



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Vyšetření genetických predispozic pro celiakii
v rodině s výskytem onemocnění diabetes mellitus
1. typu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Klára Kučerová

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

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou/diplomovou práci s názvem „Vyšetření genetických predispozic pro celiakii v rodině s výskytem onemocnění diabetes mellitus I. typu“ jsem vypracoval/a 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/diplomové 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/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.5.2019

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za odborné rady, čas a ochotu, které věnovala tomu, aby tato práce mohla vzniknout. Zároveň mi umožnila uskutečnění experimentální části mé práce v genetické laboratoři GENLABS.

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

Vyšetření genetických predispozic pro celiakii v rodině s výskytem onemocnění diabetes mellitus 1. typu

Abstrakt

Celiakie patří mezi autoimunitní onemocnění, které postihuje především sliznici tenkého střeva. Onemocnění je charakterizováno nesnášenlivostí gliadinu, který je součástí lepku. Intolerance vede k chronickému zánětu na sliznici tenkého střeva a tím dochází k chronickému průjmům, tukovité stolici, zvracení, únavě a v neposlední řadě také neprospívání. *Diabetes mellitus* I. typu je autoimunitní metabolické onemocnění, které se projevuje hyperglykemií (zvýšená hladina glukózy v krvi), která je důsledkem nedostatečného účinku inzulínu. DM I. typu se může u jedince vyskytovat jako samostatné onemocnění nebo může být sdružen s jinými autoimunitními onemocněními, jako je právě celiakie.

Rozvoj celiakie je podmíněn přítomností genetické predispozice, ale z větší části je ovlivněn vnějšími faktory, například enviromentálními. Genetická predispozice je vázána na alely HLA systému. Konkrétně se jedná o haplotypy HLA-DQ2 a HLA-DQ8. Onemocnění se vyznačuje rozdílnými klinickými příznaky, kvůli tomu je jeho diagnostika v některých případech velice obtížná a mnoho pacientů diagnostikováno vůbec není.

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo nastudování a následné shrnutí poznatků týkajících se onemocnění celiakie a *diabetu mellitu* I. typu (DMI). Z velké části se zde věnuji právě diabetu, celiakii a HLA systému. V případě celiakie jsem se zaměřila na její charakteristiku, diagnostiku, léčbu a její dědičnost. V případě diabetu jsem se zabývala jeho jednotlivými typy, léčbou a opět jeho genetickými predispozicemi. V závěru teoretické části popisuji samotný HLA systém a význam asociace DM I. typu s celiakií.

Praktická část mé práce byla prováděna v genetické laboratoři GENLABS v Českých Budějovicích. Zde jsem se zabývala vyšetřením genetických predispozic k celiakii pomocí metody real-time PCR. Vyšetření je založeno na HLA typizaci rizikových alel, pomocí komerčně vyráběného kitu EliGene® Coeliac RT (DQ2, DQ8, DR4). Cílem praktické části bylo zvládnutí základních laboratorních metod jako je izolace DNA z periferní krve a bukalního stěru, měření koncentrace DNA, osvojení si

metody real-time PCR, která slouží k určení rizikového HLA haplotypu a analýza získaných výsledků.

Klíčová slova

Celiakie; diabetes mellitus; HLA-DQ2; HLA-DQ8; HLA typizace, RT-PCR

Examination of genetic predispositions for celiac disease in a family with a history of diabetes mellitus. 1. type

Abstract

Celiac disease is one of the autoimmune disorders that mainly affects the mucous membrane of the small intestine. The disease is characterized by intolerance to gliadin, which forms part of gluten. The intolerance leads to chronic inflammation of the mucous membrane of the small intestine, causing chronic diarrhea, adipose feces, vomiting, fatigue, and last but not least also weight loss. Type I. *diabetes mellitus* is an autoimmune metabolic disease demonstrated by hyperglycemia (increased level of blood glucose) which is a result of the insufficient effect of insulin. Type I. DM can occur at individuals as an independent disease or combined with other autoimmune diseases such as celiac disease.

While genetic predisposition is a condition for the development of celiac disease, the development is influenced to a greater extent by external factors, for example environmental elements. Genetic predisposition is bound to alleles of the HLA system. This concerns in particular the HLA-DQ2 and HLA-DQ8 haplotypes. Due to various clinical symptoms, it is very difficult to diagnose the disease in some cases, and many patients are not diagnosed with the disease at all.

The aim of the theoretical part of the bachelor thesis is to study and then summarize findings concerning celiac disease and type I. *diabetes mellitus* (DM I). To a great extent, the thesis addresses the topics of diabetes, celiac disease, and the HLA system. As for celiac disease, the thesis focuses on its characteristics, diagnostics, treatment, and inheritance. In the case of diabetes, the thesis deals with its individual types, treatment and also the genetic predispositions. The conclusion of the thesis describes the HLA system itself and shows the importance of the association between the type I. *diabetes mellitus* and celiac disease.

The practical part of the thesis was conducted in the GENLABS genetics laboratory in České Budějovice. In this laboratory, genetic predispositions to celiac disease were examined by using the real-time PCR method. The examination is based on the HLA typing of the risk alleles by means of the commercially produced

EliGene[®] Coeliac RT kit (DQ2, DQ8, DR4). The goal of the practical part is to master the basic laboratory methods such as the DNA isolation from the peripheral blood and buccal swab, to measure the DNA concentration, to adopt the real-time PCR method that serves to determine the HLA risk haplotype and to analyze gained results.

Keywords

Celiac disease; diabetes mellitus; HLA-DQ2; HLA-DQ8; HLA typing, RT-PCR

Obsah

Úvod.....	10
1 Teoretická část	11
1.1 Charakteristika diabetu mellitu.....	11
1.2 Typy diabetu	12
1.2.1 DM I. Typu.....	12
1.2.2 DM II. Typu.....	17
1.2.3 Gestační diabetes (GDM)	19
1.3 Genetické predispozice.....	19
1.4 Charakteristika celiakie	21
1.5 Klinické projevy a formy celiakie	22
1.5.1 Klinické projevy	22
1.5.2 Formy celiakie	23
1.6 Diagnostika.....	24
1.6.1 Serologická imunologická laboratorní vyšetření.....	25
1.6.2 Biopsie.....	25
1.7 Screening celiakie.....	26
1.8 Genetika celiakie	27
1.8.1 Charakteristika HLA systému	27
1.8.2 Struktura HLA systému	28
1.8.3 HLA nomenklatura	31
1.8.4 Genetická predispozice k celiakii	32
1.9 Asociace celiakie s DM I. typu.....	34
2 Cíle práce	36
2.1 Cíle práce.....	36
2.2 Hypotézy.....	36
3 Praktická část	37
3.1 Metodika.....	37

3.2	Preanalytická fáze vyšetření	37
3.2.1	Odběr materiálu	37
3.3	Analytická fáze	38
3.3.1	Izolace nukleových kyselin (DNA)	39
3.3.2	Měření koncentrace DNA	42
3.3.3	Real-time PCR (q-PCR)	43
4	Výsledky	47
5	Diskuse	49
6	Závěr	52
7	Seznam použité literatury	53
8	Seznam obrázků	58
9	Seznam tabulek	59
10	Seznam zkratk	60

Úvod

Téma bakalářské práce jsem si zvolila, protože sama trpím oběma nemocemi a celiakie mi doposud nebyla diagnostikována genetickými metodami. Dalším důvodem výběru tématu bylo zjistit, ze které strany mojí rodiny jsem nemoci zdělila a zda-li má moje rodina predispozice k propuknutí celiakie.

Diabetes mellitus patří nejen v České republice k onemocněním s vysokým nárůstem pacientů a kvůli vysokému výskytu v populaci je pokládán za civilizační onemocnění. V České republice se k roku 2013 léčilo více než 861 tisíc pacientů, což oproti předchozímu roku znamenalo nárůst o více než 20 tisíc pacientů. Diabetes je zařazován do skupiny metabolických onemocnění. Pro toto onemocnění je charakteristická vysoká hladina glukózy v krvi (hyperglykemie), kterou způsobuje nedostatečný účinek hormonu inzulínu. Léčba diabetu spočívá v podávání tablet ve formě antidiabetik (v případě DM II. typu) a v podávání inzulínu v injekční formě (v případě DM I. typu).

Dalším hlavním tématem probíraným v mé bakalářské práci je problematika onemocnění celiakie, která se v mém případě vyskytuje jako přidružené onemocnění. Uvádí se, že celiakie je po autoimunitní thyreoiditidě druhou nejčastější autoimunitní chorobou sdruženou s DM I. typu. Celiakie je autoimunitní chronická enteropatie a u geneticky predisponovaných jedinců je způsobena přecitlivělostí organismu na lepek. Stejně tak jako pozorujeme nárůst pacientů s DM I. typu stoupá i výskyt celiakie. Celiakii v současnosti trpí 3-8 % diabetiků 1. typu. Celiakie se dnes běžně vyšetřuje pomocí serologických a histologických metod, ale čím dál více se přistupuje i právě k vyšetření pomocí genetických metod. Zde je nutno podotknout, že kromě potvrzení diagnózy lze pomocí genetického vyšetření zjistit i samotné predispozice k onemocnění. Celiakie se vyznačuje silnou genetickou vazbou k HLA-DQ2 a HLA-DQ8 alelám. Léčba celiakie je dnešní době jednoznačná, a to zavedení striktní bezlepkové diety.

1 Teoretická část

1.1 Charakteristika diabetu mellitu

Diabetes mellitus neboli cukrovka je chronické autoimunitní onemocnění. Základním rysem této choroby je hyperglykémie, která vzniká v důsledku nedostatečného účinku inzulínu při jeho absolutním či relativním nedostatku (Bartoš et al., 2018). Ve střevech našeho těla dochází k rozkladu cukrů na glukózu. Ta se vstřebává do krevního oběhu, kde je štěpena za vzniku energie. Po přísunu glukózy do těla, především tedy po jídle, dochází k jejímu zvýšení a tělo na tento stav reaguje uvolněním hormonu inzulínu ze slinivky břišní (Bělobrádková a Brázdová, 2006).

Cukrovka je celoživotní onemocnění a má časté sklony ke komplikacím. Díky nim se řadí na jedno z předních míst z hlediska mortality (Rybka, 2006). *Diabetes* je pokládán za civilizační onemocnění, jednak kvůli svému vysokému výskytu v populaci a jednak kvůli závislosti na negativních jevech současného způsobu života. Těmito jevy je myšlen například stres, nadměrný příjem energie, nevhodné složení potravy či nedostatek pohybu, který vede k obezitě (Jirkovská et al., 2014). Mezi rozvinuté příznaky diabetu patří zejména polyurie, polydipsie, únava, nechutenství a úbytek na váze. Stává se, že v počátku choroby jsou její příznaky nevýrazné, tudíž ani pacient je nemusí považovat za důležité a snadno je přehlédne (Bartoš a Pelikánová, 2018).

Veliké většině nemocných lze vhodným způsobem léčby umožnit téměř normální způsob života. Pro dobrou kvalitu života diabetika je nutná aktivní účast pacienta na léčbě. Z tohoto hlediska je velmi důležité, aby si diabetik byl vědom příčin a následků onemocnění (Pacovský, 1993). V poslední době byl zaznamenán významný posun v léčbě pacientů s DM, a to díky významným pokrokům v diabetologické péči. Rozšířilo se domácí samostatné měření glykémie, zvýšila se dostupnost inzulínových stříkaček, dávkovačů inzulínu a zejména dostupnost inzulínových pump (Jirkovská et al., 2014).

Předpokladem pro správnou kontrolu diabetu jsou důležité znalosti. Pacientům, kteří mají zájem o samostatnou kontrolu cukrovky lze doporučit účast v některém edukačním programu. Tyto programy pořádají diabetologické kliniky, ambulance či organizace diabetiků. Hlavními cíli těchto edukací je zajistit zvýšení kvality života

pacienta, zlepšit kompenzaci diabetu a snížit komplikace vyplývající z tohoto onemocnění (Bartoš a Pelikánová, 2018).

1.2 Typy diabetu

1.2.1 DM I. Typu

Charakteristika

Příčinou diabetu 1. typu je selektivní destrukce beta buněk slinivky břišní. Destrukce vede k absolutnímu nedostatku inzulínu a tím i k jeho celoživotnímu exogennímu dodávání (Pacovský, 1993). Nejčastější příčinou destrukce beta buněk slinivky břišní je autoimunitní reakce, jejímž spouštěcím mechanismem je zřejmě virová infekce či styk s jiným agens. U osob s genetickou predispozicí začnou buňky, které za normálních okolností ničí jen cizorodé a změněné buňky, napadat vlastní beta buňky slinivky břišní (Haluzík, 2008).

Příznaky

V důsledku nedostatku inzulínu je pro tuto poruchu slinivky břišní typická hyperglykémie a sklon ke ketoacidóze (Rybka, 2006). Díky tomu můžeme u nemocného jedince spatřit klasické příznaky jako jsou žízeň, zvracení, polydipsie, noční močení, polyurie a u dětí mnohdy i pomočování. Dalšími typickými příznaky jsou hubnutí, zvýšená únava, malátnost, mohou být přítomny přechodné poruchy ostrosti zraku, poruchy vědomí či dech páchnoucí po acetonu. V dětském věku nemusí být klinické příznaky zcela typické, a proto mohou být lehko přehlédnutelné. Pokud se jedná o kojence či batolata, zde se může být příznakem DM I. typu pouze zvýšený počet pomočených plen (Stožický a Pizingerová, 2006).

Diagnostika

V naprosté většině případů je DM I. typu diagnostikován v ambulantních zařízeních. Při podezření na toto onemocnění je důležité okamžité předání pacienta do diabetologické ambulance, kde je pacient ihned vyšetřen a léčen adekvátním způsobem (Zamrazil et al., 1997). Základem diagnostiky DM I. typu jsou laboratorní vyšetření, a

to zejména vyšetření glykémie. Pokud jsou přítomny klinické projevy a pokud je vyšetřovaná glykémie vyšší než 11,0 mmol/l (fyziologické hodnoty: 3,8-5,6 mmol/l) vede tato diagnostika k diagnóze DM I. typu. Diagnóza je potvrzena, pokud je vyšetření glykémie po osmihodinovém lačnění vyšší než 7,0 mmol/l. Pokud je ale hodnota nižší než 7,0 mmol/l jedná se pouze o poruchu metabolismu glukózy a doporučuje se provést tzv. orální glukózový toleranční test – oGTT. Princip tohoto vyšetření bude vysvětlen v kapitole Gestační diabetes (GDM). Diabetičtí pacienti jsou v péči lékařů, specialistů pro obor diabetologie, či internisty s licencí diabetologie. Pokud se jedná o pacienty dětského věku, o ty se starají lékaři se specializací v oboru pediater-endokrinolog, pediater-diabetolog nebo pediater s licencí na diabetologii. Dále se o tyto pacienty starají diabetologické a dietní sestry. Při diagnostice a léčbě *diabetu* I. typu se využívá spolupráce specialistů z jiných oborů jako je například neurologie, oftalmologie, nefrologie, ortopedie atd. (Pelikánová a Bartoš, 1999).

