

# Autoimmunity

seminář 2017/18

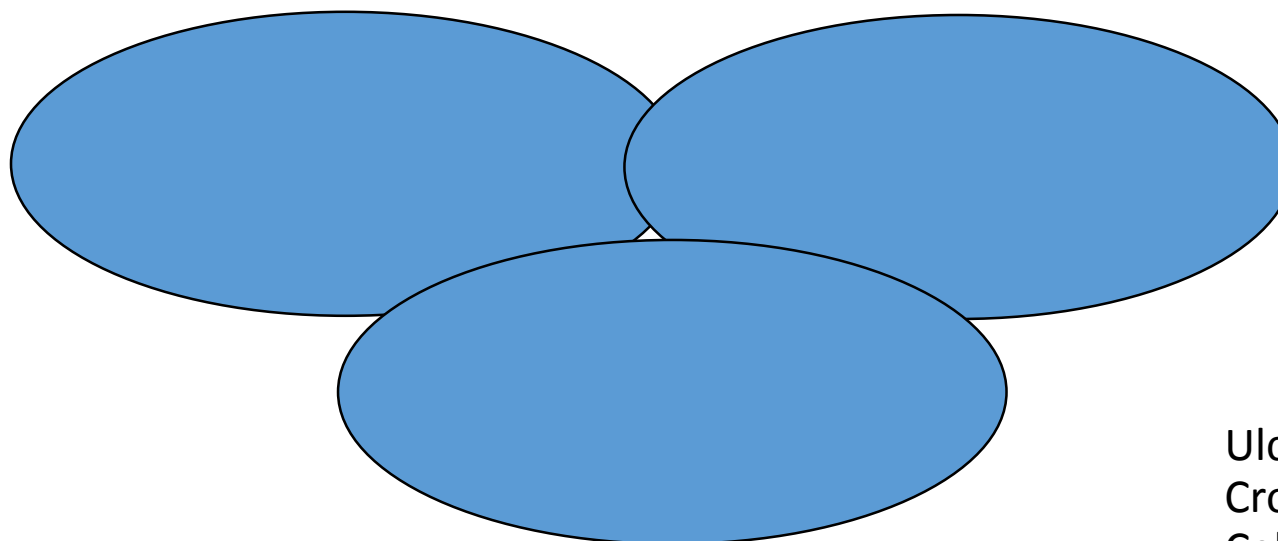
# Autoimunitní choroby

SLE  
RA  
Sjögrenův syndrom  
Dermatopolymyozitida  
Systémová sklerodermie  
Smíšená choroba pojiva  
Antifosfolipidový syndrom  
Vaskulitidy

**Systemové**

**Orgánově specifické**

Autoimunitní endokrinopatie  
Autoimunitní neurologická onemocnění  
Autoimunitní cytopenie  
Autoimunitní kožní onemocnění  
Autoimunitní oční onemocnění



**Orgánově lokalizované**

Ulcerózní kolitida  
Crohnova choroba  
Celiakie  
Autoimunitní hepatitidy  
Primární biliární cirhóza  
Primární sklerotizující cholangitida  
Plicní fibróza

# Vyšetřované autoprotilátky

## Orgánově nespecifické autoprotilátky u systémových autoimunitních chorob:

Protilátky proti jaderným antigenům:

**ANA** – antinukleární protilátky (SLE, Sjögrenův syndrom, sklerodermie, dermatopolymositida, MCTD)

**ENA** – protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům (SLE, Sjögrenův syndrom, sklerodermie, dermatopolymyositida, MCTD)

**dsDNA** – protilátky proti dvoušroubovici DNA (SLE)

**RF** – revmatoidní faktor = protilátky proti Fc částem Igg (revmatoidní artritida)

**APA** – antifosfolipidové protilátky (antifosfolipidový syndrom)

**ANCA** – protilátky proti cytoplazmě neutrofilů (vaskulitidy, ulcerózní kolitida)

# Vyšetřované autoprotilátky

## Orgánově nespecifické autoprotilátky u orgánově lokalizovaných autoimunitních chorob :

**AMA** - antimitochondriální autoprotilátky (primární biliární cirhóza)

**LKM** - autoprotilátky proti mikrosomům jater a ledvin (autoimunitní hepatitidy)

**ASMA** - proti hladkým svalům (autoimunitní hepatitida)

autoprotilátky proti **antigenům tlustého střeva a pankreatu** (ulcerózní kolitida)

autoprotilátky proti kvasince **Sacchromyces cerevisiae (ASCA)** (M.Crohn)

autoprotilátky proti **endomyziu, deamidovanému gliadinu a transglutamináze** (celiakie)

# Vyšetřované autoprotilátky

## Orgánově specifické autoprotilátky:

proti **tyreoideální peroxidáze (a-TPO)** a proti **tyreoglobulinu (a-TG)**  
štítné žlázy (Hashimotova tyreoiditis)

proti **TSH receptorům** (Graves - Basedowova choroba)

proti strukturám **ovarií** (sy předčasné ovariální dysfunkce)

proti **testes** (autoimunitní poruchy reprodukce)

proti **Langerhansovým ostrůvkům (ICA)** nebo **glutamát-dekarboxyláze (GAD)** nebo **inzulinu** (DM I.typu)

# Laboratorní stanovení autoantiláték

## Metody:

- zlatým standardem je **nepřímá imunofluorescence (NIF)**
  - umožňuje vyšetření základního spektra orgánově nespecifických autoantiláték (ANA, ds-DNA, ANCA...)
- další metody : **ELISA**
  - vyšetření orgánově specifických (protilátky proti TPO a TG štítné žlázy, proti TSH..) i orgánově nespecifických (RF, APA..) autoantiláték, obvykle doplňující vyšetření k nepřímé imunofluorescenci (např. typizace ENA)

