



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

# Diabetes mellitus versus celiakie, genetické testování uvedených onemocnění pomocí kitu Protrans

Vypracoval: Barbora Parýzková

Vedoucí práce: Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D.

České Budějovice 2016

## Abstrakt

Celiakie je autoimunitní onemocnění postihující zejména sliznici tenkého střeva. K rozvoji tohoto onemocnění dochází u geneticky predisponovaných jedinců, ale vznik onemocnění je kromě genetických faktorů podmíněn i faktory environmentálními. Genetická predispozice je připisována zejména HLA systému, a to konkrétně HLA-DQ2 a HLA-DQ8 haplotypům. Onemocnění celiakie je charakterizováno mnoha klinickými příznaky, a proto je jeho diagnostika obtížná a mnoho případů zůstává stále nediodagnostikováno.

Cílem bakalářské práce v teoretické části bylo sepsání poznatků na dané téma, kde se věnuji z velké části celiakii, a diabetu 1. typu pouze jako přidruženému onemocnění, které se může společně s celiakií vyskytovat. Zabývala jsem se zejména výskytem celiakie, její patogenezi, příznaky a formami, některými možnými diagnostickými přístupy a účinnou léčbou. V závěru teoretické části uvádím také další možná s celiakií asociovaná onemocnění.

Praktickou část mé práce jsem prováděla v genetické laboratoři GENLABS. Jednalo se o vyšetření genetických predispozic k celiakii, které je založené na HLA typizaci pomocí komerčně dodávaného kitu Protrans. Cílem práce této části bylo praktické zvládnutí diagnostické metody k určení rizikového HLA haplotypu. Dále zvládnutí metod izolace DNA z periferní krve a bukalního stěru, příprava a provedení PCR reakce a detekce vzniklých PCR produktů na agarózovém gelu pomocí gelové elektroforézy.

V současné době se již stanovení predispozic k celiakii v laboratoři Genlabs neprovádí pomocí kitu Protrans, ale nahradila ho metoda založená na principu real-time PCR, která je oproti dříve používané metodě méně pracná a méně časově i finančně náročná.

Klíčová slova: celiakie, HLA- systém, *diabetes mellitus* 1. typu

## **Abstract**

Celiac disease is an autoimmune disease affecting the mucous membrane of small intestine. The development of this disease is affected by genetic predispositions, but the onset of this disease is also influenced by environmental factors. Genetic predisposition is primarily attributed to HLA system, HLA-DQ2 and HLA-DQ8 in particular. Celiac disease is characterized by many symptoms therefore its diagnosis is difficult and stays undiagnosed in many cases.

The aim of the theoretical part of this bachelor's thesis was to summarize the knowledge of this topic regarding celiac disease and diabetes type 1. as an associated disease, possibly coexisting with celiac disease. The work, dealt with celiac disease occurrence, its pathogenesis, symptoms and types and possible diagnostic approaches and effective treatment. In the end of the theoretical part it also mentions possible associated diseases with celiac disease.

The practical part of my work took part in the genetic laboratory GENLABS, where the examination of genetic predispositions to celiac disease were conducted, based on HLA typing using commercially available Protrans kit. The aim of the practical part was to master the diagnostic method of determining the risk HLA haplotype. Further, mastering the DNA isolation method, using peripheral blood and buccal smear, preparation and execution of Polymerase Chain Reaction (PCR) and detection of created PCR products using gel electrophoresis on agarose gel.

The Protrans kit is not used for determination of the predispositions to celiac disease in GENLABS any more, it was replaced by real-time PCR method, which is less burdensome and faster and less financially demanding, than the previous one.

**Key words:** Celiac disease, HLA-complex, Diabetes type 1.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) 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 bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – 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 3. 5. 2016

.....

### **Poděkování**

Tímto bych chtěla velmi poděkovat vedoucí mé bakalářské práce, Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D., která mi předala spoustu užitečných rad a věnovala mnoho času při zpracování mé bakalářské práce. Zároveň mi umožnila uskutečnění experimentální části práce v genetické laboratoři GENLABS.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, která mě po celou dobu studia nesmírně podporovala.

# Obsah

1	Úvod .....	8
2	Teoretická část .....	9
2.1	Charakteristika celiakie .....	9
2.1.1	Historie .....	10
2.1.2	Prevalence .....	10
2.1.3	Etiologie .....	11
2.1.4	Patogeneze.....	13
2.2	Klinické projevy a formy celiakie .....	17
2.2.1	Projevy celiakie .....	17
2.2.2	Formy celiakie.....	18
2.3	Diagnostika a screening celiakie .....	22
2.3.1	Screening celiakie .....	22
2.3.2	Diagnostika celiakie .....	22
2.4	Genetika celiakie .....	29
2.4.1	HLA systém .....	29
2.4.2	Genetická predispozice k celiakii.....	32
2.5	<i>Diabetes mellitus</i> 1. typu a jeho asociace s celiakií .....	37
2.5.1	Etiopatogeneze .....	37
2.5.2	Léčba.....	38
2.5.3	Genetická predispozice .....	38
2.5.4	Asociace celiakie s diabetem 1. typu .....	39
2.6	Přidružená onemocnění celiakie .....	41
2.7	Léčba celiakie.....	42
2.7.1	Informovanost lékařů o celiakii a bezlepkové dietě.....	43
2.8	Komplikace celiakie .....	44
3	Praktická část .....	46
3.1	Cíle práce .....	46
3.2	Hypotézy .....	46
3.3	HLA typizace u onemocnění celiakií pomocí kitu PROTRANS: PROTRANS HLA Celiac Disease.....	46

3.3.1	Izolace DNA.....	47
3.3.2	Měření koncentrace DNA .....	50
3.3.3	Příprava PCR reakce (PROTRANS: PROTRANS HLA Celiac Disease).....	50
3.3.4	Příprava a provedení gelové elektroforézy.....	52
3.4	Určení predisponujících alel k celiakii pomocí kitu EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DRB4) .....	54
4	Výsledky.....	56
5	Diskuze .....	62
6	Závěr.....	64
7	Seznam informačních zdrojů .....	65
	Přílohy.....	70

# 1 Úvod

Téma mé bakalářské práce jsem si zvolila z toho důvodu, jelikož mě zajímá problematika onemocnění celiakie, o kterém se dříve tvrdilo, že se jedná vyloženě o onemocnění dětského věku, ale v současné době se stále častěji vyskytuje i v dospělé populaci.

S popisem genů, které se podílejí na rozvoji celiakie, došlo také k rozvoji genetických vyšetřovacích metod, které dokáží detekovat predisponující rizikové haplotypy a s vysokou pravděpodobností potvrdit nebo vyvrátit diagnózu celiakie. Genetické vyšetření je vhodné provádět hlavně v rodinách, kde se celiakie vyskytuje u více členů. Pokud nejsou predisponující haplotypy nalezeny, pak může být vznik celiakie s 99% pravděpodobností vyloučen.

V teoretické části jsem se zaměřila na popis onemocnění celiakie, jeho genetické predispozice a možnost provedení genetického vyšetření, zejména u osob v rizikových skupinách. Diabetem 1. typu se zabývám pouze jako přidruženým onemocněním celiakie, které má stejně jako celiakie autoimunitní charakter, ale i některé společné predisponující geny.

Cílem praktické části bylo praktické zvládnutí metody založené na HLA typizaci pomocí komerčního certifikovaného kitu PROTRANS: PROTRANS HLA Celiac Disease, který umožňuje detekci rizikových haplotypů pro vznik celiakie. Dále také zvládnutí izolace DNA z periferní krve a bukalního stěru, která předchází vlastnímu testování predispozic a dále provedení PCR reakce a následné provedení gelové elektroforézy, která slouží k vizualizaci vzniklých PCR produktů. Jedná se tedy o metodický přístup nazývaný end-point PCR.



## 2 Teoretická část

### 2.1 Charakteristika celiakie

Celiakie (nebo také endemická sprue, celiakální sprue, gluten senzitivní enteropatie, celiac disease) je imunitně zprostředkované onemocnění, které vzniká u geneticky predisponovaných jedinců. (15) Jedná se o celoživotní onemocnění s permanentní střevní intolerancí lepku neboli glutenu, který je poškozujícím faktorem přítomným hlavně v pšenici, žitu a ječmeni. Onemocnění je charakterizováno přítomností mnoha klinických příznaků. (1, 29) Imunitní reakce vyvolaná lepkem spustí zánětlivý stav na sliznici tenkého střeva, jehož výsledkem je snížení výšky střevních klků a hyperplazie krypt což vede ke kompletní atrofii klků. Poškození sliznice vyvolává malabsorpci různých živin, minerálů a vitamínů. Odstraněním lepku ze stravy dochází k remisi onemocnění, klinické příznaky mizí a atrofie klků ustupuje. (23)

Na rozvoji celiakie se podílí genetická predispozice spolu s dalšími faktory vnějšího prostředí (např.: virová infekce, dlouhodobý stres). Experimentálně byla prokázána asociace celiakie s MHC (Major histocompatibility complex) II. třídy a to s molekulami HLA-DQ2 a HLA-DQ8. (19, 39) Téměř všichni pacienti s celiakií exprimují alespoň jednu z těchto HLA molekul, jejichž dědičnost je autozomálně dominantní s neúplnou penetrací a proto mají vyšší riziko vzniku onemocnění příbuzní pacientů s celiakií. (3) Silný genetický vliv podílející se na výskytu nemoci je podpořen familiárním výskytem celiakie, který je popisován přibližně v 10 - 12% případů. Vyšší míra shody je pak nalézána u dvojčat, a to více u monozygotních (83 - 86 %) než u dizygotních (11 %). (28)

Celiakie se objevuje nejen v dětském věku, ale i během dospívání a v dospělosti. Předpokládá se, že ženy trpí celiakií častěji než muži, a to v poměru 2 : 1, zřejmě z toho důvodu, že u žen se vyskytují autoimunitní choroby častěji. (11, 14, 28)

### 2.1.1 Historie

Celiakie je onemocnění velmi staré. Nejstarší záznamy o něm můžeme vysledovat již ve starověku. Poprvé v historii popsal celiakii jeden z nejznámějších starověkých lékařů Galén, který toto onemocnění pojmenoval řecky *koiliakos*, což v překladu znamená trpící bolestmi střev. V roce 1888 popsal tuto chorobu Samuel Gee, který určil klinické příznaky nemoci a také možný způsob její léčby, což je výhradně dieta. Před 100 - 150 lety se nemocné děti léčily ovocnou nebo banánovou dietou. Až holandský lékař W. K. Dicke v roce 1952 zjistil, že celiakie souvisí s obsahem pšeničných bílkovin v potravě. Tento lékař za 2. světové války zaznamenal zlepšení stavu dětských pacientů, kterým podával stravu obsahující mouku z cibulek tulipánů, nahrazující mouku pšeničnou. Po obnovení příjmu pšeničné mouky došlo opět ke zhoršení jejich stavu. V roce 1953 profesorka Charlotta Anderson svým výzkumem potvrdila jako příčinu onemocnění intoleranci glutenu. (9, 19, 26)

Protože se jedná o autoimunitní onemocnění, byly sledovány také jeho imunologické mechanismy. Sérové protilátky proti gliadinu popsali poprvé v roce 1971 Seah a spoluautoři. Další výzkumy prokazující imunopatologie související s celiakií byly provedeny až na konci 20. století, kdy byly objeveny protilátky proti retikulinu (Chorzelski), protilátky proti endomysiu (Ladinsler) a bylo zjištěno, že primárním autoantigenem proti endomysiu je tkáňová transglutamináza (Dieterich). Všechny tyto poznatky významně přispěly k rozvoji znalostí o celiakii. (26)

### 2.1.2 Prevalence

U onemocnění celiakie se objevuje tzv. fenomén ledovce. Viditelnou část ledovce tvoří nápadné formy onemocnění s typickými příznaky, jako jsou chronický průjem, nevysvětlitelný deficit železa nebo další důvody v podobě rodinné zátěže. Ponořenou část ledovce tvoří nedagnostikované případy s méně nápadnými symptomy nebo bez

příznaků. Diagnostikována je tak pouze část nemocných, v České republice se jedná o 10 - 15 % z celkového počtu celiaků. (25)

Před uvedením teorie ledovce se uvažovalo o celiakii jako o vzácném onemocnění, které postihuje primárně kojence a batolata a je provázeno typickými příznaky. Screeningové studie ale ukazují vysokou prevalenci jak u dětí tak i u dospělých a také to, že celiakie je jedna z nejfrekventovanějších geneticky podmíněných chorob. (8, 40)

V literatuře jsou popisovány rozdíly v prevalenci mezi různými etniky. Celosvětová prevalence celiakie v populaci je udávána 1:100 - 250, ale její přesný výskyt je stále podceňován z důvodu obtížné diagnostiky tohoto onemocnění. V evropské populaci se uvádí prevalence 1:1000, ale v oblastech jako jsou Irsko a Švédsko je prevalence vyšší a to 4:1000. (21) V České republice je předpokládaná prevalence celiakie 1:200 – 250, to znamená 40 – 50 tisíc nemocných v celkové populaci. V současnosti je lékaři sledována jen asi desetina celkového množství pacientů. (19)

### **2.1.3 Etiologie**

Etiologie celiakie zatím není zcela objasněná, ale předpokladem pro vznik onemocnění je tzv. genetická vnímavost, ačkoliv všechny účastníci se geny dosud nebyly identifikovány. (16) Kromě genetických vlivů, se při rozvoji onemocnění významně uplatňují také environmentální faktory, jako jsou virové infekce nebo dlouhodobý stres.

Infekce mají největší podíl na rozvoj autoimunity, ale žádný infekční agens není přímo spojován s konkrétní autoimunitní chorobou, ta se může projevit až po dlouhé době od prodělaného infekčního onemocnění. (14) V současné době byl ale pozorován vztah mezi virovými infekcemi, jako je adenovirová infekce a virus hepatitidy C a rozvojem celiakie. Několik studií potvrzuje, že infekce adenovirem typu 12, který je obvykle izolován ze střevního traktu, funguje jako spouštěč pro rozvoj celiakie. Ve studii z Velké Británie a Spojených států byla testována séra pacientů s celiakií na přítomnost neutralizačních protilátek k adenoviru a na protilátky k syntetickým

peptidům  $\alpha$  - gliadinu. Předchozí infekce adenovirem byla prokázána u 89 % neléčených pacientů s celiakií a u 30 - 33 % léčených celiaků, v porovnání s kontrolní skupinou kde byla infekce prokázána pouze u 0 - 12,8 % jedinců. (32) Několik dalších studií také popisuje vztah mezi infekcí virem hepatitidy C a rozvojem celiakie. (32) Infekce virem hepatitidy C se považuje za nejčastější jaterní onemocnění spojované se vznikem celiakie. (32) Na rozdíl od viru hepatitidy C, jehož vliv na rozvoj celiakie je zdokumentován, u viru hepatitidy B žádný takový vztah prokázán nebyl. (32) S celiakií je také spojováno několik dalších gastrointestinálních patogenů, nejčastěji to jsou *Campylobacter jejuni*, *Giardia lamblia* a rotavirové a enterovirové infekce. (32)

Velmi důležitým environmentálním faktorem pro následný rozvoj celiakie může být kojení. Bylo zjištěno, že riziko vzniku onemocnění je sníženo u dětí, které byly kojeny ještě v době zavedení lepku do stravy. Prodloužení doby kojení je spojeno se snížením rizika vzniku celiakie. Zatím není zcela jasné, zda kojení pouze oddálí nástup příznaků onemocnění, nebo poskytuje trvalou ochranu proti vzniku onemocnění. (2)

Předčasné zavedení lepku do stravy významně přispívá k rozvoji celiakie v pozdějším věku. (21) Pokud je lepek přidán do stravy během prvních 3 měsíců života, je riziko vzniku celiakie pětinasobně vyšší než u dětí, které poprvé přijmuly lepek ve stravě mezi 4. a 6. měsícem věku. Zvýšené riziko vzniku celiakie je také u dětí, které začaly přijímat lepek až po 7. měsíci věku. (20)

Celiakie představuje mimo jiné závažný socio-ekonomický problém, ve smyslu finanční náročnosti bezlepkové diety a špatné dostupnosti bezlepkových potravin zejména mimo domov. Pacienti trpící celiakií jsou omezeni v aktivitách jako je cestování se stravováním v hotelech nebo stravování dětí ve školních jídelnách. Celiaci musí vynaložit při nákupu bezlepkových potravin více času a finančních prostředků. Finanční náročnost bezlepkového stravování vede u ekonomicky slabších nemocných k porušování bezlepkové diety a následnému rozvoji komplikací celiakie. (10, 29)

