expresi homodimerů na povrchu buněk, ačkoli bylo prokázáno, že B27 i další alotypy HLA jsou za vhodných podmínek schopny homodimerizace, přičemž byla prokázána úloha jiných cysteinových zbytků. B272 a FHC se na povrchu buněk vážou na receptory vrozené imunity na T-lymfocytech, NK a myeloidních buňkách. (Kollnberger, 2016) Patří mezi ně receptory zabijáckých imunoglobulinů KIR3DL1, KIR3DL2 a LILRB2 u lidí a párové imunoglobulinové receptory (PIR) hlodavců. Specifičnost vazby B272 a B27 FHC pro tyto receptory se liší od specifičnosti heterotrimerních komplexů HLA-B27, které sice vážou KIR3DL1 a LILRB2, ale jsou také ligandy pro LILRB1, ale nevážou KIR3DL2

s významnou afinitou. Kromě toho se B27 a FHC vážou s vyšší afinitou než jiné ligandy jak na LILRB2, tak na KIR3DL2. Interakce KIR3DL2/B27 může mít prozánětlivé účinky na NK i T lymfocyty a je spojena s fenotypem Th17 u AS. (Chen et al., 2017)

4.4.3 HLA-B27, reakce na nesložené proteiny a reakce endoplazmatického retikula na stres

HLA-B27 je schopen vyvolat zánětlivou stresovou reakci ER, alternativní důkazy však tento mechanismus vyvracejí jako důležitý patologický mechanismus při vzniku spondyloartritidy. Ve studiích na transgenním modelu B27 u potkanů tak vnesení dalších kopií lidského genu $\beta 2m$ snížilo chybné skládání B27 a kolitidu, zatímco zvýšilo výskyt a závažnost artritidy. Studie tkání pacientů s AS přesvědčivě neprokázaly přítomnost stresu ER v souvislosti se zánětem, s výjimkou jedné studie, která prokázala zvýšenou regulaci GRP78 v periferních kloubech pacientů s AS. (Antoniou et al., 2019)

HLA-B27 je tedy schopen nesprávného skládání ER a stimulace stresu ER a reakcí na nesložené proteiny *in vitro* a na zvířecích modelech. V současné době je však pro to poměrně málo přímých důkazů u lidské spondyloartritidy. (Navid & Colbert, 2017)

4.5 Klinický obraz

Onemocnění AS se projeví nejčastěji bolestí a ztuhlostí páteře, hrudníku, či kloubů horních a dolních končetin. Bolest zas potká každého člověka alespoň jednou za život, ale při AS se tato bolest liší. Potíže se zády se objevují již v brzkém věku, a to již v mládí nebo rané dospělosti. Nejčastějším projevem bolesti zad je v oblasti dolních zad a směřuje až k bolesti hýždí. Ranní ztuhlost, která je přítomna u tohoto onemocnění, může trvat různě dlouhou dobu, a to třeba i více než dvě hodiny. (Pavelka et al., 2018) Postupně vyvíjející změny na páteři vykazují změnu na postoji a pohyblivosti nemocného. Změnami se rozumí srůstání obratlů, což vede k ohýbání páteře dopředu a vyvinutí hyperkyfózy. Problém v dlouhodobém trvání nemoci je, že člověk není schopný v předklonu sebrat předmět. Srostlá páteř tedy je schopná bránit v otáčení, uklánění nebo zaklánění. (Levitová & Hušáková, 2018)

Veškeré klouby mohou být zasaženy zánětem, ale bývá tomu tak nejčastěji u kloubů dolních končetin. Postižené bývají zejména kyčelní klouby, kde může dojít k novotvorbě kosti, zužování kloubní štěrbin, což může vést k jejímu úplnému zániku.

Projevem zánětu kyčelního kloubu je bolest v třísele a může se šířit až na vnitřní stranu stehna. Při neléčené AS dochází k omezení hybnosti, kdy ohnutí a natažení kyčle je stále těžší. Svaly, které se vyskytují okolo kyčle chabnou a zkracují se, což má za následek porušený stoj s pokrčenými dolními končetinami, a proto tito lidé mají obtížnou a namáhavou chůzi. (Calabro et al., 2012)

Když se posuneme o kus dále na dolní končetině, AS se může projevit i zánětem kolenního kloubu, který bývá provázen bolestí a otokem. Při pohmatu lze nahmatat rezistenci v podkolenní jamce, kdy se jedná výčlipku synovie oteklého kloubu. Okolní svaly se stejně jako u kyčelního kloubu mohou zkrátit a oslabit. Výsledek je podobný jako u zánětu kyčelního kloubu. Dochází ke kulhání a obtížím při chůzi. Stejně tak se mohou objevit i záněty v hleznech a drobných kloubech nohy. Často bývají přítomny problémy při chůzi, které jsme schopni pozorovat v bolestivém došlápnutí. (Asim Khan, 2023) Na horní končetině se AS projevuje méně často. Když se však zde projeví, je to v ramenním kloubu. U ramene pociťuje pacient bolest jak v klidu, tak i na pohmat. Rameno je většinou oteklé a pohyb bývá omezený. (Braun & Sieper, 2011)

Dalším projevem bývá bolest v oblasti hrudníku. Jsou velmi nepříjemné a objevují se na přední straně hrudníku v rozpoložení, kde se žebra spojují s hrudní kostí. Potíže se vyvíjí postupně, ale bolest může nemocný pociťovat jak v klidu, tak při jemném dotyku, anebo i při kašli. (Braun & Sieper, 2011)

4.5.1 *Mimokloubní projevy*

Při AS můžeme narazit na řadu mimokloubních projevů. Vzhledem k tomuto zánětlivému onemocnění je časté, že nemocní pociťují únavu a mohou mít potíže se spánkem a změnami nálady. Jsou více citliví ke střevním a pohlavním infekcím. (Levitová & Hušáková, 2018)

Velmi častý projev mimokloubního projevu je zánět duhovky, přesněji přední uveitida. Vyskytuje se až u 40 % nemocných. Projev uveitidy je zarudnutí a bolest oka. Následkem toho bývá zhoršené vidění a nesnášenlivost světla. (Braun & Sieper, 2011)

Dalším méně častým projevem je lupenka neboli psoriáza, která se může rozvinout u 10 % trpících AS. Jsou přítomny změny na kůži, ale i na nehtech i ploskách nohou. (Asim Khan, 2023) Avšak nejčastějším mimokloubním projevem bývají zánětlivé změny střeva, které se objevují až u 50 % nemocných. Ale celkový obraz Crohnovy

choroby a ulcerózní kolitidy se rozvine jen u poloviny. Nejčastějšími příznaky je průjem a ubývání na váze. Nemocní si musí dát pozor na průjem s příměsí krve, který může být náznakem vyvinutí závažného stavu. Dochází pak ke změnám vnitřního prostředí organismu, které mohou nebezpečně pacientovu zdraví. (Levitová & Hušáková, 2018)

Jsou známy i vzácné mimokloubní projevy jako postižení srdce, ledvin, plic a neurologické obtíže. Postižení srdce se může projevit zánětem aorty, zánětem srdečního svalu a poruchou srdečních chlopní. Můžeme tak pozorovat bolest na hrudník, zadýchávání a sníženou toleranci zátěže. Mohou být přítomny i poruchy srdečního rytmu. Infarkt myokardu se objevuje 4krát častěji u nemocných s AS než u zdravých lidí. (Asim Khan, 2023)

4.6 Kritéria diagnostiky

Diagnostická a klasifikační kritéria pro AS se zaměřují na rentgenové nálezy sakroileitidy, což jsou kostní eroze, skleróza nebo změny v kloubní štěrbině. Tato onemocnění jsou důsledkem dlouhodobého zánětu, a proto je důležité je identifikovat co nejdříve. První klasifikační kritéria AS byla vypracována na základě rentgenových změn, a to již v 60. 20. stol. (Tabulka 3) (Šenolt, 2011)

Tabulka 3, Rentgenová stádia podle strukturálních změn sakroiliakálního kloubu

0. stádium	Normální nález
1. stádium	Neurčitě změny
2. stádium	Minimální abnormality (eroze, skleróza) nepostihující šíři kloubní štěrbin
3. stádium	Definitivní sakroileitida s rozšířením nebo zúžením kloubní štěrbin
4. stádium	Kompletní ankylóza v kloubu

Zdroj: (Šenolt, 2011)

Modifikována byla v roce 1984 v New Yorku. (Tabulka 4) New yorská klasifikační kritéria vyžadují splnění nejméně jednoho klinického příznaku choroby a RTG průkaz sakroileitidy. (Levitová & Hušáková, 2018)

Tabulka 4, Průkaz pokročilého stádia nemoci

Klasifikační kritéria	Rentgenové kritérium
Bolest a ztuhlost dolních zad trvajících déle než 3 měsíce, která se zlepšuje cvičením, ale ne v klidu	Sakroileitida stádia ≥ 2 bilaterálně nebo 3-4 unilaterálně
Omezená hybnost bederní páteře ve frontální a sagitální rovině	
Omezená expanze hrudníku	
Definitivní diagnóza ankylozující spondylitidy zahrnuje rentgenové kritérium + alespoň 1 klinické kritérium	

Zdroj: (Levitová & Hušáková, 2018)

Původní kritéria zahrnovala rentgenové změny, ale vzhledem k potřebě časně diagnózy se nyní upřednostňuje MRI, které dokáže detekovat i počáteční stadia onemocnění. (Levitová & Hušáková, 2018)

Nová diagnostická kritéria kombinují pozitivitu antigenu HLA-B27 a nálezy sakroileitidy na MRI. Taková kombinace umožňuje identifikaci pacientů s axiální spondylartritidou v rané fázi. Klinické příznaky, jako je zánětlivá bolest zad, enteazitida, artritida atd., dále podporují diagnózu. Tyto nová kritéria nezastupují původní diagnostická, ale poskytují nástroj k detekci onemocnění v časných stadiích a zahájení vhodné léčby u pacientů s vážným průběhem onemocnění. (Šenolt, 2011)

4.7 Diagnostika

Diagnostikovat AS není vždy jednoduché, jelikož obtíže jako bolest zad, kloubů a různé záněty např. očí nejsou přímo specifické. V případě opakovaných potíží lékař začíná s klinickým vyšetřením, které se poté doplňuje o zobrazovací metody a laboratorní vyšetření. (Levitová & Hušáková, 2018)

4.7.1 Klinické vyšetření

Lékař začíná rozhovorem s pacientem, kdy zjišťuje rodinnou, osobní, gynekologickou, pracovní, sociální a farmakologickou anamnézu. V tomto pohovoru lékař zjišťuje také odkdy se začali projevovat příznaky AS a zda se zdravotní stav pacienta zlepšil či zhoršil. Tento rozhovor je důležitý k vyloučení jiných revmatických onemocnění a jiných příčin pacientových obtíží. Lékař dále pokračuje vyšetřením pohybového

aparátu. Při těchto vyšetřeních se lékař zaměřuje na rozvíjení páteře ve třech rovinách, sakroiliakální klouby a expanzi hrudníku.

Jedná se o vyšetření jako je např. Vyšetření axiální pohyblivosti, Mennelův manévr, Schoberova vzdálenost, Forestierova fleche, lateroflexe a expanze hrudníku. Podrobněji jsem popsal vyšetření axiální pohyblivosti a expanze hrudníku. (McVeigh et al., 2006)

Vyšetření axiální pohyblivosti

K tomuto vyšetření se používá index BASMI (Bath Ankylosing Spondylitis Metrology Index). Jedná se rychlý a jednoduchý způsob, přičemž pro výpočet se používá výpočet desetibodového skóre. Čím vyšší je skóre, tím vyšší je poškození. U BASMI využíváme měření 5 klinických parametrů, které odrážejí axiální pohyblivost. Prvním parametrem je měření vzdálenosti *tragus* (výběžku na uchu) ke stěně, přičemž je pacient opřen hlavou o stěnu.

