

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Výskyt antigenu HLA-B27 u pacientů vyšetřovaných
pro podezření revmatologického onemocnění**

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Vít Řeháček

Konzultant: Mgr. Kamila Synková

HRADEC KRÁLOVÉ, 2016

Zuzana Lipenská

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu MUDr. Vítu Řeháčkovi, vedoucímu mé bakalářské práce a Mgr. Kamile Synkové za odborné vedení a cenné rady a připomínky, které mi pomohly zpracovat tuto bakalářskou práci.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Obsah

1.	ABSTRAKT	6
2.	ABSTRACT	7
3.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
4.	ÚVOD.....	10
5.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	11
6.	TEORETICKÁ ČÁST	12
6.1	HLA SYSTÉM	12
6.2	MOLEKULY HLA I. TŘÍDY.....	13
6.2.1	KLASIFIKACE HLA I. TŘÍDY	13
6.2.2	UMÍSTĚNÍ HLA I. TŘÍDY.....	13
6.2.3	STRUKTURA HLA I. TŘÍDY.....	13
6.2.4	FUNKCE HLA I. TŘÍDY	14
6.3	MOLEKULY HLA II. TŘÍDY.....	14
6.3.1	KLASIFIKACE A UMÍSTĚNÍ HLA II. TŘÍDY.....	15
6.3.2	STRUKTURA HLA II. TŘÍDY.....	15
6.3.3	FUNKCE HLA II. TŘÍDY	15
6.4	MOLEKULY HLA III. TŘÍDY.....	16
6.5	DĚDIČNOST HLA SYSTÉMU	16
6.6	POLYMORFISMUS HLA SYSTÉMU	16
6.7	NOMENKLATURA HLA SYSTÉMU	17
6.8	TYPIZACE HLA SYSTÉMU.....	18
6.8.1	SÉROLOGICKÉ METODY	18
6.8.2	MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ METODY	19
6.9	HLA PROTILÁTKY.....	20
6.9.1	LYMFOCYTOTOXICKÝ TEST.....	20
6.9.2	ELISA TEST.....	20
6.9.3	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	21
6.10	ASOCIACE HLA A NEMOCÍ	21

6.10.1	SÉRONEGATIVNÍ SPONDYLARTRITIDY	23
7.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
7.1	POUŽITÁ METODA A MATERIÁL	26
7.1.1	SÉROLOGICKÁ TYPIZACE ANTIGENŮ HLA-B27	26
7.1.1.1	Preanalytická fáze	26
7.1.1.2	Přístroje a pomůcky	27
7.1.1.3	Reagencie	28
7.1.1.4	Princip.....	28
7.1.1.5	Postup.....	28
	7.1.1.5.1 Izolace periferních lymfocytů pomocí hustotního gradientu	29
	7.1.1.5.2 LCT s periferními lymfocyty	29
7.1.1.6	Výsledky, hodnocení	29
7.2	ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH DAT.....	31
8.	VÝSLEDKY	32
8.1	VÝSKYT ANTIGENU HLA-B27 U VYŠETŘOVANÝCH OSOB ZA ROK 2015	32
8.2	VÝSKYT ANTIGENU HLA-B27 U ŽEN A MUŽŮ	33
8.3	VÝSKYT ANTIGENU HLA-B27 V ZÁVISLOSTI NA VĚKU	34
8.4	VÝSKYT ANTIGENU HLA B-27 U MUŽŮ A ŽEN V ZÁVISLOSTI NA POHLAVÍ A VĚKU	36
8.5	VÝSKYT ANTIGENU HLA-B27 VE VZTAHU K DIAGNÓZE PACIENTA	38
9.	DISKUSE	44
10.	ZÁVĚR	47
11.	SEZNAM ROVNIC.....	48
12.	SEZNAM TABULEK	49
13.	SEZNAM OBRÁZKŮ	50
14.	SEZNAM GRAFŮ	51
15.	POUŽITÁ LITERATURA	52

1. ABSTRAKT

Autor: Zuzana Lipenská

Název: Výskyt antigenu HLA-B27 u pacientů vyšetřovaných pro podezření revmatologického onemocnění

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Zdravotní laborant

Cíl práce: Přehled výskytu antigenu HLA B-27 u pacientů vyšetřovaných pro podezření na revmatologické onemocnění v roce 2015.

Metody: Vzorky pacientů vyšetřovaných na výskyt antigenu HLA-B27 v HLA laboratoři Transfuzního oddělení ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové se vyšetřují sérologickou metodou. Nejprve se provede izolace periferních lymfocytů pomocí hustotního gradientu, poté lymfocytotoxický test s periferními lymfocyty.

Výsledky: V roce 2015 bylo vyšetřeno 1329 pacientů. Osob s antigenem HLA-B27 bylo 207, bez antigenu 1122. Z celkového počtu vyšetřených pacientů bylo vyšetřeno 754 žen a 575 mužů. Pozitivních žen bylo nalezeno 108 a mužů 99. Nejvyšší výskyt antigenu HLA-B27 je zaznamenán ve skupině 20-29 letých, další mírný vzrůst byl ve skupině 10-19 letých a 40-49 letých. Vyšetřovaní měli především skupinovou diagnózu nemoci svalové a kosterní soustavy s nejfrekventovanější diagnózou dorzalgie (M54).

Závěry: Asociace mezi antigenem HLA-B27 a chorobami je již dávno prokázána, ovšem není odhalen přesný mechanismus, který spojení mezi HLA systémem a nemocemi podmiňuje. Nejznámější je asociace molekuly HLA-B27 s řadou nespecificky zánětlivých onemocnění např. ankylózuující spondylitidou.

Klíčová slova: HLA systém, HLA-B27 antigen, vyšetřování HLA antigenů, HLA laboratoř, transfuzní oddělení, protilátka, revmatologické onemocnění, imunita

2. ABSTRACT

Author: Zuzana Lipenská

Title: Occurrence of HLA-B27 antigen in patients examined for suspected rheumatological diseases

Bachelor's Thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Field of study: Medical Laboratory Technician

Background: The aim of the study of HLA B27 antigen in patients investigated for suspected rheumatological disease in 2015.

Methods: Patient samples examined for the presence of antigen HLA-B27 in the HLA laboratory of the Transfusion Department, University Hospital Hradec Kralove are processed using the serological method. First is used the isolation of peripheral blood lymphocytes using a density gradient, thereafter lymphotoxical test with peripheral lymphocytes.

Results: In 2015 were examined 1,329 patients. 207 persons had the HLA-B27, 1122 persons did not. Of the total number of examined patients were examined 754 women and 575 men. Positive was found 108 women and 99 men. The highest incidence of HLA-B27 was observed in the group of 20-29 years old, another slight increase was in the group of 10-19 years old and 40-49 years old. The examined persons had mainly a group diagnosis of disease of the musculoskeletal system with the most frequently diagnosed dorsalgia (M54).

Conclusions: The association between HLA-B27 antigen and the diseases has been proven long ago but the exact mechanism which makes the link between the HLA system and diseases has not been revealed yet. The best known association is the association of the molecule HLA-B27 with many non-specific inflammatory diseases e.g. ankylosing spondylitis.

Keywords: HLA system, HLA-B27 antigen, HLA antigens investigation, HLA laboratory, department of transfusion, antibody, rheumatological disease, immunity

3. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AR	absolutní riziko
AS	ankylozující spondylitida
B	histokompatibilní systém slepic
C2	složka komplementu
C4	složka komplementu
CD4	diferenciační skupina povrchových glykoproteinů přítomných na vnější straně cytoplazmatické membrány pomocných T-lymfocytů
CD8	diferenciační skupina povrchových bílkovin přítomných na vnější straně cytoplazmatické membrány cytotoxických T-lymfocytů
CMT	křížové zkoušky (cross-match)
CREGs	křížově reagující skupiny (cross-reactive groups)
dATP	deoxyadenozintrifosfát
dCTP	deoxycytozintrifosfát
ddNTP	dideoxyribonukleotid
dGTP	deoxyguanozintrifosfát
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
dTTP	deoxytymidintrifosfát
H2	histokompatibilní systém myši domácí
HLA	hlavní histokompatibilní komplex člověka (Human Leukocyte Antigens)
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
LCT	lymfocytotoxický test
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)
MIC	MHC class I chain-related genes
MICA	produkt genů z rodiny MIC
MICB	produkt genů z rodiny MIC

NK	přírozně zabíječské buňky (natural killer cells)
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PCR-SSO	PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidy
PCR-SSP	PCR se sekvenčně specifickými primery
PsA	Psoriatická artritida
ReA	reaktivní artritidy
RR	relativní riziko
RS	Reiterův syndrom
SBT	přímé sekvenování
Taq	polymeráza z kmene bakterie <i>Thermus aquaticus</i>

4. ÚVOD

Revmatologická onemocnění postihují pohybový aparát - klouby, kosti, páteř, svaly, vazy, šlachové úpony, mohou způsobit dlouhodobé následky a léčení je často až celoživotní. Revmatologické choroby významně ovlivňují funkci aparátu a zhoršují kvalitu života. Do jisté míry je možné ovlivnit jejich průběh, pokud nebude podceňována správná životospráva, ke které také patří přiměřená tělesná hmotnost a dostatek pravidelného pohybu.

Revmatologická onemocnění mají odlišné klinické projevy - jsou heterogenní s imunopatologickým základem. Imunopatologie souvisí s molekulami Major Histocompatibility Complex (MHC), které rozlišují antigeny „cizí“ od „vlastních“. U lidí se tyto molekuly označují jako Human Leukocyte Antigens (HLA). Molekuly HLA jsou rozděleny na molekuly HLA I. třídy, II. třídy a III. třídy. Molekuly HLA tvoří vazebná místa pro antigenní fragmenty, které předkládají T-lymfocytům. (Jílek, 2008)

Jednotlivé HLA antigeny se vyšetřují dvěma hlavními metodami - sérologickou a molekulárně-genetickou metodou. Mezi nejpoužívanější sérologickou metodu patří lymfocytotoxický test, významné molekulárně-genetické metody jsou na principu polymerázové řetězové reakce (PCR).

5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je zpracovat a předložit výsledky výskytu antigenu HLA B-27 u osob vyšetřovaných pro podezření revmatologického onemocnění v roce 2015 v laboratoři Transfuzního oddělení ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové.

V **teoretické části** je cílem:

- popsat HLA systém, HLA antigeny, strukturu a význam systému
- seznámit s klasifikací HLA molekul do tří tříd
- vysvětlit problematiku dědičnosti HLA antigenů
- popsat metody vyšetřování HLA antigenů
- uvést příklady vztahu HLA a onemocnění

V **praktické části** bakalářské práce je cílem:

- popsat metodiku vyšetřování antigenu HLA B-27, která se používá v laboratoři Transfuzního oddělení Fakultní nemocnice v Hradci Králové
- provést rozbor a statistické zpracování získaných dat
- popsat ve vyšetřovaném souboru závislost výskytu HLA-B27 na pohlaví, věku pacientů a na diagnóze, pro kterou byli odesláni k vyšetření

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 HLA SYSTÉM

Na povrchu buněk všech orgánů, především imunitního systému, se nacházejí membránové glykoproteiny, které podmiňují tkáňovou neslučitelnost mezi nepříbuznými jedinci, histokompatibilitu. Histokompatibilita je nezbytným předpokladem provedení transplantace. Jednovaječná dvojčata patří mezi geneticky shodné jedince, a proto transplantáty mezi jejich těly přežívají dlouhodobě. Z těchto faktů vyplývá, že imunitní systém je schopen rozeznat vlastní tkáň od cizích a reagovat na ně jako na antigeny. (Penka a spol., 2012) (Jílek, 2008)

Charakter molekul na povrchu histokompatibilních antigenů je určován genetickým systémem, který se nazývá Major Histocompatibility Complex (MHC). Geny kódující molekuly MHC jsou seskupené v malé chromozomové oblasti v důsledku opakované duplikace, mutací prvotního genu MHC během vývoje. MHC je obecný název pro všechny živočišné druhy, u myši je to H2, u slepic jsou to molekuly B, u potkanů Rt1, u šimpanzů CHLA a u lidí Human Leukocyte Antigens (HLA). (Stites a Terr, 1994) (Buc, 1989)

HLA systém byl objeven v padesátých letech s objevem protilátek aglutinujících bílé krvinky v sérech nemocných pacientů po transfuzích krve a u 20-30 % žen po opakovaném těhotenství. Zjistilo se, že je důležité hledat a studovat antigeny HLA pro úspěch transplantace orgánů a také pro jejich asociaci se specifickými nemocemi. (Stites a Terr, 1994)

Lidský MHC systém je vysoce polymorfní. Každý člověk má na povrchu svých buněk jedinečnou sestavu molekul HLA I. a II. třídy, výjimkou jsou jednovaječná dvojčata. Molekuly jsou kódované dvojicemi alel. Geny s alelami pro molekuly HLA jsou multialelické. Geny jsou u lidí umístěny na 6. chromozomu a jsou kodominantní, vyjadřují se současně. (Penka a spol., 2012)

Rozlišujeme molekuly HLA I., II. a III. třídy. Třídou I. a II. je možné rozlišit podle jejich struktur, rozložení v tkáních a funkce. (Stites a Terr, 1994)

Hlavní funkcí molekul HLA neboli molekul tkáňové slučitelnosti je předkládat cizorodé antigenní fragmenty. T-lymfocyty rozpoznávají antigeny pouze navázané na žlábký HLA molekuly, které představují největší strukturní odlišnost mezi HLA molekulami. Buňky T se znaky CD8⁺ (obecně cytotoxické) rozpoznávají antigeny z endogenních cizorodých částic ve spojení s molekulami HLA I. třídy a buňky T se znaky CD4⁺ (obecně pomocné) rozpoznávají antigeny z exogenních cizorodých částic s molekulami HLA II. třídy. Vývoj T-lymfocytů probíhá v thymu, ty buňky T, které rozpoznávají vlastní antigeny s HLA, jsou odstraňovány a buňky T rozpoznávající cizí antigeny jsou zachovány. Pokud dojde k defektu při odstraňování buněk T rozpoznávajících vlastní antigeny, může dojít k rozvinutí autoimunitního onemocnění. V opačném případě je možný vznik těžkých infekcí, nekontrolovatelného rozvinutí nádorů. (Řeháček a spol., 2013) (Jílek, 2008) (Stites a Terr, 1994)