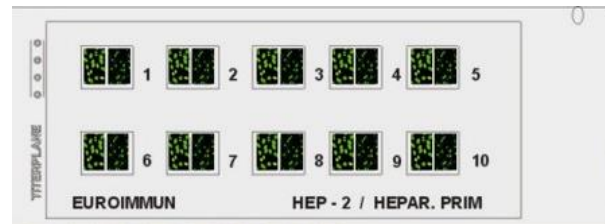
**Indikace k vyšetření:** podezření na autoimunitní proces

**Interpretace výsledku:** samotná pozitivita protiláték ještě neznamena dg. autoimunity „fyziologicky“ ve vyšším věku, po infekci

# Nepřímá imunofluorescence

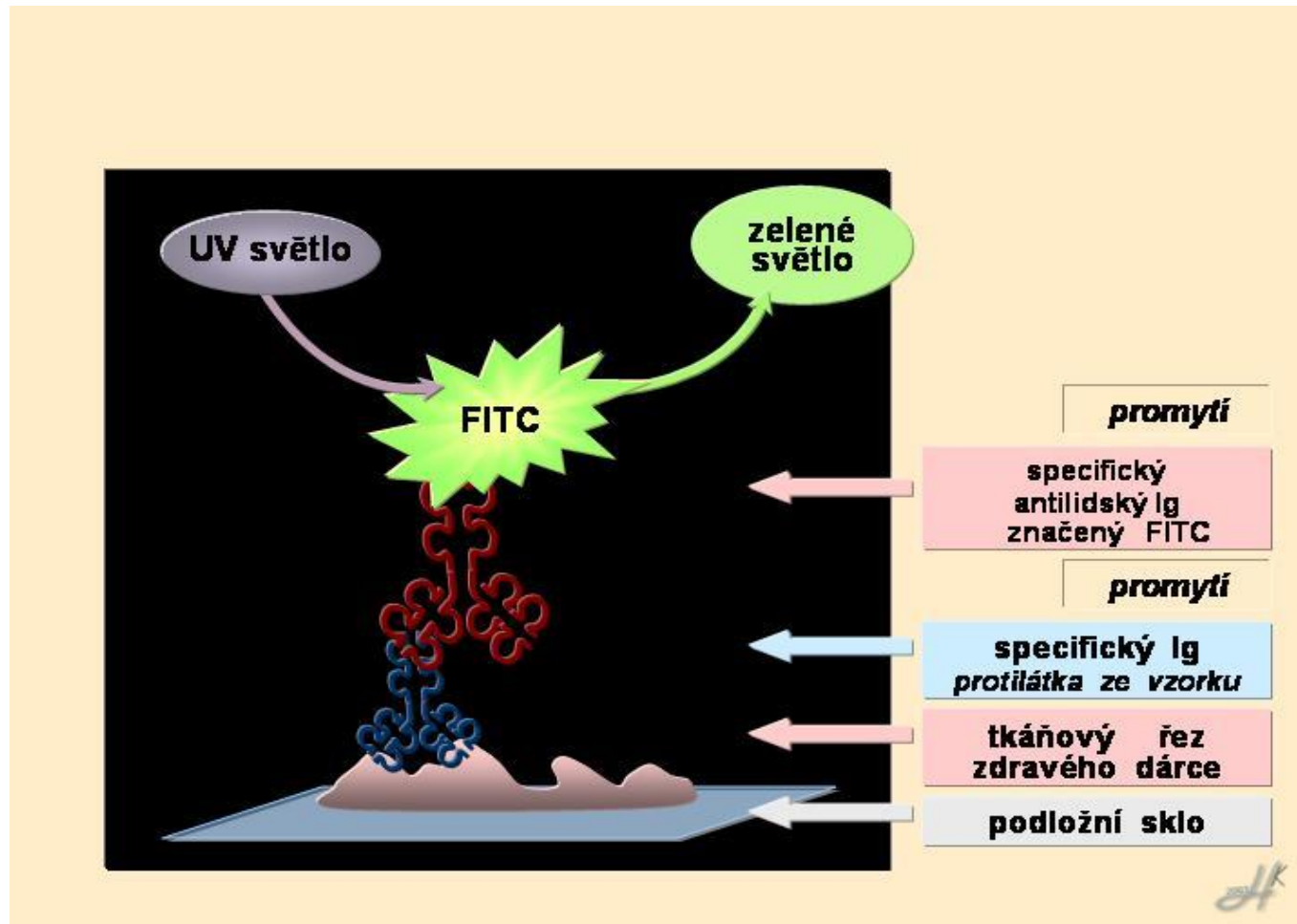
- slouží k detekci autoantilátok namířených proti tkáňovým, buněčným nebo subbuněčným strukturám
- k detekci autoantilátok je třeba mít **substrát**
- substrátem je řez tkáně, buněčná substance nebo fixovaná tkáňová kultura (např. HEP 2 buňky-linie lidského nazofaryngeálního karcinomu ke stanovení ANA, prvok *Crithidium lucilliae* ke stanovení a-dsDNA, lidské neutrofilní leuko ke stanovení ANCA..)