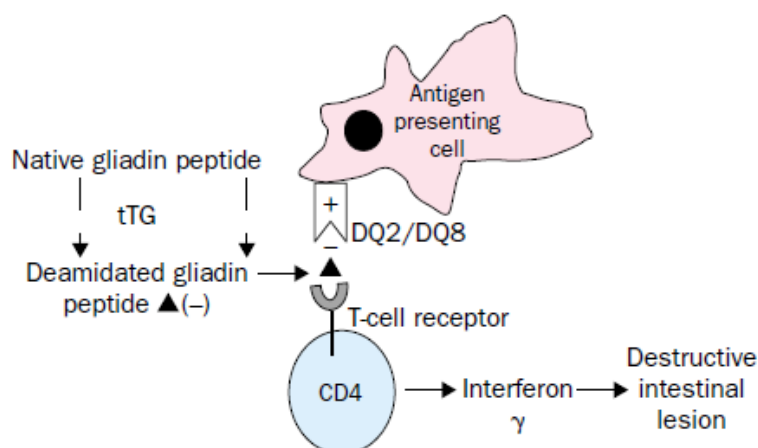
#### 2.1.4 Patogeneze

K rozvoji celiakie dochází u predisponovaných jedinců po požití lepku, který je obsažen v zrnech pšenice, žita, ječmene a ovsa. (39) Gliadinové fragmenty lepku vznikající účinkem digestivních proteáz, způsobují u geneticky predisponovaných osob zánětlivou reakci ve sliznici tenkého střeva s trvalou tvorbou autoprotilátek. (18)

Lepek je skvělým substrátem pro tkáňovou transglutaminázu, která je vlastním autoantigenem, proti které si organismus tvoří protilátky. Dochází ke komplexní zánětové reakci střevní sliznice spojené s typickými histopatologickými změnami charakterizovanými jako atrofie sliznice tenkého střeva. Přítomnost této atrofie představuje nejobektivnější doklad pro onemocnění celiakie. Princip onemocnění spočívá v tom, že gliadin vytváří s protilátkami imunitní komplexy přímo ve střevní sliznici, kde také dochází k agregaci cytotoxických T- lymfocytů, což má za následek poškození sliznice tenkého střeva především duodena a jejunu a následnou atrofii klků a navýšení intraepiteliálních lymfocytů. (18, 21, 36, 39) Výsledkem je imunologická T- lymfocytární reaktivita. (21)

Významnou roli u celiaků hraje genetická predispozice. Celiakie je asociována s HLA systémem (Human leukocyte antigen), především s HLA-DQ2 a u menší části nemocných s HLA-DQ8 haplotypem. (21) HLA geny jsou významnou částí genetického pozadí celiakie (40 %), z menší části se uplatňují také geny mimo HLA systém. (18)

Obrázek 1: Deamidací gliadinu vznikají negativně nabitě gliadinové peptidy, které jsou důležité pro vznik imunitní odpovědi a následnou vazbu gliadinových peptidů na HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8 vazebná místa, která nesou pozitivní náboj a mohou se tedy poutat s negativně nabitou kyselinou glutamovou, nacházející se v peptidu deaminovaného gliadinu.



Zdroj: Green, 2003 (převzat obrázek i jeho popis).

#### 2.1.4.1 Lepek

Lepek neboli gluten je tvořen směsí bílkovinných molekul, které jsou součástí obilných zrn. Gluten se skládá z proteinů nazývaných prolaminy, nebo také gliadiny, které jsou rozpustné v alkoholu a gluteniny, které jsou v alkoholu nerozpustné. (21) Prolaminy a gluteniny se navzájem liší svou toxicitou. (20) Gluteniny nemají v patogenezi celiakie větší úlohu. (21)

Prolaminy pšenice se nazývají gliadiny, žita secaliny, ječmene hordeiny, ovesa aveniny, kukuřice zeiny a rýže oryzeiny. (20, 21) Toxické jsou zejména gliadiny, hordeiny, secaliny a pravděpodobně i aveniny, ty obsahují aminokyselinové sekvence, které jsou bohaté na glutamin (30 %) a prolin (15 %). (35, 38) Vysoký obsah prolinu způsobuje, že se lepek stává vysoce odolný proti degradaci gastrointestinálními enzymy, takže je možné, aby velké imunogenní peptidy lepku dosáhly povrchu sliznice.

Aminokyselinové sekvence vyvolávají vznik autoprotilátek, které jsou zodpovědné za vznik autoimunitního onemocnění celiakie. Obsah aminokyselin v prolaminech kukuřice a rýže je nízký, a proto jsou pro pacienty s celiakií bezpečné. (35, 38)

Gliadiny pšenice můžeme na základě molekulové hmotnosti rozdělit do frakcí  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\omega$ . (21) Nejvíce toxická je frakce  $\alpha$ , protože peptidy z této frakce reagují s HLA-DQ2 a HLA-DQ8 antigeny CD4 pozitivních T- lymfocytů a způsobují imunitní odezvu. (36)

Specifické vlastnosti lepku jsou nezbytné pro tvorbu těsta z pšeničné mouky a dávají pečivu jedinečnou texturu a chuť. Lepek je díky svým vlastnostem široce používán v potravinářském průmyslu a to nejen v produktech, které jsou snadno spojovány s pšenicí, jako je chléb, sušenky nebo těstoviny, ale je také používán v omáčkách, instantních polévkách a dokonce i v lécích a vitaminových a minerálních doplňcích obsahujících lepek jako neaktivní složku. V důsledku všudypřítomnosti lepku v potravinách, je jeho denní příjem v západní Evropě a ve Spojených státech vysoký, pohybuje se mezi 15 a 20 gramy za den. (8, 38)

Pro pacienty s celiakií je důležitý obsah toxických peptidů v obilovinách (gliadinů). (20) Pšenice, žito a ječmen jsou převládající zrna, která toxické peptidy obsahují. (8) Pro celiaky jsou dále toxické obiloviny jako oves a mezidruhová kříženci žita a pšenice nebo ječmene a pšenice (Triticale a Tritordeum). (20) Ovšem názor na toxicitu ovsa se různí. Kanadská společnost pro celiakii udává jako bezpečnou dávku 70 gramů ovsa pro dospělého a 25 gramů ovsa pro dítě na den, je ovšem nutné aby při jeho zpracování nedošlo ke kontaminaci jinými obilnými výrobky. (20) Ve skandinávských zemích je oves povolen a americká společnost pro celiakii umožňuje, aby se pacienti sami rozhodli, zda oves zařadí do svého jídelníčku. V České republice se požívání ovsa pacientům s celiakií nedoporučuje. (20) Toxické jsou i další formy pšenice jako jsou krupice, bulgur, kuskus a jiné formy, které mají pšenici v názvu, jako např. pšeničné klíčky nebo pšeničné otruby. Toxický je také slad, protože se jedná o částečný hydrolyzát ječmenných prolaminů. Ve 100 g sladu je obsaženo 100 - 200 mg ječmenných prolaminů. (8)

Je vysoce pravděpodobné, že nově vyšlechtěné odrůdy obilovin jsou z hlediska celiakie více toxické, než obiloviny původní. Prolaminy z nově vyšlechtěných odrůd jsou rezistentnější k působení proteolytických enzymů než prolaminy z původních odrůd obilovin. Požitím některých obilovin (pšenice, ječmen, žito, oves) u geneticky predisponovaných jedinců, může dojít k projevům celiakie. (20)



## **2.2 Klinické projevy a formy celiakie**

### **2.2.1 Projevy celiakie**

U onemocnění celiakie se může objevovat mnoho klinických projevů, které můžeme rozdělit na klasické (intestinální) a atypické (extraintestinální). Celiakie se také různě projevuje u dětí a dospívajících a u dospělých. (39)

Typické gastrointestinální projevy celiakie se vyskytují pouze u 10 - 20 % případů, takže zůstává často nediodagnostikována. (36) Klinické projevy se mohou lišit v závislosti na věku pacienta, trvání a rozsahu celiakie. Faktory jako kojení, zavádění lepku do stravy a jeho množství a kvalita obilovin mohou také významně ovlivnit klinické projevy nemoci. (1, 8)

#### ***2.2.1.1 Příznaky u dětí***

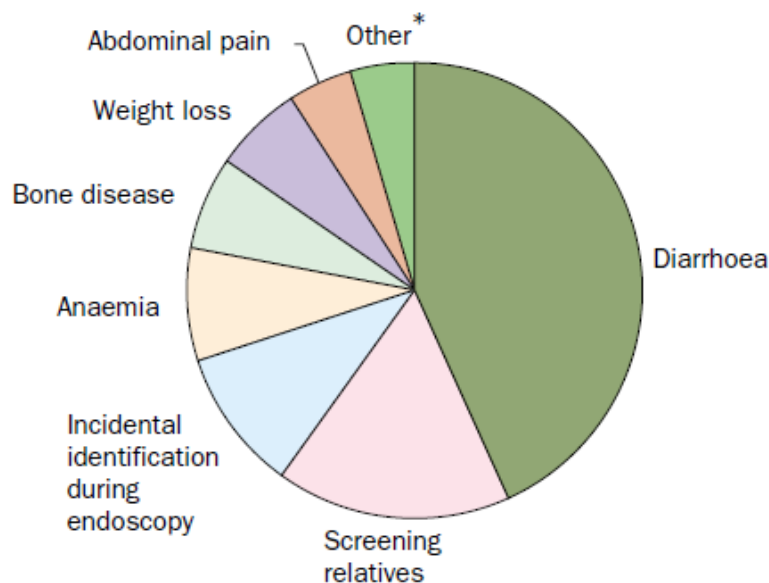
Projevy onemocnění jsou asociovány se zavedením lepku do stravy obvykle po 6. měsíci věku, závisí ale také na věku dítěte, ve kterém nemoc propukla. U malých dětí se nejčastěji objevuje celkové neprospívání, průjem, zvracení, ztráta svalové hmoty, nafouklé břicho, bolest břicha a příležitostně zácpa. U starších dětí se vykytuje anémie, křeče, malý vzrůst, defekty zubní skloviny, špatné výkony ve škole nebo poruchy chování. (1)

#### ***2.2.1.2 Příznaky u dospělých***

Nejčastějšími příznaky celiakie v dospělosti jsou bolesti břicha, chronický průjem, anémie z nedostatku železa a také podvýživa se ztrátou hmotnosti. Pacientům s celiakií může být také chybně diagnostikován syndrom dráždivého tračníku. Nejčastěji je

nemoc diagnostikována u asymptomatických pacientů s anémií z nedostatku železa, deficitem kyseliny listové, abnormálními jaterními testy nebo osteoporózou. Důsledkem celiakie u dospělých může být i malabsorpce vitamínu D a vápníku. (1)

Obrázek 2: Možné projevy celiakie. Kategorie ostatní (Other) zahrnuje dermatitis herpetiformis, neuropatii a zácpu.



Zdroj: Green, 2003 (převzat obrázek i jeho popis).

### 2.2.2 Formy celiakie

Na základě hematologických a imunologických nálezů v době diagnózy můžeme celiakii rozdělit do několika forem. Jedná se o formu klasickou, atypickou, asymptomatickou, latentní a potenciální. Tyto formy se od sebe navzájem liší klinickými příznaky a laboratorními nálezy. (8)

### **2.2.2.1 Klasická forma**

Klasická forma je charakterizována typickými příznaky, jako jsou chronický průjem, celkové neprospívání dítěte nebo úbytek svalové hmoty. Počátek těchto příznaků se obvykle vyskytuje mezi 6. a 8. měsícem věku dítěte po zavedení potravin, které obsahují prolaminy. Brzy dochází ke snížení hmotnosti dítěte. Děti jsou často bledé, nápadně hubené a mají snížené množství podkožního tuku. Stolice je charakteristicky bledá a objemná. U kojenců může dojít až k dehydrataci v důsledku častých vodnatých průjmů. (8)

U klasické formy jsou nacházeny typické laboratorní nálezy, jako je anémie z nedostatku železa, snížená hladina albuminu, vápníku a deficit některých vitamínů a minerálů. Typicky jsou také přítomné protilátky proti tkáňové transglutamináze a endomysiu. Objevují se také charakteristické histologické změny na sliznici tenkého střeva a to od mírné atrofie klků až po úplnou atrofii střevních klků. (8, 36)

### **2.2.2.2 Atypická forma**

Další formou celiakie je forma atypická. Bývá diagnostikována mezi 5 - 6 lety věku, a až 50 % nově diagnostikovaných pacientů nemá typické gastrointestinální příznaky. Nejčastějším atypickým symptomem je *dermatitis herpetiformis* Dühring, která se v současné době považuje za tzv. kožní formu celiakie. Jedná se o puchýřnaté kožní onemocnění s vyrážkou, které se nejčastěji vyskytuje na loktech, kolenou a hýždích, a které po zavedení bezlepkové diety pomalu vymizí. (8)

Dalšími příznaky atypické formy celiakie jsou anémie z nedostatku železa, která zpravidla nereaguje na její léčbu, malý vzrůst, který je často popisován u starších dětí a adolescentů. Předpokládá se, že 9 - 10 % osob s idiopaticky malým vzrůstem trpí právě celiakií. Více než 30 % neléčených pacientů s celiakií trpí defekty zubní skloviny. V malém množství se vyskytuje osteoporóza, protože v důsledku malabsorpce, zejména

vápníku, dochází ke snížení kostní hustoty a může docházet k častějším zlomeninám, dále chronická hepatitida nebo neurologické problémy. Ženy s celiakií (zejména neléčenou) mohou mít problémy s otěhotněním a může u nich docházet k opakovaným potratům. Riziko potratu u žen trpících celiakií je 8,9 x vyšší než u zdravých žen, ale se zavedením bezlepkové diety se toto riziko významně snižuje. (8)

### ***2.2.2.3 Asymptomatická (silentní, tichá) forma***

Tato forma je charakterizována nálezem histologických změn střeva a přítomností typických autoprotílátek, ale bez zjevných klinických příznaků. Nejčastěji se tato forma objeví náhodně prostřednictvím screeningových programů u zdánlivě zdravých osob. Běžně nalézáme u dospělých nedostatek železa spojený s anemií nebo i bez ní, poruchy chování, jako je sklon k depresím, podrážděnost nebo u dětí zhoršené prospívání ve škole, zhoršení fyzické kondice a snadná únava během cvičení nebo snížená hustota kostí. Po zavedení bezlepkové diety dojde u dospělých ke zlepšení fyzického i psychického stavu, a u dětí a adolescentů nejčastěji ke zvýšení hmotnosti a výšky, zvýšení chuti k jídlu, zlepšení nálady a fyzické a školní výkonnosti. (8, 36)

### ***2.2.2.4 Latentní forma***

U latentní formy nalézáme pouze typické autoprotílátky, ale histologický nález na sliznici tenkého střeva je normální. Pacient může, ale také nemusí, mít typické příznaky. Tato forma se nevykytuje příliš často. (36)

#### ***2.2.2.5 Potenciální forma***

Může být symptomatická i asymptomatická s negativním histologickým nálezem. Nalézáme specifické protilátky v krvi. Potenciální forma celiakie je spíše vzácná. (36)

## **2.3 Diagnostika a screening celiakie**

### **2.3.1 Screening celiakie**

Cílem celoplošného screeningu je odhalit všechny formy celiakie v populaci dětí i dospělých, a to prostřednictvím rychlých a neinvazivních vyšetření. (25) Provádí se pouze u osob v rizikových skupinách, jako jsou příbuzní pacientů s celiakií a pacienti trpící některou z přidružených chorob (např. *diabetes mellitus* 1. typu, autoimunitní tyreoiditida, snížená hladina imunoglobulinu IgA, primární biliární cirhóza). Další screeningovou skupinou jsou pacienti s typickými i netypickými příznaky celiakie, to znamená, pacienti s jinak nevysvětleným úbytkem váhy, s průjmy z neznámé příčiny, s nevysvětlitelnými bolestmi břicha, s jinak nevysvětlenou anémií, s osteoporózou nebo zlomeninami v časném věku nebo mužskou i ženskou neplodností. Tento screening u rizikových skupin je prováděn imunologicky pomocí stanovení autoprotilátek typických pro celiakii. (19)

Pouze negativní výsledek serologických testů nemůže celoživotně vyloučit možnost vzniku celiakie. (8) Pozitivita autoprotilátek může kopírovat intenzitu poškození tenkého střeva a stravovací návyky jedince. Při klasické formě onemocnění mají neléčení pacienti vyšší titry autoprotilátek, naopak u atypických forem může být onemocnění aktivní i při minimálních změnách sliznice tenkého střeva a titry autoprotilátek jsou nízké až negativní, proto zůstává velká část pacientů i po opakovaném screeningu nediodagnostikována. (25)

### **2.3.2 Diagnostika celiakie**

Diagnostika celiakie se stále spoléhá zejména na klinicko-patologické projevy onemocnění, zahrnuje biopsii sliznice tenkého střeva, sérologické testy a účinky bezlepkové stravy na symptomy. K velké změně v diagnostice došlo s detailnějším

popisem spektra slizniční patologie a dostupností genetických a vysoce spolehlivých sérologických markerů. Jednoznačná odpověď na bezlepkovou stravu spolu s úpravou klinického stavu pacienta by měla nastat během několika týdnů od zavedení diety, ale při těžším poškození střevní sliznice může trvat i déle. (7)

V současnosti diagnostika celiakie v České republice vychází ze směrnice Evropské společnosti pediatrické gastroenterologie, hepatologie a výživy (ESPGHAN – European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition), která zahrnuje tato diagnostická selekční kritéria (10):

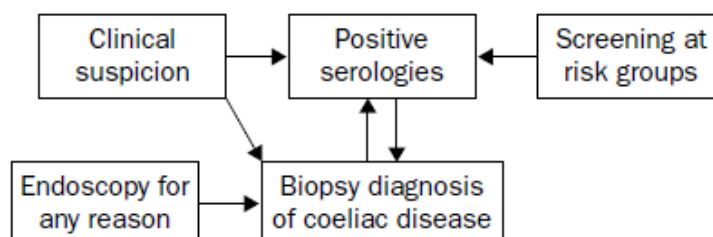
1. Anamnéza, klinický obraz, sérologické testy a histologie sliznice tenkého střeva jsou kompatibilní s diagnózou celiakie.
2. Zavedení bezlepkové stravy vede k úpravě klinických příznaků a snížení titru protilátek.
3. Vyšetřovaný jedinec je starší než 2 roky, protože zjištěné zánětlivé změny střevní sliznice mohou mít jinou příčinu než lepek (např. alergii na bílkovinu kravského mléka, virové nebo bakteriální střevní infekce nebo imunodeficitní stavy).
4. Diferenciální diagnostikou se vyloučilo jiné onemocnění s podobnými klinickými příznaky.