6.2 MOLEKULY HLA I. TŘÍDY

Molekuly HLA I. třídy jsou také nazývány klasickými histokompatibilitními molekulami. Důležitá je především jejich klasifikace, umístění, struktura a funkce. (Stites a spol., 1994)

6.2.1 KLASIFIKACE HLA I. TŘÍDY

Do HLA I. třídy patří okolo dvaceti genů. Mezi nejdůležitější patří klasické antigeny HLA-A, HLA-B, HLA-C nacházející se nejdále od centromery a vyznačující se vysokým polymorfismem. Neklasické HLA-E, HLA-F, HLA-G antigeny jsou méně polymorfní. (Penka a spol., 2012)

Místo v HLA I. třídy zauímají také molekuly rodiny MIC. Produkty genů z rodiny MIC - MICA a MICB se nenachází na lymfocytech, jako je tomu u HLA antigenů, ale nachází se na epitelových buňkách, hlavně střevní sliznice a na fibroblastech, kde mají funkci slizniční imunitní odpovědi. (Krejsek a Kopecký, 2004)

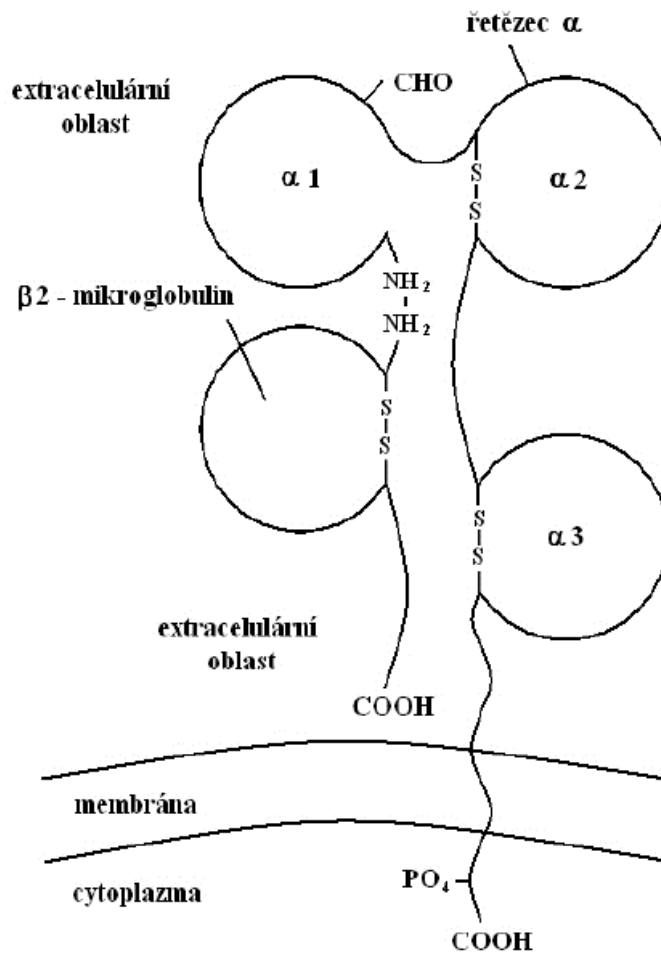
6.2.2 UMÍSTĚNÍ HLA I. TŘÍDY

HLA antigeny I. třídy se nacházejí v nestejném množství v membráně všech jaderných buněk, tedy ne na erytrocytech. Klasické antigeny můžeme nejvíce nalézt na T- a B-lymfocytech, trombocytech a granulocytech, méně na buňkách centrálního nervového systému, svalových a endokrinních. Neklasické antigeny jsou typické pro většinu somatických buněk, HLA-G jsou pouze na trofoblastech. (Fučíková, 1995) (Řeháček a spol., 2013)

6.2.3 STRUKTURA HLA I. TŘÍDY

Molekuly této třídy se skládají z těžkého neboli transmembránového glykoproteinového řetězce α a nekovalentně se vázajícího β 2-mikroglobulinu. Řetězec α se rozděluje na extracelulární hydrofilní oblast, transmembránovou hydrofóbní oblast a intracelulární hydrofilní oblast. Extracelulární oblast obsahuje tři podjednotky α_1 , α_2 , α_3 . Vazebné místo pro antigenní fragment o délce 8 - 10 aminokyselin se nachází mezi podjednotkou α_1 a α_2 . (Stites a spol., 1994) (Penka a spol., 2012)

Obrázek 6.2.3-1 Struktura HLA I. třídy



(Penka a spol., 2012)

6.2.4 FUNKCE HLA I. TŘÍDY

Všechny buňky, na které jsou navázány molekuly HLA I. třídy, mohou upozornit a mobilizovat T-lymfocyty, CD8⁺, pokud dojde k napadení buněk viry nebo jsou nádorově změněné. Tato schopnost je nazývána HLA restrikce. HLA-G a HLA-E molekuly slouží k ochraně plodu před T a NK buňkami. (Fučíková, 1995) (Penka a spol., 2012)

Antigenní fragment, který se nachází ve vazebném místě - žlábkách HLA molekul, je tvořen oligopeptidy pocházející z vlastní produkce buňky. Antigen je v komplexu s HLA I. třídy rozeznán a dojde k obranné imunitní reakci. (Jílek, 2008)

6.3 MOLEKULY HLA II. TŘÍDY

Molekuly HLA II. třídy jsou spolu s molekulami HLA I. třídy dvěma nejvýznamnějšími skupinami HLA tříd. Důležitá je jejich klasifikace, struktura a funkce. Na rozdíl od I. třídy má II. třída méně širokou tkáňovou distribuci. (Stites a spol., 1994)

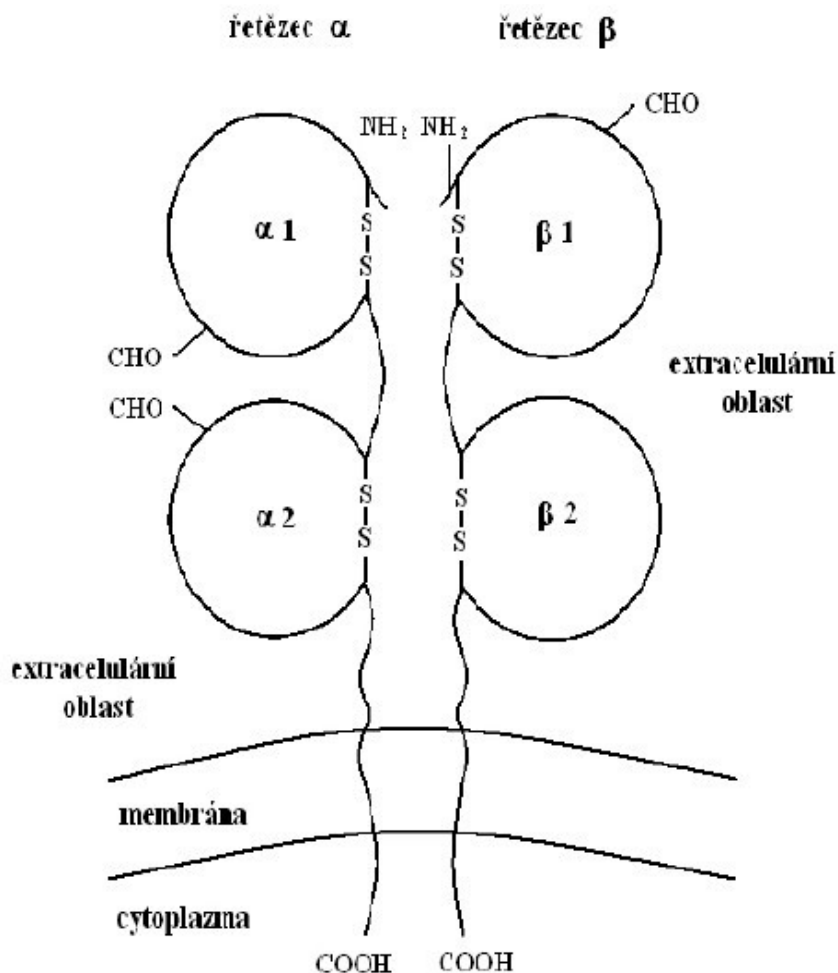
6.3.1 KLASIFIKACE A UMÍSTĚNÍ HLA II. TŘÍDY

Do HLA II. třídy patří molekuly HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP a jsou přítomny na monocytech, makrofázích, neutrofilech, lymfocytech B, aktivovaných lymfocytech T, na dendritických buňkách. (Lokaj, 1988)

6.3.2 STRUKTURA HLA II. TŘÍDY

Molekula HLA II. třídy se skládá ze dvou nekovalentně vázaných glykoproteinových řetězců - těžkého α a lehkého β . Řetězce obsahují extracelulární hydrofilní oblast, transmembránovou hydrofobní oblast, intracelulární hydrofilní oblast. Transmembránové a intracelulární oblasti jsou ukotveny v membráně. Extracelulární oblast řetězce α má domény $\alpha 1$ a $\alpha 2$, oblast řetězce β má domény $\beta 1$ a $\beta 2$. Vazebné místo pro antigenní fragment je ve žlábkku mezi $\alpha 1$ a $\beta 1$ podjednotkou. (Stites a spol., 1994)

Obrázek 6.3.2-1 Struktura HLA II. třídy



(Penka a spol., 2012)

6.3.3 FUNKCE HLA II. TŘÍDY

Hlavní funkcí molekul HLA II. třídy je předkládat antigenní fragmenty v komplexu s HLA II. třídy lymfocytům T, CD4⁺, během nástupu imunitní odpovědi. Fragmenty jsou z antigenů, které buňka zachytila nebo pohltila v okolí. Buňky, které za normálních podmínek neobsahují molekuly HLA II. třídy, je mohou navázat po indukci, což je důležitý fakt při vysvětlování asociace HLA a nemocí. (Stites a spol., 1994) (Penka a spol., 2012)

6.4 MOLEKULY HLA III. TŘÍDY

Do HLA III. třídy patří téměř 50 genů. Třída je rozdělena na dvě skupiny:

- Do první skupiny patří geny pro složky komplementu - C2 a C4, properdinový faktor B, 21-hydroxylázu, geny kódující stresové proteiny, které slouží jako chaperonové molekuly.
- Druhá skupina zahrnuje tumor nekrotizující faktor α , lymfotoxin. Molekuly této třídy funkčně nesouvisí s aktivitou HLA systému, jsou rozpustné a nepůsobí jako transplantační antigeny. (Krejsek a spol., 2004) (Penka a spol., 2012)

6.5 DĚDIČNOST HLA SYSTÉMU

HLA systém se nachází na krátkém raménku 6. chromozomu spolu s dalšími asi 200 geny a vytvářejí HLA komplex. Systém se vyznačuje vysokou koncentrací genů na relativně krátkém úseku deoxyribonukleové kyseliny (DNA). (Krejsek a spol., 2004)

Jedinec dědí od každého z rodičů jeden chromozom, na jehož lokusu se nachází kombinace alel, která představuje jednotku dědicí se jako haplotyp. Každý jedinec proto nese dva haplotypy, jeden získaný od matky, druhý od otce. Soubor haplotypů vytváří genotyp. (Stites a spol., 1994) (Penka a spol., 2012)

Lokus může obsahovat maximálně dvě alely, ty jsou kodominantní, tedy obě alely z lokusu jsou exprimovány a na povrchu buněk je možné zjistit dvě kompletní sady antigenů HLA od každého z rodičů. Fenotypově se projeví alely zděděné od matky i otce, vyšetřují se pomocí sérologických metod. (Stites a spol., 1994) (Penka a spol., 2012)

Dědičnost HLA systému se řídí Mendelovými zákony, podle kterých je 25% pravděpodobnost identických potomků, kdy dva sourozenci budou sdílet oba shodné haplotypy, 50% pravděpodobnost, že potomci se budou shodovat v jednom haplotypu, 25% pravděpodobnost odlišného haplotypu. (Stites a spol., 1994) (Penka a spol., 2012)

Frekvence určitých alel na dvou lokusech HLA je mnohdy zcela jiná než podle očekávání. Tento jev je nazýván vazebná nerovnováha a definuje se jako rozdíl mezi pozorovanou frekvencí a frekvencí očekávanou. (Stites a spol., 1994)

6.6 POLYMORFISMUS HLA SYSTÉMU

HLA systém je komplexní a polymorfní. Komplexní znamená, že obsahuje více než dva lokusy a polymorfní je, pokud daný lokus má více než dvě alely. Výjimkou je lokus, který kóduje α řetězec molekul HLA-DR, ten je monomorfní. Na ostatních lokusech se nachází jedna z mnoha alel. Během rozmnožování, tedy kombinace haplotypů, mají potomci jednoho páru pravděpodobnost 1:4, že budou mít stejné oba haplotypy. (Penka a spol., 2012) (Krejsek a spol., 2004)

Existují desítky až stovky různých alelických forem, které se liší kombinacemi až ve 20 aminokyselinách. Projevy jsou znatelné především na N-koncích části řetězců HLA molekul vytvářejících vazebná místa pro antigenní fragmenty. Rozdíly v aminokyselinovém složení mezi molekulami HLA I. a II. třídy se projeví odlišnou antigenní charakteristikou, což je hlavní prvek pro sérologické odlišení jednotlivých molekul HLA systému. (Penka a spol., 2012) (Krejsek a spol., 2004)

Polymorfismus má pro jedince i populaci ochranný význam. V případě, že by buňka obsahovala pouze jeden typ HLA alel, patogeny by se mohly vyhnout imunitní odpovědi hostitele, protože by bylo obtížné získat peptidy vážící se na alelu z proteinu daného patogenu. Unikátní sestava HLA alel zajistí pestré složení HLA molekul a je velká pravděpodobnost, že antigen bude úspěšně prezentován a bude na něj rozvinuta imunitní odpověď. (Hořejší a spol., 2009)

6.7 NOMENKLATURA HLA SYSTÉMU

Nomenklaturu neboli názvosloví HLA systému stanovuje Nomenklaturní komise Světové zdravotnické organizace (WHO). Používají se dva typy nomenklatury:

- **Sérologická nomenklatura**

Nomenklatura je založena na sérologickém nebo celulárním určování genových HLA produktů. Velkými písmeny jsou označovány lokusy - A, B, C, DR, DQ, DP a číslem specifita antigenu. HLA antigeny dělíme do tří skupin:

- Antigeny základní - např. A9, A10, B40, DR3
- Antigeny splitové - např. A9, který je rozdělen na A23, 24 nebo A10, který je rozdělen na A25, 26, 34
- Antigeny obecné - např. antigeny DR51, DR52, DR53 na lokusu DR

- **Molekulárně-genetická nomenklatura**

Molekulárně-genetická nomenklatura určuje alelové nukleotidové sekvence. Tato nomenklatura nabízí označení HLA specifity minimálně dvěma číslicemi, oproti sérologické, která používá značení maximálně dvoumístné.

