



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Genetické vyšetření HLA alel asociovaných k celiakii

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ
ZDRAVOTNÍ LABORANT

Autor: Kateřina Salzmanová

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Genetické vyšetření HLA alel asociovaných k celiakii jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů 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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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 bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2018

.....

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D. za odborné rady, čas a ochotu, které věnoval tomu, aby tato práce mohla vzniknout. Dále bych ráda poděkovala genetické laboratoři GENLABS, s.r.o. v Českých Budějovicích za možnost provedení části výzkumu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

Genetické vyšetření HLA alel asociovaných k celiakii

Abstrakt

Celiakie je autoimunitní onemocnění, které je charakterizováno intolerancí gliadinu tvořící část lepku. Jeho nesnášenlivost vede k chronické zánětlivé odpovědi ve sliznici tenkého střeva s následnou malabsorpcí vyznačující se chronickým průjmem, tukovitou stolicí a neprospíváním. Celiakie je multifaktoriální onemocnění, podílí se na něm faktory vnějšího prostředí a genetické. Genetická predispozice je dána HLA alelami HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) nebo DQ8(DQA1*0301/DQB1*0302) nebo HLA-DRB1*04. Toto onemocnění má řadu nespecifických klinických příznaků, proto většina pacientů není vůbec diagnostikována. Odhadovaný počet nemocných je až 50 000, avšak skutečnými pacienty je pouze 15 % z nich.

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo shrnout poznatky o celiakii a molekulárně genetických metodách založených na PCR, které se využívají při diagnostice predispozic k celiakii. V teoretické části o celiakii se zabývám hlavně popisem, formami, diagnostikou, patogenezí a nemocemi asociovanými s celiakií. Dále jsem se zabývala popisem a nomenklaturou HLA systému a jeho asociací s chorobami. V závěru teoretické části jsem se věnovala molekulárně genetickým metodám založených na PCR (PCR-SSP a RT-PCR).

Praktickou část bakalářské práce jsem prováděla v genetické laboratoři na Zdravotně sociální fakultě, Zemědělské fakultě a v GENLABS, s.r.o. v Českých Budějovicích. Zabývala jsem se HLA typizací alel asociovaných s celiakií. Vyšetření jsem prováděla metodami PCR-SSP pomocí kitu HISTO TYPE Celiac Disease od firmy BAG Health Care a RT-PCR pomocí kitu EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DRB4). Cílem práce bylo osvojit si správnou laboratorní praxi v genetické laboratoři. Dále zavést a zoptimalizovat komerčně dodávaný kit pro vyšetření HLA alel asociovaných s celiakií na principu PCR-SSP. Vyšetřit již vyšetřené pacienty metodou RT-PCR. Porovnat obě metody z hlediska shody a náročnosti.

Klíčová slova

celiakie; HLA-DQ2; HLA-DQ8; HLA typizace; PCR-SSP; RT-PCR

Molecular genetic testing for celiac disease-associated HLA alleles

Abstract

Celiac disease is an autoimmune disease, which is characterised by intolerance of gliadin creating a part of gluten. Its intolerance leads to a chronic inflammatory response in the mucous membrane of small intestine, followed by malabsorption characterized by chronic diarrhoea, greasy stool and failure to thrive. Celiac disease is a multifactorial disease, caused by external environment factors and genetic factors. Genetic predisposition is given by HLA alleles HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) or DQ8 (DQA1*0301/DQB1*0302) or HLA-DRB1*04. This disease has got a set of unspecified clinical symptoms, that is why most of the patients are not diagnosed at all. Estimated count of the ill people is up to 50 000, however real patients are only 15 % of them.

The aim of the theoretical part of the bachelor thesis was to sum up the findings about the celiac disease and molecular genetic methods based on PCR. In the theoretical part about the celiac disease, I deal mainly with the description, types, diagnostics, pathogenesis and also with the diseases associated with celiac disease. Moreover, I dealt with the description and the nomenclature of HLA system and its association with the diseases. In the end of the theoretical part, I dealt with molecular genetic methods based on PCR (PCR-SSP and RT-PCR).

I carried out the practical part of the thesis in a genetic laboratory at the Faculty of Health and Social Sciences, at the Faculty of Agriculture and at GENLABS, s.r.o. in Budweis. I dealt with the HLA typisation of alleles associated with the celiac disease. I did the examination by means of two methods - PCR-SSP method with the help of HISTO TYPE Celiac Disease kit and RT-PCR method with the help of EliGene® Coeliac RT kit (DQ2, DQ8, DRB4). The aim of the work was to embrace correct laboratory practice in a genetic laboratory. Then also set and optimize a commercially sold kit for an examination of HLA alleles associated with the celiac disease on the PCR-SSP principle. Examine the already examined patients by means of RT-PCR method. Compare both methods on the terms of accordance and difficulty.

Keywords

Celiac disease; HLA-DQ2; HLA-DQ8; HLA typing; PCR-SSP; RT-PCR

Obsah

Úvod	8
1. Teoretická část	9
1.1 Celiakie	9
1.1.1 Historie	9
1.1.2 Popis a projevy celiakie.....	9
1.1.3 Formy celiakie.....	11
1.1.4 Prevalence	12
1.1.5 Nemoci asociované s celiakií	12
1.1.6 Patogeneze.....	13
1.1.7 Diagnostika a screening celiakie	14
1.1.8 Komplikace s celiakií	16
1.1.9 Léčba celiakie.....	16
1.1.10 Prevence	18
1.2 HLA systém.....	18
1.2.1 Popis HLA systému.....	18
1.2.2 Nomenklatura HLA systému.....	20
1.2.3 Asociace HLA s chorobami	20
1.2.4 Asociace HLA s celiakií.....	21
1.3 PCR.....	22
1.3.1 PCR-SSP	23
1.3.2 RT-PCR.....	25
2 Cíl práce, hypotézy.....	26
2.1 Cíle práce	26
2.2 Hypotézy.....	26
3 Metodika.....	27
3.1 Izolace DNA	27
3.2 Měření koncentrace DNA.....	29
3.3 PCR-SSP.....	30
3.3.1 Amplifikace	30
3.3.2 Gelová elektroforéza PCR produktů	31
3.3.3 Dokumentace a interpretace výsledků.....	32

3.4	RT- PCR	33
4	Výsledky.....	35
4.1	PCR-SSP.....	35
4.2	RT- PCR	41
4.3	Srovnání výsledků	44
5	Diskuze.....	45
6	Závěr.....	47
7	Seznam literatury.....	48
8	Seznam příloh.....	52
9	Seznam zkratk	58

Úvod

Téma bakalářské práce jsem si zvolila zejména proto, že je velice aktuální. Celiakie je v České republice nedostatečně diagnostikována, většinou až po dlouhém trvání nemoci. Odhadovaná prevalence je 1:200-1:250, tj. 40 000-50 000 nemocných, avšak skutečnými pacienty je jen 15 % z celkového počtu. Ukazuje se, že u osob s celiakií, kteří nejsou diagnostikováni, mají čtyřnásobně větší úmrtnost (Kohout a Pavlíčková, 2010).

Celiakie je definována jako chronická autoimunitní enteropatie, která je způsobená přecitlivělostí organismu na lepek u geneticky predisponovaných jedinců. Imunitní reakcí dochází k zánětlivým změnám ve sliznici tenkého střeva. V histologickém nálezu lze vidět atrofii klků, hyperplazii krypt a zvýšený počet intraepiteliálních lymfocytů (Heřmanová, 2009). U dětí se celiakie projevuje většinou neprospíváním, zpomalením růstu nebo bolestmi břicha. U dospělých se choroba projevuje podobně. Mezi další projevy patří úbytek na váze, průjemy, snížená chuť k jídlu nebo deprese. U dospělých se často setkáváme s bezpříznakovou celiakií (Barker a Liu, 2008).

Základem diagnostiky je sérologické vyšetření. Toto vyšetření je prováděno na prvním místě u symptomatických pacientů. Prokazuje se zde pozitivita autoprotilátek proti endomysiu a tkáňové transglutamináze. Další možností je genetické vyšetření HLA-DQ2 a DQ8. Toto vyšetření se provádí u chorob asociovaných s celiakií (např. diabetes mellitus 1. typu) nebo u asymptomatických jedinců. Bioptické vyšetření slouží k potvrzení diagnózy (Fruhauf et al., 2012).

Celiakie je onemocnění se silnou genetickou vazbou. Základem genetické predispozice je asociace celiakie s molekulami HLA II. třídy, konkrétně HLA-DQ2 a HLA-DQ8. Až 90 % celiaků nese znak HLA-DQ2 a přibližně 5-10 % celiaků nese znak HLA-DQ8 (Megiorni a Pizzuti, 2012).

V mé bakalářské práci se zabývám HLA-DQ haplotypizací. Jedná se o genetické vyšetření, které prověřuje alely HLA, konkrétně HLA-DQ2 a HLA-DQ8, o kterých je známo, že hrají významnou roli při vzniku celiakie. Ve své práci srovnávám výsledky dvou metod. První je metoda PCR-SSP, byla prováděna pomocí komerčně dodávaného kitu HISTO TYPE Celiac Disease od firmy BAG Health Care. Druhá metoda je RealTime-PCR, byla prováděna pomocí kitu EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DRB4).

1. Teoretická část

1.1 Celiakie

1.1.1 Historie

První popis onemocnění pochází z 2. století od řeckého lékaře Aretaea z Cappadoiky, známého jako Galén (Guandalini, 2007). V jeho díle *Nemoc celiakie* jako první použil výraz *koiliakos* (z řeckého slova *koelia* břicho) jako příčinu průjmu a břišních bolestí (Ali, 2015).

Na začátku 19. století Mathew Bailie publikoval do vědeckých časopisů o dospělých, kteří trpěli chronickými průjmy, následnou podvýživou a nadýmáním. Jako první navrhl léčbu dietou (Guandalini, 2007).

O 75 let později z Bailieho poznatků čerpal britský pediatr Samuel Gee. Tento lékař popsal příznaky a vlastnosti celiakie. Na základě svých studií jako první přišel se zavedením bezlepkové diety a následnou recidivou po zařazení lepku do stravy (Ali, 2015).

Ve 40. letech 20. století zjistil holandský pediatr Willem Dicke, že skutečným spouštěčem celiakie je lepek (Guandalini, 2007).

Zásadním průlomem v diagnostice celiakie byla 50. léta, kdy Margot Shinerová, britská gastroenteroložka, popsala histologické změny z biopsie periferního dvanácterníku. (Guandalini, 2007).

V 90. letech byla celiakie označena jako autoimunitní onemocnění a byla prokázána asociace celiakie se specifickými geny DQ2/DQ8. V tomto období se také došlo k poznání, že enzym transglutamináza 2 je cílový autoantigen antiendomysialních protilátek (Alaedini, 2008).

1.1.2 Popis a projevy celiakie

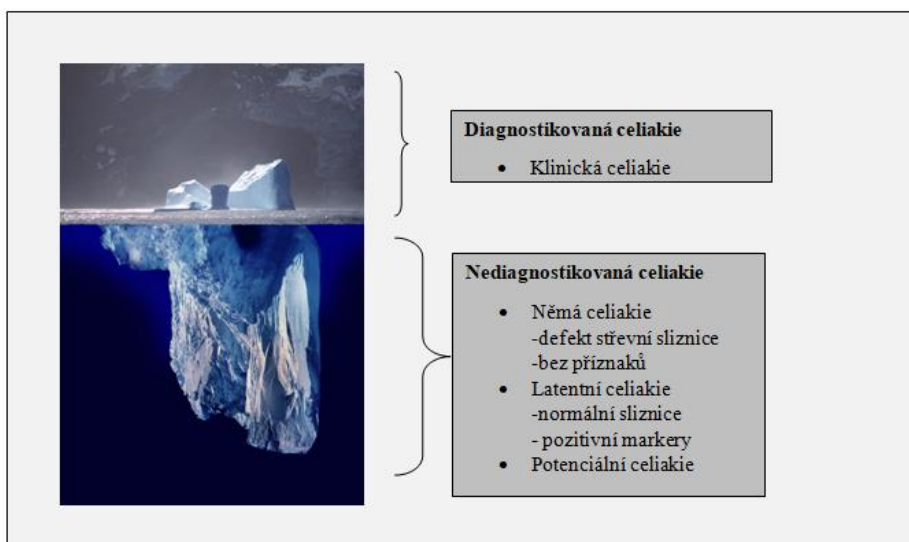
Celiakie (neboli celiakální sprue, netropická sprue, endemická sprue, Herterova choroba) je geneticky podmíněné autoimunitní onemocnění způsobené vznikem protilátek proti tenkému střevu vlivem přítomnosti lepku (glutenu) ve stravě u vnímavých jedinců (Kohout a Pavlíčková, 2010).

Lepek je bílkovinný komplex, který lze frakčně rozdělit na prolaminu a gluteniny. Zejména peptidy prolaminů spouštějí imunitní reakce u geneticky vnímavých jedinců. Nejvíce prolaminů obsahuje pšenice (až 35 %) a nejméně oves (13 %). Prolaminu mají vysoký obsah aminokyselin prolinu (až 30 %) a glutaminu (až 15 %). Peptidické vazby obsahující prolin jsou pak obtížně štěpeny trávicími enzymy (Frič a Keil, 2011).

Působením protilátek ve střevní sliznici dochází k poškození a k zánětlivým změnám. Dále dochází k vilózní atrofii sliznice, ztrátě klků, elongaci krypt a lymfocytární infiltraci poškozené sliznice (Heřmanová, 2009).

Klinické projevy celiakie jsou velmi variabilní a závisí na věku pacienta. Celiakie se může objevit již v 1. roce života, kdy se kojencům zařazují do stravy obilné kaše. V pubertě často dochází k útlumu příznaků. V dospělosti dochází opět k recidivě klinických příznaků. U žen mezi 20. - 30. rokem a poté okolo 50. roku života, u mužů kolem 40. roku. Na vzniku celiakie se může podílet i stres – infekce, porod, operace apod. (Kohout a Pavlíčková, 2010).

Klasické příznaky jsou spojené s únavou, neprospíváním, malnutricí, průjmem, zvracením, zácpou a abdominálními bolestmi. S těmito symptomy se setkáváme u pacientů s diagnózou celiakie a představují „špičku modelu ledovce“ (Barker a Liu, 2008). Zbytek ledovce představuje nedagnostikované pacienty, kteří netrpí gastrointestinálními obtížemi. Dalšími projevy mohou být recidivující afty, fraktury bez adekvátního úrazového mechanismu, opoždění puberty, amenorea (vynechání menstruace), meteorismus (plynatost střev) či exantém - dermatitis herpetiformis Duhring (Fruhauf et al., 2012). K projevům celiakie patří také hematologické projevy (hypochromní anémie nereagující na běžnou léčbu železem), projevy v oblasti reprodukce (spontánní potraty, infertilita), depresivní stavy či neurologické poruchy (Fruhauf et al., 2016).



Obr. 1: Ledovcový model výskytu celiakie (Heřmanová, 2009)

1.1.3 Formy celiakie

Celiakie se vyskytuje v mnoha formách, které se liší anamnézou, příznaky a pozitivním nálezem v biopsii tenkého střeva. Pozitivita autoprotilátek (AtTGA, AEA) patří mezi nejčastější příznaky tohoto onemocnění (Frič a Keil, 2011).

Klasická forma se projevuje klinickými gastrointestinálními příznaky, které začínají již v dětství. Patří sem nadýmání, průjmy, hubnutí a steatorrhoe (tukovitá stolice). Histologický nález z biopsie tenkého střeva je pozitivní a v séru jsou diagnostikovány specifické protilátky. (Frič a Mengerová, 2008). Těmito příznaky trpí pouze 10-20 % pacientů (Kohout a Pavlíčková, 2010).

U atypické formy se vyskytují mimostřevní příznaky s pozitivním histologickým nálezem v tenkém střevě. (Frič a Keil, 2011).

Dermatitis herpetiformis Duhring je kožní forma celiakie s lehkou atrofií střevní sliznice a výraznými kožními projevy (Frič a Mengerová, 2008). Hlavním příznakem tohoto onemocnění je puchýřovitá vyrážka, která se nachází na místech, kde dochází k častějšímu namáhání kůže (pokožka na koleni, lokti, rameni...). Stanovení diagnózy spočívá v pozitivním nálezu specifických protilátek v kožních lézích. Léčba spočívá v doživotní bezlepkové dietě. K potlačení příznaků se používají léky jako dapson, sulfony nebo steroidy (Antiga a Caproni, 2015).

Tichá forma se neprojevuje žádnými klinickými příznaky, ale je zde pozitivní nález z biopsie tenkého střeva a zvýšená hladina protilátek (Kohout a Pavlíčková, 2010). Jedná se o nejnebezpečnější formu celiakie, kdy vlivem konzumace lepku dochází k poškození tenkého střeva a mohou se rozvinout další onemocnění jako např. rakovina tlustého střeva (Ali, 2015).

Latentní forma má pozitivní sérologické vyšetření protilátek a zvýšený počet intraepiteliálních lymfocytů (Frič a Mengerová, 2008). Je zde negativní histologický nález a chybí klinické příznaky. Onemocnění se rozvíjí až v dospělosti a je diagnostikováno genetickými testy (Ali, 2015).

