

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**HLA typizace v klinické praxi – využití k testování
predispozic k onemocněním autoimunitního typu**

Diplomová práce

Bc. Dominika Veselá

Vedoucí práce: Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D., GENLABS s.r.o.

České Budějovice 2019

Veselá, D., 2019: HLA typizace v klinické praxi – využití k testování predispozic k onemocněním autoimunitního typu. [HLA typing in clinical practice – utilization to test predispositions to autoimmune diseases. Mgr. Thesis, In Czech] – 125 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Autoimunitní choroby potřebují ke svému vzniku a projevu souhru vnitřních faktorů (genetických) a vnějších faktorů (environmentálních). K zásadním genetickým parametrům patří HLA alely, jejichž nosičství souvisí s výraznou predispozicí ke vzniku konkrétního autoimunitního onemocnění.

Tato diplomová práce se zabývá problematikou autoimunitních chorob asociovaných s HLA systémem, přičemž praktická část se zaměřuje na vyšetření predisponujících alel souvisejících s celiakií, jakožto jedním z nejrozšířenějších autoimunitních onemocnění, kterým se zabývá řada vědeckých týmů, přesto v České republice chybí dostatek populačních studií věnujících se této nemoci. Díky datům získaným z genetické laboratoře GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích, ÚHKT a VFN v Praze bylo možné se takovouto populační studií zabývat.

Annotation:

Autoimmune diseases require the interplay of internal (genetic) and external (environmental) factors to develop and erupt. The essential genetic factors include HLA alleles, whose carrying is associated with a significant predisposition to the development of a specific autoimmune disease.

This Master Thesis deals with the problematics of autoimmune diseases associated with HLA system. The practical part focuses on the examination of predisposing alleles related to celiac disease as one of the most widespread autoimmune disease, which many scientific teams are dealing with, but even in the Czech Republic there are not enough population studies of this disease. Thanks to data from genetic laboratory GENLABS s.r.o. in České Budějovice, ÚHKT and VFN in Prague it was possible to focus on such population study.

Klíčová slova:

HLA antigeny, autoimunitní onemocnění, celiakie, ancestrální haplotyp 8.1, HLA typizace.

Prohlašuji, že jsem diplomovou prací na téma „HLA typizace v klinické praxi – využití k testování predispozic k onemocněním autoimunitního typu“ vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne

.....

Bc. Dominika Veselá

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Dagmar Riegert-Bystrické Ph.D., která mi po celou dobu byla skvělým rádcem a trpělivě vedla každý můj krok k úspěšnému vypracování této práce. Zároveň děkuji, že mi umožnila uskutečnit veškeré experimenty v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. Dále děkuji paní Ing. Mileně Vrané a MUDr. Peteru Szitányi, Ph.D. za to, že mi tak neuvěřitelně pomohli a vyšli vstříc. Obrovský dík patří panu doc. Mgr. Janu Riegertovi, Ph.D. za nesmírnou pomoc se statistickým zpracováním dat. V neposlední řadě děkuji mým kamarádkám Lindě Jandové a Stanislavě Škopkové, s nimiž byla radost pracovat v laboratoři.

Také bych ráda poděkovala rodině a všem ostatním, kteří v tuto dobu stáli při mně a podporovali mne.

Obsah

1	ÚVOD	1
2	HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN (HLA)	2
2.1	HLA a jeho charakteristika.....	2
2.2	Klasifikace HLA	3
2.2.1	<i>HLA I. třídy</i>	4
2.2.2	<i>HLA II. třídy</i>	4
2.2.3	<i>HLA III. třídy</i>	5
2.3	Struktura a funkce HLA systému	5
2.4	HLA nomenklatura.....	6
2.5	Relativní a absolutní riziko	8
3	AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ	9
3.1	Faktory ovlivňující autoimunitu.....	9
3.2	HLA a autoimunitní choroby.....	10
3.3	Asociace HLA alel s konkrétními chorobami	12
4	CELIAKIE	13
4.1	Genetické pozadí.....	13
4.2	Imunologické pozadí	16
4.3	Gluten.....	17
4.4	Klinický obraz	19
4.5	Střevní a mimostřevní projevy celiakie.....	20
4.5.1	<i>Intestinální projevy (střevní)</i>	20
4.5.2	<i>Extraintestinální projevy (mimostřevní)</i>	21
4.6	Formy celiakie.....	21
4.7	Léčba.....	22
4.8	Komplikace celiakie.....	25
4.8.1	<i>Refrakterní celiakie</i>	25
4.8.2	<i>Malignity</i>	25
4.9	Koexistence s ostatními onemocněními	26
4.10	Možnosti vyšetření celiakie.....	28
4.10.1	<i>Biopsie</i>	28
4.10.2	<i>Sérologická imunologická laboratorní vyšetření</i>	29
4.11	Plošný vs. cílený screening celiakie	31

5	ANCESTRÁLNÍ HAPLOTYP 8.1	34
5.1	Spojitosť mezi ancestrálním haplotypem 8.1 a autoimunitními chorobami	35
5.1.1	Ancestrální haplotyp 8.1 a jeho spojitost s celiakií	36
6	HLA TYPIZACE V KLINICKÉ PRAXI	36
6.1	Sérologické metody typizace HLA	37
6.2	Molekulárně-genetická typizace HLA	38
6.2.1	SSP (Sequence-specific primers PCR; PCR se sekvenčně specifickými primery)	38
6.2.2	SBT (Sequence-base typing; metoda přímého sekvenování)	39
6.2.3	SSO (Sequence-specific oligonucleotide probes; PCR se sekvenčně specifickými oligosondami)	39
6.2.4	q-PCR (Real-time PCR)	40
6.2.5	NGS (Next Generation Sequencing)	41
7	CÍLE PRÁCE	45
8	METODIKA	46
8.1	TYPIZACE HLA-DQ MOLEKUL	46
8.1.1	<i>Odběr biologického materiálu</i>	46
8.1.2	<i>Izolace DNA z bučálního stěru</i>	46
8.1.3	<i>Izolace DNA z periferní krve</i>	49
8.1.4	<i>Měření koncentrace DNA</i>	50
8.1.5	<i>Příprava vzorků pro PCR reakci</i>	51
8.1.6	<i>Příprava SSP PCR</i>	52
8.1.7	<i>SSP PCR</i>	53
8.1.8	<i>Gelová elektroforéza SSP PCR produktů</i>	54
8.1.9	<i>Vizualizace a hodnocení výsledků gelové elektroforézy</i>	55
8.1.10	<i>Vizualizace výsledků gelové elektroforézy</i>	57
8.1.11	<i>Příprava q-PCR</i>	58
8.1.12	<i>q-PCR</i>	59
8.2	Vytvoření on-line dotazníku	61
8.3	Statistické vyhodnocení dat	61
9	VÝSLEDKY	63
9.1	Kazuistika pacientky K. K.	63
9.2	Vyhodnocení dat z on-line dotazníku	68
9.3	Sumarizace dat o pacientech laboratoře GENLABS s.r.o.	71
9.4	Distribuce rizikových HLA alel u klientů GENLABS s.r.o.	73

9.5	Sumarizace dat o pacientech ÚHK a VFN v Praze.....	74
9.6	Distribuce rizikových HLA alel u potvrzených celiaků	76
9.7	Vliv faktoru diagnózy na distribuci HLA alel v obou kohortách	77
10	DISKUZE.....	79
11	ZÁVĚR	85
12	SEZNAM AUTORŮ A CITACÍ.....	86
13	SEZNAM ZKRATEK	113
14	PŘÍLOHY	115
14.1	Tabulka onemocnění asociovaných s HLA systémem	115

1 ÚVOD

Autoimunita je stav, při kterém některá složka imunitního systému reaguje na struktury organismu vlastní a zpravidla je tím poškozuje. Takováto reakce následně způsobí autoimunitní onemocnění, kterých existuje celá řada. Jako příklad můžeme uvést revmatoidní artritidu, celiakii nebo ankylozující spondylitidu. Vznik a průběh těchto onemocnění je ovlivněn jak faktory vnitřními (genetickými), tak těmi vnějšími (environmentálními). Dá se říci, že teprve spolupůsobení těchto faktorů vyvolá patologickou reakci.

Některé vědecké studie potvrzují spojení mezi autoimunitními onemocněními a příslušnými HLA antigeny. Antigeny HLA jsou kódovány skupinou genů, která patří k hlavnímu komplexu tkáňové slučitelnosti (major histocompatibility complex – MHC). Mají významnou funkci v imunitním systému, neboť se podílejí na rozeznávání cizorodých struktur a vystavují je ke kontrole buňkám imunitního systému.

Téma diplomové práce je zaměřeno na sledování asociací mezi autoimunitními chorobami a příslušnými HLA antigeny a na detailnější studium problematiky celiakie, jakožto jednoho z nejběžnějších modelů sledujících výskyt autoimunitních chorob a konkrétních alel HLA systému. Navzdory velkému rozvoji studia závislosti mezi HLA systémem a autoimunitními chorobami v posledních několika letech, stále nejsou mechanismy těchto chorob dokonale prostudovány a vysvětleny.

V teoretické části jsem se zaměřila na charakteristiku HLA systému, jeho klasifikaci a význam v klinické praxi. Vedle toho jsem se pokusila o celistvý pohled na autoimunitní choroby a jejich asociaci právě s HLA antigeny.

Cílem praktické části bylo osvojení molekulární typizace HLA antigenů metodami SSP PCR a real-time PCR pomocí kitů určených k typizaci HLA na molekulárně genetickém základě a využívaných k diagnostice celiakie v klinických laboratořích. Dále bylo požadováno zvládnutí izolace DNA z buňkálního stěru nebo z periferní krve, což předcházelo vlastnímu testování HLA typizace.

expresi pojmenoval histokompatibilní geny (geny H). Následně Snell vypracoval postup, jak získat myši kmeny, lišící se pouze v jediném genu H, tzv. kongenně rezistentní myši. Přispěl tím k tomu, že se z myši stal naprosto jedinečný modelový organismus pro imunologii (Götze et al., 1981). Inspirován Snellovými pokusy na myších, pokusil se o totéž i francouzský imunolog Jean Dausset. První lidský MHC antigen identifikoval v séru pacientů, kteří opakovaně dostávali krevní transfúze, pomocí leukoaglutinační techniky. Soubor genů důležitých k rozeznání cizích povrchových struktur buněk označil jako HLA – human leukocyte antigen (Dausset et al., 1958). Na úplném počátku byl antigen pojmenován jako MAC podle iniciál příjmení pacientů, které Dausset testoval, později byl přejmenován na HLA-A (Carosella et al., 2009; Degos, 2009).

2.2 Klasifikace HLA

Hlavní histokompatibilní systém člověka (HLA) je skupina genů asociována s více chorobami než kterákoli jiná část lidského genomu. Souvisí to především s provázaností HLA systému s infekčními a mnohými autoimunitními chorobami. HLA systém se vyznačuje dvěma důležitými vlastnostmi, které ztěžují patogenům možnost obejít imunitní odpověď, aniž by byly rozeznány. Zaprvé je HLA komplex vysoce polygenní – obsahuje mnoho genů náležících do dvou HLA tříd, každý jedinec má tedy odlišnou sadu antigenních peptidů vázajících povrchové molekuly. Zadruhé, HLA systém je vysoce polymorfní – to znamená, že existuje více variant jednotlivých genů v rámci jedné populace (Janeway et al., 2001). HLA komplex pokrývá asi 0,13 % lidského genomu a vykazuje vysokou úroveň vazebné nerovnováhy (z angl. linkage disequilibrium – LD), která se liší napříč populacemi. Vysoký počet HLA alel poukazuje na to, že každý jedinec má téměř naprosto unikátní set antigenní peptidy prezentujících alotypických HLA molekul, a každá jednotlivá HLA alela má schopnost vázat odlišné peptidy (Shiina et al., 2009). HLA alely jsou přenášeny společně jako haplotyp, z důvodu těsné vazby na daném chromozomu, a jsou vůči sobě kodominantní. Rodič a potomek mají společný pouze jeden haplotyp, a proto sourozenci mohou být buď HLA *identičtí*, a to s 25 % pravděpodobností (tzn. sourozenci zdědí stejný haplotyp od otce i od matky), s 50 % pravděpodobností budou *haploidentičtí* (tzn. sourozenci mají jeden shodný haplotyp, a to buď otcovský nebo mateřský), nebo jsou sourozenci s 25 % pravděpodobností zcela *rozdílní* (tzn. sourozenci zdědí od otce i od matky jiný haplotyp) (Souček et al., 2011; Nussbaum et al., 2004). HLA geny kódují glykoproteiny, které jsou následně exprimovány na povrchu jaderných buněk organismu. Podle struktury a uspořádání dělíme jednotlivé HLA geny do tří tříd – HLA I. třídy, HLA II. třídy a HLA III. třídy.

2.2.1 HLA I. třídy

Molekuly HLA I obsahují veliký alfa řetězec, který je nekovalentně vázaný s mnohem menší β_2 mikroglobulinovou podjednotkou (Kopecký, 2013). Polymorfní těžký alfa řetězec je kódován HLA-A, HLA-B a HLA-C geny, označovanými jako *klasické* (Hanna et al., 2014), popřípadě HLA-E, HLA-F a HLA-G geny, označovanými jako *neklasické* (Hořejší & Bartůňková, 2005). Ke spojení těžkého řetězce s β_2 mikroglobulinovou podjednotkou dochází v endoplazmatickém retikulu (ER). HLA I molekuly prezentují antigenní peptidy T_C lymfocytům. Nacházejí se na povrchu všech jaderných buněk, ovšem v různé hustotě. Nejvíce je jich na lymfocytech, nejméně naopak na fibroblastech, svalových buňkách nebo hepatocytech (Kopecký, 2013). Hrají důležitou roli při imunitním sledování interakcí s buňkami CD8⁺ T a NK (natural killers – přirození zabíječi) (Hanna et al., 2014). K HLA I molekulám se vážou peptidy o délce 8-9 aminokyselin (AMK). Tyto peptidy jsou endogenního původu a jsou vybrané z bílkovin přítomných v buňce (Murray et al., 2005). Imunitní systém obecně toleruje vlastní HLA glykoproteiny I. třídy v komplexu s vlastními peptidy, zatímco proti cizím HLA I vzniká imunitní reakce (Cresswell et al., 1999).

Všechny buňky, na které se váží molekuly HLA I. třídy, mohou upozornit a mobilizovat T-lymfocyty a CD8⁺ T-lymfocyty v případě, že dojde k napadení buněk viry nebo je nějakým způsobem modifikuje nádor. Tato schopnost je nazývána HLA restrikce. HLA-G a HLA-E molekuly chrání plod před T a NK buňkami (Fučíková, 1995; Penka et al., 2012).

2.2.2 HLA II. třídy

HLA II molekuly obsahují dva odlišné polypeptidické řetězce označené alfa a beta. Oba jsou kódované D oblastí HLA komplexu, přičemž tato oblast se dělí na podoblasti DP, DQ a DR. Každá z těchto podoblastí obsahuje minimálně jeden alfa a jeden beta gen (Kopecký, 2013). HLA II molekuly jsou exprimovány pouze některými buňkami imunitního systému, označovanými jako antigen prezentující buňky (Holling et al., 2004). Mezi nejznámější antigen prezentující buňky patří dendritické buňky, Langerhansovy buňky, B lymfocyty a makrofágy (Rédei, 2008; Hořejší & Bartůňková, 2005). Hlavní funkcí molekul HLA II je prezentovat zpracované antigeny, které jsou odvozeny primárně z exogenních zdrojů, CD4⁺ T_h lymfocytům. Molekuly HLA třídy II jsou proto rozhodující pro iniciaci antigen-specifické imunitní odpovědi. Ukazuje se, že ligace molekul HLA II také aktivuje intracelulární signální dráhy, často vedoucí k apoptóze. Je zajímavé, že aktivované T buňky u mnoha

druhů, s výjimkou myši, syntetizují a exprimují molekuly HLA třídy II na svém buněčném povrchu (Holling et al., 2004). Signalizace zprostředkovaná HLA II molekulami může vést k proliferaci a diferenciaci antigen prezentujících buněk (APC). Signalizace HLA II se může podílet jak na zahájení, tak na ukončení imunitní odpovědi (Mourad et al., 1990). Buňky, které za normálních okolností neobsahují molekuly HLA II. třídy, je mohou navázat po indukci, což je důležitý fakt při objasňování asociace HLA a nemocí (Stites et al., 1994).

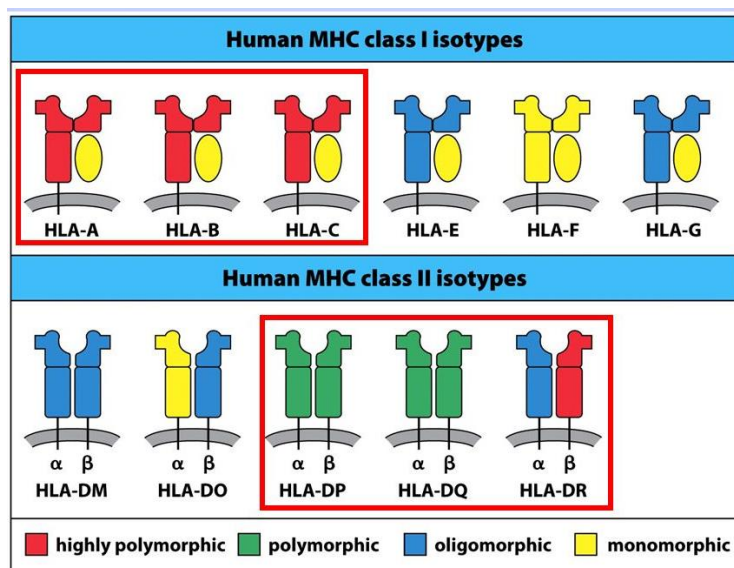
2.2.3 HLA III. třídy

Oblast HLA třídy III vykazuje nejvyšší hustotu genů, ale některé z nich nemají nic společného s imunitním systémem organismu. HLA III molekuly zahrnují několik složek komplementu a TNF α a β (Kopecký, 2013). Nedávno bylo popsáno několik genů nacházejících v oblasti telomer a tedy na konci molekul HLA třídy III, které jsou zjevně zapojené v některých specifických zánětlivých odpovědích. Tato oblast bohatá na geny byla nazvána třídou IV a zahrnuje rodinu TNF, AIF1 a HSP70 (Gruen et al., 2001). Čínští vědci taktéž prokázali spojitost mezi HLA třídou III a rizikem rakoviny prsu. Došli k závěru, že genetické polymorfismy v oblasti HLA třídy III jsou významně asociovány s ER-pozitivním karcinomem prsu v čínské populaci Han (Pan et al., 2012).

2.3 Struktura a funkce HLA systému

Hlavní funkcí molekul HLA neboli molekul tkáňové slučitelnosti je předkládat cizorodé antigenní fragmenty imunitním buňkám. Pokud je buňka lidského těla napadena patogenem, vznikají v rámci činnosti tohoto patogenu uvnitř buňky specifické chemické látky, které jsou vylučovány na povrch buňky a připojují se k HLA komplexu, kde jsou prezentovány imunitním buňkám ke kontrole (Murray et al., 2005). Vývoj humorální i buněčné imunitní odpovědi stojí a padá na aktivaci T_H buněk. Rozpoznání prezentovaného antigenu spolu s působením interleukinu 1 (IL-1) produkovaného aktivovanými makrofágy vede k aktivaci T_H buněk. Tato aktivace indukuje sekreci IL-2 T_h buňkami, které následně klonálně expandují a pomáhají aktivovat CTL (cytotoxické T lymfocyty) a taktéž stimulují B lymfocyty k tvorbě protilátek (Götze et al., 1981; Hořejší & Bartůňková, 2009; Kopecký, 2013). Burnet et al. ve své publikaci popsal teorii fyziologické funkce genů HLA: produkty genů HLA označují v organismu to, co je mu „vlastní“, tedy určují, proti kterým složkám imunitní systém reagovat nemá, pokud tato vlastní složka není nějakým způsobem pozměněna, např. výskytem nových epitopů (Burnet et al., 1970).

HLA antigeny I. třídy na sebe váží proteiny cytosolického původu. Mohou tedy vázat peptidy buňce vlastní, peptidy virového původu či peptidy původem z bakterií žijících v cytosolu (Kopecký, 2013). Buňce vlastní peptidy vystavené na HLA komplexu I. třídy nejsou antigenní, neboť cytotoxické T-lymfocyty (CTL), které by mohly rozeznat komplexy „HLA: vlastní peptid“, jsou v rámci procesu udržování tolerance vůči vlastním tkáním eliminovány nebo inaktivovány regulačními T-buňkami (Alberts et al., 2002). U molekul HLA II. třídy je scénář poněkud odlišný. V ER vznikají komplexy α a β řetězců s transmembránovým proteinem zvaným invariantní řetězec (Ii). Ten zablokuje vazebné místo pro antigen, takže se do něj nemohou navázat peptidy podobné těm, které se váží na HLA komplex I. třídy (Hořejší & Bartůňková, 2005). Geny náležící k HLA třídě III regulují složky komplementu účastníci se aktivace C3. Aktivovaná složka C3 se může vázat na makrofágy nebo B lymfocyty, aktivace vede k opsonizaci, a to způsobí uvolnění anafylatoxinu a vyvolá tvorbu chemoleukotaktických faktorů. Rovněž se aktivuje lytický řetězec komplementových enzymů C5 \rightarrow C9 (Götze et al., 1981). Obrázek 2 znázorňuje izotypy HLA třídy I a II.



Obr. 2: Izotypy HLA třídy I a II. (obrázek i popis převzat z Parham et al., 2014).

2.4 HLA nomenklatura

Nomenklaturou je myšleno názvosloví HLA systému. Stanovuje ji Nomenklatura komise Světové zdravotnické organizace (WHO). Využívají se dva typy nomenklatury (sérológická a molekulárně-genetická).

1. Sérologické názvosloví

Tato názvosloví je odvozeno od buněčného určování genových HLA produktů. Velkými písmeny jsou označeny lokusy (A, B, C, DR, DQ, DP) a číslem specifita antigenu. HLA antigeny posléze dělíme do tří skupin (Penka et al., 2012):

- Antigeny základní, např. A9, A10, B40, DR3
- Antigeny splitové, např. A9, jež je rozdělen na 23, 24. Dále např. A10, který je rozdělen na 25, 26 a 34
- Antigeny obecné, např. antigeny DR51, DR52, DR53 na lokusu DR.

2. Molekulárně-genetické názvosloví

Molekulárně-genetická nomenklatura určuje alelové sekvence nukleotidů. Toto názvosloví stanovuje HLA specifitu alespoň dvěma číslicemi, oproti nomenklatuře sérologické, podle které je značení maximálně dvoumístné (Penka et al., 2012; Krejsek et al., 2004).

• Molekuly HLA I. třídy

Modelovým příkladem je HLA-A*01:01, kde velká písmena označují lokusy, první dvě číslice po * určují sérologickou specifitu. Druhé dvě číslice určují specifickou alelu.

• Molekuly HLA II. třídy

U molekul HLA II. třídy je názvosloví složitější. Příkladem budiž DRB1*04:01. První písmeno označuje třídu, druhé rodinu, třetí α nebo β řetězec. Následující první dvě číslice za * označují sérologickou specifitu a poslední dvě konkrétní alelu (Penka et al., 2012).

Od roku 2010 platí nová pravidla týkající se především vizuální podoby zápisu jednotlivých HLA alel. Například od tohoto roku se mezi číslice označující sérologickou specifitu a ty, označující konkrétní alelu, píše dvojtečka (:) (A*010101 → A*01:01:01) (Marsh et al., 2010).

2.5 Relativní a absolutní riziko

Vztah mezi HLA antigeny a konkrétními chorobami se vyjadřuje pomocí relativního rizika (RR). Relativní riziko je ukazatel determinující vztah mezi expozicí rizikovému faktoru a zdravotním následkem (Bencko et al., 2002). Relativní riziko říká, kolikrát častěji se určitá choroba vyskytuje u osob s danou HLA alelou než u těch, kteří tuto alelu nenesou (Řeháček et al., 2013).

Relativní riziko (RR) se vypočítá podle následující rovnice:

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

(Stites et al., 1994)

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

c^- = počet kontrol, kterým chybí určitý antigen HLA

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

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

Platí, že pokud $RR = 1$, daný faktor nemá na vznik onemocnění vliv; $RR > 1$, expozice je **rizikovým** faktorem; $RR < 1$, expozice je **protektivním** faktorem.

Pravděpodobnost skutečného onemocnění u jedince nesoucího HLA antigen asociovaný s chorobou vyjadřuje absolutní riziko (AR). Je tedy definováno jako výskyt daného postižení v populaci. Absolutní riziko lze vypočítat podle následující rovnice:

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

(Stites et al., 1994)

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

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

P = výskyt nemoci v celé populaci

Podle Pavelky se asociace vyjadřuje dvěma způsoby:

- a) HLA alela se přímo účastní patogeneze onemocnění
- b) HLA alela s onemocněním nesouvisí přímo, účastní se jej pouze jako sekundární marker (Pavelka et al., 2003).

3 AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ

Autoimunitní onemocnění (AO) znamená imunitní odpověď organismu na složky pro něj vlastní – autoantigeny (Kopecký, 2013). Autoimunita je charakterizována zvýšenou intenzitou odpovědi proti vlastnímu, která provází vystupňovanou reaktivitu proti cizímu, jejíž příčinou je přechodná porucha, například vyvolaná infekcí nebo poraněním (da Silva et al., 1981). Autoimunitní onemocnění jsou způsobena poruchami imunologické regulační sítě, které se vlastními silami neupraví, naopak nakonec vyústí v patologický stav. Podmínkou vzniku autoimunitní choroby je prolomení autotolerance, tedy mechanismů udržujících imunitní reakci vůči vlastním tkáním ve fyziologických mezích (Hořejší & Bartůňková, 2005). Při vzniku AO dochází především k selhání mechanismů periferní tolerance. Tyto mechanismy jsou udržovány následujícími několika způsoby:

1. **Klonální delece** – během dozrávání imunokompetentních T a B lymfocytů jsou eliminovány ty, které by reagovaly s vlastními antigeny organismu.
2. **Klonální anergie** – ztráta nebo omezení reaktivity imunokompetentních buněk specifických proti vlastním antigenům.
3. **Periferní inhibice** – utlumení reaktivní imunokompetentní buňky jinými regulačními buňkami imunitního systému.
4. **Imunologické privilegium** – např. rohovka, kanálky varlete, myelinové pochvy – vytvoření bariéry, která brání průniku T lymfocytů. Popřípadě buňky těchto tkání na svém povrchu exprimují Fas-ligand, který se naváže na Fas-receptor aktivovaného T lymfocytu a navodí jeho apoptózu (Hořejší & Bartůňková, 2005; Pastor, 2006).

3.1 Faktory ovlivňující autoimunitu

Vývoj autoimunitních onemocnění je ovlivněn faktory vnějšími (léky, potrava, prach, infekce) a také faktory, které jsou organismu vlastní (věkové, thymové, imunodeficientní, genetické) (da Silva et al. 1981). Mnohá léčiva vyvolávají autoimunitní reakce, které obvykle vymizí po přerušení léčebné kúry. Taktéž virové a bakteriální infekce nebo plísňe mohou způsobit vznik AO vyvolaných především účinky revmatoidního faktoru a antinukleárních protilátek (Gershon et al., 1971). Další vysoce důležitou úlohu hrají faktory genetické. Cooperová ve své studii poukázala na vliv genetických faktorů na vznik autoimunitních onemocnění. Podle ní se polymorfismy více genů podílejí buď na poskytnutí predispozice

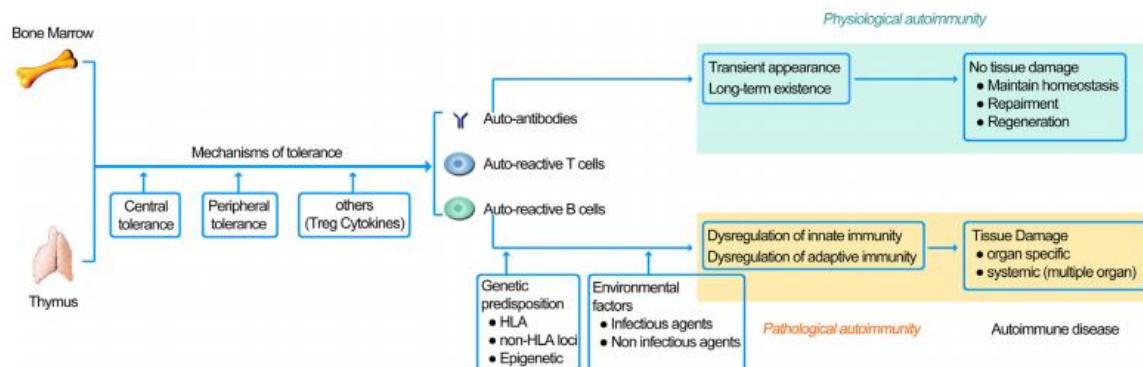
k AO nebo naopak k vytvoření ochrany proti těmto chorobám. Rodinné asociační studie uvádějí zvýšené riziko vzniku několika systémových autoimunitních onemocnění u příbuzných jedinců se systémovým AO. Tato asociace může odrážet společnou etiologickou cestu se sdílenými genetickými nebo environmentálními vlivy u těchto nemocí (Cooper et al., 1999). Genetické faktory hrají zásadní úlohu v patologii AO také z toho důvodu, že téměř u všech autoimunitních chorob lze prokázat preferenční výskyt určité alely HLA (da Silva et al., 1981). Podobně například prolaktin může mít důležité imunomodulační vlivy, které ovlivňují riziko vzniku autoimunitního onemocnění. Geny prolaktinu jsou lokalizovány v blízkosti HLA oblasti chromozomu 6 (Jara et al., 1992). Brennan a jeho kolegové taktéž uvádějí vztahy mezi genetickými markery blízko genu prolaktinu u pacientů se systémovým lupusem erythematosus (SLE), kteří měli také DRB1*03:01, a u pacientů s revmatoidní artritidou (RA), kteří měli DRB1*04:01. Tak může dojít k nerovnováze vazby mezi geny třídy I, třídy II a třídy III HLA a také mezi HLA geny a dalšími blízkými geny, které se přímo nezabývají imunitní regulací (Brennan et al., 1997).

3.2 HLA a autoimunitní choroby

Ve vědeckých studiích bylo popsáno mnoho onemocnění asociovaných s HLA geny (zejména s HLA geny I. a II. třídy). V nedávných několika letech se intenzivně studovala frekvence jednotlivých HLA polymorfismů u autoimunitních chorob. Za posledních 50 let bylo prokázáno, že polymorfismy lokusu MHC ovlivňují řadu kritických biologických znaků a citlivost jedince k autoimunitním i infekčním onemocněním (Matzaraki et al., 2017). Bylo zjištěno, že HLA geny hrají důležitou úlohu taktéž v neurologických onemocněních, v nichž jsou zahrnuty právě autoimunitní složky (International Schizophrenia Consortium, 2009).

Z hlediska autoimunity je důležité poznamenat, že i přes přísnou regulaci centrální a periferní tolerance může malé množství potenciálně samovolně reagujících lymfocytů stále „uniknout“ do periferie, a to dokonce u jinak zcela normálních a zdravých jedinců. Avšak existence těchto samovolně reagujících T a B lymfocytů a schopnost těchto buněk produkovat protilátky nemusí ještě nutně vést k patologické reakci (Salinas et al., 2013). Autoimunita může být klasifikována jako fyziologická a patologická. *Fyziologická* autoimunita bývá většinou přechodná bez prokázaného klinického onemocnění (Hang et al., 1997). To je dokázáno přítomností tzv. přirozené autoprotilátky (angl. natural antibody), která pomáhá eliminovat degradované vlastní nebo cizí antigeny v zájmu udržení homeostázy (Panda et al. 2015). O *patologické* autoimunitě mluvíme tehdy, je-li prolomena bariéra imunitní tolerance a autoprotilátky a samovolně reagující lymfocyty se podílí na

rozvoji patologické autoimunity, která nakonec vede k poškození tkáně (Hořejší & Bartůňková, 2009). Obrázek 3 znázorňuje vývoj autoimunitního onemocnění.



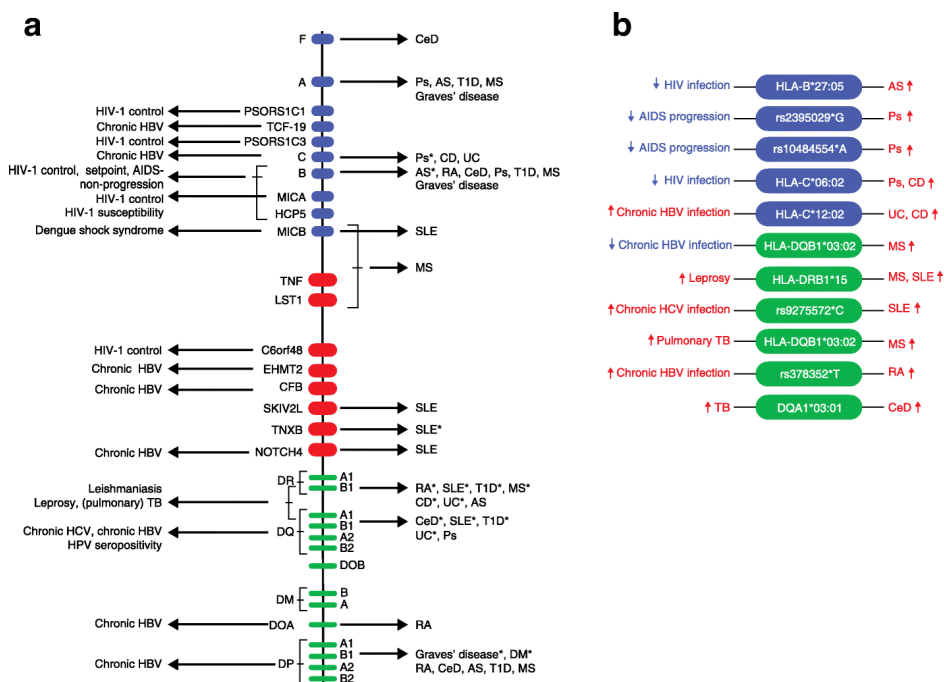
Obr. 3: Shrnutí vývoje autoimunitního onemocnění. *Dokonce i pod nejpřísnější kontrolou centrální a periferní tolerance, malý počet autoreaktivních T a B buněk "uniká" do periferie. Nicméně zůstávají neškodné, pokud neexistuje genetická predispozice k porušení tolerance. (Obrázek i popis převzat z Wang et al., 2015).*

Škála chorob asociovaných s HLA systémem je velmi rozsáhlá. Některá autoimunitní onemocnění jsou spojena jen s jednou konkrétní HLA alelickou skupinou, jako je tomu například u ankylozující spondylitidy a alely HLA-B27. Jiné choroby jsou naopak spojovány s polymorfismy více genů HLA I. a II. třídy, například u roztroušené sklerózy, narkolepsie nebo cukrovky 1. typu (Trowsdale, 2005). S určitou HLA molekulou není spojován jen výskyt daného autoimunitního onemocnění, ale taktéž stupeň závažnosti onemocnění a s tím související adekvátní odpověď na terapeutickou léčbu. Například u systémového lupus erythematoses (SLE) je haplotyp HLA-DRB1*03:01 - HLA-DQB1*02:01 asociován jak s manifestací onemocnění, tak se zvýšenou závažností choroby a pozitivitou autoprotilátek (Anaya et al., 2005; Mok et al., 2003). Pacienti s cukrovkou 1. typu a alelou HLA-DQB1*03:02 mají větší riziko vzniku autoimunitní thyreoiditidy (Sumnik et al., 2003). Dalším důležitým poznatkem je, že některé HLA molekuly jsou rizikové pro dané autoimunitní onemocnění, a jiné mohou být **protektivní**. K tomuto zásadnímu rozdílu mnohdy stačí minimální změna v aminokyselině. U ankylozující spondylitidy jsou alely B*27:01, B*27:04 a B*27:05 silně predisponovány pro AS (Khan et al., 2007; Khan et al., 2002), zatímco alely B*27:06 a B*27:09 jsou ochranné (Khan et al., 2002; Paladini et al., 2005), přičemž alela B*27:05 se liší od B*27:09 v jediné aminokyselině histidinu na pozici 116. O histidinu je známo, že mění peptidovou specificitu a rozpoznávání T buněk (Khan et al., 2007; Reveille

et al., 2006). Další důležitý faktor, který ovlivňuje frekvenci jednotlivých HLA haplotypů v asociaci s autoimunitními chorobami, je vazebná nerovnováha, která se ustavuje mezi HLA molekulami, a proto je určení správných genů, které s danou autoimunitní chorobou souvisejí, mnohdy opravdu složité.

3.3 Asociace HLA alel s konkrétními chorobami

Od objevu HLA antigenů zhruba před 60 lety byla jejich spojitost s konkrétními autoimunitními onemocněními široce studována. Bodis et al., poukazuje na to, že vzhledem k schopnosti HLA regionu ovlivnit thymickou selekci a periferní anergii T buněk, je jeho role v patogenezi autoimunity pochopitelná (Bodis et al., 2018). Právě Bodis a jemu podobní (např. Matzaraki et al., (2017), Cruz-Tapias et al., (2013) a mnozí další se rozhodli ve svých vědeckých studiích podat ucelený přehled autoimunitních chorob asociovaných s HLA antigeny. I já jsem se pokusila shrnout nabyté poznatky do přehledné tabulky. Inspirací mi přitom byl právě velice přínosný článek Matzarakiho a jeho kolegů, kteří předložili obsáhlý přehled častých i vzácnějších autoimunitních chorob asociovaných s HLA regionem. Kromě toho se zmiňují i o infekčních chorobách ovlivněných HLA antigeny (Matzaraki et al., 2017). Mnohé informace o významném alelovém sdružení histokompatibilních komplexů s autoimunitními a infekčními chorobami shrnuli v jediném schématu, jak lze vidět na obrázku 4.



Obr. 4: Asociace MHC komplexu s autoimunitními a infekčními chorobami. (Obrázek a popis převzat z Matzaraki et al., 2017).

Popis obrázku:

- a) Zkratky označené hvězdičkou naznačují autoimunitní onemocnění, které vykazuje nejsilnější souvislost se specifickým lokusem.
- b) Jednonukleotidové polymorfismy (SNP) a alely ve velkém histokompatibilním komplexu (MHC) sdíleném mezi autoimunitními a infekčními onemocněními. Modrá oblast zobrazuje alely MHC, které se nacházejí v oblasti I. třídy a zelenou barvou jsou zobrazeny oblasti II třídy. Modré šipky označují buď ochranný účinek genetické varianty proti infekčním onemocněním nebo pomalejší postup k infekční nemoci. Červené šipky naznačují zvýšenou náchylnost k odpovídající autoimunitní nebo infekční chorobě.