Základním vyšetřením při podezření na celiakii je v současné době stanovení autoprotiátek proti tkáňové transglutamináze, a to ve třídě IgA. Toto vyšetření je dostatečně citlivé i specifické. Dalším stupněm diagnostiky je provedení biopsie sliznice tenkého střeva, které stále zůstává v České republice zlatým standardem pro diagnostiku celiakie u osob konzumujících lepek. (10, 19) Vyšetření HLA genotypu je vhodné provádět zejména u pacientů s nejasnými příznaky a dále u příbuzných pacientů s celiakii prvního stupně, a to hlavně u dětí z rodin s častým výskytem celiakie. (4)

V mnoha případech není celiakie diagnostikována a může vést k trvale malému vzrůstu, mohou se objevit následky malabsorpce jako je nedostatek železa a následná anémie nebo křivice. Diagnostika a léčba celiakie nejen odstraňuje klinické příznaky a zlepšuje kvalitu života, ale také snižuje další dlouhodobá rizika, jako je lymfom a

rakovina zažívacího traktu, osteopatie, neplodnost nebo další autoimunitní onemocnění.  
(7)

Obrázek 3: Schéma diagnostiky celiakie.



Zdroj: Green, 2003 (převzat obrázek i jeho popis).

### 2.3.2.1 Sérologické vyšetření

Sérologické testy mají stále důležitou úlohu v péči o pacienty s celiakií, protože poskytují největší šanci na stanovení její diagnózy, a také umožňují lékařům sledovat již diagnostikované pacienty, zda dodržují bezlepkovou dietu. (1, 12)

U nemocných celiakií nacházíme v krvi protilátky třídy IgA a IgG tvořící se proti různým antigenním složkám lepku. Stanovení se provádí nejčastěji pomocí techniky ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent assay), kdy se stanovují: protilátky proti gliadinu (AGA), protilátky proti retikulinu (ARA), protilátky proti endomysiu (EMA) a protilátky proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG). (21)

U pacientů s celiakií se častěji vykytuje selektivní deficit IgA, přičemž jeho výskyt je u celiaků 10 až 15 x častější než u zdravé populace. Běžně dostupné sérologické metody jsou omezené právě na detekci protilátek ve třídě IgA, a proto pacienti s celiakií, kteří mají jejich deficit z jiného důvodu, mohou mít výsledky sérologických testů falešně negativní. Použitím současného stanovení protilátek proti endomysiu, gliadinu a tkáňové transglutamináze ve třídě IgG společně s použitím běžných sérologických testů mohou být spolehlivě detekovány všechny případy aktivní formy



celiakie. Těmito testy lze určit téměř všechny případy celiakie, pokud pacienti konzumují stravu s obsahem lepku, protože hladiny těchto protilátek s absencí lepku klesají. (22)

#### 2.3.2.1.1 Protilátky proti gliadinu

Gliadin je v alkoholu rozpustná frakce glutenu, která za určitých okolností vyvolává abnormální imunitní odpověď střevního slizničního imunitního systému. Protilátky proti gliadinu nalzáme pozitivní ve třídě IgA i IgG, ale při bezlepkové stravě jejich titer klesá až pod hladinu detekovatelnosti. (26)

Stanovení se provádí pomocí metody ELISA, a to pro obě třídy - IgA i IgG. Stanovení ve třídě IgA má vysokou senzitivitu, ale nízkou specifitu. Nevýhodou stanovení protilátek proti gliadinu je to, že mohou být pozitivní i u jiných onemocnění sliznice trávicího traktu, jako jsou např. Crohnova choroba nebo intolerance kravského mléka. (21, 26)

#### 2.3.2.1.2 Protilátky proti retikulinu

Jako retikulin jsou označovány složky mezibuněčné hmoty, proti nimž existují imunofluorescenčními technikami detekovatelné autoprottilátky. Vyskytují se v 5 typech (R1, R2, Rs, R3 a R4), které se liší svou reaktivitou při imunofluorescenčním vyšetření. Stanovení protilátek proti retikulinu má nízkou senzitivitu, a proto se jejich testování již tolik nevyužívá. (21, 26)

### 2.3.2.1.3 Protilátky proti endomysiu

Endomysium je protein pojivové tkáně nalézáný v kolagenní hmotě lidských a opičích tkání. Protilátky proti této pojivové tkáni se vyskytují právě u celiaků. Stanovení protilátek proti endomysiu je mimořádně specifické a provádí se imunofluorescenční metodou, kde se jako substrát používají řezy opičího jícnu nebo lidské pupečnickové cévy. Výsledek testu se udává jako kvalitativní (určí se pouze jeho pozitivita nebo negativita), nebo semikvantitativní, kdy výsledkem je nejvyšší titr séra, při kterém je ještě reakce pozitivní.

Specifičnost kvalitativního testu je velmi vysoká, téměř 100%. Stanovení protilátek proti endomysiu je finančně, technicky i časově náročné, a proto se používá spíše pro potvrzení pozitivních nálezů protilátek ke tkáňové transglutamináze. (1, 21, 26)

### 2.3.2.1.4 Protilátky proti tkáňové transglutamináze

Tkáňová transglutamináza je enzym nacházející se v *lamina propria* intestinální sliznice, ze které se při poškození epitelu uvolňuje a lepek pro ni představuje preferovaný substrát. Fyziologicky tkáňová transglutamináza modifikuje strukturu peptidů gliadinu a u predisponovaných jedinců je zodpovědná za zvýšenou afinitu těchto peptidů k molekulám HLA na antigen-prezentujících buňkách.

Stanovení je možné provést pomocí techniky ELISA a nález těchto protilátek je pro celiakii vysoce specifický. Senzitivita i specifita tohoto testu je velmi vysoká, ale zejména u pacientů s jinými autoimunitními chorobami vyšetření ztrácí specifitu a diagnózu je nutné potvrdit ještě provedením biopsie sliznice tenkého střeva. (1, 21, 26)

### 2.3.2.2 Histologické vyšetření

Zlatým standardem v diagnostice celiakie je provedení biopsie sliznice tenkého střeva. Vzorky sliznice jsou odebírány u dětí Coombsovou nebo Carreyovou kapslí, která je zavedena do oblasti 1. kličky jejunu odkud se odebere vzorek tkáně. U dospělých se vzorek odebírá při gastroskopii z oblasti duodena pod Vaterovou papilou. Díky snadnému získání bioptických vzorků se značně zvýšila rychlost diagnostiky celiakie. (1, 19)

U celiakie se vyskytuje široké spektrum histologických abnormalit, v rozmezí od normální střevní sliznice až po úplnou atrofii klků. Biopsie může potvrdit diagnózu celiakie nebo ji navrhnout u pacientů s atypickými příznaky, když sérologické vyšetření diagnózu nepotvrdilo. Patogenezi poškození sliznice tenkého střeva lze rozdělit do tří fází: (1) infiltrativní fáze charakterizovaná zvýšeným počtem intraepiteliálních lymfocytů; (2) hyperplastická fáze charakterizována hyperplazií krypt; a (3) destruktivní fáze, která je charakterizována atrofií klků vedoucí k úplnému zploštění střevní sliznice. (33)

Marsh poprvé popsal morfologické změny na sliznici tenkého střeva, a to na základě značného množství klinických výzkumů. (7) Marshova klasifikace se skládá ze čtyř po sobě následujících stavů poškození sliznice:

1. Typ 1: infiltrativní léze.
2. Typ 2: hyperplastické léze.
3. Typ 3: destruktivní léze.
4. Typ 4: atrofické léze.

U Typu 1 (infiltrativní léze) nalézáme nepoškozenou duodenální sliznici s normální architektonikou klků, ale je zde zvýšený počet intraepiteliálních lymfocytů. Tento typ poškození se objevuje u pacientů, kteří ještě nejsou zcela v remisi nebo pokud požili malé množství gliadinu. Důležité je, že se tento typ nachází u latentní formy celiakie, u rodinných příbuzných celiaků, nebo u osob s *dermatitis herpetiformis*.

Druhý typ poškození sliznice (hyperplastické léze) je charakterizován hyperplazií krypt s normální architektonikou klků, ale se zvýšeným počtem intraepiteliálních lymfocytů. Toto poškození sliznice se vyskytuje u pacientů s celiakií jen velmi zřídka.

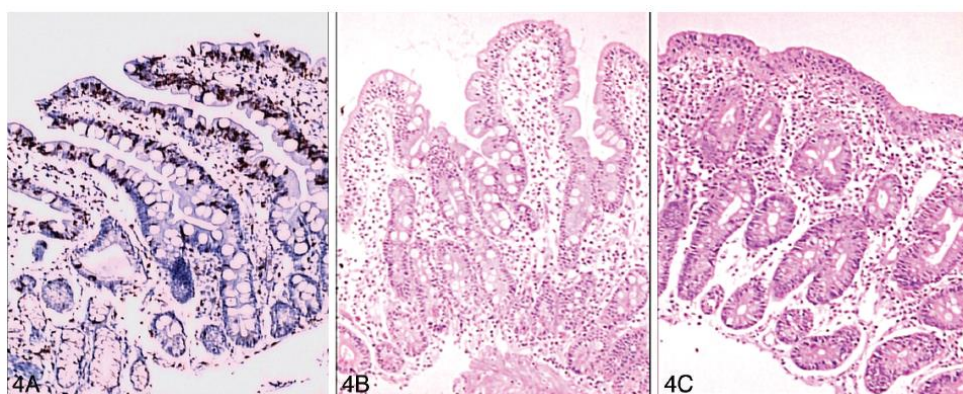
U třetího typu poškození sliznice (destruktivní léze) nalézáme atrofii klků s hyperplazií krypt a se zvýšeným počtem intraepiteliálních lymfocytů.

Čtvrtý typ (atrofické léze) je charakterizován normální výškou krypt a atrofií klků. Počet intraepiteliálních lymfocytů je normální. (7, 33)

Samotná atrofie klků se může vykytovat i u jiných chorob trávicího traktu, které vyžadují jiné diagnostické přístupy a způsoby léčby, ale endomysialní protilátky a protilátky proti tkáňové transglutamináze u nich nalézány nejsou. Choroby nebo stavy, které vykazují změny sliznice podobné celiakii, jsou např.: intolerance kravského mléka, nedávná chemoterapie, chronická ischemie, Crohnova choroba, autoimunitní enteropatie, kombinované imunodeficitní stavy, gastroenteritida, těžká malnutrice, nebo refrakterní sprue.

Ke zlepšení stavu dochází obvykle během několika týdnů od zahájení bezlepkové diety, ale návrat k normální architektonice střevní sliznice, vymizení jejího poškození a celkové histologické zlepšení může trvat až rok, ale i méně (dle závažnosti poškození sliznice). (1)

*Obrázek 4: A: normální sliznice se zvýšeným počtem IELs (intraepiteliální lymfocyty), B: zkrácená výška klků a difuzní zvýšení počtu IELs, C: plochá sliznice s difuzním zvýšením IELs.*



Zdroj: Ensari, 2010 (převzat obrázek i jeho popis)

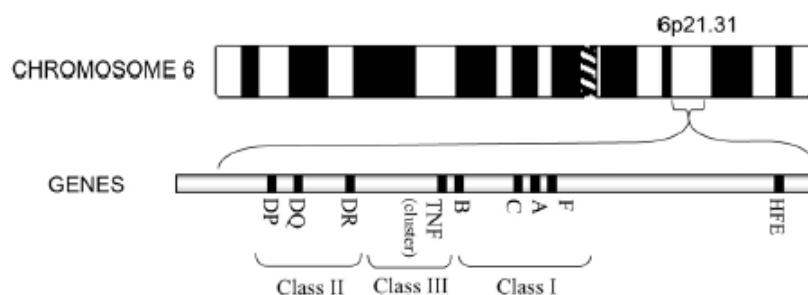
## 2.4 Genetika celiakie

### 2.4.1 HLA systém

HLA systém (Human leukocyte antigen) hraje významnou roli v patogenezi celiakie, což potvrzuje významné genetické spojení mezi celiakií a konkrétními HLA alelami. Přítomnost specifické HLA alely je nezbytná, ale ne jediná podmínka pro vznik onemocnění, protože kromě genetických faktorů se na vzniku onemocnění podílejí i vlivy vnějšího prostředí a další faktory.

Genový komplex MHC (Major histocompatibility complex), u člověka nazývaný jako HLA (Human leukocyte antigen) komplex, se nachází na krátkém raménku 6. chromozómu (6p21) a obsahuje stovky genů s imunologickou funkcí, jedná se tedy o vysoce polymorfní systém. (27, 36) Každý člověk je z hlediska HLA systému vysoce unikátní a nese na povrchu svých buněk zcela individuální sestavu HLA molekul určenou kombinací alel zděděných od matky a od otce, která ovlivňuje jeho individuální imunologickou reaktivitu.

Obrázek 6: Umístění HLA komplexu na 6. chromosomu



Zdroj: Louka, 2003 (převzat obrázek i jeho popis)

Geny kódující molekuly HLA můžeme rozdělit do tří tříd: I., II. a III. třídy, přičemž jednotlivé třídy jsou tvořeny více geny umístěnými v několika lokusech. HLA I. třída obsahuje zhruba 20 genů, HLA II. třída tři páry genů. Uvnitř lokusů pro geny HLA I. a II. třídy leží geny HLA III. třídy. Obecně rozlišujeme 6 hlavních HLA- genů

označovaných jako HLA- A, B a C pro HLA molekuly I. třídy a HLA- DR, DQ a DP pro molekuly HLA II. třídy. Geny HLA vykazují vzhledem ke svému umístění v genomu těsnou genetickou vazbu, takže mezi nimi nedochází k rekombinaci nebo pouze s minimální pravděpodobností. Jedinečná kombinace HLA genů kódujících HLA molekuly se nazývá haplotyp.