Přístrojové vybavení:



# Nepřímá imunofluorescence- princip:

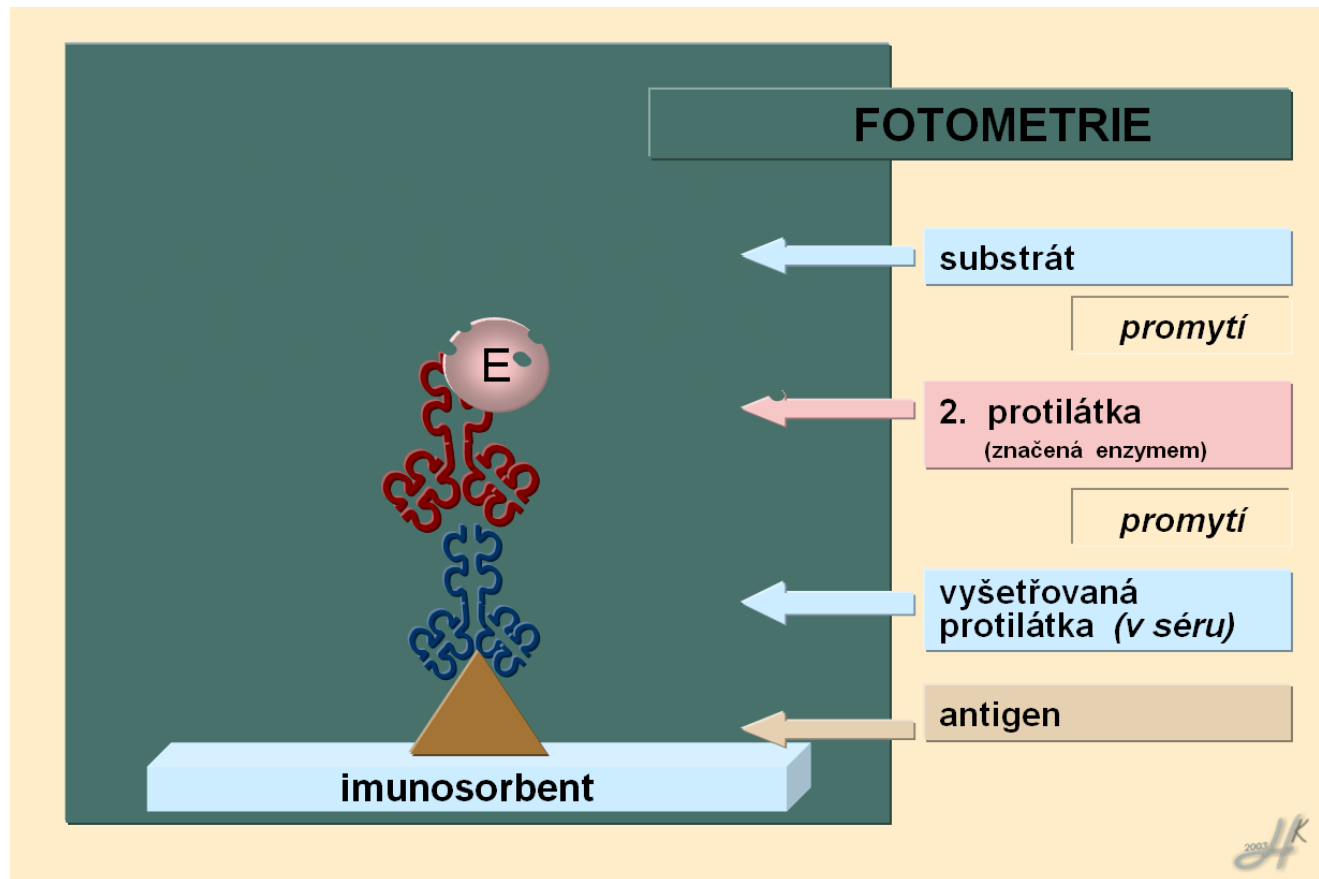
1. inkubace pacientova séra (Ab) se substrátem (Ag) fixovaným na sklíčku
2. inkubace s anti-lidskou protilátkou značenou fluorochromem např. FITC
3. detekce pomocí fluorescenčního mikroskopu





# ELISA – průkaz specifických protilátek

**Princip:** pevná fáze je pokryta Ag → přidáme vzorek s hledanou Ab → tvorba IK (Ag - Ab) → promytí → přidáme **konjugát**, tzv. „sekundární Ab“ → vzniká komplex Ag-Ab-Ab\* → promytí → přidán substrát → enzymatická reakce → vznik barevného produktu

