

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA BOH

**SEROLOŠKE IN GENETSKE ZNAČILNOSTI PRI
BOLNIKI S CELIAKIJO**

**SEROLOGICAL AND GENETIC TRAITS IN PATIENTS WITH
CELIAC DISEASE**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom doc. dr. Rada Janše, dr. med., spec. interne medicine in gastroenterologije. Odvzemi bioloških vzorcev so bili opravljeni na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo Interne klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Genetske meritve so bile opravljene na Zavodu RS za transfuzijsko medicino – Center za tipizacijo. Analize bioloških vzorcev smo opravili na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Iskreno se zahvaljujem mentorju in somentorju za omogočeno izvedbo diplomskega dela, vse dragocene strokovne nasvete in pomoč tekom dela.

Zahvaljujem se tudi vsem predavateljem Fakultete za farmacijo za predajanje neprecenljivega znanja in bogatih izkušenj.

Posebna zahvala pa gre mojemu Samu in družini, za vso izkazano podporo in potrpežljivost tekom študijskih let.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom doc. dr. Rada Janše, dr. med., spec. interne medicine in gastroenterologije.

Ljubljana, junij 2015

Špela Boh

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Mitja Kos, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Tihomir Tomašič, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | UVOD | 1 |
| 1.1 | TANKO ČREVO | 1 |
| 1.1.1 | ZGRADBA TANKEGA ČREVESA | 1 |
| 1.2 | CELIAKIJA | 2 |
| 1.1.1 | DEFINICIJA IN GLAVNE ZNAČILNOSTI CELIAKIJE | 2 |
| 1.2.2 | PATOGENEZA | 3 |
| 1.2.3 | KLASIFIKACIJA BOLEZNI | 4 |
| 1.2.4 | KLINIČNI ZNAKI | 5 |
| 1.2.5 | DIAGNOZA CELIAKIJE | 7 |
| 1.1.1.1 | SEROLOŠKI OZNAČEVALCI ZA CELIAKIJO | 9 |
| 1.1.1.2 | HISTOLOGIJA | 10 |
| 1.1.1.3 | NEINVAZIVNO DIAGNOSTIČNO OVREDNOTENJE | 13 |
| 1.1.1.4 | PRESEJALNI TESTI PRI LJUDEH S TVEGANJEM | 15 |
| 1.1.1.5 | DIFERENCIALNA DIAGNOZA | 15 |
| 1.2.6 | ZDRAVLJENJE | 16 |
| 2 | NAMEN DELA | 17 |
| 3 | MATERIALI IN METODE | 18 |
| 3.1 | PREDSTAVITEV PREISKOVANCEV | 18 |
| 3.2 | DOLOČANJE ANTIENDOMIZIJSKIH PROTITELES (EMA) RAZREDA IgA | 19 |
| 3.2.1 | PRINCIP DOLOČANJA EMA IgA | 20 |
| 3.2.2 | VZORCI | 20 |
| 3.2.3 | OBDELAVA PODATKOV | 21 |
| 3.3 | DOLOČANJE PROTITELES RAZREDA IgA PROTI TKIVNI TRANSGLUTAMINAZI (tTG) | 21 |
| 3.3.1 | PRINCIP DOLOČANJA tTG IgA | 21 |
| 3.3.2 | VZORCI | 22 |
| 3.3.3 | INTERPRETACIJA REZULTATOV | 22 |
| 3.4 | HLA TIPIZACIJA | 22 |
| 3.4.1 | Metoda PCR-SSP – Verižna reakcija s polimerazo in sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (angl. <i>polymerase chain reaction based sequence-specific priming</i>) | 23 |
| 3.4.2 | Metoda PCR-SSO – Verižna reakcija s polimerazo in hibridizacijo s sekvenčno specifičnimi oligonukleotidi (angl. <i>polymerase chain reaction based sequence-specific oligonucleotide hybridisation</i>) ter Luminex tehnologijo | 23 |
| 4 | REZULTATI | 25 |
| 4.1 | Skupina preiskovancev | 25 |
| 4.1.1 | Tipi HLA | 25 |
| 4.1.2 | Vrednosti EMA IgA in tTG IgA | 26 |
| 4.1.3 | Diagnoza celiakije | 27 |
| 4.2 | Skupina bolnikov | 27 |
| 4.2.1 | Tipi HLA pri bolnikih | 27 |
| 4.2.2 | Vrednosti EMA IgA in tTG IgA pri bolnikih | 28 |

| | | |
|------------|----------------------------|-----------|
| 4.3 | OBDELAVA REZULTATOV | 29 |
| 4.3.1 | HLA tipizacija | 29 |
| 4.3.2 | Vrednosti EMA in tTG | 35 |
| 5 | RAZPRAVA | 37 |
| 6 | SKLEP | 41 |

KAZALO SLIK

| | | |
|-----------|---|----|
| SLIKA 1: | ZGRADBA TANKEGA ČREVEVA IN ČREVESNIH RESIC..... | 1 |
| SLIKA 2: | MODEL "LEDENE GORE"..... | 2 |
| SLIKA 3: | NA LEVEM DELU SLIKE JE PRIKAZANA NORMALNA SLUZNICA DVANAJSTNIKA, NA DESNEM DELU PA SLUZNICA PRI BOLNIKU S CELIAKIJO. | 2 |
| SLIKA 4: | PATOGENEZA CELIAKIJE. | 4 |
| SLIKA 5: | SHEMA STOPENJ POŠKODB SLUZNICE PO MARSH-OBERHUBER-JU. | 11 |
| SLIKA 6: | RAZLIČNE STOPNJE POŠKODB SLUZNICE DVANAJSTNIKA PRI CELIAKIJI. A, INFILTRATIVNI TIP (TIP 1) ALI NEATROFIČNE POŠKODBE (RAZRED A). B, DESTRUKTIVNI TIP (TIP 3B) ALI ATROFIČNE POŠKODBE (RAZRED B1). C, PLOSKA STOPNJA (TIP 3C ALI RAZRED B2). | 11 |
| SLIKA 7: | ZA CELIAKIJO JE ZNAČILEN GENSKI ZAPIS HLA-DQ2 IN HLA-DQ8. SLIKA A PREDSTAVLJA ZAPIS HLA-DQ2 V CIS KONFIGURACIJI, SLIKA B PA TRANS KONFIGURACIJO. NA SLIKI C JE SHEMA ZAPISA HLA-DQ8. | 13 |
| SLIKA 8: | PRINCIP DOLOČANJA PROTITELES EMA..... | 20 |
| SLIKA 9: | PRIMER TIPIČNIH REZULTATOV TESTA ZA EMA IN UMERITVENE KRIVULJE. | 21 |
| SLIKA 10: | PRINCIP DOLOČANJA PROTITELES tTG. | 21 |
| SLIKA 11: | SHEMA METODE PCR-SSP..... | 23 |
| SLIKA 12: | SHEMA POSTOPKA PCR-SSO LUMINEX..... | 24 |

KAZALO GRAFOV

| | |
|--|----|
| GRAF 1: PRIKAZ STAROSTI VSEH PREISKOVANCEV Z GENOTIPOM ZNAČILNIM ZA CELIAKIJU | 18 |
| GRAF 2: PRIKAZ STAROSTI BOLNIKOV S HISTOLOŠKO DOKAZANO CELIAKIJU..... | 19 |
| GRAF 3: PRIKAZ PORAZDELITVE SPOLA PRI VSEH PREISKOVANCIH Z GENOTIPOM ZNAČILNIM ZA CELIAKIJU (A) IN PRI BOLNIKI (B)..... | 19 |
| GRAF 4: PRIKAZ PORAZDELITVE GENOTIPOV V SKUPINI PREISKOVANCEV..... | 25 |
| GRAF 5: PRIKAZ REZULTATOV SEROLOŠKIH TESTIRANJ IN NJIHOVI DELEŽI PRI PREISKOVANCIH..... | 26 |
| GRAF 6: PRIKAZ DELEŽEV POZITIVNIH IN NEGATIVNIH REZULTATOV ZA EMA (LEVO) IN tTG (DESNO) PRI PREISKOVANCIH..... | 26 |
| GRAF 7: PRIKAZ DELEŽA BOLNIKOV Z DOKAZANO CELIAKIJU..... | 27 |
| GRAF 8: PRIKAZ DELEŽEV GENOTIPOV MED BOLNIKI..... | 27 |
| GRAF 9: PRIKAZ REZULTATOV SEROLOŠKIH TESTIRANJ IN NJIHOVI DELEŽI PRI BOLNIKI..... | 28 |
| GRAF 10: PRIKAZ DELEŽEV POZITIVNIH IN NEGATIVNIH REZULTATOV ZA EMA (LEVO) IN tTG (DESNO) PRI BOLNIKI..... | 28 |
| GRAF 11: PRIKAZ DELEŽEV POSAMEZNIH KOMBINACIJ HAPLOTIPOV PO GENOTIPIH PRI PREISKOVANCIH (LEVI STOLPEC) IN BOLNIKI (DESNI STOLPEC)..... | 33 |
| GRAF 12: PRIKAZ DELEŽEV KOMBINACIJ HAPLOTIPOV MED BOLNIKI..... | 34 |
| GRAF 14: PRIKAZ ODSOTKA POZITIVNIH SEROLOŠKIH REZULTATOV EMA IN tTG GLEDE NA KOMBINACIJE HAPLOTIPOV..... | 36 |
| GRAF 15: PRIKAZ ODSOTKA POZITIVNIH SEROLOŠKIH REZULTATOV ZA tTG GLEDE NA KOMBINACIJE HAPLOTIPOV..... | 36 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|---|----|
| PREGLEDNICA I: PRIMERJAVA MARSH-OBERHUBER IN CORAZZA-VILLANACCI KLASIFIKACIJE TER POVZETEK PARAMETROV..... | 12 |
| PREGLEDNICA II: VZROKI ZA INTESTINALNO INTRAEPITELNO LIMFOCITOZO PROKSIMALNEGA TANKEGA ČREVESA, Z NORMALNO STRUKTURO ČREVESNIH RESIC..... | 15 |
| PREGLEDNICA III: GENOTIPI IN NJIHOV DELEŽ V SKUPINI PREISKOVANCEV Z GENOTIPOM ZNAČILNIM ZA CELIAKIJU..... | 25 |
| PREGLEDNICA IV: GENOTIPI IN NJIHOV DELEŽ V SKUPINI BOLNIKOV S CELIAKIJU..... | 27 |
| PREGLEDNICA V: PRIKAZ GENOTIPOV IN NJIHOVIH DELEŽEV MED PREISKOVANCI (LEVO) IN BOLNIKI (DESNO)..... | 29 |
| PREGLEDNICA VI: PRIKAZ DELEŽEV HOMOZIGOTOV IN HETEROZIGOTOV..... | 37 |
| PREGLEDNICA VII: KOMBINACIJE ALELOV, KI DEFINIRAJO POSAMEZNE GENOTIPE..... | 38 |

POVZETEK

Celiakija je pogosta avtoimunska vnetna bolezen tankega črevesa. Simptomi nastopijo pri genetsko dovzetnih ljudeh z genotipom HLA-DQ2 ali HLA-DQ8, ob zaužitju živil, ki vsebujejo beljakovino gluten. Je ena izmed redkih motenj, ki jo lahko nadziramo ob pravočasni diagnozi in obravnavi. Resice tankega črevesa postanejo pri bolnikih poškodovane. Pride do njihove atrofije in posledično močno zmanjšanega privzema hranilnih snovi, vitaminov in mineralov.