Akutní komplikace

Hypoglykemie

Mezi nejběžnější komplikace DM I. typu patří zejména hypoglykemie. Jedná se o patologický stav, kdy dochází ke snížení koncentrace glukózy pod 3,3 mmol/l v kapilární plazmě. Je to stav, který je provázený různými klinickými či biochemickými projevy jako je například pocit hladu, bolest hlavy, brnění jazyka, rozostřené vidění. Tyto projevy vedou k závažným poruchám činnosti mozku, který je závislý právě na přívodu glukózy. Hypoglykemie vzniká tehdy, kdy není rovnováha mezi inzulínem, kterého je nadbytek a glukózy, které je nedostatek. Příčinou tohoto stavu u pacientů trpících diabetem je nejčastěji nadměrná dávka inzulínu či opožděný nebo neadekvátní příjem potravy, další příčinou může být například náhlá fyzická zátěž.

Hypoglykemie můžeme podle přítomnosti příznaků dělit na symptomatickou a asymptomatickou, kdy symptomatická hypoglykemie se dále dělí podle klinického hlediska na:

Lehkou – pacient je při vědomí, klinický nález není žádný nebo minimální, přítomný je pouze biochemický nález.

Středně těžkou – pacient je schopen tuto situaci zvládnout sám, přítomné jsou kromě biochemického nálezu i klinické příznaky.

Těžkou – pacient je odkázán na pomoc druhé osoby.

Hypoglykemické kóma – pacient ztrácí vědomí. Kóma může být v některých případech doprovázeno křečemi.

Za zvláštní zmínku stojí noční hypoglykémie, která ve většině případů probíhá asymptomaticky a pacient se neprobudí. Na tento stav může upozornit nadměrné pocení, po probuzení jsou přítomné bolesti hlavy, únava, změna nálady (Rybka, 2006).

Běžnou lehkou či střední hypoglykémii by měl pacient, či rodiče pacienta, pokud se jedná o dítě, zvládnout sami. Nejběžnější léčbou je podání jednoduchých (tzv. rychlých) cukrů, jako je hroznový cukr či sladké tekutiny. Pokud se jedná o těžší formu hypoglykémie s poruchou vědomí, kdy není nemocný schopen přijmout potravu ústy, podává se 40 % roztok glukózy nitrožilně. V situaci, kdy není možná okamžitá aplikace glukózy nitrožilně se aplikuje 1 mg glukagonu intramuskulárně (do svalu). Injekci s glukagonem by u sebe měli mít všichni pacienti a rodina pacienta by měla být o jeho použití řádně poučena při záchytu onemocnění (Bartoš et al., 2018).

Hyperglykemie

Hyperglykemie je stav opačný hypoglykémii. Dochází při něm k náhlému zvýšení hladiny glukózy v krvi nad referenční rozmezí. Jedná se o život ohrožující stav. Příčiny tohoto stavu mohou být například nadměrný příjem jídla, pití nápojů s vysokým obsahem cukru, nedostatek inzulínu, současný výskyt jiného onemocnění, těhotenství či třeba stres nebo zlost. Typickými příznaky jsou žíznivost, pocit na zvracení, nadměrné močení, slabost, únava a ketoacidóza. Léčba hyperglykemie spočívá ve zvýšené aplikaci inzulínu, navýšeném příjmu neslazených tekutin v klidu na lůžku. Pokud však není tato porucha zvládnutá v domácí péči a pacientovi hrozí diabetické kóma, je nutná hospitalizace (Psottová, 2012).

Diabetická ketoacidóza

Další akutní komplikací DM I. typu může být život ohrožující stav, diabetická ketoacidóza. Jedná se o komplikaci metabolickou, která je vyvolána nedostatkem

inzulínu, ať relativním či absolutním. V této situaci tělo vyplavuje tzv. kontraregulační hormony (glukagon, růstový hormon, katecholaminy, a kortizol). Jejich účinek vede ke zvýšení funkce jater, ledviny produkují více glukózy, přičemž dochází k její periferní utilizaci. Následně vzniká hyperglykemie, osmotická diuréza a hyperosmolalita, provázená dehydratací a ztrátami elektrolytů močí. Následkem nedostatku inzulínu je vstup glukózy do buněk omezen, v těle se hromadí ketolátky a vzniká metabolická acidóza. Diabetická ketoacidóza se zpravidla objevuje u pacientů ještě před prvním zachycením onemocnění (manifestace nově vzniklého diabetu mellitu). Výjimečně se s ní můžeme setkat u pacienta, který už onemocněním trpí, a to zejména z důvodu vynechání dávky inzulínu, nebo v případě používání inzulínových pump při ucpání kanyly, či uvolnění kanyly z podkoží nebo například při stresové situaci.

Stejně tak jako hypoglykemie, můžeme diabetickou ketoacidózu rozdělit podle závažnosti do třech skupin – mírná, středně těžká a těžká. Mezi sebou se liší hodnotami venózního pH a bikarbonátů v krvi. U obou zmíněných parametrů můžeme podle stupně závažnosti ketoacidózy pozorovat jejich klesající hodnoty.

Projevy diabetické ketoacidózy jsou například úbytek hmotnosti, bolesti břicha, zvracení, slabost, tachykardie, hypotenze, polyurie, polydipsie, poruchy vědomí až kóma.

Léčba tohoto závažného stavu probíhá na jednotce metabolické nebo intenzivní péče, kde je potřebné vybavení pro sledování stavu pacienta. Základem léčby je ale rehydratace a náhrada inzulínu ve formě intravenózní infuze (Venháčová, 2006).

Chronické komplikace

U pacientů s *diabetes mellitus*, dochází během času k nevratným změnám v jednotlivých tkáních. K nejvýznamnějším změnám dochází v pojivové tkáni, především v cévách, kde se objevují mikro a makroangiopatie. Diabetickou mikroangiopatii zastupují nefropatie, retinopatie a neuropatie, diabetickou makroangiopatii potom cévní mozková příhoda, ischemická choroba srdeční, a také ischemická choroba dolních končetin (Rybka, 2006). Tyto komplikace lze označit jako pozdní projevy onemocnění, protože jsou důsledkem dlouhodobého působení změněného metabolismu.

Mezi mikroangiopatií a makroangiopatií nacházíme zásadní rozdíl v poškození cév. U mikroangiopatie, jak už název napovídá jsou poškozeny především malé cévy, jako jsou arterioly, kapiláry a prekapiláry. U makroangiopatie dochází k aterosklerotickému poškození velkých tepen (Bartoš et al., 2018).

Léčba

Léčba pacientů s DM spočívá především v zásadní změně životního stylu, v zavedení diety a pokud je to možné, tak navýšení fyzické aktivity. Způsob léčby se odvíjí zejména od typu diabetu, kterým pacient trpí. Nicméně u všech typů diabetu je důležité zajistit pro pacienta optimální hladinu glykémie (4-6 mmol/l), jeho přiměřenou hmotnost a fyziologické hodnoty krevního tlaku.

Pro léčbu diabetu I. typu jsou důležité tři zásadní komponenty – v první řadě je to inzulín, dále pak regulovaná strava a naposledy pravidelný pohybový režim. Aby se tato léčba mohla stát účinnou, musí se jak pacient, tak jeho rodiče (v případě, že se jedná o dítě) seznámit se všemi informacemi o nemoci a mělo by dojít k pochopení toho, jak se jednotlivé složky léčby navzájem ovlivňují. Cílem terapie je dosažení ideální kompenzace a eliminace akutních komplikací. Dalším důležitým cílem je snížení a oddálení vzniku chronických komplikací. Léčbu je tedy důležité nastavit tak aby život jedince s tímto onemocněním byl stejně plnohodnotný jako život zdravých vrstevníků (Lebl et al., 2015).

Inzulín

Pacienti s DM I. typu jsou doživotně závislí na substituci inzulínu. Cílem terapie inzulínem je co nejvíce napodobit fyziologickou sekreci inzulínu slinivky břišní. Tato léčba je zahájena bezprostředně po potvrzení diagnózy ještě při hospitalizaci pacienta. Inzulín se do těla pacienta aplikuje do podkoží, kde se nachází vrstvička tuku uložená mezi kůží a svalem. Aplikace probíhá formou inzulínových per či inzulínových pump. V současné době se používá inzulín humánní, který je shodný s molekulami lidského inzulínu. Podle toho, jak rychle nastoupí účinek inzulínu po jeho aplikaci, se inzulíny dělí na ultrakrátce, krátce, středně dlouze a dlouze působící (Bartoš et al., 2018).

Potřeba inzulínu je zcela individuální a odvíjí se od věku, hmotnosti, příjmu sacharidů, fyzické aktivity, stavu kompenzace, typu akutního onemocnění, přítomnosti jiných přidružených chorob a v neposlední řadě také od délky trvání diabetu u pacienta.

Důležitou součástí v léčbě je tzv. self-monitoring. Tím rozumíme samostatnou kontrolu onemocnění, kdy si pacient hlídá hodnoty glykémie. Do self-monitoringu řadíme kromě kontrolování hodnot glykémie také kontrolu glykosurie, ketonurie, rozpoznání hypoglykémie a hyperglykémie, kontrola denních dávek inzulínu, glykovaného hemoglobinu a dalších parametrů (Lebl et al., 2015).

Podle Otto-Buczowské et al. je novým trendem použití non-inzulínové doplňkové léčby pomocí farmak. Nejrozšířenějším lékem je metformin, spolu s inhibitory transportérů sodíku-glukózy, analogů amylinu, agonistů receptoru glukagonu a inhibitorů dipeptidylpeptidázy-4. Podávání těchto léčiv je provázeno dobrými výsledky u pacientů s diabetem I. typu. V blízké budoucnosti se plánuje jejich využití u dospělých i dospívajících pacientů s tímto onemocněním (Otto-Buczowska et al., 2017).

1.2.2 DM II. Typu

Charakteristika

Diabetes mellitus druhého typu, též dříve označovaný jako DM nezávislý na inzulínu nebo také diabetes dospělého věku, je chronické onemocnění s familiárním výskytem (Bělobrádková a Brázdová, 2006). Toto onemocnění se rozvine i přesto, že tělo produkuje inzulín, v některých případech i nadbytek inzulínu. Důvodem zvýšené hladiny krevního cukru je nedostatečná citlivost buněk na hormon inzulín. Rezistence na inzulín může být způsobena sníženým počtem plazmatických membránových receptorů na cílových buňkách nebo následkem postreceptorové blokády nitrobuněčného metabolismu glukózy (Bartoš et al., 2018). *Diabetes mellitus* 2. typu postihuje spíše starší osoby, nejčastěji se toto onemocnění manifestuje po dosažení 40. roku věku, nicméně projevit se může kdykoli. Další významnou ohroženou skupinou jsou osoby s nadváhou či obezitou (Lebl et al., 2015) a to v 60-90 % případů (Rybka, 2006).

Příznaky

Příznaky onemocnění mohou být nevýrazné či skryté, a proto jsou odhaleny zcela náhodně (Bartoš, Pelikánová et al., 2018). Mezi rozvinuté příznaky diabetu 2. typu patří žízeň, polyurie, polydipsie a únava. Nechutenství či úbytek na váze, jako je tomu v případě diabetu 1. typu se nemusí projevit. Pacient bývá v tomto případě i při hodnotách nad 10 mmol asymptomatický (Bělobrádková a Brázdová, 2006).

Komplikace

Komplikace u DM II jsou totožné s komplikacemi u DM I a jsou popsány v kapitole DM I. Typu.

Léčba

Nejdůležitějším způsobem léčby DM I. typu je léčba nefarmakologická, jedná se o dietu a fyzickou aktivitu. Dieta, patří mezi trvalou léčbu a je to nejjednodušší způsob, jak docílit kompenzovaného diabetu, avšak tato metoda je jednou z méně realizovatelných, protože dodržování diety vyžaduje znalost a zásady zdravého životního stylu. Změna dosavadního způsobu života pacienta může být náročná. Dieta podporuje udržení optimální hladiny glykemie a také snižuje výkyvy jejích hodnot, včetně hladin krevních tuků, jimiž jsou triacylglyceroly a cholesterol (Bartášková a Mengerová, 2008). Také pravidelná fyzická aktivita je velice prospěšná, zejména z důvodu snížení inzulínové rezistence. Doporučuje se pravidelný pohyb, nejméně 30 minut denně (Klener, 2006).

Dalším způsobem léčby je kromě diety a pohybu také užívání léků, tzv. perorálních antidiabetik. Ty se používají v případě, kdy dieta nepostačuje ke kompenzaci glykémie. Antidiabetika jsou léky, které zlepšují využití inzulínu v těle pacienta a zvyšují jeho tvorbu (Svačina, 2003).

I když lidé trpící tímto onemocněním nejsou závislí na podávání exogenního inzulínu, občas je jeho podání důležité v zájmu udržení správné kompenzace cukrovky a úpravy hyperglykemie. K tomuto typu léčby se přistupuje, když nestačí léčba dietou ani perorálními antidiabetiky (Bartoš a Pelikánová, 1999).

1.2.3 Gestační diabetes (GDM)

Metabolické a hormonální změny probíhající v těhotenství mohou být příčinou vzniku diabetu u těhotných žen. Gestační *diabetes mellitus* (GDM) neboli těhotenská cukrovka, je onemocnění vznikající teprve v průběhu těhotenství, a to nejčastěji po 20 týdnu gravidity. Těhotenská cukrovka je popisována u 2-3 %, v některých zemích až 6 % těhotných žen. T má společné rysy s diabetem II. typu.

V těle matky se vyskytuje normální či dokonce zvýšené množství hormonu inzulinu. GDM se nejčastěji manifestuje mezi 24. a 30. týdnem gravidity (Roztočil, 2017). Onemocnění souvisí se sekrecí anti-inzulárně působících hormonů, z nichž nejdůležitějšími jsou kortizol a humánní placentární laktogen. Antiinzulární efekt mohou mít také estrogeny (Pelikánová a Bartoš, 2018). Ve většině případů nejde o závažnou poruchu tolerance glukózy, avšak je nezbytné gestační diabetes pečlivě sledovat, aby se minimalizovala rizika pro plod, jako je makrozomie, vrozené malformace a zvýšená perinatální morbidita a mortalita (Wiener K., 1992). Naprostá většina GDM souvisí jen s těhotenstvím a záhy po porodu mizí. Je nutné podotknout, že ženy trpící GDM mají větší předpoklad k vzniku DM II. typu v budoucnosti (Bartoš a Pelikánová, 2018).

Léčba

Léčba GDM je založena na režimových opatřeních, jako jsou dieta a pohyb. Cílem léčby GDM je dosažení glykemie dosahující hodnoty 5,3 mmol/l před jídly a 7,2 mmol/l po jídle. Pacientkám se doporučuje dodržování diabetické diety s obsahem 275–325 g sacharidů za den (Nicholson et al., 2009). V tomto případě je také velice důležitý selfmonitoring, kterým se rozumí samostatná kontrola diabetu. Zahrnuje kontrolu hodnot glykemie pacientem (pomocí glukometru) a kontrolu glykosurie a ketonurie pomocí testovacích proužků (Bartoš a Pelikánová, 2018).