Potenciální forma je bezpříznaková. Projevuje se buď přítomností protilátek nebo zvýšením intraepiteliálních lymfocytů. Může se vyvinout i v jiné formy celiakie (Frič a Keil, 2011).

1.1.4 Prevalence

Celiakie je celosvětově se vyskytující autoimunitní choroba. Prevalence této choroby v rozvinutých zemích je asi 1 % (Frič a Keil, 2011). Odhadovaná prevalence v České republice je 1:200-1:250 (tj. 40 000 až 50 000 nemocných). Avšak skutečnými pacienty je pouze 15 % z celkového počtu (Kohout a Pavlíčková, 2010). Uvádí se, že touto chorobou jsou častěji postiženy ženy, a to v poměru 2:1. Manifestace celiakie závisí také na genetické predispozici, u příbuzných 1. stupně (rodiče, sourozenci a děti) je pravděpodobnost nemoci mezi 8-18 %, u jednovaječných dvojčat až 70 %. U osob s dalšími autoimunitními nemocemi je incidence 10krát vyšší. Výskyt celiakie je daleko častější, než se kdysi předpokládalo, velká část pacientů není diagnostikována (Frič a Keil, 2011).

1.1.5 Nemoci asociované s celiakií

Celiakie se dále pojí s jinými autoimunitními chorobami. Uvádí se, že je 10-30krát vyšší riziko než v ostatních populacích. Nejčastější je asociace s endokrinními nemocemi jako diabetes mellitus 1. typu (3-8 %) či thyreoiditida (až 10 %) (Frič a Keil, 2011).

Diabetes mellitus 1. typu patří mezi nejčastější nemoci asociované s celiakií. Uvádí se, že diabetes 1. typu představuje 5 až 10krát vyšší riziko u dětí s celiakií. Toto riziko částečně vysvětluje genetická vazba s HLA. Přibližně 5-10 % pacientů s diabetem vykazovalo protilátky s celiakií a až 75 % mělo abnormality na sliznici tenkého střeva. Prevalence celiakie a diabetu 1. typu se uvádí mezi 1-19 % (Parzanese et al., 2017).

U pacientů s celiakií je zaznamenána zvýšená prevalence poruch štítné žlázy (2-5 %). Jedná se o hypertyreózu - Gravesova nemoc nebo o hypotyreózu - Hashimotova nemoc. Poruchy jsou často diagnostikovány před, nebo po diagnóze celiakie. Tyto dvě poruchy sdílejí stejné genetické faktory, které představují HLA-DQ2 a DQ8. Haplotypy HLA DQ2 a DQ8 jsou spojené s Hashimotovou chorobou, zatímco asociace HLA-DQ2 s Gravesou nemocí není zcela známa. Tento rozdíl mezi hyper a hypotyreózou se také projevuje vyšším rizikem u pacientů s Hashimotovou poruchou než s Gravesem. Kromě HLA byla zaznamenána asociace s genem kódující antigen 4 cytotoxického T-lymfocyty. Dalším mechanismem, který souvisí s těmito dvěma stavy, je abnormální absorpce s následným nedostatkem selenu. Tento stav vede k poškození štítné žlázy, která je velice citlivá na nedostatek selenu a také k poškození střev (Parzanese et al., 2017).

Další choroby sdružené s celiakií jsou hepatitida, sklerozující cholangitida, primární bilární cirhóza, systémový lupus erythematoses, Sjogrenův syndrom, revmatoidní artritida, IgA

nefropatie, plicní hemosideróza, Downův syndrom, Turnerův syndrom a další (Frič a Keil, 2011).

1.1.6 Patogeneze

Na vzniku celiakie se podílí řada faktorů. Patogenezi onemocnění ovlivňují interakce mezi environmentálními, genetickými a imunologickými faktory (Kagnoff, 2007). Náchylnost k celiakii je podmíněná i geneticky, je identifikována na hlavním histokompatibilním komplexu (Parzanese et al., 2017).

Celiakie je aktivována bílkovinami, které se nacházejí v obilných zrnech pšenice, žita a ječmene. Tyto proteiny jsou chybně nazývány jako lepek, přesněji řečeno lepek zahrnuje pouze proteiny pšenice, které se podílejí na aktivaci onemocnění. Gluten obsahuje 2 hlavní typy proteinů, gliadiny a gluteniny. Oba proteiny obsahují peptidy, které se podílejí na patogenezi celiakie. Úzce příbuzné proteiny v ječmeni a žitě jsou hordeleiny a sekaliny. Proteiny u ovesa, aveniny, nevyvolávají celiakii, přestože jsou příbuzní proteinům v pšenici, žitě a ječmeni a mají podstatně nižší obsah prolinů. Analogické bílkoviny v rýži, kukuřici, čiroku, prosu, slzovce a miliče jsou vzdáleně příbuzné a nepodílejí se na aktivaci celiakie. Gliadiny, gluteniny, horniny a sekaliny mají vysoký obsah prolinu a glutaminu. Vysoký obsah prolinů činí tyto proteiny rezistentní vůči úplnému proteolytickému štěpení ve střevě. Enzymy, které se podílí na proteolytickém štěpení, mají nedostačující aktivitu prolyl peptidázy. Tento deficit může vést k akumulaci velkých peptidových fragmentů (až 50 aminokyselin) v tenkém střevě. Nicméně špatné štěpení proteinů nestačí k samotnému vyvolání celiakie (Kagnoff, 2007).

Velkou roli v patogenezi celiakie hraje genetická predispozice. Je známo, že na dědičnosti celiakie se podílí specifické alely lidského leukocytárního antigenu (HLA) II. třídy, které mapují lokus HLA-DQ. Přítomnost specifických HLA-DQ alel je nezbytná pro fenotypovou expresi onemocnění prakticky u všech jedinců. Téměř všichni pacienti s pozitivním histologickým vyšetřením exprimují alely HLA-DQ, které kódují specifické heterodimery HLA-DQ2 a HLA-DQ8. Heterodimery HLA-DQ2 poskytují vnímavost k onemocnění a jsou tvořeny β řetězcem kódovaným pomocí alely HLA-DQB1*02 (HLA-DQB1*0201 nebo *0202). Heterodimer HLA-DQ2 je tvořen i α řetězcem a je kódován alelou HLA-DQA1*05. S tímto heterodimerem se setkáváme až u 90-95 % celiaků. Byl také zaznamenán malý počet celiaků, u kterých byla přítomna pouze jedna z těchto alel DQ2 (HLA-DQB1*02 nebo vzácně HLA-DQA1*05). Heterodimer HLA-DQ8 byl nalezen u zbývajících 5-10 % pacientů.

Heterodimer HLA-DQ8 je tvořen α i β řetězcem a je kódován alelou HLA-DQB1*0302 a HLA-DQA1*03 (Kagnoff, 2007).

HLA-DQ2 a HLA-DQ8 heterodimery se nacházejí na antigen prezentujících buňkách, které umí vázat a prezentovat peptidy k populacím CD4+ T-lymfocytům v lamina propria v tenkém střevě. Velkou roli hraje tkáňová transglutamináza (tTG), která se uvolňuje ve střevní sliznici během poranění tkáně. Její funkcí je opravovat tkáň a vytvářet isopeptidické vazby mezi zbytky glutaminu a lysinu. Tkáňová transglutamináza má schopnost za určitých podmínek (např. nízké pH) deaminovat glutamin na neutrální glutamin, který se přemění na kyselinu glutamovou. Jakmile vznikne komplex peptid-HLA-DQ, tak se mohou aktivovat T-lymfocyty ve sliznici tenkého střeva. Aktivací T-lymfocytů dojde k produkci INF- γ , který má klíčovou roli v počátečním stádiu poškození střevní sliznice. V patogenezi celiakie je ještě mnoho neznámých mechanismů, které ovlivňují vznik onemocnění (např. mechanismus procházení peptidů přes intraepiteliální buněčnou stěnu, úloha vrozené imunity a IEL, úloha IL-15 a INF- α a podnět pro uvolnění tTG) (Kagnoff, 2007).

1.1.7 Diagnostika a screening celiakie

Celiakie se diagnostikuje nedostatečně často a po dlouhém trvání nemoci. Není-li tato nemoc včas rozpoznána, doprovázejí pacienta zdravotní komplikace jako autoimunitní choroby, neurologická onemocnění či osteoporóza (Latta, 2012).

Diagnostika celiakie se řídí podle směrnice Evropské společnosti pro pediatriickou gastroenterologii, hepatologii a výživu (ESPGHAN) (Frič a Keil, 2011). U osob s indikacemi ke screeningu se provádí následující vyšetření. Mezi základní vyšetření patří stanovení specifických sérových autoprotilátek, provedení biopsie sliznice tenkého střeva pomocí endoskopu a genetické vyšetření HLA typizace (Fruhauf et al., 2012).

1.1.7.1 Sérologické testy

Při sérologickém vyšetření se stanovují sérové autoprotilátky proti tkáňové transglutamináze 2 (TG 2 IgA) a endomysální protilátky (EMA IgA). Jedná se o velice specifické protilátky ve vztahu k celiakii. K vyloučení celiakie pomáhá negativita deaminovaných protilátek proti glutenu (DGP IgG) (Fruhauf et al., 2012). U 3 % celiaků je přítomen deficit IgA, v těchto případech se vyšetřuje AtTG v třídě IgG. V případě pozitivity protilátek je indikována biopsie (Latta, 2012).

1.1.7.2 Bioptické vyšetření

Zlatým standardem v diagnostice celiakie je biopsie tenkého střeva (pod Vaterovou papilou) pomocí endoskopu. ESPGHAN doporučuje odebrat nejméně 4 vzorky ve druhé třetině duodena a jeden v bulbu duodena (Fruhauf, et. al., 2016). Hodnotí se atrofie klků, hyperplazie krypt, snížená výška enterocytů a zánětlivé infiltráty z biopsie sliznice tenkého střeva. Na základě lézí je histopatologie celiakie rozdělena do různých diagnostických kategorií dle Marshe (Parzanese et al., 2017).

Marsh 0: Normální slizniční struktura, bez intraepiteliální lymfocytární infiltrace

Marsh I: Lymfocytární enteritida, normální slizniční struktura s infiltrací

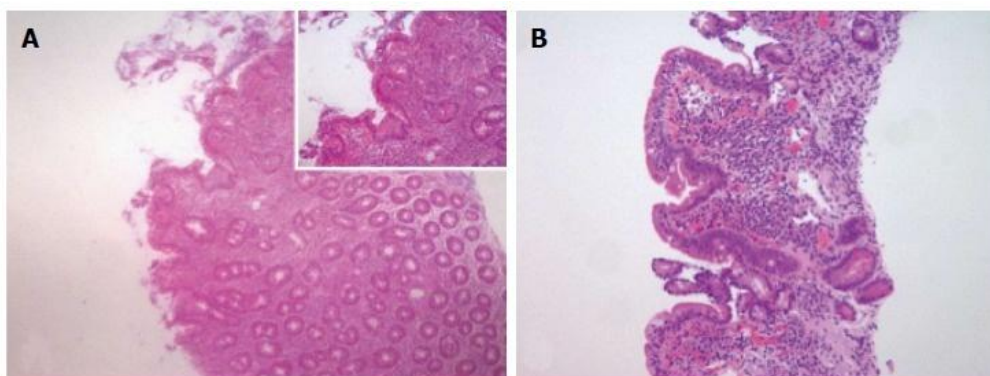
Marsh II: Lymfocytární enteritida s hyperplázií krypt

Marsh III: Intraepitelová lymfocytóza, hyperplazie krypt atrofie klků

Marsh IIIA: Částečná atrofie, klky jsou tupé a zkrácené

Marsh IIIB: Těžká atrofie, klky jsou atrofické, ale rozpoznatelné

Marsh IIIC: Úplná atrofie klků, sliznice se podobá tlustému střevu



Obr. 2: Histologické vyšetření tenkého střeva. A: Příklad tkáně klasifikované jako Marsh II. B: Příklad tkáně označené jako Marsh III. A. (Parzanese et al., 2017).

1.1.7.3 HLA typizace

HLA typizace je genetické vyšetření, které prověřuje alely lidského leukocytárního antigenu (HLA) patřící do oblasti HLA-DQ 6. chromozomu, přesněji HLA-DQ2 a HLA-DQ8. O těchto oblastech je známo, že hrají významnou roli při rozvoji celiakie prostřednictvím prezentace antigenu. Z krve či bukalního stěru pacienta se vyizoluje DNA, která se podrobí polymerázové řetězové reakci (PCR), aby se vytvořilo velké množství kopií DNA. Vyšetření se rutinně používá u nejednoznačných sérologických a histologických výsledků. HLA typizace má velký význam v rámci screeningu příbuzných pacienta právě kvůli genetické

asociaci (Ali, 2015). Při absenci HLA DQ2/8 se vylučuje genetická predispozice na celiakii u členů rodin s touto nemocí (Parzanese et al., 2017).

1.1.7.4 Zátěžový test na lepek

Tento test je navržen pro pacienty, kteří mají negativní sérologické a biotické vyšetření, ale jsou na bezlepkové dietě. Zátěžový test se provádí u pozitivní HLA typizace (Ali, 2015). Test by se neměl provádět u dětí do 5 let a v pubertě. Při zátěžovém testu je třeba mít dostatečný příjem lepku (alespoň 15g/den) a sledují se autoprotilátky specifické pro celiakii. U přetrvávající negativity sérologického vyšetření a nepřítomnosti symptomů lze považovat test za dokončený po dvou letech. Je potřeba pacienta nadále sledovat, protože je možnost recidivy v horizontu několika let (Fruhauf et al., 2016).

1.1.8 Komplikace s celiakii

S celiakii se vyskytují komplikace, které závisí na věku pacienta při stanovení celiakie a také na dodržování bezlepkové diety. Mezi nejvýznamnější komplikace patří refrakterní celiakie, malignity, metabolická osteopatie, neuropsychiatrické poruchy a atrofie sleziny (Frič a Keil, 2011).

1.1.8.1 Refrakterní celiakie

Tato komplikace je nejvýznamnější příčinou celiakie neodpovídající na léčbu a tvoří 10-20 % pacientů. Mužské pohlaví, přidružená autoimunitní choroba, úbytek tělesné hmotnosti a atrofie střevní sliznice se zvýšeným počtem intraepiteliálních T-lymfocytů (IEL) patří mezi predikční faktory. Diagnostika se opírá o genetické vyšetření potvrzení genotypu HLA-DQ2/DQ8 a vyšetření intraepiteliálních T-lymfocytů (Frič, 2009).

1.1.8.2 Maligní nádory

Maligní nádory jsou u pacientů s celiakii daleko vyšší než u ostatní populace (výskyt pozorovaný/očekávaný=1,3). Zvýšené riziko je u imunoproliferativních chorob a nehodgkinských lymfomů. Celková incidence lymfomů je odhadována na 8-10 %. Komplikací jsou i karcinomy tenkého střeva, jícnu a hltanu (Frič a Keil, 2011).

1.1.9 Léčba celiakie

Jedinou dosud možnou léčbou celiakie je doživotní bezlepková dieta a substituční terapie (Frič a Keil, 2011).

1.1.9.1 Bezlepková dieta

Bezlepková dieta je jediná kauzální terapie. Představuje úplné vyloučení potravin s obsahem obilovin (žito, pšenice, ječmen a oves). Vhodnou náhradou jsou potraviny bezlepkové (rýže, kukuřice, pohanka, proso, jáhly, amarant a brambory). Příznivý účinek bezlepkové diety se dostavuje v průběhu několika týdnů. Dodržování diety je kontrolováno stanovením autoprotilátek. Nejčastější příčinou neúspěšné léčby je nedodržování diety (Keil a Frič, 2011).

1.1.9.2 Substituční terapie

Substituční terapie se využívá k léčbě poruch spojených s celiakií, mezi které patří např. nedostatek vitaminů a minerálů. Jedná se o preparáty železa, kyseliny listové, vápníku, draslíku, vitamínu D a vitamínu B₁₂. Je doporučeno podávat tyto preparáty injekčně, protože je snížena vstřebávací schopnost tenkého střeva (Frič a Keil, 2011).

1.1.9.3 Jiné alternativy léčby

V současné době se hledají i jiné alternativy než bezlepková dieta, protože je finančně nákladná a snižuje pacientům komfort.

Možný krok v léčbě celiakie představuje proces inhibice antigenů. Jedním z cílů je inhibovat enzym transglutaminázu 2. Tento enzym zprostředkovává a zlepšuje prezentaci antigenů procesem deaminace. Deaminace způsobuje přeměnu aminokyselinových zbytků na glutamát, který zvyšuje afinitu T-buněk, aby vázaly imunogenní glutenové peptidy kvůli HLA. Všechny tyto reakce způsobují přehnanou imunitní odpověď a způsobují projevy celiakie. Jako vhodné inhibitory transglutaminázy byly navrženy deriváty cysteinu a imidazolu. Tato alternativa by mohla přinést i vedlejší účinky, protože se enzym transglutamináza podílí na programované buněčné smrti. Tato možnost léčby však není používána a je zapotřebí mnoho dalších výzkumů (Ali, 2015).