Zakasnjena diagnoza in zdravljenje z brezglutensko dieto povišata tveganje za razvoj ostalih avtoimunskih bolezní, smrtnosti in tveganja za osteoporozo ter maligne tvorbe. Zato je pravilna in hitra diagnoza ključnega pomena.

V diplomski nalogi smo izvedli serološka testiranja in na podlagi le-teh ter že opravljenih genetskih testiranj oseb s sumljivo klinično sliko določili serološke in genetske značilnosti bolnikov.

S serološkimi testi odkrivamo za celiakijo značilna protitelesa v krvi bolnikov. To so antigliadinska protitelesa razredov IgA in IgG, antiendomizijska protitelesa razreda IgA in protitelesa proti tkivni transglutaminazi.

S HLA tipizacijo (metodi PCR-SSP in PCR-SSO) pa identificiramo gene poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa, ki jih je oseba podedovala ter pripadajoče antigene, prisotne na površini antigen predstavitevni celic.

Rezultati vseh preiskav so nam omogočili določitev genetskih značilnosti skupine slovenskih bolnikov in njihove serološke značilnosti. V skladu s pričakovanji je prisotnost HLA-DQ2/8 genotipa med vsemi bolniki ter največja verjetnost za razvoj bolezní pri bolnikih s HLA-DQ2,2 in HLA-DQ8,5. Rezultati so nam razkrili dejstvo, da je DQ8 med našimi bolniki prisoten v večjem odstotku (22%), kot pa je splošno navedeno v literaturi (5-10%). Sklepamo, da do razlik prihaja glede na narodnost oziroma področje bivanja, vendar pa bi bilo potrebno to še v nadaljnje podrobnejše raziskati z večjo skupino preiskovancev. Podrobnejša povezava s serološkimi značilnostmi bi lahko omogočila enostavnejše, pravilnejše predvsem pa hitrejše diagnosticiranje celiakije.

ABSTRACT

Celiac disease is a common autoimmune inflammatory disorder of small intestine. Its symptoms arise in response to gluten consumption by genetically predisposed persons with HLA-DQ2/8. It is one of the few disorders to be managed with timely and correct diagnosis. Patient's small bowel villi are being damaged. This can lead to villous atrophy and consequently to malabsorption of nutrients, minerals and vitamins.

Delayed diagnosis and gluten-free diet are associated with increased prevalence of other autoimmune conditions, mortality and increased risk of osteoporosis and malignancies. Therefore, correct and fast diagnosis is crucial.

In the thesis, we carried out serological tests. Based on those results and already performed genetic tests for people with suspicious clinical picture, we determined serological and genetic traits for patients with celiac disease.

Serological tests provide us with information about specific antibodies level. Those are antigliadin antibodies (AGA) class IgA and IgG, antiendomysium (EMA) IgA antibodies and human tissue transglutamine antibodies (anti-tTG).

HLA typing (PCR-SSP and PCR-SSO methods) identifies genes of major histocompatibility complex (MHC) and corresponding cell surface receptor type protein found on antigen presenting cells.

Results of our research enabled us to determine genetic traits of a group of Slovenian patients and their serological traits. Up to expectations is a presence of HLA-DQ2/8 and the highest probability for celiac disease with possessing HLA-DQ2,2 and HLA-DQ8,5. HLA-DQ8 carries higher percentage (22%) of patients than stated in the literature (5-10%), which we ascribe to differences in nationalities and place of living. However, the research should be continued on a larger, more representative group of patients. More detailed connection to serological trait could result in simplified, more correct and faster diagnosis of celiac disease.

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|--------------|--|
| AGA | antigliadinska protitelesa |
| anti-tTG | protitelesa proti tkivni transglutaminazi |
| BGD | brezglutenska dieta |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| CLIA | indirektna kemiluminiscenčna metoda |
| ELISA | encimsko imunoabsorpcijska preiskava |
| EMA | antiendomizijska protitelesa |
| ESPGHAN | Evropsko združenje za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano |
| HLA | humani levkocitni antigeni (angl. <i>Human leukocyte antigen</i>) |
| HRP | hrenova peroksidaza |
| IEL | intraepitelni limfociti |
| IFN γ | interferon γ |
| IgA | imunoglobulin A |
| IgG | imunoglobulin G |
| IgG anti-DGP | IgG avtoprotitelesa proti deaminiranim proteinom gliadina |
| IL | interlevkin |
| NNV | negativna napovedna vrednost |
| PCR-SSO | metoda, ki uporablja verižno reakcijo s polimerazo in hibridizacijo s sekvenčno specifičnimi oligonukleotidi (angl. <i>Polymerase chain reaction based sequence-specific oligonucleotide hybridisation</i>) |
| PCR-SSP | metoda, ki uporablja verižno reakcijo s polimerazo s sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (angl. <i>Polymerase chain reaction based sequence-specific priming</i>) |
| TČ | tanko črevo |
| TNF α | tumor nekrotizirajoči faktor α |
| tTG | tkivna transglutaminaza |

1 UVOD

1.1 TANKO ČREVO

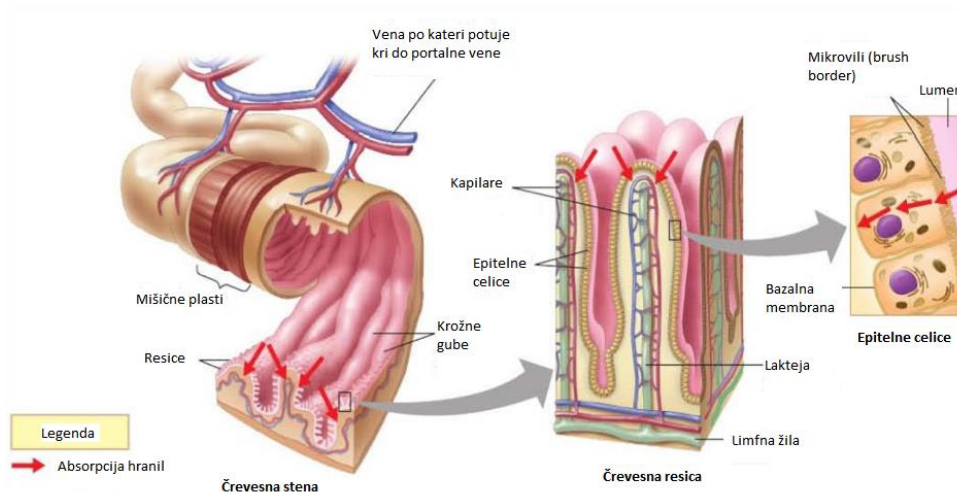
Tanko črevo (TČ) je votli prebavni organ, ki povezuje želodec in široko črevo. Predstavlja približno tri četrtine prebavne poti, kar omogoča podaljšan stik med hrano in prebavnimi encimi. Poglavitna fiziološka funkcija TČ je absorpcija hranil, je pa tudi sekretorni, metabolni, endokrini, živčni in imunski organ. (1)

1.1.1 ZGRADBA TANKEGA ČREVESJA

Tanko črevo sestavljajo dvanajstnik (30 cm), jejunum – tešče črevo (2,5 m) in ileum – vito črevo (3,5 m). V splošnem je stena TČ razdeljena na štiri plasti: sluznico, podsluznico, mišično plast in serozno plast.

Sluznico sestavljajo epitelij, lamina propria in tanek sloj mišičja (muscularis mucosae). Sluznično površino povečujejo gube in številni prstasti izrastki - resice (vili). Resice tvorijo epitelij in lamina propria. Na bazi črevesnih resic ležijo intestinalne žleze - kripte. Epitelij resic sestavljajo predvsem absorptivne celice – enterociti, med njimi pa so med drugim razsejani tudi intraepitelijski limfociti (IEL). Normalno število IEL je 30-40 na 100 epitelnih celic. Apikalni pol enterocitov ima številne mikrovile, ki dajejo pod mikroskopom krtačast videz (ang. brush border). (1, 2)

Prenos hranilnih snovi iz črevesja v kri (resorpcija) je ena izmed najpomembnejših nalog TČ, zato je notranja površina le-tega za 600-krat povečana z gubami, resicami in mikrovili (Slika 1).



Slika 1: Zgradba tankega črevesja in črevesnih resic.

1.2 CELIAKIJA

1.1.1 DEFINICIJA IN GLAVNE ZNAČILNOSTI CELIAKIJE

Celiakija je pogosta avtoimunska vnetna bolezen TČ (jejunuma). Simptomi nastopijo pri genetsko dovzetnih ljudeh z genotipom HLA-DQ2 ali HLA-DQ8 ob zaužitju živil, ki vsebujejo beljakovino gluten. (1) Je doživljenjska motnja, ki se lahko pojavi pri obeh spolih vseh starosti in je ena izmed redkih motenj, ki jo lahko nadziramo ob pravočasni diagnozi in



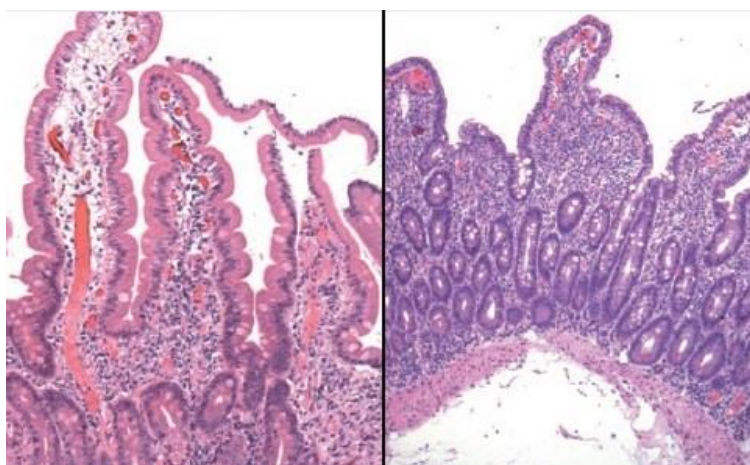
Slika 2: Model "ledene gore".

obravnavi. (3) Prisoten je širok spekter kliničnih fenotipov. Simptomi celiakije so pogosto predstavljeni z modelom "ledene gore", pri kateri vrh ponazarja bolnike s klasično malabsorpcijo, večji in neviden del pod gladino pa atipične bolnike (Slika 2). (4)

Pri bolnikih s celiakijo postanejo resice TČ poškodovane zaradi zaužitja glutena iz žitnih vrst kot so pšenica, ječmen, rž in pira. Pride do atrofije resic in posledično močno zmanjšanega privzema hranilnih snovi, vitaminov in

mineralov (Slika 3).