HLA- molekuly jsou glykoproteiny, které mají stejnou stavební strukturu, ale liší se sekvencí aminokyselin. HLA- molekuly se rozdělují stejně jako jejich kódující geny do dvou hlavních tříd, a to podle jejich struktury, buněčné exprese a funkce. Molekuly HLA I. třídy jsou kódovány geny HLA- A, B a C a molekuly II. třídy kódují geny HLA- DR, DQ a DP. Molekuly I. třídy se skládají ze dvou polypeptidových podjednotek, a to, variabilního těžkého řetězce  $\alpha$ , který je kódován MHC komplexem a  $\beta_2$ -mikroglobulinu, který je kódován genem mimo MHC oblast (na 15. chromozomu). Antigeny II. třídy jsou také heterodimery složené ze dvou těžkých řetězců  $\alpha$  a dvou řetězců  $\beta$ , oba jsou kódovány geny v MHC a stejně jako molekuly I. třídy tvoří integrální součást buněčné membrány. (31, 36)

Molekuly I. třídy (HLA- A, B, C) jsou integrální částí plazmatické membrány jaderných buněk. Tyto HLA- molekuly jsou tedy exprimovány na všech jaderných buňkách a prezentují cytotoxickým T- lymfocytům antigenní peptidy, které pocházejí z nitrobuněčné syntézy. Imunitní systém rozpoznává a reaguje pouze na peptidové fragmenty odvozené z proteinu. Proteiny jsou degradovány v cytoplazmě a transportovány do endoplazmatického retikula, v němž dochází k připojení antigenních fragmentů do žlábků HLA- molekuly. Vzniklý komplex se dostává přes Golgiho aparát, na povrch buňky, na kterém je rozpoznán cytotoxickými T- lymfocyty. (31, 36)

Molekuly II. třídy (HLA- DQ, DP, DR) jsou exprimovány na B- lymfocytech, makrofázích a aktivovaných T- lymfocytech a za určitých okolností mohou být exprimovány i na jiných typech buněk, které v aktivovaném stavu mohou prezentovat antigen. Ke komplementaci heterodimeru  $\alpha$ - $\beta$  molekuly HLA dochází v endoplazmatickém retikulu, ten pak přestupuje Golgiho aparátem do kyselého prostředí endozomo-lyzozomálního kompartmentu, ve kterém dochází k navázání antigenních peptidů vzniklých proteolytickou digescí exogenních peptidů. Vzniklý

komplex je transportován na povrch buňky a připraven k interakci s pomocnými T-lymfocyty. (31, 36)

Geny III. třídy, které nejsou pravými HLA geny, zahrnují geny pro polymorfní sérové a membránové receptory a jsou úzce spjaté s imunologickými funkcemi, např. proteiny komplementu C2 a C4. (31)

#### ***2.4.1.1 Dědičnost a polymorfismus HLA- systému***

HLA systém je vysoce polymorfní, což je dáno velkým počtem alel, které se mohou v jednotlivých genových lokusech vyskytovat. Ve všech genových lokusech bylo rozpoznáno velké množství odlišných genových variant, v současné době je známo více než 6 000 odlišných alel a neustále přibývají nové. Nejvíce polymorfní oblastí je oblast HLA- B, ve které je popsáno více než 100 různých alel. Velká část alel se vyskytuje vzácně, existuje mnoho různých kombinací, které jsou charakteristické pro jejich nositele. (31, 36)

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). (31, 36)

Variabilita v profilu a frekvenci HLA variant se vyskytuje i mezi různými populacemi, některé HLA varianty se vyskytují ve všech populacích (např. HLA- A2), jiné jsou naopak populačně specifické. Některé haplotypy jsou častější, než se předpokládá a jiné jsou velmi vzácné. HLA haplotypy vykazují značnou vazebnou nerovnováhu. Vyskytuje se etnicky odlišná distribuce jednotlivých HLA alel, ale i etnická distribuce haplotypů. (31)

#### **2.4.1.2 HLA nomenklatura**

Tradiční systém HLA nomenklatury rozlišuje jednotlivé HLA alely podle jejich reakce na panel protilátek (antisér, získaných od mnohorodiček, které mají vytvořené protilátky proti otcovským HLA-antigenům, produkované jejich plody). Jedná se tedy o testy stanovení HLA antigenů sérologickými metodami a HLA výbava je určena podle toho, s jakými protilátkami sérum reaguje. (31, 36)

HLA nomenklatura odpovídá označení daného lokusu a číslu antigenu, který může být pomocí daných antisér určen. Příkladem může být označení HLA alely DQA1\*05:05, kde DQA1 představuje název genového lokusu, za něj se přidává hvězdička, první dvojčíslí za hvězdičkou odpovídá sérologické specifitě a druhé dvojčíslí označuje specifickou alelu s konkrétní sekvencí nukleotidů. (31, 36)

#### **2.4.2 Genetická predispozice k celiakii**

Vysoká prevalence celiakie mezi příbuznými prvního stupně pacientů s celiakií ukazuje na významný genetický vliv přispívající ke vzniku onemocnění. Genetický vliv je také doložen vyšším výskytem celiakie u monozygotních dvojčat. (35)

HLA- systém je hlavním predisponujícím genetickým faktorem pro rozvoj celiakie, ve kterém představují hlavní genetickou predispozici geny HLA-DQA1 a HLA-DQB1 označované jako CELIAC1. Samotné HLA molekuly se podílí na dědičnosti choroby přibližně ze 40 %, z čehož vyplývá, že je onemocnění ovlivněno také dalšími geny. (17, 34, 41)

V rámci hledání všech možných genetických rizikových faktorů pro celiakii bylo studováno mnoho jiných kandidátních genových oblastí, ale oficiálně byly jako predisponující genetické faktory uznány pouze 3 další chromozomální oblasti, a to 5q31-q33 (CELIAC2), 2q33 (CELIAC3) a 19p13.1 (CELIAC4). V posledních několika letech bylo identifikováno celogenomovými studiemi mnoho non-HLA genů,



asociovaných se zvýšeným rizikem vzniku celiakie, jsou to např. geny kódující cytokiny, chemokiny a jejich receptory, buněčné adhezivní molekuly nebo T- a B-buněčné aktivátory. Podíl těchto non-HLA genů na rozvoji celiakie je ale velmi slabý, a to přibližně 15 %, takže se jejich vliv nebere v úvahu při stanovení genetických rizik pro celiakii. (28)

Přibližně u 90 % pacientů s celiakií je přítomen HLA-DQ2 heterodimer, označovaný jako DQ2.5, který je kódován alelami DQA1\*05 a DQB1\*02. Tyto alely mohou být přenášeny společně, tzn. - vyskytují se na stejném chromozomu v cis konfiguraci, nebo odděleně, kdy se vyskytují na homologních chromozomech v konfiguraci trans. Většinou jsou DQA1\*05 a DQB1\*02 přítomny v cis konfiguraci jako DRB1\*03:01-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01 haplotyp, nebo v trans konfiguraci jako DRB1\*11/12-DQA1\*05:05-DQB1\*03:01; DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*02:02 haplotyp. Na základě několika studií je přítomnost alely DQB1\*02 v homozygotním stavu spojována s vysokým rizikem celiakie a její agresivnější formou. (28) U jedinců homozygotních pro HLA-DQ2.5 je prokázáno 5 x vyšší riziko rozvoje celiakie než u jedinců, kteří jsou pro HLA-DQ2.5 heterozygotní. (38)

U 5 - 10 % pacientů, kteří jsou DQ2.5 negativní, je nacházen DQ8 heterodimer kódovaný alelou DQB1\*03:02, a to obvykle v kombinaci s DQA1\*03 v cis konfiguraci (DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02). Většina DQ2.5/DQ8 negativních celiaků (asi 5 %) jsou DQ2.x pozitivní, tento haplotyp je spojován pouze s nízkým rizikem vzniku celiakie. DQ2.x je kódován rizikovou alelou DQB1\*02 za nepřítomnosti DQA1\*05 varianty. (28)

Jen velice zřídka se u pacientů s celiakií vyskytují jiné DQ molekuly. Vyskytují se i rozdíly mezi pohlavími, ženy často nesou DQ2.5 a/nebo DQ8 haplotypy, které se u mužů s celiakií nevyskytují. (28)

Obrázek 7: S celiakií asociované rizikové DQ heterodimery kódované různými kombinacemi alel DQA1 a DQB1.



Zdroj: Megiorni, 2012 (převzat obrázek i jeho popis).

Asociace haplotypů HLA-DQ s celiakií byla primárně vysvětlena experimenty na CD4<sup>+</sup> T- lymfocytech izolovaných ze střevní biopsie pacientů schopných rozpoznat peptidy lepku prezentované DQ2.5/DQ8 pozitivními antigen prezentujícími buňkami. Heterodimery DQ2.5/DQ8 vykazují vysokou afinitu pro negativně nabitě aminokyseliny získané deaminací, jedná se o konverzi aminokyseliny glutaminu na kyselinu glutamovou, což je aktivně řízeno enzymem tkáňovou transglutaminázou. Ta má schopnost upravit peptidy lepku právě tak, aby odpovídaly požadavkům na vysokou afinitu k HLA-DQ2.5/DQ8. (28, 38)

HLA-DQ zprostředkovaná prezentace peptidů lepku CD4<sup>+</sup> T-lymfocytům je důležitým krokem pro stimulaci jak buněčné, tak humorální imunitní odpovědi. Sekrece cytokinů, hlavně TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor) a INF- $\gamma$  (Interferon gamma), indukuje intestinální fibroblasty k sekreci metaloproteináz degradujících matrix, jejichž působení vede k atrofii klků a hyperplazii krypt. Zvýšená sekrece interferonu gama také vede k vyšší expresi molekul HLA-DQ , a tím dochází ke zvýšené prezentaci peptidů lepku. (28, 38) Vyžívání B-lymfocytů vede k produkci autoantilát, které jsou namířené hlavně proti tkáňové transglutamináze. (28) Tímto způsobem dochází ke vzniku pro celiakií typického zánětu sliznice tenkého střeva. (27)

Obrázek 8: HLA-DQ varianty a s nimi spojené riziko vzniku celiakie.

<i>HLA status</i>	<i>Disease risk</i>
DQ2.5 and DQ8	Very high
DQ2.5 (with a double dose of DQB1*02)	Very high
DQ8	High
DQ2.5 (with a single dose of DQB1*02)	High
DQ2.x (with a double dose of DQB1*02)	High
DQ2.x (with a single dose of DQB1*02)	Low
DQX.5	Extremely low
DQX.x	Extremely low

x = DQA1 alleles different from \*05.  
X = DQB1 alleles different from \*02 and \*03:02.

Zdroj: Megiorni, 2012 (převzat obrázek i jeho popis).

Ne u všech jedinců, kteří nesou HLA-DQ2.5 a HLA-DQ8 predisponující alely dojde k rozvoji celiakie, což je důvodem k tomu, že HLA genotypy jsou nezbytné, nikoli však dostačující pro vznik celiakie. Genetické studie identifikovaly mnoho dalších genů, které malou měrou přispívají k rozvoji onemocnění. Většina těchto genů kóduje proteiny zapojené v imunitních reakcích, což podporuje představu, že je celiakie imunitně zprostředkované onemocnění. (38)

#### 2.4.2.1 Genetické vyšetření

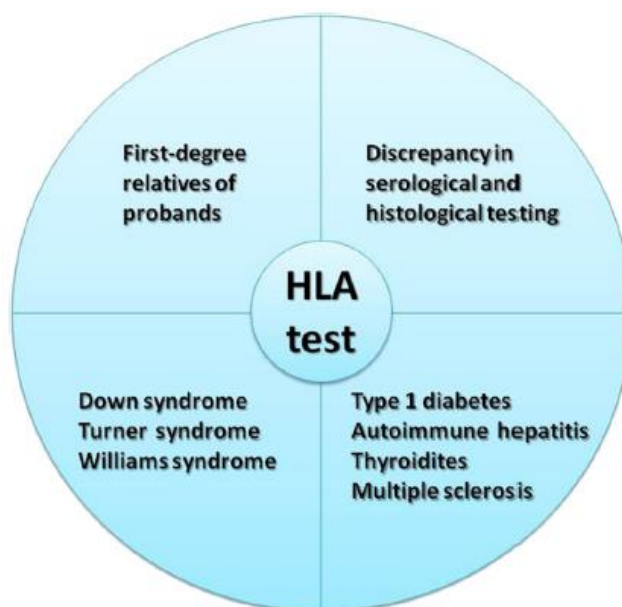
Výhodou genetického vyšetření je, že HLA genotyp je během života neměnný, takže vyšetření stačí provést jednou za život. Další pozitiva spočívají v minimální zátěži pro pacienta (odběr periferní krve nebo provedení bukalního stěru), kdy výsledek vyšetření není ovlivněn přítomností lepku ve stravě. Nepřítomnost predisponujících alel HLA-DQ2 a HLA-DQ8 vylučuje onemocnění s vysokou pravděpodobností. Genetické vyšetření má ale omezení ve své nízké selektivitě a samotné ho nelze použít pro definitivní potvrzení diagnózy celiakie.

Podle doporučení ESPGHAN z roku 2012 se u pacientů s přesvědčivými klinickými projevy, vysokou pozitivitou protilátek (titr tkáňové transglutaminázy ve třídě IgA více než 10 x nad normou) a pozitivitou pro HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8, může bezpečně stanovit diagnóza celiakie bez provedení bioptického vyšetření. Toto doporučení je ale v ČR v současné době ve stadiu ověřování platnosti. (4)

Haplotypy HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8 jsou nalézány asi u 30 % populace, přičemž pouze u 3 % se následně vyvine skutečná nesnášenlivost lepku. Pokud ale není u jedince detekován žádný z rizikových haplotypů HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8, může být diagnóza celiakie s vysokou pravděpodobností vyloučena. (28)

HLA typizace u onemocnění celiakie je sice test s negativní prediktivní hodnotou, ale přesto je důležitým nástrojem schopným objevit geneticky náchylné jedince a to zejména v rizikových skupinách (příbuzní pacienta s celiakií prvního stupně) a především rozlišit pacienty s jiným autoimunitním onemocněním (*diabetes mellitus* 1. typu, roztroušená skleróza, apod.). (4, 28)

Obrázek 5: Rizikové skupiny, u kterých je vhodné provedení genetického testu.



Zdroj: Megiorni, 2012 (převzat obrázek i jeho popis).

## 2.5 *Diabetes mellitus* 1. typu a jeho asociace s celiakií

*Diabetes mellitus* 1. typu (DM1T) je autoimunitní onemocnění, jehož typickým rysem je hyperglykémie, kterou způsobuje absolutní nebo relativní nedostatek inzulínu. Komplexní poruchu metabolismu cukrů, tuků a bílkovin způsobuje právě nedostatek inzulínu. Nemocní jsou pak závislí na jeho exogenním podáváníí. (36)

### 2.5.1 Etiopatogeneze

Na základě autoimunitní destrukce  $\beta$ -buněk pankreatu dochází k absolutnímu nedostatku inzulínu. K destrukci  $\beta$ -buněk dochází na základě vlivu faktorů zevního prostředí u geneticky predisponovaných jedinců. Mezi faktory zevního prostředí patří zejména enteroviry, takže spouštěčem onemocnění může být virová infekce (virus zarděnek, herpetický virus, cytomegalovirus, EBV nebo chřipkové viry). (36)

U diabetu 1. typu jsou nalézány autoprotilátky proti inzulínu, proinzulínu, dekarboxyláze kyseliny glutamové a tyrozinokináze, které se nepodílejí na destrukčním procesu, ale využívají se k diagnostice. Hladina autoprotilátek je vysoká na počátku onemocnění a v dalším průběhu nemoci se snižuje.  $\beta$ -buňky pankreatu jsou ničeny cytokiny, zejména IL1(interleukin) a TNF- $\alpha$ , které zahajují vlastní zánětlivý proces. Genetická predispozice k diabetu 1. typu ještě znásobuje sílu autoimunitní reakce. (36)

Destrukce  $\beta$ -buněk se klinicky projeví, až když zanikne jejich určité množství, což může trvat týdny, měsíce, ale i roky. K manifestaci diabetu 1. typu dochází obvykle již v dětství nebo v dospívání, kdy prvním příznakem může být akutní dekompenzace s hyperglykemií, glykosurií, dehydratací a ketoacidózou. Méně často se onemocnění manifestuje později v dospělosti, a to při pomalejším průběhu nebo zastavení autoimunitního procesu, kdy nemusí dojít k úplné destrukci inzulínovorné tkáně a tento typ se označuje jako LADA (Latent autoimmune diabetes of adults). (36, 30)

### 2.5.2 Léčba

Pacientům s diabetem 1. typu je nutné dlouhodobě podávat inzulín a upravit dietní režim. Pacientům je také doporučována vhodná fyzická aktivita, protože pohyb zvyšuje využití glukózy a její odsun z krve. Vyčerpávající fyzická zátěž je nevhodná, protože může dojít k těžké hypoglykémii. Důležité je také sledování nemocných v diabetologických poradnách, kde je kontrolován aktuální stav pacienta a také jeho dlouhodobá kompenzace pomocí stanovení glykovaného hemoglobinu, který určuje průměrnou glykémii za předchozí 2 - 3 měsíce. (36, 30)

### 2.5.3 Genetická predispozice

*Diabetes mellitus* 1. typu je fenotypově i genotypově heterogenní onemocnění, na jehož vzniku se podílí mnoho etiopatogenetických příčin. Onemocnění je multifaktoriální a genetické riziko je podmíněno přítomností více variantních genů. Predispozice jsou pravděpodobně způsobeny polymorfními variantami genů, a ne vzácnými mutacemi. (3)

Vliv genetických faktorů na vznik nemoci potvrzuje zvýšený výskyt diabetu 1. typu u jednovaječných dvojčat (40 - 50 %) a častější výskyt u příbuzných diabetiků prvního stupně. Vyskytují se i populační a demografické rozdíly ve výskytu tohoto onemocnění a vliv genetických faktorů potvrzuje také výskyt diabetu u řady vrozených chorob. (37)

*Diabetes mellitus* 1. typu je onemocnění s dobře definovanou vazbou na HLA-systém. Hlavní riziko je připisováno celé molekule HLA-DQ, s přispěním některých DRB1\*04 podtypů. Uplatňují se zde ale i geny mimo I. a II. třídu HLA- systému. (6) HLA- systém přispívá ke vzniku onemocnění přibližně ze 30 - 60 %, HLA- geny nesou největší část rizika pro vznik onemocnění, a jedná se zejména o molekuly II. třídy, geny HLA-DQ a HLA-DR (36)

Se zvýšeným rizikem rozvoje diabetu 1. typu jsou spojeny tyto genotypy: DQB1\*0201/0302 a DQB1\*0302/0302. Naopak protektivně působí genotypy DQB1\*0201/0301 a DQB1\*0201/0602. (6) Geny HLA I. třídy mají pouze malý vliv na rozvoj diabetu 1. typu. (36)

Znalosti genetických predispozic k diabetu 1. typu mají význam pro jeho predikci, ačkoli uvedené haplotypy jsou nalézány i u zdravé populace, takže jejich význam nelze v této souvislosti přeceňovat. (6, 37) Genetické vyšetření pro určení rizika diabetu 1. typu zatím nelze využít v praxi, protože nebyla prokázána žádná genová varianta, která by byla pro vznik diabetu 1. typu nezbytná. (3)

#### **2.5.4 Asociace celiakie s diabetem 1. typu**

U pacientů s diabetem 1. typu je zvýšené riziko vzniku celiakie. Přibližně u 8 % pacientů s diabetem 1. typu nalézáme pozitivní protilátky proti endomysiu ve třídě IgA. (1) Celiakie může přispívat k výskytu mnoha gastrointestinálních příznaků, které se běžně vyskytují i u diabetu 1. typu, jako jsou průjem, nafouklé břicho, ztráta váhy nebo steatorea. (1)

Pokud není u pacientů s diabetem 1. typu proveden screening na přítomnost celiakie, tak zůstává často nediodagnostikována. Pacienti mají často atypické příznaky, ale i u pacientů s typickými příznaky zůstává diagnóza celiakie přehlížena. Doporučuje se, aby byl screening celiakie součástí rutinního vyšetření pacientů s diabetem 1. typu, vzhledem k vysokému výskytu celiakie u těchto pacientů a pozitivní odezvě na bezlepkovou dietu. Lékaři by si měli být vědomi sdružení celiakie a diabetu 1. typu a měli by provést řádnou diagnostiku. (13)

Zejména u dětí s diabetem 1. typu by měl být prováděn screening na celiakii s následným potvrzením diagnózy provedením biopsie sliznice tenkého střeva a nasazením bezlepkové diety. Bezlepková strava zavedená u dětí s celiakií a diabetem 1. typu výrazně zlepšila stav diabetu a ubylo i závažných hypoglykemických epizod.