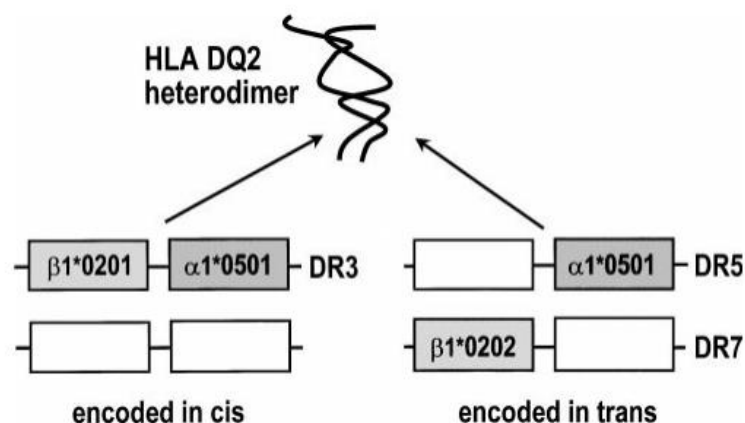
Zkratky: AIDS: syndrom získané imunodeficiency, AS: ankylozující spondylitida, CD: Crohnova nemoc, CeD: celiakie, DM: dermatomyozitida, HBV: virus hepatitidy B, HCV: virus hepatitidy C, HIV: virus lidské imunodeficiency, MS: roztroušená skleróza, Ps: psoriáza (=lupénka), RA: revmatoidní artritida, SLE: systémový lupus erythematosus, T1D: cukrovka typu 1, TB: tuberkulóza, UC: ulcerózní kolitida, HPV: virus lidského papilomaviru.

Má tabulka autoimunitních onemocnění asociovaných s HLA regionem je vložena v příloze (Příloha 1).

4 CELIAKIE

4.1 Genetické pozadí

Celiakální sprue (taktéž glutenová enteropatie) je autoimunitní onemocnění, které se řadí mezi primární malabsorpční syndromy a je podmíněno genetickou predispozicí. Charakteristická je pro něj porucha trávení a/nebo vstřebávání, v jehož důsledku vzniká chorobný stav vycházející z absence základních živin. Toto onemocnění je způsobeno konzumací jídla obsahujícího gluten s následnou imunitní odpovědí, charakterizovanou atrofií klků tenkého střeva a infiltrací lymfatických buněk, které sliznici střeva poškozují. Onemocnění bývá diagnostikováno zpravidla v dětském věku, nicméně může se projevit i v dospělosti (Klener, 2011). Charakteristická je přítomnost rizikové alely HLA – DQ2 nebo HLA – DQ8 (Hadithi et al., 2007). Obrázek 5 znázorňuje HLA – DQ2 heterodimer.



Obr. 5: Asociace celiakie s HLA-DQ2 lokusem. Více než 95 % pacientů jsou heterozygoti pro DR3 nebo pro DR5 a DR7, kódující HLA-DQ2 v cis nebo trans pozici. (Převzato z Schuppan, 2000).

Esenciální v případě tohoto onemocnění je sérotypová skupina DQ2. Její β řetězec je kódován alelickou skupinou DQB1*02, lokalizovanou na lokusu DQB1. Tento β řetězec se může kombinovat s nejrůznějšími typy α řetězců, a tím dát vzniknout rozličným DQ2 heterodimerům (Karrel, 2003). Mnohé studie, například ta od Megiorniho, ukázaly, že homozygotní nositelé DQB1*02 mívají vyšší riziko propuknutí celiakie a také daleko závažnější průběh onemocnění (Megiorni et al., 2012). Kromě DQ2 skupiny je ve vztahu k celiakii důležitá také skupina DQ8. Obě tyto skupiny jsou zajímavé a raritní v tom, že jejich vazebná místa přednostně vážou negativně nabitě peptidové fragmenty, tedy například gluten (Sollid et al., 2000).

Důležité ve vztahu k celiakii jsou alely DQB1*02:01 a DQA1*05:01 (Matzaraki et al., 2017), které jsou nalézány takřka u 90 % pacientů s tímto onemocněním (Medrano et al., 2012). Tyto alely mohou být zděděny společně (tj. na stejném chromozomu, DQ 2.5 *cis*), a pak mluvíme o *cis* konfiguraci. Nebo mohou být poděděny odděleně (tj. na homologních chromozomech, od každého rodiče jedna, DQ 2.5 *trans*), v tom případě hovoříme o *trans* konfiguraci (Schuppan, 2000; Medrano et al., 2012). Většinou jsou alely DQB1*02 a DQA1*05 prezentovány v *cis* konfiguraci společně s genem DRB1 (DRB1*03:01 - DQB1*02:01 - DQA1*05:01) nebo také v *trans* konfiguraci (DRB1*11/12 - DQB1*03:01 - DQA1*05:05; DRB1*07 - DQB1*02:02 - DQA1*02:01 (Megiorni et al., 2012). Alely DQA1*05, DQB1*02 a DRB1*03:01 mohou být přítomny ve dvou různých haplo-specifických variantách a tvoří tzv. ancestrální haplotypy (AH) 8.1 a (AH) 18.2 (Medrano et al., 2012). Haplotyp AH 8.1 je spojen mimo jiné s onemocněním HIV, náchylností k inzulin-

dependentnímu diabetu mellitu (IDDM), systémovému lupus erythematosus (SLE), dermatitis herpetiformis, myasthenia gravis a několika dalšími chorobami (Price et al., 1999). Podle Santiaga et al. je haplotyp AH 18.2 přednostně spojen s citlivostí k diabetu 1. typu. Na tomto haplotypu popsali vysoce konzervovanou oblast mezi DDR1 a HLA-DQA1 geny. Porovnání haplotypů AH 18.2 a AH 8.1 ukázalo, že 233 SNP oblasti byly ve výše uvedené konzervované oblasti odlišné. Tato data naznačují, že oblast MHC na haplotypu AH 18.2 mezi geny DDR1 a HLA-DRA pravděpodobně nese další alely asociované s náchylností k T1D (Santiago et al., 2009).

Studie podle Medrana a kolegů z roku 2012 ukazuje HLA vliv na rozvoj celiakie tzv. efektem dávky (z angl. dose effect). Jedinci mohou mít klasifikovanou náchylnost k onemocnění podle množství alel DQA1*05 a DQB1*02, které nesou. Homozygoti pro alely DQA1*05 a DQB1*02 (DQ 2.5) v *cis* konfiguraci a heterozygoti mající stejnou kombinaci alel v *cis* konfiguraci, doplněnou o nosičství alely DQB1*02 na druhém chromozomu (tedy DQ2.5/DQ 2.2) vykazují jedno z nejvyšších rizik propuknutí celiakie (Medrano et al., 2012), společně s kombinovaným haplotypem DQ2.5/DQ2.5 (Almeida et al., 2016). Střední náchylnost je pozorována u jedinců, kteří mají alely DQB1*02:01 a DQA1*05:01 v *cis* konfiguraci bez nosičství alel DQB1*02:02 a DQA1*02:01, tedy s jednou kopií DQB1*02 (Medrano et al., 2012).

Medrano dodává, že molekula HLA DQ8 (DQA1*03 - DQB1*03:02) se vyskytuje u všech pacientů s celiakií, kteří nenesou DQ2.5. Almeida et al. ve své studii postulují, že nosičství samotného haplotypu DQ8 představuje poměrně nízké riziko propuknutí celiakie, zatímco DQ8 v kombinaci s DQ2.5 představuje třetí nejvyšší riziko (Almeida et al., 2016). Některé studie se zaměřují také na prokázání skutečnosti, že celiakie není pouze záležitostí faktorů kódujících DQ2 a DQ8, ale na rozvoj onemocnění mají vliv i jiné faktory (Medrano et al., 2012). De la Concha ve své studii zmiňuje například některé varianty genu TNF, patřící do HLA III. třídy, které mohou být brány jako nezávislé faktory DQ2 pro citlivost k celiakii. Stejně tak mohou být dodatečným rizikovým faktorem v souvislosti s AH 8.1 (de la Concha et al., 2000).

Podstatou onemocnění je geneticky podmíněná porucha slizniční imunity. Po průniku složek glutenu střevní sliznicí dojde k jejich deaminaci tkáňovou transglutaminázou (TG2). V lymfatické tkáni gastrointestinálního traktu (GIT) se vytvoří protilátky, které mají zkříženou reaktivitu s antigeny enterocytů střevní sliznice (Kohout, 2008). Samotné

poškození střevní sliznice se děje za účasti T-lymfocytů. Výsledkem je atrofizace sliznice s poruchou absorpce (Tlaskalová – Hogenová et al., 1999; Martucci et al., 2002).

4.2 Imunologické pozadí

Základní procesy celiakie se odehrávají na sliznici tenkého střeva. V důsledku imunologických reakcí je pozorován vývoj zánětlivého procesu s typickými histopatologickými lézemi. V patogenezi celiakie je nesmírně důležitá imunologická buněčná odpověď s významnou rolí T lymfocytů. Podle jedné hypotézy je v této nemoci postulována neproliferační aktivace CD4 + lymfocytů *lamina propria* a proliferační aktivace intraepitelových TcR α / β CD8 + a TcR γ / δ lymfocytů. V imunologické reakci na gluten jsou kromě T lymfocytů zahrnuty i další buňky (lymfocyty B, NK buňky, neutrofil, eozinofily, makrofágy, mastocyty). V patogenezi celiakie je často zdůrazněna účast cytokinů produkovaných lokálně v tenkém střevě (Muller et al., 2005). Lundin et al. dodává, že CD4+ paměťové T buňky rozeznávají specifické lepkové peptidy, mohou být izolovány z biopsie postižených střev. Navíc tyto gluten-specifické T lymfocyty používají DQ2 molekuly (popř. DQ8 molekuly u DQ8 pozitivních pacientů) jako své restriční elementy (Lundin et al., 1993). Dietrich et al. přišel s poznatkem, že celiakie má specifickou autoimunitní složku charakterizovanou výskytem autoreaktivních protilátek specifických pro celiakii. Titry těchto autoprotiátek kolísají na základě přijímání glutenu ve stravě. V roce 1996 Dietrich a kolegové prokázali, že tyto autoreaktivní sérové IgA protilátky jsou zaměřeny na enzymovou tkáňovou transglutaminázu (tTG) (Dietrich et al., 1996).

Nejzásadnější vlastností tTG a dalších transglutamináz je katalyzovat složku specifického glutaminového zbytku v substrátovém proteinu na primární amin. Akceptorový amin může být buď protein-vázající lyzin nebo polyamin. Folk uvádí, že reakce mezi substrátem a tTG probíhá ve dvou odlišných krocích (Folk, 1983). Prvním krokem je vazba Gln aminoskupiny od substrátu ke katalytickému místu tTG, po němž následuje uvolňování NH_3 a vznik substrát-enzymového meziprojektu. Druhým krokem je reakce mezi substrátem a dostupným aminem, nebo v nepřítomnosti aminů, reakce s H_2O . Pokud substrát reaguje s H_2O , dojde k deaminaci reaktivního Gln za vzniku kyseliny glutamové (Glu). Je třeba poznamenat, že reakce s H_2O probíhá pomaleji než reakce s akceptorovými aminy (Folk et al., 1968). Důležité je, že výsledkem dvoustupňové reakce mezi tTG a substrátem je vždy posttranslační modifikace specifického Gln zbytku v substrátu (Molberg et al., 2000).

TG2 je většinou zadržována intracelulárně v inaktivní formě a je aktivována teprve po svém uvolnění během poškození tkáně (Lorand et al., 2003; Siegel et al., 2008). Přestože reakce CD4⁺ T lymfocytů proti nativním glutenovým peptidům jsou poměrně vzácné, mohly by představovat první porušení perorální tolerance k lepku. Prezentace nativních glutenových peptidů HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8 molekulami CD4 + T buňkám vede k produkci IFN- γ . Produkce IFN- γ následně vede k vyšší expresi molekul HLA-DQ, a tím také ke zvýšené glutenové peptidové prezentaci. V přítomnosti lepku dochází k poškození tkáně, která vede k uvolnění TG2, modifikující nativní glutenové peptidy ve vysoce afinitní ligandy pro HLA-DQ2 a/nebo HLA-DQ8, čímž se rozšíří gluten-specifická CD4⁺ T buněčná reakce, vedoucí k dalšímu poškození tkáně (Tjon et al., 2010).

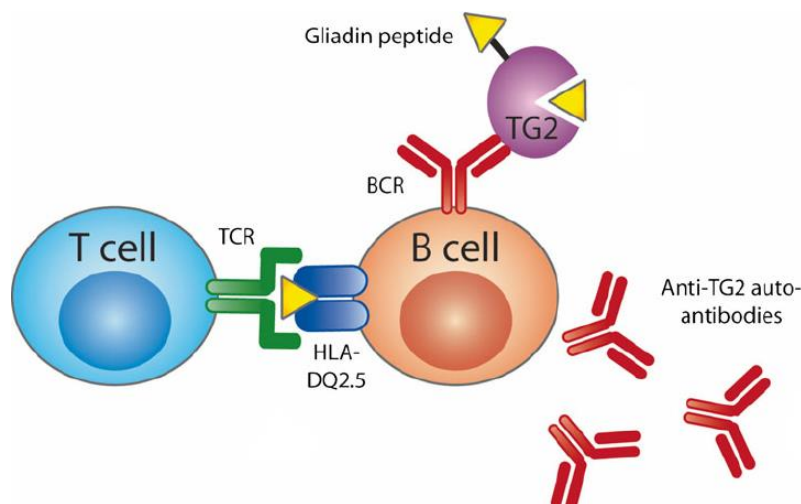
4.3 Gluten

Gluten (neboli lepek) je směs proteinů souhrnně nazvaných prolaminy a gluteliny (Food and Drug Administration, 2007; Biesiekierski, 2017), jež jsou společně se škrobem uloženy v endospermu různých obilných zrn. Najdeme je v pšenici, ječmeni, žitě a jejich příbuzných druzích, stejně tak jako u hybridů, jakým je například špalda (Biesiekierski, 2017). Pšeničné, ječmenné, žitné a ovesné prolaminy jsou označovány jako gliadiny, hordeiny, sekaliny a aveniny. Tyto třídy bílkovin jsou pak souhrnně označovány jako lepek (Biesiekierski, 2017). Pravý lepek je omezen na výše uvedená zrna. Bílkoviny kukuřice a rýže jsou někdy nazývány glutény, ale liší se od skutečného lepku (Food and Drug Administration, 2007).

Nezanedbatelné procento populace vykazuje senzibilitu na lepek, která může vést k rozvoji onemocnění souhrnně označovaných jako „choroby související s glutenem“ neboli „gluten-related disorders“. Vedle celiakie zahrnují i ‚neceliakální‘ přecitlivělost na lepek (NCGS: non-celiac gluten sensitivity), alergii na pšenici, glutenovou ataxii a dermatitis herpetiformis (Ludvigsson et al., 2013). V současné době se jejich výskyt zvyšuje ve většině geografických oblastí světa (Tovoli et al., 2015; Lionetti et al., 2015). To lze vysvětlit rostoucím westernizováním stravy (Tovoli et al., 2015), tzn. přechodem od neupravované přirozené stravy k stravě technologicky zpracovávané, chemicky upravované a energeticky vydatné (Perlín, 2008). Dále rostoucí konzumací potravin na bázi pšenice, které jsou součástí středomořské stravy (Volta et al., 2013), postupným nahrazováním rýže pšenicí v mnoha zemích Asie, a také střední, východní a severní Africe (Tovoli et al., 2015), vývojem nových druhů pšenice s vyšším množstvím cytotoxických glutenových peptidů v posledních letech, a

také vyšším obsahem glutenu v pečivu z důvodu snížení doby kynutí těsta (Volta et al., 2013).

Jak HLA-DQ2, tak HLA-DQ8 přednostně váží do svého vazebného místa negativně nabitě peptidové fragmenty. Nativní gluten tyto složky sice neobsahuje, přesto má schopnost se na HLA alely vázat. Sice ne příliš, ale zřejmě dostatečně na to, aby aktivoval protein TG2. Klíčovou roli v patogenetickém procesu vedoucím k enteropatii hraje tento protein nazvaný transglutamináza 2 (TG2), který je schopen enzymaticky modifikovat gliadinové peptidy odvozené od glutenu. TG2-katalyzovaná deamidace gliadinových peptidů vede k jejich zvýšené vazebné afinitě k molekulám DQ2 a DQ8, což umožňuje zahájit silnou imunitní odpověď, konkrétně nadprodukcí IFN- γ (Rauhavirta et al. 2016). Obrázek 6 znázorňuje gluten-dependentní produkci TG2 protilátek.



Obr. 6: Gluten-dependentní produkce specifických TG2 protilátek. (Obrázek převzat z Qiao et al., 2012).

Bylo zjištěno, že řada sekvencí z α , γ a ω gliadinů, stejně jako z gluteninů, aktivuje celiakii. Předpokládá se, že několik stovek glutenových peptidů je imunogenních a vyvolávají reakci zprostředkovanou T-buňkami. Nejvíce imunodominantní T-buněčný epitop pochází z α gliadinu, ačkoliv se předpokládá také T-buněčná zkřížená reaktivita proti glutenu odvozeného ze sekulinu a hordeinu. Navíc v každém zrně existuje zřetelná hierarchie imunostimulačních glutenových peptidů (Arentz-Hansen et al., 2002). Ze všech peptidů, o kterých je známo, že stimulují T-buněčnou odpověď u celiakie, může každý pacient reagovat pouze na několik z nich (Biesiekierski et al., 2017). Otázkou tedy zůstává, proč ze všech proteinů, kterým je lidské tělo vystaveno během denního příjmu potravy, právě gluten vyvolává imunitní odpověď, která vede k atrofizaci střevní sliznice. Sollid a kolegové

předkládají dvě možná vysvětlení. Zaprvé, gluten může působit jako adjuvans, které zesiluje imunitní odpověď a reakci T-lymfocytů. Zadruhé, *lamina propria* tenkého střeva obsahuje veliké množství T-lymfocytů, které se následně účastní patologického procesu celiakie. Peptidy lepku díky tomu, že jsou deamidovány TG2 a složeny z 9 a více aminokyselin (což je minimální délka peptidu požadovaná pro rozpoznání T-lymfocytů), dosahují této vrstvy tenkého střeva více než jiné proteiny získané z konzumovaného jídla (Sollid et al., 2002).

4.4 Klinický obraz

U nemocných s celiakií lze diagnostikovat histologické abnormality tenkého střeva, kupříkladu atrofii klků, prohloubení Lieberkühnovy krypty nebo vzrůst mitotického indexu (Intraepiteliální lymfocyty – IEL). Charakteristická je také infiltrace *lamina propria* plazmatickými buňkami, lymfocyty, mastocyty, bazofily a eozinofily. U epitelových buněk dochází při postižení celiakií dokonce až k vymizení kartáčového lemu a kuboidální výstelky (Husby, 2012).

Klinické projevy dělíme na intrainestinální, tj. postihující střevo, a extraintestinální, tj. mimostřevní. Manifestace celiakie je jiná u dětí a dospělých. Zatímco v dětském věku pozorujeme především rozsáhlé poškození tenkého střeva v oblasti dvanáctníku (jejuna), u dospělých bývá střevní poškození ložiskové (tj. lokalizované v proximálních částech). Z toho důvodu bývají u dospělých příznaky většinou atypické nebo je jejich míra projevu malá (Češka, 2010). Ačkoli zánětlivý proces se specificky zaměřuje na střevní sliznici, pacienti mohou vykazovat další gastrointestinální příznaky, případně ještě jiné extraintestinální symptomy, popřípadě obojí, což naznačuje, že se jedná o systémové onemocnění. Leonard et al. ve své studii poukazuje na to, že není dobré plést si celiakální sprue s obdobnou „neceliakální“ přecitlivělostí na lepek. Citlivost na lepek se diagnostikuje u jedinců, kteří nemají celiakii nebo alergii na pšenici, ale přesto mají střevní příznaky, extraintestinální příznaky nebo obojí, což souvisí s požitím zrněk obsahujících lepek, a které se projeví symptomatickým zlepšením po jejich vysazení z jídelníčku. Vždy musí být proveden screening celiakie před zavedením bezlepkové diety, protože jakmile pacient zahájí bezlepkovou dietu, vyšetření na celiakii již není přesné. Celiakální onemocnění a citlivost na lepek jsou častá onemocnění. Přestože oba stavy jsou zpravidla ošetřeny bezlepkovou dietou, je pro dlouhodobou léčbu důležité rozlišovat mezi celiakií a nesnášenlivostí lepku. Pacienti s celiakií by měli být pečlivě sledováni, pokud jde o adherenci, výživové nedostatky a vývoj možných komorbidit (Leonard et al. 2017). Nutno podotknout, že i ve zdravé populaci je prevalence HLA-DQ2 celkem vysoká (zhruba asi 25 % - 30 %), přičemž ale celiakie se

vyvine zhruba u 1 % nositelů této alely. To naznačuje, že v patogenezi celiakie hrají důležitou roli i jiné faktory, nesouvisející s HLA regionem (Schuppan, 2000).

Nedávné studie prokázaly, že na rozvoji onemocnění se vysokou měrou podílí také změna střevní mikroflóry. Z dostupných údajů vyplývá, že konkrétně změny v bakteriálních kmenech *Firmicutes* (Nistal et al., 2012; Olivares et al., 2015) a *Bacteroidetes* (Sellitto et al., 2012) v horní části tenkého střeva a následně i ve fekální flóře jsou spojeny s progresí celiakie. Toto neplatí pouze pro celiakální sprue. Změny ve střevním mikrobiómu předcházejí nástupu diabetu 1. typu (T1D) a jsou také spojeny s progresí onemocnění (Dunne et al., 2014). Je zajímavé, že u revmatoidní artritidy (RA) jsou perorální, např. *Porphyromonas gingivalis* (Martinez – Martinez et al., 2009) a *Prevotella nigrescens* (Moen et al., 2006) a intestinální, např. *Bacteroidetes* a *Bifidobacterium* (Vaahtovuori et al., 2008; Scher et al., 2013) mikrobiota korelována s nástupem a průběhem onemocnění. Nedávné údaje ukázaly, že změny v kolonizaci segmentovaných vláknitých bakterií ovlivňují autoimunitu dokonce i v dospělosti.

4.5 Střevní a mimostřevní projevy celiakie

Mezi klasické příznaky u dosud neléčených celiakiů patří bledá, objemná a mastná stolice (steatorrhoea) a ztráta hmotnosti (respektive nemožnost přibrat). Jiné symptomy mohou být mírné nebo primárně se vyskytující u jiných orgánů než u samotných střev (Schuppan, 2013).

4.5.1 Intestinální projevy (střevní)

Mohly by být nazvány spíše gastrointestinální, neboť mnohdy se netýkají pouze střev. Průjem je chronický, bledý, značného objemu a s abnormálně velkým zápachem. Lze si povšimnout bolesti a křečí v břiše, nadýmání s abdominální distenzí (je zřejmě způsobeno fermentační produkcí střevního plynu) a vředů v ústech (Ferguson, 1976). Projevy bývají často připisovány syndromu dráždivého tračníku (Irritable Bowel Syndrome – IBS), který je později vyvrácen diagnózou celiakie. Malá část populace s příznaky IBS trpí klasickou celiakií a u osob s IBS příznaky se velmi doporučuje provést screening celiakie (National Institute for Health and Clinical Excellence, 2008). Dlouhodobá a neléčená nemoc může vést k dalším komplikacím, jako je ulcerózní jejunitis (tvorba vředů v tenkém střevě) a zúžení (v důsledku obstrukce střeva) (American Gastroenterological Association, 2001). U dospělých se navíc může v důsledku celiakie vyvinout tzv. **malabsorpční syndrom**. Změny ve střevě znemožňují efektivně absorbovat živiny, minerály a vitamíny A, D, E a K rozpustné v tucích

(De Sabatino et al., 2009). Neschopnost absorbovat sacharidy a tuky vede ke snížení váhy (nebo selhání růstu až zastavení růstu u dětí) a únavě z nedostatku energie. Anémie se může rozvinout několika způsoby: malabsorpce železa může způsobit anémii z nedostatku železa a malabsorpce kyseliny listové a vitamínu B12 může vyvolat megaloblastickou anemii. Neefektivní vstřebávání vápníku a vitamínu D (popř. kompenzační sekundární hyperparatyreóza) může způsobit osteopenii (snížený obsah minerálů v kostech) nebo osteoporózu (oslabení kostí a riziko zlomenin). Nedostatek mědi a zinku je také spojen s rizikem celiakie (Pietzak, 2014).

4.5.2 Extraintestinální projevy (mimostřevní)

Mezi časté mimostřevní projevy patří již zmíněná anémie z nedostatku železa v důsledku malabsorpce železa a mikroskopických ztrát krve (Fine et al., 1996). Z reprodukčních poruch je důležité zmínit časný nástup menopauzy a riziko neplodnosti. Ženám trpícím nediagnostikovanou celiakií hrozí potrat, narození mrtvého dítěte a vyšší novorozenecká úmrtnost (Ciacci et al., 1996). Mezi neurologické projevy související s celiakií patří periferní neuropatie, demence, deprese a migrény (Martucci et al., 2002; Lukáš, 2007). Potíže u dětí jsou odlišné od obtíží u dospělých. Dětské problémy lze definovat celkovým neprospíváním, menším vzrůstem dítěte, poruchami chování, opožděným vývojem, únavou, nezájmem o okolí a opožděnou pubertou. Další potíže mohou manifestovat v podobě křivice, defektů postihujících chrup a chronického průjmu (Lukáš, 2007; Iwańczak et al., 2013).

4.6 Formy celiakie

V současné době rozeznáváme 5 forem celiakie, lišících se od sebe charakterem, intenzitou obtíží, anamnézou a histologickým nálezem na sliznici tenkého střeva (Frič, 2008).

Klasická – detekovatelné protilátky v krvi, pozitivní biopsie, klasické příznaky, tj. u dětí opožděný růst, průjmy, celkové neprospívání, nedostatek vitaminů a minerálů, objemné stolice s příměsí tuku u dospělých, bolesti břicha a hubnutí.

Atypická – projevuje se převážně mimo zažívací trakt (jako anémie z nedostatku železa), avšak protilátky v krvi a pozitivní biopsie celiakii potvrdí.

Silentní (tichá) – žádné příznaky, ale biopsie je pozitivní. Pokud celiakie není rozpoznána, dochází později ke komplikacím. Ohroženou skupinou jsou příbuzní celiaků.

Latentní – pozitivní protilátky v krvi, biopsie normální. Příznaky nejsou. I zde se doporučuje dodržovat bezlepkovou dietu.

Potenciální – i tato forma je bezpříznaková. Je zde možnost negativity protilátek a jedinou známkou onemocnění je zvýšené množství IEL v histologickém nálezu (Lukáš, 2007).

Tabulka I shrnuje poznatky k jednotlivým formám celiakie.

Tab. I: Jednotlivé formy celiakie.

Forma	Biopsie	Protilátky	Příznaky
Klasická	Ano	Ano	Ano
Atypická	Ano	Ano	Mimostřevní
Silentní = tichá	Ano	Ano	Ne, často RA
Latentní	Ano	IEL	Ne
Potenciální	Ano/ne	IEL/nic	Povětšinou ne

Ano – pozitivní

Ne – negativní (nevyskytují se)

IEL – intraepiteliální lymfocyty

RA – rodinná anamnéza (Frič, 2008).

Jednotlivé formy celiakie mohou přecházet jedna v druhou (Lukáš, 2007).

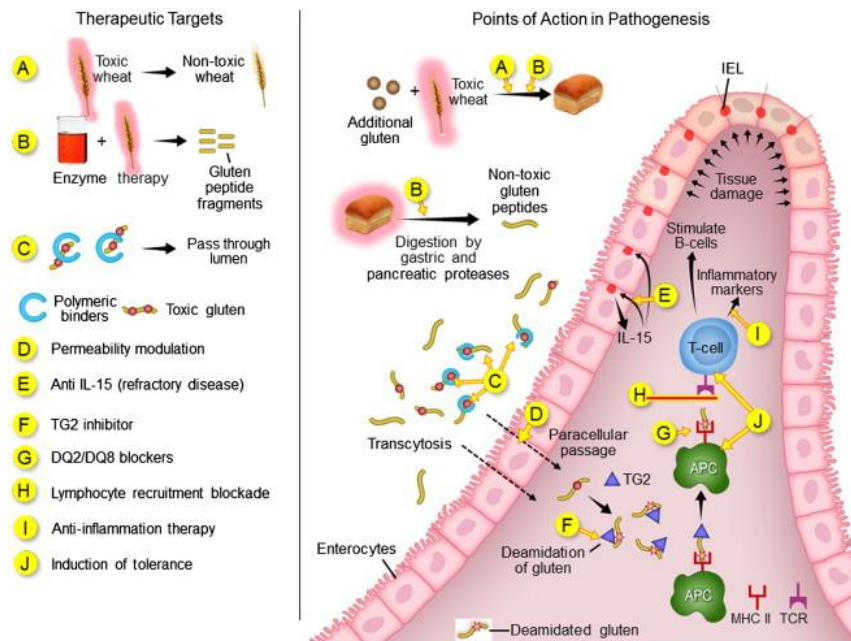
4.7 Léčba

Vzhledem k recentním poznatkům zůstává stále nejrozšířenější (a v mnohých případech také jedinou) možností léčby celiakie **bezlepková dieta**. Musí být dodržována striktně a mnohdy i celoživotně. Na základě doporučení FDA (Food and Drug Administration, USA) se za bezlepkové potraviny považují ty, které obsahují méně než 20 ppm glutenu (v přepočtu 20 mg glutenu na 1 kg potraviny). Spotřeba 200 mg denně lepku po dobu 4 týdnů u pacientů s celiakií byla spojena s rozvojem patologických změn na sliznici tenkého střeva (Catassi et al., 1993). V jiné studii spotřeba 10-50 mg glutenu denně po dobu 3 měsíců rovněž vyústila ve střevní histologické abnormality (Catassi et al., 2007). V dalších studiích však bylo průměrné denní požití 34-36 mg lepku poměrně dobře tolerováno (Kaukinen et al., 2000). To naznačuje, že tolerance lepku je mezi pacienty velmi variabilní.

Zcela jistě je nutné vyloučit mouku pšeničnou, žitnou, ječnou, včetně těch potravin, které tyto složky obsahují i v malém množství – omáčky, konzervy, uzeniny, pivo. Na vhodnost ovesných produktů není názor zcela vyhraněný. Doporučuje se zpočátku je také vynechat, později je zkusit konzumovat, ale jen omezeně (Češka, 2010).

Pokročilé porozumění molekulárním mechanismům v patofyziologii celiakie vede ke stále detailnější identifikaci patologických mechanismů, na které je možné cílit moderní terapeutické strategie. Atraktivní alternativou striktní bezlepkové diety by mohla být modifikace pšeničných kmenů, postrádajících imonumodulační glutenové peptidy, ale schopných zachovat si uspokojivé kvality zpracování příslušných potravin. Toho by se dalo dosáhnout prostřednictvím genového inženýrství vymazáním toxické glutenové sekvence (Nehra et al., 2014). Di Cagno postuluje, že některé laktobacily mají peptidázy, které dokáží hydrolyzovat glutenové peptidy bohaté na prolin v pšeničné mouce, včetně imunologicky potentního 33 - mer peptidu z α_2 -gliadinu, a tím se snižuje jejich imunogenicita. Proteolýza pšeničné mouky kyselinou mléčnou má za následek značnou, ale ne úplnou, hydrolýzu pšeničných gliadinů (Di Cagno et al., 2002). Shan a Hausch dodávají, že gliadin a další prolaminy jsou částečně odolné vůči degradaci střevními peptidázami kvůli jejich vysokému obsahu prolinů a glutaminu. K neefektivnímu trávení těchto bílkovin dochází proto, že obě gastrointestinální peptidázy vykazují špatnou afinitu k sousedním peptidovým vazbám přilehlým k prolinu a glutaminu, což vede k akumulaci imunogenního 33 - mer a 26 - mer oligopeptidového fragmentu (Shan et al., 2002; Hausch et al., 2002). Detoxifikace glutenu orálně podávanými enzymy je atraktivní alternativou bezlepkové diety (GFD). Glutenázy pak fungují jako endopeptidázy se schopností efektivně zaměřit prolinové a glutenové peptidové fragmenty a převést je v neimunogenní složky u vnímavých jedinců (Nehra et al., 2014).

Další alternativy léčby/prevence celiakie jsou znázorněny na obrázku č. 7.



Obr. 7: Terapeutické cíle léčby celiakie. (Obrázek a popis převzaty z Nehra et al., 2014).

Popis obrázku:

(A) Netoxická pšenice: generace druhů pšenice, které postrádají imunogenní glutenové peptidy.

(B) Enzymová terapie: detoxikace glutenových peptidů enzymatickou složkou nebo ošetření pšeničné mouky mikrobiálními proteázami.

(C) Polymerní pojiva: omezují toxicitu glutenu tím, že zabraňují degradaci a absorpci.

(D) Modulace permeability: antagonisté zonulinu (larazotid) inhibují zvýšenou permeabilitu vyvolanou gliadinem inhibicí uvolňování zononinu blokadou receptoru.

(E) Anti IL-15: glutenové peptidy vyvolají vrozenou imunitní odpověď vyvoláním exprese IL-15 a interakce mezi epiteliálním MIC a NKG2D receptorem na povrchu intraepitellového lymfocytu. Tato interakce ligand-receptor indukuje epiteliální apoptózu stimulací cytotoxických T lymfocytů.

(F) inhibitory TG2: gliadin peptidy jsou deaminovány TG2 v lamina propria. Blokáda TG2 může inhibovat adaptivní imunitní odpověď.

(G) blokáda HLA: zabraňuje vazbě gliadinových peptidů na HLA DQ2 nebo DQ8 na povrchu buněk prezentujících antigen.

(H) Inhibice náboru T-lymfocytů: blokuje migraci imunitních buněk do střevních tkání.

(I) Anti-cytokinová terapie: protilátky proti IFN- γ a TNF- α produkované v reakci na aktivaci T-buněk snižují poškození sliznice u celiakie.

(J) Indukce imunitní tolerance: vakcína s imunologickými glutenovými peptidy.

4.8 Komplikace celiakie

4.8.1 Refrakterní celiakie

Refrakterní celiakie (RCD) je definována perzistujícími a opakujícími se malabsorpčními příznaky i přes striktní dodržování GFD (z angl. Gluten free diet, bezlepkové diety) po dobu nejméně 6–12 měsíců bez přítomnosti jiných zjevných příčin. Symptomy refrakterní celiakie mohou být poměrně vážné a vyžadují další terapeutické zákroky, dále pouze dodržovat GFD nestačí. RCD může být klasifikována jako typ 1 (normální intraepiteliální lymfocytový fenotyp) anebo jako typ 2 (bývá diagnostikován abnormální intraepiteliální fenotyp). Někteří pacienti trpící RCD nikdy neodpovídají na léčbu GFD, v horším případě se jim i navzdory GFD vracejí epizody relapsů. U pacienti s RCD mohou onemocnět v i závažným lymfomem T-buněk spojeným s enteropatií (EATL) (Rubio-Tapia et al., 2010). Refrakterní celiakie se týká zhruba 5 % pacientů (Tack et al., 2010).

4.8.2 Malignity

Celiakie je spojena se zvýšeným rizikem jak adenokarcinomu, tak lymfomu tenkého střeva (viz. EATL) nebo jiného non-Hodgkin lymfomu (Freeman et al., 2009). Tato asociace byla poprvé popsána začátkem 60. let minulého století a od té doby byla několikrát potvrzena (Austad et al., 1967). Riziko nádoru se zvyšuje u příbuzných prvního stupně, jako jsou sourozenci a rodiče s dětmi. Zda GFD dokáže toto riziko snižovat, není jasné (Gujral et al., 2012). Card et al. se zabýval dlouhodobou populační studií. V letech 1978 až 2001 vyšetřil 869 lidí s prokázanou diagnózou celiakie. Cílem studie bylo prokázat, u kolika vyšetřovaných se objeví malignita v porovnání se zdravou kohortou. Z počtu 869 celiaků se nádor objevil u 83 z nich, přičemž dva pacienti vykazovali tři rakovinná onemocnění a pět pacientů dvě. Diagnostikováno bylo celkem 20 lymfomů (všechny non-Hodgins lymfomy), přičemž pět z nich se primárně objevilo v tenkém střevě (tři z nich byly T-buněčné lymfomy spojené s enteropatií, jeden byl anaplastický T-buněčný lymfom a jeden B-buněčný lymfom). Z těchto lymfomů, postihujících tenké střevo, jediný, který byl diagnostikován více než 2 roky po diagnóze celiakie, byl anaplastický T-buněčný lymfom a jediný pacient, který přežil více než 1 rok, byl nositel B-buněčného lymfomu. Z výsledků vyplývá, že

nebyla nalezena, ve srovnání se zdravou kohortou, zvýšená náchylnost k nádorovým onemocněním obecně, ale u nemocných s celiakií je pětikrát větší riziko k propuknutí non-Hodgkin lymfomu a čtyřicetkrát větší riziko k lymfomu tenkého střeva než v běžné populaci (Card et al., 2004).

4.9 Koexistence s ostatními onemocněními

Celiakie je spojena s řadou dalších chorob autoimunitního charakteru, jak je patrné v tabulce II. V mnoha případech je celiakie identifikována až následně po původní diagnóze, neboť příznaky mohou být nesprávně interpretovány v důsledku původní diagnózy. Vliv souběžné celiakie na jiná autoimunitní onemocnění nebyl doposud dokonale prostudován, o čemž například svědčí nedostatečné výsledky u pacientů trpících celiakií a zároveň diabetem 1. typu (Collins et al., 2002).

Tabulka II znázorňuje koexistenci celiakie s dalšími autoimunitními chorobami.

Tab. II: Autoimunitní choroby sdružené s celiakií.

ASOCIOVANÉ CHOROBY	PREVALENCE U CELIAKŮ (%)
Dermatitis herpetiformis	~70
<i>Diabetes mellitus</i> 1. typu	2-8
Choroby štítné žlázy	2-6
Addisonova choroba	1-12
<i>Alopecia areata</i> (ztráta vlasů z neznámé příčiny)	1-2
Primární biliární cirhóza	2-7
Autoimunitní hepatitida	3-5
Idiopatická ataxie	1-7
Downův syndrom	4-17
Anémie z nedostatku železa	3-7
Syndrom dráždivého střeva	0-11
Periferní neuropatie	do 23

Zvýšená teplota	4-8
------------------------	-----

(tabulka a popis převzaty z Leeds et al., 2008).