Prevalenca celiakije pri kavkazijski rasi je ocenjena na 1 na 100-300 prebivalcev, vendar mnogo primerov, sploh med odraslimi, ostane nediagnosticiranih. (1, 4) Bolniki z asimptomatsko in netipično obliko bolezni predstavljajo večino primerov celiakije, vendar imajo manj možnosti za diagnozo kot bolniki s klasičnimi simptomi. (3) Celiakija se pogosteje pojavlja pri ženskem spolu kot pri moškem, v razmerju 2:1. Poleg tega je pogostejša pri rizičnih skupinah (sorodniki v prvem kolenu, specifični genetski sindromi ali avtoimunske bolezni). (1, 4)



Slika 3: Na levem delu slike je prikazana normalna sluznica dvanaajstnika, na desnem delu pa sluznica pri bolniku s celiakijo.

Diagnozo potrdimo z antiendomizijskimi protitelesi (EMA) ali protitelesi proti tkivni transglutaminazi (tTG), z značilno histološko sliko dvanajstnika in začasnim izboljšanjem kliničnih in seroloških rezultatov ob brezglutenski dieti (BGD).

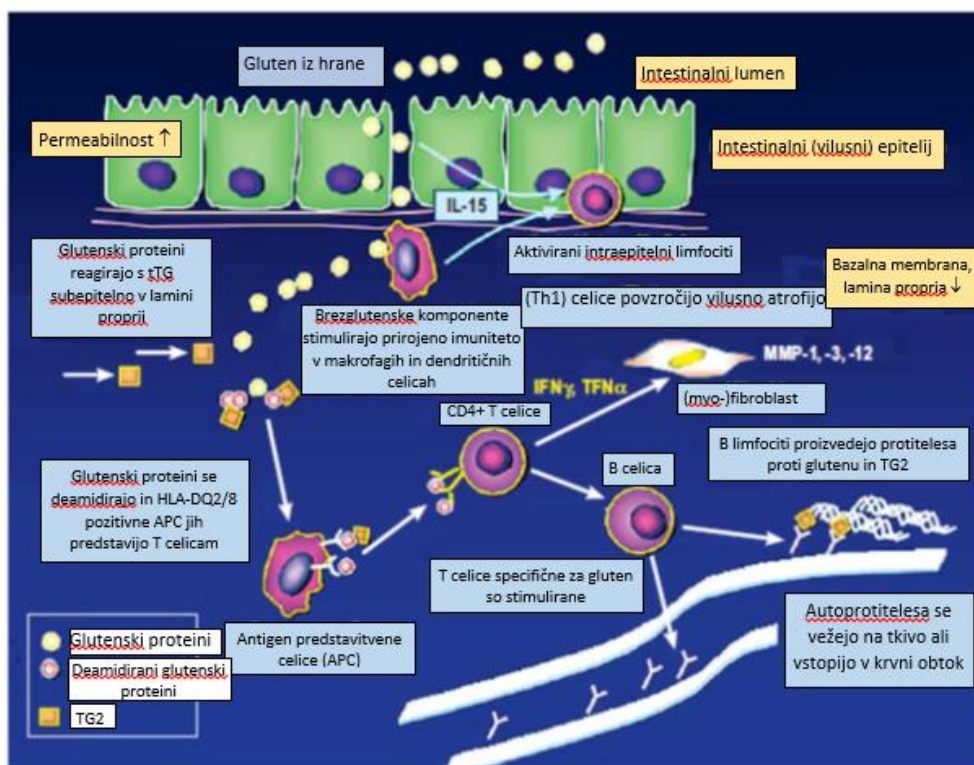
1.2.2 PATOGENEZA

Celiakija je ena izmed boljše okarakteriziranih bolezni imunskega sistema. Bolnikom je skupno naslednje:

- Definiran sprožitveni faktor.
- Genetska predispozicija (HLA-DQ2 ali HLA-DQ8).
- Visoko občutljiva in specifična avtoprotitelesa proti naravno prisotnemu encimu tkivni transglutaminazi (tTG).

Vzrok bolezni je prekomerno okrepljen imunski odziv v lamini proprie TČ, ki ga sprožijo nevodotopne beljakovine prisotne v pšenici, piri, rži, ječmenu in ovsu - prolamini. Vsi ti prolamini vsebujejo določene sorodne predele oz. aminokislinska zaporedja, ki pri bolniku sprožijo imunski odgovor, katerega posledica so gastrointestinalni simptomi, tipični za celiakijo. Gluten je beljakovina pšenice in pire. (1) Glutenske molekule v pšenici sestavljata v glavnem dve večji skupini beljakovin, v približno enakem razmerju: glutenini in gliadini. Gliadini predstavljajo prolaminsko frakcijo, ki je toksična za bolnika s celiakijo in jih najdemo samo v pšenici. (1) Osrednjo vlogo pri patogenezi celiakije igra tTG, ki ojača imunogenost glutena.

Po zaužitju se nekatere glutenske beljakovine ne razgradijo z gastrointestinalnimi encimi. Prehajajo preko epitelija sluznice TČ v lamino proprio. tTG v lamini proprie deaminira gluten v gliadin, kar omogoči močno vezavo na antigen predstavitveni celici (z HLA-DQ2 ali HLA-DQ8 pogojeni receptorji). HLA-antigen komplekse prepoznajo receptorji CD4+ limfocitov T v črevesni sluznici. Posledica je humoralni imunski odgovor s tvorbo protiteles IgA in IgG (antigliadinska – AGA, antiendomizijska – EMA, protitelesa proti tkivni transglutaminazi – anti-tTG) in celični imunski odgovor s tvorbo vnetnih citokinov (IFN gama, TNF alfa, IL-15). Imunski odziv povzroči značilno namnožitev limfocitov T CD4+ v lamini proprie in intraepitelijskih limfocitov T CD8+ (Slika 4). Aktivirani limfociti T so toksični, kar vključuje **apoptozo enterocitov, atrofijo ali vsaj skrajšanje črevesnih resic sluznice, hipertrofijo kript in malabsorpcijo.** (1, 5)



Slika 4: Patogeneza celiakije.

Glutenski peptidi prehajajo epitelij TC do lamine propriae, kjer jih tTG deamidira v gliadin. Vežejo se s HLA-DQ2 in HLA-DQ8 pogojenimi receptorji na antigen predstavitveni celici. HLA-antigen kompleks prepoznajo CD4+ T limfociti. Dendritične celice in IL-15, nastali v intestinalnem epiteliju stimulirajo intraepitelne limfocite. Ostali citokini tipične imunske reakcije vključujejo na primer: IFN-gama, TNF-alfa, IL-8, IL-18 in IL-21.

1.2.3 KLASIFIKACIJA BOLEZNI

Klinična slika pri celiakiji je odraz starosti bolnika, trajanja bolezni in obsega sprememb na črevesju. Posledično je zelo raznolika in se odraža na več načinov:

KLASIČNA CELIAKIJA

Pri tej skupini bolnikov je bolezen določena z **atrofijo črevesnih resic** in posledično **malabsorpcijo** (kronična diareja, steatoreja, napihnjenost, podhranjenost/hujšanje, mišična distrofija-sarkopenija, hipoproteinemija-ascites/periferni edemi, amenoreja, utrujenost, pomanjkanje vitaminov, osteopenija/osteoporoza, helioza, glositis, hematomi, parestezije/tetanija). Z odstranitvijo glutena iz prehrane se sluznica obnovi in sistemski simptomi in znaki izginejo v obdobju od nekaj tednov do 2-3 mesecev. (1, 6)

ATIPičNA CELIAKIJA

Gastrointestinalni simptomi so večinoma **minimalno izraženi** (napihnjnost in napenjanje). Najpogostejša obravnava zaradi sideropenične anemije, hipoplazije zobne sklenine, osteoporoze ali osteopenije, artritisa, povišanih vrednosti transaminaze, nevroloških simptomov in neplodnosti. (1, 6)

ASIMPTOMATSKA (TIHA) CELIAKIJA

Ti bolniki **nimajo simptomov** bolezni, vendar pogosto poročajo o prenehanju kronične utrujenosti po uvedbi BGD. Imajo značilne **serološke in patohistološke spremembe**.(6)

LATENTNA CELIAKIJA

Tukaj govorimo o dveh skupinah bolnikov. Prva so bolniki, ki so imeli v otroštvu prisotne značilne spremembe in simptome in so se izboljšali ali normalizirali z BGD. Še naprej ostajajo asiptomatski pri ponovni uvedbi uživanja glutena.