Druhým parametrem je rotace krční páteře. Třetím je pohyblivost bederní páteře do předklonu, kdy se jedná o tzv. modifikovanou Schoberovu distanci. Čtvrtým klinickým parametrem jsou úklony bederní páteře, tedy lateroflexe. Pátým je maximální vzdálenost mezi vnitřními kotníky při unožení tzv. maximální intermaleolární distance. (Češka, 2010)

Expanze hrudníku

Fyzikální vyšetření expanze hrudníku je důležitou součástí klinického hodnocení plicní funkce a respiračních problémů. Během tohoto vyšetření lékař nebo zdravotník pozoruje a hodnotí schopnost pacienta rozšiřovat hrudník při nádechu a stahovat ho při výdechu. Zde je několik klíčových bodů, které jsou běžně sledovány: symetrie expanze, rozsah expanze, hloubka dechu, frekvence dechu a přítomnost případných anomálií. Expanze hrudníku by měl minimálně měřit 5 cm. (Haladová & Nechvátalová, 2010)

4.7.2 Zobrazovací metody

Jsou prováděny za účelem potvrzení patologie pohybového systému na kostech a kloubech.

RTG

Princip RTG popsán výše. Při podezření na AS se provádí RTG páteře a SI skloubení. Jednotlivé patologické změny se objevují díky probíhajícímu zánětu. Změny, po kterých se pátrá, jsou srůsty obratlů jinak známých jako syndesmofyty. Když jsou při klinickém vyšetření nalezeny i změny horních a dolních končetinách je proveden i RTG končetin. Z preventivního hlediska se provádí i RTG plic, které by mohl souviset s AS anebo později ovlivňovat léčbu. (Malíková, 2022)

SONO

Sonografické vyšetření využívá ultrazvuku k vizualizaci vnitřních orgánů a tkání těla. Jedná se o neinvazivní metodu, která nepotřebuje žádnou speciální přípravu. Při tomto vyšetření se využívá sondy, která vysílá ultrazvukové vlny. Ultrazvuk prochází tkáněmi a odráží se od různých struktur v těle. Návrat odražených vln je zachycen senzory v sondě a zpracován do obrazu na monitoru. (Janík, 2011)

U AS se provádí v případě, že klouby nebo úpony šlach ke kostem jsou bolestivé, ale není prokázán otok kloubu. SONO prokazuje, zda je zánět přítomen ve zkoumané tkáni. (Janík, 2011)

Magnetická rezonance

MRI (Magnetic Resonance Imaging) je pokročilá diagnostická metoda v medicíně, která vytváří detailní obrazy vnitřních struktur těla pomocí silného magnetického pole a radiových vln. Princip MRI je založen na umístění pacienta do silného magnetického pole, kde je vystaven krátkým impulzům radiových vln. Atomová jádra vodíku v těle reagují a vysílají signály. Tyto signály jsou zachyceny anténou v MRI zařízení a zpracovány do obrazů pomocí počítače. Díky tomu lze vytvořit podrobné až vrstevnaté obrazy vnitřních struktur těla, které lékaři používají k diagnostice a sledování onemocnění. (Navrátil & Rosina, 2005)

MRI je u AS používána, pokud na RTG nejsou zobrazeny typické zánětlivé změny. Nejčastěji se provádí vyšetření SI skloubení, ale může být použito i ke zobrazení páteře, aby se vyloučili jiné příčiny bolesti zad. (Navrátil & Rosina, 2005)

4.7.3 Laboratorní metody

Biochemické a hematologické metody

CRP, FW – Při podezření na AS se v první řadě provádí stanovení nespecifických zánětlivých parametrů CRP a FW. CRP parametr se označuje jako zvýšený, když dosáhne hodnoty vyšší než 5 mg/l. U FW je důležité zohlednit věk nemocného, protože s vyšším věkem se sedimentace zrychluje. Jelikož se jedná o nespecifické markery, je důležité zmínit, že tyto parametry nejsou zvýšené jen u AS, ale i u jiných infekčních onemocněních. (Racek, 2006)

Imunologické metody

Průtoková cytometrie – Můžeme použít stejně jako u RA provést stanovení HLA-B27 antigenu pomocí imunologické metody průtokové cytometrie. Stanovení je založeno na expresi antigenu HLA-B27 monoklonálními protilátkami. V případě, že je test pozitivní, provádí se test zkřížené reaktivity pomocí HLA-B7. Materiálem na vyšetření je nesrážlivá krev, kde antikoagulačním činidlem je EDTA nebo heparin. (Hořejší & Bartůňková, 2009)

Genetické vyšetření

HLA-B27 – Genetické vyšetření HLA-B27 není běžné, ale je možné. Nejčastěji používaná metoda ke genetickému vyšetření přítomnosti alely HLA-B27 je real-time PCR. (Dorak, 2007)

4.8 Léčba

AS je vážné onemocnění, které není možné zcela vyléčit. Léčba spočívá v kombinaci farmakologických a nefarmakologických metod, přičemž klíčový je aktivní přístup pacienta, který zahrnuje pravidelné cvičení a dlouhodobou rehabilitaci. Důležité je zahájit léčbu co nejdříve, aby se maximalizovaly výsledky a zpomalil se vývoj onemocnění. (Levitová & Hušáková, 2018)

Pacienti často hledají jednotnou léčbu pro AS, ale je nutné přistupovat k terapii individuálně podle konkrétních příznaků a jejich závažnosti, typu postižení (axiální nebo periferní), přítomnosti entezitid a dalších příznaků mimo klouby. Je důležité také zohlednit věk, pohlaví a další přidružená onemocnění pacienta. (Šenolt, 2011)

4.8.1 Farmakologická léčba

Pokud jde o léčbu léky, používané skupiny léčiv slouží k potlačení zánětlivých reakcí v organismu, potlačení přehnané imunitní odpovědi proti vlastním tkáním a zpomalení progresu AS. Tyto základní skupiny léčiv zahrnují nesteroidní antirevmatika (NSA), imunosupresiva a kortikosteroidy. Specifický výběr léků a jejich dávkování je individuální a závisí na zdravotním stavu každého pacienta. Léky jsou pravidelně upravovány na základě výsledků pravidelných kontrol a konzultací s ošetřujícím lékařem. (Ramiro et al., 2023)

4.8.2 Biologická léčba

V současné době je biologická léčba pomocí inhibitorů tumor nekrotizujícího faktoru- α (TNF- α) významně rozvíjena. Tato léčba zahrnuje použití několika různých přípravků, jako jsou infliximab a etanercept, které cíleně potlačují abnormální imunitní reakci, což je hlavní příčina AS. Pro nasazení této léčby musí pacient splňovat určitá kritéria. (Xie et al., 2021)

Biologická léčba může významně zmírnit jednotlivé příznaky AS a zpomalit postup onemocnění, což vede k návratu pacienta do normálního života bez neustálé bolesti. Navíc minimalizuje výskyt nežádoucích účinků, které jsou obvyklé u některých jiných léků, jako jsou imunosupresiva. Efektivitu této terapie je však nutné pravidelně sledovat. Mezi výhody biologické léčby patří rychlý nástup účinků, cílené působení a prokazatelně pozitivní výsledky, které mohou zastavit nebo alespoň zpomalit progresi onemocnění. Nevýhodou je omezená dostupnost této léčby. (Jang et al., 2021)

Kromě inhibitorů TNF- α se také studuje a využívá biologická léčba cílená na inhibici interleukinu-17 (IL-17), který hraje roli v patogenezi AS. Tyto léky také nabízejí novou naději v léčbě tohoto onemocnění. (Xie et al., 2021)

4.8.3 Rázová vlna

Léčba pomocí rázové vlny sice není schopná zastavit ani zpomalit průběh onemocnění, ale může poskytnout pacientům částečnou úlevu od bolesti. Během této terapie jsou na postižené místo aplikovány speciální hlavice generátoru vysokotlakých impulzů. Tyto impulzy jsou krátké a intenzivní, což umožňuje rozrušení a rozpuštění vápenatých

usazenin v měkkých tkáních a zlepšení prokrvení v dané oblasti. Tím dochází ke snížení napětí a zmírnění bolesti. (Šenolt, 2011)

4.8.4 Fyzioterapie

Kromě klasické léčby je důležité začlenit pravidelnou rehabilitaci a fyzikální terapii do léčebného plánu, které by měly být dlouhodobě a ideálně denně součástí života pacienta. Doporučení lékaře či fyzioterapeuta by mělo být vždy dodržováno, aby byl rehabilitační program zaměřen na konkrétní obtíže a dosahoval co nejlepších výsledků. (Sharan & Rajkumar, 2017)

Kromě rehabilitace mohou být také pro zmírnění obtíží užitečné profesionálně provedené masáže a dechová cvičení, která mohou být doplněna tréninkem správného držení těla a udržování flexibility. Důležité je také, aby pacient při usínání zaujímal správnou polohu. Cvičení ve vodě je další užitečnou doplňkovou terapií, která pomáhá uvolnit napětí a zlepšit pohybový rozsah. (Dagfinrud et al., 2004)

4.8.5 Chirurgická léčba

Chirurgická léčba AS není běžnou praxí a obvykle se používá pouze v případech závažných komplikací, jako jsou deformity páteře nebo selhání kloubů, které způsobují výrazné bolesti nebo omezení pohybu. Chirurgická léčba při AS je invazivní a může nést rizika a komplikace. Možností chirurgické léčby je oprava deformit páteře, což může zahrnovat použití ocelových tyčí, šroubů, či drátů, aby se páteř stala stabilní a byla ukotvena v požadované poloze. Další možností léčby je náhrada kloubu. Pokud AS se rozvine již v mladém věku, je možné předpokládat, že totální náhrada bude potřeba. Jedná se většinou o kyčelní a kolenní klouby. (Levitová & Hušáková, 2018)

5 Cíle práce

- 1) Teoretický přehled revmatických chorob
- 2) Detekce vybraných typů revmatických chorob prostřednictvím geneticky molekulárních metod
- 3) Vyhodnocení výsledků

6 Metodika práce

Metodická část této bakalářské práce probíhala v prostorách laboratoří Zdravotně sociální fakulty, Fakulty zemědělské a technologické Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a laboratoří GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích. Na fakultách Jihočeské univerzity jsem pracoval pod odborným dohledem Ing. Anety Zlámalové. V laboratoří GENLABS jsem pracoval pod odborným dohledem Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. jako konzultanta. Před zahájením praktických částí ve všech laboratořích jsem byl seznámen s vnitřním řádem laboratoří a BOZP. Během laboratorních prací jsem používal ochranné pomůcky a postupoval jsem podle pracovních postupů dodaných ke komerčním soupravám a dle pokynů vedoucí práce.

Cílem praktické práce bylo detekovat vybraný typ revmatické choroby pomocí metod molekulární biologie. Vybraným typem revmatické choroby byla ankylozující spondylitida, více známá jako Bechtěrevova choroba. U tohoto onemocnění se pomocí metod molekulární biologie detekuje predispoziční alela HLA-B27. V průběhu metodické části jsem prováděl izolaci DNA z bukalních stěrů a periferní krve. V další části jsem prováděl měření koncentrací izolované DNA, po kterém jsem pokročil k samotnému měření real-time PCR. Pro komparaci výsledků měření real-time PCR jsem provedl druhé měření pomocí real-time PCR od jiné firmy, Druhou komparaci jsem provedl pomocí měření koncentrací spolu s nečistotami na lepším a spolehlivějším přístroji.