- Molekuly HLA I. třídy

Vzorovým příkladem je HLA-A*0101, kde velká písmena označují lokusy, první dvě číslice po * označují sérologickou specifitu. Druhé dvě číslice určují specifickou alelu.

➤ Molekuly HLA II. třídy

U molekul HLA II. třídy je názvosloví složitější. Příkladem je DRB1*0401. První písmeno označuje třídu, druhé rodinu, třetí α nebo β řetězec. Následující první dvě číslice za * označují sérologickou specifitu a poslední dvě konkrétní alelu. (Penka a spol., 2012) (Krejsek a spol., 2004) (Stites a spol., 1994)

6.8 TYPIZACE HLA SYSTÉMU

Stanovení HLA molekul je nejdůležitější především v transplantační imunologii, pro zjištění asociace s autoimunitní imunopatologickou nemocí, případně s infekčním onemocněním. Typizace se využívá také v kriminalistice nebo k určení paternity. (Krejsek a spol., 2004)

HLA výbavu člověka lze zjistit dvěma postupy:

- Sérologickou metodou k identifikaci dané HLA molekuly
- Molekulárně-genetickou metodou k určení HLA alely na úrovni nukleové kyseliny

6.8.1 SÉROLOGICKÉ METODY

Sérologické metody slouží k rozlišení molekul HLA I. a II. třídy na základě antigenních rozdílů podmíněných aminokyselinovým složením polymorfních částí molekul HLA. Metoda využívá typizační séra, která je možné např. získat z krve matky po porodu minimálně dvou dětí v případě, že plod zdědil HLA molekuly po otci. Imunitní systém matky zareaguje na odlišné HLA molekuly plodu a začne vytvářet protilátky. Po třetím těhotenství se získají séra obsahující dostatek protilátek proti HLA molekulám plodu. HLA protilátky se vyskytují trvale až u 20% žen po opakovaných těhotenstvích, nejčastěji se jedná o protilátky třídy IgG. Další možností, jak získat HLA protilátky, je transfuze nebo transplantace. (Krejsek a spol., 2004) (Řeháček a spol., 2013)

HLA typizace je prováděna **lymfocytotoxickým testem (LCT)** na Terasakiho destičkách s předkapanými typizačními séry. Séra tvoří testovací panel, ve kterém jsou protilátky proti HLA antigenům. Lymfocyty pacienta se smísí a inkubují s typizačním sérem, poté se přidá komplement. (Penka a spol., 2012)

K pozitivní reakci dojde v případě, pokud se protilátky ze séra naváží na buňky pacienta a po přidání komplementu dojde k lýze buněk. Výsledek lze pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem po navázání vitálního barviva na DNA rozpadlých buněk. Buňky živé se neobarví, reakce je negativní. (Krejsek a spol., 2004)

Značnou nevýhodou tohoto stanovení je, že některé antigeny HLA systému náleží do tzv. křížově reagující skupiny (CREGs – cross-reactive groups). Tyto antigeny reagují s více séry a to

může mít za následek falešně pozitivní výsledek. Slabá exprese HLA molekul na buňkách pacientů může způsobit falešně negativní výsledek. Obtížnější typizace je také u nádorových buněk nebo buněk se sníženou životností. (Penka a spol., 2012)

6.8.2 MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ METODY

Metoda je nejčastěji prováděna polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Tímto způsobem je možné namnožit daný úsek DNA. PCR je využívána např. k diagnostice chorob nebo v kriminalistice. K reakci jsou potřeba především specifické primery, DNA polymeráza, a deoxyribonukleotidy. (Genetics Learn, 2008)

Primery jsou krátké, syntetické úseky DNA se specifickými sekvencemi komplementárními k bázím na horním a dolním konci úseku DNA, který je potřeba namnožit. Primery slouží k ohraničení replikovaného úseku. (Genetics Learn, 2008)

DNA polymeráza je enzym, jehož funkcí je vznik fosfodiesterových vazeb, teda vznik nového vlákna DNA. Polymeráza se rozkládá při teplotě okolo 95 °C. Nejčastěji je používána termostabilní Taq polymeráza z kmene bakterie *Thermus aquaticus*, která má teplotní optimum přibližně 72 °C, v tomto případě není třeba po denaturaci opět přidávat DNA polymerázu. (Genetics Learn, 2008)

Deoxyribonukleotidy tvoří směs čtyř typů nukleotidů - deoxadenozintrifosfátu (dATP), deoxytymidintrifosfátu (dTTP), deoxyguanozintrifosfátu (dGTP), deoxycytozintrifosfátu (dCTP). DNA polymeráza zařazuje nukleotidy na konec primeru. (Genetics Learn, 2008)

Reakce probíhá ve třech krocích. První krok PCR je zahájen denaturací. Vzorek je třeba zahřát na teplotu vyšší než 90 °C, při níž se dvoušroubovice DNA rozdělí na dvě samostatná vlákna. Annealing je fáze, kdy dochází k ochlazení na teplotu 40-60 °C a navázání primerů. Při třetím kroku - extenzi se při teplotě 72 °C vytváří nové vlákno. (Roche molecular system inc., 2016)

Molekulárně-genetické metody se provádějí:

- **PCR se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP).** Používají se sady párových primerů. Pokud jsou zcela komplementární k dané DNA sekvenci, dojde k PCR reakci. Rozdělení DNA fragmentů nastane použitím elektroforézy v agarózovém gelu, přidá se fluorescenční barvivo a reakci je možné sledovat pod UV zářením. Svítící proužek značí pozitivní reakci. Identifikovat alely je možné z kombinace použitých primerů. (Řeháček a spol., 2013)
- **PCR se sekvenčně specifickými oligosondami (PCR-SSO).** Pomocí jednoho páru primerů dojde k amplifikaci dané části lokusu. Rozlišení alel probíhá reverzní hybridizací se sekvenčně specifickými DNA oligosondami. Vazba produktu amplifikace se sondou je zvýrazněna barevnou enzymatickou reakcí, fluorescencí nebo radioizotopem. (Řeháček a spol., 2013)
- **Přímým sekvenováním (SBT).** Slouží k určení pořadí nukleotidů a identifikaci nových HLA alel. Po amplifikaci se využívají fluorochromem značené

dideoxyribonukleotidy (ddNTP), které po navázání na daný úsek DNA zastaví jeho další množení. Vznikají různě dlouhé fragmenty DNA, které jsou vždy zakončeny ddNTP. Fragmenty se rozdělí na základě své délky na gelové koloně. Fluorescenci lze pozorovat pomocí laseru. (Řeháček a spol., 2013)

- **Metodou mikročipu.** Po navázání mikročipu k DNA dojde k hybridizaci a pomocí specifických analyzátorů je hybridizace hodnocena. Metoda mikročipu není v laboratořích příliš využívána. (Penka a spol., 2012)
- **HLA typizací průtokovým analyzátozem (Luminex).** Používají se mikročástice značené fluorochromy, které se využívají ke spojení s protilátkou nebo DNA sondou. Prvním krokem je amplifikace DNA, poté hybridizace s DNA sondami, které se váží na barevně značené mikročástice. Výsledky jsou zpracovány v průtokovém analyzátoru pomocí laseru. (Penka a spol., 2012)

6.9 HLA PROTILÁTKY

Anti-HLA protilátky vznikají imunizací během těhotenství, transfuzí nebo transplantací. Protilátky jsou nejčastěji cytotoxiny nebo aglutininy.

- Cytotoxiny vážou HLA antigeny a komplement. V místě výskytu antigenu naruší membránu a protilátka usmrtí buňku. Cytotoxiny patří do třídy IgG.
- Aglutininy se dělí na kompletní nebo inkompletní. Navazují se na povrch antigenních receptorů, mohou způsobit slepování leukocytů nebo shluk trombocytů. Aglutininy náleží do třídy IgG nebo IgM. (Hrubiško a spol., 1981)

Protilátky se vyšetřují lymfocytotoxickým testem (LCT), metodou ELISA a průtokovou cytometrií. (Řeháček a spol., 2013)

6.9.1 LYMFOCYTOTOXICKÝ TEST

Využívá se stejný princip jako u sérologické typizace. K vyšetření lze využít plazmu nebo sérum pacienta a panel buněk se známými HLA antigeny od dárců. Zjišťuje se procento reagujících protilátek a specifita anti-HLA protilátek. (Řeháček a spol., 2013)

Před transplantací je důležité aplikovat CMT - křížové zkoušky (cross-match). Zajistí se spojení plazmy nebo séra příjemce s lymfocyty daného dárce. Při pozitivním výsledku, tedy přítomnosti anti-HLA protilátek není možná transplantace od dárce. Výjimku představují protilátky třídy IgM, kvůli kterým se používá LCT s dithiotreitem. (Řeháček a spol., 2013)

6.9.2 ELISA TEST

HLA antigeny jsou navázány na dno jamek a v případě výskytu protilátek v séru se naváží na dané antigeny. Vazbu lze zviditelnit přidáním protilátek proti lidským imunoglobulinům spojených s enzymem, který způsobí barevnou reakci. Nenavázané protilátky

se odstraní promytím. ELISA test slouží k identifikaci a screeningu protilátek proti HLA antigenům I. a II. třídy. (Řeháček a spol., 2013)

6.9.3 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Důležitým krokem je inkubace séra pacienta s mikročásticemi potaženými HLA specifitami. Některé protilátky se na ně naváží, ostatní se promytím odstraní. Vazbu lze opět zviditelnit přidáním protilátek proti lidským imunoglobulinům, které jsou fluorescenčně označeny. Fluorescence se sleduje na průtokovém cytometru. Metoda slouží pro záchyt a identifikaci anti-HLA protilátek I. a II. třídy. (Řeháček a spol., 2013)

6.10 ASOCIACE HLA A NEMOCÍ

Průlom ve zkoumání vztahů mezi antigeny HLA systému a revmatickými chorobami nastal roku 1973, kdy byla prokázána asociace mezi antigenem HLA B-27 a ankylozující spondylitidou. Tento objev se stal motivací pro hledání dalších asociací. (Pavelka a spol., 2003)

Dnes jsou známy vztahy s více než 500 nozologickými jednotkami, více než 40 chorob představuje výrazné asociace s antigeny HLA-systému. Tyto choroby mají několik společných znaků:

- neznámou příčinu
- patofyziologický mechanismus
- dědičný typ rozložení
- slabou penetraci, proto se vztah nezdá jako absolutní asociaci s daným antigenem
- souvislost s imunologickými abnormalitami
- minimální vliv na reprodukci

(Stites a spol., 1994) (Pavelka a spol., 2003)

Mezi nejvýznamnější asociace patří vztah mezi HLA-B27 a ankylozující spondylitidou, HLA-DQ6 a narkolepsií, HLA-DQ2 a celiakií, HLA-DR2,DQ6 a roztroušenou sklerózou, HLADQ8/DQ2 a juvenilním diabetem, HLA-Cw6 a psoriázou, HLA-B35 a subakutní tyreoiditidou. (Pavelka a spol., 2003)

Tabulka 1 Asociace HLA systému s chorobami

Onemocnění	HLA znaky	RR
ankylozující spondylartritida (M. Bechtěrev)	B27	80 – 150

uveitida	B27	8 – 26
reaktivní artritida	B27	17 – 40
narkolepsie	DQA1*0102-DQB1*0602	40 – 129
celiakální sprue	(DQ2) HLA-DQA1*0501-DQB1*02 DQA1*0201-DQB1*02, (DQ8) HLA- DQA1*0301-DQB1*0302	10 – 50 [§] 6 – 15 [§]
revmatoidní artritida	DR4	4 – 11
psoriasis vulgaris	Cw6	10 – 25

(Řeháček a spol., 2013)

Asociace znamená zvýšenou frekvenci antigenu u nemocných vzhledem ke zdravé populaci. Jestliže se určitý antigen vyskytuje na jiném než 6. chromozomu, není spojován s HLA systémem a nemusí znamenat genetickou vazbu ani chorobu. (Stites a spol., 1994) (Pavelka a spol., 2003)

Vztah HLA antigenů a chorob se vyjadřuje relativním rizikem (RR). RR říká, kolikrát častěji se určitá choroba vyskytuje u osob s danými HLA znaky. (Řeháček a spol., 2013)

RR lze vypočítat následovně:

Rovnice 1 Relativní riziko

$$RR = \frac{p^+ \times c^-}{p^- \times c^+}$$

(Stites a spol., 1994)

p^+ = počet nemocných, u kterých se vyskytuje určitý antigen HLA

c^- = počet kontrol, kterým chybí určitý antigen

p^- = počet nemocných, kterým chybí určitý antigen HLA

c^+ = počet kontrol, které mají určitý antigen HLA

Platí vztah, čím vyšší RR, tím častěji se antigen vyskytuje u nemocné populace. (Stites a spol., 1994)

Pravděpodobnost skutečného onemocnění osoby, u které se vyskytuje HLA antigen s asociací k chorobě, vyjadřuje absolutní riziko (AR).

