

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie**

**Charakterizace B buněčných populací
u pacientů s revmatoidní artritidou
se zaměřením na B lymfocyty
specifické pro proteiny obsahující citrulin**

Tereza Moravcová

Revmatologický ústav, Praha, 2006

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Šárka Růžičková

Práce byla vypracována samostatně, pouze s použitím citované literatury pod vedením vedoucího diplomové práce.

V Praze 26.4.2006

Tereza Moravcová

Tereza Moravcová

Děkuji RNDr. Šárce Růžičkové za odborné vedení práce, laskavý přístup a všechny čas, který mi v průběhu vypracování práce věnovala.

Děkuji Zdenku Cimburkovi za provedení analýz na průtokovém cytometru a za uvedení do problematiky průtokové cytometrie.

Děkuji Zuzaně Hůzlové a Ireně Veselé za pomoc při vypracování práce a za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji Ing. Věře Kebrdlové za sekvenaci produktů.

Diplomová práce byla vypracována v letech 2003 - 2006 na Oddělení molekulární biologie a imunogenetiky Revmatologického ústavu. Práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM 0021620812 poskytnutým MŠMT ČR a 00023728 poskytnutým IGA MZ ČR.

The Characterization of B Cell Populations in Patients with Rheumatoid Arthritis Focused to B Lymphocytes Specific for Citrulline Containing Peptides

The objective of this study was to investigate the distribution of peripheral blood B cell subpopulations and to analyze the presence of B lymphocytes specific for citrulline containing proteins in peripheral blood and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis (RA) compared with healthy controls and patients with other rheumatic diseases.

The immunophenotyping was performed by polychromatic flow cytometry. Five biotinylated citrulline containing peptides derived from natural proteins were used. Single-cell RT-PCR was employed to analyze expressed V_H gene families.

A significant reduction in frequencies of circulating memory B cells was found, which suggests a selective migration of these cells into inflamed tissue. B lymphocytes specific for at least two of used peptides were detected in all of analyzed peripheral blood and synovial tissue samples. The frequencies of $CD19^+$ B lymphocytes specific for citrulline containing proteins were higher in synovial tissue compared to peripheral blood, the increase was statistically significant for peptide P1 (filaggrin). The identical immunoglobulin rearrangements were found in individual B cells isolated from synovial tissue of a patient with RA.

In conclusion, these data indicate the presence of several B cell subsets specific for different citrulline containing autoantigens in patients with RA and point to the role of anti-CCP autoantibody producing cells in the development of the disease. The higher frequencies of citrullinated peptide specific B lymphocytes in synovial tissue compared to peripheral blood and their clonal relation in synovial tissue suggest the autoantigen driven selection and activation of B cells ongoing directly in the inflamed joint.

Klíčová slova:

revmatoidní artritida, B lymfocyty, proteiny obsahující citrulin, CD antigeny, V_H přestavba, klonalita, plazmatické buňky, průtoková cytometrie, single-cell RT-PCR

Key words:

rheumatoid arthritis, B lymphocytes, citrulline containing proteins, CD antigens, V_H rearrangment, clonality, plasma cells, flow cytometry, single-cell RT-PCR

1. OBSAH

1. OBSAH	5
2. ÚVOD	8
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1. Klinický obraz	10
3.2. Etiopatogeneze a rozvoj RA	12
3.3. Léčba RA	16
3.3.1. Analgetika a nesteroidní antirevmatika.....	16
3.3.2. Chorobu modifikující antirevmatické léky	16
3.3.3. Synoviortéza	16
3.3.4. Kortikosteroidy	16
3.3.5. Biologická léčba	17
3.3.5.1. Anti-TNF α	17
3.3.5.2. Rituximab	17
3.3.5.3. Další biologická léčba	18
3.3.6. Nemedikamentózní léčba	18
3.4. B lymfocyty v RA	19
3.4.1. Vznik autoreaktivních B lymfocytů	20
3.4.2. Ektopická germinální centra	20
3.5. Autoprotilátky u RA	23
3.5.1. Mechanismus tvorby autoprotilátek	24
3.5.2. Typy autoprotilátek u RA	26
3.5.2.1. Revmatoidní faktory.....	28
3.5.2.2. Autoprotilátky specifické pro proteiny obsahující citrulin	29
3.6. Průtoková cytometrie	34
4. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	38
5. MATERIÁL A METODY	39
5.7. Příprava buněčné suspenze, zpracování periferní krve, synoviální tkáně a synoviální tekutiny	39
5.7.1. Periferní krev	39
5.7.2. Synoviální tkáň	40
5.7.3. Synoviální tekutina	41
5.8. Značení buněčné suspenze pro průtokovou cytometrii	41
5.9. Detekce B buněk specifických pro peptidy obsahující citrulin	44
5.10. RT-PCR na úrovni jedné buňky (single-cell RT-PCR)	44
5.11. Amplifikace V_HD_HJ_H uspořádaných genů	45
5.11.1. Amplifikace externími primery	45
5.11.2. Amplifikace interními primery.....	46

5.12.	Sledování přítomnosti PCR produktu	48
5.13.	Purifikace PCR produktu	48
5.14.	Sekvenování PCR produktů	49
5.15.	Precipitace sekvenačního produktu ethanolem.....	50
5.16.	Vyhodnocování a analýza sekvencí uspořádaných $V_H D_H J_H$ genů.....	50
5.17.	Statistická analýza	51
6.	SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ A PŘÍSTROJŮ.....	52
6.18.	Chemikálie a kity	52
6.19.	Protilátky.....	55
6.20.	Roztoky	56
6.21.	Přístroje a vybavení.....	57
7.	VÝSLEDKY.....	58
7.1.	Klinická charakteristika sledovaného souboru.....	58
7.2.	Imunohistochemická analýza synoviálních tkání.....	62
7.3.	Detekce $CD19^+$ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin.....	63
7.3.1.	Detekce $CD19^+$ B lymfocytů specifických pro peptidy P1, P3 a P0428.....	64
7.3.2.	Detekce $CD19^+$ B lymfocytů specifických pro peptidy biot1 a biot2	68
7.4.	Imunofenotypizace detekovaných $CD19^+$ B lymfocytů	69
7.5.	Sledování exprese V_H genů u $CD19^+$ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin izolovaných ze synoviální membrány	85
8.	DISKUZE.....	91
8.6.	Detekce B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin	91
8.6.1.	Inhibiční test	91
8.6.2.	Detekce B lymfocytů pomocí peptidů P1, P3, P0428 a biot1	91
8.6.3.	Lymfocytární gate.....	92
8.6.4.	Frekvence B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin	93
8.7.	Imunofenotypizace B lymfocytů	96
8.7.1.	Sledované povrchové antigeny	96
8.7.2.	Signifikantně snížené frekvence paměťových B lymfocytů a signifikantně zvýšené frekvence naivních B lymfocytů u pacientů s RA	97
8.7.3.	Signifikantně zvýšené frekvence plazmablastů fenotypu $CD19^+ CD27^{high}$ u pacientů s RA ...	99
8.7.4.	Snížení frekvence $CD38^+ CD138^+$ buněk v populaci naivních B lymfocytů a $CD38^+ CD138^-$ buněk v populaci plazmablastů u pacientů s RA.....	100
8.7.5.	Zvýšení frekvence $CD38^+ CD138^-$ buněk u naivních B lymfocytů ve srovnání a s paměťovými a korelace frekvencí $CD38^+ CD138^+$ mezi naivními a paměťovými buňkami u RA	101
8.7.6.	Srovnání zastoupení jednotlivých buněčných populací v periferní krvi a synoviální tekutině	102

8.8. Sledování exprese V_H genů u $CD19^+$ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin izolovaných ze synoviální tkáně	102
8.8.1. Pacient č. 47	103
8.8.2. Pacient č. 8B	105
8.8.3. Mutační frekvence	105
9. SOUHRN.....	107
10. PUBLIKACE A PREZENTACE	108
11. CITACE	109
12. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	125

2. ÚVOD

Revmatoidní artritida (RA) patří mezi chronická autoimunitní onemocnění. Způsobuje nevratnou destrukci chrupavky a následně celého kloubu a zapříčiňuje tím jeho bolestivost, omezuje pohyblivost pacienta a může vést až k invaliditě. RA se stejně jako většina ostatních autoimunitních onemocnění vyskytuje výrazně častěji u žen než u mužů, celkově postihuje až 1% populace. První příznaky se objevují nejčastěji ve čtvrté dekádě života. Kromě zánětu kloubů je RA doprovázena mimokloubními projevy, jako je vaskulitida, serozitida nebo vznik revmatických uzlů. Během nemoci se střídají fáze remise a exacerbace, celkově se však stav pacienta zhoršuje a nemoc zkracuje život až o 10 let.

Přes dlouhotrvající výzkum není stále zcela objasněna etiopatogeneze nemoci. Pravděpodobně se jedná o multifaktoriálně podmíněné onemocnění, podíl na vzniku má jak genetická predispozice (některé alely HLA genů, genů pro cytokiny a jejich receptory), tak faktory vnějšího prostředí (infekce, kouření, stres).

Zcela známá není ani imunologická podstata nemoci. Původně se předpokládalo, že RA je zprostředkována výhradně CD4⁺ T lymfocyty, ale postupně se od této hypotézy upouštělo. Dnes se předpokládá, že se na patogenezi RA významně podílejí B lymfocyty společně s dalšími složkami vrozené a adaptivní imunity.

Hlavní úlohou B lymfocytů v RA je produkce autoprotilátek detekovatelných v séru pacientů s RA. Většina z nich ale není specifická pouze pro RA a vyskytuje se také u ostatních autoimunitních onemocnění a zdravých jedinců. Aby mohla být s jistotou určena diagnóza, byly intenzivně hledány autoprotilátky, které by byly specifické výhradně pro RA. Takovými autoprotilátkami jsou protilátky proti proteinům obsahujícím citrulin, které mají jako marker časně fáze RA značný prognostický potenciál.

Moje diplomová práce byla zaměřena na analýzu B lymfocytů rozeznávajících proteiny obsahující citrulin. Tyto B lymfocyty jsou po diferenciaci v plazmatické buňky zodpovědné za vznik protilátek proti citrulinovaným proteinům. Cílem práce bylo zjistit, zda je možné B lymfocyty specifické pro proteiny obsahující citrulin detekovat pomocí syntetických citrulinovaných peptidů, izolovat je a určit, jaké imunoglobulinové geny jsou u těchto B lymfocytů exprimovány. Abychom mohli lépe poznat imunologickou podstatu onemocnění, zaměřili jsme se také na charakterizaci B lymfocytárních populací přítomných v periferní krvi pacientů s RA. Výsledky práce by

mohly v budoucnu umožnit syntézu antiidiotypových protilátek zaměřených na autoprotilátky přítomné u konkrétního pacienta. Léčbu by tak bylo možné zahájit již v časném stádiu vývoje, byla by mířena specificky a došlo by k výraznému zmírnění vedlejších účinků.

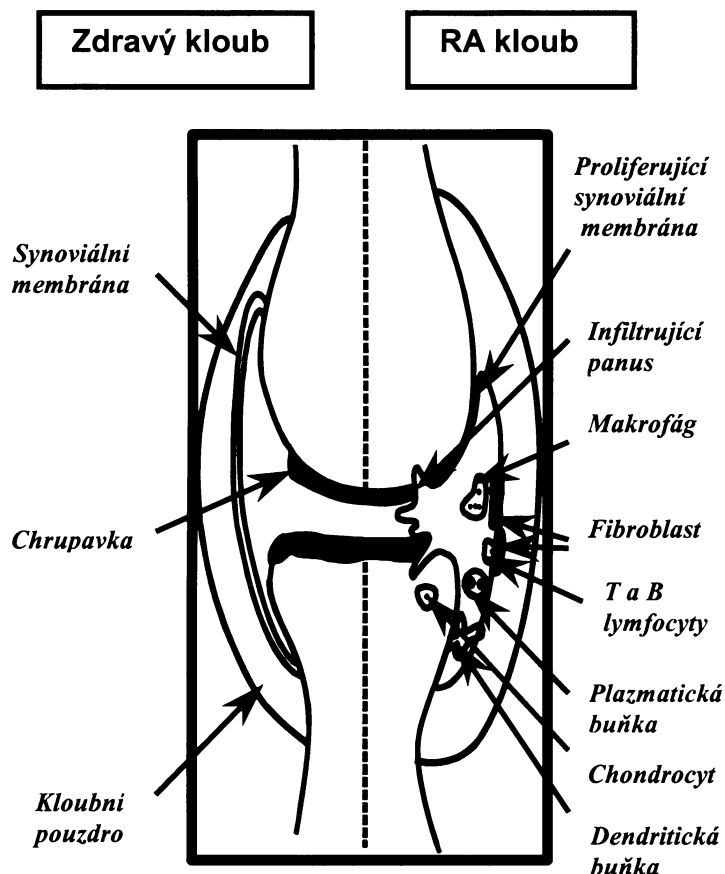
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Klinický obraz

Jedním z hlavních klinických projevů revmatoidní artritidy (RA) je symetrický chronický zánět malých i velkých kloubů (ZVAIFLER, 1973). Jako první bývají postiženy malé klouby (záprstní, zápěstní a klouby prstů), později dochází k poškození také velkých kloubů (zejména ramenní, loketní, kolenní a kotníkové klouby). Průběh nemoci je těžko předvídatelný a projevy se mohou velmi lišit – od mírného průběhu až po vážné systémové onemocnění, kdy je zánět kloubů doprovázen četnými mimokloubními projevy. Nejčastěji jde o vaskulitidu (zánět cév), serozitidu (zánět sérózní blány) a vznik revmatických uzlů (pravděpodobně následek vaskulitidy malé cévy), které jsou tvořeny centrální nekrózou obklopenou proliferujícími fibroblasty. Mezi méně časté komplikace patří postižení očí, plic, srdce, různé hematologické abnormality, Feltyho syndrom (kombinace RA, splenomegalie a leukopenie), postižení jater, různá neurologická postižení nebo amyloidóza (ukládání amyloidu ve tkáních) (PAVELKA et al., 2003). Dlouhodobá prognóza nemoci je nepříznivá – po 10 letech od diagnózy vykazuje 50% pacientů významné zhoršení pohyblivosti, po 20 letech je již 80% pacientů znehybněno (SCOTT et al., 1987). Celkově RA zkracuje život až o 10 let (VAN LEEUWEN et al., 1993). U části pacientů s časnou RA trvající méně než 4 měsíce může vzácně dojít ke spontánní remisi onemocnění (RAZA et al., 2005).

Nejvýznamnějším projevem zánětu kloubu je hyperplazie synoviální membrány, ve které je zánět lokalizován. Ta je nadměrně prokrvována, kapiláry a venuly se rozšiřují a krevní plazma se dostává do kloubní dutiny. Umožňuje tak vznik zánětlivého infiltrátu tvořeného zejména makrofágy, aktivovanými T lymfocyty, B lymfocyty, dendritickými a plazmatickými buňkami (FIRESTEIN a ZVAIFLER, 1990; FELDMANN et al., 1996; THOMAS et al., 1999; DÖRNER a BURMESTER, 2003). Makrofágy tvoří v zanícené synovii přes 80% z celkové buněčné populace (oproti 20-30% v normální synovii), jsou zde aktivovány a produkují řadu prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-6, TNF- α) (CUTOLO et al., 1993). Vznik zánětlivého infiltrátu společně s nadměrnou proliferací fibroblastů přirozeně přítomných v synoviální membráně přispívá k hypertrofii synoviální membrány, která je nadměrně prokrvená a oteklá, na jejím povrchu se tvoří klky a fibrinové ostrůvky (PAVELKA et al., 2003). S postupem nemoci otok mizí a klky atrofují. Synoviální výstelka kloubu výrazně proliferuje, je značně zvětšená a zbytnělá a tvoří prstovité výběžky (tzv. panus) prorůstající povrch chrupavky.

Synoviální membrána hraje důležitou roli ve výživě chrupavky. Při zánětlivém procesu je membrána značně poškozena a chrupavka tak nemá být z čeho vyživována. Aktivované buňky v panusu navíc produkují řadu degradačních enzymů, které přispívají k destrukci chrupavky a přilehlé kosti. Postupně zánět postihuje také kloubní pouzdra, šlachy, vazy, labra a disky (PAVELKA et al., 2003) (Obr.1).



Obr.1 Srovnání kloubu postiženého RA a zdravého kloubu

Uvnitř kloubu postiženého RA dochází k tvorbě zánětlivé tkáně zvané panus, která prorůstá chrupavku a od obvodu ji začíná nahrazovat. Později se panus rozšiřuje také na ostatní části kloubu. Zároveň dochází k vazodilataci kapilár a venul synoviální membrány a krevní plazma tak může pronikat do kloubní dutiny, kde spolu s makrofágy, T a B lymfocyty a plazmatickými buňkami vytváří zánětlivý infiltrát. Pozměněny jsou také vazivové a dendritické buňky kloubní tkáně .

Histologicky se v zanícené synovii vyskytují tři radiálně uspořádané vrstvy – centrální (nekrotická), střední a vnější. Centrální část vzniká fibroidní degenerací a nekrózou, je pro ni charakterický výskyt IgM a IgG. Střední vrstva je tvořena palisádovým lemem makrofágů, popřípadě mnohояdernými buňkami, které obklopují centrální zónu. Vnější vrstvu tvoří lymfocyty a plazmatické buňky (PAVELKA et al., 2003).

3.2. Etiopatogeneze a rozvoj RA

Příčina vzniku revmatoidní artritidy není doposud známa, z mnoha studií je však zřejmé, že se jedná o multifaktoriální onemocnění podmíněné polygenně s příspěvkem faktorů vnějšího prostředí (WANDSWORTH a BELL, 1992). Na genetické predispozici se podílejí zejména určité alely HLA II genů (VENCOVSKÝ, 1996). Pro RA pacienty kavkazské populace (obyvatelstvo evropského původu) jde především o HLA-DR1 a HLA-DR4, pro některé jiné etnické skupiny také o další antigeny. V kavkazské populaci jsou asociovány alely DRB1*0101, DRB1*0404 a DRB1*0401, přičemž zejména posledně jmenovaná alela předznamenává závažnější prognózu onemocnění (WEYAND et al., 1992; PAVELKA et al., 2003). DRB1 v názvu označuje lokus alely; * určuje, že se jedná o alelu; 04 označuje sérologickou specifitu; 01 je označení alely na základě její aminokyselinové sekvence (RŮŽIČKOVÁ a VENCOVSKÝ, 2001; KOLESÁR, 2004). Hlavní roli v patogenezi RA hraje tzv. sdílený (shared) epitop, který se vyskytuje u všech asociovaných alel. Jde o sekvenci 5 aminokyselin ve třetí hypervariabilní oblasti β řetězce vazebného žlábků pro peptid v pozici 70-74 (Gln-Arg/Lys-Arg-Ala-Ala) (GREGERSEN et al., 1987; WEYAND et al., 1992) (tab.1). Při rozvoji onemocnění se navíc uplatňuje tzv. efekt dávky genu – tedy čím více alel odpovědných za vznik revmatoidní artritidy jedinec má, tím pravděpodobněji RA vyvine. Alely asociované s RA tvoří oproti neasociovaným alelám (např. DR*0402, DR*0403) relativně nestabilní DR-CLIP komplexy (komplex zabraňující navázání vlastních peptidů na MHC II molekulu), což potenciálně vede k prezentaci autoantigenů a následnému prolomení autotolerance (PATIL et al., 2001). Pro úlohu HLA genů svědčí také přítomnost IgG4 autoprotilátek (zatímco izotypy IgG2 a IgG3 se vyskytují pouze velmi vzácně), která je charakteristická pro produkci protilátek závislou na T lymfocytech (VOSSENAAR a VAN VENROOIJ, 2004A).

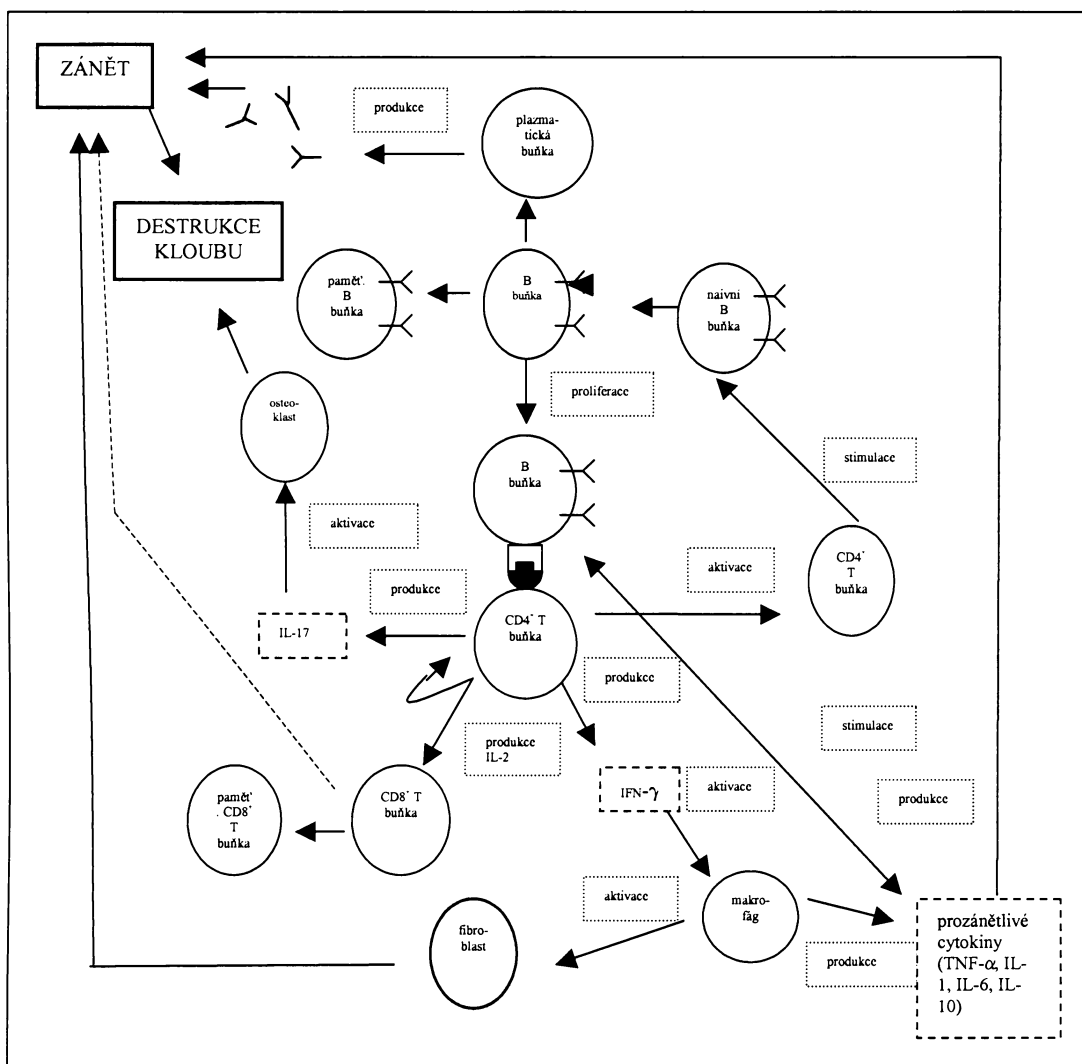
Při vzniku RA se však uplatňuje také mnoho non-MHC genů. Byla vyvinuta hypotéza tzv. dvousložkového procesu, která říká, že alely určitých genů predisponují k rozvoji autoimunitního stavu obecně (např. HLA II geny), zatímco na vzniku individuálních forem RA i dalších autoimunitních onemocnění se specificky podílejí alely některých non-MHC genů (GLASS a GIANNINI, 1999). Uvažují se zejména geny pro cytokiny a jejich receptory (KLARESKOG et al., 2002), dále např. promotor genu pro IL-10 (LARD et al., 2003), gen pro enzym peptidylarginin deiminázu 4 (peptidylarginin deimináza způsobuje záměnu argininového zbytku v proteinu za citrulin) (SUZUKI et

al., 2003), geny kódující expresi molekul CD80 a CD86 (CORNÉLIS et al., 1998) nebo promotor genu pro FCRL 3 (Fc receptor-like gen 3) (IKARI et al., 2006).

Alela	Aminokyselinová sekvence (70-74)	Asociace s RA
HLA DRB1*0101	Gln-Arg-Arg-Ala-Ala	+
HLA DRB1*0401	Gln-Lys-Arg-Ala-Ala	+
HLA DRB1*0402	Asp-Glu-Arg-Ala-Ala	-
HLA DRB1*0403	Gln-Arg-Arg-Ala-Glu	-
HLA DRB1*0404	Gln-Arg-Arg-Ala-Ala	+
HLA DRB1*0405	Gln-Arg-Arg-Ala-Ala	+
HLA DRB1*0408	Gln-Arg-Arg-Ala-Ala	+
HLA -Dw16	Gln-Arg-Arg-Ala-Ala	+
HLA DRB1*1001	Arg-Arg-Arg-Ala-Ala	-
HLA DRB1*1402	Gln-Arg-Arg-Ala-Ala	+

Tab. 1 Porovnání aminokyselinové sekvence u asociovaných a některých neasociovaných alel

Pro všechny alely asociované s RA je charakteristická sekvence 5 aminokyselin ve třetí hypervariabilní oblasti β řetězce vazebného žlábků pro peptid v pozici 70-74 (Gln-Arg/Lys-Arg-Ala-Ala), tzv. sdílený epitop. Alely DRB1*0101, DRB1*0401 a DRB1*0404 jsou charakteristické pro kavkazoidní populaci, alely DRB1*1402 a HLA-Dw16 pro některé americké Indiány, alela DRB1*0405 pro japonskou populaci. U neasociovaných alel jsou odlišné aminokyseliny označeny červeně.



Obr. 2 Vzájemná spolupráce buněk při vzniku a udržování zánětu u RA

K aktivaci T buněk dochází po navázání antigenu prezentovaného APC buňkou na příslušný T buněčný receptor (TCR). Aktivované T lymfocyty následně produkují prozánětlivé cytokiny, jako jsou interleukin 2 (IL-2), IL-17 a IFN- γ . IL-2 je zodpovědný za klonální expanzi T lymfocytů. IL-17 se podílí na aktivaci osteoklastů, což má za následek rozpad kostní tkáně. IFN- γ stimuluje makrofágy k produkci velkého množství prozánětlivých cytokinů, jako je IL-1, IL-6 nebo TNF- α (Panayi, 2005). T lymfocyty po aktivaci začínají růst a na svém povrchu exprimují řadu molekul, jako je CD69, TNF- α ligand pro RANK (RANKL) nebo ligand pro osteoprotegerin. Každá z těchto molekul se podílí na aktivaci některého typu buněk a podporuje tak rozvoj zánětu. CD69 napomáhá aktivovat makrofágy, TNF- α synoviální fibroblasty a RANKL a ligand pro osteoprotegerin hrají důležitou roli v aktivaci osteoklastů (Panayi, 2005). Aktivované T lymfocyty mohou navíc aktivovat makrofágy přímým mezibuněčným kontaktem. Všechny tyto děje vedou společně ke vzniku a udržení chronického zánětu (Panayi, 2005). Role CD8⁺ T lymfocytů při rozvoji RA je stále nejistá.

Důležitým faktorem je pohlaví, u žen se RA vyskytuje 2,5x častěji než u mužů. Konkordance u jednovaječných dvojčat je 15-30%, což ukazuje na důležitou úlohu faktorů vnějšího prostředí (VENCOVSKÝ, 1996). Těmito faktory může být například sters, kouření (zejména u RF pozitivních pacientů navíc zvyšuje riziko výskytu revmatických uzlů) (NYHALL-WAHLIN et al., 2006), užívání hormonální antikoncepce (GABRIEL, 2001) nebo infekce (ALBANI et al., 1995). O řadě bakterií nebo virů je známo, že mohou vyvolat artritidu u zvířat (LORENZ et al., 2006). U lidí se uvažuje o roli EBV, mykobakterií nebo retrovirů (např. K10), žádná z těchto hypotéz však nebyla potvrzena (VENCOVSKÝ, 1996; EJTEHADI et al., 2006).

U geneticky predisponovaných jedinců spouští vnější podnět kaskádu buněčných a molekulárních reakcí, která vede ke vzniku RA (KOTZIN, 2005). Mezi počátečním impulsem a skutečným vznikem nemoci může být však až několik let (VOSSENAAR a VAN VENROOIJ, 2004B). Jak je patrné z obr.2, zánětlivého procesu se účastní mnoho typů buněk, včetně monocytů, makrofágů, B a T lymfocytů, endoteliálních buněk a fibroblastů. Na základě posledních výzkumů je stále větší důležitost přikládána B buňkám. Hypotézy předpokládající jejich značný podíl na rozvoji RA vycházejí především z výsledků studií myších transgenních modelů RA (SILVERMAN a CARSON, 2003) a z velmi úspěšné léčby RA pomocí protilátky zvané Rituximab, která se specificky váže na B lymfocyty (EDWARDS et al., 2004).

Pro aktivaci B lymfocytů je velmi důležitá exprese kostimulační molekuly CD40, která interaguje s molekulou CD40L (CD154) na povrchu aktivovaných CD4⁺ T lymfocytů. Interakce mezi T a B buňkami jsou nyní považovány za nejdůležitější součást imunitní reakce při RA. B buňky poskytují kostimulační signály nutné pro aktivaci a klonální expanzi CD4⁺ T buněk (PANAYI, 2005) a stimulují jejich migraci do zanícené tkáně (TAKEMURA et al., 2001). Aktivované T lymfocyty stimulují non-T efektorové buňky včetně B lymfocytů k produkci prozánětlivých cytokinů. Důležité jsou zejména TNF- α a IL-1 (FONTENOT et al., 2003), ale také IL-6 a IL-10, které zpětnou vazbou pozitivně stimulují B buňky a zánětlivé procesy jsou tak opakovaně vyvolávány. Aktivita B buněk je u pacientů s RA vyšší než u zdravých jedinců, stejně tak jako jejich mutační aktivita v zanícené synoviální tkáni (DÖRNER a BURMESTER, 2003). Navíc cytokiny produkované aktivovanými B lymfocyty mohou ovlivnit funkci antigen prezentujících dendritických buněk (DÖRNER a BURMESTER, 2003). B buňky dále produkují autoprotilátky a hrají důležitou roli jako antigen prezentující buňky (APC).

3.3. Léčba RA

Nejdůležitější faktorem pro úspěšnou léčbu RA je její včasná diagnóza. K poškození kloubu dochází během prvních dvou měsíců po nástupu onemocnění a změny jsou nevratné (MACHOLD et al., 2002; ALETAHA et al., 2005). Současné metody léčby jsou schopné postup destrukce zastavit nebo alespoň výrazně zpomalit (SMOLEN a STEINER, 2003). S ohledem na stav pacienta a protilátky přítomné v séru (typ, titry) a jejich prognostický význam je nutné volit pro každého jedince individuální léčbu.

3.3.1. Analgetika a nesteroidní antirevmatika

Analgetika a nesteroidní antirevmatika (NSA) se podávají v aktivní fázi nemoci spolu s jinými léky a slouží pouze jako symptomatická léčba, příčinu neodstraňují. Odpověď na tyto léky je u každého pacienta odlišná, a proto bylo vyvinuto více druhů NSA. Nevýhodou jsou možné nežádoucí účinky (PAVELKA et al., 2003)

3.3.2. Chorobu modifikující antirevmatické léky

Chorobu modifikující antirevmatické léky (disease modifying antirheumatic drugs – DMARDs) narozdíl od NSA potlačují přímo zánětlivou reakci a omezují tak destrukci kloubu (PANAYI et al., 2005). Patří sem například cyklosporin A, antimalarika nebo soli zlata, z novějších pak methotrexát a sulfasalazin. Výhodou modernějších DMARDs je rychlejší nástup účinku. Typ DMARDs se určuje podle prognostických ukazatelů, u onemocnění s nepříznivou prognózou se využívá kombinace 2 typů léků. Většina DMARDs není pacientem tolerována více jak dva roky (PAVELKA et al., 2003).

3.3.3. Synoviortéza

Využívá se zejména tzv. radiosynoviortézy, tedy podání radioizotopů (např. yttrium) do kloubní dutiny. Účelem synoviortézy je razantní potlačení zánětu a hyperplazie synovie. Původní obavy z možného poškození chromozomů při radiosynoviortéze se ukázaly jako neopodstatněné (PAVELKA et al., 2003).

3.3.4. Kortikosteroidy

Kortikosteroidy jsou rychle a intenzivně působící protizánětlivé léky a mají často příznivý vliv také na mimokloubní projevy RA. Jejich účinek se však s postupem onemocnění ztrácí. Nevýhodou jsou časté vedlejší účinky, zejména vznik osteoporózy (VAN STAA et al., 2000). Kortikosteroidy lze podávat rovněž intravenózně, tento způsob však není zcela bezpečný a může mít až fatální důsledky (selhání srdce, závažné

infekce), proto se používá pouze při život ohrožujících stavech. Dále je možné nitrokloubní podání, které vede k ovlivnění lokálního zánětu kloubu a některých mimokloubních projevů (PAVELKA et al., 2003).

3.3.5. Biologická léčba

3.3.5.1. Anti-TNF α

Zánětlivý proces při RA je doprovázen produkcí řady cytokinů. Jako nejdůležitější byl identifikován TNF α , jehož inhibice vede ke snížení aktivity RA. Jako inhibitory se využívají plně humánní anti-TNF α monoklonální protilátka (D2E7), myší humanizovaná anti-TNF α monoklonální protilátka (CDP571), chimerická lidská/myší anti-TNF α monoklonální protilátka zvaná Infliximab, plně humanizovaná monoklonální protilátka proti TNF α Adalimumab a rozpustný receptor pro TNF α zvaný Entanercept - jde o fúzovaný protein obsahující 2 rekombinativní p75 TNF α receptor a Fc segment lidského IgG1 (MORELAND et al., 1997).

3.3.5.2. Rituximab

V současné době se v biologické léčbě využívá také nový lék Rituximab, který byl původně vyvinut pro léčbu B buněčných malignit (CLL, NHL). V terapii RA se začal zkoušet s objevením úlohy B buněk na rozvoji onemocnění. Jedná se o chimerickou lidskou/myší monoklonální protilátku specificky se vážící na CD20⁺ antigen B buněk, komerčně zvanou MabThera[®]/Rituxan[®] (Roche Pharmaceuticals, Basilej, Švýcarsko; Genentech, South San Francisco, USA; IDEC Pharmaceuticals, San Diego, USA) (OLIGINO a DALRYMPLE, 2003). Rituximab se skládá z lidských konstantních domén těžkého řetězce IgG₁ a konstantních domén lehkého řetězce κ a myších variabilních domén (ROUZIÈRE et al., 2005). CD20 molekula je 32 kDa neglykosylovaný fosfoprotein, který je přítomný na B buňkách všech vývojových stádií. Na ostatních typech buněk včetně plazmatických buněk přítomný není (RILEY a SLIWKOWSKI, 2000), vazba Rituximabu na B buňky je proto vysoce specifická a způsobuje významné snížení jejich počtu tak, že B lymfocyty nejsou dlouhodobě (obvykle 6 – 9 měsíců) detekovatelné v cirkulaci pacienta (EDWARDS et al., 2004; GORMAN et al., 2003). Ke snížení počtu CD20⁺ B buněk dochází několika způsoby, z nichž nejdůležitější jsou tyto tři:

1) Cytotoxicita závislá na protilátkách (CLYNES et al., 2000), kdy je díky vazbě CD20 na Fc γ receptor lýza CD20⁺ B buněk zprostředkována cytotoxickými T (Tc) lymfocyty, monocyty a makrofágy.

2) Stimulace CD20⁺ B lymfocytů k apoptóze (REFF et al., 1994).

3) Deplece B lymfocytů zprostředkovaná aktivací komplementové kaskády a následnou tvorbou lytického póru, která je způsobena současnou vazbou Rituximabu na CD20 molekulu a C1q (REFF et al., 1994).

Pravděpodobným následkem vymizení CD20⁺ B lymfocytů z cirkulace je také výrazné a dlouhodobé snížení hladiny autoprotilátek, např. RF (EDWARDS et al., 2004). Rituximab se používá rovněž v kombinaci s některými DMARDs (cyklofosfamid, methotrexát) nebo kortikosteroidy (GORMAN et al., 2003; EDWARDS et al., 2004). Při léčbě pomocí Rituximabu dochází k významnému zmírnění projevů nemoci, při léčbě v kombinaci s jinými léčivými, zejména methotrexátem jsou výsledky ještě slibnější (EDWARDS et al., 2004). Léčba Rituximabem je pacienty dobře snášena a rozvoj imunitní reakce proti Rituximabu je vzácný (EDWARDS et al., 2004). Navíc CD20 molekula není přítomna ani na B buněčných prekurzorech, což umožňuje po skončení léčby obnovu B buněk v kostní dřeni (ROUZIÈRE et al., 2005).

3.3.5.3. Další biologická léčba

Kromě anti-TNF α a Rituximabu se zkoušelo také podávání monoklonálních protilátek proti CD4, CD7, CDw52, CD5, ICAM-1, IL-2R a IL-1, léčba však neměla žádaný účinek (ECKSCHLAGER et al., 1999). Jako potenciální cíl léčby se jeví také BAFF (B-cell activating factor), jehož množství je nejen u RA, ale také u dalších autoimunitních onemocnění zprostředkovaných B lymfocyty (systémový lupus erythematosus, primární Sjögrenův syndrom), signifikantně zvýšeno (WEINSTEIN et al., 2004).