Podle MUDr. Pavla Frühaufa, CSc. a jeho kolegů je procentuální prevalence přidružených chorob u celiaků poněkud odlišná, jak dokazují i data z tabulky III.

Tab. III: Nemoci sdružené s celiakií podle MUDr. Pavla Frühaufa, CSc.

ASOCIOVANÁ CHOROBA	PREVALENCE U CELIAKŮ (%)
<i>Diabetes mellitus 1. typu</i>	3-12
Autoimunitní tyroiditida	3
Autoimunitní hepatitida	13,5
Deficit sérového IgA	3
IgA nefropatie	4
Downův syndrom	0,3-5,5
Turnerův syndrom	6,5
Williamsův syndrom	9,5
Juvenilní idiopatická artritida	1,5-2,5

(Tabulka a popis převzaty z Frühauf et al., 2016).

Doplnění k některým chorobám:

Dermatitis herpetiformis Dühringi je svědivá kožní vyrážka charakteristická puchýřky naplněnými vodnatou tekutinou (Singal et al., 2002). Na první pohled by se mohlo zdát, že je způsobena herpes viry, ale není tomu tak. Název je odvozen od toho, že způsobuje zánět kůže, jehož průvodním jevem je vyrážka připomínající herpes. Nejčastěji se vyskytuje u pacientů pocházejících ze Severní Evropy nebo severní Indie a je spojen s haplotypem HLA-DQ2. Vyskytuje se společně s celiakií a citlivostí na gluten (Van et al., 2008).

Mechanismus asociace celiakie a **diabetu 1. typu** zahrnuje sdílené genetické pozadí – HLA haplotyp DR3-DQ2 a DR4-DQ8 je silně asociován s cukrovkou 1. typu a genotyp DR3-DQ2 je rizikový pro celiakii (Camarca et al., 2012). Elfström et al. přichází ve své studii s poznatkem, že více než jeden z dvaceti pacientů s diabetem 1. typu má biologicky

ověřenou celiakii. Tato prevalence je již dostatečně vysoká, aby motivovala k screeningu celiakie u pacientů s diabetem 1. typu (Elfström et al., 2014).

Addisonova choroba se projevuje selháním funkce nadledvin, které přestávají produkovat hormon kortizol a případně i aldosteron (anamneza.cz). Sollid et al. ve své studii objasňuje, že Addisonova choroba je silně spojená s HLA-DR3 a DR4 alelou (Sollid et al., 1993). Genotyp HLA-DQA1*05:01, související s predispozicí k celiakii, je častý i u Addisonovy nemoci (Badenhoop et al., 1995).

Alopecia areata je onemocnění charakterizované ztrátou vlasů z nejasných příčin (Štork et al., 2008). Corazza et al., v roce 1995 postuloval, že celiakie je často spojována s jinými autoimunitními poruchami, ale do té doby nebyla hlášena v souvislosti s alopecia areata. V klinické praxi byli následně pozorováni 3 pacienti s touto asociací. U jednoho z pacientů byla celiakie diagnostikována po výskytu symptomů malabsorpce. Výsledky nakonec ukázaly, že alopecia areata může být klinickým projevem celiakie, a že souvislost mezi těmito dvěma stavy je skutečná, protože pozorovaná četnost asociace je mnohem větší, než by odpovídalo náhodě (Corazza et al., 1995).

Williamsův-Beurenův syndrom (WBS) je genetická porucha, která postihuje mnoho částí těla (Genetics Home, 2018). Obličejové rysy jsou nápadné širokým čelem, krátkým nosem a plnými tvářemi. Tento vzhled byl popsán jako "elfi" (Martens et al., 2008). Charakteristické je mírné až středně těžké intelektuální postižení se zvláštními problémy s vizuálními prostorovými úkoly, jako je kresba (Genetics Home, 2018). Výsledky studie Giannottiho et al., naznačují, že prevalence celiakie je u lidí trpících WBS vyšší než u zbytku populace a je srovnatelná s výskytem Downova syndromu a Turnerova syndromu. Doporučuje proto screening aspartylglukosaminidázy (AGA) a endomysialních protilátek (EMA) u pacientů s WBS (Giannotti et al., 2001).

4.10 Možnosti vyšetření celiakie

V současné době lze celiakii vyšetřit pomocí biopsie, sérologických testů (zahrnujících i testy imunologické) a stále populárnější HLA typizace genů zodpovědných za genetickou predispozici k onemocnění.

4.10.1 Biopsie

Přesná počáteční diagnostika celiakie je kritická. Jakožto celoživotní porucha, je celiakie z hlediska účinné léčby a přísné bezlepkové stravy, obvykle velmi nákladná a časově náročná pro pacienta. Dvě kritéria, aplikovaná postupně, jsou pro diagnózu nezbytná:

nejprve vyšetření histopatologického nálezu dosud neléčeného celiaka by mělo být detailně zdokumentováno, poté, protože se jedná o poruchu citlivosti na gluten, připraveny informace o reakci na bezlepkovou dietu (Freeman, 2017). Konkrétně se v nemocničních podmínkách provádí gastroskopie, tedy vyšetřovací metoda využívající endoskop k vyšetření horní části trávicího systému – jícnu, žaludku, a horní části duodena (anamneza.cz). ESPGHAN (The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition) doporučuje odebrat alespoň čtyři vzorky z druhé třetiny dvanáctníku a alespoň jeden vzorek by měl být odebrán z bulba duodena (tj. ta část dvanáctníku nejbližší žaludku) (Husby et al., 2012). Porovnává a hodnotí se vzhled Lieberkühnových krypt a také počet intraepiteliálních lymfocytů (IEL) na 100 enterocytů, přičemž hraniční hodnota je 25 IEL/100 enterocytů (Ensari et al., 2010).

Míra poškození střeva se stanovuje podle tzv. Marshovy klasifikace, která má několik stupňů:

TYP 0: mikroskopická enteritida, normální klky s patologickým nárůstem T-lymfocytů, zkrácení mikroklyků a zvýšení $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ receptorů T-buněk.

TYP 1: mikroskopická enteritida, zvýšení IEL nad 20/100 enterocytů (intraepiteliální lymfocytóza), normální krypty i klky.

TYP 2: intraepiteliální lymfocytóza a hyperplázie krypt.

TYP 3: hyperplázie krypt a atrofie klků, destruktivní léze.

TYP 4: hypoplázie krypt, destruktivní léze (Marsh et al., 1992; Frühauf et al., 2012).

Rostami et al. (1998; 1999), klasifikaci mírně doplnil:

MARSH I: normální klky, 30 IEL/100 enterocytů

MARSH II: prodloužení krypt a příliv zánětlivých buněk

MARSH IIIa: zkrácení klků, infiltrace IEL a hyperplázie krypt.

MARSH IIIb: viditelně atrofické klky, infiltrace zánětlivých buněk a prodloužení krypt.

MARSH IIIc: úplná atrofie až úplná absence klků (Rostami et al., 1998, 1999).

4.10.2 Sérologická imunologická laboratorní vyšetření

MUDr. Malíčková z Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky v Praze uvádí, že v séru neléčených pacientů trpících celiakií se objevují protilátky proti gliadinu

(AGA), endomysiu (EMA), retikulinu (ARA) a tkáňové transglutamináze (anti-tTG). Vzhledem k vysoké specifitě a senzitivitě anti-tTG doporučuje provést vyšetření těchto protilátek jako první screening při podezření na celiakii (Malíčková et al., 2005).

- Protilátky proti endomysiu (EMA)

Endomysium je pojivová tkáň představující jednu z vazivových vrstev ve svalovině (Konrádová et al., 2000). V séru pacienta jsou přítomny protilátky třídy IgA a IgG proti endomysiu, jež jsou detekovatelné metodou nepřímá imunofluorescence (NIF). Test je vysoce senzitivní a specifický, na druhou stranu poměrně finančně náročnější (Malíčková et al., 2005).

- Protilátky proti retikulinu (ARA)

Protilátky třídy IgA jsou namířeny proti složkám kolagenu. Jejich typy R1-R4 a Rs se od sebe liší reaktivitou při imunofluorescenčním vyšetření. Díky poměrně nízké senzitivitě tento způsob vyšetření pomalu ustává (Malíčková et al., 2005).

- Protilátky proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG)

Přítomnost protilátek třídy IgA patří mezi vysoce senzitivní a specifické laboratorní důkazy glutenové enteropatie. Spolu se stanovením protilátek proti endomysiu dosahuje senzitivita a specifita takřka 100 %. Analýza anti-tTG se provádí metodou ELISA (Malíčková et al., 2005). V nízkých titrech se mohou nacházet i u lidí trpících jiným autoimunitním onemocněním (např. Crohnovou chorobou, ankylozující spondylitidou nebo lupénkou) (Teichmann et al., 2009), nádory, srdeční vadou nebo infekcí (Malíčková et al., 2005; Kohout, 2006). Hladina anti-tTG protilátek rychle reaguje na bezlepkovou dietu, tudíž mohou přispět i k monitoringu úspěšnosti bezlepkové diety. Primární je stanovení protilátek v třídě IgA, u jedinců se selektivním deficitem IgA je nutné vyšetřit protilátky IgG (Makovický, 2008). Protilátky třídy IgG jsou ale zatíženy vyšší nespecifitou, zvýšené hladiny lze nalézt i u různých zánětlivých onemocnění střev (Kohout, 2006, Malíčková et al., 2005).

- Protilátky proti gliadinu (AGA)

Gliadin je proteinová složka glutenu schopná za určitých okolností vyvolat abnormální imunitní reakci na sliznici střeva. Přítomnost antigliadinových protilátek vypovídá o zvýšené střevní permeabilitě, která nemusí být spjata pouze s celiakií. AGA se mohou nacházet i v séru pacientů s oportunní střevní infekcí (Ferrara et al., 2009), gluten-dependentní idiopatickou neuropatií (Hadjivassiliou et al., 1996), u lidí s alergií např. na kravské mléko (Walker-Smith et al., 1990; Vojdani et al., 2014). Stanovují se konkrétně protilátky třídy IgG (toto vyšetření je senzitivnější), popřípadě protilátky třídy IgA (specifické pro celiakii). Rutinně se diagnostikují ELISOU (Malíčková et al., 2005), nicméně dnes už se pro diagnostiku celiakie příliš nepoužívá (Vraná, 2019).

Sérologická vyšetření protilátek proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG) a endomysiu (EMA) a biopsie střevní sliznice jsou zlatým standardem diagnostiky celiakie (Frič, 2011; Prokopová, 2008).

Kapitola 6 – HLA typizace v klinické praxi shrnuje další sérologické metody vyšetření celiakie a navíc poskytuje vhled do problematiky HLA typizace genů zodpovědných za predispozici k celiakii.

4.11 Plošný vs. cílený screening celiakie

Prevalence celiakální sprue každým rokem roste (Aggarval et al., 2012), přesto se ale doposud nepřistoupilo k plošnému celopopulačnímu screeningu celiakie. V roce 1968 vydala Světová zdravotnická organizace (WHO) pokyny pro rozhodnutí, zda je celiakie vhodná pro plošný screening (Wilson et al., 1968). Zda toto onemocnění splňuje všechna kritéria pro plošný screening, je dodnes velmi diskutabilní. Menšinový názor je takový, že populace by měla být podrobena screeningu celiakie, neboť splňuje hlavní kritéria pro plošný screening: a) obtížnost včasné detekce, b) vysoká prevalence, c) dostupnost citlivých a specifických testů pro správnou diagnostiku a d) dostupná léčba. Při pozdním zaléčení může navíc dojít k poměrně závažným komplikacím (Fasano, 2009). Předmětem debat zůstává, zda program pro screening zaměřit na obecnou populaci symptomatických nebo i asymptomatických jedinců. Screening asymptomatických jedinců v obecné populaci není v současné době doporučován, preferována je strategie detekce jednotlivých případů (Aggarval et al., 2012).

Prof. MUDr. Jiří Nevoral, Csc. však podotýká, že vzhledem k mnohdy pozdní diagnostice celiakie a závažným komplikacím sdruženým s pozdní diagnostikou, vzniká naléhavá potřeba screeningového programu (Nevoral, 2010). Je však rozdíl mezi plošným a cíleným screeningem. Dle MUDr. Pavla Frühaufa, Csc. je plošný screening celiakie v našich podmínkách neopodstatněný (Frühauf et al., 2016), s čímž souhlasí i MUDr. Nevoral. Ten dokonce o plošném screeningu, zahrnujícím i vyšetření asymptomatických pacientů, hovoří jako o kontroverzním. Podle něj nebyl doposud podán přesvědčivý důkaz o tom, že by plošný screening zredukoval rozptýl nemoci v populaci (Nevoral, 2010). Podle článku 1 věstníku Ministerstva zdravotnictví ČR z roku 2011:

- Záměrem cíleného screeningu je identifikace velké populace dosud nediodagnostikovaných celiaků vzhledem k tomu, že celiakie se nadále diagnostikuje v české populaci buď nedostatečně často nebo naopak pozdě. Příčinou je změněný fenotyp nemoci. V současné době převládají střevní příznaky jen u malých dětí, kdežto u ostatních populačních skupin a zejména u dospělých převládají mimostřevní (atypické) příznaky. Další příčinou jsou nestandardní a chybné diagnostické postupy.
- Cílem screeningu je časná diagnostika celiakie s následnou časnou terapií (zavedení bezlepkové diety), odhalení atypických forem celiakie, zjištění skutečné prevalence celiakie v České republice, prevence komplikací celiakie, omezení a lepší kontrola přidružených autoimunitních chorob, jakož i zlepšení kvality života celiaků, (MZ ČR, 2011, Čl.1, Obecná ustanovení, doslovné znění).

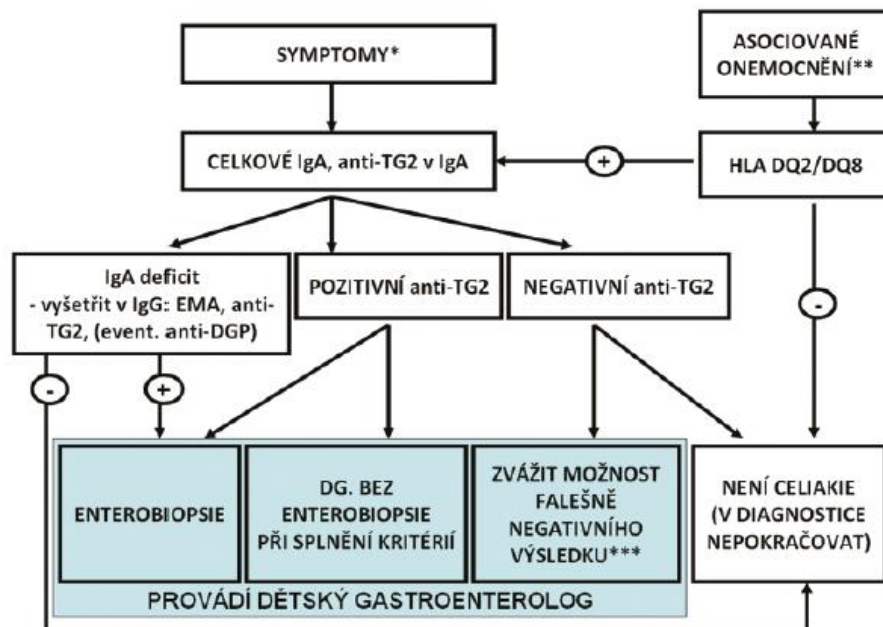
Pro zlepšení současného stavu onemocnění je důležitý cílený screening zaměřený na rizikové skupiny (Husby et al., 2012). K cílenému screeningu jsou vybíráni pacienti s definovanými symptomy, sdruženými chorobami a příbuzní celiaků 1. stupně (Frühauf et al., 2016). Greco et al., prokázal vyšší míru prevalence celiakie mezi členy rodiny a taktéž vyšší míru shody u monozygotních dvojčat než u dizygotních dvojčat (83-86 % vs. 11 %) (Greco et al., 2002). Při pozitivním nálezu u příbuzných 1. stupně se přistupuje k vyšetření příbuzných 2. stupně, dále jsou pod drobnohledem lidé s atypickými příznaky mimo GIT a pacienti s průjmovou formou dráždivého střeva rezistentní k terapeutické léčbě (Pískovská, 2011).

U vytipovaných jedinců se doporučuje aplikovat dvoustupňový screeningový postup. Prof. MUDr. Nevoral, Csc. popisuje obě úrovně. V **prvním stupni** doporučuje stanovit anti-tTG protilátky ve třídě IgA a následně vyšetřit celkové IgA. Upozorňuje však na to, že zhruba u 3 % pacientů lze spatřit tzv. IgA deficit, proto je nutné v takovém případě vyšetřit IgG

protilátky. Doplňuje, že vyšetření protilátek proti endomysiu vykazuje podobně vysokou senzitivitu a specifitu jako stanovení anti-tTG. Oproti tomu vyšetření protilátek proti gliadinu je méně specifické a senzitivní, proto od tohoto kroku doporučuje ustoupit (Nevoral, 2010). MUDr. Frühauf, Csc. k tomuto prvnímu stupni ještě dodává, že negativita anti-tTG protilátek u pacienta bez IgA deficitu diagnózu prakticky vylučuje. V době vyšetření však musí pacient konzumovat stravu s obsahem lepku, a to v dostatečném množství (alespoň 15 g/den). Ještě dodává, že naordinování bezlepkové diety (GFD) před definitivním stanovením diagnózy je obrovskou chybou (Frühauf et al., 2016). Při pozitivním nálezů anti-tTG se přistupuje k **druhému stupni** screeningového postupu, tedy perorální biopsii aborálního duodena. Vzorek se odebírá z několika míst sliznice a před zafixováním je nutné je orientovat klky nahoru (Frič, 2002). Histologické změny se posuzují podle již zmíněných Marshových kritérií (Nevoral, 2010). Další možnosti screeningu u dospělých shrnuje věstník MZ ČR z roku 2011 (MZ ČR, 2011).

Mnozí autoři se shodují v tom, že zatímco sérologické metody při screeningu celiakie se spíše hodí k diagnostice onemocnění, molekulárně-genetická typizace HLA-DQ molekul je vhodná spíše k jejímu vyloučení (Sollid et al., 2005). Jak Sollid et al., tak Nevoral společně s Frühaufem et al., vysvětlují, že haplotypy HLA-DQ2 i HLA-DQ8 se vyskytují ve zdravé populaci s procentuálním zastoupením zhruba 35-40 %, přičemž celiakie se nakonec vyvine pouze u 1 % z nich (Sollid et al., 2005; Nevoral, 2010; Frühauf et al., 2016). Frühauf et al., proto upozorňuje, že typizace HLA-DQ molekul se nehodí k vyhledávání pacientů s celiakií v neselektované populaci a jejich rutinní diagnostice (Frühauf et al., 2016). Sollid et al., a Margaritte-Jeannin et al., dodává, že HLA typizace se hodí k vyloučení diagnózy – při negativním nálezů HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8 lze náchylnost k celiakii prakticky vyloučit, a to s negativní predikční hodnotou blížící se 100 % (Sollid et al., 2005; Margaritte-Jeannin et al., 2004). HLA typizace se hodí k vyloučení choroby, popřípadě k potvrzení, že celiakie je vysoce nepravděpodobná při absenci obou alel. Měla by se proto provádět u nejistých diagnóz (Frühauf et al., 2016).

Obrázek 8 znázorňuje diagnostický algoritmus celiakie.



Obr. 8: Diagnostický algoritmus celiakie. (Obrázek i popis převzaty z Frühauf et al., 2016).

Frühauf et al. dodává, že doposud bylo stanovení anti-tTG protilátek a enterobiopsie jakýmsi „zlatým standardem“ při diagnostice celiakie. Podle pamfletu ESPGHAN z roku 2012 je zkušený gastroenterolog oprávněn v některých případech určit diagnózu bez předchozí biopsie. Mezi hlavní podmínky mimo jiné patří pozitivita anti-tTG nad 10násobek normy (Frühauf et al., 2016).

5 ANCESTRÁLNÍ HAPLOTYP 8.1

Ancestrální haplotyp 8.1, též známý pod názvy „HLA A1-B8-DR3-DQ2 haplotyp“, „AH8.1“, „COX“ (Horton et al., 2008), „super B8“ a „ancestrální MHC 8.1“ (Rocca et al., 2004), je multigenový haplotyp pokrývající většinu lidského HLA komplexu na chromozomu 6 (nezaměňovat s HLA-DQ heterodimerem DQ 8.1) a je asociován s více než 30 autoimunitními chorobami (Thorsby et al., 2005). V osmdesátých letech 20. století vědci vyzkoumali, že některá autoimunitní onemocnění mají daleko silnější asociaci s příslušnými kombinovanými alelami na několika lokusech, než s alelami jednotlivými. Tyto rozsáhlé oblasti čítající několik alel pojmenovali ancestrální haplotyp (AH), neboť definují vysoce konzervativní haplotypy, které se zdají být odvozeny od společného vzdáleného předka. Skládají se ze segmentů nebo bloků zřetelně konzervovaných genomických sekvencí oddělených rekombinačními hotspoty (Dawkins et al., 1983). Konzervace haplotypů mnohdy brání identifikaci jednotlivých genů odpovědných za průběh nemoci (Price et al., 1999). AH

8.1 je charakterizovaný, mimo jiné, alelami HLA-A*01, B*08, DRB1*03, DQB1*02 a DQA1*05 (Bartůňková et al., 2006). Podle Candoreové a jejího týmu je přesné složení ancestrálního haplotypu 8.1 následující: HLA-A1, Cw7, B*08, TNF AB*a2b3, TNF N*S, C2*C, Bf*s, C4A*Q0, C4B*1, DRB1*03:01, DRB3*01:01, DQA1*05:01, DQB1*02:01. Jedná se o haplotyp nejvíce spojovaný s autoimunitními chorobami u kavkazské populace (Candore et al., 2006). 8.1 AH je běžný zvláště v severní Evropě, a u zdravých jedinců je tento haplotyp spojen s imunologickými změnami způsobenými změnou produkce cytokinů (Candore et al., 2002). Některé genetické varianty tohoto haplotypu obecně zvyšují imunitní odpověď, a stejné alely se proto budou podílet na autoimunitních onemocněních (Price et al., 1999). AH 8.1 se u Indoevropanů vyskytuje s frekvencí okolo 10 %, což je více, než by se očekávalo z pouhé frekvence jednotlivých HLA alel na tomto haplotypu. Má se za to, že se haplotyp AH 8.1 oddělil od společného předka zhruba před 23-24 000 lety (Smith et al., 2006) z důvodu nedávné expanze tohoto haplotypu (Jindra, 2011).

5.1 Spojitost mezi ancestrálním haplotypem 8.1 a autoimunitními chorobami

U více než 30 autoimunitních onemocnění lze najít spojitost s haplotypem 8.1. Mezi významné kandidáty ovlivňující asociaci AH 8.1 s autoimunitními chorobami patří TNF alela, zejména promotor označovaný jako SNP -308, který ovlivňuje expresi *TNF- α* (Bayley et al., 2004). U revmatoidní artritidy bylo prokázáno, že homozygotita pro pozitivně asociovaný SNP -308 má za následek zlepšení odpovědi na terapeutickou léčbu infliximabem (Mugnier et al., 2003). U nositelů ancestrálního haplotypu 8.1 hraje velmi důležitou roli v incidenci autoimunitního onemocnění humorální imunitní odpověď, jejíž intenzita se zvyšuje na úkor buněčné imunity. Při této imunitní odpovědi dochází k zvýšení počtu spontánně apoptotických krevních lymfocytů a zvýšené produkci některých autoprotilátek. K přebytku apoptotických buněk zapojených do zvýšené produkce autoantigenů zjevně dochází geneticky podmíněnou, zvýšenou koncentrací tumor necrosis faktoru α (TNF- α) (Price et al., 1999; Lio et al., 2001). Kromě toho je 8.1 ancestrální haplotyp charakterizován nultou alelou genu C4A (Price et al., 1999; Candore et al., 2003), která nekóduje funkční C4A protein, jež hraje roli v protizánětlivých procesech opsonizace a imunoclearance. Jedná se tedy o genetickou vadu spojenou se zvýšenou produkcí autoprotilátek namířených proti buňkám, které podstoupily apoptózu, ale nejsou účinně likvidovány vzhledem ke snížené antigenní clearanci. Snížení odezev imunitní odpovědi způsobuje pokles makrofágů, neutrofilů a NK buněk, jakož i defekty aktivace T buněk (Lio et al., 1997; Price et al., 1999; Candore et al., 2002; Candore et al., 2003). U nositelů

ancestrálního haplotypu 8.1 zvýšení produkce TNF- α způsobí nárůst autoantigenů tím, že se zvýší počet apoptotických buněk regulujících autoimunitní odezvu (Klein et al., 2000; Candore et al., 2002).

5.1.1 Ancestrální haplotyp 8.1 a jeho spojitost s celiakií

Genetická asociace mezi celiakální sprue a haplotypy HLA-DQ2 (alely DQA1*05 – DQB1*02) a HLA-DQ8 (alely DQA1*03 – DQB1*03:02) byla široce studována. Zásadní s celiakií asociovanou alelou je alela DRB1*03:01, vyskytující se v silné vazebné nerovnováze s alelami DQA1*05 a DQB1*02 (Keuning et al., 1976). Mnohé studie se zabývají zkoumáním všech haplotypů, které nesou právě oblast DRB1*03:01, mezi něž patří i ancestrální haplotyp 8.1. Medrano a jeho tým přicházejí s poznatkem, že nosičství AH 8.1 představuje pro jedince vyšší riziko propuknutí celiakie, než nosičství kteréhokoli jiného haplotypu nesoucího alelu DRB1*03:01, ale děje se tak pouze za předpokladu, že jedinec má také jednu kopii alely DQB1*02 (Medrano et al., 2012). Mělo se tedy za to, že za rozvojem rizika propuknutí celiakie může oblast DRB1*03:01 obsažená pouze v AH 8.1 a jiné oblasti na rozvoj celiakie nemají významný vliv. Nicméně Bratanic et al., ve slovanské populační studii objevil over-exprimovaný haplotyp DRB1*03:01 - DQB1*02:01 - DQA1*05:01 - A*01-B*08 u pacientů s celiakií a diabetem 1. typu. Navíc odhalil rozšířený haplotyp MICA*008-B*08 - A1 - DR3 - DQ2 a došel k závěru, že nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro celiakii obsaženým v tomto haplotypu je poměrně vzácná alela HLA B*08, která je mimo jiné také součástí AH 8.1 (Bratanic et al., 2010).

6 HLA TYPIZACE V KLINICKÉ PRAXI

HLA typizací rozumíme stanovení konkrétních HLA alel. Jedná se tedy o rozbor HLA znaků neboli určení zděděného fenotypu. Typizace konkrétní haplotypy neurčuje, je však možné je vymezit za pomoci k tomu určených složitých metod. Typizaci lze možno provádět na dvou úrovních. Historicky starší metodou je sérologická typizace, která účelně definuje HLA antigeny, tj. stanovuje molekuly exprimované na buněčných membránách. Mnohem mladší metodou je molekulárně-genetické stanovení, kteréžto určuje HLA alely, tzn. sekvence nukleotidů kódující HLA antigeny. Používá se také termín DNA typizace nebo genotypizace HLA (Penka, 2012).

Určení HLA typu je nezbytné pro výběr nejvhodnějšího páru dárce-příjemce před transplantací orgánů nebo krvetvorných buněk, dále pro studium asociací HLA antigenů s některými nemocemi a může se uplatnit i při řešení paternitních sporů (Penka, 2012).

6.1 Sérologické metody typizace HLA

Sérologická typizace neboli **mikrolymfocytotoxický test (CTT)** je základní metoda pro testování histokompatibility a byla objevena v roce 1964 Dr. Paulem Terasakim (Terasaki, et al., 1964). Principem mikrolymfocytotoxického testu je reakce mezi HLA antigenem na povrchu buňky a sérem se specifickou HLA protilátkou (Kábrt, 2009). V případě, že buňky nesou právě onen antigen, proti němuž je HLA protilátka přítomná v séru namířena, pak v průběhu 1. inkubační doby dojde na povrchu buňky k vytvoření komplexu antigen-protilátka. Po přidání králičího komplementu (2. inkubační doba) dochází k jeho aktivaci komplexem antigen-protilátka, aktivovaný komplement rozruší buněčnou membránu a dochází k lýze buňky. Jestliže se v séru nenachází protilátka specifická pro daný HLA antigen, pak k tvorbě komplexu antigen-protilátka nedochází, není tedy možná ani aktivace komplementu a buňky zůstávají živé. Po obarvení buněčné suspenze vitálním barvivem (eosin Y, trypanová modř) a odečtení pod mikroskopem, je reakce, ve které jsou buňky poškozeny a obarveny vitálním barvivem, hodnocena jako pozitivní a reakce, kde buňky zůstávají živé a nezabarveny, je hodnocena jako negativní (Dyer, et al., 1993; Stites, et al., 1994).

Výhodou sérologické typizace rychlý výsledek, což má význam u zemřelých dárců orgánů. Proto se také stále tato metoda používá k vyšetření pacientů před transplantacemi. Test bývá často uplatňován pro svou jednoduchost a také proto, že nevyžaduje drahé vybavení laboratoře. Na druhou stranu sérologická typizace přináší i nevýhody. Vyžaduje poměrně velké množství krve, životaschopnost lymfocytů a často bývá obtížné nalézt vhodné anti-sérum nutné pro reakci se vzácnými antigeny různých populací. Za největší nevýhodu je považována nepřesnost, s jakou jsou HLA antigeny typizovány (Penka, 2012). Proto ji v současné době začínají nahrazovat přesnější molekulárně-genetické metody.

Další sérologickou metodou, která se standardně používá, je **průtoková cytometrie** (Pei et al., 1998). Tato metoda také využívá vazbu protilátky na HLA antigen, nepoužívá se však ke komplexní HLA typizaci, ale pouze k určení konkrétních HLA alel (např. HLA-B*27 při pomocné diagnostice Bechtěrevovy choroby (Hoffmann et al., 1997).

6.2 Molekulárně-genetická typizace HLA

Molekulární typizace (genotypizace) se běžně využívá k průkazu genových sekvencí určujících konkrétní HLA výbavu. V dnešní době se provádí celá řada genotypizačních technik, každá z nich se nicméně odvíjí od izolace DNA z periferní krve nebo z bukalního stěru (Genetics Learn, 2008).

V zásadě jsou možné dva genotypizační přístupy k typizaci HLA systému. Prvním je tzv. *low resolution*, který určuje příslušnost alely v určité alelické skupině (Krejsek et al., 2004). Druhým je tzv. *high resolution*, který umožňuje identifikaci konkrétních HLA alel.

S vývojem a aplikací PCR převzaly techniky založené na průkazu konkrétních genových sekvencí určujících jednotlivé HLA alely vedoucí roli. Výhodou těchto metod je jejich přesnost, snadná reprodukovatelnost, jakož i větší citlivost a schopnost determinovat výsledky pro low i high resolution. DNA metody HLA typizace zahrnují **SSP PCR** (PCR se sekvenčně specifickými primery), **SBT** (sequencing-based typizace), **SSO** (PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidy), **real-time PCR** a v neposlední řadě také **NGS** (next generation sequencing) (Eng et al., 2011; Dunn, et al., 2015).

6.2.1 SSP (Sequence-specific primers PCR; PCR se sekvenčně specifickými primery)

Tato metoda umožňuje amplifikaci genů, u kterých je k dispozici pouze částečná sekvenční informace, přičemž následuje jednosměrný genomový screening od známých do neznámých oblastí chromozomu (Shymala et al., 1993). Jedná se o poměrně jednoduchou formu polymerázové řetězové reakce (PCR), která zahrnuje navržení jednoho nebo obou primerů tak, aby umožnily amplifikaci PCR produktu (Welsh et al., 1999). Používají se sady párových primerů. Pokud jsou zcela komplementární k dané DNA sekvenci, dojde k PCR reakci. Rozdělení amplifikovaných DNA fragmentů se děje za použití elektroforézy v agarózovém gelu, přidá se fluorescenční barvivo a reakci je možné sledovat pod UV zářením. Vizualizovaný PCR produkt májící konkrétní velikost značí pozitivní reakci. Identifikovat alely je možné z kombinace použitých primerů (Řeháček et al., 2013). V této metodě primerové páry prakticky zastupují panelové protilátky známé ze sérologické typizace. Jejich specifita, založená na komplementaritě nukleotidů primeru s nukleotidy v sekvenci konkrétní alely, je však mnohem vyšší. Metoda PCR-SSP se v České republice používá běžně, a to zejména pro svou robustnost a relativně nízkou cenu, např. pro vyšetření pacientů před transplantací kostní dřeně nebo pro detekci určité alely. Dokáže rozpoznat sekvenci konkrétní alely, například u celiakie asociaci s DQB1*02:01, u narkolepsie s DQB1*06:02. Tato metoda je

technicky jednoduše proveditelná, časově nenáročná a co je důležitější, lehce interpretovatelná. Zatímco u sérologických metod je vyžadována určitá zkušenost laboratorního personálu pro správné odečtení výsledků, interpretace výsledků SSP-PCR je mnohem jednodušší (Ferenčík et al., 1993). Ve zkratce se dá říci, že mnozí shledávají metodu SSP-PCR nejvhodnější pro rutinní stanovování HLA alel (Woszczek et al., 1997).

6.2.2 SBT (Sequence-base typing; metoda přímého sekvenování)

Tato metoda je kritická při transplantaci hematopoetických kmenových buněk, kde je důležitá tzv. *high resolution* genotypizace HLA alel. Některé studie ukazují, že při tzv. „mismatch“ HLA alel se exponenciálně zvyšuje riziko propuknutí GvHD (neboli reakce štěpu proti hostiteli). Jedná se o případy, kdy jsou konkrétní HLA alely přítomny u pacienta, ale chybí u dárce (Petersdorf et al., 2015). Podobné studie prokázaly, že riziko selhání štěpu stoupá se zvyšujícím se počtem „mismatch“ ve směru hostitel vs. štěp (tj. HLA geny jsou přítomné u dárce, ale chybí u pacienta) (Hurley et al., 2013). Výhodou SBT je to, že není omezena jen na úseky nukleotidovými sekvencemi „pokryté“ primery (PCR-SSP) nebo oligonukleotidovými sondami (PCR-SSOP) nebo restrikcí enzymy (RFLP). SBT umožňuje určit kompletní sekvenci dané polymorfní oblasti. Tímto způsobem lze také objevit nové alely. Po amplifikaci se využívají fluorochromem značené dideoxyribonukleotidy (ddNTP), které po navázání na daný úsek DNA zastaví jeho další množení. Vznikají tedy různě dlouhé fragmenty DNA, které jsou vždy zakončeny ddNTP. Fragmenty se poté standardně rozdělí na základě své délky na gelu. Fluorescenci lze pozorovat pomocí laseru (Řeháček et al., 2013). SBT je metoda využívaná také pro typizaci HLA alel asociovaných s některými onemocněními (interpretace alely HLA-DRB1*06:02 u pacientů s narkolepsií (Alaez et al., 2008)) a mimo jiné i pro odhalení citlivosti na některé drogy a léčiva (asociace alely HLA-B*57:01 a přecitlivělosti na léčivo Abacavir u HIV pozitivních pacientů (Dean, 2018)).

6.2.3 SSO (Sequence-specific oligonucleotide probes; PCR se sekvenčně specifickými oligosondami)

SSO je metoda kombinující schopnost definovat nejjemnější HLA specificitu analýzou odpovídajících sekvencí DNA s možností studovat velké populace normálních i postižených jedinců. Tato technologie se využívá k přesné charakterizaci HLA lokusů spojených s citlivostí na autoimunitní onemocnění, jako je revmatoidní artritida, *diabetes mellitus* typu I, celiakie a *pemphigus vulgaris* (Wordsworth, 1991). Pomocí jednoho páru primerů se naamplifikují dané části lokusu. Rozlišení alel probíhá reverzní hybridizací se sekvenčně speci-

fickými DNA oligosondami. Vazba produktu amplifikace na sondu je vizualizována barevnou enzymatickou reakcí, fluorescencí nebo radioizotopem (Řeháček et al., 2013). Analyzátor založený na principu průtokové cytometrie Luminex® je následně schopen identifikovat fluorescenční intenzitu fykoerytrinu (PE) u každé mikročástice (Cesbron-Gautier et al., 2004). Jelikož tato metoda je poměrně časově náročná, přechází se pozvolna spíše k reverzní SSO PCR, jejíž zavedení umožnilo zařazení této metody jako vhodnější pro plošnou HLA typizaci. Zahrnuje imobilizaci oligonukleotidových sond navázaných na pevném nosiči a následnou hybridizaci těchto sond s kapalným PCR produktem. Jelikož jsou hybridizační podmínky pro oligosondy standardizované, časová náročnost metody se snižuje, a tato může být používána rutinně (Beksaç, 2007).

6.2.4 q-PCR (Real-time PCR)

Jedná se o metodu založenou na principu klasické PCR, umožňuje však kvantifikaci amplifikovaného úseku DNA v reálném čase. Na rozdíl od běžné PCR, kde se analyzuje až výsledný produkt pomocí elektroforézy, je při real-time PCR zaznamenáván každý cyklus PCR ve skutečném čase (Ruijter, 2013). Detekce amplifikace je založena na principu fluorescence, kdy se používají sondy, vážící se specificky nebo nespecificky na amplifikovanou DNA. Primery pro alelově-specifickou amplifikaci se mísí dohromady s interní kontrolou v jedné zkumavce, což činí tuto metodu vhodnou pro klinické použití. Tato reakce je podobně jako klasická PCR prováděna v přístroji termocyklér, který je ale oproti klasické verzi vybaven optickým zařízením pro snímání intenzity fluorescenčního záření ze sond v reálném čase (Ruijter, 2013). Optický signál je zaznamenáván a zpracováván specializovaným software prostřednictvím matematických metod. Tato metoda je kromě jiného rychlá, vyžaduje méně manipulačních kroků a poskytuje takřka 100 % specifitu a senzitivitu (Profaiser et al., 2011). Jedná se o slibnou technologii v případech, kdy je třeba identifikovat pouze několik specifických alel, zejména v případě celiakie, kde je požadována genotypizace alel DQB1*02, DQB1*03:02 a DQA1*05 (Profaiser et al., 2007). Z praktického hlediska mohou být primery a master mixy předem alikvotovány a zmraženy, takže je potřeba následně přidat pouze vzorek izolované DNA, což zvyšuje snadnost testu. Při vyloučení potřeby odečítat výsledky PCR produktu pomocí gelové elektroforézy se sníží počet manipulací se vzorkem, což redukuje pravděpodobnost kontaminace.

