

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Vyšetření celiakie v souvislosti s osteoporózou

bakalářská práce

Autor práce: Romana Sladká
Studijní program: specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: zdravotní laborant
Vedoucí práce: MUDr. Marie Ládová

Datum odevzdání práce: 3. 5. 2013

Abstrakt

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala vyšetřením celiakie v souvislosti s osteoporózou.

Cílem této práce bylo stanovení hladiny protilátek v séru proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a IgG u pacientů s prokázanou osteoporózou. Na základě výsledků dané studie vyhodnotit možné souvislosti osteoporózy a celiakie. Dále porovnání výsledků s literárními údaji.

V první části práce jsem se zaměřila na stávající poznatky o chorobách celiakie a osteoporózy. U celiakie jsem nastínila historii choroby, charakteristiku onemocnění. Také jsem se zaměřila na diagnostiku celiakie pomocí laboratorních sérologických testů ELISA. A na závěr jsem se zmínila o léčbě bezlepkovou dietou. U osteoporózy jsem popsala její historii, příznaky, formy, rizika a komplikace, které osteoporóza přináší.

Metodickou část mé práce jsem prováděla v biochemicko-hematologické laboratoři Stafila, s. r. o. se sídlem v Českých Budějovicích, kde jsem zaměstnána. Měření jsem prováděla na úseku mikrobiologie, kde se také provádí imunologická vyšetření. Prováděla jsem screening celiakie ze séra a to stanovení protilátek proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a IgG metodou ELISA – sandwich. Měření jsem prováděla u 58 sér pacientů s diagnózou osteoporózy. Séra jsem získávala za pomoci mé vedoucí práce MUDr. Marie Lákové, která vede osteologickou ambulanci v Českých Budějovicích. Sérologické markery celiakie jsem stanovovala enzymoimuno analýzou na automatickém analyzátoru Nexgen Four od firmy Test-line. V této části popisuji analyzátor Nexgen Four, jeho specifikaci, vlastní kontroly přístroje, kalibrace a kontroly stanovení. Dále popisuji princip metody ELISA sandwich. Jde o nekompetitivní enzymoimunoanalýzu. Na závěr této části jsem popsala metodický postup práce, přípravu pracovních roztoků a kontrol. Přípravu a ředění vzorků k analýze a pracovní postup pro vyhodnocení semikvantitativní – indexem positivity a kvantitativní – U/ml. Dále jsem pokračovala vlastním měřením. U všech kroků, které jsem během měření provedla jsem postupovala dle standardních operačních postupů laboratoře Stafila, s. r. o..

Výsledky mého měření jsem zpracovala ve třetí části této práce. Naměřené výsledky jsem zanesla do tabulky: kvantitativní vyjádření hladiny protilátek proti tTg IgA a IgG (U/ml) v sérech pacientů s prokázanou osteoporózou. Dále jsem vypracovala graf: procentuální vyjádření výsledků stanovení hladiny protilátek proti tTg IgA a IgG v séru u pacientů s prokázanou osteoporózou. Do výsledků jsem dále zařadila kalibrační grafy pro metody tkáňové transglutaminázy IgA a IgG a tabulky naměřených hodnot kontrol pro tyto metody.

Z 58 zkoumaných vzorků osteoporotických pacientů byly 3 vzorky pozitivní, tedy měly hodnotu hladiny protilátek tTg IgA a IgG vyšší jak 22 U/ml. 1 vzorek měl hraniční hodnoty, to znamená, že měl protilátky proti tTg IgA a IgG v rozmezí 18 až 22 U/ml. Pozitivní výsledky jsem naměřila u pacientů narozených v roce 1976 a 1978. Hraniční výsledek měl pacient narozen v roce 1962. V grafu č. 1 jsem naměřené hodnoty protilátek proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a IgG vyjádřila procentuálně. Z 58 měřených vzorků byly 3 vzorky pozitivní, což představuje 5% a 1 vzorek hraniční, což představuje 2%. Ve své analýze jsem vycházela z dostupnosti zkoumaného materiálu a možností naší laboratoře. Celiakie je onemocnění, kterému se v dřívější době nevěnovalo příliš pozornosti. Hypotéza o souvislosti osteoporózy s celiakií se potvrdila.

Na závěr mé práce jsem pro zajímavost uvedla dvě kazuistiky, které mi poskytla MUDr. Ládová ze své ordinace a statistické údaje z laboratoře Stafila za rok 2012, týkající se vyšetření celiakie a s ním spojené diagnózy.

Abstract

My Bachelor's thesis deals with the examination of celiac disease in connection to osteoporosis.

The aim of the thesis was to specify the level of antibodies against tissue transglutaminase in the class IgA and IgG in the serum with osteoporosis diagnosed patients, to interpret, based on the results of the study, possible link between osteoporosis and celiac disease as well as to compare the outcome with scientific data.

I focused on the present knowledge of osteoporosis and celiac disease in the first part. As for celiac disease, I described its history and characteristics. I also paid attention to diagnostics of celiac disease with the assistance of laboratory serological tests ELISA. I mentioned the free-gluten diet treatment after that. As regards osteoporosis, I described its history, symptoms, forms, perils and complications which the disease causes.

I conducted the methodical part of my work in the biochemical – haematological laboratory Stafila where I work, with its seat in České Budějovice. As for measurements, I took them in the department of microbiology, where immunologic tests are also taken. I carried out the screening of celiac disease from serum, namely the determination of antibodies against tissue transglutaminase in the class IgA And IgG, with the aid of ELISA - a sandwich method. I took measurements with 58 osteoporosis diagnosed patients. I obtained the sera thanks to the supervisor of my thesis Mrs. Marie Láďová, who is at the head of an osteological outpatient department in České Budějovice. I stated the serological markers of celiac disease with the assistance of enzymatic immunoanalysis conducted on automatic analyzer Nexgen Four, which was provided by the firm Test-line. I describe the analyzer, its specification, checking and calibration of the gadget together with determination checks in this part of the thesis. Additionally, there is described the principle of the method ELISA- sandwich, which is non-competitive enzymatic immunoanalysis. At the end of the section there is depicted the methodical procedure of my work, the preparation of working solutions and checks, the preparation and dilution of samples for analysis and working procedure for

semiquantitative interpretation – with positivity index and for quantitative interpretation– U/ml. I continued with my own measurements, while respecting standard operations procedures of the laboratory Stafila, a limited liability company.

The results of my measurements are processed in the third part of the thesis. The acquired results are given in a table: quantitative interpretation of the antidote against tTg IgA and IgG (U/ml) level in the sera of the osteoporosis diagnosed patients. Then I presented a graph interpreting the proportional relation of the antidote against tTg IgA and IgG levels in the sera of the osteoporosis diagnosed patients. There are included calibration graphs for tissue transglutaminase IgA and IgG and tables of the obtained data of checks for the methods in the results.

3 out of the 58 examined samples of osteoporotic patients were positive, they had the level of antibodies higher than 22 U/ml. One of the samples had marginal figures, which means it had the antidotes against tTg IgA and IgG between 18 and 22 U/ml. Positive results were found with patients born in 1976 and 1978. A patient born in 1962 appeared to have a marginal result. The acquired antidote figures against tissue transglutaminase in the class IgA and IgG are presented proportionally in the graph 1. 3 out of the 58 measured samples were positive, which represents 5%, and 1 sample was marginal, which is 2%. My analysis is based on the availability of the examined material and the potential of our laboratory. Celiac disease is an illness which was not paid much attention to in the past. Hypothesis about the link between osteoporosis and celiac disease has been proved.

The very end of my thesis presents two interesting cases provided by Dr Ládová, who had chosen them of her patients, and statistical data from the laboratory Stafila relating to the examination of celiac disease and its diagnosis collected in 2012.

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 26.4.2013

.....

Romana Sladká

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomohli při psaní bakalářské práce. Zejména mé vedoucí práce paní MUDr. Marii Ládové, RNDr. Slavomíru Rakouskému, CSc., MUDr. Věře Cihlové, Bc. Šárce Ochozkové a Ing. Milanu Valentovi za jejich cenné rady, informace a připomínky.

Obsah

Úvod.....	10
1. Teoretická část.....	11
1.1. Onemocnění zvané „celiakie“	11
1.1.1. Co předcházelo celiakii.....	11
1.1.2. Charakteristika celiakie neboli celiakální sprue.....	11
1.1.3. Co si představit pod pojmem „autoimunitní onemocnění“	13
1.1.4. Nejčastější příznaky celiakie.....	14
1.1.5. Celiakie a její formy.....	15
1.1.6. Sdružená onemocnění, která souvisí s celiakií.....	15
1.1.7. Laboratorní vyšetření při diagnostice celiakie	16
1.1.8. Bezlepková dieta léčbou celiakie	19
1.2. Onemocnění zvané „osteoporóza“	20
1.2.1. Co předcházelo osteoporóze	20
1.2.2. Osteoporóza a její formy	20
1.2.3. Charakteristické známky osteoporózy	21
1.2.4. Příznaky, kterými lze osteoporózu charakterizovat	21
1.2.5. Jaká rizika a komplikace osteoporóza přináší?.....	21
1.2.6. Celiakie jako mechanismus vzniku osteoporózy	22
1.2.7. Charakteristika struktury a funkce kosti a metabolismus vápníku.....	23
1.2.8. Složení kosti z makroskopického hlediska	23
1.2.9. Složení kosti z mikroskopického hlediska	23
1.2.10. Rozdělení kostních buněk.....	24
1.2.11. Vápník a jeho metabolismus.....	24
1.2.12. Parathormon (PTH)	25
1.2.13. Vitamin D	25
1.2.14. Kalcitonin	26
1.2.15. Vyšetřovací metody při diagnostice osteoporózy	26
1.2.16. Kdy osteodenzitometrii indikovat ?.....	27
1.2.17. Několik způsobů jak léčit osteoporózu.....	28
2. Metodika.....	29
2.1. Specifikace analyzátoru NEXGEN FOUR.....	30
2.2. Princip metody – sendvičová technika ELISA.....	31
2.3. Metodický postup práce	31
2.3.1. Příprava pracovních roztoků	32
2.3.2. Příprava a ředění vzorků k analýze	33
2.3.3. Pracovní postup.....	33
2.3.4. Validita testu	34
2.3.5. Interpretace výsledků	35
2.4. Průběh vlastního měření.....	35
3. Výsledky.....	40
4. Diskuze	47
5. Závěr.....	51
6. Seznam použité literatury :	52
7. Přílohy:	56

Seznam použitých zkratek

BMC - bone mineral contents-informuje o obsahu minerálů v kosti

BMD - bone mineral density- informuje o kostní densitě

CaBp – calcium binding protein

Dg - diagnóza

DPG - deamidovaný gliadin peptid

ELFO - elektroforéza

ELISA - enzyme immunoassay (analytická metoda pro stanovení různých antigenů)

IgA - imunoglobulin A

IgD - imunoglobulin D

IgE - imunoglobulin E

IgG - imunoglobulin G

IgM - imunoglobulin M

QCT - kvantitativní výpočetní tomografie

PTH - parathormon

RTG – rentgen

SD – směrodatná odchylka

tTG - tkáňová transglutamináza

Úvod

Jako téma pro svoji bakalářskou práci jsem si zvolila vyšetření celiakie v souvislosti s osteoporózou. Celiakie je dědičné autoimunitní onemocnění, které vyvolává nesnášenlivost lepku, s níž jsou spojeny další komplikace a přidružené choroby. Mezi hlavní projevy patří zánětlivé změny na sliznici tenkého střeva, které způsobují poruchu vstřebávání živin. Důsledkem celiakie je vznik autoprotilátek ve třídě IgA a IgG proti tkáňové transglutamináze, gliadinu a autoprotilátek proti endomysiu. K onemocněním, která mohou a mnohdy i souvisí s celiakií patří také osteoporóza. Lidé trpící osteoporózou patří do rizikové skupiny. Mnoho neobjasněných případů osteoporózy je spojováno s onemocněním celiakií. U těchto pacientů se provádí vyšetření na celiakii a to především hladiny protilátek proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a IgG.

Tímto tématem se zabývám z toho důvodu, že v současné době je problematika celiakie aktuálním, avšak ne tolik probádaným onemocněním. Pracuji v akreditované laboratoři Stafila, s. r. o. pod vedením MUDr. Marie Ládové. V naší laboratoři kromě jiných vyšetření provádíme také vyšetření celiakie, vyšetřujeme rovněž markery osteoporózy. Paní doktorka Ládová vede osteologickou ambulanci a touto problematikou se zabývá řadu let. Záměrem mé bakalářské práce je tuto problematiku nastínit a v rámci vlastního měření zjistit, zda a kolik procent pacientů s osteoporózou trpí zároveň celiakií.

CÍL PRÁCE: stanovení hladiny protilátek proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a IgG u pacientů s prokázanou osteoporózou – diagnózou M81-90. Na základě této studie následně vytvořit statistiku souvislosti osteoporózy s celiakií. Porovnání vlastních výsledků s literárními údaji a diskuze na dané téma.

1. Teoretická část

1.1. Onemocnění zvané „celiakie“

1.1.1. Co předcházelo celiakii

Historie celiakie zasahuje až do antických dob či starověkého Egypta (15). Jídelníček našich předků nebyl pestrý. Maso z ulovené zvěře a plody keřů a stromů. Změna nastala, když naši předci zjistili, že když se usadí na jednom místě, mohou zasít obiloviny a počkat si na úrodu. Spousta předků, kteří si vylepšili stravu pšenicí, ječmenem či žitem, ji špatně snášela. Mnozí kvůli ní dokonce zemřeli. Silnější jedinci sice přežili, ale pomocí svých genů předávali dalším generacím informaci varující tělo před lepkem (7).

1.1.2. Charakteristika celiakie neboli celiakální sprue

Celiakie (coeliacus, kailiakós) – znamená „břišní“. Celiakální sprue je střevní onemocnění, způsobující poruchu vstřebávání živin (7, 16).

Výskyt celiakie je v České republice 1:200. Neléčená celiakie může vést ke komplikacím, jako jsou osteoporóza a s ní související zlomeniny, anémie, vyšší frekvence infekčních či nádorových onemocnění (15).

Jedná se o autoimunitní chorobu, která postihuje střevní sliznici a to především v oblasti jejunu. Funkcí střevní imunity je poskytnout ochranu vůči patogenům, při zachování složení střevní mikroflóry a tolerance k perorálně přijímané potravě. Toho je dosaženo prostřednictvím několika úzce regulovaných mechanismů, včetně tvorby IgA protilátek střevními plazmatickými buňkami. Celiakie je střevní porucha způsobená dysfunkční imunitní reakcí, pomocí masivní střevní IgA odpovědi. Sekreční IgA je považován za jeden z klíčových imunitních efektorových mechanismů v udržení homeostázy na slizničních površích (20).