6.1 Vyšetřování probandů

Probandi, kteří se zúčastnili tohoto měření podepsali Informovaný souhlas s vyšetřením vlastní DNA pro následný výzkum Ústavu laboratorní diagnostiky a veřejného zdraví – „Diagnostika revmatických chorob pomocí metod molekulární biologie“ konkrétně pro Bechtěrevovu chorobu a Informovaný souhlas probanda o výsledcích měření. Zúčastněných bylo 23 probandů (Tabulka 5). Součástí vyšetřovaných probandů byli probandi, kteří byli diagnostikováni AS v klinickém zařízení, probandi s predispozičními znaky pro AS a zdraví jedinci. Byla zastoupena obě pohlaví a různé věkové kategorie. Část probandů byla odebrána pomocí bukalního stěru. Bukální stěr si probandi prováděli sami, přičemž byli poučeni o technice odběru a o chování před odběrem bukalního stěru. Rizikové chování před odběrem bukalního stěru je jezení, pití a kouření méně než hodinu před samotným odběrem. U druhé části probandů byla

vzorkem periferní krev. Odebrání byli v prostorách laboratoří Zdravotně sociální fakulty Jihočeské univerzity odborným pracovníkem.

Tabulka 5, Přehled probandů

Proband	Pohlaví	věk	Vzorek	Diagnóza
1	Muž	68	BS	AS
2	Muž	68	BS	AS
3	Žena	62	BS	AS
4	Muž	52	BS	AS
5	Muž	66	BS	AS
6	Muž	67	BS	AS
7	Žena	25	PK	PZ
8	Muž	23	PK	PZ
9	Muž	33	PK	PZ
10	Žena	49	PK	ZJ
11	Muž	38	PK	PZ
12	Muž	53	PK	ZJ
13	Žena	67	PK	ZJ
14	Muž	67	PK	ZJ
15	Muž	47	PK	PZ
16	Žena	27	PK	PZ
17	Muž	24	BS	PZ
18	Muž	22	BS	ZJ
19	Žena	22	BS	ZJ
20	Muž	27	BS	PZ
21	Žena	50	BS	AS
22	Muž	56	BS	ZJ
23	Žena	39	PK	PZ

Zdroj: Vlastní

Legenda: BS – bukální stěr, PK – periferní krev, AS – ankylozující spondylitida, PZ – predispoziční znaky, ZJ – zdraví jedinec

Každý odebraný vzorek byl řádně označen číslem. V případě vzorků periferní krve byly použity vakuové zkumavky obsahující antikoagulační činidlo K3 EDTA a byly navíc označeny podpisem odebírajícího. Vzorky se uchovávali při transportu v chladničkové teplotě 4°C. Poté byly uloženy do chladničky, kde byla stabilní teplota také 4°C.

6.2 Izolace DNA

Izolace DNA byla prováděna z bukálních stěrů a periferní krve. Pro oba typy vzorků byl použit komerčně vyráběná izolační souprava od firmy Generi biotech „Kit for isolation

of DNA from body fluids“. Tento kit obsahoval pytlík se sběrnými zkumavkami, pytlík s kolonkami a reagentie: Buffer BL1, Buffer BL2, Wash Buffer BL3, Elution Buffer BL4, Proteinase K a Proteinase K Buffer (PKB). V první půli vzorků (1-16) jsem používal již načatý izolační kit. V druhé půli vzorků (17-23) jsem použil kit nový. Oba izolační kity byly od firmy Generi biotech.

Dříve než byla zahájena izolace jednotlivých vzorků, musel jsem si připravit reagentie. Jako první jsem si musel připravit Wash Buffer BL3, do kterého jsem přidal 48 ml 96% ethanolu. Připravený roztok jsem potom promíchal a označil, že byl připraven k použití. Druhou reagentií, kterou jsem si připravil, byla Proteinase K. Proteinase K je dodávána v lyofilizované formě, kterou jsem musel rekonstituovat přidáním 1,35 ml pufru PKB. Po přidání jsem roztok řádně promíchal a označil tak, aby bylo zřejmé, že je připraven k použití. Třetí připravovanou reagentií byl Elution Buffer BL4, který musel být přehřátý na 70 °C. Proto jsem si nastavil blokový termostat na 70 °C a vložil jsem do něho Elution Buffer BL4.

Dalším krokem přípravy před izolací bylo nachystat si stojan pro zkumavky s odběrovým materiálem a řádně označit jednotlivé vzorky čísly 1-23. Pro každý vzorek z bukálního stěru jsem si připravil 3 zkumavky o objemu 1,5 ml (nebyly součástí kitu), 2 sběrné zkumavky a 1 kolonku. Pro vzorky k izolaci z periferní krve jsem si připravil 2 zkumavky o objemu 1,5 ml (nebyly součástí kitu), 2 sběrné zkumavky a 1 kolonku. Všechny připravené zkumavky jsem si označil čísly příslušných vzorků.

6.2.1 Izolace DNA z bukálního stěru sliznice

Do 1,5 ml zkumavek jsem odstříhl vzorek bukálního stěru, ke kterému jsem následně přidal 200 µl deionizované vody, 200 µl Buffer BL1 a 25 µl Proteinasy K. Poté jsem každý jednotlivý vzorek vortexoval po dobu 20 sekund. Po promíchání jsem vzorky vložil do blokového termostatu přehřátého na 70°C. Zde jsem vzorky inkuboval 15 minut. Po uplynutí této doby jsem vzorky vyndal z blokového termostatu, a ještě před otevřením jsem je krátce promíchal na vortexu a stočil v centrifuze. Pro ukončení první fáze izolace z bukálního stěru jsem pomocí automatické pipety odpipetoval 1,5 ml vzorku a přenesl ho do jiné 2 ml zkumavky. Stěrový materiál se zkumavkou jsem vyhodil.

Dále jsem přidal 210 µl 96 % ethanolu do každého vzorku pomocí automatické pipety. Po přidání ethanolu jsem vzorky promíchal na vortexu a krátce stočil v centrifuze.

Poté jsem postoupil ke třetímu kroku samotné izolace. Tímto třetím krokem jsem navazoval DNA. Na každou připravenou kolonku, které byly umístěny ve sběrných zkumavkách, jsem odpipetoval 600 µl vzorku. Poté jsem vzorky vložil do centrifugy a stočil po dobu 1 minuty při 11 000 rpm/min. Po stočení vzorků jsem sběrnou zkumavku s filtrátem odstranil a kolonky jsem vložil do nových připravených sběrných zkumavek.

Pokračováním izolace byl promývací krok, při kterém jsem na každou kolonku napipetoval 500 µl Buffer BL2. Poté jsem vzorky dal znovu do centrifugy a stočil 1 minutu při 11 000 rpm/min. Po stočení jsem tekutinu ze sběrných zkumavek vylil a kolonky vložil zpět do sběrných zkumavek. Dále došlo k druhému promývacímu kroku pomocí Wash Buffer BL3. Napipetoval jsem 600 µl Wash Buffer BL3 na každou jednotlivou kolonku. Poté jsem vzorky znovu centrifugoval, avšak po dobu 2 minut při 11 000 rpm/min. Po centrifugaci jsem sběrné zkumavky s filtry vyhodil a kolonky vložil do připravených a označených 2 ml zkumavek.

Pro ukončení izolace následoval krok eluční, při kterém jsem na každý střed kolonky napipetoval 100 µl předehřátého Buffer BL4 na 70°C. Pokračoval jsem inkubací po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě. Po inkubaci jsem vzorky vložil do centrifugy a stočil je po dobu 1 minuty při 11 000 rpm/min. Posledním krokem bylo odstranění izolačních kolonek, po kterém mi zbyla ve zkumavkách čistá izolovaná genomová DNA připravená pro další použití.

6.2.2 Izolace DNA z periferní krve

Před samotnou izolací DNA z periferní krve jsem odebraný materiál ve zkumavkách dal promíchat na válivou třepačku po dobu 10 minut a nechal jsem vzorky vytemperovat na laboratorní teplotu. Po vytemperování a dostatečném promíchání jsem odpipetoval od každého vzorku 200 µl a přemístil do jednotlivých označených 2 ml zkumavek.

Prvním krokem izolace DNA z periferní krve bylo, že ke každému 200 µl vzorku krve ve 2 ml zkumavce jsem přidal pomocí automatické pipety 25 µl Proteinasy K a 200 µl Buffer BL1. Poté jsem postupoval stejně jako u izolace z bukalního stěru.

6.2.3 Měření koncentrace DNA

Vzorky, které jsem vyizoloval tak, aby obsahovaly čistou genomovou DNA jsem změřil na spektrofotometru Colibri v prostorech laboratoří Zdravotně sociální fakulty. (Tabulka 6)

Tabulka 6, Měření koncentrací izolovaných vzorků

Vzorky	Koncentrace DNA (ng/μl)
1	48,93
2	37,54
3	17,VI
4	41,03
5	38,68
6	35,24
7	29,74
8	35,09
9	13,74
10	42,84
11	65,31
12	30,56
13	44,24
14	57,86
15	23,33
16	32,18
17	47,98
18	52,65
19	61,37
20	88,12
21	81,34
22	32,19
23	120,84

Zdroj: Vlastní

6.3 Real-time PCR

K detekci jsem využil metodu real-time PCR. Použil jsem komerční kit gb GENETIC HLA-B27 od společnosti Generi biotech. Tento kit umožňuje detekci alely HLA-B27 v genomové DNA. Vyšetření je založeno na principu specifické amplifikace alely

HLA-B27. Přítomnost haplotypu B27 lidského leukocytárního antigenu, protože je silně asociována s AS. Tato izolační souprava obsahovala reagentie pro 25 reakcí.

Assay qPCR byla v této soupravě směs amplifikačních primerů, fluorescenčně značených sond specifických k HLA-B27 a genu POLR2A jako interní pozitivní kontrole, pufru, nukleotidů a polymerázy. Assay obsahovala specifické sondy pro detekované sekvence. Pro detekci alel ze skupiny B27 byla sonda značena fluorochromem FAM ($\lambda_{\text{EXCITACE}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EMISE}} = 520 \text{ nm}$) a sonda pro interní pozitivní kontrolu fluorochromem HEX ($\lambda_{\text{EXCITACE}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EMISE}} = 556 \text{ nm}$).

Standardy sloužily jako pozitivní a negativní kontroly k ověření validity analýzy a nastavení parametrů k vyhodnocení. Standard NEG představoval alelu HLA-B44, zatímco Standard POS představoval alelu HLA-B27. (Tabulka 7)

Tabulka 7, Složení a popis komponent soupravy gb GENETIC HLA-B27

Komponenta	Objem (ml)	Koncentrace
Assay qPCR HLA-B27	0,4	1,25x
Standard NEG HLA-B44	0,2	5×10^3 kopií/ μl
Standard POS HLA-B27	0,2	5×10^3 kopií/ μl
Deionizovaná voda	1	

Zdroj: Vlastní

Pracovní postup přípravy vzorků pro detekci začal přípravou mikrotitrační destičky, automatické pipety, špiček s filtrem a označených vzorků spolu s reagentiemi, které jsem nechal rozmrznout a vytemperovat na laboratorní teplotu. Po rozmrznutí a vytemperování reagentií a vzorků jsem je promíchal na vortexu a krátce stočil v centrifuze. Detekční assay jsem rozpipetoval po 16 μl do jamek mikrotitrační destičky. Do první jamky jsem napipetoval pozitivní kontrolu a do druhé jsem napipetoval negativní kontrolu, přičemž oba objemy pipetovaných kontrol byly 4 μl . Do dalších jamek obsahující assay jsem přidal po 4 μl jednotlivých vzorků, aby konečný objem byl 20 μl . Na mikrotitrační destičku jsem důkladně nalepil folii k uzavření vzorků v jamkách a krátce jsem mikrotitrační destičku stočil v centrifuze.

Po vyjmutí mikrotitrační destičky z centrifugy jsem destičku vložil do cycleru QuantStudio 6 Flex Real Time PCR System od společnosti Applied biosystems. Na tomto přístroji jsem nastavil teplotní profil (Tabulka 8). Pro snímání fluorescence jsem nastavil kanály FAM a HEX. Po nastavování jsem spustil měření.