AR lze vypočítat následovně:

Rovnice 2 Absolutní riziko

$$AR = \frac{p^+}{c^+} \times P$$

(Stites a spol., 1994)

p^+ = počet nemocných, u kterých se vyskytuje určitý antigen HLA

c^+ = počet kontrol, které mají určitý antigen HLA

P = výskyt nemoci v celé populaci

(Stites a spol., 1994)

Podstata asociace se vyjadřuje dvěma způsoby:

- HLA antigeny se přímo účastní patogeneze onemocnění.
- HLA antigeny přímo nesouvisí s onemocněním, asociaci s chorobou odrážejí sekundárně jako markery.

(Pavelka a spol., 2003)

6.10.1 SÉRONEGATIVNÍ SPONDYLARTRITIDY

U spondylartritid byla prokázána asociace s antigenem HLA-B27 v roce 1973. Síla vazby se liší u různých typů spondylartritid, nejsilnější je u ankylozující spondylartritidy. Asociace s antigenem HLA-B27 je prokázána u většiny rasových a etnických skupin. HLA-B27 se pravděpodobně přímo účastní patogeneze spondylartritid. Účast je způsobená funkcí vazby a prezentace endogenního peptidu cytotoxickým T-lymfocytům. Při zkoumání spondylartritid se používají myši a potkani s vloženým lidským genem pro HLA-B27. (Pavelka a spol., 2003)

Spondylartritidy se u pacientů s pozitivním antigenem HLA-B27 rozvíjejí nejčastěji v mladším věku. Častější výskyt lze nalézt u uveitidy, balanitidy, periferní artritidy, postižení axiálního skeletu. HLA-B27 negativní pacienti mají vyšší výskyt psoriázy, enteropatií, s menším výskytem v rodinách. (Pavelka a spol., 2003)

Antigen HLA-B27 se skládá z několika subtypů. Dnes je zjištěno 23 alel označených B*2701 až B*2723. Důležitý je subtyp B*2705, z kterého vznikly další subtypy lišící se jednou až pěti aminokyselinami ve vazebném žlábků. Bělošská kavkazská populace je typická alelami HLA-B*705, B*2701 a B*2702. (Pavelka a spol., 2003)

Ankylozující spondylartritida (AS)

Ankylozující spondylartritida neboli Bechtěrevova choroba je forma artritidy postihující páteř, ale také klouby. Projevuje se zánětem kloubů v ramenou, bocích, žebrech, patě nebo drobných kloubů na ruce a nohou, způsobující bolest a zhoršují kvalitu života. Dlouhotrvající zánět může způsobit osifikaci vazů podél obratlů, což způsobuje nepohyblivost a pacient se

často uchyluje do předkloněné pozice. Zakřivení páteře se projevuje jako lumbální lordóza, hrudní hyperkyfóza s předsunutím hlavy, vyklenutí břicha. (Kucharská, 2006)

Obrázek 6.10.1-1 Zdravý a nemocný člověk



(Zýková, 2013)

Mezi další klinické příznaky patří:

- osteoporóza, zejména pokud má nemoc dlouhodobé trvání
- oční projevy - iritidy, iridocyklitidy
- kardiální potíže
- amyloidóza
- plicní postižení - spondylitická plicní fibróza s možnou sekundární bakteriální nebo plísňovou infekcí (Kucharská, 2006)

Hodnota RR je u evropské bělošské populace kavkazského původu 87, frekvence výskytu antigenu HLA-B27 u nemocných je 97% a v populaci 9%, u nemocných černochoů 48%. Predispoziční vliv má také HLA-B-60, riziko nemoci se s tímto antigenem zvyšuje 3-6 krát. (Pavelka a spol., 2003)

Diagnóza je založena na klinických a rentgenologických nálezech. Asociaci nelze pokládat za stoprocentní, protože většina osob s pozitivním nálezem antigenu HLA-B27 je zdravá, okolo 5-20 % těchto lidí trpí AS. Jednoduše lze říci, že negativní nález antigenu nevylučuje AS a pozitivní nepotvrzuje, pouze zvyšuje pravděpodobnost rozvoje AS. (Pavelka a spol., 2003)

Byla provedena studie marockého obyvatelstva, kde se vybralo 75 pacientů s diagnózou AS pro klinické projevy. Antigen HLA-B27 byl zjištěn u 64 % zkoumaných. Výskyt byl spojen s mladším věkem, při rodinné anamnéze a uveitidě. Ve skupině pozitivních

se vyskytovalo šest podtypů HLA-B27, mezi nejčastější patřily HLA-B27*2705 a B*2702. Antigeny HLA-BCw*02 a HLA-DRB*15 se zvýšeným výskytem mají predispoziční vliv. (Mouraghi a spol., 2015)

Psoriatická artritida (PsA)

PsA je spojená s psoriázou, u většiny pacientů má průběh benigní, ale u 20 % může jít o vážné kloubní destrukce s poruchou funkce. (Kuchařská, 2006)

Antigen HLA-B27 se vyskytuje u 20 % osob s touto nemocí, při postižení axiálního skeletu je výskyt 50-60%. Prokázala se také zvýšená frekvence antigenů HLA-B38, B39, B13, B17, Cw6, DR7, DQ3. Vztah mezi Cw6, HLA-B13 a B17 je primární. (Pavelka a spol., 2003)

Uveitida

Frekvence výskytu HLA-B27 u uveitidy neboli iridocyklitidy, která je asociována s AS, je okolo 50 %. Vztah s HLA-B27 lze pozorovat ve všech rasových a etnických skupinách, ale s rozdílným frekvenčním výskytem a silou asociace. Nejsilnější asociace a zároveň vyšší frekvence HLA-B27 a výskyt AS se nachází u bělošské populace kavkazského původu, slaběji u asijsko-americké rasy a zřídka u černochů. (Pavelka a spol., 2003)

Reiterův syndrom (RS)

Onemocnění je doprovázeno periferní artritidou, nespecifickou uretritidou a konjunktivitidou. Frekvence výskytu RS je u nemocných okolo 60-80 % a postihuje hlavně mladé muže ve věku 20-30 let. (Pavelka a spol., 2003) (Hána a spol., 1982)

Reaktivní artritidy (ReA)

Frekvence antigenu HLA-B27 je 33-90%. Hodnota závisí na tom, který mikroorganismus (*Yersinia*, *Shihella*, *Salmonell*, *Chlamydia*, *Campylobacter*) přispěl k rozvoji onemocnění. (Pavelka a spol., 2003)

Juvenilní spondylartropatie

Toto onemocnění se projevuje v dětském věku. U kavkazského původu jsou pozitivní především chlapci s průměrným věkem 4,5 let. Výskyt antigenu u postižených pacientů je více než 90%. (Pavelka a spol., 2003) (Hána a spol., 1982)

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem bylo popsat metodiku vyšetřování antigenu HLA B-27, která se používá v laboratoři Transfuzního oddělení ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové. Ze získaných dat byl proveden rozbor a statistické zpracování. Důraz byl kladen především na souvislost mezi pohlavím, věkem, diagnózou a výskytem vyšetřovaného antigenu.

7.1 POUŽITÁ METODA A MATERIÁL

Biologickým materiálem byly vzorky periferní krve pacientů s podezřením na onemocnění, které může být asociováno s HLA B27. Vyšetřování se provádělo sérologickou metodou, která je popsána v následující kapitole.

7.1.1 SÉROLOGICKÁ TYPIZACE ANTIGENŮ HLA-B27

7.1.1.1 Preanalytická fáze

Preanalytická fáze je soubor všech postupů a operací, kterými projde vzorek biologického materiálu od okamžiku vzniku požadavku na analýzu, do okamžiku, kdy je vzorek analyticky zpracován. Lékař, který odebírá vzorek, informuje pacienta o požadavcích na odběr. Každá laboratoř musí mít veřejně přístupnou Laboratorní příručku, ve které jsou uvedeny informace týkající se daného vyšetření. K odběru se používají jednorázové pomůcky a doporučené dezinfekční prostředky. Odebírá se 5 ml nesrážlivé krve do zkumavky označené zelenou barvou s heparinem sodným. Vzorek musí být správně označen štítkem, který umožní identifikaci pacienta. Zkumavka s krví pacienta obsahuje štítek se jménem, datem narození a datem odběru. Při odběru může nastat několik chyb:

- záměna zkumavky s jiným protisrážlivým činidlem
- nedostatečné množství vzorku pro analýzu
- nesprávný poměr protisrážlivého činidla a vzorku
- znečištění jehly stopami nezaschlého dezinfekčního prostředku
- použití příliš úzké jehly a násilné, rychlé nasávání krve
- prudké třepání krve ve zkumavce

Transport vzorků je možný dvěma způsoby:

- Individuálně - sanitář nebo jiná pověřená osoba donese materiál na oddělení
- Pravidelným svozem materiálu - probíhá v 9:00, 12:00 a 13:30 hod.

Vzorky jsou doneseny do přízemí budovy č. 19 (Transfuzní oddělení - nová budova), kde je vzorek vložen do označeného stojanu pro laboratoř č. 17 (Ústav klinické imunologie a alergologie, Ústav klinické mikrobiologie). K vyšetření je potřeba správně vyplněná žádanka od lékaře, na kterou se musí zaznamenat čas a datum doručení vzorku. Po telefonické výzvě si osobně přichází odpovědná osoba laboratoře č. 17 pro materiál, který přijímá ke zpracování. Správně vyplněná žádanka musí obsahovat tyto údaje:

- adresu a IČZ zdravotnického zařízení
- jméno a příjmení pacienta
- pohlaví pacienta
- rodné číslo pacienta
- zdravotní pojišťovnu pacienta
- diagnózu nemoci
- žádost o vyšetření
- datum odběru vzorku
- odebraný materiál (typ vzorku)
- IČO, jméno a podpis odesílajícího lékaře

Laboratoř odmítne vyšetření těch vzorků, u kterých žádanka není správně vyplněna, je potřísněna biologickým materiálem, odebrané množství materiálu není dostačující, vzorek je chybně označen. Chybějící údaje je třeba telefonicky doplnit nebo ověřit. Při vyšetření biologického materiálu, u něhož byl proveden chybný odběr, výsledek nelze získat. Neadekvátní vzorek je označen jako neuzavřený a musí být nahrazen novým. (Laboratorní příručka, verze č. 4)

7.1.1.2 Přístroje a pomůcky

Zkumavky umělohmotné 10 ml

Baňka Erlenmayerova 25, 100, 250 ml

Válce odměrné 10, 50, 100, 150 ml

Pipety Pasteurovy, stříčky umělohmotné, sklíčka krycí

Komůrka Bürkerova

Špičky 2-4 ml, dávkovač 2,5 ml

Komerčně vyráběné mikrodestičky Terasakiho s 60 jamkami

Mikroskop světelný klasický

Mikroskop inverzní s fázovým kontrastem
Váhy analytické, termostat, mrazničky
Mikropipeta Hamiltonova 1 µl a 5 µl jednoramenná
Mikropipeta Hamiltonova 1 µl a 5 µl víceramenná
Pipety automatické 1 ml a 2,5 ml
Centrifuga s chlazením
Boxy skříňové mrazící
Umělohmotná korýtka

7.1.1.3 Reagencie

PBS pufr
Roztok NH₄Cl na lýzu erytrocytů
Histoprep separační roztok k izolaci buněk
Fyziologický roztok k proplachování pipet
Aqua pro injectione
Roztok eosinu 5% vodný
Olej parafínový
Hankův promývací roztok pro izolaci lymfocytů
Komerční set s anti-HLA dg séry: HLA Ready Plate B27, Histo-Tray AB 72
Králičí komplement

7.1.1.4 Princip

Provede se izolace mononukleárních buněk z periferní krve pomocí hustotního gradientu. Buňky jsou separovány na základě jejich rozdílné denzity. Vyšetření HLA antigenů je provedeno pomocí lymfotoxického testu (LCT). K diagnostickým sérum v jamkách Terasakiho destiček se přidávají testované lymfocyty. Během inkubace se protilátky ze sér naváží na testované buňky. Pokud protilátka neodpovídá HLA antigenu na povrchu buňky, vazba se neuskuteční. Ke směsi se přidá králičí komplement, který zviditelní reakci a způsobí lýzu buněk s navázanými protilátkami - pozitivní reakce. Negativní reakce nastane u buněk, na které se protilátky nenašly. Reakce obarvené eosinem se odečítají pod optickým mikroskopem.

7.1.1.5 Postup

7.1.1.5.1 Izolace periferních lymfocytů pomocí hustotního gradientu

Nejprve je důležité zkontrolovat údaje uvedené na zkumavce a žádance. Pro každý vzorek se popíše a připraví do stojánku 3 zkumavky (10 ml). Do první zkumavky se napipetuje 2,5 ml Histoprepu (separační roztok) a do třetí nadávkuje 2,5 ml PBS (ředící roztok), druhá je prozatím prázdná, použije se v dalších krocích. Vzorky krve se naředí, promíchají a přelijí do zkumavky s PBS. Dalším krokem je navrstvení vzorků - pipetou se nabere a přenesou 2 x 2,5 ml naředěné krve do zkumavky s Histoprepem (pomalu po stěně). Následuje centrifugace při 2500 otáčkách za minutu po dobu 15 minut. Pipetou se odsaje vzniklý prstýnek lymfocytů z rozhraní plazma/separační roztok a přenesou se do druhé zkumavky, doplní se do 5 ml PBS stříčkou. Následující centrifugace je provedena při 1400 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Supernatant je odlit do umyvadla, sediment buněk se roztřepe a doplní se PBS roztokem. Proveďte se centrifugace 10 minut při 900 otáčkách za minutu. Komerčně připravené Terasakiho destičky s předkapanými HLA-séry se vyndají z mrazničky a popíše 15 minut předem. Supernatant je odlit do umyvadla, sediment buněk se roztřepe a pipetou se doplní Hank roztokem do světle růžové barvy. V Bürkerově komůrce pod mikroskopem je zkontrolována suspenze lymfocytů. Pokud se vyskytnou erytrocyty, je potřeba zředit lyzačním roztokem (4 ml NH₄Cl) a nechat 10 minut působit.