Celiakie se projevuje zánětem střevní sliznice po sekundárním požití lepku. Dochází k tomu u geneticky predisponovaných pacientů (31).

Sliznice našeho těla zabírají plochu 200 metrů čtverečních. Největší zásluhu na tom mají miliony klků ve sliznici tenkého střeva, jehož povrch zvětšují pětikrát. Jednotlivé epitelové buňky obsahují mikrokly, pomocí nichž se ze stravy vstřebávají do krevního oběhu základní živiny. Ty složitější z nich ji pomáhají svými enzymy rozložit na jednodušší látky. Celiakie je intolerancí ke gliadinu, který je alkoholem rozpustnou komponentou glutenu neboli lepku. Jelikož celiakie vzniká konzumací glutenu v potravě, můžeme její příznaky zmírnit dodržováním celoživotní bezlepkové diety (7, 25).

Lepek se vyskytuje v různých cereáliích (pšenice, ječmen, žito). Skládá se ze směsi proteinů, které se dělí do dvou skupin, prolamíny a gluteiny. Nejčastěji se vyskytujícím prolaminem je gliadin (15, 16, 30).

Štěpné produkty lepku vyvolají u vnímavých osob nepřiměřenou imunitní reakci s trvalou tvorbou autoprotilátek a trvalou zátěží imunitního systému (11).

Jestliže pacient postižený celiakií opakovaně přijímá potravu obsahující lepek, vede to ke zničení sliznice tenkého střeva, která pak vykazuje plochý povrch bez klků, ale s viditelnými hlubokými kryptami. Následkem toho dochází k funkčním poruchám (7, 14, 15, 16).

Dle Marshovy klasifikace střevní histopatologii onemocnění dělíme do tří stupňů:

Marshův typ 1: zvýšení počtu intraepitelových lymfocytů, normální stavba sliznice

Marshův typ 2: hyperplázie krypt, klky jsou normální

Marshův typ 3: hyperplázie krypt, degenerace epitelových buněk doprovázená atrofií klků. Typ 3 se dále dělí na typ A (částečná atrofie klků), typ B (subtotální atrofie klků), typ C (totální atrofie klků) (7, 16, 30).

1.1.3. Co si představit pod pojmem „autoimunitní onemocnění“

Fyziologickou funkcí imunitního systému organismu je mimo jiné rozlišit a tolerovat antigeny tkání vlastních. Proto hovoříme o autoimunitním onemocnění tehdy, když autoimunitní odezva našeho těla vede k poškození vlastních tkání. Autoimunitní reakci dělíme na buněčnou nebo humorální. Při reakcích humorálních se tvoří autoprotilátky izotypu IgG, ty se podílí na poškození tkání cytotoxicky, nebo tvorbou imunokomplexů. Může dojít až k funkční změně buňky, nebo proteinu ke kterému se váže. Při buněčných reakcích dochází k poškozujícím zánětům díky Tc a Th1 lymfocytům a cytokinovým produktům. O autoimunitním onemocnění proto hovoříme, když můžeme charakterizovat autoantigen, a když je možné poškozující reakci reprodukovat in vitro i in vivo. Hlavní známkou autoimunitních chorob je zánět, označovaný v anglické odborné literatuře termínem „immune mediated inflammatory disorders“ (IMID). Vzniká při poruše autotolerance, resp. mechanismů, které zajišťují toleranci vlastních tkání. Celiakie patří do skupiny orgánově specifických autoimunitních chorob, kombinují se zde jak buněčné, tak humorální autoimunitní reakce, Vytváří se autoprotilátky proti antigenům endomysia a hlavně tTG (12).

Protilátky – imunoglobuliny jsou základní složkou imunitní odpovědi. Redukují škodlivé antigeny v těle. Zesilují působení složek přirozené imunity – fagocytózy a komplementu. Jejich absence je neslučitelná se životem. Jsou produktem plazmatických buněk a B-lymfocytů. Molekuly imunoglobulinů jsou složeny z lehkých a těžkých řetězců. Každý řetězec má variabilní a konstantní část. Izotypy imunoglobulinů jsou určeny dle konstantních částí těžkých řetězců. Rozlišujeme tyto imunoglobuliny-IgG, IgA, IgM, IgE, IgD (12).

Variabilní část řetězců udává vazebné místo pro antigen. Imunoglobuliny nacházející se v séru, jsou polyklonální. Níže uvádím nejčastější typy imunoglobulinů a jejich charakteristiky .

IgM – tvoří povrch B lymfocytů a to BCR receptor. Tvoří se jako první po setkání s antigenem. Aktivuje komplement .

IgG – nejčastější izotyp. Jako jediný prostupuje v těhotenství placentou. Opsonizuje antigeny a neutralizuje viry.

IgA – vyskytuje se v séru, slinách, slzách a mateřském mléce. Chrání sliznice, opsonizuje antigeny a neaktivuje komplement. Dělí se na sérový a slizniční.

IgE – v séru zdravého jedince se nachází minimálně. Zapřičiňuje alergické reakce. Chrání tělo před parazity.

IgD – je součástí BCR receptorů na B lymfocytech. V séru se vyskytuje minimálně (12).

Celiakie je střevní porucha způsobená dysfunkční imunitní reakcí, pomocí masivní střevní IgA odpovědi. Sekreční IgA je považován za jeden z klíčových imunitních efektorových mechanismů v udržení homeostázy na slizničních površích (20).

Sekreční IgA se dělí na dva izotypy a to IgA1 a IgA2. IgA1 se nachází v dýchacích cestách. Druhým je IgA2, který převládá v zažívacím traktu. Hlavní funkcí sekrečního IgA je neutralizovat antigeny nacházející se na sliznicích. Tomuto procesu říkáme imunitní exkluze. Za pomoci obecných obranných mechanismů a to pohybu řasinek, hlenu a střevní peristaltiky, je slizniční IgA spolu s navázaným antigenem transportován ven z těla. Slizniční IgA neaktivuje komplement a proto nedochází k poškozování sliznic (12).

Deficit IgA je označován jako selektivní imunoglobulinový defekt, s částečnou nebo úplnou ztrátou imunoglobulinových izotypů. V kombinaci s deficitem IgA se často vyskytuje také deficit IgG (12).

1.1.4. Nejčastější příznaky celiakie

Mnozí autoři člení příznaky celiakie podle závažnosti, místa nebo typu jejího projevu, například následovně: (Červenková)

Celkové: děti pomaleji rostou a přestanou přibírat na váze. Dospělí jedinci naopak hubnou, jsou unavení a celkově neklidní.

Kosterní a pohybové: osteoporóza, poruchy svalů, artritida a bolestivost kostry.

Interní: díky špatnému vstřebávání železa ve střevech dochází k anémii z nedostatku železa, patří sem také velké bolesti břicha, nadýmání, krvácení ze sliznic, otoky a u dětí je typická objemná, kašovitá, mastná a zapáchající stolice.

Neurologické: migréna, neuropatie, ataxie.

Gynekologické: spontánní potraty, neplodnost, poruchy menstruačního cyklu.

Duševní: úzkostné a depresivní stavy.

Kožní: atopický ekzém, afty v dutině ústní (7).

1.1.5. Celiakie a její formy

Celiakie má formu klasickou a latentní, která má skryté příznaky nebo minimální projev. U starších pacientů se setkáme většinou se skrytou formou. Objeví se až s přidruženým onemocněním a to nejčastěji s osteoporózou (1).

U klasické formy jsou přítomny gastrointestinální a extraintestinální klinické příznaky. V séru jsou pozitivní protilátky proti endomysiu a tTG. Střevní sliznice je atrofovaná (16).

Je známá ještě jedna forma celiakie a to potenciální, která je bez klinických příznaků. V séru jsou pozitivní protilátky proti endomysiu a tTG. Sliznice střevní není atrofovaná – tím se liší od předchozích forem, jsou při ní také zjišťovány imunohistochemické změny (16).

1.1.6. Sdružená onemocnění, která souvisí s celiakií

Řadíme sem autoimunitní onemocnění jako diabetes mellitus 1. typu, Sjogrenův syndrom. Dále sem patří jiné imunopathie, jako například deficit IgA, u pacientů s celiakií je deficit 10krát větší než u zdravých jedinců. IgA nefropatie a především Duhringova dermatitida. Nelze opomenout chromosomální vady a to Turnerův syndrom, Downův syndrom a Williamsův syndrom. Další onemocnění související

s celiakií jsou anémie. Může to být na perorální léčbu nereagující hypochromní anémie z nedostatečného vstřebávání železa. U dětí s neobjasněnou hypochromní anémií bylo diagnostikováno 6 až 12% onemocnění celiakií. Nebo také anémie z nedostatku vitamínu B12. Naopak makrocytární anémie z poruchy vstřebávání folátu se v souvislosti s celiakií vyskytuje minimálně. Další je metabolická osteopatie, kam patří osteoporóza a patologické fraktury způsobené nedostatečným vstřebáváním minerálů, vápníku, hořčíku, vitamínu D a bílkovin. Při snížení hladiny celkové bílkoviny a to albuminu dochází ke vzniku hypoproteinemického edému. Ráda bych zmínila také výskyt maligního nádoru ve 13%. Z toho v polovině případů se jednalo o lymfom (9,16, 23, 30).

V Plzni na X. celostátním kongresu sekundární osteoporózy v roce 2012 proběhla přednáška na téma screening celiakie u pacientů s osteopenií a osteoporózou v regionu severní a střední Moravy. Screening byl prováděn u 40 000 osob, kam byli zahrnuti pacienti s osteoporózou, dermatitis herpetiformis, anémií a osoby příbuzné. Výsledkem výzkumu bylo zjištění, že u osteoporotických pacientů se celiakie vyskytla ve 2,4% případů a jednalo se o pacienty kolem 50 let věku. Anémie se vyskytla u 3,5% pacientů s osteoporózou. Jednalo se o makrocytární i mikrocytární anémii (24).

1.1.7. Laboratorní vyšetření při diagnostice celiakie

Laboratorní vyšetření celiakie se běžně provádí sérologickými testy ELISA. Jedná se o nekompetitivní – nesoutěživou metodu. Touto metodou se stanovují antigeny, protilátky a hapteny. Pro značení se používá enzym, který se substrátem barevně reaguje. Výsledně se měří absorbance barevného produktu. Ke značení se používají různé enzymy a to alkalická fosfatáza, beta-galaktosidaza, křenová peroxidaza nebo glukosaoxidaza (8).

Tyto testy jsou velmi citlivé na specifické protilátky: anti-endomysium, anti-transglutamináza a anti-gliadin. Protilátky se stanovují v séru nebo plazmě. Principem je pevná fáze-antigen-protilátka-značená protilátka. Vyšetření se provádí v mikrotitračních destičkách. Stěny jamek na destičkách jsou pokryty rekombinantní lidskou tTG.

Označovanou protilátkou je zvířecí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgA, konjugovaná křenovou peroxidázou. Peroxidázová aktivita se stanovuje pomocí substrátu s TMB, jedná se o chromogenní substrátový roztok. Testy se hodnotí jako pozitivní a negativní. Pozitivita se projeví modrým zbarvením, které se pomocí tzv. zastavovacího roztoku přemění ve žluté. Intenzita zbarvení se hodnotí pomocí fotometru při vlnové délce 450 nm (2).

Protilátky se stanovují kvantitativně nebo semikvantitativně. Přes vysokou citlivost těchto testů nedávné výzkumy prokázaly, že v některých případech je jejich přesnost neúplná. A to hlavně u pacientů s lehčím poškozením střevní sliznice a právě se skrytou formou celiakie. Vědci zjistili, že je přesnější vyšetřovat kombinaci protilátek endomysia, tTG a gliadinu. V tomto případě je specifita testů 95%. Vědci také objevili protilátky proti deamidovanému gliadinu peptidu (DPG). Proto se zdá být nejpřesnější kombinace vyšetření IgA proti tTG a IgG proti DPG. Sérologické testy se skládají z IgA – tTG screeningu v kombinaci s celkovým sérovým IgA. Cílem je vyloučit jedince s IgA deficitem. Při sekundárním deficitu IgA protilátek se nemusí ještě jednat o celiakii. IgA neaktivuje komplement. Toto vyšetření by mělo být provedeno ještě dříve, než odstraníme pacientovi lepek ze stravy (1).

Jiní odborníci doporučují odběr protilátek proti tTG ve screeningu v řadě IgA. Při podezření na přidružený deficit IgA je vhodné odebrat též protilátky řady IgG. Protilátky proti endomysiu jsou samozřejmým odběrem. Naopak protilátky proti gliadinu jsou velice senzitivní, přesto je jejich specifita nízká (15).

Jak již bylo zmíněno dříve, gliadin je složka glutenu, která je rozpustná v ethanolu. Gluten je adhezivní protein, který je obsažen v pšenici, žitu, ovsu a ječmeni. Pomocí vyšetření IgA a IgG protilátek proti gliadinu můžeme sledovat do jaké míry pacienti s celiakií dodržují dietu a společně s vyšetřením antiendomysialních protilátek ve třídě IgA můžeme nahradit enterobiopsii. Přítomnost protilátek proti gliadinu je velmi často průvodním znakem snížené koncentrace sekrečního i sérového IgA. U pacientů s aktivní celiakií jsou pozitivní protilátky proti aktivované tTG ve třídě IgA téměř u 100%

onemocnění. U pacientů s dermatitis herpetiformis Duhring se jedná o 70%. V patogenezi celiakie je důležitý enzym tTG (25).

Post-translační modifikace gliadinu je katalyzována tTG. tTG je především intracelulární protein, který je lokalizován v cytosolu, mitochondriích, jádru a odděleních buněčných membrán. Je také vylučován extracelulárně. Gliadin – tTG komplex může vyvolat imunitní odpověď na tTG tím, že způsobuje reaktivitu B-buněk. Aktivita celiakie je spojena s laboratorním vyšetřením sérových protilátek proti tTG (4).

Gliadin, který se dostane do těla potravou, působí jako substrát pro tTG a u geneticky zatížených jedinců zapříčiňuje imunoalteraci (skryté epitopy), ze které vznikají tzv. horké epitopy, které jsou klíčové autoagresivní mechanismy celiakie. Provokují nebo zapříčiňují prvotní produkci patogenních autoprotilátek proti aktivované tTG a jsou zodpovědné za řízení autoimunitní odpovědi proti gliadinu (25).