1.3 Genetické predispozice

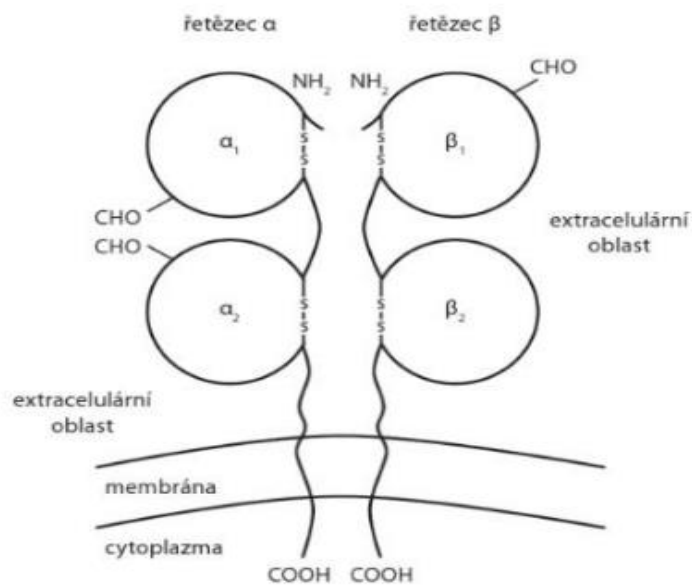
Onemocnění *diabetes mellitus* I. typu patří mezi fenotypově i genotypově heterogenní skupinu onemocnění. Na jeho vzniku se podílí mnoho faktorů, zejména etiopatogenetických. Genetické riziko onemocnění je podmíněno přítomností více

variantních genů. Predispozice jsou pravděpodobně způsobeny polymorfními variantami genů, a ne vzácnými mutacemi (Brdička a Didden, 2018).

V průměru je riziko prevalence pro děti s negativní rodinnou anamnézou 0,4 %. Prevalence se zvyšuje na 6 %, pokud tímto onemocněním trpí jeden z rodičů, pokud nemocí trpí oba rodiče, dochází ke zvýšení prevalence na 30 % (Prasad a Groop, 2015).

Diabetes mellitus I. typu je onemocnění, u kterého je dobře definovaná vazba na HLA-systém. Genové produkty třídy II, HLA-DR3 a DR4, mohou být primárními geny souvisejícími s citlivostí na DM I. typu. Produkty těchto genů aktivují patogenetické imunitní mechanismy, které pod dodatečným vlivem speciálních HLA genů třídy I. a III. vedou k vývoji diabetu. Extrémně vysoká četnost heterozygotů HLA-DR3 a DR4 u diabetických pacientů, genetická heterogenita u B8 a různé klinické, epidemiologické a imunologické parametry, poukazují na existenci alespoň dvou různých genů ovlivňujících citlivost k diabetu. Největší riziko pro vznik diabetu je připisováno HLA-DQ molekulám, ale přispívají i některé podtypy DRB* 04. Jsou zde ale uplatňovány i některé geny mimo I. i II. třídu HLA-systému (Cinek et al., 2001). Ke vzniku onemocnění přispívá HLA systém přibližně z 30-60 %. Největší část rizika pro vznik onemocnění nesou HLA molekuly II. třídy (Souček, 2011).

Mezi HLA genotypy, které jsou spojené s DM I. typu lze zahrnout haplotypy HLA-DR/D4, HLA-DQ2/DQ8, HLA-DRB1 a HLA DR2. Pro regulaci imunitní odpovědi je velice důležitý HLA komplex II. třídy (Martinescu et al., 2012). Strukturu HLA molekuly II. třídy zobrazuje Obrázek 1.



Obrázek 1: Struktura HLA molekuly II. třídy. (obrázek převzat z Penka et al., 2012).

Podle MUDr. Marie Černé dochází během vyžívání T-lymfocytů v thymu i za fyziologických podmínek k neúplné negativní selekci a naivní autoreaktivní T-lymfocyty se proto dostávají do periferních lymfatických orgánů. Specifické HLA molekuly, které jsou zapojeny do prezentace peptidů dozrávajícím T-lymfocytům, mohou tedy přispívat k náchylnosti k autoimunitě. Molekuly HLA-DQ asociované s autoimunitním diabetem (zejména DQB1* 0302) mají strukturální vlastnosti, které svědčí o nedostatečné komunikaci během rozpoznávání T-lymfocytů, což odpovídá hypotéze, že asociace HLA-DQ s DM I. typu je částečně vysvětlena neadekvátní časnou selekcí a maturací T-lymfocytů (Černá, 2003).

1.4 Charakteristika celiakie

Celiakie (neboli celiakální sprue, endemická sprue, Herterova choroba či netropická sprue) je geneticky podmíněné, imunitně zprostředkované onemocnění (Kohout a Pavlíčková, 2010). Jedná se o celoživotní onemocnění, kdy pacient trpí permanentní střevní intolerancí na lepek neboli gluten (Murray, 2003). Lepek je komplex bílkovin, který je možné pomocí frakce rozdělit na dvě složky – gluteniny a prolamininy. Především peptidy prolaminů spouštějí u geneticky senzitivních jedinců

imunitní reakce. Prolaminy jsou nejvíce obsažené v pšenici (až 35 %) a nejméně jich obsahuje oves (13 %). Trávicí enzymy mají problém s jejich štěpením, protože prolaminy mají vysoký obsah aminokyselin (prolinu a glutaminu), a tím i peptidických vazeb (Frič a Keil, 2011). Ve střevní sliznici dochází k tvorbě protilátek, kvůli kterým dochází na sliznici střeva k zánětlivým změnám, dále také dochází ke ztrátě klků, atrofii sliznice, elongaci krypt a k lymfocytární infiltraci poškozené sliznice (Heřmanová, 2012).

Na rozvoji celiakie se kromě genetické predispozice podílejí také vlivy vnějšího prostředí, jako jsou například virová infekce či dlouhodobý stres. Celiakie je asociována s MHC (Major Histokompatibilitý komplex) II. třídy, a to s molekulami HLA-DQ2 a HLA-DQ8 (Kohout, 2006). HLA DQ2 alela je exprimována u většiny osob trpících celiakií (> 90 %), DQ8 alela asi u 8 %. Dědičnost těchto molekul je autozomálně recesivní s dominantní nekompletní penetrací, proto je vyšší riziko vzniku onemocnění u příbuzných pacientů s celiakií. Celiakie se objevuje častěji u žen než u mužů, v poměru asi 2:1 (Tonutti a Bizzaro, 2014).

1.5 Klinické projevy a formy celiakie

1.5.1 Klinické projevy

U celiakie se objevuje mnoho klinických projevů, které se rozdělují na klasické (neboli intestinální) a atypické (extraintestinální). Tyto projevy jsou velmi proměnlivé a velice závisí na věku pacienta. Mezi všeobecné projevy můžeme zařadit nevolnost, nechutenství, plynatost či poruchy trávení. Dále sem také patří deprese, zvýšená únava, poruchy chování a u žen sklon k potratům a neplodnost. Celiakie se může projevit už v 1. roce života, kdy se kojencům do stravy zařazují obilné kaše. V pubertě často dochází k útlumu příznaků, ale v dospělosti naopak dochází k jejich recidivě (Kohout a Pavlíčková, 2010).

Symptomy u dětí jsou mírně odlišné od symptomů popisovaných u dospělých. U dětí se celiakie nejčastěji projevuje nafouklým břichem, bolestmi břicha, průjmy a úbytkem na váze. Také může docházet k poruše růstu nebo až k zastavení růstu. Chronickými příznaky jsou podvýživa, anémie a otoky nohou. Protože dochází

k poruchám trávení, tudíž i k nedostatečnému vstřebávání živin a vitamínů, pacient trpí podvýživou (Červenková, 2006).

U dospělých se celiakie projevuje podobně, ale příznaky se zmírní nebo úplně vymizí a dochází k vývoji tzv. bezpříznakové formy. Jsou to například bolesti břicha, chronický průjem, změny stolice, anémie z nedostatku železa a také malnutrice a ztráta hmotnosti. Častým důsledkem těchto příznaků je osteoporóza, poruchy vidění nebo poruchy imunity. U pacientů trpících tímto onemocněním je potvrzen vyšší výskyt nádorových onemocnění. (Kohout a Pavlíčková, 2010).

1.5.2 Formy celiakie

Celiakii můžeme na základě hematologických a imunologických nálezů rozdělit do několika forem. Jedná se o formu klasickou, atypickou, asymptomatickou, latentní a potencionální. Tyto formy se liší především, charakterem, intenzitou obtíží, anamnézou ale také histologickým nálezem na sliznici tenkého střeva (Frič a Keil, 2011).

Klasická forma se projevuje typickými příznaky, jako jsou chronický průjem, celkové neprospívání nebo úbytek svalové hmoty dítěte. Tato forma je obvykle přítomna u dětí ve věku mezi 6. – 8. měsícem, kdy se do stravy zařazují potraviny bohaté na prolaminy. Děti jsou často hubené, bledé s nafouklým břichem a mají malé množství podkožního tuku. Stolice u takto nemocných dětí bývá charakteristicky bledá a objemná. Veliké riziko vzniká u kojenců, kdy může dojít až k dehydrataci kvůli častým vodnatým průjmům (Kohout a Pavlíčková, 2010).

U této formy se objevují typické laboratorní nálezy, kterými jsou např. anémie z nedostatku železa, snížená hladina albuminu a vápníku a deficit některých důležitých vitamínů a minerálů. Běžným nálezem je také přítomnost protilátek proti tkáňové transglutamináze a endomysiu. Typické jsou také změny na sliznici tenkého střeva, a to od mírné až po úplnou atrofii střevních klků (Fasano, 2001).

Jako další je **forma atypická**, která je většinou diagnostikovaná mezi 5-6 rokem věku dítěte. Přibližně více než 50 % čerstvě nemocných pacientů nemá typické gastrointestinální příznaky. Tito pacienti mají atypický příznak a tím je *dermatitis herpetiformis Dühring* (Frič a Mengerová, 2008). V tomto případě se jedná o tzv. kožní formu celiakie, kdy se na pokožce nemocného objevují puchýře a vyrážka. Nejčastěji se

vyskytuje na místech, kde dochází k opakovanému namáhání pokožky. Po zavedení bezlepkové diety a nasazení speciálních kožních léků tyto příznaky vymizí (Antiga a Caproni, 2015).

Další příznaky, které provázejí atypickou formu celiakie je například anémie z nedostatku železa a malý vzrůst, který je často nacházen u adolescentů a starších dětí. V ojedinělých případech se může objevovat i osteoporóza. V důsledku špatného vstřebávání živin, zejména vápníku dochází k poklesu hustoty kostí a tím může docházet k častějším zlomeninám. Také se může vyskytovat chronická hepatitida či neurologické problémy (Lukáš a Žák, 2007).

Asymptomatická forma je charakteristická histologickým nálezem na sliznici střeva a také přítomností typických autoprotilátek. Při této formě pacient nevykazuje žádné klinické příznaky. Tato forma se většinou objeví náhodně při screeningu rizikových osob, jako jsou například lidé trpící jinou autoimunitní chorobou či příbuzní pacientů s celiakií (Kohout a Pavlíčková, 2010). U dospělých trpících touto formou celiakie je nacházeno snížené množství železa, který může být spojený s anémií. Dále také sklony k depresi, podrážděnost, zhoršením fyzické kondice či se snížená hustota kostí, jak již bylo zmíněno výše. Ke zlepšení stavu pacienta dochází po zavedení bezlepkové diety, což vede ke zlepšení jak stavu psychického, tak fyzického, ke zvýšení chuti k jídlu, zlepšení nálady a fyzické výkonnosti (Klener, 2006).

U **latentní formy** je pozitivní sérologické vyšetření protilátek a také zvýšený počet lymfocytů. Histologický nález na sliznici střeva je fyziologický a klinické příznaky se mohou či nemusí objevit. Tato forma není častá (Frič a Mengerová, 2008).

Potencionální forma celiakie je bezpříznaková a imunologická abnormalita se projevuje pouze jedním znakem. To znamená zvýšenými lymfocyty nebo přítomností autoprotilátek. Tato forma se může rozvinout i do jiných forem celiakie (Frič a Keil, 2011).

1.6 Diagnostika

Běžně používanými vyšetřeními při diagnostice celiakie jsou biopsie sliznice tenkého střeva a sérologické testy (zahrnujících i testy imunologické) (Ensari, 2010).

Společnost pro dětskou gastroenterologii a výživu – ESPGHAN, resp. NAPSGHAN neboli evropská, resp. severoamerická společnost byla stanovena kritéria pro diagnostiku celiakie. Kritéria, která byla původně stanovena vyžadovala provedení 3 biopsií (3 odběrů vzorku sliznice tenkého střeva). První odběr se prováděl při obtížích, další po zavedení bezlepkové diety a třetí, poslední po navrácení lepku do diety. Kdy při druhém odběru by mělo být prokazatelné zlepšení, a naopak při třetím by se mělo znovu ukázat zhoršení stavu tenkého střeva. Zvrat v diagnostice nastal po objevení specifických protilátek – zejména protilátek proti endomysiu a tkáňové transglutamináze, kdy pacient podstupuje pouze jednu biopsii vzorku tenkého střeva. Tato kritéria platí i u vyšetření dospělých (Ribes -Koninckx et al., 2012).

1.6.1 Serologická imunologická laboratorní vyšetření

V současné době je v České republice základním vyšetřením při podezření na celiakii stanovení autoproti látek proti tkáňové transglutamináze (anti-tTG), ve třídě IgA. Přítomnost protilátek této třídy se řadí mezi velice specifické laboratorní důkazy glutenové enteropatie. Analýza autoproti látek proti tkáňové transglutamináze se provádí pomocí metody ELISA. Díky rychlé reaktivitě anti-tTG protilátek na bezlepkovou dietu, lze pozorovat úspěšnost zavedené bezlepkové diety.

Dalšími vyšetřovanými parametry v serologické diagnostice celiakie jsou protilátky proti gliadinu (AGA), endomysiu (EMA) a retikulínu (ARA) (Malíčková et al., 2005).

1.6.2 Biopsie

Nedílnou součástí pro diagnostiku celiakie je biopsie. Konkrétně se v nemocničních podmínkách provádí gastrokopie neboli metoda, která využívá endoskop k prozkoumání horní části trávicího systému – zahrnujícího jícen, žaludek a horní část dvanáctníku. ESPGHAN doporučuje odebrání alespoň 4 vzorků z druhé třetiny dvanáctníku a alespoň 1 vzorek z bulby duodena (tj. ta část dvanáctníku nejbliže žaludku) (Husby, 2012). Z těchto vzorků se porovnává a hodnotí vzhled Lieberkühnových krypt a též počet intraepiteliálních lymfocytů (IEL) na 100 enterocytů. Hraniční hodnota je 25 IEL/100 enterocytů (Ensari et al., 2010).