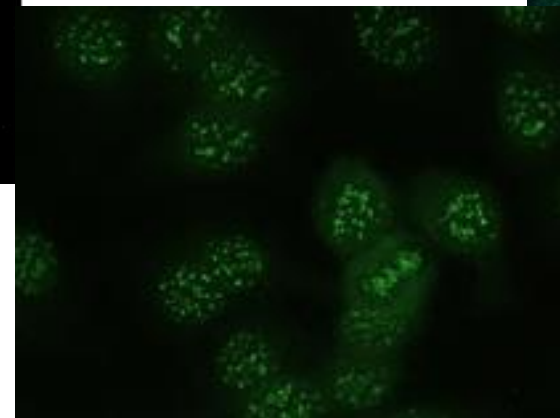
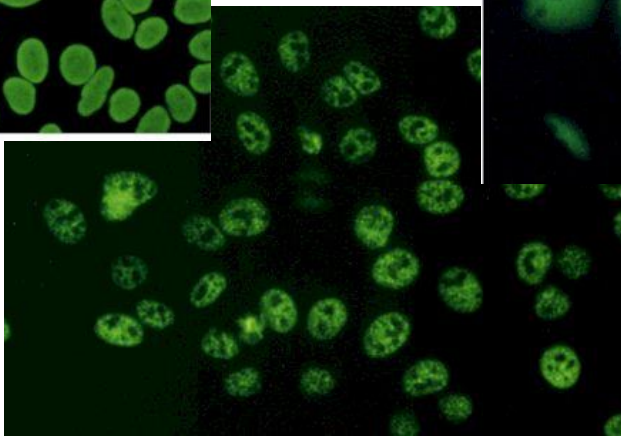
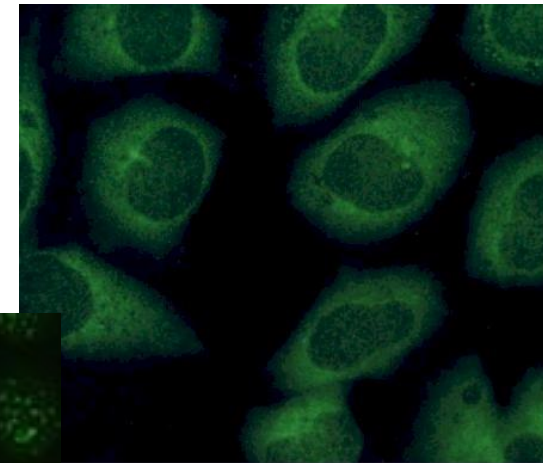
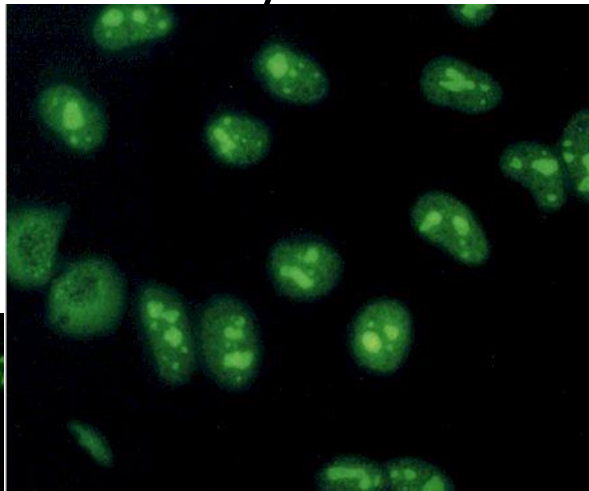
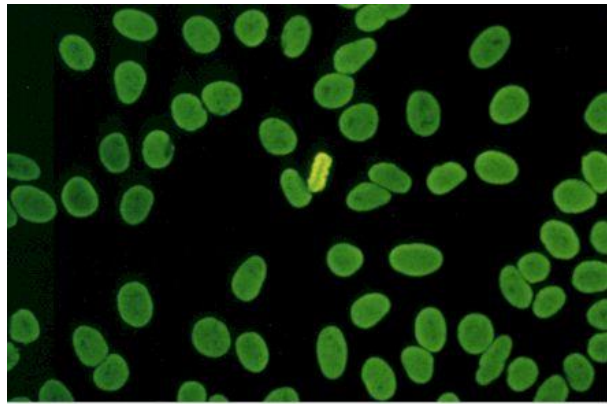


**Hodnocení ELISA:** fotometr měří absorbanci (intenzitu zbarvení) vzniklého barevného produktu.

Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci vyšetřovaného vzorku a příslušná hodnota se odečítá pomocí kalibrační křivky

# Anti Nuclear Antibodies (ANA)

- nespecifické, namířené proti různým jaderným, ale i cytoplazmatickým strukturám (histony, DNA, jaderná membrána, jadérka, ribonukleové kyseliny...)
- vyšetřují se NIF, substrát HEp-2 buňky
- rozeznáváme různé typy fluorescence ANA (homogenní, zrnitá, nukleolární, centromerový, cytoplazmatický), na základě fluorescenčního obrazu můžeme usuzovat na přítomnost protilátek proti konkrétním antigenům (homogenní typ IF - dsDNA, zrnitý typ IF - ENA..) → v případě positivity ANA provádíme další vyšetření k určení specifity protilátek



Titr 1:100  
1:320  
1:640  
1:1280

# Autoprotilátky proti ENA

- podskupina jaderných antigenů
- autoprotiátky proti extrahovatelným jaderným antigenům - všechny ribonukleoproteiny a nehistonové proteiny, které mohou být vymyty z jader užitím neutrálního roztoku pufru (RNP, sm antigen, tRNA syntetáza, DNA topoizomeráza...)
- vyšetřují se obvykle ELISA metodikou (ENA typizace)

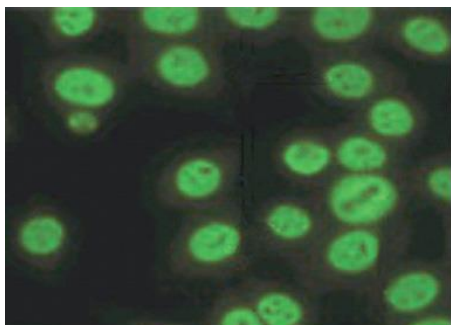
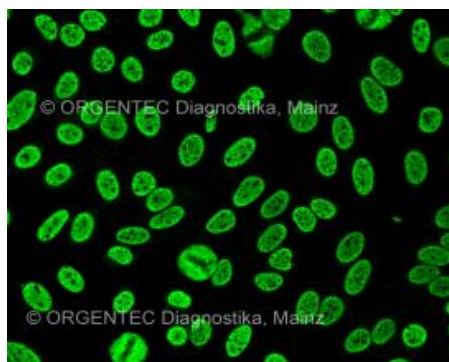


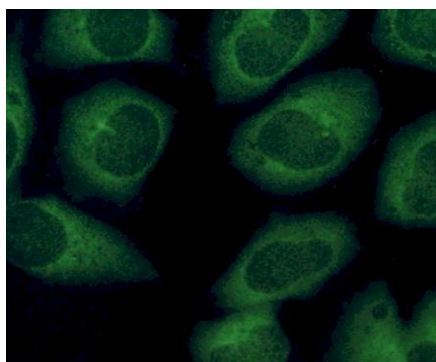
FIGURE 4: Fine speckled nuclear FANA - corresponds to anti-Ro/SSA and anti-La/SSB antibodies, markers of Sjögren's syndrome, subacute cutaneous LE and neonatal LE