Další možnou alternativou je očkování. Byla provedena úspěšná studie na myších, do kterých byl očkovan imunodominantní DQ2 lepek. Na základě studie byla navržena glutenová vakcína Nexvax2, která obsahuje glutenové peptidy. Cílem očkování je navození imunitní tolerance na lepek u celiaků. Vhodnými kandidáty na vakcinaci jsou celiaci s genem HLA-DQ2 (tento gen má 90-95 % celiaků). Očkování funguje na principu tolerance imunitního systému vůči cizímu antigenu. Cílem je zamezit imunitní reakci a umožnit pacientům s celiakií normální stravovací návyky, aniž by se museli vyhýbat potravinám s obsahem lepku (Ali, 2015).

1.1.10 Prevence

Prevence celiakie lze rozdělit na primární a sekundární. Primární prevence zahrnuje prodlouženou dobu kojení dětí mateřským mlékem a oddálení prvního kontaktu s lepke. Sekundární prevence představuje dodržování bezlepkové diety, aby nedošlo k relapsu choroby (Kohout a Pavlíčková, 2010). Hlavním cílem je omezit riziko vzniku celiakie u geneticky predisponovaných jedinců. Toto opatření je potřeba provést již v těhotenství a v časném dětství. U gravidních žen s celiakií může dojít k opožděnému vývoji plodu, proto jsou doporučovány častější kontroly u lékaře. Gravidita u žen s nedagnostikovanou celiakií přináší další komplikace jako nízká porodní váha, porod císařským řezem a předčasný porod. V časném dětství dochází k vývoji střevního mikrobiomu a vyžívání imunitního systému vlivem kojení. V tomto období má kojení preventivní účinek na vznik celiakie. Ve všech populacích je prokázána nepřímá závislost mezi frekvencí kojení a projevem této nemoci. Je prokázáno, že větší množství lepku během kojení zvýší výskyt nemoci do 2 let. U dětí se doporučuje, aby první kontakt s lepke přišel ještě během kojení, ne dříve než ve 4. měsíci a ne později než v 7. měsíci. Toto doporučení snižuje riziko nejen celiakie, ale i alergie na lepek a diabetu mellitu 1. typu. V tomto období se mohou na vzniku celiakie podílet i virové enteritidy způsobené zejména rotaviry a enteroviry (Frič a Keil, 2011).

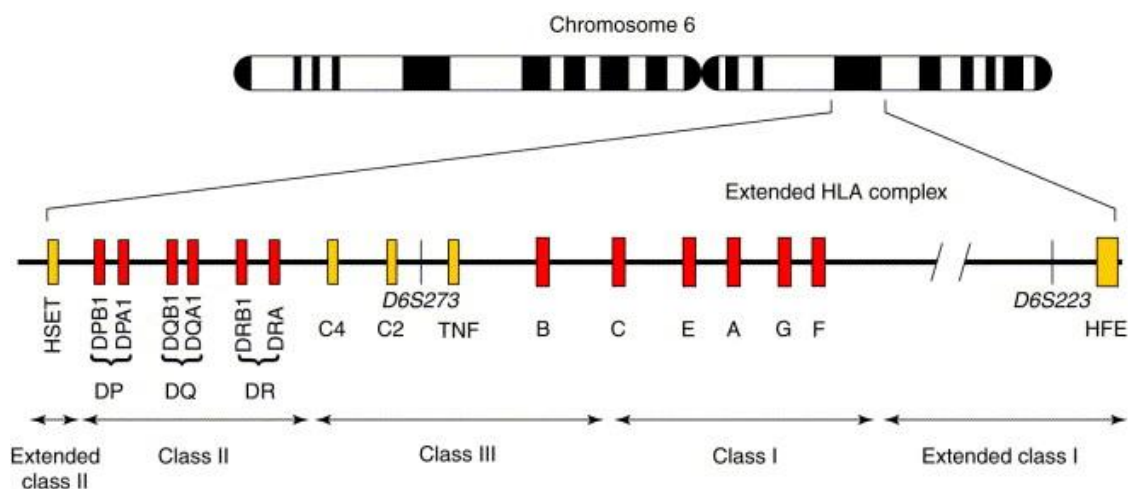
1.2 HLA systém

Hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex, MHC) je obecné označení pro histokompatibilní systémy všech vyšších živočichů. Jeho hlavní funkcí je rozlišovat „vlastní a cizí“ struktury. Tato schopnost slouží k rozpoznávání poškozených buněk a tkání, které mohou představovat potenciální nebezpečí. Označení HLA (Human Leukocyte Antigens) je vyhrazeno pro *Homo sapiens* a bylo poprvé popsáno na leukocytech. Další imunobiologickou funkcí HLA molekul je navázání antigenních peptidů do specifického vazebného místa HLA molekuly a prezentace těchto peptidů T lymfocytům (Krejsek et al., 2016).

1.2.1 Popis HLA systému

Lidský histokompatibilní komplex HLA se nachází na krátkém raménku 6. chromozomu (6p21) přibližně o velikosti 3600 kilobází DNA (Choo, 2007). V této části je vysoká hustota genů, která tvoří asi jednu tisícinu lidského genomu. Geny pro HLA se rozdělují do 3 tříd, které se nacházejí na jednotlivých lokusech. Nejvýznamnější jsou však HLA I. třídy a HLA II. třídy. Geny I. třídy kódují molekuly HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-E, HLA-F a HLA-G. Genetická oblast I. třídy je ohraničena genem *MICB* na centromerické straně a

genem pro molekulu HLA-F po straně telomerické. Geny pro molekuly HLA mají alelový charakter a jsou polymorfní. Nejvíce polymorfní jsou HLA-B, ty obsahují přes 4000 alel. V oblasti D 6. chromozomu se setkáváme s geny pro molekuly II. třídy. Tato oblast se dále dělí na podoblasti DP, DQ, DR, DO a DM. Nejbliže od centromerické části se nachází oblast DP, v této oblasti nacházíme geny pro HLA-DPA1 a HLA-DPB1. Lze zde najít geny pro transportér TAP či komponenty proteasomu LPM. Oblast III. třídy kóduje proteiny, které jsou úzce spjaty s imunitním systémem. Nalézáme zde např. geny pro komplementové složky C2 a C4 nebo gen pro TNF α (Krejsek et al., 2016).



Obr. 3 : Organizace genetické informace pro molekuly HLA (Undlien et al., 2001)

1.2.1.1 HLA molekuly I. třídy

Tyto molekuly jsou přítomné na všech jaderných buňkách organismu. Skládají se z těžkého transmembránového polypeptidového řetězce α a nekovalentními vazbami připojeného lehkého β řetězce (Hořejší et al., 2005). Molekulová hmotnost α řetězce je 44 000. U α řetězce se rozlišují tři domény: α_1 , α_2 a α_3 . Domény α_1 a α_2 vytváří vazebné místo pro peptidy. Doména α_3 je konzervativní a podobná u všech HLA I. třídy. Molekula I. třídy se skládá i z β řetězce, který je připojen nekovalentními vazbami. Jedná se o protein β -2-mikroglobulin, jehož molekulová hmotnost je 11 500. Jeho funkcí je udržovat konformaci celé molekuly. Oblast mezi doménami α_1 a α_2 vytváří vazebné místo pro antigenní peptidy. Vazební místo je schopno přijmout a navázat peptid o délce 8-10 aminokyselin. Hlavní funkcí těchto molekul je prezentace antigenních peptidů cytotoxickým CD8⁺ T lymfocytům (Krejsek et al., 2016).

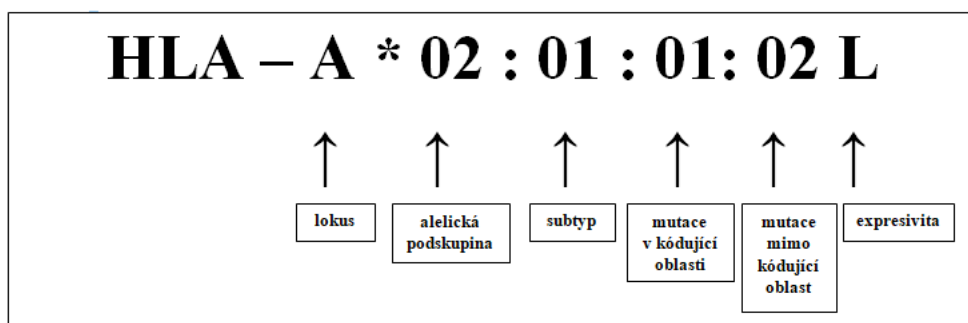
1.2.1.2 HLA molekuly II. třídy

Molekuly HLA II. třídy patří také k transmembránovým proteinům. Skládají se ze dvou nekovalentně asociovaných řetězců α a β . Molekulová hmotnost těchto řetězců je kolem 30 000. N-terminální domény α_1 a β_1 vytvářejí vazebné místo pro peptidy, které je strukturně

podobné molekulám HLA I. třídy. Vazebné místo molekul HLA II. třídy je schopno navázat peptid o délce 15-40 aminokyselin. Hlavní funkcí těchto molekul je prezentace peptidů pomocným CD4⁺ T lymfocytům. Molekuly HLA II. třídy jsou přítomné na antigen prezentujících buňkách (tzn. dendritických buňkách, makrofázích, B lymfocytech a na aktivovaných T lymfocytech) (Krejsek, et al., 2016).

1.2.2 Nomenklatura HLA systému

Názvosloví HLA alel bylo zavedeno v roce 1987 a je neustále upravováno. Označení začíná HLA, následuje lokus, který je označen velkými písmeny (např. A). Následuje symbol hvězdičky (*), který slouží jako oddělovač. Dále jsou číselné skupiny oddělené dvojtečkou (:). První číselná skupina představuje alelickou skupinu a její sérologickou specifitu. Další číselná skupina představuje alelický subtyp. Třetí číselná skupina definuje záměnu nukleotidů bez změny aminokyselinového pořadí v kódovaných proteinech. Čtvrtá skupina vyjadřuje alely s polymorfismy mimo kódovanou oblast. Na konci popisu je velké písmeno, které určuje expresivitu. Velké „L“ značí nízkou expresi, „N“ definuje neexprimovanou alelu apod. (Krejsek et al., 2016).



Obr. 4: Nomenklaturní pravidla a schematický popis alel HLA (Krejsek et at., 2016)

1.2.3 Asociace HLA s chorobami

Již před čtyřiceti lety bylo zjištěno, že některá onemocnění, zvláště s autoimunitní povahou, jsou silně asociována s HLA. Mezi nejvýznamnější nemoci, které se asociují s HLA molekulami patří narkolepsie, ankylozující spondylitida, celiakie, revmatoidní artritida a diabetes mellitus. Přesné mechanismy mezi HLA a chorobami se dosud nepodařilo objasnit. Předpokládá se, že zde hrají roli environmentální a genetické faktory (Choo, 2007). Existuje řada hypotéz, které se snaží vysvětlit mechanismus vlivu HLA fenotypu na určité onemocnění. Jedna z hypotéz říká, že na specifické vazebné místo HLA molekuly nasedne antigenní peptid, který má asociaci s konkrétním onemocněním. T lymfocyt rozpozná peptid a vyvolá zánětlivou reakci. Příkladem takového onemocnění je celiakie nebo revmatoidní

artritida. Další hypotéza je založená na tzv. molekulových mimikrách, jejíž podstatou je podobnost molekuly HLA se strukturami patogenů. Příkladem takového onemocnění je Bechtěrevova nemoc a její spojitost HLA-B27 a Klebsiellou (Krejsek et al., 2016).

Asociace HLA s celiakií je známa již delší dobu. Nalézáme u ní výskyt molekul HLA-DQ, konkrétně HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8. HLA-DQ2 je kódován rizikovými alelami HLA-DQA1*05:01/HLA-DQB1*02:01. HLA-DQ8 je kódován rizikovými alelami HLA-DQA1*03:01/HLA-DQB1*03:02.

U revmatoidní artritidy byla prokázána asociace s HLA-DR4, hlavně s alelami HLA-DRB1*04:01, HLA-DRB1*04:04 a HLA-DRB1*04:05.

U diabetu mellitu nalézáme silnou asociaci s alelami HLA-DQB1*03:02, HLA-DQB1*02:01 a HLA-DQB1*03:03.

Velmi silná asociace HLA je i u ankylozující spondylitidy s molekulou HLA-B27. Kritickými alelami jsou HLA-B*27:02, HLA-B*27:04, HLA-B*27:05 a HLA-B*27:07. S molekulou HLA-B27 je asociován Reiterův syndrom a akutní uveitida.

Mezi další onemocnění, které se pojí s HLA molekulami, patří systémový lupus erythematoses, Hashimotova tyreotida nebo myastenia gravis.

HLA molekuly jsou citlivé i na infekce. Např. molekula HLA-DR2 je vnímavá na *Mycobacterium leprae*, HLA-B53 na malárii a molekuly HLA-B35 a HLA-B53 jsou asociovány s HIV.

Byla prokázána citlivost molekul HLA na některé léky. Příkladem je alela HLA-B*57:01 s lamivudinem. Lamivudin je antiretrovirotikum, které se používá v léčbě HIV/AIDS. U pacientů s HLA-B57 byly zaznamenány silné anafylaktické reakce (Krejsek et al, 2016).

1.2.4 Asociace HLA s celiakií

U více jak u 90 % celiaků se setkáváme s přítomností HLA-DQ2 heterodimeru, označovaným jako DQ2.5, který je kódován alelami DQA1*05 a DQB1*02. Tyto alely se nachází na stejném chromozomu (konfigurace cis), nebo odděleně na dvou homologních chromozomech (konfigurace trans). Alely DQA1*05 a DQB1*02 jsou většinou v konfiguraci cis jako DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 haplotyp, nebo v konfiguraci trans jako DRB1*11/12-DQA1*05:05-DQB1*03:01 haplotyp nebo DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:02 haplotyp. Rozsáhlé studie potvrdily, že homozygotnost DQB1*02 je spojena se

zvýšeným rizikem a agresivnějšími formami celiakie. Celiaci, kteří jsou DQ2.5 negativní (5-10 %) nesou DQ8 heterodimer, který je kódovaný alelou DQB1*03:02 společně v kombinaci s DQA1*03 v cis konfiguraci (DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02). U celiaků, kteří jsou DQ2.5 nebo DQ8 negativní (5%), jsou přítomny molekuly DQ2.X, které jsou kódovány DQB1*02 za nepřítomnosti varianty DQA1*05. Velmi zřídka nacházíme u pacientů s celiakií jiné molekuly DQ. Tyto molekuly se označují jako DQX.5 heterodimery, které jsou kódované alelou DQA1*05 za nepřítomnosti variant DQB1*02 nebo *03:02. Molekuly DQX.x jsou tvořeny DQA1≠*05 alfa řetězcem a DQB1≠*02 nebo ≠*03:02 beta řetězcem. Byly zaznamenány také rozdíly v expresi molekul HLA u pohlaví. Celiaticky často nesou DQ2.5 a/ nebo DQ8 molekuly, které se u celiatiků nevyskytují (Magiorni a Pizzuti, 2012).

Tabulka č. 1: HLA varianty a s nimi spojené riziko s celiakií

HLA varianta	Riziko celiakie
DQ2.5 a DQ8	Velmi vysoké
DQ2.5 (DQB1*02 v homozygotním stavu)	Velmi vysoké
DQ8	Vysoké
DQ2.5 (DQB1*02 v heterozygotním stavu)	Vysoké
DQ2.x (DQB1*02 v homozygotním stavu)	Vysoké
DQ2.x (DQB1*02 v heterozygotním stavu)	Nízké
DQX.5	Velmi nízké
DQX.x	Velmi nízké

(Magiorni a Pizzuti, 2012)

1.3 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z anglického Polymerase Chain Reaction) je molekulární metoda, která byla vyvinuta v roce 1985 Kary B. Mullisem. Tato metoda umožňuje rychlé a snadné namnožení požadované a specifické sekvence DNA *in vitro* na principu replikace nukleových kyselin (Šmarda, 2005).

K této *in vitro* amplifikaci je potřeba templátová DNA, u které chceme provést amplifikaci. Dále primery (synteticky připravované oligonukleotidové fragmenty komplementární ke koncům templátu), deoxyribonukleotidtrifosfáty (dATP, dTTP, dCTP a dGTP) a DNA polymerázu (Mazura, 1999). Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin. Podstatou je cyklická enzymová syntéza vybraných částí dvouřetězcové DNA ve směru 5→3.