Stanovení míry poškození střeva vychází z tzv. Marshovy klasifikace, která má několik stupňů (viz tab. č. 1).

tab. č. 1 Modifikovaná Marshova klasifikace

Typ	IEL/100 enterocytů	Krypty	Klky
0 normální	< 40	normální	normální
1 infiltrativní	> 40	normální	normální
2 hyperplastický	> 40	hyperplastické	normální
3a částečná atrofie klků	> 40	hyperplastické	mírná atrofie
3b subtotální atrofie klků	> 40	hyperplastické	výrazná atrofie
3c totální atrofie klků	> 40	hyperplastické	úplná atrofie
4 hypoplastický	≥ 40	hyperplastické	úplná atrofie

(Zdroj: Marsh et al., 1992)

1.7 Screening celiakie

V české populaci je diagnostika celiakie spíše podceňována, její diagnostika je doporučována zřídka, a proto je opožděná. Přistupuje se k ní většinou až po dlouhém trvání nemoci (Frič a Bušinová, 2008). V případě, že celiakie není rozpoznána včas, může docházet k závažným komplikacím jako je například osteoporóza, rozvoj autoimunitních chorob, neurologické onemocnění či maligní onemocnění, které jsou v léčebné fázi těžko ovlivnitelné. U pacientů s nedagnostikovanou celiakií, se popisuje čtyřnásobně větší úmrtnost oproti osobám, které jsou séronegativní (Rubio – Tapia et al., 2009). V České republice je dlouhodobě doporučováno zavedení cíleného screeningu, který je zaměřený na tzv. cílové skupiny, kdy je očekáván vyšší výskyt osob s nerozpoznanou celiakií. Do této tzv. cílové skupiny patří příbuzní pacientů s celiakií, pacienti s přidruženými onemocněními s celiakií – př. DM I. typu, autoimunitní tyreoiditida, snížená hladina imunoglobulinu IgA, Bergerova IgA nefropatie a další. Tento screening se provádí i u pacientů, kteří vykazují příznaky typické pro celiakii –

tzn. u pacientů s náhlým úbytkem váhy, s průjmy neznámé příčiny, bolestmi břicha, anémií či sideropenií, osteoporózou mužskou i ženskou neplodností a další atd. (Frič, 2003). Vyšetření probíhá v první fázi stanovením sérových autoprotilátek proti tkáňové transglutamináze ve třídě IgA a stanovením celkového IgA – kvůli vyloučení celkového deficitu IgA protilátek. Při pozitivním výsledku screeningu prvního stupně se přechází do druhé fáze screeningu, tj. endoskopicky provedená biopsie sliznice tenkého střeva (Rostom A. et al., 2006).

1.8 Genetika celiakie

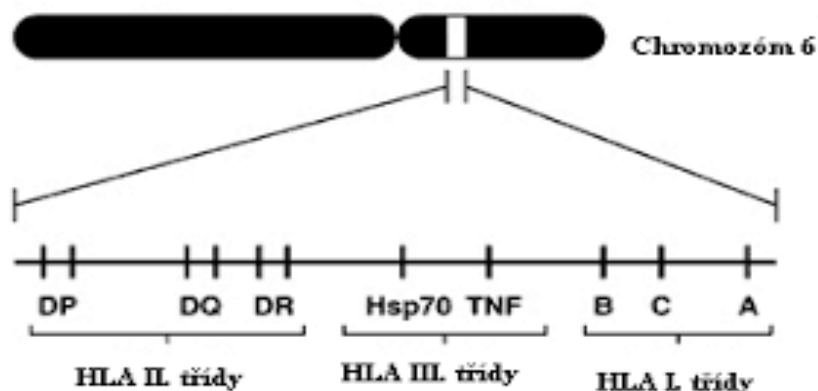
1.8.1 Charakteristika HLA systému

HLA systém, je systém, který byl u člověka poprvé popsán na bílých krvinkách, a proto se nazývá Human Leukocyte antigens (HLA) neboli hlavní histokompatibilní systém člověka (Major histocompatibility complex – MHC). Obsahuje více než 200 polymorfních genů, jejichž produkty jsou exprimovány na povrchu všech lidských buněk a jsou vlastním imunitním systémem rozpoznávány jako cizorodé. Jejich hlavní funkcí je prezentace zpracovaných endogenních a exogenních peptidů T-lymfocytům, které zahajují imunitní odpověď (Penka et al., 2012).

Geny HLA systému jsou u člověka lokalizovány krátkém raménku šestého chromozomu, v poloze 6p21.31. až 6p21.33 (viz. Obrázek 2), a tvoří přibližně jednu tisícinu lidského genomu. Na tomto krátkém úseku DNA se nachází velký počet genů, které mají mnoho různých variant (neboli alel), tzn., že se jedná o velice polymorfní a polygenní systém. Tato vysoká specifita zajišťuje, že každý člověk je z hlediska HLA systému jedinečný a nese na povrchu svých buněk naprosto individuální sestavu HLA molekul, která je určena kombinací těch alel, které byly zděděny od matky a otce (haplotypy – sady zděděných znaků), a která ovlivňuje jeho imunologickou reaktivitu (Medrano et al., 2012). V každé HLA oblasti (čili lokusu) se nacházejí vždy dvě alely. Jedinec, který zdědil obě alely stejné se nazývá homozygot, v opačném případě se jedinec označuje jako heterozygot. Alely HLA systému jsou vůči sobě kodominantní a jsou exprimovány do určitých membránových proteinů (Penka et al., 2012). Ojediněle se však může stát, že jedinec nemá haplotyp stejný s rodičovským. To znamená, že při meióze došlo k výměně nesesterských chromatid chromosomů (Krejsek a Kopecký,

2004). Z teoretického hlediska se jednotlivé HLA alely mohou mezi sebou nezávisle kombinovat. To vysvětluje obrovský počet možných HLA sestav. Významnou roli zde ale hraje také vazebná nerovnováha, která způsobí, že se některé HLA haplotypy vyskytují častěji, než by se teoreticky předpokládalo a také nerovnoměrnou distribucí alel, tzn., že většina HLA haplotypů je označována jako poměrně běžné varianty a zbylé varianty jsou pak vzácné (Penka et al., 2012).

Samotný rozvoj imunitní odpovědi mají na starost antigen prezentující buňky (APC), které využívají vazebná místa na HLA molekulách. APC na vazebná místa připojují zpracovaný antigenní materiál, který pak předkládají ostatním buňkám imunitního systému. Na základě této reakce se vyvine imunitní reakce (Krejsek a Kopecký, 2004).



Obrázek 2: Struktura HLA regionu na chromozomu 6. (obrázek převzat z Dobrovolná et al., 2015).

1.8.2 Struktura HLA systému

Jednotlivé geny HLA systému jsou na základě struktury a uspořádání rozděleny do třech tříd – HLA I. třídy, HLA II. třídy a HLA III. třídy. Nejvýznamnější jsou antigeny HLA I. třídy (-A, -B, -C) a HLA antigeny II. třídy (-DR, DP, -DQ). Mezi antigeny HLA III třídy se řadí cytokiny, stresové hormony anebo složky komplementu (Krejsek a Kopecký, 2004).

HLA molekuly I. třídy

HLA molekuly I. třídy jsou nedílnou součástí plazmatické membrány všech jaderných buněk, nicméně jejich hustota je různá. Největší množství jich najdeme na lymfocytech, nejméně pak na fibroblastech, hepatocytech nebo svalových buňkách (Krejsek a Kopecký, 2004).

Obsahují jeden velký alfa řetězec, který je vázaný nekovalentní vazbou s druhou menší $\beta 2$ mikroglobulinovou podjednotkou (viz Obrázek 3). Těžký řetězec alfa (polymorfní) je kódován geny HLA-A, HLA-B a HLA-C – ty se označují také jako klasické, eventuálně HLA-E, HLA-F a HLA-G geny, které jsou označovány jako neklasické. Ke spojení $\beta 2$ mikroglobulinové podjednotky a těžkého řetězce dochází v endoplazmatickém retikulu (Hořejší, 2013).

V nitru buňky dochází k syntéze antigenních peptidů, které jsou dále prezentovány cytotoxickým T-lymfocytům. Imunitní systém rozpozná tyto peptidy, ale reaguje pouze na fragmenty, které jsou z proteinu odvozeny. Proteiny jsou následně v cytoplazmě degradovány a transportovány do endoplazmatického retikula, kde dochází k připojení fragmentů antigenu do HLA molekuly. Takto vzniklý komplex se dostává přes Golgiho aparát na povrch buňky, kde je rozpoznán právě cytotoxickými T-lymfocyty (Krejsek a Kopecký, 2004).

HLA molekuly II. třídy

Geny II. třídy – HLA-DQ, HLA-DR a HLA-DP jsou exprimovány hlavně na B-lymfocytech, T-lymfocytech (aktivovaných) a makrofázích. Za určitých okolností mohou být prezentovány i na buňkách, které mohou v aktivovaném stavu prezentovat antigen, a které jsou označovány jako APC (antigen prezentující buňky) (Řeháček et al., 2013). Molekuly HLA II. třídy obsahují dva odlišné nekovalentně vázané transmembránové glykoproteinové řetězce. Tyto řetězce se označují jako alfa a beta (viz. Obrázek 3). Každá podjednotka se sestavuje ze dvou extracelulárních domén a transmembránové kotvící sekvence. Oba dva řetězce kóduje tzv. D region HLA komplexu, která se dělí na podoblasti DR, DQ a DP. V DR podoblasti můžeme najít 10 HLA genů, ale jen 5 z nich kóduje na membráně exprimované HLA molekuly. Každá

z těchto podoblastí obsahuje alespoň jeden beta a jeden alfa gen (Krejsek a Kopecký, 2004).

Mezi geny alfa a beta se nachází vazebné místo, kde dochází k vystavení zpracovaných exogenních antigenních fragmentů (většinou o délce 15ti až 20ti aminokyselin). Tento materiál poté rozpoznávají CD4+ pomocné T-lymfocyty (Penka et al., 2012). Hlavní funkce molekul HLA II. třídy je prezentace zpracovaných antigenů CD4+ T-lymfocytům. Antigeny nejčastěji vycházejí z exogenních zdrojů. Proto jsou molekuly HLA II. třídy rozhodující při zahájení antigen specifické imunitní odpovědi.

V tab. č. 2 jsou znázorněné odlišnosti v expresi molekul HLA I a HLA II třídy.

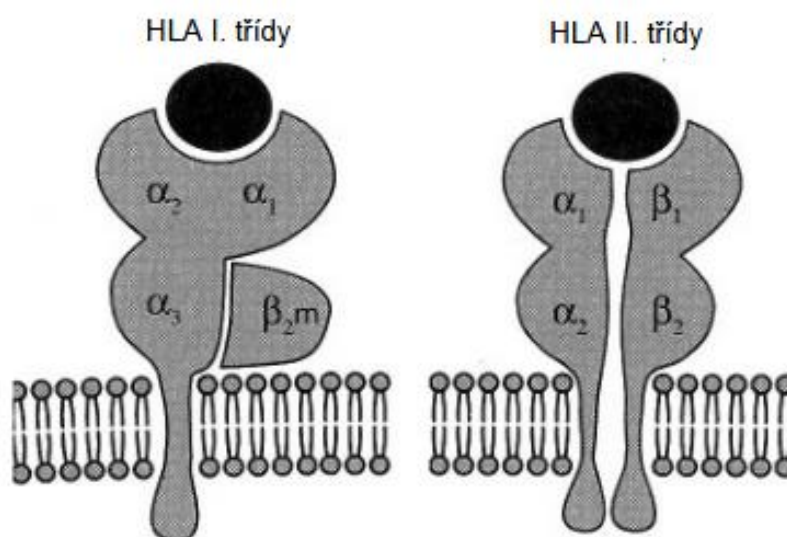
tab. č. 2 Odlišnosti v expresi molekul

Typ buňky, tkáň	Exprese	
	HLA I	HLA II
Buňky imunitního systému		
Dendritické buňky	+++	+
Makrofágy	+++	++
T – lymfocyty	+++	+
B – lymfocyty	+++	+++
Jiné jaderné buňky		
Neutrofilní granulocyty	+++	-
Eosinofilní granulocyty	+++	-
Epitelové buňky	+++	-
Hepatocyty	+	-
Nervové buňky	+	-
Buňky ledvin	+	-
Nejaderné buňky		
Trombocyty	++	-
Erytrocyty	-	-

(Zdroj: Krejsek a Kopecký, 2004)

HLA III. třídy

Molekuly HLA III. třídy obsahují nejvíce genů, ale některé z nich nejsou společné imunitnímu systému. Označují se také jako nepravé HLA geny, protože se strukturně, ani funkčně nepodobají molekulám HLA systému. Nacházejí se mezi lokusy HLA-B a HLA-DR. HLA molekuly III. třídy nesou i geny zodpovědné za funkce, které souvisejí s imunitním systémem, jako jsou například TNF alfa (tumor nekrotizující faktor alfa) nebo proteiny komplementu C2 a C4 (Krejsek a Kopecký, 2004).



Obrázek 3: Struktura molekul HLA I. a II. třídy. (obrázek převzat z Dobrovolná et al., 2015)

1.8.3 HLA nomenklatura

Založení přehledného názvosloví bylo zapotřebí už v roce 1968, kdy vznikl Nomenklaturní výbor světové zdravotnické organizace (WHO) pro faktory HLA. Postupem času docházelo k nárůstu počtu známých alel a ke zdokonalování názvosloví. V roce 2010 bylo nutné HLA nomenklaturu změnit, aby se daly nové alely systematicky pojmenovávat a zařazovat podle jejich sekvenční podobnosti. Největším přínosem však bylo zavedení rozdělovačů (:) do názvu alel. Tím došlo k odstranění dříve omezené čtyřčíselné řady tzv. „4-digit“ a číselná řada se tak stala prakticky nekonečnou (Penka et al., 2012).

1.8.4 Genetická predispozice k celiakii

Ke vzniku onemocnění významně přispívá přítomnost genetického faktoru, na který poukazuje vysoká prevalence celiakie mezi pacienty s celiakií prvního stupně a jejich příbuznými. Taktéž u monozygotních dvojčat je doložen vyšší výskyt celiakie (Sollid et al., 2000).