Sdružení celiakie a diabetu 1. typu bylo prokázáno nejen u dětí, ale také u dospělých pacientů. (13)



## 2.6 Přidružená onemocnění celiakie

Spolu s celiakií se vyskytují některá další asociovaná autoimunitní onemocnění, z toho důvodu, že toto onemocnění predisponuje ke vzniku imunopatologických onemocnění, která mohou postihovat různé orgány v těle. U některých z těchto stavů se přímo předpokládá souvislost s lepkem, jako např. autoimunitní thyreoiditida, další jsou na lepku nezávislé, jako např. selektivní deficit IgA. (1, 21) Předpokládá se, že prevalence autoimunitních onemocnění u pacientů s celiakií je úměrná době působení lepku. (8) Sdružení celiakie s dalšími autoimunitními chorobami u stejné osoby, nebo u různých členů v rámci jedné rodiny, naznačuje, že na vzniku autoimunity se podílí společné predisponující geny. (28)

Nejčastějším přidruženým autoimunitním onemocněním u celiakie je *dermatitis herpetiformis* Dühring, kterou trpí 60 - 90 % celiaků. Po zavedení bezlepkové diety dochází k vymizení kožních projevů. (21) Může také dojít ke vzniku autoimunitního onemocnění štítné žlázy, a to nejčastěji ke vzniku Hashimotovi thyreoiditidy nebo Graves-Basedowovi choroby. U celiakie se také může vyskytovat Addisonova choroba, což je autoimunitní onemocnění kůry nadledvin. (21)

## 2.7 Léčba celiakie

Jedinou možnou a účinnou léčbou celiakie je celoživotní dodržování bezlepkové diety. Pacienti s celiakií jsou o bezlepkové stravě informováni lékaři nebo dietology a důležitým zdrojem informací a podpory jsou také regionální sdružení pacientů s celiakií. (8)

Bezlepková dieta zakazuje požívat obiloviny, jako jsou pšenice, žito, ječmen a oves, a všechny výrobky, které tyto obiloviny přímo obsahují, obsahují jejich příměsí nebo jsou jimi kontaminovány. Základem bezlepkové stravy jsou obiloviny neobsahující lepek, jako jsou kukuřice, rýže, pohanka, proso, veškeré luštěniny (sója, hrách, čočka, fazole), ovoce a zelenina. Přirozeně bezlepkové je také maso, mléko a mléčné výrobky. Bezlepková strava tedy může být dostatečně vyvážená a pestrá. (19)

V České republice je podle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví jako bezlepkový považován výrobek, který obsahuje méně než 10 mg gliadinu ve 100 g sušiny výrobku nebo 100 g nápoje. Z důvodů stopových množství lepku v potravinách označených jako bezlepkové nelze u některých pacientů navodit klidový stav a normalizovat hodnoty sérologických markerů. Toto stopové množství lepku podporuje autoimunitní reakci a dochází k trvalému poškození sliznice tenkého střeva. Podstatou léčby celiakie je trvalá kontrola množství požívaného lepku ve stravě. (20)

Důležité je monitorování množství lepku ve vyráběných bezlepkových nebo přirozeně bezlepkových potravinách, ve kterých se výskyt lepku nepředpokládá. Aby nedocházelo ke kontaminaci lepkem, je nutné dodržovat postupy správně výrobní praxe, a to zejména ve mlýnech, kde může docházet k tzv. křížení provozů.

Problém při dodržování bezlepkové diety představují některé přídatné látky (aditiva), které mohou obsahovat malé množství lepku. Lepek mohou obsahovat aditiva jako je karamel (E 150 a-d), maltitol (E 965) a modifikované škroby (E 1400-1451).

Požívání alkoholu poškozuje pacienty s celiakií stejně jako zdravé jedince. Lepek ani jeho štěpné produkty neobsahují čisté destiláty nebo přírodní víno. Naopak lepek mohou obsahovat výrobky dobarvované karamellem, doslazované nebo jinak

dochucované. Pivo se podle legislativy označuje jako bezlepková potravina, ale množství, ve kterém se běžně požívá, překračuje povolený příjem lepku. (19)

### **2.7.1 Informovanost lékařů o celiakii a bezlepkové dietě**

Z výsledků studie Friče a Bušinové z roku 2008 vyplývá, že pouze 15 % respondentů považuje znalosti lékařů o celiakii jako výborné a 10 % jako dostatečné. Tři čtvrtiny respondentů nebyli spokojeni a hodnotí informovanost lékařů jako nedostatečnou (58 %) nebo katastrofální (17 %).

Podle uvedené studie je v České republice také nedostatečná diagnostika celiakie. U mnoha pacientů bylo dlouhé období mezi objevením příznaků a stanovením diagnózy. Mnoho z nich muselo navštívit více než jednoho praktického lékaře nebo gastroenterologa, než byla stanovena správná diagnóza. Z výsledků studie také vyplývá, že v České republice je stále nejčastější diagnostickou metodou biopsie sliznice tenkého střeva, která byla provedena u 37 % pacientů.

Bezlepková dieta je jediným způsobem léčby celiakie, a pro její úspěch je nutný týmový přístup pacienta, ošetřujícího lékaře, popř. rodiny a nutričního terapeuta. Důležitá může být také podpora přicházející ze sdružení celiaků. Celiakům často tato podpora částečně nebo úplně chybí. Během prvního roku se polovina respondentů psychicky nevyrovnala s bezlepkovou dietou a jedna pětina ji nedodržovala během dovolené. Bezlepková dieta je také finančním problémem, protože bezlepkové potraviny jsou finančně nákladnější a méně dostupné než potraviny s obsahem lepku. (10)

## 2.8 Komplikace celiakie

Pokud pacient s celiakií nedodrží bezlepkovou dietu, může dojít ke vzniku několika závažných dlouhodobých komplikací, jako jsou podvýživa, autoimunitní onemocnění jater, neuropatie nebo střevní malignity. (28) Mezi časté komplikace patří refrakterní sprue, ulcerativní jejunoleitida a malignity. (19)

Refrakterní sprue se vykytuje u malého množství dospělých pacientů. Jedná se o celiakii, která nereaguje na léčbu bezlepkovou dietou. Nejpravděpodobnější příčinou je požívání lepku, ať už vědomé či nevědomé. Za další příčiny lze považovat jiné potravinové intolerance jako např. enteropatie spojené s T- buněčným lymfomem nebo ulcerózní jejunitidu. Pacienti s refrakterní sprue podstupují farmakologickou terapii, kdy nejčastější je léčba steroidy nebo imunosupresivy. Pokud na tuto léčbu pacienti nereagují, je konečnou léčbou úplná parenterální výživa. Od refrakterní sprue je nutné odlišit ulcerativní jejunoleitidu a IgA maligní lymfom, do kterých může toto onemocnění přecházet. (8, 19)

Další komplikací celiakie je ulcerativní jejunoleitida, což je vzácné onemocnění tenkého střeva charakteristické hlubokými vředy na střevní sliznici, kdy mohou vzniknout stenózy se zúžením střevního průsvitu. Tento stav opět může přecházet v maligní IgA lymfom nebo spontánní perforací vyvolat akutní zánět pobřišnice. (19)

Nejzávažnější komplikací celiakie je s enteropatií asociovaný T- lymfocytární lymfom (EATL, Enteropathy associated T cell lymphoma). Zánětlivý proces ve střevní sliznici indukuje maligní transformaci intraepitelových T- lymfocytů, dochází k jejich proliferaci a ke genovým poruchám, což je základ pro nádorovou transformaci. (21)

Pacienti s diagnostikovanou celiakií mají vyšší riziko vzniku non-Hodgkinova lymfomu a lymfomu tenkého střeva než běžná populace, ale absolutní riziko je velmi malé. Nebylo prokázáno zvýšené riziko karcinomu gastrointestinálního traktu, ani více případů rakoviny prsu. Celkově je riziko malignit nižší než se předpokládalo dříve. (5)

Další z komplikací celiakie může být vznik osteoporózy. Snížení hustoty kostí totiž vede ke zvýšenému riziku zlomenin, zejména dlouhých kostí nebo obratlů. Při zavedení bezlepkové diety se hustota kostí zvyšuje, ale už nemusí dosáhnout normálu.

Screeningem pacientů s idiopatickou osteoporózou mohou být identifikováni také pacienti s celiakií. (12, 19)

## **3 Praktická část**

### **3.1 Cíle práce**

Cílem praktické části bakalářské práce bylo zvládnutí diagnostické metody založené na HLA typizaci pomocí komerčního kitu Protrans (PROTRANS: PROTRANS HLA Celiac Disease). Dále také zvládnutí metod izolace DNA z bukalního stěru a periferní krve, příprava PCR reakce, gelová elektroforéza a vyhodnocení získaných dat.

### **3.2 Hypotézy**

Autoimunitní onemocnění celiakie se vyskytuje častěji u žen než u mužů. Rizikový haplotyp HLA-DQ2 se u celiaků vyskytuje častěji než rizikový haplotyp HLA-DQ8.

### **3.3 HLA typizace u onemocnění celiakií pomocí kitu PROTRANS: PROTRANS HLA Celiac Disease**

Vyšetření se provádí ze vzorku DNA získané izolací, která předchází každému molekulárně biologickému vyšetření, a to buď z nesražené periferní krve, nebo z bukalního stěru. Periferní krev je standardně odebírána ze žíly v loketní jamce do sterilní zkumavky s protisrážlivým činidlem EDTA. Po odběru se zkumavka důkladně promíchá, aby se zabránilo vzniku sraženiny. Doporučené množství vzorku periferní krve je 0,2 - 2 ml. Periferní krev by měla být doručena do laboratoře v den odběru, ale může být uchovávána při chladničkové teplotě maximálně 1 týden.

Bukální stěr se provádí speciální sterilní vatovou tyčinkou, která je uložena ve sterilní zkumavce. Po vypláchnutí úst vodou se provede stěr bukální sliznice pomocí jedné nebo více vatových tyčinek ze zadní strany ústní dutiny. Vatová tyčinka se poté vloží do sterilní zkumavky a ta se důkladně uzavře. Množství vzorku pro analýzu jsou 1 - 2 vatové tyčinky. Bukální stěr by se měl do laboratoře doručit do 48 hodin od odběru.

### **Princip metody**

Jedná se o alelově specifickou PCR s následnou detekcí vzniklých PCR produktů na agarózovém gelu. Pro detekci byl používán certifikovaný kit firmy PROTRANS: PROTRANS HLA Celiac Disease. Jde o HLA typizaci lokusů HLA-DQB1\*, HLA-DQA1\* a HLA-DRB1\*. V rámci testu je provedeno celkem 24 PCR reakcí zahrnujících také 1 PCR reakci, ke které se nepřidá DNA vzorku a představuje tak negativní kontrolu (kontrolu možné kontaminace). Součástí kitu je také vnitřní pozitivní kontrola správné amplifikace zajištěná přítomností primerů pro další lidský gen v každé z 24 PCR reakcí. Tyto primery pak zajišťují amplifikaci kontrolního PCR produktu o velikosti 440 bp. Příslušné HLA alely detekované v rámci jednotlivých PCR reakcí jsou uvedeny v tabulce v příloze č. 1 spolu s délkami amplifikovaných fragmentů. Po odečtení pozitivních PCR reakcí se genetický test hodnotí pomocí softwaru PROTRANS SSP Reporter, který je součástí tohoto kitu.

### **3.3.1 Izolace DNA**

#### ***3.3.1.1 Izolace genomové DNA z plné krve pomocí Genomic DNA Mini Kitu***

**Reagencie:** 96% ethanol, GT Buffer, W1 Buffer, Wash Buffer, Elution Buffer, RBC Lysis Buffer

## **Pracovní postup**

Nejprve bylo napipetováno 300  $\mu$ l plné krve do označené mikrozkušavky o objemu 1,5 ml. Dále bylo přidáno 900  $\mu$ l RBC Lysis Buffer, mikrozkušavka byla promíchána převrácením v ruce a byla inkubována 10 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byla zkušavka centrifugována při 3 tis. x g po dobu 5 minut. Následně byl odstraněn supernatant, peleta složená z lymfocytů byla ponechána. K ní bylo přidáno 100  $\mu$ l RBC Lysis Bufferu ve kterém se peleta resuspendovala. Poté bylo přidáno 200  $\mu$ l GB Bufferu, zkušavka byla zvortexována, krátce stočena a inkubována 10 - 15 minut v termostatu při 60°C (lyzát byl projasněný). V průběhu inkubace byla zkušavka pravidelně převrácena každé 3 minuty. K lyzátu bylo přidáno 200  $\mu$ l ethanolu, zkušavka byla vortexována 10 sekund a poté byla krátce stočena. Obsah mikrozkušavky byl přepipetován na kolonku (GD Column), která byla vložena do čisté sběrné zkušavky (2 ml Collection Tube). Kolonka se sběrnou zkušavkou byla centrifugována při 14 - 16 tis. x g po dobu 5 minut. Kolonka s navázanou DNA byla přendána do nové sběrné zkušavky a použitá sběrná zkušavka se vyhodila. Poté bylo na kolonku napipetováno 400  $\mu$ l W1 Buffer a kolonka se sběrnou zkušavkou byla centrifugována při 14 - 16 tis. x g/ 30 sekund. Po centrifugaci byla vylita tekutina ze sběrné zkušavky a kolonka do ní byla vrácena. Na kolonku bylo napipetováno 600  $\mu$ l Wash Buffer a kolonka se sběrnou zkušavkou byla centrifugována při 14 - 16 tis. x g/ 30 sekund, ze sběrné zkušavky byla vylita tekutina a kolonka byla do ní vrácena. Po centrifugaci bylo zkontrolováno, zda je kolonka suchá, a pokud suchá nebyla, byla centrifugace při 14 - 16 tis. x g/ 3 min. opakována, dokud kolonka nebyla zcela suchá. Suchá kolonka byla přesunuta do čisté 1,5 ml mikrozkušavky, která byla řádně označena štítkem, který obsahoval jméno a příjmení klienta, rodné číslo, LIČ vzorku, datum izolace a iniciály toho, kdo izolaci provedl. Na filtr kolonky bylo napipetováno 50  $\mu$ l Elution Buffer, který byl vytemperovaný na 60°C, a inkubace probíhala nejméně 3 minuty při pokojové teplotě. Nakonec byla kolonka s 1,5 ml mikrozkušavkou zcentrifugována při 14 - 16 tis. x g po dobu 30 sekund. DNA byla pro pozdější použití uložena do lednice nebo do mrazicího boxu (-20°C), ve kterém je možné DNA archivovat po neomezenou dobu.



### **3.3.1.2 Izolace genomové DNA z bukálního stěru pomocí DNA Isohelix DNA** **Isolation kitu: DDK-3/DDK-50**

**Reagencie:** Lysis buffer LS, Proteinase K, Capture buffer CT, Re-hydration buffer TE

#### **Pracovní postup**

Pro jeden vzorek byly připraveny 3 mikrozkušavky o objemu 1,5 ml. Suchá lázeň byla nastavena na teplotu 60°C a proteináza K byla vyjmuta z mrazáku, aby mohla rozmrznout při pokojové teplotě.