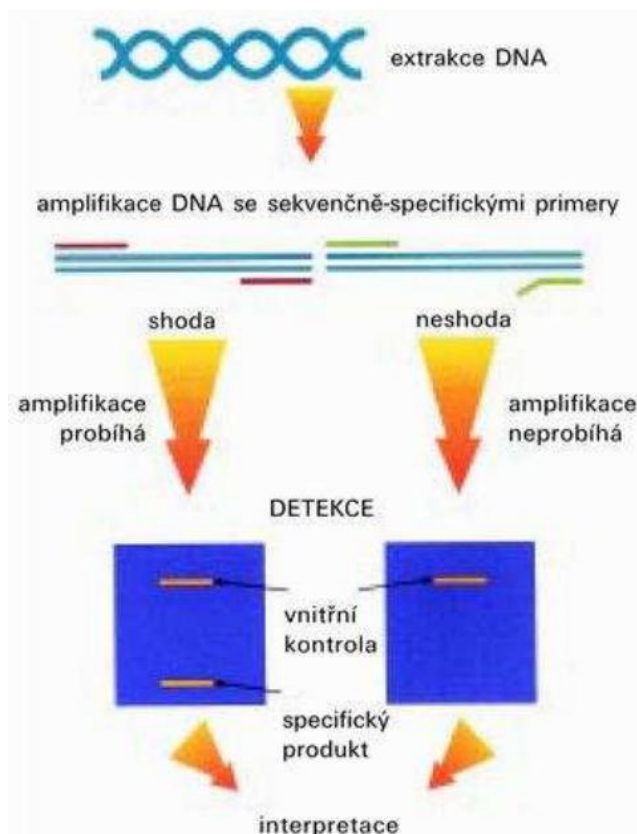
K syntéze nového vlákna se používají termostabilní polymerázy, které se izolují z termostabilních organismů. Nejčastěji používaná je Taq polymeráza. Jedná se o enzym, který byl izolován z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v horkých pramenech. Díky tomu odolává vysokým teplotám, při nichž se DNA denaturuje. To umožňuje, aby PCR probíhala cyklicky. V průběhu PCR se střídají tři cykly, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými teplotními nároky:

- Denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94°C)
- Nasednutí primerů k odděleným řetězcům DNA (30-65°C)
- Syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy (65-75°C).

PCR se provádí v termocykleru. Je to zařízení, které je schopné automaticky měnit teplotu v časových intervalech. Postupným opakováním tří cyklů se vytváří až miliarda kopií vybraného úseku DNA. Výsledným produktem jsou úseky DNA určité délky o velikosti desítek až tisíce bp, které se nazývají amplikony. Podrobná analýza PCR produktů se provádí několika metodami (Šmarda, 2005). Nejrozšířenější metodou pro analýzu produktů PCR je elektroforéza na agarózovém gelu, kde se oddělují produkty DNA na základě velikosti a náboje. Gelová elektroforéza umožňuje stanovit přítomnost a velikost PCR produktu. Ke stanovení velikosti je potřeba molekulárního markeru, což je předem určená DNA se známou velikostí (Garibyan a Avashia, 2013).

1.3.1 PCR-SSP

Polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP) je modifikace klasické PCR, kde je využíváno detekce sekvence specifické pro alelu pomocí specifických primerů (Krejsek et al., 2016). Prodlužování primerů je závislé na přesné shodě 3' konců obou primerů s templátovou DNA. Dojde-li k přesnému usazení obou primerů na cílovou sekvenci, získáme produkt, který se identifikuje gelovou elektroforézou (návod k použití HISTO TYPE SSP Kits, 2017).



Obr. 5: Princip PCR-SSP (Petřek, 2000)

1.3.1.1 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je fyzikálně-chemická metoda, která slouží k separaci nukleových kyselin v elektrickém poli (Knoll a Vykoukalová, 2002). Principem je pohyb záporně nabitých fosfátových skupin ke kladně nabitě elektrodě. Elektroforéza se provádí na vhodném nosiči, tj. agarózový nebo polyakrylamidový gel. Agarózové gely se používají pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti od 100 bp až po 50 kb, polyakrylamidové gely jsou vhodnější pro separaci menších molekul o velikosti 10 až 1000 bp (Šmajda, 2005). Elektroforéza slouží i identifikaci, separaci a purifikaci fragmentů DNA, které jsou děleny ve stejnosměrném elektrickém poli v závislosti na velikosti fragmentů (Ruml et al., 2002). Elektroforéza se provádí v zařízení, které se skládá z elektroforetické vany s anodou, katodou a pufrem, držáku gelu, kde dochází k separaci, a externího zdroje stejnosměrného napětí. Rozpuštěný agarózový gel se nalije do vaničky, kde jsou tzv. hřebínky, které vytvoří jamky pro umístění vzorků. DNA putuje ke kladné elektrodě, anodě. Rychlost pohybu závisí na vlastnostech DNA, nosiče (gelu), pufru a přivedeném napětí (Knoll a Vykoukalová, 2002). Velikost separovaného vzorku o neznámé velikosti lze stanovit srovnáním s elektroforetickou pohyblivostí velikostního standardu, což je molekula DNA o známé velikosti. Separované molekuly je také potřeba zviditelnit. K tomu je potřeba např. ethidium bromidu (EtBr). Jedná

se o nejpoužívanější metodu k barvení gelů, využívá se zde fluorescenčních vlastností ethidia, který interkaluje mezi sousední páry bází v DNA a vytváří komplex, který po osvětlení ultrafialovým světlem červeně fluoreskuje (Šmarda, 2005). Ethidium bromid detekuje dvouřetězcové i jednořetězcové molekuly. Jeho nevýhodou je silná mutagenita a toxicita (Knoll a Vykoukalová, 2002).

1.3.2 RT-PCR

Real Time PCR je další z mnoha modifikací PCR. RT-PCR umožňuje detekci a kvantifikaci PCR produktu v reálném čase, zatímco je produkt syntetizován (Garibyan a Avashia, 2013). Záznam amplifikace je vyhodnocen na základě sledování intenzity fluorescenčního signálu ze sond. Jedním z mnoha využití této metody je v kvantifikaci genomové DNA (např. viry, GMO) nebo mRNA. Lze ji použít i k analýze bodu tání produktu, kde se ověřuje identita a kvalita produktu. Ve své práci však bude použita ke genotypizaci (Knoll a Vykoukalová, 2002).

K detekci fluorescenčního signálu se používají různé typy metod. Dvě nejběžnější metody jsou SYBR Green a Taqman. SYBR Green I je fluorescenční barvivo, které se nespecificky váže na dvouvláknovou DNA. Slouží ke kvantifikaci a identifikaci produktů. Toto barvivo se stává fluorescenčně aktivní v případě, že se naváže na dvouvláknovou DNA, kterou je PCR produkt. Cykler tak po každém cyklu excituje molekuly SYBR Green I a zaznamenává emitované množství zeleného světla. TaqMan jsou hydrolyzační sondy, které jsou na obou koncích značené dvěma molekulami: reportérem a zhášecem (angl. quencher). Reportér vydává fluorescenční záření a zhášec je schopný inhibice fluorescenčního záření emitovaného reportérem, je-li v jeho blízkosti. Exonukleázovou aktivitou Taq polymerázy dochází k odbourávání navázané sondy, což způsobí ukončení zhášení a dojde k emisi fluorescence v závislosti na růstu množství PCR produktu (Knoll a Vykoukalová, 2002).

Na metodu RT-PCR je potřeba speciální typ cykleru, který umí odečítat intenzitu fluorescence ve vzorku, nezbytnou součástí je vyhodnocovací zařízení, které zpracovává optický signál (Knoll a Vykoukalová, 2002).

2 Cíl práce, hypotézy

2.1 Cíle práce

Cílem praktické části bakalářské práce bylo osvojit si praktické znalosti správné laboratorní praxe v genetické laboratoři. Zavést a zoptimalizovat komerčně dodávaný kit pro vyšetření HLA alel asociovaných s celiakií na principu PCR-SSP. Již vyšetřené pacienty vyšetřit metodou Real Time PCR. Dále zvládnutí metody izolace DNA z bukalního stěru, příprava PCR reakce, gelová elektroforéza a vyhodnocení dat. Porovnat obě metody z hlediska náročnosti a shody.

2.2 Hypotézy

1. Předpokládám, že výhodou Real-Time PCR bude rychlost získání výsledků oproti PCR-SSP.
2. Předpokládám, že výsledky obou metod budou ve většině případů shodné.

3 Metodika

Data pro svou bakalářskou práci jsem sbírala v období od 1. 9. 2017 do 12. 4. 2018 v Českých Budějovicích. Vyšetřovaným souborem byli pacienti genetické laboratoře GENLABS, s. r. o. a dobrovolníci s podezřením na celiakii. Od pacientů genetické laboratoře GENLABS jsem již dostala naizolovanou DNA, zatímco u dobrovolnické části souboru jsem izolovala DNA sama. Výchozím biologickým materiálem všech vzorků byl stěr bukální sliznice. Veškerá data k bakalářské práci jsou zpracována anonymně. Samotný výzkum jsem prováděla v genetické laboratoři na Zdravotně sociální fakultě, Zemědělské fakultě a v GENLABS, s.r.o. v Českých Budějovicích pod vedením Ing. Tomáše Nixe, Ph.D.

3.1 Izolace DNA

Prvním krokem samotného vyšetření je izolace DNA. V naší genetické laboratoři se používá komerčně dodávaný kit QiAmp DNA Mini Kit od QIAGEN. Tento kit využívá schopnost nukleové kyseliny vázat se v přítomnosti chaotropních solí na silikátový povrch v silikagelové kolonce. Izolace DNA lze rozdělit do několika kroků. Nejprve dochází k lýze buněk z bukálního stěru a k uvolnění DNA, která je následně vysrážena etanolem. Vzniklý buněčný lyzát je přenesen na kolonku se silikagelem, kde se zachytí DNA a ostatní složky lyzátu po centrifugaci protečou. Následuje promývání DNA promývacími pufrů, které odstraní nežádoucí látky. Na silikagelové kolonce pak zůstane čistá DNA, která se uvolní elučním pufrům (aktuální příbalová informace k soupravě *QIAamp DNA Mini Kit Handbook*, 2016).

Přístrojové vybavení:

- Vortex mixer: Labnetinternational, Inc.
- Minicentrifuga: PrismTMMini
- Centrifuga: MiniSpinEppendorf
- Inkubátor: Mini Dry Bath
- Automatické mikropipety
- Mrazicí a chladičí box pro laboratorní účely

Chemikálie:

- reagentie komerčně dodávaného kitu QiAmp DNA Mini Kit od QIAGEN
- ethanol

Postup:

1. Do 2 ml mikrozkušavky sterilně odstříhneme nylonový tampón se vzorkem, poté napipetujeme 20 μ l proteinázy K a 400 μ l AL pufru. Směs několikrát zvortexujeme a stočíme.
2. Mikrozkušavku se směsí 15 minut inkubujeme při 56°C v inkubátoru, poté ji zcentrifugujeme a zvortexujeme. Nylonový tampon sterilně vyndáme.
3. Ke směsi přidáme 200 μ l 96 % ethanolu. Vzorek se zvortexujeme a krátce stočíme.
4. Výslednou směs přelijeme do označené QIAamp spin kolonky, která je vložena v kolekční zkumavce. Kolonku uzavřeme a stočíme v centrifuze na 1 minutu při otáčkách 6000 g.
5. Kolekční zkumavku s filtrátem vyhodíme a vložíme kolonku do nové kolekční zkumavky.
6. Do kolonky přidáme 500 μ l promývacího pufru AW1, stočíme v centrifuze na 1 minutu při otáčkách 6000 g.
7. Kolekční zkumavku s filtrátem vyhodíme a vložíme kolonku do nové kolekční zkumavky.
8. Do kolonky přidáme 500 μ l promývacího pufru AW2, stočíme v centrifuze na 3 minuty při otáčkách 20 000 g.
9. Kolekční zkumavku s filtrátem vyhodíme a vložíme kolonku do nové kolekční zkumavky, stočíme v centrifuze na 1 minutu na maximální možné otáčky.
10. Kolekční zkumavku s filtrátem vyhodíme a kolonku vložíme do 1,5 ml zkumavky, která je předem označena číslem DNA, datem a příjmením.
11. Do kolonky přidáme 200 μ l elučního pufru AE. Necháme inkubovat 5 minut při pokojové teplotě.
12. Stočíme v centrifuze na 2 minuty při otáčkách 6000 g.
13. Roztok DNA znovu napipetujeme na kolonku a necháme inkubovat 5 minut.
14. Stočíme v centrifuze na 2 minuty při otáčkách 6000 g.
15. Zkumavka s izolovanou DNA se pro krátkodobé skladování uchovává v lednici, pro dlouhodobé v mrazicím boxu (aktuální příbalová informace k soupravě *QIAamp DNA Mini Kit Handbook*, 2016).

Naizolovanou DNA se doporučuje také precipitovat (přečistit).

Postup:

1. K roztoku DNA přidáme 22 μ l 3M octan sodný. Směs zvertexujeme a stočíme.
2. Ke směsi přidáme 2,5 objemu 96% ledového etanolu (tj. 555 μ l etanolu). Směs zvertexujeme a stočíme.
3. Mikrozkušavku dáme minimálně na 1 hodinu do mrazicího boxu.
4. Stočíme v centrifuze na 20 minut na maximální možné otáčky.
5. Odstraníme supernatant a přidáme 555 μ l 75 % ledového etanolu.
6. Směs promícháme 2-3 x ve dlani.
7. Stočíme v centrifuze na 5 minut na maximální možné otáčky.
8. Odpipetujeme supernatant a peletu DNA necháme přes noc vyschnout v boxu.
9. Připipetujeme 10 μ l PCR vody, zvertexujeme a stočíme.

Po precipitaci se měří koncentrace DNA.

3.2 Měření koncentrace DNA

Měření koncentrace DNA jsme prováděli pomocí přístroje spektrofotometru UV/VIS Shimadzu BioSpec-nano a příslušného počítačového programu. Tento model se používá pro měření malých objemů od 1 μ l v rozsahu 220 nm do 800 nm. Jeho výhodou je rychlé a jednoduché měření koncentrace nukleových kyselin (návod na obsluhu Spectrophotometer For Life Science BioSpec-Nano, 2012).

Přístrojové vybavení:

- Spektrofotometr: UV/VIS ShimadzuBioSpec-nano (viz příloha č. 1)
- Vortex mixer: Labnetinternational, Inc.
- Minicentrifuga: PrismTMMini
- Automatická mikropipeta

Postup:

1. Před samotným měřením musíme řádně zvertexovat a stočit vzorek DNA.
2. Nejprve si na měřicí terč napipetujeme 1 μ l blanku (PCR voda) a stiskneme na počítačové obrazovce ikonu „blank“.
3. Poté napipetujeme na měřicí terč 1 μ l DNA a stiskneme ikonu „start“.
4. DNA je proměřena a v programu uložena pod příslušným identifikačním číslem.

3.3 PCR-SSP

Pro HLA genotypizaci technikou PCR-SSP byl použit komerčně dodávaný kit HISTO TYPE Celiac Disease od firmy BAG Health Care. Kit je určen na typizaci HLA na molekulárně genetickém základě. Celiakie je silně asociována s HLA alelami DQA1*05:01-DQB1*02:01 a DQA1*03-DQB1*03:02 haplotypem (návod k použití HISTO TYPE SSP Kits, 2017).

3.3.1 Amplifikace

HISTO TYPE Celiac Disease stripy pro HLA typizaci jsou již předkapané, převaliquotované a vysušené reakční směsi, které obsahují specifické primery pro danou alelu, stejně jako kontrolní primery a nukleotidy. První reakční směs je vždy označena šipkou a poslední reakční směs je kontaminační kontrola, která je označena modře (viz příloha č. 2) (návod k použití HISTO TYPE SSP Kits, 2017).

Přístrojové vybavení:

- Termocykler: MJ MiniTMPersonalThermalCycler (viz příloha č. 3)
- Vortex mixer: Labnetinternational, Inc.
- Minicentrifuga: PrismTMMini

Chemikálie:

- souprava pro PCR-SSP HISTO TYPE Celiac Disease od firmy BAG Health Care
- Happy Taq polymeráza
- H₂O pro PCR

Postup:

1. Z krabice si vyndáme požadovaný počet testů. Jeden test se skládá ze tří řad po 8 mikrozkušavkách.
2. Do 1,5 ml mikrozkušavky si připravíme Master-Mix z 28 µl 10x PCR pufru, 2,2 µl Happy Taq polymerázy a 222 µl PCR- H₂O. Obsah mikrozkušavky zvortexujeme a krátce centrifugujeme.
3. 10 µl směsi bez DNA přidáme do poslední mikrozkušavky s kontaminační kontrolou. Poté přidáme 28 µl DNA o koncentraci 25-50 ng/µl. Směs zvortexujeme a centrifugujeme.
4. Master-Mix s DNA rozpipetujeme do zbylých 23 reakčních směsí ve stripech po 10 µl. Po každém pipetování vyměňujeme špičku.

5. Stripy pevně uzavřeme víčky a nedotýkáme se vnitřní strany víček, ani horních okrajů mikroskopů, abychom maximálně omezili kontaminaci.
6. Destičku lehce sklepneme dolů, tak aby se Master-Mix dostal ke zbytku reagentů na dně mikroskopu a rozpustil peletku.
7. Destičku krátce stočíme a vložíme do cyklu. Víko cyklu těsně upevníme, aby se mikroskopu v průběhu PCR neotevřely a nevypařil se obsah.
8. Na cyklu nastavíme a spustíme příslušný PCR program (návod k použití HISTO TYPE SSP Kits, 2017).