Spouštěčem tohoto onemocnění je lepek ve stravě, resp. jeho součást – gliadin a glutenin. Fakticky jde o oligopeptidy vznikající štěpením potravy obsahující lepek, které jsou složené z osmi až deseti aminokyselin, a které nedokáží enzymy lidského střeva rozložit. Když dojde k průniku těchto peptidů do sliznice tenkého střeva, dochází k jejich deaminaci (na které se mimo jiné podílí i tkáňová transglutamináza) a následně dochází v lymfatické tkáni gastrointestinálního traktu k jejich navázání na povrchové glykoproteiny HLA-DQ2 a HLA-DQ8 molekul. Tyto imunokompetentní buňky spouštějí ve sliznici tenkého střeva jak buněčnou, tak humorální imunitní odpověď. Dochází k sekreci cytokinů – hlavně TNF- α (tumor necrosis factor) a INF- γ (interferon gamma). Tím dochází ke vzniku autoprotilátek právě proti tkáňové transglutamináze. Kvůli působení autoprotilátek dochází k poškození buněk sliznice tenkého střeva (enterocytů). Míra poškození je individuální, od minimálního poškození sliznice (tzn. změny na úrovni kartáčového lemu enterocytů) až k atrofii klků, hypertrofii Lieberkühnových krypt a infiltraci leukocytů do lamina propria mucosae (Lukáš et al., 2018).

Hlavním predisponujícím faktorem pro rozvoj celiakie je tedy HLA systém, kde hlavní genetickou predispozici v něm představují alely HLA-DQ2 a HLA-DQ8 (Klener, 2006). V případě tohoto onemocnění je důležitá přítomnost sérotypové skupiny DQ2. Beta řetězec skupiny DQ2 je kódován alelickou skupinou DQB1*02, která je lokalizovaná na DQB1 lokusu. Beta řetězec této skupiny se může volně kombinovat s různými typy alfa řetězců a tím mohou vznikat nejrůznější DQ2 heterodimery. S celiakií je asociována kromě skupiny DQ2 již zmíněná skupina DQ8 (Sollid et al., 2000).

HLA-DQ2 heterodimery jsou přítomny přibližně u 90 % pacientů s tímto onemocněním. Tento heterodimer je označován jako DQ2.5 a je kódován DQB1*02 a

DQA1*05 alelami (Matzaraki et al., 2017). Tyto alely se vyskytují na stejném chromozomu (DQ2.5) v cis konfiguraci – tzn., že mohou být zděděny společně, anebo mohou být přenášeny odděleně v konfiguraci trans na homologních chromozomech – tzn. od každého z rodičů jedna alela (Medrano et al., 2012). DQA1*05 a DQB1*02 alely se ve většině případů vyskytují jako DRB1*03:01-DQA1*05:01 haplotyp, nebo se nacházejí v trans konfiguraci jako DRB1*11/12-DQA1*05:05-DQB1*03:01 či DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:02 haplotyp.

Několik studií potvrzuje, že přítomnost alely DQB1*02 v homozygotním stavu je spojována s vysokým rizikem celiakie i její agresivnější podobou. U jedinců s homozygotní alelou HLA-DQ2.5 je prokazatelné 5x vyšší riziko rozvoje celiakie než u těch jedinců, kteří jsou pro alelu HLA-DQ2.5 heterozygotní (Megiorni et al., 2012).

U zbylých 5-10 % pacientů, kteří nemají pozitivní DQ2.5 alelu, je nalézán DQ8 heterodimer, který je kódovaný DQB1*03:02 alelou, a to zpravidla v kombinaci s DQA1*03 alelou v cis konfiguraci (DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02). Asi 5 % celiaků, kteří jsou DQ2.5/DQ8 negativní, jsou pozitivní pro formu DQ2.x. Takový haplotyp je spojován jen s nízkým rizikem vzniku celiakie. Haplotyp DQ2.x je sice kódován alelou DQB1*02, které je riziková, ale za nepřítomnosti DQA1*05 alely.

U celiaků jen velice zřídka nalzáme jiné DQ molekuly (Megiorni et al., 2012). Není pravdou, že u všech jedinců nesoucích predisponující alely HLA-DQ2.5 a HLA-DQ8 musí dojít k rozvoji celiakie. To poukazuje na fakt, že HLA genotypy jsou nezbytné, ale nejsou dostačující pro vznik celiakie. Mnoho jiných genetických studií je prokázalo existenci dalších genů, které malou mírou přispívají k rozvoji tohoto onemocnění. K představě, že celiakie je imunitně zprostředkované onemocnění, přispívá fakt, že pro jeho projevy jsou nezbytné právě tyto geny, zapojené v imunitních reakcích (Tjon et al., 2010). V tab. č. 3 je uvedena míra rizikovosti vzniku celiakie vzhledem k jednotlivým HLA-DQ variantám.

tab. č. 3 Rizikové HLA-DQ varianty

HLA status	Disease risk
DQ2.5 and DQ8	Very high
DQ2.5 (with a double dose of DQB1*02)	Very high
DQ8	High
DQ2.5 (with a single dose of DQB1*02)	High
DQ2x (with a double dose of DQB1*02)	High
DQ2x (with a single dose of DQB1*02)	Low
DQX.5	Extremely low
DQX.x	Extremely low

x= DQA1 allels diferent from *05.

X = DQB1 allels different from *02 and *03:02.

(Zdroj: Megiorni, 2012)

1.9 Asociace celiakie s DM I. typu

Celiakie se může vyskytovat současně i s jinými autoimunitními chorobami. Nejvíce popisovaná je její asociace s endokrinními nemocemi jako je například *diabetes mellitus* I. typu (až 8 %).

Uvádí se, že u dětí s DM I. typu je riziko vzniku celiakie 5 až 10krát vyšší než u zdravých jedinců. Toto riziko vyplývá z podobné souvislosti týkající se HLA systému. Protilátky charakteristické pro celiakii jsou nacházeny přibližně u 5-10 % pacientů s diabetem a 75 % z nich vykazuje změněnou sliznici tenkého střeva (Parzanese et al., 2017).

Pokud u pacientů s DM I. typu není proveden screening na přítomnost protilátek proti endomysiu ve třídě IgA, celiakie bývá často nedignostikována. Tito pacienti často mívají atypické příznaky, nicméně i u jedinců, kteří mají typické příznaky, bývá celiakie často přehlížena. Vzhledem k vysokému výskytu celiakie u pacientů s diabetem se doporučuje, aby byl screening celiakie součástí běžného vyšetření. Lékaři by měli prokázat v tomto ohledu zodpovědnost a respektovat sdružení celiakie s diabetem I. typu a nezanedbat řádnou a pravidelnou diagnostiku (Holmes, 2001).

Přechod pacienta s DM I. typu a celiakií na bezlepkovou dietu není jednoduchý. V začátcích je totiž hladina glykémie často nevypočitatelně rozkolísaná. Je tedy na místě, aby se složením stravy pomohl pacientovi odborník. Ale i přes zdařilé zavedení bezlepkové diety většina diabetiků uvádí, že oproti diabetikům, kteří netrpí celiakií mají problém s kolísáním hladiny glykémie a jsou značně omezení a pociťují sníženou kvalitu života (Pham – Short et al., 2016).

2 Cíle práce

2.1 Cíle práce

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo seznámení s problematikou onemocnění a vypracování rešerše na dané téma.

Cílem praktické části bakalářské práce bylo zvládnutí základních metod používaných v genetické laboratoři, jež zahrnovalo odběr materiálu (bukální stěr a periferní krev), následná izolace DNA ze získaného materiálu, PCR reakce a metoda real-time PCR, a nakonec také analýza získaných výsledků a jejich vyhodnocení.

2.2 Hypotézy

Prokázání rizikového genu souvisejícího s celiakií, který se nachází u pacienta, u kterého byl diagnostikován DM I. typu a onemocnění celiakie bylo prokázáno pouze serologickými metodami a biopsií.

Tento vrozený rizikový faktor se vyskytuje i v širší rodině tohoto pacienta. Rodina pacienta byla vyšetřena na predispozice rizikových alel.

3 Praktická část

3.1 Metodika

Vyšetřovaným souborem dat pro mou bakalářskou práci byli členové mojí rodiny. Výchozí materiál jsem od nich získala pomocí stěru z bukální sliznice. Tento odběr byl pro ně neinvazivní a mohla jsem ho provést v pohodlí domova na rozdíl od odběru krve, který proběhl pouze u mě. Získaný materiál jsem od izolace vzorků DNA až po samostatné vyhodnocení prováděla v genetické laboratoři GENLABS, s.r.o. v Českých Budějovicích pod vedením Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D.

3.2 Preanalytická fáze vyšetření

Součástí všech laboratorních vyšetření je samozřejmě i preanalytická fáze. Jsou to postupy, které předcházejí vlastnímu laboratornímu vyšetření vzorku.

Pacienti přichází do genetické laboratoře na základě indikace či doporučení ambulantního specialisty (např. alergolog, onkolog, gynekolog, klinický genetik apod.). Pokud pacient nemá doporučení od specialisty a jedná se pouze o jeho osobní zájem (stává se samoplátcem), je mu navrhována konzultace s lékařem, který má atestaci v oboru klinické genetiky. Tato konzultace by měla probíhat jak před, tak i po provedení laboratorního vyšetření s následným vyhodnocením výsledků.

Každý pacient, který přijde do genetické laboratoře, ať už s vlastním zájmem, či na doporučení lékaře, musí být řádně informován o povaze a důsledku genetického testu a zavazuje se podpisem informovaného souhlasu k provedení odběru materiálu a vlastního genetického vyšetření vzorku.

3.2.1 Odběr materiálu

Periferní krev

Tento druh materiálu je běžně odebírám ze žíly nacházející se v loketní jamce. Odběr probíhá do sterilní zkumavky s protisrážlivým roztokem K₃EDTA. Celý systém odběru funguje jako uzavřený odběrový systém Vacuette, která zajišťuje nejvhodnější poměr periferní krve a protisrážlivého roztoku. Po odběru krve se zkumavka lehce promíchá, aby nedošlo ke sražení. Minimální objem, nutný k laboratornímu vyšetření je

1 ml. Odebraný vzorek se v co nejkratší době odevzdá do laboratoře. Součástí odevzdané zkumavky s periferní krví musí také být řádně vyplněná žádanka a informovaný souhlas s molekulárně genetickým vyšetřením. Pokud není možné krev odevzdat v den odběru, je nitné ji uchovat při chladničkové teplotě do doby, kdy bude možno ji dopravit do laboratoře. Podmínkou molekulárně-genetického vyšetření, kdy bude izolována DNA je maximální stáří krve 1 týden.

Bukální stěr

Aby byla genetická analýza provedena úspěšně, je nezbytné provést stěr tamponem ze sliznice dutiny ústní tak důkladně a dlouho, aby bylo získáno dostatečné množství materiálu k izolaci DNA. K bukálnímu stěru slouží odběrová sada, ve které se nachází speciální sterilní vatová tyčinka uložená ve sterilní (plastové) zkumavce. Adept, kterému je výkon prováděn si nejprve vypláchne dutinu ústní obyčejnou vodou (ne ústní) a pomocí jedné či více vatových tyčinek se provede stěr. Bukální stěr se odebírá ze zadní strany dutiny ústní (vlhká načervenalá tkáň, vystylající dutinu ústní a nacházející se po obou stranách mezi horní a dolní čelistí a vnitřní stranou tváře) pod mírným tlakem po dobu min. 1 minuty. Vatová tyčinka se v průběhu odběru otáčí, aby byly odebrané buňky na co největším jejím povrchu. Po odběru se vatová tyčinka vloží do originální sterilní plastové zkumavky, která je součástí balení a řádně ji uzavře. Je velice důležité, aby se jak odebíraný klient, tak nikdo jiný používané vatové tyčinky nedotýkal, jak před, tak ani po odběru, aby nedošlo ke kontaminaci odebíraného vzorku jiným typem buněk. Stejně jako při odběru krve se odběrová souprava se vzorkem co nejdříve odevzdá s řádně vyplněnou žádankou a informovaným souhlasem s molekulárně-genetickým vyšetřením do příslušné laboratoře, kde bude následně probíhat analýza. Je důležité, aby před odběrem dotyčný nejméně 60 minut nejedl a nepil nic mimo neslazené nápoje a neprováděl ústní hygienu. U takového odběru platí, že ke genetickému vyšetření nesmí být stěr starší více než 48 hodin.

3.3 Analytická fáze

Při analytické fázi dochází k samotnému vyšetření (analýze) vzorku. Toto vyšetření probíhá v souladu s postupy správné laboratorní práce. Také zahrnuje vnitřní a vnější

kontrolu kvality, díky kterým by mělo docházet k minimalizaci chyb analytického procesu.

3.3.1 Izolace nukleových kyselin (DNA)

Pro všechna genetická vyšetření je nezbytná izolace nukleových kyselin z odebraného biologického materiálu. Tato metoda je prováděna z nesrážlivé periferní krve, ze stěru bukální sliznice, kostní dřeně a různých typů jiných tkání a buněk. Pro svůj výzkum jsem použila rutinně odebíraný materiál, kterým jsou stěry z bukální sliznice a odběr periferní krve.

Z bukálního stěru

K laboratorní genetické analýze byla použita DNA z bukálního stěru, který byl proveden pomocí odběrové soupravy Isohelix. Samotná izolace nukleové kyseliny z bukálního stěru byla provedena pomocí kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV Mini (GeneAll). Tato metoda je velice jednoduchá a rychlá pro izolaci jakékoliv DNA (genomové, bakteriální virové, mitochondriální i parazitické). Postup probíhal podle manuálu určeného výrobcem, Reagencie, které byly během izolace použity jsou uvedeny i s objemy v tab. č. 4.

tab. č. 4: Reagencie s objemy

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

Před začátkem samotné izolace je zapotřebí, aby proběhly malé přípravy, jako je řádné označení zkumavek laboratorním informačním číslem (LIČ), předeřtátí suché lázně na 56 °C (TDB-120, Dry block thermostat, bioSan) a nakonec vyjmutí proteinázy K z mrazícího boxu, aby došlo k zahřtátí na pokojovou teplotu (RT).

Následně už probíhal samotný proces izolace nukleových kyselin. Do té samé zkumavky, ve které se nachází tampon bukalního stěru (DNA Buccal Swabs SK-2S) se napipetovalo 40 µl PK o celkové koncentraci 20 mg/ml a 400 µl PBS pufru a 400 µl BL pufru. K tomu, aby byla směs řádně promíchána byl použit vortex (vortex Microspin V-2400, bioSan). Následně se zkumavka se směsí vložila do již předeřtáté suché lázně, vyhřtáté na 56 °C na dobu 10 minut. V tomto kroku zlyzovaly buňky a v DNA extraktu došlo ke zbavení proteinů. Po uplynutí inkubační doby se daly zkumavky stočit do stolní centrifugy (Centrifuge Eppendorf 4521R), protože bylo nezbytné odstranění kapek z vnitřní strany víčka zkumavky. Ke stočené směsi bylo v dalším kroku přidáno 400 µl 100% ethanolu a směs byla znovu zvortexována. Poté následovalo opět krátké stočení ve stolní centrifuze. Jako další bod izolace DNA bylo přenesení směsi na řádně označenou kolonku, kdy přenos probíhal ve dvou krocích. Dále byla směs stočena v centrifuze při 8 200 rpm po dobu 1 minuty. Po stočení následovalo odstranění supernatantu společně se sběrnou zkumavkou a tato zkumavka byla nahrazena novou, do které byla vložena kolonka s navázanou DNA. Poté následovalo napipetování 600 µl BW pufru a 700 µl TW pufru na kolonku. Zkumavka se dala znovu stočit při 8 200 rpm na dobu 1 minuty. Dále byl supernatant dekantován ze sběrné zkumavky a kolonka se vrátila zpět do stejné sběrné zkumavky, ze které byla vyjmuta. Po tomto kroku byla zkumavka opět stočena, tentokrát už nasucho, aby došlo k odstranění promývacího pufru (13 000 rpm, 1 minuta).