Do zkumavky s tamponem s bukálním stěrem bylo napipetováno 500 µl LS a přidáno 20 µl PK. Zkumavka byla krátce zvortexována a zcentrifugována. Po centrifugaci byla zkumavka inkubována 1 hodinu při 60°C. Poté byla zkumavka opět krátce zvortexována a zcentrifugována. Přibližně 400 - 500 µl vzorku bylo přepipetováno do čisté 1,5 ml mikrozkušavky a tampon byl v původní zkumavce otočen tak, aby se tyčinka tamponu opírala o dno zkumavky (nedošlo pak ke ztrátě materiálu). Zkumavka byla krátce zcentrifugována a vzniklý supernatant byl přepipetován k odebraným 400 µl vzorku. Následně bylo do zkumavky přidáno 500 µl CT a krátce zvortexováno, poté byla zkumavka zcentrifugována při 13 tis. x g po dobu 7 minut. Po centrifugaci byl opatrně odstraněn supernatant tak, aby nedošlo k porušení pelety DNA, vzorek byl opět krátce zcentrifugován a zbylý supernatant byl odstraněn. K peletě DNA bylo napipetováno 150 µl TE a následovala inkubace 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byla zkumavka krátce zvortexována a centrifugována při 13 tis. x g po dobu 2 minut. Vzniklý supernatant obsahující izolovanou DNA byl poté odebrán do nové 1,5 ml zkumavky. DNA byla uložena do lednice nebo do mrazicího boxu (-20°C) pro pozdější využití.

### 3.3.2 Měření koncentrace DNA

Po provedení izolace DNA z bukalního stěru nebo periferní krve bylo provedeno měření její koncentrace. Měření bylo prováděno pomocí fluorometru Qubit® 2.0 Fluorometer. Tento přístroj měří pouze koncentraci DNA, čistotu nukleových kyselin měřit nedokáže.

Koncentrace DNA se vyjadřuje v ng/μl a ideální hodnota pro PCR reakci by měla být v rozmezí 50 - 100 ng/μl. Čistota DNA se stanovuje podle poměru absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm. Nejvhodnější výsledek se pohybuje v rozmezí od 1,8 do 2,0. Pokud je výsledek nižší než 2, může se jednat o znečištění vzorku bílkovinami. Když je naopak výsledek vyšší než 2, tak je nejspíše ve vzorku přítomná RNA. Odlišné hodnoty mohou být způsobeny buď jiným znečištěním vzorku, nebo špatným postupem měření.

### 3.3.3 Příprava PCR reakce (PROTRANS: PROTRANS HLA Celiac Disease)

#### Princip metody

Metoda je založená na alelově specifické PCR s následnou detekcí vzniklých PCR produktů na agarózovém gelu. Pro detekci je používán certifikovaný kit firmy PROTRANS: PROTRANS HLA Celiac Disease. Součástí každé reakce je také vnitřní pozitivní kontrola, sloužící jako kontrola průběhu správné amplifikace, kdy výsledný produkt PCR reakce má velikost 440 bp. Vyhodnocení výsledku testu se provádí pomocí softwaru PROTRANS SSP Reporter.

**Reagencie:** Protrans Celiac Domino Strip, Buffer R, Buffer Y, Dream Taq Polymeráza o koncentraci 5U/μl

## Pracovní postup

Reagencie Buffer R, Buffer Y a izolovaná DNA byly vyjmuty z mrazicího boxu, aby mohly rozmrznout při pokojové teplotě. Ostatní součásti kitu Protrans Celiac Disease Domino Strip se skladují v lednici. Stripy obsahující primery byly vloženy do připraveného stojánku. Orientace stripů byla naznačena černou linkou. Primer Mixy (specifické jednořetězcové oligonukleotidy) byly přítomny na dně zkumavek v lyofylizované formě, přičemž formát stripu byl 3x8 reakcí (celkem 24 reakcí).

Příprava všech směsí pro PCR byla prováděna v laminárním boxu a v jednorázových rukavicích, aby bylo zamezeno kontaminaci jak vzorků, tak použitých reagentů. Společný Pre Master Mix byl připravován pro všechny vzorky v 1,5 ml zkumavce. Do ní bylo napipetováno 70  $\mu$ l Bufferu R, 140  $\mu$ l Bufferu Y a 1,6  $\mu$ l Taq Polymerázy o koncentraci 5U/ $\mu$ l.

Jako negativní kontrola bylo do pozice 24 na Domino Stripu napipetováno 10  $\mu$ l Pre Master Mixu bez přidané DNA. Ke zbylému Pre Master Mixu bylo přidáno 50  $\mu$ l DNA vzorku o koncentraci DNA 50 - 100 ng/ $\mu$ l. Směs byla dobře zvertexována a krátce stočena. Následně bylo napipetováno do zbývajících 23 pozic vždy 10  $\mu$ l Master Mixu s DNA. Stripy byly uzavřeny víčky a zcentrifugovány, aby se Master Mix dostal na dno zkumavek. Strip byl vložen do termocycleru (Multigene Labnet Internacional) a byl spuštěn příslušný amplifikační program. Pokud nebylo možné uzavřený strip zpracovat okamžitě, bylo možné ho před amplifikací skladovat maximálně 2 hodiny při 2 - 8°C.

Tabulka 1: Teplotní profil reakce

Denaturace		2 min.	94°C
Denaturace	10 cyklů	15 s	94°C
Anealing a extenze		60 s	65°C
Denaturace	20 cyklů	15 s	94°C
Anealing		50 s	61°C
Extenze		30 s	72°C
Hold (chlazení)		15 min.	4°C
Ramp rate (rychlost zahřívání) 1°C/s			

Po dokončení PCR, která probíhala zhruba po dobu dvou hodin, byla provedena kontrola PCR produktů na 2% agarózovém gelu. Odečet pozitivních PCR reakcí a následné vyhodnocení testu bylo provedeno pomocí softwaru PROTRANS SSP Reporter.

### 3.3.4 Příprava a provedení gelové elektroforézy

**Reagencie:** Crystal 10xTBE Buffer – prášek, 10xTBE – roztok připravený z Crystal 10xTBE Buffer, podle doporučení výrobce, pracovní roztok 1x TBE, agarózové tablety\* - 1 tableta = 0,5 g agarózy, Midori Green Advanced DNA Stain, 100 bp DNA LADDER H3RTU\*, DNA Loading Buffer Blue (Reagencie označené hvězdičkou jsou součástí kitu FastGene®Electrophoresis Reagent Kit, který dodává Elisabeth Pharmacon)

#### Pracovní postup

Nejprve byl připraven roztok 1x TBE pufru. Pracovní roztok 1x TBE byl připraven smícháním 50 ml 10xTBE pufru a 450 ml destilované vody.

Pro přípravu 2% gelu byly do 100 ml kádinky vloženy 2 agarózové tablety obsahující 0,5 g agarózy a 50 ml pufru 1x TBE. Tablety se zcela rozpustily. Poté byla kádinka vložena do mikrovlnné trouby a byla zahřívána (max. ohřev/3 min.) minimálně dvakrát. Během ohřívání bylo kontrolováno, aby tvořící se gel nevytekl a agarózový prášek byl zcela rozpuštěný. K horkému gelu bylo přimícháno 6 - 15 µl barvičky Midori Green Advanced DNA Stain.

Předem byla připravena elektroforetická podložka pro nalévání gelu spolu s hřebeny. Po nalití gelu na elektroforetickou podložku byl gel ponechán ve tmě po dobu 10 - 15 minut. Ze ztuhlého gelu byly vyndány hřebeny a gel byl vložen do elektroforetické vany s 1x TBE pufrem jehož hladina byla minimálně 3 mm nad gelem (gel byl celý ponořený).

Do poslední jamky v každé řadě bylo napipetováno 5 µl hmotnostního markeru (100 bp DNA LADDER H3RTU) pro možnost kontroly velikosti PCR produktů.

Elektroforéza byla spuštěna při napětí 100 V – 135 V na 10 – 15 minut. Pomocí speciálního iluminátoru (Mupid<sup>TM</sup> LED Illuminator) bylo možné sledovat průběh elektroforézy, a to díky použití barvičky Midori Green Advanced DNA Stain. Po uplynutí zvoleného času byla elektroforéza automaticky vypnuta. Analýza a focení gelu bylo umožněno pomocí detekčního systému FastGene® CelPic LED Box. Na výsledném gelu byly nebo nebyly detekovány PCR produkty odpovídajících délek uvedených v tabulce, která je součástí přílohy č. 1, a to na základě přítomnosti či nepřítomnosti rizikových haplotypů. V rámci každé PCR reakce mimo negativní kontrolu byl detekován kontrolní fragment o velikosti 440 bp. Jednotlivé délky fragmentů byly odečteny a vyhodnoceny pomocí softwaru PROTRANS SSP Reporter.

### **3.4 Určení predisponujících alel k celiakii pomocí kitu EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DRB4)**

#### **Princip metody**

Metoda je založená na principu real-time PCR. Pro detekci haplotypů DQ2, DQ8, DRB, kdy jsou použity specifické primery a fluorescenčně značené sondy (FAM a JOE). Souprava EliGene Coeliac RT detekuje alely DQA1\*05, DQB1\*02 (HLA-DQ2), DQB1\*0302 a DRB1\*04. Jako vnitřní kontrola kvality DNA a její amplifikace je použit gen SYPL 2 (synaptophysin-like 2). Primery použité pro amplifikaci tohoto genu jsou součástí každé amplifikační reakce. Real-time PCR probíhala v přístroji LightCycler 2.0 (Roche) ve skleněných kapilárách.

**Reagencie:** CELI DQ2 Mix, CELI DRB Mix, CELI DQ8 Mix, PC CELI, Eli Blocker

#### **Pracovní postup**

Z mrazicího boxu byly vyjmuty jednotlivé zkumavky s CELI DQ2 Mixem, CELI DQ8 Mixem a CELI DRB Mixem, zkumavka s pozitivní kontrolou a Eli Blocker, aby mohly rozmraznout při pokojové teplotě. Po rozmrznutí byly zkumavky s jednotlivými mixy promíchány a krátce stočeny, ke každému mixu byly napipetovány 3  $\mu$ l Eli Blockeru (reakce probíhala ve skleněných kapilárách, Eli Blocker zabraňuje reaktivitě reagensů se skleněným povrchem kapilár), zkumavky byly opět krátce promíchány a stočeny.

Pro každý vzorek byly připraveny 3 kapiláry, pro DQ2 mix, DQ8 mix a DRB mix. Do první kapiláry bylo napipetováno 17,5  $\mu$ l DQ2 mixu, do druhé kapiláry 17,5  $\mu$ l DQ8 mixu a do třetí kapiláry 17,5  $\mu$ l DRB mixu. Následně byla do každé kapiláry napipetována DNA vzorku o objemu 2,5  $\mu$ l. Jako pozitivní kontrola sloužila PC CELI, která je dodávána v rámci kitu. Do kapilár připravených pro negativní kontrolu bylo přidáno 2,5  $\mu$ l sterilní vody. Všechny kapiláry byly uzavřeny víčky, stočeny a vloženy do karuselu, který byl umístěn do přístroje LightCycler® 2.0 (Roche) a byl spuštěn

příslušný amplifikační program uvedený v tabulce 2. Reakční program probíhal téměř 2 hodiny.

Tabulka 2: Reakční protokol

Denaturace		3 min.	95°C	Ramp rate 20 °C/s
Kvantifikace	45 cyklů	15 s	95 °C	Ramp rate 20 °C/s
		40 s	61 °C	Ramp rate 2,5 °C/s
Hold (chlazení)		1 min.	40 °C	Ramp rate 4 °C/s

Vyhodnocení real-time PCR bylo prováděno odečtením nárůstu emisního spektra, a to v obou kanálech FAM a JOE.

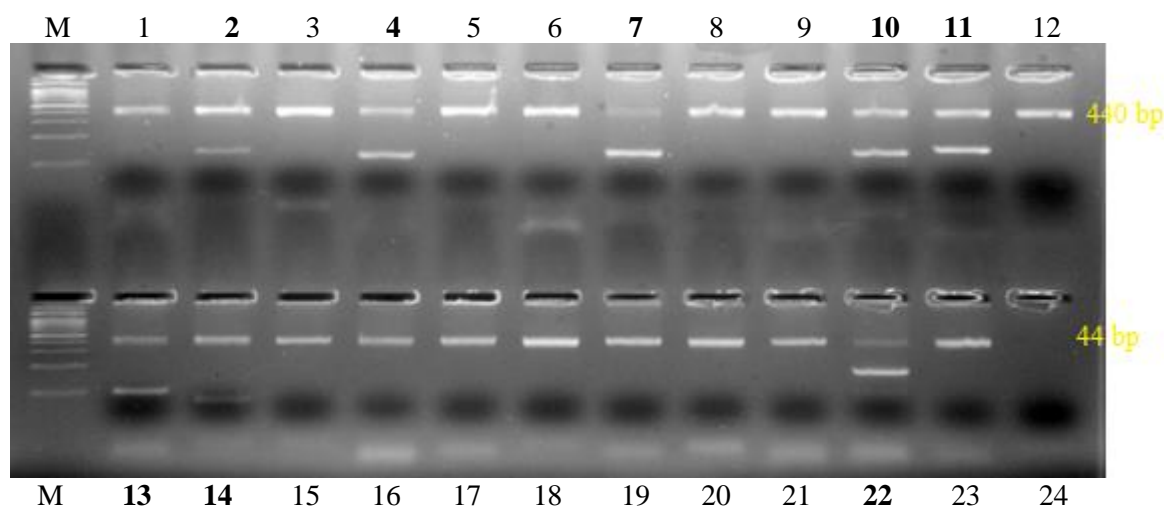
## 4 Výsledky

Zde uvádím několik vzorků vyšetřených kitem PROTRANS: PROTRANS HLA Celiac Disease v genetické laboratoři. Tabulka s výsledky všech provedených vyšetření od roku 2014 do února 2016 je uvedena v příloze č. 2.

Čísla 1 – 24 označují jednotlivé PCR reakce, kdy do každé jamky bylo pipetováno 10 µl PCR produktu. Písmeno M označuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU), který byl napipetován po 5 µl do první nebo poslední jamky v obou řadách.

Na gelu se hodnotila v rámci každé PCR reakce zejména přítomnost kontrolního fragmentu o velikosti 440 bp a pak velikost možných PCR produktů vznikajících v rámci jednotlivých reakcí. Velikost PCR produktů byla vždy <260 bp.

**Obr. 1: Vzorek číslo 1**

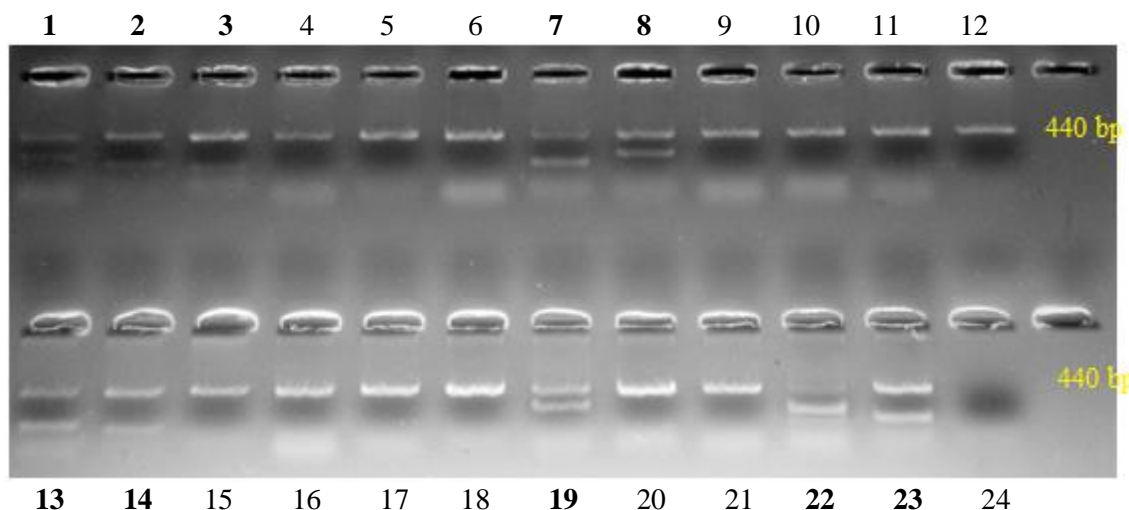


**Vyhodnocení gelové elektroforézy:** Pozitivní PCR reakce číslo: **2** (velikost produktu 140 bp, DQB1\*02:01, DQB1\*03:01/\*03:02), **4** (velikost produktu 135 bp), **7** (velikost produktu 140 bp, DQB1\*03:01/\*03:02), **10** (velikost produktu 145 bp, DQB1\*03:02), **11** (velikost produktu 165 bp), **13** (velikost produktu 105 bp, DQA1\*02:01), **14** (velikost produktu 85 bp, DQA1\*02:01, DQA1\*03:01) a **22** (velikost produktu 115/190 bp, DRB1\*07). Součástí každé PCR reakce je fragment interní kontroly o velikosti 440 bp.