7.1.1.5.2 LCT s periferními lymfocyty

Do každé jamky Terasakiho destičky se přidá 1 µl suspenze lymfocytů. Následuje inkubace v termostatu 30 minut při + 22 °C. Do lyofilizovaného králičího komplementu, který se vyjme z mrazničky 30 minut předem, se přidá 1 ml vody na injekci. Do každé jamky destičky se přidá multikanálovou pipetou 5 µl komplementu. Proběhne inkubace 1 minutu při pokojové teplotě a poté je přebytečný eosin z destičky odstraněn. Terasakiho destička se přelije parafínovým olejem a přebytek oleje se odstraní. Reakce se odečítá pod optickým mikroskopem při zvětšení 100x nebo 150x.

7.1.1.6 Výsledky, hodnocení

Negativní reakce: buňka je živá, svítí, nepřijímá vitální barvivo eosin

Pozitivní reakce: buňka je mrtvá, membrána je propustná pro vitální barvivo

Hodnotí se procento mrtvých, obarvených buněk v každé jamce Terasakiho destičky a výsledek reakce se určuje podle tabulky.

Tabulka 2 Hodnocení výsledku na základě mrtvých buněk

SKÓRE	% MRTVÝCH BUNĚK	INTERPRETACE
1	0 – 10	Negativní výsledek
2	11 – 20	Negativní výsledek
4	21 – 50	Slabě pozitivní výsledek

6	51 – 80	Pozitivní výsledek
8	81 – 100	Silně pozitivní výsledek
0	-	nehodnotitelné

Vyhodnocuje se pozitivita či negativita antigenu HLA B-27, výsledek je buď HLA B-27 pozitivní nebo HLA B-27 negativní. (SOP č. II 3. 8. 4.) Metodu může provádět pouze pověřený laboratorní pracovník. Při práci jsem pozorovala laborantku a zkusila si vyhodnotit výsledky pod optickým mikroskopem.

7.2 ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH DAT

Získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu Excel. Celkem bylo vyšetřeno 1329 pacientů s podezřením na přítomnost antigenu HLA-B27 ve Fakultní nemocnici na Transfuzním oddělení v Hradci Králové v roce 2015. Všichni pacienti byli vyšetřeni sérologickou metodou.

Statisticky byly vyhodnoceny následující údaje a závislosti vážící se k vyšetřovaným vzorkům:

- počty pozitivních a negativních výsledků
- pozitivita/negativita u žen a mužů
- výskyt antigenu HLA-B27 v závislosti na věku
- výskyt antigenu HLA B-27 u žen a mužů v závislosti na věku
- výskyt diagnóz v souboru vyšetřovaných
- nejčastější diagnózy u HLA-B27 pozitivních žen a mužů

8. VÝSLEDKY

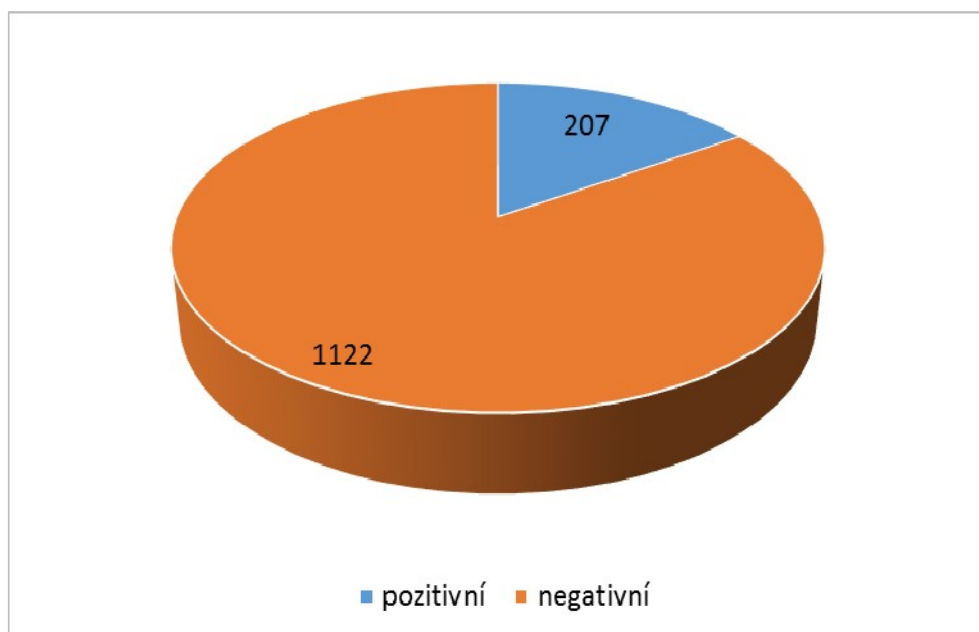
8.1 VÝSKYT ANTIGENU HLA-B27 U VYŠETŘOVANÝCH OSOB ZA ROK 2015

Ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové v období od 1. 1. 2015 do 31. 12. 2015 bylo celkem vyšetřeno 1329 vzorků, z toho 20 vzorků nesplnilo požadavky preanalytické fáze a musely být nahrazeny novými. (viz 7.1.1.1 Preanalytická fáze) U 207 vzorků (15,58 %) byla zjištěna přítomnost antigenu HLA-B27. (viz tab. č. 3 a graf. č. 8-1)

Tabulka 3 Výsledky vyšetření antigenu HLA-B27

PACIENTI		
	Počet	Procenta
HLA-B27 POZITIVNÍ	207	15,58 %
HLA-B27 NEGATIVNÍ	1122	84,42 %
CELKEM	1329	100,0 %

Graf 8-1 Výsledky vyšetření antigenu HLA-B27



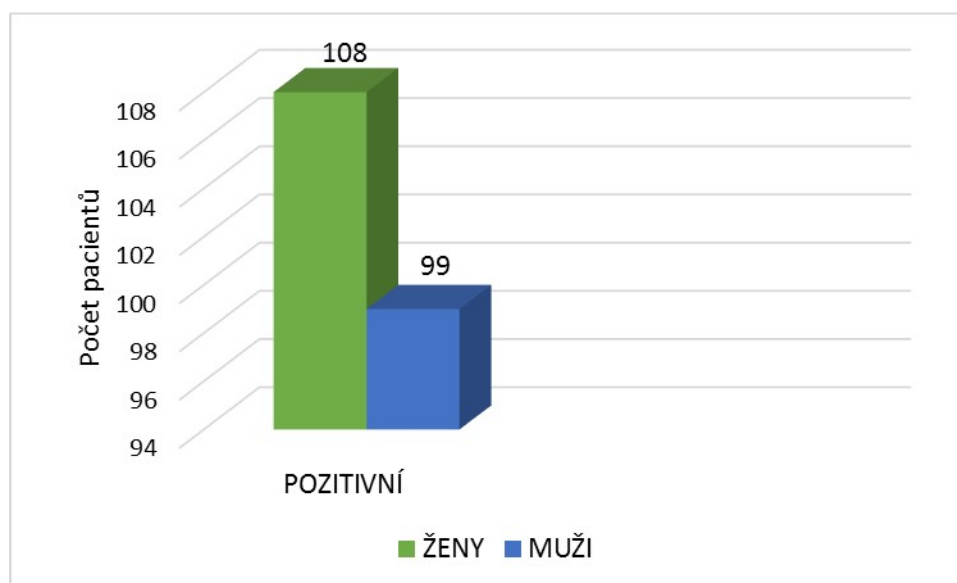
8.2 VÝSKYT ANTIGENU HLA-B27 U ŽEN A MUŽŮ

V souboru 1329 pacientů bylo vyšetřeno 754 žen a 575 mužů. Antigen HLA B-27 byl prokázán u 108 (14,32 %) žen a 99 (17,22 %) mužů. (viz tab. č. 4 a graf č. 8-2)

Tabulka 4 Antigen HLA-B27 u mužů a žen

PACIENTI		
	ŽENY	MUŽI
CELKEM – POČET	754	575
POZITIVNÍ – POČET	108	99
POZITIVNÍ – PROCENTA	14,32 %	17,22 %

Graf 8-2 Výskyt antigenu HLA-B27 u žen a mužů



8.3 VÝSKYT ANTIGENU HLA-B27 V ZÁVISLOSTI NA VĚKU

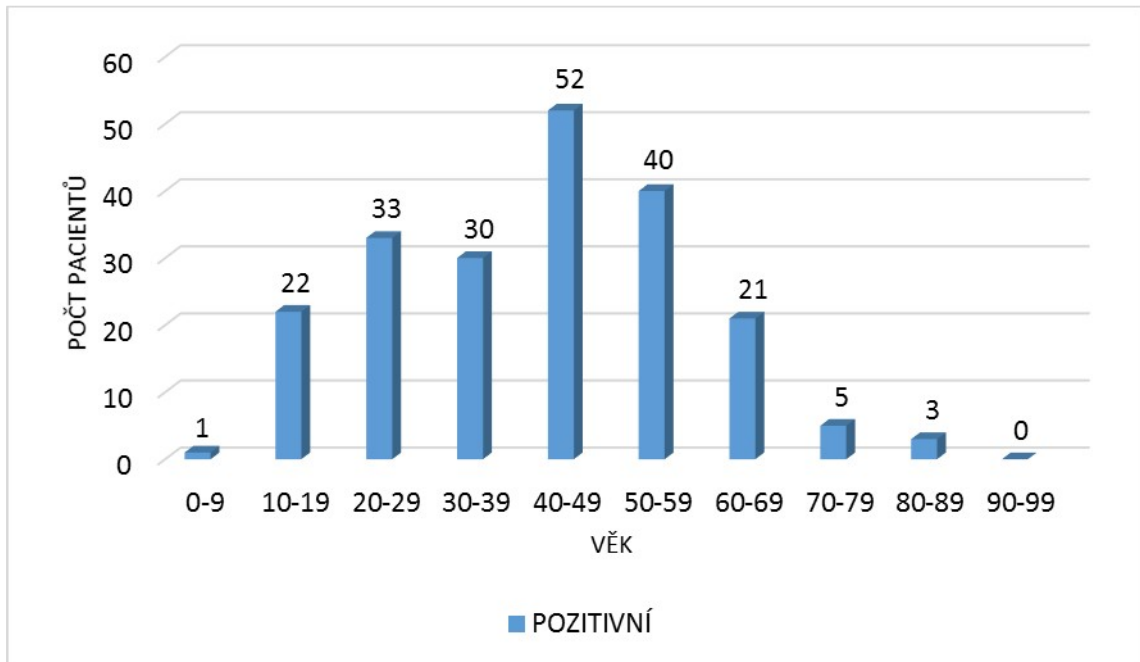
Pacienti byli rozděleni podle věku na 10 skupin po 10 letech. Do skupiny 0-9 letých byli zařazeni pacienti narození 2006-2015, do skupiny 10-19 letých pacienti narození 1996-2005, do skupiny 20-29 letých pacienti narození 1986-1995, do skupiny 30-39 letých pacienti narození 1976-1985, do skupiny 40-49 letých pacienti narození 1966-1975, do skupiny 50-59 letých pacienti narození 1956-1965, do skupiny 60-69 letých pacienti narození 1946-1955, do skupiny 70-79 letých pacienti narození 1936-1945, do skupiny 80-89 letých pacienti narození 1926-1935 a do skupiny 90-99 letých pacienti narození 1916-1925.

Výskyt antigenu HLA-B27 v jednotlivých věkových kategoriích viz tab. č. 5 a graf č. 8-3, č. 8-4.