**a-RNP, a-Sm:**  
zrnitá fluorescence  
jader



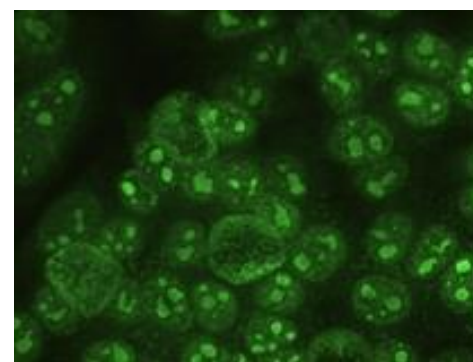
MCTD    SLE



**a-Jo-1** (histidyl tRNA syntetáza):  
jemně zrnitá fluorescence  
cytoplazmy s max.perinukleárně



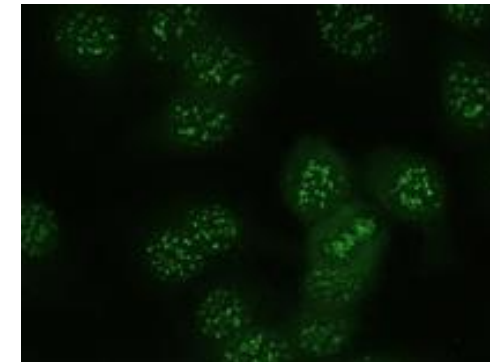
PM/DM



**a-scl 70** (DNA topoizomeráza)  
fluorescence jaderek



Sclerodermie



**a-centromery**

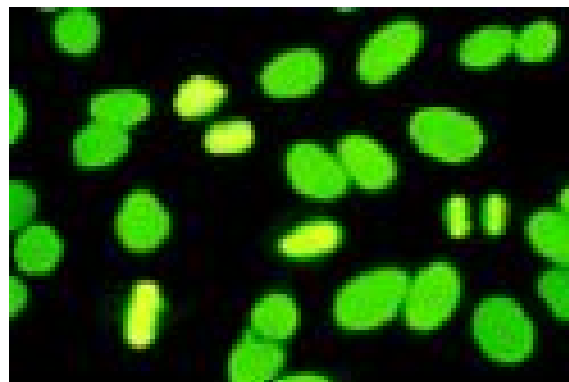


CREST

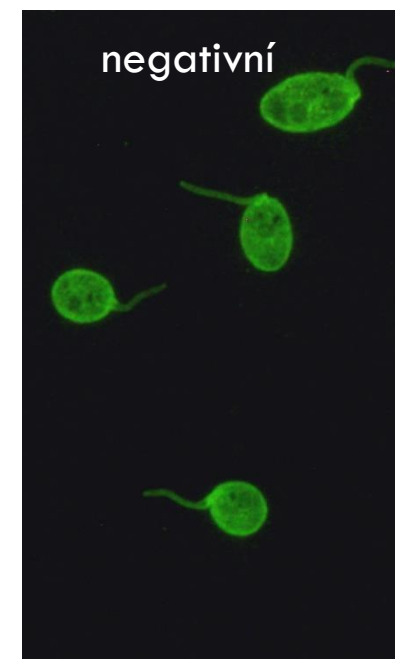
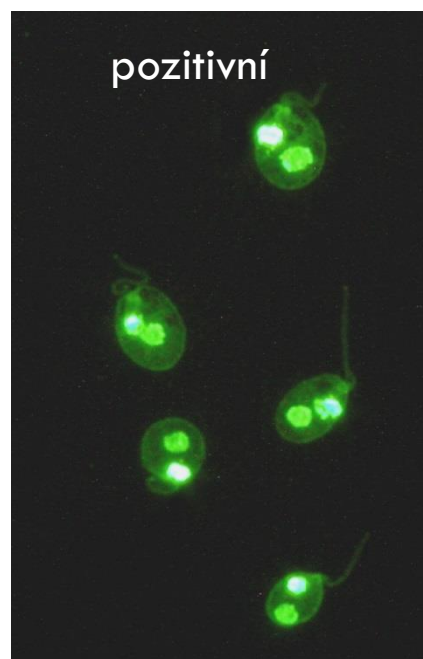
SS, SLE

# Autoprotilátky proti dvojspirálové DNA (a-dsDNA)

ANA homogenní fluorescence jader na HEP 2 bb



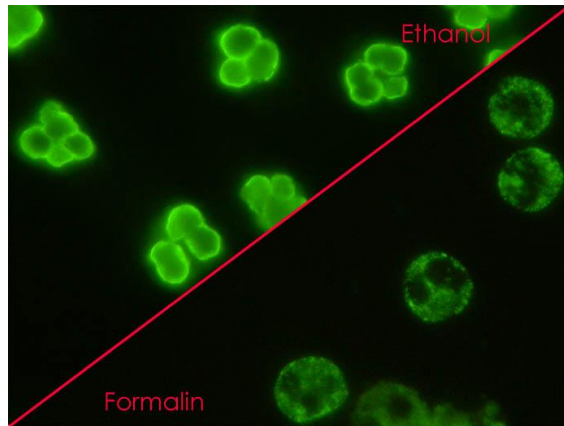
- Specifickým substrátem je Crithidia luciliae, bičíkovec, který obsahuje kromě jadra kinetoplast, který obsahuje čistou dvouvláknovou DNA.
- **antigen:** dsDNA
- **klinická asociace:** významný autoantigen u systémového lupusu, se specifitou okolo 95%.