3.3.6. Nemedikamentózní léčba

Jako podpora užívaných léků se využívá nemedikamentózní léčba. Ke zmírnění zánětlivých procesů významnou měrou přispívá klid – k lokálnímu zklidnění se využívá dlahy nebo ortézy, pro zmírnění zátěže u nosných kloubů opěrné pomůcky (hole), ke zklidnění systémové zánětlivé odpovědi je využíván klid na lůžku. Pohyb a cvičení sice napomáhá rozvoji zánětu, ale terapie musí být vždy doplněna odbornou rehabilitací. Jako další pomocné procedury se využívá kryoterapie (léčba chladem), elektroterapie, ultrazvuková terapie, magnetoterapie nebo terapie laserem. Krajiním řešením je operace (částečná nebo úplná synovektomie), jde ale pouze o symptomatickou léčbu. Jako

poslední možnost může být použito také ozáření lymfatických uzlin nebo dokonce transplantace kostní dřeně (PAVELKA et al., 2003)

3.4. B lymfocyty v RA

Úloha B lymfocytů v rozvoji RA nebyla dlouhou dobu pokládána za příliš podstatnou. Kvůli nemožnosti korelace množství autoprotilátek v periferní krvi a stavu pacienta, byla RA považována za onemocnění, na jehož rozvoji se podílejí prakticky výhradně T lymfocyty, konkrétně CD4⁺ T lymfocyty. Také počet T buněk v synoviální tkáni postižené RA je výrazně vyšší než počet B buněk a množství prozánětlivých cytokinů produkovaných T lymfocyty je značné (WEINSTEIN et al., 2004). S postupujícím výzkumem bylo ovšem prokázáno, že samotné T lymfocyty nejsou pro rozvoj a udržení RA dostačující a že jejich aktivace v revmatoidní synovii je závislá na přítomnosti B lymfocytů (TAKEMURA et al., 2001). Navíc eliminace autoreaktivních B lymfocytů, například pomocí léku Rituximab, vede k výraznému zlepšení onemocnění (EDWARDS et al., 2004). B buňky tak přestaly být považovány pouze za zdroj protilátek a je jasné, že v patogenezi RA mají mnohem více kriticky důležitých rolí (WEINSTEIN et al., 2004).

Pro RA je nejdůležitější přítomnost B lymfocytů v zanícené synovii, kam jsou chemotakticky přitahovány zejména chemokiny CXCL9 a CXCL12, které se váží na B buněčné receptory CXCR3, resp. CXCR4 (ODENDAHL et al., 2004). Nejzřetelnější B buněčnou funkcí je již zmíněná produkce autoprotilátek, ať už se jedná o aCCP, RF nebo některé další méně časté autoprotilátky. Velmi důležitou funkci plní B lymfocyty také jako antigen prezentující buňky (APC). B buněčný receptor (BCR) se skládá z povrchově vázaného imunoglobulinu a molekul Ig α a Ig β (CD79a, CD79b) (HOŘEJŠÍ a BARTUŇKOVÁ, 2005). Povrchový imunoglobulin (nejčastěji IgD nebo IgM) je schopný navázat také antigeny, které se v okolí vyskytují pouze ve velmi omezeném množství. Tento antigen B buňka následně rozštěpí na antigenní peptid a pomocí HLA-DR4 molekuly ho prezentuje T lymfocytům. B lymfocyty tak díky specifické vazbě působí jako 100 – 1000x schopnější aktivátory T buněk v porovnání s ostatními APC, jako jsou makrofágy nebo dendritické buňky (KOTZIN, 2005; PANAYI, 2005). Funkcí B lymfocytů je rovněž produkce cytokinů (např. TNF- α , TNF- β , LT- β), které jsou nezbytné pro diferenciaci FDC v sekundárních lymfoidních orgánech, správnou funkci lymfoidních orgánů a podporují vznik germinálních center včetně ektopických (ROUZIÈRE et al., 2005).

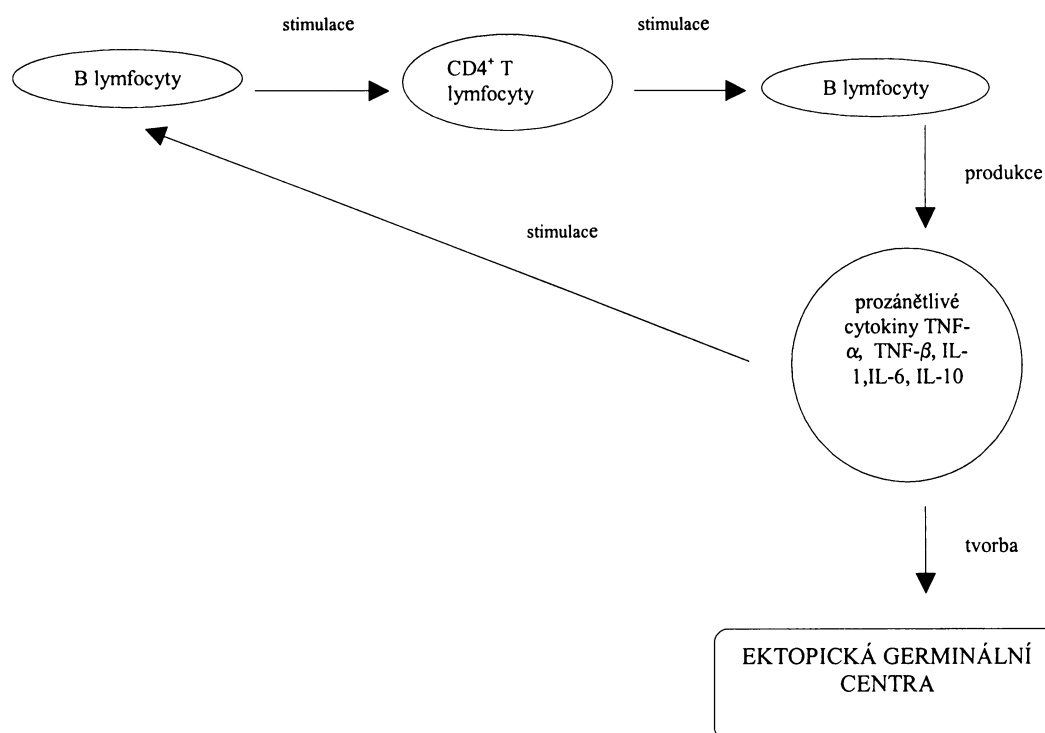
3.4.1. *Vznik autoreaktivních B lymfocytů*

Navození B buněčné autotolerance je proces ovlivňovaný mnoha faktory, jako je koncentrace antigenu v okolí, hormonální prostředí (ženy jsou autoimunitními chorobami postihovány výrazně častěji než muži) nebo exprese rozličných molekul, které regulují sílu BCR vazby, funkčnost signalizačních drah a produkci cytokinů. Míra negativní selekce se proto může v jednotlivých případech velmi lišit a B buňky, které by byly za normálních okolností eliminovány, mohou v určitém prostředí přežívat (WEINSTEIN et al., 2004).

Ke změnám ve funkci B buněk však dochází nejen u RA, ale také u mnoha dalších autoimunitních onemocnění, jako je systémový lupus erythematoses (SLE), primární Sjögrenův syndrom (pSS), myastenia gravis nebo diabetes mellitus (ROUZIÈRE et al., 2005). U všech nemocí, na jejichž rozvoji se podílejí autoreaktivní B buňky, je vždy přítomen defekt negativní selekce B buněk. Ten je způsoben buď větší schopností B buněk přežít, zvýšenou citlivostí k cytokinům poskytujícím pozitivní signály nebo zvýšenou citlivostí ke kostimulaci pomocí T lymfocytů. Porucha se ovšem nemusí týkat pouze B buněk, ale také T buněk nebo dendritických buněk, které jsou náchylnější k aktivaci a produkují cytokiny umožňující B buňkám uniknout negativní selekci nebo dávají B buňkám nesprávný kostimulační signál (WEINSTEIN et al., 2004).

3.4.2. *Ektopická germinální centra*

V synoviální membráně kloubu postiženého revmatoidní artritidou se nacházejí útvary strukturně, buněčně a částečně také funkčně podobné germinálním centrům (GC) sekundárních lymfoidních orgánů, ve kterých dochází k afinitní maturaci protilátek při sekundární fázi protilátkové odpovědi (SCHRÖDER et al., 1996; KIM et al., 1999; ITOH et al., 2000A; HOŘEJŠÍ a BARTŮŇKOVÁ, 2005). Tyto útvary se nazývají ektopická germinální centra nebo také pseudogerminální centra (SCHRÖDER et al., 1996; KIM et al., 1999). Skládají se z centrální, tmavé zóny obsahující hlavně B lymfocyty a světlé zóny, která centrální obklopuje a obsahuje zejména folikulární dendritické buňky (FDC). Prvním krokem pro vznik ektopického germinálního centra je tvorba FDC sítě stimulovaná prozánětlivými cytokiny TNF- α a lymfotoxinem- α (LT- α , TNF- β) produkovanými B lymfocyty (obr.3). V počátku onemocnění jsou ektopická GC poměrně vzácná a formují se až se změnou morfolgie synoviální tkáně (KIM et al., 1999).



Obr. 3 Mechanismus vzniku ektopických germinálních center

B lymfocyty přítomné v synovii působí jako antigen prezentující buňky (APC) a poskytují stimulační signály $CD4^+$ T buňkám, které následně stimulují B lymfocyty k produkci prozánětlivých cytokinů. Ty podporují vznik ektopických germinálních center a zároveň znovu stimulují B lymfocyty a umožňují tak vznik koloběhu a udržení zánětlivého procesu (KIM et al., 1999; SHIOKAWA et al., 2003)

Malá, vznikající ektopická GC obsahují spíše T_H lymfocyty a pouze velmi malý podíl B lymfocytů, zatímco velká centra obsahují především B lymfocyty (YANNI et al., 1992). Kromě folikulárních dendritických buněk, B lymfocytů a T_H lymfocytů obsahují ektopická GC také synoviální fibroblasty a makrofágy (SCHRÖDER et al., 1996; KIM et al., 1999). B buňky vznikající v centrální zóně postupně migrují do světlé zóny a soutěží zde s folikulárními dendritickými buňkami o antigen. Pokud dostanou podpůrný signál od přítomných T buněk, přežívají a mohou se dále diferencovat v paměťové nebo plazmatické buňky, které produkují vysoce afinní a vysoce specifické autoprotilátky (KIM et al., 1999). Postupně s délkou nemoci dochází k akumulaci mutací ve V_H genech B lymfocytů přítomných mezi folikulárními dendritickými buňkami (KIM et al., 1999).

Rozložení B lymfocytů přítomných v zanícené synoviální membráně a přístup k antigen prezentujícím buňkám jsou u jednotlivých pacientů velmi rozdílné a mají za následek různou intenzitu onemocnění. V zásadě existují tři možnosti rozmístění B lymfocytů v revmatoidní synovii. B buňky mohou:

- 1) vytvářet sekundární folikulární struktury
- 2) vytvářet útvary podobné folikulům s nepravidelnou sítí FDC
- 3) být difúzně rozptýleny po zanícené tkáni

Tvorba folikulů má za následek rozvoj RA se systémovými projevy, zatímco difúzní uspořádání má za následek pouze velmi mírnou manifestaci choroby (KRENN et al., 2000).

V ektopických germinálních centrech dochází k několika zásadním dějům důležitým v rozvoji RA:

A) Klonální expanze a (auto)antigenem řízená selekce

Klonální expanze je důsledkem autoantigenem řízené imunitní odpovědi (SHIOKAWA et al., 2003). Zúčastňují se jí jak paměťové, tak aktivované B buňky, probíhá in situ a zapříčiňuje vznik B lymfocytů s omezenou variabilitou BCR, které mohou reagovat na lokální autoantigeny (ITOH et al., 2000A). Expandující B lymfocyty jsou v synoviální tkáni přítomné po celou dobu zánětu (ITOH et al., 1999; SHIOKAWA et al., 2003). Autoantigenem řízená selekce zvyšuje afinitu autoreaktivního BCR a B lymfocyty ji mohou podstoupit vícekrát (ITOH et al., 2000A),

B) Exprese rekombinací aktivujících genů Rag 1 a Rag 2 a revize receptoru

Proteiny produkované Rag1 a Rag2 geny stimulují přeskupování variabilních oblastí genů pro těžké řetězce imunoglobulinů, tzv. revizi receptoru (SCHRÖDER et al., 1996; KIM et al., 1999; ITOH et al., 2000A). Podstupují ji buňky, které neváží antigen s dostatečnou afinitou (ITOH et al., 2000A; WILSON et al., 2000) a revize receptoru je tak jedna z možných cest ke vzniku autoimunity.

C) Diferenciace B buněk v plazmatické buňky

Posledním a velmi podstatným dějem, ke kterému v ektopických GC dochází je již zmíněná diferenciace B buněk v plazmatické buňky a následná produkce autoprotilátek (ZVAIFLER et al., 1973; KIM et al., 1999). Plazmatické buňky mají v synoviální tkáni

poměrně dlouhou životnost (více než jeden rok), a proto se u pacientů s RA akumuluje a obklopuje zánětlivý infiltrát (ZVAIFLER et al., 1973; KIM et al., 1999; MOSER et al., 2006). Velké množství plazmatických buněk se vyskytuje zejména v synoviální membráně pacientů s dlouhotrvající synovitiidou. Naproti tomu životnost B buněk je v synoviální tkáni velmi omezená (KIM et al., 1999).

Současným působením všech těchto mechanismů vzniká nový repertoár B buněk s velmi vysokou afinitou k antigenu. Každý konkrétní pacient má tak pouze omezený soubor imunitních buněk, typický pro každý jednotlivý kloub postižený revmatoidní artritidou. Majoritní zastoupení mají především V_{H1} a V_{H3} genové rodiny obsahující somatické mutace zejména v CDR3 oblastech (VAN ESCH et al., 2003). Podobné B buněčné klony ale mohou být přítomny na odlišných oddělených místech (SHIOKAWA et al., 2003).

V synoviální membráně kloubu postiženého RA dochází k masivní klonální expanzi nejen B, ale také T lymfocytů (KIM et al., 1999), oba typy buněk navíc úzce spolupracují. Omezený repertoár B a T buněk u pacientů s RA souvisí s malým množstvím poskytovaných autoantigenů, které jsou neustále buňkám k dispozici. Počet autoreaktivních buněk a jejich afinita tak s délkou trvání nemoci narůstá (ITOH et al., 2000A, B).

Přestože ektopická GC jsou klasickým GC velmi podobná, vznikají v prostředí, které za normálních okolností diverzifikaci B buněk nepodporuje a nedává jim stejné typy a množství diverzifikačních signálů jako GC. To vede k rozdílům v zapojených mechanismech (somatické mutace, revize receptoru) a v jejich regulaci. Nulová selekce vzniklých mutací a přestaveb může vést ke vzniku nefunkčního BCR nebo také k iniciaci autoimunity (ITOH et al., 2000A).

3.5. Autoprotilátky u RA

Jednou z charakteristik revmatoidní artritidy je přítomnost autoprotilátek v cirkulaci, které mohou přímo přispívat ke vzniku zánětu. Buňky sekretující protilátky se nacházejí v kostní dřeni, sliznicích a chronicky zanícených tkáních (ODENDAHL et al., 2004). Přestože jak pacienti s RA, tak zdraví jedinci mají v periferní krvi mnoho prekurzorových B buněk, které by po aktivaci byly schopné produkovat autoprotilátky, nejsou tyto buňky pravděpodobně odpovědné za produkci autoprotilátek detekovatelných v séru (REPARON-SCHUIJT et al., 2001). Autoprotilátky, které mají

majoritní podíl na rozvoji RA, jsou produkovány přímo v místě zánětu plazmatickými buňkami přítomnými v ektopických germinálních centrech (SCHRÖDER et al., 1996, KIM et al., 1999). Hladiny imunoglobulinů v synovii zaníceného revmatického kloubu mohou dosáhnout stejné výše jako ve slezině (MASSON-BESSIÈRE et al., 2000).

3.5.1. *Mechanismus tvorby autoprotilátek*

Protilátky se skládají ze čtyř polypeptidů – dvou identických těžkých a dvou identických lehkých řetězců. Existují dva typy lehkých řetězců – κ a λ , mezi kterými nejsou žádné funkční rozdíly. Těžký řetězec je s druhým těžkým řetězcem a s lehkým řetězcem spojen disulfidickými můstky. Antigenní specifita dané protilátky je dána zhruba 110 aminokyselinami na NH_2 terminálních doménách těžkých i lehkých řetězců, které tvoří tzv. variabilní oblast. Konstantní oblasti těžkých řetězců jsou rozdílné podle izotypu imunoglobulinu, konstantní oblasti lehkých řetězců se navzájem neliší (SERREZE, 2001).

Geny pro imunoglobulinové řetězce se nachází na chromozomu 14 (geny pro těžký řetězec), 2 (geny pro lehký řetězec κ) a 22 (geny pro lehký řetězec λ). Existuje 7 genových rodin variabilní oblasti těžkého řetězce nazývaných V_{H1} - V_{H7} a rozlišovaných podle signální sekvence. Všechny jsou minimálně z 80% homologické (WILSON et al., 2000). Geny pro lehké i těžké řetězce imunoglobulinů obsahují tři CDR (complementarity determining region) oblasti a čtyři FR (framework region) oblasti. CDR1 a CDR2 jsou kódované pouze V_H geny, oblast kódující CDR3 se skládá z 3' konce V_H úseku, celého D_H úsek, 5' konce J_H úseku a N nukleotidů, které jsou náhodně přidávány na V_H -D a D- J_H spoje (SHIOKAWA et al., 2003). Pro klonální analýzu B lymfocytů je důležitá zejména CDR3 oblast těžkého řetězce (HCDR3), jednotlivé klony vykazují značnou homologii aminokyselinových sekvencí v CDR3 oblastech (RAATS et al., 2003). Délka HCDR3 je velmi variabilní (5-35 tripletů), ale je charakteristická a prakticky neměnná pro členy jednotlivých klonů, a proto může být využívána pro jejich identifikaci. U zdravého jedince se rozsah délek HCDR3 oblastí rozprostírá na Gaussově křivce s vrcholem na délce 15 tripletů, posun jakýmkoliv směrem signalizuje specifickou B buněčnou klonální expanzi. Také v rámci klonů ovšem dochází k určité diverzifikaci a jednotliví členové klonu mohou obsahovat rozdílné mutace (ITOH et al., 2000A)

Při tvorbě autoprotilátek jsou využívány mechanismy platné pro tvorbu protilátek obecně – tj. pomocí mechanismu výběru (selekce) a přeskupování imunoglobulinových segmentů (gene rearrangement) se vytváří molekula mRNA kódující těžký a následně také lehký Ig řetězec. Přeskupování imunoglobulinových segmentů probíhá synchronně na obou chromozomech (HOŘEJŠÍ a BARTŮŇKOVÁ, 2005).

Prvním krokem tvorby protilátek je D-J přeskupení, při kterém dochází k vyštěpení oblasti mezi jedním z D segmentů a některým J segmentem. Následuje vyštěpení oblasti mezi vzniklým D-J úsekem a některým V segmentem tak, že nevyštěpen zůstane pouze jeden D segment. Pokud je jeden chromozom s takovouto přestavbou schopen produkovat těžké řetězce, je přeskupování zastaveno také na druhém chromozomu a buňka tak produkuje pouze jeden typ těžkého řetězce. Tomuto procesu se říká alelická exkluze a jeho mechanismus není dosud přesně znám. Jako první se vytvářejí C_{μ} řetězce, jejichž geny jsou nejbližší VDJ seskupení. Buňka, která je schopna tvořit μ -řetězce, se nazývá pre-B lymfocyt má na svém povrchu tzv. pre-BCR, který se skládá z těžkého řetězce a tzv. náhradního lehkého řetězce tvořeného proteiny VpreB a $\lambda 5$ (HOŘEJŠÍ a BARTŮŇKOVÁ, 2005). Na přeskupování genů se podílejí zejména tři enzymy – produkty genu Rag1 a Rag2 a kináza Prkdc (protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide). RAG1 a RAG2 nejsou přes značnou podobnost funkcí sekvenčně příbuzné (SERREZE, 2001).

Přeskupování lehkých řetězců probíhá podobně jako u těžkých, rozdíly jsou závislé na jednodušší struktuře (kromě absence D segmentu mají také menší počet V a J úseků). Přestavba začíná přeskupováním lehkého řetězce κ a probíhá souběžně na obou chromozomech, dokud není řetězec schopný vytvářet s H řetězcem stabilní povrchový IgM. Také při přeskupování lehkých řetězců se uplatňuje alelická exkluze. K zahájení přestavby λ řetězců dochází pouze v případě, že rearrangement κ řetězců není úspěšný ani na jednom z chromozomů. Tato přestavba probíhá obdobným způsobem a pokud opět není úspěšná, buňka zanikne. Stejný osud čeká buňku v případě, že není schopna vytvářet stabilní dimery H a L řetězců, a není tudíž schopna vytvářet kompletní povrchový IgM (HOŘEJŠÍ a BARTŮŇKOVÁ et al., 2005). U člověka má zhruba 60% protilátek lehký řetězec κ (KÜPPERS et al., 1993), u autoprotilátek je však výrazně vyšší podíl imunoglobulinů obsahujících λ řetězec (RAATS et al., 2003). V případě úspěšného pokusu a následné expresi IgM se z pre B lymfocytů stává nezralý B lymfocyt (HOŘEJŠÍ a BARTŮŇKOVÁ, 2005). V určitých patologických případech

(např. u autoimunitních chorob) není výběr V_H a V_L genů neomezený a párování tedy není možné považovat za náhodné (VAN ESCH et al., 2003).

Náhodnost přeskupení mezi V a J segmenty a asociace samostatných lehkých a těžkých řetězců má za následek obrovskou rozmanitost vznikajících B lymfocytů. Variabilita může být navíc podpořena také tzv. spojovací variabilitou, tedy tím, že přeskupování není vždy přesné a často dochází k delecí nukleotidů z 3' konce V segmentu, z 5' konce J segmentu a u těžkých řetězců také z obou konců D segmentu. Navíc jsou terminální transferázou (TdT) náhodně přidávány nukleotidy (tzv. N-sequvence) na spojení přeskupených genových segmentů. Variabilita rovněž narůstá somatickými mutacemi již přeskupených V segmentů po styku zralého B lymfocytu s antigenem prezentovaným na povrchu folikulárních dendritických buněk (HOŘEJŠÍ a BARTŮŇKOVÁ, 2005). U RA je však v důsledku omezeného množství poskytovaného antigenu a antigenem řízené stimulace a selekce B lymfocytů v ektopických GC omezená exprese genů germinální linie. V_H alely vyskytující se u jednotlivých jedinců jsou pravděpodobně důsledkem rozdílné genetické predispozice. V B lymfocytech izolovaných ze synoviální tekutiny pacientů s RA převládají zejména V_{H1} a V_{H3} , ale také V_{H4} imunoglobulinové rodiny (RAATS et al., 2003). Omezené množství V_H a V_L genů a jejich značná homologie má pravděpodobně důležitou úlohu v rozpoznávání proteinů obsahujících citrulin (RAATS et al., 2003).

3.5.2. Typy autoprotilátek u RA

Nejčastějšími autoprotilátkami jsou revmatoidní faktory (RF) rozpoznávající Fc část IgG vlastního organismu a autoprotilátky specifické pro proteiny obsahující citrulin (aCCP) (SCHELLEKENS et al., 2000; KOTZIN, 2005). Dále se při RA mohou v séru pacienta vyskytovat anti-RA33 (HASSFELD et al., 1989), anti-kalpastatin (VAN BOEKEL et al., 2002), antineutrofilní cytoplazmatické protilátky (ANCA; VAN BOEKEL et al., 2002), antifosfolipidové protilátky (VAN BOEKEL et al., 2002), protilátky proti jaderným antigenům (ANA; TAN, 1986), proti kolagenu typu II (VAN BOEKEL et al., 2002), antifibronektinové protilátky (VAN BOEKEL et al., 2002), anti-GPI (SCHALLER et al., 2001), protilátky proti peptidylarginin deimináze 4 (TAKIZAWA et al., 2005), anti-BiP (BLÄSS et al., 2001; BiP – heavy chain Binding Protein) nebo anti-Sa protilátky (MÉNARD et al., 2000). Kromě tří posledně jmenovaných nejsou ale tyto méně hojné autoprotilátky příliš specifické pro RA a

vyskytují se také u dalších autoimunitních onemocnění, jako je např. SLE (VOSSENAAR a VAN VENROOIJ, 2004A).

Protilátky proti glukóza-6-fosfát izomeráze (anti-GPI protilátky) se vyskytují u 64% pacientů s RA a nejsou přítomny v séru kontrol. Byly objeveny u myších modelů RA, kde mohou samy o sobě vyvolat rozvoj onemocnění. Jejich přítomnost u lidí však patrně není spojena s patologickými procesy (VAN BOEKEL et al., 2002; KOTZIN, 2005).

Anti-BiP protilátky reagují na N-acetylglukosamin karbohydrátové skupiny BiP, která ale není na proteinu za normálních okolností přítomna (BLÄSS et al., 2001). Objevuje se zde v případě, že je buňka stresována (např. zánět synoviální membrány) a způsobuje translokaci BiP proteinu z místa jeho vzniku (endoplazmatické retikulum) na povrch buňky (BLÄSS et al., 2001). Anti-BiP protilátky však pravděpodobně nemají žádný prognostický potenciál, ani se nevyskytují v časných stádiích onemocnění. Navíc jejich specifita pro RA nebyla nikdy plně potvrzena (VOSSENAAR a VAN VENROOIJ, 2004A).

Anti-Sa protilátky jsou protilátky namířené proti citrulinovanému vimentinu (VOSSENAAR et al., 2004A) a dnes se proto řadí mezi protilátky proti proteinům obsahujícím citrulin. Poprvé byly identifikovány v séru pacienta s RA jménem Savoy a antigen byl podle něj nazván Savoy antigen (Sa-antigen) (MAGALHÃES et al., 2002; VOSSENAAR et al., 2004A). Sa-antigen je 48-50 kDa velký protein, byl nalezen v lidských epiteliálních buňkách, v extraktech z lidské placenty nebo v kloubní synovii postižené RA (DESPRÉS et al., 1994; MÉNARD et al., 2000) a jako citrulinovaný vimentin byl identifikován teprve v roce 2004 Vossenaarem (VOSSENAAR et al., 2004A). Protilátky proti němu se vyskytují již v časných stádiích vývoje RA, dokáží předpovědět erozivní vývoj nemoci (MÉNARD et al., 2000) a mají poměrně vysokou specifitu (GOLDBACH-MANSKY et al., 2000). Nevýhodou anti-Sa protilátek pro diagnostiku RA je jejich nízká senzitivita (20-47%) (DESPRÉS et al., 1994; GOLDBACH-MANSKY et al., 2000; EL-GABALAWY a WILKINS, 2004).

Nejnovější studie ukazují, že kromě autoproti látek a autoimunitních buněk, které organismu škodí a podporují zánětlivou reakci, existují u revmatoidní artritidy a dalších autoimunitních onemocnění také mechanismy negativně regulující působení prozánětlivých autoproti látek. Jedná se zejména o autoimunitní B buňky, které

produkují neutralizující autoprotiilátky proti mnoha mediátorům zánětu, zejména cytokinům (ZOHAR et al., 2006).

3.5.2.1. Revmatoidní faktory

Revmatoidní faktory jsou antiimunoglobulinové autoprotiilátky specificky reagující s Fc částí vlastního IgG v oblasti C_H2 a C_H3 domén. Jedná se o konformační typ epitopu, který je tvořen oddělenými oblastmi, které se do své blízkosti dostanou až po složení proteinu do terciární konformace (BONAGURA et al., 1993; ROUTSIAS et al., 2003). RF jsou syntetizovány především v tkáni zaníceného kloubu, lymfatických uzlech, kostní dřeni, podkožních revmatických uzlech a slezině. Detekovatelné jsou zejména v séru a kloubní tekutině, kam se dostávají cirkulací. RF nejsou asociované pouze s RA, ale také s dalšími autoimunitními chorobami. Nízké hladiny byly zjištěny také u všech zdravých jedinců, u osob nad 60 let frekvence výskytu RF výrazně stoupá (HRNČÍŘ, 1986). Dlouhotrvající výskyt RF byl zaznamenán rovněž u chronických bakteriálních onemocnění jako je tuberkulóza, syfilis nebo lepra (MAGEED et al., 1994), přechodně dochází k jejich výskytu při virových infekcích (chřipka, virová hepatitida, AIDS) a po očkování (SYMMONS a CHAKRAVARTY, 1993).

Nejhojnější patologické RF jsou izotypu IgM (vyskytují se u 75-90% pacientů s RA), dále IgG RF, IgA RF a IgE RF (MERETEY et al., 1982). IgG RF mohou díky schopnosti vázat IgG molekuly vytvářet obrovské imunokomplexy, které mohou opakovaně aktivovat imunitní systém. Imunokomplexy obsahující RF se váží na Fc receptory makrofágů v synoviální membráně a stimulují produkci prozánětlivých cytokinů, jako je TNF α (CHOY a PANAYI, 2001). Významnou úlohu v rozvoji RA mají pravděpodobně RF tvořené v kloubní tkáni, které zůstávají v místě svého vzniku a přispívají zde výše uvedenými mechanismy k rozvoji zánětu. RF jsou navíc schopné prodlužovat životnost B buněk a zvýšit tak svoji produkci (PANAYI, 2005).

U pacientů s vysokými hladinami RF je průběh nemoci většinou závažnější a mimokloubní projevy (zejména podkožní revmatické uzly a nekrotizující vaskulitida) jsou častější (WILLIAMS, 1992). To je způsobeno zejména schopností IgM RF a IgG RF aktivovat komplementovou kaskádu (TANIMOTO et al., 1975). Pro RA jsou z RF nejdůležitější IgG RF, které mohou vytvářet vzájemně asociované imunokomplexy a vazbou na synoviální makrofágy přispívat k neustálému vyvolávání nového zánětu a vzniku chronického onemocnění (VENCOVSKÝ, 1996). Jsou produkovány ve větších množstvích než IgM RF a v séru se vyskytují ve vyšší koncentraci (KEMP et al., 1986).

Patogenicita stejně jako velikost jednotlivých IgG RF molekul je rozdílná a závisí na mnoha vlastnostech RF (zejména afinitě) a na poměru IgG RF k normálním IgG (MANNIK, 1985).

RF se u pacientů často vyskytují již několik let před objevením příznaků onemocnění. Budoucí nástup nemoci predikují zejména IgA RF (29% pacientů s RA je IgA RF pozitivní více jak 1,5 roku před nástupem onemocnění) a významnou předpovědní hodnotu má také výskyt více izotypů RF v séru zároveň (RANTAPÄÄ-DAHLQVIST et al., 2003).

3.5.2.2. *Autoprotilátky specifické pro proteiny obsahující citrulin*

Autoprotilátky proti proteinům obsahujícím citrulin jsou po RF druhými nejčastějšími autoprotilátkami produkovanými při RA a signalizují horší prognózu onemocnění. Vyskytují se zejména jako IgG izotyp, IgM a IgA se vyskytují v mnohem menším rozsahu, IgD a IgE nebyly detekovány vůbec. Jsou vysoce specifické pro RA, vyskytují se již v časném stádiu nemoci a signalizují jeho těžší průběh.

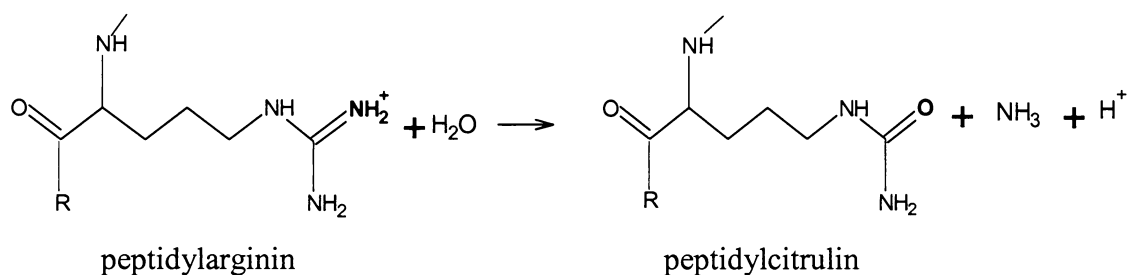
3.5.2.2.1. *Objev protilátek proti proteinům obsahujícím citrulin*

Jak již bylo uvedeno výše, RF nejsou pro RA zcela specifické. Hledal se proto jiný marker, který by byl vysoce specifický pro RA, detekovatelný již v počátečních stádiích onemocnění a který by měl dobrý prognostický potenciál. V roce 1964 byl objeven tzv. antiperinukleární faktor (APF) který je pro RA specifický (NIENHUIS a MANDEMA, 1964). Anti-perinukleární protilátky jsou namířeny proti tzv. perinukleárnímu faktoru, který je lokalizován uvnitř keratohyalinových tělísek některých epiteliálních buněk (HOET et al., 1991), kde reagují na filagrin (VENCOVSKÝ, 1996). V roce 1979 byly objeveny další protilátky - tzv. antikeratinové protilátky (AKA) - s o něco nižší specifitou pro revmatoidní artritidu, ale stále poměrně vysoce specifické (YOUNG et al., 1979). Antikeratinové protilátky reagují proti zkeratinizovaným epiteliím stratum corneum (zrohovatělá vrstva) krysích jícnu a lidské epidermis (YOUNG et al., 1979; MASSON-BESSIÈRE ET AL., 2000) a jsou přítomny v séru ještě zdravých lidí, u kterých se později vyvine RA (KURKI et al., 1992). Později se ukázalo, že název antikeratinové protilátky nebyl zvolen příliš vhodně, protože látkou, na kterou AKA reagují není keratin, ale stejně jako u APF filagrin.

Filagrin (filament aggregating protein) je protein, který propojuje keratinová filamenta, chrání keratin před degradací proteázami a zajišťuje tak rigiditu cytoskeletu (MANABE et al. 1991; MACK et al., 1993). Je produkován během pozdních stádií epidermální

diferenciace u savců. Je součástí cytoplasmy povrchových buněk savčí epidermis (SIMON et al. 1995). Je syntetizován ve formě velkého, mnohonásobně fosforylovaného prekurzorového proteinu profilagrinu, který se skládá z 10-12 podjednotek (GAN et al., 1991). V poslední fázi diferenciace keratinocytů je profilagrin proteolyticky štěpen na filagrin, jednotlivé podjednotky jsou uvolňovány a celý proces je doprovázen defosforylací a posttranslační citrulinací (MCKINLEY-GRANT et al., 1989; GIRBAL-NEUHAUSER et al., 1999). Je pravděpodobné, že citrulinace významně pozmění strukturu proteinu, a tím umožní přístup proteázám, které profilagrin rozštěpí na jednotlivé podjednotky (PEARTON et al., 2002). Lidský profilagrinový genový systém je vysoce polymorfní, většinou se jedná o jednonukleotidové záměny, ale může zahrnovat také změnu náboje (GAN et al., 1991). Filagrin je značně heterogenní protein vyznačující se sekvenční variabilitou mezi podjednotkami (GAN et al., 1991), variabilní fosforylací a citrulinací (TARCSA et al., 1996).

Citrulin není jako nestandardní aminokyselina syntetizován během translace, ale vzniká posttranslační deiminací argininu pomocí enzymu peptidylarginin deiminázy (PAD) za přítomnosti Ca^{2+} iontů (VOSSENAAR et al., 2003B) (Obr.4). Za normálních okolností je peptidylarginin deimináza přítomna uvnitř buněk v neaktivním stavu a to díky nízké koncentraci Ca^{2+} iontů. K její aktivaci je nutná koncentrace Ca^{2+} iontů cca 10^{-5} M, uvnitř buněk je tato koncentrace aktivně udržována na 10^{-7} M, zatímco v extracelulárním prostoru je 10^{-3} M (TAKAHARA et al., 1986; VOSSENAAR a VAN VENROOIJ, 2004A). Během závěrečné diferenciace epidermálních buněk často dochází k porušení integrity plazmatické membrány, čímž je umožněn vstup Ca^{2+} iontů a cca 20% argininových zbytků filagrinu je přeměněno na citrulin. Citrulinace způsobuje unfolding proteinů, a tím zvyšuje jejich náchylnost k degradaci (VOSSENAAR et al., 2004B). Aktivace PAD je pravděpodobně ovlivňována také hormonálně, usnadňována je zejména některými složkami estrogenu (VAN VENROOIJ A PRUIJN, 2000).



Obr. 4 Deiminace peptidylargininu

Citrulin je nestandardní aminokyselina, neexistuje pro něj odpovídající tRNA a nemůže být tedy do proteinu začleněn během proteosyntézy. Vzniká při postranlačních úpravách deiminací argininu přítomného v proteinu. Deiminace peptidylargininu (nepřesně citrulinace) je prováděna enzymem peptidylarginin deiminázou za přítomnosti Ca^{2+} iontů.

Vzhledem k tomu, že AKA ani APF nereagují na filagrin, v němž byl citrulin nahrazen jinou aminokyselinou, je jasné, že právě citrulin je antigenní determinanta, na kterou tyto protilátky reagují (SCHELLEKENS et al., 1998). Hlavní epitop je lokalizovaný na aminokyselinové pozici 306 - 324 (ROUTSIAS et al., 2004). AKA ani APF ovšem nereagují na volný citrulin a rovněž v zanícené synovii jsou přítomny spíše proteiny obsahující citrulin než volný citrulin (SCHELLEKENS et al., 1998; BAETEN et al., 2001).

Pro analýzu pomocí ELISA testu byly na filagrinu vytipovány antigenní determinanty obsahující citrulin a byl vyvinut syntetický cyklický citrulinovaný peptid (SCHELLEKENS et al., 1998). Podle substrátu využívaného k jejich detekci byly protilátky pojmenovány protilátky proti cyklickým citrulinovaným peptidům (anti-CCP, aCCP). AKA, AFA, APF a aCCP jsou tedy shodné protilátky, jediný rozdíl je v substrátu, který je využíván k jejich detekci (SEBBAG et al., 1995). Postupně byla vytvořena celá řada syntetických oligopeptidů obsahujících 1-2 citruliny a lišících se délkou řetězce (13-18 aminokyselin) (SCHELLEKENS et al., 1998).