Tabulka č. 2: Parametry amplifikace pro soupravu HISTO TYPE Celiac Disease

Krok programu	Teplota	Čas	Počet cyklů
První denaturace	96°C	5 min.	1 cyklus
Denaturace	96°C	20 s.	5 cyklů
Annealing + extenze	68°C	1 min.	
Denaturace	96°C	20 s.	10 cyklů
Annealing	64°C	50 s.	
Extenze	72°C	45 s.	
Denaturace	96°C	20 s.	15 cyklů
Annealing	61°C	50 s.	
Extenze	72°C	45 s.	
Závěrečná extenze	72°C	5min	1 cyklus

(upraveno dle návodu k použití HISTO TYPE SSP Kits, 2017)

3.3.2 Gelová elektroforéza PCR produktů

Gelová elektroforéza na horizontálním agarózovém gelu se používá k separaci amplifikačních produktů. Separaci jsme prováděli v elektroforetické vaně s 0,5 x TBE pufrem (45mM Tris, 45mM kyselina boritá, 0,5 mM EDTA) a na agarózovém gelu o koncentraci 2 %. (návod k použití HISTO TYPE SSP Kits, 2017).

Přístrojové vybavení:

- Jednotka na gelovou elektroforézu: MS major science Safe Blue MBE-150 PLUS (viz příloha č. 4)
- Laboratorní sklo
- Laboratorní váhy
- Mikrovlnná trouba

Chemikálie:

- Agaróza pro separaci DNA (Top Vision Agarose, ThermoScientific)
- 0,5x TBE pufr (45mM Tris, 45mM kyselina boritá, 0,5 mM EDTA)
- Ethidium bromid (Ethidium bromide aqueoussolution 1% w/v, SERVA)
- DNA délkový standard (100 bp DNA Ladderequalized, Carl Roth GmbH + Co. + Co. KG Karlsruhe)

Postup:

1. Na laboratorní váze navážíme 1,5 g agarózy a přidáme ji do Erlenmayerovy baňky.
2. Poté přilijeme 75 ml 0,5 TBE pufru. Směs povaříme v mikrovlnné troubě a v momentě, kdy je agaróza rozpuštěna, tak směs dáme do vodní lázně.
3. Při dosažení teploty 70°C k směsi přidáme 2 µl ethidium bromidu a pečlivě promícháme.
4. Roztok nalijeme do vodorovné formy s hřebínky.
5. Gel necháme asi 30 minut polymerizovat. Poté odstraníme hřebínky a přeneseme gel do elektroforetické vany s 0,5x TBE puftrem.
6. Po ukončení amplifikace vyjmeme vzorky z cykleru a vneseme celý reakční objem do odpovídající jamky v gelu. Dále přidáme 10 µl DNA délkového standardu tak, aby bylo možno odečíst délku produktů amplifikace.
9. Po nanesení vzorků na gel uzavřeme a zapneme elektroforézu na 70 V a 30 minut. (návod k použití HISTO TYPE SSP Kits, 2017).

3.3.3 Dokumentace a interpretace výsledků

Po dokončení elektroforézy položíme a prosvítíme gel UV transiluminátorem a vyfotografujeme jej fotografickým přístrojem. Vyhodnocení a interpretaci výsledků provádíme pomocí softwaru HISTO TYPE (návod k použití HISTO TYPE SSP Kits, 2017).

Přístrojové vybavení:

- UV transiluminátor a detekční systém: Uvitec Cambridge, UVISAVE HD5 (viz příloha č. 5)
- Počítač se softwarem HISTO TYPE (viz příloha č. 6)

3.4 RT-PCR

Pro HLA genotypizaci technikou RT-PCR byl použit komerčně dodávaný kit EliGene* Coeliac RT (DQ2,DQ8, DRB1*04) od firmy Elisabeth Pharmacon. Tato souprava slouží ke genotypizaci HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02), DQ8 (DQB1*0302) a HLA DRB1*04 genů z izolované DNA. Pro detekci alel genů pro DQ2, DQ8 a DRB a interní kontroly jsou použity specifické primery a fluorescenčně značené sondy (FAM a JOE). Tento kit využívá jako interní izolační kontrolu detekci lidského genu *SYPL2* (*synaptophysin-like 2*) v CELIDRB Mixu v kanálu JOE. Tento gen se nachází v každé lidské DNA. Amplifikace a detekce produktů probíhala v přístroji LightCycler 2.0 (Roche). (*Aktuální příbalová informace k soupravě EliGene*Coeliac RT (DQ2, DQ8, DRB1*04), 2018*).

Přístrojové vybavení:

- LightCycler 2.0 (Roche) (viz příloha č. 8)
- Vortex mixer: Labnetinternational, Inc.
- Centrifuga: MiniSpinEppendorf
- Automatické mikropipety
- Mrazicí a chladič box pro laboratorní účely

Chemikálie:

- Souprava EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DRB4)
- PCR H₂O

Postup:

1. Z mrazicího boxu vyjmeme jednotlivé reagenty: CELI DQ2 Mix, CELI DQ8 Mix, CELI DRB mix a pozitivní kontrolu. Zkumavky po rozmrazení promícháme a stočíme.
2. Pro každý vzorek pipetujeme do tří sad amplifikačních kapilár po 17,5 µl každého mixu a přidáme 2,5 µl izolované DNA.
3. Jako pozitivní kontrola slouží PC CELI, která je součástí soupravy.
4. Jako negativní kontrola slouží PCR voda.
5. Kapiláry byly uzavřeny víčky, stočeny a vloženy do karuselu, který jsme umístili do přístroje LightCycler 2.0 (Roche) a byl spuštěn příslušný teplotní profil, který je uvedený v tabulce č. 3. Amplifikace probíhala necelé 2 hodiny.

6. Odečet výsledků RT-PCR byl proveden podle nárůstu emisního spektra v kanálech FAM a JOE.

Tabulka č. 3: Parametry amplifikace pro soupravu EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DRB4)

Krok programu	Počet cyklů	Čas	Teplota
Denaturace	1 cyklus	3 min.	95°C
Kvantifikace	45 cyklů	15 s. 40 s.	95°C 58°C
Chlazení	1 cyklus	1 min.	40°C

(upraveno dle příbalové informace k soupravě EliGene® Celiac Disease RT (DQ2, DQ8, DRB1*04), 2018)

4 Výsledky

Pro tuto bakalářskou práci byl vyšetřen soubor 18 vzorků v období od 1. 9. 2017 do 12. 4. 2018. Z tohoto souboru bylo vyšetřeno 18 vzorků komerčně dodávaným kitem HISTO TYPE Celiac Disease od firmy BAG Health Care na principu PCR-SSP. Druhou vyšetřovací metodou byla RealTime-PCR, která byla prováděna pomocí kitu EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DRB4). Touto metodou bylo vyšetřeno 5 vzorků. Oběma metodami bylo vyšetřeno pouze 5 vzorků, a to z důvodu nedostatku DNA a reagensů pro metodu RealTime-PCR.

Vyšetřované DNA byly získány izolací stěru z bukální sliznice od dobrovolníků s podezřením na celiakii. DNA byla izolována komerčně dodávaným kitem QiAmp DNA Mini Kit od firmy QIAGEN. Výsledné koncentrace DNA jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 4: Koncentrace DNA testovaných vzorků

Číslo vzorku	Koncentrace [ng/μl]	Číslo vzorku	Koncentrace [ng/μl]
1	230,9	10	87,9
2	585,6	11	69,9
3	72,5	12	87,6
4	64,2	13	117,3
5	59,3	14	51,2
6	175,0	15	87,8
7	66,4	16	121,6
8	96,0	17	224,0
9	79,3	18	153,0

(vlastní výzkum)

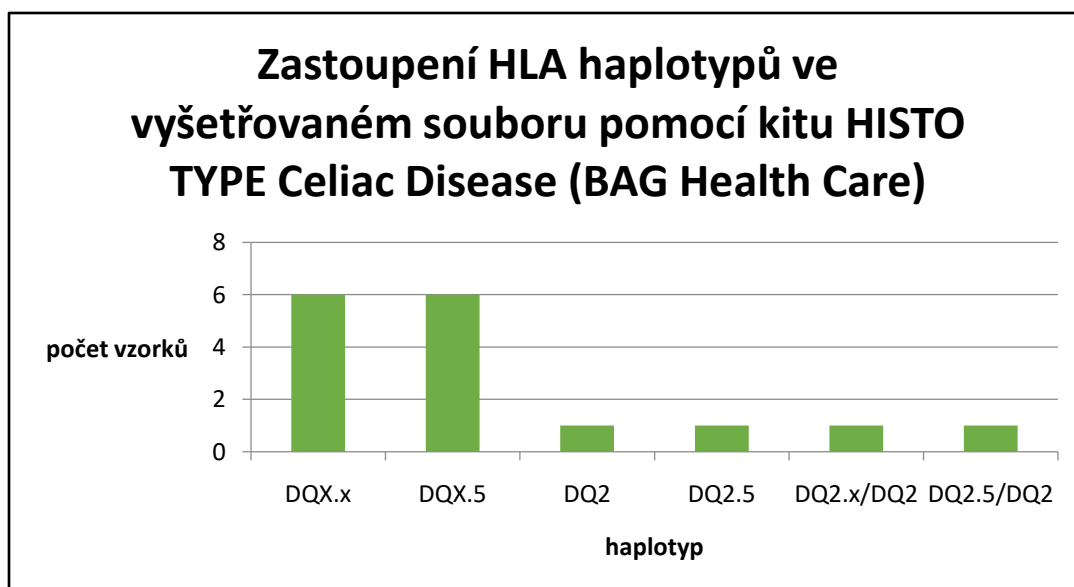
4.1 PCR-SSP

Komerčně dodávaným kitem HISTO TYPE Celiac Disease od firmy BAG Health Care na principu PCR-SSP bylo celkem vyšetřeno 18 vzorků, avšak u 2 vzorků se nám nepovedlo vyšetření provést. V tabulce č. 5 jsou uvedeny výsledky vyšetřených vzorků metodou PCR-SSP. V grafu (obr. č. 6) je uvedeno zastoupení HLA haplotypů v mém vyšetřovaném souboru pomocí kitu HISTO TYPE Celiac Disease. Vyšetřeno tedy bylo celkem 16 vzorků. Nejčastěji se vyskytujícím haplotypem ve vyšetřovaném souboru je haplotyp DQX.x a DQX.5. U těchto HLA variant je riziko vzniku celiakie velmi nepravděpodobné. Další zastoupený haplotyp je DQ2, u kterého je riziko rozvoje celiakie nízké. U HLA variant DQ2.5 a DQ2.x/DQ2 je riziko rozvoje nemoci vysoké. U haplotypu DQ2.5/DQ2 je riziko rozvoje celiakie velmi vysoké. Haplotypy DQ2.5/DQ8 a DQ8 nebyly v tomto souboru nalezeny.

Tabulka č. 5: Výsledky vyšetřených vzorků metodou PCR-SSP

Číslo vzorku	Výsledný haplotyp vyšetřený metodou PCR-SSP
3	DQX.x
4	DQX.5
5	DQX.x
6	DQX.x
7	DQX.5
8	DQ2
9	DQX.5
10	DQX.5
11	DQX.x
12	DQX.x
13	DQX.x
14	DQX.5
15	DQ2.x/DQ2
16	DQ2.5
17	DQX.5
18	DQ2.5/DQ2

(vlastní výzkum)



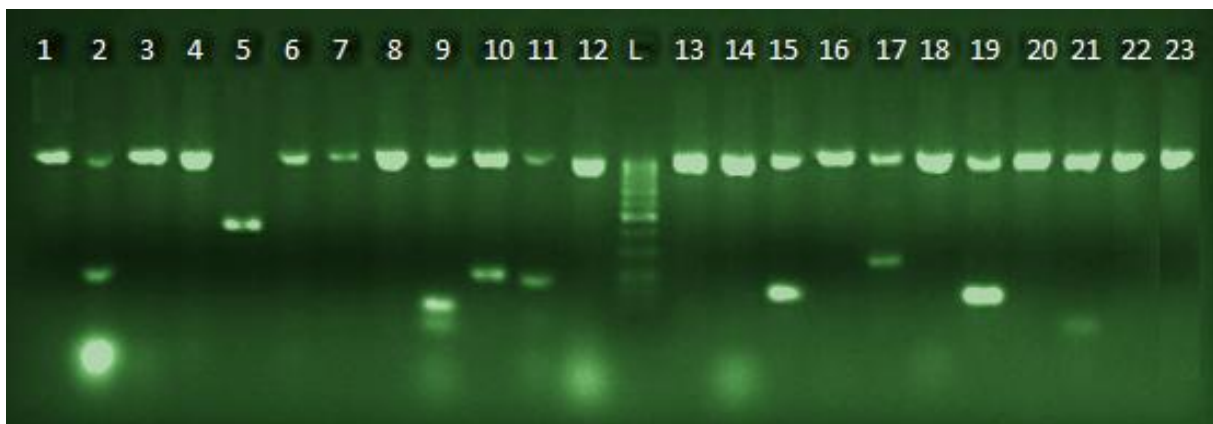
(vlastní výzkum)

Obrázek č. 6: Zastoupení HLA haplotypů ve vyšetřovaném souboru pomocí kitu HISTO TYPE Celiac Disease (BAG Health Care)

V této části uvádím několik vzorků, které byly vyšetřené kitem HISTO TYPE Celiac Disease od firmy BAG Health Care na principu PCR-SSP v genetické laboratoři na Zdravotně sociální fakultě V Českých Budějovicích.

Čísla 1 – 23 označují jednotlivé PCR reakce, kdy do každého slotu v gelu bylo napipetováno celé množství reakční zkumavky ze stripu ze soupravy (viz příloha č. 2). 24. reakce byla kontaminační kontrola. L (ladder) označuje hmotnostní marker (100 bp DNA Ladderequalized, Carl Roth GmbH + Co. + Co. KG Karlsruhe), který byl napipetován do prostředního slotu po 5 µl. Po gelové elektroforéze se gel hodnotil na UV transiluminátoru. Sledovala se přítomnost vnitřní kontroly (o velikosti 1070 bp, zatímco u 5. reakce o velikosti 430 bp) a možných PCR produktů v rámci jednotlivých reakcí. Pozitivní reakce byly zaznamenány do softwaru HISTO MATCH pro vyhodnocení a interpretaci výsledků. Tento program odvodil pozitivitu jednotlivých alel a příslušný heterodimer, který určil riziko celiakie. Pro každý vzorek byla možnost exportovat ze softwaru report o výsledku daného vzorku. V příloze přikládám report o vzorku č. 16 (viz příloha č. 8).

Obrázek č. 7 : Gelová elektroforéza vzorku č. 3



(vlastní výzkum)

Vyhodnocení gelové elektroforézy:

Pozitivní PCR reakce: **2** (velikost produktu 200 bp), **9** (velikost produktu 105 bp), **10** (velikost produktu 200 bp), **11** (velikost produktu 185 bp) a **15** (velikost produktu 135 bp). Součástí každé reakce je PCR fragment vnitřní kontroly (o velikosti 1070 bp, zatímco u 5. reakce o velikosti 430 bp).

Výsledky alelických skupin:

DRB1*03 , DRB1*04 [1]; DRB1*03 , DRB1*08 [0]; DRB1*03 , DRB1*14 [0]; DRB1*14 ,

DRB1*04 [1]; DRB1*14 , DRB1*08 [0]; DRB1*14 , DRB1*14 [0]; DRB1*04,- [2];
DRB1*04 , DRB1*04 [1]; DRB1*04 , DRB1*08 [1]; DRB1*04 , DRB1*14 [1]; DRB1*04 ,
DRB1*11 [1]; DRB1*08,- [0]; DRB1*08 , DRB1*14 [0]; DRB1*08 , DRB1*11 [0];
DRB1*14,- [0]; DRB1*14 , DRB1*11 [0]; DQB1*02 , DQB1*03 [1]; DQB1*03,- [2];
DQB1*03 , DQB1*03 [2]; DQB1*03 , DQB1*06 [1]; DQA1*05,- [0]

Výsledek testu:

Na základě pozitivních reakcí byl detekován haplotyp DQX.x. U této HLA varianty je riziko vzniku celiakie velmi nízké.

Obrázek č. 8 : Gelová elektroforéza vzorku č. 4



(vlastní výzkum)

Vyhodnocení gelové elektroforézy:

Pozitivní PCR reakce: **4** (velikost produktu 170/175 bp), **9** (velikost produktu 105 bp), **10** (velikost produktu 200 bp), **11** (velikost produktu 185 bp), **15** (velikost produktu 135 bp) a **23** (velikost produktu 235 bp). Součástí každé reakce je PCR fragment vnitřní kontroly (o velikosti 1070 bp, zatímco u 5. reakce o velikosti 430 bp).

Výsledky alelických skupin:

DRB1*03 , DRB1*11 [1]; DRB1*14 , DRB1*11 [1]; DRB1*04 , DRB1*11 [1]; DRB1*11,- [2]; DRB1*11 , DRB1*11 [1]; DQB1*02 , DQB1*03 [1]; DQB1*03,- [2]; DQB1*03 , DQB1*03 [2]; DQB1*03 , DQB1*06 [1]; DQA1*05 , DQA1*05 [1]; DQA1*05,- [2]

Výsledek testu:

Na základě pozitivních reakcí byl detekován haplotyp DQX.5. U této HLA varianty je riziko vzniku celiakie velmi nízké.