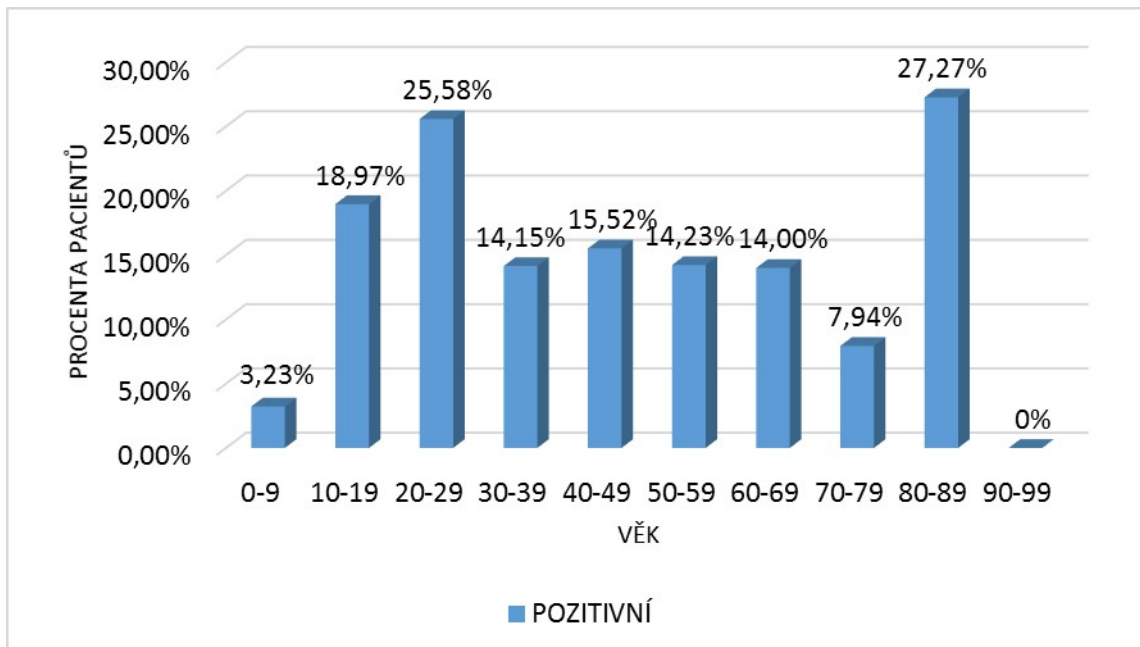
Tabulka 5 Výskyt HLA-B27 v závislosti na věku

PACIENTI			
VĚK	PACIENTI- POČET	POZITIVNÍ- POČET	POZITIVNÍ- PROCENTA
0-9	31	1	3,23 %
10-19	116	22	18,97 %
20-29	129	33	25,58 %
30-39	212	30	14,15 %
40-49	335	52	15,52 %
50-59	281	40	14,23 %
60-69	150	21	14,00 %
70-79	63	5	7,94 %
80-89	11	3	27,27 %
90-99	1	0	0 %
CELKEM	1329	207	

Graf 8-3 Výskyt antigenu HLA-B27 v závislosti na věku - (počty pacientů)



Graf 8-4 Výskyt antigenu HLA B-27 v závislosti na věku - (% pozitivních v dané věkové skupině)



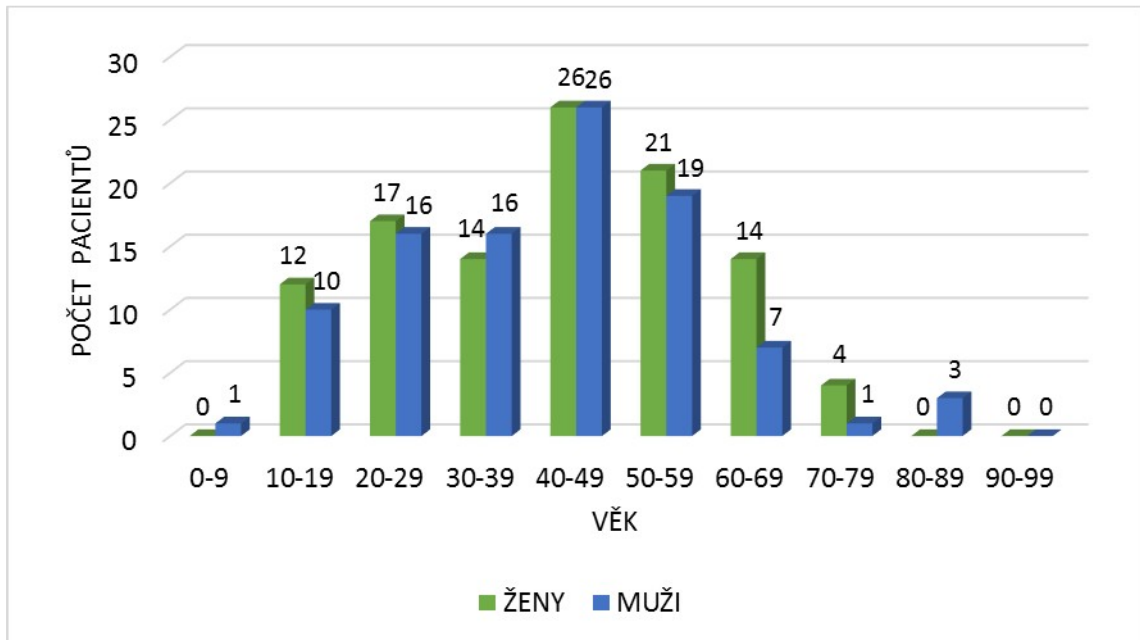
8.4 VÝSKYT ANTIGENU HLA B-27 U MUŽŮ A ŽEN V ZÁVISLOSTI NA POHLAVÍ A VĚKU

Počet vyšetřených osob a výskyt antigenu HLA-B27 u žen a mužů v jednotlivých věkových kategoriích viz tab. č. 6 a graf č. 8-5, č. 8-6.

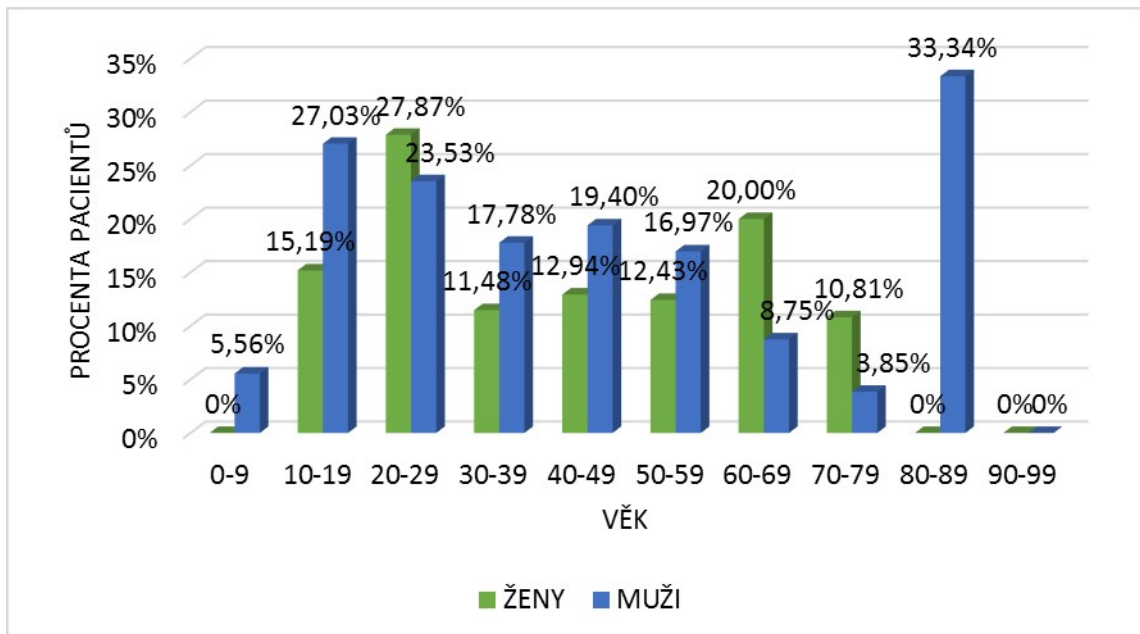
Tabulka 6 Pozitivita antigenu HLA-B27 u žen a mužů

PACIENTI						
	ŽENY			MUŽI		
	CELKEM- POČET	POZITIVNÍ- POČET	POZITIVNÍ- PROCENTA	CELKEM- POČET	POZITIVNÍ- POČET	POZITIVNÍ- PROCENTA
0-9	13	0	0 %	18	1	5,56 %
10-19	79	12	15,19 %	37	10	27,03 %
20-29	61	17	27,87 %	68	16	23,53 %
30-39	122	14	11,48 %	90	16	17,78 %
40-49	201	26	12,94 %	134	26	19,40 %
50-59	169	21	12,43 %	112	19	16,97 %
60-69	70	14	20,00 %	80	7	8,75 %
70-79	37	4	10,81 %	26	1	3,85 %
80-89	2	0	0 %	9	3	33,34 %
90-99	0	0	0 %	1	0	0 %
CELKEM	754	108		575	99	

Graf 8-5 Pozitivita HLA-B27 u žen a mužů - (počty pacientů)



Graf 8-6 Pozitivita HLA-B27 u žen a mužů - (% pozitivních v dané věkové skupině)



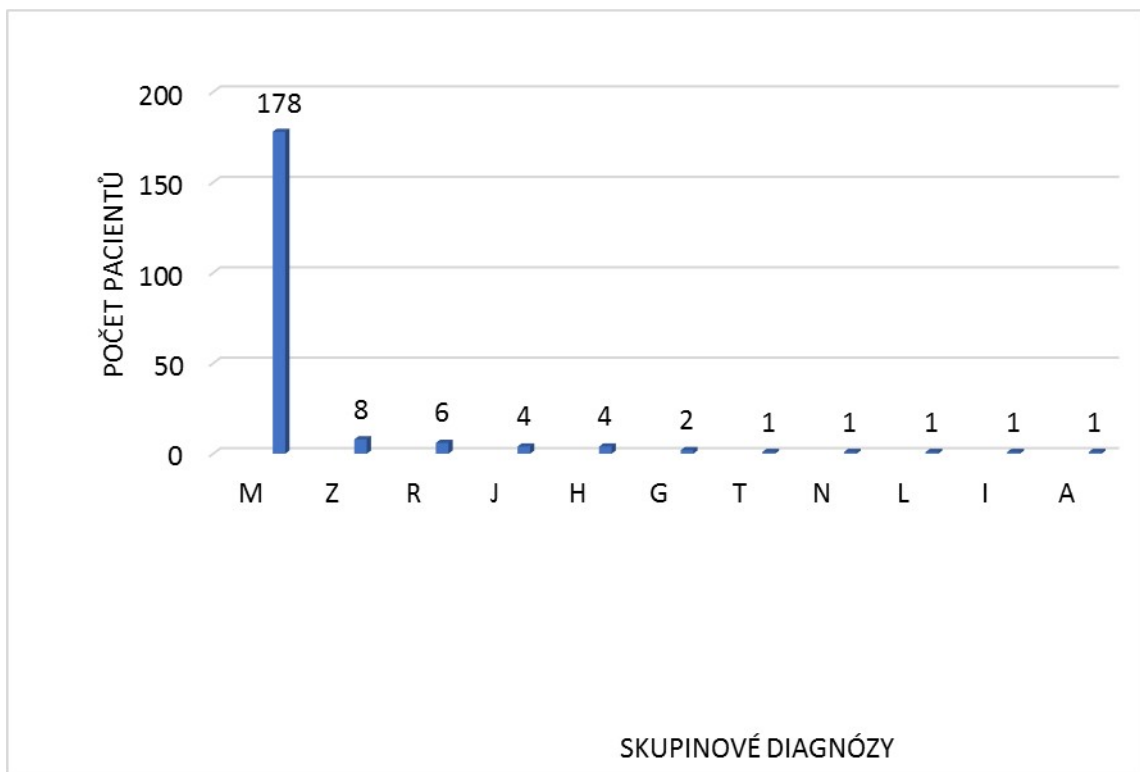
8.5 VÝSKYT ANTIGENU HLA-B27 VE VZTAHU K DIAGNÓZE PACIENTA

Přehled skupinových diagnóz, které byly diagnostikovány u HLA-B27 pozitivních jedinců. Procento je vztaženo k celkovému počtu pozitivních (viz tab. č. 7 a graf č. 8-7.)

Tabulka 7 Přehled skupinových diagnóz u pozitivních pacientů

SKUPINY DIAGNÓZ	POČET	PROCENTA
Nemoci svalové a kosterní soustavy (M)	178	85,99 %
Faktory ovlivňující zdravotní stav (Z)	8	3,86 %
Příznaky, znaky a nálezy nezařazené jinde (R)	6	2,90 %
Nemoci dýchací soustavy (J)	4	1,93 %
Nemoci oka a očních adnex, nemoci ucha (H)	4	1,93 %
Nemoci nervové soustavy (G)	2	0,97 %
Poranění, otravy, následky působení vnějších příčin (T)	1	0,49 %
Nemoci močové a pohlavní soustavy (N)	1	0,49 %
Nemoci kůže a podkožního vaziva (L)	1	0,48 %
Nemoci oběhové soustavy (I)	1	0,48 %
Infekční a parazitární nemoci (A)	1	0,48 %
CELKEM	207	100 %

Graf 8-7 Výskyt skupinových diagnóz u HLA-B27 pozitivních pacientů



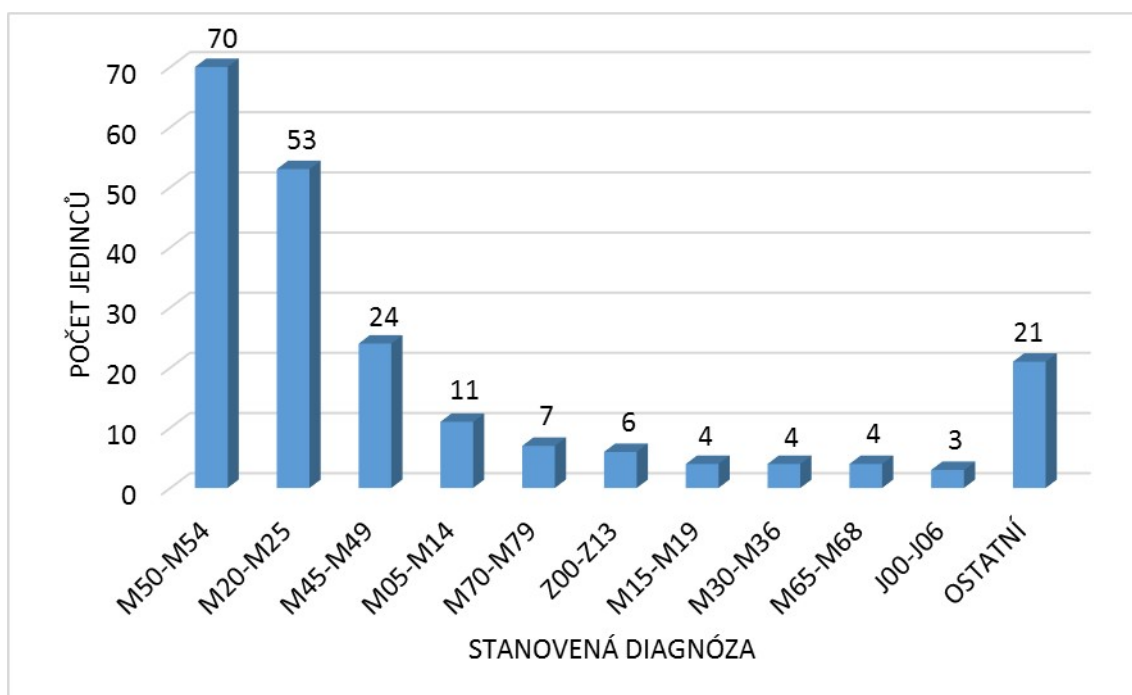
Diagnózy byly rozděleny do skupin na základě Mezinárodní klasifikace nemocí - 10. revize. Nejčastější diagnózy při vyšetřování antigenu HLA-B-27 viz tab. č. 8 a graf č. 8-8. Mezi ostatní diagnózy, které se nevyskytovaly více jak třikrát, patří například jiné poruchy nervové soustavy (G90-G99), nemoci skléry, rohovky, duhovky a řasnatého tělesa (H15-H22), jiné nemoci ledvin a močových cest (N25-N29), příznaky a znaky týkající se nervové, svalové a kosterní soustavy (R25-R29), celkové příznaky a znaky (R50-R69) atd.