3.5.2.2.2. *Specifita protilátek proti proteinům obsahujícím citrulin*

Anti-CCP protilátky se často vyskytují u RF negativních pacientů (VENCOVSKÝ, 1996), zhruba 40% těchto pacientů je aCCP pozitivních (VOSSENAAR a VAN VENROOIJ, 2004A). Vyskytují se již v časných stádiích onemocnění a jejich specifita pro revmatoidní artritidu byla prokázána v mnoha studiích (SCHELLEKENS et al., 2000; BIZZARO et al., 2001; BAS et al., 2002). Zatímco revmatoidní faktory IgM

izotypu (IgM RF) se podle pokusů Vasishty (VASISHTA, 2002) vyskytují také u 15% zdravých jedinců a 50% osob s nemocí jinou než RA, aCCP se vyskytují pouze u 5% osob s nemocí jinou než RA a u zdravých jedinců nevyskytují vůbec. Z další studie (PINHEIRO et al., 2003) vyplývá, že zatímco senzitivita je u IgM RF a aCCP zhruba stejná (cca 80%), specifita je u aCCP výrazně vyšší – 97% oproti 78% u IgM RF. Procentuální zastoupení aCCP pozitivních jedinců mezi pacienty s RA je geograficky závislé (ZENG et al., 2002). Kromě RA se aCCP vyskytují nejčastěji u juvenilní chronické artritidy (JCA) (LEE a SCHUR, 2003; VOSSENAAR, 2004A). Ze studie N. Bizzarové (BIZZARO et al., 2001) je navíc zřejmé, že zdraví jedinci, u kterých se vyskytli vysoké titry aCCP, později vyvinuli RA. Pravděpodobně se tedy jedná o RA v časném stádiu vývoje. Specifitu protilátek proti proteinům obsahujícím citrulin lze proto pro RA považovat za téměř absolutní a lze je využívat k rozlišení časných stádií revmatoidní artritidy od nemocí, které jsou RA některými příznaky podobné a u kterých se rovněž vyskytují RF (např. SLE, hepatitida typu C) (VOSSENAAR a VAN VENROOIJ, 2004A).

3.5.2.2.3. *Protilátky proti proteinům obsahujícím citrulin jako marker vývoje RA*

Lze říci, že aCCP mají z doposud známých protilátek nejvyšší schopnost předpovídat budoucí nástup onemocnění (RANTAPÄÄ-DALHQVIST et al., 2003). Je možné je u 25% pacientů detekovat více jak 1,5 roku před rozvojem příznaků revmatoidní artritidy (IgA RF 29%) a u 52% pacientů 1,5 roku nebo méně před nástupem onemocnění (IgA RF 39%) (RANTAPÄÄ-DAHLQVIST et al., 2003). Dají se proto využívat jako časný marker nemoci. Navíc je známo, že předznamenávají horší průběh onemocnění, zejména jeho erozivní charakter. Přítomnost aCCP protilátek může pomoci identifikovat pacienty, pro které je vzhledem k prognóze onemocnění vhodná agresivní léčba (BIZZARO et al., 2001; BAS et al., 2002; Vasishta, 2002; PINHEIRO et al., 2003; VENCOVSKÝ et al., 2003).

Bylo prokázáno, že kombinace IgM nebo IgA RF a aCCP má větší diagnostický a prognostický potenciál než sledování pouze jednoho z obou markerů (RANTAPÄÄ-DALHQVIST et al., 2003; VOSSENAAR a VAN VENROOIJ, 2004A). Stejně tak sledování přítomnosti aCCP protilátek v kombinaci se sledováním přítomnosti asociovaných HLA-DR4 alel je pro určení vývoje nemoci přesnější prognostický údaj ve srovnání se sledováním hladiny samotných aCCP protilátek nebo HLA-DR4 genu (BERGLIN et al., 2004).

3.5.2.2.4. Úloha apoptózy v citrulinaci

Jak již bylo řečeno, začlenění nestandardní aminokyseliny citrulinu do peptidového řetězce – citrulinace – je jev, který provází terminální diferenciaci buněk a jejich apoptózu, popř. nekrózu. V zanícené synoviální membráně je nerovnoměrně metabolizován kyslík, což vede k hromadění reaktivních kyslíkových radikálů nebo naopak ke vzniku oxidativního stresu. Oba tyto jevy vedou k nadměrnému odumírání buněk (HITCHON A EL-GABALAWY, 2004). Také mnoho vnějších faktorů podílejících se na vzniku RA přispívá k nárůstu apoptózy nebo poruše mechanismů zajišťujících odstraňování mrtvých buněk (VAN VENROOIJ A PRUIJN, 2000) a následně k hromadění usmrcených buněk.

Během apoptózy je PAD porušenou plazmatickou membránou uvolňována do extracelulárního prostoru, dochází k její aktivaci a následné citrulinaci extracelulárních proteinů. Podobně dochází k citrulinaci také intracelulárních proteinů - Ca^{2+} ionty pronikají do buňky a aktivují PAD enzym, který zůstal uvnitř. Takto byla popsána citrulinace histonů v granulocytech (NAKASHIMA et al., 2002) a vimentinu v makrofázích (ASAGA et al., 1998). Déle aktivované makrofágy (více než 24h) jsou velmi náchylné k buněčné smrti (RODENBURG et al., 2000A) a snadno tak dochází k aktivaci PAD a následné citrulinaci synoviálních proteinů, jako např. vimentinu, aggrekanu nebo α a β řetězců fibrinu (MASSON-BESSIÈRE et al., 2001; RAATS et al., 2003).

3.5.2.2.5. Mechanismus prezentace citrulinovaných proteinů

Citrulinace může zásadně změnit strukturu a funkci proteinu (VOSSENAAR a VAN VENROOIJ, 2004A). Chemicky dochází k výměně guanido skupiny za ureido skupinu, a tím ke ztrátě kladného náboje (VAN VENROOIJ A PRUIJN, 2000; VOSSENAAR et al., 2003A). Pozměněné peptidy jsou vystavovány imunitnímu systému, který je díky odlišnosti nemusí rozpoznat jako vlastní a může dojít k rozvoji imunitní odpovědi (RODENBURG et al., 2000B). Pomocí mechanismu zvaného šíření epitopu (epitop spreading) se může rozvinout polyklonální autoprotilátková odpověď proti celému proteinu nebo komplexu obsahujícímu citrulinovaný protein. U aCCP pozitivních pacientů vytvoří lokálně produkované aCCP autoprotilátky imunokomplex s citrulinovanými proteiny. Tyto imunokomplexy následně aktivují zánětlivé buňky a stimulují produkci prozánětlivých cytokinů. Cytokiny zprostředkují zvýšenou migraci zánětlivých buněk do synovie. Jejich případná smrt zapříčiní další produkci

citrulinovaných proteinů. Anti-CCP protilátky tak přispívají k neustálému vyvolávání nového zánětu a vzniku chronického onemocnění (VOSSENAAR a VAN VENROOIJ, 2004).

Ke vzniku takovéto kaskády musí být však jedinec patrně geneticky predisponován (SCHELLEKENS et al., 1998). Pravděpodobná podstata citrulin-specifické imunitní odpovědi spočívá ve schopnosti alely DRB1*0401, a pravděpodobně také dalších asociovaných alel, vázat proteiny obsahující citrulin s afinitou až stonásobně vyšší než proteiny necitrulinované (HILL et al., 2003). U geneticky predisponovaných osob tak může citrulinace vést k prezentaci citrulinovaných peptidů pomocí APC a následně k aktivaci a proliferaci T buněk a postupnému rozvoji autoimunitní choroby (VOSSENAAR a VAN VENROOIJ, 2004). Korelace mezi HLA-DR4 a aCCP pozitivitou u pacientů s RA je naprosto prokazatelná (GOLDBACH-MANSKY et al., 2000).

3.6. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, pomocí které je možné vyšetřit najednou více znaků na velkém počtu buněk - a to nejen kvalitativně, ale také kvantitativně. Velkou výhodou oproti fluorescenční mikroskopii je možnost zpracování mnohonásobně většího množství dat a uchování získaných výsledků v elektronické formě, takže je možné se k nim vracet a opětovně je zpracovávat.

Průtokový cytometr se skládá z fluidního a optického systému a elektroniky. Fluidní systém slouží k uvedení měřených částic do pohybu. Buňky pomocí nosné kapaliny (izotonický roztok) přecházejí z jedné nádoby do druhé a jsou usměřovány do velmi tenkého proudu, který prochází průtokovou komůrkou, ve které na buňky dopadá světelný paprsek vysílaný optickým systémem. Optický systém se skládá ze zdroje světla, filtrů, dichroického zrcadla a detektorů světla (ECKSCHLAGER et al., 1999). Existují tři typy filtrů

- *long pass*: propouští pouze světlo nad určitou vlnovou délkou a zbytek zachytí
- *short pass*: propouští pouze světlo pod určitou vlnovou délkou a zbytek zachytí
- *band pass*: propouští pouze světlo mezi určitými vlnovými délkami a zbytek zachytí

Soustavu filtrů doplňuje dichroické zrcadlo, které odráží světlo o určité vlnové délce a zbytek propouští. Je umístěno na začátku soustavy před filtry. Posledním článkem řetězu jsou detektory světla, které měří světlo rozptýlené buňkami po dopadu světelného paprsku v závislosti na jejich morfologických vlastnostech. Měření je tzv. forward scatter (FSC; rozptyl světla v malém úhlu), který vypovídá o velikosti buněk a tzv. side scatter (SSC; rozptyl světla v 90° úhlu), který vypovídá o buněčné granularitě. U buněk, na jejichž povrchu je pomocí monoklonální protilátky navázán fluorochrom, navíc dochází k emisi fluorescence o různých vlnových délkách podle typu fluorochromu (tab.2). Světlené signály jsou převáděny na elektrické impulzy pomocí fotodiody a zesíleny fotonásobičem. Zesílení je prováděno buď logaritmicky nebo lineárně. Logaritmické zesílení umožňuje větší šíři rozsahu detekce fluorescence a má větší citlivost u fluorescence s nižší intenzitou. Lineární zesílení umožňuje detekovat menší rozdíly. Při měření průtokovým cytometrem je vždy nutné udělat kompenzaci překrývajících se okrajových částí (cca 5 – 10 %) emisních spekter fluorochromů (ECKSCHLAGER et al., 1999).

Velkou výhodou průtokového cytometru je možnost tzv. gateování, tj. označení určité populace splňující konkrétní znaky a následné měření jiných znaků pouze u jedinců spadajících do této populace (Obr.5).

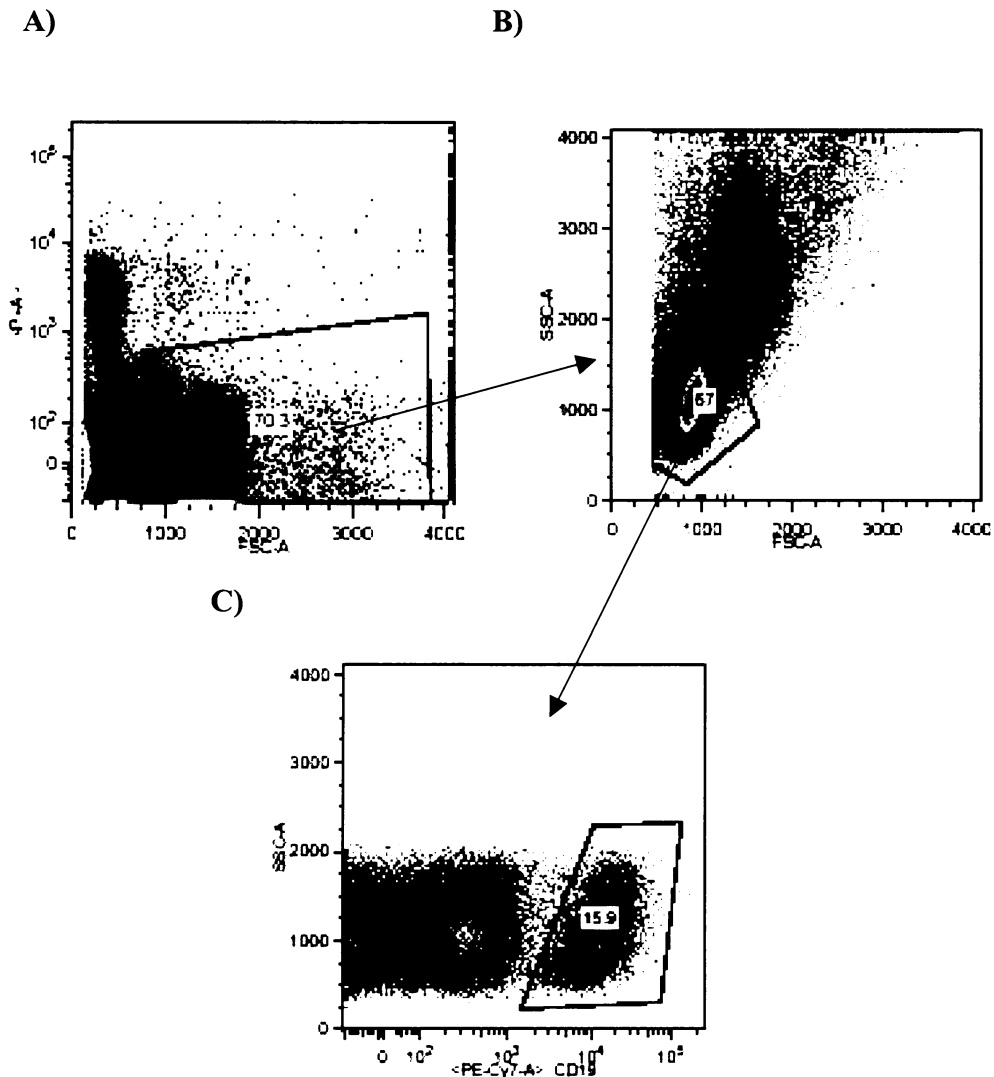
Měření může být buď jednoparametrové nebo dvouparametrové. U jednoparametrového je na ose x zanesena intenzita fluorescence a na ose y počet buněk, u dvouparametrového je na ose x intenzita fluorescence jednoho znaku, na ose y intenzita fluorescence druhého znaku a počet buněk je vyznačován hustotou teček. Tento graf se nazývá dot plot (ECKSCHLAGER et al., 1999).

Speciálním typem průtokového cytometru je tzv. sorter, který rozděluje buňky na základě jejich charakteristik. Rozdělení se dosahuje pomocí kmitání piezoelektrického krystalu, který přeměňuje sílu, která na něj působí, na elektrické impulzy, a tím rozděluje kapalinu nesoucí buňky do jednotlivých kapek, z nichž každá obsahuje pouze jedinou buňku.

Tab. 2 Přehled emisních vlnových délek vyzařovaných jednotlivými fluorochromy používanými v této diplomové práci (ECKSCHLAGER et al., 1999; www.bdbiosciences.com/spectra; www.invitrogen.co.jp/catalogue/molecular_probes/genomics/content34/index.html)

FLUOROCHROM	EMISNÍ VLNOVÁ DÉLKA (nm)
fluoresceinizothyokyanát (FITC)	525
fykoerytrin (PE)	580
konjugát fykoerytrin-cyanin 5 (PE-Cy5)	670
konjugát fykoerytrin-cyanin 5.5 (PE-Cy5.5)	694
konjugát fykoerytrin-cyanin 7 (PE-Cy7)	767
allofykocyanin – cyanin 5.5 (APC-Cy5.5)	694
propidiumjodid	620
hoechst 34580	498

Buňkám s určitými vlastnostmi je přidělován náboj a ony jsou pak odpuzovány nebo přitahovány elektrickými deskami, a tak na základě zvolených parametrů usměřovány do jednotlivých zkumavek nebo jamek destičky (ECKSCHLAGER et al., 1999).



Obr. 5 Příklady gateování

A) Populace živých buněk

Pomocí propidiumjodidu (PI), který proniká pouze do mrtvých buněk, jsou odlišeny mrtvé buňky od živých.

B) Lymfocytární gate

Na základě rozptýlu světla jsou buňky odlišeny podle své velikosti a granularity na lymfocyty, monocyty a granulocyty. Tento gate byl vytvořen už pouze z populace živých buněk.

C) Populace CD19⁺ pozitivních buněk

Na základě exprese povrchové molekuly CD19, zde označené kojugátem PE-Cy7, jsou v populaci lymfocytů ohraničeny CD19⁺ buňky.

4. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Analýzou buněk periferní krve a synoviální tkáně pacientů s RA zjistit, zda je možné detekovat CD19⁺ B lymfocyty specifické pro proteiny obsahující citrulin a stanovit jejich zastoupení v obou zmiňovaných oblastech.
2. Charakterizovat přítomné B lymfocytární populace.
3. Izolovat B lymfocyty specifické pro proteiny obsahující citrulin z periferní krve a synoviální tkáně pacientů s RA.
4. Pomocí single-cell RT-PCR analyzovat expresi genů pro těžké řetězce imunoglobulinů u CD19⁺ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin a určit, zda se jedná o přestavby klonálního původu.

5. MATERIÁL A METODY

Vzorky periferní krve a synoviální tkáň byly za sterilních podmínek odebírány během operace (synovektomie nebo úplná náhrada kloubu) pacientům s RA diagnostikovanou podle platných kritérií (ARNETT, 1987), tkáň byla uložena do 40 – 50 ml sterilního média RPMI 1640 s glutaminem (Gibco, Paisley, Velká Británie).

5.7. Příprava buněčné suspenze, zpracování periferní krve, synoviální tkáň a synoviální tekutiny

5.7.1. Periferní krev

Alternativa I

1. Změřili jsme objem krve a přelili ji do 50 ml zkumavky.
2. Do 45 ml jsme doplnili deionizovanou vodou a 20 sekund jemně míchali.
3. Potom jsme dolili do 50 ml 9x PBS s 0,5M EDTA (Sigma, St. Louis, USA).
4. Vzorek jsme stočili na centrifuze Jouan Ji (Trigon-plus, Čestlice, ČR) při 1000 ot./min. (RCF = 117,33 g) po dobu 10 minut při 10°C.
5. Supernatant jsme odsáli pomocí vodní vývěvy a sediment ještě jednou promyli deionizovanou vodou a PBS.
6. Vzorek jsme stočili na centrifuze (Trigon-plus) při 1000 ot./min. po dobu 10 min. při 10°C.
7. Supernatant jsme odsáli pomocí vodní vývěvy a sediment doplnili WSB pufrem na původní objem.
8. Do zkumavek určených pro nastavení průtokového cytometru jsme přepipetovali 100 µl vzorku, do zkumavek určených k analýze jsme rozdělili zbylé množství vzorku, vždy minimálně 100 µl.

Alternativa II

1. Změřili jsme objem krve a přelili ji do 50 ml zkumavky.
2. Přidali jsme stejné množství PBS.
3. Do druhé 50 ml zkumavky jsme nalili stejný objem lymphoprepu (Axis-Shields PoC AS, Oslo, Norsko).
4. Zkumavku s lymphoprepem jsme naklonili do šikmé polohy a na povrch lymphoprepu jsme opatrně pomocí Pasteurovy pipety nalili směs krve a PBS.
5. Vzorek jsme stočili na centrifuze (Trigon-plus) při 2200 ot./min. (RCF = 258,13 g) po dobu 40 min. při 10°C.

6. Prstenec obsahující leukocyty, který se vytvořil na rozhraní dvou fází, jsme pomocí Pasteurovy pipety opatrně přenesli do čisté 50 ml zkumavky.
7. Doplnili jsme 50 ml PBS.
8. Vzorek jsme stočili na centrifuze Jouan Ji (Trigon-plus, Čestlice, ČR) při 1000 ot./min. (RCF = 117,33 g) po dobu 10 minut při 10°C.
9. Supernatant jsme slili a doplnili do 50ml WSB.
10. Vzorek jsme stočili na centrifuze Jouan Ji (Trigon-plus, Čestlice, ČR) při 1000 ot./min. po dobu 10 minut při 10°C.
11. Supernatant jsme slili a k sedimentu jsme přidali 5 ml WSB.
12. 50 µl roztoku jsme přenesli do mikrozkuavky a přidali 50 µl barvy 0,25% Trypan Blue Stain (Gibco) v 1xPBS.
13. Pod světelným mikroskopem (Meopta, Přerov, ČR) jsme spočítali buňky pomocí počítací komůrky Fuchs-Rosenthal (Laboroptik, Friedrichsdorf, Německo). Buňky jsme počítali v jednom velkém čtverci a dosažené číslo jsme vynásobili 10⁴. Získali jsme tak počet buněk na 1 ml.
14. Do zkumavek určených k nastavení průtokového cytometru jsme dali 0,5x10⁶ buněk, do zkumavek určených k imunofenotypizační analýze jsme dali 1x10⁶, do zkumavek určených k detekci B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin jsme dali 3x10⁶ buněk.

5.7.2. Synoviální tkáň

1. Z odebrané tkáně jsme odstranili tuk a tkáň jsme na Petriho misce nůžkami stříhali, dokud jsme nezískali hmotu kašovitě konzistence.
2. Na tkáň jsme nalili 1 ml média RPMI 1640 (Gibco) obsahujícího 1 mg hyaluronidázy (Roche, Mannheim, Německo) a nechali 5 min. působit.
3. Takto zpracovanou tkáň jsme lžičkou shrnuli z Petriho misky do zkumavky, do které byla tkáň odebrána. Přidali jsme digesční médium obsahující 50 mg kolagenázy D (Roche, f.c. 1 mg/ml), 100 µl gentamicinu (Krka, Praha, ČR, f.c. 0,16 mg/ml) a 7,5 mg DNázy I (Sigma, f.c. 0,15 mg/ml) a doplnili jsme RPMI médium (Gibco) do 50 ml.
4. Tkáň jsme inkubovali přes noc při 37 °C.
5. Médium s uvolněnými buňkami jsme přes umělohmotné čajové sítko slili do čisté 50 ml zkumavky a doplnili do 50 ml WSB pufem.
6. Buněčnou suspenzi jsme stočili na centrifuze Jouan Ji (Trigon-plus) při 1000 ot./min. (RCF = 117, 33g) po dobu 10 min.

7. Supernatant jsme odsáli pomocí vodní vývěvy a sediment doplnili do 50 ml WSB pufrem.
8. Vzorek jsme stočili opět na centrifuze Jouan Ji (Trigon-plus) při 1000 ot./min. po dobu 10 min.
9. Supernatant jsme odsáli pomocí vodní vývěvy a k sedimentu přidali 5 ml WSB pufru.
10. 50 μ l roztoku jsme přenesli do mikrozkušavky a přidali 50 μ l barvy 0,25% Trypan Blue Stain (Gibco) v 1xPBS.
11. Pod světelným mikroskopem (Meopta, Přerov, ČR) jsme spočítali buňky pomocí počítací komůrky Fuchs-Rosenthal (Laboroptik, Friedrichsdorf, Německo). Buňky jsme počítali v jednom velkém čtverci a dosažené číslo jsme vynásobili 10^4 . Získali jsme tak počet buněk na 1 ml.
12. Do zkumavek určených k nastavení průtokového cytometru jsme dali $0,5 \times 10^6$ buněk, do zkumavek určených k detekci B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin jsme dali 3×10^6 . V případě, že jsme B lymfocyty ze synoviální tkáň izolovali k analýze exprese V_H genů, přenesli jsme všechny buňky, které jsme nepoužili pro nastavení průtokového cytometru do jedné zkumavky.

5.7.3. Synoviální tekutina

1. Do zkumavky se synoviální tekutinou jsme přidali 1mg hyaluronidázy a 30 min. jsme inkubovali ve vodní lázni při teplotě 37°C.
2. Zkumavku jsme vyjmuli z vodní lázně a doplnili do 50 μ l PBS.
3. Dále jsme synoviální tekutinu zpracovávali jako vzorky periferní krve, kroky 1- 13.
4. Do zkumavek určených k nastavení průtokového cytometru jsme dali $0,5 \times 10^6$ buněk, do zkumavek určených k imunofenotypizační analýze jsme dali 1×10^6 , do zkumavek určených k detekci B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin jsme dali 3×10^6 buněk.

5.8. Značení buněčné suspenze pro průtokovou cytometrii

1. Buňky jsme značili monoklonálními protilátkami (viz Seznam použitých chemikálií a přístrojů) podle příložených protokolů. Byly používány myší monoklonální protilátky proti lidským antigenům charakterizujícím cílové buňky. Ukázka protokolu je uvedena v tab.3.

Tab.3

Periferní krev		
č.	protilátky	objem protilátek (μl)
1	—	—
2	CD19 PE-Cy7	2
3	CD20 FITC	3
4	CD38 APC-Cy5.5	2
5	CD27 PE	3
6	CD56 PE Cy5.5	3
7	CD45 PE-Cy5	3
8	SA-PE	5
9	CD19 PE-Cy7 / SA-PE	2 / 5
10	CD19 PE-Cy7/ CD20 FITC/ CD27 PE	2 / 3 / 3
11	CD19 PE-Cy7/ CD20 FITC/ CD27 PE/ CD38 APC-Cy5.5/ / CD138 PE-Cy5.5	2 / 3 / 3 / 2 / 3
12	CD19 PE-Cy7 / SA-PE / Prot. 1 P104-1bio P	2 / 5 / 10
13	CD19 PE-Cy7 / SA-PE / Prot. 3 P104-3bio A	2 / 5 / 10
14	CD19 PE-Cy7 / SA-PE / Prot. 0428b FF	2 / 5 / 10
Synoviální tkáň / synoviální tekutina		
15	CD45 PE-Cy5 / CD19 PE-Cy7/ CD20 FITC/ CD27 PE	3 / 2 / 3 / 3
16	CD45 PE-Cy5 / CD19 PE-Cy7/ CD20 FITC/ CD27 PE/ CD38 APC- Cy5.5/CD138 PE-Cy5.5	3 / 2 / 3 / 3 / 2 / 3
17	CD45 PE-Cy5 / CD19 PE-Cy7/ SA-PE / Peptid P1	3 / 2 / 5 / 10
18	CD45 PE-Cy5 / CD19 PE-Cy7 / SA-PE / Peptid P3	3 / 2 / 5 / 10
19	CD45 PE-Cy5 / CD19 PE-Cy7 / SA-PE / Peptid P0428	3 / 2 / 5 / 10

2. B lymfocyty specifické pro peptidy obsahující citrulin byly detekovány pomocí citrulinovaných peptidů (obr.6) konjugovaných s biotinem. Značené peptidy byly podle publikovaných sekvencí (SCHELLEKENS, 1998) syntetizovány ve Výzkumném ústavu biofarmacie a veterinárních léčiv Dr. Flégelovou.

Vazba B lymfocytu na biotinylovaný peptid s citrulinem byla vizualizována pomocí konjugátu streptavidin – phycoerythrin (SA-PE, alternativně SA-PE Cy5, SA-PE Cy7), který se na biotin váže (obr.7)

Postup značení

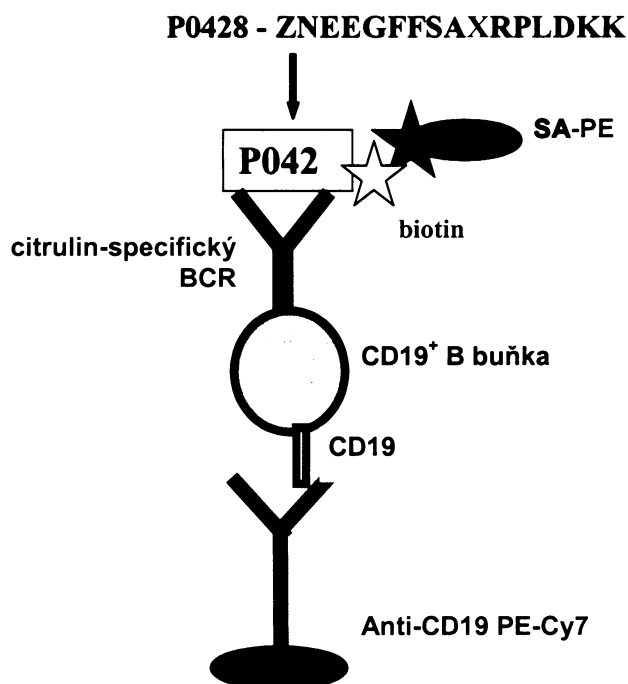
3. K buněčné suspenzi jsme přidali protilátku a peptid a nechali 30 min. inkubovat ve tmě při 4 °C. Přidali jsme 4 ml WSB pufu, stočili na centrifuze Jouan Ji (Trigon-plus) při 1000 ot./min. (RCF = 117, 33g) po dobu 10 minut a supernatant slili.

4. Přidali jsme SA-PE (DakoCytomation, Glostrup, Dánsko) a nechali 30 min. inkubovat ve tmě při 4 °C.

P1 - filagrin	SHQESTXGRS
P0428 – fibrin	ZNEEGFFSAXRPLDKK
P3 - aggrekan	WLADXRSVRY

Obr. 6 Značené syntetické peptidy obsahující citrulin

K izolaci B lymfocytů specifických pro peptidy obsahující citrulin byly používány peptidy odvozené od proteinů přirozeně se vyskytujících v lidském těle: P1 – peptid odvozený od filagrinu, P0428- peptid odvozený od fibrinu a P3 – peptid odvozený od aggrekanu a peptidy biot1 a biot2, jejichž sekvenci neznáme. X symbolizuje citrulin.



Obr. 7 Schéma detekce B buněk specifických pro peptidy obsahující citrulin

Biotinem (žlutá hvězdička) značený peptid obsahující citrulin se přes BCR váže na N lymfocyty specifické pro proteiny obsahující citrulin. Pro vizualizaci vazby byla používána myší monoklonální protilátka CD19 PE-Cy7 a konjugát SA-PE, který váže biotin.

5. Přidali jsme 4 ml WSB puftru, stočili na centrifuze (Trigon-plus) při 1000 ot./min. po dobu 10 min. a supernatant slili.

6. Přidali jsme 100 µl WSB puftru.

5.9. Detekce B buněk specifických pro peptidy obsahující citrulin

Detekce a sortování buněk byly prováděny pomocí průtokové cytometrie na přístroji LSR II (Becton and Dickinson, San Jose, USA) v Sektoru gnotobiologie a imunologie, MBÚ AV ČR Praha. K vyloučení mrtvých buněk byl používán propidium jodid (1 $\mu\text{g/ml}$, Sigma).

5.10. RT-PCR na úrovni jedné buňky (single-cell RT-PCR)

Izolované B buňky byly tříděny do mikrozkušavek nebo jamek destičky obsahujících 50 μl lyzačního RT-PCR pufru (tab. 4).

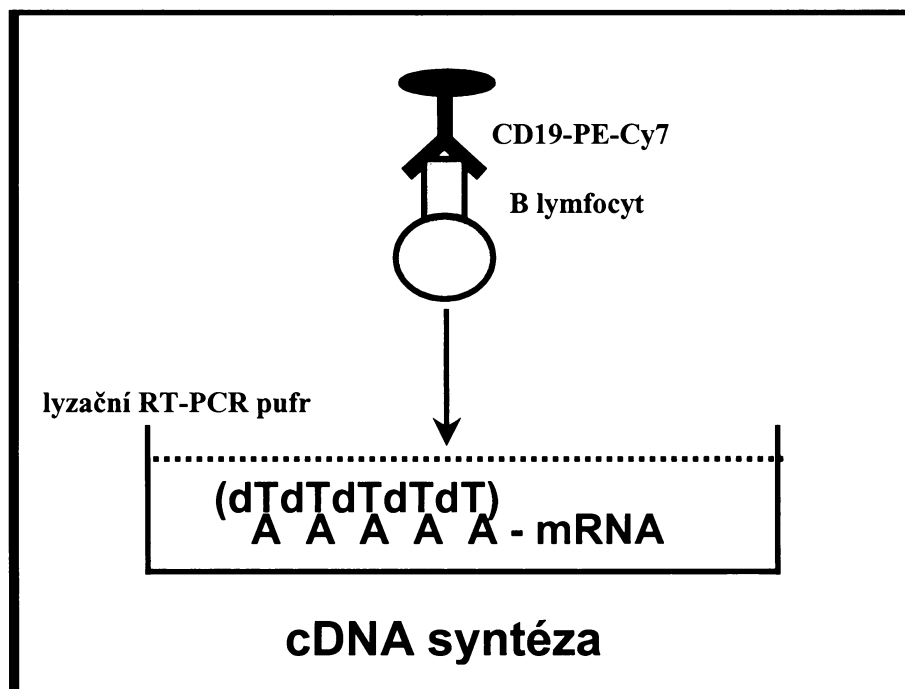
Tab. 4

	objem (μl / jamka)	finální koncentrace
H ₂ O	28,95	-
0,1 M DTT	2,5	5 mM
RNasin (40 U/ μl)	0,5	20 U
50 nM Spermidin	0,5	0,5 nM
10 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ BSA	0,05	0,5 μg
800 ng/ μl Oligo dT	0,5	400 ng
10% Triton X	5,0	1%
5x RT PCR buffer	10,0	1x
10 mM dNTPs	1,0	0,2 mM
směs enzymů	1,0	-

Amplifikační reakce probíhala v cykleru (Bio-Rad, Hercules, USA) podle schématu:

1. 50°C 40 min.
2. 4°C trvale

Syntéza prvního řetězce cDNA z každé izolované buňky byla okamžitě po vytřídění zahájena pomocí oligo-dT primeru. (obr.8)



Obr.8 Schéma syntézy cDNA

Izolované B lymfocyty byly vizualizovány pomocí myši monoklonální protilátky konjugované s PE-Cy7. Okamžitě po vyřídění do jamek destičky byla zahájena syntéza prvního cDNA řetězce pomocí oligo-dT primerů.

5.11. Amplifikace $V_H D_H J_H$ uspořádaných genů

K amplifikaci $V_H D_H J_H$ genů byla používána nested-PCR.

5.11.1. Amplifikace externími primery

Jako externí primery byly používány primery pro konstantní oblast imunoglobulinu a pro tzv. signální (leader) sekvenci. (FOSTER, 1997; KÜPPERS, 1993) a připravili jsme následující reakční směs o celkovém objemu 75 μ l na jamku (tab.5).

Externí PCR primery:

SVH1, 5' - CCA TGG ACT GGA CCT GGA - 3'
 SVH2, 5' - ATG GAC ACA CTT TGC TMC AC - 3'
 SVH3, 5' - CCA TGG AGT TTG GGC TGA GC - 3'
 SVH4, 5' - ATG AAA CAC CTG TGG TTC TT - 3'
 SVH5, 5' - ATG GGG TCA ACC GCC ATC CT - 3'
 SVH6, 5' - ATG TCT GTC TCC TTC CTC AT - 3'
 Mju, 5' - TCA GGA CTG ATG GGA AGC CC - 3'
 Ga, 5' - CAG GCC GCT GGT CAG AGC G - 3'

Tab. 5

	objem (μl / jamka)	finální koncentrace
H ₂ O	52,98	-
25 mM MgCl ₂	8	2,5 mM
100 μM SVH1	0,56	0,7 μM
100 μM SVH2	0,56	0,7 μM
100 μM SVH3	0,56	0,7 μM
100 μM SVH4	0,56	0,7 μM
100 μM SVH5	0,56	0,7 μM
100 μM SVH6	0,56	0,7 μM
100 μM C μ / C γ	0,56	0,7 μM
10 mM dNTPs	1,6	0,2 mM
10x PCR pufr	8	1x
Taq polymeráza (5U/ μl)	0,5	2,5 U / jamka

Připravenou směs jsme rozpipetovali do jednotlivých jamek destičky a do každé přidali 5 μl cDNA a kapičku minerálního oleje (Top-Bio, Praha, ČR). Destičku jsme dali do cykleru (Bio-Rad), amplifikační reakce probíhala podle následujícího schématu:

1. 95 °C	7 min.	7. 34x kroky 4 – 6	
2. 50 °C	1 min.	8. 94 °C	1 min.
3. 72 °C	1,5 min.	9. 50 °C	30 sec.
4. 94 °C	1 min.	10. 72 °C	7 min.
5. 50 °C	30 sec.	11. 4 °C	trvale
6. 72 °C	1,5 min.		

5.11.2. Amplifikace interními primery

Jako interní primery byly použity primery specifické pro FRI oblasti a společné J sekvence (KÜPPERS,1993) a pro amplifikaci jsme připravili následující reakční směs (tab.6).

Tab.6

	objem (μl / jamka)	finální koncentrace
H ₂ O	54,98	-
25 mM MgCl ₂	8	2,5 mM
10 mM dNTPs	1,6	0,2 mM
100 μM VH FRI	0,48	0,6 μM
100 μM iJH 6K	0,48	0,6 μM
100 μM iJH2K	0,48	0,6 μM
100 μM iJH1/3/4/5	0,48	0,6 μM
10x PCR pufr	8	1x
Taq polymeráza (5U/μl)	0,5	2,5 U/jamka

Interní PCR primery:

VH1 FRI, 5' - CCT CAG TGA AGG TYT CCT GCA AGG C - 3'
 VH2 FRI, 5' - GTC CTG CGC TGG TGA AAC CCA CAS A - 3'
 VH3 FRI, 5' - GGG GTC CCT GAG ACT CTC CTG TGC AG - 3'
 VH4 FRI, 5' - GAC CCT GTC CCT CAC CTG CRC TGT C - 3'
 VH5 FRI, 5' - AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG ARG A - 3'
 VH6 FRI, 5' - CTC ACT CAC CTG TGC CAT CTC CGG - 3'
 iJH1/3/4/5, 5' - CGA CGG TGA CCA GGG TBC CYT GGC C - 3'
 iJH2, 5' - CGA CAG TGA CCA GGG TGC CAC GGC C - 3'
 iJH6, 5' - CGA CGG TGA CCG TGG TCC CTT GCC - 3'

Připravenou směs jsme rozpipetovali do jednotlivých jamek destičky a do každé přidali 5 μl DNA z amplifikace pomocí externích primerů a kapku minerálního oleje (Top-Bio). Destičku jsme dali do cykleru (Bio-Rad), amplifikační reakce probíhala podle následujícího schématu:

- | | | | |
|----------|----------|-------------------|---------|
| 1. 95 °C | 7 min. | 7. 34x krok 4 - 6 | |
| 2. 63 °C | 1 min. | 8. 94 °C | 1 min. |
| 3. 72 °C | 1,5 min. | 9. 63 °C | 30 sec. |
| 4. 94 °C | 1 min. | 10. 72 °C | 7 min. |
| 5. 63 °C | 30 sec. | 11. 4 °C | trvale |
| 6. 72 °C | 1,5 min. | | |

5.12. Sledování přítomnosti PCR produktu

Přítomnost PCR produktu jsme sledovali pomocí gelové agarózové elektroforézy. Byl používán 1,5 % agarózový gel v 0,5x TBE barvený ethidium bromidem (f.c. 0,01 µg/ml, Sigma). Naváženou agarózu (Top-Bio) jsme rozpustili v odpovídajícím množství 0,5xTBE a nechali projít varem. Přidali jsme ethidium bromid (Sigma) a nechali cca 35 min. chladnout při pokojové teplotě. Mezitím jsme si připravili gelový nosič a zchladlou směs do něj nalili. Počkali jsme cca 30 min., až gel ztuhnul a s nosičem ho přenesli do elektroforetické vany (Bio-Rad). Dolili jsme 0,5x TBE tak, aby byl gel ponořen. Do jamek jsme nanесли 20 µl PCR produktu a 5 µl SLB, do jedné jamky jsme aplikovali 4 µl velikostního standardu DNA Molecular Weight Marker XIV (Roche) a 1 µl SLB (Sigma, 0,1µl/ml). Dělení probíhalo při napětí 70 V / 525 cm² po dobu cca 60 minut. Identifikovali jsme pozitivní vzorky a gel vyfotografovali kamerou Kodak 1D Image Analysis Software (Kodak Digital Science, New Haven, USA).