Tabulka 8, Nastavení reakčních profilů gb GENETIC HLA-B27

Fáze	Teplota	čas	Cykly
Počáteční denaturace	95 °C	180 s	1x
Denaturace	95 °C	10 s	50x
Annealing + elongace (+snímání fluorescence)	60 °C	20 s	

Zdroj: Vlastní

Po ukončení měření jsem analyzoval výsledky. Nastavil jsem si treshold pro kanály FAM a HEX. Pro alelu HLA-B27 jsem odečítal treshold hodnoty v kanálu FAM a treshold hodnoty pro gen POLR2A v kanálu HEX. Analýzu jsem označil jako validní pouze v případě, že STANDARD NEG vyšel negativní a STANDARD POS vyšel pozitivní. V případě, že jsem signál detekoval pouze v kanálu HEX označil jsem ho jako vzorek negativní. Zatímco jsem signál detekoval v obou kanálech, vyhodnotil jsem ho jako pozitivní. Pokud jsem výsledek detekoval jinak než takto, označil jsem výsledek jako nevalidní, a to i v případě, že byl detekován pouze v kanálu FAM nebo treshold hodnota obou kanálů byla vzdálena více než o 5 cyklů.

6.4 Komparace

V případě, že byl vzorek nevalidní, provedl jsem doplňující analýzu vzorků pomocí real-time PCR od jiné firmy a měření koncentrací a nečistot na lepším a spolehlivějším spektrofotometru.

6.4.1 Komparace real-time PCR

Pro případnou komparaci výsledků jsem zvolil stejnou metodu analýzy, ale od jiné společnosti. Souprava EliGene Spondylitis HLA-B27 RT byla od společnosti Elisabeth Pharmacon. Kit EliGene Spondylitis HLA-B27 RT detekuje alelu HLA-B27 (subtypy B* 2701-2759). Pro interní kontrolu byl použit gen SYPL2. Souprava obsahovala Master Mix HLA-B27 Mix a pozitivní kontrolu PC DNA HLA-B27 (Tabulka 9).

Tabulka 9, Složení a popis komponent soupravy EliGene Spondylitis HLA-B27

Komponenta	Objem
HLA-B27 Mix	1 ml
PC DNA HLA-B27	0,1 ml

Zdroj: Vlastní

Příprava vzorků a reagensů spolu s jejich pipetováním

V případě komparace, byla práce s tímto kitem následující. Před použitím jsem nechal reagensie a vzorky rozmraznout a vytemperovat na laboratorní teplotu. Po tomto kroku jsem reagensie a vzorky krátce promíchal na vortexu a stočil v centrifuze. Připravil jsem si také automatické pipety, špičky s filtrem, amplifikační mikrozukumavky a vícejamkovou destičku.

Pro komparaci 1 vzorku jsem použil 20 μ l HLA-B27 Mix, který jsem napipetoval do amplifikační mikrozukumavky. Potom jsem přidal pomocí jiné automatické pipety 5 μ l vzorku čisté genomové DNA. Pro ověření správného vyhodnocení a provedení reakce, byla součástí této soupravy pozitivní kontrola PC DNA HLA-B27. Tu jsem připravil, tak, že jsem napipetoval automatickou pipetou 20 μ l HLA-B27 Mix do druhé amplifikační mikrozukumavky, ke kterému jsem potom přidal 5 μ l pozitivní kontroly PC DNA HLA-B27. Po této přípravě jsem vložil mikrozukumavky do vícejamkové destičky. Destičku jsem uzavřel folií a poté dal do real-time PCR přístroje LightCycler 2.0 od společnosti Roche Diagnostics. Přístroj byl připojený k počítači s ovládacím panelem.

Nastavení reakčních profilů EliGene Spondylitis HLA-B27 RT

Na počítači jsem nastavil reakční profil pro tuto reakci (Tabulka 10). Po nastavení reakčních profilů a snímání fluorescence v kanálech FAM ($\lambda_{\text{EXCITACE}} = 510$ nm, $\lambda_{\text{EMISE}} = 528$ nm) a HEX ($\lambda_{\text{EXCITACE}} = 530$ nm, $\lambda_{\text{EMISE}} = 548$ nm) jsem spustil měření.

Tabulka 10, Nastavení reakčních profilů EliGene Spondylitis HLA-B27 RT

Fáze	Počet cyklů	teplota	Čas	Acquisition mode
Počáteční denaturace	1 x	95 (°C)	180 s	None
Amplifikace + měření fluorescence	40 x	95 (°C)	10 s	None
		62 (°C)	30 s	Single
Chlazení	1 x	40 (°C)	60 s	None

Zdroj: Vlastní

Analýza výsledku

Po ukončení komparačního real-time PCR jsem analyzoval výsledky. Nastavil jsem si treshold pro kanály FAM a HEX. Pro alelu HLA-B27 jsem odečítal treshold hodnoty v kanálu FAM, Pro interní kontrolu genu SYPL2 jsem odečítal treshold hodnoty

v kanálu HEX. Analýzu jsem označil jako validní pouze v případě, že pozitivní kontrola PC DNA HLA-B27 vyšla pozitivní pouze v kanálu FAM i HEX, kde v kanálu HEX je interní kontrola charakterizována amplifikací s mírným nárůstem signálu V případě, že jsem signál detekoval pouze v kanálu HEX označil jsem ho jako vzorek negativní. Zatímco jsem signál detekoval v obou kanálech, vyhodnotil jsem ho jako pozitivní. Pokud jsem výsledek detekoval jinak než takto, označil jsem výsledek jako nevalidní.

6.4.2 Komparační měření koncentrace a nečistot DNA

V případě nejasných výsledků real-time PCR analýzy vzorků jsem provedl komparační měření koncentrací izolovaných vzorků, které jsem obohatil o analýzu nečistot. (Tabulka 11) Měření koncentrací a nečistot DNA jsem provedl na spektrofotometru BioSpec-nano od společnosti SHIMADZU na fakultě Zemědělské a technologické.

Tabulka 11, Koncentrace a nečistoty DNA

vzorky	koncentrace DNA (ng/μl)	OD 260/280	OD 260/230
1	47,69	1,59	0,79
2	39,33	1,16	0,74
3	17,78	1,09	1,17
4	40,91	1,22	0,68
5	35,61	1,81	0,68
6	34,53	1,52	0,59
7	31,43	1,32	0,58
8	39,04	1,79	1,32
9	9,58	0,74	0,67
10	41,93	1,7	1,86
11	61,7	1,74	2,28
12	30,06	1,59	1,52
13	41,21	1,7	2,56
14	52,05	1,76	1,13
15	24,01	1,45	0,74
16	33,05	1,65	2,39
17	46,59	1,84	2,69
18	49,59	1,49	0,8
19	56,74	1,81	1,58
20	73,12	1,78	1,62
21	76,02	1,82	1,65
22	30,64	1,64	4,69
23	112,94	1,81	2,54

Zdroj: Vlastní

7 Vyhodnocení výsledků

Cílem bakalářské práce bylo diagnostikovat vybraný typ revmatického onemocnění pomocí metod molekulární biologie. Pro diagnostiku jsem si vybral Bechtěrevovu chorobu. Využil jsem k tomu metodu real-time PCR.

7.1 Měření koncentrací izolovaných vzorků

Výsledkem tohoto měření byli hodnoty koncentrací, které dosahovaly dostatečných hodnot k následné detekci alely HLA-B27. Jediný vzorek číslo 9 dosahoval nižších hodnot koncentrace oproti ostatním. (Tabulka 12)

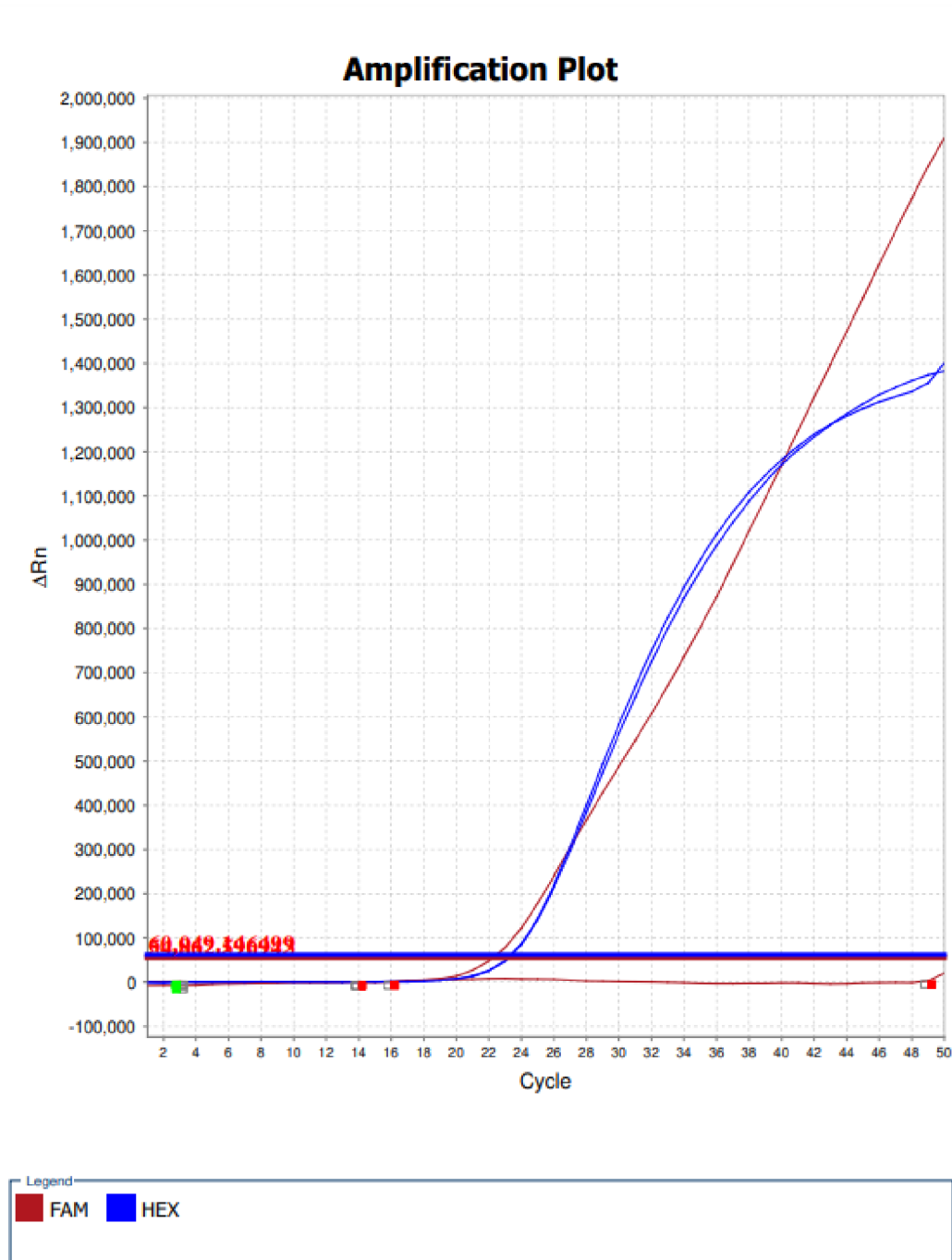
Tabulka 12, Zhodnocení měření koncentrací izolovaných vzorků

Vzorky	Koncentrace DNA (ng/ μ l)
1	48,93
2	37,54
3	17,61
4	41,03
5	38,68
6	35,24
7	29,74
8	35,09
9	13,74
10	42,84
11	65,31
12	30,56
13	44,24
14	57,86
15	23,33
16	32,18
17	47,98
18	52,65
19	61,37
20	88,12
21	81,34
22	32,19
23	120,84