Tabulka 8 Zastoupení nejčastějších diagnóz u HLA-B27 pozitivních pacientů

DIAGNOZY	NÁZEV	POČET	PROCENTA
M50-M54	Jiné dorzopatie	70	33,81 %
M20-M25	Jiná onemocnění kloubů	53	25,60 %
M45-M49	Spondylopatie	24	11,60 %
M05-M14	Zánětlivá polyartropatie	11	5,32 %
M70-M79	Jiná onemocnění měkké tkáně	7	3,38 %
Z00-Z13	Osoby, které se setkaly se zdravotnickými službami za účelem prohlídky a vyšetření	6	2,90 %
M15-M19	Artrózy	4	1,93 %
M30-M36	Systémová onemocnění pojivové tkáně	4	1,93 %
M65-M68	Onemocnění synoviální blány a šlachy	4	1,93 %
J00-J06	Akutní infekce horních dýchacích cest	3	1,45 %

	ostatní	21	10,15 %
CELKEM		207	100 %

Graf 8-8 Zastoupení nejčastějších diagnóz u HLA B27 pozitivních pacientů

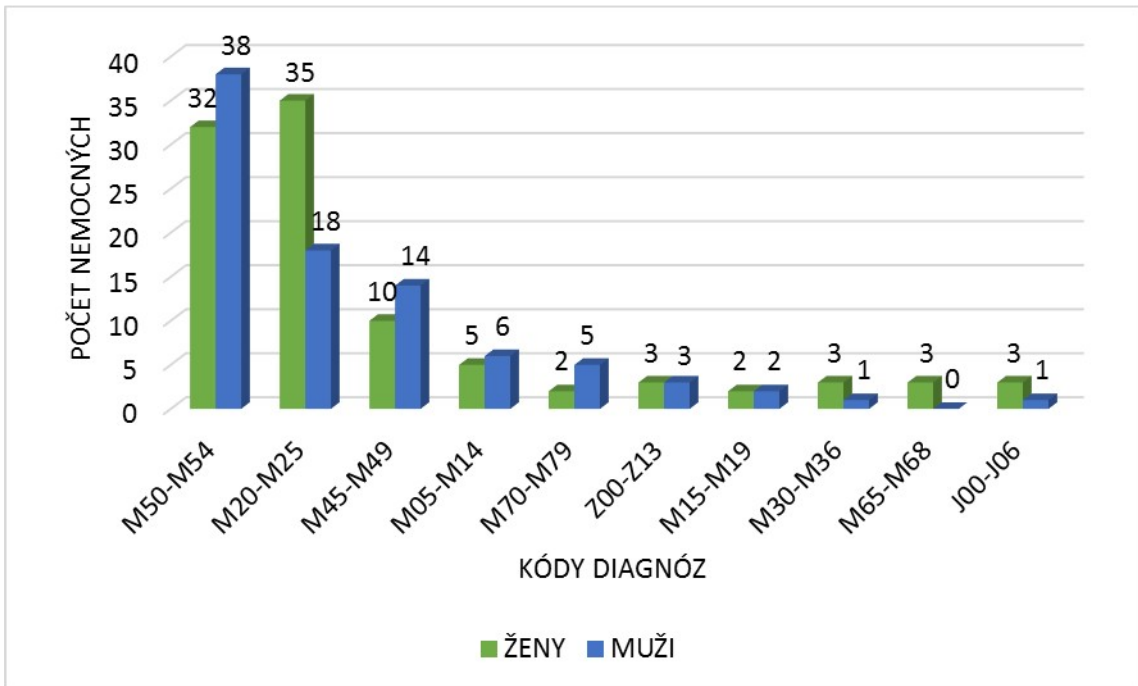


Výskyt antigenu HLA-B27 v jednotlivých skupinách diagnóz u celkového počtu vyšetřených, u žen a mužů viz tab. č. 9 a graf č. 8-9, č. 8-10.

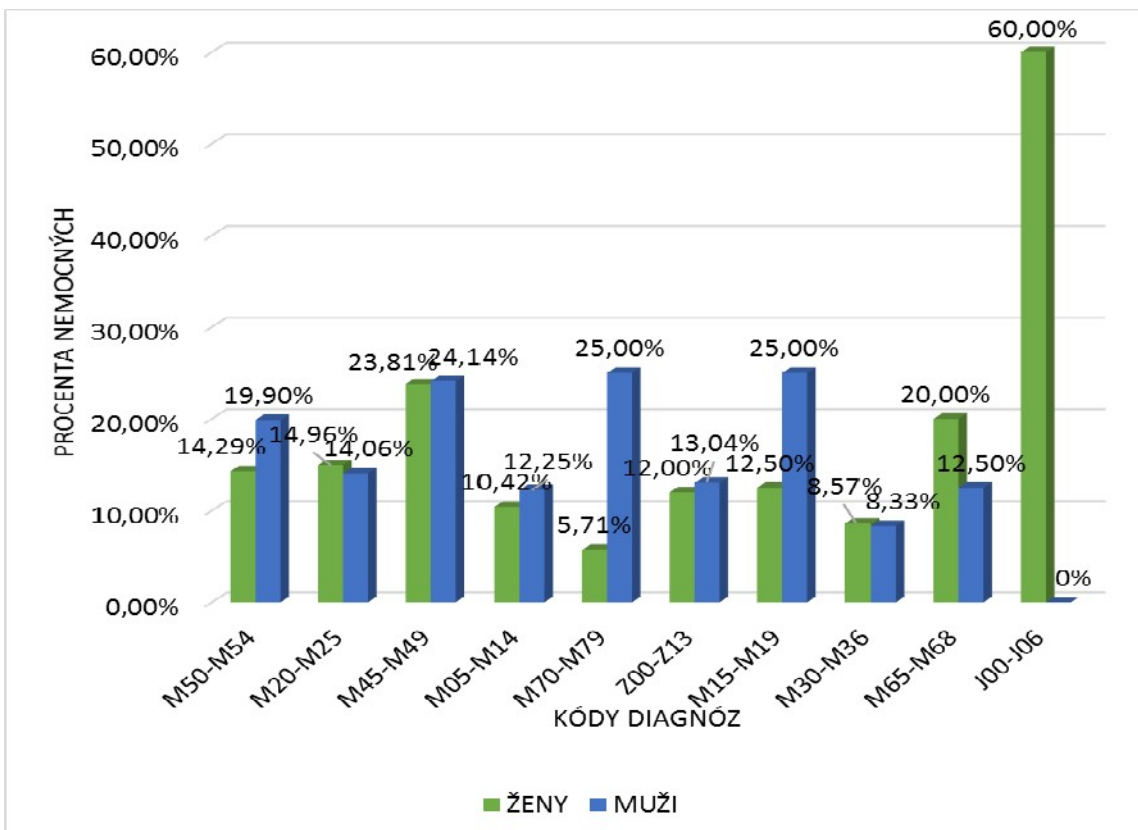
Tabulka 9 Antigen HLA-B27 u vyšetřovaných, u žen a mužů podle diagnostických skupin

DIAGNÓZY	PACIENTI	PACIENTI	%	ŽENY	ŽENY	%	MUŽI	MUŽI	%
		POZ.			POZ.			POZ.	
M50-M54	415	70	16,87%	224	32	14,29%	191	38	19,90%
M20-M25	362	53	14,64%	234	35	14,96%	128	18	14,06%
M45-M49	100	24	24,00%	42	10	23,81%	58	14	24,14%
M05-M14	97	11	11,34%	48	5	10,42%	49	6	12,25%
M70-M79	55	7	12,73%	35	2	5,71%	20	5	25,00%
Z00-Z13	48	6	12,5%	25	3	12,00%	23	3	13,04%
M15-M19	24	4	16,67%	16	2	12,5%	8	2	25,00%
M30-M36	47	4	8,51%	35	3	8,57%	12	1	8,33%
M65-M68	23	4	17,39%	15	3	20,00%	8	1	12,5%
J00-J06	8	3	37,5%	5	3	60,00%	3	0	0%

Graf 8-9 Antigen HLA-B27 u žen a mužů dle diagnostických skupin - (počty pacientů)



Graf 8-10 Antigen HLA-B27 u žen a mužů - (% pozitivních dle diagnostických skupin)



9. DISKUSE

Během sledovaného období bylo v HLA laboratoři Transfuzního oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové sérologickou metodikou vyšetřeno 1329 pacientů s podezřením na výskyt antigenu HLA-B27, u dalších 20 vzorků nebylo možno vyšetřit nebo vydat výsledek, pravděpodobně pro nevyhovující preanalytickou fázi.

Vzorky do HLA laboratoře odesílají lékaři odborných ambulancí Fakultní nemocnice a ambulantní specialisté regionu. HLA laboratoř má na internetu dostupnou laboratorní příručku, ve které jsou uvedeny požadavky na odběr materiálu k vyšetření a transport (viz 7. 1. 1. - preanalytická fáze). Odesílající ne vždy dodrží požadavky preanalytické fáze, takže vzorek nemůže být zpracován. Laboratoř vždy informuje lékaře požadujícího vyšetření o přijetí nevyhovujícího vzorku nebo o neuzavřeném výsledku a žádá o nový odběr biologického materiálu. Ve sledovaném období bylo 20 vzorků, ze kterých nemohl být určen výsledek z důvodu rozpadlých lymfocytů. Vzhledem k vyšetřenému množství vzorků se jedná o nízké číslo, a však pro eliminaci nevyhovujícího materiálu by bylo vhodné zjistit, kde se nejčastěji stávají chyby v preanalytické fázi, a zamezit jejich opakování.

Z vyšetřených osob mělo 15,58 % antigen HLA-B27. V evropské populaci se antigen HLA-B27 vyskytuje asi u 8 % lidí (J. Sheehan, 2004). V souboru vyšetřených osob byla spočítána hodnota výskytu téměř dvojnásobná - 15,58 %. Tato hodnota je vyšší z důvodu provádění vyšetření přímo u pacientů, u kterých bylo vysloveno podezření na chorobu nebo kterým již byla stanovena diagnóza, jež může souviset s výskytem antigenu HLA-B27.

Celkem bylo vyšetřeno 757 žen a 575 mužů. Z množství pozitivních lidí byl výskyt antigenu HLA-B27 častější u mužů s 17,22 %, u žen s 14,32 %. Testování antigenu HLA-B27 se provádí především k vyloučení diagnózy ankylozující spondylitidy, která se častěji vyskytuje u mužů. (Emam a spol., 2007)

Různá onemocnění jsou typická svým výskytem v určitém období života. Věk pacienta hraje důležitou roli a většinou platí, že s rostoucím věkem roste riziko výskytu choroby. Antigen HLA-B27 byl zaznamenán u osob, jejichž věk byl od 0 do 99 let. Pro lepší přehlednost byli pacienti rozděleni do 10 skupin po 10 letech. Nejvíce osob bylo vyšetřeno ve skupině 40-49 letých - 335 pacientů a ve skupině 50-59 letých - 281 pacientů. Relativní výskyt antigenu HLA-B27 vzhledem k počtu vyšetřených osob byl nejvyšší ve skupině 20-29 letých, kde bylo nalezeno 25,58 % HLA-B27 pozitivních pacientů. Vyšší záchyt antigenu HLA-B27 byl také ve skupině 40-49 letých s 15,52 %. Další skupinou, kde se tento antigen vyskytoval ve větší míře, byla skupina 80-89 letých s 27,27 %, avšak vzhledem k nízkému počtu vyšetřených (11) a pozitivních (3) pacientů, nelze tento výsledek považovat za plnohodnotný. První vlna vzestupu je typická pro pacienty trpící ankylozující spondylitidou, pro kterou je charakteristický rozvoj okolo 25-30 roku (Šenolt, 2011). Druhá vlna vyššího nálezu je typická pro výskyt zánětlivých polyartropatií, jejichž nástup je ve věku okolo 50 let (Kvien a spol., 2006).

Výskyt antigenu HLA-B27 u žen koreluje částečně s celkovým výskytem antigenu a vytváří nejprve také 2 vlny vzestupu, ve skupině 60-69 letých se objevuje další vyšší výskyt s 20,00 % z celkových 70 vyšetřených žen. V této věkové kategorii je antigen HLA-B27 typický pro výskyt revmatoidní artritidy, která se nejčastěji vyskytuje u žen okolo 60 let (Kucharská, 2006). Ve skupině 20-29 letých výskyt odpovídal 27,87 % z 61 vyšetřených žen a ve skupině 40-49 letých výskyt odpovídal 12,95 % z 201 žen. Výskyt u mužů byl také výrazný především ve 3 věkových skupinách. V rozmezí 10-19 letých s 27,03 % z celkového počtu 37 mužů. Tento výskyt je typický pro artritidu s entezitidou (zánětlivé postižení úponů svalových šlach), která se objevuje častěji u chlapců ve věku 9-13 let (Muntau, 2014). Ve skupině 40-49 letých bylo vyšetřeno 134 mužů, pozitivní antigen HLA-B7 byl u 19,40 % z nich. Po urogenitální infekci je tato věková skupina mužů často postižena reaktivní artritidou (Češka a spol., 2010). Skupina 80-89 letých zahrnuje 33,34 % HLA-B27 pozitivních mužů, avšak celkový počet mužů v této skupině byl pouze 9, proto není pravděpodobně možné tento výsledek považovat za vypovídající o dané skutečnosti.