**Výsledek testu:** Test je pro rizikové haplotypy celiakie negativní. Vznik onemocnění celiakie může být s vysokou pravděpodobností vyloučen.

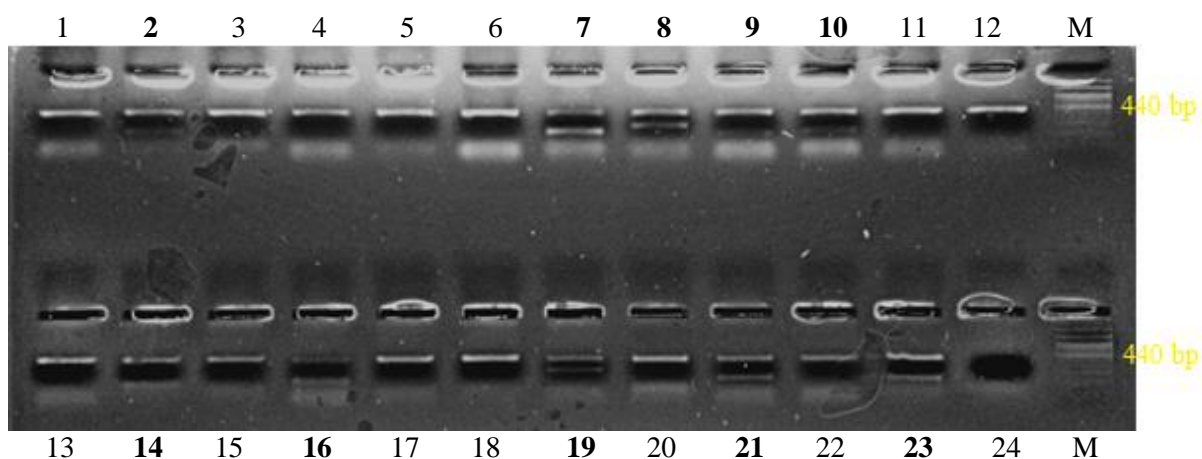
**Obr. 2: Vzorek číslo 3**



**Vyhodnocení gelové elektroforézy:** Pozitivní PCR reakce číslo: **1** (velikost produktu 200 bp, DQB1\*02:01), **2** (velikost produktu 140 bp, DQB1\*02:01, DQB1\*03:01/\*03:02), **3** (velikost produktu 115 bp, DQB1\*02:02), **7** (velikost produktu 140 bp, DQB1\*03:01/\*03:02), **8** (velikost produktu 215 bp, DQB1\*03:01), **13** (velikost produktu 105 bp, DQA1\*02:01), **14** (velikost produktu 85 bp, DQA1\*02:01, DQA1\*03:01), **19** (velikost produktu 235 bp, DQA1\*05:05), **22** (velikost produktu 115/190 bp, DRB1\*07) a **23** (velikost produktu 125 bp). Součástí každé PCR reakce je fragment interní kontroly o velikosti 440 bp.

**Výsledek testu:** Na základě pozitivních PCR reakcí byl detekován rizikový haplotyp DQ2 a DQ7 (DR5-DQ2 a DR7-DQ7). Výsledek genetického testu je pozitivní a u testovaného jedince může dojít k rozvoji celiakie.

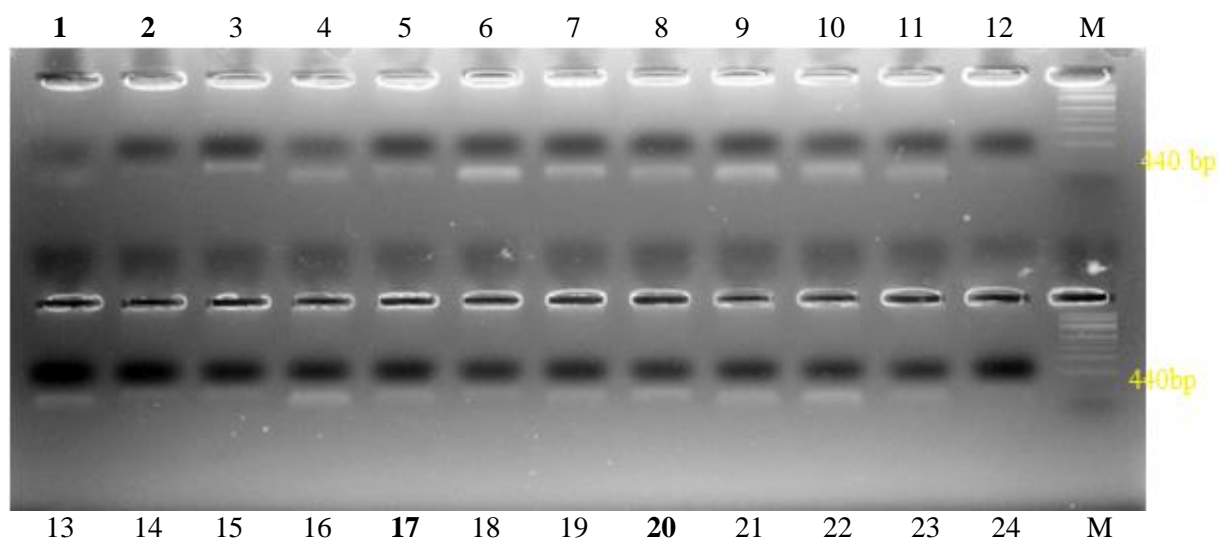
**Obr. 3: Vzorek číslo 4**



**Vyhodnocení gelové elektroforézy:** Pozitivní PCR reakce číslo: **2** (velikost produktu 140 bp, DQB1\*02:01, DQB1\*03:01/\*03:02), **7** (velikost produktu 140 bp, DQB1\*03:01/\*03:02), **8** (velikost produktu 215 bp, DQB1\*03:01), **9** (velikost produktu 130 bp, DQB1\*03:02), **10** (velikost produktu 145 bp, DQB1\*03:02), **14** (velikost produktu 85 bp, DQA1\*02:01, DQA1\*03:01), **16** (velikost produktu 110 bp, DQA1\*03:01), **19** (velikost produktu 235 bp, DQA1\*05:05), **21** (velikost produktu 145 bp, DRB1\*04) a **23** (velikost produktu 125 bp). Součástí každé PCR reakce je fragment interní kontroly o velikosti 440 bp.

**Výsledek testu:** Na základě pozitivních PCR reakcí byl detekován rizikový haplotyp DQ8 (DR4-DQ8). Výsledek genetického testu je pozitivní a je asociován s rizikem vzniku celiakie.

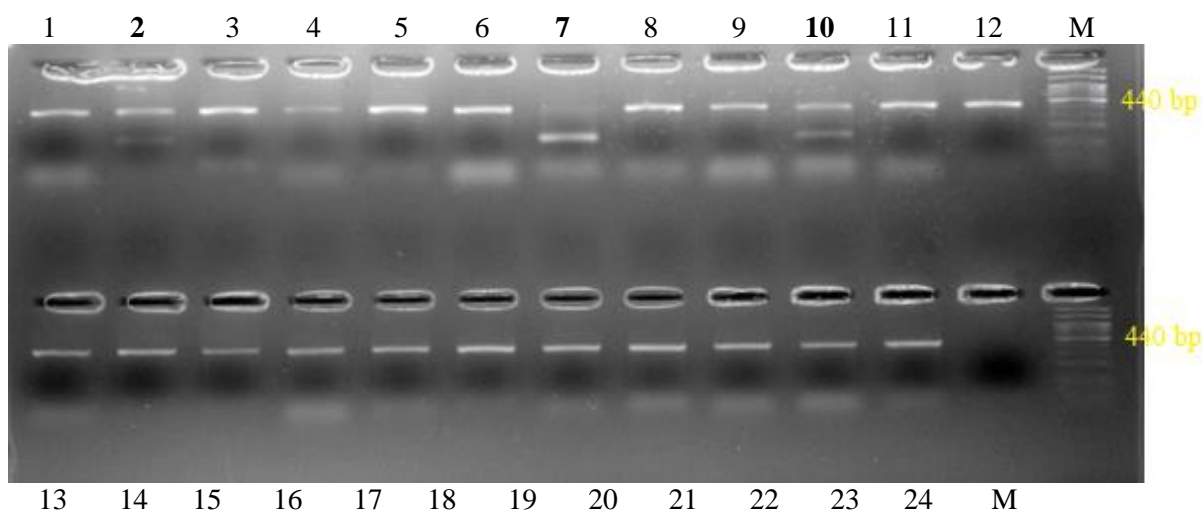
**Obr. 4: Vzorek číslo 8**



**Vyhodnocení gelové elektroforézy:** Pozitivní PCR reakce číslo: **1** (velikost produktu 200 bp, DQB1\*02:01), **2** (velikost produktu 140 bp, DQB1\*02:01, DQB1\*03:01/\*03:02), **17** (velikost produktu 235 bp, DQA1\*05:01) a **20** (velikost produktu 225 bp, DRB1\*03:01). Součástí každé PCR reakce je fragment interní kontroly o velikosti 440 bp.

**Výsledek testu:** Na základě pozitivních PCR reakcí byl detekován rizikový haplotyp DQ2 (DR3-DQ2/DR3-DQ2). Výsledek genetického testu je tedy pozitivní a u testovaného jedince může dojít ke vzniku onemocnění celiakie.

**Obr. 5: Vzorek číslo 12**



**Vyhodnocení gelové elektroforézy:** Pozitivní PCR reakce číslo: **2** (velikost produktu 140 bp, DQB1\*02:01, DQB1\*03:01/\*03:02), **7** (velikost produktu 140 bp, DQB1\*03:01/\*03:02) a **10** (velikost produktu 145 bp, DQB1\*03:02). Součástí každé PCR reakce je fragment interní kontroly o velikosti 440 bp.

**Výsledek testu:** Test je pro rizikové haplotypy celiakie negativní. Vznik onemocnění celiakie může být s vysokou pravděpodobností vyloučen.

Ve sledovaném souboru bylo od roku 2014 do února 2016 v genetické laboratoři GENLABS provedeno vyšetření genetických predispozic k celiakii u 22 jedinců. 13 vzorků bylo vyšetřeno pomocí kitu PROTRANS: PROTRANS HLA Celiac Disease (vzorky 1 - 13) a zbylých 9 vzorků bylo vyšetřeno metodou založenou na principu real-time PCR pomocí kitu EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DRB4) jednalo se o vzorky 14 - 22 (viz tabulka v příloze č. 2). Celkem bylo vyšetřeno 14 vzorků žen a 8 vzorků mužů. Věkový průměr byl u žen 32 let a u mužů 33 let.

Pomocí kitu PROTRANS HLA Celiac Disease byly detekovány predisponující haplotypy u 3 vzorků, a to konkrétně u vzorku číslo 3 rizikové haplotypy DQ2 a DQ7, u vzorku číslo 4 rizikový haplotyp DQ8 a u vzorku číslo 8 rizikový haplotyp DQ2. Všechny pozitivní genetické predispozice byly nalezeny u žen.

Pomocí kitu EliGene® Coeliac RT byly detekovány rizikové haplotypy u 5 osob. U vzorků 17 a 18 byly detekovány rizikové haplotypy DQ2, a u vzorků 19 a 20 byly detekovány rizikové haplotypy DQ2.x, které jsou spojovány s nízkým rizikem vzniku celiakie. U vzorku číslo 22 byl detekován rizikový haplotyp DQX.5, který představuje extrémně nízké riziko vzniku celiakie. Touto metodou byly predisponující haplotypy nalezeny u 3 žen (vzorky číslo 17, 20 a 22) a u 2 mužů (vzorky číslo 18 a 19).

Celkem bylo vyšetřeno 14 žen a rizikové haplotypy byly nalezeny u 6 z nich. Mužů bylo celkem vyšetřeno 8 a rizikové haplotypy byly nalezeny pouze u 2 jedinců.

Pomocí kitu PROTRANS: PROTRANS HLA Celiac Disease ani pomocí kitu EliGene® Coeliac RT nelze určit, zda je jedinec pro daný haplotyp homozygotní nebo heterozygotní.

## 5 Diskuze

V praktické části mé bakalářské práce bylo cílem praktické zvládnutí metody založené na HLA typizaci pomocí kitu Protrans. Celkově bylo vyšetřeno v daném období 22 vzorků pocházejících od mužů i žen. Predispozice k celiakii byly nalezeny častěji u žen než u mužů, což potvrzuje tvrzení, že autoimunitní onemocnění celiakie se vyskytuje častěji u žen. Z celkově 8 pozitivních výsledků byl u 6 z nich detekován rizikový haplotyp DQ2 (v jednom případě v kombinaci s DQ7 a ve dvou případech typ DQ2.x), a pouze v jednom případě byl nalezen rizikový haplotyp DQ8, u jednoho vzorku byl detekován haplotyp DQX.5, který představuje extrémně nízké riziko vzniku celiakie. Častější nález haplotypu DQ2 podporuje tvrzení, že přibližně u 90 % pacientů je přítomen heterodimer HLA-DQ2 a u menšiny pacientů heterodimer HLA-DQ8, které uvádí ve své práci Megiorni (2012). V genetické laboratoři se provádí genetické vyšetření predispozic k celiakii samoplátčům, což je důvod pro poměrně nízký počet vyšetřených jedinců.

Důvodem pro nahrazení HLA typizace pomocí kitu Protrans jinou metodou detekující rizikové haplotypy pro celiakii bylo zejména získání nového přístroje LightCycler 2.0 do laboratoře. Tento přístroj umožňuje provádět diagnostiku založenou na principu real-time PCR. Tato metoda je velice přesná, rychlá a účinná a zároveň pro analýzu potřebuje nízkou koncentraci DNA (2.5 ng). Výhodou je také cena za jedno vyšetření, která je minimálně poloviční ve srovnání s původní metodou. 24 PCR reakcí tak bylo nahrazeno pouze 3 PCR reakcemi s možností relativní kvantifikace PCR produktu v reálném čase, kdy zcela odpadá detekce amplifikovaných fragmentů na agarózovém gelu.

Součástí mé práce bylo také vyhodnocení dotazníků týkajících se celiakie (dotazníkový formulář je uveden v příloze č. 3). Dotazník sloužil zejména pro zjištění, jak často se společně s celiakií vyskytuje *diabetes mellitus* 1. typu a jaká je povědomost o možnosti genetického vyšetření predispozic k celiakii. Dále dotazník zahrnoval otázky týkající se projevů onemocnění, jakým způsobem a v kolika letech byla nemoc diagnostikována a zda se celiakie vyskytuje i u dalších členů rodiny.

Celkem jsem získala odpovědi od 28 respondentů, z nichž 96,4 % tvořily ženy a 3,6 % muži a jejich věkový průměr byl 31 let. Onemocnění celiakií a současně i diabetem 1. typu uvedlo pouze 3,6 % respondentů a zbylých 96,4 % uvedlo pouze celiakii. Na otázku zda trpí celiakií i další členové rodiny, odpovědělo kladně 25 % respondentů. Průměrný věk, kdy byla celiakie diagnostikována, byl 25 let, což vyvrací tvrzení, že je celiakie nemoc vyskytující se pouze v dětském věku. Jako nejčastější příznaky byly uváděny nadýmání (60,7 %), bolesti břicha (57,1 %), průjem (50 %), únava (50 %) a další příznaky (50 %), z nichž nejčastěji byly uváděny kožní problémy. Diagnóza celiakie byla nejčastěji stanovena sérologickými metodami a střevní biopsií a pouze u 10,7 % respondentů byl proveden genetický test. Z toho vyplývá, že biopsie střevní sliznice stále zůstává často používanou diagnostickou metodou, i když je pro pacienta stresujícím a nepříjemným zákrokem a nemusel by být prováděn u pacientů s vysokým titrem protilátek a pozitivní genetickou predispozicí. Z výsledků dále vyplývá, že ošetřující lékař nabídl genetické vyšetření pouze 7,1 % respondentů, přičemž 78,6 % respondentů neví, že je provedení genetického vyšetření možné a 67,9 % respondentů by bylo ochotných si genetické vyšetření zaplatit.

Vzhledem k rozšiřujícím se možnostem a rozvojem molekulární biologie a genetiky je možné předpokládat, že genetické vyšetření se bude do budoucna uplatňovat v diagnostice celiakie stále více, a to zejména k vyloučení této diagnózy. S nárůstem počtu genetických vyšetření bude docházet i ke snižování potřebných finančních nákladů.

## 6 Závěr

V rámci teoretické části bakalářské práce byly shrnuty poznatky o onemocnění celiakie a diabetu 1. typu jako jeho přidruženém onemocnění.

V praktické části bylo splněno zvládnutí metody HLA typizace u onemocnění celiakie pomocí komerčně dodávaného kitu Protrans. Dále zvládnutí izolace DNA z periferní krve a bukalního stěru, příprava PCR reakce a následná detekce PCR produktů pomocí gelové elektroforézy a vyhodnocení získaných výsledků.