Laboratorní vyšetření tTG v současné době slouží k pomoci při diagnóze celiakie, k identifikaci osob s přítomností celiakálních protilátek, které jsou považovány za rizikovou skupinu. Slouží lékařům pro kontrolu při léčbě bezlepkovou dietou. Kromě toho může sloužit jako prostředek výběru jedinců pro klinické studie zaměřené na prevenci nemocí nebo případné pozorování. Naopak sérové protilátky proti endomysiu jsou velmi citlivé a zmizí ve většině případů do jednoho roku po vyloučení lepku ze stravy (18).

Jestliže je sérologické vyšetření na celiakii pozitivní, je nutné potvrdit diagnózu biopsií tenkého střeva. Děti vyšetřujeme pomocí enterobioptické kapsle, dospělé vyšetřujeme pomocí endoskopu. Endoskopické vyšetření je důležité z důvodu možnosti provedení diferenciální diagnostiky postižení duodena či jejunu. Odběr bioptického vzorku se provádí pod Vaterskou papilou, z distálního duodena nebo z proximálního jejunu. Jedná se o oblast, kterou je možné dosáhnout při gastrokopii (15).

Zatímco střevní biopsie je stále považována za nezbytnou pro diagnostiku celiakie, máme doplňující laboratorní vyšetření a to právě sérologické testy ELISA. Jsou používány více než 20 let jako cenné markery pro screening celiakie (29).

1.1.8. Bezlepková dieta léčbou celiakie

Jedinou a účinnou léčbou celiakie je doživotní dodržování bezlepkové diety. Jedná se o dietu s přísným vyloučením všeho, co obsahuje pšenici, žito a ječmen. Potraviny se považují za bezlepkové, pokud obsahují méně jak 10 mg gliadinu na 100 g sušiny výrobku. Dále jsou vyrobené ze škrobu, který při použití neobsahoval více než 0,3 g bílkovin na 100 g sušiny výrobku. Při zahájení léčby je nutno na přechodnou dobu vyloučit laktózu ze stravy, z důvodu atrofické sliznice střeva, kde je snížena aktivita střevní laktázy. (23) Při poctivém dodržování diety zmizí po krátké době nepříjemné příznaky choroby. Za určitý časový úsek zmizí také protilátky, které jsou průkazné v séru při přítomnosti lepku ve stravě. Dále dojde ke změně skladby střevní mikroflóry a obnově struktury sliznice tenkého střeva. Organismus se tak celkově zregeneruje. Nesmí se zapomínat na přísun vitamínů a železa do organismu. V těžkých případech poškození střevní sliznice se podávají kortikoidy (7, 23).

Červenková popisuje případ pacienta, který pomocí správného dodržování bezlepkové diety předešel plánované transplantaci svých těžce poškozených jater (7).

Také popisuje laboratorní výzkumy na myších, který ukázaly, že děti dodržující přísnou bezlepkovou dietu v raném věku, nejsou postiženy diabetem mellitus 1. typu.

Naopak při nedodržování dietního režimu nepříjemné příznaky neustoupí, ale postupně zesilují a přidružují se k nim další potíže. Poškození sliznice tenkého střeva může vést až k jeho perforaci. V důsledku nedostatečného vstřebávání ve střevní sliznici sílí osteoporóza a dochází k opakovaným zlomeninám. Nejvážnější je však riziko vzniku zhoubného střevního lymfomu (7).

1.2. Onemocnění zvané „osteoporóza“

1.2.1. Co předcházelo osteoporóze

Osteoporóza, prořidnutí kosti, se dnes považuje za civilizační chorobu s vysokým výskytem v průmyslově vyspělých zemích. Předpokládá se, že osteoporóza různého typu a stupně se vyskytuje zhruba u 16% našeho obyvatelstva (14).

Historie osteoporózy sahá do 3.-5. století n. l. , na základě zjištění Smrčka a spol. (1989), kteří odhalili předčasnou osteoporózu u koster mladých žen pocházejících z pohřebiště Wadi Quitna v Egyptě. Jejich domněnkou je, že se konzumoval chléb se zvýšeným obsahem fytátu – látky, která na sebe váže ve střevech vápník (kalcium, Ca). Významný krok vpřed nastal roku 1885, kdy Sommer rozlišil osteoporózu od osteomalacie. Největší pokrok nastal po druhé světové válce vydáním monografie Albrighta a Reifensteina „The Parathyroid Gland and Metabolit Bone Disease“. Byla ustanovena definice osteoporotického syndromu jako patologický úbytek organické a anorganické části kosti se změnami funkce a mikrostruktury kosti a se zvýšeným rizikem zlomenin (3).

1.2.2. Osteoporóza a její formy

Osteoporózu dělíme na primární a sekundární. Primární forma nemá jasnou příčinu, kdežto u sekundární známe kauzální faktory (3).

Primární osteoporóza nemá souvislost s ostatními chorobami, patří sem postmenopauzální a involuční, neboli stařecká osteoporóza.

Sekundární forma je spojena s chorobnými stavy, při kterých vzniká. Patří sem nemoci trávicího traktu, chronická renální onemocnění, nemoci žláz s vnitřní sekrecí, choroby krve – anémie, nedostatek vitamínu D, revmatologické choroby, dlouhodobé užívání kortikoidů. Sekundární forma osteoporózy je velice častá (3, 26, 27)

1.2.3. Charakteristické známky osteoporózy

Jedná se o onemocnění způsobené nedostatečnou kalcifikací kostí. Poruchou rovnováhy mezi tvorbou nové hmoty kosti a jejím odbouráváním. Tento proces je do třicátého roku věku vyvážený a po třicátém roce je odbourávání větší než novotvorba. Velmi záleží, jaké množství vápníku si organismus nastřádal do třicátého roku věku. Z toho vyplývá, že nejlepší prevencí osteoporózy je dostatečný přísun vápníku v ranném věku a dostatečná tělesná aktivita. Osteoporózu způsobuje nedostatečný přísun vápníku do těla, nedostatečné vstřebávání vápníku v zažívacím traktu související s nedostatkem vitamínu D, nebo s chorobami tenkého střeva, slinivky břišní, žlučových cest, při celiakii, při úbytku ženských pohlavních hormonů, po menopauze (14).

1.2.4. Příznaky, kterými lze osteoporózu charakterizovat

Časté jsou zlomeniny vertebrální v oblasti bederní a hrudní páteře. Dále nonvertebrální a to fraktury krčku kosti stehenní a zlomeniny dolního předloktí. (3). U dětí trpících celiakií je častým příznakem právě nedostačující nárůst kostní hmoty a vznik osteoporózy v pozdějším věku (26). Nejčastějším problémem však bývá bolest v zádech, kterou způsobují mikrofraktury a komprese těl obratlů. Další příčinou bolestí jsou ischemizace a reflexní spazmy paravertebrálních svalů. To vede dále k vystupňování hrudní kyfozy a bederní i krční lordozy (22).

1.2.5. Jaká rizika a komplikace osteoporóza přináší?

U určité části nemocných se osteoporóza ve skutečnosti nemusí projevit žádnými obtížemi. Přesto choroba může pokračovat a rozvíjet se a prvním projevem může být až některá z typických osteoporotických zlomenin a to vertebrální a nonvertebrální. U osob, které samy netrpí žádnými příznaky je nutno brát v úvahu možnost osteoporózy z rizikových faktorů, mezi ně patří genetická zatíženost v rodině. Genetický faktor je významným faktorem v rozvoji osteoporózy (26).

1.2.6. Celiakie jako mechanismus vzniku osteoporózy

Jsou známy dva mechanismy, které souvisí s celiakií i osteoporózou. Jsou to poruchy střevní absorpce živin a přítomnost chronického zánětu střevní sliznice spojeného s uvolňováním prozánětlivých cytokinů (2).

Při celiakii dochází důsledkem průjmů ke zploštění střevních klků. To je hlavní příčina malabsorpce a s tím spojené poruchy vstřebávání vápníku. Průzkumy uvádí, že 20-50% nově diagnostikovaných pacientů s celiakií trpí úbytkem kostní hmoty. Osteopenie byla však prokázána také u pacientů s velmi dobře zaléčenou celiakií nebo úplně vyléčených. Vědci se domnívají, že k osteoporóze spojené s celiakií dochází nejen při nedostatečné absorpci vápníku, ale hrají zde roli také jiné mechanismy. A to cytokiny, parathormon, estrogeny, androgeny, kortikosteroidy a vitamin D, které stimulují nukleární faktor B-osteoprotegerin. (17).

Zahraniční vědci provedli laboratorní studii týkající se závislosti osteoporózy a celiakie. Shromáždili 30 pacientů s Crohnovou chorobou, jejichž průměrný věk byl 19 až 50 roků s převahou žen (poměr pohlaví 9 žen : 1 muž) . U devíti bylo riziko osteoporózy (kouření, vyhublost – BMI <18,5 kg/m²). Kontrolní skupina 30 osob byla sestavena vzhledem k věku a pohlaví. Průměrná doba do diagnózy celiakie byla 4,1 let a průměrná doba trvání nemoci byla 4,6 roku. V době stanovení diagnózy, byla nedostatečná absorpce uvedena v 73,4% případech. Sérologické testy na celiakii byly pozitivní u všech pacientů. Téměř polovina pacientů (14 případů – 46,6%) měla v séru zvýšen parathormon a kostní markery jako kalcium, anorganický fosfor, chloridy a celkovou bílkovinu. Crosslaps-marker kostní resorpce, byl zvýšen ve 30% případů. Stejně tak markery novotvorby a resorpce kostí byly vyšší u pacientů s celiakií ve srovnání s kontrolami. Hladina vitamínu D v séru neprokazovala žádný významný rozdíl mezi oběma skupinami (31).

1.2.7. Charakteristika struktury a funkce kosti a metabolismus vápníku

Skelet tvoří 15-20% hmotnosti těla. Kostní tkáň vzniká z mezodermu a to jednak přímou přeměnou na kost a jednak přes chrupavčité stadium. Kost má v organizmu trojí funkci. Slouží jako mechanická opora, je homeostatickým orgánem metabolismu minerálů, zejména kalcia a je místem hemopoézy. Kost může plnit tyto životně důležité funkce proto, že je metabolicky velmi aktivní. V kosti probíhá celoživotně stálá přestavba, remodelace, jež spočívá v osteoklastické resorpci a následné osteoblastické kostní tvorbě. Toto funkční spřažení zajišťuje obnovu kosti při zachování její anatomické a strukturální integrity (3, 14).

1.2.8. Složení kosti z makroskopického hlediska

Vnější část, označovaná jako kortikální (kompaktní) kost tvoří zhruba 70% celkového skeletu. Vnitřní část – kost trámčitá (trabekulární) představuje sice menší podíl hmotnosti skeletu, ale pro svou trámčitou strukturu má podstatně větší povrch. Vzhledem k velké ploše je trabekulární kost metabolicky aktivnější. Remodelace kosti neprobíhá ve skeletu paralelně.

Povrch kosti je kryt okosticí (periostem), která je dobře vaskularizována a je metabolicky aktivní (3, 14).

1.2.9. Složení kosti z mikroskopického hlediska

Periost je upevněn k vlastní kosti tzv. Sharpeyovými vlákny. Cévy a nervy procházejí do kosti Volkmannovými kanálky. Vlastní kost je směrem od povrchu ke dřeni složena z kompakty a ze spongyózy. Trabekulární kost je složena z houbovitě uspořádaných trámců (trabekul) čnicích do dřevové dutiny (3, 14).

1.2.10. Rozdělení kostních buněk

Kostní buňky zajišťují metabolickou aktivitu kosti. Jsou to jednak osteoblasty, které tvoří osteoid čili kostní matrix, do níž se ukládají minerální soli, dále osteoklasty, jejichž hlavní funkcí je kostní resorbce a konečně osteocyty, jejichž úloha v remodelaci kostí tkví v jemné regulaci kostní resorbce, čímž doplňují funkci osteoklastů. Osteoblasty i osteoklasty vznikají v kostní dřeni. Osteoblasty pocházejí z mezenchymálních buněk dřevného stromatu, zatímco osteoklasty pocházejí z buněk hemopoetické tkáně stromatu. Zabudováním do vnitřních částí kostí se osteoblasty mění na osteocyty. Ty vytvářejí v kosti jakési syncyrium, propojené kanálky jež obsahují tekutinu (3, 14).

1.2.11. Vápník a jeho metabolismus

Lidský organismus disponuje asi s 25 moly vápníku. Ten je vázán v kostech a zubní sklovině v podobě krystalického hydroxyapatitu. V plazmě se vyskytují tři druhy vápníku:

1. nedifuzibilní – váže se na bílkoviny, především na albumin
2. soli, či komplexy – váže se na citrany, uhličitany, fosforečnany
3. ionizovaný vápník, což je volný kationt Ca^{2+}

Mezi těmito druhy vápníku je rovnováha, která závisí na pH a také na skladbě a koncentraci bílkovin v séru. Biologicky aktivní je ionizovaný vápník. Ten ovlivňuje permeabilitu membrán, krevní srážlivost, svalovou kontrakci a nervosvalovou dráždivost. Denní potřeba vápníku je 20 mmol u dospělé osoby. Jelikož je vápník zásadní při výstavbě kostí, měl by být jeho přísun o polovinu větší v období růstu, těhotenství a laktace. 30% přijatého vápníku je vstřebáváno v trávicím traktu, především v tenkém střevě, za podpory vitamínu D (5). Vstřebávání vápníku ve střevě souvisí také s přítomností sacharidů – laktózy a dalších cukrů. Tento stav je závislý na množství laktózy ve stravě a aktivitě střevní laktázy, která rozkládá laktózu na

glukózu a galaktózu. Při onemocnění tenkého střeva dochází k poškození laktázy, což je enzym nacházející se na vrcholku klků. Při jeho nedostatku dochází k nesnášenlivosti mléka (laktózová intolerance). Tento stav může vést až k dlouhodobému nedostatku vápníku (14). Metabolismus vápníku řídí hormony – parathormon, kalcitonin a vitamin D, v menší míře také kortizol a thyreoidální hormony T3 a T4. Mezi orgány, které se podílí na metabolismu vápníku patří tenké střevo, kosti a ledviny (28).

1.2.12. Parathormon (PTH)

Jedná se o peptid, který je produkován příštítnými tělísky, jsou to 4 tělíška ležící na zadní straně štítné žlázy. Podnětem k jeho sekreci je pokles plazmatické koncentrace Ca^{2+} . Podporuje vyplavení vápníku z kostí. Parathormon také napřímo působí na tenké střevo tak, že podporuje resorpci iontů Ca^{2+} střevní sliznicí (28). Vyplavování parathormonu je řízeno mechanismem jednoduché zpětné vazby – hladinou vápníku v plazmě. To znamená, že zvýšená hladina vápníku sekreci parathormonu tlumí. Snížená hladina naopak sekreci parathormonu stimuluje (21).