Obrázek č. 9: Gelová elektroforéza vzorku č. 5



(vlastní výzkum)

Vyhodnocení gelové elektroforézy:

Žádná pozitivní reakce. Součástí každé reakce je PCR fragment vnitřní kontroly (o velikosti 1070 bp, zatímco u 5. reakce o velikosti 430 bp).

Výsledky alelických skupin:

DRB1*03,- [0]; DRB1*03 , DRB1*14 [0]; DRB1*03 , DRB1*04 [0]; DRB1*03 , DRB1*11 [0]; DRB1*14,- [0]; DRB1*14 , DRB1*04 [0]; DRB1*14 , DRB1*11 [0]; DRB1*04,- [0]; DRB1*04 , DRB1*11 [0]; DRB1*11,- [0]; DQB1*02,- [0]; DQB1*02 , DQB1*02 [0]; DQB1*02 , DQB1*03 [0]; DQB1*03,- [0]; DQA1*05,- [0]

Výsledek testu:

Na základě reakcí byl vyhodnocen test jako negativní. Byl detekován haplotyp DQX.x. U této HLA varianty je riziko vzniku celiakie velmi nepravděpodobné.

Obrázek č. 10: Gelová elektroforéza vzorku č. 8



(vlastní výzkum)

Vyhodnocení gelové elektroforézy:

Pozitivní PCR reakce: **15** (velikost produktu 135 bp), **14** (velikost produktu 145 bp), **13**

(velikost produktu 95 bp), **12** (velikost produktu 120 bp), **6** (velikost produktu 150 bp), **5** (velikost produktu 800 bp), **2** (velikost produktu 200 bp) a **1** (velikost produktu 220 bp). Součástí každé reakce je PCR fragment vnitřní kontroly (o velikosti 1070 bp, zatímco u 5. reakce o velikosti 430 bp).

Výsledky alelických skupin:

DRB1*03 , DRB1*03 [1]; DRB1*03 , DRB1*04 [2]; DRB1*03 , DRB1*08 [1]; DRB1*03 , DRB1*14 [1]; DRB1*03,- [0]; DRB1*03 , DRB1*11 [0]; DRB1*14 , DRB1*04 [1]; DRB1*14 , DRB1*08 [0]; DRB1*14 , DRB1*14 [0]; DRB3*,- [0]; DQB1*02 , DQB1*03 [2]; DQA1*05,- [0]

Výsledek testu:

Na základě pozitivních reakcí byl detekován haplotyp DQ2. Výsledek genetického testu je pozitivní. Riziko rozvoje celiakie je však nízké.

Obrázek č. 11: Gelová elektroforéza vzorku č. 15



(vlastní výzkum)

Vyhodnocení gelové elektroforézy:

Pozitivní PCR reakce: **1** (velikost produktu 220 bp), **3** (velikost produktu 140 bp), **5** (velikost produktu 800 bp), **6** (velikost produktu 150 bp) a **7** (velikost produktu 140 bp). Součástí každé reakce je PCR fragment vnitřní kontroly (o velikosti 1070 bp, zatímco u 5. reakce o velikosti 430 bp).

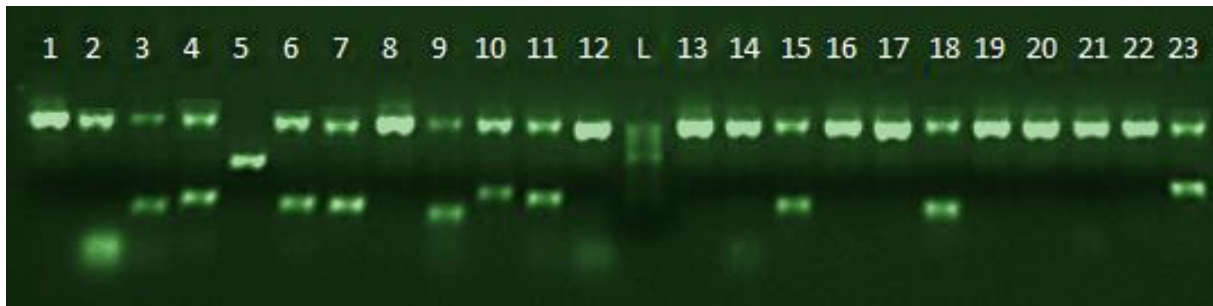
Výsledky alelických skupin:

DRB1*03 , DRB1*07 [2]; DRB1*14 , DRB1*07 [1]; DRB3*,- [0]; DQB1*02 , DQB1*02 [2]; DQB1*02,- [0]; DQB1*02 , DQB1*03 [0]; DQA1*05,- [0]

Výsledek testu:

Na základě pozitivních reakcí byl detekován haplotyp DQ2.x/DQ2. Výsledek genetického testu je pozitivní. Riziko vzniku celiakie je vysoké.

Obrázek č. 12: Gelová elektroforéza vzorku č. 16



(vlastní výzkum)

Vyhodnocení gelové elektroforézy:

Pozitivní PCR reakce: **3** (velikost produktu 140 bp), **4** (velikost produktu 170/175 bp), **6** (velikost produktu 150 bp), **7** (velikost produktu 140 bp), **9** (velikost produktu 105 bp), **10** (velikost produktu 200 bp), **11** (velikost produktu 185 bp), **15** (velikost produktu 135 bp) a **23** (velikost produktu 235 bp). Součástí každé reakce je PCR fragment vnitřní kontroly (o velikosti 1070 bp, zatímco u 5. reakce o velikosti 430 bp).

Výsledky alelických skupin:

DRB1*07 , DRB1*11 [2]; DQB1*02 , DQB1*03 [2]; DQA1*05 , DQA1*05 [1]; DQA1*05,- [2]

Výsledek testu:

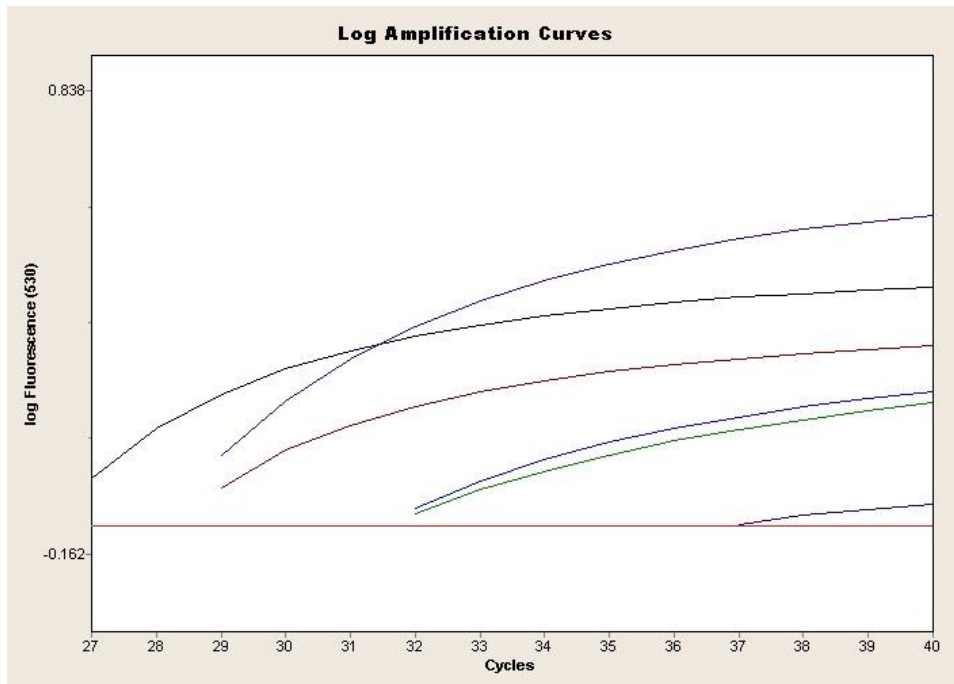
Na základě pozitivních reakcí byl detekován haplotyp DQ2.5. Výsledek genetického testu je pozitivní. Riziko rozvoje celiakie je vysoké.

4.2 RT- PCR

Vyšetřovací metodou na principu RealTime-PCR pomocí kitu EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DRB4) bylo vyšetřeno 5 vzorků, které již byly vyšetřeny kitem HISTO TYPE Celiac Disease od firmy BAG Health Care na principu PCR-SSP. Tato výzkumná část byla prováděna v genetické laboratoři GENLABS,s.r.o. v Českých Budějovicích.

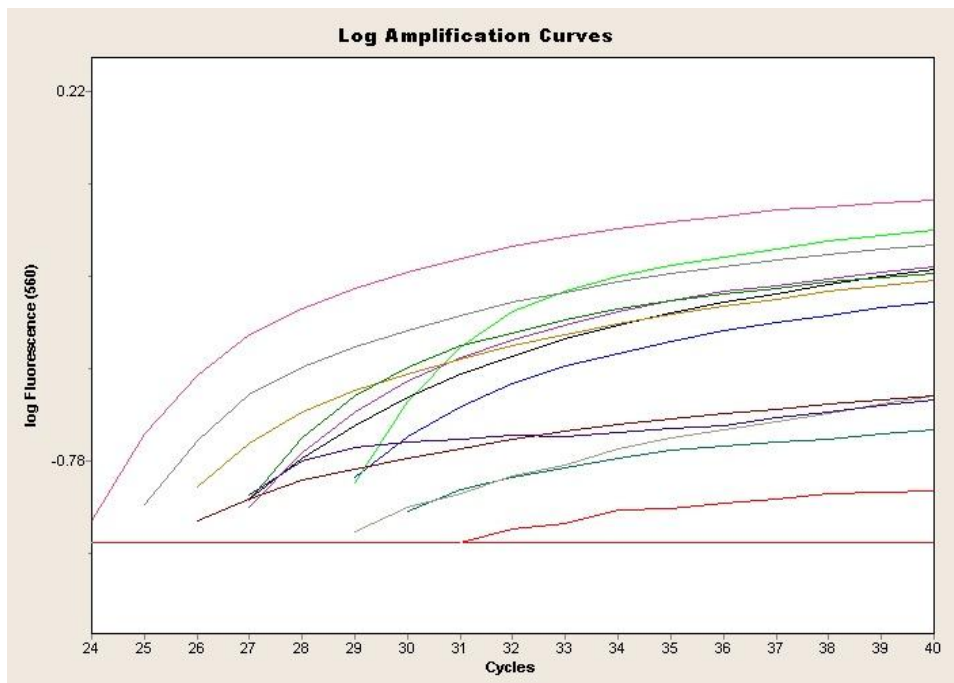
V této části uvádím vyšetřené vzorky metodou RT-PCR. Odečet výsledků byl prováděn v příslušném softwaru. Pozitivní výsledek byl charakterizován amplifikací spojenou s nárůstem signálu v kanálech FAM (530) (viz obrázek č. 13) a JOE (560) (viz obrázek č. 14).

Obrázek č. 13: Nárůst signálu v kanálu FAM (530)



(vlastní zdroj)

Obrázek č. 14: Nárůst signálu v kanálu JOE (560)



(vlastní zdroj)

V následujících tabulkách (č. 6, č. 7, č. 8, č. 9 a č. 10) můžeme vidět pozitivní a negativní reakce v jednotlivých kanálech a výsledný haplotyp u vyšetřovaných vzorků. Metodou RT-

PCR byly detekovány tyto haplotypy: DQ2.5, DQX.5 a DQ2. U haplotypu DQ2.5 je riziko rozvoje celiakie vysoké, zatímco u haplotypů DQX.5 a DQ2 je rozvinutí této nemoci nízké.

Tabulka č. 6: Výsledek vzorku č. 15 metodou RT-PCR

Vzorek č. 15							
CELIDQ2 Mix		CELIDRB Mix		CELIDQ8 Mix	Pozitivní kontrola	Negativní kontrola	Výsledný haplotyp
FAM DQA1*05	JOE DQB1*02	FAM DRB1*04	JOE IC	FAM DQB1*0302			
+	+	-	+	-	+	-	DQ2.5

(vlastní výzkum)

Tabulka č. 7: Výsledek vzorku č. 16 metodou RT-PCR

Vzorek č. 16							
CELIDQ2 Mix		CELIDRB Mix		CELIDQ8 Mix	Pozitivní kontrola	Negativní kontrola	Výsledný haplotyp
FAM DQA1*05	JOE DQB1*02	FAM DRB1*04	JOE IC	FAM DQB1*0302			
+	+	-	+	-	+	-	DQ2.5

(vlastní výzkum)

Tabulka č. 8: Výsledek vzorku č. 17 metodou RT-PCR

Vzorek č. 17							
CELIDQ2 Mix		CELIDRB Mix		CELIDQ8 Mix	Pozitivní kontrola	Negativní kontrola	Výsledný haplotyp
FAM DQA1*05	JOE DQB1*02	FAM DRB1*04	JOE IC	FAM DQB1*0302			
+	-	-	+	-	+	-	DQX.5

(vlastní výzkum)

Tabulka č. 9: Výsledek vzorku č. 18 metodou RT-PCR

Vzorek č. 18							
CELIDQ2 Mix		CELIDRB Mix		CELIDQ8 Mix	Pozitivní kontrola	Negativní kontrola	Výsledný haplotyp
FAM DQA1*05	JOE DQB1*02	FAM DRB1*04	JOE IC	FAM DQB1*0302			
-	+	-	+	-	+	-	DQ2

(vlastní výzkum)

Tabulka č. 10: Výsledek vzorku č. 7 metodou RT-PCR

Vzorek č. 7							
CELIDQ2 Mix		CELIDRB Mix		CELIDQ8 Mix	Pozitivní kontrola	Negativní kontrola	Výsledný haplotyp
FAM DQA1*05	JOE DQB1*02	FAM DRB1*04	JOE IC	FAM DQB1*0302			
+	-	-	+	-	+	-	DQX.5

(vlastní výzkum)

4.3 Srovnání výsledků

V této části práce je uvedena souhrnná tabulka zobrazující výsledky obou metod. V tabulce č. 11 jsou zobrazeny výsledky z PCR-SSP vyšetřené pomocí kitu HISTO TYPE Celiac Disease od firmy BAG Health Care a výsledky z RT-PCR vyšetřené kitem EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DRB4).

Tabulka č. 11: Výsledky metod PCR-SSP a RT-PCR

Číslo vzorku	Výsledný haplotyp vyšetřený metodou PCR-SSP	Výsledný haplotyp vyšetřený metodou RT-PCR
15	DQ2.x/DQ2	DQ2.5
16	DQ2.5	DQ2.5
17	DQX.5	DQX.5
18	DQ2.5/DQ2	DQ2
7	DQX.5	DQX.5

(vlastní zdroj)

5 Diskuze

Cílem praktické části bylo zavést a zoptimalizovat komerčně dodávaný kit pro vyšetření HLA alel asociovaných s celiakií na principu PCR-SSP. Dále již vyšetřené pacienty vyšetřit metodou RT-PCR. V praktické části bakalářské práce byl vyšetřen soubor 18 vzorků, ze kterého byly všechny vzorky vyšetřeny metodou PCR-SSP. Metoda PCR-SSP byla provedena pomocí komerčně dodávaného kitu HISTO TYPE Celiac Disease od firmy BAG Health Care. Pět vzorků z testovaného souboru bylo zároveň vyšetřeno metodou RT-PCR pomocí kitu EliGene* Coeliac RT (DQ2,DQ8, DRB1*04) od firmy Elisabeth Pharmacon.

Jak již bylo řečeno, metodou PCR-SSP bylo vyšetřeno celkem 18 vzorků. Z testovaného souboru nedošlo u dvou vzorků (č. 1 a č. 2) ke správné amplifikaci při PCR. Na gelové elektroforéze nebyly detekovány vnitřní kontroly ani žádné PCR produkty. U zbylých 16 vzorků jsem došla k reprezentativním výsledkům. Z celkového počtu bylo detekováno 10 pozitivních výsledků. U 6 vzorků byl vyšetřen haplotyp DQX.5 představující extrémně nízké riziko vzniku celiakie. V jednom případě byl vyšetřen haplotyp DQ2, který představuje nízké riziko. Dále byly detekovány haplotypy DQ2.5, DQ2.x/DQ2 a DQ2.5/DQ2, které představují vysoké riziko rozvoje tohoto onemocnění.

Součástí mé práce bylo vyšetřit vzorky metodou RT-PCR, které byly již vyšetřeny metodou PCR-SSP. Metodou RT-PCR se mi podařilo vyšetřit jen 5 vzorků z důvodu nedostatku DNA a potřebných reagensů. Pro tuto metodu jsme vybrala pouze vzorky s pozitivním výsledkem z předešlé metody. U 2 vzorků byly detekovány haplotypy DQ2.5, ve 2 případech DQX.5 a pouze v jednom případě haplotyp DQ2.