Zdroj: Vlastní

7.2 Real-time PCR

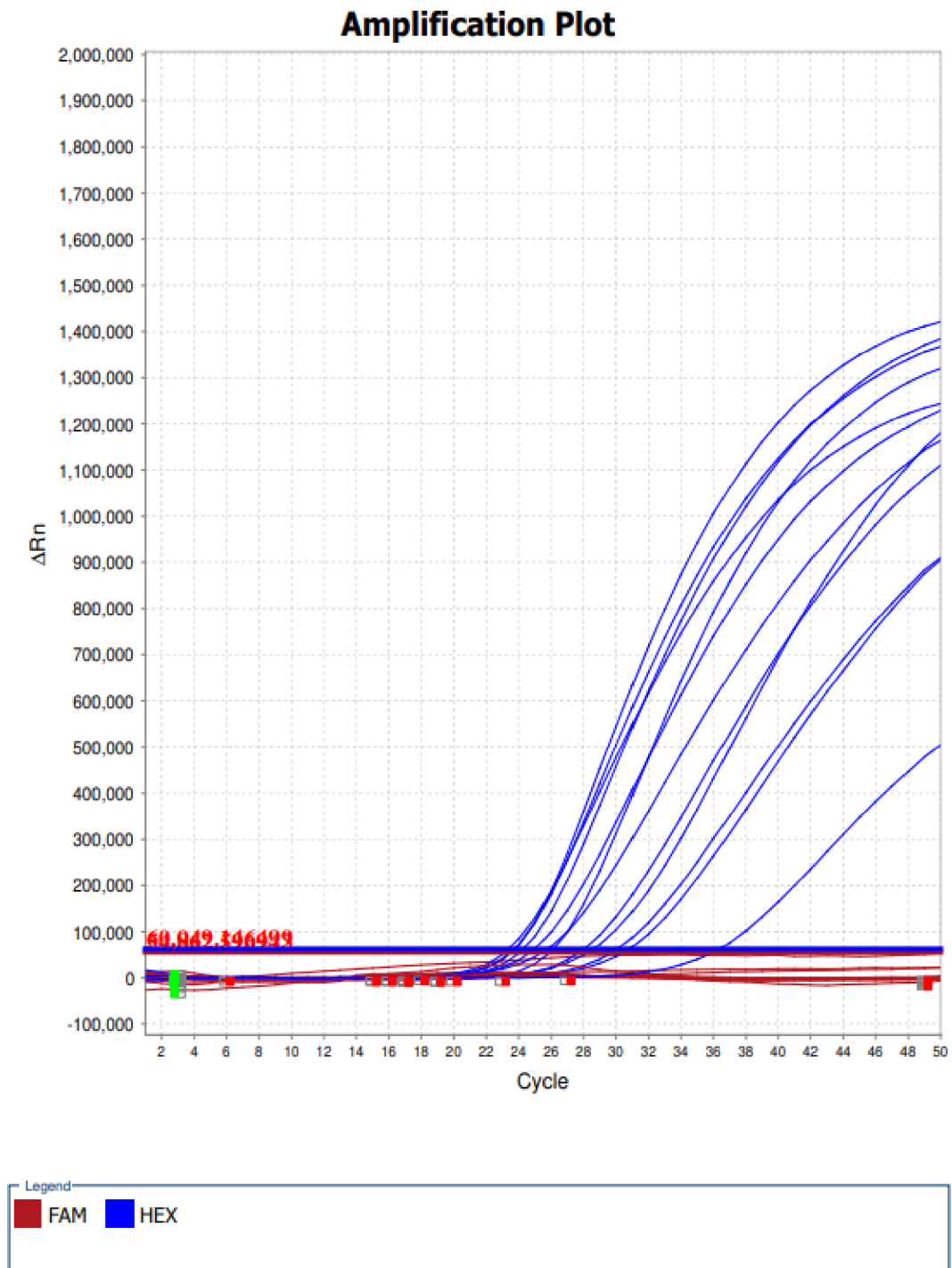
K detekci alely HLA-B27 jsem použil real-time PCR. Pozitivní a negativní kontrola byla též součástí detekce.



Obrázek 1, Pozitivní a negativní kontrola; Zdroj: Vlastní

V grafu je vidět (Obrázek 1), že pozitivní kontrola vyšla pozitivně a negativní kontrola vyšla negativně. Tím pádem jsem mohl označit tuto metodu jako validní.

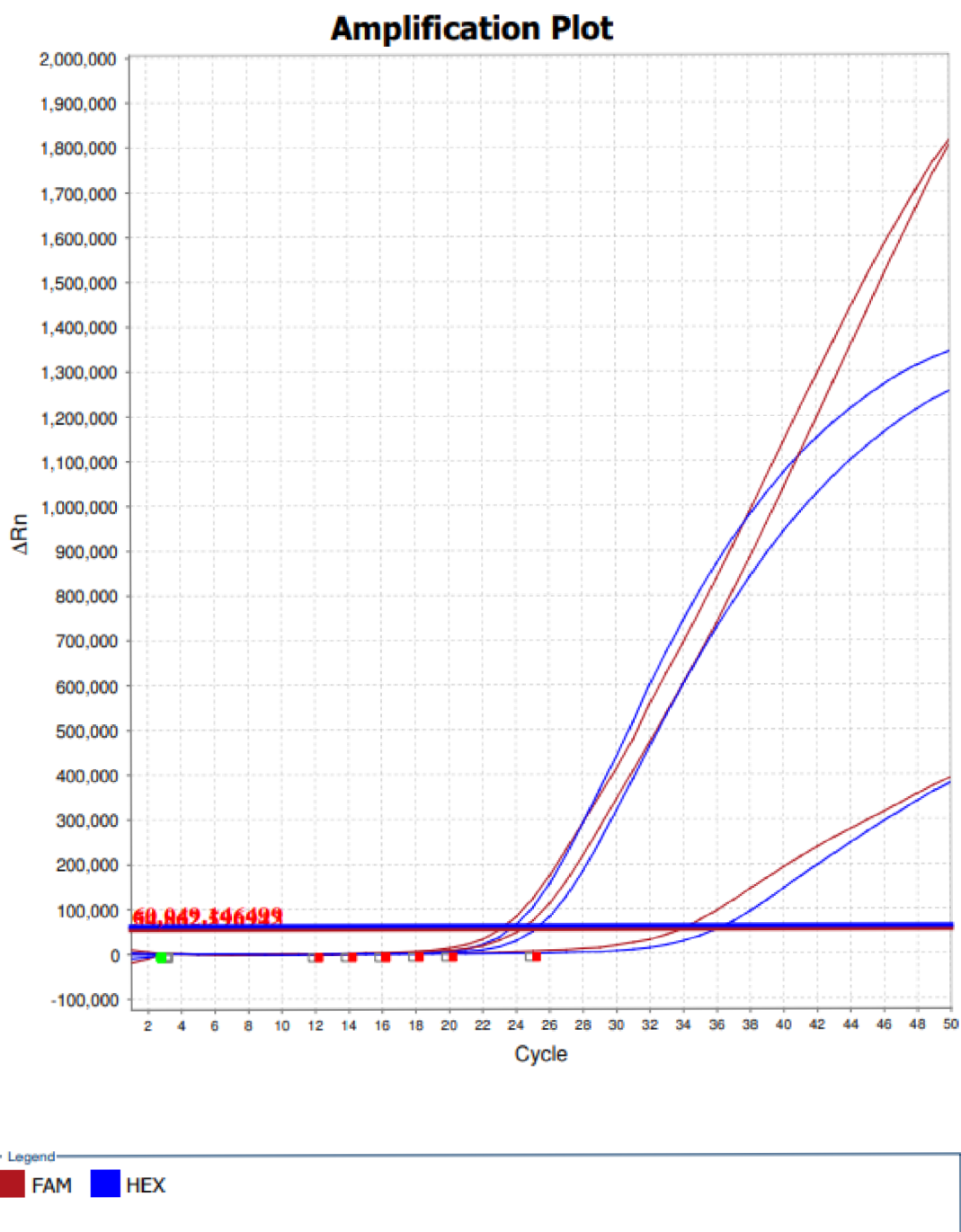
Takto vypadaly všechny vzorky, které prošly metodou real-time PCR. (Obrázek 2)



Obrázek 2, Real-time PCR všech vzorků spolu s PK a NK; Zdroj: Vlastní

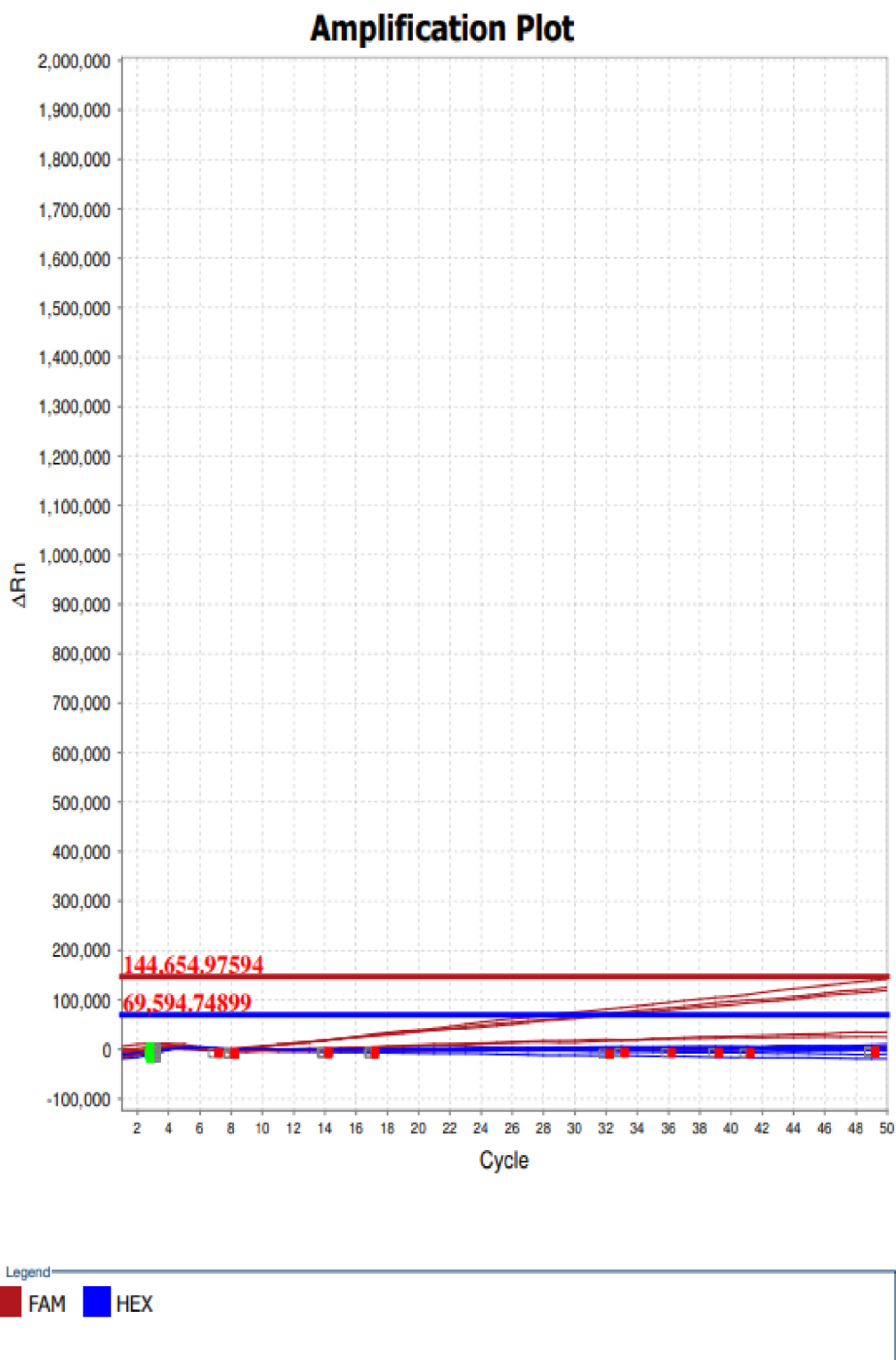
Po rozložení jednotlivých vzorků jsem zjistil, že některé vzorky byly pozitivní, což znamená, že tyto vzorky byly pozitivní v kanálu HEX i FAM. Většina výsledků byla negativní, což znamená, že byly pozitivní pouze v kanálu HEX. Pozitivní vzorky byly

s číslem: 7, 12, 13. (Obrázek 3) Negativní vzorky byly s číslem: 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 22 a 23.