Druga skupina pa so bolniki, pri katerih se bo bolezen razvila kasneje v odrasli dobi, čeprav so testiranja pokazala sluznico v dobrem stanju ob uživanju glutena. (6)

REFRAKTARNA CELIAKIJA

Klinična slika se kljub BGD po 6 do 12 mesecih ne izboljša. Značilne so histološke spremembe ter imunofenotipske atipične populacije limfocitov. Zlasti refraktarna celiakija tip II predstavlja nevarnost razvoja limfoma. (1)

1.2.4 KLINIČNI ZNAKI

Celiakijo so sprva obravnavali kot otroško bolezen. Sčasoma so spoznali, da lahko prizadene odrasle vseh let in da je otroci ne prerastejo. S prihodom seroloških testov v letu 1980 smo lahko odkrivali tudi netipične oblike celiakije. Spekter kliničnih simptomov je postal zelo širok. (7)

SIMPTOMI V OTROŠKI DOBI

Pri otrocih se celiakija pokaže različno, odvisno od njihove starosti in trajanja bolezni. (7) S **klasičnimi simptomi** kot so diareja, abdominalna napihnjnost in zaostanek v rasti, se pogosteje pokaže pri **zelo mladih otrocih**. (7) Ponavadi se pojavi pri postopnem uvajanju hrane, ki vsebuje gluten. (6)

Pri **starejših otrocih in adolescentih** se verjetneje pokaže z **atipičnimi gastrointestinalnimi težavami**, kot so bolečina, bruhanje ali celo zaprtje. Tudi **zunajčrevesni** simptomi, kot so artritis, nevrološki simptomi in anemija so pogosti. Bolniki s **tiho obliko** bolezni so brez očitnih simptomov. Izkušnje kažejo, da se pri večini otrok celiakija pokaže na enega od dveh glavnih načinov: težava z rastjo in pogosta nespecifična abdominalna bolečina. (7)

SIMPTOMI V ODRASLI DOBI

Glavni način izražanja bolezni je **diareja**, vendar so pogostejše atipične oblike bolezni (pri več kot 50%). (7) Ostali načini vključujejo blage in dolgotrajne težave, kot so kronična utrujenost, blaga sideropenija/anemija, napihnjenost in povišane vrednosti transaminaze. (6) Do anemije pride zaradi pomanjkanja železa, hranilnih snovi in pri kroničnih boleznih. (7) Zelo pomembno je postaviti pravilno diagnozo zaradi štirih razlogov: 1) nevarnosti za razvoj malignoma pri nezdravljeni bolezni 2) potencialne prisotnosti pomanjkanja hranilnih snovi 3) nevarnosti rojstva otroka z nizko porodno maso pri materi z nediagnosticirano celiakijo 4) pojava ostalih možnih spremljajočih avtoimunskih bolezni. (6)

Bolezen se lahko kaže z naslednjimi simptomi in znaki:

- **Splošni:** izguba telesne mase, šibkost, nizek krvni tlak, glavobol.
- **Gastrointestinalni:** glositis, aftozne ulceracije, diareja, anoreksija, slabost in bruhanje, abdominalna distenzija/napihnjenost, bolečine v trebuhu, vetrovi.
- **Presnovni in endokrini:** anemija, nagnjenost h krvavenju, hipoproteinemijski edemi, parestezije.
- **Mišično-skeletni:** miopatija, bolečine v kosteh, artritis, netravmatski zlom.
- **Nevrološki/psihološki:** glavobol, periferna nevropatija, anksioznost, depresija, epilepsija.
- **Reprodukcijski:** motnje menstrualnega ciklusa, zmanjšanja plodnost.
- **Kožni:** izpuščaji, patološke pigmentacije, rdečica, petehije, hematomi. (6)

Nezdravljenje lahko celiakijo poslabša in je dolgoročno povezana z večjim tveganjem za pojav gastrointestinalnega raka. Zunajčrevesni znaki lahko pri klinični sliki prevladujejo in tako zasenčijo črevesne. (5) Ob zgodnji pravilni diagnozi in BGD se stanje izboljša.

SPREMLJEVALNE BOLEZNI

Vzporedno se skupaj s celiakijo pogosto pojavlja tudi niz drugih bolezni.

- **Bolezni kože:** dermatitis herpetiformis, atopijski dermatitis.
- **Bolezni žlez z notranjim izločanjem:** sladkorna bolezen tipa I, avtoimunsko obolenje ščitnice, Addisonova bolezen.
- **Bolezni živčnega sistema:** cerebralna ataksija, nevropatija, epilepsija, migrena.
- **Bolezni srca:** idiopatska dilatativna kardiomiopatija, avtoimunski miokarditis.
- **Bolezni jeter:** primarna biliarna ciroza, avtoimunski hepatitis, avtoimunski holangitis.
- **Ostale:** Syörgeenov sindrom, Downov sindrom, Turnerjev sindrom, IgA deficienca, alopecija, Crohnova bolezen, ulcerozni kolitis, mikroskopski kolitis, osteoporoza, artritis. (6)

Povezava celiakije in avtoimunskih bolezni je močna. Približno 30% odraslih s celiakijo ima eno ali več avtoimunskih motenj, medtem ko je v splošni populaciji ta odstotek 3%. Mehanizem te povezave ni znan. Študija v Franciji je pokazala, da BGD ščiti pred razvojem avtoimunskih bolezni. (7)

1.2.5 DIAGNOZA CELIAKIJE

Pravilna diagnoza celiakije je ključna, saj zahteva doživljenjsko upoštevanje BGD. Zgodnja diagnoza in zdravljenje imata še dodatne koristi, saj se v nasprotnem primeru poviša prevalenca ostalih avtoimunskih bolezni, smrtnosti in tveganja za osteoporozo in maligne tvorbe. Zato so nujni standardizirani protokoli z občutljivimi in specifičnimi testi za potrditev diagnoze in tveganja. (8) Pri postavljanju pravilne diagnoze moramo upoštevati kombinacijo kliničnih, seroloških, genetskih in histoloških aspektov. Pri bolnikih te faktorje, razen genetskega, ocenjujemo v času uživanja gluten, saj BGD spremeni vzorce in tako onemogoči prepoznavo karakteristik bolezni. (9)

Na podlagi črevesnih in zunajčrevesnih simptomov ter prisotnosti spremljajočih bolezni in sorodstva so določili skupine, pri katerih moramo posumiti in raziskati možnost celiakije:

- I. Posamezniki z visokim sumom na celiakijo (hude malabsorpcije in prisotnost bolezni v močni povezavi s celiakijo):
 - Sindrom malabsorpcije s ponavljajočim se, diareji podobnim, iztrebljanjem, abdominalna bolečina in izrazita izguba telesne mase;
 - Dermatitis herpetiformis, imenovan tudi kožna celiakija.
- II. Posamezniki z zmernim sumom na celiakijo (atipični ali zunajčrevesni simptomi in spremljajoče bolezni):
 - Atipični gastrointestinalni simptomi;
 - Zunajčrevesni simptomi;
 - S celiakijo povezane bolezni.
- III. Sorodniki bolnikov s celiakijo v prvem kolenu (4-17% prisotnost pri sorodnikih v prvem kolenu). (9) (6)

Evropsko združenje za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano (ESPGHAN) je prvotno določila stroge diagnostične kriterije, ki so zahtevali tri biopsije za prikaz sprememb strukture sluznice teščega črevesa ob uživanju glutena, klinično in histološko izboljšanje simptomov ob upoštevanju BGD in razpad sluznice med obremenitvijo z glutenom.

Posodobljene smernice ESPGHAN pa so primernejše in široko uporabljane. **Značilne strukturne spremembe sluznice TČ ob uživanju glutena in popolno klinično izboljšanje simptomov ob upoštevanju BGD** sta dva bistvena zahtevana kriterija. Diagnozo podpre prisotnost seroloških protiteles, ki izginejo ob BGD. (8)

Kljub napredku v diagnostičnih postopkih, je sama diagnoza pri bolnikih zakasnjena za približno 7 do 10 let ali celo spregledana. Več študij je poročalo, da prepoznamo 25% bolnikov, medtem ko je večina spregledanih in izpostavljenih večjim tveganjem.

Že pred več kot 20 leti je Marsh definiral spremembe sluznice TČ pri celiakiji in ocenil anomalije v povezavi z resnostjo bolezni ter tako poudaril pomembnost izvajanja biopsije TČ. Pred razpoložljivostjo zelo zanesljivih testov za anti-tTG in EMA, je biopsija tankega črevesa postala zlati standard diagnosticiranja celiakije. Izboljšana natančnost teh testov je zganila klinične zdravnike k razpravam o smiselnosti izvajanja biopsije pri bolnikih z nenormalno povišanimi vrednostmi anti-tTG in EMA protiteles. (3)

1.1.1.1 SEROLOŠKI OZNAČEVALCI ZA CELIAKIJO

S serološkimi testi odkrivamo za celiakijo značilna protitelesa v krvi bolnikov. (5) To so antigliadinska protitelesa (AGA) razredov IgG in IgA, antiendomizijska protitelesa (EMA) razreda IgA in protitelesa proti tkivni transglutaminazi (anti-tTG). Indicirani so pri vseh ljudeh pri katerih sumimo na celiakijo in pri vseh s tveganjem za le-to. Serumska protitelesa imajo razpolovni čas 30-60 dni, zato naj bi bolniki vsaj nekaj dni do nekaj tednov pred serološkimi testi (tako kot pred biopsijo) uživali živila z glutenom. Vsi testi imajo negativno napovedno vrednost (NNV) blizu 100%; normalne vrednosti praktično izključujejo aktivno celiakijo (ob normalni histologiji in uživanju glutena). (5)

Protitelesa proti tkivni transglutaminazi razreda IgA (anti-tTG IgA) imajo najvišjo občutljivost (98%) in specifičnost (90%) za celiakijo. Visoka vrednost titra (>5-kratna vrednost zgornje meje) je skoraj vedno pokazatelj celiakije. Lažno pozitivni rezultati (približno 10%) skoraj vedno predstavljajo srednje nizek titer (<2-kratna vrednost zgornje meje). (9) tTG je avtoantigen za protitelesa EMA. Le-ta katalizira križno povezavo med glutaminskimi in lizinskimi ostanki v proteinih. Gliadin s številnimi glutaminskimi ostanki je pomemben substrat za ta encim.

V diagnostiki določamo prisotnost anti-tTG z metodo **ELISA**. Dokazovanje anti-tTG je danes skupaj z dokazovanjem EMA osnova diagnostike celiakije. (5)

Antiendomizijska protitelesa razreda IgA (EMA) so manj občutljiva v primerjavi z anti-tTG IgA (90%), vendar skoraj absolutno **specifična** za celiakijo. Večinoma se pri dokazovanju EMA odloča za komercialne indirektne imunofluorescenčne teste. (5)

Antigliadinska protitelesa razreda IgA (AGA) so manj občutljiva in specifična kot anti-tTG in EMA in so danes zastarela metoda. (9) Iskanje prisotnosti AGA je uporabno le v **zgodnjem otroštvu** (pri otrocih mlajših od dveh let). V tem starostnem obdobju kažejo večjo občutljivost kot ostali testi, saj so prva protitelesa, ki se pojavijo. Pozitiven rezultat na IgA AGA v povezavi z negativnima rezultatoma za EMA in anti-tTG ni skoraj nikoli pokazatelj celiakije pri odraslih in otrocih starejših od dveh let. (9) Serumska raven AGA se določa z uporabo komercialnih sendvič encimsko imunskih testov **ELISA**. (5)

Uporabo **IgG** razreda protiteles moramo omejiti na bolnike s pomanjkanjem IgA, ker je samo pri tej podskupini bolnikov rezultat značilen za celiakijo. Priporočljiv je test na anti-tTG (z AGA pri otrocih mlajših od dveh let). Negativen rezultat za anti-tTG z zelo nizkimi vrednostmi (<0,1 AU) vedno namiguje na prisotnost selektivnega pomanjkanja IgA in nakazuje iskanje anti-tTG razreda IgG. (9)