6.2.5 NGS (Next Generation Sequencing)

Tyto metody, známé také pod názvem „*high-throughput sequencing*“, zahrnují nejmodernější sekvenační postupy. Mezi nejznámější patří **Illumina/Solexa** (Illumina, San Diego, CA, USA), **Roche 454** (Roche Life Sciences, Branford, CT, USA), **Ion Torrent** (PGM, Life Technologies, Guilford, CT, USA), **SOLiD** (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), **Oxford Nanopore** (Oxford Science Park, Oxford, United Kingdom) a **PacBio** (Pacific Bioscience, Menlo Park, CA, USA) (Eisenstein et al., 2012). Tyto nové technologie umožňují sekvenovat DNA a RNA mnohem rychleji a levněji, než tomu bylo u dříve používané Sangerovy metody (Bahassi et al., 2014). Co se týče HLA typizace, je využití moderních NGS metod stále poměrně nové, technologie založené na NGS jsou ve vlastnickém užívání a mnohdy nejsou veřejně dostupné (Wittig et al., 2015). Navíc HLA region je nejvíce polymorfní část lidského genomu, tudíž využití NGS metod k jeho typizaci donedávna zaostávalo za použitím klasických metod (Major et al., 2013). Přesto se ale v posledních letech vědci pokouší alternovat standardní metody metodami NGS (Bentley et al., 2009; Erlich et al., 2011). Většina těchto technologií se opírá o klasickou PCR cílové oblasti genu následovanou masivním paralelním sekvenováním amplikónů. Výhodou NGS metod je možnost sekvenace jednovláknového řetězce s výstupem velkého množství sekvenačních úseků na jeden vzorek, popřípadě jeden lokus. To umožňuje velice přesvědčivé určení konkrétní HLA alely. Nicméně i zde lze narazit na problémy, neboť kroky paralelní sekvenace bývají náročné a jsou vyžadovány poměrně složité kroky při optimalizaci PCR a výběru primerů (Bahassi et al., 2014).

6.2.5.1 ILLUMINA (MiSeq)

Platforma Illumina vychází ze zásady sekvenace syntézou. Před sekvenováním jsou klonální populace fragmentů, které mají být osekvenovány, generovány přímo na sekvenčním sklíčku pomocí „můstkové“ (bridge) PCR. Sekvenovací proces spočívá v optickém sledování začlenění fluorescenčních nukleotidů asociovaných s reverzibilním terminátorem. Začlenění probíhá za přispění DNA polymerázy (Turcatti et al., 2008). Mezi hlavní přednosti této technologie pro sekvenaci HLA patří schopnost čtení poměrně dlouhých „readů“ (až 300 párů bází), absence homopolymerních chyb, nižší náklady na provoz a relativně vysoká přesnost sekvenace (Ewing et al., 1998; Gabriel et al., 2014). Rychlost sekvenace je však poměrně nízká, protože osekvenovat 600 bází trvá přibližně 56 hodin (Carapito et al., 2016). Illumina data s krátkými délkami „readů“ nebyla příliš často využívána pro HLA typizaci, ani úseky z celogenomových studií využívajících technologii Illumina se pro účel HLA typi-

zace příliš nepoužívala (Wang et al., 2012). Teprve projekty jako *1000 genomů* (1KG) a *HapMap* umožnily porovnat HLA alely typizované některými ověřenými molekulárními metodami s ověřenými Illumina daty (1000 genomes project Consortium, 2010; International HapMap Consortium, 2003). De Santis ve své studii zmiňuje Curta Linda and Dimitriose Monose, kteří se zabývali sekvenováním na čtyřech různých platformách a jejich následným porovnáním. Přišli s výsledkem, že Illumina MiSeq vykazuje nejnížší pozorovatelnou chybovost a dokáže určit HLA genotypy bez jakékoli nejednoznačnosti (De Santis et al., 2013). Naopak velikým nedostatkem může být chybně přečtená báze nebo záměna jednoho nukleotidu (Kolísko, 2017).

6.2.5.2 ION TORRENT

Ion Torrent metoda stojí na podobném principu jako pyrosekvenování. Ion Torrent však neměří množství uvolněného pyrofosfátu po připojení nové báze do DNA řetězce pomocí luciferázy, ale pomocí měření pH reakční směsi. Dle intenzity změny pH lze poznat, kolik bází bylo přiřazeno (pH roztoku se mění s každou přidanou bází o 0,02 jednotky). Technologie Ion Torrent má problém se čtením delších homopolymerních řetězců složených z jediného typu nukleotidu (Kolísko, 2017). Ion Torrent se jeví jako technologie s nejkratšími sekvenčními časy, s čtecí délkou přibližně 3 hodiny na 400 bází. Navíc schopnost čtení až 400 bází představuje také atraktivní rys pro sekvenaci HLA (Carapito et al., 2016). Účinnost technologie Ion Torrent pro typizaci HLA nedávno ukázala studie Barone et al., který dosáhl míry shody v rozmezí 98,9 % pro HLA-DPB1 až 99,8 % pro HLA-DRB1 a HLA-DQB1 ve srovnání s Sequence-based Typing (SBT) (Barone et al., 2015). Nejčastější čtecí chybou Ion Torrent sekvenování je podle Kolíska chybějící báze, nebo naopak báze navíc (četnost chyb v obou případech se uvádí kolem 1 %) (Kolísko, 2017).

6.2.5.3 ROCHE 454

Tato platforma využívá pyrosekvenování DNA fragmentů, které byly předtím klonálně amplifikovány pomocí emulzní PCR. Během 454 sekvenování je molekula DNA nejdříve uchycena na malou „kuličku“, na jejímž povrchu se postupně namnoží, až kuličku zcela pokryjí identické molekuly DNA (Margulies et al., 2005). Kulička i s DNA je následně vložena do jedné z milionů komůrek destičky, kde probíhá sekvenační reakce na principu pyrosekvenování. Jde o vůbec první prakticky použitelnou a komerčně dostupnou metodou sekvenování druhé generace. Kolísko říká, že nejmodernější verze dokáže analyzovat více než milion molekul DNA najednou, přičemž délka každé jednotlivé sekvence („readu“) se

pohybuje okolo 700 až 1 000 bází, kdy právě 1 000 bází se uvádí jako maximum. (Kolísko, 2017). Podobně jako u Ion Torrent dochází i zde k postupnému toku nukleotidů na destičce a v homopolymerních oblastech se zaznamenává současně několik inkorporací, což vede k stejnému typu chyb. Jednou z hlavních výhod této technologie je čtení až 1000 bází naráz. Nicméně kvůli její poměrně nízké kapacitní propustnosti (maximálně 700 Mb za běh), a kvůli spojení s vysokými náklady se systém příliš nepoužívá pro sekvenování HLA alel. To je možná jeden z důvodů, které vedly Roche k ukončení této platformy. Délka jednoho běhu je střední, např. 23 hodin pro 700 bází (nyní čteno systémem GS FLX) (Carapito et al., 2016).

6.2.5.4 SOLiD

Platforma SOLiD (*Sequencing by oligonucleotide ligation and detection*) byla poprvé představena v roce 2007 společností, která dnes nese název Life Technologies. DNA knihovna se připravuje ligací adaptérů na 3' a 5' konce fragmentů, které jsou komplementární k nukleotidům imobilizovaným na povrchu paramagnetických kuliček. Po amplifikaci pomocí emulzní PCR (emPCR) jsou kuličky kovalentně navázány na sklíčko se speciálně upraveným povrchem (Koubková et al., 2014). Při SOLiD sekvenování se k templátu přidají fragmenty DNA, tzv. sondy, které začínají všemi možnými dvojkombinacemi čtyř základních nukleotidů, tedy 16 různých sond. Každá sonda také nese jednu ze čtyř fluorescenčních barviček, což znamená, že čtyři různé dvojkombinace nukleotidů jsou označeny stejnou fluorescenční značkou. V každém kroku pak enzym ligáza připojí k rostoucímu řetězci sondu nesoucí dvojkombinaci nukleotidů odpovídající templátové DNA a snímač přečte její fluorescenční označení, které je poté odstraněno a může se připojit další sonda. Podle Kolíska má SOLiD sekvenování podobný výstup jako Illumina a produkuje rovněž krátké sekvence o délce maximálně 100 bází. (Kolísko, 2017). Tato metoda se nejčastěji využívá pro transkriptomovou analýzu (RNA-sequencing), analýzu exprese kódující i nekódující RNA v genomu, studium DNA-proteinových interakcí (ChIP-sequencing) a metagenomiku (analýzu biologické diverzity, např. pro genotypizaci bakterií) (Metzker et al., 2010). Pro typizaci HLA alel se SOLiD zatím příliš nepoužívá.

6.2.5.5 OXFORD NANOPORE (MinION)

Metoda Oxford Nanopore se řadí mezi *metody třetí generace*. U metod třetí generace nemusí být DNA templát před sekvenováním nijak namnožen, čímž se tyto metody liší od pyrosekvenování nebo Illuminy, spadající do metod sekvenování druhé generace. U platformy Oxford Nanopore dochází ke čtení signálu z jediné (původní) molekuly (Kolísko, 2017).

Technologie je založena na biologických vlastnostech nanopóru, který je začleněn do lipidové dvojvrstvy oddělující jamky naplněné elektrolytem. Procházející jednovláknová DNA zeslabuje konstantní proud, jenž je vháněn do systému. Jednotlivé nukleotidy jsou detekovány na základě specifické modulace toku iontů a délce trvání tohoto omezení. Rychlost, kterou je DNA sekvenována, reguluje DNA polymeráza (Rhee et al., 2006). Ačkoli technologie je poměrně nová a stále ve fázi vývoje, může být vhodná pro studium komplexu HLA, protože umožňuje získat velmi dlouhé sekvence, omezené pouze délkou DNA molekul prezentovaných nanoporům (délka až 50 kb). Ashton et al. tvrdil, že tato technologie ještě není připravena sama přesně sekvenovat molekuly HLA, ne pokud se nezlepší přesnost četby, která zatím činí 72-80 % (Ashton et al., 2015), ale v dnešní době se už v některých laboratořích rutinně využívá (Liu et al., 2017). Dosud kapacita nepřekročí 400 Mb v průběhu 48 hodin (Carapito et al., 2016).

6.2.5.6 *PacBio*

Metoda od společnosti Pacific Bioscience se také řadí mezi nejmodernější metody sekvenování třetí generace, která k detekci výsledné sekvence využívá fluorescenčně značené nukleotidy. Kolísko dodává, že novinkou je vysoká citlivost, jež umožňuje v reálném čase zaznamenávat zařazení buď jediného nukleotidu do (jediného) řetězce DNA (Kolísko et al., 2017). Klonové sekvenování se provádí metodou jednorázové sekvenční analýzy v reálném čase (SMRT), která se skládá z optického sledování začlenění jednotlivých fluorescenčních nukleotidů imobilizovanou DNA polymerázou do jamek (Eid et al., 2009). Metoda PacBio přináší jednu velkou výhodu při HLA typizaci, a to je její schopnost číst skutečně dlouhé sekvence během jednoho běhu (průměrná čtecí délka je asi 5,5 Kb), v tomto ohledu tato platforma vede před všemi ostatními NGS technologiemi (Chang et al., 2014). PacBio sekvenátor je schopen přečíst 10 i více tisíc bází v rámci jedné analyzované molekuly DNA a produkuje tak velmi dlouhé sekvence, což je výhodné zejména pro sekvenování genomů (Kolísko, 2017). Velikou nevýhodou této metody je poměrně velká chybovost (přibližně 15–20 %), což výrazně snižuje úspěšnost genotypizace HLA alel, jakožto vysoce polymorfních oblastí (Chang et al., 2014). Dnes tuto metodu genotypizace využívá například registr kostní dřeně Anthony Nolan (Vraná, 2019).

7 CÍLE PRÁCE

- I. Vypracovat rešerši shrnující informace o autoimunitních chorobách asociovaných s HLA systémem s konkrétním zaměřením na celiakii.
- II. Osvojit si principy práce v laboratoři klinické genetiky, vč. sběru a zpracování vzorků.
- III. Shromáždit relevantní informace o pacientech laboratoře GENLABS s.r.o. a pracovišť ÚHKT a VFN a přehledně je zaznamenat.
- IV. Vytvořit on-line dotazník. Zpracovat jej.
- V. Statisticky zpracovat získaná data a z výsledků vyvodit odpovídající závěry.

8 METODIKA

8.1 TYPIZACE HLA-DQ MOLEKUL

Vlastní proces typizace HLA-DQ alel zahrnoval následující laboratorní kroky: odběr biologického materiálu, izolaci DNA z tělních tekutin, měření koncentrace izolované DNA, přípravu PCR reakce, vlastní PCR reakci, gelovou elektroforézu PCR produktů a vyhodnocení výsledků pomocí gelové elektroforózy.

8.1.1 Odběr biologického materiálu

K izolaci DNA se rutinně využívá periferní krev nebo stěr bukální sliznice. Druhá varianta je atraktivní zejména u dětí, neboť přináší možnost neinvazivního odběru biologického materiálu. Z krve se pro izolaci využívají leukocyty, v případě bukálního stěru se jedná o epitelální buňky. Pro izolaci z periferní krve se odebírá krev plná a nesrážlivá, a to do EDTA. Odebraný biologický materiál by měl být zpracován ihned, popřípadě uskladněn při ledničkové teplotě do doby použití k izolaci, max. však 14 dnů, nebo v mrazícím boxu při -20 °C po neomezenou dobu. K odebrání epitelii z bukální sliznice se používá speciální odběrová souprava obsahující speciální sterilní vatovou tyčinku, kterou se vnitřní strana tváří vytírá po dobu jedné až tří minut. Poté se vatová tyčinka vloží do příslušného plastového obalu a může být takto skladována 48 hodin od odběru. Popřípadě je možné ji ponechat v teplotě 4-8 °C po dobu 7 dnů a zpracovat až poté dle doporučení výrobce.

8.1.1.1 Informovaný souhlas

Formulář s informovaným souhlasem s genetickým vyšetřením byl přiložen ke každé odběrové soupravě pro bukální stěr. Všichni pacienti jsou vždy patřičně seznámeni s obsahem a cílem vyšetření, což stvrdí podepsáním tohoto informovaného souhlasu. Zároveň se prostřednictvím souhlasu mají možnost rozhodnout, zda si po skončení výzkumu přejí nadále skladovat svůj vzorek DNA či nikoli.

8.1.2 Izolace DNA z bukálního stěru

Ke genetickému vyšetření se použila DNA ze vzorků bukálního stěru získaného pomocí odběrové soupravy Isohelix. K samotné izolaci se používal kit DDK DNA Isolation Kit DDK3/DDK-50 (Isohelix), jež je kompatibilní s odběrovými soupravami. Postupovalo se dle manuálu výrobce. Všechny reagentie použité během izolace společně s jejich objemy jsou uvedeny v tabulce IV.

Tab. IV: Reagenty a jejich objemy pro izolaci DNA (DDK DNA Isolation Kit DDK3/DDK-50).

REAGENCIE	OBJEM (μl)
Lysis buffer (solution LS)	500
Proteináza K (PK)	20
Capture buffer (solution CT)	500
Re-hydratation buffer (solution TE)	30

Před započítím samotné izolace se pro každý vzorek připravily tři 1,5 ml mikrozkušavky, které se řádně popsaly konkrétním laboratorním identifikačním číslem (LIČ), které je unikátní pro každého klienta. Suchá lázeň se nastavila na 60 °C (*TDB-120, Dry block thermostat, BioSan*) a proteináza K se předem vyjmula z mrazícího boxu, aby rozmrzla při pokojové teplotě (RT).

Do zkumavky obsahující vatovou tyčinku s bukálním stěrem (*DNA Buccal Swabs SK-2S*) se napipetovalo 500 μ l LS a 20 μ l PK. Směs se krátce zvortexovala a stočila na stolní centrifuze (*Mini centrifuga/vortex Microspin FV-2400, BioSan*) a následně se uložila do suché lázně vyhřáté na 60 °C k inkubaci po dobu 60 minut. V tomto kroku došlo k lýze buněk a hrubý DNA extrakt se zbavil proteinů. Po inkubaci byla směs opět krátce zvortexována a stočena. Následně byl veškerý supernatant přepipetován do předpřipravené a označené 1,5 ml mikrozkušavky. K roztoku se přidalo 500 μ l CT a směs byla stočena (19 000 x g/13 000 rpm, 7 minut). Supernatant se odstranil a bylo při tom dbáno na neporušení pelety DNA. Po jeho odstranění se mikrozkušavka znovu stočila a zbylý supernatant byl opět dekantován. K peletě DNA a proteinů se přidalo 30 μ l TE/H₂O (Aqua pro Injection) v závislosti na potřebném množství a koncentraci DNA. Tato směs se inkubovala po dobu 5 minut při RT. Po inkubaci byla zkumavka zvortexována a stočena (19 000 x g/13 000 rpm, 2 minuty). Supernatant nyní obsahoval izolovanou DNA, byl tedy opatrně odebrán do nové 1,5 ml mikrozkušavky tak, aby nebyla poškozena peleta. Poté byla u vzorků změřena koncentrace DNA na fluorometru (*Quibit Fluorometr 2.0, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific*). Takto izolovaná DNA byla uložena v mrazícím boxu a skladována při -20 °C nebo ihned zpracována.

Od roku 2018 přešla laboratoř GENLABS s. r. o. k izolaci genomové DNA pomocí kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV Mini (SK168_GL_001_D, výrobce GeneAll). Jedná se o rychlou a jednoduchou metodu izolace DNA, a to genomové, mitochondriální, bakteriální, parazitické i virové. Stejně jako při použití kitu DDK DNA Isolation Kit DDK-3/DDK-50 lze i v tomto případě extrahovanou DNA ihned použít, není potřeba ji nijak dodatečně zpracovávat. Takto vyizolovaná DNA má konzistentní výtěžnost, vysokou čistotu (1,8 ~ 2,0) a je ihned připravena k použití pro PCR, Southern blotting, genotypizaci, atd. Tabulka V shrnuje reagenty a jejich objemy potřebné pro úspěšnou izolaci DNA s kitem GeneAll ExGene™ Clinic SV Mini.

Tab. V: Reagenty a jejich objemy pro izolaci DNA (GeneAll ExGene™ Clinic SV Mini).

REAGENCIE	OBJEM (μl)
BL buffer	400
Proteináza K (PK)	40
BW buffer	600
TW buffer	700
AE buffer	50

Postup pro izolaci DNA pomocí kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV Mini je následující: Před samotným započítím práce byla suchá lázeň vytemperovaná na 56 °C. Do zkumavky s bukálním stěrem se napipetovalo 400 μl BL pufru. Dále se přidalo 40 μl proteinázy K o celkové koncentraci 20 mg/ml. Směs se důkladně promíchala s pomocí vortexu (*Mini centrifuga/vortex Microspin FV-2400, BioSan*). Následně byla směs inkubována v 56 °C po dobu 10 minut. Zkumavka byla krátce stočena v stolní centrifuze (*Centrifuge 5421R, Eppendorf*), aby došlo k odstranění kapek z vnitřní strany víčka zkumavky. Ke směsi se přidalo 400 μl 100 % ethanolu. Směs byla vortexována v pulzech, aby došlo k jejímu důkladnému promíchání. Poté byla opět krátce stočena v stolní centrifuze. Dále byla tekutina přenesena na pečlivě označenou kolonku ve dvou krocích (např. dvakrát po max. 700 μl). Směs byla pokaždé stočena v centrifuze (8 200 rpm, 1 minuta). Supernatant byl vždy společně se sběrnou zkumavkou odstraněn. Sběrná zkumavka byla nahrazena novou, do které byla vložena kolonka s navázanou DNA. Na kolonku bylo napipetováno 600 μl BW pufru. Směs byla stočena (8 200 rpm, 1 minuta), sběrná zkumavka se supernatantem

byla odstraněna a opět nahrazena novou. Na kolonku bylo dále napipetováno 700 µl TW pufru. Krok se stáčením byl zopakován (8 200 rpm, 1 minuta). Následně byl supernatant ze sběrné zkumavky dekantován a kolonka byla navracena do stávající sběrné zkumavky. Takto byl vzorek opět stáčen nasucho, aby došlo k odstranění zbytkového promývacího pufru (13 000 rpm, 1 minuta). Nová 1,5 ml mikrozkušavka byla řádně popsána LIČ příslušného klienta a byla do ní vložena kolonka s adsorbovanou DNA. Přímou na střed kolonky bylo přidáno 50 µl AE pufru, přičemž takto byl vzorek inkubován po dobu 5 minut při RT. Po uplynutí této doby byla zkumavka s kolonkou stočena při nejvyšších otáčkách (13 000 rpm, 1 minuta). Přefiltrovaný supernatant byl následně napipetován zpět na kolonku, směs se opět inkubovala 5 minut. Poté byla zkumavka s kolonkou znovu stočena při nejvyšších otáčkách (13 000 rpm, 1 minuta). Následně byla u vzorků změřena koncentrace DNA na fluorometru (*Quibit Fluorometr 2.0, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific*). Takto izolovaná DNA byla uložena v mrazicím boxu a skladována při -20 °C nebo ihned zpracována.

8.1.3 Izolace DNA z periferní krve

Pro izolaci DNA z leukocytů v periferní krvi byl opět použit kit GeneAll Exgene™ Clinic SV Mini (SK168_GL_001_D, GeneAll). Postupovalo se podle návodu GeneAll Exgene Protocols následovně: Před samotným začátkem izolace byly 1,5 ml mikrozkušavky řádně popsány LIČ příslušného pacienta a suchá lázeň byla vyhřáta na 56 °C. Do každé mikrozkušavky bylo napipetováno 40 µl Proteinázy K (koncentrace 20 mg/ml), která byla předtím vyjmuta z lednice. K proteináze bylo přidáno 400 µl periferní krve. Dále bylo do mikrozkušavek připipetováno 400 µl BL pufru. Takto byly zkumavky řádně zvortexovány a stočeny (*Mini centrifuga/vortex Microspin FV-2400, BioSan*). Následně byly uloženy do suché lázně k inkubaci na 10 minut. Posléze byly zkumavky opět krátce stočeny, aby došlo k odstranění kapek z vnitřku víček. K směsi bylo napipetováno 400 µl 100 % ethanolu. Zkušavky byly dále vortexovány v pulzech. Směs byla poté po částech přenesena na pečlivě označenou kolonku (tj. několikrát po max. 700 µl) a stočena ve stolní centrifuze (*Centrifuge 5421R, Eppendorf*) na 6 000 x g/ 8 200 rpm po dobu 1 minuty. Supernatant byl vždy společně se sběrnou zkumavkou odstraněn. Sběrná zkumavka byla nahrazena novou, do které byla vložena kolonka s navázanou DNA. Na kolonku bylo dále napipetováno 600 µl BW pufru. Směs byla stočena (6 000 x g/8 200 rpm, 1 minuta), sběrná zkumavka se supernatantem byla odstraněna a opět nahrazena novou. Na kolonku bylo napipetováno 700 µl TW pufru. Krok se stáčením byl opakován (6 000 x g/8 200 rpm, 1 minuta), dokud tekutina ve sběrné zkumavce nebyla naprosto čirá. Následně byl tento supernatant ze sběrné

zkumavky dekantován a kolonka byla navracena do stávající sběrné zkumavky. Takto byl vzorek opět stáčen nasucho při nejvyšších otáčkách, aby došlo k odstranění zbytkového promývacího pufru (19 000 x g/13 000 rpm, 1 minuta). Nová 1,5 ml mikrozkušavka byla řádně popsána LIČ příslušného klienta a byla do ní vložena kolonka s adsorbovanou DNA. Přímo na střed kolonky bylo přidáno 50 µl AE pufru, přičemž takto byl vzorek inkubován po dobu 5 minut při RT. Po uplynutí této doby byla zkumavka s kolonkou stočena při nejvyšších otáčkách (19 000 x g/13 000 rpm, 1 minuta). Přefiltrovaný supernatant byl následně napipetován zpět na kolonku, směs se opět inkubovala 5 minut. Poté byla zkumavka s kolonkou znovu stočena při nejvyšších otáčkách (19 000 x g/13 000 rpm, 1 minuta). Následně byla u vzorků změřena koncentrace DNA na fluorometru (*Qubit Fluorometr 2.0, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific*). Takto izolovaná DNA byla uložena v mrazícím boxu a skladována při -20 °C nebo ihned zpracována.

8.1.4 Měření koncentrace DNA

Pro měření koncentrace izolované DNA pomocí fluorometru (*Qubit Fluorometr 2.0, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific*) byl použit kit AccuGreen™ Broad Range dsDNA Quantitation Solution (*Biotum*). Kit je navržen pro použití s ručními fluorometry, jako je právě fluorometr Qubit firmy Thermo Fisher. Kvantifikační roztok AccuGreen™ je specifický pro dsDNA a může kvantifikovat vzorky DNA v rozmezí 0,2-100 ng/µl. Použití tohoto kitu na fluorometru Qubit vyžaduje dva standardy.

AccuGreen™ Solution byl nejprve vyjmut z lednice k vytemperování při RT. Pro standardy bylo napipetováno 190 µl kvantifikačního roztoku (*Quantitation Solution AccuGreen™, Biotum*) do předpřipravené 0,5 ml mikrozkušavky (Qubit Assay Tubes, Invitrogen), jež byla řádně označena. Do jedné mikrozkušavky určené pro standard bylo napipetováno 10 µl AccuGreen™ Standard 1 (0 ng/µl). Do druhé mikrozkušavky určené pro standard bylo připipetováno 10 µl AccuGreen™ Standard 2 (100 ng/µl). Do mikrozkušavek určených pro vzorek bylo napipetováno 195 µl kvantifikačního roztoku a k tomuto přidáno po 5 µl izolované DNA. Mikrozkušavky byly krátce zvortexovány a stočeny. Vzorky byly následně ponechány k inkubaci při RT alespoň po dobu 2 minut. Posléze byla koncentrace izolované DNA změřena na přístroji *Qubit Fluorometr 2.0, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific*, přičemž jako první byl změřen standard 1, poté standard 2 a následně byly měřeny koncentrace vlastních vzorků s DNA. Hodnoty koncentrací byly řádně zaznamenány.

8.1.5 Příprava vzorků pro PCR reakci

Před započítím samotné PCR reakce k amplifikaci konkrétního DNA lokusu bylo potřeba připravit amplifikační reakci, do které byla následně přidána izolovaná DNA. To obnášelo namíchání tzv. master mixů, poskytujících vhodné podmínky pro namnožení specifického DNA lokusu. Ke genotypizaci HLA alel byly použity dvě metody, primárně SSP PCR a v případě nízké koncentrace DNA izolátu, popř. z důvodu ověření správnosti výsledků se přistoupilo také k citlivé metodě real-time PCR (q-PCR). V obou případech se pracovalo s komerčně dostupnými kity určenými k namíchání master mixu takovým způsobem, aby se počet manipulací s izolátem DNA snížil na minimum, čímž se redukovalo riziko jeho kontaminace. Tabulka VI poskytuje přehled komerčních kitů vhodných ke genotypizaci HLA alel.

Tab. VI: Přehled komerčních kitů vhodných k typizaci HLA alel.

SSP PCR			real-time PCR		
FIRMA	KIT	ALELY	FIRMA	KIT	ALELY
Olerup™	Olerup SSP Kit	A, B, C, DR, DQ, DP	LinkSeq™	LinkSeq™ HLA Typing Kit	A, B, C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, PDB1
Thermo Fisher Scientific™	HLA-SSP Typing Kit		Histo SPOT™	Histo Type B*27 Q Kit	
One Lambda™	Micro SSP™	HLA třídy I a II	Bioneer Corporation™	HLA B-27 RealTime PCR Kit	
	Allset + Gold SSP Kit	ABC, ABDR, ABDRDQ, DRDQ			
	Secore™ GSSP Kit	A, B, C, DPB1, DQB1, DRB			
Histo SPOT™	Histo Type SSP Kit	A, B, C, ABC, ABDR, DR, DQB, DRDQB	Nimagen™	GenVinSet HLA-B27 Detection Kit	
Protrans™	Protrans HLA SSP Kit	A, B, DRB1, DQB1			
TBG Diagnostics Ltd.™	Morgan HLA-B SSP Typing Kit		Gentaur™	HLA B-27 Real-TM PCR Kit	
ROSE Gen. Tec.™	HLA SSP Typing Kit	A, B, DR, C, DQ, DRDQ, ABC, ABDR, ABDRDQ	Inno-Train™	HLA Fluo Gene Kit	
Inno-Train™	HLA-Ready Gene Kit	ABC, ABDR, DRDQDP, DQDP	3B BlackBio™	HLA B-27 PCR Kit	
BIOSeWoom™	HLA-A, -B, -C PCR/SSP Kit	A, B, C, ABC			
Eurex Medica™	HLA-B SSP Typing kit		Eagle Biosciences™	MutaPLATE HLA-DQ2+8 (RT) PCR Assay Kit	
OSB India™	HLA Tissue Typing SSP Kit		Olerup™	Olerup Qtype®	

8.1.6 Příprava SSP PCR

Jako primární metoda ke genotypizaci rizikových HLA alel byla zvolena metoda SSP PCR, při níž dochází k amplifikaci konkrétní sekvence definované specifickými primery. Použit byl kit Histo Type SSP Kit a pracovalo se dle manuálu Histo Type Celiac Disease od společnosti *BAG Health Care GmbH* (Lich, Germany).

Komerčně připravené PCR stripy (3 řady po 8 jamkách) obsahující specifické primerové páry, uchovávané v lednici při teplotě od 2 do 8 °C, byly před samotnou prací vyjmuty a přeneseny do dekontaminovaného laminárního boxu. Pufr a polymeráza, uchovávané v mrazícím boxu v teplotě -20 °C, byly rozmrazeny při RT. Reagencie byly po rozmražení drženy na ledu v dekontaminovaném laminárním boxu, aby nedošlo ke kontaminaci reakční směsi. Jeden test se skládá z 24 jamek. Výrobce na stěnu každé jamky naadsorboval specifické jednořetězcové oligonukleotidy, které detekují různé HLA alelické skupiny nejčastěji asociované s celiakií (výjimkou z výše uvedeného je jamka č. 24, v které jsou naadsorbovány všechny oligonukleotidy, a tato jamka tedy slouží jako negativní neboli kontaminační kontrola). Na dně každé z jamek plata jsou adsorbovány také primery specifické pro každou HLA alelu, jakožto i kontrolní primery pro vnitřní kontrolu (specifickou pro lidský gen G3PDH). Amplifikační parametry jsou nastaveny na celkový objem 10 µl reakční směsi v každé jamce.

Pro každý vzorek byl připraven master mix dle rozpisu v tabulce VII.

Tab. VII: Složení master mixu v závislosti na počtu reakcí (Histo Type SSP Kit).

Počet reakcí	Destil. H ₂ O (µl)	10x PCR pufr (µl)	Happy Taq-polymeráza (µl) (5 U/µl)	Roztok DNA (µl) (25-50 ng/ µl)	Celkový objem (µl)
1	8	1	0,08	1	10
24	222	28	2,2	28	280

Do 1,5 ml mikrozkuhavky bylo v laminárním boxu napipetováno 222 µl destilované H₂O, 28 µl 10x PCR pufru a 2,2 µl Happy Taq-polymerázy (tj. 5U/µl; kat. č. 70976). Zkuhavka se zvortexovala a stočila v minicentrifuze (*Mini centrifuga/vortex Microspin V-2400, bioSan*), aby se jednotlivé komponenty řádně promíchaly a nezůstaly na stěnách nebo

víčku zkumavky. Z takto namíchaného master mixu bylo nejprve napipetováno 10 μ l do jamky č. 24, tedy do kontaminační kontroly (značena modře). Do zbytku master mixu byla již mimo laminární box napipetována DNA. Pokud se koncentrace DNA pohybovala okolo 50 ng/ μ l, přidalo se jí do master mixu 28 μ l. Jestliže byla koncentrace DNA vyšší nebo nižší než 50 ng/ μ l, upravilo se její vstupní množství tak, aby do reakční směsi bylo přidáno celkem 1400 ng DNA a objem 28 μ l byl následně doplněn sterilní H₂O nebo byl celkový objem vody poměrově snížen. Master mix i s DNA byl následně rozpipetován po 10 μ l do zbývajících 23 jamek. Takto připravený vzorek byl řádně uzavřen přiloženými plastovými víčky, krátce stočen kvůli odstranění kapek ze stěny a víčka, a poté již umístěn do gradientového termocycleru (*MultiGene, Labnet*), ve kterém probíhá PCR reakce. Takto připravený test je možné uchovat při 2–8 °C, přičemž následující PCR reakce by měla být zahájena do dvou hodin po přípravě reakční směsi.

8.1.7 SSP PCR

Po pečlivém namíchání master mixu a přidání příslušného množství DNA izolátu bylo 24 jamkové plato umístěno do připraveného gradientového termocycleru (*MultiGene, Labnet*), ve kterém proběhla příslušná PCR reakce. Amplifikační profil je uveden v tabulce VIII.

Tab. VIII: Amplifikační profil metody SSP PCR pro detekci rizikových HLA alel.

Krok programu	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	96	5 minut	1
Denaturace	96	20 sekund	5
Annealing + extenze	68	1 minuta	
Denaturace	96	20 sekund	10
Annealing	64	50 sekund	
Extenze	72	45 sekund	
Denaturace	96	20 sekund	15
Annealing	61	50 sekund	

Extenze	72	45 sekund	
Závěrečná extenze	72	5 minut	1

8.1.8 Gelová elektroforéza SSP PCR produktů

Pro vizualizaci produktů metody SSP PCR byla použita rozšířená gelová elektroforéza. Tato analytická metoda umožňuje separaci makromolekul. Dochází k migraci iontů v elektrickém poli na základě rozdílnosti jejich velikosti a náboje. Také záleží na tom, v jakém médiu elektroforéza probíhá. Nukleové kyseliny nesou záporný náboj díky fosfátové skupině, tudíž se pohybují od katody k anodě. Voet et al. dodává, že v případě gelové elektroforézy se využívají polyakrylamidové a agarózové gely, které obsahují póry brzdící větší molekuly, které následně gelem postupují pomaleji. Gely bývají zpravidla ponořené ve speciálním pufru udržujícím stabilní pH (Voet et al., 2011).

Po proběhnutí PCR byla přítomnost a velikost ampliconů ověřena na 3 % agarózovém gelu, který byl připraven z 50 ml 1x TBE pufru (Thermo Scientific, připravený z 50 ml 10x TBE (*InvitrogenTM*) a 450 ml destilované vody), do něhož byl přidán potřebný počet tablet obsahujících 0,5 g agarózy (*Nippon Genetics*) (pro 3 % gel byly rozpuštěny 3 tabletky). Množství roztoku závisí na požadované velikosti gelu (50 ml = malý gel, 100 ml = velký gel). V takovém případě koncentraci gelu určuje počet použitých tablet (1 tabletky/50 ml = 1 % gel, 2 tabletky/100 ml = 1 % gel). Počkalo se, dokud nebyly tablety zcela rozpuštěny a posléze byla směs v kádince z plastu zahřívána v mikrovlnné troubě (alespoň třikrát po zhruba 3 minutách). Výsledkem byl čirý homogenní gel, do kterého bylo přidáno 12 µl barvičky Midori Green Advanced DNA Stain (*FastGene*). Takto obarvený gel byl nalit do připravené vaničky s ukotvenými hřebeny. Následně byl gel ponechán na tmavém místě pro zatuhnutí.

Tuhý gel byl vyjmut z vaničky a přenesen do elektroforetické vany (*Mupid® One Electrophoresis Systém*), ve které byl po rysku nalit 1x TBE pufr. Pro správný průběh elektroforézy musel být gel v elektroforetické vaně vždy ponořen v pufru, aby tento mohl zajišťovat stabilní pH. V tomto bodě bylo možné do jamek gelu nanést produkty odpovídající 24 PCR reakcím po 10 µl a také 5 µl hmotnostního markeru 100 bp DNA LADDER H3RTU (*FastGene*), který slouží pro kontrolu velikosti PCR produktů

Samotná elektroforéza probíhala při 100–135 V zhruba 10–15 minut. Za pomoci iluminátoru MUPID™ Led bylo možno sledovat průběh celé elektroforézy, a to díky použité barvě Midori Green. Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen na detekční systém *FastGene® Gel-Pic LED Box*. Díky tomuto světelnému boxu bylo možné výsledek elektroforézy vyfotografovat a pomocí paměťové karty přenést do počítače k dalšímu zhodnocení.

8.1.9 Vizualizace a hodnocení výsledků gelové elektroforézy

Viditelné PCR produkty o známé velikosti byly na gelu následně vizuálně vyhodnoceny. V každé PCR reakci musí být v nepřítomnosti specifického proužku přítomna vnitřní kontrola o velikosti 1070 bp (v jamce č. 5 je to 429 bp). V přítomnosti specifického proužku je band vnitřní kontroly velice slabý nebo zcela chybí. Velikosti jednotlivých amplifikovaných PCR produktů odpovídající příslušným PCR reakcím, jakožto i zastoupení jednotlivých HLA oligonukleotidů naadsorbovaných na stěnách zkumavek kitu Histo Type SSP Kit, jsou znázorněny na obrázku 9.

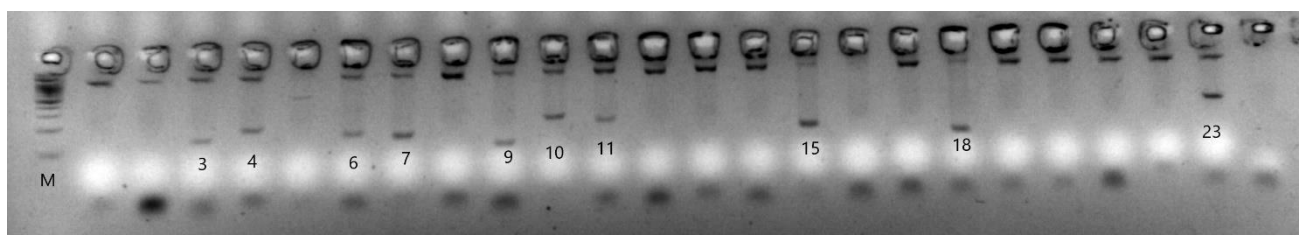
Konečný výsledek byl zadán do speciálního softwaru BAG Health Care® HISTO MATCH Software, který dokáže během několika sekund na základě typu a počtu pozitivních bandů vyhodnotit přítomnost rizikových alel asociovaných s možným propuknutím celiakie.

Vysvětlivky: w = slabá amplifikace, ! = velikost interní kontroly v jamce č. 5 je 429 bp.