Nyní byla vzata a pečlivě popsána nová mikrozukumavka LIČ příslušného pacienta a do ní byla vložena stočená kolonka s naadsorbovanou DNA. Přímo doprostřed kolonky bylo přidáno 50 µl AE pufru a vzorek byl v této fázi izolace inkubován 5 minut při pokojové teplotě (RT). Po uplynutí inkubační doby se zkumavka s kolonkou dala stočit při nejvyšších otáčkách (13 000 rpm) na 1 minutu. Po stočení se přefiltrovaný supernatant napipetoval zpět na kolonku a po 5 minutách inkubace při RT se opakovala centrifugace. V posledním kroku postupu byla u všech vzorků změřena koncentrace

vyizolované DNA. Měření probíhalo na fluorometru (Qubit Fluorometr 2.0, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific).

Výsledky měření koncentrace byly pečlivě zapsány a takto odizolovaná DNA se uschovala v mrazícím boxu při -20 °C nebo byla ihned zpracována.

DNA vyizolovaná pomocí tohoto kitu má vysokou čistotu (1,8 ~ 2,0) a má konzistentní výtěžnost. Dále je také výhodná v tom, že ji lze okamžitě použít například k PCR, genotypingu či Southern blottingu.

Z periferní krve

Izolace genomové DNA z plné krve byla prováděna pomocí kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV Mini. Postup probíhal podle manuálu určeného výrobcem, Reagencie, které byly během izolace použity jsou uvedeny i s objemy v tab. č. 5.

tab. č. 5: Reagencie s objemy

REAGENCIE	OBJEMY (μl)
Proteináza K	20
BL buffer	200
BW buffer	600
TW buffer	700
AE buffer	50

Před zahájením samotné izolace je zapotřebí, aby proběhly malé přípravy, jako je řádné označení zkumavek laboratorním informačním číslem (LIČ), předeřtí suché lázně na 56 °C (TDB-120, Dry block thermostat, bioSan) a nakonec vyjmutí proteinázy K z mrazícího boxu, aby došlo k zahřátí na pokojovou teplotu (RT).

Následně už probíhal samotný proces izolace nukleových kyselin. Do čisté 1,5 μl mikrozkušky bylo napipetováno 20 μl proteinázy K, která už byla zahřátá na pokojovou teplotu. K tomuto roztoku bylo přidáno 200 μl vzorku a 200 μl BL bufferu. Následně proběhlo důkladné promíchání pomocí vortexu. Mikrozkuška byla po

promíchání vložena do předem připravené suché lázně, kde probíhala inkubace po dobu 10 ti minut. V době inkubace probíhaly další přípravy, a to příprava kolonky, která je potřeba v dalších krocích. Po uplynutí inkubační doby bylo potřeba mikrozkušavku krátce stočit, aby došlo k odstranění kapek z vnitřní strany víčka. Dále bylo přidáno 200 μ l 100% ethanolu a mikrozkušavka byla v pulzech zvortexována a opět krátce stočena, aby došlo k důkladnému promíchání. Následně probíhal přenos směsi na předem připravenou kolonku. Po přenesení bylo zapotřebí kolonku se směsí centrifugovat po dobu 1 minuty při 8 200 rpm. Během centrifugace byla připravena nová sběrná zkušavka. Po stočení a výměně sběrných zkušavek bylo ke směsi přidáno 600 μ l BW bufferu. Postup centrifugace a náhrady sběrných zkušavek se znovu opakoval. Následně bylo k roztoku přidáno 700 μ l TW bufferu a směs byla centrifugována stejně tak, jako v předchozích krocích. Vzniklý supernatant byl ze sběrné zkušavky odstraněn a kolonka byla zpět vrácena do té samé sběrné zkušavky. Aby došlo k odstranění zbytkového promývacího roztoku, bylo nutné mikrozkušavku zcentrifugovat při nejvyšších otáčkách v čase jedné minuty. V době centrifugace byla připravena nová 1,5 μ l mikrozkušavka s víčkem, která byla řádně popsána a po skončení centrifugace do ní byla vložena kolonka. Přímou na střed kolonky bylo přidáno 50 μ l AE bufferu a mikrozkušavka s kolonkou se nechala inkubovat 5 minut při pokojové teplotě. Po skončení inkubační doby bylo znovu přidáno 50 μ l AE bufferu a znovu proběhla inkubace. V dalším, předposledním kroku se mikrozkušavka stočila při nejvyšších otáčkách po dobu jedné minuty. Poslední krok celého postupu směřuje k změření vyizolované DNA.

3.3.2 Měření koncentrace DNA

Poté co byla provedena izolace DNA bylo zapotřebí zjistit její koncentraci. Ta se vyjadřuje v jednotkách ng/ μ l. Pro PCR reakci, která bude dále následovat je ideální hodnota koncentrace DNA v rozmezí od 50-100 ng/ μ l.

Aby bylo možné změřit koncentraci izolované DNA pomocí fluorometru (Quibit Fluorometr 2.0, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific), bylo zapotřebí použít kit AccuGreenTM Broad Range dsDNA Quantitation Solution (Biotum). Tento kit je

navrhnut právě pro ruční fluorometr Qubit od firmy Thermo Fisher. Pro měření bylo také nutné použití kvantifikačního roztoku AccuGreen™, který je specifický pro stanovení koncentrace dsDNA a může stanovovat vzorky DNA v rozmezí od 0,2 do 100 ng/μl. Pro změření koncentrace DNA bylo zapotřebí použití dvou standardů.

Nejprve bylo nutné vytemperování kvantifikačního roztoku AccuGreen™ Solution na pokojovou teplotu, a proto byl vyndán z lednice. Do předpřipravené 0,5 ml mikrozkušavky (Qubit Assay Tubes, Invitrogen) pro standard, která byla řádně popsána, bylo napipetováno 190 μl kvantifikačního roztoku (Quantitation Solution AccuGreen™, Biotum). Dalším krokem bylo napipetování 10 μl AccuGreen™ Standard 1 (0 ng/μl) do jedné a 10 μl AccuGreen™ Standard 2 (100 ng/μl) do druhé zkumavky určené pro standard. Do mikrozkušavek, kde se nacházel vzorek bylo přidáno 195 μl kvantifikačního roztoku a 5 μl odizolované DNA. Všechny zkumavky bylo potřeba krátce zvortexovat, stočit a po dobu alespoň dvou minut nechat inkubovat při RT. Poté následovalo samotné měření koncentrace DNA, kdy jako první bylo zapotřebí změřit standard 1, poté standard 2 a nakonec koncentrace všech vzorků. Naměřené hodnoty byly pečlivě zaznamenány.

3.3.3 Real-time PCR (q-PCR)

Tato metoda pro genotypizaci rizikových HLA alel je založená na amplifikaci (namnožená) určitého sledovaného úseku DNA v reálném čase na rozdíl od běžné PCR reakce. Do procesu této metody jsou použity fluorescenčně značené sondy. Ty jsou k reakci proto, aby se navázaly na amplifikovaný úsek DNA. V přístroji, ve kterém real-time reakce probíhá je optické zařízení, které slouží ke snímání intenzity tohoto fluorescenčního záření v reálném čase. Výhodou této metody však je, že výsledný produkt reakce už není potřeba analyzovat pomocí gelové elektroforézy.

Příprava real-time PCR reakce

K tomu, aby mohla správně proběhnout PCR reakce, v přístroji pro real-time PCR (Light Cycler 2.0, Roche), při které dochází k amplifikaci konkrétního lokusu DNA, bylo potřeba přichystat náležité prostředí pro izolovanou DNA. Toto prostředí zajišťují

tzv. master mixy, které právě poskytují vhodné podmínky potřebné k namnožení DNA. Pro metodu real-time PCR (q-PCR) byly použity komerčně vyrobené kity.

Pro uskutečnění metody byl použit kit EliGene[®] Coeliac RT (DQ2, DQ8, DR4) (Elisabeth Pharmacon, s. r. o.). Tento kit slouží ke genotypizaci HLA-DQ2, HLA-DQ8 a HLA-DR4 genů z izolátu DNA. Aby mohly být alely těchto genů a vnitřní kontroly detekovány, bylo zapotřebí použít značené sondy (FAM a JOE) a primery. Pomocí soupravy EliGene[®] Coeliac RT je možné detekovat alely HLA-DQ2 (DQA1* 05, DQB1* 02), HLA-DR4 (DRB1* 04) a HLA-DQ8 (DQA1* 03, DQB1* 03:02). Pro správný průběh reakce je důležité, aby byla použita také vnitřní kontrola. Při této reakci byla jako kontrola použit lidský gen SYPL2 (synaptophysin-like 2), který se nachází v každé lidské DNA, a tudíž již nebylo potřeba ho dále přidávat k vzorkům.

Pro detekci alel DQA1* 05, DRB1* 04 a DQB1* 03:02 byla podle manuálu EliGene[®] Coeliac RT použita sonda FAM barvou (exc. 494 nm – em. 518 nm) a pro detekci DQA1* 03, DQB1* 02 a SYPL2 (vnitřní kontrola) alel sonda značená JOE barvou (exc. 520 nm – em. 548 nm). Komerčně dodávaný master mix také obsahuje referenční barvu ROX (pasivní), která slouží pro normalizaci signálu.

Kit EliGene[®] Coeliac RT (DQ2, DQ8, DR4) obsahuje již předmíchané master mixy. V těch se nachází všechny potřebné roztoky, včetně primerů a DNA polymerázy. Master mixy CELI-DQ8, CELI-DQ2 a CELI-DR4, které se nacházely v mrazícím boxu byly předem vyjmuty a přeneseny do laminárního boxu, který byl již dekontaminovaný a připravený k práci. Zde byly master mixy uchovány na ledu, aby se snížilo riziko kontaminace reakčních směsí. Do tohoto boxu byl také vložen namražený blok, který obsahoval hliníkové adaptéry (LightCycler[®] Centrifuge Adapters, Roche Life Science). Do těchto adaptéřů byly pinzetou opatrně vloženy speciální kapiláry (objem 20 µl). Poté co se master mixy rozmrazily byly krátce zvortexována a stočeny. Následně probíhalo pipetování 17,5 µl master mixu do tří sad (tzn. DQ2, DQ8 a DR4) detekčních kapilár. Dále bylo do dalších třech kapilár napipetováno také 17,5 µl master mixu, ty sloužili jako pozitivní kontrola a další tři kapiláry sloužily jako negativní kontrola. I do těch bylo přidáno 17,5 µl master mixu.

V dalším kroku bylo do prvních třech detekčních kapilár (DQ2, DQ8 a DR4) přidáno 2,5 µl izolované DNA. Do kapilár, které sloužily jako pozitivní kontrola

se přidala kontrolní DNA (PC CELI) a do negativní kontroly byla napipetována H₂O (Aqua pro Injectione). Následně proběhlo krátké stočení kapilár v centrifuze, do které se kapiláry vložily i s hliníkovými obaly, aby nedošlo k jejich poškození. Poté již následoval poslední krok přípravy reakce real-time PCR. Kapiláry se vsunuly do specifického pro tento typ cycleru (LightCycler[®] 2.0, Roche Life Science) a došlo k navolení a spuštění odpovídajícího reakčního protokolu.

Real-time PCR

Poté co bylo pečlivě provedeno napipetování master mixů a izolované DNA byly kapiláry vloženy do cycleru a byl zvolen odpovídající reakční protokol. Parametry amplifikace shrnuje tab. č. 6.

tab. č. 6: Parametry amplifikace

FÁZE	POČET CYKLŮ	TEPLOTA (°C)	ČAS
Udržovací	1	95	3 minuty
Cyklovací	40	95 61 (extenze s annealingem)	15 sekund 40 sekund

Ihned po dokončení programu proběhla specifická úprava (barevná kompenzace apod.) a analýza dat. Následně byla pak možná i interpretace získaných výsledků. V případě pozitivního výsledku došlo v kanálu FAM (510-528) i JOE (530-548) k amplifikaci a nárůstu signálu. Naopak v případě negativního výsledku k amplifikaci vůbec nedošlo. Bereme-li v potaz pozitivní kontroly, zde byl patrný významný nárůst signálu v kanále JOE i FAM. Tím bylo potvrzeno, že reakce proběhla správně. Na druhou stranu u negativní kontroly k nárůstu signálu nedošlo, a díky tomu bylo jasné, že vzorky nebyly při přípravě kontaminované. V tab. č. 7 jsou znázorněné potencionální výsledky testu.

tab. č. 7: Potencionální výsledky testu

Genotyp	CELI-DQ2 Mix		CELI-DR4 Mix		CELI-DQ8 Mix	
	FAM DQA1* 05 (DQ2)	JOE DQB1* 02 (DQ2)	FAM DRB1* 04 (DRB)	JOE IC (vnitřní kontrola)	FAM DQB1* 03:02 (DQ8)	JOE DQA1* 03 (DQ8)
DQ2	-	+	+	+	-	+
DQ 2.5	+	+	-	+	-	-
DQ8	+	-	-	+	+	+
DQ8	-	+	-	+	+	+
DQ8	-	-	+	+	+	+
DRB4	+	-	+	+	-	+
DRB4	-	+	+	+	-	+
DRB4	-	-	+	+	-	-
DQ2/DQ8	+	+	-	+	+	+
DQX.5	+	-	-	+	-	-
negativní	-	-	-	+	-	-
DQ 2.x	-	+	-	+	-	-

4 Výsledky

tab. č. 8: Výsledky real-time PCR reakce

Číslo vzorku	DQA1* 05 (DQ2)	DQB1* 02 (DQ2)	DRB1* 04 (DRB)	Vnitřní kontrola	DQB1* 03:02 (DQ8)	DQA1* 03 (DQ8)	c DNA (ng/μl)	Výsledek
1	-	-	+	+	+	+	9,84	DQ8
2	+	+	+	+	-	+	7,28	DQ2.5
3	-	+	+	+	-	+	0,96*	DQ2
4	-	-	+	+	+	+	2,86	DQ8
5	-	+	+	+	-	+	30	DQ2
6	+	-	-	+	-	-	4,96	DQx.5
7	+	+	+	+	-	+	4,86	DQ2.5
8	+	-	+	+	+	+	12,9	DQ8
9	-	-	+	+	+	+	8,19	DQ8
10	-	-	+	+	+	+	16,9	DQ8
11	-	-	+	+	-	+	20,9	Neg.
12	+	-	-	+	-	-	8,6	DQx.5