Glede na to, da gre pri dokazovanju EMA in anti-tTG za protitelesa razreda IgA, je treba upoštevati morebitno pomanjkanje celotnih IgA. Več kot 2% bolnikov s celiakijo ima **primanjkljaj selektivnih IgA**, zato so lahko testi na IgA negativni kljub aktivni bolezni. Skupna vrednost IgA se zato izmeri pred testi. Če ugotovimo primanjkljaj IgA, je priporočeno opraviti test za IgG avtoprotitelesa proti deaminiranim proteinom gliadina (IgG anti-DGP). Te beljakovine se tvorijo v sluznici TČ samo pri celiakiji.(5)

1.1.1.2 HISTOLOGIJA

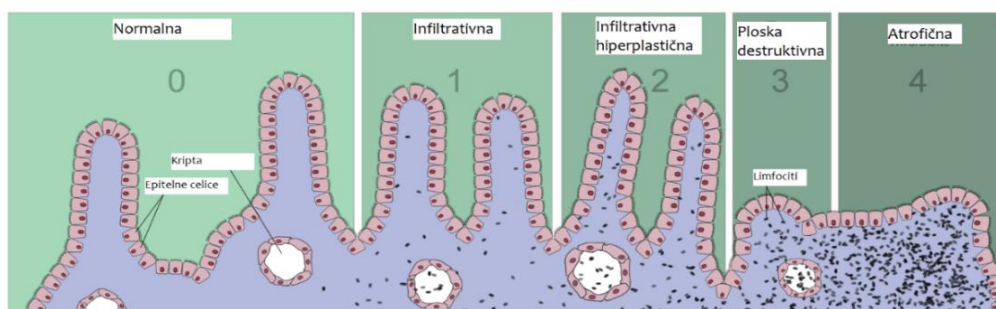
Intestinalna biopsija prvega in drugega dela dvanajstnika ostaja bistvenega pomena pri potrjevanju diagnoze celiakije. (9) V praksi se priporoča odvzem vsaj štirih do šestih endoskopskih biopsijskih vzorcev iz dvanajstnika, z dvema vzorcema iz bulbusa. (10) Izvedba biopsije samo v bulbusu je lahko izvor napake ali pa vsaj močno zmanjša občutljivost preiskave. (9) Endoskopija običajno razkrije nenormalnosti v proksimalnem delu tankega črevesja.

Histološka diagnoza je sestavljena iz celostnega ovrednotenja sledečih temeljnih poškodb:

- **Povišana vrednost intraepitelnih T limfocitov (IEL):** mejne vrednosti so med 25 in 29 IEL/100 enterocitov, vrednosti >30 IEL/100 enterocitov predstavljajo patološko limfocitozo.
- **Zmanjšana višina in sploščenost enterocitov, intracitoplazemska vakuolizacija** ter, tudi možno, vendar ne značilno, **zmanjšanje ali odsotnost mikrovilov.**
- **Hiperplazija kript:** podaljšanje regeneracijskih epitelnih kript, povezano s spremembami prisotnosti več kot ene mitoze na kripto.
- **Atrofija črevesnih resic:** zmanjšanje višine resic, sprememba normalnega razmerja resica/kripto (3:1) do popolnega izginotja resic.

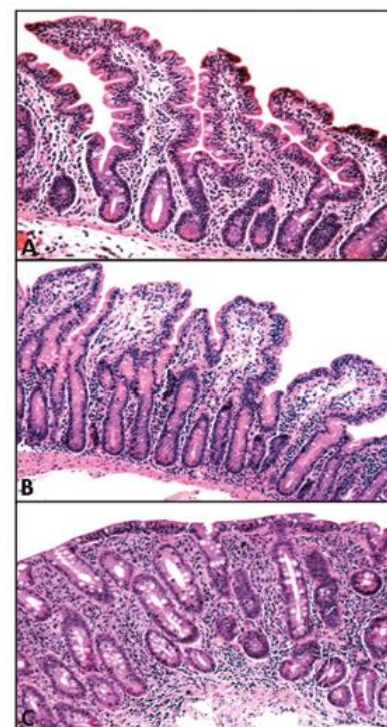
Diagnoza celiakije temelji na identifikaciji histoloških poškodb skupaj s kliničnimi in serološkimi podatki. (9) Pri analizi teh sprememb se najpogosteje uporablja klasifikacija Marsh/Oberhuber. Leta 1992 je Marsh na osnovi kliničnih raziskav črevesnih motenj in opažanj odzivov pri uvedbi glutena v prehrano, predstavil shemo razredov za razvrščanje morfoloških spektrov celiakije. V letu 1999 je Oberhuber objavil prilagojeno shemo. Marsh/Oberhuber klasifikacija opisuje pet medsebojno povezanih stanj sprememb sluznice tankega črevesa (Slika 5).

SLUZNICA DVANAJSTNIKA



Slika 5: Shema stopenj poškodb sluznice po Marsh-Oberhuber-ju.

- **Tip 0** - normalna črevesna sluznica, z manj kot 30 IEL/100 enterocitov.
- **Tip 1 oz. infiltrativna stopnja** - sluznica skoraj normalne zgradbe, normalna zgradba kript in resic, kjer je epitelij resic infiltriran z limfociti (≥ 30 IEL/100 enterocitov).
- **Tip 2 oz. infiltrativno-hiperplastična stopnja** - obsežnejše arhitekturne spremembe, predvsem hipertrofija in hiperplazija kript, črevesne resice še prisotne. Epitelij je izrazito infiltriran z limfociti (≥ 30 IEL/100 enterocitov).
- **Tip 3 oz. ploska destruktivna stopnja** - najznačilnejša sprememba pri celiakiji. Delimo jo na tri podskupine glede na stopnjo atrofije resic (10):
 - Tip 3a: blaga atrofija resic, razmerje resica/kripta $< 3:1$ ali $2:1$, ≥ 30 IEL/100 enterocitov.



Slika 6: Različne stopnje poškodb sluznice dvanaestnika pri celiakiji. A, infiltrativni tip (tip 1) ali neatrofične poškodbe (razred A). B, destruktivni tip (tip 3b) ali atrofične poškodbe (razred B1). C, ploska stopnja (tip 3c ali razred B2).

- Tip 3b: Izrazita atrofija resic, razmerje resica/kripta <1:1, ≥ 30 IEL/100 enterocitov.
- Tip 3c: Popolna atrofija resic s sploščeno sluznico, ≥ 30 IEL/100 enterocitov (Slika 6).
- **Tip 4 oz. atrofična stopnja** (tudi hipoplastična poškodba) - zelo redka oblika, s sploščeno sluznico in samo nekaj vidnimi kriptami ter vrednostmi IEL blizu normalnih. (10)

Tip 1 in 2 pogosto ostaneta neprepoznana, pri poškodbah tipa 3a in 3b pa je visoka stopnja raznolikosti določevanja, celo med strokovnjaki gastrointestinalne patologije. Corazza in Villanacci sta predlagala novo histološko klasifikacijo, ki deli poškodbe sluznice na dve kategoriji: neatrofične in atrofične poškodbe. Glede na prisotnost ali odsotnost resic se razred B deli na B1 in B2.

- **Razred A:** neatrofična, normalna struktura resic in kript, povišana vrednost IEL (>25 IEL/100 enterocitov).
- **Razred B1:** atrofična, razmerje resica/kripta <3:1, resice še zaznamo, povišana vrednost IEL (>25 IEL/100 enterocitov).
- **Razred B2:** atrofična in sploščena, odsotnost resic, povišana vrednost IEL (>25 IEL/100 enterocitov).

Preglednica I: Primerjava Marsh-Oberhuber in Corazza-Villanacci klasifikacije ter povzetek parametrov.

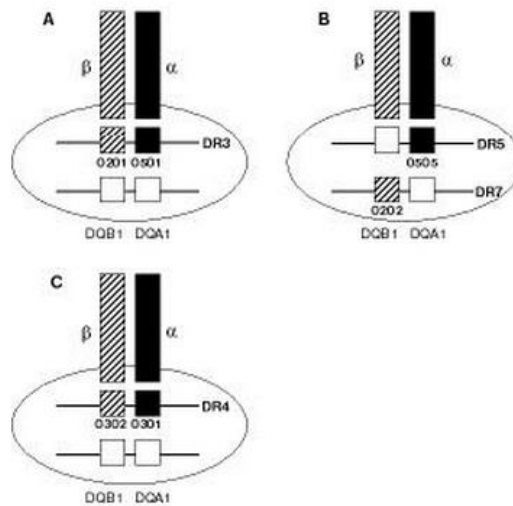
| Stara in nova histopatološka klasifikacija poškodb sluznice s parametri | | | | |
|---|---|------------------------------|---------------|------------------|
| <i>Marsh-Oberhuber klasifikacija</i> | <i>Corazza-Villanacci klasifikacija</i> | <i>IEL(/100 enterocitov)</i> | <i>Kripte</i> | <i>Č. resice</i> |
| Tip 0 | | normalno | normalne | normalne |
| Tip 1 | Razred A | >30 | normalne | normalne |
| Tip 2 | | >30 | hipertrofične | normalne |
| Tip 3a | Razred B1 | >30 | hipertrofične | blaga atrofija |
| Tip 3b | | | | zmerna atrofija |
| Tip 3c | Razred B2 | | | popolna atrofija |
| Tip 4 | Izbrisan | normalno | normalne | popolna atrofija |

Ta klasifikacija je enostavnejša in je pokazala večje strinjanje med opazovalci kot pri Marsh-Oberhuber klasifikaciji (Preglednica I). (10)

Pomembno je, da opravimo biopsijo dvanajstnika približno istočasno kot serološke teste, dokler so pri pacientu še prisotni simptomi. Bistvenega pomena za diagnostično veljavnost biopsije je tudi, da se pacient v času biopsije normalno prehranjuje. (9)

1.1.1.3 NEINVAZIVNO DIAGNOSTIČNO OVREDNOTENJE

Celiakija je tesno povezana s **človeškima levkocitnima antigenoma** (angleški izraz human leukocyte antigen-HLA) **DQ2** (kodiran z aleloma A1*05 in B1*02) in **DQ8** (kodiran z aleloma A1*03 in B1*0302) (Slika 7). (9, 11)



Slika 7: Za celiakijo je značilen genski zapis HLA-DQ2 in HLA-DQ8. Slika A predstavlja zapis HLA-DQ2 v cis konfiguraciji, slika B pa trans konfiguracijo. Na sliki C je shema zapisa HLA-DQ8.