# ANCA (= Anti-Neutrophil Cytoplasm Antibodies)

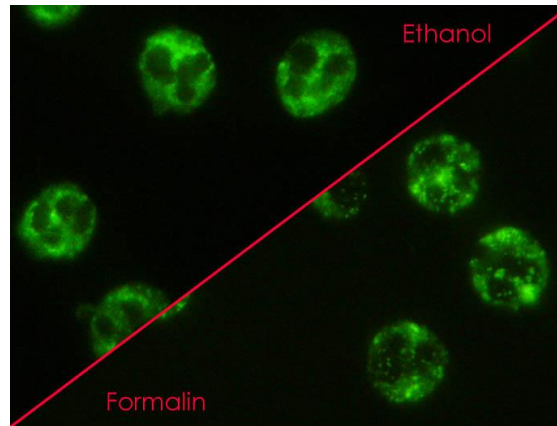
- obecný název pro všechny autoprotiátky namířené proti cytoplazmatickým antigenům neutrofilů
- cílové antigeny ANCA jsou proteináza 3, myeloperoxidáza, elastáza, katepsin, laktoferin lysozym...(enzymy granul)
- aktivují neutrofile, které se účastní patogeneze vaskulitid
- stanovují se NIF, k potvrzení se doplňuje ELISA typizace

## p- ANCA (myeloperoxidáza)



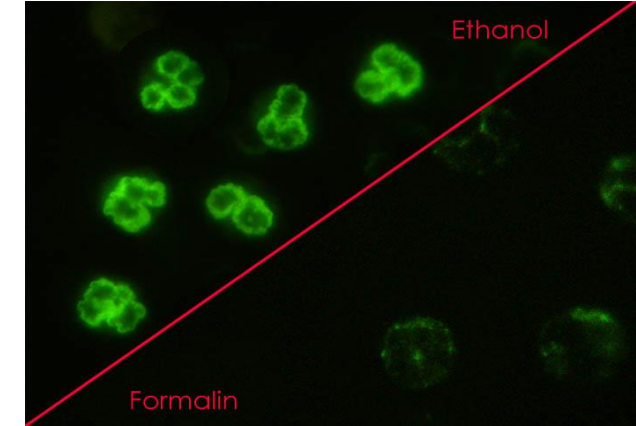
VELMI JEMNĚ ZRNITÁ AŽ HOMOGENNÍ PERINUKLEÁRNÍ FLUORESCENCE ETANOLEM FIXOVANÝCH GRANULOCYTŮ, VE FORMALÍNU FIXOVANÝCH GRANULOCYTECH ZRNITÁ FLUORESCENCE CYTOPLAZMY

## c - ANCA (proteináza 3)



ZRNITÁ FLUORESCENCE CYTOPLAZMY ETANOLEM FIXOVANÝCH GRANULOCYTŮ, VE FORMALÍNU FIXOVANÝCH GRANULOCYTECH PONĚKUD HRUBŠÍ ZRNITÁ FLUORESCENCE CYTOPLAZMY

## atypická - ANCA (elastáza, laktoferin, lysozym, katepsin...)



HOMOGENNÍ PERINUKLEÁRNÍ FLUORESCENCE NEBO JEMNĚ ZRNITÁ, ZASAHUJÍCÍ DO CYTOPLAZMY NEBO ZRNITÁ CYTOPLAZMA ETANOLEM FIXOVANÝCH GRANULOCYTŮ, VE FORMALÍNU FIXOVANÝCH GRANULOCYTECH BEZ FLUORESCENCE

# Revmatoidní faktor (RF)

= **autoprotiátky** proti Fc fragmentu IgG imunoglobulinu

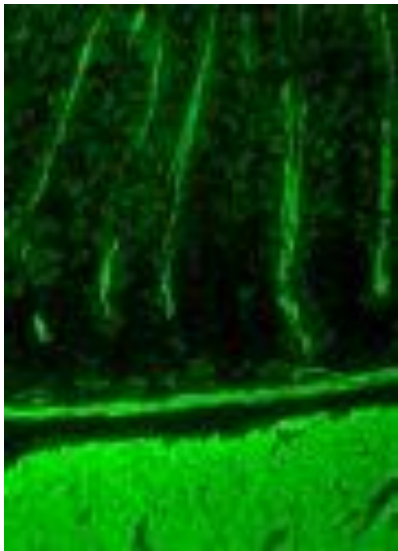
- RF může být nalezen ve všech imunoglobulinových třídách (RF IgG, RF IgA, RF IgM)
- Stanovuje se latexovou aglutinací (IgM) nebo **ELISA** (IgG, IgA, IgM)
- Typický pro RA



# Antifosfolipidové protilátky (APA)

- skupina autoprotiátek, jejichž cílovými antigeny jsou plazmatické proteiny navázané na negativně nabitě fosfolipidové povrchy
- nejčastěji stanovujeme protilátky **anti-kardiolipin (ACLA)**, **anti-protrombin**, **anti- $\beta$ 2-glykoprotein I** (*patogenetické*)
- stanovení provádíme ELISA metodou, ve třídách IgG a IgM
- APA protilátky zasahují různými mechanismy do procesu koagulace (interference s koagulačními faktory, přímá vazba na endoteliální bb, alterace trombocytární agregace, inhibice fibrinolýzy...)
- důsledkem APA navozené poruchy koagulace dochází k arteriálním a venózním trombózám – klinickou jednotkou je antifosfolipidový syndrom

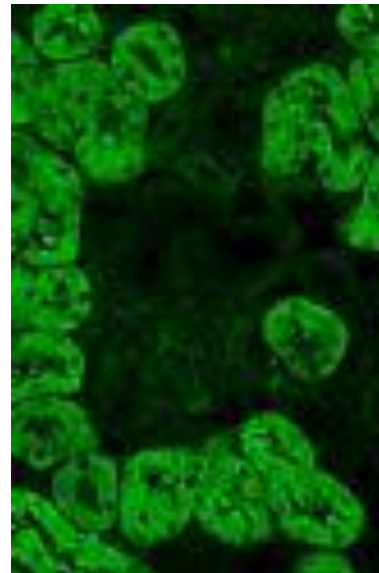
# Příklady fluorescenčních obrazů některých orgánově nespecifických autoprotilátek u orgánově lokalizovaných autoimunitních chorob:



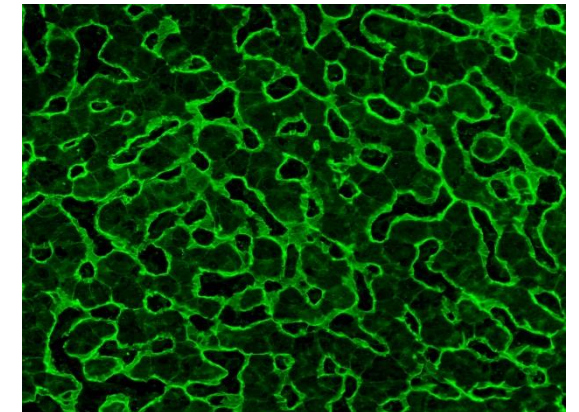
ASMA



AMA



LKM



endomyziální  
autoprotilátky



# Celiakie

- autoimunitní onemocnění dětí i dospělých způsobené nesnášenlivostí lepku (lepek je obsažen v povrchní části obilných zrn pšenice, žita, ovsa a ječmene)
- prevalence v ČR 1:200 – 1:250
- dědí se AD s neúplnou penetrací, výskyt u příbuzných 1.stupně je 8 - 18%, rizikový haplotyp je HLA DQ2 u 95%, HLA DQ8 u ostatních
- dochází k rozvoji autoimunitní enteritidy (hlavně v duodenu a jejunu)- porucha střevních funkcí s poruchou vstřebávání – průjemy, neprospívání, váhový úbytek, anémie, poruchy psychosomatického vývoje
- mimostřevní příznaky u dospělých: anemie, osteoporóza, únava, neplodnost, poruchy chování, deprese, dermatitis herpetiformis Duhring

## Komplikace:

- přidružené autoimunitní choroby 10-30x častější než v běžné populaci (tyreoiditida, DM I.typu)
- vyšší výskyt malignit (lymfomy)

# Celiakie

## Diagnostika:

- anamnéza, klinický obraz
- autoprotiátky – proti **tkáňové transglutamináze** ve třídě IgA (cave pacienti s deficitem IgA), **antigliadinové, antiendomysialní**
- histologie střevní sliznice

## Léčba:

- Doživotní bezlepková dieta - vede k úpravě klinického obrazu a autoprotiátek
- Bezlepkové suroviny: rýže, kukuřice, sója, pohanka, proso, jáhly, amarant, brambory

# SYSTÉMOVÝ LUPUS ERYTHEMATODES

- multiorgánové systémové onemocnění
- chronický průběh, střídání období spontánní aktivity a remise
- postihuje převážně ženy v reprodukčním období (9x častěji u žen)
- prevalence 30 : 100 000
- **autoantilátky** reagují se složkami **jaderného aparátu** buněk, narušují buněčné funkce, **imunokomplexy** obsahující dsDNA se **ukládají v tkáních**
- **laboratorní nálezy:** vysoká FW, nízké CRP, cytopenie (trombocytopenie, leukopenie, hemolytická anémie), snížení C4, C3, hypergamaglobulinémie

# KLINICKÉ PROJEVY SLE

- celkové nespecifické projevy (únava, slabost, teploty)
- projevy kloubní a svalové (artralgie, artritida, myalgie, myozitida)
- kožní postižení (motýlovitý erytém v obličeji), fotosenzitivita
- plicní postižení (pleuritida, akutní lupusová pneumonitida)
- srdeční postižení (perikardiální výpotek, myokarditida, endokarditida)
- ledvinové postižení - lupusová nefritida (5 tříd)
- postižení CNS (CMP, hypertenzní encefalopatie, organický mozkový psychosyndrom)
- gastrointestinální postižení (vaskulitida, pankreatitida, hepatitida)
- postižení retikuloendoteliálního systému (lymfadenopatie, zvětšení sleziny)
- hematologické postižení (anémie, leukopenie, lymfopenie, trombocytopenie)



# Diagnostická kritéria SLE podle Americké revmatologické společnosti (1982, upravená 1997)

Musí platit 4 z 11 kritérií současně nebo postupně

Obličejový kožní erytém	
Diskoidní exantém	
Fotosenzitivita	
Ulcerace v dutině ústní	
Artritida	
Serozitida	pleuritida
	perikarditida
Postižení ledvin	a) přetrvávající proteinurie > 0,5 g 24 hodin nebo +++, není-li provedeno kvantitativní vyšetření
	b) buněčné válce
Neurologické postižení	křeče nebo psychóza
Hematologické poruchy	Hemolytická anemie nebo leukopenie < 4000/mm <sup>3</sup> nebo lymfopenie 1,500/ mm <sup>3</sup> nebo trombocytopenie < 100 000/ mm <sup>3</sup>
Imunologické poruchy	Průkaz anti - dsDNA
	Průkaz anti-Sm protilátek
	Průkaz antifosfolipidových protilátek
Antinukleární protilátky	ve vysokém titru

# Systemový lupus erythematoses

## Léčba:

- a) nespecifická léčba postihující tvorbu autoantilátok  
př. glukokortikoidy, antimalarika (plaquenil), při vysoké aktivitě choroby - cyklofosfamid, azathioprin, metotrexát, ev. v kombinaci s plazmaferézou, studie s biolog. léčbou (anti CD 20)
- b) symptomatická léčba např. analgetiky a antipyretiky, které působí protizánětlivě (NSA)
- c) léky, jejichž podávání je vynuceno postižením funkce jednotlivých pro život důležitých orgánů jako jsou ledviny, srdce, plíce