8.1.10 Vizualizace výsledků gelové elektroforézy

Po skončení elektroforézy byl gel vyjmut z pufru a přenesen na foto dokumentační systém (*FastGene® GelPic LED Box*). Následně byly odečteny výsledky a pořízena fotodokumentace gelu. Fotografie gelů byly přeneseny pomocí paměťové karty do PC.

Obrázek 10 znázorňuje pořízený snímek elektroforetického gelu pomocí systému *FastGene® GelPic LED Box*.



Obr. 10: Snímek elektroforetického gelu znázorňující vyšetřené rizikové alely pro celiakii (zdroj: laboratoř *GENLABS s.r.o.*).

Na gelu vidíme, že se amplifikoval produkt na 3., 4., 6., 7., 9., 10., 11., 15., 18. a 23. pozici. Písmeno „M“ značí marker (ladder). Podle tabulky uvedené na straně 56 bychom mohli vyhodnotit alely následovně:

Pozice 3.: **DRB1*07**

Pozice 4.: **DRB1*11:01, 11:21, 11:23**

Pozice 6., 7.: **DQB1*02:01, 02:02, 02:03, 02:05**

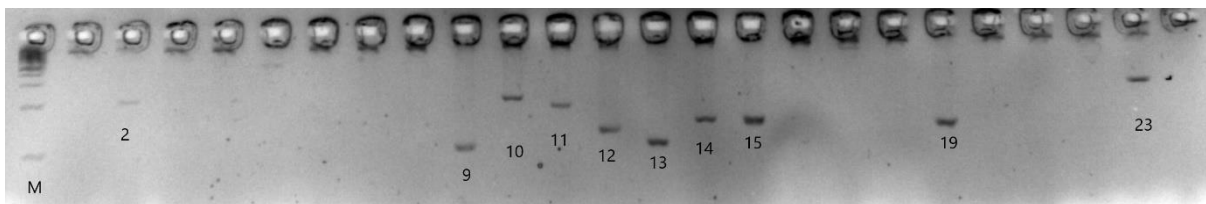
Pozice 9., 10., 11., 15.: **DQB1*03:01, 03:03, 03:09, 03:10/03:07, 03:08, 03:14/DQB1*03:02, 03:04, 03:12, 03:13, 03:14**

Pozice 18.: **DQA1*03:01**

Pozice 23.: **DQA1*05:05**

Výsledný haplotyp: DQ2.5

Snímek 11 znázorňuje snímek jiného elektroforetického gelu.



Obr. 11: Snímek elektroforetického gelu znázorňující vyšetřené rizikové alely pro celiakii (zdroj: laboratoř GENLABS s.r.o.).

Na gelu vidíme, že se amplifikoval produkt na 2., 9., 10., 11., 12., 13., 14., 15., 19. a 23. pozici. Písmeno „M“ značí marker (ladder). Podle tabulky uvedené na straně 56 bychom mohli vyhodnotit alely následovně:

Pozice 2.: **DRB1*04:01**

Pozice 9., 10., 11., 12., 13., 14., 15.: DQB1*03:01, 03:03, 03:09, 03:10/03:07, 03:08, 03:14/**DQB1*03:02**, 03:04, 03:12

Pozice 19.: **DQA1*05:01**, **DQA1*05:02**, 05:03, 05:04, 05:07, 05:08

Pozice 23.: **DQA1*05:05**

Výsledný haplotyp: DQ8

K soupravě HISTO TYPE SSP (Celiac disease) patří i software HISTO Match (HISTO SPOT® HLA AB Module), který je zdarma poskytován společností BAG Health Care. Díky tomuto inovativnímu softwaru odpadá nutnost vyhledávat jednotlivé pozitivní alely v tabulce (viz str. 59). Zde stačí zadat odečtené pozitivní HLA alely do programu jednoduše podle čísel jamek a jediným kliknutím získat výsledek, a to jak haplotyp, tak jednotlivé alely (ty hlavní, které přispívají ke konečnému haplotypu i vedlejší, které sice neovlivňují výsledek, ale jejichž přítomnost nelze vyloučit).

8.1.11 Příprava q-PCR

Jako další pro genotypizaci rizikových HLA alel byla zvolena metoda real-time PCR (q-PCR). Na rozdíl od běžné PCR, zde lze kvantifikovat sledovaný úsek DNA v reálném čase. Do procesu jsou zahrnuty fluorescenčně značené sondy, které se váží na amplifikovaný úsek DNA. Optické zařízení následně snímá intenzitu fluorescenčního záření v reálném čase, čímž odpadá nutnost analyzovat výsledný produkt na agarózovém gelu.

Použit byl komerční CE IVD kit EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DR4) (Elisabeth Pharmacon, s. r. o.), sloužící ke genotypizaci rizikových haplotypů HLA-DQ2, HLA-DQ8 a

HLA-DR4. Pro detekci vybraných HLA alel a vnitřní kontroly byly využity primery a značené sondy (FAM a JOE). Souprava EliGene® Coeliac RT detekuje alely HLA-DQ2 (DQA1* 05, DQB1* 02), HLA-DQ8 (DQA1* 03, DQB1* 03:02) a HLA-DR4 (DRB1* 04). Jako vnitřní kontrola je použit lidský gen SYPL2 (synaptophysin -like 2). Podle manuálu EliGene® Coeliac RT je pro detekci DQA1* 05, DRB1* 04 a DQB1* 03:02 alel použita sonda značená fluorescenční barvičkou FAM (exc. 494 nm – em. 518 nm) a pro detekci DQA1*03, DQB1*02 a SYPL2 (vnitřní kontrola) alel je použita sonda značená fluorescenční barvičkou JOE (exc. 520 nm – em. 548 nm). Master mix obsahuje pasivní referenční barvu ROX pro normalizaci signálu. Kit využívá jako vnitřní izolační kontrolu detekci lidského genu SYPL2 v CELI-DRB mixu detekovatelnou v kanálu JOE. Gen pro SYPL2 je přítomen v každém vzorku lidské DNA.

Kit EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DR4) je dodáván s již předmíchanými master mixy, v nichž se nachází vše včetně DNA polymerázy, primerů a sond. Jednotlivé master mixy CELI-DQ2, CELI-DQ8 a CELI-DR4 byly vyjmuty z mrazícího boxu a přeneseny do dekontaminovaného laminárního boxu, kde byly po rozmražení uchovávány ve vychlazeném hliníkovém bloku z důvodu snížení rizika kontaminace reakčních směsí. Vychlazený blok obsahuje speciální adaptéry (*LightCycler® Centrifuge Adapters, Roche Life Science*), do nichž byly pinzetou vloženy skleněné kapiláry o objemu 20 µl (*LightCycler® Capillaries, Roche Life Science*). Master mixy byly po rozmražení zvortexovány a krátce stočeny a následně byly pipetovány do tří sad (DQ2, DQ8, DR4) detekčních kapilár po 17,5 µl z každého mixu. V rámci každého běhu byla použita pozitivní i negativní kontrola amplifikační reakce. Následně byla do detekčních kapilár (DQ2, DQ8, DR4) přidána izolovaná DNA v objemu 2,5 µl. Do kapilár sloužících jako pozitivní kontrola byla napipetována kontrolní DNA (PC CELI) dodávaná společně s kitem a do negativní kontroly byla napipetována H₂O (*Aqua pro Injectione*). Následně byly kapiláry uzavřeny speciálním výčkem a ukotvené v kovových adaptérech, vloženy do stolní centrifugy a velice krátce stočeny (max. 1000 ot/min.). Poté již byly přesunuty z kovových adaptérů do rotoru real-time cycleru (*LightCycler® 2.0, Roche Life Science*) a byl spuštěn příslušný program.

8.1.12 q-PCR

Před spuštěním amplifikační reakce je proveden minimálně jedenkrát v pracovním dnu tzv. self-test přístroje, který zajistí jeho kalibraci. Profil PCR reakce, který doporučuje výrobce kitu, byl mírně upraven a je uveden v tabulce IX.

Tab. IX: Amplifikační profil metody q-PCR pro detekci rizikových HLA alel.

FÁZE	POČET CYKLŮ	TEPLOTA (°C)	ČAS
Denaturační	1	95	3 minuty
Cyklovací	40	95	15 sekund
		61 (<i>extenze s annealingem</i>)	40 sekund

Po dokončení amplifikace mohly být ihned odečteny a interpretovány výsledky. Pozitivní výsledek byl charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v kanálu FAM (510-528 nm.) a/nebo v kanálu JOE (530-548 nm.). V případě negativní reakce nedošlo k amplifikaci a detekci signálu. V případě pozitivní kontroly byl patrný signifikantní nárůst signálu ve FAM i JOE, čímž bylo potvrzeno, že reakce proběhla úspěšně. V negativní kontrole, která neobsahovala DNA, nárůst signálů patrný nebyl, a nedošlo tedy ke kontaminaci jednotlivých reagensů.

Tabulka X. znázorňuje možné výsledky testu.

Tab. X: Možné výsledky metody real-time PCR (EliGene® Coeliac RT).

Genotyp	CELI-DQ2 Mix		CELI-DR4 Mix		CELI-DQ8 Mix	
	FAM DQA1* 05 (DQ2)	JOE DQB1* 02 (DQ2)	FAM DRB1* 04 (DRB)	JOE IC (vnitřní kontrola)	FAM DQB1* 03:02 (DQ8)	JOE DQA1* 03 (DQ8)
DQ2	-	+	+	+	-	+
DQ 2.5	+	+	-	+	-	-
DQ8	+	-	-	+	+	+
DQ8	-	+	-	+	+	+
DQ8	-	-	+	+	+	+
DRB4	+	-	+	+	-	+
DRB4	-	+	+	+	-	+
DRB4	-	-	+	+	-	-
DQ2/DQ8	+	+	-	+	+	+
DQx.5	+	-	-	+	-	-
negativní	-	-	-	+	-	-

DQ 2.x	-	+	-	+	-	-
--------	---	---	---	---	---	---

8.2 Vytvoření on-line dotazníku

Během vypracování diplomové práce jsem se také zabývala sběrem a sumarizací dat laboratoře GENLABS s.r.o. Mým úkolem bylo pečlivě projít žádanky a výsledkové listy jednotlivých pacientů laboratoře, kteří v letech 2014 až 2019 podstoupili vyšetření vrozených rizikových faktorů pro celiakii. Za účelem přehlednosti jsem vytvořila tabulku v programu Excel, do které jsem zanesla personálie jednotlivých klientů. Zajímalo mě především jejich pohlaví, rok narození, metoda vyšetření, výsledek ve smyslu, zda byli vyhodnoceni jako pozitivní (existuje u nich riziko propuknutí celiakie) nebo negativní (riziko propuknutí celiakie je vyloučeno), dále přítomnost jednotlivých rizikových alel a v poslední řadě výsledný rizikový haplotyp.

Za účelem prohloubení znalostí o jednotlivých pacientech jsem na internetovém portálu Survio vytvořila on-line dotazník, jehož cílem bylo striktně oddělit ty pacienty s lékařsky potvrzenou diagnózou celiakie od těch, kteří mají lékařsky potvrzeno, že chorobou netrpí, popř. těch, kteří neabsolvovali nutná sérologicko-histologická vyšetření, a tudíž u nich diagnóza nebyla ani potvrzena ani vyloučena. Jedním z důvodů k vytvoření tohoto dotazníku byl právě fakt, že výskyt rizikových alel (popř. haplotypů) pro celiakii nutně neznamená, že daný pacient chorobou skutečně trpí. Pokud jsme chtěli komparovat rizikové alely mezi klienty, museli jsme se pokusit kohortu vyšetřených pacientů rozdělit právě podle tohoto hlediska na ty s lékařsky potvrzenou celiakií a na ty bez diagnózy celiakie. Proto byly otázky formulovány následovně, např. „Máte lékařsky potvrzenou/vyvrácenou diagnózu celiakie?“, „Podstoupil/a jste vyšetření protilátek nebo histologii k potvrzení/vyvrácení diagnózy celiakie?“ On-line dotazník jsem odeslala pacientům e-mailovou cestou. Každému z nich byl přidělen unikátní identifikační kód, podle kterého jsem mohla propojit jeho odpovědi s výsledkem vyšetření v laboratoři GENLABS s. r. o. Získaná anonymizovaná data byla následně zpracována.

8.3 Statistické vyhodnocení dat

Sesbíraná data byla zpracována v programech Canoco 5¹ a Excel. Datovou jednotku představovali jednotliví pacienti, u kterých byl zjištěn výskyt alel (0/1).

¹ Ter Braak C.J.F. & Šmilauer P. (2012): Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0. Microcomputer Power, Ithaca, USA, 496 pp.

Tato mnohorozměrná data byla analyzována v programu Canoco 5 pomocí metod Detrended Correspondence Analysis (nepřímá metoda – DCA) a Canonical Correspondence Analysis (přímá metoda – CCA). Jako závislá proměnná byl u DCA analýzy určen faktor ne/potvrzené diagnózy celiakie. Výsledky byly stanoveny jako průkazné při $p < 0,05$ za použití Monte-Carlo permutačního testu.

9 VÝSLEDKY

9.1 Kazuistika pacientky K. K.

Během vytváření diplomové práce jsem se v laboratoři GENLABS s.r.o. seznámila se studentkou K. K., od které jsem se dozvěděla, že trpí cukrovkou I. typu (*diabetes mellitus I. typu*) společně s celiakií. Na základě řízeného rozhovoru s ní bylo rozhodnuto o jejím vyšetření na ne/přítomnost rizikových HLA-DQ alel. Všechny informace důležité pro tuto studii byly získány během osobních rozhovorů, popř. diskusí vedených prostřednictvím internetových portálů. Z případové studie jsou vynechány identifikační údaje, jakožto i informace pro účel této práce nepodstatné.

I. TEORETICKÝ PŘEHLED

Celiakie je onemocnění vyskytující se poměrně často s dalšími autoimunitními chorobami, především *diabetem I. typu*. Výrazně zvýšené riziko celiakie je právě u nemocných cukrovkou (pravděpodobnost rozvinutí celiakie je až sedmkrát vyšší). Diagnostika celiakie bývá u diabetiků obtížná, neboť se nemusí projevit očekávané symptomy, popř. tyto mohou být připsány právě cukrovce (Valerio et al., 2002).

II. OSOBNÍ ÚDAJE

Iniciály: K.K.

Datum narození: 1997

Místo trvalého bydliště: České Budějovice

S diabetem léčena od roku 2007, kdy jí bylo 9 let. Jako primární spouštěč onemocnění uvádí vleklé střevní onemocnění s rapidním snížením imunitní ochrany. Prvotním projevem choroby byl noční ketoacidotický záchvat. Po příjezdu do nemocnice poskytla vzorek moči, ve kterém lékaři potvrdili acetonový zápach. Na základě vyšetření krve potvrzena diagnóza *diabetes mellitus*. Zhruba třičtvrtě roku po potvrzení diabetu diagnostikována i celiakie na základě histologického vyšetření (stvrzena změna střevní výstelky).

III. RODINNÁ ANAMNÉZA:

Diagnóza *diabetes mellitus* u všech členů rodiny vyloučena. Členové rodiny hromadně vyšetřeni na IgA protilátky kvůli potvrzení/vyvrácení celiakie. Diagnóza vyloučena. Sestra V. K. trpí od dětství dětskou mozkovou obrnou (DMO), spolu s otcem a matkou je trápí

vysoký krevní tlak. Babička (matka otce) má operovaný šedý zákal a potvrzený zelený zákal. Oba dědečkové zemřeli na infarkt.

IV. OSOBNÍ ANAMNÉZA:

Prodělala několik zlomenin prstů a jedenkrát zlomené zápěstí. V 5 letech podstoupila extrakci nosních mandlí. Léčba ve všech případech bez komplikací. Potvrzena alergie na pyl, prach, roztoče, kočičí a psí srst, seno a slámu.

Rekreačně sportuje. Dle jejích slov ji cukrovka ve vykonávání sportu omezuje, ale dá se s tím naučit pracovat.

Bezlepkovou dietu nedodrží striktně.

Medikamenty: inzulin, léky proti alergii, Euthyrox (pro léčbu poruch štítné žlázy), antikoncepce, doplňky stravy (vitamin B a magnezium).

V. MANIFESTACE A NYNĚJŠÍ STAV:

První manifestace diabetu v 9 letech. Cítila ohromnou únavu a nedostatek energie. Navíc prodělala veliký úbytek hmotnosti (kolem 6 kg/2 měsíce). Trpěla neustávajícími pocity žízně a nočním pomočováním.

Nyní *diabetes* labilní (ne kompenzovaný), také kvůli přidružené celiakii. Hodnoty glykémie kolísají (od 2,8 do 16,7 mmol/l). Inzulin aplikuje inzulinovou pumpou, která dává malé množství inzulinu každou minutu (bazální inzulin cca 35 j./den + 4 j. snídane, 4 j. oběd, 4 j. večeře a 2+2 j. svačiny = 51 j. inzulinu na 20 j. jídla, druhou večeři si nedává). Kontrola u diabetologa jedenkrát za tři měsíce.

VI. SOCIÁLNÍ ASPEKTY:

Rodiče reagovali na zjištění, že dcera má *diabetes mellitus*, dobře. Ve škole si zažila posměšky. Učitelé byli buď lhostejní nebo nervózní z její přítomnosti. Z tělesné výchovy osvobozena nebyla. Lékaři nebyla dostatečně informována o diabetu, spoustu informací se dozvěděla z literatury (DIACEL) a internetu.

VII. VYŠETŘENÍ:

Pacientka K. K. souhlasila s vyšetřením rizikových HLA-DQ alel u sebe i u členů své rodiny. Pro tento účel byl klientce K. K. proveden odběr krve, zatímco ostatním

vyšetřovaným rodinným příslušníkům byl proveden sěr bukální sliznice (*DNA Buccal Swabs SK-2S*). Následně byla provedena izolace DNA dle standardních manuálů (viz. Kapitola 8.1.2) s použitím kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV Mini (GeneAll) pro izolaci DNA jak z bukálního stěru, tak z periferní krve. Poté byly typizovány rizikové HLA-DQ alely metodou real-time PCR (q-PCR) podle návodu v kapitolách 8.1.11 a 8.1.12 s použitím kitu EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DR4).

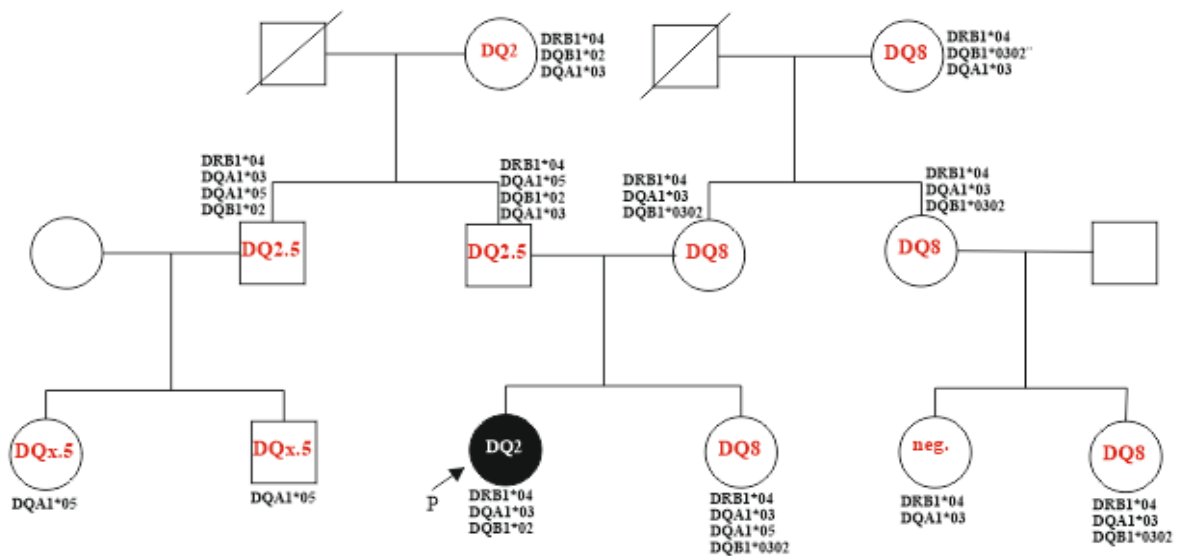
Výsledky měření včetně koncentrací izolované DNA jsou shrnuty v tabulce XI.

Tab. XI. Koncentrace DNA a výsledky real-time PCR rodinných příslušníků pacientky K. K.

LIČ	c DNA (ng/μl)	DQA1* 05 (DQ2)	DQB1* 02 (DQ2)	DRB1* 04 (DRB)	Vnitřní kontrola	DQB1* 03:02 (DQ8)	DQA1* 03 (DQ8)	Výsledek
80/18	9,84	-	-	+	+	+	+	DQ8
81/18	7,28	+	+	+	+	-	+	DQ2.5
82/18	0,96*	-	+	+	+	-	+	DQ2
83/18	2,86	-	-	+	+	+	+	DQ8
84/18	30	-	+	+	+	-	+	DQ2
89/18	4,96	+	-	-	+	-	-	DQx.5
90/18	4,86	+	+	+	+	-	+	DQ2.5
91/18	12,9	+	-	+	+	+	+	DQ8
92/18	8,19	-	-	+	+	+	+	DQ8
93/18	16,9	-	-	+	+	+	+	DQ8
94/18	20,9	-	-	+	+	-	+	Neg.
95/18	8,6	+	-	-	+	-	-	DQx.5

* vzhledem k velice nízké koncentraci bylo do vzorku přidáno 5 μl DNA místo 2 μl

Výsledky měření byly shrnuty v rodokmenu na obrázku 12.



Obr. 12: Přehled rizikových HLA alel v rodině pacientky K. K.

Vysvětlivky:

Pacientka K. K. je v rodokmenu označena a) jako proband (P) a b) jako diabetik a celiak (černé zvýraznění).

VIII. DISKUZE KE KAZUISTICE

V laboratoři GENLABS s.r.o. byla v roce 2018 přijata 22letá studentka Zdravotně-sociální fakulty v Českých Budějovicích, která se už od svých 9 let léčí s *diabetes mellitus I. typu*, k němuž má navíc přidruženou i celiakii. Podle Camarcové et al. se celiakie vyskytuje u pacientů s diabetem I. typu s prevalencí 4,4 - 11,1 % oproti 0,5 % u běžné populace (Camarca et al., 2012). Obě onemocnění patří mezi autoimunitní choroby asociované s HLA systémem. Camarcová et al. dodává, že mechanismus asociace těchto dvou chorob zahrnuje sdílené genetické pozadí – HLA haplotyp DR3-DQ2 a DR4-DQ8 je silně asociován s cukrovkou I. typu a genotyp DR3-DQ2 je rizikový pro celiakii (Camarca et al., 2012).

Pacientka K. K. měla z jiných zdravotnických pracovišť diagnostikována jako *diabetes mellitus* (primárně), tak celiakii (sekundárně), proto jsme k ní mohli přistupovat jako ke klientovi s potvrzenou diagnózou. U ostatních rodinných příslušníků nebyla ani jedna ze zmíněných chorob diagnostikována, tudíž u nich vyšetření přispělo k odhalení nosičství rizikových HLA alel asociovaných s těmito onemocněními. Při vyhodnocování výsledků

jsme se opírali o poznatky o HLA haplotypech shrnuté v následujícím odstavci:

- **HLA-DQ 2 haplotyp**
 - čítá alely HLA-DQA1*05/HLA-DQB1*02
 - vyskytuje se u 90–95 % pacientů s celiakií
 - rizikový pro *diabetes mellitus* I. typu hlavně v jižních populacích (Cinek, 2002)
 - izoforma **HLA-DQ2.5** (HLA-DQA1*05:01/HLA-DQB1*02:01)
 - izoforma **HLA-DQx.5** (HLA-DQA1*05/HLA-DQA1*03/HLA-DRB1*04)
- **HLA-DQ 8 haplotyp**
 - čítá alely HLA-DQA1*03:01/HLA-DQB1*03:02
 - vyskytuje se u zbylých 5-10 % pacientů s celiakií
 - pro *diabetes mellitus* rizikový především v severských populacích (Cinek, 2002)
- **HLA-DRB1 subtyp**
 - konkrétní alela HLA-DRB1*04
 - podle MUDr. Cinka je efekt molekuly DQ modifikován subtypem alely DRB1*04 nesené na DQB1*03:02 - DQA1*03 - DRB1*04 haplotypu. Různé subtypy alely DRB1*04 jsou asociovány s rizikem, které se navzájem zásadně liší (Cinek, 2002).

Dále jsme se při odečítání výsledků ve vztahu k celiakii řídili následující tabulkou:

Tab. XII. HLA status a riziko propuknutí celiakie.

HLA status	Poznámka	Riziko propuknutí
DQ2.5/DQ8		Velmi vysoké
DQ2.5	Dvě alely DQB1*02	Velmi vysoké
DQ8		Vysoké
DQ2.5	Jedna alela DQB1*02	Vysoké
DQ2.x	Dvě alely DQB1*02	Vysoké
DQ2.x	Jedna alela DQB1*02	Nízké
DQx.5, X.x		Velmi nízké

(Tabulka a popis převzaty z Megiorni et al., 2012).

Na základě těchto poznatků byly zpracovány výstupy z real-time PCR, přičemž jednotlivé pozitivní alely byly přiřazeny ke konkrétnímu haplotypu, jak lze vidět na obrázku č. 12. Dědičnost HLA genů není řízena volnou kombinovatelností, naopak se jedná o geny vázané, tudíž jsou děděny „en bloc“ od rodičů jako haplotypy, mezi nimiž dochází jen sporadicky ke crossing overu.

Z rodokmenu na obrázku č. 12 lze vyčíst plynulou dědičnost HLA znaků, které si lze povšimnout ve všech třech generacích vyšetřených klientů. U pacientky K. K. (P) lze spatřit zdědění HLA genů jak od otce, tak od matky, stejně jako u její sestry V. K. Mezi sourozenci lze pozorovat nosičství velmi podobných rizikových HLA alel, přičemž choroby se vyvinuly pouze u jedné z nich, což dává tušit ovlivnění vnějšími podmínkami a potvrzuje multifaktoriální profil autoimunitních chorob asociovaných s HLA systémem, které neovlivňuje pouze dědičná složka, ale také ta environmentální.

9.2 Vyhodnocení dat z on-line dotazníku

V laboratoři GENLABS s.r.o. podstoupilo celkem 283 klientů vyšetření rizikových alel pro celiakii (myšleno od února roku 2014). Všichni tito klienti podepsali před samotným vyšetřením informovaný souhlas se zpracováním vzorků a mimo jiné zmínili, zda si přejí nebo nepřejí být z jakýchkoli důvodů znovu kontaktováni.

Z 283 klientů jich 208 souhlasilo s opětovným kontaktováním a 75 jich vyjádřilo striktní nesouhlas. Těchto 75 lidí jsem tedy z šetření vyjmula a dále se zabývala jen těmi 208, kteří souhlasili. Z nich bylo následně možné oslovit přesně 100, protože ti v žádance uvedli i svoji e-mailovou adresu, kam bylo možné dotazník zaslat.

Ze 100 oslovených pacientů jich dotazník vyplnilo pouze 51. Sumarizovaná data uvádím v tabulce (viz Tabulka XV). Dá se říci, že 53 % dotázaných (27 klientů z 51) uvedlo, že nemá diagnózu ani potvrzenou, ani vyvrácenu, neboť nepodstoupili ani jedno diagnostické vyšetření (sérologii nebo histologii). Dalších 41 % (21 klientů z 51) odpovědělo, že má lékařsky vyvrácenu diagnózu celiakie, přičemž 19 z nich pro potvrzení podstoupilo sérologické vyšetření protilátek, ale histologii nikoli, a pouze 2 zbývající podstoupili i biopsii. Z oslovených lidí dotazník vyplnili pouze 3 ti, kteří údajně mají lékařsky potvrzenou diagnózu celiakie. Dokládají to odpovědí, že kromě vyšetření v laboratoři GENLABS s.r.o. absolvovali i sérologii a histologii.

Tabulka XIII znázorňuje vztah mezi výsledky genetického vyšetření provedeného v laboratoři GENLABS s.r.o. a odpověďmi z on-line dotazníku.

Tab. XIII. Výsledky vyšetření rizikových HLA alel a jejich korelace s daty z dotazníku.

GENLABS s.r.o.			Odpovědi z dotazníku							
Pohlaví	Věk	Výsledek vyšetření	Potvrzená diagnóza	Celiakie u jiných členů rodiny	Sérologie	Histologie	Jiná choroba	Aplikuje inzulín?	Dodržuje bezpečnou dietu?	Začal/a ji držet před vyšetřením?
žena	36	DQX.x	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Žádná	Ne	Ne	Nedrží
žena	73	DQX.x	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Vysoký tlak	Ne	Kvůli sobě. Cítí se tak lépe.	Ne
muž	74	DQx.5	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Žádná	Ne	Ne	Nedrží
žena	49	DQ8	Celiakii nemá	Dcera	Ano	Ne	Vysoký tlak	Ne	Ne	Ne
muž	51	DQ2.5	Celiakii nemá	Dcera	Ano	Ne	Vysoký tlak	Ne	Ne	Ne
žena	39	DQx.5	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Neví	Ne	Ne	Nedrží
muž	10	DQ2	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Dermatitida	Ne	Ne	Nedrží
muž	8	DQx.5	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Žádná	Ne	Ne	Nedrží
žena	8	negativní	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Autismus, nemoci ledvin	Ne	Ne	Nedrží
muž	5	negativní	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Ekzémy	Ne	Ne	Nedrží
muž	45	negativní	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Pohybový aparát	Ne	Ne	Nedrží
žena	77	DQ2	Celiakii nemá	Vnučka	Ano	Ne	Zelený zákal	Ne	Ne	Nedrží
žena	22	DQ2	Celiakii má	Nemají	Ano	Ano	Diabetes mellitus 1. typu	Ano	Ano	Ne
muž	50	DQx.5	Celiakii nemá	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ano	Ne	Neví	Ne	Ne	Nedrží
muž	19	negativní	Celiakii nemá	Matka	Ano	Ne	Dermatitida	Ne	Ne	Nedrží
muž	49	DQX.x	Nepotvrzena	Neteř	Ne	Ne	Žádná	Ne	Ne	Nedrží
žena	56	DQ2.2	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Laktózová intolerance, borelióza, fybromyalgie	Ne	Kvůli sobě. Cítí se tak lépe.	Ano
muž	51	negativní	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Žádná	Ne	Ne	Nedrží
muž	24	DQ2.5, DQ8	Nepotvrzena	Matka	Ne	Ne	Neví	Ne	Ne	Nedrží
žena	65	DQ2.5	Celiakii má	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ano	Ne	Neví	Ne	Ano	Ano
žena	29	DQ8	Celiakii nemá	Sestra	Ano	Ne	DMO	Ne	Ne	Nedrží
žena	73	DQ8	Celiakii nemá	Vnučka	Ano	Ne	Neví	Ne	Ne	Nedrží
muž	54	DQ2.5	Celiakii nemá	Neteř	Ano	Ne	Žádná	Ne	Ne	Nedrží
muž	34	DQX.x	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Neví	Ne	Ne	Nedrží
muž	28	DQx.5	Celiakii nemá	Sestřenice	Ano	Ne	Neví	Ne	Ne	Nedrží
žena	57	DQX.x	Celiakii nemá	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ano	Ne	Žádná	Ne	Ne	Nedrží
žena	37	DQ2.5	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Žádná	Ne	Ne	Nedrží
žena	52	negativní	Celiakii nemá	Synovec	Ano	Ne	CHOPN	Ne	Kvůli sobě. Cítí se tak lépe.	Ano
žena	70	DQ8	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Neví	Ne	Kvůli sobě. Cítí se tak lépe.	Ne

žena	53	DQx.5	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Neví	Ne	Ne	Ne
žena	25	DQx.5	Celiakii nemá	Sestřenice	Ano	Ne	Žádná	Ne	Ne	Ne
žena	19	DQ8	Celiakii nemá	Sestřenice	Ano	Ne	Žádná	Ne	Ne	Ne
žena	45	DQ8	Celiakii nemá	Neteř	Ano	Ne	Žádná	Ne	Ne	Ne
žena	12	DQx.5	Celiakii nemá	Sestřenice	Ano	Ne	Žádná	Ne	Ne	Ne
muž	32	DQ2	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Bechtěrev	Ne	Kvůli sobě. Cítí se tak lépe.	Ano
žena	46	DQx.5	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Neví	Ne	Kvůli sobě. Cítí se tak lépe.	Ne
muž	41	DQx.x	Celiakii nemá	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ano	Ne	Neví	Ne	Kvůli sobě. Cítí se tak lépe.	Ne
žena	44	DQx.x	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Žádná	Ne	Ne	Nedrží
žena	51	DQx.x	Celiakii nemá	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ano	Ne	Žádná	Ne	Kvůli sobě. Cítí se tak lépe.	Ne
muž	34	DQx.x	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Neví	Ne	Ne	Nedrží
žena	54	DQx.5	Celiakii nemá	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ano	Ano	Žádná	Ne	Ne	Ne
žena	56	DQx.x	Celiakii nemá	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ano	Ne	Neví	Ne	Ne	Nedrží
žena	43	DQ2.5/DQ2	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Neví	Ne	Ne	Nedrží
žena	64	DQx.5	Celiakii nemá	Neteř	Ano	Ano	Žádná	Ne	Kvůli sobě. Cítí se tak lépe.	Ne
muž	63	DQ2.5	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Neví	Ne	Ne	Nedrží
muž	33	DQx.5	Celiakii nemá	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ano	Ne	Ekzémy	Ne	Kvůli sobě. Cítí se tak lépe.	Ne
muž	53	DQ2	Nepotvrzena	Sestřenice	Ne	Ne	Žádná	Ne	Ne	Ne
žena	75	DQ2	Celiakii má	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ano	Ano	Vysoký tlak	Ne	Ano	Ano
muž	72	DQx.5	Celiakii nemá	Snacha	Ano	Ne	zákal	Ne	Kvůli sobě. Cítí se tak lépe.	Ano
muž	57	DQ2	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Neví	Ne	Ne	Ne
žena	37	DQx.x	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Neví	Ne	Ne	Ne
žena	47	DQ2.5	Nepotvrzena	Neví (nebyli vyšetřeni)	Ne	Ne	Žádná	Ne	Ne	Ne

Z tabulky XIII vyplývá to, co se podařilo dokázat již v kazuistice pacientky K. K., a to multifaktoriální profil autoimunitních chorob asociovaných s HLA systémem. Patrné je to především u klientů, u kterých bylo genetickým vyšetřením odhaleno nosičství rizikových alel pro celiakii (DQ2, DQ8, DQ2.5, ...), a přesto u nich doplňková vyšetření prokázala, že celiakii nemají – viz klienti označení v tabulce modrou barvou. Ostatní s vyvrácenou diagnózou celiakie patří mezi nositele alel s minimálním rizikem pro vznik celiakie (DQx.x, DQx.5), případně jsou zcela negativní.

Tři pacienti s potvrzenou diagnózou celiakie jsou nositeli vysoce rizikových alel pro celiakii. V tomto případě se jedná o alely DQ2 a DQ2.5. Ti jsou v tabulce označení oranžově.

Výsledky z dotazníku nejsou statisticky signifikantní, zejména kvůli nízkému počtu relevantních odpovědí. Pro další účely práce bylo s kohortou pacientů laboratoře GENLABS nadále zacházeno jako s případy se suspektní diagnózou celiakie.

9.3 Sumarizace dat o pacientech laboratoře GENLABS s.r.o.

Nasbíraná data o pacientech, kteří v GENLABS s.r.o. podstoupili vyšetření rizikových alel asociovaných s celiakií, jsem zaznamenala do tabulky v programu Excel. Třídila jsem se především podle níže zmíněných kritérií:

a) Pohlaví – muž/žena
b) Rok narození
c) Laboratorní identifikační číslo (LIČ) pacienta
d) Kit použitý pro vyšetření – <i>Protrans/Eligene Coeliac/HISTO Type</i>
e) Metoda vyšetření – <i>SSP PCR/real-time PCR</i>
f) Výsledek – <i>negativní/pozitivní ve smyslu konkrétního haplotypu (např. DQ2, DQ8, ...)</i>
g) Výsledek podrobně – <i>seznam vyšetřených alel (např. DQA1*03:01, DQB1*02:01, ...)</i>

Podle těchto parametrů jsem rozdělila kohortu pacientů takto:

- Poměr muži vs ženy **92:191**
- Z **283** vyšetřených pacientů je **133** nositelem nějakého rizikového haplotypu DQ. Shrnuje tabulka XIV.

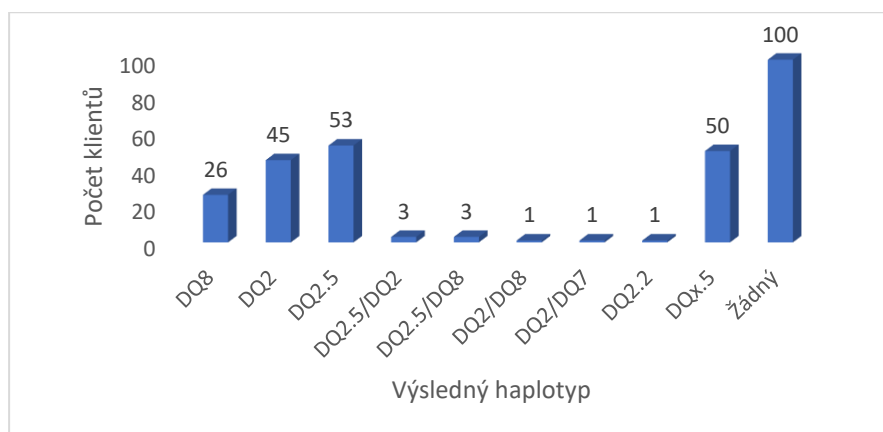
Tab. XIV. Rizikové haplotypy a počty jejich nositelů podle výsledků laboratoře GENLABS.

<u>Haplotyp</u>	DQ8	DQ2	DQ2.5	DQ2.5/DQ2	DQ2.5/DQ8	DQ2/DQ8	DQ2/DQ7	DQ2.2
				*	*	*	*	
<u>Počet</u>	26	45	53	3	3	1	1	1
<u>Počet v procentech (%)</u>	19,5	33,8	39,8	2,2	2,2	0,75	0,75	0,75

* výsledek podle kitu Protrans

- Z **283** pacientů je **50** nositelem haplotypu DQx.5, asociovaného s minimálním rizikem propuknutí celiakie.
- Z **283** pacientů je **100** těch, kteří nemají žádný rizikový haplotyp pro vznik celiakie.

Všechny uvedené údaje shrnuje graf na obrázku 13.