HLA geni razreda I in II se izražajo na krajši ročici kromosoma 6 in so razporejeni zelo na gosto. HLA geni so del poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC). Odsek je razdeljen na tri regije, ki kodirajo beljakovine z različno funkcijo-I, II in III.

HLA II heterodimeri (alfa in beta verige) so določeni z geni na HLA-D regiji, ki vključuje HLA-DP (DPA1 in DPB1), DQ (DQA1 in DQB1) ali DR (DRB1 in DRA) gene. (4) DQ2 in DQ8 molekule antigen predstavitevni celic vežejo gliadinske proteine in jih predstavijo intestinalnim limfocitom T. (9)

HLA I molekule/endogene antigene specifično prepoznajo CD8⁺ T celice, ki aktivirajo citotoksični odziv. HLA II heterodimere/eksogene antigene pa vežejo CD4⁺ celice, ki pa

sprožijo humoralni odziv. (4) Aktivirane Th1 T celice izločijo vnetne citokine, ki povzročijo intestinalne poškodbe značilne za celiakijo.

Vsi bolniki so pozitivni na enega od HLA ali na frakcijo heterodimera, vendar genetsko testiranje ni nikoli signifikantno za diagnozo, saj ima vsaj 30% splošne populacije prisotna ista HLA kot bolniki s celiakijo. (9) Približno 90–95% bolnikov s celiakijo ima HLA-DQ2 genotip. Večina od 5-10% bolnikov negativnih za HLA-DQ2, nosijo HLA-DQ8 molekule. Manj kot 1% bolnikov nima ne DQ2 ne DQ8 alela. (12) Negativni rezultat za oba HLA pomeni zelo malo verjetnost za diagnozo celiakije (NNV>99%). Čeprav nepraktično in drago HLA tipiziranje ni priporočljivo za rutinsko diagnozo, jo lahko uporabimo za izključevanje celiakije pri nejasni diagnozi, saj ima več kot 95% negativno napovedno vrednost. (8)

Genetsko testiranje izvedemo pri:

- Razhajanju med serološkimi in histološkimi rezultati.
- Sorodnikih v prvem kolenu za ocenitev genetske dovzetnosti za celiakijo.

Pomen genetskega testiranja:

- Glavni klinični pomen je izključitev diagnoze ob odsotnosti HLA-DQ2 (in njegove frakcije) in –DQ8 v primeru dvoma pri diagnozi.
- Izključitev dovzetnosti za celiakijo pri družinskih članih ob odsotnosti HLA-DQ2 (in frakcij) in –DQ8. (9)

Novo ESPGHAN smernice vključujejo naslednje parametre za molekularno-genetsko diagnozo (pod ustreznimi omejitvami nemškega zakona "Gendiagnostikgesetz"):

- **HLA-DQ2** heterodimer v cis konfiguraciji (HLADR3-DQA1*0501-DQB1*0201) ali v trans konfiguraciji (HLA-DR5-DQA1*0505-DQB1*0301 in DR7-DQA1*0201-DQB1*0202) in
- **HLA-DQ8** heterodimer (HLA-DR4-DQA1*0301-DQB1*0302)

S temi novimi diagnostičnimi parametri lahko zagotovo izključimo celiakijo v primeru, da so negativni. Če so pozitivni lahko celiakijo potrdimo brez biopsije, v primeru, da so izpolnjeni vsi naslednji pogoji:

- Klasični gastrointestinalni simptomi bolezni
- Desetkratni dvig IgA anti-tTG titra nad kritično vrednostjo
- Potrditev seropozitivnosti z detekcijo EMA ($\geq 1 : 5$) v overjenem laboratoriju

- Svetovanje pediatra gastroenterologa o prednostih in slabostih biopsije dvanajstnika
- Klinično in serološko zmanjšanje simptomov po uvedbi BGD. (4, 5)

Ta diagnostična priporočila slonijo na ugotovitvi, da visok anti-tTG IgA titer napoveduje atrofijo črevesnih resic. Takšen sestav bomo našli pri nizkem odstotku bolnikov, saj je celiakija pogosto klinično tiha ali oligosimptomatska. (5)

1.1.1.4 PRESEJALNI TESTI PRI LJUDEH S TVEGANJEM

V to kategorijo spadajo ljudje z genetsko ali avtoimunsko boleznijo, kot tudi tisti s klinično sliko, ki nakazuje na celiakijo. Pri ljudeh pozitivnih na HLA-DQ2/8, se vsaki dve ali tri leta izvede test za anti-tTG IgA. Če je postavljena diagnoza celiakija, se priporoča genetsko svetovanje in testiranje bližnjih sorodnikov za HLA-DQ2/8 genotip ali anti-tTG avtoprotitelesa.

1.1.1.5 DIFERENCIALNA DIAGNOZA

Najpomembnejši problem pri diagnozi celiakije predstavljajo zgodnje poškodbe. Preglednica 2 prikazuje številna patološka stanja z enakimi morfološkimi aspekti v zgodnjih stanjih kot pri celiakiji, kar pomeni normalna struktura črevesnih resic s patološko povišanimi vrednostmi IEL (>25-30/100 epitelnih celic) (Marsh tipa I oziroma razred A) (Preglednica II). (9)

Preglednica II: Vzroki za intestinalno intraepitelno limfocitozo proksimalnega tankega črevesa, z normalno strukturo črevesnih resic.

| |
|--|
| Preobčutljivost za gluten |
| Neglutenska preobčutljivost (na primer: žita, kravje mleko, sojini izdelki, ribe, riž, piščanec) |
| Infekcije (na primer: virusni enteritis, <i>Giardia</i> , <i>Cryptosporidia</i> , <i>Helicobacter pylori</i>) |
| Razrast bakterij |
| Zdravila (na primer: NSAID) |
| Imunska disregulacija (na primer: Hašimotov tiroiditis, revmatoidni artritis, avtoimunska enteropatija) |
| Imunska deficienca (na primer: pomanjkanje IgA, splošna variabilna imunodeficienca) |
| Vnetna črevesna bolezen |
| Limfocitni in kolageni kolitis |

Za razlikovanje med temi patološkimi stanji je ključna primerna klinična ocena, ki temelji na histoloških in laboratorijskih podatkih. (9)

Diferencialna diagnostična ocena naj bi bila izvedena s ciljnim laboratorijskimi študijami in endoskopijo ter po potrebi z radiologijo, smiselno načrtovana na osnovi prehranske zgodovine, bolnikove sheme telesne mase in kliničnih rezultatov. (5)

1.2.6 ZDRAVLJENJE

Celiakija se zdravi s strogo doživljensko **brezglutensko dieto**. Striktnost pri dieti je težavna za veliko pacientov, saj so sledovi glutena prisotni pri večini hrane. Po dveh tednih diete se pri 70% bolnikov s klasičnimi simptomi stanje izboljša. Serološke značilnosti celiakije se normalizirajo v treh do dvanajstih mesecih.

V teku so prizadevanja za razvoj učinkovite podporne **farmakoterapije** za ljudi na strogi BGD, saj je upoštevanje le-te pogosto nezadostno in ker se nekateri bolniki odzovejo že na zelo majhno količino glutena (50 mg na dan, ekvivalent enege rezanca). Potencialni pristopi za zdravljenje z zdravili:

1. "glutenaze" za razgradnjo imunodominantnega peptida glutena, ki drugače ni vključen v proteolitično razgradnjo v intestinalnem lumnu,
2. zdravila za zmanjševanje črevesne prepustnosti,
3. "glutensko cepljenje" za sprožitev oralne tolerance,
4. zaviranje črevesne tTG s specifičnimi tTG blokerji,
5. blokada antigen-predstavitvenih HLA-DQ2/8,
6. modulacija pro-vnetnih črevesnih citokinov z biološkimi agensi. (5)

2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je opredelitev značilnosti genetske predispozicije, določitev seroloških značilnosti ter prednosti in slabosti le-teh pri slovenskih bolnikih od januarja 2010 dalje ter določitev uporabnosti teh lastnosti v klinični praksi. Prepoznavanje celiakije in določitev pravilne ter pravočasne diagnoze je kompleksen proces. Pri tem sta pomembni neinvazivni serološka in genetska preiskava - temeljita analiza in interpretacija krvnih izvidov ter HLA tipizacija, ki je prav tako neinvaziven, pacientu prijazen postopek, vendar z visoko negativno napovedno vrednostjo. Uporablja se predvsem kot način za izključitev celiakije in pri mejnih, nejasnih seroloških vrednostih. Prisotnost HLA-DQ2/8 genotipa je nujen vendar ne zadosten pogoj za razvoj celiakije.

Cilj raziskave je določiti osebe z genetsko predispozicijo za celiakijo, ugotoviti delež homozigotov, heterozigotov ter značilnosti alelov, določiti njihove serološke vrednosti specifičnih protiteles ter podrobno definirati medsebojno povezavo in uporabnost v klinični praksi.

Želimo primerjati zlasti vrednosti neinvazivnih preiskav, značilnih v diagnostiki celiakije.

V nalogi bomo:

- Poiskali osebe z genotipom HLA-DQ2/8, določenim s HLA tipizacijo.
- Izvedli serološke teste za pridobitev vrednosti EMA in tTG protiteles pri bolnikih z ustreznim genotipom.
- Pridobili ostale potrebne podatke za raziskavo: skupna vrednost IgA, upoštevanje BGD.
- Ovrednotili rezultate ter ugotavljali, kakšna je medsebojna povezava določenih parametrov.

Rezultate bomo statistično obdelali in skušali odgovoriti na vprašanje, ki se pojavlja v zvezi z diagnosticiranjem celiakije in na podlagi katerega smo postavili naslednjo delovno hipotezo: izvajanje HLA tipizacije in primerjava genetskih s serološkimi značilnostmi pomembno vpliva na hitrejšo, pravilnejšo in enostavnejšo diagnozo celiakije.

3 MATERIALI IN METODE

Študijo smo izvedli v sodelovanju s Kliničnim oddelkom za gastroenterologijo Interne klinike v Ljubljani, Zavodom Republike Slovenije za transfuzijsko medicino – Center za tipizacijo tkiv, Kliničnim inštitutom za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani (KIKKB) in Službo za specialno laboratorijsko diagnostiko Pediatrične klinike.