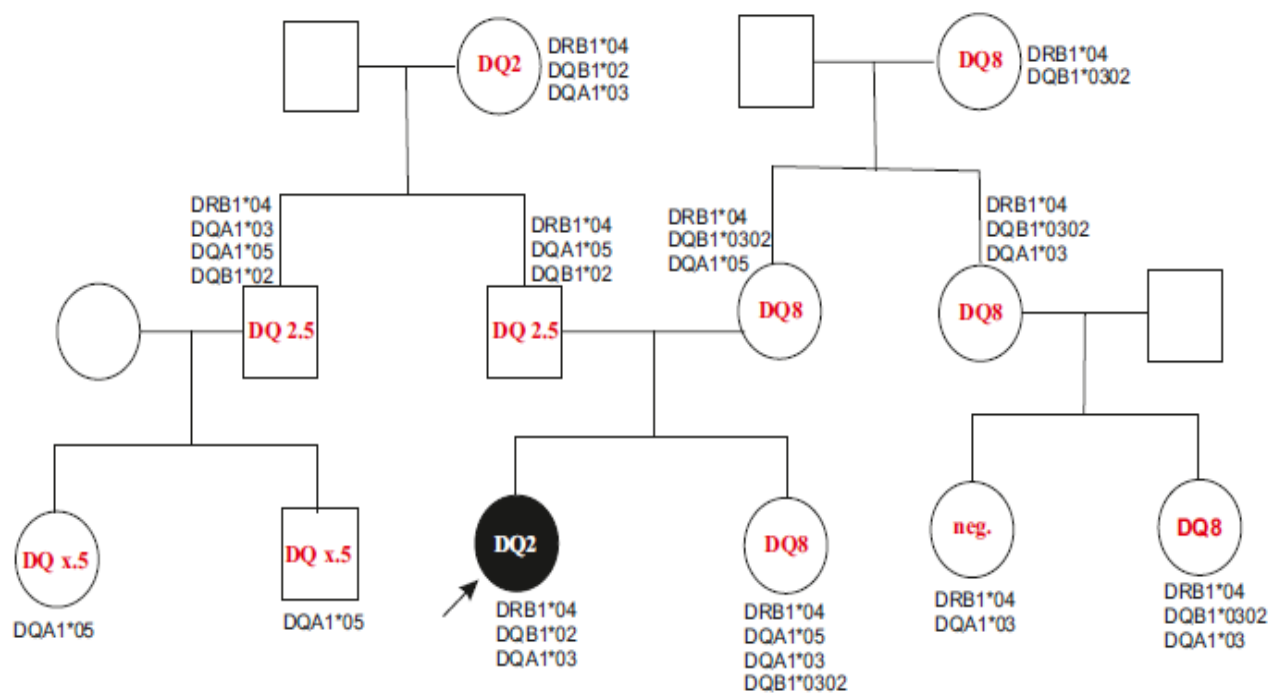
*koncentrace DNA je pod 1 ng/μl

Zastoupení jednotlivých alel v laboratoři GENLABS od roku 2014 z celkového počtu 270 pacientů, ze kterých bylo 123 vzorků pozitivních (viz tab. č. 9), 45 vzorků bylo detekováno jako haplotyp DQx.5 a 48 pacientů vykazovalo haplotyp DQX.x. Oba tyto haplotypy mají velice nízké riziko vzniku celiakie, a proto nejsou považovány za pozitivní.

tab. č. 9: Zjištěné zastoupení haplotypů celiakie

Rizikové alely	Počet pacientů	Procentuální zastoupení
DQ8	24	19,5 %
DQ2	26	21,1 %
DQ2.5	49	39,8 %
DQ2.x	16	13 %
DQ2.5/DQ2	3	0,024 %
DQ2.5/DQ8	3	0,024 %
DQ2/DQ8	1	0,008 %
DQ2/DQ7	1	0,008 %

Získané výsledky byly vyšetřovány pomocí metody real-time PCR pomocí kitu EliGene[®] Coeliac RT (DQ2, DQ8, DR4) (Elisabeth Pharmacon, s. r. o.) a dále byli vyhodnoceni. Ze získaných dat, lze vyčíst, že z celkového počtu 12ti vzorků byly u 11 detekovány rizikové haplotypy, pouze v jednom případě vyšel výsledek negativní. V tab. č. 8 můžeme vidět jednotlivé vyhodnocení vzorků, které lze odečíst i z rodokmenu vyšetřované rodiny (viz Obrázek 4). Z 11 pozitivních vzorků bylo největší zastoupení rizikového haplotypu DQ8, a to v pěti případech, u dvou vzorků byl a zjištěn haplotyp DQ2, v dalších dvou případech byl detekován haplotyp DQ2.5 a pokud se jedná o poslední dva vzorky, zde byl zjištěn haplotyp DQx.5, který se vyznačuje velice nízkým rizikem vzniku celiakie.



Obrázek 4: Rodokmen vyšetřované rodiny (vlastní zdroj)

5 Diskuse

Celiakie je onemocnění definované jako nesnášenlivost lepku a řadí se mezi autoimunitní onemocnění. Celiakie se projevuje zejména postižením sliznice tenkého střeva. Spouštěčem autoimunitní reakce proti buňkám tenkého střeva (enterocytům) je lepek, resp. peptidické štěpy, které jsou obsažené v různé míře v bílkovinách žita, ječmene, pšenice a částečně také ovsa. Nejvýznamnější rizikové faktory pro onemocnění celiakie jsou haplotypy HLA-DQ2 a HLA-DQ8, ačkoliv ale nemohou nikdy samostatně sloužit jako diagnostický prvek. Teprve kombinace genetických a sérologických testů může potvrdit nebo vyloučit diagnózu celiakie (Fasano et al., 2001).

Nedávné studie prokazují, že 41 % dospělých a až 60 % dětí jsou sice diagnostikováni, ale zcela bez příznaků. Proto je důležitý screening celiakie, díky kterému je možné zjistit potencionální riziko vzniku onemocnění v okruhu příbuzných pacienta nebo se týká pacientů, kteří trpí asociovanými chorobami. V tomto případě se jedná nejvíce o onemocnění *diabetes mellitus* I. typu. Zde je známá prevalence i 3–10 %. Příčiny asociace těchto dvou onemocnění nejsou zcela objasněny, nicméně životní podmínky pacienta s diabetem mohou stimulovat rozvoj celiakie, stejně jako ji může vyvolat genetická predispozice (Gujral, 2012).

Hlavním cílem mé bakalářské práce bylo vyšetření genetických predispozic pro celiakii v mé rodině, kdy já sama trpím jak celiakií, jako přidruženým onemocněním k *diabetu mellitu* I. typu. *Diabetes mellitus* 1. typu mi byl diagnostikován v 9 letech (2007), po střevním onemocnění, kdy jsem upadla do ketoacidózy. Po dalších asi 10 měsících dekompenzovaného diabetu mi byla po souboru vyšetření biochemicky, pomocí protilátek, prokázána alergie na lepek a následně po biopsii tenkého střeva určena diagnóza celiakie. Určení celiakie trvalo velice dlouho, kvůli nejasným příznakům. Jediným příznakem byly právě dlouhodobě nesrovnatelné hodnoty glukózy, které se nesnižovaly ani po vysokých dávkách inzulínu.

Předpoklad, že se celiakie vyskytuje jako přidružené onemocnění diabetu se v mém případě potvrdil. Tento předpoklad je dán geneticky. Vrozené rizikové faktory, které jsou spojeny s celiakií se nazývají HLA-DQ2 a HLA-DQ8, a právě genetické vyšetření je jedinou cestou, jak lze jejich přítomnost prokázat. Protože se jedná o dědičné faktory,

je důležité vyšetřit také sourozence, rodiče a popřípadě děti pacientů. Pokud se u některých z nich celiakie potvrdí, měli by vyšetřením dále projít prarodiče nemocného, jeho strýcové a tety. V mojí bakalářské práci byli kromě již zmíněných příbuzných vyšetřeny také sestřenice a bratranec.

Pro vyšetřovaný soubor 12 ti vzorků byla zvolena metoda real-time PCR, která je velice citlivá. Výhodou této metody je možnost vyšetření vzorků s velice nízkou koncentrací DNA (od 1 ng/μl). V případě mojí praktické práce byla pouze jedna koncentrace pod 1 ng/μl (vzorek číslo 3), přesto se podařilo tento vzorek analyzovat a výsledek testu bylo možno odečíst. Genetické vyšetření prokázalo přítomnost rizikových alel, které se vyskytují u všech členů mé blízké i širší rodiny, kromě jednoho. Zastoupení rizikových genotypů znázorňuje rodokmen na Obrázek 4, ze kterého taktéž vyplývá, že tyto rizikové alely se v rodině dědí už po 3 generace a jsou přítomny v obou větvích rodiny.

Z výsledků lze vyčíst, že nejčastěji zastoupený haplotyp je v mé rodině haplotyp DQ8, a to u 5 vzorků – ze 12 (42 %), a který v porovnání s ostatními vyšetřeními v laboratoři GENLABS tak častý není (pouze 19,5 %). Z odborných publikací vyplývá, že tento haplotyp je spíše vzácný (asi 8 %) v porovnání s rizikovými haplotypy typu DQ2 (>90 %) (Vraná, 2017). V mé rodině se také dvakrát objevil haplotyp DQ2.5, který se u celiaků vyskytuje vůbec nejčastěji a stejně tak byl prokázán u nejvyššího počtu testovaných jedinců v laboratoři. Druhým nejčastěji detekovaným haplotypem byl ve sledovaném období v laboratoři haplotyp DQ2, který se v mé rodině vyskytl celkem dvakrát. Dva rodinní příslušníci měli haplotyp DQx.5, který přináší jen velmi malé riziko pro vznik tohoto onemocnění a v laboratoři se od roku 2014 objevilo pouze 45 jedinců (z 270 vyšetřovaných), představujících 16,6 %. Pouze jeden vzorek z mého souboru byl vyhodnocen jako negativní, v tomto jediném případě výsledek diagnózu celiakie s vysokou pravděpodobností vylučuje.

Zajímavé je, že nikdo z příbuzných, kterým byly detekovány rizikové haplotypy netrpí žádným z příznaků celiakie či DM I. typu jako já.

Asociace celiakie s DM I. typu se podle statistik z posledních let stává čím dál víc častějším problémem a počet nově nemocných celiakií stoupá. Jak v případě diabetu, tak v případě celiakie se jedná o autoimunitní onemocnění a přičemž jeho nástup nelze

témeř ovlivnit. Důležitá je včasná diagnostika a zavedení vhodné dietní léčby, kterou je důležité důsledně dodržovat. Pevné dodržování léčby je důležitým faktorem, který ovlivňuje jak samotný průběh onemocnění, tak úzce souvisí s prognózou a je prevencí před chronickými komplikacemi, které jsou v případě obou onemocnění velice vážné.

Z výsledků této studie vyplývá že hypotéza č. 1, týkající se průkazu vrozeného rizikového faktoru souvisejícího s celiakií u pacienta s diagnózou DM I. typu a celiakie, je pravdivá. Pokud se jedná o hypotézu č. 2, předpokládající výskyt vrozených rizikových faktorů pro celiakii v širší rodině pacienta s celiakií, potvrdila se její pravdivost až ne jeden případ, mé sestřenice, kdy byl výsledek testu negativní. Ačkoli je nutno dodat, že přítomnost rizikového haplotypu nelze samostatně interpretovat jako potvrzení celiakie, vzhledem k jeho nízké specifitě pro tuto diagnózu a pro její potvrzení je nutné doplnit toho vyšetření a sérologické testy.

Vyšetření mé rodiny přineslo zajímavé výsledky. Ostatní členové rodiny neprodělali virové onemocnění, popř. stres, po kterém by následovalo rozvinutí onemocnění, což poukazuje na ovlivnění těchto dvou chorob i environmentálními faktory, pouze genetické predispozice nestačí.

6 Závěr

Teoretickou část této bakalářské práce jsem věnovala shrnutím poznatků o celiakii, diabetu, HLA systému a genetické provázanosti obou onemocnění. V praktické části jsem si osvojila správnou laboratorní praxi v genetické laboratoři. Absolvovala jsem proces vyšetření od odběru vzorků až po interpretaci výsledků. Úvod praktické části jsem věnovala preanalytické fázi vyšetření, kde jsem se zabývala odběrem materiálu. V další části praktické práce jsem popisovala analytickou fázi, kde jsem vysvětlila princip metody real-time PCR a popsala postup této metody, která byla prováděna pomocí komerčně dodávaného kitu EliGene[®] Coeliac RT (DQ2, DQ8, DR4) (Elisabeth Pharmacon, s. r. o.) v přístroji Light Cycler 2.0 (Roche). Součástí praktické části byla analýza získaných výsledků. Následně v diskusi byla tato data náležitě prodiskutována a porovnána s ostatními výsledky, které získala genetická laboratoř v průběhu několika let.

V závislosti na získaných datech, lze potvrdit obě stanovené hypotézy. Bylo potvrzeno, že rizikové faktory pro vznik celiakie vyšetřované genetickou metodou real-time PCR se vyskytují nejen u mě samotné, ale i v širší rodině. Nejčastěji byl v souboru 12 vzorků zastoupený haplotyp jindy poměrně vzácný haplotyp DQ8, haplotypy DQ2, DQ2.5, DQx.5 měly zastoupení stejné a byly detekovány vždy u dvou vzorků. Kromě přítomnosti alel DQx.5, představující dle dostupných odborných prací jen velmi nízké riziko rozvoje celiakie, a jednoho vzorku, vyhodnoceného jako negativní, mají všichni ostatní příbuzní potenciální riziko vzniku onemocnění celiakie.