# REVMATOIDNÍ ARTRITIDA

- chronická destruktivní zánětlivá choroba, charakterizovaná hyperplazií synoviální tkáně a infiltrací kloubního prostředí zánětlivými buňkami, postupně dochází k poškození kloubní chrupavky, kostním erozím a deformitám
- klinicky se projevuje jako chronická **symetrická polyartritida s variabilní přítomností mimokloubních příznaků**
- obvykle plíživý začátek (artritida se vyvíjí během týdnů až měsíců), výjimečně akutně či perakutně během několika dní
- může začít v jakémkoli věku, častěji jsou postiženy ženy (2-3x)
- prevalence 1%

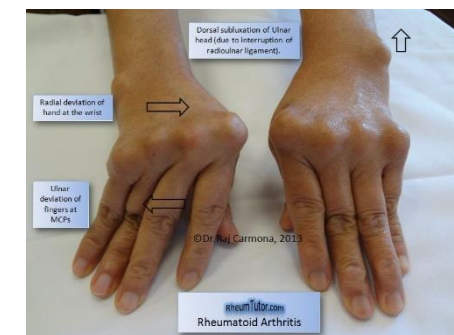
# REVMATOIDNÍ ARTRITIDA

## Příznaky:

### **kloubní postižení:**

bolesti a ranní ztuhlost postižených kloubů, klouby jsou zduřelé a teplejší, kůže nad kloubem nebývá barevně změněna, postiženy mohou být téměř všechny klouby kromě distálních interfalangeálních

na rukou se objevují vřetenovitá zduření proximálních interfalangeálních kloubů a atrofie interoseálních svalů



### **mimokloubní postižení**

- revmatoidní uzly (nejčastěji v podkoží např. nad olekranonem)
- osteoporóza
- postižení kůže (hladká, atrofická kůže na prstech, chladná akra s hyperhidrózou, palmární erytém)
- plicní postižení (revmatoidní uzly, fibrotické změny intersticia)
- kardiální projevy (perikarditida, myokarditida)
- oční postižení (suchá keratokonjunktivitida u 10-35% pacientů)
- vaskulitida, neuropatie





# DIAGNOSTIKA RA

- **laboratorní nález:** zvýšení CRP i FW, hypergamaglobulinémie
- **autoprotilátky :**
  - proti Fc fragmentu imunoglobulinů- revmatoidní faktor **RF**  
(20% pacientů má RF negativní- tzv. seronegativní RA)
  - proti cyklickému citrulinovému peptidu filagrinu (**anti CCP**)
- **RTG** (snímek rukou, zápěstí, nohou):  
periartikulární poróza, marginální eroze,  
v pozdních stádiích kloubní deformity až ankylóza



# Diagnostická kritéria RA podle Americké revmatologické asociace z roku 1988

Musí platit 4 z 7 kritérií

Ranní ztuhlost	Ranní ztuhlost v kloubu a kolem kloubu trvající alespoň 1 hodinu před maximálním zlepšením.
Artritida tří nebo více kloubních oblastí	Současná přítomnost otoku měkkých tkání kolem kloubů nebo přítomnost tekutiny v kloubu pozorovaná lékařem. Týká se 14 kloubních oblastí (vlevo nebo vpravo)- PIP, MCP, zápěstí, lokte, kolena, kotníky a MTP.
Artritida ručních kloubů	Alespoň jedna kloubní oblast na ruce postižena (zápěstí, MCP, PIP).
Symetrická artritida	Současné postižení stejných kloubních oblastí na obou stranách těla.
Revmatoidní uzly	Podkožní uzly nad kloubními výběžky nebo nad extenzory.
Revmatoidní faktory	Průkaz abnormálních hladin RF.
Rentgenové změny	RTG změny typické pro RA na předozadním snímku rukou a zápěstí, které musí zahrnovat eroze nebo nepochybnou kostní dekalifikaci lokalizovanou v kloubech nebo jejich bezprostředním okolí.

# REVMATOIDNÍ ARTRITIDA

## Léčba:

komplexní, zahrnuje:

- **Léky modifikující průběh choroby (Disease modifying drugs-DMD)**

- antimalarika (chlorochin, hydrochlorochin)

- sulfasalazin

- metotrexát (dnes nejužívanější)

- méně často u těžších forem azathioprin, cyklofosfamid, cyklosporin, leflunomid

Léčbu DMD je třeba začít včas před vznikem ireverzibilních RTG změn, po celou dobu trvání choroby, nejčastější kombinace metotrexát + sulfasalazin + hydrochlorochin, metotrexát + leflunomid

- **Glukokortikoidy**

- v období akutních projevů na přemostění období do nástupu účinku DMD

- prednison p.o., metylprednisolon i.v.

- **Biologická léčba**

- v současné době je nejúčinnější léčbou RA.

- je indikována k léčbě aktivní revmatoidní artritidy nereagující na předchozí podání choroby modifikující léků včetně metotrexátu.

- základem je anti TNF léčba (**TNF** (tumor nekrotizující faktor) uplatňuje se v patogenezi RA, je klíčovým faktorem zánětlivé odpovědi)

- monoklonální **protilátka proti TNF-alfa** (INFLIXIMAB, ADALIMUMAB)

- NÚ anti TNF léčby- zvýšená náchylnost k TBC, před nasazením nutné vyloučit latentní TBC

- vyšší riziko lymfomů, demyelinizačních poruch a cytopenií

- **Nesteroidní antirevmatika** (diclofenac, ibuprofen, meloxikam, nimesulid..), **fyzikální terapie a rehabilitace**

Děkuji za pozornost.