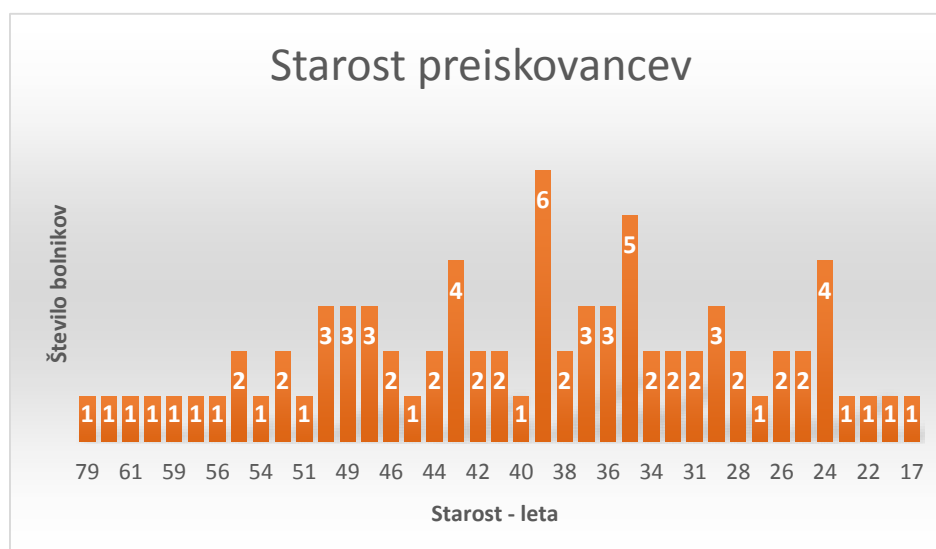
V okviru raziskave smo pri preiskovancih določili serumske vrednosti EMA in tTG, zbrali podatke o tipu HLA in prisotnosti celiakije.

3.1 PREDSTAVITEV PREISKOVANCEV

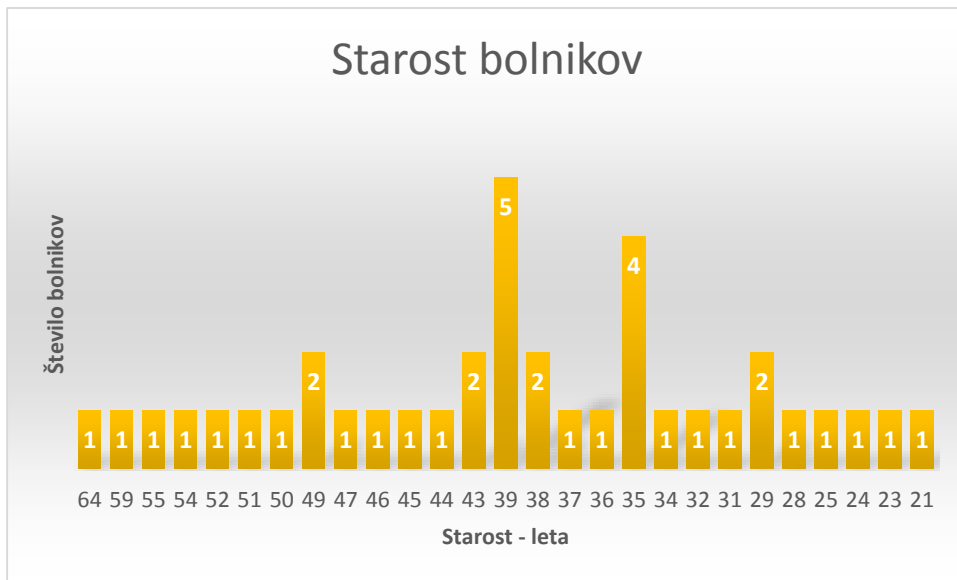
Zajeli smo 79 oseb, za katere so na Centru za tipizacijo tkiv določili tip HLA značilen za celiakijo in s tem tveganje za prisotnost le-te. Tipizacije so bile opravljene v obdobju med januarjem 2010 in decembrom 2014.

Ti preiskovanci z možnostjo za celiakijo so bili obravnavani na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo Interne klinike v Ljubljani zaradi suma na prisotnost bolezni. Operirala sem s podatki o bolnikih, ki jih je somentor pred tem zbral in šifriral (podatki brez osebnih podatkov bolnikov). Pri pregledu sem tako dobila podatke o potrjeni prisotnosti oziroma odsotnosti diagnoze celiakije.

Na KIKKB sem nato izvedla serološka testiranja za pridobitev vrednosti EMA IgA in tTG IgA iz zamrznjenih vzorcev bolnikov z reagentom, opisanim v nadaljevanju. Vse dobljene rezultate sem zbrala, preučila in statistično obdelala. Primerjala sem značilnosti skupine vseh preiskovancev in, znotraj le-teh, skupine z dokazano celiakijo.

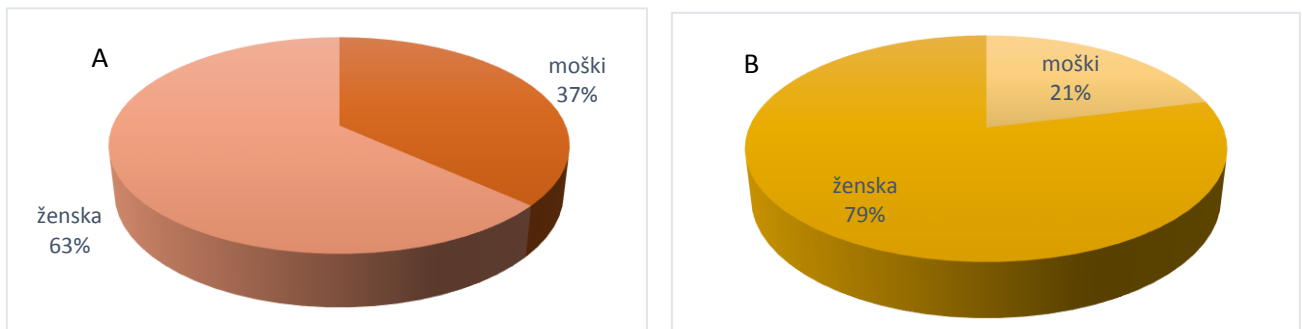


Graf 1: Prikaz starosti vseh preiskovancev z genotipom značilnim za celiakijo.



Graf 2: Prikaz starosti bolnikov s histološko dokazano celiakijo.

Starost preiskovancev je med 17 in 79 let (letniki rojstva med 1936 in 1998), v približno enakem razmerju (Graf 1, Graf 2). Zastopana sta oba spola (Graf 3).



Graf 3: Prikaz porazdelitve spola pri vseh preiskovancih z genotipom značilnim za celiakijo (A) in pri bolnikih (B).

3.2 DOLOČANJE ANTIENDOMIZIJSKIH PROTITELES (EMA) RAZREDA IgA

Encimskoimunski test (ELISA) je metoda za kvantitativno določevanje EMA IgA avtoprotiteles. Izvaja se na avtomatskem analizatorju Liaison®.

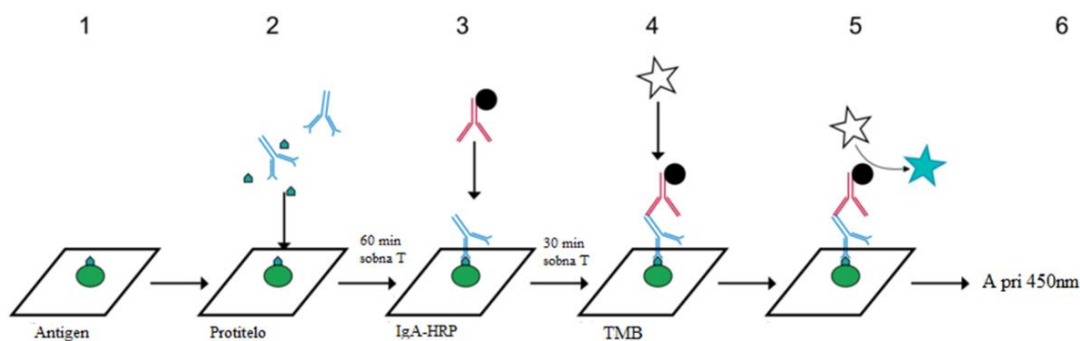
3.2.1 PRINCIP DOLOČANJA EMA IgA

Avtoprotitelesa iz razredčenih vzorcev in standardov reagirajo z avtoantigeni, ki so vezani na trdnem nosilcu mikrotitrne plošče. Poteče specifična vezava avtoprotiteles, ki jo zaznamo z imunofluorescenco. Po inkubacijskem času 60 minut pri sobni temperaturi (18 – 25 °C) se nosilec spere, za odstranitev nevezanih protiteles.

Vezana protitelesa specifično reagirajo s človeškimi-IgA protitelesi, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo (HRP). Inkubacijski čas je 30 minut pri sobni temperaturi. Odvečen konjugat se spere.

Doda se raztopino substrata 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). HRP pretvori ta brezbarvni substrat v moder produkt. To encimsko reakcijo ustavi dodatek kisle raztopine (0.25M H₂SO₄) v vdolbinice, po 15 minutah pri sobni temperaturi, s spremembo barve iz modre v rumeno (Slika 8).

Optična gostota (OG) raztopine pri 450 nm je direktno sorazmerna količini specifičnih vezi s protitelesi. Standardna krivuljo je prikazana z nanašanjem koncentracij protiteles kalibratorjev na x os in pripadajočih izmerjenih vrednosti OG na y os. Koncentracija protiteles vzorca se odčita neposredno iz krivulje (U/ml).



Slika 8: Princip določanja protiteles EMA.

3.2.2 VZORCI

Vzorec seruma dobimo z odvzgom venske krvi in centrifugacijo po strjevanju. Lipemični, hemolitični in okuženi vzorci se ne uporabljajo. Pred testiranjem morajo vzorci doseči sobno temperaturo. Z rahlim tresenjem se zagotovi homogenost.

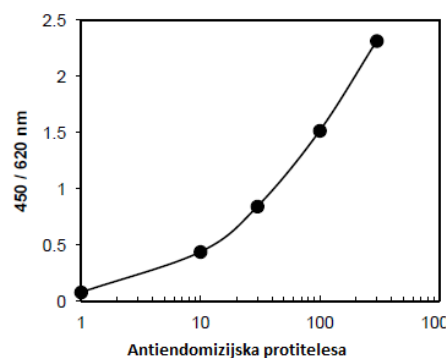
3.2.3 OBDELAVA PODATKOV

Standardno krivuljo dobimo z nanašanjem vrednosti OG kalibratorjev 0-4 na y os in pripadajoče koncentracije (logaritemske vrednosti) na x os. Neznana koncentracija protiteles iz vzorca se odčita neposredno iz krivulje (Slika 9).