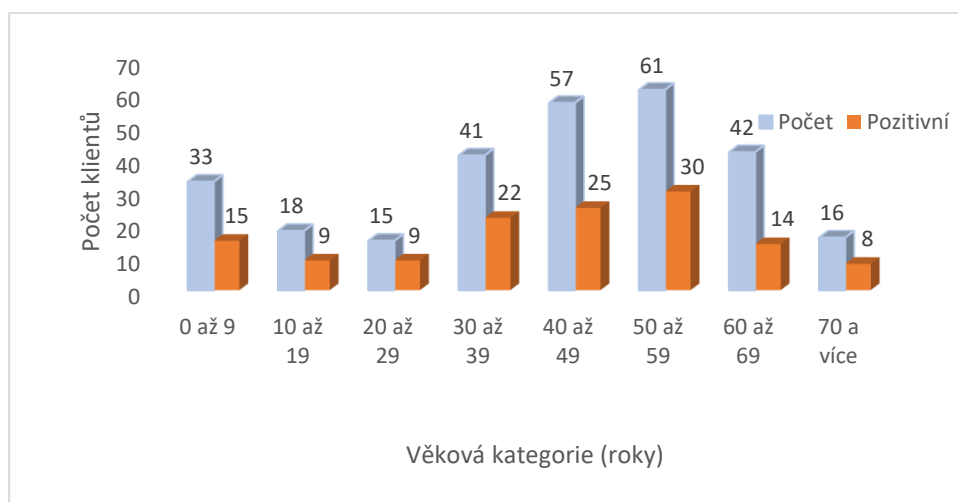
Obr. 13: Výsledné haplotypy zjištěné u pacientů vyšetřených v laboratoři GENLABS s.r.o.

Počty vyšetřených pacientů podle věku shrnuje tabulka č. XV.

Tab. XV. Počty klientů podle věkové kategorie.

Věková kategorie (let)	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70 a více
Počet vyšetřených	33	18	15	41	57	61	42	16
Z toho nositelů riz. haplotypu	15	9	9	22	25	30	14	8

Rozdělení pacientů podle věku shrnuje graf na obrázku 14. Světle modré sloupce znázorňují faktický počet lidí v jednotlivých věkových rozmezích, oranžové sloupce zobrazují počet nositelů některého rizikového haplotypu.



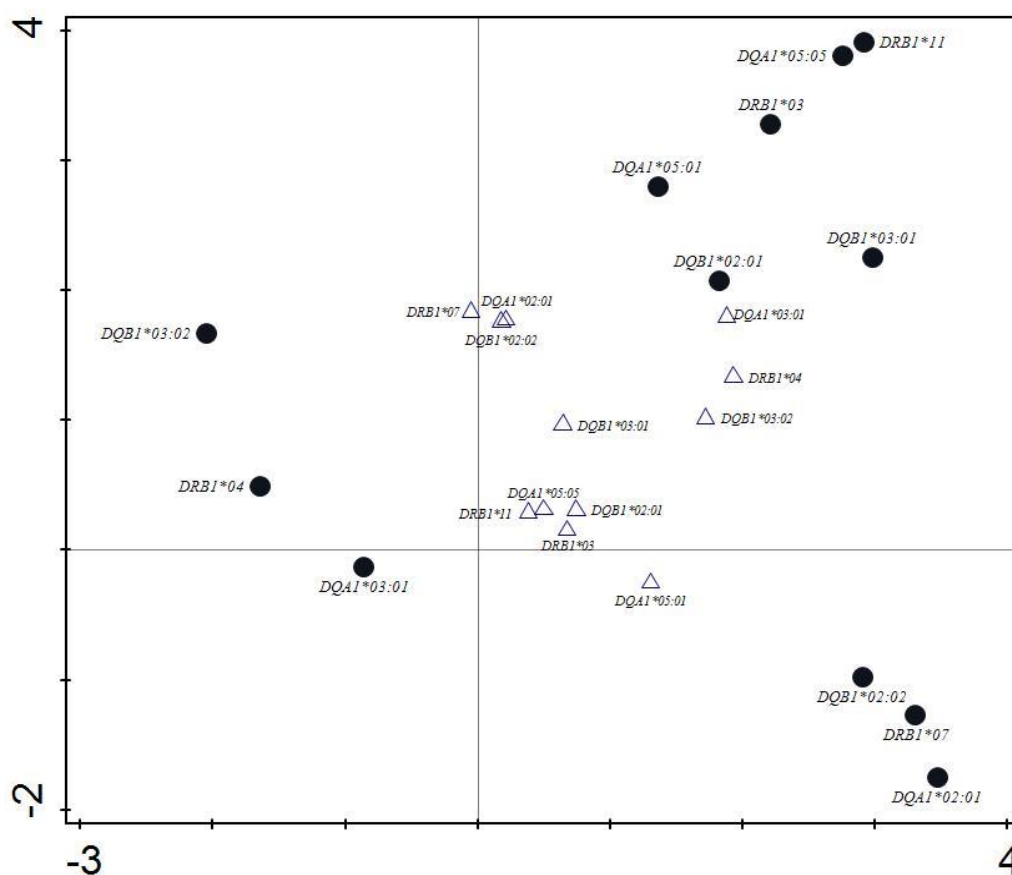
Obr. 14: Rozdělení a počty klientů laboratoře GENLABS s.r.o. podle věkové kategorie.

Podle grafu (obr. 14) bylo nejvíce vyšetřených klientů ve věkovém rozmezí 30–69 let, tzn. dospělí pacienti. Ve vyšetřovaném vzorku byli zastoupeni i dětští pacienti a senioři nad 70 let. Kohorta byla tedy rozmanitá a obsáhla všechny věkové kategorie.

9.4 Distribuce rizikových HLA alel u klientů GENLABS s.r.o.

Pacienti laboratoře GENLABS s.r.o. patří do skupiny lidí se suspektní diagnózou celiakie.

Distribuce vyšetřených HLA alel z laboratoře GENLABS s.r.o. je znázorněna na obrázku č. 15.



Obr. 15: Distribuce vyšetřených HLA alel laboratoře GENLABS s.r.o. (CCA analýza, I. a II. ordinační osa dohromady vysvětlují 34,26 % variability).

Vysvětlivky: ● pozitivní alela (potvrzená)

△ negativní alela (nepotvrzená)

Tabulka XVI. shrnuje počty jednotlivých alel v kohortě.

Tab. XVI. Zastoupení jednotlivých alel ve skupině pacientů laboratoře GENLABS s.r.o.

Alela	Zastoupení v kohortě	Frekvence (%)
DQA1*05:01	107	38
DQA1*05:05	26	9
DQA1*02:01	22	7
DQA1*03:01	89	31
DQB1*02:01	95	33
DQB1*02:02	33	11
DQB1*03:01	18	6
DQB1*03:02	37	13
DRB1*04	77	27
DRB1*03	43	15
DRB1*07	32	11
DRB1*11	26	9

Nejvíce je ve vyšetřovaném vzorku zastoupena alela DQA1*05:01 společně s alelou DQB1*02:01 (tvoří haplotyp DQ2.5 pozitivní). Dále můžeme pozorovat nemalý výskyt alel DQA1*03:01 a DQB1*03:02 (tvořící heterodimer DQ8). K těmto alelám se přidává ještě DRB1*04, jež je často spojena právě s alelou DQB1*03:02 (obr. 15) Ve čtvrtém kvadrantu vidíme vazbu mezi alelami DQA1*02:01 a DQB1*02:02 (tvoří haplotyp DQ2.2), k nimž se připojuje alela DRB1*07. Některé studie potvrzují vazbu mezi alelami DQA1*05:05 - DQB1*03:01 - DRB1*11 (obr. 15).

Při statistickém zpracování byly použity ještě závislé proměnné „pohlaví“ a „věk“, které však nebyly statisticky průkazné.

9.5 Sumarizace dat o pacientech ÚHKT a VFN v Praze

Po domluvě s Ing. Milenou Vranou a MUDr. Peterem Szitányim, Ph.D. mi byla do diplomové práce poskytnuta skupina 70 pacientů s potvrzenou diagnózou celiakie. Choroba u nich byla prokázána na základě vysokých titrů vyšetřených protilátek (anti-tTG IgA), jež musely přesáhnout hodnotu 100 U/ml. Tímto byla potvrzena diagnóza u non- biopsy

pacientů, kterých bylo **41**. Zbývajících **29** lidí bylo diagnostikováno biopsií. HLA typizace u těchto pacientů byla v naprosté většině případů provedena metodou SSP PCR. U nejasných výsledků byla provedena doplňková real-time PCR.

Poměr muži vs ženy **23:47**.

Všichni potvrzení celiaci jsou nositelé vysoce rizikových HLA haplotypů, což znázorňuje tabulka XVII, která mimo jiné porovnává počty pacientů s rizikovými haplotypy z ÚHKT a VFN v Praze a laboratoře GENLABS s.r.o.

Tab. XVII. Porovnání rizikových haplotypů u pacientů s potvrzenou celiakií z Prahy s pacienty laboratoře GENLABS s.r.o.

Pacienti z ÚHKT a VFN		Pacienti z GENLABS s.r.o.	
Rizikový haplotyp	Počet pacientů	Rizikový haplotyp	Počet pacientů
DQ2.2	3	DQ2.2	1
DQ2.5	31	DQ2.5	53
DQ2.5/DQ2.2	12	DQ2.5/DQ2	3
DQ2.5/DQ8	5	DQ2.5/DQ8	3
DQ2.x	4	DQ2	45
DQ2/DQ8	7	DQ2/DQ8	1
DQ8	8	DQ2/DQ7	1
		DQ8	26

Tabulka XVIII. zobrazuje zastoupení jednotlivých alel u potvrzených celiaků.

Tab. XVIII. Zastoupení alel u potvrzených celiaků.

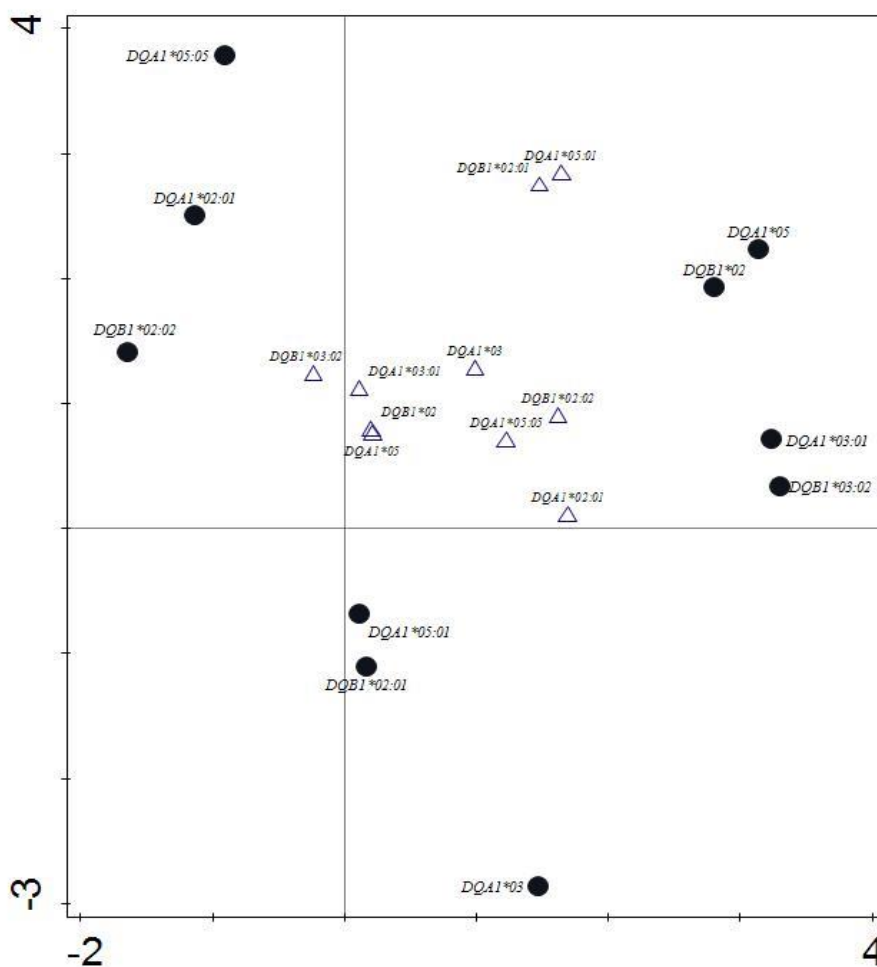
Alela	Zastoupení v kohortě	Frekvence (%)
DQA1*05:01	39	55
DQA1*05:05	10	14
DQA1*05	17	24
DQA1*02:01	28	40
DQA1*03	10	14

DQA1*03:01	21	30
DQB1*02	23	32
DQB1*02:01	41	58
DQB1*02:02	28	40
DQB1*03:02	29	41

9.6 Distribuce rizikových HLA alel u potvrzených celiaků

Pacienti z Kliniky dětského a dorostového lékařství Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a Ústavu hematologie a krevní transfúze tamtéž patří mezi lékařsky potvrzené celiaky.

Obrázek 16 znázorňuje distribuci rizikových HLA alel u diagnostikovaných případů.



Obr. 16: Distribuce rizikových alel u pacientů s potvrzenou celiakií. (CCA analýza, I. a II. ordinační osa dohromady vysvětlují 44,61 % variability).

Vysvětlivky: ● pozitivní alela (potvrzená)

△ negativní alela (nepotvrzená)

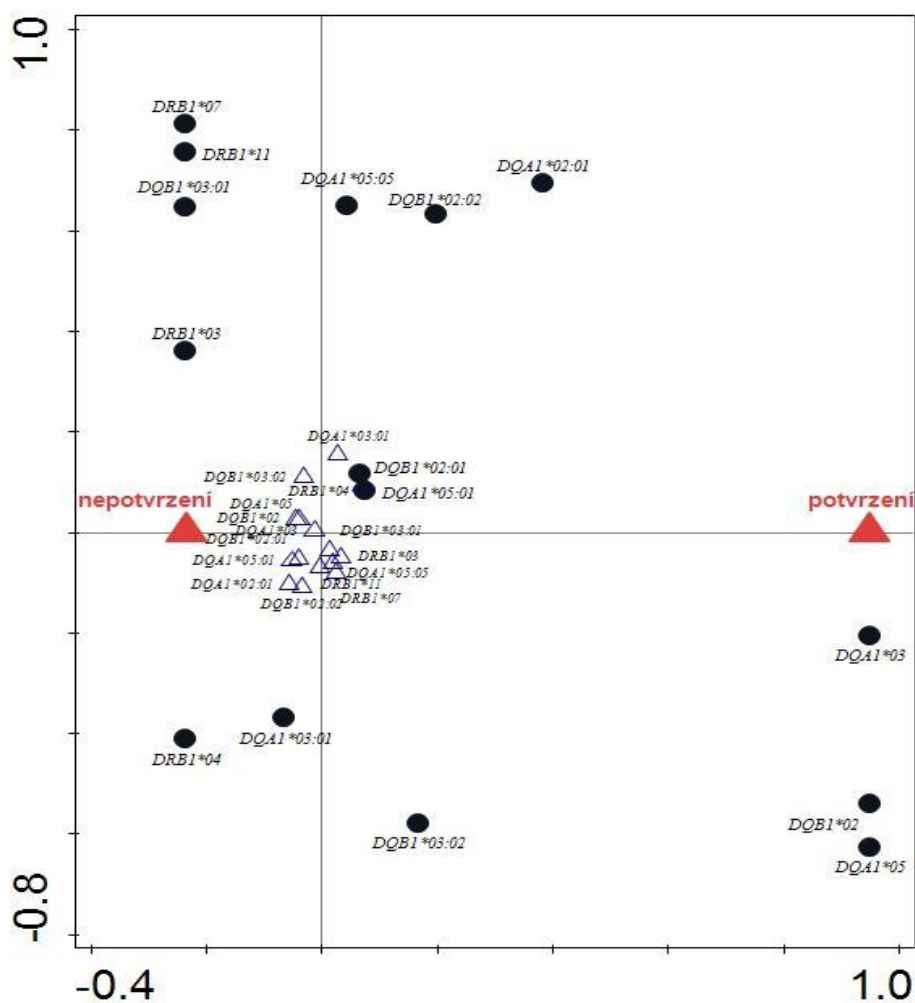
Ve skupině potvrzených celiaků jsou opět nejvíce zastoupeny alely DQA1*05:01 a DQB1*02:01 (tj. haplotyp DQ2.5). Dále si můžeme všimnout přítomnosti alely DQB1*03:02 v poměrně velkém počtu, jenž je viditelně ve vazbě s alelou DQA1*03:01 a tvoří heterodimer DQ8 (obr. 16). Za povšimnutí stojí vazba mezi alelami DQA1*02:01 - DQB1*02:02, které vytvářejí haplotyp DQ2.2, stojící za prokázanou predispozicí k celiakii. Alely DQA1*05 a DQB1*02 ve vazbě vytváří haplotyp DQ2, související s vysokým rizikem pro vznik onemocnění (obr. 16).

Při statistickém zpracování byly použity ještě závislé proměnné „pohlaví“ a „věk“, které však nebyly statisticky průkazné.

9.7 Vliv faktoru diagnózy na distribuci HLA alel v obou kohortách

Zajímá nás vliv faktoru ne/potvrzeného onemocnění na rozptyl alel, tentokrát v obou kohortách. Za tímto účelem byly obě skupiny pacientů (suspektních i prokázaných) sloučeny a zpracovány najednou.

Obrázek 17 zobrazuje distribuci HLA alel v závislosti na diagnóze.



Obr. 17: Vliv diagnózy na distribuci HLA alel u obou kohort pacientů (*DCA analýza, I. a II. ordinační osa dohromady vysvětlují 21,43 % variability*).

Vliv faktoru potvrzená/nepotvrzená diagnóza byl signifikantní (*DCA analýza; Pseudo-F = 19,0; P = 0,002*). Z grafu (*obr. 17*) je zřejmé, že v pravých kvadrantech se nachází pacienti s potvrzenou diagnózou. Nejčastěji se u nich společně vyskytovaly alely *DQA1*05 – DQB1*02 (DQ2)*, *DQA1*05:01 – DQB1*02:01 (DQ2.5)*, *DQA1*02:01 – DQB1*02:02 (DQ2.2)*.

10 DISKUZE

HLA systém patří mezi nejkompexnější a nejpolymorfnější soustavy v lidském těle. Každý jedinec nese svou unikátní skupinu HLA alel, jedinou výjimku tvoří monozygotní dvojčata. Základní úlohou HLA systému je předkládat cizorodé antigeny buňkám imunitního systému (především však T-lymfocytům), což je esenciální předpoklad pro vznik imunitní reakce, která má za úkol chránit před invazí mikroorganismů.

Jednou z prvních nemocí, u které byla prokázána asociace s HLA systémem, byla ankylozující spondylitida, jejíž spojitost s alelou HLA-B27 byla potvrzena v roce 1973 (Brewerton et al., 1973). Od té doby se rozvinuly masivní studie desítek chorob pro jejich možnou asociaci s HLA alelami, a u více než 50 z nich byla spojitost prokázána. Nemoci asociované s HLA systémem mají několik společných rysů: jedná se většinou o nemaligní chronická onemocnění převážně autoimunitního typu, a velká část těchto chorob je multifaktoriálních, tzn. k propuknutí je nutná souhra genetických a environmentálních faktorů (Ceccerelli et al., 2017), přičemž environmentální složky, jako cizorodé mikroorganismy nebo stres, slouží jako spouštěče daného onemocnění.

V rámci praktické části své diplomové práce jsem se zabývala celiakií, což je poměrně vážné, imunitně zprostředkované systémové onemocnění, vyvolané u geneticky predisponovaných jedinců glutenem a jemu podobnými složkami (Frühauf et al., 2016). MUDr. Frühauf také dodává, že prevalence tohoto onemocnění v České republice činí zhruba 1:250–300 v celém věkovém spektru a postiženější bývají ženy (Frühauf et al., 2007).

Náš prvotní zájem směřoval k zajímavému případu pacientky K. K., která kromě toho, že v laboratoři GENLABS s.r.o. figurovala jako klient, sama zde vypracovávala svou bakalářskou práci, jejímž stěžejním bodem bylo vyšetření sebe a svých rodinných příslušníků. S jejím dovolením jsem mohla získaná data použít ve své diplomové práci jako případovou studii. Vyšetření členů rodiny přineslo jednoznačný výsledek – všichni jsou nositeli rizikových alel pro vznik celiakie, ale pouze u pacientky K. K. došlo k rozvoji celiakální sprue a diabetu 1. typu. Ostatní příbuzní mají obě onemocnění lékařsky vyloučena. Tím jsme potvrdily teze ve studiích Sollida, Vojdaniho, Ceccerelliho a dalších, kteří přisuzují vznik celiakie (v případě Vojdaniho i jiných autoimunitních onemocnění) souhře mezi genetickými a environmentálními faktory (Sollid et al., 2004; Vojdani et al., 2014; Ceccerelli et al., 2017). Jak bylo zmíněno v kazuistice, pacientka K. K. je geneticky predisponovaný

jedinec, u kterého ale až vlekklé střevní onemocnění v dětském věku vyvolalo celiakii.

Zdaleka největší částí diplomové práce bylo zpracování dat laboratoře GENLABS s.r.o., a to konkrétně se zaměřením na pacienty vyšetřené na rizikové alely pro vznik celiakie. Součástí zpracování souborů laboratoře bylo vytvoření on-line dotazníku, který by pomohl rozdělit kohortu vyšetřených klientů na ty s potvrzenou/vyvrácenou diagnózou. Na samotném počátku bylo potřeba k pacientům přistupovat odlišně, neboť zde se jedná o klienty samoplátce, kteří ve většině případů podstoupili vyšetření rizikových HLA alel na vlastní žádost a nikoli na doporučení lékaře, jak tomu bývá v jiných zdravotnických zařízeních. Nebylo možné oslovit všechny klienty, ale pouze ty, kteří souhlasili s opětovným kontaktováním v případě dotazů nebo upřesnění výsledků. Tím se počet kontaktovaných značně snížil. Dále bylo potřeba vzít v úvahu, že klienti samoplátci nejspíše nepodstoupí sérologické vyšetření nebo biopsii, obzvlášť pokud si nechali rizikové HLA alely vyšetřit např. jen ze zajímavosti a bez předchozího klinického doporučení. Takových pacientů byla nakonec naprostá většina, jak dokazuje tabulka na str. 70. Z několika odpovědí jsme udělali odpovídající závěr (statisticky neprůkazný). I zde jsme potvrdily zmíněné teze o souhrě predisponujících genů a environmentálních faktorů, neboť z dotazníku vyplývá, že pouhé nosičství rizikových HLA alel nezaručuje propuknutí celiakie, jak lze spatřit u nositelů rizikového haplotypu, u kterých byla diagnóza lékařem vyloučena. Skutečnost kromě jiných potvrzuje i MUDr. Peter Szitányi, Ph.D., který říká, že molekuly HLA jsou nutným, avšak nedostačujícím spouštěčem celiakie (Szitányi et al., 2019). U potvrzených celiaků je takřka 100 % jistota nosičství rizikových HLA alel, jak tvrdí i MUDr. Pavel Frühauf, CSc ve své studii a dodává, že haplotyp DQ2 má 95 % pacientů s celiakií a většina ze zbývajících 5 % pacientů má heterodimer DQ8. Je nutné však brát v úvahu, že přibližně 35–40 % zdravých lidí má také tyto haplotypy, celiakií však onemocní pouze 1 % populace (Frühauf et al., 2016), což také poukazuje na skutečnost, že mít predisponující HLA geny k propuknutí choroby nestačí (Sollid et al., 2013).

Odpovědí z dotazníku nakonec nebylo dost na to, aby se kohorta pacientů laboratoře GENLABS s. r. o. dala jednoznačně rozdělit na případy potvrzené nebo vyloučené diagnózy celiakie. Nadále tedy byla skupina považována za suspektní. Nejzastoupenější alelou v kohortě byla alela DQA1*05:01, která společně s alelou DQB1*02:01 (druhá nejčastější ve skupině) vytváří sérologický ekvivalent DQ2.5 pozitivní. Z obr. 15 vyplývá, že geny jsou v poměrně těsné blízkosti, což naznačuje vazbu mezi těmito dvěma alelami a dědění ve

formě výše zmíněného haplotypu. Ploski et al. již ve své studii z roku 1993 postulují, že citlivost k celiakii je způsobena hlavně konkrétním HLA-DQ heterodimerem kódovaným geny DQA1*05:01 a DQB1*02:01 buď v cis nebo v trans poloze. Navíc zmiňuje nositele alel DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 a DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*02:01 z hlediska vyšší náchylnosti k celiakii (Ploski et al., 1993). Graf (obr. 15) potvrzuje blízkost genů DQA1*05:01 a DQB1*02:01, přičemž alela DRB1*03:01 je také poměrně těsně u nich. Stejně tak gen DQA1*02:01 se nachází velice blízko alele DRB1*07:01, což prokazuje nejen Ploskiho studie, ale například i článek Wongsurawata et al., který postulují vazbu mezi geny DRB1*07 a DQA1*02:01, k nimž podle něj patří ještě alela DQB1*02:02. Takto tvoří haplotyp rizikový kromě jiného například ke Gravesově chorobě (Wongsurawat et al., 2006). Souvislost mezi geny DRB1*07-DQA1*02:01- DQB1*02:02 jsme prokázali i my. Jelikož pacienti laboratoře GENLABS s.r.o. byli bráni jako ti s nepotvrzenou celiakií, na vyšetřené HLA alely nebylo tedy nutné nahlížet jako na ty spjaté pouze s glutenovou enteropatií, ale mohla být pozorována i možná asociace s jinými autoimunitními chorobami. Například několik alel HLA-DQB1 je spojených se zvýšeným rizikem vzniku diabetu 1. typu (Todd et al., 1990). Alely DQB1*02:01 a DQB1*03:02 představují vysoké riziko, které je částečně sdíleno s lokusem HLA-DR (sérotyp DR3 s alelou DQB1*02:01 a DR4 s alelou DQB1*03:02) (Todd et al., 1997; Redondo et al., 2001). Dále stojí za zmínku Gravesova choroba. Asociace HLA alel s tímto onemocněním, zejména alely DRB1*03 (Bech et al., 1977) a DQA1*05:01 (Yanagawa et al., 1993) a DRB1*03-DQB1*02-DQA1*05:01 haplotyp, byla patrná jak v případových, tak v rodinných studiích (Heward et al., 1998). Bolstad et al. ve své studii uvádí spojitost alel DRB1*03-DQB1*02-DQA1*05:01 související s predispozicí k Sjögrenově syndromu (Bolstad et al., 2001). Četné studie ale přicházejí se zajímavými poznatky právě o celiakii. Obecně jsou DQA1*05 a DQB1*02 přítomny v cis pozici na haplotypu DR3 (DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01) nebo v trans pozici na haplotypech DR5/DR7 (DRB1*11/12-DQA1*05:05-DQB1*03:01; DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:02). Těsnou blízkost všech těchto genů jsme prokázali také. Některé experimenty navíc potvrdily, že homozygotnost DQB1*02 je obvykle spojena se zvýšeným rizikem a agresivnějšími formami celiakie. Téměř všichni DQ2.5 negativní pacienti (5-10 %) nesou DQ8 heterodimery kódované geny DQB1*03:02, obvykle v kombinaci s variantou DQA1*03 v cis poloze na haplotypu DR4 (DRB1*04-DQA1*03:01 - DQB1*03:02) (Kagnoff et al., 2007; Megiorni et al., 2008; Karell et al., 2003; Alshiekh et al., 2017). Haplotyp DRB1*11-DQA1*05:05-DQB1*03:01 je asociován s neonatálním lupus

erythematosus (NLE) (Miyagawa et al., 1997).

Díky datům z Kliniky dětského a dorostového lékařství (KDDL) a Ústavu hematologie a krevní transfúze (ÚHK) v Praze jsme měli možnost porovnat kohortu nepotvrzených celiaků s potvrzenými případy (obr. 16). Vzorek sestával ze 70 pacientů, u kterých byla buď vyšetřením protilátek nebo biopsií diagnostikována enteropatie. Také v jejich případě patřily alely DQA1*05:01-DQB1*02:01 k nejzastoupenějším. Nóbrega ve svém článku uvádí, že většina pacientů s celiakií nese právě specifickou genetickou varianci HLA-DQ2 – DQA1*05:01, DQB1*02:01 – známou jako DQ2.5 (Nóbrega, 2018), což prokázaly i výsledky naší kohorty potvrzených případů (obr. 16). Ing. Milena Vraná ve své prezentaci „Interpretace neběžných haplotypů celiakie“ předkládá frekvence výskytu HLA alel asociovaných s celiakií v české populaci. S pomocí dat uvedených na internetovém portálu www.allelefrequencies.net došla k závěru, že frekvence výskytu alely DQA1*05:01 v české populaci je 20–50 %, stejně tak u alely DQB1*02:01 (Vraná, 2016). Dále zmiňuje frekvenci 30 % u genu DQA1*02:01, jenž v naší skupině činí dokonce 40 %. Na druhou stranu podle internetového portálu www.allelefrequencies.net je frekvence alely DQA1*05:05 asi 35 %, ale v naší kohortě se vyskytovala s frekvencí jen 14 %. Stejně tak nedošlo ke shodě u genu DQB1*02:02 – v případě celé české populace frekvence osciluje někde kolem 20 %, ale v případě naší skupiny činila 40 %, což je pravděpodobně způsobeno malým počtem participantů v testované skupině. Alela DQB1*02:02 tvoří společně s genem DQA1*02:01 haplotyp DQ2.2., který ještě v roce 2012 nebyl v ESPGHAN pamfletu (Guidelines for the Diagnosis of Celiac disease, 2012) uváděn jako predispoziční pro celiakii. Ale právě tým v čele s paní Ing. Vranou a panem MUDr. Szitányim Ph.D. vypracoval studii, ve které identifikoval tento genotyp u českých dětí s prokázanou diagnózou celiakie, tudíž i podle jiných podobných studií (Mubarak et al., 2013) je nutné tento haplotyp považovat za predispoziční (Szitányi et al., 2018). V případě kohorty potvrzených pacientů je haplotyp DQ2.2 (tj. DQ2.2 i DQ2.5/DQ2.2) zastoupen více než haplotyp DQ8, jenž je považován za druhý nejrozšířenější hned po haplotypu DQ2. Na druhou stranu ve skupině nepotvrzených (suspektních) celiaků (obr. 15) figuroval pouze jeden pacient s haplotypem DQ2.2, což naznačuje, že i přes nezanedbatelnou přítomnost u diagnostikovaných jedinců, stále se jedná o poměrně raritní haplotyp. Murray, Karell a Pietzak et al. ve svých studiích uvádějí 10 % frekvenci haplotypu DQ2.2 v rámci celé populace. Co se týče celiakie, činí frekvence DQ2.2 dokonce jen 1 %. Tato skutečnost se poměrně dramaticky mění, jakmile se k haplotypu DQ2.2 přidá DQ2.5. V takovém případě činí frekvence haplotypu DQ2.2/DQ2.5 v rámci

celé populace jen 2 %, ale u celiaků se tento kombinovaný haplotyp objevuje s frekvencí kolem 25 % (Murray et al., 2007; Karell et al., 2003; Pietzak et al., 2009). V naší kohortě potvrzených případů (obr. 16) činí frekvence haplotypu DQ2.2 4 % z celku. Kombinovaný haplotyp DQ2.2/DQ2.5 se ve skupině pacientů vyskytuje s frekvencí 17 %. Vzhledem k počtu testovaných subjektů ve vzorku se naše výsledky poměrně shodují s daty ze studií jiných autorů.

Za zmínku stojí i subtypy alely HLA-DRB. Podle MUDr. Cinka je efekt molekuly DQ modifikován subtypem alely DRB1*04 nesené na DQB1*03:02-DQA1*03-DRB1*04 haplotypu (Cinek, 2002). Přesto u testované skupiny potvrzených celiaků (obr. 16) můžeme vidět prokazatelnost diagnostiky bez nutnosti detekce DRB subtypů. V první řadě záleží na komerčním kitu, který byl k vyšetření použit, ale i tak na rozdíl od vzorku suspektních pacientů, kde byly detekovány čtyři subtypy alely DRB1 (DRB1*03, DRB1*04, DRB1*07, DRB1*11), v případě potvrzených případů nevyvstala potřeba tyto alely detekovat. Obecně se má za to, že alely DRB1 samy o sobě dokáží zvyšovat riziko různých autoimunitních onemocnění, kam neřadíme jen celiakii, ale například i *diabetes mellitus* 1. typu (Souček et al., 2011) nebo revmatoidní artritidu (Gregersen et al., 1987). Z rozšířených HLA haplotypů byl haplotyp s nejsilnějším rizikem pro celiakii prokázán u DRB3 ve spojení s DQA1*05:01-DQB1*02:01. V subpopulační analýze zůstal tento haplotyp nejvýznamnější u pacientů se skandinávskou etnicitou, zatímco DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:02 představoval nejvyšší riziko celiakie u neskandinávců. Data také odhalila odlišné riziko celiakie u konkrétních alel DRB3*01:01:02 nebo DRB3*02:02:01, což naznačuje, že různé DRB1 haplotypy představují odlišné riziko pro vznik celiakie (Alshiekh et al., 2017). Již Michalski se v roce 1996 zabýval alelami DRB1 u pacientů s celiakií ze západního Irsku, geografické oblasti s nejvyšší mírou výskytu celiakie na světě. Potvrdil vysokou frekvenci HLA-DR3 v této populaci a dokázal také prokázat další riziko rozvoje celiakie způsobené alelou HLA-DR7. Většina pacientů bez DR3 byla heterozygotní pro DR7 a DR11 nebo 12 (DR5), nebo měla DR4. Kromě toho všichni pacienti s celiakií (5 z 5) s DR4 měli haplotyp spojený s DQB1*03:02 alelou. Jeho zjištění navíc naznačuje roli genotypu DQ asociovaného s DR4 při rozvoji celiakie (Michalski et al., 1996). Megiorni et al. říká, že obvykle jsou geny DQB1*02 a DQA1*05 prezentovány v cis konfiguraci společně s genem DRB1 – DRB1*03:01-DQB1*02:01-DQA1*05:01, nebo méně často v trans konfiguraci – DRB1*11/12-DQB1*03:01-DQA1*05:05, popř. DRB1*07-DQB1*02:02-DQA1*02:01 (Megiorni, 2012), což dokazuje i graf (obr. 15). Geny DRB1 souvisejí se zvýšeným rizikem

pro vznik onemocnění, je tedy vhodné je vyšetřovat společně s alelami DQA1 a DQB1, nicméně záleží na možnostech a detekčních schopnostech jednotlivých komerčních genotypizačních kitů.

V závěru statistického zpracování dat došlo ke spojení obou kohort pacientů za účelem zjištění rozptylu HLA alel. Jako závislá proměnná byl u DCA analýzy určen faktor ne/potvrzené diagnózy celiakie, který byl prokázán jako statisticky signifikantní (obr. 17). Faktor potvrzené diagnózy celiakie tedy měl na rozptyl alel vliv. V pravých kvadrantech (obr. 17) lze vidět distribuci alel u diagnostikovaných pacientů. Stejně jako v předchozích případech i zde se alely rozptýlily takovým způsobem, že vytvořily známé „shluky“ vypovídající o tendenci k dědění ve formě haplotypů. V případě celiaků (obr. 17) jde jednoznačně o haplotypy DQ2 (DQA1*05 – DQB1*02), DQ2.5 (DQA1*05:01 – DQB1*02:01) a DQ2.2 (DQA1*02:01 – DQB1*02:02). Striktnímu pravidlu o haplotypech se poněkud vymyká alela DQA1*05:05. Ta je strukturně podobná alele DQA1*05:01 z DQ2.5 haplotypu. Když jsou produkty genu DQA1*05:05 nebo DQA1*05:01 vystaveny na buněčný povrch, stávají se řetězci $\alpha 5$. Genové produkty DQB1*02:02 a DQB1*02:01 jsou téměř totožné a fungují podobně, tudíž výsledkem může shodný fenotyp přesto, že se geneticky jedná o dva různé haplotypy (Louka et al., 2002; Maňásková, 2013). Alela DQA1*05:05 se velmi často vyskytuje společně s genem DQB1*03:01 a vytváří haplotyp DQ7.5 (ve starších publikacích je označován jako DQ2.5_{trans}) (Pera et al., 2000). Gen DQB1*03:01 ale komerčními kity v Praze vyšetřován nebyl. Z heterodimeru DQ8 zbyla v pravém kvadrantu jen alela DQB1*03:02 jako průkazná. Alely DQA1*03:01, DQB1*03:01 a všechny alely DRB1 se posunuly do statisticky nesignifikantních kvadrantů.

11 ZÁVĚR

V diplomové práci jsem se zabývala problematikou autoimunitních chorob asociovaných s HLA systémem. Stěžejním tématem praktické části byla celiakie a genotypizace rizikových HLA alel souvisejících s tímto onemocněním.

Za výběrem tématu stálo prohlášení ESPGHAN z roku 2012, podle kterého nejvhodnějšími nástroji k diagnostice celiakie jsou enterobiopsie a stanovení protilátek proti tkáňové transglutamináze. Genotypizace HLA molekul se díky své takřka 100 % negativní predikční hodnotě hodí spíše k vyloučení diagnózy.

Naším cílem bylo pečlivě zdokumentovat pacienty vyšetřené na přítomnost alel rizikových pro celiakii a zjistit, zda distribuce HLA alel v naší kohortě bude v souladu či rozporu s daty ve studiích jiných autorů.

Cíle práce, které jsem si stanovila na začátku, jsem splnila. Podařilo se mi sepsat ucelený přehled o celiakii a HLA alelách, které mají spojitost s tímto onemocněním, a v praktické části jsem si vyzkoušela sběr biologického materiálu, vyšetření rizikových alel a v neposlední řadě i zpracování a vyhodnocení získaných dat.

Ze získaných dat vyvozují tyto závěry:

- Byla potvrzena souhra mezi predisponujícími geny a environmentálními faktory u onemocnění asociovaných s HLA systémem, čemuž odpovídá fakt, že pouhé nosičství rizikových alel nestačí k propuknutí nemoci.
- Nejzastoupenějšími alelami u potvrzených i nepotvrzených celiaků byly DQA1*05:01 a DQB1*02:01, jakožto i haplotyp DQ2.5, což odpovídá závěrům dalších studií.
- Potvrdil se rozptyl HLA alel odpovídající běžně rozšířeným haplotypům.
- Faktor potvrzené diagnózy celiakie byl statisticky průkazný.
- Data z on-line dotazníku nepřinesla žádné signifikantní výsledky, kromě toho, že i zde bylo patrné, že nosičství rizikových alel nezaručuje propuknutí celiakie.