Dalším cílem mé práce bylo porovnat dvě výše zmíněné metody z hlediska shody. Jak již bylo řečeno, oběma metodami bylo vyšetřeno 5 vzorků. Ve 3 případech se výsledné haplotypy shodovaly. U vzorku č. 15 a č. 18 se výsledné haplotypy lišily. U vzorku č. 15 riziko rozvoje onemocnění zůstalo stejné, tedy vysoké. U vzorku č. 18 se naopak lišilo, metoda PCR-SSP předpověděla velmi vysoké riziko. Tato neshoda byla zapříčiněna tím, že kit HISTO TYPE Celiac Disease na principu PCR-SSP detekuje více alel než kit EliGene* Coeliac RT (DQ2, DQ8, DRB1*04) na principu RT-PCR. U vzorku č. 15 byly detekovány metodou PCR-SSP tyto alely: DRB1*03 , DRB1*07 [2]; DRB1*14 , DRB1*07 [1]; DQB1*02 , DQB1*02 [2]. Zatímco metodou RT-PCR DQA1*05 a DQB1*02. U vzorku č. 18 byly detekovány metodou PCR-SSP tyto alely: DRB1*03 , DRB1*07 [1]; DRB1*14 , DRB1*07 [1]; DRB1*04 , DRB1*07 [1]; DRB1*07,- [2]; DRB1*07 , DRB1*11 [1]; DQB1*02,- [2]; DQB1*02 ,

DQB1*02 [1]; DQB1*02 , DQB1*03 [1]; DQA1*03 , DQA1*05 [2]. Zatímco metodou RT-PCR DQB1*02. Neshoda haplotypů u vzorku č. 18 byla zřejmě zapříčiněna absencí alely silně asociované s celiakií DQ8 DQA1*0302 v kitu EliGene* Coeliac RT (DQ2, DQ8, DRB1*04).

Zaměřila jsem se také na srovnání dvou zmíněných metod z hlediska náročnosti. Časově náročnější byla metoda PCR-SSP s kitem HISTO TYPE Celiac Disease. Najednou bylo možné vyšetřit pouze dva vzorky. Celý proces vyšetření trval okolo 3 hodin. Výhodu tohoto kitu vidím v široké škále vyšetřovaných alel a v automatické interpretaci výsledků. Nevýhodu v odečítání PCR produktů v agarózovém gelu a také v pořizovací ceně kitu, která byla 9 719 Kč (vč. DPH) pro 20 testů. Jeden test vyšel tedy na 486 Kč. Další jeho nevýhodou je potřeba velkého množství DNA na jeden test. Analýza požadovala 28 µl DNA o koncentraci 25-50 ng/µl. Rychlejší metodou byla RT-PCR s kitem EliGene* Coeliac RT (DQ2,DQ8, DRB1*04). Najednou bylo možné vyšetřit až 8 vzorků. Vyšetření trvalo asi 1,5 hodiny. Nevýhodu tohoto kitu vidím v absenci silně asociované alely s celiakií DQ8 DQA1*0302. Kromě rychlé a přesné analýzy vidím výhodu v potřebném množství DNA k jedné analýze. Výrobce uvádí 2,5 µl DNA o koncentraci 1-10ng/µl. V neposlední řadě je příjemná i cena kitu, která je 18 389 Kč (vč. DPH) pro 50 testů. Jeden test tedy vyšel na 368 Kč.

Z výše uvedeného tedy mohu říci, že hypotéza č. 1 (Předpokládám, že výhodou Real-Time PCR bude rychlost získání výsledků oproti PCR-SSP.) je správná. Na základě dat získaných během výzkumu mohu vyvrátit hypotézu č. 2 (Předpokládám, že výsledky obou metod budou ve většině případů shodné.), protože ve dvou sledovaných případech byly detekovány odlišné haplotypy.

6 Závěr

V teoretické části této bakalářské práce byly stručně shrnuty poznatky o celiakii a molekulárně genetických metodách založených na PCR, které se využívají při diagnostice predispozice k celiakii. V praktické části se mi podařilo osvojit správnou laboratorní praxi v genetické laboratoři. Prošla jsem si celým procesem od přijetí vzorku až po interpretaci výsledku. V úvodu praktické části byly popsány postupy pro izolaci DNA a HLA typizaci pomocí dvou komerčně dodávaných kitů: HISTO TYPE Celiac Disease od firmy BAG Health Care (princip PCR-SSP) a EliGene* Coeliac RT (DQ2, DQ8, DRB1*04) od firmy Elisabeth Pharmacon (princip RT-PCR). Ve výsledkové části byly uvedeny reprezentativní výsledky rizikových alel a haplotypů vyšetřovaných metodami PCR-SSP a RT-PCR. Výsledky obou metod byly náležitě srovnány a v diskuzi bakalářské práce prodiskutovány.

Na základě dat získaných během mého výzkumu lze stanovené hypotézy potvrdit. Z celého sledovaného souboru (tj. 18 vzorků) bylo 16 vzorků vyšetřeno metodou PCR-SSP a 5 z nich metodou RT-PCR. Metodou PCR-SSP bylo detekováno 10 rizikových haplotypů.

Nejpočetněji zastoupený byl haplotyp DQX.5 představující extrémně nízké riziko celiakie. V jednom případě byl detekován haplotyp DQ2, který představuje nízké riziko. Dále byly vyšetřeny haplotypy DQ2.5, DQ2.x/DQ2 a DQ2.5/DQ2, které představují vysoké riziko rozvoje tohoto onemocnění. Pět pozitivních vzorků vyšetřených metodou PCR-SSP bylo znovu vyšetřeno metodou RT-PCR. Ve třech případech byly detekovány shodné haplotypy a u dvou vzorků byla neshoda. Výše zmíněné metody jsem také porovnála z hlediska náročnosti. Časově a finančně náročnější byla metoda na principu PCR-SSP. Obtížné bylo také odečítat výsledky z agarózového gelu. Její výhodu vidím v široké škále vyšetřovaných alel a v automatické interpretaci výsledků. Naopak metoda na principu RT-PCR byla méně časově a finančně náročná. Velkou výhodou této metody je potřeba minimálního množství DNA na jednu reakci oproti PCR-SSP. Nevýhodou tohoto kitu vidím v absenci silně asociované alely s celiakií DQ8 DQA1*0302.

7 Seznam literatury

1. *Aktuální příbalová informace k soupravě QIAamp DNA Mini Kit Handbook*, 2016. [online].QIAGEN [cit. 2017-10-14]. Dostupné z: <https://www.qiagen.com/cz/resources/resourcedetail?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>
2. *Aktuální příbalová informace k soupravě EliGene*Celiac Disease RT (DQ2, DQ8, DRB1*04)*, 2018. Elisabeth Pharmacon.
3. ALAEDINI, A., 2008. Autoantibodies in cealiac disease. *Autoimmunity*. 41(1),19-26, doi:10.1080/08916930701619219. Dostupné z:<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08916930701619219?journalCode=iaut20>
4. ALI, N., 2015. Kniha pro celiaky: nové poznatky pro nemocné, lékaře a pacienty. Praha: Pragma, s. 20-23,48-50,84-86. ISBN 978-80-7349434-6
5. ANTIGA, E., CAPRONI, M., 2015. The diagnosis and treatment of dermatitis herpetiformis. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* [online]., 257-265 [cit. 2017-10-28]. DOI: 10.2147/CCID.S69127. ISSN 1178-7015. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/the-diagnosis-and-treatment-of-dermatitis-herpetiformis-peer-reviewed-article-CCID>
6. BARKER, J., M., LIU, E., 2008. Pathophysiology, Clinical Manifestations and Associated Autoimmune Conditions. *Advances in Pediatrics* [online]. 55(1), 349-365 [cit. 2017-10-28]. doi: 10.1016/j.yapd.2008.07.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065310108000029>
7. CHOO, S., Y., 2007. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. *Yonsei Medical Journal* [online]. 48(1), 11- [cit. 2017-10-28]. doi: 10.3349/ymj.2007.48.1.11. Dostupné z: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3349/ymj.2007.48.1.11>
8. FRIČ, P., 2009. Refrakterní celiakie [online]. *Medicína po promoci* 10(3),99-102.[cit. 2017-10-06]. Dostupné z:<https://www.tribune.cz/clanek/14346>

9. FRIČ, P., KEIL, R., 2011. Celiakie pro praxi [online]. *Medicína pro praxi* 8(9),354-359. [cit. 2017-10-06]. Dostupné z:<https://www.solen.cz/pdfs/med/2011/09/03.pdf>
10. FRIČ, P., MENGEROVÁ O., 2008. Celiakie: Bezlepková dieta a rady lékaře. Čestlice: Medica Publishing, s. 15-16. ISBN 978-80-85936-62-9.
11. FRUHAUF, P., BRONSKÝ, J., DĚDEK, P., NEVORAL, J., KOTALOVÁ, R., SÝKORA, J., SZITÁNYI, N., ŠEBKOVÁ, A., ZAHRADNÍČEK, L., 2016. Celiakie - doporučený postup pro diagnostiku a terapii u dětí a dospívajících [online]. *Pediatric pro praxi*. 17(3). [cit. 2017-10-24]. Dostupné z:
<https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2016/03/16.pdf>
12. FRUHAUF, P., SZITÁNYI, P., VYHNÁNEK, R., 2012. Nové doporučení ESPGHAN pro diagnostiku celiakie [online]. *Pediatric pro praxi*. 13(3), 211-213. [cit. 2017-10-28]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2012/03/18.pdf>
13. GARIBYAN, L., AVASHIA, N., 2013. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*[online]. 133(3), 1-4 [cit. 2017-10-27]. doi: 10.1038/jid.2013.1. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1536139X>
14. GUANDALINI, S., 2007. A Brief History of Celiac Disease [online]. Chicago: The University of Chicago Celiac Disease Center [cit. 2017-10-05]. Dostupné z:https://www.cureceliacdisease.org/wp-content/uploads/SU07CeliacCtr.News_.pdf
15. HEŘMANOVÁ, Z., 2009. Možnosti laboratorní diagnostiky u pacientů s celiakií [online]. *FONS* 19(4),32-35. [cit. 2017-10-06]. Dostupné z:
<http://www.bulletinfons.cz/42009/labo3.pdf>
16. HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J., 2005. *Základy imunologie*. Vyd. 3. Praha: Triton, ISBN 80-7254-686-4.
17. KAGNOFF, M., F., 2007. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 117(1), 41-49 [cit. 2017-10-28].

DOI: 10.1172/JCI30253. Dostupné z: <http://www.jci.org/cgi/doi/10.1172/JCI30253>

18. KHALESI, M., JAFARI, SA., KIANI, M., PICARELLI, A., BORGHINI, R., SADEGHI, R., EGHTEGAR, A., AYATOLLAHI, H., KIANIFAR, HR., 2016. In Vitro Gluten Challenge Test for Celiac Disease Diagnosis [online]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*62(2), [cit. 2017-10-07]. doi: 10.1097/0000000000000917. Dostupné z:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26196202>
19. KNOLL, A., VYKOUKALOVÁ, Z., 2002. *Molekulární genetika zvířat: (metody detekce polymorfizmů DNA genů)*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, s. 7-22. ISBN 80-7157-616-6.
20. KOHOUT, P., PAVLÍČKOVÁ, J., 2010. Otázky kolem celiakie. Víte si rady s bezlepkovou dietou? Svazek X. Praha: Forsapi, s. 7-33. ISBN: 978-80-87250-09-9
21. KREJSEK, J., ANDRÝS, C., KRČMOVÁ, I., 2016. *Imunologie člověka*. Hradec Králové: Garamon, s. 57-65. ISBN 978-80-86472-74-4.
22. LATTA, J., 2012. Celiakie - od screeningu k diagnóze[online]. *Interní medicína pro praxi.* 14(5), 221-223. [cit. 2017-07-25]. Dostupné z:https://www.internimedicina.cz/artkey/int-201205-0009_Celiakie-od_screeningu_k_diagnoze.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3Dceliakie%26from%3D0%26spage%3D30
23. MAZURA, I., 1999. *Speciální metody molekulární biologie*. Praha: Karolinum, Učební texty Univerzity Karlovy v Praze, s. 7-9. ISBN 80-246-0258-x.
24. MEGIORNI, F., PIZZUTI, A., 2012. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *Journal of Biomedical Science* [online]., 19(1), 88- [cit. 2017-10-28]. doi: 10.1186/1423-0127-19-88. Dostupné z: <http://www.jbiomedsci.com/content/19/1/88>
25. Návod k použití HISTO TYPE SSP Kits, 2017. [online]. BAG Health Care GmbH [cit. 2017-10-14]. Dostupné z: <http://www.bag->

healthcare.com/fileadmin/user_upload/PDF_Diagnostik/IFUs/HISTO_TYPE_Happy/IFU-HISTOTYPE-V17-2017-EN.pdf

26. *Návod na obsluhu Spectrophotometer For Life Science BioSpec-Nano*, 2012. [online].SHIMADZU [cit. 2017-10-14]. Dostupné z:<https://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/Spectroscopy/c101-e112c.pdf>
27. *Návod na obsluhu Spectrophotometer For Life Science BioSpec-Nano*, 2018. [online].SHIMADZU [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <https://pr.vwr.com/store/product/8100613/biospec-nano-small-volume-uv-spectrophotometer-shimadzu>
28. PARZANESEI, QEHAJAJ, D., PATRINICOLA, F., ARALICA, M., CHIRIVA-INTERNATI, M., STIFLER S., ELLI, L., GRIZZI F., 2017. Celiac disease: From pathophysiology to treatment. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 8(2). [cit. 2017-10-07]. doi: 10.4291/wjgp.v8.i2.27. Dostupné z:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5437500/>
29. PETŘEK, M., 2000. Hlavní histokompatibilní komplex člověka (HLA) v klinické imunologii: nomenklatura a možnosti laboratorní diagnostiky. *Alergie (Praha, Print)*, 2000, Roč. 2, č. 3, s. 155-160. ISSN: 1212-3536.
30. RUML, T., RUMLOVÁ, M., PAČES, V., 2002. *Genové inženýrství*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, s. 45-47. ISBN 80-7080-499-8.
31. SOLLID, L., M., 2002. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Reviews Immunology.* 2(9), 647-655.
32. ŠMARDA, J., 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, s. 13-14, 73-84. ISBN 80-210-3841-1.
33. UNDLIEN, D., E., LIE, B., A., THORSBY, E., 2001. HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved? *Trends in Genetics* [online]. 17(2), 93-100 [cit. 2017-10-19]. doi: 10.1016/S0168-9525(00)02180-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952500021806>

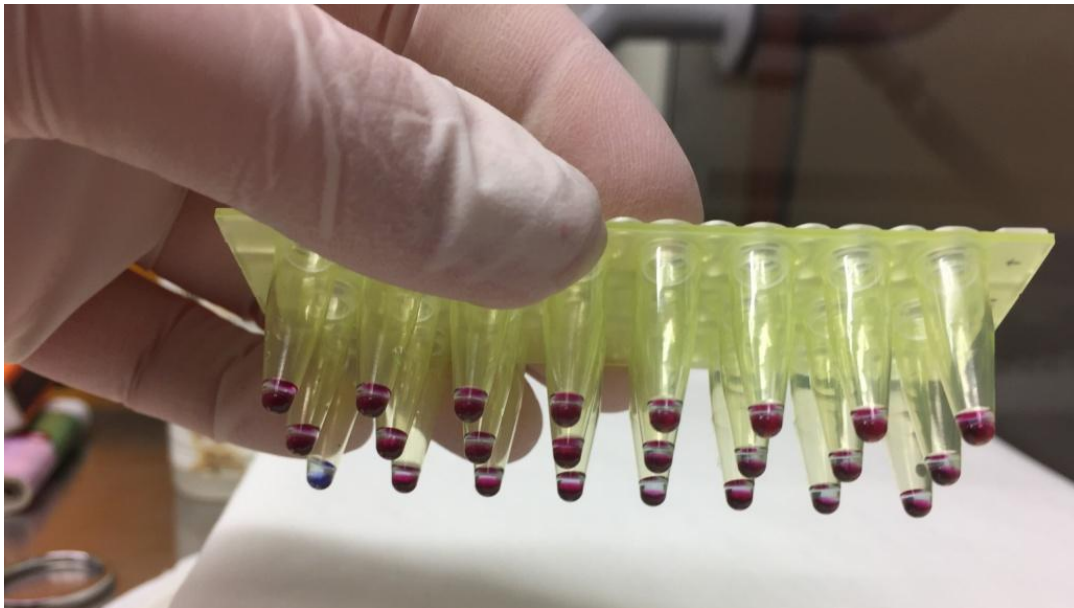
8 Seznam příloh

Příloha č. 1: Spektrofotometr: UV/VIS ShimadzuBioSpec-nano



(Návod na obsluhu Spectrophotometer For Life Science BioSpec-Nano, 2018)