5.13. Purifikace PCR produktu

Purifikace byla provedena pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Německo)

1. Zbylé množství PCR produktu pozitivních vzorků z předchozí kroku (60 µl) jsme nechali rozdělit pomocí gelové agarózové elektroforézy v 1,5 % gelu v 0,5x TBE při napětí 70 V / 525 cm² po dobu cca 3h. Gel byl obarven opět ethidium bromidem. Aby se zamezilo kontaminaci, pipetovali jsme vzorky na gel ob jamku.
2. Každý pozitivní proužek o požadované velikosti (tj. 230-300 pb) jsme vyřízli pomocí skalpelu, dali do sterilní 1,5 ml zkumavky.
3. Ke gelu jsme přidali 600 µl QG pufru a inkubovali při 50 °C 10 min. ve vodní lázni. Aby se gel snáze rozpustil, 3 – 4x jsme vzorky během inkubace vortexovali.
4. Vyndali jsme zkumavku z lázně, přidali 200 µl isopropanolu (Penta, Chrudim, ČR) a důkladně vortexovali.
5. Polovinu obsahu jsme přelili do popsané zkumavky s kolonkami a stočili na mikrocentrifuze (Eppendorf, Hamburg, Německo) při 13 000 ot./min. (RCF = 6231,87 g) po dobu 1 min.
6. Vyndali jsme filtr a obsah zkumavky vylili.
7. Zbytek obsahu zkumavky jsme přelili na kolonku a stočili na mikrocentrifuze (Eppendorf) při 13 000 ot./min. po dobu 1 min.

8. Vyndali jsme filtr a obsah zkumavky vylili.
9. Přidali jsme 500 μ l QG pufru a stočili na mikrocentrifuze (Eppendorf) při 13 000 ot./min. po dobu 1 min.
10. Přidali jsme 750 μ l PE-WASH pufru s ethanolem a 5 min. při pokojové teplotě inkubovali.
11. Na mikrocentrifuze jsme stočili vzorek při 13 000 ot./min. po dobu 1 min.
12. Obsah zkumavky jsme vylili, filtr dali zpět a opakovali krok 10.
13. Přendali jsme kolonky do speciálních zkumavek se šroubovacím víčkem, na střed napipetovali 30 μ l EB pufru a 1 min. inkubovali při pokojové teplotě.
14. Na centrifuze (Trigon-plus) jsme stočili vzorek při 14 000 ot./min. (RCF = 22996,57g) po dobu 1 min.

5.14. Sekvenování PCR produktů

Pro sekvenační PCR jsme používali Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). Připravili jsme si následující reakční směs (tab.7).

Tab. 7

	Objem (μ l / strip)
H ₂ O	2 μ l
Big Dye pufr	2 μ l
5' primer (ředěný v poměru 1 : 20)	1 μ l

Připravenou směs jsme rozpipetovali do jednotlivých stripů a do každé přidali 5 μ l purifikovaného PCR produktu. Stripy (BD Biosciences, Le Pont De Claix, Francie) jsme dali do cykleru, amplifikační reakce probíhala podle následujícího schématu:

1. 96°C 10 sec.
2. 45 °C 5 sec.
3. 60 °C 4 min.
4. 34 x kroky 1 – 3
5. 4 °C trvale

5.15. Precipitace sekvenačního produktu ethanolem

1. Připravili jsme si následující precipitační směs o celkovém objemu 350 μl (tab. 8).

Tab. 8

	Objem (μl / vzorek)
H ₂ O	90 μl
3 M NaAc (pH 5,2)	10 μl
100 % ethanol	250 μl

2. Sekvenační produkt jsme krátce stočili na mikrocentrifuze (Eppendorf).

3. Precipitační směs jsme přepipetovali do 1,5 ml zkumavek a přidali 10 μl sekvenačního produktu.

4. Vzorek jsme stočili na centrifuze (Trigon-plus) při 14 000 ot./min. (RCF = 22996,57g) po dobu 20 min.

5. Supernatant jsme opatrně slili a k sedimentu přidali 350 μl 70% ethanolu

6. Vzorek jsme stočili na centrifuze (Trigon-plus) při 14 000 ot./min. po dobu 10 min.

7. Supernatant jsme slili.

8. Sediment jsme nechali v laminárním boxu Foster Bio 48 (Chemos, Praha, ČR) vysušit.

9. Vzorek jsme stočili na centrifuze (Trigon-plus) při 14 000 ot./min. po dobu 10 min.

Vlastní sekvenování produktů sekvenačního PCR bylo prováděno Ing. V. Kebrdlovou na Biologickém ústavu 1. LF UK na sekvenátoru ABI377 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

5.16. Vyhodnocování a analýza sekvencí uspořádaných V_HD_HJ_H genů

Získaná data jsme analyzovali pomocí databáze V-BASE Sequence Directory DNA Plot (<http://www.genetikunikoeln.de/dnaplot>) obsahující tzv. germinální Ig sekvence, tj. nemutované zárodečné sekvence. Zjistili jsme, o kterou Ig rodinu a gen se jedná, dále délku naší sekvence (počet nukleotidů) a počet v ní obsažených mutací. Vypočítali jsme mutační frekvenci podle vzorečku:

$$mf(\%) = \frac{\text{počet mutací}}{\text{počet nt}} \times 100$$



5.17. Statistická analýza

Statistická analýza dat získaných z průtokového cytometru byla provedena pomocí GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, USA). Pro analýzu rozdílů mezi jednotlivými skupinami byl použit neparametrický Mann-Whitney U t-test, který lze užít v případě negaussovského rozložení, případně byla používána korelační analýza.

6. SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ A PŘÍSTROJŮ

6.18. Chemikálie a kity

Agaróza	Top-Bio, Praha, ČR
Azid sodný	Sigma, St. Louis, USA
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
BSA	Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Německo
DNA Molecular Weight Marker XIV	Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Německo
DNáza I	Sigma, St. Louis, USA
dNTPs 10 mM	Sigma, St. Louis, USA
DTT 0,1 M	Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Německo
EB pufr	QIAGEN GmbH, Hilden, Německo
EDTA ($C_{14}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2 H_2O$)	Sigma, St. Louis, USA
Ethidium bromid	Sigma, St. Louis, USA
Gentamicin	Krka, Praha, ČR
Hyaluronidáza	Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Německo
Izopropylalkohol	Penta, Chrudim, ČR
Kolagenáza	Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Německo
Lymphoprep	Axis-Shields PoC AS, Oslo, Norsko
MgCl ₂ 25mM	Sigma, St. Louis, USA
Minerální PCR olej	Top-Bio, Praha, Česká republika
NaAc 3M	Sigma, St. Louis, USA
PCR pufr 10x	Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Německo

PCR H ₂ O	Top-Bio, Praha, Česká republika
PE – WASH pufr	QIAGEN GmbH, Hilden, Německo
Primery na nested PCR 100 μM	Sigma, St. Louis, USA
Propidiumjodid	Sigma, St. Louis, USA
Peptid 1 P104-1bio P – filagrin	poskytnuté prof. W.J. van Venrooijem (Radboud University, Nijmegen, Nizozemí)
Peptid 3 P104-3bio – aggrekan	
Peptid 0428b FF - fibrin	
Peptid biot1	poskytnuté prof G. Serrem (Laboratory of Epidermis Differentiation and Rheumatoid Autoimmunity, Toulouse III University, Francie)
Peptid biot2	
QG pufr	QIAGEN GmbH, Hilden, Německo
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Německo
RNasin 40 U/ μl	Roche Diagnostics GmbH, Manhein, Německo
RPMI 1640 s L-Glutaminem	Gibco, Paisley, Velká
Británie	
SA – PE	DaKoCytomation, Glostrup, Dánsko
SLB	Sigma, St. Louis, USA
Spermidin 50 nM	Roche Diagnostics GmbH, Manhein, Německo
Taq polymeráza	Sigma, St. Louis, USA
Titan One Tube RT-PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Manhein, Německo
Tris base (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Amersham, Cleveland, USA

Triton X 10%

Želatina

Roche Diagnostics GmbH,

Manheim, Německo

Sigma, St. Louis, USA

6.19. Protilátky

Monoclonal Mouse Anti-Human CD19/FITC, klon HD37	}	Dako Cytomation, Glostrup Dánsko
Monoclonal Mouse Anti-Human CD20/FITC, klon B-Ly1		
Monoclonal Mouse Anti-Human CD27/RPE , klon M-T271		
Monoclonal Mouse Anti-Human CD45/RPE-Cy5, klon T29/33		
Streptavidin/RPE		
Streptavidin/RPE –Cy-5		
CD 3 biotin	}	Caltag, Burlingame, USA
Human CD 19 RPE Conjugate, klon SJ25-C1		
Human CD19 PE Cy7 Conjugate, klon SJ25-C1		
Human CD 38 APC Cy5.5 Conjugate, klon HIT2		
Human CD 38 FITC Conjugate, klon HIT2		
Human CD 56 PE Cy5.5 Conjugate, klon MEM-188		
Human CD 138 PE Cy5.5 Conjugate, klon 1D4		
Streptavidin/RPE –Cy-7		
Human CD 14 biotin Conjugate, klon UCHM1		Serotec, Oxford, Velká Británie

6.20. Roztoky

1,5% agarózový gel s ethidium bromidem

agaróza	6 g	f.c. 1,5%
0,5x TBE	400 ml	-
ethidium bromid	0,04 ml	f.c. 0,01 $\mu\text{g/ml}$

10x PBS

NaCl	80g	f.c. 1,37 M
KCl	2g	f.c. 0,027 M
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	29 g	f.c. 0,081 M
KH ₂ PO ₄	2 g	f.c. 0,015 M
H ₂ O	doplnit do 1000 ml	-

9x PBS

90 ml 10x PBS + 10 ml H₂O

1x PBS

10 ml 10x PBS + 90 ml H₂O

5x TBE

Tris base	54g	f.c. 450 mM
kyselina boritá	27,5 g	f.c. 450 mM
0,5 M EDTA (pH 8)	20 ml	f.c. 10 mM
H ₂ O	doplnit do 1000 ml	-

WSB

želatina	4 ml	f.c. 0,18%
azid sodný	1g	f.c. 0,1 %
1x PBS	doplnit do 1000 ml	-

6.21. Přístroje a vybavení

Automatické pipety	Gilson, Villers-le-Bel,
Francie	
Centrifugy	Trigon-plus, Čestlice, ČR
Destičky	BD Biosciences, Le Pont De Claix, Francie
Elektroforetické vany	Bio-Rad, Hercules, USA
Kamera	Kodak Digital Science, New Haven, USA
Laminární box Foster Bio 48	Chemos, Praha, ČR
LSR II	
Mikrocentrifuga	Eppendorf, Hamburg,
Německo	
Mikrozkumavky	Eppendorf, Hamburg,
Německo	
Mikroskop	Meopta, Přerov, ČR
PCR cykler	Bio-Rad, Hercules, USA
Počítací komůrka Fuchs-Rosenthal	Laboroptik, Friedrichsdorf, Německo
Průtokový sorter FACS Vantage SE	Becton and Dickinson, San Jose, USA
Rukavice	Vulkan, Hrádek nad Nisou, ČR
Sekvenátor ABI377	Applied Biosystems, Foster City, USA
Stripy	Eppendorf, Hamburg, Německo
Špičky	Gilson, Villers-le-Bel, Francie
Vodní lázeň	WEB MLK Prüfgeräte, Freital, Německo
Vortex	Janke& Kunkel, Staufen, Německo
Zdroj elektrického napětí	Bio-Rad, Hercules, USA

7. VÝSLEDKY

7.1. Klinická charakteristika sledovaného souboru

Celkem bylo sledováno 47 pacientů a 10 zdravých kontrol. Vzorky pro analýzu jsme získali z periferní krve, synoviální tkáň a synoviální tekutiny pacientů s RA, periferní krve pacientů s jiným systémovým revmatickým onemocněním a periferní krve zdravých dárců. Synoviální tkáň byla odebírána při operaci postiženého kloubu a její množství se odvíjelo od stádia onemocnění a typu operovaného kloubu. Periferní krev pacientů byla odebírána před operací pacienta s RA nebo během pravidelné lékařské kontroly. Periferní krev kontrol byla získána od dobrovolných dárců. Bylo odebíráno vždy cca 7-15 ml krve. Synoviální tekutina byla odebírána během radiosynoviortézy, tj. podání radioizotopů (v našem případě yttria) do kloubní dutiny za účelem potlačení zánětu a hyperplazie synovie. Vzhledem k nepoměrně snazší dostupnosti vzorků periferní krve oproti vzorkům synoviální tkáň a synoviální tekutiny, byla PK analyzována výrazně častěji. Všechny vzorky byly odebrány na základě informovaného souhlasu.

Na přítomnost B lymfocytů specifických pro peptidy P1 – filagrin, P3 – aggrecan a P0428 v periferní krvi bylo analyzováno celkem 18 pacientů s RA, z toho 17 žen a 1 muž a 1 pacientka s juvenilní revmatoidní artritidou (JCA). Na přítomnost B lymfocytů specifických pro tyto peptidy v synoviální tkáni bylo analyzováno celkem 15 pacientů s RA (14 žen a 1 muž) a 1 pacientka s JCA. U pacienta č. 8 byly analyzovány dva vzorky synoviální tkáň odebírané v rozestupu dvou měsíců. Dále byla analyzována synoviální tekutina 1 pacientky s RA z obou kolen (odděleně) a u tří pacientů byla v synoviální tekutině sledována přítomnost B lymfocytů specifických pro peptid P1. Synoviální tkáň pacienta č. 2 byla analyzována peptidy P1, P3 a P0428 (2A) a po 18 měsících peptidem biot2 (2B) synoviální tkáň pacienta č. 8 byla analyzována dvakrát peptidy P1, P3 a P0428 v rozmezí dvou měsíců (8A, 8B).

Na přítomnost B lymfocytů specifických pro peptidy biot1 a biot2 v periferní krvi bylo testováno celkem 16 pacientů s RA (11 žen a 5 mužů). 9 pacientů s RA bylo zároveň testováno na přítomnost B lymfocytů specifických pro peptid P1 v PK, tyto frekvence jsou pro přehlednost uváděny jak v tabulce 12 (frekvence B lymfocytů specifických pro peptidy biot1 a biot2), tak v tabulce 15 (frekvence B lymfocytů specifických pro peptidy P1, P3 a P0428). Na přítomnost B lymfocytů specifických pro peptid biot1 a biot2 v synoviální tekutině byly sledováni 3 pacienti (1 žena a 2 muži). Dále byla

analyzována periferní krev 4 pacientů s JCA (3 ženy a 1 muž), 1 pacientky se smíšeným onemocněním pojivové tkáně (MCTD) a 5 zdravých kontrol. Všichni pacienti s JCA a MCTD byly zároveň testovány na přítomnost B lymfocytů specifických pro peptid P1.

Imunofenotypizace B lymfocytů přítomných v periferní krvi byla prováděna celkem u 10 pacientů s RA (8 žen a 2 muži), imunofenotypizace B lymfocytů přítomných v synoviální tekutině u 3 pacientů (1 žena a 2 muži). Dále byla analyzována krev 7 pacientů s JCA (5 žen a 2 muži), 4 pacientů s ankylozující spondylitidou (1 žena a 3 muži) a 1 pacientky se smíšeným onemocněním pojivové tkáně.

Informace o léčebných postupech, stavu onemocnění a hladinách protilátek u pacientů byly získány od ošetřujících lékařů a z příslušných laboratorních pracovišť. Absence klinických údajů u části pacientů je zaviněna spoluprací s velkým množstvím lékařů, z nichž ne všichni byli ochotni údaje poskytovat. Věk pacientů s RA se pohyboval v rozmezí 28 – 80 let (medián $56 \pm 2,54$; průměr $54,8 \pm 13,46$), věk pacientů s JCA (v rozmezí 16-55 (medián $23 \pm 3,86$; průměr $27,1 \pm 11,59$). U většiny pacientů, o kterých jsme získali klinické údaje, bylo onemocnění již v pokročilejším stádiu - 8 pacientů mělo stupeň onemocnění III, 5 pacientů stupeň onemocnění IV, pouze dva pacienti měli stupeň onemocnění II. Onemocnění dosahovalo jak mírné (4 pacienti), tak střední (2 pacienti) a vysoké (5 pacientů) aktivity. Většina pacientů s RA, u nichž byla zjišťována přítomnost revmatoidních faktorů (19/25), byly na tyto autoprotiátky pozitivní. Hladiny aCCP stanovené v séru pacientů s RA se pohybovaly v rozmezí 0 – 1300 U/ml (medián $250,30 \pm 85,59$; průměr $402,00 \pm 436,40$), pacienti s JCA byly pro tyto protilátky většinou negativní, pouze u 1 pacientky byla naměřena hodnota 14,1 U/ml. Hladiny C-reaktivního proteinu (CRP) byly zjišťovány u 12 pacientů s RA a pohybovaly se v rozmezí 1,8 – 123,4 mg/l (medián $22,00 \pm 9,95$; průměr $31,12 \pm 34,47$), u 81% pacientů tak byla hladina CRP zvýšena nad normál ($<5\text{mg/l}$; PAVELKA et al., 2003). Rychlost sedimentace červených krvinek byla u pacientů s RA v rozpětí 6 – 75 mm/hod (medián $19,5 \pm 6,72$; průměr $29,9 \pm 23,3$). Normální hodnoty sedimentace jsou 2-5 mm/hod u mužů a 3-8 mm/hod u žen (PAVELKA et al., 2003), u všech pacientů s výjimkou pacientů č. 8B a č. 9, tak byly hodnoty sedimentace zvýšené. Všechny údaje charakterizující onemocnění jednotlivých pacientů jsou shrnuty do tab. 9.

Tab. 9 Charakteristika pacientů

Vysvětlivky: aCCP – protilátky proti proteinům obsahujícím citrulin; CRP – C-reaktivní protein; M – muž; nd – nedefinováno; RF – revmatoidní faktory; Ž – žena

číslo pacienta	pohlaví	věk	diagnóza	stupeň onemocnění	RF	aCCP (U/ml)	aktivita onemocnění	CRP (mg/l)	sedimentace (mm/hod)
1	Ž	61	RA	III	pozitivní	390	vysoká	42,4	33
2A	Ž	51	RA	nd	nd	0	nd	1,8	9
3	Ž	76	RA	III	pozitivní	636	střední	1,9	17
4	Ž	48	RA	III	pozitivní	97	vysoká	10	16
5	Ž	53	RA	IV	pozitivní	1300	mírná	49,1	58
6	Ž	nd	RA	nd	negativní	1090	nd	nd	nd
7	Ž	62	RA	nd	pozitivní	1200	nd	38,2	44
8A	Ž	80	RA	III	pozitivní	26	vysoká	24,3	60
8B				III	pozitivní	26	vysoká	nd	8
9	Ž	68	RA	IV	pozitivní	163	mírná	6,6	6
10	Ž	63	RA	IV	nd	0	nd	nd	nd
11	Ž	nd	RA	IV	pozitivní	56	mírná	19,7	15
12	Ž	61	RA	II	pozitivní	0	mírná	51,4	22
13	Ž	55	RA	III	pozitivní	372	vysoká	nd	75
14	M	45	RA	III	pozitivní	0	střední	nd	40
15	Ž	49	RA	nd	negativní	0	nd	nd	12,4
16	Ž	61	RA	IV	negativní	981	nd	nd	nd
17	Ž	46	RA	nd	nd	nd	nd	nd	nd
18	Ž	38	RA	II	pozitivní	126,2	nd	4,6	18
19	Ž	20	JCA	nd	negativní	nd	nd	33	nd
20	Ž	27	RA	nd	pozitivní	88,9	nd	nd	nd
21	Ž	42	RA	nd	negativní	404,7	nd	nd	nd
22	Ž	59	RA	nd	negativní	604,9	nd	nd	nd
23	M	68	RA	nd	pozitivní	337,5	nd	nd	nd
24	Ž	75	RA	nd	negativní	111,2	nd	nd	nd
25	Ž	41	RA	nd	pozitivní	1195	nd	nd	nd
26	Ž	38	RA	nd	pozitivní	446,9	nd	nd	nd
27	M	66	RA	nd	nd	nd	nd	nd	nd
28	M	55	RA	nd	pozitivní	nd	nd	nd	nd
29	Ž	61	RA	nd	nd	nd	nd	nd	nd
30	Ž	57	RA	nd	nd	nd	nd	nd	nd
31	M	29	RA	nd	nd	nd	nd	123,4	40
32	M	nd	RA	nd	nd	nd	nd	nd	nd
33	Ž	58	RA	nd	nd	nd	nd	nd	nd
34	M	21	JCA	nd	negativní	0	nd	nd	nd
35	Ž	23	JCA	nd	negativní	0	nd	nd	nd
36	Ž	55	JCA	nd	pozitivní	14,1	nd	nd	nd
37	Ž	16	JCA	nd	negativní	0	nd	nd	nd
38	Ž	33	JCA	nd	negativní	0	nd	55,7	72
39	M	22	JCA	nd	negativní	0	nd	87,1	38
40	Ž	29	JCA	nd	nd	nd	nd	nd	nd
41	Ž	25	JCA	nd	negativní	0	nd	18	72
42	M	29	AS	nd	negativní	0	nd	nd	nd
43	M	26	AS	nd	negativní	0	nd	nd	nd
44	M	32	AS	nd	nd	nd	nd	nd	nd
45	Ž	29	AS	nd	negativní	0	nd	nd	nd
46	Ž	nd	MCTD	nd	pozitivní	0	nd	nd	nd
47	M	nd	RA	III	pozitivní	800	nd	nd	nd

číslo pacienta	DMARDs	biologická léčba	steroidy (mg/den)
1	LEF	ne	5
2A	ne	ne	ne
3	AZA	ne	2,5
4	MTX	ne	10
5	AZA	ne	10
7	MTX	nd	nd
8A	MTX	Entanercept	5
8B	SAS	ne	nd
9	ne	ne	5
11	LEF	ne	5
12	MTX	ne	5
13	ne	Adalimumab	10
14	HQ	ne	4
16	nd	Abatacept	nd
19	MTX	nd	nd
31	MTX	ne	nd
34	ne	Infliximab	nd
35	MTX	ne	nd
36	ne	ne	5
38	MTX	ne	nd
39	ne	Entanercept	nd
41	MTX	Entanercept	nd

Tab. 10 Léčba pacientů

Vysvětlivky: Entanercept je solubilní receptor TNF, Abatacept je monoklonální protilátka proti CTLA4, Adalimumab je plně humanizovaná monoklonální protilátka proti TNF- α , Infliximab je chimerická myší/lidská monoklonální protilátka proti TNF- α , AZA – azathioprin; DMARDs – chorobu modifikující antirevmatické léky; HQ – hydrochloroquine; LEF – leflunomid; MTX – metotrexát; nd – nedefinováno; SAS – sulfasalazin; množství steroidů je udáváno jako ekvivalent prednizonu

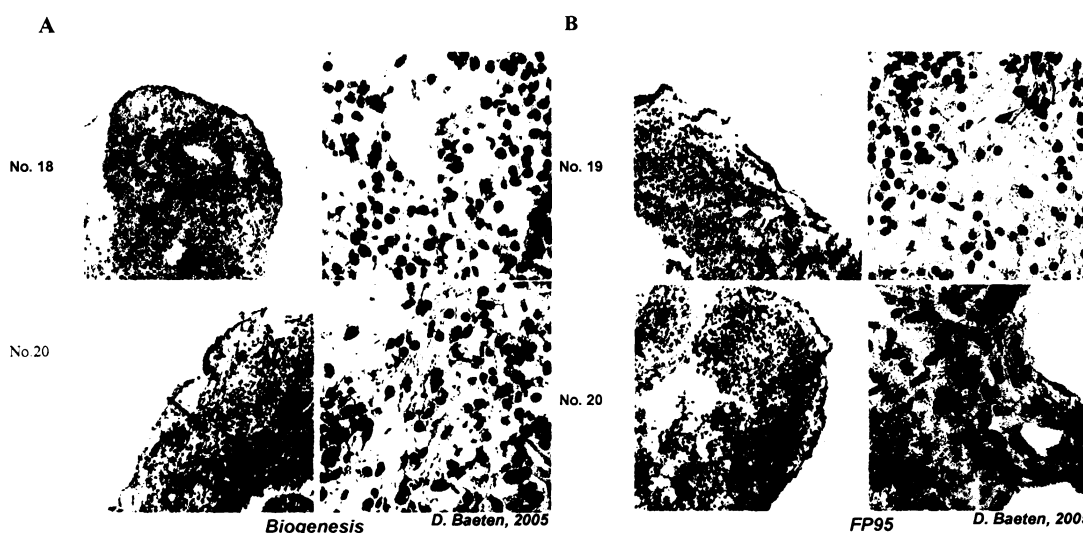
Většina pacientů (15/22) byla léčena pomocí chorobu modifikujících antirevmatických léků (DMARDs), z toho 9 pomocí metotrexátu, 2 pomocí leflunomidu, 2 pomocí azathioprinu, 1 pacient byl léčen sulfasalazinem a 1 hydrochloroquinem. 11 pacientů podstoupilo léčbu steroidy v dávkách 2,5 – 10mg denně, u všech se tedy jednalo o tzv. léčbu malými dávkami (PAVELKA et al., 2003). Současnou léčbu pomocí DMARDs a steroidů podstupovalo 8 pacientů. Biologickou léčbou bylo léčen 6 pacientů, a to buď Entanerceptem (3 pacienti), Abataceptem, Infliximabem nebo Adalimumabem. Jeden z pacientů léčených Entanerceptem byl zároveň léčen metotrexátem a 5 mg steroidů na den a jeden byl léčen zároveň samotným metotrexátem. Pacient léčený Adalimumabem byl zároveň léčen 10 mg steroidů na den. Jeden pacient neužíval žádnou léčbu, dva pacienti užívali pouze kortikosteroidy. Údaje o léčbě jednotlivých pacientů jsou shrnuty do tab. 10, jsou uváděny pouze pacienti, u kterých jsme znali způsob léčby.

7.2. Imunohistochemická analýza synoviálních tkání

Přítomnost proteinů obsahujících citrulin v synoviální tkáni pacientů byla zjišťována pomocí imunohistologické analýzy. Protilátky specifické pro proteiny obsahující citrulin Biogenesis a FP95 vhodné pro využití při imunohistologické analýze jsou těžko dostupné, a proto byly analýzy laskavě provedeny laboratoří D. Baetena, která těmito protilátkami disponuje. Imunohistochemická analýza synoviálních tkání byla provedena u 11 ze sledovaných pacientů, u pacientky č. 8 byla analýza provedena u obou z odebraných tkání (obr. 9).

Obr.9 Imunohistologická analýza

Jako reprezentativní příklad je uváděna imunohistologická analýza synoviálních tkání tří ze sledovaných pacientů s RA. Tkáně byly obarveny protilátkami specifickými pro proteiny obsahující citrulin A) Biogenesis, B) FP95. Šipky označují místa s výskytem citrulinovaných proteinů.



Detekce proteinů obsahujících citrulin byla prováděna u 9 pacientů, v jejichž tkáni byla nalezena výstelková vrstva. Proteiny obsahující citrulin byly detekovány ve 4 případech a vždy byly identifikovány oběma protilátkami (tab. 11). U pacienta č. 8 byly proteiny obsahující citrulin nalezeny pouze v jednom z případů (8B).

číslo pacienta	pohlaví	stav onemocnění	výstelková vrstva	Biogenesis	FP95
1	Ž	III	přítomna	negativní	negativní
2A	Ž	nd	přítomna	pozitivní	pozitivní
3	Ž	III	nepřítomna	nd	nd
4	Ž	III	přítomna	negativní	negativní
5	Ž	IV	nepřítomna	nd	nd
8A	Ž	III	přítomna	negativní	negativní
8B	Ž	III	přítomna	pozitivní	pozitivní
9	Ž	IV	nepřítomna	nd	nd
11	Ž	IV	přítomna	negativní	negativní
12	Ž	II	přítomna	negativní	negativní
13	Ž	III	přítomna	pozitivní	pozitivní
14	M	III	přítomna	pozitivní	pozitivní

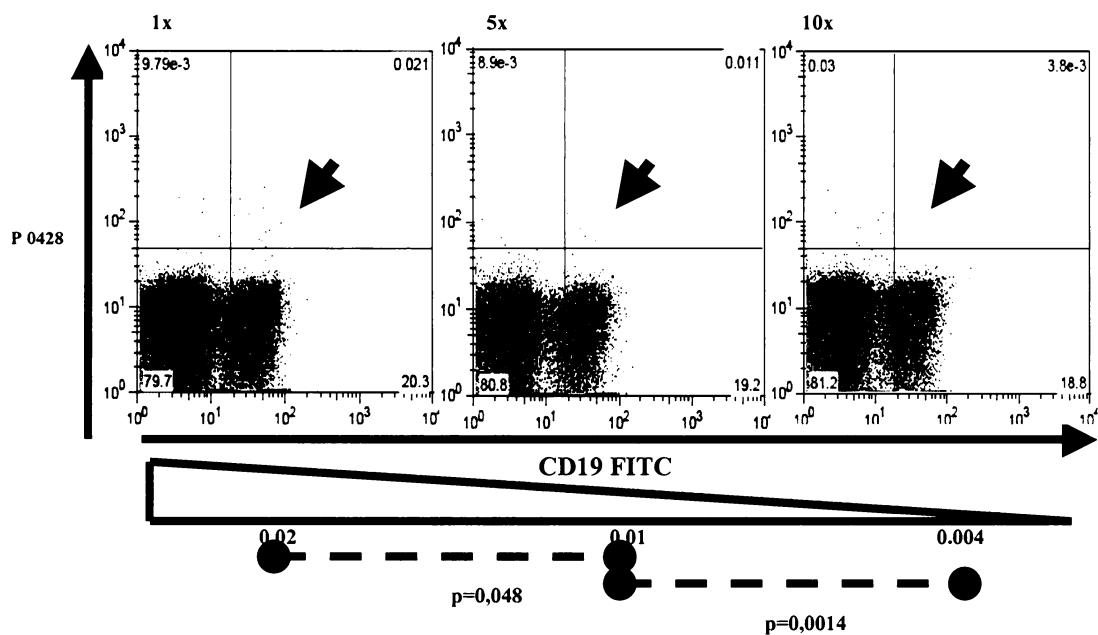
Tab. 11 Imunohistologické vyšetření přítomnosti proteinů obsahujících citrulin v synoviální tkáni

Biogenesis a FP95 jsou protilátky specifické pro proteiny obsahující citrulin, Biogenesis - polyklonální protilátka, FP95 - monoklonální protilátka; M – muž; nd – nedefinováno; Ž - žena

7.3. Detekce CD19⁺ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin

Vzorky byly testovány na přítomnost CD19⁺ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin pomocí metody popsané v kapitole Materiál a metodika. Specifita této metody byla ověřena pomocí inhibičního testu s použitím nebiotinylovaných peptidů obsahujících citrulin shodných s peptidy P1, P3, P0428, biot1 a biot2. Jednotlivými nebiotinylovanými peptidy byly lymfocyty označeny ještě před inkubací s biotinylovanými peptidy. Koncentrace nebiotinylovaných peptidů se postupně zvyšovala z 10μg na 50μg a 100μg.

Výsledkem testu byla významná redukce frekvence CD19⁺ B lymfocytů specifických pro jednotlivé peptidy obsahující citrulin (obr.10) s výjimkou peptidu biot2. Frekvence B lymfocytů detekovaných pomocí peptidu biot2 kolísaly naprosto nezávisle na množství použitého nebiotinylovaného peptidu.



Obr.10 Inhibice pomocí nebiotinylovaného peptidu obsahujícího citrulin

Na příkladu peptidu P0428 je ukázáno, že zvyšování hladiny nebiotinylovaných peptidů obsahujících citrulin má za následek významné snižování frekvence detekovaných CD19⁺ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin v periferní krvi pacienta s RA. Čísla označují příslušné buněčné frekvence.

7.3.1. Detekce CD19⁺ B lymfocytů specifických pro peptidy P1, P3 a P0428

Frekvence CD19⁺ B lymfocytů specifických pro peptidy P1, P3 a P0428 v PK a ST pacientů s RA se lišily podle typu použitého peptidu. Ve většině případů byly u jednoho pacienta detekovány B lymfocyty specifické pro alespoň dva z použitých peptidů (tab. 12, tab. 13).

a) u pacientů

číslo pacienta	pohlaví pacienta	typ vzorku	diagnóza	P1 (%)	P3 (%)	P0428 (%)
1	Ž	PK	RA	0,02	0,01	nd
2A	Ž	PK	RA	0,03	0,06	nd
3	Ž	PK	RA	0,00	0,01	nd
4	Ž	PK	RA	0,01	0,00	nd
5	Ž	PK	RA	0,02	0,04	nd
6	Ž	PK	RA	0,02	0,02	nd
7	Ž	PK	RA	0,03	0,03	0,04
8B	Ž	PK	RA	0,01	0,03	0,01
9	Ž	PK	RA	0,00	0,07	0,04
10	Ž	PK	RA	0,00	0,00	0,00
11	Ž	PK	RA	0,00	0,01	0,01
12	Ž	PK	RA	0,08	0,06	0,08
13	Ž	PK	RA	nd	nd	nd
14	M	PK	RA	nd	nd	nd
15	Ž	PK	RA	0,2	0,25	0,42
16	Ž	PK	RA	0,01	0,01	0,02
17	Ž	PK	RA	0,02	0,02	0,03
18	Ž	PK	RA	0,18	0,21	0,11
19	Ž	PK	JCA	0,03	0,01	0,01
20	Ž	PK	RA	0,055	nd	nd
21	Ž	PK	RA	0,0	nd	nd
22	Ž	PK	RA	0,00458	nd	nd
23	M	PK	RA	0,0018	nd	nd
24	Ž	PK	RA	0,024	nd	nd
25	Ž	PK	RA	0,11	nd	nd
26	Ž	PK	RA	0,018	nd	nd
30	Ž	PK	RA	0,083	nd	nd
33	Ž	PK	RA	0,013	nd	nd
34	M	PK	JCA	0,018	nd	nd
35	Ž	PK	JCA	0,011	nd	nd
36	Ž	PK	JCA	0,00805	nd	nd
37	Ž	PK	JCA	0,013	nd	nd
46	Ž	PK	MCTD	0,0049	nd	nd

b) u zdravých kontrol

číslo	P1 (%)	P3 (%)	P0428 (%)
K1	0,003	0,001	0,002
K2	0,001	0,002	0,002
K3	0,003	0,002	0,002
K4	0,001	0,002	0,003

Tab. 12 Přítomnost B lymfocytů specifických pro peptidy P1, P3 a P0428 v periferní krvi

Vysvětlivky: JCA – juvenilní revmatoidní artritida; M-muž; MCTD-smíšené onemocnění pojivové tkáně; nd – nedefinováno; PK – periferní krev; RA – revmatoidní artritida; Ž - žena

číslo pacienta	pohlaví pacienta	typ vzorku	diagnóza	P1 (%)	P3 (%)	P0428 (%)
1	Ž	ST	RA	0,19	0,11	nd
2A	Ž	ST	RA	0,07	0,08	nd
3	Ž	ST	RA	0,06	0,06	nd
4	Ž	ST	RA	0,03	0,06	nd
5	Ž	ST	RA	0,03	0,06	nd
6	Ž	ST	RA	0,00	0,00	nd
8A	Ž	ST	RA	0,02	0,01	0,02
8B	Ž	ST	RA	0,17	0,12	0,11
9	Ž	ST	RA	0,14	0,33	0,24
10	Ž	ST	RA	0,06	0,00	0,06
12	Ž	ST	RA	0,04	0,05	0,19
13	Ž	ST	RA	0,00	0,00	0,0
14	M	ST	RA	0,21	nd	nd
15a	Ž	SF	RA	0,09	0,19	0,55
15b				0,15	0,71	0,35
16	Ž	ST	RA	nd	nd	0,00
17	Ž	ST	RA	nd	0,01	0,00
18	Ž	ST	RA	nd	nd	0,00
19	Ž	ST	JCA	0,00	0,00	0,00
27	M	SF	RA	0,049	nd	nd
28	M	SF	RA	0,67	nd	nd
29	Ž	SF	RA	0,034	nd	nd

Tab. 13 Přítomnost B lymfocytů specifických pro peptidy P1, P3 a P0428 v synoviální tkáni a synoviální tekutině

Vysvětlivky: JCA – juvenilní revmatoidní artritida; M-muž; nd – nedefinováno; RA – revmatoidní artritida; SF – synoviální tekutina; ST – synoviální tkáň; Ž – žena
U pacientky č.15 byla analyzována odděleně SF z pravého a levého kolene, oba klouby byly postiženy RA, pacientovi č.8 byla ST odebírána dvakrát v rozestupu dvou měsíců.