1.2.13. Vitamin D

Vitamín D je látka rozpustná v tucích, vzniká v kůži působením slunečního záření. Spíše než o vitamín, jedná se o steroidní hormon. Jeho funkcí je udržení rovnováhy minerálů, hlavně vápníku a fosforu. Dále má velký význam pro funkci nervů, svalů a krevního srážení. Podporuje růst buněk a tvorbu osteokalcinu. Snižuje ztrátu kostní hmoty a výskyt osteoporotických zlomenin. Vitamín D má dvě chemické formy:

Ergokalciferol (vitamín D2) vzniká fotochemicky z ergosterolu v plísňích a houbách při ultrafialovém záření.

Cholekalciferol (vitamín D3) se syntetizuje v kůži za působení UV-záření na provitamin 7-dehydrocholesterol (3, 6, 21).

Vitamín D se přetváří dvěma hydroxylacemi. První probíhá v endoplazmatickém retikulu jaterní buňky, za vzniku kalcidiolu. Druhá probíhá v mitochondriích proximálního tubulu v ledvinách, za vzniku kalcitriolu. Vitamín D se svými metabolity váže v plazmě na specifickou bílkovinu (DBP). Vitamín D ovlivňuje metabolismus vápníku. Ve střevní buňce podporuje tvorbu CaBP, tím reguluje přenos Ca^{2+} střevní buňkou. Jako steroidní hormon působí na spoustu tkání tím, že usnadňuje diferenciaci buněk pomocí intracelulárního Ca^{2+} (3, 6, 21).

1.2.14. Kalcitonin

Kalcitonin hormon a tumorový marker. V souvislosti s osteoporózou inhibuje zvýšenou osteoresorpční aktivitu. Kalcitonin řadíme k peptidovým regulačním působcům. Tvoří se v parafolikulárních C-buňkách štítné žlázy. Je prokázána souvislost kalcitoninu s hormony trávicího ústrojí. Specifické receptory kalcitoninu jsou nejvíce koncentrovány v kostech a tím ovlivňují i kalciový metabolismus. Jeho nejdůležitější funkcí je udržení kalciové homeostázy na buněčné i celkové úrovni. Stimulem sekrece kalcitoninu je zvýšená koncentrace Ca^{2+} v plazmě. Kalcitonin působí ukládání vápníku do kostí a tím snižuje hladinu vápníku v krvi (3, 21, 28).

1.2.15. Vyšetřovací metody při diagnostice osteoporózy

V klinické praxi se k danému účelu využívá celotělová osteodensitometrie. Je neinvazivní, nebolestivá a přitom přesná. Stanovuje kostní hmotu. Měřit lze kdekoli na kostře. Měříme na předem domluvené oblasti, nejčastěji v bederní páteři, předloktí a stehenní kosti (26).

Informuje nás o kostní densitě (bone mineral density, BMD) a o obsahu minerálů (bone mineral contents, BMC). BMD vyjadřuje BMC v poměru k šířce kosti. Hlavní význam měření BMD spočívá ve zhodnocení rizika zlomenin. Metoda využívá absorpci fotonů z rentgenova X-záření nebo radionuklidového zdroje. Radiační zátěž je

minimální (3). Principem této metody je měření úbytku průchodu záření měřenou oblastí (22). Grafické znázornění je vyjadřováno v tzv. T-skore a v Z-skore (3).

Matematickým zpracováním získaných dat je stanovena hustota kostního minerálu v měřené oblasti. Jedná se o statistické údaje: Z-skóre je počet směrodatných odchylek (SD) nad nebo pod střední hodnotou BMD pro jedince stejného věku jako je osoba měřená. T-skóre je počet SD nad nebo pod průměrnou hodnotou BMD pro mladou populaci. Hodnota BMD pod 2, 5 SD je stanovena jako hranice osteoporózy (22).

Další metodou je kvantitativní výpočetní tomografie (QCT). Měření prováděné pouze v oblasti páteře. Jde o metodu posuzující množství absorpce ionizujícího záření kalcifikovanými tkáněmi. Jako referenční standard slouží hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4) v přepočtu na cm^3 kosti. (3). Pomocí QCT měříme objem hmoty bederních obratlů a rozlišujeme podíl trámčité a kortikální kostní hmoty (26).

Rentgenové (RTG) vyšetření se využívá především k porovnání míry osteoporózy. Počítáme při něm podíl kortikální kostní hmoty. Bez doplňujícího vyšetření jej, ale nemůžeme použít k terapii osteoporózy (14, 26).

1.2.16. Kdy osteodenzitometrii indikovat ?

Zahrnujeme sem ženy a muže s podezřením na metabolické kosterní onemocnění. Dále pacienty s poruchami kosterního a kalciofosfátového metabolismu, bez patrných RTG změn, ženy po menopauze, pacienty s mentální anorexií, hypogonadismem, anorexií a zvláště pacienty s chronickými chorobami trávicího traktu a laktózovou intolerancí. Mimo to pacienty s chronickými jaterními a renálními chorobami, s diabetem 1. typu a tyreotoxikózou. Toto vyšetření se rovněž využívá ke sledování účinku léčby osteoporózy a po ortopedických operacích (3).

K diagnostice osteoporózy patří také laboratorní vyšetření. Dělíme je na obecná a speciální. Biochemické parametry stanovujeme ze séra a krve, ale také z moče. Do obecných vyšetření řadíme odpady Ca a P v ranní moči, ale také v moči sbírané za 24 hodin. V krvi stanovujeme krevní obraz a sedimentaci. V séru hladinu celkového Ca, P a ostatních minerálů, dusíkaté katabolity jako jsou urea, kreatinin a kyselina močová.

Významnými ukazateli jsou hladina celkové bílkoviny, albumin, alkalická fosfatáza (odráží aktivitu osteoblastů). Mezi speciální vyšetření patří kyselá fosfatáza (u osteomalacie, kde příčinou je nedostatek vitamínu D v dospělosti). Dále elektroforéza (ELFO) bílkovin, crosslaps, hladina vitamínu D, osteokalcinu a parathormonu. Při trvale vysoké hladině parathormonu dochází k vyplavování vápníku z kostí, to může zapříčinit zvýšené odbourávání kosti a s tím spojené vyšší vylučování vápníku do moči. Vyšetřujeme také hormony štítné žlázy a to především TSH a FT4. (3, 14, 26).

Pro dostatečné posouzení zdravotního stavu pacienta je nutno měřit jednak kosterní markery vypovídající o novotvorbě kosti (osteokalcin, alkalickou fosfatázu), které jsou ve vyšším věku sniženy. A také markery pro odbourávání kosti (kyselá fosfatáza, deoxypyridinolin, části kolagenních řetězců), ty jsou při poklesu pohlavních hormonů zvýšené. Tyto informace velmi dobře doplňují denzitometrické měření. Kontrolní osteodensitometrie se provádí jedenkrát ročně. Kontrolní laboratoř se provádí po 6 měsících od zahájení léčby (3, 14, 26).

1.2.17. Několik způsobů jak léčit osteoporózu

Léčba osteoporózy není jednoduchá. Jestliže je zahájena v pozdní fázi, bývá dlouhodobá a málo úspěšná. Preventivní úlohu by měla mít dietní léčba, bohatá na vápník a bílkoviny. Denní potřeba vápníku u dospělé osoby činí zhruba 1-2 g na kilogram tělesné váhy. Velmi důležitá je léčba fyzickou zátěží, protože k remodelaci kostí a obnově kostní hmoty dochází při zatěžování skeletu. Dále nesmíme opomenout léčbu chorob podporujících vznik a rozvoj osteoporózy, v našem případě celiakie (kdy je na místě přísná dieta) (14).

Nejdůležitější je však medikamentózní léčba, kam patří preparáty vápníku aplikované preventivně i léčebně (při špatném vstřebávání vápníku u zažívacích chorob jako celiakie). Hormonální preparáty a to estrogeny v kombinaci s gestageny. Dále vitamín D jako kausální lék u osteomalacie (měknutí kostí). Substituce vitamínem D musí být kontinuální, ne jednorázová (14).

2. Metodika

Laboratorní část této bakalářské práce jsem prováděla v biochemicko-hematologické laboratoři Stafila, s. r. o. se sídlem v Českých Budějovicích, kde jsem zaměstnána. Laboratoř se dělí na několik úseků – biochemický, hematologický a mikrobiologický. Vedoucí laboratoře je MUDr. Marie Ládová. Za její podpory a svolení jsem měření prováděla na úseku mikrobiologie, kde se provádí mimo jiné i imunologická vyšetření. Vedoucí části mikrobiologie je MUDr. Věra Cihlová, pod jejímž vedením jsem pracovala. Při mé práci na mě také dohlížela laborantka Bc. Šárka Ochozková. Laboratoř Stafila je akreditována Českým institutem pro akreditaci, o. p. s., ČSN EN ISO 15189: 2007. Během roku 2012 jsem provedla analýzu 58 sér. Prováděla jsem screening celiakie a to metody: stanovení protilátky IgA proti tTG a protilátky IgG proti tTG ze séra metodou ELISA-sandwich. Zaměřila jsem se na problém, zda-li souvisí onemocnění celiakií s diagnózou osteoporózy. A to na základě vyšetření sér pacientů s dg: M81-90 (osteoporóza). Tyto vzorky jsem získávala za pomoci MUDr. Ládové, která vede osteologickou ambulanci v Českých Budějovicích a tímto problémem se zabývá již řadu let. Naše laboratoř spolupracuje s lékaři celého Jihočeského kraje a jak jsem již uvedla celiakie je jedním z vyšetření, které se v naší laboratoři provádí.

Sérologické markery celiakie jsem stanovovala enzymo-immunoanalýzou na automatickém analyzátoru Nexgen Four od firmy Test-Line.

Jedná se o plně automatizovaný, otevřený 4-jehlový a 4-destičkový analyzátor. Je možno stanovovat 16 paralelních testů současně v 96 jamkovém formátu. Níže uvádím podrobnější údaje k danému přístroji.

2.1. Specifikace analyzátoru NEXGEN FOUR

- 1 centrálně uložená stanice pro vzorky s možností zpracování až 120 vzorků. Centrální karusel na vzorky se skládá z 8 držáků na zkumavky, označených S1-S8. Každý z držáků obsahuje 15 primárních a 15 předředovacích zkumavek.

- 2 pipetovací robotická ramena – systém DUAL. Každé rameno se skládá ze standardní vyměnitelné špičky a kovové jehly. Každé rameno může zpracovat 2 destičky. Je zde možnost dvoukrokového ředění vzorků. Pipetovací objem je 10-1000 µl. Přesnost pipetování je < 2, 5%.

- 2 zásobníky na plastové špičky

- 4 samostatné inkubátory

- 2 fotometry

- 2 promývací stanice se snímáním hladiny analytu. 6 promývacích roztoků a integrovaný kontejner se senzorem na odpad.

Zařízení využívá software-PC pro Windows XP, obousměrné rozhraní ASTM, XML, provádí archivování výsledků pacientů, kontrolu kvality Levey-Jemings a řídí se pravidly Westgard.

Vlastní kontroly přístroje: analyzátor Nexgen-Four je vybaven vnitřními diagnostickými funkcemi. Toto programové vybavení nám zaručuje, že po spuštění funkce Self-Test budou tyto kontroly automaticky proměřeny. Analyzátor není možno použít k další analýze, pokud dojde k jakékoliv neshodě v měření těchto kontrol.

Kalibrace a kontroly stanovení: analyzátor Nexgen Four je kalibrován výrobcem. Zaškolený pracovník firmy Test-Line, s. r. o. , provádí pravidelnou údržbu a kalibraci minimálně dvakrát ročně. Je však vhodné provádět kalibrace dle vnitřních pravidel laboratoře. A to z důvodu dodržení správné laboratorní praxe (13).

2.2. Princip metody – sendvičová technika ELISA

Jedná se o nekompetitivní (nesoutěživou) enzymoimunoanalýzu. Stanovení protilátek sendvičovou metodou řadíme mezi nejpoužívanější techniky ELISA. Na pevnou fázi je navázán antigen, na nějž se dále váže protilátka. Po důkladném promytí se na takto navázanou protilátku naváže antiglobulin, který je značený enzymem a druhově se liší od stanovované protilátky. Dojde ke vzniku značeného imunokomplexu (na pevnou fázi navázaný antigen + protilátka ze séra pacienta + antiimunoglobulin značený enzymem). Tímto vznikne tzv. sendvič, na němž je založena daná metoda. Následuje další promývání a inkubace. Po přidání substrátu se měří barevný produkt. Intenzita zbarvení produktu je přímo úměrná koncentraci protilátky ve vyšetřovaném séru pacienta. Výsledné zbarvení roztoku měříme fotometricky při vlnové délce 450 nm (6, 9, 19, 30).

2.3. Metodický postup práce

Ve své práci jsem používala imunoenzymatickou soupravu pro stanovení protilátek proti tTG ve třídě IgA a IgG od firmy Test-Line.

Jedná se o metodu stanovení principem sandwich: pevná fáze-antigen-protilátka-značená protilátka. Stěny jamek na mikrotitračních destičkách jsou pokryty rekombinantní lidskou tTG. Značenou protilátkou je zvířecí imunoglobulinová frakce proti lidskému IgA a IgG, konjugovaná křenovou peroxidázou. Peroxidázovou aktivitu stanovujeme substrátem s TMB. Pozitivita (přítomnost protilátek proti tTG) se ukáže modrým zbarvením, které se po přidání zastavovacího roztoku změní na žluté. Intenzita tohoto žlutého zbarvení se měří fotometricky při vlnové délce 450 nm.

EIA souprava pro stanovení protilátek proti tTG ve třídě IgA a IgG od firmy Test Line obsahuje:

- potaženou destičku s navázaným antigenem, uloženou v sáčku se sušidlem,

- negativní kontrolu (Kal 1). Jedná se o lidské sérum bez protilátek proti tkáňové transglutamináze v ředěném stavu (2 ml),
- Cut-Off (Kal 2), jedná se o lidské sérum obsahující protilátky proti tkáňové transglutamináze v hraniční koncentraci (2 ml),
- pozitivní kontrolu (Kal 3), jedná se o lidské sérum s protilátkami proti tkáňové transglutamináze (2 ml),
- kalibrátor (Kal 4), jde o lidské sérum s protilátkami proti tkáňové transglutamináze,
- konjugát: zvířecí imunoglobulin proti lidskému IgA a IgG, značený křenovou peroxidázou (15 ml),
- ředící roztok vzorků 2 × (55 ml),
- TMB- complete -chromogenní substrátový jednosložkový roztok s vodou (H₂O) a TMB (14 ml),
- 20 × koncentrovaný promývací roztok 2 × (75 ml),
- zastavovací roztok s kyselinou sírovou 1 mol/l (15 ml).