Na základě dat získaných z genetické laboratoře nelze stanovené hypotézy potvrdit a zároveň ani vyvrátit, a to z důvodu malého počtu vzorků a také z důvodu rozdílného zastoupení mužů a žen ve sledovaném souboru. Ve sledovaném souboru bylo vyšetřeno celkem 8 mužů a predispozice k celiakii byly nalezeny u 2 z nich, v obou případech byl detekován rizikový haplotyp HLA-DQ2. Žen bylo ve sledovaném souboru vyšetřeno celkem 14 a predispozice k celiakii byly nalezeny u 6 z nich, u 4 vzorků byl detekován rizikový haplotyp HLA-DQ2, u jednoho vzorku byl detekován rizikový haplotyp HLA-DQ8 a v jednom případě haplotyp HLA-DQX.5, který představuje extrémně nízké riziko pro vznik celiakie.

Genetické vyšetření vrozených predispozic pro celiakii pomocí kitu Protrans již není v genetické laboratoři GENLABS využíváno. Nahradilo ho vyšetření založené na principu real-time PCR, které je oproti dříve používané metodě méně náročné zejména vzhledem ke vstupnímu množství DNA, dále je méně časově i finančně náročné a výsledky jsou lépe odečitatelné.



## 7 Seznam informačních zdrojů

1. ABDULKARIM, A. S., MURRAY, J. A. *Review article: the diagnosis of coeliac disease*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2003, roč. 17, s. 987-995.
2. AKOBENG, A. K., RAMANAN, A. V., BUCHAN, I., HELLER, R. F. *Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies*. *Archives of Disease in Childhood*, 2006, roč. 91, č. 1, s. 39-43.
3. BRDIČKA, R. *Genetika v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Galén, 2014. ISBN 978-80-7492-106-3.
4. BRDIČKA, R., DIDDEN, W. *Genetika v klinické praxi*. První vydání. Praha: Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-182-7.
5. CARD, T. R., WEST, J., HOLMES, G. K. T. *Risk of malignancy in diagnosed coeliac disease: a 24-year prospective, population-based, cohort study*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2004, roč. 20, č. 7, s. 769-775.
6. CINEK, O., KOLOUŠKOVÁ, S., ŠNAJDEROVÁ, M., ŠUMNÍK, Z., SEDLÁKOVÁ, P., DŘEVÍNEK, P., VAVŘINEC, J., RONNINGEN, K., S. *HLA class II genetic association of type 1 diabetes mellitus in Czech children*. *Pediatric Diabetes*, 2001, roč. 2, s. 98-102.
7. ENSARI, A. *Gluten-Sensitive Enteropathy (Celiac Disease): controversies in diagnosis and classification*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2010, roč. 134, č. 6, s. 826-836.
8. FASANO, A., CATASSI, C. *Current Approaches to Diagnosis and Treatment of Celiac Disease: An Evolving Spectrum*. *Gastroenterology*, 2001, roč. 120, s. 636-651.

9. FRIČ, P. *Celiakální sprue-současnost a perspektiva*. Postgraduální medicína, 2006, roč. 8, s. 588-593.
10. FRIČ, P., BUŠINOVÁ, I. *Celiakie-pohledy z druhé strany*. Interní medicína pro praxi, 2008, roč. 10, č. 10, s. 482-484.
11. FRÜHAUF, P. *Celiakální sprue*. Pediatrie pro praxi, 2007, roč. 8, č. 6, s. 333-335.
12. GREEN, P. H., JABRI, B. *Coeliac disease*. Lancet, 2003, roč. 362, s. 383-391.
13. HOLMES, G. K. T. *Coeliac disease and Type 1 diabetes mellitus – the case for screening*. Diabetic Medicine, 2001, roč. 18, č. 3, s. 169-177.
14. HOŘEJŠÍ, V. a BARTŮŇKOVÁ J. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009, 316 s. ISBN 978-80-7387-280-9.
15. HUSBY, S. aj. *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease*. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2012, roč. 54, č. 1, s. 136-160.
16. IVARSSON, A., HERNELL, O., STENLUND, H., PERSSON, L. A. *Breast-feeding protects against celiac disease*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2002, roč. 75, s. 914-921.
17. KAGNOFF, M. F. *Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease*. The Journal of Clinical Investigation, 2007, roč. 117, č. 1, s. 41-49.
18. KLENER, P. *Vnitřní lékařství*. 3., přepr. a dopl. vyd. Praha: Karolinum, 2006, 1158 s. ISBN 80-246-1252-6.
19. KOHOUT, P. *Diagnostika a léčba celiakie*. Interní medicína pro praxi, 2006, roč. 7, s. 324-326.

20. KOHOUT, P. *Novinky v bezlepkové dietě*. Interní medicína pro praxi, 2008, roč. 10, č. 3, s. 113-116
21. KREJSEK, J. a KOPECKÝ, O. *Klinická imunologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004, 941 s. ISBN 808622550x.
22. KUMAR, V., JARZABEK-CHORZELSKA, M., SULEJ, J., KARNEWSKA, K., FARRELL, T., JABLONSKA, S. *Celiac Disease and Immunoglobulin A Deficiency: How Effective Are the Serological Methods of Diagnosis?*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2002, roč. 9, č. 6, s. 1295-1300.
23. LÍSOVÁ, S., EHRMANN, J., KOLEK, A., SEDLKOVÁ, E., KOLÁŘ, Z. *Imunohistochemická studie mechanismů apoptózy a proliferace ve sliznici tenkého střeva u celiakální sprue*. Česko-slovenská patologie, 2005, roč. 41, č. 3, s. 85-93.
24. LOUKA, A. S., SOLLID, L. M. *HLA in coeliac disease: Unravelling the complex genetics of a complex disorder*. Tissue Antigens, 2003, roč. 61, s. 105-117.
25. MAKOVICKÝ, P., RIMÁROVÁ, K. *Význam a možnosti skríningu v diagnostice celiakie*. Vnitřní lékařství, 2011, roč. 57, č. 2, s. 183-187.
26. MALÍČKOVÁ, K., JANATKOVÁ, I., ŠANDOVÁ, P., FUČÍKOVÁ, T. *Imunologická laboratorní vyšetření při podezření na celiakii*. Interní medicína pro praxi, 2005, roč. 10, s. 440-443.
27. MEDRANO, L. M., DEMA, B., LÓPEZ-LARIOS, A., MALUENDA, C., BODAS, A., LÓPEZ-PALACIOS, N., FIGUEREDO, M. A., FERNÁNDEZ-ARQUERO, M., NÚÑEZ, C. *HLA and Celiac Disease Susceptibility: New Genetic Factors Bring Open Questions about the HLA Influence and Gene-Dosage Effects*. Plos One, 2012, roč. 7, č. 10, s. 1-5.

28. MEGIORNI, F., PIZZUTI, A., *HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing*. Journal of Biomedical Science, 2012, roč. 19, č. 88, s. 1-5.
29. MENŠÍKOVÁ, A., BEHARKOVÁ, N. *Život pacientů s celiakií. Ošetrovatelství a porodní asistence*, 2010, roč. 1, č. 4, s. 139-144.
30. NAVRÁTIL, L. *Vnitřní lékařství: pro nelékařské zdravotnické obory*. 1. vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 9788024723198.
31. NUSSBAUM, L., MCINNES R. R., WILLARD, H. F., THOMPSON, J. a THOMPSON, M. W. *Klinická genetika: Thompson & Thompson*. Vyd. 6, Praha: Triton, 2004. 426 s. ISBN 80-7254-475-6.
32. PLOT, L., AMITAL, H. *Infectious associations of Celiac disease*. Autoimmunity Reviews, 2009, roč. 8, č. 4, s. 316-319.
33. SERRA, S., JANI, P.A. *An approach to duodenal biopsies*. Journal of Clinical Pathology, 2006, roč. 59, č. 11, s. 1133-1150.
34. SCHUPPAN, D., JUNKER, Y., BARISANI, D. *Celiac Disease: From Pathogenesis to Novel Therapies*. Gastroenterology, 2009, roč. 137, s. 1912-1933.
35. SOLLID, L. M. *Molecular basis of celiac disease*. Annual Review of Immunology, 2000, roč. 18, č. 1, s. 53-81.
36. SOUČEK, M.(ed.), ŠPINAR, J. (ed.) a VORLÍČEK, J (ed.). *Vnitřní lékařství*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2011, 3 sv. ISBN 978-80-247-2110-1.
37. STÁRKA, L. *Endokrinologie*. Praha: Maxdorf, 1997. Jessenius. ISBN 80-85800-77-2.
38. TJON, J., BEGEN, J., KONING, F. *Celiac disease: how complicated can it get?*. Immunogenetics, 2010, roč. 62, č. 10, s. 641-651.

39. TONUTTI, E., BIZZARO, N. *Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity*. Autoimmunity Reviews, 2014, roč. 13, s. 472-476.
40. VOSPĚLOVÁ, J., TENORA, J., KARÁSKOVÁ, E., FLÖGLOVÁ, H., MATHONOVÁ, J. *Celiakální krize u batolete*. Pediatrie pro praxi, 2008, roč. 9, č. 4, s. 253-256.
41. WOLTERS, V. M., WIJMENGA, C. *Genetic Background of Celiac Disease and Its Clinical Implications*. American Journal of Gastroenterology, 2008, roč. 103, s. 190-195.

## Přílohy

*Příloha 1: Specifikace HLA-DQB1\*, HLA-DQA1\* a HLA-DRB1\* alel a odpovídající délky PCR produktů získaných v rámci jednotlivých reakčních mixů, čísla mixů odpovídají číslům PCR produktů na obrázcích gelů uvedených v kapitole výsledky. HLA alely asociované s celiakií jsou v tabulce vyznačeny tučně.*

HLA-DQB1*		
Mix	HLA-DQB1* specifikace	Velikost (bp)
01	DQB1* <b>02:01</b> -02:06	200
02	DQB1* <b>02:01</b> , DQB1* <b>03:01</b> /* <b>03:02</b> /05/06?-08?/10/11?-15?/16/17?-18?/19/20?/21w/23?/25/26?/27-36/37?/38-39, DQB1*04:01/02/03?-05?/06-08, DQB1*06:01/05?-07?/08?/10?-11?/13?-33?/35?/37?/40?/43	140
03	DQB1* <b>02:02</b> /03?/05?/06, DQB1*06:05?-07?/08?/10?-11?/13?-33?/35?/37?/40?	115
04	DQB1*02:03, DQB1*03:03/06w/12/15/20/25w/26/30-31/33-34/38-39, DQB1*04:03w	135
05	DQB1*02:04, DQB1*06:05?-07?/08?/10?-11?/13?-33?/35?/37?/40?	140
06	DQB1*02:05	180
07	DQB1* <b>03:01</b> /* <b>03:02</b> -03:39, DQB1*04:01-08, DQB1*05:01-14, DQB1*06:01-44/47	140
08	DQB1* <b>03:01</b> /04/09-10/13-14/16/19/21-22/24/27-29/35	215
09	DQB1* <b>03:02</b> /07-08/11/32/37, DQB1*06:29	130
10	DQB1* <b>03:02</b> /03/05-06/08/11/15/17-18/20/25-26/30w/31-34/37-39, DQB1*04:01w-03w/04/05/06w-08w, DQB1*05:02:02/03/06/08-10/13, DQB1*06:19w	145
11	DQB1*03:08, DQB1*06:02/10-11/13/14:02/16/19-20/24/29/33/47	165
12	DQB1*06:01/35/43	225

	HLA-DQA1*, -DRB1*	
Mix	HLA-DQA1*, -DRB1* specifikace	Velikost (bp)
13	DQA1* <b>02:01</b>	105
14	DQA1* <b>02:01</b> , DQA1* <b>03:01</b> , DQA1*04:03N?, DQA1*05:02?/05:04?	85
15	DQA1*03:02-03, DQA1*04:03N?, DQA1*05:02?/05:04?	85
16	DQA1* <b>03:01</b> /02/03	110
17	DQA1* <b>05:01</b> /02?/03/04?/06-07, DQA1*01:06?, DQA1*04:03N?	235
18	DQA1*05:02?/03/04?/06-07	85
19	DQA1* <b>05:05</b> /05:02?/04?/08-11, DQA1*01:06?, DQA1*04:03N?	235
20	DRB1* <b>03:01</b> -41/43-75/77, DRB1*11:07/53/103/105/107, DRB1*14:104/111, DRB3*01:14	225
21	DRB1* <b>04</b> , DRB1*08:04:02?, DRB1*11:22, DRB1*14:10/57, DRB4*01:02?	145
22	DRB1* <b>07</b> , DRB1*01:21w	115/190
23	DRB1*11, DRB1*03:08/65, DRB1*04:15/61, DRB1*08:31/41, DRB1*12:04, DRB1*14:11, DRB1*16:16, DRB3*02:18, DRB5*01:13	125
24	Negativní kontrola	

(Obrázek převzat a upraven podle reakčního protokolu PROTRANS HLA Celiac disease)

Vysvětlivky: w = slabá amplifikace, ? = není známa nukleotidová sekvence, tučným písmem jsou zaznamenány HLA alely asociované s celiakií

*Příloha 2: Souhrn výsledků provedených vyšetření od roku 2014 do února 2016 v genetické laboratoři GENLABS.*

<b>PROTRANS: PROTRANS HLA Celiac Disease</b>				
<b>Číslo</b>	<b>Pohlaví</b>	<b>Věk</b>	<b>Výsledek</b>	<b>Materiál</b>
1	Žena	51	Negat.	Perif. krev
2	Žena	49	Negat.	Perif. krev
3	Žena	34	Pozit., haplotyp DQ2 a DQ7	Perif. krev
4	Žena	41	Pozit., haplotyp DQ8	Perif. krev
5	Žena	45	Negat.	Perif. krev
6	Muž	20	Negat.	Perif. krev
7	Muž	48	Negat.	Perif. krev
8	Žena	23	Pozit., haplotyp DQ2	Perif. krev
9	Žena	3	Negat.	Perif. krev
10	Žena	27	Negat.	Bukál. stěr
11	Muž	30	Negat.	Bukál. stěr
12	Muž	48	Negat.	Bukál. stěr
13	Muž	54	Negat.	Bukál. stěr
<b>EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DRB4)</b>				
14	Muž	38	Negat.	Bukál. stěr
15	Žena	3	Negat.	Bukál. stěr
16	Žena	53	Negat.	Bukál. Stěr
17	Žena	3	Pozit., haplotyp DQ2	Bukál. stěr
18	Muž	9	Pozit., haplotyp DQ2	Perif. krev
19	Muž	16	Pozit., haplotyp DQ2.x	Perif. krev
20	Žena	30	Pozit., haplotyp DQ2.x	Bukál. stěr
21	Žena	48	Negat.	Bukál. Stěr
22	Žena	32	Pozit., haplotyp DQX.5	Perif. krev



*Příloha 3: Dotazníkový formulář*

- 1) Věk
- 2) Pohlaví
  - a) Žena
  - b) Muž
- 3) Trpíte zároveň celiakií i diabetem?
  - a) Pouze celiakií
  - b) Pouze diabetem
  - c) Obojí
- 4) Trpí celiakií i další členové Vaší rodiny? Pokud ano uveďte který.
- 5) Trpí diabetem i další členové Vaší rodiny? Pokud ano uveďte který.
- 6) V kolika letech bylo u Vás diagnostikováno onemocnění celiakie?
- 7) V kolika letech bylo u Vás diagnostikováno onemocnění diabetes mellitus?
- 8) Jaké příznaky se u Vás objevily, než Vám bylo onemocnění diagnostikováno?
  - a) Průjem
  - b) Zvracení
  - c) Bolesti břicha
  - d) Ztráta váhy
  - e) Nadýmání
  - f) Nechutenství
  - g) Chudokrevnost
  - h) Únava
  - i) Podrážděnost
  - j) Další příznaky
- 9) Jaké testy Vám byly provedeny při podezření na onemocnění?
  - a) Krevní testy (protilátky proti tkáňové transglutamináze)
  - b) Biopsie sliznice tenkého střeva a následné histologické vyšetření
  - c) Genetické vyšetření
- 10) Při jakých příležitostech u Vás dochází ke zhoršení stavu onemocnění?
  - a) Při jiném onemocnění (nachlazení, chřipka, jiné infekce)

- b) Stresové situace
- c) Nedodržení diety
- d) Ke zhoršení nedochází

11) Jaké vyšetření Vám lékař při podezření na celiakii doporučil?

- a) Serologické vyšetření (protilátky proti tkáňové transglutamináze)
- b) Střevní biopsie
- c) Genetické vyšetření

12) Nabídl Vám lékař možnost genetického vyšetření při podezření na celiakii?

- a) Ano
- b) Ne

13) Víte o možnosti genetického vyšetření na celiakii?

- a) Ano
- b) Ne

14) Genetické vyšetření na celiakii není hrazeno zdravotními pojišťovnami, byly byste ochotni si genetické vyšetření zaplatit?

- a) Ano
- b) Ne