12 SEZNAM AUTORŮ A CITACÍ

1. 1000 Genomes Project Consortium. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467(7319), 1061.
2. Addisonova choroba. (2011). [online]. Dostupné na adrese: <http://www.anamneza.cz/nemoc/Addisonova-choroba-387>. Citováno 12.2. 2019.
3. Aggarwal, S., Lebwohl, B., & Green, P. H. (2012). Screening for celiac disease in average-risk and high-risk populations. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 5(1), 37-47.
4. Akkoç, N., Yarkan, H., Kenar, G., & Khan, M. A. (2017). Ankylosing spondylitis: HLA-B* 27-positive versus HLA-B* 27-negative disease. *Current rheumatology reports*, 19(5), 26.
5. Alaez, C., Lin, L., Flores-A, H., Vazquez, M., Munguia, A., Mignot, E., ... & Goro-dezky, C. (2008). Association of narcolepsy-cataplexy with HLA-DRB1 and DQB1 in Mexican patients: a relationship between HLA and gender is suggested. *BMC medical genetics*, 9(1), 79.
6. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular biology of the Cell*. 5th Edition.
7. Almeida, L. M., Gandolfi, L., Pratesi, R., Uenishi, R. H., Almeida, F. C. D., Selleski, N., & Nóbrega, Y. K. D. M. (2016). Presence of DQ2. 2 associated with DQ2. 5 increases the risk for celiac disease. *Autoimmune diseases*, 2016.
8. Alshiekh, S., Zhao, L. P., Lernmark, Å., Geraghty, D. E., Naluai, Å. T., & Agardh, D. (2017). Different DRB1* 03: 01-DQB1* 02: 01 haplotypes confer different risk for celiac disease. *Hla*, 90(2), 95-101.
9. American Gastroenterological Association Medical Position Statement: Celiac Sprue. (2001). Clinical Practice and Practice Economics Committee. *Gastroenterology*. 120:1522–1525.
10. Anaya, J. M., Mantilla, R. D., & Correa, P. A. (2005, April). Immunogenetics of primary Sjögren's syndrome in Colombians. In *Seminars in arthritis and rheumatism* (Vol. 34, No. 5, pp. 735-743). WB Saunders.
11. Arentz-Hansen, H., Mcadam, S. N., Molberg, Ø., Fleckenstein, B., Lundin, K. E., Jørgensen, T. J., ... & Sollid, L. M. (2002). Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*, 123(3), 803-809.

12. Ashton, P. M., Nair, S., Dallman, T., Rubino, S., Rabsch, W., Mwaigwisya, S., ... & O'grady, J. (2015). MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. *Nature biotechnology*, 33(3), 296.
13. Austad, W. I., Cornes, J. S., Gough, K. R., McCarthy, C. F., & Read, A. E. (1967). Steatorrhea and malignant lymphoma the relationship of malignant tumors of lymphoid tissue and celiac disease. *The American journal of digestive diseases*, 12(5), 475-490.
14. Badenhop, K., Walfish, P. G., Rau, H., Fischer, S., Nicolay, A., Bogner, U. H., ... & Usadel, K. H. (1995). Susceptibility and resistance alleles of human leukocyte antigen (HLA) DQA1 and HLA DQB1 are shared in endocrine autoimmune disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80(7), 2112-2117.
15. Bahassi, E. M., & Stambrook, P. J. (2014). Next-generation sequencing technologies: breaking the sound barrier of human genetics. *Mutagenesis*, 29(5), 303-310.
16. Barone, J. C., Saito, K., Beutner, K., Campo, M., Dong, W., Goswami, C. P., ... & Hsu, S. (2015). HLA-genotyping of clinical specimens using Ion Torrent-based NGS. *Human immunology*, 76(12), 903-909.
17. Bartůňková, Šedivá. (2006). Alergie a autoimunita: jin a jang imunopatologie.
18. Bayley, J. P., Ottenhoff, T. H. M., & Verweij, C. L. (2004). Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes and immunity*, 5(5), 315.
19. Bech, K., Lumholtz, B., Nerup, J., Thomsen, M., Platz, P., Ryder, L. P., ... & Larsen, J. H. (1977). HLA ANTIGENS IN GRAVES' DISEASE. *European Journal of Endocrinology*, 86(3), 510-516.
20. Bechtěrevova nemoc. (2008). [online]. Dostupné na adrese: <http://www.anamneza.cz/nemoc/Bechterevo-va-nemoc-morbus-Bechtere-vo-spondylitis-ancylosans-63>. Citováno 14.2. 2019.
21. Beksac, M. (Ed.). (2007). Bone marrow and stem cell transplantation.
22. Benešová, Y. (2013). Epidemiologie roztroušené sklerózy. Lékařská fakulta Masarykovy univerzity. *Veřejné služby informačního systému* [online]. Dostupné na adrese: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/lf/js13/rs_2/web/pages/01-epidemiologie-roztrousene-sklerozy.html. Citováno 20.6. 2019.
23. Bentley, G., Higuchi, R., Hoglund, B., Goodridge, D., Sayer, D., Trachtenberg, E. A., & Erlich, H. A. (2009). High-resolution, high-throughput HLA genotyping by next-generation sequencing. *Tissue antigens*, 74(5), 393-403.

24. Bettencourt, A., Carvalho, C., Leal, B., Brás, S., Lopes, D., Martins da Silva, A., ... & Barbosa, P. (2015). The Protective Role of HLA-DRB113 in Autoimmune Diseases. *Journal of immunology research*, 2015.
25. Bier, O. G., Da Silva, W. D., Götze, D., & Mota, I. (2012). *Fundamentals of immunology*. Springer Science & Business Media.
26. Biesiekierski, J. R. (2017). What is gluten? *Journal of gastroenterology and hepatology*, 32, 78-81.
27. Bodis, G., Toth, V., & Schwarting, A. (2018). Role of Human Leukocyte Antigens (HLA) in Autoimmune Diseases. *HLA Typing*, 11-29.
28. Bolstad, A. I., Wassmuth, R. A. L. F., Haga, H. J., & Jonsson, R. O. L. A. N. D. (2001). HLA markers and clinical characteristics in Caucasians with primary Sjögren's syndrome. *The Journal of rheumatology*, 28(7), 1554-1562.
29. Bratanic, N., Smigoc Schweiger, D., Mendez, A., Bratina, N., Battelino, T., & Vidan-Jeras, B. (2010). An influence of HLA-A, B, DR, DQ, and MICA on the occurrence of Celiac disease in patients with type 1 diabetes. *Tissue antigens*, 76(3), 208-215.
30. Brennan, P., Hajeer, A., Ong, K. R., Worthington, J., John, S., Thomson, W., ... & Ollier, B. (1997). Allelic markers close to prolactin are associated with HLA-DRB1 susceptibility alleles among women with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 40(8), 1383-1386.
31. Brewerton, D. A., Hart, F. D., Nicholls, A., Caffrey, M., James, D. C. O., & Sturrock, R. D. (1973). Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *The Lancet*, 301(7809), 904-907.
32. Buc, M. (1997). *Klinická imunológia*.
33. Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Immunological Aspects of Neoplasia*, 13, 1-27.
34. Camarca, M. E., Mozzillo, E., Nugnes, R., Zito, E., Falco, M., Fattorusso, V., ... & Franzese, A. (2012). Celiac disease in type 1 diabetes mellitus. *Italian journal of pediatrics*, 38(1), 10.
35. Candore, G., Balistreri, C. R., Campagna, A., Colombo, A., Cuppari, I., Di-Carlo, D. A., ... & Lio, D. (2006). Genetic Control of Immune Response in Carriers of Ancestral Haplotype 8.1. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1089(1), 509-515.
36. Candore, G., Lio, D., Romano, G. C., & Caruso, C. (2002). Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions. *Autoimmunity reviews*, 1(1-2), 29-35.

37. Candore, G., Modica, M. A., Lio, D., Colonna-Romano, G., Listì, F., Grimaldi, M. P., ... & Caruso, C. (2003). Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: a genetically determined defect of C4 influences immunological parameters of healthy carriers of the haplotype. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 57(7), 274-277.
38. Carapito, R., Radosavljevic, M., & Bahram, S. (2016). Next-generation sequencing of the HLA locus: methods and impacts on HLA typing, population genetics and disease association studies. *Human immunology*, 77(11), 1016-1023.
39. Card, T. R., West, J., & Holmes, G. K. T. (2004). Risk of malignancy in diagnosed coeliac disease: a 24-year prospective, population-based, cohort study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 20(7), 769-775.
40. Carney, P. R., Berry, R. B., & Geyer, J. D. (Eds.). (2005). Clinical sleep disorders.
41. Carosella, E. D. (2009). From MAC to HLA: Professor Jean Dausset, the pioneer. *Human immunology*, 70(9), 661.
42. Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., D'agate, C., Francavilla, R., Biagi, F., ... & Pianaelli, G. (2007). A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease-. *The American journal of clinical nutrition*, 85(1), 160-166.
43. Catassi, C., Rossini, M., Räscht, I. M., Bearzi, I., Santinelli, A., Castagnani, R., ... & Giorgi, P. L. (1993). Dose dependent effects of protracted ingestion of small amounts of gliadin in coeliac disease children: a clinical and jejunal morphometric study. *Gut*, 34(11), 1515-1519.
44. Ceccarelli, F., Agmon-Levin, N., & Perricone, C. (2017). Genetic factors of autoimmune diseases 2017. *Journal of immunology research*, 2017.
45. Cesbron-Gautier, A., Simon, P., Achard, L., Cury, S., Follea, G., & Bignon, J. D. (2004, January). Technologie Luminex: application aux typages HLA par biologie moléculaire (PCR-SSO) et à l'identification des anticorps anti-HLA. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 62, No. 1, pp. 93-98).
46. Ciacci, C., Cirillo, M., Auriemma, G., Di Dato, G., Sabbatini, F., & Mazzacca, G. (1996). Celiac disease and pregnancy outcome. *Obstetrical & gynecological survey*, 51(11), 643-644.
47. Collin, P., Kaukinen, K., Välimäki, M., & Salmi, J. (2002). Endocrinological disorders and celiac disease. *Endocrine Reviews*, 23(4), 464-483.

48. Cooper, G. S., Miller, F. W., & Pandey, J. P. (1999). The role of genetic factors in autoimmune disease: implications for environmental research. *Environmental health perspectives*, *107*(suppl 5), 693-700.
49. Corazza, G. R., Andreani, M. L., Venturo, N., Bernardi, M., Tosti, A., & Gasbarrini, G. (1995). Celiac disease and alopecia areata: report of a new association. *Gastroenterology*, *109*(4), 1333-1337.
50. Cortes, A., Pulit, S. L., Leo, P. J., Pointon, J. J., Robinson, P. C., Weisman, M. H., ... & Chiochia, G. (2015). Major histocompatibility complex associations of ankylosing spondylitis are complex and involve further epistasis with ERAP1. *Nature communications*, *6*, 7146.
51. Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T., & Diedrich, G. (1999). The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunological reviews*, *172*(1), 21-28.
52. Cruz-Tapias, P., Rojas-Villarraga, A., Maier-Moore, S., & Anaya, J. M. (2012). HLA and Sjögren's syndrome susceptibility. A meta-analysis of worldwide studies. *Autoimmunity reviews*, *11*(4), 281-287.
53. Češka, R., Tesař, V., Dítě, P., & Štulc, T. (2010). Interna. *Praha: Triton*, 397-398.
54. Danze, P. M., Colombel, J. F., Jacquot, S., Loste, M. N., Heresbach, D., Ategbo, S., ... & Cezard, J. P. (1996). Association of HLA class II genes with susceptibility to Crohn's disease. *Gut*, *39*(1), 69-72.
55. Dausset, J. (1958). Iso-leuco-anticorps. *Acta haematologica*, *20*(1-4), 156-166.
56. Dawkins, R. L., Christiansen, F. T., Kay, P. H., Garlepp, M., McCluskey, J., Hollingsworth, P. N., & Zilko, P. J. (1983). Disease associations with complotypes, supratypes and haplotypes. *Immunological reviews*, *70*(1), 5-22.
57. de la Concha, E. G., Fernández-Arquero, M., Vigil, P., Rubio, A., Maluenda, C., Polanco, I., ... & Figueredo, M. A. (2000). Celiac disease and TNF promoter polymorphisms. *Human immunology*, *61*(5), 513-517.
58. de Medeiros Nóbrega, Y. K. (2018). Genotype DQ2. 5/DQ2. 2 ($\beta\beta 2/\beta\beta 2$) and High Celiac Disease Risk Development. In *Celiac Disease-From the Bench to the Clinic*. IntechOpen.
59. De Santis, D., Dinauer, D., Duke, J., Erlich, H. A., Holcomb, C. L., Lind, C., ... & Parham, P. (2013). 16th IHIW: review of HLA typing by NGS. *International journal of immunogenetics*, *40*(1), 72-76.

60. Dean, L. (2018). Abacavir Therapy and HLA-B* 57: 01 Genotype. *Medical Genetics Summaries* [Online]. Citováno 14.2.2019.
61. Dean, L. E., Jones, G. T., MacDonald, A. G., Downham, C., Sturrock, R. D., & Macfarlane, G. J. (2013). Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology*, 53(4), 650-657.
62. Di Cagno, R., De Angelis, M., Lavermicocca, P., De Vincenzi, M., Giovannini, C., Faccia, M., & Gobetti, M. (2002). Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Applied and environmental microbiology*, 68(2), 623-633.
63. Di Sabatino, A., & Corazza, G. R. (2009). Coeliac disease. *The Lancet*, 373(9673), 1480-1493.
64. Diegelmann, J., Czamara, D., Le Bras, E., Zimmermann, E., Olszak, T., Bedynek, A., ... & Brand, S. (2013). Intestinal DMBT1 expression is modulated by Crohn's disease-associated IL23R variants and by a DMBT1 variant which influences binding of the transcription factors CREB1 and ATF-2. *PLoS One*, 8(11), e77773.
65. Dunn, P. P. (2015). Novel approaches and technologies in molecular HLA typing. *Molecular Typing of Blood Cell Antigens*, 213-230.
66. Dunne, J. L., Triplett, E. W., Gevers, D., Xavier, R., Insel, R., Danska, J., & Atkinson, M. A. (2014). The intestinal microbiome in type 1 diabetes. *Clinical & Experimental Immunology*, 177(1), 30-37.
67. Dyer, P., & Middleton, D. (1993). Histocompatibility testing: a practical approach.
68. Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., ... & Bibillo, A. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, 323(5910), 133-138.
69. Eisenstein, M. (2012). The battle for sequencing supremacy. *Nature biotechnology*, 30(11), 1023.
70. Elfström, P., Sundström, J., & Ludvigsson, J. F. (2014). Systematic review with meta-analysis: associations between coeliac disease and type 1 diabetes. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 40(10), 1123-1132.
71. Eng, H. S., & Leffell, M. S. (2011). Histocompatibility testing after fifty years of transplantation. *Journal of immunological methods*, 369(1-2), 1-21.

72. Ensari, A. (2010). Gluten-sensitive enteropathy (celiac disease): controversies in diagnosis and classification. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 134(6), 826-836.
73. Erlich, R. L., Jia, X., Anderson, S., Banks, E., Gao, X., Carrington, M., ... & de Bakker, P. I. (2011). Next-generation sequencing for HLA typing of class I loci. *BMC genomics*, 12(1), 42.
74. Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome research*, 8(3), 175-185.
75. Fasano, A. (2009). Should we screen for coeliac disease? Yes. *BMJ: British Medical Journal (Online)*, 339.
76. Ferencik, S., & Grosse-Wilde, H. (1993). A simple photometric detection method for HLA-DRB1 specific PCR-SSP products. *International Journal of Immunogenetics*, 20(2), 123-125.
77. Ferguson, R., Basu, M. K., Asquith, P., & Cooke, W. T. (1976). Jejunal mucosal abnormalities in patients with recurrent aphthous ulceration. *Br Med J*, 1(6000), 11-13.
78. Fernando, M. M., Stevens, C. R., Sabeti, P. C., Walsh, E. C., McWhinnie, A. J., Shah, A., ... & Vyse, T. J. (2007). Identification of two independent risk factors for lupus within the MHC in United Kingdom families. *PLoS genetics*, 3(11), e192.
79. Ferrara, P., Cicala, M., Tiberi, E., Spadaccio, C., Marcella, L., Gatto, A., ... & Castellucci, G. (2009). High fat consumption in children with celiac disease. *Acta gastro-enterologica Belgica*, 72(3), 296-300.
80. Fine, K. D. (1996). The prevalence of occult gastrointestinal bleeding in celiac sprue. *New England journal of medicine*, 334(18), 1163-1167.
81. Folk, J. E. (1983). Mechanism and basis for specificity of transglutaminase-catalyzed-(-glutamyl) lysine bond formation. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol*, 54, 1-56.
82. Folk, J. E., Cole, P. W., & Mullooly, J. P. (1968). Mechanism of Action of Guinea Pig Liver Transglutaminase V. THE HYDROLYSIS REACTION. *Journal of Biological Chemistry*, 243(2), 418-427.
83. Food and Drug Administration (2007). Food and Drug Administration. Food Labeling; Gluten-Free Labeling of Foods. [online]. Dostupné na adrese: <http://web.archive.org/web/20070126011901/https://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/05n-0279-npr0001.pdf>. Citováno 17.5. 2019.

84. Freeman, H. J. (2017). Celiac Disease. Reference Module in Biomedical Sciences. *International Journal of Celiac Disease*, 6(1), 30-32.
85. Freeman, H. J. (2009). Adult celiac disease and its malignant complications. *Gut and liver*, 3(4), 237.
86. Frič, P. (2002). Endoskopická diagnostika celiakální sprue. *Endoskopie*, 11, 69-73.
87. Frič, P. (2008). Celiakie–celosvětová choroba mnoha tváří. *Česká a Slovenská Gastroenterologie a Hepatologie*, 62(4), 187-189.
88. Frič, P. (2011). Cílený screening celiakie (metodický pokyn). *Věstník MZ-ČR, částka*, 3(28), 2.
89. Frühauf, P., Szitányi, P., & Vyhnánek, R. (2012). Nové doporučení ESPGHAN pro diagnostiku celiakie. *Pediatric pro praxi*, 13(3), 211-213.
90. Frühauf, P. (2007). Celiakální sprue. *Pediatric pro praxi*, 8(6), 333-335.
91. Frühauf, P., Bronský, J., Dědek, P., Nevoral, J., Kotalová, R., Sýkora, J., ... & Zahradníček, L. (2016). Celiakie–doporučený postup pro diagnostiku a terapii u dětí a dospívajících. *Pediatric pro praxi*, 17(3).
92. Fučíková, T. (1995). Klinická imunologie v praxi.
93. Furukawa, H., Kawasaki, A., Oka, S., Ito, I., Shimada, K., Sugii, S., ... & Ito, S. (2014). Human leukocyte antigens and systemic lupus erythematosus: a protective role for the HLA-DR6 alleles DRB1* 13: 02 and* 14: 03. *PloS one*, 9(2), e87792.
94. Gabalec, L. (2009). Ulcerózní kolitida–klasifikace, diagnostika, léčba a kvalita života. *Interní medicína*, 11(6), 276-281.
95. Gabriel, C., Fürst, D., Faé, I., Wenda, S., Zollkofer, C., Mytilineos, J., & Fischer, G. F. (2014). HLA typing by next-generation sequencing–getting closer to reality. *Tissue Antigens*, 83(2), 65-75.
96. Gastroskopie. (2015). Vyšetření žaludku. [online]. Dostupné na adrese: <http://www.anamneza.cz/vysetreni/Gastroskopie-Vysetreni-zaludku-Gastroduodendoskopie-duodendoskopie-fibroskopie-zaludku-horni-endoskopie-ezofagogastroduodendoskopie-fibroskopie-zaludku-endoskopicke-vysetreni-zaludku-540>. Citováno 10.3. 2019.
97. Giannotti, A., Tiberio, G., Castro, M., Virgili, F., Colistro, F., Ferretti, F., ... & Dalla-piccola, B. (2001). Coeliac disease in Williams syndrome. *Journal of medical genetics*, 38(11), 767-768.

98. Genetics Home Reference. (2014). Williams syndrome. Lister Hill National Center for Biomedical Communications U.S. *National Library of Medicine*. 3-5.
99. Genetics Learn, (2008). PCR. *Salt Lake City Genetic Science learning center*. [online]. University of Utah Health Sciences. Dostupné na adrese: <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>. Citováno 12.4. 2019.
100. Goëb, V., Dieudé, P., Daveau, R., Thomas-L'Otellier, M., Jouen, F., Hau, F., ... & Cornélis, F. (2008). Contribution of PTPN22 1858T, TNFR2 196R and HLA-shared epitope alleles with rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibodies to very early rheumatoid arthritis diagnosis. *Rheumatology*, 47(8), 1208-1212.
101. Gomes, V., Mesquita, A., & Capela, C. (2015). Autoimmune diseases and pregnancy: analysis of a series of cases. *BMC research notes*, 8(1), 216.
102. Gottenberg, J. E., Busson, M., Loiseau, P., Cohen-Solal, J., Lepage, V., Charron, D., ... & Mariette, X. (2003). In primary Sjögren's syndrome, HLA class II is associated exclusively with autoantibody production and spreading of the autoimmune response. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 48(8), 2240-2245.
103. Goyette, P., Boucher, G., Mallon, D., Ellinghaus, E., Jostins, L., Huang, H., ... & Oksenberg, J. R. (2015). High-density mapping of the MHC identifies a shared role for HLA-DRB1* 01: 03 in inflammatory bowel diseases and heterozygous advantage in ulcerative colitis. *Nature genetics*, 47(2), 172.
104. Greco, L., Romino, R., Coto, I., Di Cosmo, N., Percopo, S., Maglio, M., ... & D'agate, C. (2002). The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*, 50(5), 624-628.
105. Gregersen, P. K., Silver, J., & Winchester, R. J. (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 30(11), 1205-1213.
106. Gruen, J. R., & Weissman, S. M. (2001). Human MHC class III and IV genes and disease associations. *Front Biosci*, 6, D960-972.
107. Gujral, N., Freeman, H. J., & Thomson, A. B. (2012). Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World journal of gastroenterology: WJG*, 18(42), 6036.

108. Gutierrez-Achury, J., Zhernakova, A., Pulit, S. L., Trynka, G., Hunt, K. A., Romanos, J., ... & de Bakker, P. I. (2015). Fine mapping in the MHC region accounts for 18% additional genetic risk for celiac disease. *Nature genetics*, *47*(6), 577.
109. Hadithi, M., von Blomberg, B. M. E., Crusius, J. B. A., Bloemena, E., Kostense, P. J., Meijer, J. W., ... & Pena, A. S. (2007). Accuracy of serologic tests and HLA-DQ typing for diagnosing celiac disease. *Annals of internal medicine*, *147*(5), 294-302.
110. Hadjivassiliou, M., Gibson, A., Davies-Jones, G. A. B., Lobo, A. J., Stephenson, T. J., & Milford-Ward, A. (1996). Does cryptic gluten sensitivity play a part in neurological illness?. *The Lancet*, *347*(8998), 369-371.
111. Hang, L., Nakamura, R. M., & Tubbs, R. (1997). Current concepts and advances in clinical laboratory testing for autoimmune diseases. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, *34*(3), 275-311.
112. Hanna, S., & Etzioni, A. (2014). MHC class I and II deficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *134*(2), 269-275.
113. Harloe, K., & Morley, N. (2012). Thucydides and the modern world: Reception, reinterpretation and influence from the Renaissance to the present.
114. Hausch, F., Shan, L., Santiago, N. A., Gray, G. M., & Khosla, C. (2002). Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *283*(4), G996-G1003.
115. Heward, J. M., Allahabadia, A., Daykin, J., Carr-Smith, J., Daly, A., Armitage, M., ... & Gough, S. C. (1998). Linkage disequilibrium between the human leukocyte antigen class II region of the major histocompatibility complex and Graves' disease: replication using a population case control and family-based study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *83*(10), 3394-3397.
116. Hoffmann, J. J., & Janssen, W. C. (1997). HLA-B27 phenotyping with flow cytometry: further improvement by multiple monoclonal antibodies. *Clinical chemistry*, *43*(10), 1975-1981.
117. Holling, T. M., Schooten, E., & van Den Elsen, P. J. (2004). Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Human immunology*, *65*(4), 282-290.

118. Horton, R., Gibson, R., Coggill, P., Miretti, M., Allcock, R. J., Almeida, J., ... & Hart, E. (2008). Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: the MHC Haplotype Project. *Immunogenetics*, *60*(1), 1-18.
119. Hořejší, V., & Bartůňková, J. *Základy imunologie*. 3. vydání Praha: Triton, 2005.
120. Howson, J. M., Walker, N. M., Clayton, D., Todd, J. A., & Diabetes Genetics Consortium. (2009). Confirmation of HLA class II independent type 1 diabetes associations in the major histocompatibility complex including HLA-B and HLA-A. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *11*, 31-45.
121. Hu, X., Deutsch, A. J., Lenz, T. L., Onengut-Gumuscu, S., Han, B., Chen, W. M., ... & Raychaudhuri, S. (2015). Additive and interaction effects at three amino acid positions in HLA-DQ and HLA-DR molecules drive type 1 diabetes risk. *Nature genetics*, *47*(8), 898.
122. Hurley, C. K., Woolfrey, A., Wang, T., Haagenson, M., Umejiego, J., Aljurf, M., ... & Oudshoorn, M. (2013). The impact of HLA unidirectional mismatches on the outcome of myeloablative hematopoietic stem cell transplantation with unrelated donors. *Blood*, blood-2013.
123. Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I. R., Mearin, M. L., Phillips, A., Shamir, R., ... & Lelgeman, M. (2012). ESPGHAN gastroenterology committee; european society for pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition. European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, *54*(1), 136-160.
124. Chai, W., Lian, Z., Chen, C., Liu, J., Shi, L. L., & Wang, Y. (2013). JARID1A, JMY, and PTGER4 polymorphisms are related to ankylosing spondylitis in Chinese Han patients: a case-control study. *PLoS One*, *8*(9), e74794.
125. Chang, C. J., Chen, P. L., Yang, W. S., & Chao, K. M. (2014). A fault-tolerant method for HLA typing with PacBio data. *BMC bioinformatics*, *15*(1), 296.
126. Chermesh, I., Azriel, A., Alter-Koltunoff, M., Eliakim, R., Karban, A., & Levi, B. Z. (2007). Crohn's disease and SLC11A1 promoter polymorphism. *Digestive diseases and sciences*, *52*(7), 1632-1635.
127. International HapMap Consortium. (2003). The international HapMap project. *Nature*, *426*(6968), 789.

128. International Schizophrenia Consortium. (2009). Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature*, 460(7256), 748.
129. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. Immunobiology. 2001. *Garland Science, New York and London, USA and UK*.
130. Jara, L. J., Lavalle, C., & Espinoza, L. R. (1992). Does prolactin have a role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus?. *The Journal of rheumatology*, 19(9), 1333.
131. Jindra, P. (2011). Imunopatologické a imunogenetické aspekty transplantací krvetvorných buněk a solidních orgánů. Doktorská disertační práce. *Univerzita Karlova v Praze. Lékařská fakulta v Plzni*.
132. Jung, Cheon (2016): HLA-C*01 is a Risk Factor for Crohn's Disease. *Inflamm. Bow. Dis.* 22(4):796-806.
133. Kábrt, L. (2009). HLA genetická příbuznost Čechů s ostatními národy. Praha, 2009. Diplomová práce. *České vysoké učení technické v Praze, Fakulta elektrotechnická, Katedra kybernetiky*.
134. Kagnoff, M. F. (2007). Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *The Journal of clinical investigation*, 117(1), 41-49.
135. Kang, H. I., Fei, H. M., Saito, I., Sawada, S., Chen, S., ... & Erlich, H. A. (1993). Comparison of HLA class II genes in Caucasoid, Chinese, and Japanese patients with primary Sjögren's syndrome. *The Journal of Immunology*, 150(8), 3615-3623.
136. Karell, K., Louka, A. S., Moodie, S. J., Ascher, H., Clot, F., Greco, L., ... & European Genetics Cluster on Celiac Disease. (2003). HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1* 05-DQB1* 02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Human immunology*, 64(4), 469-477.
137. Kaukinen, K., Turjanmaa, K., Mäki, M., Partanen, J., Venäläinen, R., Reunala, T., & Collin, P. (2000). Intolerance to cereals is not specific for coeliac disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 35(9), 942-946.
138. Keuning, J. J., Pena, A. S., Van Hooff, J. P., Van Leeuwen, A., & Van Rood, J. J. (1976). HLA-DW3 associated with coeliac disease. *The Lancet*, 307(7958), 506-508.
139. Khan, M. A. (2002). Update on spondyloarthropathies. *Annals of Internal Medicine*, 136(12), 896-907.

140. Khan, M. A., Mathieu, A., Sorrentino, R., & Akkoc, N. (2007). The pathogenetic role of HLA-B27 and its subtypes. *Autoimmunity reviews*, 6(3), 183-189.
141. Kim, K., Bang, S. Y., Lee, H. S., Okada, Y., Han, B., Saw, W. Y., ... & Bae, S. C. (2014). The HLA-DR β 1 amino acid positions 11–13–26 explain the majority of SLE–MHC associations. *Nature communications*, 5, 5902.
142. Kim, K., Bang, S. Y., Yoo, D. H., Cho, S. K., Choi, C. B., Sung, Y. K., ... & Shim, S. C. (2016). Imputing variants in HLA-DR beta genes reveals that HLA-DRB1 is solely associated with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *PLoS One*, 11(2), e0150283.
143. King, R. C., Stansfield, W. D., & Mulligan, P. K. (2006). *A Dictionary of Genetics*. 7th.
144. Klein, J. A. N., & Sato, A. (2000). The HLA system. *New England journal of medicine*, 343(10), 702-709.
145. Klener, P. *Vnitřní lékařství*. 3. vydání. Praha: Galén, 2006.
146. Kolísko, M. (2017). Moderní metody sekvenování DNA. *Nakladatelství Academia*, SSČ AV ČR, Živa 3/2017. Dostupné na adrese: <http://ziva.avcr.cz/2017-3/moderni-metody-sekvenovani-dna.html>. Citováno 20.5. 2019.
147. Kohout CSc, P. (2008). Novinky v bezlepkové dietě. *Interní medicína pro praxi*, 10(3), 113-116.
148. Kohout, P. (2006). Diagnostika a léčba celiakie. *Interní Med.*, 7(8), 324-6.
149. Konrádová, V., Uhlík, J., & Vajner, L. (2000). Funkční histologie. *H&H*, 2. vydání.
150. Kopecký (2013): Osobní sdělení.
151. Koubková, L., Vojtěšek, B., & Vyzula, R. (2014). Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Klinická onkologie*, 27(3).
152. Krejsek, J., & Kopecký, O. (2004). *Klinická imunologie*.
153. Kryštůfková, O. (2017). Sjögrenův syndrom ve světle nových diagnostických kritérií. Revmatologický ústav, Praha. Veřejný informační systém [online]. Dostupné na adrese: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/sjogrenuv-syndrom-ve-svetle-novych-diagnostickykh-kriterii-484096>. Citováno 20.6. 2019.
154. Lavard, L., Madsen, H. O., Perrild, H., Jacobsen, B. B., & Svegaard, A. (1997). HLA class II associations in juvenile Graves' disease: indication of a strong

- protective role of the DRB1* 0701, DQA1* 0201 haplotype. *Tissue antigens*, 50(6), 639-641.
155. Lebl, J. *Klinická pediatrie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2012, 698 s.
 156. Leeds, J. S., Hopper, A. D., & Sanders, D. S. (2008). Coeliac disease. *British medical bulletin*, 88(1), 157-170.
 157. Leonard, M. M., Sapone, A., Catassi, C., & Fasano, A. (2017). Celiac disease and nonceliac gluten sensitivity: a review. *Jama*, 318(7), 647-656.
 158. Lio, D., Candore, G., Colombo, A., Romano, G. C., Gervasi, F., Marino, V., ... & Caruso, C. (2001). A genetically determined high setting of TNF- α influences immunologic parameters of HLA-B8, DR3 positive subjects: implications for autoimmunity. *Human immunology*, 62(7), 705-713.
 159. Lio, D., Candore, G., Romano, G. C., D'anna, C., Gervasi, F., Di, G. L., ... & Caruso, C. (1997). Modification of cytokine patterns in subjects bearing the HLA-B8, DR3 phenotype: implications for autoimmunity. *Cytokines, cellular & molecular therapy*, 3(4), 217-224.
 160. Lionetti, E., Gatti, S., Pulvirenti, A., & Catassi, C. (2015). Celiac disease from a global perspective. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 29(3), 365-379.
 161. Liu, W. X., Jiang, Y., Hu, Q. X., & You, X. B. (2016). HLA-DRB1 shared epitope allele polymorphisms and rheumatoid arthritis: a systemic review and meta-analysis. *Clinical and Investigative Medicine (Online)*, 39(6), E1.
 162. Liu, C., Xiao, F., Hoisington-Lopez, J., Lang, K., Quenzel, P., Duffy, B., & Mitra, R. D. (2017). Accurate typing of class I human leukocyte antigen by Oxford nanopore sequencing. *BioRxiv*, 178590.
 163. Lorand, L., & Graham, R. M. (2003). Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(2), 140.
 164. Louka, A. S., Nilsson, S., Olsson, M., Talseth, B., Lie, B. A., Ek, J., ... & Sollid, L. M. (2002). HLA in coeliac disease families: a novel test of risk modification by the 'other' haplotype when at least one DQA1* 05-DQB1* 02 haplotype is carried. *Tissue Antigens*, 60(2), 147-154.
 165. Ludvigsson, J. F., Leffler, D. A., Bai, J. C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P. H., ... & Lundin, K. E. A. (2013). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, 62(1), 43-52.

166. Lukáš, K., & Žák, A. (2007). Gastroenterologie a hepatologie. Praha. Grada. (111-113).
167. Lundin, K. E., Scott, H., Hansen, T., Paulsen, G., Halstensen, T. S., Fausa, O., ... & Sollid, L. M. (1993). Gliadin-specific, HLA-DQ (alpha 1* 0501, beta 1* 0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *Journal of Experimental Medicine*, 178(1), 187-196.
168. Mahdi, B. M. (2015). Role of HLA typing on Crohn's disease pathogenesis. *Annals of medicine and surgery*, 4(3), 248-253.
169. Major, E., Rigo, K., Hague, T., Berces, A., & Juhos, S. (2013). HLA typing from 1000 genomes whole genome and whole exome illumina data. *PloS one*, 8(11), e78410.
170. Makovický, P., Makovický, P., Klimik, M., Greguš, M., & Zimmermann, M. (2008). Pozitivita sérových protilátek proti endomýziu, jejunu a histopatologická diagnostika celiakie u detí. *Vnitř Lék*, 54, 25-30.
171. Malíčková, M. K., Janatková, R. I., Šandová, P., & Fučíková DrSc, M. T. (2006). Imunologická laboratorní vyšetření při podezření na celiakii. *Interní medicína pro praxi*, 7(10), 440-443.
172. Maňásková, D. (2013). [online] Genetika celiakie. Podmínky rozvoje celiakie. Dostupné na adrese: http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt&p_sub=celiakie/e-genetika. Citováno 25.11.2019.
173. Margaritte-Jeannin, P., Babron, M. C., Bourgey, M., Louka, A. S., Clot, F., Percopo, S., ... & Greco, L. (2004). HLA-DQ relative risks for coeliac disease in European populations: A study of the European genetics cluster on coeliac disease. *Tissue antigens*, 63(6), 562-567.
174. Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bembem, L. A., ... & Dewell, S. B. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376.
175. Marsh, M. N. (1992). Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine: a molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology*, 102(1), 330-354.
176. Marsh, S. G., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Dupont, B., Erlich, H. A., ... & Lau, M. (2010). Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue antigens*, 75(4), 291-455.

177. Martens, M. A., Wilson, S. J., & Reutens, D. C. (2008). Research Review: Williams syndrome: a critical review of the cognitive, behavioral, and neuroanatomical phenotype. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, *49*(6), 576-608.
178. Martucci, S., Biagi, F., Di Sabatino, A., & Corazza, G. R. (2002). Coeliac disease. *Digestive and Liver Disease*, *34*, S150-S153.
179. Matzaraki, V., Kumar, V., Wijmenga, C., & Zhernakova, A. (2017). The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome biology*, *18*(1), 76.
180. Medrano, L. M., Dema, B., López-Larios, A., Maluenda, C., Bodas, A., López-Palacios, N., ... & Núñez, C. (2012). HLA and celiac disease susceptibility: new genetic factors bring open questions about the HLA influence and gene-dosage effects. *PloS one*, *7*(10), e48403.
181. Megiorni, F., & Pizzuti, A. (2012). HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *Journal of biomedical science*, *19*(1), 88.
182. Megiorni, F., Mora, B., Bonamico, M., Barbato, M., Montuori, M., Viola, F., ... & Mazzilli, M. C. (2008). HLA-DQ and susceptibility to celiac disease: evidence for gender differences and parent-of-origin effects. *The American journal of gastroenterology*, *103*(4), 997.
183. Menconi, F., Marcocci, C., & Marinò, M. (2014). Diagnosis and classification of Graves' disease. *Autoimmunity reviews*, *13*(4-5), 398-402.
184. Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, *11*(1), 31.
185. Mignot, E., Hayduk, R., Black, J., Grumet, F. C., & Guilleminault, C. (1997). HLA DQB1* 0602 is associated with cataplexy in 509 narcoleptic patients. *Sleep*, *20*(11), 1012-1020.
186. Michalski, J. P., McCombs, C. C., Arai, T., Elston, R. C., Cao, T., McCarthy, C. F., & Stevens, F. M. (1996). HLA-DR, DQ genotypes of celiac disease patients and healthy subjects from the West of Ireland. *Tissue antigens*, *47*(2), 127-133.
187. Mindell, J. A., & Owens, J. A. (2015). A clinical guide to pediatric sleep: diagnosis and management of sleep problems.
188. Mok, C. C., & Lau, C. S. (2003). Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Journal of clinical pathology*, *56*(7), 481-490.