Obrázek 3, Pozitivní vzorky 7, 12, 13; Zdroj: Vlastní

Bohužel některé vzorky nebyly validní, jelikož signál nebyl zachycen ani v kanálu HEX a FAM. Nevalidní vzorky byly s číslem: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 18 a 20. (Obrázek 4)

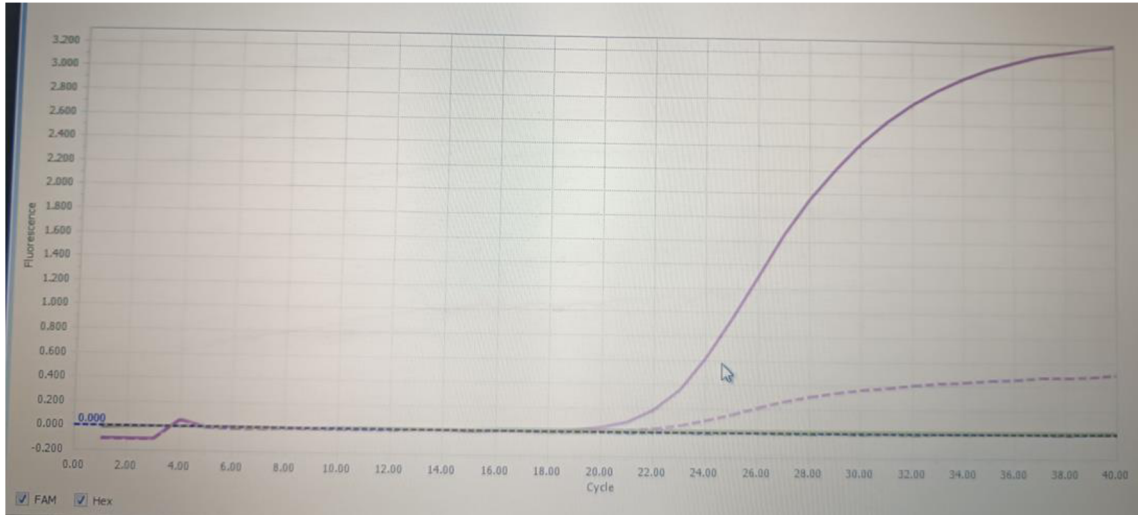


Obrázek 4, Nevalidní vzorky; Zdroj: Vlastní

7.3 Komparační real-time PCR

Kvůli nevalidním vzorkům s číslem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 18 a 20 jsem prováděl komparační stanovení pomocí real-time PCR soupravy od společnosti Elisabeth Pharmacon. Kvůli

těmto vzorkům jsem prováděl komparační stanovení. Komparační stanovení pomocí této metody jsem provedl pouze u pozitivní kontroly (Obrázek 5) a dvou nevalidních vzorků s nejvyšší koncentrací. Byly to vzorky s číslem 5 (Obrázek 6) a 20 (Obrázek 7).



Obrázek 5, Pozitivní kontrola u komparačního stanovení real-time PCR; Zdroj: Vlastní



Obrázek 6, Vzorek č. 5; Zdroj: Vlastní



Obrázek 7, Vzorek č. 20; Zdroj: Vlastní

Bohužel naše komparační stanovení vyšlo znovu u obou vzorků nevalidní.

7.4 Komparační měření koncentrací izolovaných vzorků a nečistot

Komparační měření koncentrací a nečistot mi ukázalo, že koncentrace naměřené při prvním měření koncentrací na Zdravotně sociální fakultě nebyly shodné, ale tento rozdíl v koncentracích by nijak neovlivnil detekci alely HLA-B27 pomocí real-time PCR.

Čistota vzorků, kterou byla tato analýza obohacena, nebyla dostačující u několika vzorků. Jelikož hodnoty čistoty OD 260/280 by měli dosahovat rozmezí 1,7-2,0, aby se jednalo o čistou DNA. Nižší poměr absorbance zde naznačuje přítomnost bílkovin, fenolu nebo jiných kontaminantů, které mají absorbanci blízko 280 nm. Hodnotu OD 260/230 jsem použil jako sekundární měřítko čistoty, kde se za čistý vzorek považuje rozmezí 2,0-2,2. Pokud byl poměr nižší než očekávaný rozsah, znamená to přítomnost kontaminantů ve vzorku. Toto opět několik vzorků nesplňovalo (Tabulka 13)

Tabulka 13, Komparační měření koncentrací a nečistot DNA

vzorky	koncentrace DNA (ng/μl)	OD 260/280	OD 260/230
1	47,69	1,59	0,79
2	39,33	1,16	0,74
3	17,78	1,09	1,17
4	40,91	1,22	0,68
5	35,61	1,81	0,68
6	34,53	1,52	0,59
7	31,43	1,32	0,58
8	39,04	1,79	1,32
9	9,58	0,74	0,67
10	41,93	1,7	1,86
11	61,7	1,74	2,28
12	30,06	1,59	1,52
13	41,21	1,7	2,56
14	52,05	1,76	1,13
15	24,01	1,45	0,74
16	33,05	1,65	2,39
17	46,59	1,84	2,69
18	49,59	1,49	0,8
19	56,74	1,81	1,58
20	73,12	1,78	1,62
21	76,02	1,82	1,65
22	30,64	1,64	4,69
23	112,94	1,81	2,54

Zdroj: Vlastní

Výsledkem tohoto komparačního měření byli hodnoty absorbancí a koncentrací. Jediný vzorek, který nedosahoval dostatečné koncentrace byl vzorek číslo 9. Hodnoty vzorků nečistot OD 260/280 měly některé vzorky splňující. Jednalo se o vzorky s číslem: 5, 8, 10, 11, 13, 14, 17, 19, 20, 21 a 23. Ostatní vzorky nesplňovaly rozmezí OD 260/280. Druhotné měření nečistot OD 260/230 také nesplnilo požadavky měření. Vzorky, které neodpovídaly rozmezí byly vzorky s číslem: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 18, 19, 20 a 21.

8 Diskuze

Revmatoidní artritida a Bechtěrevova choroba jsou revmatická onemocnění, přičemž oba typy těchto onemocnění se řadí mezi zánětlivá. Obě tyto onemocnění se projevují záněty pohybového aparátu, ale důležitým signálem mohou být i mimokloubní záněty. Hlavním a tím největším rozdílem těchto onemocnění je, že RA (Revmatoidní artritida) spadá mezi difúzní choroby pojivové tkáně. Naopak AS (Ankylozující spondylitida/Bechtěrevova choroba) se řadí mezi spondylartritidy. Dalším rozdílem je místo poškození pojivového aparátu, kdy u RA jsou postiženými oblastmi periferní klouby, ale u AS probíhá zánět v obratlích, z čehož vyplývá, že postiženou oblastí je páteř. Obě tyto onemocnění však mají společné, že jsou autoimunitního typu. U AS je etiologie prozatím neznámá, ale je známa silná asociace s alelou HLA-B27. Pro etiologické poznání AS bylo již vypracováno několik vědeckých prací, které zpracovávají a ověřují různé etiologické hypotézy.

Mezi nejznámější se řadí tyto tři: prezentace artritogenních peptidů, exprese volných forem těžkého řetězce HLA-B27, včetně homodimerů, na povrchu buněk a jejich rozpoznávání imunoreceptory rodiny NK a HLA-B27, reakce na nesložené proteiny a reakce endoplazmatického retikula na stres. Nejvíce prozatím pravděpodobnou etiologickou hypotézou je myšlenka prezentace artritogenních peptidů. Hraje zde velkou roli mikroorganismus, od kterého by měl pocházet peptid, který by byl vyvázán pomocí HLA-B27. To by vyvolalo imunitní odpověď CD 8pozitivních T-lymfocytů, čímž by se spustila zánětlivá reakce, pomocí zkříženě reagujícího v kombinaci B27/peptidu. (Schittenhelm et al., 2015)

U Bechtěrevovy choroby je velmi zajímavé, že alela HLA-B27 se nevyskytuje ve všech případech onemocnění touto chorobou. Alela se vyskytuje pouze v 90 % případů. (Hwang et al., 2021) Stejně tak je prokázáno, že pokud člověk má alelu HLA-B27 ve své genetické výbavě, neznamená to, že nemoc musí propuknout. (Mauro et al., 2021)

V metodické části bylo hlavním cílem prokázat u některého z probandů alelu HLA-B27, která je spojována s Bechtěrevovou chorobou. Podařilo se mi získat vzorky od 23 probandů, přičemž nemoc byla prokázána u 7 probandů a 9 probandů mělo predispoziční znaky. Vzorkový materiál byl bukální stěr a periferní krev, který byl po

odběru izolován tak, aby výsledkem byla čistá genomová DNA vhodná k amplifikaci pomocí real-time PCR.

Před samotným provedením real-time PCR byly změřeny hodnoty koncentrací a hodnoty nečistoty ve vzorku OD 260/280 a OD 260/230. Koncentrace naměřené u vzorků byly dostačující ke stanovení alely, ale výsledky nečistot OD 260/280 a OD 260/230 byly mimo vymezené meze absorbance.

Alela HLA-B27 byla prokázána u 3 probandů: 7, 12, 13. Diagnosticky významné to bylo pro probanda 7, jelikož se nachází v rozmezí let, kdy se toto onemocnění projevuje. Bohužel u osmi probandů vyšel výsledek nevalidní, a proto jsem pokračoval ve zjišťování chyby. U dvou vzorků bylo provedeno komparační stanovení real-time PCR od jiné společnosti, které vyšlo znovu nevalidní. Z tohoto důvodu bylo provedeno další komparační měření koncentrace DNA spolu s nečistotami. Tato metoda byla provedena u všech vzorků. Měření na spolehlivějším přístroji prokázalo, že koncentrace nebyla dostačující pouze u jednoho vzorku, který však pomocí q-PCR detekoval jako negativní. Větší roli v následné detekci hrály nečistoty. Vzorky, které nesplňovaly rozmezí OD 260/280 byly: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 12, 15, 16, 18, a 22. Vzorky, které nesplňovaly rozmezí OD 260/230 byly: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 18, 19, 20 a 21. Všechny nevalidní vzorky byly izolovány z bukalních stěrů. Kit použitý k izolaci DNA prokazuje daleko lepší schopnost izolace u vzorků z periferní krve. Můžeme tedy usuzovat, že pro kit použitý pro izolaci je lepším materiálem periferní krev než bukalní stěr.

Domnívám se, že došlo k chybě při izolaci DNA z bukalních stěrů a její kontaminaci nečistotami OD260/280 a OD260/230. Je také možné, že došlo k chybě již při odběru bukalního stěru, jelikož nelze posoudit, zda probandi před odebráním vzorku nepili, nejedli, či nekouřili, i přes to, že byli poučeni. Všechny tyto možnosti u odběru bukalního stěru mohli ovlivnit následnou izolaci a detekci alely HLA-B27. Možností chyby, která nelze opomenout, je možnost přidání nesprávné reagentie při izolaci, či špatné přípravy reagentií, jenž museli být namíchaný s jinou, tak aby vykazovaly vlastnost důležitou pro reakci izolace DNA.

Pro zjištění validních výsledků u probandů 1, 2, 3, 4, 5, 6, 18 a 20, by bylo potřeba opakovat celý proces od odběru nového vzorku až po samostatnou real-time PCR analýzu.

9 Závěr

Moje bakalářská práce s názvem „Diagnostika revmatických chorob pomocí metod molekulární biologie“ byla rozdělena do dvou částí. V teoretické části bylo cílem vypracovat přehled revmatických chorob, ve kterém jsem se zaměřil na dvě revmatická onemocnění, revmatoidní artritidu a Bechtěrevovu chorobu. U obou těchto onemocnění je důležitý autoimunitní proces. Popsal jsem u obou onemocnění příznaky, různé stupně klinického projevu, imunopatologický proces, diagnostiku a různé možnosti léčby.