V periferní krvi se frekvence CD19⁺ B lymfocytů specifických pro peptid P1 (filagrin) se pohybovala v rozsahu 0,00 – 0,20 % (medián 0,02 ± 0,01; průměr 0,04 ± 0,05), pro peptid P3 (aggrekan) 0,00 – 0,25 % (medián 0,02 ± 0,02; průměr 0,05 ± 0,07), pro peptid P0428 (fibrin) 0,00 – 0,42 % (medián 0,03 ± 0,03; 0,07 ± 0,11). V synoviální tkáni a synoviální tekutině se frekvence CD19⁺ B lymfocytů specifických pro peptid P1 (filagrin) pohybovala v rozmezí 0,00 – 0,67 % (medián 0,06 ± 0,04; průměr 0,11 ± 0,15), pro peptid P3 (aggrekan) 0,00 – 0,71 (medián 0,06 ± 0,05; průměr 0,12 ± 1,18), pro peptid P0428 (fibrin) 0,00 – 0,55% (medián 0,06 ± 0,05; průměr 0,14 ± 0,18) (tab.

14). Frekvence CD19⁺ B lymfocytů specifických pro peptidy P1, P3 a P0428 v periferní krvi zdravých kontrol nepřesáhla v žádném z případů 0,003%.

Tab. 14 Statistické vyhodnocení frekvencí B lymfocytů pro peptidy P1, P3 a P0428 v PK a ST a SF

a) u pacientů s RA

Protein	frekvence specifických B lymfocytů v PK (%)	medián	frekvence specifických B lymfocytů v ST a SF (%)	medián
P1 (filagrin)	0,00 – 0,20	0,02 ± 0,01	0,00 – 0,67	0,06 ± 0,04
P3 (aggrekan)	0,00 – 0,25	0,02 ± 0,02	0,00 – 0,71	0,06 ± 0,05
P0428 (fibrin)	0,00 – 0,42	0,03 ± 0,03	0,00 – 0,55	0,06 ± 0,05

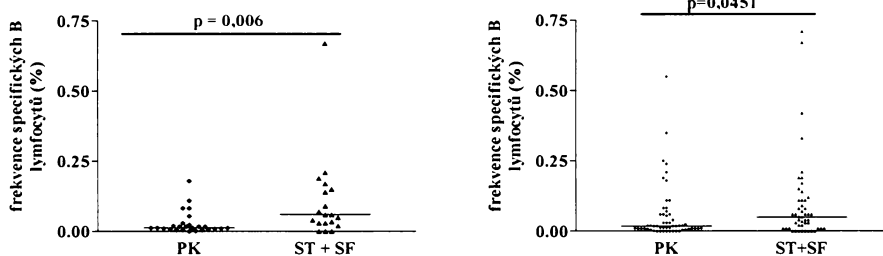
b) u zdravých kontrol

Protein	frekvence specifických B lymfocytů v PK (%)	medián
P1 (filagrin)	0,001-0,003	0,002 ± 0,0006
P3 (aggrekan)	0,001 – 0,002	0,002 ± 0,0003
P0428 (fibrin)	0,002 – 0,003	0,002 ± 0,0003

Frekvence CD19⁺ B lymfocytů specifických pro jednotlivé peptidy obsahující citrulin byly u pacientů s RA v synoviální tkáni a synoviální tekutině vyšší oproti frekvencím v periferní krvi. Pro peptid P1 (filagrin) a pokud byly hodnoceny všechny peptidy zároveň, bylo toto zvýšení statisticky významné ($p = 0,006$, resp. $p = 0,0451$) (obr.11).

A)

B)



Obr.11 Srovnání frekvence CD19⁺ B lymfocytů specifických pro peptidy obsahující citrulin v periferní krvi a synoviálních kompartmentech

Z obrázku je patrná zvýšená frekvence CD19⁺ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin v synoviální tkáni a synoviální tekutině oproti periferní krvi u pacientů s RA. Vodorovná čára označuje mediány. **A)** frekvence B lymfocytů detekovaných pomocí peptidu P1, **B)** frekvence B lymfocytů detekovaných pomocí peptidů P1, P3 a P0428 dohromady.

7.3.2. Detekce CD19⁺ B lymfocytů specifických pro peptidy biot1 a biot2

V periferní krvi se frekvence CD19⁺ B lymfocytů specifických pro peptid biot1 pohybovaly v rozmezí 0,00 – 0,07 % (medián 0,02 ± 0,01, průměr 0,04 ± 0,04) (tab.15, 17). Peptid biot2 jsme vzhledem k výsledkům inhibičního testu označili jako nespecifický, a proto jsem jej nezařadila do statistik. Uvádím pouze naměřené frekvence B lymfocytů. Pomocí peptidu biot2 byly v PK naměřeny výrazně vyšší frekvence, u pacienta č. 36 byla hodnota naměřená pomocí biot2 dokonce 260x vyšší než hodnota naměřená pomocí biot1. Překvapivě byly u SF vždy naměřeny mírně vyšší frekvence pomocí peptidu biot1 (tab. 16).

U zdravých kontrol dosahovala frekvence B lymfocytů specifických pro peptid biot1 maximálně 0,03%, u pacientů s jiným revmatickým onemocněním 0,06% (pacient s JCA).

a) u pacientů

číslo pacienta	pohlaví pacienta	Typ vzorku	Diagnóza	biot1	biot2	P1
20	Ž	PK	RA	0,01	0,041	0,055
21	Ž	PK	RA	0,052	0,054	0,0
22	Ž	PK	RA	0,034	0,083	0,00458
23	M	PK	RA	0,00261	0,22	0,0018
24	Ž	PK	RA	0,073	0,81	0,024
25	Ž	PK	RA	0,035	2,24	0,11
26	Ž	PK	RA	0,01	0,7	0,018
30	Ž	PK	RA	0,14	0,52	0,083
31	M	PK	RA	0,019	0,52	nd
32	M	PK	RA	0,14	0,64	nd
33	Ž	PK	RA	0,027	0,053	0,013
34	M	PK	JCA	0,00401	nd	0,018
35	Ž	PK	JCA	0,013	0,22	0,003
36	Ž	PK	JCA	0,002	0,52	0,006
37	Ž	PK	JCA	0,059	0,27	0,013
46	Ž	PK	MCTD	0,0037	0,4	0,0049

b) u zdravých kontrol

číslo	bito1 (%)	biot2 (%)
K5	0,00	0,80
K6	0,03	0,03
K7	0,00	0,003
K8	0,001	0,05
K9	0,00	0,05

Tab.15: Procentuální zastoupení CD19⁺ buněk B lymfocytů specifických pro peptidy biot1 a biot2 v PK

Vysvětlivky: AS – ankylozující spondylitida; JCA – juvenilní chronická artritida; MCTD – smíšené onemocnění pojivové tkáně; nd – nedefinováno; PK – periferní krev; RA – revmatoidní artritida; SF – synoviální tekutina

číslo pacienta	pohlaví pacienta	typ vzorku	diagnóza	biot1	biot2
2B	Ž	ST	RA	nd	0,01
27	M	SF	RA	0,12	0,1
28	M	SF	RA	1,02	0,59
29	Ž	SF	RA	0,17	0,062

Tab.16: Procentuální zastoupení B lymfocytů (CD19⁺ buněk) specifických pro peptidy biot1 a biot2 v ST a SF
M – muž; SF – synoviální tekutina;
ST – synoviální tkáň; Ž - žena

a) u pacientů

Protein	frekvence specifických B lymfocytů v PK (%)	medián	frekvence specifických B lymfocytů v SF (%)	medián
biot 1	0,00 – 0,14	0,03 ± 0,01	0,12 – 1,02	0,17 ± 0,29

b) u kontrol

		frekvence specifických B lymfocytů v PK (%)	medián
kontroly		0,00 – 0,035	0,0005 ± 0,009
nemoci jiné než RA	biot1	0,004 – 0,059	0,002 ± 0,009
	P1	0,00 -0,018	0,0045 ± 0,00

Tab. 17 Statistické vyhodnocení frekvencí B lymfocytů specifických pro peptid biot1 u pacientů a kontrol

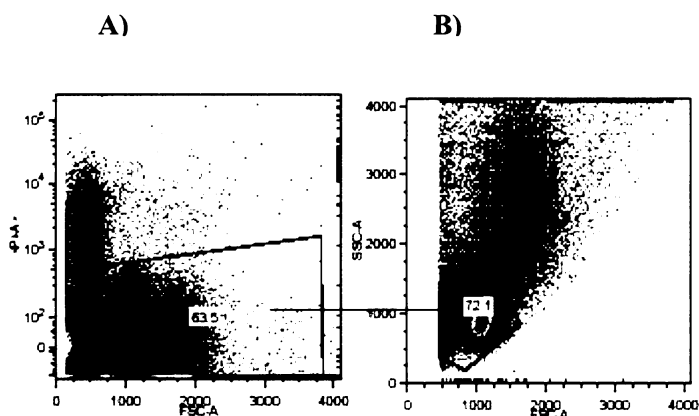
Nebyla nalezena žádná korelace mezi hladinou aCCP v séru pacienta a frekvencí CD19⁺ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin. U pacientů s nulovou hladinou aCCP v séru jsme v některých případech našli vysokou frekvenci CD19⁺ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin a naopak u některých pacientů s vyššími hladinami (>300 U/ml) nebyly detekovány žádné CD19⁺ B lymfocyty specifické pro proteiny obsahující citrulin.

7.4. Imunofenotypizace detekovaných CD19⁺ B lymfocytů

Byly sledována exprese povrchových antigenů u B lymfocytů přítomných v periferní krvi pacientů s RA v porovnání s kontrolními skupinami. Buňky byly značeny monoklonálními protilátkami konjugovanými s fluorescenční barvou podle výše uvedeného protokolu a analyzovány pomocí polychromatické průtokové cytometrie.

Bylo sledováno celkem 25 pacientů se systémovým revmatickým onemocněním a 6 zdravých kontrol. Z toho PK byla analyzována u 10 pacientů s RA (7 žen a 3 muži), 7 pacientů s JCA (5 žen a 2 muži), 4 pacientů s ankylozující spondylitidou (1 žena a 3 muži), 1 pacientky se smíšeným onemocněním pojivové tkáně (MCTD) a zdravých kontrol. Dále byla prováděna analýza vzorků synoviální tekutiny získaných od tří pacientů s RA (1 žena a 2 muži). Výsledky získané porovnání se SF lze však díky nízkému počtu pacientů považovat pouze za orientační.

Jako marker zralých B buněk v periferní krvi i synoviální tkáni byl využíván CD19 antigen, jako marker leukocytů byl v synoviální tekutině využíván antigen CD45. Pomocí propidiumjodidu byly odlišeny živé buňky od mrtvých (obr. 12 A) a následně byl označen lymfocytární gate (obr. 12 B). Bylo testováno procentuální zastoupení jednotlivých buněčných populací v rámci lymfocytů (tab. 18, obr. 13 A-D), v rámci CD19⁺ B lymfocytů (tab. 20, obr. 14 A,B) a přítomnost povrchových antigenů CD38 a CD138 (tab. 22, obr.14 A) v rámci populace naivních buněk (CD19⁺CD20⁺CD27⁻), paměťových buněk (CD19⁺CD20⁺CD27⁺) a plazmablastů (CD19⁺CD20⁻CD27⁺).



Obr.12 Označení na dot plotu
A) živých buněk, B) lymfocytárního gate

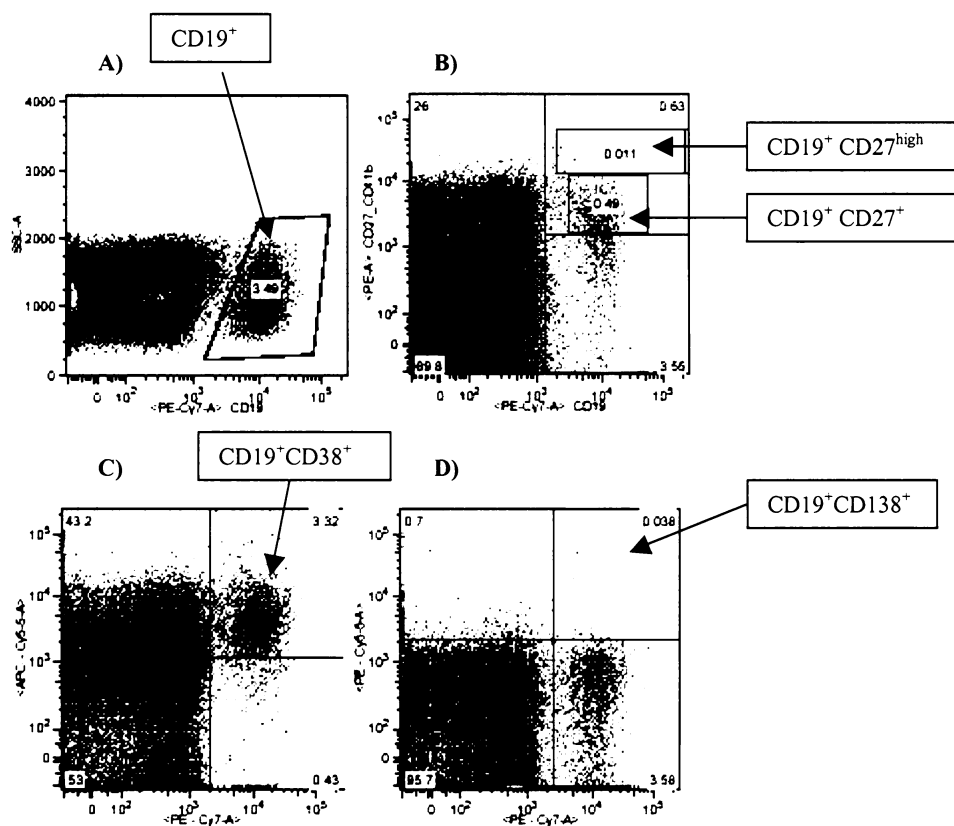
Tab. 18 Procentuální zastoupení jednotlivých populací v rámci lymfocytárního genu

a) u pacientů

číslo pacienta	typ vzorku	Diagnóza	CD19 ⁺ (%)	CD19 ⁺ CD27 ⁺ (%) (paměťové buňky)	CD19 ⁺ CD27 ^{high} (%) (plazmablasty)	CD19 ⁺ CD38 ⁺ (%)	CD19 ⁺ CD138 ⁺ (%)
20	PK	RA	6,21	0,28	1,77	4,82	0,013
21	PK	RA	3,26	0,05	0,77	2,57	0,11
22	PK	RA	4,7	0,00549	0,94	3,65	0,071
23	PK	RA	3,49	0,011	0,49	2,61	0,055
24	PK	RA	12,9	0,01	1,76	10,1	0,17
25	PK	RA	3,91	0,00767	0,35	2,92	0,19
26	PK	RA	9,72	2,64	0,1	2,78	0,18
27	SF	RA	1,28	0,3	0,0	0,75	0,98
28	SF	RA	3,4	0,32	0,0	1,07	3,01
29	SF	RA	2,17	0,82	0,00856	1,45	1,73
30	PK	RA	3,61	0,52	0,025	2,63	0,00243
32	PK	RA	0,8	0,45	0,014	0,57	0,16
33	PK	RA	4,4	1,65	0,013	2,69	0,02
35	PK	JCA	4,02	0,71	0,047	2,83	0,066
36	PK	JCA	7,16	1,71	0,023	4,2	0,027
37	PK	JCA	15,9	0,098	1,84	13,5	0,2
38	PK	JCA	3,94	0,011	1,17	2,66	0,14
39	PK	JCA	13,9	0,14	1,08	10,9	0,62
40	PK	JCA	4,11	0,015	0,36	2,41	0,069
41	PK	JCA	13,6	0,06	2,11	8,74	0,43
42	PK	AS	4,11	0,0097	0,59	3,41	0,23
43	PK	AS	6,05	0,015	0,97	5,18	0,095
44	PK	AS	8,16	0,024	1,29	7,0	0,08
45	PK	AS	6,9	0,0075	0,32	2,92	0,097
46	PK	MCTD	5,75	0,00407	0,058	4,57	0,24

b) u zdravých dárců

číslo kontroly	CD19 ⁺ (%)	CD19 ⁺ CD27 ⁺ (%) (paměťové buňky)	CD19 ⁺ CD27 ^{high} (%) (plazmablasty)	CD19 ⁺ CD38 ⁺ (%)	CD19 ⁺ CD138 ⁺ (%)
K5	1,99	0,41	0,0034	1,57	0,013
K6	4,17	3,07	0,019	3,58	0,1
K7	5,38	3,52	0,049	3,73	0,12
K8	6,1	5,01	0,012	5,65	0,51
K9	3,54	0,96	0,01	3,32	0,038
K10	6,38	3,36	0,023	5,61	0,094



Obr. 13 Procentuální zastoupení B buněčných populací v rámci lymfocytů A) CD19⁺B lymfocyty B) CD19⁺CD27⁺ B lymfocyty, v rámci této populace je možné na základě exprese CD27 identifikovat dvě odlišné subpopulace buněk – CD27⁺ a CD27^{high} – kdy CD19⁺CD27⁺ představují populaci paměťových buněk a CD19⁺CD27^{high} populaci prekurzorů plazmatických buněk (plazmablastů) C) CD19⁺CD38⁺ B lymfocyty, populace představuje prekurzory plazmatických buněk, D) CD19⁺CD138⁺ B lymfocyty, populace plazmablastů

Našli jsme statisticky významné snížení paměťových B buněk fenotypu CD19⁺CD27⁺ ($p = 0,0075$) (obr. 15 A) a statisticky významné zvýšení plazmablastů fenotypu CD19⁺CD27^{high} ($p = 0,0312$) (obr. 15 D) u pacientů s RA ve srovnání se zdravými kontrolami.

Frekvence žádné ze sledovaných buněčných populací u pacientů s RA v rámci lymfocytárního gatu se signifikantně nelišila od frekvencí stejné buněčné populace pacientů s JCA ani pacientů s AS. Statistické vyhodnocení je uvedeno v tabulce č. 19.

Našli jsme velmi výrazně zvýšené zastoupení populace CD19⁺CD138⁺ v synoviální tekutině ve srovnání s frekvencí v periferní krvi.

Tab. 19 Statistické vyhodnocení frekvencí jednotlivých buněčných populací v rámci lymfocytů

a) u pacientů s RA

	frekvence (%)	medián	průměr
CD19 ⁺	0,8 – 12,9	4,16 ± 1,1	5,30 ± 3,52
CD19 ⁺ CD27 ⁺	0,005 – 2,64	0,17 ± 0,28	0,56 ± 0,89
CD19 ⁺ CD27 ^{high}	0,01 - 1,77	0,42 ± 0,22	0,62 ± 0,68
CD19 ⁺ CD38 ⁺	0,57- 10,1	2,74 ± 0,80	3,53 ± 2,54
CD19 ⁺ CD138 ⁺	0,002 - 0,19	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,07

b) u pacientů s JCA

	frekvence (%)	medián	průměr
CD19 ⁺	3,94 – 15,9	7,16 ± 2,01	8,95 ± 5,33
CD19 ⁺ CD27 ⁺	0,01- 1,71	0,10 ± 2,34	0,39 ± 0,63
CD19 ⁺ CD27 ^{high}	0,02 – 2,11	1,08 ± 0,32	0,95 ± 0,84
CD19 ⁺ CD38 ⁺	2,41 - 13,50	4,20 ± 1,72	6,46 ± 4,54
CD19 ⁺ CD138 ⁺	0,03 – 0,62	0,14 ± 0,08	0,22 ± 0,22

c) u pacientů s AS

	rozmezí frekvence (%)	medián	průměr
CD19 ⁺	4,11 – 8,16	6,48 ± 0,85	6,31 ± 1,70
CD19 ⁺ CD27 ⁺	0,007 - 0,02	0,01 ± 0,003	0,01 ± 0,007
CD19 ⁺ CD27 ^{high}	0,32 – 1,29	0,78 ± 0,21	0,79 ± 0,43
CD19 ⁺ CD38 ⁺	2,92 – 7,00	4,30 ± 0,93	4,63 ± 1,86
CD19 ⁺ CD138 ⁺	0,08 – 0,23	0,10 ± 0,04	0,13 ± 0,07

d) u zdravých dárců

	rozmezí frekvence (%)	medián	průměr
CD19 ⁺	1,99 – 6,38	4,78 ± 0,69	4,59 ± 1,68
CD19 ⁺ CD27 ⁺	0,41 -5,01	3,22 ± 0,70	2,72 ± 1,72
CD19 ⁺ CD27 ^{high}	0,01 – 0,05	0,02 ± 0,006	0,02 ± 0,01
CD19 ⁺ CD38 ⁺	1,57 – 5,65	3,66 ± 0,63	3,91 ± 1,54
CD19 ⁺ CD138 ⁺	0,013 – 0,51	0,097 ± 0,07	0,15 ± 0,18

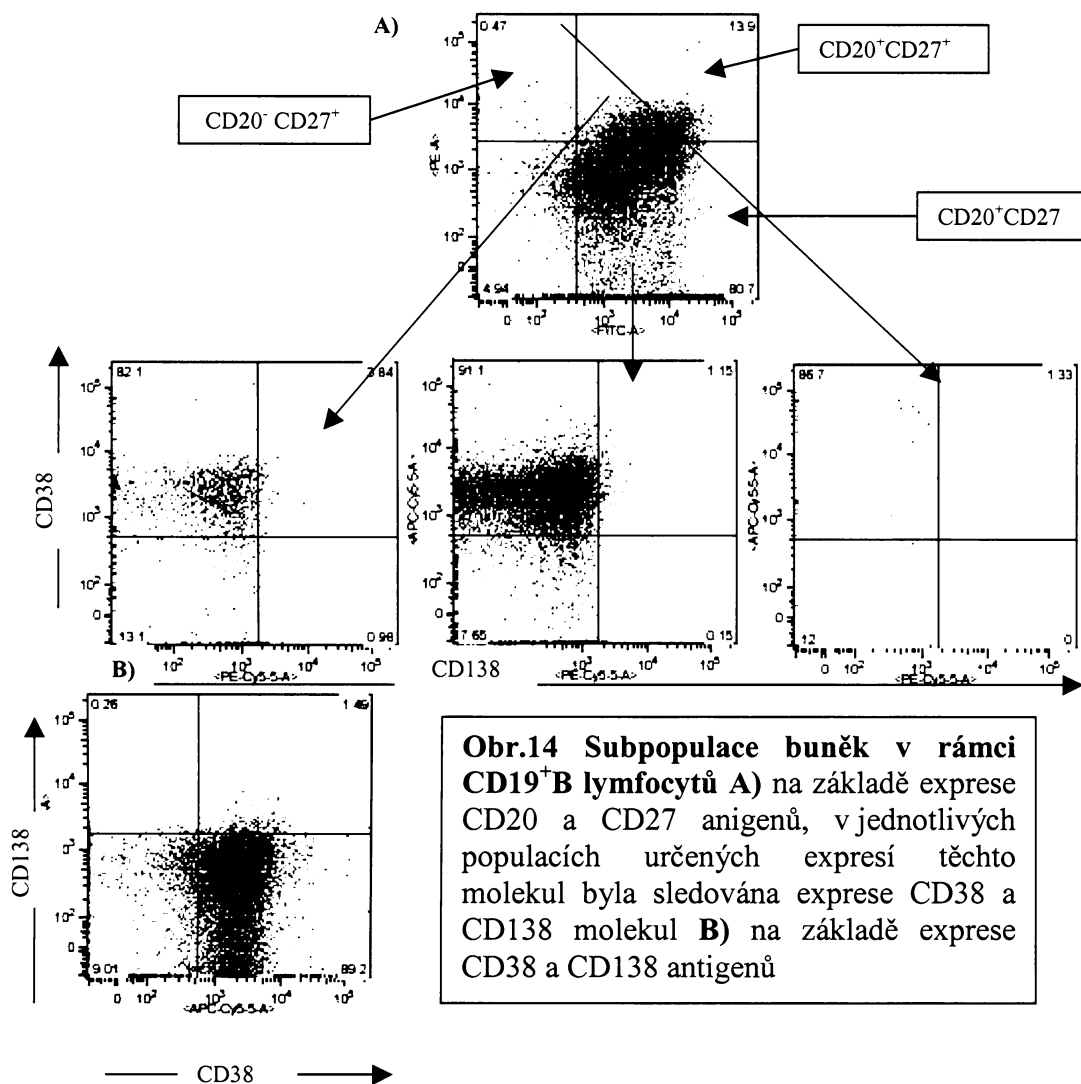
Tab. 20 Procentuální zastoupení jednotlivých populací buněk v rámci CD19⁺ B lymfocytů

I) u pacientů

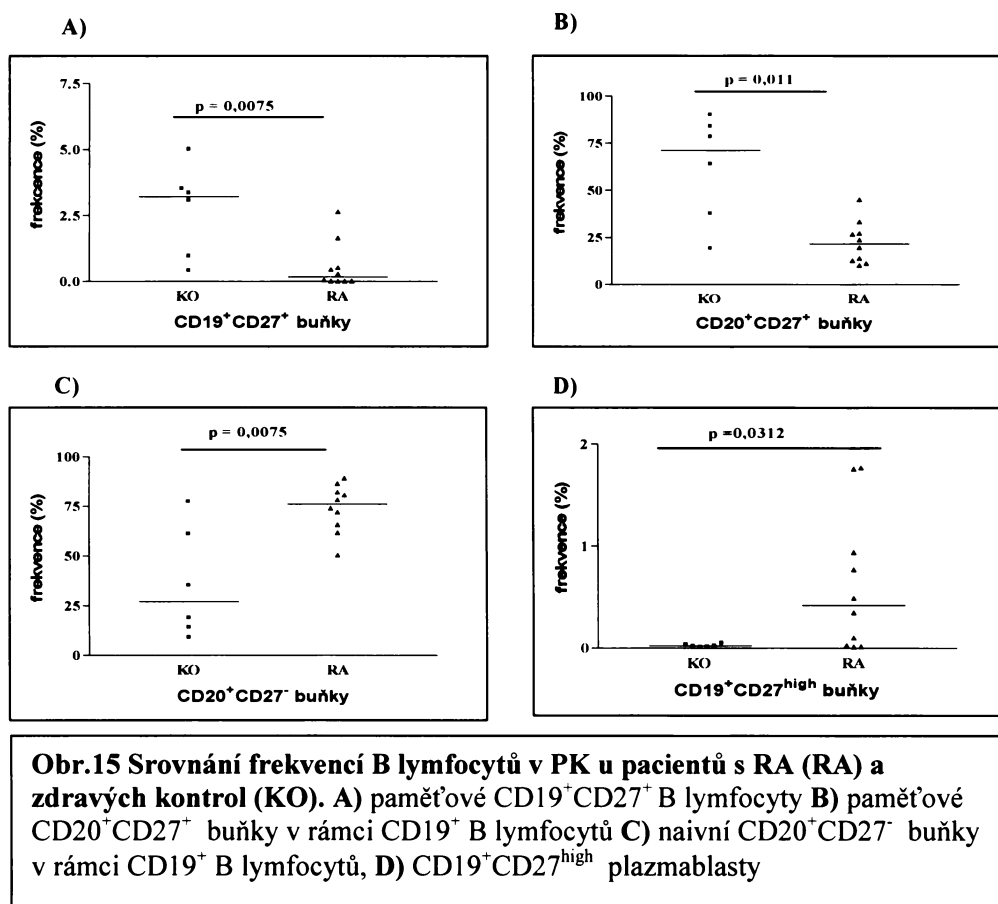
pacient	Typ vzorku	Diagnóza	CD20 ⁺ CD27 ⁻ (%) (naivní buňky)	CD20 ⁺ CD27 ⁺ (%) (paměťové buňky)	CD20 ⁻ CD27 ⁺ (%) (plazmablasty)	CD38 ⁺ CD138 ⁺ (%)
20	PK	RA	61,7	26,7	5,11	0,51
21	PK	RA	74,0	23,7	0,82	7,47
22	PK	RA	78,3	19,6	0,35	1,52
23	PK	RA	86,5	12,7	0,44	1,96
24	PK	RA	80,7	13,9	0,47	1,49
25	PK	RA	89,3	10,1	0,28	8,43
26	PK	RA	72,0	27,2	0,75	0,27
27	SF	RA	75,0	22,1	0,0	66,2
28	SF	RA	21,0	8,57	2,86	89,5
29	SF	RA	64,2	35,0	0,79	67,8
30	PK	RA	82,1	11,2	2,85	0,0084
32	PK	RA	50,4	45,1	2,79	4,68
33	PK	RA	65,7	33,4	0,49	0,14
35	PK	JCA	82,4	16,3	1,18	0,27
36	PK	JCA	78,4	21,4	0,11	0,035
37	PK	JCA	88,2	11,5	0,21	1,54
38	PK	JCA	69,1	29,7	0,13	4,11
39	PK	JCA	91,0	8,58	0,16	4,9
40	PK	JCA	91,1	8,53	0,29	1,79
41	PK	JCA	83,9	15,7	0,26	3,41
42	PK	AS	85,4	13,6	0,47	7,4
43	PK	AS	80,8	18,7	0,37	3,65
44	PK	AS	83,6	16,0	0,29	1,54
45	PK	AS	94,0	4,47	0,48	2,77
46	PK	MCTD	98,4	1,06	0,047	4,57

II) u zdravých dárců

číslo kontroly	CD20 ⁺ CD27 ⁻ (%) (naivní)	CD20 ⁺ CD27 ⁺ (%) (paměťové)	CD20 ⁻ CD27 ⁺ (%) (plazmablasty)	CD38 ⁺ CD138 ⁺ (%)
K5	77,4	19,2	3,51	0,33
K6	14,2	84,2	1,33	1,81
K7	18,9	78,5	2,25	1,66
K8	9,04	90,3	0,54	7,18
K9	61,1	37,7	1,11	0,86
K10	35,2	64,1	0,49	1,25



Obr.14 Subpopulace buněk v rámci CD19⁺B lymfocytů A) na základě exprese CD20 a CD27 anigenů, v jednotlivých populacích určených expresí těchto molekul byla sledována exprese CD38 a CD138 molekul B) na základě exprese CD38 a CD138 antigenů

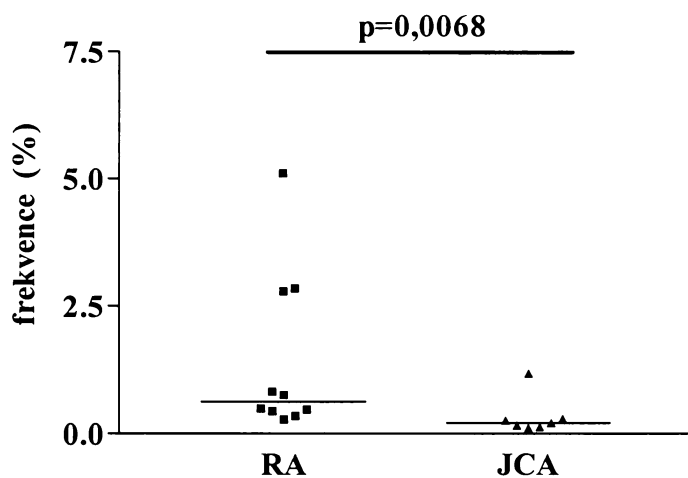


Byl zjištěn statisticky významný pokles procentuálního zastoupení paměťových buněk imunofenotypu CD20⁺CD27⁺ v rámci populace CD19⁺ B lymfocytů u pacientů s RA oproti zdravým kontrolám ($p = 0,011$) (obr. 15 B) a naopak statisticky významný nárůst frekvencí naivních buněk fenotypu CD20⁺CD27⁻ v rámci populace CD19⁺ B lymfocytů u pacientů s RA oproti zdravým kontrolám ($p = 0,075$) (obr. 15 C).

Pacienti s RA vykazovali signifikantní nárůst frekvencí CD20⁻CD27⁺ plazmablastů v rámci CD19⁺ B lymfocytů oproti pacientům s JCA ($p = 0,0068$) (obr.16). Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl ve frekvencích CD19⁺CD38⁺ a CD19⁺CD138⁺ plazmablastů v rámci lymfocytární populace ani CD20⁻CD27⁺ a CD38⁺CD138⁺ plazmablastů v rámci populace CD19⁺ B lymfocytů u pacientů s RA oproti zdravým kontrolám. Statistické vyhodnocení je shrnuto v tab. 20.

V synoviální tekutině jsme našli značné rozdílnosti v procentuálním zastoupení B lymfocytárních populací na základě exprese CD20 a CD27 antigenů. Frekvence plazmablastů CD38⁺CD138⁺ v rámci CD19⁺ B lymfocytů byly v synoviální tekutině výrazně vyšší než v periferní krvi.

Obr. 16 Srovnání frekvence CD20⁻CD27⁺ plazmablastů v rámci CD19⁺ B lymfocytů u pacientů s RA a JCA
Vodorovné čáry představují mediány



Tab.21 Statistické vyhodnocení jednotlivých buněčných populací v rámci CD19⁺ B lymfocytů

a) u pacientů s RA

	frekvence (%)	medián	průměr
CD20 ⁺ CD27 ⁻	50,40 – 89,30	76,15 ± 3,80	74,07 ± 12,02
CD20 ⁺ CD27 ⁺	10,10 – 45,10	21,65 ± 3,54	22,36 ± 11,21
CD20 ⁻ CD27 ⁺	0,28 – 5,11	0,62 ± 0,51	1,44 ± 1,62
CD38 ⁺ CD138 ⁺	0,008 – 8,43	1,50 ± 1,00	2,65 ± 3,12

b) u pacientů s JCA

	frekvence (%)	medián	průměr
CD20 ⁺ CD27 ⁻	69,1 – 91,1	69,10 ± 2,97	83,44 ± 7,86
CD20 ⁺ CD27 ⁺	8,53 – 29,70	15,70 ± 2,88	15,96 ± 7,62
CD20 ⁻ CD27 ⁺	0,11 – 1,18	0,21 ± 0,14	0,33 ± 0,38
CD38 ⁺ CD138 ⁺	0,04 – 4,9	1,79 ± 0,71	2,30 ± 1,89

c) u pacientů s AS

	frekvence (%)	medián	průměr
CD20 ⁺ CD27 ⁻	80,80 – 94,00	84,50 ± 2,85	85,95 ± 5,69
CD20 ⁺ CD27 ⁺	4,47 – 18,70	14,80 ± 3,10	13,19 ± 6,28
CD20 ⁻ CD27 ⁺	0,29 – 0,48	0,42 ± 0,045	0,40 ± 0,09
CD38 ⁺ CD138 ⁺	1,54 – 7,40	3,21 ± 1,26	3,84 ± 2,53

d) u zdravých kontrol

	frekvence (%)	medián	průměr
CD20 ⁺ CD27 ⁻	9,04 – 77,4	27,05 ± 11,31	35,97 ± 27,71
CD20 ⁺ CD27 ⁺	19,2 – 90,3	71,30 ± 11,54	62,33 ± 28,26
CD20 ⁻ CD27 ⁺	0,49 – 3,51	1,22 ± 0,47	1,54 ± 1,16
CD38 ⁺ CD138 ⁺	0,33 – 7,18	1,46 ± 1,02	2,18 ± 2,50

Tab 22. Expresse povrchových antigenů CD38 a CD138 v B buněčných populacích

a) naivní B buňky (CD19⁺CD20⁺CD27⁻)

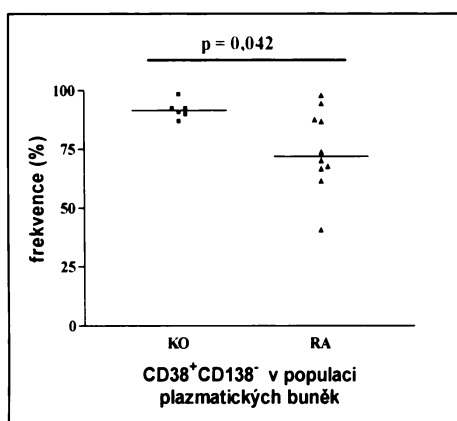
I) u pacientů

Pacient	Typ vzorku	Diagnóza	CD38 ⁺ CD138 ⁻ (%)	CD38 ⁺ CD138 ⁺ (%)	CD38 ⁻ CD138 ⁺ (%)
20	PK	RA	99,0	0,086	0,0
21	PK	RA	90,7	5,64	0,035
22	PK	RA	94,4	1,44	0,0
23	PK	RA	87,3	2,21	0,085
24	PK	RA	91,1	1,15	0,15
25	PK	RA	85,2	8,51	0,098
26	PK	RA	36,8	0,63	0,63
27	SF	RA	9,8	64,7	21,6
28	SF	RA	9,09	90,9	0,0
29	SF	RA	15,1	65,2	14,7
30	PK	RA	88,7	0,061	0,0
32	PK	RA	86,4	3,21	0,0
33	PK	RA	77,6	0,21	0,047
35	PK	JCA	83,8	0,4	0,059
36	PK	JCA	71,1	0,11	0,14
37	PK	JCA	95,9	1,49	0,033
38	PK	JCA	83,6	4,78	0,23
39	PK	JCA	92	4,2	0,035
40	PK	JCA	80,7	1,72	0,16
41	PK	JCA	84,7	3,09	0,23
42	PK	AS	95,4	4,04	0,0
43	PK	AS	97,3	1,73	0,018
44	PK	AS	94,3	3,4	0,1
45	PK	AS	93,3	2,3	0,087
46	PK	MCTD	91,1	4,53	0,024

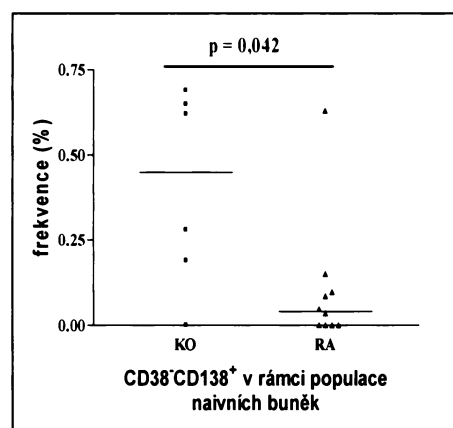
II) u zdravých dárců

číslo kontroly	CD38 ⁺ CD138 ⁻ (%)	CD38 ⁺ CD138 ⁺ (%)	CD38 ⁻ CD138 ⁺ (%)
K5	98,2	0,11	0,0
K6	90,2	5,22	0,65
K7	85,4	7,2	0,69
K8	79,9	15,6	0,62
K9	93,1	4,14	0,28
K10	91,7	5,49	0,19

A)



B)



Obr. 17 Srovnání frekvencí B lymfocytů v periferní krvi u pacientů s RA (RA) a zdravých kontrol (KO) A) CD38⁺CD138⁻ buněk v rámci populace prekurzorů plazmatických buněk, B) CD38⁻CD138⁺ buněk v rámci populace naivních B lymfocytů. Vodovrné čáry označují mediány.