7 Seznam použité literatury

1. ABDULKARIM, A. S. a J. A. MURRAY, 2003. The diagnosis of coeliac disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. **17**(8), 987-995. DOI: 10.1046/j.1365-2036.2003.01442.x. ISSN 0269-2813. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2036.2003.01442.x>
2. ANTIGA, Emiliano a Marzia CAPRONI, 2015. The diagnosis and treatment of dermatitis herpetiformis. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* [online]. (8), 257-5-265 [cit. 2019-03-11]. 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>
3. BARTÁŠKOVÁ, Dagmar a Olga MENGEROVÁ, c2008. *Cukrovka: dieta a rady lékaře*. Čestlice: Medica Publishing. Dieta (Medica Publishing). ISBN 978-80-85936-60-5.
4. BĚLOBRÁDKOVÁ, Jana a Ludmila BRÁZDOVÁ, 2006. *Diabetes mellitus*. V Brně: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů. ISBN 80-7013-446-1.
5. BRDIČKA, Radim a William DIDDEN, 2018. *Genetika v klinické praxi*. Praha: Galén. ISBN 9788074921063.
6. CERNA, M., P. NOVOTA, K. KOLOSTOVA, et al., 2003. HLA in Czech adult patients with autoimmune diabetes mellitus: comparison with Czech children with type 1 diabetes and patients with type 2 diabetes. *European Journal of Immunogenetics*. **30**(6), 401-407. DOI: 10.1111/j.1365-2370.2003.00424.x. ISSN 0960-7420. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2370.2003.00424.x>
7. CINEK, Ondrej, Stanislava KOLOUSKOVA, Marta SNAJDEROVA, Zdenek SUMNIK, P SEDLAKOVA, Pavel DREVINEK, Jan VAVRINEC a Kjersti S RONNINGEN, 2001. HLA class II genetic association of type 1 diabetes mellitus in Czech children. *Pediatric Diabetes* [online]. **2**(3), 98-102 [cit. 2018-12-14]. DOI: 10.1034/j.1399-5448.2001.002003098.x. ISSN 1399-543X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-5448.2001.002003098.x>
8. ČERVENKOVÁ, Renata, c2006. *Celiakie*. Praha: Galén. ISBN 80-7262-425-3.
9. DOBROVOLNÁ, Marie, Milena VRANÁ a Dyr, Jan EVANGELISTA, 2015. Polymorfismus hlavního histokompatibilního systému člověka: funkce – indikace – detekce – interpretace. *Chemické listy* [online]. **109**(1), 45-50 [cit. 2019-02-21]. Dostupné z: <https://www.medvik.cz/bmc/view.do?gid=1077558>
10. ENSARI, A., 2010. Gluten-sensitive enteropathy (celiac disease): controversies in diagnosis and classification. *Arch Pathol Lab Med* [online]. **2010**(6), 826-836 [cit. 2019-01-23]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20524861>

11. FASANO, Alessio a Carlo CATASSI, 2001. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology*. **120**(3), 636-651. DOI: 10.1053/gast.2001.22123. ISSN 00165085. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508501251877>
12. FRICĚ, DRSC a doc. MUDr. Radan KEIL, PH.D., 2011. Celiakie pro praxi. *Med. praxi* 2 [online]. **9**(8) [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/med/2011/09/03.pdf>
13. FRICĚ, DRSC, prof. MUDr. Přemysl a Ing. Iva Bušinová BUŠINOVÁ, 2008. Celiakie - pohledy z druhé strany. *Interní Med.* [online]. **10**(10), 482-484 [cit. 2019-02-11]. Dostupné z: https://www.internimediceina.cz/artkey/int-200810-0012_Celiakie-pohledy_z_druhe_strany.php
14. FRICĚ, Přemysl a Olga MENGEROVÁ, c2008. *Celiakie: bezlepková dieta a rady lékaře*. Čestlice: Medica Publishing. Dieta (Medica Publishing). ISBN 978-80-85936-62-9.
15. GUJRAL, Naiyana, 2012. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World Journal of Gastroenterology* [online]. **18**(42) [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.3748/wjg.v18.i42.6036. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v18/i42/6036.htm>
16. HALUZÍK, Martin, 2008. *Trendy soudobé diabetologie*. Praha: Nakladatelství Galén. ISBN 978-80-7262-549-9.
17. HEŘMANOVÁ, Eva, 2012. *Koncepty, teorie a měření kvality života*. Praha: Sociologické nakladatelství (SLON). Studijní texty (Sociologické nakladatelství). ISBN 978-80-7419-106-0.
18. HOLMES, G.K., 2001. Coeliac disease and Type 1 diabetes mellitus - the case for screening. *Diabet Med.* [online]. **3**(18), 169-177 [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11318836>
19. HOŘEJŠÍ, Václav, 2013. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-713-2.
20. JIRKOVSKÁ, Alexandra, 2014. *Jak (si) kontrolovat a zvládat diabetes: manuál pro edukaci diabetiků*. Praha: Mladá fronta. Lékař a pacient. ISBN 9788020432469.
21. KLENER, Pavel, c2006. *Vnitřní lékařství*. 3., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 807262430x.
22. KOHOUT, Pavel, 2006. Diagnostika a léčba celiakie: The diagnosis and treatment of celiac disease. *Interní medicína pro praxi*. **8**(7-8), 324-326. ISSN 1212-7299.
23. KOHOUT, Pavel a Jaroslava PAVLÍČKOVÁ, 2010. *Celiakie: víte si rady s bezlepkovou dietou?*. Praha: Forsapi. Rady lékaře, průvodce dietou. ISBN 978-80-87250-09-9.

24. KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ, 2004. *Klinická imunologie*. Hradec Králové: Nucleus HK. ISBN 80-86225-50-x.
25. LEBL, Jan, Štěpánka PRŮHOVÁ a Zdeněk ŠUMNÍK, 2015. *Abeceda diabetu: příručka pro děti a mladé dospělé, kteří chtějí o diabetu vědět víc*. 4. přeprac. a rozšíř. vyd. Praha: MAXDORF. ISBN 978-80-7345-438-8.
26. LUKÁŠ, Karel a Aleš ŽÁK, 2007. *Gastroenterologie a hepatologie: učebnice*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-1787-6.
27. MALÍČKOVÁ, MUDr. Karin, RNDr. Ivana JANATKOVÁ, Ing. Petra ŠANDOVÁ a prof. MUDr. Terezie FUČÍKOVÁ, DRSC., 2005. Imunologická laboratorní vyšetření při podezření na celiakii. *Interní Med.* [online]. **10**(7), 440-443 [cit. 2019-02-12]. Dostupné z: https://www.internimedicina.cz/artkey/int-200510-0006_Imunologicka_laboratorni_vysetreni_pri_podezreni_na_celiakii.php
28. MARSH, Michael N., 1992. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. *Gastroenterology*. **102**(1), 330-354. DOI: 10.1016/0016-5085(92)91819-P. ISSN 00165085. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001650859291819P>
29. MATZARAKI, Vasiliki, Vinod KUMAR, Cisca WIJMENGA a Alexandra ZHERNAKOVA, 2017. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biology*. **18**(1). DOI: 10.1186/s13059-017-1207-1. ISSN 1474-760X. Dostupné také z: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-017-1207-1>
30. MEDRANO, Luz María, Bárbara DEMA, Arturo LÓPEZ-LARIOS, et al., 2012. HLA and Celiac Disease Susceptibility: New Genetic Factors Bring Open Questions about the HLA Influence and Gene-Dosage Effects. *PLoS ONE* [online]. **7**(10) [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1371/journal.pone.0048403. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0048403>
31. MEGIORNI, Francesca a Antonio PIZZUTI, 2012. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *Journal of Biomedical Science*. **19**(1), 88. DOI: 10.1186/1423-0127-19-88. ISSN 1423-0127. Dostupné také z: <http://www.jbiomedsci.com/content/19/1/88>
32. NICHOLSON, Wanda, Shari BOLEN, Catherine Takacs WITKOP, Donna NEALE, Lisa WILSON a Eric BASS, 2009. Benefits and Risks of Oral Diabetes Agents Compared With Insulin in Women With Gestational Diabetes. *Obstetrics & Gynecology* [online]. **113**(1), 193-205 [cit. 2018-12-14]. DOI: 10.1097/AOG.0b013e318190a459. ISSN 0029-7844. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00006250-200901000-00027>
33. OTTO-BUCZKOWSKA, Ewa a Natalia JAINTA, 2017. Pharmacological Treatment in Diabetes Mellitus Type 1 – Insulin and What Else?. *International Journal of Endocrinology and Metabolism* [online]. **16**(1), 1 [cit. 2019-02-15]. DOI: 10.5812/ijem.13008. ISSN 1726-913X. Dostupné z: <http://endometabol.com/en/articles/13008.html>

34. PACOVSKÝ, Vladimír, 1993. *Vnitřní lékařství: [učebnice pro střední zdravotnické školy]*. Martin: Osveta. ISBN 80-217-0558-2.
35. PARZANESE, Ilaria, Dorina QEHAJAJ, Federica PATRINICOLA, Merica ARALICA, Maurizio CHIRIVA-INTERNATI a STIFTER, 2017. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. **8**(2). DOI: 10.4291/wjgp.v8.i2.27. ISSN 2150-5330. Dostupné také z: <http://www.wjgnet.com/2150-5330/full/v8/i2/27.htm>
36. PELIKÁNOVÁ, Terezie a Vladimír BARTOŠ, 1999. *Diabetes mellitus: minimum pro praxi*. Praha: Triton. Levou zadní. ISBN 8072540203.
37. PELIKÁNOVÁ, Terezie a Vladimír BARTOŠ, [2018]. *Praktická diabetologie*. 6. aktualizované a doplněné vydání. Praha: Maxdorf. Jessenius. ISBN isbn978-80-7345-559-0.
38. PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ, 2012. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3460-6.
39. PHAM-SHORT, Anna, Kim C. DONAGHUE, Geoffrey AMBLER, Sarah GARNETT a Maria E. CRAIG, 2016. *The Journal of Pediatrics*. **179**. DOI: 10.1016/j.jpeds.2016.08.105. ISSN 00223476. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347616308885>
40. PRASAD, Rashmi a Leif GROOP, 2015. Genetics of Type 2 Diabetes—Pitfalls and Possibilities. *Genes [online]*. **6**(1), 87-123 [cit. 2018-12-14]. DOI: 10.3390/genes6010087. ISSN 2073-4425. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2073-4425/6/1/87>
41. PSOTTOVÁ, Jana, 2015. *Praktický průvodce cukrovkou: co byste měli vědět o diabetu*. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-279-7.
42. RIBES-KONINCKX, C., ML. MEARIN, IR. KORPONAY-SZABÓ, et al., 2012. Coeliac Disease Diagnosis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. **54**(1), 15-19. DOI: 10.1097/MPG.0b013e31822a00bb. ISSN 0277-2116.
43. ROSTOM, A., J.A. MURRAY a M.F. KAGNOFF, 2006. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology*. [online]. **6**(131), 1981-2002 [cit. 2019-01-07]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17087937>
44. ROZTOČIL, Aleš, 2017. *Moderní porodnictví*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-5753-7.
45. RUBIO-TAPIA, Alberto, Robert A. KYLE, Edward L. KAPLAN, Dwight R. JOHNSON, William PAGE, Frederick ERDTMANN, Tricia L. BRANTNER a KIM, 2009. *Gastroenterology*. **137**(1). DOI: 10.1053/j.gastro.2009.03.059. ISSN 00165085. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650850900523X>
46. RYBKA, Jaroslav, 2006. *Diabetologie pro sestry*. Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 80-247-1612-7.

47. ŘEHÁČEK, Vít a Jiří MASOPUST, 2013. *Transfuzní lékařství*. Praha: Grada. ISBN 9788024745343.
48. SOLLID, Ludvig M., 2000. Molecular Basis of Celiac Disease. *Annual Review of Immunology*. **18**(1), 53-81. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.53. ISSN 0732-0582. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.18.1.53>
49. SOUČEK, Miroslav, Jindřich ŠPINAR a Jiří VORLÍČEK, ed., 2011. *Vnitřní lékařství*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2110-1.
50. STOŽICKÝ, František a Kateřina PIZINGEROVÁ, 2006. *Základy dětského lékařství*. Praha: Karolinum. ISBN isbn80-246-1067-1.
51. SVAČINA, Štěpán, c2003. *Prevence diabetu*. Praha: Galén. ISBN 80-7262-165-3.
52. TJON, Jennifer May-Ling, Jeroen VAN BERGEN a Frits KONING, 2010. Celiac disease: how complicated can it get?. *Immunogenetics*. **62**(10), 641-651. DOI: 10.1007/s00251-010-0465-9. ISSN 0093-7711. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00251-010-0465-9>
53. TONUTTI, Elio a Nicola BIZZARO, 2014. Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity. *Autoimmunity Reviews* [online]. **13**(4-5), 472-476 [cit. 2019-04-13]. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.01.043. ISSN 15689972. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156899721400055X>
54. VENHÁČOVÁ, MUDr. Jitřenka a MUDr. Petra VENHÁČOVÁ, 2006. *Akutní komplikace u diabetes mellitus 1. typu* [online]. (1), 14-17 [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: https://www.solen.cz/artkey/ped-200601-0003_Akutni_komplikace_u_diabetes_mellitus_1_typu.php
55. VRANÁ, Milena, *Vyšetření HLA pro vazbu s chorobami - přehled a kvalita testů prováděných v ČR* [online]. 14 [cit. 2019-04-25]. Dostupné z: https://www.uhkt.cz/veda-vyzkum/usek-pro-vedu-a-vyzkum/oddeleni-hla/aktuality/stanoveni-hla-znaku-asociovaných-s-chorobami-workshop-2017/prehled-testovani-hla-pro-diagnostiku-chorob-v-cr_m-vrana.pdf
56. WIENER, K., 1992. The Diagnosis of Diabetes Mellitus, Including Gestational Diabetes. *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine* [online]. **29**(5), 481-493 [cit. 2018-12-14]. DOI: 10.1177/000456329202900502. ISSN 0004-5632. Dostupné z: <http://acb.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/000456329202900502>
57. ZAMRAZIL, Václav, Aranka ŠIMEČKOVÁ a Karel VONDRA, 1997. *Časná stadia diabetes mellitus: diagnostika, prevence, perspektivy léčby*. Praha: Maxdorf. ISBN 80-85800-74-8.

8 Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura HLA molekuly II. třídy.	21
Obrázek 2: Struktura HLA regionu na chromozomu 6.....	28
Obrázek 3: Struktura molekul HLA I. a II. třídy.	31
Obrázek 4: Rodokmen vyšetřované rodiny.	48

9 Seznam tabulek

tab. č. 1 Modifikovaná Marshova klasifikace.....	26
tab. č. 2 Odlišnosti v expresi molekul.....	30
tab. č. 3 Rizikové HLA-DQ varianty	34
tab. č. 4: Reagencie s objemy	39
tab. č. 5: Reagencie s objemy	41
tab. č. 6: Parametry amplifikace	45
tab. č. 7: Potencionální výsledky testu.....	46
tab. č. 8: Výsledky real-time PCR reakce	47
tab. č. 9: Zjištěné zastoupení haplotypů celiakie	47

10 Seznam zkratek

AGA = protilátky proti gliadinu

APC = Antigen Presenting Cells, antigen prezentující buňka

ARA = protilátky proti retikulínu

CD = Cluster of Differentiation, diferenciatční skupina lymfocytů

DM = diabetes mellitus

DNA = deoxyribonukleová kyselina

EMA = protilátky proti endomysiu

ESPGHAN = European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition, Evropská společnost pro dětskou gastroenterologii, hepatologie a výživa

GDM = gestační diabetes mellitus

HLA = Human Leukocyte Antigens, lidské leukocytární antigeny

IEL = intraepiteliální lymfocyty

IgA = imunoglobulin A

INF = interferon

LIČ = laboratorní informační číslo

MHC = Major Histocompatibility Complex, hlavní histokompatibilní komplex

PCR = Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce

rpm = revolutions per minute, otáčky za minutu

RT = Room Temperature, pokojová teplota

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

TNF = tumor nekrotizující faktor

tTG = tkáňová transglutamináza

WHO = World Health Organization, světová zdravotnická organizace