Avšak hlavním cílem této bakalářské práce bylo detekovat vybraný typ revmatického onemocnění pomocí metod molekulární biologie. Vybral jsem si onemocnění známé jako Bechtěrevova choroba, u které je molekulární diagnostika zaměřena na alelu HLA-B27. Tato alela má významný predispoziční vliv na vznik tohoto onemocnění, ačkoliv není touto alelou podmíněna.

Výsledky laboratorní práce prokázaly alelu HLA-B27 u trojice probandů s číslem 7, 12, 13. Proband s číslem 7, měl predispoziční znaky, které se objevují u Bechtěrevovy choroby. Jelikož tento proband dosahuje věku 25 let, je možné, že by u něho mohla tato choroba teprve propuknout. Naopak u probandů s číslem 12 a 13 bychom mohli vyloučit tuto chorobu, jelikož se jedná o zdravé jedince a jejich věk dosahuje 53 (12) a 67(13) let.

Díky této práci jsem se zdokonalil a naučil nové molekulárně genetické metody a procvičil jsem si řešení laboratorních problémů. Molekulárně genetické metody spolu s jejich přípravou, které jsem se naučil, byly izolace DNA z krve a bukalního stěru, q-PCR od různých společností. Procvičil jsem si také práci s odbornou literaturou.

Téma práce jsem si zvolil, protože revmatické choroby jsou v naší společnosti velmi běžné a mohou postihnout každého člověka. Diagnostiku Bechtěrevovy choroby jsem zvolil kvůli její neznámé etiologii a zajímavé asociaci s alelou HLA-B27. Věřím, že se potvrdí jedna z hypotéz etiologie Bechtěrevovy choroby nebo bude objevena a potvrzena nová hypotéza. Díky tomuto budoucímu objevu by mohlo dojít k cílené diagnostice a léčbě, která by mohla toto onemocnění zcela vyléčit nebo alespoň zlepšit kvalitu života nemocných.

10 Literární přehled

- 1) Acton, A. (2012). Tumor Necrosis Factor (TNF) Inhibitors: Advances in Research and Application. ScholarlyEditions. ISBN: 978-14-8160-972-2
- 2) Antoniou, A. N., Lenart, I., Kriston-Vizi, J., Iwawaki, T., Turmaine, M., McHugh, K., Ali, S., Blake, N., Bowness, P., Bajaj-Elliott, M., Gould, K., Nesbeth, D., & Powis, S. J. (2019). Salmonella exploits HLA-B27 and host unfolded protein responses to promote intracellular replication. *Annals of the rheumatic diseases*, 78(1), 74–82. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213532>
- 3) Asim Khan, M. (2023). Ankylosing Spondylitis and Axial Spondyloarthritis (2. přepracované vydání). Oxford University. ISBN: 978-01-9886-415-8
- 4) Bartůňková, J., & Paulík, M. (2011). Vyšetřovací metody v imunologii (2., přeprac. a doplň. vyd). Grada. ISBN: 978-80-2477-089-5
- 5) Bečvář, R., & Pavelka, K. (2009). Současné trendy v diagnostice a léčbě revmatoidní artritidy. *Interní medicína pro praxi*, 11(7), 340-344.
- 6) Behrens, F., Tak, P. P., Østergaard, M., Stoilov, R., Wiland, P., Huizinga, T. W., Berenfus, V. Y., Vladeva, S., Rech, J., Rubbert-Roth, A., Korkosz, M., Rekalov, D., Zupanets, I. A., Ejbjerg, B. J., Geiseler, J., Fresenius, J., Korolkiewicz, R. P., Schottelius, A. J., & Burkhardt, H. (2015). MOR103, a human monoclonal antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in the treatment of patients with moderate rheumatoid arthritis: results of a phase Ib/IIa randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Annals of the rheumatic diseases*, 74(6), 1058–1064. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204816>
- 7) Bínovský, A. (2003). Funkčná anatómia pohybového systému. Univerzita Komenského. ISBN: 978-80-2231-380-3
- 8) Bowness P. (2015). HLA-B27. *Annual review of immunology*, 33, 29–48. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112110>

- 9) Braun, J., & Sieper J. (2011). Clinician's Manual on Ankylosing Spondylitis. Springer Healthcare Limited. ISBN: 978-19-0767-330-6
- 10) Buřval, S., Černá, M., Čtvrtlík, F., Dusíková, R., Hazlinger, M., Heřman, M., Köcher, M., Michálková, K., Spáčilová, K., Tüdös, Z., Veverkové, L., & Vomáčka, J. (2015). Základy radiologie. Univerzita Palackého. ISBN: 978-80-2444-333-1
- 11) Calabro, J., Dick, C., Dick, W. C. (2012). Ankylosing Spondylitis. Springer Netherlands. ISBN: 978-94-0093-231-9
- 12) Češka, R. (2010). Interna. Triton. ISBN: 978-80-7387-423-0
- 13) Čihák, R. (2011). Anatomie 1 (Třetí, upravené a doplněné vydání). Grada. ISBN: 978-80-2479-209-5
- 14) Dagfinrud, H., Kvien, T. K., & Hagen, K. B. (2004). Physiotherapy interventions for ankylosing spondylitis. The Cochrane database of systematic reviews, (4), CD002822. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002822.pub2>
- 15) de Hair, M. J., Lehmann, K. A., van de Sande, M. G., Maijer, K. I., Gerlag, D. M., & Tak, P. P. (2012). The clinical picture of rheumatoid arthritis according to the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria: is this still the same disease?. Arthritis and rheumatism, 64(2), 389–393. <https://doi.org/10.1002/art.33348>
- 16) Deshpande, S. (2014). History of rheumatology. Medical Journal of Dr. D.Y. Patil University, 7(2), 119-123. https://journals.lww.com/mjdy/Fulltext/2014/07020/History_of_rheumatology.2.aspx#
- 17) Domingues, L. (2023). PCR Methods and Protocols. SPRINGER-VERLAG NEW YORK. ISBN: 978-10-7163-358-8
- 18) Dorak, T. (2007). Real-time PCR. Taylor & Francis. ISBN: 978-02-0396-731-7
- 19) Dungl, P. (2014). Ortopedie (2., přepracované a doplněné vydání). Grada. ISBN: 978-80-2474-357-8

- 20) Dupont, B., Duquesoy, R., Hansen, J., Gorski, J., Lee, T., Zhao, T., & Strothman, R. (2012). *The HLA System A New Approach*. Springer. ISBN: 978-14-6123-454-8
- 21) Dylevský, I. (2009). *Funkční anatomie*. Grada. ISBN: 978-80-2473-240-4
- 22) Dylevský, I., Mrázková, O., & Druga, R. (2000). *Funkční anatomie člověka*. Grada. ISBN: 978-80-7169-681-0
- 23) Fiala, P., Valenta, J., & Eberlová, L. (2015). *Stručná anatomie člověka*. Karolinum. ISBN: 978-80-2462-693-2
- 24) Fraenkel, L., Bathon, J. M., England, B. R., St Clair, E. W., Arayssi, T., Carandang, K., Deane, K. D., Genovese, M., Huston, K. K., Kerr, G., Kremer, J., Nakamura, M. C., Russell, L. A., Singh, J. A., Smith, B. J., Sparks, J. A., Venkatachalam, S., Weinblatt, M. E., Al-Gibbawi, M., Baker, J. F., ... Akl, E. A. (2021). 2021 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis care & research*, 73(7), 924–939. <https://doi.org/10.1002/acr.24596>
- 25) Golder, V., & Schachna, L. (2013). Ankylosing spondylitis: an update. *Australian family physician*, 42(11), 780–784.
- 26) Grim, M., & Druga, R. (2019). *Základy anatomie: Anatomie krajiny těla*. Galén. ISBN: 978-80-7492-401-9
- 27) Haladová, E., & Nechvátalová, L. (2010). *Vyšetřovací metody hybného systému (Vyd. 3., nezměn)*. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů. ISBN: 978-80-7013-516-7
- 28) Hořejší, V., & Bartůňková, J. (2009). *Základy imunologie (3. přepracované a doplněné vydání)*. Triton. ISBN: 978-80-7387-280-9
- 29) Howell, W. M., Carter, V., & Clark, B. (2010). The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. *Journal of clinical pathology*, 63(5), 387–390. <https://doi.org/10.1136/jcp.2009.072371>

- 30) Hwang, M. C., Ridley, L., & Reveille, J. D. (2021). Ankylosing spondylitis risk factors: a systematic literature review. *Clinical rheumatology*, 40(8), 3079–3093. <https://doi.org/10.1007/s10067-021-05679-7>
- 31) Chen, B., Li, J., He, C., Li, D., Tong, W., Zou, Y., & Xu, W. (2017). Role of HLA-B27 in the pathogenesis of ankylosing spondylitis (Review). *Molecular medicine reports*, 15(4), 1943–1951. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6248>
- 32) Chen, L., Shi, H., Yuan, J., & Bowness, P. (2017). Position 97 of HLA-B, a residue implicated in pathogenesis of ankylosing spondylitis, plays a key role in cell surface free heavy chain expression. *Annals of the rheumatic diseases*, 76(3), 593–601.
- 33) Imboden, J. B., Hellmann, D. B., Stone, J., & Stone, J. H. (2013). *Current Diagnosis & Treatment in Rheumatology* (3. přepracované vydání). McGraw Hill. ISBN: 978-00-7163-806-7
- 34) Jang, D. I., Lee, A. H., Shin, H. Y., Song, H. R., Park, J. H., Kang, T. B., Lee, S. R., & Yang, S. H. (2021). The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2719. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>
- 35) Janík, V. (2011). Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů. *Ultrasonografie*, 4.(1.), 12-22. ISSN: 1804-3143
- 36) Jenšovský, J. (2018). *Diagnostika a léčba osteoporózy a dalších onemocnění skeletu*. Karolinum. ISBN: 978-80-2463-741-9
- 37) Jílek, P. (2019). *Imunologie: stručně, jasně, přehledně* (2., doplněné vydání). Grada. ISBN: 978-80-2710-595-3
- 38) Kachlík, D. (2018). *Anatomie pro nelékařské zdravotnické obory*. Karolinum. ISBN: 978-80-2464-058-7
- 39) Kessler, S., & Musil, J. (1993). *Memorix – Laboratorní diagnostika* (2., přeprac. vyd.). Scientia Medica. ISBN: 978-80-8552-612-7

- 40) King, R., Stansfield, W., & Mulligan, P. (2006). *A Dictionary of Genetics* (7. přepracované vydání). Oxford University. ISBN: 978-01-9530-762-7
- 41) Klener, P., Jirásek, V., Brodanová, M., Mareček, Z., & Pavelka, K. ml. (1997). *Vnitřní lékařství*. Karolinum. ISBN: 978-80-7184-607-9
- 42) Kolář, P. (2020). *Rehabilitace v klinické praxi* (2., doplněné vydání). Galén. ISBN: 978-80-7262-657-1
- 43) Kubiček, M., Jandová, D., & Veselá, I. (2022). *Léčebná rehabilitace v ortopedii a revmatologii* (2. vydání). Raabe. ISBN: 978-80-7496-497-8
- 44) Lanás, A. (2016). *NSAIDs and Aspirin Recent Advances and Implications for Clinical Management*. Springer International Publishing. ISBN: 978-33-1933-889-7
- 45) Levitová, A., & Hušáková, M. (2018). *Bechtěrevova nemoc: návod na aktivní život a průvodce cvičením*. Grada. ISBN: 978-80-2712-008-6
- 46) Lochmanová, A. (2014). *Základy imunologie: skriptum*. Ostravská univerzita. ISBN: 978-80-7464-570-9
- 47) Malíková, H. (2022). *Základy radiologie a zobrazovacích metod* (2. doplň. vyd.). Karolinum. ISBN: 978-80-2465-190-3
- 48) Mauro, D., Thomas, R., Guggino, G., Lories, R., Brown, M. A., & Ciccia, F. (2021). Ankylosing spondylitis: an autoimmune or autoinflammatory disease? *Nature reviews. Rheumatology*, 17(7), 387–404. <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00625-y>
- 49) McInnes, I. B., & Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*, 365(23), 2205–2219. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1004965>
- 50) McVeigh, C. M., & Cairns, A. P. (2006). Diagnosis and management of ankylosing spondylitis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 333(7568), 581–585. <https://doi.org/10.1136/bmj.38954.689583.DE>