Příloha č. 2: HISTO TYPE stripy pro HLA typizaci



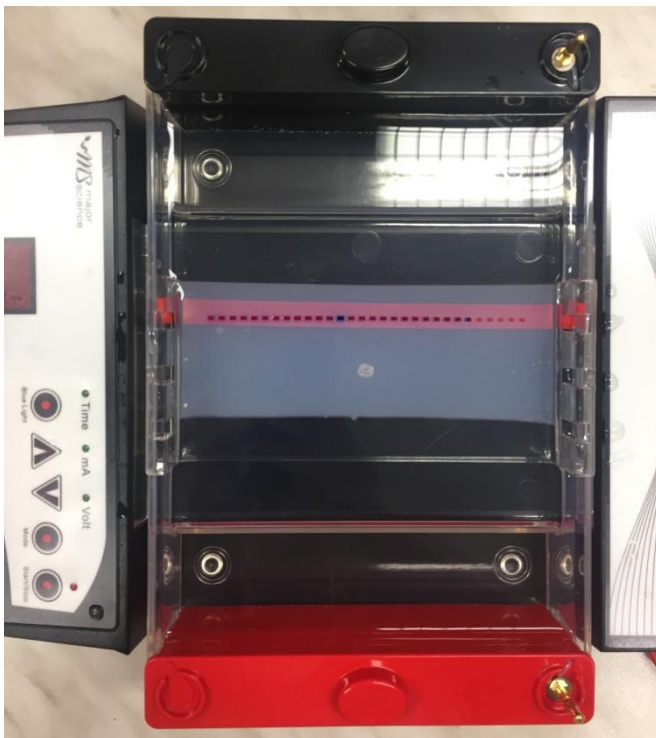
(vlastní zdroj)

Příloha č. 3: Termocykler: MJ Mini™ Personal Thermal Cycler



(vlastní zdroj)

Příloha č. 4: Jednotka na gelovou elektroforézu: MS major science Safe Blue MBE-150 PLUS



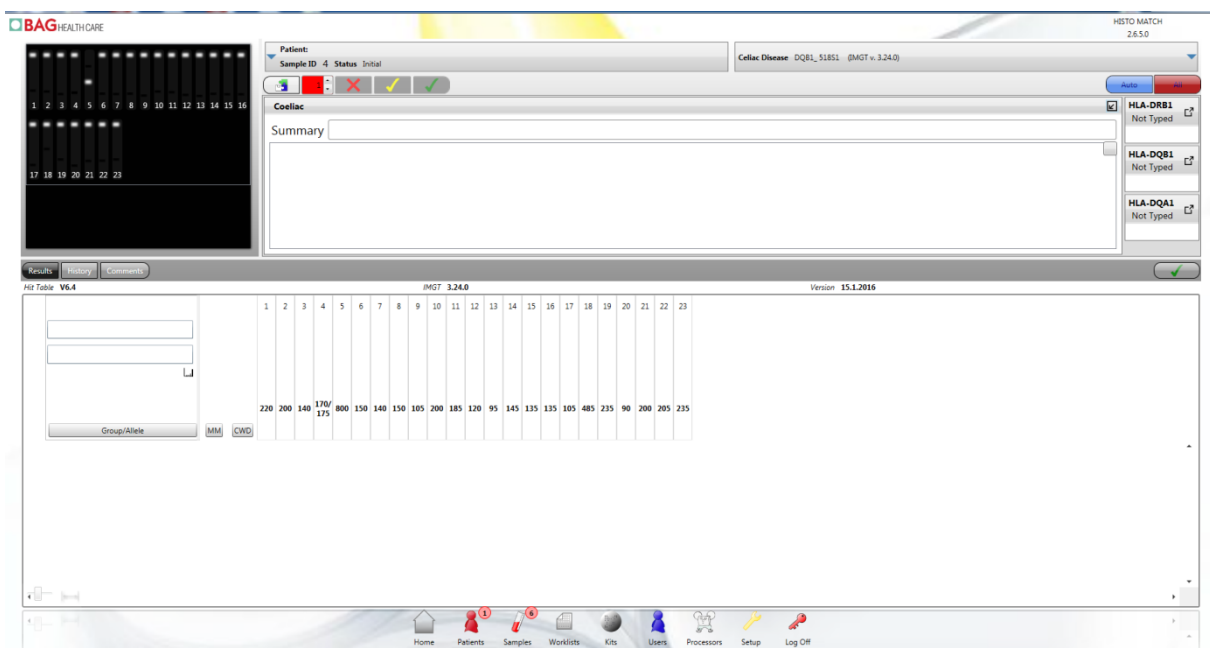
(vlastní zdroj)

Příloha č. 5: UV transiluminátor a detekční systém: Uvitec Cambridge, UVISAVE HD5



(vlastní zdroj)

Příloha č. 6: Software HISTO TYPE k vyhodnocení a interpretaci výsledků



(vlastní zdroj)

HISTO MATCH Sample Report

1234567890

Sample ID: 33 / 18 **Collected:**

Patient:

Patient Name:

Sample Received:

Extraction Method:

Tests

Worklist

Extraction
Date Performed
Analyzed By katerina
Date Analyzed 23.3.2018
Approved By
Date Approved
Authorized By katerina
Date Authorized 23.3.2018

Kit

Batch: DQB1_51851
Expiry: 31.5.2017
Hit Table: Hit Table: V6.4, IMGT db: 3.24.0, ver:15.1.2016
Method: SSP **Version:** HISTOMATCH

Authorised Result

Summary: DQ2.5 [Coeliac Risk: High]

Filter: Display All Alleles

Serology: DR7/DR7*/DRNull, DR11/DR11*/DRNull/DR-;;DQ2/DQ2*/DQNull, DQ0/3*/DQ3*/DQ7/DQNull;DQA1?

Assigned NMDP: DRB1*07:XX, DRB1*11:XX;;DQB1*02:XX, DQB1*03:XX;DQA1*05:XX, DQA1*05:SGKS

Group Result:

DRB1*07, DRB1*11 [2]
DQB1*02, DQB1*03 [2]
DQA1*05, DQA1*05 [1]
DQA1*05,- [2]

Allelic Result:

HISTO MATCH Sample Report

1234567890

Sample ID: 33 / 18

Collected:

DRB1*07:01:01:01/ 07:03/07:05/07:07/07:11/07:13/ 07:01:01:02/07:01:03/07:01:02/07:01:03/07:01:04/07:01:05/07:01:06/
07:01:07/07:01:08/07:01:09/07:01:10/07:01:11/07:01:12/07:01:13/07:01:14/07:01:15/07:01:16/07:01:17/07:01:18/07:01:19/07:01:20/07:01:21/07:01:22/07:01:23/07:01:24/07:01:25/07:01:26/07:01:27/07:01:28/07:01:29/07:01:30/07:01:31/07:01:32/07:01:33/07:01:34/07:01:35/07:01:36/07:01:37/07:01:38/07:01:39/07:01:40/07:01:41/07:01:42/07:01:43/07:01:44/07:01:45/07:01:46/07:01:47/07:01:48/07:01:49/07:01:50/07:01:51/07:01:52/07:01:53/07:01:54/07:01:55/07:01:56/07:01:57/07:01:58/07:01:59/07:01:60/07:01:61/07:01:62/07:01:63/07:01:64/07:01:65/07:01:66/07:01:67/07:01:68/07:01:69

DRB1*11:01:01:01/ 11:01:02/ 11:02:01/ 11:03:01/ 11:04:01/ 11:04:02/ 11:05/ 11:06:01/
11:08:01/11:09/ 11:10:01/ 11:11:01/ 11:12:01/ 11:13:01/ 11:14:01/ 11:15/ 11:16/ 11:17/ 11:18/
11:19:01/ 11:20/ 11:24/ 11:25/ 11:28:01/ 11:29:01/ 11:32/ 11:34/ 11:36/ 11:37:01/ 11:39/ 11:42/ 11:43/ 11:45/
11:47/ 11:56/ 11:69/ 11:69/ 11:01:01:02/11:01:03/11:01:04/11:01:05/11:01:06/11:01:07/11:01:08/11:01:09/11:01:10/11:01:11/11:01:12/11:01:13/
11:01:14/11:01:15/11:01:16/11:01:17/11:01:18/11:01:19/11:01:20/11:01:21/11:01:22/11:01:23/11:01:24/11:01:25/11:01:26/11:01:27/11:02:02/11:02:03/
11:02:04/11:02:05/11:02:06/11:04:03/11:04:04/11:04:05/11:04:06/11:04:07/11:04:08/11:04:09/11:04:10/11:04:11/11:04:12/11:06:02/11:06:03/11:08:02/
11:08:03/11:10:02/11:11:03/11:12:02/11:12:03/11:13:02/11:14:02/11:15:02/11:16:02/11:19:03/11:21/11:23:01/11:23:02/11:26/11:27:01/11:27:02/11:27:03/11:28:02/
11:29:02/11:31/11:33/11:35/11:37:02/11:40/11:41/11:44/11:46:01/11:46:02/11:48/11:49:01/11:49:02/11:50/11:51/11:52/11:54:01/11:54:02/11:55/11:57/
11:58:01/11:58:02/11:59/11:60/11:61/11:62:01/11:62:02/11:63:01/11:63:02/11:64/11:65:01/11:65:02/11:66/11:70/11:72/11:73/11:74:01/11:74:02/11:75/
11:76/11:77/11:78/11:79/11:80/11:81/11:82/11:83/11:84:01/11:84:02/11:84:03/11:85/11:86/11:87/11:88/11:89/11:90/11:91/11:92/11:93/11:94/11:95/
11:96/11:97/11:98/11:99/11:100/11:101:01/11:101:02/11:104/11:105/11:106/11:108/11:109/11:110/11:111/11:112/11:113/11:114/11:115/11:116/11:117/11:118/
11:119/11:120/11:121/11:122/11:123/11:124/11:125/11:126/11:127/11:128/11:129/11:130/11:131/11:132/11:133/11:134/11:135/11:137/11:138/11:139/11:140/
11:141/11:142/11:143/11:144/11:145/11:146/11:147:01/11:147:02/11:148/11:149/11:150/11:151/11:152/11:153/11:154/11:155/11:156/11:157/11:158/
11:159/11:160/11:161/11:162/11:163/11:164/11:165/11:166/11:167/11:168/11:169/11:170/11:171/11:172/11:174/11:176/11:177/11:178/11:179/11:180/
11:181/11:182/11:183/11:184/11:185/11:186/11:187/11:188/11:189/11:190/11:191/11:192/11:194/11:195/11:197/11:198/

DQB1*02:02:01:01/ 02:02:01:02/02:02:02/02:05/02:06/02:10/02:11/02:12/02:13/02:15/02:16/02:18/02:19/02:20/02:21/02:22/02:23/
02:24/02:25/02:26/02:28/02:29/02:30/02:31/02:32/02:33/02:34/02:35/02:36/02:37/02:38/02:39/02:40/02:41/02:42/02:43/02:44/02:45/02:46/02:47/02:48/
02:50/02:51/02:52/02:54/02:55/02:56/02:58/02:60/02:61/02:62/02:64/02:65/02:66/02:67

DQB1*03:01:01:01/ 03:01:03/ 03:01:04/ 03:19:01/ 03:01:01:02/03:01:01:03/03:01:05/03:01:06/03:01:08/03:01:09/03:01:10/
03:01:11/03:01:12/03:01:13/03:01:14/03:01:15/03:01:16/03:01:17/03:01:18/03:01:19/03:01:20/03:01:21/03:01:22/03:01:23/03:01:24/03:01:25/03:01:26/
03:01:27/03:01:28/03:01:29/03:01:30/03:01:31/03:01:32/03:01:33/03:15/03:16:02/03:21/03:22/03:24/03:27/03:28/03:29/03:30/03:31/03:32/03:33/03:34/03:35/
03:47/03:48/03:49/03:50/03:51/03:52/03:53/03:54/03:55/03:56/03:57/03:58/03:59/03:60/03:71/03:74/03:75/03:77/03:78/03:80/03:83/03:84/03:85/03:86/
03:94/03:101/03:102/03:103/03:106/03:109/03:114/03:115/03:116/03:118/03:119/03:120/03:121/03:122/03:123/03:126/03:129/03:130/03:131/03:133/
03:134/03:135/03:136/03:140/03:143/03:144/03:147/03:148/03:150/03:151/03:152/03:154/03:157/03:158/03:159/03:160/03:163/03:164/03:165/03:166/
03:167/03:168/03:170/03:171/03:172/03:173/03:182/03:185/03:187/03:188/03:191/03:192/03:193/03:195/03:197/03:198/03:201/03:202/03:206/03:207/
03:216/03:218/03:219/

DQA1*05:05:01:01/ 05:08/ 05:09/ 05:01:02/05:05:01:02/05:05:01:03/05:05:01:04/05:05:01:05/05:10/05:11

DQA1*05:05:01:01/ 05:08/ 05:09/ 05:05:01:02/05:05:01:03/05:05:01:04/05:05:01:05/05:10/05:11;

Could Not Exclude

Positive Reactions

3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 15, 23

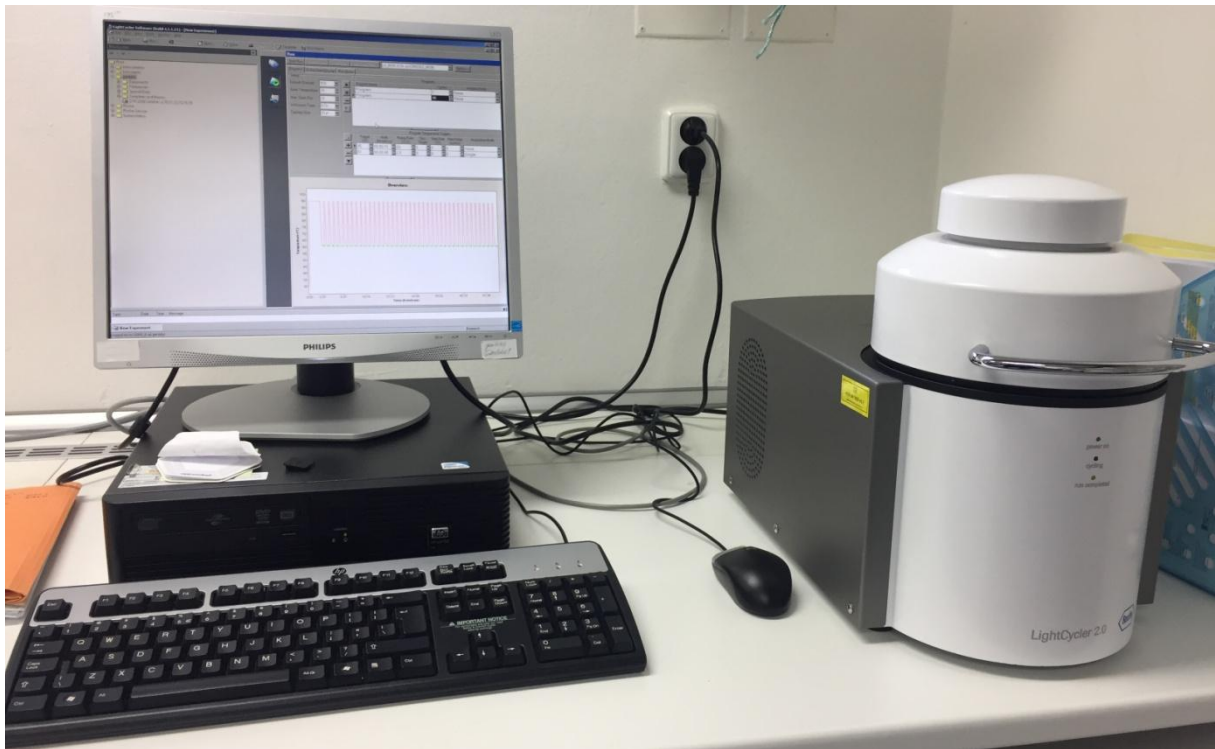
Ignored Reactions

Comments

Test History

23.3.2018 16:20	katerina	Test Authorization(Authorized)
23.3.2018 16:20	katerina	Test Interpreted (10)

Příloha č. 8: LightCycler 2.0 (Roche)



(vlastní zdroj)

9 Seznam zkratek

AEA= Anti-Endomysium Antibodies, anti-endomysiální protilátky

AtTGA=Antitissue Transglutaminase Antibodies, protilátky proti tkáňové transglutamináze

bp= párů bází

CD= Cluster of Differentiation, diferenciační skupina lymfocytů

dATP= deoxyadenosin trifosfát

DTP= deoxyribonukleotid trifosfát

DGP= deaminovaný gliadinový peptid

DNA=deoxyribonukleová kyseliny

dCTP= deoxycytidin trifosfát

dTTP=deoxythymidin trifosfát

EDTA= ethylendiamintetraoctová kyselina

EMA= Endomysial Antibodies, endomysiální protilátky

ESPGHAN= Evropská společnost pro dětskou gastroenterologii, hematologii a výživu

EtBr= ethidium bromid

HLA= Human Leukocyte Antigens, lidské leukocytární antigeny

IEL= intraepiteliální lymfocyty

IgA= imunoglobulin A

IgG=imunoglobulin G

IL=interleukin

INF=interferon

MHC= Major Histocompatibility Complex, hlavní histokompatibilní komplex

mRNA= mediátorová ribonukleová kyselina

PCR= Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce

PCR-SSP= Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers, polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery

RT-PCR= Real-Time Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce v reálném čase

TBE= trisborátový pufr

TG=transglutamináza

tTG= tkáňová transglutamináza

UV= ultrafialové světlo