Na soupravě je uvedena doba expirace, která je platná při skladování při +2 až +8 °C. Souprava nesmí zmrznout (9, 30).

2.3.1. Příprava pracovních roztoků

- reagentie necháme vytemperovat na laboratorní teplotu a důkladně promícháme,
- koncentrovaný promývací roztok ředíme v poměru 1:19 destilovanou H₂O. Po naředění je stabilní 1 týden.
- kalibrátory, konjugát a TMB jsou připraveny k práci, již se neředí (9, 30).

2.3.2. Příprava a ředění vzorků k analýze

– důkladně promíchaná séra se ředí 1:100 ředícím roztokem vzorků. To znamená, že na 10 µl vzorku-séra přidáme 1000 µl ředícího roztoku vzorků. Je důležité řádné promíchání. Po naředění jsou vzorky stabilní nejdéle 24 hodin.

– vzorky je třeba skladovat při +2 až +8 °C po dobu maximálně 4 dnů. Jestliže má být skladovací doba delší, je třeba vzorky zamrazit na -20 °C.

Protilátky stanovujeme semikvantitativně, nebo kvantitativně (9, 30).

2.3.3. Pracovní postup

Níže popsaný pracovní postup je pro ruční analýzu, kterou se celiakie vyšetřovala v naší laboratoři dříve, než byl zakoupen analyzátor Nexgen Four. V současné době je tento pracovní postup i s časy inkubací naprogramován v analyzátoru, který si jej sám provádí.

1a) Pro semikvantitativní vyhodnocení indexem positivity.

- jamka A1: pipetujeme 100 µl Ředícího roztoku vzorků –Blank,
- jamka A2: pipetujeme 100 µl Negativní kontroly (Kal 1),
- jamka A3, A4 : pipetujeme 100 µl Cut-Off kontroly (Kal 2),
- jamka A5 : pipetujeme 100 µl Pozitivní kontroly (Kal 3),
- do zbývajících jamek pipetujeme 100 µl testovaných vzorků ředěných 1:100.

1b) Pro kvantitativní vyhodnocení v U/ml.

- jamka A1: pipetujeme 100 µl Ředícího roztoku vzorků – Blank,
- jamka A2 : pipetujeme 100 µl Negativní kontroly (Kal 1),
- jamka A3, A4 : pipetujeme 100 µl Cut-Off kontroly (Kal 2),
- jamka A5, A6 : pipetujeme 100 µl Pozitivní kontroly (Kal 3),
- jamka A7, A8 : pipetujeme 100 µl Kalibrátoru (Kal 4),

- do zbývajících jamek pipetujeme 100 µl testovaných vzorků ředěných 1:100.
- 2. Takto rozpipetovanou destičku přikryjeme víčkem a necháme inkubovat 30 minut při +37 °C.
- 3. Po inkubaci se obsah jamek odsaje a 4 × promyje pracovním promývacím roztokem. Jamky se plní 300 µl. Nakonec se důkladně vyklepou zbytky roztoku do svého materiálu.
- 4. Do všech jamek se napipetuje 100 µl Konjugátu.
- 5. Destička se opět přikryje víčkem a nechá se inkubovat 30 minut při +37 °C.
- 6. Po inkubaci se obsah jamek odsaje a 4× promyje pracovním promývacím roztokem. Jamky se plní 300 µl. Na konec se důkladně vyklepou zbytky roztoku do svého materiálu.
- 7. Do všech jamek se napipetuje 100 µl jednosložkového substrátu TMB-Complete.
- 8. Destička se přikryje víčkem, vloží do termostatu a inkubuje se 15 minut při +37 °C v temnu.
- 9. Přidáním 100 µl Zastavovacího roztoku ve stejném pořadí jako byl dávkován TMB-Complete se zastaví reakce.
- 10. Do 30 minut po zastavení reakce se změří intenzita zbarvení roztoků v jamkách proti jamce A1(blank), při vlnové délce 450 nm pomocí fotometru (9, 30).

2.3.4. Validita testu

Naměřené výsledky jsou platné v případě když:

- absorbance blanku je menší než 0,150,
- absorbance Negativní kontroly je menší než 0,200,
- absorbance Cut-Off je v rozmezí 0,200-0,600 a větší jak absorbance Negativní kontroly,

- absorbance Pozitivní kontroly je více jak 3,5 násobek průměrné absorbance Cut-Off a méně jak absorbance Kalibrátoru (9, 30).

2.3.5. Interpretace výsledků

Výpočet indexu pozitivity (IP)-absorbance testovaného vzorku se vydělí průměrnou absorbancí Cut-Off (naměřenou v téže sérii vyšetření)

Interpretace výsledků měření:

- IP menší než 0,9 = negativní,
- IP 0,9 až 1,1 = hraniční,
- IP větší než 1,1 = pozitivní.

Hraniční výsledek měření je potřeba opakovat za 3-6 týdnů a to formou nového odběru vzorku.

Kvantitativní vyhodnocení v jednotkách (U/ml)

Toto vyhodnocení spočívá v sestrojení kalibrační křivky. Na osu X se nanese koncentrace kalibrátorů v U/ml. Na osu Y se nanesou odpovídající absorbance. Takto získané body se spojí v křivku. Hladina protilátek v analytech (U/ml) se stanoví odečtem těchto hodnot z dané kalibrační křivky (9, 30).

2.4. Průběh vlastního měření

U všech kroků, které jsem během měření provedla, jsem postupovala dle standardních operačních postupů laboratoře Stafila, s. r. o. Práci jsem započala na příjmu materiálu, který je společný pro všechny úseky laboratoře Stafila. Pracovník svozu přivezl materiál, který jsem roztřídila. Přiřadila jsem žádanky k odebranému materiálu dle jména, příjmení a rodného čísla. Takto roztříděný materiál je zadán do počítače pracovníky k tomu vyškolenými. Naše laboratoř pracuje s počítačovým programem Infolab. Po zadání žádanky do systému byl vytištěn čárový kód, který jsem nalepila na zkumavku a na příslušnou žádanku. Takto zanesená data s požadovanými

vyšetřeními jsou systémem Infolab dále předány na konkrétní úseky laboratoře, kde se dále vyšetřují již pod čárovými kódy. Práce na příjmu je velice důležitá a je potřeba, aby zde pracovali lidé velice pečliví a zodpovědní. Když se zde stane chyba při rozdělování a zadávání, tak se velice obtížně odhaluje a může to ohrozit především pacienta. V naší laboratoři máme svědomité zaměstnance a proto máme také minimální reklamace ze strany spolupracujících lékařů.

Zkumavky s čárovými kódy jsem odnesla odstředit. Séra se centrifugují 10 minut při 3000 otáčkách za minutu (vyobrazení centrifugy je v příloze 2). Po ukončení centrifugace jsem zkumavky slila. To znamená, že jsem oddělila odstředěné sérum od krevní masy. Sérum jsem odlila do zkumavek s totožným čárovým kódem, který je shodný s primární zkumavkou. Dále jsem séra ve stojánku odnesla na úsek mikrobiologie, kde jsem měření prováděla (viz příloha 3).

Takto získané vzorky jsem uzavřela víčkem a uložila do lednice. Screening celiakie provádíme jednou za dva až tři dny. Jde o vyšetření, které není rutinní a každý den není takové množství materiálu, které by pokrylo náklady spojené s tímto vyšetřením. Séra uchováváme v lednici při teplotě +2 až +8 °C po dobu nejdéle 4 dnů. Při delším skladování je nutno séra zamrazit na -20 °C.

Provedla jsem měření protilátek proti tTG ve třídě IgA a IgG ze séra, metodou ELISA-sandwich, kvantitativním vyhodnocením v U/ml, na automatickém analyzátoru-fotometru Nexgen-Four od firmy Test-Line.

Screenink celiakie v laboratoři Stafila se skládá z několika vyšetření a to stanovení:

- protilátek proti tTG ve třídě IgA,
- protilátek proti tTG ve třídě IgG,
- protilátek proti gliadinu ve třídě IgA,
- protilátek proti gliadinu ve třídě IgG,
- protilátek proti endomysiu ve třídě IgA.

Stanovovala jsem protilátky proti tTG ve třídě IgA a IgG u dospělých, protože dle odborníků tyto protilátky mají při diagnostice celiakie největší výpovědní hodnotu.

Specifičnost protilátek IgA a IgG proti gliadinu je ve srovnání s protilátkami proti tTG IgA, IgG výrazně nižší. Protilátky proti gliadinu mohou být ale naopak jediným sérologickým markerem celiakie u novorozenců a malých dětí (25).

Ráno jsem zapnula analyzátor Nexgen Four, který má vlastní počítač s ovládacím softwarem. Je propojen s laboratorním počítačem. Po spuštění se aktivuje operační program analyzátoru a počítače. Dále jsem pustila údržbu, během které se analyzátor inicializuje a provede kontrolu všech systémových nástrojů a proplach pomocí destilované H₂O, která se doplňuje podle potřeby během práce a po ukončení měření. (Fotografii analyzátoru Nexgen Four dokládám v příloze 5).

Dále jsem si vyndala séra z lednice a nechala je vytemperovat na pokojovou teplotu.

Společně se vzorky jsem si vyndala z lednice sety pro vyšetření protilátek proti tTG ve třídě IgA a protilátek proti tTG ve třídě IgG od firmy Test-Line. Nechala jsem je také vytemperovat na laboratorní teplotu.

Analyzátor je propojen s laboratorní databází Infolab. V programu Load and status session, ve kterém se pracuje, jsem si zvolila panel do kterého jsem přenesla z Infolabu soubor pacientů, který jsem vyšetřovala. Počet připravených vzorků z lednice souhlasil se vzorky zadanými v počítači.

V analyzátoru je v každém příslušném panelu naprogramováno umístění reagensů pro tu příslušnou metodu. Reagencie jsou umístěny v panelech určených pro jednotlivé metody.

Po vytemperování a řádném promíchání všech potřebných reagensů, jsem je umístila dle programu na určené panely pro tTG IgA a IgG. Na každý panel jsem umístila lahvičky s negativní kontrolou, pozitivní kontrolou, Cut-Off, kalibrátorem, konjugátem, ředícím roztokem vzorků, TMB-Complete 3, promývacím roztokem a zastavovacím roztokem, náležící každé metodě. V tomto vyšetření má každá třída

protilátek svůj ředící roztok. Každý panel má své reagentie ze svého setu. Tyto panely jsem vložila na určené místo do analyzátoru.

Po takovéto přípravě reagentií jsem jako další krok provedla přípravu destiček, ve kterých celá analýza probíhá. Destičky jsou součástí každého setu. Do destiček jsem vložila potřebný počet stripů potažených rekombinantní lidskou tTG s navázaným antigenem. Stripy nesmí zvlhnout, proto jsou v setu hermeticky uzavřeny se sušidlem. (Ukázku panelu s reagentiemi a destičky se stripy dokládám v příloze 4).

Dle schématu v počítači jsem umístila stripy na dvě destičky – pro analýzu IgA a IgG protilátek. Počet stripů na každé destičce se odvíjí od počtu vyšetřovaných pacientů. Na první pozici je vždy na destičce umístěn strip který slouží pro kontrolní roztoky, jež jsou blank, negativní kontrola, Cut-Off, pozitivní kontrola a kalibrátor. Další stripy již slouží pro vyšetřované vzorky. Nejvýhodnější je vyšetřovat soubor pacientů dělitelný osmi. Takto připravené destičky jsem vložila do analyzátoru na pozice pro ně určené (viz. příloha 6).

Dále jsem si v programu Load and status session vyhledala rozmístění zkumavek se séry pacientů pro každou metodu. Dle tohoto schématu jsem rozmístila séra na příslušné pozice do karuselů (viz. příloha 7). Ke každému séru náležely dvě předředovací zkumavky. Analyzátor si v těchto prázdných zkumavkách nařídil vzorky 1:100, to znamená 10 μ l vzorku-séra +1000 μ l ředícího roztoku vzorků. Koncentrovaný ředící roztok ředíme v poměru 1:19 destilovanou H₂O. Po naředění je stabilní 1 týden.

Po těchto krocích byl analyzátor s roztoky a séry připraven k práci. Vše jsem ještě jednou zkontrolovala a odstartovala příkazem Run.

Analyzátor provádí vlastní analýzu sám. To znamená, že si nejprve nařídí vyšetřovaná séra v prázdných zkumavkách v karuselu v poměru 1:100 s ředícím roztokem vzorků. Napipetuje kontrolní vzorky do mikrotitračních destiček. Dále předředěná séra rozpipetuje po 100 μ l na určená místa v mikrotitračních destičkách. Dále analyzátor provádí kroky popsané výše pro kvantitativní vyhodnocení v U/ml. Inkubační časy a teploty má také přesně naprogramovány. Analýza probíhá zhruba 2 hodiny. Končí po přidání zastavovacího roztoku, který způsobí zastavení reakce

v analytu. Dojde ke změně intenzity zbarvení vzorku (viz příloha 8). Tato se fotometricky změří v jamkách proti jamce A1(blank), při vlnové délce 450 nm. Konec měření nám oznámí zvuková signalizace.

Po zaznění signalizace o ukončení měření jsem v programu Load and status session otevřela soubor s naměřenými daty – protilátky proti tTG ve třídě IgA a ve třídě IgG. Ke každé metodě se také zobrazily hodnoty negativních a pozitivních kontrol a hodnoty Cut-Off. A dále se zobrazila kalibrační křivka pro každou metodu: na osu X se nanesly koncentrace kalibrátorů v U/ml. Na osu Y se nanesly odpovídající absorbance kontrol. Takto získané body se spojily v křivku. Hladina protilátek v analytech (U/ml) byla stanovena odečtem těchto hodnot z dané kalibrační křivky. Dané metody mají rozdílné křivky.

Naměřené výsledky jsou platné v případě, když: absorbance blanku je menší než 0,150, absorbance negativní kontroly je menší než 0,200, absorbance Cut-Off je v rozmezí 0,200-0,600 a větší jak absorbance negativní kontroly, absorbance pozitivní kontroly je více jak 3,5 násobek průměrné absorbance Cut-Off a méně než absorbance kalibrátoru.

Pokud naměřené hodnoty odpovídají podmínkám výše zmíněným, je test označen jako validní a můžeme použít výsledky patřící vyšetřované sérii vzorků. U měření, která jsem provedla byly kontrolní testy vždy validní.