U pacientů s RA bylo ve srovnání se zdravými kontrolami nalezeno statisticky významné snížení CD38⁻CD138⁺ v rámci populace naivních buněk ($p = 0,042$) (Obr. 17B) a u pacientů s AS bylo ve srovnání se zdravými dárci nalezeno statisticky významné snížení frekvence CD38⁺CD138⁻ buněk v rámci populace naivních B lymfocytů ($p = 0,0095$).

V populaci naivních B lymfocytů v synoviální tekutině jsme zaznamenali výrazně nižší frekvence CD38⁺CD138⁻ buněk a naopak výrazně vyšší frekvence CD38⁺CD138⁺ buněk (v obou případech $p = 0,007$) ve srovnání s frekvencemi v periferní krvi.

b) paměťové B buňky (CD19⁺CD20⁺CD27⁺)**I) u pacientů**

Pacient	Typ vzorku	Diagnóza	CD38 ⁺ CD138 ⁻ (%)	CD38 ⁺ CD138 ⁺ (%)	CD38 ⁻ CD138 ⁺ (%)
20	PK	RA	88,4	0,5	0,2
21	PK	RA	78,1	4,0	0,54
22	PK	RA	86,3	0,99	0,0
23	PK	RA	74,0	0,38	0,19
24	PK	RA	82,1	3,84	0,98
25	PK	RA	72,6	7,97	0,0
26	PK	RA	17,5	0,086	0,15
27	SF	RA	13,3	80,0	0,0
28	SF	RA	0,0	88,9	11,1
29	SF	RA	12,0	72,3	13,1
30	PK	RA	63,2	0,15	0,15
32	PK	RA	74,3	4,58	0,0
33	PK	RA	40,5	0,0	0,0
35	PK	JCA	34,8	0,13	0,084
36	PK	JCA	20,7	0,0	0,094
37	PK	JCA	82,4	1,93	0,12
38	PK	JCA	78,5	2,59	0,43
39	PK	JCA	53,7	12,5	3,54
40	PK	JCA	43,4	2,59	1,72
41	PK	JCA	47,1	5,08	2,84
42	PK	AS	88,2	9,28	0,0
43	PK	AS	90,6	4,62	0,61
44	PK	AS	84,9	5,9	0,98
45	PK	AS	75,1	6,99	0,91
46	PK	MCTD	68,9	8,89	0,0

II) u zdravých dárců

číslo kontroly	CD38 ⁺ CD138 ⁻ (%)	CD38 ⁺ CD138 ⁺ (%)	CD38 ⁻ CD138 ⁺ (%)
K5	68,9	1,3	0,0
K6	83,8	4,58	0,58
K7	71,7	4,69	1,3
K8	78,2	15,6	0,43
K9	84,7	3,31	0,53
K10	87,2	3,89	0,36

U pacientů s JCA bylo ve srovnání se zdravými dárci nalezeno statisticky významné snížení frekvence CD38⁺CD138⁻ buněk v rámci populace paměťových B lymfocytů (p = 0,035), u pacientů s RA toto snížení zaznamenáno nebylo.

Stejně jako u populace naivních buněk jsme i u paměťových B lymfocytů zaznamenali v synoviální tekutině výrazně nižší frekvence CD38⁺CD138⁻ buněk a výrazně vyšší frekvence CD38⁺CD138⁺ buněk (v obou případech p = 0,007) ve srovnání s periferní krví.

c) plazmablasty (CD19⁺CD20⁻CD27⁺)

I) u pacientů

Pacient	Typ vzorku	Diagnóza	CD38 ⁺ CD138 ⁻ (%)	CD38 ⁺ CD138 ⁺ (%)	CD38 ⁻ CD138 ⁺ (%)
20	PK	RA	97,9	2,08	0,0
21	PK	RA	87,5	9,37	0,0
22	PK	RA	66,7	0,0	0,0
23	PK	RA	94,4	0,0	0,0
24	PK	RA	86,7	1,33	0,0
25	PK	RA	61,5	0,0	0,0
26	PK	RA	73,8	3,12	1,25
27	SF	RA	0,00*	0,00*	0,00*
28	SF	RA	0,0	100,0	0,0
29	SF	RA	0,0	83,3	16,7
30	PK	RA	70,2	0,58	0,0
32	PK	RA	67,7	9,68	0,0
33	PK	RA	40,6	0,0	0,0
35	PK	JCA	84,8	1,75	0,58
36	PK	JCA	50,0	0	4,55
37	PK	JCA	96,6	0,0	0,0
38	PK	JCA	50,0	0,0	0,0
39	PK	JCA	80,0	0,0	0,0
40	PK	JCA	91,7	0,0	0,0
41	PK	JCA	86,7	5,0	0,0
42	PK	AS	81,8	9,09	4,55
43	PK	AS	73,1	15,4	3,85
44	PK	AS	92,9	0,0	0,0
45	PK	AS	68,6	17,1	0,0
46	PK	MCTD	50,0	0,0	0,0

* U pacienta č. 27 bylo detekováno 0% CD19⁺CD20⁻CD27⁺ B buněk

II) u zdravých kontrol

číslo kontroly	CD38 ⁺ CD138 ⁻ (%)	CD38 ⁺ CD138 ⁺ (%)	CD38 ⁻ CD138 ⁺ (%)
K5	98,20	0,00	0,00
K6	90,70	2,33	0,00
K7	92,30	0,96	0,00
K8	89,70	2,56	0,00
K9	92,30	2,94	0,00
K10	86,70	0,00	0,00

U pacientů s RA bylo ve srovnání se zdravými kontrolami nalezeno signifikantní snížení CD38⁺CD138⁻ buněk v rámci populace plazmablastů (p = 0,042) (obr. 17A).

U plazmablastů, bylo zastoupení CD38⁻CD138⁺ populace téměř vždy 0%, pokud bylo procentuální zastoupení vyšší, jednalo se vždy o 1 nebo v jednom případě (pacient č. 26) 2 buňky.

V synoviální tekutině jsme jako majoritní populaci našli populaci CD38⁺CD138⁺ buněk, a to nejen v rámci plazmablastů, ale rovněž naivních a paměťových B lymfocytů, zatímco v periferní krvi byla u všech sledovaných skupin a populací majoritní populace CD38⁺CD138⁻.

Statistické vyhodnocení exprese CD38 a CD138 antigenů v rámci jednotlivých B buněčných populací je shrnuto do tab. 23, 24 a 25.

Tab. 23 Statistické vyhodnocení exprese CD38 a CD138 molekul v rámci populace naivních buněk

a) u pacientů s RA

	frekvence (%)	medián	průměr
CD38 ⁺ CD138 ⁻	36,8 – 99,00	88,00 ± 5,51	83,72 ± 17,44
CD38 ⁺ CD138 ⁺	0,06 – 8,51	1,30 ± 0,88	2,32 ± 2,78
CD38 ⁻ CD138 ⁺	0,00 – 0,63	0,04 ± 0,06	0,10 ± 0,19

b) u pacientů s JCA

	frekvence (%)	medián	průměr
CD38 ⁺ CD138 ⁻	71,10 – 95,90	83,30 ± 3,01	84,54 ± 7,97
CD38 ⁺ CD138 ⁺	0,11 – 4,78	1,72 ± 0,69	2,26 ± 1,82
CD38 ⁻ CD138 ⁺	0,03 – 0,23	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,09

c) u pacientů s AS

	frekvence (%)	medián	průměr
CD38 ⁺ CD138 ⁻	93,30 – 97,30	94,85 ± 0,86	95,08 ± 1,71
CD38 ⁺ CD138 ⁺	1,73 – 4,04	2,85 ± 0,52	2,87 ± 1,05
CD38 ⁻ CD138 ⁺	0,00 – 0,1	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02

d) u zdravých kontrol

	frekvence (%)	medián	průměr
CD38 ⁺ CD138 ⁻	79,90 – 98,20	90,95 ± 2,60	89,75 ± 6,37
CD38 ⁺ CD138 ⁺	0,11 – 12,80	5,36 ± 1,70	5,83 ± 4,16
CD38 ⁻ CD138 ⁺	0,00 – 0,69	0,45 ± 0,12	0,41 ± 0,29

Tab. 24 Statistické vyhodnocení exprese CD38 a CD138 molekul v rámci populace paměťových buněk

a) u pacientů s RA

	frekvence (%)	medián	průměr
CD38 ⁺ CD138 ⁻	17,5 – 88,4	74,15 ± 7,05	67,70 ± 22,3
CD38 ⁺ CD138 ⁺	0,00 – 7,97	0,75 ± 0,86	2,25 ± 2,71
CD38 ⁻ CD138 ⁺	0,00 – 0,98	0,15 ± 0,10	0,22 ± 0,31

b) u pacientů s JCA

	frekvence (%)	medián	průměr
CD38 ⁺ CD138 ⁻	20,7 – 8,45	47,10 ± 8,45	51,51 ± 22,36
CD38 ⁺ CD138 ⁺	0,00 – 12,5	2,59 ± 1,63	3,55 ± 4,31
CD38 ⁻ CD138 ⁺	0,08 - 3,54	0,43 ± 0,55	1,26 ± 1,45

c) u pacientů s AS

	frekvence (%)	medián	průměr
CD38 ⁺ CD138 ⁻	75,10 – 90,60	86,55 ± 3,41	84,70 ± 6,81
CD38 ⁺ CD138 ⁺	4,62 – 9,28	6,45 ± 0,99	6,70 ± 1,98
CD38 ⁻ CD138 ⁺	0,00 – 0,98	0,76 ± 0,22	0,63 ± 0,45

d) u zdravých kontrol

	frekvence (%)	medián	průměr
CD38 ⁺ CD138 ⁻	68,90 – 87,20	81,00 ± 3,05	79,08 ± 7,47
CD38 ⁺ CD138 ⁺	1,30 – 15,60	4,24 ± 2,07	5,56 ± 5,07
CD38 ⁻ CD138 ⁺	0,00 – 1,30	0,48 ± 0,17	0,54 ± 0,43

Tab. 25 Statistické vyhodnocení exprese CD38 a CD138 molekul v rámci populace plazmablastů

a) u pacientů s RA

	frekvence (%)	medián	průměr
CD38 ⁺ CD138 ⁻	40,60 – 97,90	72,00 ± 5,48	74,70 ± 17,34
CD38 ⁺ CD138 ⁺	0,00 – 9,68	0,96 ± 1,20	2,62 ± 3,79
CD38 ⁻ CD138 ⁺	0,00 – 1,25	0,00 ± 0,13	0,13 ± 0,40

b) u pacientů s JCA

	frekvence (%)	medián	průměr
CD38 ⁺ CD138 ⁻	50,00 – 96,6	84,8 ± 7,27	77,11 ± 19,24
CD38 ⁺ CD138 ⁺	0,00 – 5,00	0,00 ± 0,72	0,96 ± 1,90
CD38 ⁻ CD138 ⁺	0,00 – 4,55	0,00 ± 0,64	0,73 ± 1,70

c) u pacientů s AS

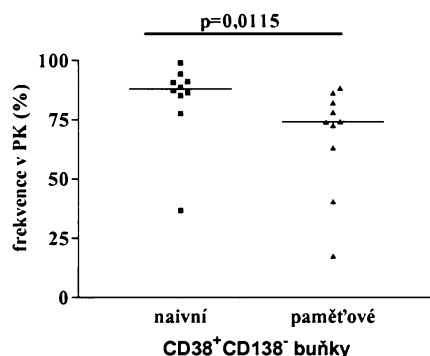
	frekvence (%)	medián	průměr
CD38 ⁺ CD138 ⁻	68,60 – 92,90	77,45 ± 5,35	79,10 ± 10,71
CD38 ⁺ CD138 ⁺	0,00 – 17,10	12,25 ± 3,87	10,40 ± 7,74
CD38 ⁻ CD138 ⁺	0,00 – 4,55	1,93 ± 1,22	2,10 ± 2,44

d) u zdravých kontrol

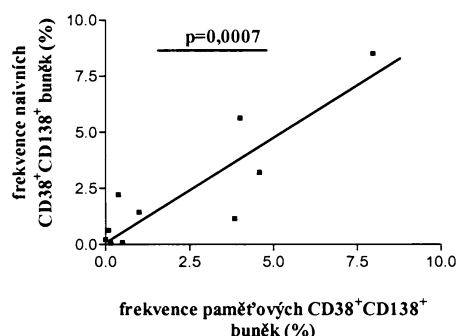
	frekvence (%)	medián	průměr
CD38 ⁺ CD138 ⁻	86,7 – 98,2	91,5 ± 1,56	91,65 ± 3,82
CD38 ⁺ CD138 ⁺	0,00 – 3,31	1,65 ± 0,57	1,53 ± 1,41
CD38 ⁻ CD138 ⁺	0,00 – 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

U pacientů s RA bylo nalezeno signifikantně větší procentuální zastoupení CD38⁺CD138⁻ buněk v rámci naivních B lymfocytů vzhledem k frekvenci stejných buněk v rámci paměťových B lymfocytů ($p = 0,0115$) (obr. 18A). Dále byla u pacientů s RA nalezena korelace mezi procentuálním zastoupením CD38⁺CD138⁺ v rámci naivních a v rámci paměťových B lymfocytů ($p = 0,0007$) (obr.18B).

A)



B)



Obr.18 Srovnání frekvencí buněk exprimujících CD38 a CD138 antigen v naivních a paměťových B lymfocytech
A) CD38⁺CD138⁻ buňky, B) CD38⁺CD138⁺ buňky

7.5. Sledování exprese V_H genů u $CD19^+$ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin izolovaných ze synoviální membrány

Expres V_H genů byla sledována v jednotlivých $CD19^+$ B lymfocytech specifických pro proteiny obsahující citrulin izolovaných pomocí průtokového cytometru z periferní krve nebo synoviální tkáně pacienta č. 47 a pacienta č 8B.

Pacient č. 47

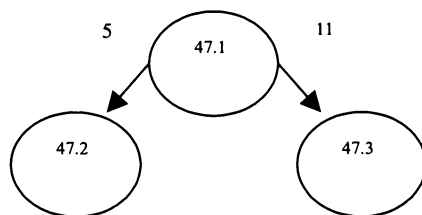
Byly analyzovány 3 V_H přestavby z 15 buněk izolovaných z periferní krve a 5 V_H přestaveb z 15 buněk z periferní krve.

Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v expresi V_H genů v periferní krvi a synoviální tkáni. Byly nalezena exprese rodin V_{H4} (gen V_{H4} -39) a V_{H5} (gen V_{H5} -51) a J_{H4} , J_{H6} a J_{H3} rodiny (tab. 26).

U sekvencí 47.1 – 47.3 byla nalezena naprosto shodná CDR3 oblast, ukazující na klonální původ těchto tří sekvencí (obr. 19,20A). Homologie ve V_H oblasti mezi těmito sekvencemi dosahovala 92,59 - 97,72%, všechny tři sekvence obsahovaly 26 shodných mutací a rozdílnost vyplývala především z delece jednoho resp. dvou tripletů u sekvence 47.2 resp. 47.3. Všechny tři sekvence měli shodné V-D a D-J spoje. V CDR oblastech se v naprosté většině případů vyskytovaly záměnové mutace (zm) a pouze jedna tichá mutace (tm) v CDR2 oblasti (poměr $zm/tm = 5$), v FR oblastech bylo tichých mutací detekováno více, poměr zm/tm byl u sekvence 47.1 2,4, u sekvence 47.2 2 a u sekvence 47.3 1,67. Pokud se vyskytovaly dvě mutace na triplet, počítala se pouze jedna záměnová mutace, delece tripletu nebyly počítány.

Klonálně příbuzné jsou pravděpodobně také sekvence 47.4 a 47.5, u kterých se v CDR3 oblasti vyskytuje pouze jednonukleotidová variabilita. Ve V_H oblasti 47.4 sekvence však byly nalezeny 3 stopkodony. V CDR oblastech sekvencí 47.4 a 47.5 nebyly narozdíl od FR oblastí zaznamenány žádné tiché mutace, v sekvencích 47.6-47.8, které pravděpodobně neprošly klonální expanzí nebyl nalezen rozdíl mezi zm/tm poměrem v CDR a FR oblastech (obr. 20B)

Všechny sekvence byly poměrně výrazně mutovány, průměrný počet mutací na V_H oblast byla 19,75, průměrná mutační frekvence 9,09% a celková mutační frekvence 9,08% (158 mutací/1740 nukleotidů).



Obr. 19 Diverzifikace V_H4-39 V_H genu v synoviální tkáni pacienta č.47

Čísla nad šipkami označují počet mutací mezi jednotlivými sekvencemi

sekvence	původ	V _H gen	J _H gen	izotyp	délka V _H oblasti (bp)	počet mutací ve V _H oblasti	mutační frekvence (%)	délka CDR3 oblasti (bp)	zm/tm poměr v CDR oblasti	zm/tm poměr v FR oblasti
47.1	ST	V _H 4-39	J _H 4	IgG	222	27	12,16	33	6	2,4
47.2	ST	V _H 4-39	J _H 4	IgG	213	26	12,20	33	6	2
47.3	PK	V _H 4-39	J _H 4	IgM	210	25	11,90	33	4	1,67
47.4	ST	V _H 5-51	J _H 6	IgG	213	16	7,51	51	≥ 5	3,5
47.5	ST	V _H 5-51	J _H 6	IgG	216	12	5,56	51	≥ 4	2
47.6	ST	V _H 5-51	J _H 4	IgG	219	13	5,94	51	1,5	1
47.8	PK	V _H 5-51	J _H 4	IgG	222	21	9,46	39	2	8
47.7	PK	V _H 5-51	J _H 3	IgM	225	18	8,00	45	8	7

Tab. 26 Vyhodnocení sekvencí izolovaných se synoviální tkáně pacienta č.47

Vysvětlivky: CDR – complementarity determining region; FR – framework region; PK – periferní krev; ST – synoviální tkáň; zm/tm poměr – poměr záměnových a tichých mutací

Obr. 20 Sekvence imunoglobulinových genů izolovaných ze synoviální tkáně pacienta č. 47

Jsou vyznačeny exprimované V_H , J_H popř. D_H germinální geny, aminokyselinové pozice a odchylky v analyzovaných sekvencích. Tiché mutace jsou označeny malým písmenem, červeně jsou označeny mutace na stopkodony. Delece jsou značeny jako xxx. U sekvencí, kde nejsou uvedeny D segmenty, se díky rozsáhlým mutacím nepodařilo určit, o který gen se jedná. V, D a J segmenty jsou v sekvenci germinálního genu odděleny kolmou čarou. A) sekvence 47.1 - 47.3. B) sekvence 47.4 - 47.8

A)

		CDR1													
		26	27	28	29	30	31	31a	31b	32	33	34	35	36	
VH4-39		GGT	GGC	TCC	ATC	AGC	AGT	AGT	AGT	TAC	TAC	TGG	GGC	TGG	
47.1		---	-A-	---	---	-A-	-AC	-CA	GAC	---	---	---	---	---	
47.2			-A-	---	---	-A-	-AC	-CA	GAC	---	---	---	---	---	
47.3				--g	-A-	G-A	-AC	xxx	xxx	---	---	---	---	---	

		37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
VH4-39		ATC	CGC	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGG	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG
47.1		---	---	---	---	---	---	---	-t	---	---	---	---	-C-
47.2		---	---	xxx	---	---	---	---	-t	---	---	---	---	-C-
47.3		---	---	---	---	---	---	---	-t	---	---	---	---	-C-

		CDR2													
		50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
VH4-39		AGT	ATC	TAT	TAT	AGT	GGG	AGC	ACC	TAC	TAC	AAC	CCG	TCC	CTC
47.1		---	---	---	-c	---	---	-C-	T-	---	---	---	---	---	---
47.2		---	---	---	-c	---	---	-C-	T-	---	---	---	---	---	---
47.3		---	---	---	-c	---	---	-C-	T-	---	---	---	---	---	---

		64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77
VH4-39		AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATA	TCC	GTA	GAC	ACG	TCC	AAG	AAC	CAG
47.1		---	---	---	---	T-	---	---	-c	---	---	---	---	-G-	---
47.2		---	---	---	---	TGG	---	---	-c	---	---	C-	---	-G-	---
47.3		---	---	---	---	T-	---	---	-c	---	---	C-	---	-G-	---

		78	79	80	81	82	82a	82b	82c	83	84	85	86	87	88
VH4-39		TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCC	GCA	GAC	ACG	GCT
47.1		---	---	---	---	G-	-AT	---	---	---	---	---	-t	---	-c
47.2		---	---	---	---	G-	-AT	---	---	---	---	---	-t	---	-c
47.3		---	---	---	---	G-	-AT	---	---	---	---	---	-t	---	-c

		CDR3															
		89	90	91	92	93	94	95							-AC	TAC	
VH4-39/ J_H4		GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA										
47.1		CAT	---	-T-	---	---	-g	GCA	GGA	CTT	GTG	ACA	TCT	---	---	CT-	
47.2		CAT	---	-T-	---	---	-g	---	---	---	---	---	---	---	---	CT-	
47.3		CAT	---	-T-	---	---	-g	---	---	---	---	---	---	---	---	CT-	

		95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
J_H4		TTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGA	ACC	CTG	GTC	ACC	GTC		
47.1		---	---	---	---	---	-G	-C	---	---	---	---	---		
47.2		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
47.3		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		

B)

														CDR1				
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36					
VH5-51	GGT	TCT	GGA	TAC	AGC	TTT	ACC	AGC	TAC	TGG	ATC	GGC	TGG					
47.4			---	--A	C-G	C--	---	-T-	---	---	---	---	---					
47.5			---	---	G--	A--	---	-T-	---	---	---	---	---					
47.6			---	--t	-A-	A--	---	GA-	C-T	---	---	---	---					
47.8			---	-T-	---	C--	---	G--	A--	---	---	-C-	---					
47.7	---	---	---	---	---	---	-TT	-T-	---	---	-G	-C-	---					
														CDR2				
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49					
VH5-51	GTG	CGC	CAG	ATG	CCC	GGG	AAA	GGC	CTG	GAG	TGG	ATG	GGG					
47.4	---	-CT	T--	-A-	--a	---	---	---	---	---	---	---	---					
47.5	---	---	---	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---					
47.6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---					
47.8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---					
47.7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--a	---	---	---					
														CDR2				
	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61					
VH5-51	ATC	ATC	TAT	CCT	GGT	GAC	TCT	GAT	ACC	AGA	TAC	AGC	CCG					
47.4	---	---	G--	---	CA-	---	---	---	---	-C-	--A	---	---					
47.5	---	---	G--	---	CC-	---	---	---	---	-C-	---	---	-A-					
47.6	---	---	---	---	-C-	---	---	---	---	---	---	--t	---					
47.8	---	--t	-T-	--a	---	---	---	---	---	-A-	---	--t	---					
47.7	G--	-C-	C--	---	-T-	---	---	-t	---	-A-	---	---	---					
														CDR2				
	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74					
VH5-51	TCC	TTC	CAA	GGC	CAG	GTC	ACC	ATC	TCA	GCC	GAC	AAG	TCC					
47.4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---					
47.5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---					
47.6	---	--t	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---					
47.8	---	---	-G-	---	-GA	---	---	---	-t	T--	---	---	---					
47.7	---	---	---	---	--C	---	---	---	---	-T-	---	C--	---					
														CDR2				
	75	76	77	78	79	80	81	82	82a	82b	82c	83	84					
VH5-51	ATC	AGC	ACC	GCC	TAC	CTG	CAG	TGG	AGC	AGC	CTG	AAG	GCC					
47.4	---	--t	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---					
47.5	---	--t	---	xxx	---	--c	---	---	---	---	---	C--	---					
47.6	---	--t	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	--a					
47.8	---	GC-	---	---	---	---	---	---	---	G--	---	G--	---					
47.7	-G-	-A-	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C--	---					
														CDR2				
	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95							
VH5-51/D6-6	TCG	GAC	ACC	GCC	ATG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	CA-	GAG	TAT					
47.4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	GCC	CGT	---					
47.5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	GCC	CGT	---					
47.6	---	---	---	---	--A	---	---	---	---	---	GGT	GGG	GGA					
47.8	---	---	---	---	G-A	---	---	---	---	---	CAT	CGG	GGG					
47.7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	GGG	GGT	GTC					
														CDR3				
	AGC	AGC	TCG	TCC	-AT	TAC	TAC	TAC	TAC	TAC	GGT	ATG	GAC					
D6-6/J _H 6	---	-A-	---	---	G--	GGT	C--	---	-T	---	-C	---	---					
47.4	---	-A-	---	---	G--	GGT	C--	---	-T	---	-C	---	---					
47.5	---	-A-	---	---	G--	GGT	C--	---	-T	---	-C	---	---					
J _H 4										-AC	TAC	TTT	GAC					
47.6	TCT	TGT	AAC	GGT	GAT	AGT	TGT	TAC	TCC	TTA	GGC	C--	---					
47.8	TTT	AGC	AGC	GGC	CAA	TAC	TAC	TTT	GAC	TCG	xxx	xxx	xxx					
J _H 3									-T	GAT	GCT	TTT	GAC					
47.7	GAT	ATT	TCG	ACT	GGT	TAT	TAT	GAT	GCC	TTA	-A-	A-C	xxx					
														CDR3				
	GTC	TGG	GGC	CAA														
J _H 6	---	---	---	---														
47.4	--A	---	---	---														
47.5	---	---	---	---														
J _H 4	TAC	TGG	GGC	CAG	GGA	ACA	CTG											
47.6	---	---	-C-	A--														
47.8	xxx	---	---	---	--C	--C	---											
J _H 3	ATC	TGG	GGC	CAA														
47.7	xxx	---	---	---														

Pacient č. 8B

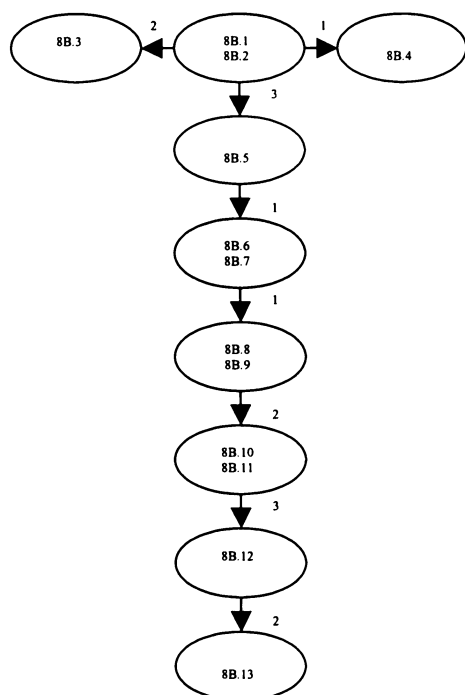
U pacienta č. 8B bylo z 96 buněk izolovaných pomocí peptidu P1 analyzováno 14 přestaveb V_H genů. Ve všech případech byla amplifikována pouze V_H oblast.

sekvence	původ	V_H gen	izotyp	délka (bp)	počet mutací	mutační frekvence (%)	zm/tm poměr v CDR oblasti	zm/tm poměr v FR oblasti
8B.1	ST	$V_{H7-04.1}$	IgM	129	8	6,20	≥ 2	≥ 2
8B.2	ST	$V_{H7-04.1}$	IgM	129	8	6,20	≥ 2	≥ 2
8B.3	ST	$V_{H7-04.1}$	IgM	132	10	7,58	≥ 2	≥ 3
8B.4	ST	$V_{H7-04.1}$	IgM	126	9	7,14	≥ 2	≥ 3
8B.5	ST	$V_{H7-04.1}$	IgM	133	11	8,27	≥ 3	3
8B.6	ST	$V_{H7-04.1}$	IgM	133	12	9,02	≥ 4	3
8B.7	ST	$V_{H7-04.1}$	IgM	132	12	9,09	≥ 4	3
8B.8	ST	$V_{H7-04.1}$	IgM	134	13	9,70	≥ 4	1,5
8B.9	ST	$V_{H7-04.1}$	IgM	129	13	10,08	≥ 4	1,5
8B.10	ST	$V_{H7-04.1}$	IgM	116	14	12,07	5	3
8B.11	ST	$V_{H7-04.1}$	IgM	120	14	11,66	5	3
8B.12	ST	$V_{H7-04.1}$	IgM	134	18	13,43	6	1,5
8B.13	ST	$V_{H7-04.1}$	IgM	125	21	16,80	6	≥ 7
8B.14	ST	V_{H4-55}	IgM	228	0	-	-	-

Tab. 27 Vyhodnocení sekvencí izolovaných se synoviální tkáně pacienta č.8B
Vysvětlivky: CDR – complementarity determining region; FR – framework region;
ST – synoviální tkáň; zm/tm poměr – poměr záměnových a tichých mutací

Překvapivě byla zjištěna exprese zejména V_H7 rodiny, pouze u jedné buňky jsme zjistili expresi V_H4 rodiny. V_H7 geny byly detekovány pomocí V_H1 primerů. U V_H7 rodiny se jednalo o V_H gen $V_{H7-04.1}$, u V_H4 se rodiny o V_{H4-55} gen. Sekvence $V_{H7-04.1}$ byly poměrně výrazně mutovány, mutační frekvence byla průměrně 9,79%, záměnové mutace se vyskytovaly výrazně častěji než tiché mutace, a to jak v FR oblastech, tak v CDR oblastech. V_H4 gen mutován nebyl (tab. 27). Ve všech případech se jednalo o mRNA IgM izotypu.

A)



Obr.21 Diverzifikace B buněk v synoviální tkáni pacienta 8B.
A) Genealogický strom diverzifikace V_H7-04.1 V_H genu. Čísla u jednotlivých šipek označují počet mutací **B)** Kodony odlišující se od sekvence V_H7-04.1. V prvním řádku je uveden germinální gen, nad ním aminokyselinové pozice a polohy CDR1 a CDR2 oblastí.

B)

	CDR1					CDR2									
	26	28	29	30	31	33	38	41	51	53	58	64	65	66	67
V _H 7-04.1	GGA	ACC	TTC	ACT	AGC	GCT	CGA	CCT	ATC	AAC	ACG	ACA	GGA	CGG	TTT
8B.1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C--	TC--	GTC	C-G
8B.2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C--	TC--	GTC	C-G
8B.3	C-G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	C--	TC--	GTC	C-G
8B.4	---	---	---	---	---	---	---	-A-	---	---	---	C--	TC--	GTC	C-G
8B.5	--t	---	---	---	-C-	---	-C-	---	---	---	---	C--	TC--	GTC	C-G
8B.6	--t	---	---	---	-C-	---	-C-	---	---	T--	---	C--	TC--	GTC	C-G
8B.7	--t	---	---	---	-C-	---	-C-	---	---	T--	---	C--	TC--	GTC	C-G
8B.8	--t	---	---	--c	-C-	---	-C-	---	---	T--	---	C--	TC--	GTC	C-G
8B.9	--t	---	---	--c	-C-	---	-C-	---	---	T--	---	C--	TC--	GTC	C-G
8B.10	---	---	---	-c	-C-	---	-C-	---	T--	T--	--a	C--	TC--	GTC	C-G
8B.11	---	---	---	--c	-C-	---	-C-	---	T--	T--	--a	C--	TC--	GTC	C-G
8B.12	--t	-GT	---	--c	-C-	-G-	-C-	---	T--	T--	--a	C--	TC--	GTC	C-G
8B.13	---	-GT	-CA	CTC	-C-	-G-	-C-	---	T--	T--	--a	C--	TC--	GTC	C-G

U všech buněk exprimujících V_H7 byla nalezena shodná mutantní sekvence na konci CDR2 oblasti. Jednalo se o záměnové mutace v pozicích 64 a 65 (CCA TCA, místo ACA GGA), kdy místo threoninu v pozici 64 byl syntetizován prolin a místo glycinu v pozici 65 byl syntetizován serin (obr.21).

8. DISKUZE

8.6. Detekce B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin

8.6.1. *Inhibiční test*

V případě peptidů P1, P3, P0428 a biot1 výsledkem inhibičního testu snížení počtu detekovaných CD19⁺ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin, které bylo způsobeno zablokováním vazebného místa v příslušném BCR nebiotinylovaným peptidem. V důsledku toho se nemohl na BCR navázat odpovídající biotinylovaný peptid, a proto nemohl být B lymfocyt průtokovou cytometrií detekován. Testem tak bylo potvrzeno, že nedochází k nespecifickému navázání těchto biotinylovaných peptidů obsahujících citrulin a že uvedené peptidy lze používat k přímé detekci B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin.

U peptidu biot2 však bylo výsledkem inhibičního testu kolísání frekvencí detekovaných B lymfocytů naprosto nezávislé na množství přidávaného nebiotinylovaného peptidu biot2. To ukazuje na nespecifičnost vazby peptidu biot2, která by mohla být způsobena například přítomností velkého množství kladně nabitého argininu. Na nespecifičnost vazby ukazují také výrazně vyšší frekvence B lymfocytů detekovaných peptidem biot2 (minimum 0,04; maximum 2,24) oproti všem ostatním používaným peptidům a vysoké frekvence B lymfocytů detekovaných tímto peptidem u zdravých dárců (až 0,8 %). Vzhledem k výše uvedenému nebyla data získaná použitím peptidu biot2 dále vyhodnocována.

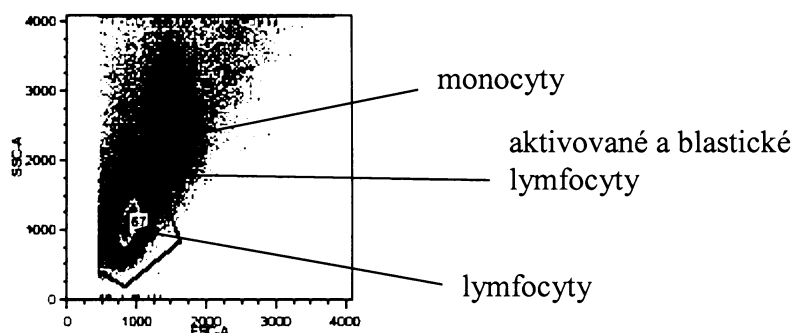
8.6.2. *Detekce B lymfocytů pomocí peptidů P1, P3, P0428 a biot1*

Množství CD19⁺ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin jak v periferní krvi, tak synoviální tkáni je velmi nízké a jejich detekce je tedy velmi obtížná. Ke studiu B lymfocytů sekretujících protilátky je tradičně používáno několik metod. Mezi takové patří např. hybridomová technika (RAY et al., 1996); technika „antibody phage display“ založená na vnesení cDNA kódující studovanou protilátku do fagemidu nebo fágového vektoru a detekci protilátek exprimovaných na povrchu pomocí ELISA metody (RAATS et al., 2003) nebo ELISpot (UMEMURA et al., 2006). Jejich nevýhodou je vyšší náročnost metody a nemožnost zároveň studovat povrchové znaky detekovaných B lymfocytů. Nevýhodou hybridomové techniky je navíc nižší schopnost B buněk tvořit v pozdějších diferenačních stádiích hybridomy způsobilé

produkovat protilátky, což může mít za následek arteficiální výsledky (RAY et al., 1996). Námí používaná metoda detekce pomocí průtokové cytometrie je v porovnání s výše uvedenými metodami časově poměrně málo náročná a schopná analyzovat přímo specifické B buňky bez ohledu na jejich schopnost tvořit hybridomy nebo produkovat imunoglobuliny. Umožňuje zároveň analýzu dalších znaků, jako jsou znaky paměťových buněk nebo cytokinové receptory a výrazně neovlivňuje vlastnosti studovaných buněk. Navíc je možné v izolovaných antigen-specifických B lymfocytech analyzovat expresi Ig mRNA a přiřadit ji ke konkrétnímu definovanému B lymfocytu. Podobný postup byl použit např. Odendahlem (ODENDAHL et al., 2005) při studiu B lymfocytů specifických pro C fragment tetanového toxinu, Hansenem (HANSEN et al., 2002; 2004) při studiu buněčných populací u Sjögrenova syndromu, Babušíkovou (BABUŠÍKOVÁ et al., 2005) při studiu B buněčné akutní lymfoblastické leukémie (B-ALL) nebo Reparón-Schuijtovou (REPARON-SCHUIJT et al., 1998) při studiu B buněk produkujících revmatoidní faktory.

8.6.3. *Lymfocytární gate*

Prováděli jsme analýzu buněčných populací v rámci lymfocytů. Existují tři možnosti označení této populace - lymfocytární gate, velký lymfocytární gate a lymfomonocytární gate. Při označení čistě lymfocytárního gate nejsou detekovány aktivované a blastické buňky, tj. buňky, pro které je charakteristicky vyšší FSC. Proto jsme se rozhodli využívat velký lymfocytární gate, který zahrnuje aktivované a blastické buňky, ale vynechává monocyty a jeví se tak pro námi prováděnou analýzu jako nejvhodnější.