- 51) Mitchell, J. A., Ahmetaj-Shala, B., Kirkby, N. S., Wright, W. R., Mackenzie, L. S., Reed, D. M., & Mohamed, N. (2014). Role of prostacyclin in pulmonary hypertension. *Global cardiology science & practice*, 2014(4), 382–393. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2014.53>
- 52) Müllerová, E. (2019). DOPORUČENÍ PRO LÉČBU REVMATOIDNÍ ARTRITIDY. *Revma Liga*, (1)
- 53) Navid, F., & Colbert, R. A. (2017). Causes and consequences of endoplasmic reticulum stress in rheumatic disease. *Nature reviews. Rheumatology*, 13(1), 25–40. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.192>
- 54) Navrátil, L. (2017). *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory (2. zcela přepracované a doplněné vydání.)*. Grada. ISBN: 978-80-2719-181-9
- 55) Navrátil, L. (2019). *Fyzikální léčebné metody pro praxi*. Grada. ISBN: 978-80-2711-097-1
- 56) Navrátil, L., & Rosina, J. (2005). *Medicínská biofyzika*. Grada. ISBN: 978-80-2712-700-9
- 57) Nekula, J. (2005). *Radiologie*. Univerzita Palackého. ISBN: 978-80-2441-011-1
- 58) Neumann, E., Frommer, K., Diller, M., & Müller-Ladner, U. (2018). Rheumatoide Arthritis [Rheumatoid arthritis]. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 77(9), 769–775. <https://doi.org/10.1007/s00393-018-0500-z>
- 59) Olejárová, M., Filková, M. (2023). *Revmatoidní artritida –moderně*. Maxdorf. ISBN: 978-80-7345-751-8
- 60) Pavelka, K. (2005). *Farmakoterapie revmatických onemocnění*. Grada. ISBN: 978-80-2470-459-3
- 61) Pavelka, K., Arenberger, P., Lukáš, M., Zima, T., Doležal, T., Olejárová, M., & Cetkovská, P. (2014). *Biologická léčba zánětlivých autoimunitních onemocnění v revmatologii, gastroenterologii a dermatologii*. Grada. ISBN: 978-80-2479-599-7

- 62) Pavelka, K., Vencovský, J., Horák, P., Šenolt, L., Mann, H., Štěpán, J., (2018). *Revmatologie*. Česko: Galén. ISBN: 978-80-7345-583-5
- 63) Petersen, T., Laslett, M., Thorsen, H., Manniche, C., Ekdahl, C., & Jakobsen, S. (2003). Diagnostic classification of non-specific low back pain. A new system integrating patho-anatomic and clinical categories. *Physiother Theory Pract.*, 19(1).
- 64) Pincus, T., Kavanaugh, A., Aletaha, D., & Smolen, J. (2006). Complexities in defining remission in rheumatic diseases. *Clinical and experimental rheumatology*, 24(43), 1-6.
https://academic.oup.com/rheumatology/article/39/suppl_2/3/1779301
- 65) Platzer, A., Nussbaumer, T., Karonitsch, T., Smolen, J. S., & Aletaha, D. (2019). Analysis of gene expression in rheumatoid arthritis and related conditions offers insights into sex-bias, gene biotypes and co-expression patterns. *PloS one*, 14(7), e0219698.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219698>
- 66) Racek, J., & Rajdl, D., (2021). *Klinická biochemie* (3., přeprac. vyd). Galén. ISBN: 978-80-7492-545-0
- 67) Ramiro, S., Nikiphorou, E., Sepriano, A., Ortolan, A., Webers, C., Baraliakos, X., Landewé, R. B. M., Van den Bosch, F. E., Boteva, B., Bremander, A., Carron, P., Ciurea, A., van Gaalen, F. A., Géher, P., Gensler, L., Hermann, J., de Hooge, M., Husakova, M., Kiltz, U., López-Medina, C., ... van der Heijde, D. (2023). ASAS-EULAR recommendations for the management of axial spondyloarthritis: 2022 update. *Annals of the rheumatic diseases*, 82(1), 19–34.
<https://doi.org/10.1136/ard-2022-223296>
- 68) Rosina, J. (2022). *Základy lékařské biofyziky: pro studenty lékařských fakult*. Grada. ISBN: 978-80-2712-574-6
- 69) Rovenský, J. (2008). REUMATOIDNÁ ARTRITÍDA – KLINICKÝ OBRAZ, DIAGNOSTIKA A LIEČBA. *Via practica*, 5(1), 6-13.

- 70) Sharan, D., & Rajkumar, J. S. (2017). Physiotherapy for Ankylosing Spondylitis: Systematic Review and a Proposed Rehabilitation Protocol. *Current rheumatology reviews*, 13(2), 121–125. <https://doi.org/10.2174/1573397112666161025112750>
- 71) Scherer, H. U., Häupl, T., & Burmester, G. R. (2020). The etiology of rheumatoid arthritis. *Journal of autoimmunity*, 110, 102400. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102400>
- 72) Schittenhelm, R. B., Sian, T. C., Wilmann, P. G., Dudek, N. L., & Purcell, A. W. (2015). Revisiting the arthritogenic peptide theory: quantitative not qualitative changes in the peptide repertoire of HLA-B27 allotypes. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, N.J.), 67(3), 702–713. <https://doi.org/10.1002/art.38963>
- 73) Souček, M, & Svačina, P. (2019). *Vnitřní lékařství v kostce*. Grada. ISBN: 978-80-2711-095-7
- 74) Suchý, D. (2003). REVMATOIDNÍ ARTRITIDA – DIAGNÓZA A LÉČBA. *Interní medicína pro praxi*, 5(7), 342-347.
- 75) Šenolt L, & Mann H. (2021). Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře. Accessed February 20. <https://docplayer.cz/3303973-Doporučene-diagnosticke-aterapeuticke-postupy-pro-vseobecne-practicke-lekare-revmatologie.html>
- 76) Šenolt, L. (2011). Současný pohled na diagnostiku a léčbu ankylozující spondylitidy. *Interní medicína pro praxi*, 13(10), 374-377.
- 77) Wu, C. Y., Yang, H. Y., Luo, S. F., & Lai, J. H. (2021). From Rheumatoid Factor to Anti-Citrullinated Protein Antibodies and Anti-Carbamylated Protein Antibodies for Diagnosis and Prognosis Prediction in Patients with Rheumatoid Arthritis. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 686. <https://doi.org/10.3390/ijms22020686>
- 78) Xie, Z., Yu, W., Zheng, G., Li, J., Cen, S., Ye, G., Li, Z., Liu, W., Li, M., Lin, J., Su, Z., Che, Y., Ye, F., Wang, P., Wu, Y., & Shen, H. (2021). TNF- α -mediated m6A modification of ELMO1 triggers directional migration of

mesenchymal stem cell in ankylosing spondylitis. *Nature communications*, 12(1), 5373. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25710-4>

79) Zampeli, E., & Moutsopoulos, H. M., (2020). *Immunology and Rheumatology in Questions*. Springer International Publishing. ISBN: 978-30-3056-670-8

80) Zima, T. (2007). *Laboratorní diagnostika* (2., dopl. a přeprac. vyd). Galén. ISBN: 978-80-7262-372-3

Seznam obrázků

Obrázek 1: Pozitivní a negativní kontrola; Zdroj: Vlastní.....	51
Obrázek 2, Real-time PCR všech vzorků spolu s PK a NK; Zdroj: Vlastní.....	52
Obrázek 3, Pozitivní vzorky 7, 12, 13; Zdroj: Vlastní.....	53
Obrázek 4, Nevalidní vzorky; Zdroj: Vlastní.....	54
Obrázek 5, Pozitivní kontrola u komparačního stanovení real-time PCR; Zdroj: Vlastní.....	55
Obrázek 6, Vzorek č. 5; Zdroj: Vlastní.....	55
Obrázek 7, Vzorek č. 20; Zdroj: Vlastní.....	55

Seznam tabulek

Tabulka 1, Klasifikace revmatických onemocnění dle Pavelky.....	11
Tabulka 2, Klasifikační kritéria ACR/EULAR z roku 2010	19
Tabulka 3, Rentgenová stádia podle strukturálních změn sakroiliakálního kloubu.....	33
Tabulka 4, Průkaz pokročilého stádia nemoci.....	34
Tabulka 5, Přehled probandů.....	42
Tabulka 6, Měření koncentrací izolovaných vzorků.....	45
Tabulka 7, Složení a popis komponent soupravy gb GENETIC HLA-B27.....	46
Tabulka 8, Nastavení reakčních profilů gb GENETIC HLA-B27.....	47
Tabulka 9, Složení a popis komponent soupravy EliGene Spondylitis HLA-B27.....	47
Tabulka 10, Nastavení reakčních profilů EliGene Spondylitis HLA-B27 RT.....	48
Tabulka 11, Koncentrace a nečistoty DNA.....	49
Tabulka 12, Zhodnocení měření koncentrací izolovaných vzorků.....	50
Tabulka 13, Komparační měření koncentrací a nečistot DNA.....	56

Seznam zkratek

DNA – deoxyribonukleová kyselina

HLA – systém lidských leukocytárních antigenů

PCR – polymerázová řetězová reakce

RA – revmatoidní artritida

AS – ankylozující spondylitida/Bechtěrevova choroba

TNF- α – tumor necrosis factor- α

IL-1 β – interleukin-1 β

IL-17 – interleukin-17

RF – revmatoidní faktor

AMPA – protilátky proti posttranslačně modifikovaným proteinům; anti modified protein antibodies

ACPA – protilátky proti posttranslačně modifikovaným proteinům citrulinací

aCarP – protilátky proti posttranslačně modifikovaným proteinům karbamylací

AAPA – protilátky proti posttranslačně modifikovaným proteinům acetylací

ROS – reaktivní formy kyslíku

MHC – hlavní histokompatibilní komplex/major histocompatibility complex

CRP – C-reaktivní protein

ACR – americké kolegium revmatologie/American college of Rheumatology

EULAR – Evropská liga proti revmatismu/ European league against Rheumatism

FW – sedimentace dle Fahraeuse a Westergrena

mg/ μ l – miligram na mikrolitr

Ig – imunoglobulin

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

Anti-CCP – protilátky proti cyklickým citrulinovaným peptidům

EU/ml – endotoxinové jednotky na mililitr; endotoxin units per mililiter

RNA – ribonukleová kyselina

Ca – vápník

Mg – hořčík

Se – selen

Zn – zinek

RTG – rentgenová skiografie

CO₂ – oxid uhličitý

NO – oxid dusný

NSAID – nesteroidní protizánětlivé léky

PKB – Proteinase K Buffer

BOZP – bezpečnost a ochrana zdraví při práci

DMARD – léky modifikující průběh onemocnění

JAK – Janus kináza

SI – sakroiliakální

EU – Evropská unie

CD – cluster of differentiation

tj. – to jest

TCR – receptor cytotoxických T-lymfocytů

FHC – forma volného těžkého řetězce

ml – mililitr

NSA – nesteroidní antirevmatika

SONO – sonografické vyšetření

NK – přirození zabíječi; natural killers

ER – endoplazmatické retikulum

MRI – magnetická rezonance; magnetic resonance imaging

C1-C2 – krční obratle 1-2

Th12 – hrudní obratel 12

cm – centimetr

BASMI – Bath ankylosing spondylitis index

BS – bukální stěr

PK – periferní krev

PZ – predispoziční znaky

ZJ – zdravý jedinec

Rpm/min – otáčky za minutu

ng/ μ l – nanogram na mikrolitr

nm – nanometr

qPCR – real-time polymerázová řetězová reakce

μ l – mikrolitr