Nejčastěji byli vyšetřováni pacienti se skupinovou diagnózou nemoci svalové a kosterní soustavy (M) s 85,99 %. Z počtu pacientů, kteří měli antigen HLA-B27, byl tento antigen nejvíce zastoupen ve skupině diagnóz jiné dorzopatie (M50-M54) s 33,81 %, s 25,60 % u jiných onemocnění kloubů (M20-M25), s 11,60 % u spondylopatii (M45-M49), s 5,32 % u zánětlivých polyartropatií (M05-M14), s 3,38 % u jiných onemocnění měkké tkáně (M70-M79), s 2,90 % u osob, které se setkaly se zdravotnickými službami za účelem prohlídky a vyšetření (Z00-Z13) a s 1,93 % u artróz (M15-M19). Tyto nemoci také patřily mezi nejčastější diagnózy, se kterými pacienti přicházeli na vyšetření.

S diagnózou M50-M54 bylo na vyšetření posláno celkem 415 osob, z nichž 16,87 % bylo pozitivních na antigen HLA-B27. Diagnózu M20-M25 mělo 362 pacientů a u 14,64 % byl prokázán antigen HLA-B27. Nemocných s M45-M49 bylo 100 a 24,00 % mělo daný antigen. S diagnózou M05-M14 bylo vyšetřeno 97 osob a pozitivních na antigen HLA-B27 bylo 11,34 %. Diagnózu M05-M79 mělo diagnostikováno 55 osob, u 12,73 % z nich byl prokázán antigen HLA-B27.

Pro každé pohlaví je typické jiné onemocnění, které může souviset s výskytem antigenu HLA-B27. Četnost jednotlivých diagnóz v souboru byla závislá na pohlaví. Na vyšetření s diagnózou jiné dorzopatie byli lékařem více posíláni muži s 19,90 %, žen bylo vyšetřeno 14,29 %. Dorzalgie (M54), která patří do dorzopatií, je typickým klinickým příznakem ankylozující spondylitidy, která je častější právě u mužů (Emam a spol., 2007). Spondylopatii mělo 23,81 % žen a 24,14 % mužů, zdroj Češka (2010) uvádí, že více postiženi jsou muži a to v poměru 2-3 : 1. Statistika sledovaného souboru dokazuje pouze mírnou převahu mužů nad ženami. Nemoci kloubů více postihují ženy, například artróza, osteoporóza, revmatoidní artritida (Hrabáková a spol., 2011). Tento fakt se ovšem nepodařilo dokázat, diagnóza zánětlivá polyartropatie měla u obou pohlaví podobný výskyt antigenu HLA-B27 - u žen 10,42 %, u mužů 12,25 %, zdroj (Laivoranta-Nyman a spol., 2000) popisuje, že poměr výskytu žen k mužům s revmatoidní artritidou je kolem 3 : 1. Artrózou trpělo 12,5 % žen a 25,00 % mužů, tento výsledek se neshoduje s literaturou (Hrabáková a spol., 2011), podle které jsou ženy více postiženy artrózou. Diagnózu akutní infekce horních dýchacích cest, u které byl prokázán antigen HLA-B27, mělo 60 % žen a žádný muž. Tato diagnóza patří mezi faktory zevního prostředí, které

mohou způsobit psoriatickou artritidu vyskytující se u žen a mužů v poměru 1 : 1. (Kucharská, 2006)

10. ZÁVĚR

V bakalářské práci bylo cílem zjistit, kde se antigen HLA-B27 vyskytuje více u žen nebo mužů, v jakém věku a zda jeho výskyt souvisí s diagnózou stanovenou lékařem. Ve zkoumaném období bylo vyšetřeno více žen, avšak výskyt antigenu HLA-B27 byl častější u mužů. Nejvyšší výskyt antigenu HLA-B27 byl zaznamenán ve skupině 20-29 letých a 40-49 letých pacientů. Tyto intervaly podle literatury odpovídají nástupům onemocnění artritidy a Bechtěrevovy choroby.

Antigen HLA-B27 byl nejčastěji vyšetřován se skupinovou diagnózou Nemoci svalové a kosterní soustavy a diagnózou Jiné dorzopatie. Ženy jsou více postiženy kloubním onemocněním například artrózou nebo revmatoidní artritidou, u mužů se více vyskytuje Bechtěrevova choroba.

Asociace mezi antigenem HLA-B27 a chorobami je již dávno prokázána, ovšem není odhalen přesný mechanismus, který spojení mezi HLA systémem a nemocemi podmiňuje. Výzkum v této oblasti bude mít velký vliv na objasnění původu, příčin a vývoje autoimunitních onemocnění a také jejich léčbu.

11. SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 Relativní riziko	22
Rovnice 2 Absolutní riziko.....	23

12. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Asociace HLA systému s chorobami.....	21
Tabulka 2 Hodnocení výsledku na základě mrtvých buněk	29
Tabulka 3 Výsledky vyšetření antigenu HLA-B27	32
Tabulka 4 Antigen HLA-B27 u mužů a žen	33
Tabulka 5 Výskyt HLA-B27 v závislosti na věku	34
Tabulka 6 Pozitivita antigenu HLA-B27 u žen a mužů.....	36
Tabulka 7 Přehled skupinových diagnóz u pozitivních pacientů	38
Tabulka 8 Zastoupení nejčastějších diagnóz u HLA-B27 pozitivních pacientů	40
Tabulka 9 Antigen HLA-B27 u vyšetřovaných, u žen a mužů podle diagnostických skupin	42

13. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 6.2.3-1 Struktura HLA I. třídy.....	14
Obrázek 6.3.2-1 Struktura HLA II. třídy.....	15
Obrázek 6.10.1-1 Zdravý a nemocný člověk	24

14. SEZNAM GRAFŮ

Graf 8-1 Výsledky vyšetření antigenu HLA-B27.....	32
Graf 8-2 Výskyt antigenu HLA-B27 u žen a mužů	33
Graf 8-3 Výskyt antigenu HLA-B27 v závislosti na věku - (počty pacientů).....	35
Graf 8-4 Výskyt antigenu HLA B-27 v závislosti na věku - (% pozitivních v dané věkové skupině).....	35
Graf 8-5 Pozitivita HLA-B27 u žen a mužů - (počty pacientů)	37
Graf 8-6 Pozitivita HLA-B27 u žen a mužů - (% pozitivních v dané věkové skupině).....	37
Graf 8-7 Výskyt skupinových diagnóz u HLA-B27 pozitivních pacientů	39
Graf 8-8 Zastoupení nejčastějších diagnóz u HLA B27 pozitivních pacientů.....	41
Graf 8-9 Antigen HLA-B27 u žen a mužů dle diagnostických skupin - (počty pacientů) .	43
Graf 8-10 Antigen HLA-B27 u žen a mužů - (% pozitivních dle diagnostických skupin)..	43

15. POUŽITÁ LITERATURA

Sheehan, N. J.: *The ramifications of HLA-B27* [online]. místo neznámé: PubMed [online]. Publikováno 2004 [citace 12. 4. 2016]. Dostupné na: https://www.google.cz/search?q=J+R+Soc+Med.+2004+Jan%3B+97%281%29:+10%E2%80%9314.&ie=utf-8&oe=utf-8&gws_rd=cr&ei=vS8NV5X5Blbe6QSRiIOoCA

Šenolt, L.: Současný pohled na diagnostiku a léčbu. *Interní medicína pro praxi* [online]. Publikováno 10.2011 [citace 4. 3. 2016]. Dostupné na: http://www.internimediceina.cz/artkey/int-201110-0002_Soucasny_pohled_na_diagnostiku_a_lecbu_ankylozujici_spondylitidy.php

(WHO) Světová zdravotnická organizace.: *Mezinárodní klasifikace nemocí, 10. revize*. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky, 1992. str. 21-31.

Buc, M.: *HLA Komplex v biológii a medicíne*. Bratislava: VEDA, 1989. 183 s. ISBN 8022400297.

Češka, R. a spol.: *Artritidy reaktivní* [online]. místo neznámé: medicabaze.cz [online]. Publikováno 2010 [citace 24. 5. 2016]. Dostupné na: http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&catelId=25&cname=Ortopedie&termId=2881&tname=Artritida+reaktivn%C3%AD&h=empty#jump

Češka, R.: *Ankylozující spondylitida* [online]. Praha: medicabaze. Publikováno 2010 [citace 5. 4. 2016]. Dostupné na: http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&catelId=28&cname=Revmatologie&termId=154&tname=Ankylozuj%C3%ADc%C3%AD+spondylitida&h=empty#jump

Emam, J. S. a spol.: *Evaluation of 278 HLA-B27 positive patients suspected of Seronegative Spondyloarthropathies* [online]. Ahwaz: Pakistan journal of medical sciences. Publikováno 14. 2 2007 [citace 14. 3. 2016]. Dostupné na: <http://www.pjms.com.pk/issues/octdec107/article/article16.html>

Fučíková, T.: *Klinická imunologie v praxi*. 1. Praha: Galén, 1995. 343 s. ISBN 80-85824-24-8. s. 24-25,253-254.

Genetics Learn.: *PCR* [online]. Salt Lake City: Genetic science learning center, University of Utah Health Sciences. Publikováno 2008 [citace 12. 4. 2016]. Dostupné na: <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>

Hána, I., Ivašková, E., Dostál, C.: *Hlavní histokompatibilní systém člověka (HLA) a nemoci*. 1. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n. p. 1982. 233 s. s. 106-118.

Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie*. 4. Praha: TRITON, 2009. 279 s. ISBN 978-80-7387-280-9. s.79-80.

Hrabáková, J., Havlová, S.: *Nemoci kloubů a kostí: artróza, artritida, osteoporóza* [online]. Publikováno 10.11.2011 [citace 25. 4. 2016]. Dostupné na: <http://www.ireceptar.cz/zdravi/nemoci-kloubu-a-kosti-artroza-artritida-osteoporoz/>

Hrubíško, M. a spol.: *Hematologie a Transfúziologie*. 1. Martin: Osveta, 1981. 493s. ISBN 70-056-81. s. 338-345.

Jamborová, G.: *Sérologická typizace antigenu HLA B-27 na periferních lymfocytech*. Hradec Králové: SOP, 2014. č. II. 3. 8. 4.

Jílek, P.: *Základy imunologie*. 3. Praha: Anyway, 2008. 79 s. ISBN 978-80-254-2422-3. s. 24-29.

Jiroušová, H.: *Laboratorní příručka*. Laboratoř HLA systému a PCR diagnostiky. Hradec Králové, 15. 9. 2015. verze č. 4.

Krejsek, J., Kopecký, O.: *Klinická Imunologie*. 1. Hradec Králové: NUCLEUS HK, 2004. 941 s. ISBN 80-86225-50-X.

Kucharská, R.: *Moderní léčba spondylartritid* [online]. Praha: Interní oddělení Nemocnice Na Františku. Publikováno 2006 [citace 12. 3. 2016]. Dostupné na: <http://www.nlk.cz/publikace-nlk/referatove-vybery/revmatologie/2006/moderni-lecba-spondylartritid>

Kvien, TK. a spol.: *Epidemiological aspects of rheumatoid arthritis: the sex ratio* [online]. Oslo: PubMed. Publikováno 6.2006 [citace 15. 4. 2016]. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16855148>

Laivoranta-Nyman, S. a spol.: *Differences between female and male patients with familial rheumatoid arthritis* [online]. Turku : Annals of Rheumatic Diseases. Publikováno 5.9.2000 [citace 15. 4. 2016]. Dostupné na: <http://ard.bmj.com/content/60/4/413.full>

Lokaj, J.: *Lékařská imunologie pro zdravotní laboranty*. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání středních zdravotnických pracovníků, 1988. ISBN 80-7013-002-4. s. 13-14.

Mouraghi, El. a spol.: *Polymorphisms of HLA-A, -B, Cw and DRB1 antigen in moroccan patients with ankylosing spondylitis and comparison od clinical features with frequencies of HLA-B*27* [online]. Tétouan: Department of biology, Faculty of sciences, University Abdelmalek Essaidi. Publikováno 2.2015 [citace 11. 3. 2016]. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25626601>

Muntau, A. C.: *Pediatric*. 6. vydání. Praha: Grada Publishing a. s., 2014. 608 s. ISBN 978-80-247-9292-7. s. 224.

Pavelka a spol.: *Klinická Revmatologie*. 1. Praha: Galén, 2003. 952 s. ISBN 80-7262-174-2. s. 101-109.

Penka, M. a spol.: *Hematologie a transfúzní lékařství II*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2012. 192 s. ISBN 978-80-247-3460-6

Roche molecular system inc.: *PCR: HOW WE COPE DNA* [online]. Pleasanton: Roche molecular system inc. Publikováno 2016 [citace 11. 3. 2016]. Dostupné na: <http://molecular.roche.com/pcr/Pages/Process.aspx>

Řeháček, V. a spol.: *Transfuzní lékařství*. 1. Praha: Grada Publishing, a.s., 2013. 264 s. ISBN 978-80-247-4534-3. s. 180-190.

Stites, Daniel P., Terr, Abba I.: *Basic and Clinical Immunology*. Praha: VICTORIA PUBLISHING, a.s., 1994. 741 s. ISBN 80-85605-37-6. s. 49-61.

Zýková, K.: *Pohybová aktivita u Bechtěrevovy choroby* [online]. místo neznámé: Moodle-Institutu Klinické a Experimentální Medicíny. Publikováno 11.11.2013 [citace 12. 3. 2016]. Dostupné na: <http://www.dlouhovekostbezleku.cz/mod/forum/discuss.php?d=113>