Obr. 22 Označení populace lymfocytů na dot plotu

8.6.4. Frekvence B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin

U pacientů s RA byly CD19⁺ B lymfocyty specifické pro proteiny obsahující citrulin detekovány jak v PK, tak v ST a většinou rozeznávaly alespoň dva z použitých peptidů. Procentuální zastoupení CD19⁺ B lymfocytů specifických pro různé proteiny u jednoho pacienta vzájemně nekorelovalo. To je pravděpodobně důsledkem rozdílnosti protilátkové odpovědi u jednotlivých pacientů v závislosti na tom, který konkrétní peptid obsahující citrulin působil jako antigen stimulující B lymfocyty (VOSSENAAR a VAN VENROOIJ, 2004A). V synoviální tkáni pravděpodobně není přítomen pouze jeden peptid obsahující citrulin, ale zřejmě celá řada různých citrulinovaných proteinů (např. fibrin, aggrecan, vimentin) (SIMON et al., 1995; SCHELLEKENS et al., 1998). Výsledkem je vznik rozsáhlého repertoáru B buněk specifických pro proteiny obsahující citrulin, které produkují různé aCCP. Procentuální zastoupení B lymfocytů v rámci detekované populace tak závisí na tom, zda jako antigen působí v synoviální tkáni pacienta protein podobný námi používaným peptidům, v jakém množství se zde vyskytuje, jak je B lymfocytům dostupný a také zda se zde vyskytují další proteiny obsahující citrulin.

U většiny pacientů byly v ST zjištěny vyšší frekvence CD19⁺ B buněk specifických pro proteiny obsahující citrulin oproti PK. Pro peptid P1 a pokud byly vyhodnocovány všechny peptidy společně, bylo toto zvýšení statisticky významné ($p = 0,006$, resp. $p = 0,0174$). Tento fakt může být způsoben jednak antigenem řízenou stimulací přímo v zaníceném kloubě pacienta s RA a jednak migrací plazmablastů do zanícené tkáně, kam jsou pravděpodobně přitahovány různými chemokiny (např. CXCL9, CXCL13) na základě exprese receptorů, jako je CXCR3, bez ohledu na svoji antigenní specifitu (HARINGMAN et al., 2004; MOSER et al., 2005; ODENDAHL et al., 2005). Mnoho cytokinů působících jako atraktanty plazmablastů zároveň podporuje přežívání plazmatických buněk a umožňuje tak obrovské nahromadění plazmatických buněk v synoviální tkáni (MOSER et al., 2005).

U 3 pacientů (č. 17, č. 18 a č. 19) byly frekvence B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin vyšší v PK než ST. Revmatoidní artritida téměř vždy postihuje větší počet kloubů, a je tedy možné, že frekvence B lymfocytů specifických pro citrulinované proteiny naměřené v PK, korespondovaly s frekvencemi specifických B lymfocytů vznikajících v jiném, než námi sledovaném kloubu. V PK mohly být také detekovány buňky právě migrující z jiných imunokompartmentů (slezina, lymfatické uzliny, kostní

dřeň). Zároveň je možné, že v ST těchto pacientů se vyskytují především již diferencované plazmatické buňky, které naší detekci unikají (neexprimují CD19 antigen ani BCR). Navíc u pacienta č. 18 byla přítomnost B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin testována pouze peptidem P0428 a je tedy možné, že hladiny B lymfocytů specifických pro peptidy P1 a P3 byly vyšší.

U zdravých dárců byla frekvence CD19⁺ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin v PK maximálně 0,03%, jednalo se navíc o značně vybočující hodnotu, všechny ostatní naměřené frekvence se u zdravých kontrol pohybovaly v rozmezí 0,00 – 0,003 %. Tato hodnota představuje pravděpodobně inaktivní formy B buněk, které sice jsou potenciálně schopné produkovat aCCP, ale tyto protilátky neprodukují, pravděpodobně v důsledku nízké koncentrace citrulinovaných proteinů u zdravého jedince. Teprve po překročení určitého množství proteinů obsahujících citrulin dochází k aktivaci a expanzi specifických B lymfocytů (REPARON-SCHUIJT et al., 2001). Malé množství B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin se může vyskytovat u každého, tedy i zdravého, jedince jako důsledek fyziologické citrulinace kožního proteinu filagrinu v pozdních stádiích diferenciaci. V souladu s našimi výsledky je i studie Reparón-Schuijtové (REPARON-SCHUIJT et al., 2001), která detekovala v krvi pacientů s RA i zdravých osob určité frekvence B lymfocytů, které po aktivaci produkovaly aCCP protilátky. U pacientů s RA dochází k masivní prezentaci citrulin obsahujících antigenů, v důsledku čehož dochází k aktivaci specifických B lymfocytů a následné produkci autoprotiáték. Je tedy možné, že B buňky v periferní krvi nejsou zodpovědné za produkci aCCP detekovatelných v séru (RŮŽIČKOVÁ et al., 2005).

U pacientů s jiným autoimunitním onemocněním (JCA, MCTD) dosahovala frekvence detekovaných B lymfocytů maximálně 0,06% (u pacienta s JCA). JCA byla identifikována jako nemoc, u které se nejčastěji ze všech revmatických onemocnění kromě RA, vyskytují aCCP protilátky (LEE a SCHUR, 2003). Je však možné, že minimálně část aCCP pozitivních JCA jsou špatně diagnostikované RA s nástupem v dětství (VOSSENAAR a VAN VENROOIJ, 2004).

Zjištěné frekvence CD19⁺ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin v PK a ST nevykazovaly žádnou korelaci s hladinou aCCP v séru pacientů. Námi detekované buňky jsou především prekurzory plazmatických buněk (viz výše), navíc protilátky mají daleko delší životnost než CD19⁺B lymfocyty a hladina aCCP v séru

odráží produkci plazmatickými buňkami v celém organismu. Je možné, že aCCP protilátky detekované v séru pacienta, byly produkovány B lymfocyty přítomnými v jiném, než námi sledovaném kloubu, popřípadě B lymfocyty přítomnými v kostní dřeni. Část plazmatických buněk zpětně osidluje kostní dřeň, kde se stávají tzv. dlouho žijícími plazmatickými buňkami (životnost až několik let) (SLIFKA et al., 1998; MOSER et al., 2006). Vzhledem k tomu, že aCCP se v séru pacientů vyskytují již v raných stádiích RA, je velmi pravděpodobné, že část plazmatických buněk produkujících tyto autoprotiátky se během rozvoje onemocnění v kostní dřeni usadila. Přestože bylo prokázáno, že aCCP se podílejí na destrukci kloubu, jejich hladina v séru, ani hladina jakýchkoliv jiných protilátek, nekoreluje se závažností RA (WEINSTEIN et al., 2004). Podobně u primárního Sjögrenova syndromu byla nalezena u pacientů sérová hypergamaglobulinemie, přestože frekvence ani absolutní počty cirkulujících plazmatických buněk nejsou ve srovnání se zdravými kontrolami zvýšené (HANSEN et al., 2002).

Nenašli jsme korelace mezi frekvencemi B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin a žádným z klinických údajů využívanými jako ukazatele aktivity nebo závažnosti onemocnění (hladina aCCP, hladina CRP, sedimentace).

Velký vliv na frekvenci B lymfocytů má také podávaná léčba, zejména pokud je pacient léčen biologickou léčbou namířenou proti CD20 molekule, která má velmi podobný výskyt jako molekula CD19, popřípadě jinou biologickou léčbou. U pacienta č. 13, který byl léčen Adalimumabem (monoklonální protilátka proti TNF α), nebyly v synoviální tkáni detekovány B lymfocyty specifické pro žádný z námi používaných peptidů obsahujících citrulin. Navíc u pacienta č. 8, kterému byly v rozmezí dvou měsíců odebírány dva vzorky synoviální tkáně a který byl při prvním odběru léčen Entanerceptem (solubilní TNFR), ale při druhém již pouze DMARDs, jsme zaznamenali značný nárůst frekvencí B lymfocytů detekovaných všemi třemi použitými peptidy (P1, P3, P0428) v synoviální tkáni odebírané později. Nejvyšší hodnoty, které jsme našli v PK pomocí peptidů P1, P3 a P0428 a v ST a SF pomocí peptidů P3 a P0428 byly zaznamenány u jednoho pacienta (č. 15). Bohužel, u tohoto pacienta neznáme způsob léčby.

Pomocí imunohistologické analýzy byla prokázána přítomnost proteinů obsahujících citrulin v synoviální tkáni. Proteiny byly nalezeny ve 4 z 9 testovaných tkáních a vždy byly detekovány oběma použitými protilátkami (Biogenesis a FP95). U pacienta č. 8,

byla prováděna analýza dvou odebraných tkání. Zatímco u vzorku 8A proteiny obsahující citrulin nebyly nalezeny, u vzorku 8B tyto proteiny detekovány byly. Patrně se jedná o tzv. vzorkovací chybu (sampling error), tj. byla analyzována jiná část synoviální tkáně, než v které byly proteiny přítomny. Vzhledem k tomu, že v obou případech měl pacient stejnou hladinu aCCP protilátek, není pravděpodobné, že by se proteiny obsahující citrulin objevily až v později odebíraném vzorku synoviální tkáně. Je velice pravděpodobné, že stejnou příčinu, tedy vzorkovací chybu, mají i ostatní negativní nálezy.

Závěrem lze říci, že pozorované frekvence B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin v periferní krvi odpovídají očekávaným frekvencím antigenně specifickým B lymfocytům (1:10 000; NEWMAN et al., 2003).

8.7. Imunofenotypizace B lymfocytů

Analyzovali jsme vzorky periferní krve 10 pacientů s RA, jako kontrolní skupiny jsme použili vzorky periferní krve pacientů s JCA (7 pacientů), pacientů s AS (4 pacienti) a zdravé kontroly (6 osob). Dále jsme sledovali vzorky synoviální tekutiny od tří pacientů s RA. Jedná se o velmi malý, a tudíž nereprezentativní, soubor, srovnání s frekvencemi B lymfocytů v periferní krvi je však velmi zajímavé a částečně nahrazuje vzorky synoviální tkáně, kterou jsme pro její nedostatek nemohli využít.

8.7.1. Sledované povrchové antigeny

U pacientů jsme sledovali frekvenci naivních, paměťových a plazmatických buněk v periferní krvi pomocí povrchových antigenů CD19, CD20, CD27, CD38, CD45 a CD138.

B lymfocyty jsou molekulárně charakterizované zejména přítomností CD19 a CD20 molekul na povrchu. Obě molekuly se vyskytují u všech vývojových stádií B buněk s výjimkou velmi časných vývojových stádií a plazmatických buněk a kromě B buněk se nevyskytují na žádných jiných buněčných typech (MARINOV, 2003). CD19 molekula se však na povrchu vyvíjející se buňky objevuje dříve a zároveň její exprese je utlumována v pozdějších diferenciačních stádiích (CIUDAD et al., 1998; KLEIN et al., 1998; www.ncbi.nlm.nih.gov/prow).

Plazmatické buňky jsou charakterizovány výskytem CD38 molekuly. Buňky, které mají na svém povrchu jak CD38, tak CD19 molekulu, jsou považovány za prekurzory

plazmatických buněk, tzv. plazmablasty (RŮŽIČKOVÁ et al., 2005). CD38 molekula se vyskytuje také na kmenových a prekurzorových buňkách (www.ncbi.nlm.nih.gov/prow).

CD27 molekula patří do rodiny TNF receptorů a vyskytuje se na T a B lymfocytech. Paměťové B lymfocyty jsou charakterizovány současnou přítomností CD19 a CD27 molekul, CD19^{+/low}/CD27^{high} buňky jsou považovány za plazmablasty a neexprimují CD20 molekulu (CD19⁺CD20⁻CD27⁺) (KLEIN et al., 1998). Počet paměťových B lymfocytů roste s věkem.

CD45 je panleukocytární antigen (HOŘEJŠÍ a BARTUŇKOVÁ, 2005), který jsme využívali k odlišení leukocytů od ostatních buněk v synoviální tkáni.

CD138 antigen je charakteristický zejména pro plazmatické buňky (HOŘEJŠÍ a BARTUŇKOVÁ, 2005) a pro kmenové a prekurzorové buňky. Vzhledem k tomu, že molekula CD138 se vyskytuje pouze na malém procentu leukocytů, využívali jsme u kontrol pro nastavení průtokového cytometru molekulu CD56 konjugovanou se stejnou fluorescenční barvou jako CD138 (PE-Cy5.5). CD56 je přítomna zejména NK buňkách a aktivovaných T buňkách (HOŘEJŠÍ a BARTUŇKOVÁ, 2005).

8.7.2. *Signifikantně snížené frekvence paměťových B lymfocytů a signifikantně zvýšené frekvence naivních B lymfocytů u pacientů s RA*

Našli jsme statisticky významně snížené zastoupení populace paměťových buněk fenotypu CD19⁺CD27⁺ a CD19⁺CD20⁺CD27⁺ ($p = 0,0075$ a $p = 0,011$) u pacientů s RA v porovnání se zdravými kontrolami. Toto snížení je pravděpodobně způsobeno migrací paměťových B lymfocytů do zaníceného kloubu, kde vstupují do pseudogerminální reakce a jsou diferencovány v plazmatické buňky. V zaníceném kloubu je nadměrné množství antigenu, které je navíc neustále doplňováno a obnovováno a paměťové buňky jsou tak nepřetržitě usměrňovány do místa zánětu. Pokles je natolik výrazný, že se odráží nejen v B lymfocytární populaci, ale také v celé populaci lymfocytů.

Podobné snížení frekvencí paměťových buněk v PK bylo popsáno u primárního Sjögrenova syndromu (HANSEN et al., 2002). Primární Sjögrenův syndrom (pSS) je chronické autoimunitní onemocnění, které je charakterizováno zejména zánětem exokrinních žláz. Zánět u pSS je z imunologického hlediska prakticky totožný se zánětem kloubů u RA (PAVELKA et al., 2003). Naopak u SLE byla zjištěna významně

zvýšená frekvence paměťových B lymfocytů, které zde představují majoritní populaci B buněk (ODENDAHL et al., 2000). SLE je typicky B lymfocytární onemocnění, které je charakterizováno produkcí velkého množství autoprotilátek proti dsDNA a ribonukleoproteinům a četnými systémovými projevy (není tedy orgánově specifické a imunocyty jsou rozloženy v celém organismu mnohem rovnoměrněji než u RA nebo pSS) (ODENDAHL et al., 2000; PAVELKA et al., 2003).

Zvýšená frekvence naivních B lymfocytů v periferní krvi pacientů s RA je pravděpodobně důsledek snížení procentuálního zastoupení populace paměťových B lymfocytů. Tomu nasvědčuje i fakt, že u kontrol, u nichž jsme zaznamenali velké rozmezí ve frekvenci naivních B lymfocytů (9,04 – 77,40 %), se u jedinců, u kterých jsme detekovali vysokou frekvenci přítomným naivních buněk, vyskytovaly vždy úměrně nižší frekvence paměťových B lymfocytů a naopak (rozmezí frekvencí paměťových B lymfocytů: 19,2 – 90,3 %). Frekvence plazmatických buněk byly výrazně homogennější (0,49 – 3,51%) a nebyly přímo ani nepřímo úměrné frekvencím detekovaných naivních ani paměťových B lymfocytů. Rovněž snížení frekvence paměťových buněk v PK u pSS bylo provázáno zvýšením frekvence naivních buněk a zvýšením frekvence paměťových buněk SLE je důsledek snížení počtu naivních buněk (ODENDAHL et al., 2000; HANSEN et al., 2002). Zvýšená frekvence CD27⁻ B lymfocytů byla pozorována také u HIV pozitivních pacientů, zejména u neléčených, (CHONG et al., 2004) a u systémové sklerodermie (SATO et al., 2004). Systémová sklerodermie (SSc) je B lymfocytární onemocnění, na jehož vzniku se podílejí zejména aktivované paměťové B lymfocyty. Frekvence paměťových B lymfocytů, stejně jako plazmablastů, je však u SSc v důsledku zvýšené náchylnosti k apoptóze snižena. Nadměrná produkce naivních B lymfocytů může být vysvětlena jako snaha kompenzovat snížený počet CD27⁺ a CD27^{high} buněk (SATO et al., 2004). Stejně tak CD27⁻ B lymfocyty u neléčených HIV-1 pozitivních pacientů jsou sice v důsledku infekce náchylnější k apoptóze, ale zároveň se musí rychleji obnovovat (CHONG et al., 2004). Podobný důvod by mohla mít také zvýšená frekvence naivních B lymfocytů u pacientů s RA. V důsledku neustálé migrace B lymfocytů do zaníceného kloubu a následné diferenciaci v plazmatické buňky, pravděpodobně musí imunitní systém nepřetržitě vytvářet nové B lymfocyty.

Teoreticky je možné, že část populace naivních buněk, o kterou je frekvence u pacientů s RA navýšena, jsou paměťové B lymfocyty fenotypu CD19⁺CD27⁻. Takovéto buňky

byly detekovány Hansenem jak u pacientů s pSS (10,3%; 17,1%) (HANSEN et al., 2002; 2004), tak v menší míře u zdravých jedinců (4,5%) (HANSEN et al., 2004). Je však možné, že tyto buňky představují populaci právě diferencující z naivních buněk v paměťové B lymfocyty, neboť jejich $V_HD_HJ_H$ oblasti byly výrazně mutovány.

Naše výsledky jsou v protikladu se studií Bohnhorstové (BOHNHORST et al., 2001), kde byly nalezeny naopak vyšší frekvence $CD19^+CD27^+$ B lymfocytů v periferní krvi oproti zdravým kontrolám (průměrně 40,8% $CD27^+$ buněk v rámci $CD19^+$ B lymfocytů u pacientů s RA a 31,3 % u zdravých kontrol). V této studii však nebyli odlišovány paměťové $CD27^+$ B lymfocyty a $CD27^{high}$ plazmatické buňky.

Rozmezí frekvencí jak naivních (50,4 - 89,3 %), tak paměťových B lymfocytů (10,1 – 45,1 %) bylo u pacientů s RA výrazně menší než u zdravých kontrol a nejvyšší hodnota naměřená u paměťových B lymfocytů nedosahovala nejnižší hodnoty naměřené u naivních B lymfocytů. Velké rozpětí frekvencí paměťových a naivních B lymfocytů u kontrol a naopak malé u pacientů s RA ukazuje, že nízké frekvence paměťových B lymfocytů a vysoké frekvence naivních B lymfocytů v krvi pacientů s RA nejsou sice pro onemocnění specifické, ale jsou pro něj charakteristické.

8.7.3. Signifikantně zvýšené frekvence plazmablastů fenotypu $CD19^+CD27^{high}$ u pacientů s RA

Našli jsme statisticky významné zvýšení frekvencí $CD19^+CD27^{high}$ plazmablastů u pacientů s RA oproti zdravým kontrolám ($p = 0,0312$). Toto zvýšení by mohlo být způsobené značně zvýšenou tvorbou plazmatických buněk v zaníceném kloubu v důsledku přítomnosti nadměrného množství antigenu. Je pravděpodobné, že část těchto B lymfocytů je specifická pro proteiny obsahující citrulin a další antigeny typické pro RA a že stejně jako u B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin, se plazmatické buňky vyskytují ve větším počtu v synoviální tkáni oproti periferní krvi. V důsledku malého množství synoviální tkáně, jsme však imunofenotypizaci B lymfocytů prováděli pouze u buněk přítomných v periferní krvi a u vzorků synoviálních tekutin získaných od tří pacientů. V synoviální tekutině však bylo nalezeno velmi malé množství $CD19^+CD27^{high}$ B lymfocytů (max. 0,00856 % v rámci lymfocytů).

Zároveň bylo zjištěno statisticky významné zvýšení frekvencí plazmablastů $CD20^-CD27^+$ v rámci populace $CD19^+$ B lymfocytů u pacientů s RA oproti pacientům s juvenilní chronickou artritidou (JCA) ($p = 0,0068$). Pro JCA je ve srovnání s RA

výrazně méně charakteristická produkce autoprotilátek, většinou se jedná o RF negativní onemocnění, i když u části pacientů se autoprotilátky vyskytují. To je pravděpodobně také důvodem nižších frekvencí plazmatických buněk u JCA.

Nebylo však nalezeno zvýšení frekvence $CD20^+CD27^+$ plazmablastů v rámci B lymfocytů u pacientů s RA ve srovnání s kontrolami ani zvýšení frekvence $CD19^+CD27^{high}$ u pacientů s RA oproti pacientům s JCA. Je tedy možné, že detekované zvýšení frekvencí plazmatických buněk je pouze důsledek změn ve frekvencích paměťových a naivních buněk. Navíc nebylo zaznamenáno zvýšení frekvencí $CD19^+CD38^+$ a $CD19^+CD138^+$ buněk v rámci lymfocytů, ani $CD38^+CD138^+$ buněk v rámci B lymfocytů. Naproti tomu byla výrazně zvýšena frekvence plazmatických buněk fenotypu $CD19^+CD38^+CD138^+$ v synoviální tekutině proti periferní krvi. Je tedy velice pravděpodobné, že nezměněné frekvence plazmablastů v PK jsou důsledek stejnoměrné migrace plazmablastů do a z synoviální tkáně.

8.7.4. Snížení frekvence $CD38^-CD138^+$ buněk v populaci naivních B lymfocytů a $CD38^+CD138^-$ buněk v populaci plazmablastů u pacientů s RA

Frekvence naivních B lymfocytů fenotypu $CD19^+CD20^+CD27^-$ byla u pacientů s RA ve srovnání se zdravými kontrolami signifikantně zvýšena. Na základě exprese molekul CD38 a CD138 byly naivní B lymfocyty rozděleny na 4 populace ($CD38^+CD138^-$, $CD38^+CD138^+$, $CD38^-CD138^+$ a $CD38^-CD138^-$). Jako dominantní byla v periferní krvi u pacientů s RA, JCA, AS a MCTD a zdravých kontrol zjištěna populace $CD38^+CD138^-$. CD38 je molekula charakteristická zejména pro plazmatické buňky a plazmablasty, ale také pro kmenové, prekurzorové a aktivované buňky. CD138 molekula je exprimována na podobných typech buněk jako CD38, nevyskytuje se však na aktivovaných buňkách (BILLARD et al., 2000; www.ncbi.nlm.nih.gov/prow).

Nalezli jsme statisticky významné snížení frekvence $CD38^-CD138^+$ buněk v rámci populace naivních B lymfocytů u pacientů s RA vzhledem ke zdravým kontrolám ($p = 0,042$). Mírné snížení bylo pozorováno rovněž u JCA a u AS a také u pacientky s MCTD jsme detekovali výrazně nižší frekvenci $CD38^-CD138^+$ buněk v rámci populace naivních B lymfocytů v porovnání se zdravými kontrolami.

Takovéto snížení je pravděpodobně důsledkem zvýšené diferenciaci naivních B lymfocytů v plazmatické buňky při revmatoidní artritidě v důsledku vyšší aktivity imunitního systému. Větší část populace naivních B buněk, než je obvyklé u populace

zdravých jedinců, už patrně diferencovala v plazmablasty a exprimuje proto CD38 antigen.

Zároveň byla zaznamenána významná redukce CD38⁺CD138⁻ buněk v rámci populace plazmablastů ($p = 0,042$). CD38⁺CD138⁻ je fenotyp typický pro aktivované B lymfocyty (BILLARD et al., 2000) a snížení frekvence by tak znamenalo snížení aktivity plazmablastů u RA nebo migraci aktivovaných B lymfocytů do ST. Podobné snížení bylo zaznamenáno také u pacientů s JCA, AS a u pacientky s MCTD. Je však možné, že se jedná pouze o falešné snížení, způsobené malým počtem buněk v populaci plazmatických buněk fenotypu CD19⁺CD20⁻CD27⁺ u některých pacientů a kontrol (např. v periferní krvi pacienta č. 38 pouze 2 buňky, v synoviální tekutině pacienta č. 27 0 buněk). Populace CD38⁺CD138⁻ však měla v rámci plazmatických buněk i přes detekované snížení frekvence u všech skupin majoritní zastoupení.

8.7.5. Zvýšení frekvence CD38⁺CD138⁻ buněk u naivních B lymfocytů ve srovnání a s paměťovými a korelace frekvencí CD38⁺CD138⁺ mezi naivními a paměťovými buňkami u RA

Zjistili jsme statisticky významný rozdíl ve frekvenci CD38⁺CD138⁻ buněk v rámci populace naivních B buněk ve srovnání s frekvencí stejných buněk v rámci populace plazmablastů ($p = 0,0115$). Toto zjištění bylo ve shodě s nalezeným snížením frekvencí CD38⁻CD138⁺ v rámci naivních buněk u pacientů s RA ve srovnání se zdravými kontrolami, pravděpodobně se jedná o vzájemně související skutečnosti. Podobný rozdíl byl nalezen také u všech ostatních sledovaných skupin, u pacientů s JCA a u zdravých kontrol však nebylo statisticky významné. Jedná se tedy pravděpodobně o obecný jev, který není charakteristický pro revmatoidní artritidu.

Zároveň jsme zjistili korelaci mezi frekvencemi CD38⁺CD138⁺ buněk v rámci populace naivních a paměťových buněk u pacientů s RA ($p = 0,0007$). Podobná korelace nebyla nalezena u žádné jiné sledované skupiny. Pravděpodobně se jedná o důsledek nadměrné diferenciaci B lymfocytů v plazmatické buňky, charakterizovaný expresí CD38 antigenu.

8.7.6. Srovnání zastoupení jednotlivých buněčných populací v periferní krvi a synoviální tekutině

Imunofenotypickou analýzu buněk přítomných v synoviální tekutině jsme prováděli pouze u 3 pacientů, v některých případech však byly rozdíly v zastoupení buněčných populací mezi PK a SF natolik markantní, že je nelze považovat za náhodné. Všeobecně se frekvence exprese antigenů u jednotlivých pacientů velmi lišily.

Zjistili jsme velmi výrazné zvýšení frekvence $CD38^+CD138^+$ v rámci populace $CD19^+$ B lymfocytů v synoviální tekutině ve srovnání s periferní krví. Zatímco v periferní krvi frekvence B lymfocytů exprimujících tyto antigeny v žádném z případů nedosáhla 9%, v synoviální tekutině je exprimovala naprostá většina B lymfocytů. V rámci lymfocytárního gatů bylo zaznamenáno zvýšení frekvence $CD19^+CD138^+$ buněk, toto zvýšení však nebylo tak výrazné, jako v rámci B lymfocytů. Zjištěné zvýšení frekvence pravděpodobně odráží diferenciaci B lymfocytů přímo v zaníceném kloubu a odráží se proto zejména v populaci B lymfocytů. V synoviální tekutině zdravých osob se vyskytuje pouze velmi malé množství lymfocytů (PAVELKA et al., 2003).

Zatímco v periferní krvi byla u naivních B lymfocytů, paměťových B lymfocytů i plazmablastů dominantní populace $CD38^+CD138^-$, v synoviální tekutině to byla ve všech případech $CD38^+CD138^+$ populace. Toto zjištění je v souladu s předchozím a pravděpodobně také odráží diferenciaci B lymfocytů v plazmatické buňky přímo v zaníceném kloubu.

8.8. Sledování exprese V_H genů u $CD19^+$ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin izolovaných ze synoviální tkáně

Anti-CCP autoprotilátky jsou protilátky charakteristické pro RA a patří k hlavním mediátorům destrukce kloubu. B lymfocyty specifické pro proteiny obsahující citrulin se sice mohou u zdravých osob vyskytovat, vždy však ve velmi nízkých frekvencích. Jedná se tedy o populaci charakteristickou pro pacienty s revmatoidní artritidou. Z těchto důvodů jsme sledovali expresi V_H genů právě u $CD19^+$ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin pomocí RT-PCR na úrovni jedné buňky.

Jednotlivé izolované B buňky byly průtokovým cytometrem tříděny do jamek destičky obsahujících lyzační RT-PCR pufr a ihned poté byla započata single-cell RT-PCR. Do naší analýzy jsou tak zahrnuty pouze živé buňky s již dokončeným procesem přeskupování genů, u kterých jsme schopni analyzovat izotypově specifické mRNA.

Buňky jsme izolovali ze synoviální tkáně a periferní krve pacienta č. 47 a synoviální tkáně pacienta č. 8B. Mezi oběma pacienty jsme našli značné rozdíly v exprimovaných genech. Zatímco u pacienta č. 47 byla zjištěna exprese V_{H4} a V_{H5} rodin imunoglobulinových genů, u pacienta 8B se jednalo zejména o geny málo hojné V_{H7} rodiny, pouze u jedné buňky byla exprimován gen V_{H4} rodiny. U zdravého člověka převažují V_{H3} a V_{H4} imunoglobulinové geny, u RA byly doposud detekovány především V_{H1} , V_{H3} a V_{H4} genové rodiny (KIM et al., 1999; VAN ESCH et al., 2003; RAATS et al., 2003), většinou však byla prováděna analýza B lymfocytů bez ohledu na jejich antigenní specifitu (SCHRÖDER et al., 1996; KIM et al., 1999). Pokud byla použita metoda „antibody phage display“ založená na detekci aCCP protilátek byla V_{H7} rodina detekována také (RAATS et al., 2003). Je tedy teoreticky možné, že V_{H7} rodina se charakteristicky vyskytuje u B lymfocytů produkujících aCCP. Navíc je velmi pravděpodobné, že část genů detekovaných jako V_{H1} rodina, patřila do V_{H7} rodiny, která byla objevena poměrně nedávno a jejíž geny lze detekovat pomocí primerů pro V_{H1} rodinu. Rovněž my jsme V_{H7} gen amplifikovali pomocí primerů pro V_{H1} .

U značné části izolovaných buněk, nebyla po amplifikaci nalezena žádná imunoglobulinová přestavba. Pravděpodobně se jedná o důsledek přítomnosti rozsáhlých mutací, které zabránily nasednutí námi používaných primerů specifických pro nemutované V_H segmenty (podobně SCHRÖDER et al., 1996; HANSEN et al., 2002; 2004), popřípadě nebyla mRNA dostatečně deproteinována nebo byly izolovány mrtvé buňky. Naši detekci unikají také případné přestavby Ig mRNA jiného izotypu než IgM a IgG.

8.8.1. Pacient č. 47

Z osmi analyzovaných přestaveb V_H genů byl u tří nalezen V_{H4-39} gen (2 buňky z ST – přestavby 47.1 a 47.2; 1 buňka z PK – přestavba 47.3) a u pěti byl zjištěn V_{H5-51} gen (3 z ST – přestavby 47.4-47.6, 2 z PK – 47.7, 47.8). Přestavby 47.3 a 47.7 byly izotypu IgM, ostatní přestavby byly izotypu IgG. Průměrně bylo nalezeno 19,75 mutací/ V_H oblast, podobně Schröderová našla v buňkách revmatoidní synovie průměrně 18 mutací/ V_H segment (SCHRÖDER et al., 1996).

U přestaveb 47.1, 47.2 a 47.3 byla nalezena naprosto shodná CDR3 oblast (délka 11 aminokyselin). U zdravého jedince je délka CDR3 oblastí rozložena po Gaussově křivce s vrcholem na délce 15 nukleotidů, změna gaussovského uspořádání jakýmkoliv

směrem svědčí pro klonální expanzi B lymfocytů (ITOH et al., 2000A). CDR3 oblast se skládá ze 3' konce V segmentu, celého D segmentu a 5' konce J segmentu a obsahuje tak 2 spoje, vzniklé při přestavbě Ig genů, které jsou charakteristické značnou variabilitou podpořenou náhodným vkládáním nukleotidů enzymem terminální transferázou. Značně mutován bývá také D segment, a to často v takové míře, že nelze určit, ze kterého germinálního genu vznikl. To, že se CDR3 oblasti těchto tří sekvencí neliší ani v jediném nukleotidu, je naprosto jasným důkazem, že mají společný klonální původ. Bylo dokázáno, že díky patologickému prostředí v revmatoidní synoviální tkáni, mohou B lymfocyty proliferovat bez hromadění nových somatických mutací (SCHRÖDER et al., 1996). Dalším důkazem pro klonální původ těchto buněk je výrazně vyšší poměr zm/tm v CDR oblastech ve srovnání s FR oblastmi. Je zajímavé, že jedna z buněk (47.3) byla izolována v periferní krvi. V periferní krvi se B lymfocyty prakticky nemohou setkat s citrulinem, který v našem případě působí jako antigen a je proto velmi pravděpodobné, že se jedná o buňku, která vymigrovala ze synoviální tkáně. Tato buňka měla jako jediná přestavbu izotypu IgM, tedy přestavbu charakteristickou pro naivní B lymfocyty, které se ještě nesetkaly s antigenem.

Ze zbylých pěti buněk, exprimujících gen V_{H5-51} , byly klonálně příbuzné patrně jen 47.4 a 47.5, které se lišily 7 záměnovými mutacemi (z toho 3 měly za následek vznik stopkodonů v sekvenci 47.4), 2 tichými mutacemi a delecí jednoho tripletu v sekvenci 47.5. Exprimovaly D gen $D6-6$ a J gen J_{H6b} , jejich CDR3 oblast měla stejnou délku a lišila se pouze jednou záměnovou mutací v posledním tripletu. Byl nalezen výrazně vyšší poměr zm/tm v CDR oblastech ve srovnání s FR oblastmi, což svědčí pro antigenem řízenou selekci, jejímž důsledkem je klonální expanze (SHIOKAWA et al., 2003). Ostatní sekvence nevykazovaly známky klonálního původu (odlišné J_H geny, rozdílné délky CDR3 oblasti) a poměry zm/tm v FR a CDR oblastech se výrazněji nelišily. Sekvence 47.7 však exprimovala poměrně vzácnou a u zdravých osob se příliš nevyskytující rodinu Ig genů J_{H3} . Je však možné, že klonální potomci, popř. předchůdci izolovaných buněk se vyskytovaly v jiné části ST, která nebyla pacientovi během operace odebrána, nebo že byly Ig geny obsahovaly takové množství mutací, které zabránilo nasednutí primerů.

Je zajímavé, že obě sekvence izotypu IgM byly vyizolovány z PK. Pravděpodobně se jedná buď o buňky, které vymigrovaly do PK ihned po izotypovém přesmyku ze synoviální tkáně a stále ještě obsahují IgM transkripty (HANSEN et al., 2004) nebo o

buňky, které po stimulaci antigenem v synoviální tkáni podstoupily proces hypermutace, ale ne izotypový přesmyk a ihned poté vymigrovaly do PK. Zde pravděpodobně důsledkem velmi malého množství citrulinovaných proteinů v PK nejsou aktivovány antigenem a nedochází proto k další diferenciaci. Tento fakt může také potvrzovat domněnku, že B lymfocyty specifické pro proteiny obsahující citrulin přítomné v periferní krvi jsou v neodpovídavém stavu a autoprotiilátky neprodukují (REPARON-SCHUIJT et al., 2001).

8.8.2. Pacient č. 8B

V DNA z každé buňky nesoucí $V_H7-04.1$ přestavbu byly nalezeny podobné mutace. Pro všechny členy V_H7 rodiny byla charakteristická mutovaná frekvence na konci CDR2 oblasti. Jednalo se o tři SNP, které měly za následek záměnu dvou aminokyselin. Tato sekvence se nevyskytuje v žádném z V_H7 genů a jedná se proto o důsledek somatické mutace. Fakt, že se stejná sekvence vyskytovala u všech izolovaných V_H7 B lymfocytů, svědčí pro existenci klonální expanze v zaníceném kloubu. Bohužel nebyla amplifikována CDR3, aby existenci klonální expanze potvrdila nebo vyvrátila. Jak v CDR, tak v FR oblastech docházelo především k záměnovým mutacím. V_H4 gen nebyl mutován, což naznačuje, že jde o buňku, která do ST přimigrovala teprve nedávno.

8.8.3. Mutační frekvence

Mutační frekvence u pacienta č. 8B ($V_H7-04.1$ přestavby) dosahovala průměrně 9,79% (8 - 21 mutací/ V_H segment; celková mutační frekvence 163 mutací/1672 nukleotidů 9,75%), u pacienta č. 47 9,09% (12 - 27 mutací/ V_H segment; celková mutační frekvence 158 mutací/1740 nukleotidů 9,08%). U B lymfocytů z GC v mandlích zdravých osob se vyskytuje výrazně méně mutací (1 - 12 mutací/ V_H segment; PASCUAL et al., 1994), což ukazuje na neobvyklou hypermutaci u B lymfocytů přítomných v revmatoidní synovii. Obdobně u pSS (8,6%) a SLE (6,1%), dosahují $CD19^+CD27^+$ B lymfocyty vyšších hodnot mutační frekvence (HANSEN et al., 2002; 2004).

Všechny námi izolované buňky s výjimkou jedné buňky izolované ze synoviální tkáně pacienta č. 8B, obsahovaly ve V_H genech somatické mutace. Jejich přítomnost je charakteristická pro paměťové B lymfocyty. Vzhledem k tomu, že naprostá většina B buněk může být zařazena mezi naivní resp. paměťové jak podle exprese CD27, tak podle přítomnosti somatických mutací v genech pro imunoglobuliny (HANSEN et al.,

2002; 2004), potvrzuje výše uvedené domněnku, že snížení frekvence paměťových B lymfocytů v periferní krvi je důsledek jejich migrace do zanícené synoviální tkáně.

9. SOUHRN

S použitím průtokové cytometrie jsme prokázali, že v periferní krvi, synoviální tkáni a synoviální tekutině, lze pomocí syntetických peptidů obsahujících citrulin detekovat B lymfocyty specifické pro proteiny obsahující citrulin. V synoviální tkáni jsme našli významně vyšší frekvence těchto B lymfocytů. B lymfocyty přítomné v synoviální tkáni exprimovaly pouze omezené množství Ig V_H genů, které byly značně mutovány. Jednotlivé buňky vykazovaly známky klonální příbuznosti. Tato dvě zjištění svědčí pro přítomnost autoantigenem (citrulinem) řízené selekce a aktivace B lymfocytů v zanícené synoviální tkáni. Zároveň tak byla podpořena domněnka, že v synoviální tkáni dochází k oligoklonální expanzi CD19⁺ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin.

Zjistili jsme, že periferní krev a synoviální tkáň obsahují B lymfocyty specifické pro více proteinů obsahujících citrulin, což odráží přítomnost více typů citrulinovaných proteinů, které působí jako autoantigen.