Pod tímto hodnocením se zobrazila tabulka s výsledky měřených vzorků. U každého vzorku byl výsledek vyjádřen číselně (U/ml) a slovně (negativní, hraniční, pozitivní).

Takto naměřené výsledky byly z počítače analyzátoru automaticky přeneseny do systému Infolab, tam se přiřadily k příslušnému pacientovi. Dále došlo ještě ke kontrole lékařem a po odsouhlasení byly vytištěny a odeslány pomocí svozové služby k lékaři, který toto vyšetření požadoval. Některým lékařům byly výsledky odeslány také elektronicky.

3. Výsledky

Výsledky laboratorního měření stanovení hladiny protilátek proti tTG IgA a IgG

Mé měření spočívalo v analýze 58 vzorků sér pacientů s prokázanou osteoporózou, tedy diagnózou M 81-90. Vzorky sér jsem získala od mé vedoucí práce MUDr. Marie Ládrové, která již řadu let léčí ve své osteologické ordinaci pacienty s osteoporózou. Měření jsem prováděla metodou ELISA-sandwich na imunologickém analyzátoru Nexgen Four. Ze screeningu celiakie jsem volila stanovení protilátek proti tTG ve třídě IgA a IgG z toho důvodu, že dle odborníků jako například Fojtíka, 2009 mají tyto protilátky spolu s antiendomysialními protilátkami nejvyšší výpovědní hodnotu při diagnostice celiakie. Každé sérum bylo od jiného pacienta.

Výsledky měření jsem zanesla do tabulky číslo 1., ve které uvádím naměřené hodnoty hladiny protilátek proti tTG ve třídě IgA a IgG. Vzorky jsem očíslovala 1 až 58 a pod každý jsem uvedla rok narození pacienta a to proto, že jsem chtěla zjistit jaké věkové kategorie se pozitivita celiakie při onemocnění osteoporózou týká. Výsledky měření jsem udala kvantitativně (U/ml) a kvalitativně (pozitivní, negativní a hraniční). Pozitivní a hraniční hodnoty jsem označila tučně. Z důvodu ochrany soukromých dat pacientů, jsem neuváděla jména ani rodná čísla.

Mezní hodnoty hladiny protilátek proti tTG IgA a IgG

- Méně jak 18 (U/ml) = negativní.
- V rozmezí 18 až 22 (U/ml) = hraniční.
- Více jak 22 (U/ml) = pozitivní.

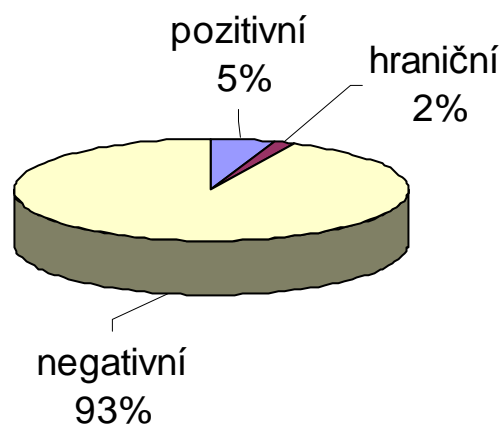
Tabulka č. 1: kvantitativní vyjádření hladiny protilátek proti tTG IgA a IgG (U/ml)
v sérech pacientů s prokázanou osteoporózou.

Protilátky proti tkáňové transglutamináze IgA a IgG (0, 00 – 17, 99) U/ml
Séra pacientů s prokázanou osteoporózou-Dg M 81-90

Číslo vzorku	Hodnota tTG IgA	Hodnota tTG IgG	Číslo vzorku	Hodnota tTG IgA	Hodnota tTG IgG
Ročník			Ročník		
1.	2, 58	3, 59	30.	88, 94	90, 05
1970	negativní	negativní	1976	pozitivní	pozitivní
2.	22, 45	25, 06	31.	1, 04	2, 08
1978	pozitivní	pozitivní	1946	negativní	negativní
3.	4, 89	5, 25	32.	1, 87	5, 09
1969	negativní	negativní	1975	negativní	negativní
4.	11, 64	7, 91	33.	0, 00	4, 41
1939	negativní	negativní	1957	negativní	negativní
5.	2, 11	4, 06	34.	3, 35	5, 58
1941	negativní	negativní	1956	negativní	negativní
6.	0, 59	1, 08	35.	0, 00	0, 08
1982	negativní	negativní	1976	negativní	negativní
7.	0, 07	3, 06	36.	0, 86	0, 95
1944	negativní	negativní	1954	negativní	negativní
8.	5, 18	7, 01	37.	0, 18	7, 59
1944	negativní	negativní	1939	negativní	negativní
9.	0, 64	3, 68	38.	4, 06	5, 27
1945	negativní	negativní	1979	negativní	negativní
10.	5, 00	2, 46	39.	5, 80	7, 06
1946	negativní	negativní	1946	negativní	negativní
11.	6, 43	2, 48	40.	0, 01	1, 04
1948	negativní	negativní	1977	negativní	negativní
12.	2, 80	4, 05	41.	4, 49	7, 56
1945	negativní	negativní	1970	negativní	negativní
13.	4, 83	7, 01	42.	2, 56	4, 38
1945	negativní	negativní	1961	negativní	negativní
14.	0, 00	0, 08	43.	0, 46	2, 31
1950	negativní	negativní	1960	negativní	negativní
15.	3, 42	7, 08	44.	2, 09	5, 97
1953	negativní	negativní	1957	negativní	negativní
16.	2, 51	5, 09	45.	2, 57	3, 60
1957	negativní	negativní	1960	negativní	negativní
17.	0, 01	0, 22	46.	0, 75	11, 64
1968	negativní	negativní	1948	negativní	negativní

Číslo vzorku	Hodnota tTG IgA	Hodnota tTG IgG	Číslo vzorku	Hodnota tTG IgA	Hodnota tTG IgG
Ročník			Ročník		
18.	0, 50	1, 48	47.	7, 46	11, 34
1949	negativní	negativní	1956	negativní	negativní
19.	0, 06	4, 32	48.	5, 82	9, 38
1952	negativní	negativní	1943	negativní	negativní
20.	8, 24	12, 29	49.	22, 22	33, 02
1973	negativní	negativní	1978	pozitivní	pozitivní
21.	4, 54	17, 48	50.	4, 28	9, 11
1970	negativní	negativní	1982	negativní	negativní
22.	4, 32	9, 06	51.	4, 08	7, 25
1939	negativní	negativní	1938	negativní	negativní
23.	3, 93	10, 21	52.	1, 48	8, 80
1959	negativní	negativní	1939	negativní	negativní
24.	6, 03	5, 89	53.	2, 59	4, 40
1963	negativní	negativní	1979	negativní	negativní
25.	2, 79	5, 17	54.	10, 94	17, 35
1964	negativní	negativní	1984	negativní	negativní
26.	1, 30	4, 48	55.	3, 43	2, 25
1985	negativní	negativní	1960	negativní	negativní
27.	2, 55	14, 53	56.	3, 60	5, 68
1979	negativní	negativní	1963	negativní	negativní
28.	0, 16	1, 74	57.	6, 59	7, 28
1965	negativní	negativní	1984	negativní	negativní
29.	1, 08	0, 01	58.	19, 06	21, 30
1976	negativní	negativní	1962	<i>hraniční</i>	<i>hraniční</i>

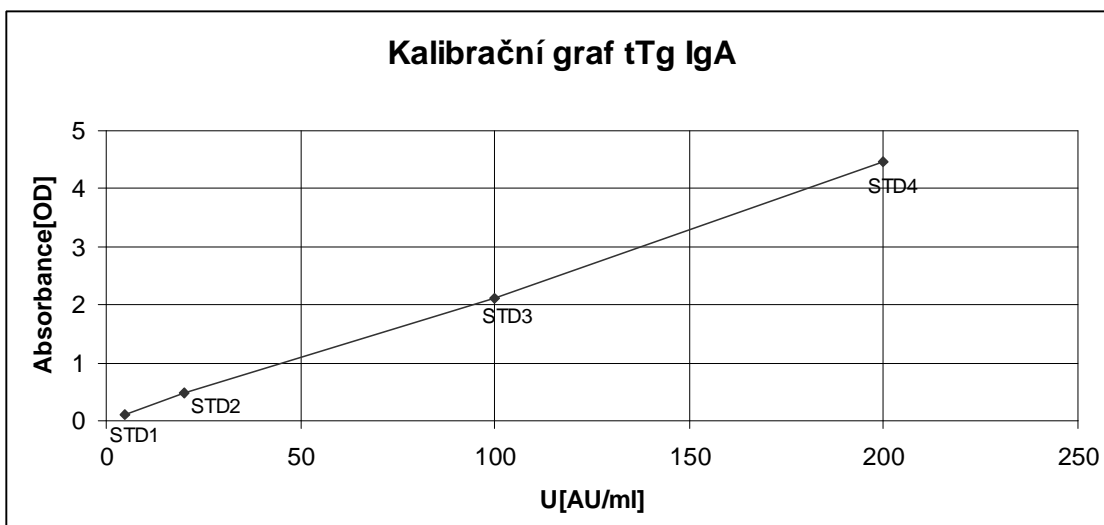
Procentuální vyjádření stanovení protilátek proti tkáňové transglutamináze IgA a IgG v séru u pacientů s prokázanou osteoporózou



Graf č. 1: Procentuální vyjádření výsledků stanovení hladiny protilátek proti tTG IgA a IgG v séru u pacientů s prokázanou osteoporózou

Poznámka: Graf č. 1 udává procentuální rozdělení pozitivních, hraničních a negativních výsledků z celkového počtu 58 vzorků.

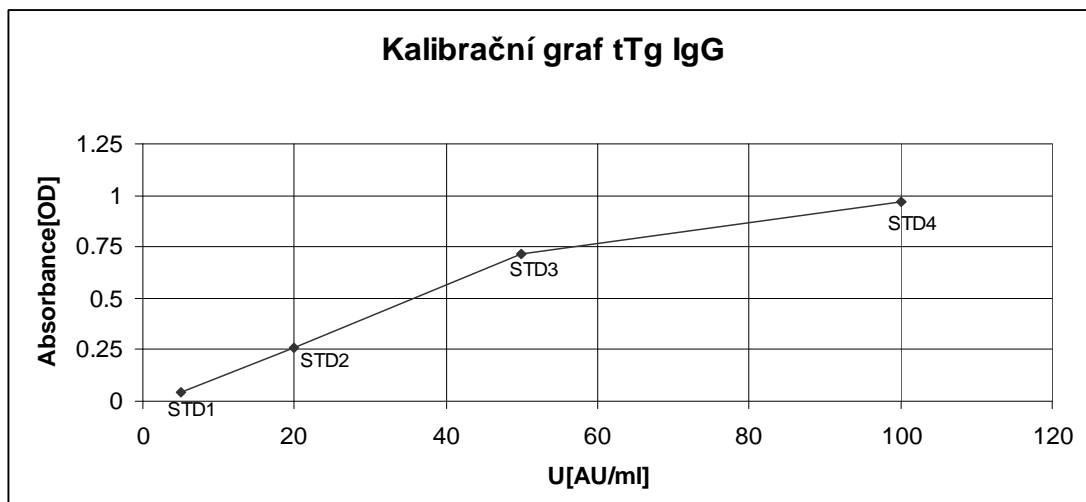
Správnost naměřených hodnot dokládám kalibračními grafy pro tTG, IgA a IgG a tabulkami s naměřenými absorbancemi kontrol. Kalibrační grafy a tabulky jsem zanesla k výsledkům měření. Před každou analýzou jsem provedla měření kontrolních vzorků, na základě kterého je v programu analyzátoru sestrojen kalibrační graf. Pokud by naměřené hodnoty kontrol neodpovídaly požadovaným hodnotám, tak je další měření neplatné a musí se i s kontrolami opakovat. U naměřených vzorků, které jsem v průběhu roku zpracovávala, byly kalibrační grafy a absorbance kontrol u obou metod tTG IgA a IgG validní a tudíž i naměřené výsledky objektivní. V této práci jsem použila na ukázkou dva kalibrační grafy a dvě tabulky z mého měření. Kalibrační křivky jsem sestrojila tak, že na osu X jsem nanesla naměřené koncentrace kalibrátorů v U/ml a na osu Y odpovídající absorbance. Získané body jsem spojila křivkou. Ráda bych popsala také hodnoty v tabulkách pod kalibračními grafy. BLANK je slepá kontrola, jejíž absorbance musí být méně jak 0,150 a odečítá se od všech ostatních kontrol. STD1 je negativní kontrola jejíž absorbance musí být vždy menší jak 0,200. STD2 je CUT-OFF, který je průměrem absorbancí CUT-OFF1 a CUT-OFF2. Absorbance STD2 musí být v rozmezí 0,200 až 0,600. STD3 je pozitivní kontrola, což je průměr pozitivních kontrol 1 a 2. Absorbance STD3 musí být větší jak 3, 5 násobek průměrné absorbance CUT-OFF. STD4 je kalibrátor, jehož absorbance je průměrem kalibrátorů 1 a 2. Absorbance STD4 musí být větší jak hodnota STD3. Hladinu protilátek ve vzorcích (U/ml) stanovujeme odečtem těchto absorbancí z kalibrační křivky. Každá metoda tTG, IgA a IgG má jiný tvar kalibrační křivky.