189. Molberg, Ø., McAdam, S. N., & Sollid, L. M. (2000). Role of tissue transglutaminase in celiac disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 30(3), 232-240.
190. Morling, N., Andersen, V., Fugger, L., Georgsen, J., Halberg, P., Oxholm, P., ... & Svejgaard, A. (1991). Immunogenetics of rheumatoid arthritis and primary Sjögren's syndrome: DNA polymorphism of HLA class II genes. *Disease markers*, 9(5), 289-296.
191. Morris, D. L., Taylor, K. E., Fernando, M. M., Nititham, J., Alarcón-Riquelme, M. E., Barcellos, L. F., ... & Pons-Estel, B. A. (2012). International MHC and Autoimmunity Genetics Network; Systemic Lupus Erythematosus Genetics Consortium. Unraveling multiple MHC gene associations with systemic lupus erythematosus: model choice indicates a role for HLA alleles and non-HLA genes in Europeans. *Am J Hum Genet*, 91(5), 778-793.
192. Mourad, W., Geha, R. S., & Chatila, T. (1990). Engagement of major histocompatibility complex class II molecules induces sustained, lymphocyte function-associated molecule 1-dependent cell adhesion. *Journal of Experimental Medicine*, 172(5), 1513-1516.
193. Moutsianas, L., Jostins, L., Beecham, A. H., Dilthey, A. T., Xifara, D. K., Ban, M., ... & Anderson, C. A. (2015). International IBD Genetics Consortium (IIBDGC); International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet*, 47(10), 1107-1113.
194. Mubarak, A., Spierings, E., Wolters, V., van Hoogstraten, I., Kneepkens, C. F., & Houwen, R. (2013). Human leukocyte antigen DQ2. 2 and celiac disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 56(4), 428-430.
195. Mugnier, B., Balandraud, N., Darque, A., Roudier, C., Roudier, J., & Reviron, D. (2003). Polymorphism at position- 308 of the tumor necrosis factor α gene influences outcome of infliximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 48(7), 1849-1852.
196. Müller, L., & Szaflarska-Popławska, A. (2005). Immunological mechanisms of celiac disease. *Przegląd lekarski*, 62(2), 123-127.
197. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2015). Medical microbiology.

198. Murray, J. A., Moore, S. B., Van Dyke, C. T., Lahr, B. D., Dierkhising, R. A., Zinsmeister, A. R., ... & Czaja, A. J. (2007). HLA DQ gene dosage and risk and severity of celiac disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(12), 1406-1412.
199. Nakken, B., Jonsson, R., Brokstad, K. A., Omholt, K., Nerland, A. H., Haga, H. J., & Halse, A. K. (2001). Associations of MHC class II alleles in Norwegian primary Sjögren's syndrome patients: implications for development of autoantibodies to the Ro52 autoantigen. *Scandinavian journal of immunology*, 54(4), 428-433.
200. Nehra, V., Marietta, E. V., & Murray, J. A. (2014). Celiac disease and its therapy: current approaches and new advances. *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*, 143-155.
201. Nevorál, J. (2010). Cílený screening celiakie. Univerzita Karlova v Praze. Veřejný informační systém [online]. Dostupné na adrese: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/cileny-screening-celiakie-452401>. Citováno 20.6. 2019.
202. NICE (National Institute for Health and Clinical Excellence. (2008). Irritable bowel syndrome in adults: diagnosis and management of irritable bowel syndrome in primary care. *Clinical Guideline 61*, 37 stran.
203. Nistal, E., Caminero, A., Herrán, A. R., Arias, L., Vivas, S., de Morales, J. M. R., ... & Casqueiro, J. (2011). Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: effect of age, gluten diet, and disease. *Inflammatory bowel diseases*, 18(4), 649-656.
204. Novák, M. V., Medřická, M. H., & Slonková, M. J. (2008). NARKOLEPSIE U ADOLESCENTNÍ PACIENTKY. *Pediatr. pro Praxi*, 9(1): 58-60.
205. Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F., Thompson, J., Thompson, M., & Thompson & Thompson. (2004). *Klinická genetika*.
206. Okada, Y., Kim, K., Han, B., Pillai, N. E., Ong, R. T. H., Saw, W. Y., ... & Lee, H. S. (2014). Risk for ACPA-positive rheumatoid arthritis is driven by shared HLA amino acid polymorphisms in Asian and European populations. *Human molecular genetics*, 23(25), 6916-6926.
207. Okada, Y., Momozawa, Y., Ashikawa, K., Kanai, M., Matsuda, K., Kamatani, Y., ... & Kubo, M. (2015). Construction of a population-specific HLA imputation reference panel and its application to Graves' disease risk in Japanese. *Nature genetics*, 47(7), 798.

208. Okada, Y., Momozawa, Y., Ashikawa, K., Kanai, M., Matsuda, K., Kamatani, Y., ... & Kubo, M. (2015). Construction of a population-specific HLA imputation reference panel and its application to Graves' disease risk in Japanese. *Nature genetics*, 47(7), 798.
209. Olivares, M., Neef, A., Castillejo, G., De Palma, G., Varea, V., Capilla, A., ... & Ribes-Koninckx, C. (2015). The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. *Gut*, 64(3), 406-417.
210. Ollila, H. M., Ravel, J. M., Han, F., Faraco, J., Lin, L., Zheng, X., ... & Jennum, P. (2015). HLA-DPB1 and HLA class I confer risk of and protection from narcolepsy. *The American Journal of Human Genetics*, 96(1), 136-146.
211. Orhan, Y., Azezli, A., Çarin, M., Aral, F., Sencer, E., & Molvalılar, S. (1993). Human lymphocyte antigens (HLA) and Graves' disease in Turkey. *Journal of clinical immunology*, 13(5), 339-343.
212. Paladini, F., Taccari, E., Fiorillo, M. T., Cauli, A., Passiu, G., Mathieu, A., ... & Sorrentino, R. (2005). Distribution of HLA-B*27 subtypes in Sardinia and continental Italy and their association with spondylarthropathies. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 52(10), 3319-3321.
213. Pan, Q., Ning, Y., Chen, L. Z., Zhang, S., Liu, Z. Z., Yang, X. X., ... & Wang, J. X. (2012). Association of MHC class-III gene polymorphisms with ER-positive breast cancer in Chinese Han population. *Genetics and Molecular Research*, 11(4), 4299-4306.
214. Panda, S., & Ding, J. L. (2015). Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *The journal of immunology*, 194(1), 13-20.
215. Parham, P. (2014). The immune system.
216. Park, M. H., Park, Y. J., Song, E. Y., Park, H., Kim, T. Y., Park, D. J., ... & Cho, B. Y. (2005). Association of HLA-DR and-DQ genes with Graves disease in Koreans. *Human immunology*, 66(6), 740-746.
217. Patsopoulos, N. A., Barcellos, L. F., Hintzen, R. Q., Schaefer, C., Van Duijn, C. M., Noble, J. A., ... & Olsson, T. (2013). Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS genetics*, 9(11), e1003926.

218. Pavelka, K., & Rovenský, J. (2003). *Klinická revmatologie*. Praha: Galén, 952 s.
219. Pei, R., Wang, G., Tarsitani, C., Rojo, S., Chen, T., Takemura, S., ... & Lee, J. (1998). Simultaneous HLA class I and class II antibodies screening with flow cytometry. *Human immunology*, 59(5), 313-322.
220. Penka, M., Tesařová, E. (2012). *Hematologie a transfuzní lékařství II: Transfuzní lékařství*.
221. Pera, C., Delfino, L., Longo, A., Pistillo, M. P., & Ferrara, G. B. (2000). Novel associations among HLA-DQA1 and-DQB1 alleles, revealed by high-resolution sequence-based typing (SBT). *Tissue Antigens: Brief communication*, 55(3), 275-279.
222. Perez-Guijo, V., Muñoz, E., Escudero, A., Veroz, R., Sánchez, M., Muñoz-Villanueva, M. C., ... & Collantes-Estevez, E. (2002). Distribution of HLA-DRB1 genes in patients with sporadic ankylosing spondylitis in the south of Spain. *Joint Bone Spine*, 69(5), 458-462.
223. Perlín, C. (2008). Některé nutričně imunologické problémy technologického a kulinářského zpracování potravin. [online]. Dostupné na adrese: <http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=print&val=80971>. Citováno 20.6. 2019.
224. Petersdorf, E. W., Malkki, M., O'huigin, C., Carrington, M., Gooley, T., Haagensohn, M. D., ... & Stevenson, P. (2015). High HLA-DP expression and graft-versus-host disease. *New England Journal of Medicine*, 373(7), 599-609.
225. Picascia, A., Grimaldi, V., & Napoli, C. (2016). From HLA typing to anti-HLA antibody detection and beyond: the road ahead. *Transplantation Reviews*, 30(4), 187-194.
226. Picascia, S., Sidney, J., Camarca, A., Mazzarella, G., Giardullo, N., Greco, L., ... & Gianfrani, C. (2017). Gliadin-Specific CD8+ T Cell Responses Restricted by HLA Class IA* 0101 and B* 0801 Molecules in Celiac Disease Patients. *The Journal of Immunology*, 1601208.
227. Pietzak, M. M. (2014). Dietary supplements in celiac disease. *Celiac Disease*, 137-159.
228. Pietzak, M. M., Schofield, T. C., McGinniss, M. J., & Nakamura, R. M. (2009). Stratifying risk for celiac disease in a large at-risk United States population by using HLA alleles. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 7(9), 966-971.

229. Ploski, R., Ek, J., Thorsby, E., & Sollid, L. M. (1993). On the HLA-DQ ($\alpha 1^*$ 0501, $\beta 1^*$ 0201)-associated susceptibility in celiac disease: A possible gene dosage effect of DQB1* 0201. *Tissue antigens*, 41(4), 173-177.
230. Prescott, N. J., Fisher, S. A., Franke, A., Hampe, J., Onnie, C. M., Soars, D., ... & Mansfield, J. C. (2007). A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology*, 132(5), 1665-1671.
231. Price, P., Witt, C., Allock, R., Sayer, D., Garlepp, M., Kok, C. C., ... & Christiansen, F. (1999). The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunological reviews*, 167(1), 257-274.
232. Profaizer, T. A., Taylor, M. R., & Eckels, D. D. (2007). 124-P: Allele specific typing using real-time PCR. *Human Immunology*, 1(68), S77.
233. Prokopová, M. (2008). Celiakie-co má vědět ambulantní internista. *Interní Medicina pro praxi*, 10(5), 233-239.
234. Psoriáza. (2010). [online]. Dostupné na adrese: <http://www.anamneza.cz/nemoc/Lupenka-Psoriasis-54>. Citováno 25.4. 2019.
235. Psoriáza. (2012). [online]. Dostupné na adrese: http://www.dermanet.cz/cs/kozni-choroby/lupenka/co-je-to-lupenka_s581x7290.html. Citováno 25.4. 2019.
236. Qiao, S. W., Iversen, R., Ráki, M., & Sollid, L. M. (2012). The adaptive immune response in celiac disease. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 34, No. 4, pp. 523-540). Springer-Verlag.
237. Rauhavirta, T., Hietikko, M., Salmi, T., & Lindfors, K. (2016). Transglutaminase 2 and transglutaminase 2 autoantibodies in celiac disease: a review. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 1-16.
238. Raychaudhuri, S., Sandor, C., Stahl, E. A., Freudenberg, J., Lee, H. S., Jia, X., ... & Siminovitch, K. A. (2012). Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nature genetics*, 44(3), 291.
239. Rédei, G. P. (2008). Encyclopedia of genetics, genomics, proteomics, and informatics.

240. Redondo, M. J., Fain, P. R., & Eisenbarth, G. S. (2001). Genetics of type 1A diabetes. *Recent progress in hormone research*, 56, 69-89.
241. Reveille, J. D. (2006). Major histocompatibility genes and ankylosing spondylitis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 20(3), 601-609.
242. Rhee, M., & Burns, M. A. (2006). Nanopore sequencing technology: research trends and applications. *Trends in biotechnology*, 24(12), 580-586.
243. Rocca, P., Codes, L., Chevaller, M., Trepo, C., & Zoulim, F. (2004). Auto-immunization induced by interferon alpha therapy in chronic hepatitis C. *Gastroenterologie clinique et biologique*, 28(11), 1173-1176.
244. Roitberg-Tambur, A., Friedmann, A., Safirman, C., Markitziu, A., Ben-Chetrit, E., Rubinow, A., ... & Brautbar, C. (1993). Molecular analysis of HLA class II genes in primary sjogren's syndrome: A study of Israeli Jewish and Greek Non-Jewish patients. *Human immunology*, 36(4), 235-242.
245. Rostami, K., Kerckhaert, J., Tiemessen, R., Von Blomberg, B. M. E., Meijer, J. W., & Mulder, C. J. (1999). Sensitivity of antiendomysium and antigliadin antibodies in untreated celiac disease: disappointing in clinical practice. *The American journal of gastroenterology*, 94(4), 888-894.
246. Rostami, K., Kerckhaert, J., Von Blomberg, B. M. E., Meijer, J. W. R., Wahab, P., & Mulder, C. J. J. (1998). SAT and serology in adult coeliacs, seronegative coeliac disease seems a reality. *The Netherlands journal of medicine*, 53(1), 15-19.
247. Rubio-Tapia, A., & Murray, J. A. (2010). Classification and management of refractory coeliac disease. *Gut*, 59(4), 547-557.
248. Ruijter, J. M., Pfaffl, M. W., Zhao, S., Spiess, A. N., Boggy, G., Blom, J., ... & Derveaux, S. (2013). Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods*, 59(1), 32-46.
249. Řeháček, V. Transfuzní lékařství. 1. vyd. Editor Jiří Masopust. Praha: Grada, 2013, 237 s.
250. Salinas, G. F., Braza, F., Brouard, S., Tak, P. P., & Baeten, D. (2013). The role of B lymphocytes in the progression from autoimmunity to autoimmune disease. *Clinical immunology*, 146(1), 34-45.
251. Sellitto, M., Bai, G., Serena, G., Fricke, W. F., Sturgeon, C., Gajer, P., ... & Gicquelais, R. (2012). Proof of concept of microbiome-metabolome analysis and

- delayed gluten exposure on celiac disease autoimmunity in genetically at-risk infants. *PloS one*, 7(3), e33387.
252. Shahbazi, M., Abadi, J. S. A., Roshandel, D., Koochaki, M., Amiri, H., Kohansal, R., ... & Zamani, M. (2017). Combination of interleukin-10 gene promoter polymorphisms with HLA-DRB1* 15 allele is associated with multiple sclerosis. *The Indian journal of medical research*, 145(6), 746.
 253. Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., ... & Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297(5590), 2275-2279.
 254. Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H., & Kulski, J. K. (2009). The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *Journal of human genetics*, 54(1), 15.
 255. Shyamala, V., & Ames, G. F. L. (1993). Single specific primer-polymerase chain reaction (SSP-PCR) and genome walking. *PCR Protocols*, 339-348.
 256. Schuppan, D. (2000). Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology*, 119(1), 234-242.
 257. Schuppan, D., & Zimmer, K. P. (2013). The diagnosis and treatment of celiac disease. *Deutsches Ärzteblatt International*, 110(49), 835.
 258. Siegel, M., Strnad, P., Watts, R. E., Choi, K., Jabri, B., Omary, M. B., & Khosla, C. (2008). Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue injury. *PloS one*, 3(3), e1861.
 259. Simmonds, M. J., & Gough, S. C. L. (2007). The HLA region and autoimmune disease: associations and mechanisms of action. *Current genomics*, 8(7), 453-465.
 260. Singal, A., Bhattacharya, S. N., & Baruah, M. C. (2002). Dermatitis herpetiformis and rheumatoid arthritis. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, 68(4), 229.
 261. Smith, W. P., Vu, Q., Li, S. S., Hansen, J. A., Zhao, L. P., & Geraghty, D. E. (2006). Toward understanding MHC disease associations: partial resequencing of 46 distinct HLA haplotypes. *Genomics*, 87(5), 561-571.
 262. Snell, G. D. (1948). Methods for the study of histocompatibility genes. *Journal of genetics*, 49(2), 87-108.

263. Sollid, L. M. (2000). Molecular basis of celiac disease. *Annual review of immunology*, 18(1), 53-81.
264. Sollid, L. M., & Lie, B. A. (2005). Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 3(9), 843-851.
265. Sollid, L. M., & Thorsby, E. (1993). HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology*, 105(3), 910-922.
266. Sollid, L. M., & Jabri, B. (2013). Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nature Reviews Immunology*, 13(4), 294.
267. Sollid, L. M., McAdam, S. N., Molberg, Ø., Quarsten, H., Arentz-Hansen, H., Louka, A. S., & Lundin, K. E. A. (2001). Genes and environment in celiac disease. *Acta Odontologica Scandinavica*, 59(3), 183-186.
268. Souček, M. (2011). Vnitřní lékařství.
269. Stites, D. P., & Terr, A. I. (1994). Základní a klinická imunologie.
270. Sun, C., Molineros, J. E., Looger, L. L., Zhou, X. J., Kim, K., Okada, Y., ... & Bhattarai, K. (2016). High-density genotyping of immune-related loci identifies new SLE risk variants in individuals with Asian ancestry. *Nature genetics*, 48(3), 323.
271. Szitányi, P., Vraná, M., Kelifová, S., Ratajová, E. (2018). Aktualizace přístupu k non-biopsy diagnostice celiakie. [online] Dostupné na adrese: <https://docplayer.cz/98917320-Aktualizace-pristupu-k-non-biopsy-diagnostice-celiakie.html>. Citováno 25.11.2019.
272. Škrha, J. (2014). Epidemiologie diabetu. Univerzita Karlova v Praze. Veřejný informační systém [online]. Dostupné na adrese: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/epidemiologie-diabetu-474955>. Citováno 20.6. 2019.
273. Štork, J. Dermatovenerologie. 1. vyd. Praha: Galén, 2008.
274. Šumník, Z., Dřevínek, P., Šnajdcrová, M., Koloušková, S., Sedlakova, P., Pechová, M., ... & Cinek, O. (2003). HLA-DQ polymorphisms modify the risk of thyroid autoimmunity in children with type 1 diabetes mellitus. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 16(6), 851-858.
275. Tack, G. J., Verbeek, W. H., Schreurs, M. W., & Mulder, C. J. (2010). The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 7(4), 204.

276. Teichmann, J., Voglauer, M. J., & Lange, U. (2010). Antibodies to human tissue transglutaminase and alterations of vitamin D metabolism in ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Rheumatology international*, 30(12), 1559-1563.
277. Terasaki, P. I., & McClelland, J. D. (1964). Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature*, 204(4962), 998.
278. Thorsby, E., & Lie, B. A. (2005). HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms. *Transplant immunology*, 14(3-4), 175-182.
279. Thorsby, E., & Lie, B. A. (2005). HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms. *Transplant immunology*, 14(3-4), 175-182.
280. Tjon, J. M. L., van Bergen, J., & Koning, F. (2010). Celiac disease: how complicated can it get?. *Immunogenetics*, 62(10), 641-651.
281. Tlaskalová-Hogenová, H., Tučková, L., Štěpánková R. (1999). Imunopatogenetické mechanismy celiakie. *Trendy soudobé pediatrie 1*, Galén, 181-197.
282. Todd, J. A. (1990). Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes. *Immunology today*, 11, 122-129.
283. Todd, J. A. (1997). Genetics of type 1 diabetes. *Pathologie-biologie*, 45(3), 219-227.
284. Tovoli, F., Masi, C., Guidetti, E., Negrini, G., Paterini, P., & Bolondi, L. (2015). Clinical and diagnostic aspects of gluten related disorders. *World Journal of Clinical Cases: WJCC*, 3(3), 275.
285. Trombetta, E. S., & Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 975-1028.
286. Trowsdale, J. (2005). HLA genomics in the third millennium. *Current opinion in Immunology*, 17(5), 498-504.
287. Turcatti, G., Romieu, A., Fedurco, M., & Tairi, A. P. (2008). A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic acids research*, 36(4), e25-e25.
288. Valdes, A. M., Thomson, G., & Barcellos, L. F. (2010). Genetic variation within the HLA class III influences T1D susceptibility conferred by high-risk HLA haplotypes. *Genes and immunity*, 11(3), 209.

289. Valerio, G., Maiuri, L., Troncone, R., Buono, P., Lombardi, F., Palmieri, R., & Franzese, A. (2002). Severe clinical onset of diabetes and increased prevalence of other autoimmune diseases in children with coeliac disease diagnosed before diabetes mellitus. *Diabetologia*, 45(12), 1719-1722.
290. Van, L., Browning, J. C., Krishnan, R. S., Kenner-Bell, B. M., & Hsu, S. (2008). Dermatitis herpetiformis: potential for confusion with linear IgA bullous dermatosis on direct immunofluorescence. *Dermatology online journal*, 14(1).
291. Vencovský, J. (2015). Dermatomyozitida. [online]. Dostupné na adrese: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/dermatomyozitida-479048>. Citováno 23.6. 2019.
292. Voet, D., Voet, J. Biochemistry. (2004). New York. *Nakladatelství Wiley*, 4. vydání. 1520 s.
293. Vojdani, A., Kharrazian, D., & Mukherjee, P. S. (2013). The prevalence of antibodies against wheat and milk proteins in blood donors and their contribution to neuroimmune reactivities. *Nutrients*, 6(1), 15-36.
294. Vojdani, A. (2014). A potential link between environmental triggers and autoimmunity. *Autoimmune diseases*, 2014.
295. Volta, U., Caio, G., Tovoli, F., & De Giorgio, R. (2013). Non-celiac gluten sensitivity: questions still to be answered despite increasing awareness. *Cellular & molecular immunology*, 10(5), 383.
296. Vraná, M. (2016). Interpretace neběžných haplotypů celiakie. Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku. ÚHKT. Praha.
297. Vraná, M. (2019). Osobní sdělení.
298. Walker-Smith, J. A. G. S. (1990). Revised criteria for diagnosis of celiac disease. *Arch. Dis. Child.*, 65, 909-911.
299. Wang, C., Krishnakumar, S., Wilhelmy, J., Babrzadeh, F., Stepanyan, L., Su, L. F., ... & Mindrinos, M. (2012). High-throughput, high-fidelity HLA genotyping with deep sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22), 8676-8681.
300. Wang, L., Wang, F. S., & Gershwin, M. E. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *Journal of internal medicine*, 278(4), 369-395.
301. Welsh, K., & Bunce, M. (1999). Molecular typing for the MHC with PCR-SSP. *Reviews in immunogenetics*, 1(2), 157-176.

302. Wilson, J. M. G., Jungner, G., & World Health Organization. (1968). Principles and practice of screening for disease.
303. Wittig, M., Anmarkrud, J. A., Kässens, J. C., Koch, S., Forster, M., Ellinghaus, E., ... & Görg, S. (2015). Development of a high-resolution NGS-based HLA-typing and analysis pipeline. *Nucleic acids research*, 43(11), e70-e70.
304. Wordsworth, P. (1991). PCR-SSO typing in HLA-disease association studies. *International Journal of Immunogenetics*, 18(1-2), 139-146.
305. Woszczek, G., Borowiec, M., Miś, M., Gorska, M., & Kowalski, M. L. (1997). Comparison of serological and molecular (PCR-SSP) techniques of HLA-DR typing in clinical laboratory routine. *Annals of transplantation*, 2(1), 39-42.
306. Yanagawa, T., Manglabruks, A., Chang, Y. B., Okamoto, Y., Fisfalen, M. E., Curran, P. G., & DeGroot, L. J. (1993). Human histocompatibility leukocyte antigen-DQA1* 0501 allele associated with genetic susceptibility to Graves' disease in a Caucasian population. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 76(6), 1569-1574.
307. Zamrazil, V. (2013). Nemoci štítné žlázy v klinické praxi. Endokrinologický ústav, Praha. Veřejný informační systém [online]. Dostupné na adrese: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/nemoci-stitne-zlazy-v-klinicke-praxi-472161>. Citováno 20.6. 2019.

13 SEZNAM ZKRATEK

TNF (α , β) – Tumor necrosis factor (α , β)

AIF1 – Allograft Inflammatory Factor 1

Hsp70 – Heat shock protein 70

TcR – T-cell receptor (T-buněčný receptor)

PTPN22 – Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22

CTLA4 – Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4

STAT4 – *Signal transducer and activator of transcription 4*

IL-2RA – Interleukin 2 (IL2) receptor alpha

CD 28 – Cluster of Differentiation 28 (kostimulační receptor T-lymfocytů)

IRF5 – Interferon regulatory factor 5

GATA 3 – GATA binding protein 3

PAD4 – Peptidyl arginine deiminase, type IV

IL-1 β – Interleukin-1 beta

BACH 2 – Broad complex-tramtrack-bric a brac and Cap'n'collar homology 2

RGS1 – Regulator of G-protein signaling 1

RGS 21 – Regulator of G-protein signaling 21

CCR 9 – C-C chemokine receptor type 9

TAGAP – T-cell activation Rho GTPase-activating protein

CBLB – Cbl proto-oncogene B

CCHCR1 – Coiled-coil alpha-helical rod protein 1

BLK – B-cell lymphocyte kinase

CD 226 – Cluster of Differentiation 226

BANK1 – B Cell Scaffold Protein With Ankyrin Repeats 1
RASGRP3 – Ras guanyl-releasing protein 3
IKZF1 – IKAROS family zinc finger 1 protein
PRKCQ – Protein kinase C theta enzyme
SH2B3 – SH2B adapter protein 3
PTPN2 – Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2
anti-Ro/SSA – Anti-Sjögren's-syndrome-related antigen A
anti-La/SSB –
MGUS – Monoclonal gammopathy of undetermined significance
PTGER4 – Prostaglandin E2 receptor 4
JARID1A – Histone demethylase that specifically demethylates 'Lys- 4' of histone H3
JMY – Junction-mediating and regulatory protein
ATG16L1 – Autophagy related 16 like 1
IL23R – Interleukin-23 receptor
IRGM – Immunity-related GTPase family M protein
SLC11A1 – Natural resistance-associated macrophage protein 1
TNFAIP3 – Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
MDR1 – Multi-drug resistance gene 1
anti-TSHR – Anti Thyroid Stimulating Hormone Receptor

14 PŘÍLOHY

14.1 Tabulka onemocnění asociovaných s HLA systémem

Choroba	Zákl. asociace	Protektivní alely	HL rizik. lokus	Další rizik. alely	Prevalence	Riziko propuknutí	Non-HLA molekuly	Populace	Referen- ce
RA	sdílený epitop (HLA-DRB1* 01:01, 01:02, 04:01, 04:04, 04:05, 04:08, 10:01, 14:02, 14:20) AMK (70-74)	HLA-DRB1* 01:03, 04:02, 11:02, 11:03, 12:01, 13:01, 13:02, 13:04, 15:01	HLA-DRB1 (AMK 11, 13, 57, 71, 74)	HLA-B* 08 (AMK 9), HLA-DPB1 (AMK 9, 84), HLA-DOA (rs 378352), HLA-B* 40:02	0,5 - 1 %	u kuřáků se zdvojnásobuje	PTPN22, CTLA4, STAT4, IL-2RA, CD 28, IRF5, GATA 3, PAD4, IL-1β, TNFα	Kavkaz - 04:01, 04:04, 04:08; Japonsko - 04:05; Izrael - 01:01, 01:02; Indiáni - 14:02; Řecko - 10:04; Latinská Amerika - 01:01, 04:01, 04:04, 04:05	Matzarakis et al., (2017); Cruz-Tapias et al., (2013); Gough et al., (2007); Goëb et al., (2008); Raychardhuri et al., (2012); Okada et al., (2014); Okada et al., (2015); Liu et al., (2016); Suzuki et al., (2018); Giuseppe et al., (2014), Bettencourt et al., (2015)
CS	HLA-DQ lokus (HLA-DQ 2 a HLA-DQ 8); HLA-DQA1* 02:01, 03:01, 05:01, 05:02; HLA-DQB1* 02:01, 02:02, 03:02 HLA-DRB1* 03:01	HLA-DQA1* 01:01, 02:01 a DQB1* 03:01 (Chilská studie)	HLA-DQA1 (AMK 25 a 47), HLA-DQB1 (AMK 57 a 74), HLA-DQA1* 05:01 - DQB1* 02:01; DQA1* 03:01- DQB1* 03:02	HLA-DRB1 (AMK 9) rs 2301226 (blízko DPB1 genu) HLA-B* 08:01, 39:06 HLA-DQA1* 05:07, 05:11, 05:04, 05:10 HLA-DQB1* 02:04, 02:06,	celkově v populaci 0,5 - 2 % v Evropě 1,5 %, liší se podle regionů (Finsko 2,4 %; Německo 0,3 %); USA 1 %	rizikový haplotyp nese přibližně 40 % populace (rozvoj proběhne u 2 - 3 % z nich)	IL-2, IL-21, BACH 2, RGS1, RGS 21, CCR 9, TAG AP	Evropa Amerika	Matzarakis et al., (2017), Vraná (2015), Gough et al., (2007) Gautier et al., (2015), Pisacsia et al., (2017), Cruz-Tapias et al., (2013), Sharma (2016), Leonard

Choroba	Zákl. asociace	Protektivní alely	HL rizik. lokus	Další rizik. alely	Prevalence	Riziko propuknutí	Non-HLA molekuly	Populace	Referen- ce
				02:48, 02:64					(2017), Nevorál (2010)
MS	HLA-DRB1* 15:01 a HLA-DQB1* 06:02 ve vazebné nerovnováze	HLA-A* 02:01	HLA-DRB1* 15:01	HLA-DRB1* 13:03, 03:01, 01:08, 04, 13:01 HLA-A* 02:01 HLA-DPB1 (AMK 65)	zhruba 1 % populace (hodně případů v Sardinii, v ČR 100:100 000, v USA a Austrálii 5-29: 100 000, Latinská Amerika 5: 100 000)	2 - 3x častěji u žen u příbuzných 3 - 4x větší riziko	CBLB CCHCR1 BLK CD 226	Kavkaz Latinská Amerika Evropa Austrálie	Matzarakis et al., (2017), Cruz-Tapias et al., (2013), Shahbazi et al., (2017), Patsopoulos et al., (2013), Moktisanas et al., (2015), Anaya et al., (2013), Benešová (2013)
SLE	HLA-DRB1* 03:01, 15:01; HLA-DRB1* 08:01-HLA-DQA1* 01:02 ; AH 8.1 jako běžný evropský haplotyp	HLA-DRB1* 13:02, 14:03 (Japonská studie)	HLA-DRB1 (AMK 11, 12, 26); HLA-DQB1* 06:02 - HLA-DRB1* 15:01 (VN) intron TNXB - rs 1150753 MSH5	HLA-C HLA-DQB1* 02 HLA-DRB1* 09	0,04 - 0,12 % USA 1,2: 1000 v ČR bylo podle ČRS v roce 2013 6 - 10 000 pacientů	vyšší u žen (při propuknutí po 50. roce je poměr ženy vs muži 4:1); u dětí je poměr ženy vs muži 3:1	BANK1 RA-SGRP3 CTLA4 IKZF1 CD226 rs 419788	Amerika Evropa (08:01 a 01:02) Korea	Matzarakis et al., (2017), Cruz-Tapias et al., (2013), Anaya et al., (2013), Kim et al., (2014), Morris et al., (2012), Sun et al., (2016), Kim et al., (2016), Chakravarty et al., (2017), Bettencourt et al., (2015), Furukawa et al., (2014)
T1D	HLA-DRB1 (AMK 13,71) HLA-DQB1 (AMK 57) u heterozygoty DR3, DR4 HLA-B* 38	HLA-DRB1* 15:01, HLA-DQB1* 06:02	HLA-DQB1* 03:02, 04 HLA-DRB1* 03:01	HLA-B* 39:06, 18:01, 50:01 HLA-A* 24:02, 03	0,2 - 0,3 % Evropa 6,8 % (2013) v roce 2035 se odhaduje na 7,1 %; Afrika 5,7 % (2013); Asie 4-5 %; USA 20 %	vyšší zejména u dětí (vliv vnějších okolností obezita) změna incidence i uvnitř populace	PTPN22 CTLA4 TAGAP PRKCQ SH2B3 PTPN2 CD 226	Evropa Asie Afrika Amerika	Matzarakis et al., (2017), Wagener et al., (1982), Cruz-Tapias et al., (2013), Anaya et al., (2013), Hu et al.,

Choroba	Zákl. asociace	Protektivní alely	HL rizik. lokus	Další rizik. alely	Prevalence	Riziko propuknutí	Non-HLA molekuly	Populace	Referen- ce
									(2015), Howson et al., (2009), Valdes et al., (2010), Škrha (2014)
SS	HLA-DQA1 HLA-DQB1 HLA-DRB1	HLA-DQA1* 02:01, 03:01, HLA-DQB1* 05:01	HLA-DQA1* 05:01 HLA-DQB1* 02:01 HLA-DRB1* 03:01	HLA-DRB1* 15	0,1 - 4,8 % (liší se na základě kritérií pro epidemiolo- gické stanovení)	vyšší u žen ženy vs muži 9:1	anti- Ro/SSA anti- La/SSB MGUS nižší koncen- trance C3 a C4	Norové (DRB3* 01:01), Dáni (DQB1* 06:02), Japonci (DRB1* 04:01, 04:05), Čína (DRB1* 08:03, DQB1* 06:01)	Matzara- ki et al., (2017), Cruz- Tapias et al., (2012), Nakken et al., (2001), Morling et al., (1991), Kang et al., (1993), Roitberg- Tambur at al., (1993), Cruz- Tapias et al., (2013), Got- tenberg et al., (2003) Kryš- tůfková (2017)
AS	HLA-B* 27	HLA-B* 07:02, 27:06, 27:09, 57: 01	HLA-B* 27:01, 27:02, 27:05 slabší asociace HLA-B* 27:06, 27:09	HLA-A* 02:01, HLA- DPB1, HLA- DRB1* 01:03 další HLA-B alely (HLA-B* 13:02, 40:01, 40:02, 51:01)	0,5 - 1 % (24:10 000 Evropa; 16,7: 10 000 Asie; 32: 10 000 Severní Amerika; 10,2: 10 000 Latin- ská Ameri- ka; 7,4: 10 000 Afrika)	u mužů 2-3 krát častější	TNF-α IL-1 PTGER4 (VB, Austrálie, Kanada), JARID1 A JMY (Čína)	Evropa (alelu HLA-B* 27 nese asi 7 % české populace) Asie Amerika	Matzara- ki et al., (2017), Cruz- Tapias et al., (2013), Perez- Guio et al., (2002), Cortes et al., (2015), Akkoc et al., (2017), Dean et al., (2013), Chai et al., (2013), Paladini et al., (2005)

Choroba	Zákl. asociace	Protektivní alely	HL rizik. lokus	Další rizik. alely	Prevalence	Riziko propuknutí	Non-HLA molekuly	Populace	Referen- ce
CD	HLA-C HLA-DRB1	HLA-DRB1* 15:01, 13:02, 03	HLA-DRB1* 01:03	HLA-C* 06:02 HLA-C* 01	130:100 000 inci- dence u dětí 2-3x vyšší	10 - 35 x vyšší u příbuzných 1. stupně	ATG16L 1 IL23R IRGM SLC11A 1	Evropa Korea (HLA-C* 01)	Matzara- ki et al., (2017) Goyette et al., (2015) Jung et al., (2016) Lebl et al., (2012), Mahdi et al., (2015), Prescott et al., (2007), Diegel- man et al., (2013), Cher- mesh et al., (2007)
Pso	HLA-Cw6 HLA-C* 06:02	HLA-DRB1* 13 (portugal- ská studie)	HLA-C* 06:02	HLA-C* 12:03 HLA-B (amk 9 a 67) HLA-A (amk 95) HLA- DQA1 (amk 53)	2-3 % populace (USA 7 %)	vyšší při gen. pre- dispozicích (postižen 1 rodič: riziko 8-30 %, postižení oba rodiče: riziko 41-75 %)	TNFAIP3 STAT4	Evropa USA	Matzara- ki et al., (2017), anamne- za.cz, Nair et al., (2009), Thorsby et al., (2005), Okada et al., (2014), Anaya et al., (2013), Betten- court et al., (2015)
UK	HLA- DQA1 HLA- DRB1	za protek- tivní se považuje kouření a apendekto- mie + HLA- DRB1* 04:01	HLA- DRB1* 01:03	HLA-C* 12:01 rs 6927022	0,5 - 24,5: 100 000 v ČR 3-5: 100 000	zvyšuje se u příbuznosti 1. stupně (až 15x)	MDR1	Evropa USA	Matzara- ki et al., (2017), Goyette et al., (2015), Jung et al., (2016), Gabalec (2009), Mahdi et al., (2015)
Nar	HLA- DQB1	HLA- DPA1* 01:03- DPB1* 04:02	HLA- DQB1* 06:02	HLA- DRB1* 15:01 HLA- DQA1* 01:02	1:2000 (údaj z roku 2008) 0,02-0,18 % popula- ce	vyšší v nízkém věku (asi 1/3 ochorí před 15. rokem)	nižší hladina hipokre- tinu	Evropa USA	Mignot (1997), Novák (2008), Carney (2009), Mindell (2015)
GD	HLA- DRB1* 03:01 -	HLA- DRB1* 07:01	HLA- DPB1 (amk 35)	HLA- DPB1 (amk 9)	vyšší u žen (v pubertě a klimakte-	nositelé B12, B18 a B44 mají	anti- TSHR protilátky	Kavkaz (DR3 a DQA1*	Park et al., (2005),

Choroba	Zákl. asociace	Protektivní alely	HL. rizik. lokus	Další rizik. alely	Prevalence	Riziko propuknutí	Non-HLA molekuly	Populace	Referen- ce
	DQA1* 05:01 - DQB1* 02:01 (DR3-DQ2 haplotyp) HLA-C	HLA- DQA1* 02:01 (juvenilní)	a 55) HLA- DPB1* 05:01	HLA-B8 HLA-B49 HLA-DR3 HLA-DR4 HLA- DR10	riu) ženy vs muži 8:1 0,5 - 1 % populace	tendenci k propuknutí ve vyšším věku (tu- recká studie) nositelé haplotypu DRB1* 13:01- DQB1* 06:03 ochoří častěji v nižším věku (korejská studie)		05:01), Korea (DRB1, DQB1), DRB1* 03:01	Orhan et al., (1993), Menconi et al., (2014), Matzara- ki et al., (2017), Zamrazil (2013), Lavard et al., (1997)
DM	HLA-DPB1		HLA- DPB1* 17 rs77504 58-A	HLA- DRB1* 03- DQA1* 05- DQB1* 02	5-11/100 000 v Česku kolem 1000 nemocných	vyšší u žen (2-3x častěji); stoupá s věkem (50.- 60. rok)	PTPN22 IFN 1	Eyropa Čína (populace Han)	Matzara- ki et al., (2017) Vencov- ský (2015)

Vysvětlivky zkratk:

- RA = Revmatoidní artritida
- CS = Celiakální sprue
- MS = Roztroušená skleróza
- SLE = Systémový lupus erythematoses
- T1D = Diabetes 1. typu
- SS = Sjögrenův syndrom
- AS = Ankylozující spondilitida
- CD = Crohnova choroba
- Pso = Psoriáza (lupénka)
- UK = Ulcerózní kolitida
- Nar = Narkolepsie
- GD = Gravesova choroba
- DM = Dermatomyositida