Našli jsme významně pozměněné frekvence B buněčných populací v periferní krvi pacientů s RA. Zaznamenali jsme statisticky významné snížení frekvencí CD19⁺CD27⁺ a CD19⁺CD20⁺CD27⁺ paměťových B lymfocytů a statisticky významné zvýšení frekvence naivních CD19⁺CD20⁺CD27⁻ B lymfocytů v periferní krvi pacientů s RA ve srovnání se zdravými dárči. Tato skutečnost patrně odráží migraci paměťových buněk do zaníceného kloubu, kde vstupují do pseudogerminální reakce a dochází k jejich diferenciaci v plazmatické buňky a zvýšenou tvorbu nových B lymfocytů.

Cílem práce bylo přispět k objasnění úlohy B lymfocytů v rozvoji revmatoidní artritidy, zaměřili jsme se zejména na B lymfocyty specifické pro proteiny obsahující citrulin. Na základě výše uváděných výsledků bylo prokázáno, že B lymfocyty hrají v rozvoji a udržení zánětu u revmatoidní artritidy velmi důležitou roli a že B lymfocyty specifické pro proteiny obsahující citrulin jsou jedním z hlavních mediátorů destrukce kloubu při RA. Patologický mechanismus diferenciaci B lymfocytů a genové přestavby však bude muset být dále zkoumán.

10. PUBLIKACE A PREZENTACE

Publikace:

Šárka Růžičková, Zdenek Cimburek, Tereza Moravcová, Zuzana Hůzlová, Irena Veselá, Olga Kryštůfková, Jiří Vencovský.

Role B lymfocytů v patogenezi revmatoidní artritidy II.

Detekce CD19⁺ B lymfocytů specifických pro peptidy obsahující citrulin v periferní krvi a synoviální tkáni pacientů s revmatoidní artritidou.

Rheumatológia 19, 2005, č. 2, s.81-86

Prezentace:

1) Šárka Růžičková, Walter Jan Van Venrooij, Jan Walter Drijfhout, Tereza Moravcová, Zuzana Hůzlová, Irena Veselá, Olga Kryštůfková, Jiří Vencovský.

Citrullinated peptide-specific CD19⁺ B cells are present in synovial tissue and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis.

Annual European Congress of Rheumatology, EULAR, 8.6-11.6.2005, Vienna, Austria

In: Annals Rheum Dis 2005; 64(Suppl. 111), p. 104, ISSN: 0003-4967

2) Šárka Růžičková, Zdenek Cimburek, Tereza Moravcová, Zuzana Hůzlová, Irena Veselá, Jaroslava Niederlová, Olga Kryštůfková, Jiří Vencovský.

Citrullinated peptide-specific CD19⁺ B cells are present in synovial tissue and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis.

25th European Workshop on Rheumatology Research, 24.2. – 27.2. 2005, Glasgow, Scotland, UK

In: Arthritis Research and Therapy, 2005; 7 (Suppl. 1), p. S53 (P149)

3) Šárka Růžičková, Zdenek Cimburek, Tereza Moravcová, Zuzana Hůzlová, Irena Veselá, Jaroslava Niederlová, Olga Kryštůfková, Jiří Vencovský.

Citrullinated peptide-specific CD19⁺ B cells are present in synovial tissue and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis.

Rheumatology Meeting in Austria, 20.1.-24.1.2005, Reichenau (Vienna), Rakousko

3) Šárka Růžičková, Zdenek Cimburek, Walter Jan Van Venrooij, Jan Walter Drijfhout, Tereza Moravcová, Zuzana Hůzlová, Irena Veselá, Petra Parkmanová, Olga Kryštůfková, Jiří Vencovský.

Detekce minoritních populací pomocí více-barevné průtokové cytometrie - CD19⁺ B buňky specifické pro autoantigen v synoviální tkáni a periferní krvi pacientů s revmatoidní artritidou.

Analytická cytometrie III, 21.6-25.6.2005, Hrubý Jeseník, Česká Republika

11. CITACE

1. Albani S, Keystone EC, Nelson JL, Olliver WER, La Clava A, Montemayor AC, Weber DA, Montecucco C, Martini A, Carson DA (1995). Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1: 448-452
2. Aletaha D, Breedveld FC, Smolen JS (2005). The Need for New Classification Criteria for Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 52(11): 3333-3336
3. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA jr., Mirchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG (1988). *Arthritis Rheum* 31: 315 - 325
4. Asaga H, Yamada M, Senshu T (1998). Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 641-646
5. Asaga H, Nakashima K, Senshu T, Ishigami A, Yamada M (2001). Immunocytochemical localization of peptidylarginine deiminase in human eosinophils and neutrophils. *J Leukoc Biol* 70: 46-51
6. Babušíková O, Železníková T, Mlčáková A, Kusenda J, Številová L (2005). The knowledge on the 3rd type hematogones could contribute to more precise detection of small numbers of precursor B-acute lymphoblastic leukemia. *Neoplasma* 52(6): 502-509
7. Bas S, Perneger TV, Seitz M, Tiercy JM, Roux-Lombard P, Guerne PA (2002). Diagnostic tests for rheumatoid arthritis: the role of anti-CCP antibodies. *Am Clin Lab* 21:34-36
8. Baeten D, Peene I, Union A, Meheus L, Sebbag M, Serre G, Veys EM, de Keyser F (2001). Specific presence of intracellular citrullinated proteins in rheumatoid arthritis synovium: Relevance to antifilaggrin autoantibodies. *Arthritis Rheum* 44: 2255-2262
9. Berglin E, Padyukov L, Sundin U, Hallmans G, Stenlund H, van Venrooij WJ, Klareskog L, Rantapää-Dahlqvist S (2004). A combination of autoantibodies to cyclic citrullinated peptide (CCP) and HLA-DRB1 locus antigens is strongly associated with future onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 6: 303-308.

10. Billard Ch, Delaire S, Raffoux E, Bensussan A, Boumsell (2000). Switch in the protein tyrosine phosphatase associated with human CD100 semaphorin at terminal B-cell differentiation stage. *Blood* 95: 965-972
11. Bizzaro N, Mazzabti G, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R (2001). Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 47: 1089-1093
12. Bläss S, Union A, Raymackers J, Schumann F, Ungethum U, Muller-Steinbach S, De Keyser F, Engel JM, Burmester GR (2001). The stress protein BiP is overexpresses and is a major B and T cell target in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44: 761-771
13. van Boekel MAM, Vossenaar ER, van den Hoogen FHJ, van Venrooij WJ (2002). Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res* 4: 87-93
14. Bohnhorst J, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM (2001). Significantly Depressed Percentage of CD27⁺ (Memory) B Cells among Peripheral Blood B Cells in Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *Scand J Immunol* 54: 421-427
15. Bonagura VR, Artandi SR, Davidson A, Randen I, Agostino N, Thompson K, Natvig JB, Morrison SL (1993). Mapping studies reveal unique epitopes on IgG recognized by rheumatoid arthritis-derived monoclonal rheumatoid factors. *J Immunol* 151: 3840-3852
16. Ciudad J, Orfao A, Vidriales B, Macedo A, Martinez A, Gonzalez M, Lopes-Berges MC, Valverde B, San Miguel JF (1998). Immunophenotypic analysis of CD19⁺ precursors in normal human adult bone marrow: implications for minimal residual disease detection. *Haematologica* 83: 1069-75
17. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV (2000). Inhibitory Fc receptors modulates in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6: 443-446
18. Cornélis F, Fauré S, Martinez M, Prud'homme JF, Fritz P, Dib C, Alves H, Barrera P, de Vries N, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Maenaut K, Westhovens R, Migliorini P, Tran TH, Delaye A, Prince N, Lefevre C, Thomas G, Poirier M, Soubigou S, Alibert O, Lasbleitz S, Fouix S, Bouchier Ch, Lioté F, Loste MN, Lepage V, Charron D, Gyapay G, Lopes-Vaz A, Kuntz D, Bardin T Weissenbach J (1998). New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10746-50

19. Cutolo M, Sulli A, Barone A, Seriola B, Accardo S (1993). Macrophages, synovial tissue and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 11: 331-339
20. Després N, Boire G, Lopez-Longo FJ, Menard HA (1994). The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 21: 1027-1033
21. Dörner T, Burmester GR (2003). The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanism and therapeutic targets. *Curr Opin Rheumatol* 15: 246-252
22. Duddy ME, Alter A, Bar-Or A (2004). Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J Immunol* 172: 3442-3347
23. Eckschlager T, Bartůňková J, Vybíralová H (1999). Průtoková cytometrie v klinické praxi. Grada Publishing, Praha, 7-19; 87-88
24. Edwards JCW, Szczepański L, Szechiński J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T (2004). Efficacy of B-Cell-Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 350: 2572-2581
25. Ejtehadi HD, Freimanis GL, Ali HA, Bowman S, Alavi A, Axford J, Perera SA, Callaghan R, Nelson PN (2006). The potential role of human endogenous retrovirus K10 in pathogenesis of rheumatoid arthritis: a preliminary study. *Ann Rheum Dis.* 65: 612-616
26. El-Gabalawy HS, Wilkins JA (2004). Anti-Sa antibodies: prognostic and pathogenetic significance to rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 6: 86-89
27. Emery P (2004). Targeting B Cells: The Clinical Experience, EULAR 2004 Satellite Symposium, Berlin, Germany
28. van Esch WJE, Reparón-Schuijt CC, Hamstra HJ, van Kooten C, Logtenberg T, Breedveld FC, Verweij CL (2003). Human IgG Fc-binding phage antibodies constructed from synovial fluid CD38⁺ B cells of patients with rheumatoid arthritis show imprints of an antigen-dependent process of somatic hypermutation and clonal selection. *Clin Exp Immunol* 131: 364-376
29. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN (1996). Rheumatoid arthritis. *Cell* 85: 307-310
30. Firestein GS, Zvaifler NJ (1990). How important are the T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum* 33: 768-773
31. Fontenot AP, Gharavi L, Bennett SR, Cnavera SJ, Newman LS, Kotzin BL (2003). CD28 costimulation independence of target organ versus circulating memory antigen-specific CD4⁺ T cells. *J Clin Invest* 112(5): 776-784

32. Foster SJ, Brezinschek HP, Brezinschek RI, and Lipsky PE (1997). Molecular mechanisms and selective influences that shape the κ gene repertoire of IgM⁺ B cells. *J Clin Invest* 99: 1614-1627
33. Gabriel SE (2001). The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 27: 269-281
34. Gan SQ, McBride OW, Idler WW, Markova N, Steinert PM (1991). Organization, structure, and polymorphism of the human profilaggrin gene. *Biochemistry* 29: 9432-9440
35. Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, Simon M, Senshu T, Masson Bessiere C, Jolivet-Reynaud C, Jolivet M, Serre G (1999). The epitopes targeted by rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 162: 585-594
36. Glass DN, Giannini EH (1999). Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait. *Arthritis Rheum* 2261-2268
37. Goldbach-Mansky R, Lee J, McCoy A, Hoxworth J, Yarboro C, Smolen JS, Steiner G, Rosen A, Zhang C, Menard HA, Zhou ZJ, Palosuo T, van Venrooij WJ, Wilder RL, Klippel JH, Schumacher HRJ, El-Gabalawy HS (2000). Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Rheum* 2: 236-243
38. Gorman C, Leandro M, Isenberg D (2003). B cell depletion in autoimmune disease. *Arthritis Res Ther* 5(Suppl 4): S17-S21
39. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum* 30: 1205-1213
40. Guerrin M, Ishigami A, Mechin MC, Nachat R, Valmary S, Sebbag M, Simon M, Senshu T, Serre G (2003). cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I. *Biochem J* 370:167-174
41. Hagiwara T, Nakashima T, Hirano H, Senshu T, Yamada M (2002). Deimination of arginine residues in nucleophosmin/B23 and histones in HL-60 granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 979-983
42. Hainsworth JD (2003). Safety of rituximab in the treatment of B cell malignancies: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 5(Suppl 4): S12-S16

43. Hansen A, Gosemann M, Pruss A, Reiter K, Růžičková Š, Lipsky PE, Dörner T (2004). Abnormalities in Peripheral B Cell Memory of Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum* 50: AQ1-AQ13
44. Hansen A, Odendahl M, Reiter K, Jacobi AM, Feist E, Scholze J, Burmester GR, Lipsky PE, Dörner T (2002). Diminished Peripheral Blood Memory B Cells and Accumulation of Memory B Cells in the Salivary Glands of Patients With Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum.* 46: 2160-2171
45. Haringman JJ, Ludikhuize J, Tak PP (2004). Chemokines in joint disease: the key to inflammation? *Ann Rheum Dis* 63: 1186-1194
46. Hassfeld W, Steiner G, Hartmuth K, Kolarz G, Scherak O, Graninger W, Thumb N, Smolen JS (1989). Demonstration of a new antinuclear antibody (anti-RA33) that is highly specific for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 32: 1515-1520
47. Henneken M, Dörner T, Burmester GR, Berek C (2005). Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Atrhritis Res Ther* 7(5): R1001-R1013
48. Hill JA Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E (2003). Cutting Edge: The conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol* 171: 538-541
49. Hitchon CA, El-Gabalawy HS (2004). Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 6: 265-278
50. Hoet RM, Boerbooms AM, Arends M, Ruiters DJ, van Venrooij WJ (1991). Antiperinuclear factor, a marker autoantibody for rheumatoid arthritis: colocalisation of the perinuclear factor and profilaggrin. *Ann Rheum Dis* 50: 611-618
51. Hořejší V, Bartůňková J (2005). *Základy imunologie*, 3. vydání, Triton, Praha
52. Hrnčář Z (1986). Citováno podle Vencovský J (1996). *Revmatoidní artritida – imunopatogeneze onemocnění, role revmatoidních faktorů a nové možnosti léčby*. Praha
53. Chong Y, Ikematsu H, Yamamoto M, Murata M, Yamaji K, Nishimura M, Nabeshima S, Kashiwagi S, Hayashi J (2004). Increased Frequency of CD27 (Naive) B Cells and Their Phenotypic Alteration in HIV Type 1-Infected Patients. *AIDS Research and Human Retroviruses* 20: 621-629

54. Choy EH, Panayi GS (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 344: 907-916
55. Ikari K, Momohara S, Nakamura T, Hara M, Yamanaka H, Tomatsu T, Kamatani N (2006). Supportive evidence for a genetic association of the FCRL3 promoter polymorphism with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 65: 671-673
56. Ishigami A, Ohsawa T, Asaga H, Akiyama K, Kuramoto M, Maruyama N (2002). Human peptidylarginine deiminase type II: molecular cloning, gene organization, and expression in human skin. *Arch Biochem Biophys* 407: 25-31
57. Itoh K, Meffre E, Albesiano E, Farber A, Dines D, Dtein P, Asnis SE, Furie RA, Jain RI, Chiorazzi N (2000A). Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Gene Replacement As a Mechanism for Receptor Revision in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue B Lymphocytes. *J Exp Med* 192:1151-1164
58. Itoh K, Patki V, Furie RA, Chartash EK, Jain RI, Lane L, Asnis SE, Chiorazzi N (2000B). Clonal expansion is a characteristic feature of the B-cell repertoire of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2:50-58
59. Kambham N, Kong C, Longacre TA, Natkunam Y (2005). Utility of syndecan-1 (CD138) expression in the diagnosis of undifferentiated malignant neoplasm: a tissue microarray study of 1,754 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13: 304-310
60. Kanno T, Kawada A, Yamanouchi J, Yosida-Noro C, Yoshiki A, Shiraiwa M, Kusakabe M, Manabe M, Tezuka T, Takahara H (2000). Human peptidylarginin deiminase type III: molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA, properties of recombinant enzyme, and immunohistochemical localization in human skin. *J Invest Dermatol* 115: 813-823
61. Kemp M, Holmskov-Nielsen U, Teisner B, Husby S, Svehag SE (1986). Relationship between levels of rheumatoid factor isotypes and complement component C3 conversion in blood from patients with rheumatoid arthritis. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect C*: 171-174
62. Kim HJ, Krenn V, Steinhauser G, Berek C (1999). Plasma Cell Development in Synovial Germinal Centers in Patients with Rheumatoid and Reactive Arthritis. *J Immunol* 162: 3053-62
63. Klareskog L, Lorentzen J, Padyukov L, Alfredsson L (2002). Genes and environment in arthritis: can RA be prevented? *Arthritis Res* 4(Suppl 3): S31-S36

64. Klein U, Rajewsky K, Küppers R (1998). Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188: 1679-1689
65. Kolesár Libor (2004). Molekulárně-genetické metody pro vyšetřování HLA polymorfismu. Diplomová práce
66. König A, Krenn V, Toksoy A, Gerhard N (2000). Mig, GRO α and RANTES messenger RNA expression in lining layer, infiltrates and different leucocyte populations of synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Springer Verlag* 436: 449-458
67. Kotzin BL (2005). The Role of B Cells in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* 32 Suppl73:14-18
68. KrennV, Souto-Carneiro MM, Kim HJ, Berek C, Starostik P, König A, Harms H, Müller-Hermelink HK (2000). Histopathology and molecular pathology of synovial B-lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol* 15(3): 791-8
69. Küppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J* 12: 4955-4967
70. Kurki P, Aho K, Palosuo T, Heliövaara M (1992). Immunopathology of rheumatoid arthritis. Antikeratin antibodies the clinical disease. *Arthritis Rheum* 35: 914-917
71. Lard LR, van Gaalen FA, Schronkeren JJM, Pieterman EJ, Stoeken G, Vos K, Nelissen RGHH, Westendorp RGJ, Hoeben RC, Breedveld FC, Toes REM, Huizinga TWJ (2003). Association of the -2849 Interleukin-10 Promoter Polymorphism With Autoantibody Production and Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 47: 1841-1848
72. Lee DM, Schur PH (2003). Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic disease. *Ann Rheum Dis* 62: 870-874
73. van Leeuwen MA, van Rijswijk MH, van der Heijde DM, Te Meerman GJ, van Riel PL, Houtman PM, van De Putte LB, Limburg PC (1993). The acute-phase response in relation to radiographic progression in early rheumatoid arthritis: a prospective study during the first three years of the disease. *Br J Rheumatol* 32: 9-13

74. Lorenz W, Sigrist G, Shakibaei M, Mobasher A, Trautmann C (2006). A hypothesis for the origin and pathogenesis of rheumatoid diseases. *Rheumatol Int.* 26: 641-654
75. Mack JW, Steven AC, Steinert PM (1993). The mechanism of interaction of filaggrin with intermediate filaments. The ionic zipper hypothesis. *J Mol Biol* 232: 50-66
76. Magalhães R, Stiehl P, Morawietz L, Berek C, Krenn V (2002). Morphological and molecular pathology of the B cell response in synovitis of rheumatoid arthritis. *Virchows Arch* 441: 415-427
77. Mageed RA, Vencovský J, Maini RN (1994). Rheumatoid factors and germline genes in rheumatoid arthritis evidence of an intrinsic B lymphocyte defect? *Br J Rheumatol* 33: 105-108
78. Machold KP, Stamm TA, Eberl GJ, Nell VK, Dunky A, Uffmann M, Smolen JS (2002). Very recent onset arthritis-clinical, laboratory, and radiological findings during the first year of disease. *J Rheumatol* 29(11): 2258-60
79. Manabe M, Sanchez M, Sun TT, Dale BA (1991). Interaction of filaggrin with keratin filaments during advanced stages of normal human epidermal differentiation and in ichthyosis vulgaris. *Differentiation* 48: 43-50
80. Mannik M (1985). Citováno podle Vencovský J (1996). *Revmatoidní artritida – imunopatogeneze onemocnění, role revmatoidních faktorů a nové možnosti léčby.* Praha
81. Marinov I (2003). *Průtoková cytometrie v klinické hematologii.* Triton, Praha, 11-23.
82. Masson-Bessière C, Sebbag M, Durieux JJ, Noguiera L, Vincent C, Girbal-Neuhauser E, Durroux R, Cantagrel A, Serre G (2000). In the rheumatoid pannus, anti-filaggrin autoantibodies are produced by local plasma cells and constitute a higher proportion of IgG than in synovial fluid and serum. *Clin Exp Immunol* 119: 544-552
83. Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Noguiera L, Vincent C, Senshu T, Serre G (2001). The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the α - and β -chains of fibrin. *J Immunol* 166: 4177-4184
84. McCarthy DJ, Cheung HS (1982). Origin and significance of rise bodies in synovial fluid. *Lancet* 2: 715-716

85. McKinley-Grant LJ, Idler WW, Bernstein IA, Parry DA, Cannizzaro L, Croce CM, Huebner K, Lessin SR, Steinert PM (1989). Characterisation of a cDNA clone encoding human filaggrin and localisation of the gene of chromosome region Ig21. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4848-4852
86. Ménard HA, Lapointe E, Rochdi MD, Zhou ZJ (2000). Insights into rheumatoid arthritis derived from Sa immune system. *Arthritis Res* 2: 429-432
87. Meretey K, Falus A, Erhardt CC, Maini RN (1982). IgE and IgE-rheumatoid factors in circulating immune complexes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 41: 405-408
88. Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, Tindall EA, Fleischmann RM, Weayer AL, Ettlinger RE, Cohen S, Koopman WJ, Mohler K, Widmer MB, Blosch CM (1997). Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75) – Fc fusion protein. *N Engl J Med* 337: 141-143
89. Moser K, Muehlinghaus G, Manz R, Mei H, Voigt C, Yoshida T, Dörner T, Hiepe F, Radbruch A (2006). Long-lived plasma cells in immunity and immunopathology. *Immunol Lett* 103(2): 83-85
90. Nagata S, Senshu T. Peptidylarginine deiminase in rat and mouse hamatopeiotic cells (1990). *Experientia* 46:72-74
91. Nakashima K, Hagiwara T, Yamada M (2002). Nuclear localisation of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *J Biol Chem* 277: 49562-49568
92. Newman J, Rice JS, Wang Ch, Harris SL, Diamond B (2003). Identification of an antigen-specific B cell population. *J Immunol Methods* 272: 177-187
93. Nienhuis RLF, Mandema EA (1964). A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis. The antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis* 23:302-305
94. Nyhall-Wahlin BM, Jacobsson LT, Petersson IF, Turesson C (2006). Smoking is a strong risk factor for rheumatoid nodules in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 65: 601-606
95. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, Lipsky PE, Radbruch A, Dörner T (2000). Disturbed Peripheral B Lymphocyte Homeostasis in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 165: 5970-5979
96. Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, Berek C, Hiepe F, Manz R, Radbruch A, Dörner T (2005). Generation of migratory antigen-

specific plasma blasts and mobilisation of resident plasma cells in a secondary response. *Blood* 105: 1614-1621

97. Oligino TJ, Dalrymple SA (2003). Targeting B cells for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 5(Suppl 4):S7-S11
98. Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C (1994). Cytokiny. In: Stites DP, Terr AI. *Základní a klinická imunologie*. Victoria Publishing, Praha, 77-96
99. Panayi GS (2005). B cells: a fundamental role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Rheumatology* 44(Suppl. 2): ii3-ii7
100. Panayi GS, Hainsworth JD, Looney RJ, Keystone EC (2005). Panel discussion on B cells and rituximab: mechanistic aspects, efficacy and safety in rheumatoid arthritis and non-Hodgkin's lymphoma. *Rheumatology* 44(Suppl. 2): ii18-ii20
101. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD (1994). Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med*. 180: 329-
102. Patil NS, Pashine A, Belmares MP, Liu W, Kaneshiro B, Rabinowitz J, McConnell H, Mellins ED (2001). Rheumatoid arthritis (RA)-associated HLA-DR alleles form less stable complexes with class II-associated invariant chain peptide than non-RA-associated HLA-DR alleles. *J Immunol* 167: 7157-7168
103. Pavelka K, Rovenský J.(Eds.) (2003): *Klinická revmatologie*, Galén, Praha, 181-214
104. Pearton DJ, Dale BA, Presland RB (2002). Functional analysis of the profilaggrin N-terminal peptide: identification of domains that regulate nuclear and cytoplasmic distribution. *J Invest Dermatol* 119: 661-669
105. Pinheiro GC, Scheinberg MA, Aparecida-Da Silva M, Maciel S (2003). Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in advanced rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 139: 234-235
106. Raats JMH, Winjen EM, Pruijn GJM, van den Hoogen FHJ, van Venrooij WJ (2003). Recombinant Human Monoclonal Autoantibodies Specific for Citrulline-Containing Peptides from Phage Display Libraries Derived from Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* 30: 1696-1711
107. Rantapää-Dalqvist S, De Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ (2003). Antibodies against citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2741-2749

108. Ray SK, Putterman C, Diamond B (1996). Pathogenic autoantibodies are routinely generated during the response to foreign antigen: a paradigm for autoimmune disease. *proc Natl Acad Sci USA* 93: 2019-2024
109. Raza K, Falciani F, Curnow SJ, Ross EJ, Lee CY, Akbar AN, Lord JM, Gordon C, Buckley CD, Salmon M (2005). Early rheumatoid arthritis is characterized by distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res Ther* 7: R784-R795
110. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson DR (1994). Depletion of B cells in vivo by chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83: 435-445
111. Reparon-Schuijt CC, van Esch WJE, van Kooten C, Levarht EWN, Breedveld FC, Vewelij L (1998). Functional analysis of rheumatoid factor-producing B cells from the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 41(12): 2211-2220
112. Reparon-Schuijt CC, van Esch WJE, van Kooten C, Schellekens GA, de Jong BAW, van Venrooij WJ, Breedveld FC, Verweij CL. Secretion of Anti-Citrulline-Containing Peptide Antibody by B Lymphocytes in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2001 1:41-47
113. Riley JK, Sliwkowski MX (2000). CD20: a gene in search of function. *Semin Oncol Suppl* 12: 17-24
114. Rodenburg RJ, Ganga A, van Lent PL, van de Putte LB, van Venrooij WJ (2000A). The antiinflammatory drug sulfasalazine inhibits tumor necrosis factor alfa expression in macrophages by inducing apoptosis. *Arthritis Rheum* 43: 1941-1950
115. Rodenburg RJ Raats RM, Pruijn GJ, van Venrooij WJ (2000B). Cell death: a trigger of autoimmunity? *Bioessays* 22: 627-636
116. Routsias JG, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM (2004). The clinical value of intracellular autoantigens B-cell epitopes in systemic rheumatic diseases. *Clin Chim Acta* 340: 1-25
117. Rouzière AS, Kneitz C, Palanichamy A, Dörner T, and Tony HP (2005). Regeneration of the immunoglobulin heavy-chain repertoire after transient B-cell depletion with an anti-CD20 antibody *Arthritis Res Ther.* 7(4): R714–R724.
118. Růžičková Š, Cimburek Z, Moravcová T, Hůzlová Z, Veselá I, Kryštůfková O, Vencovský J (2005). Role B lymfocytů v patogenezi revmatoidní artritidy II.

Detekce CD19⁺ B lymfocytů specifických pro peptidy obsahující citrulin v periferní krvi a synoviální tkáni pacientů s revmatoidní artritidou. *Rheumatologia* 2: 81-86

119. Růžičková Š, Vencovský J (2001). Genetika autoimunitních chorob I. Revmatoidní artritida. *Česká revmatologie* 9:14-20
120. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K (2004). Altered Blood B lymphocyte Homeostasis in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum* 50: 1918-1927
121. Scott DL, Symmons DP, Coulton BL, Popert AJ (1987). Long-term outcome of treating rheumatoid arthritis: results after 20 years. *Lancet* 1:1108-1111
122. Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessière C, Girbal E, Durieux J-J, Serre G (1995). The Antiperinuclear Factor and the So-called Antikeratin Antibodies Are the Same Rheumatoid Arthritis-Specific Autoantibodies. *J Clin Invest* 95:2672-2679
123. Senshu T, Akiyama K, Ishigami A, Nomura K (1999). Studies on specificity of peptidylarginine deiminase reactions using an immunochemical probe that recognises an enzymatically deiminated partial sequence of mouse keratin K1. *J Dermatol Sci* 21:113-126
124. Serreze DV (2001). Genetic control of immunological responses. In: Reeve ECR *Encyclopedia of Genetics*. Butler and Tanner, Londýn,
125. Shiokawa S, Matsumoto N, Nishimura J (2003). Clonal analysis of B cells in the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 32:12-18
126. Schaller M, Burton DR, Ditzel HJ (2001). Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nat Immunol* 2: 746-753
127. Schellekens GA, De Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ (1998). Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101: 273-281
128. Schellekens GA, Visser H, De Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ (2000). The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 43: 155-163

129. Schröder AE, Greiner A, Sayfert C, Berek, C (1996). Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 221-225
130. Silverman GJ, Carson DA (2003). Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 5(Suppl 4): S1-S6
131. Simon M, Vincent C, Haftek M, Girbal E, Sebbag M, Gomes-Daudrix V, Serre G (1995). The rheumatoid arthritis-associated autoantibodies to filaggrin label fibrous matrix of the cornified cells but not the profilaggrin-containing keratohyalin granules in human epidermis. *Clin Exp Immunol* 100: 90-98
132. Slifka MK, Anita R, Whitmire JK, Ahmed R (1998). Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8: 363-372
133. Smolen JS, Steiner G (2003). Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Disc* 2: 473-488
134. van Staa TP, Leufkens HGM, Abenhaim L, Zhang B, Cooper C (2000). Oral corticosteroids and fracture risk: relationship to daily and cumulative doses. *Rheumatology* 39: 1383-1389
135. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K (2003). Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 34: 395-402
136. Symmons DP, Chakravarty K (1993). Can immunization trigger rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 52: 843-844
137. Takahara H, Okamoto H, Sugawara K (1986). Calcium-dependent properties of peptidylarginine deiminase from rabbit skeletal muscle. *Agric Biol Chem* 50: 2899-2904
138. Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM (2001). T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 167: 4710-4718
139. Takizawa Y, Sawada T, Suzuki A, Yamada R, Inoue T, Yamamoto K (2005). Peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) identified as a conformation-dependent autoantigen in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 34(3):212-215.
140. Tan EM (1982). Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 33: 167-240

141. Tanimoto K, Cooper NR, Johnson JS, Vaughan JH (1975). Complement fixation by rheumatoid factor. *J Clin Invest* 55: 437-445
142. Tarcsa E, Marekov LN, Mei G, Melino G, Lee SC, Steinert PM (1996). Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem* 271: 30709-30716
143. Thomas R, MacDonald KP, Pettit AR, Cavanagh LL, Padmanabha J, Zehntner S (1999). Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Leukoc Biol* 66: 286-292
144. Umemura T, Wang RY, Schechterly C, Shih JW, Kiyosawa K, Alter HJ (2006). Quantitative analysis of anti-hepatitis C virus antibody-secreting B cells in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 43(1): 91-99
145. Vasishta A (2002). Diagnosing early-onset rheumatoid arthritis: the role of anti-CCP antibodies. *Am Clin Lab* 21: 34-36
146. Vencovský J (1996). *Revmatoidní artritida – imunopatogeneze onemocnění, role revmatoidních faktorů a nové možnosti léčby*. Praha
147. Vencovský J, Macháček S, Šedová L, Kafková J, Gaterová J, Pešáková V, Růžičková Š (2003). Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62: 427-430
148. van Venrooij WJ, Pruijn GJM (2000). Citrullination: a small change for protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2: 249-251
149. Vossenaar ER, Després N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, van Venrooij WJ, Ménard HA (2004A). Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther* 6: R142-150
150. Vossenaar ER, Lopez-Hoyos M, Merino J, van Boekel MA, Joosten LA, van Venrooij WJ, Merino R (2004B). Absence of citrulline-specific autoantibodies in animal models of autoimmunity. *Arthritis Rheum* 50: 2370-2372
151. Vossenaar ER, Nijenhuis S, Helsen MM, van der Heijden A, Senshu T, van der Berg WB, van Venrooij WJ, Joosten LA (2003A). Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2489-2500.
152. Vossenaar ER, Radstake TRD, van der Heijden A, van Mansum MAM, Dieteren C, de Rooij D-J, Barrera P, Zendman AJW, van Venrooij WJ (2004C). Expression and activity of citrullinating PAD enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis*, 63: 373-381

153. Vossenaar ER, van Venrooij WJ (2004). Anti-CCP antibody, a highly specific marker for (early) rheumatoid arthritis. *Clin Appl Immun Rev* 4: 239-262
154. Vossenaar ER, van Venrooij WJ. Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004B, 6:107-111
155. Vossenaar ER, Zendman AJW, van Venrooij WJ, Pruijn GJ (2003B). PAD, a growing family of citrullinating enzymes: Genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 25: 1106-1118
156. Wandsworth BP, Bell JI (1992). The immunogenetics of rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 14: 59-78
157. Watanabe K, Akiyama K, Hikichi K, Ohtsuka R, Okuyama A, Senshu T (1988). Combined biochemical and immunochemical comparison of peptidylarginine diminases present in various tissues. *Biochem Biophys Acta* 966: 375-383
158. Weinstein E, Peeva E, Putterman C, Diamond B (2004). B-cell biology. *Rheum Dis Clin N Am* 30: 159-174
159. Weyand CM, Hicok KC, Conn DL, Goronzy JJ (1992). The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 117: 801-806
160. Williams RC Jr (1992). Rheumatoid factors: historical perspective, origins and possible role in disease. *J Rheumatol* 19: 42-45
161. Wilson PC, Wilson K, Liu YJ, Banchereau J, Pascual V, Capra JD (2000). Receptor Revision of Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Genes in Normal Human B Lymphocytes. *J Exp Med* 191: 1881-1194
162. Wright PW, Bolling PC, Calvert ME, Sarmiento OF, Berkeley EV, Shea MC, Hao Z, Jayes FC, Bush LA, Shetty J, Shore AN, Reddi PP, Tung KS, Samy E, Allietta MM, Sherman NE, Herr JC, Coonrod SA (2003). ePAD, an oocyte and early embryo-abundant peptidylarginine deiminase-like protein that localizes to egg cytoplasmic sheets. *Dev Biol* 256: 74-89
163. Yanni G, Whelan A, Freighery C, Bresnihan B. Analysis of cell populations in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Semin Arthritis Rheum* 1992, 21: 393-399
164. Young BJ, Mallaya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ (1979). Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J* 2: 97-99
165. Zeng X, Ai M, Tian X, Gan X, Shi Y, Song Q, Tang F (2003). Diagnostic Value of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody in Patients with Rheumatoid Athritis. *J Rheumatol* 30: 1451-1455

166. Zohar Y, Wildbaum G, Karin N (2006). Beneficial autoimmunity participates in the regulation of rheumatoid arthritis. *Front Biosci.* 11: 368-379.
167. Zvaifler NJ (1973). Immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Adv Immunol* 16: 236-295

12. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABI	Applied Biosystems Instruments
aCCP	protilátky proti proteinům obsahujícím citrulin
AFA	antifilagrinové protilátky
AKA	antikeratinové protilátky
APC	antigen prezentující buňka
APC	allofykocyanin
APF	antiperinukleární faktor
AZA	azathioprin
B-ALL	B buněčná akutní lymfoblastická leukémie
BCR	B buněčný receptor
BiP	heavy chain binding protein
BSA	bovinní serový albumin
BSF	B buněčný stimulační faktor
CCP	cyklický citrulinovaný peptid
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CDR	complementarity determining region
CLIP	class II – associated invariant chain peptide
CLL	chronická lymfoidní leukémie
CRP	C-reaktivní protein
CSF	colony stimulating factor (faktor stimulující faktor)
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte antigen
CXCL	CXC chemokinový ligand
CXCR	CXC chemokinový receptor
Cy	cyanin
D _H úsek	„diversity“ úsek genového komplexu kódujícího těžký řetězec imunoglobulinu
DMARDs	disease modifying antirheumatic drugs
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
DTT	1,4-dithiothreitol
EBV	virus Epstein-Barrové
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová

EGF	epiteliální růstový faktor
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
f.c.	finální koncentrace
FCRL	Fc receptor-like gen
FDC	folikulární dendritická buňka
FITC	fluoresceinizothyokyanát
FR	framework region
FSC	forward scatter
GC	germinální centrum
G-CSF	granulocytární faktor stimulující kolonie
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
GPI	glukóza-6-fosfát izomeráza
HCDR	complementarity determining region těžkého řetězce
HLA	lidský leukocytární antigen
HQ	Hydrochloroquin
H řetězec	těžký (heavy) řetězec imunoglobulinu
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
JCA	juvenilní chronická artritida
J _H úsek	„joining“ úsek genového komplexu kódujícího těžký řetězec imunoglobulinu
LEF	lwflunomid
LF UK	Lékařská fakulta Univerzity Karlovy
LT	lymfotoxin
L řetězec	lehký (light) řetězec imunoglobulinu
MCGF	růstový faktor mastocytů
mf	mutační frekvence
MBP	myelin basic protein
MBÚ AV ČR	Mikrobiologický Ústav Akademie věd České republiky
MCTD	smíšené onemocnění pojivové tkáně (mixed connective tissue disease)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
MTX	methotrexát
NaAc	acetát sodný

NHL	non-Hodgkinův lymfom
nt	nukleotid
PAD	peptidylarginin deimináza
PADI	gen pro peptidylarginin deiminázu
PBS	phosphate buffered saline
PE	fykoerytrin
PI	propidiumjodid
PK	periferní krev
Prkdc	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
pSS	primární Sjögrenův syndrom
RA	revmatoidní artritida
Rag	rekombinaci aktivující gen
RANK	receptor activator of nuclear factor-kappaB
RANKL	ligand pro RANK
RANTES	redulated on activation – normal T-cell expressed and secreted
RT-PCR	reverzně transkriptázová PCR
Sa-antigen	Savoy antigen
SA – PE	konjugát streptavidin – fykoerythrin
SAS	sulfasalazin
SE	střední chyba
SDS	sodium dodecyl sulfát
SF	synoviální tekutina
SLB	Sigma loading buffer
SLE	systemový lupus erythematoses
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
SSc	systemová sklerodermie
SSC	side scatter
ST	synoviální tkáň
TACE	TNF- α converting enzyme
TBE	tris-borátový pufr s EDTA
TdT	terminální transferáza
TCR	T buněčný receptor
tm	tichá mutace

TNF	tumor necrosis factor
TNFR	receptor pro tumor necrosis factor
V _H úsek	„variability“úsek genového komplexu kódujícího těžký řetězec imunoglobulinu
WSB	wash and staining buffer
zm	záměnová mutace