Kalibrační graf č. 2 vztahu hodnot mezinárodních jednotek [U] tTG IgA na absorbanci vzorků

Tabulka č. 2 – vlastní naměřené hodnoty kontrol pro metodu tTG IgA

Kontrola	Typ kontroly	Absorbance [OD]	Koncentrace kalibrátoru [AU/ml]
BL	Blank	0,045	0
STD1	Standard	0,101	5
STD2 (1/2)	Standard	0,461	19,497
STD2 (2/2)	Standard	0,486	20,651
STD2	Standard-průměr	0,474	20
STD3 (1/2)	Standard	1,953	97,032
STD3 (2/2)	Standard	2,067	102,334
STD3	Standard-průměr	2,010	100
STD4(1/2)	Standard	4,410	198,280
STD4 (2/2)	Standard	4,494	201,720
STD4	Standard-průměr	4,452	200



Kalibrační graf č. 3 vztahu hodnot mezinárodních jednotek [U] tTG IgG na absorbanci vzorků

Tabulka č. 3 – vlastní naměřené hodnoty kontrol pro metodu tTG IgG

Kontrola	Typ kontroly	Absorbance [OD]	Koncentrace kalibrátoru [AU/ml]
BL	Blank	0,061	0
STD1	Standard	0,045	5
STD2 (1/2)	Standard	0,244	19,014
STD2 (2/2)	Standard	0,272	20,925
STD2	Standard-průměr	0,258	20
STD3 (1/2)	Standard	0,702	49,339
STD3 (2/2)	Standard	0,722	51,938
STD3	Standard-průměr	0,712	50
STD4(1/2)	Standard	0,967	99,419
STD4 (2/2)	Standard	0,973	100,581
STD4	Standard-průměr	0,970	100

4. Diskuze

Dle Kotalové, 2009 (16) je celiakie onemocnění, kterému se v dřívějších dobách nevěnovala příliš velká pozornost. V současnosti máme díky rozvoji vědy a stále nových laboratorních vyšetření a poznatků větší zkušenosti s tímto onemocněním. Víme již, že s celiakií souvisí spousta druhotných onemocnění a příznaků, které by se neměly podceňovat. Tato problematika mě zaujala a proto jsem se rozhodla provést výzkum souvislosti celiakie s osteoporózou. Dle Kotalové a Nevorala, 2002 (23) vzniká osteoporóza druhotně při onemocnění celiakií a to nedostatečným vstřebáváním minerálů, vápníku, hořčíku, vitamínu D a bílkovin z poškozené střevní sliznice. Příznaky mohou mít plíživý nebo nevýrazný charakter a pacient dlouhou dobu neví, že je nemocný. Teprve silící potíže ho dovedou k odborníkovi, který diagnostikuje osteoporózu. Ve článku Gliadin + transglutamináza autoprotilátky, nemocnice Šternberk, 2009 (25) se udává že u pacientů s aktivní celiakií jsou pozitivní protilátky proti aktivované tTG ve třídě IgA téměř u 100% onemocnění. Z mé tabulky naměřených hodnot č. 1 je patrné, že z 58 zkoumaných vzorků osteoporotických pacientů jsou 3 vzorky pozitivní na průkaz celiakie, tedy mají hodnotu hladiny protilátek tTG IgA a IgG vyšší jak 22 U/ml. 1 vzorek má hraniční hodnoty, to znamená, že jsou protilátky proti tTG IgA a IgG v rozmezí 18 až 22 U/ml. Dle EIA metodického návodu je potřeba hraniční výsledek měření opakovat za 3-6 týdnů a to formou nového odběru vzorku. Současně se ukázalo, že úspěšnost záchytu pacientů s indikovanou celiakií podle výše uvedených markerů je závislá na věku vyšetřovaných osob (pozitivní výsledky jsem naměřila u pacientů narozených v roce 1976 a 1978, tj. stáří 35-37 let. Hraniční výsledek měl pacient narozený v roce 1962).

Odhady z dřívější doby o prevalenci celiakie s osteoporózou, které udávaly hodnoty 1:300 jsou dnes již dle Fojtíka, 2009 podhodnoceny (10). A to z důvodu dřívějšího nedostatečného vědění o spektru choroby a její klinice. Dle nejnovějších screeningových programů se v Evropě a USA udává prevalence celiakie a osteoporózy 1:70 až 550 (10). Palička ve svém článku uvádí, že o souvislosti celiakie s osteoporózou existuje dostatek dat, která se ale číselně dosti liší (27).

V grafu č. 1 jsem naměřené hodnoty protilátek proti tTG ve třídě IgA a IgG vyjádřila procentuálně. Z 58 měřených vzorků byly 3 vzorky pozitivní, což představuje 5% a 1 vzorek hraniční, což představuje 2%. Mé výsledky se liší od výzkumu, který byl proveden v roce 2012 v regionu severní a střední Moravy. Tam bylo zjištěno, že u osteoporotických pacientů se celiakie vyskytla ve 2,4% případů. Sledováno bylo 40000 osob s osteoporózou, anémií a dermatitis herpetiformis. Ve své analýze jsem vycházela z dostupnosti zkoumaného materiálu a možností naší laboratoře. Musíme brát v úvahu, že průzkum na Moravě byl prováděn u daleko více osob a také stravovací návyky, životospráva a genetické predispozice těchto osob se mohly lišit od pacientů v našem regionu. Jak již bylo řečeno údaje jednotlivých výzkumů se od sebe dosti liší. Například Fojtík, 2009 (10) udává výskyt osteopenie u 18 až 24% pacientů s celiakií. Osteopenie byla však prokázána také u pacientů s velmi dobře zaléčenou celiakií nebo úplně vyléčených.

Dle Paličky (27) některá data udávají, že při záchytu celiakie trpí 1/3 pacientů osteoporózou. Opačný pohled na problém, jak častý je výskyt nedidiagnostikované celiakie u osteoporotických pacientů, je ještě složitější. A to z důvodu, že celiakie u pacientů s osteoporózou má ještě další příznaky jako jsou nevysvětlitelná sekundární hyperparathyreóza, malabsorpce, anémie (27). Nevoral a Kotalová, 2002 (23) se ve svém článku mimo jiné zmiňují o souvislosti celiakie s hypochromní anémií z nedostatečného vstřebávání železa, která na léčbu nereaguje. V této souvislosti bych ráda popsala dva zajímavé případy vyšetření celiakie, které mi poskytla MUDr. Ládová ze své hematologické ordinace.

V prvním případě byl v roce 2007 do hematologické ambulance odeslán pacient ve věku 37 let. Již při nástupu do vojenské služby mu byla zjištěna mikrocytární anémie s nízkou hladinou železa v séru. Pacient byl hospitalizován v ústřední vojenské nemocnici, kde byla provedena sternální punkce. Železo bylo podáváno parenterálně a metabolismus železa se znormalizoval. V roce 2007 laboratorní testy prokázaly pozitivitu protilátek proti tTG IgA a IgG. Při perorálním podávání železa se nedařilo udržet KO v normě ani hladinu železa v séru. Parenterální podávání železa však vedlo vždy k normalizaci KO i hladiny železa v séru. Protože pacient odmítl držet

bezlepkovou dietu a perorální léčba železem nebyla účinná, byl nemocný předán do péče hematologického oddělení v nemocnici. V současné době je problém s podáváním parenterální formy železa v ambulancích. Tento způsob podání je povolen pouze nemocnicím.

Ve druhém případě byla v květnu roku 2012 do hematologické ambulance k MUDr. Láďové odeslána pacientka ve věku 51 let pro lehkou makrocytární anémii spojenou s únavovým syndromem, průjmy a váhovým úbytkem. Laboratorní testy prokázaly deficit vitamínu B12 a kyseliny listové. Dále byly zjištěny vysoce pozitivní protilátky proti tTG IgA, gliadinu IgA a endomysiu IgA. Závěr byl: celiakie s plně rozvinutým obrazem malabsorpce, sekundární hyperparathyreózou a nedostatkem vitamínu B 12. Pacientce byla nařízena přísná bezlepková dieta, po které se cítí lépe.

Z mnoha odborných studií je známo, že celiakie kromě osteoporózy souvisí i s řadou dalších onemocnění. Ve svých člancích toto zmiňují například Kotalová (16), nebo Nevoral (23). Dovolila jsem si proto pro zajímavost a na doplnění mé práce zpracovat přehled diagnóz, které byly spojeny s pozitivními výsledky vyšetření celiakie. V průběhu roku 2012 jsme v Laboratoři Stafila, s. r. o. na úseku mikrobiologie vyšetřili 537 sér na screening celiakie. Stanovovány byly protilátky proti tTG ve třídě IgA, IgG a gliadinu ve třídě IgA a IgG. Vyšetření byla prováděna dle požadavků ošetřujících lékařů na žádankách. Z 537 sér bylo 38 sér pozitivních na celiakii a 4 séra měla hraniční výsledek. 10 pacientů s diagnózami třídy **K** - nemoci trávicí soustavy mělo pozitivní hodnoty vyšetření celiakie. 8 pozitivních výsledků se pojilo s diagnózami třídy **L** - nemoci kůže a podkožního vaziva. 7 pozitivit bylo naměřeno u diagnóz ve třídě **R** - jiná neurčená břišní bolest. 5 pacientů s diagnózami **Z** - faktory ovlivňující zdravotní stav mělo také pozitivní výsledky. 5 pozitivit bylo naměřeno též u diagnóz **J** - nemoci dýchací soustavy. A jeden pozitivní výsledek se vyskytl u diagnóz ve třídě **A** - infekční a parazitární nemoci, **D** - nemoci krve a imunity, **E** - nemoci endokrinní a metabolické. Hraniční výsledky byly naměřeny 4 a to: 3 u diagnóz třídy **R** a 1 ve třídě **Z**. Výsledky dokládám v příloze 1- tabulkou č.4: přehled diagnóz pojících se s pozitivními výsledky screeningu celiakie. Do tabulky jsem zanesla pozitivní výsledky měření, diagnózu a rok narození pacienta.

Daleko důležitější je však to, že se potvrdila hypotéza o souvislosti osteoporózy s celiakií. A je velmi důležité aby byl brán zřetel na to, že se za příznaky osteoporózy mohou skrývat i další onemocnění jako právě celiakie. Pokud zůstane celiakie neodhalena, může se osteoporóza dále zhoršovat a tím i kvalita života pacienta.

5. Závěr

Celiakie je onemocnění, kterému se v dřívější době nevěnovalo příliš pozornosti. Panovaly dokonce mýty o tom, že u dětí celiakie v pubertě vymizí a člověk je po zbytek života zdravý. S celiakií ale souvisí spousta druhotných onemocnění a příznaků, které by se neměly podceňovat. Patří sem mimo jiné i osteoporóza. Není však zanedbatelná ani souvislost celiakie s anémií. V dnešní době se již řada lékařů specialistů touto problematikou zabývá. Ale je i řada lékařů například obvodních, kteří se v praxi s touto problematikou nesetkávají tak často, a proto této problematice nepřikládají takový význam. Přitom pacient zavítá s prvními příznaky právě k obvodnímu lékaři.

Můj výzkum spočíval ve stanovení hladiny protilátek v séru proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a IgG u 58 pacientů s prokázanou osteoporózou, metodou ELISA. Dále jsem vytvořila statistiku souvislosti osteoporózy s celiakií. Můj výzkum se poněkud liší od dat, která udává průzkum na Moravě. Dle Paličky však o souvislosti celiakie s osteoporózou existuje dostatek dat, která se ale číselně dosti liší (27). V každém případě se potvrdila hypotéza o vztahu celiakie a osteoporózy.

Dle Paličky, 2007 (27) v současné době nemůžeme zaujmout jednoznačné stanovisko, zda cíleně vyhledávat pacienty s celiakií v osteoporotické populaci. Bylo by zapotřebí citlivějších metod k detekci choroby. Jednou z metod by mohlo být vyšetření HLA antigenů. Dle studie má většina pacientů s celiakií v evropské populaci heterodimerní změny v HLA DQ2 a HLA DQ8 a to asi u 70% osob. V současné době musíme vycházet z kvalitního klinického vyšetření a sledování sekundárních příznaků choroby a dále aktivně po celiakii při osteoporóze pátrat.

6. Seznam použité literatury :

- (1) ADMOU, B. , L. ESSAADOUNI, K. KRATI, K. ZAHER, M. SBIHI, L. CHABAA, B. BELAABIDIA a A. ALAOUI-YAZIDI. Atypical celiac disease: From recognizing to managing. *Gastroenterology Research and Practice* [online]. 2012, č. 2012, s. 1-9 [cit. 2013-03-17]. DOI: 10. 1155/2012/637187. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/grp/2012/637187/>
- (2) BIANCHI, M. -L. a M. T. BARDELLA. Bone in celiac disease. *Osteoporosis International* [online]. 2008, roč. 19, č. 12, s. 1705-1716 [cit. 2013-03-21]. ISSN 0937941x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00198-008-0624-0>
- (3) BLAHOŠ, Jaroslav. *Osteoporóza: Diagnostika a terapie v praxi*. Praha: Galén, 1995. Folia practica, sv. III. ISBN 80-85824-26-4.
- (4) CAPUTO, I. , A. SECONDO, M. LEPRETTI, G. PAOLELLA, S. AURICCHIO, M. V. , BARONE, C. ESPOSITO a M. GASSET. Gliadin peptides induce tissue transglutaminase activation and ER-stress through Ca² mobilization in Caco-2 Cells. *PLOS ONE* [online]. 2012, roč. 7, č. 9, s. 1-12 [cit. 2013-03-21]. ISSN e11932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0045209>
- (5) ČERMÁKOVÁ, Marta a Irena ŠTĚPÁNOVÁ. *Klinická biochemie*. 1. vyd. Brno: IDVPZ, 2003, 120 s. ISBN 80-701-3372-4.
- (6) ČERMÁKOVÁ, Marta a Irena ŠTĚPÁNOVÁ. *Klinická biochemie*. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 2003-2005, 2 sv. (120, 164 s.). ISBN 80-7013-424-02.
- (7) ČERVENKOVÁ, Renata. *Celiakie: První vydání*. Praha 5: Galén, 2006. ISBN 80-7262-425-3.
- (8) DOLEŽALOVÁ, Věra. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. 4. přeprac. vyd. Brno: IDVPZ, 1995, 286 s. ISBN 80-701-3198-5.

- (9) EUROIMMUN. Protilátky proti tkáňové transglutamináze ELISA (IgA): Návod na provedení testu. Germany, 2011.
- (10) FOJTÍK, Petr, Ondřej URBAN, Přemysl FALT a Pavel NOVOSAD. SOLEN. Interní medicína pro praxi: Výživa a sekundární osteoporóza. Ostrava, 2009. Dostupné z: <http://www.solen.cz/pdfs/int/2009/12/08.pdf>
- (11) HEJCMAN, Jan. E-MEDICA. Celiakie a nespecifické střevní záněty: celiakie-mýty a pověry. České Budějovice, 07.12.2011. Dostupné z: <http://www.stafila.cz/files/files/6f2a59c2f1676977d95b62795ee7109c.pdf>
- (12) HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTUŇKOVÁ. Základy imunologie. 4. vyd. Praha: Triton, 2009, 316 s. ISBN 978-807-3872-809.
- (13) KAZÍK, Oldřich. TEST-LINE. Instalační a validační protokol. Brno, 2012.
- (14) KOHOUT, Pavel a Jaroslava PAVLÍČKOVÁ. *Osteoporóza*. Svazek č. 3. Pardubice: Filip Trend Publishing, 2001. Rady od pramene. ISBN 80-86282-16-3.
- (15) KOHOUT, Pavel. Medicína pro praxi. Celiakie v ambulantní praxi. II. interní klinika Fakultní Thomayerova nemocnice. Praha, 6/2007, (250-252s.). Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/06/02.pdf>
- (16) KOTALOVÁ, Radana: CELIAKIE. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů : Portál 2. Lékařské fakulty [online] 26.10.2010, poslední aktualizace 11.1.2011 [cit. 2013-04-13] Dostupný z: <http://mefanet-motol.cuni.cz/clanky.php?aid=1443>
- (17) LARUSSA, T. No evidence of circulating autoantibodies against osteoprotegerin in patients with celiac disease. *World J Gastroenterol* [online]. 2012, roč. 18, č. 14, s. 1622-1627 [cit. 2013-03-21]. ISSN 2219-2840. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v18/i14/1622.htm>
- (18) LI, M. , L. YU, C. TIBERTI, M. BONAMICO, I. TAKI, D. MIAO, J. A MURRAY, M. J REWERS, E. J HOFFENBERG, D. AGARDH, P. MUELLER, M. STERN, E. BONIFACIO a E. LIU. A Report on the International Transglutaminase Autoantibody Workshop for Celiac Disease. *The American*

- Journal of Gastroenterology* [online]. 2009, roč. 104, č. 1, s. 154-163 [cit. 2013-03-21]. ISSN 0002-9270. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ajg.2008.8>
- (19) LUKŠ, David, Miroslav ŠEDIVÝ a Andrea MULLEROVÁ. TEST-LINE. Základní informace o principu metody a jejím správném provedení. Brno, 2012, (11-18 s.).
- (20) MESIN, Luka, Ludvig M. SOLLID a Roberto Di NIRO. The intestinal B-cell response in celiac disease. *Frontiers in Immunology* [online]. 2012, roč. 3, č. 313, s. 1-12 [cit. 2013-03-17]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: http://www.frontiersin.org/Mucosal_Immunity/10.3389/fimmu.2012.00313/abstract
- (21) MOUREK, Jindřich a [ilustrace Kateřina NOVOTNÁ]. Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů. Vyd. 1. Praha: Grada, 2005. ISBN 978-802-4711-904.
- (22) NĚMCOVÁ, Jana a Jaroslav KORSÁ. Medicína pro praxi. Komplexní léčba a prevence osteoporózy – postavení a význam pohybové aktivity a léčebné rehabilitace. Praha, 2008; 5(4) (165–168s.). Dostupné z: <http://www.solen.cz/pdfs/med/2008/04/07.pdf>
- (23) NEVORAL, Jiří a Radana KOTALOVÁ. Zdraví. Postgraduální medicína: Celiakální sprue-glutensenzitivní enteropatie. Praha, 2002. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/celiakalni-sprue-glutensenzitivni-enteropatie-142383>
- (24) NOVOSAD, P. , P. FOJTÍK a O. URBAN. MEDIEKOS. X. celostátní kongres sekundární osteoporóza: Screening celiakie u pacientů s osteopenií a osteoporózou v regionu severní a střední Moravy v České republice. Plzeň, 13. -15. 4. 2012. Dostupné z: <http://www.osteoakademie.cz/zpravy-akce.php?cla=183>
- (25) ODDĚLENÍ LABORATORNÍ MEDICÍNY NEMOCNICE ŠTERNBERK. Gliadin+transglutamináza autoprotiilátky. Šternberk, 2009. Dostupné z: <http://olm.nemstbk.cz/olm/soubsys/gliadtgl.pdf>

- (26) PALIČKA, Vladimír et al. Osteoporóza: Choroba, která se může týkat nás všech. Liga proti osteoporóze, 2003, 57 s. ISBN 80-239-0844-8.
- (27) PALIČKA, Vladimír. EDITORIAL. Celiakie a osteoporóza-je vazba natolik těsná, že vyžaduje akci? *Vnitřní lékařství*, 2007, 53(12): 1243-1244. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=v1_07_12_02.pdf
- (28) RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie. 2. , přeprac. vyd.* Praha: Galén, 2006, 329 s. ISBN 80-726-2324-9.
- (29) SUGAI, E. Celiac disease serology in patients with different pretest probabilities: Is biopsy avoidable?. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2010, roč. 16, č. 25, s. 3144-3152 [cit. 2013-03-21]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v16/i25/3144.htm>
- (30) TEST-LINE. EIA. Transglutaminase IgA: Návod na provedení testu. Brno, 2012.
- (31) YOUNES, M. , H. SAFER, H. FADOUA , S. ZROUR , I. BEJIA, M. TOUZI, M. F NAJJAR, H. SAFFAR, N. BERGAOUI. Prevalence of bone loss in adult celiac disease and associated factors: a control case study. *La Tunisie Médicale* [online]. 2012, roč. 90, č. 2, s. 129-135 [cit. 2013-03-21]. Dostupné z: <http://www.latunisiemedicale.com/article-medicale-tunisie.php?article=1886&Codelang=en>

7. Přílohy:

Příloha 1: Tabulka č.4 - přehled diagnóz, pojících se s pozitivními výsledky screeningu celiakie

Tkáňová transglutamináza IGA, IgG (0, 00 – 17, 99) U/ml
gliadin IgA, IgG (0, 00 - 22, 49) RU/ml

Číslo vzorku Ročník	Hodnota tTG IgA	Hodnota gliadin IgA	Hodnota tTG IgG	Hodnota gliadin IgG	Diagnóza
1. 2000	8, 46 negativní	16, 14 negativní	6, 68 negativní	32, 56 pozitivní	L282
2. 2000	30, 26 pozitivní	1, 48 negativní			L209
3. 2002	3, 57 negativní	22, 52 pozitivní			K529
4. 2002	0, 93 negativní	1, 58 negativní	24, 08 pozitivní	2, 01 negativní	J069
5. 2002	36, 08 pozitivní		33, 46 pozitivní		K30
6. 2002	74, 65 pozitivní				J039
7. 2003			26, 20 pozitivní		R104
8. 2003	23, 14 pozitivní				A084
9. 2004	0, 04 negativní	2, 71 negativní	32, 04 pozitivní	6, 31 negativní	L200
10. 2005	0, 96 negativní	1, 11 negativní	6, 27 negativní	27, 53 pozitivní	Z000
11. 2010	12, 74 negativní			26, 23 pozitivní	R104
12. 2010	0, 06 negativní	1, 63 negativní	0, 14 negativní	22, 68 pozitivní	J069
13. 1946	3, 61 negativní	4, 61 negativní	10, 25 negativní	24, 45 pozitivní	J100
14. 1953	1, 95 negativní	9, 63 negativní	20, 00. 08 hraniční	2, 12 negativní	R104
15. 1954	20, 23 hraniční		40, 8 pozitivní		L011

Číslo vzorku Ročník	Hodnota tTG IgA	Hodnota gliadin IgA	Hodnota tTG IgG	Hodnota gliadin IgG	Diagnóza
16.	20, 20	88, 08			D519
1961	hraniční	pozitivní			
17.	4, 45	22, 58	6, 71	3, 84	K30
1963	negativní	pozitivní	negativní		
18.	55, 47		6, 3		K509
1968	pozitivní		negativní		
19.	38, 18				K599
1969	pozitivní				
20.	24, 29		3, 97		Z000
1973	pozitivní		negativní		
21.	0, 004			35, 24	J209
1973	negativní			pozitivní	
22.	34, 48	9, 17	10, 30	14, 27	L301
1976	pozitivní	negativní	negativní	negativní	
23.	145, 78				J311
1976	pozitivní				
24.	23, 80				K599
1977	pozitivní				
25.	4, 32	3, 52	5, 84	60, 93	K523
1980	negativní	negativní	negativní	pozitivní	
26.	4, 57	2, 44	22, 77	3, 27	L039
1980	negativní	negativní	pozitivní	negativní	
27.	7, 07	3, 65	8, 03	23, 68	K900
1983	negativní	negativní	negativní	pozitivní	
28.	18, 9				R509
1985	hraniční				
29.	37, 35	56, 89	71, 55	19, 52	Z008
1976	pozitivní	pozitivní	pozitivní	negativní	
30.	0, 09	3, 23	8, 78	25, 61	Z000
1988	negativní	negativní	negativní	pozitivní	
31.	2, 88		18, 89		Z000
1990	negativní		hraniční		

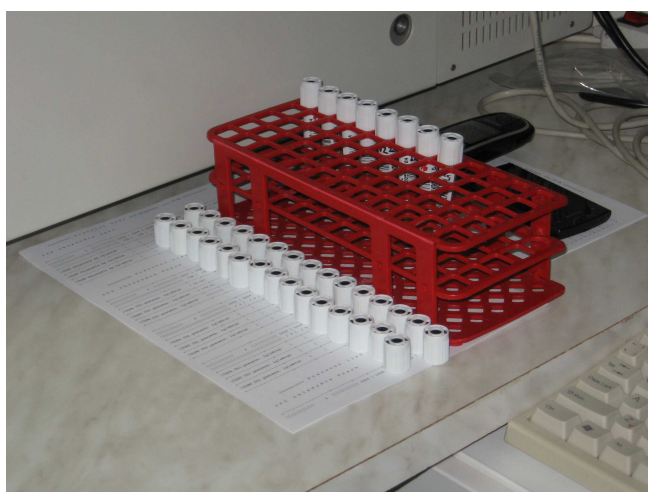
Číslo vzorku	Hodnota tTG IgA	Hodnota gliadin IgA	Hodnota tTG IgG	Hodnota gliadin IgG	Diagnóza
Ročník					
32.	14, 59	2, 98	20, 40	4, 82	R104
1990	negativní	negativní	<i>hraniční</i>	negativní	
33.		67, 98	16, 49	57, 47	K900
1992		pozitivní	negativní	pozitivní	
34.		1, 23			Z000
1992		negativní			
35.	50, 8	8, 85	7, 24	5, 94	K30
1993	pozitivní	negativní	negativní	negativní	
36.		78, 30			L209
1994		pozitivní			
37.	10, 66	25, 17	5, 9	6, 94	R104
1995	negativní	pozitivní	negativní	negativní	
38.	0, 06	29, 44	0, 03	19, 42	R104
1996	negativní	pozitivní	negativní	negativní	
39.	3, 27	22, 71	3, 33	5, 09	R104
1997	negativní	pozitivní	negativní	negativní	
40.	13, 9	23, 01			E46
1997	negativní	pozitivní			
41.	12, 02	8, 61	4, 7	24, 87	L200
1999	negativní	negativní	negativní	pozitivní	
42.	4, 02	8, 6	5, 05	49, 17	R69
1999	negativní	negativní	negativní	pozitivní	

Příloha 2: Centrifuga



Zdroj: vlastní foto

Příloha 3: vzorky připraveny k analýze



Zdroj: vlastní foto

Příloha 4: panel s reagenциemi a destička se stripy od firmy Test-Line



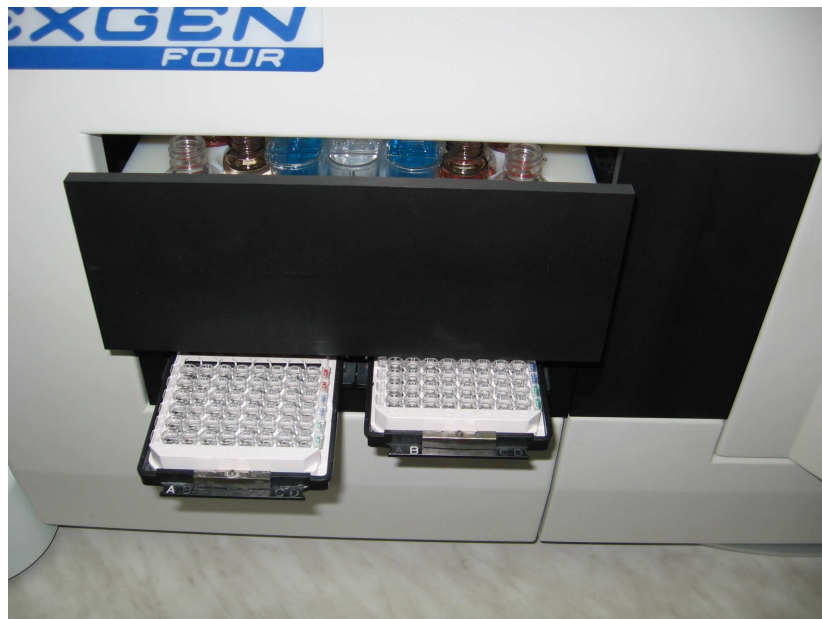
Zdroj: vlastní foto

Příloha 5: analyzátor Nexgen Four



Zdroj: vlastní foto

Příloha 6: pozice v analyzátoru Nexgen Four pro destičky se stripy



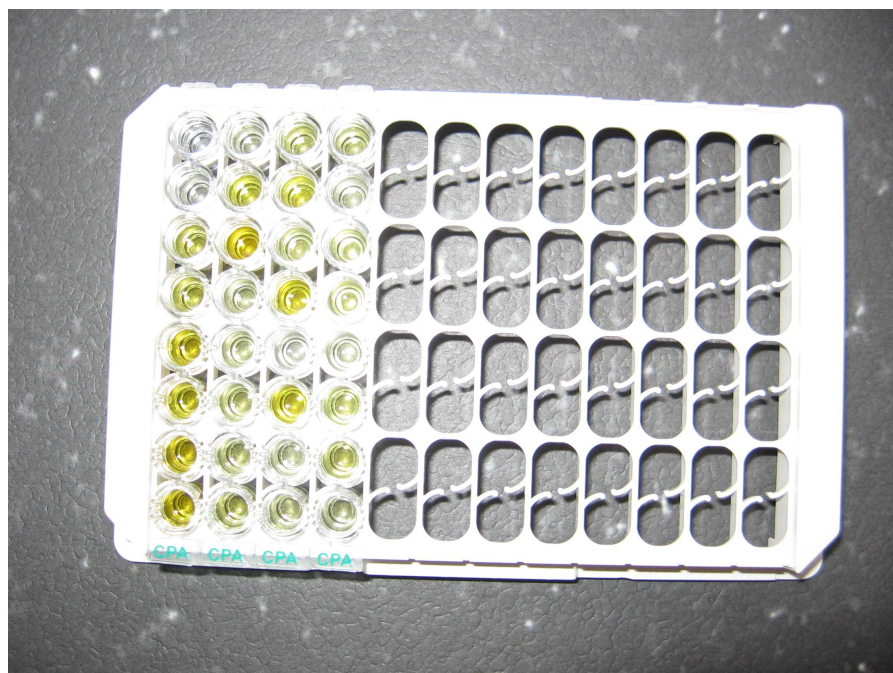
Zdroj: vlastní foto

Příloha 7: rozmístění zkumavek do karuselů v analyzátoru Nexgen Four



Zdroj: vlastní foto

Příloha 8: změna intenzity zabarvení vzorku po přidání zastavovacího roztoku



Zdroj: vlastní foto