Primer tipičnih rezultatov testa

| vdolbinica | OG (a) | OG (b) | OG (povp.) | E/ml |
|------------|--------|--------|------------|------|
| Kal 0 | 0.072 | 0.084 | 0.078 | 1 |
| Kal1 | 0.425 | 0.450 | 0.438 | 10 |
| Kal2 | 0.825 | 0.859 | 0.842 | 30 |
| Kal3 | 1.501 | 1.530 | 1.516 | 100 |
| Kal4 | 08 | 2.322 | 2.315 | 300 |
| bolnik | 1.241 | 1.260 | 1.250 | 65 |

Tipična umeritvena krivulja



Slika 9: Primer tipičnih rezultatov testa za EMA in umeritvene krivulje.

3.3 DOLOČANJE PROTITELES RAZREDA IgA PROTI TKIVNI TRANSGLUTAMINAZI (tTG)

Indirektna kemiluminiscenčna metoda (CLIA) je metoda za kvantitativno določanje protiteles IgA proti tkivni transglutaminazi. Izvaja se na avtomatskem analizatorju Liaison®.

3.3.1 PRINCIP DOLOČANJA tTG IgA

Človeška rekombinantna tTG (iz bakulovirusov) prekriva magnetne delce (trdna faza). Mišja monoklonalna protitelesa proti človeškim IgA so vezana na derivat isoluminola (konjugat isoluminol-protitelo). Med prvo inkubacijo se anti-tTG prisotna v kalibratorjih, vzorcih ali kontrolah vežejo na trdno fazo. Med drugo inkubacijo reagira konjugat s tTG IgA, že vezano na trdni fazi. Po vsaki inkubaciji se nevezan material odstrani s spiranjem. Dodatek start reagentov sproži kemiluminiscenčno reakcijo (Slika 10).



Slika 10: Princip določanja protiteles tTG.

Svetlobni signal in nadalje količina konjugata isoluminol-protitelo se izmeri s fotopomnoževalcem kot relativne svetlobne enote (ang. Relative light units RLS) in nakazuje koncentracijo tTG IgA v kalibratorjih, vzorcih in kontrolah.

3.3.2 VZORCI

Vzorec seruma dobimo z odvzemom venske krvi in ločitvi od strdka po strjevanju. Vzorce lahko hranimo do enega tedna pri temperaturi 2–8 °C, daljše shranjevanje poteka pri -20 °C.

3.3.3 INTERPRETACIJA REZULTATOV

Analizator avtomatsko izračuna koncentracijo anti-tTG IgA, izraženo v arbitrarnih enotah (AE/ml) in rezultate razvrsti. Analizator neposredno izračuna anti-tTG IgA do 800 AE/ml.

3.4 HLA TIPIZACIJA

S HLA tipizacijo identificiramo gene poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa, ki jih je oseba podedovala ter pripadajoče antigene, prisotne na površini njihovih celic. Ti antigeni pomagajo imunskemu sistemu telesa razločevati med "svojimi" in "ne-svojimi" oziroma "tujimi" celicami. Celice prepoznane kot slednje lahko sprožijo imunski odgovor, vključno s proizvodnjo protiteles.

HLA gensko testiranje se med drugim uporablja tudi kot pomoč pri diagnozi avtoimunskih motenj, ko se telo nepravilno odzove na njemu lastne celice s proizvodnjo protiteles (avtoprotiteles). (13)

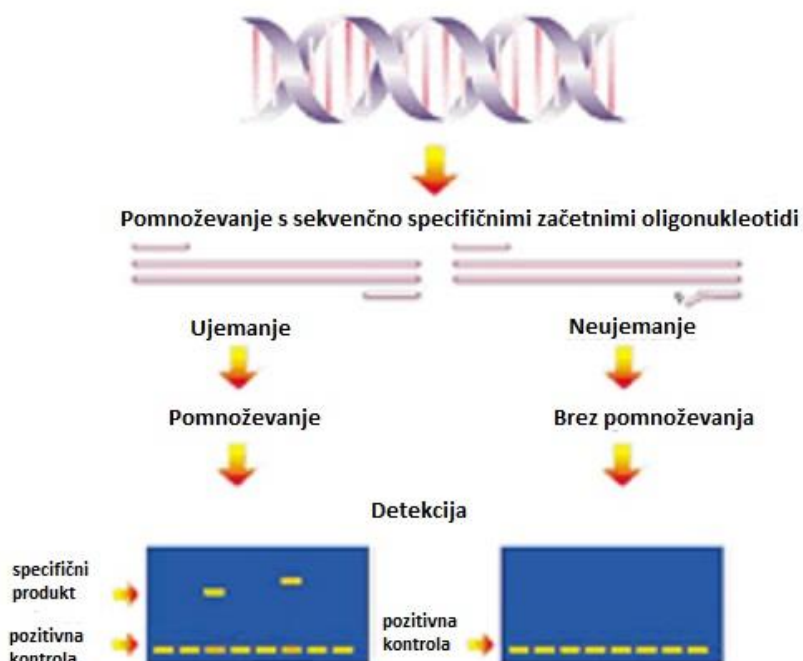
V preiskavi smo zajeli rezultate HLA tipizacij opravljenih v obdobju od začetka leta 2010 do konca 2014. Iz krvnih vzorcev darovalcev, ki jih takoj po odvzemu anonimizirajo s pomočjo kodne oznake darovalca, izolirajo deoksiribonukleinsko kislino (DNA) ter v njej s pomočjo posebnih postopkov pomnoževanja in zaznavanja na osnovni oziroma nizki stopnji ločljivosti razberejo osnovne značilnosti genskih zapisov za antigene HLA.

DNA tipizacija se je izvajala po postopku PCR-SSP in PCR-SSO Luminex.

3.4.1 Metoda PCR-SSP – Verižna reakcija s polimerazo in sekvenčno specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (angl. *polymerase chain reaction based sequence-specific priming*)

PCR-SSP je metoda, ki za tipizacijo uporablja sekvenčno specifične začetne oligonukleotide, ki v procesu PCR (verižna reakcija s polimerazo) pomnožijo odseke tarčne DNA. (14), (15)

Temelji na vezavi para specifičnih začetnih oligonukleotidov, ki sta na 3'-koncu komplementarna s tarčnim DNA zaporedjem. Neujemanje začetnih oligonukleotidov s tarčno DNA



Slika 11: Shema metode PCR-SSP.

zavre pomnoževanje. Ta pristop se uporablja za pomnoževanje specifičnih alelov.

Produkte na koncu se detektira z elektroforezo na agaroznem gelu, kjer se preko mobilnosti (molekulska teža) določi specifičnost pomnoženega odseka. Pomnožki z nižjo molekulsko maso potujejo hitreje od tistih z višjo (Slika 11). (14, 15)

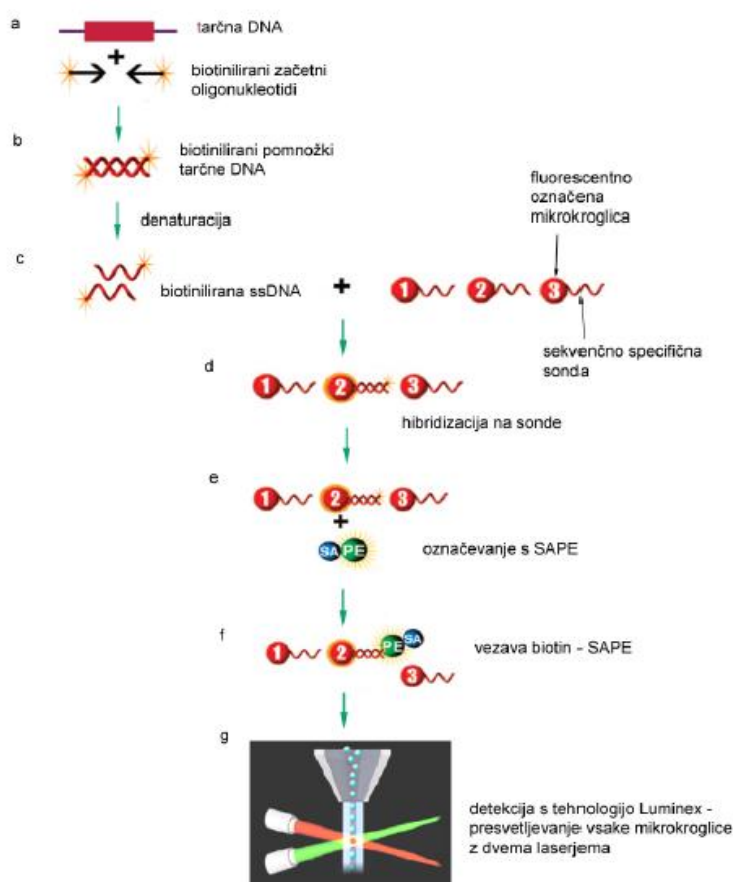
3.4.2 Metoda PCR-SSO – Verižna reakcija s polimerazo in hibridizacijo s sekvenčno specifičnimi oligonukleotidi (angl. *polymerase chain reaction based sequence-specific oligonucleotide hybridisation*) ter Luminex tehnologijo

Metoda uporablja za določitev alelov v vzorcu DNA sekvenčno specifične oligonukleotidne sonde, vezane na fluorescentno označene mikrokroglice. S PCR, z lokusno specifičnimi biotiniliranimi začetnimi oligonukleotidi, najprej pomnožimo tarčno DNA. Le-ti omogočajo pomnoževanje polimorfnih delov lokusa analiziranega HLA (drugega eksona pri genih HLA II. razreda in tretjega eksona pri genih HLA I. razreda). Rezultat so pomnožki označeni z biotinom.

Naslednji korak je denaturacija pomnoženih zaporedij na enoverižne odseke DNA in inkubacija s sondami, ki so konjugirane na mikrokroglice. Sonde so specifične za alel ali

skupino alelov. Enoverižni odseki vzorčne DNA se med procesom hibridizacije vežejo na sonde s komplementarnimi zaporedji (v posameznem kompletu za tipiziranje HLA je tudi po več sto različnih sond).

Sledi spiranje nevezanih pomnožkov in dodatek R-fikoeritrin-konjugiranega streptavidina (SAPE). Le-ta se veže na biotinizirane pomnožke hibridizirane na sonde, saj ima fikoeritrin, vezan znotraj SAPE, izredno visoko afiniteto do biotina. S tem je omogočeno fluorescentno zaznavanje sond. Analizator Luminex presvetli vsako mikrokroglico z vezanimi sondami z dvema laserjema. Zeleni laser vzbudi fikoeritin, torej zazna le tiste sonde, na katere se je vezala vzorčna DNA označena z biotinom. Rdeči laser pa vzbudi barvilo znotraj mikrokroglice s specifičnimi sondami in jo tako razpozna. Intenziteta fluorescence se pretvori v elektronsko obliko. Alel oz. skupino alelov se nato določi z računalniškim programom (Slika 12). (14)



Slika 12: Shema postopka PCR-SSO Luminex.

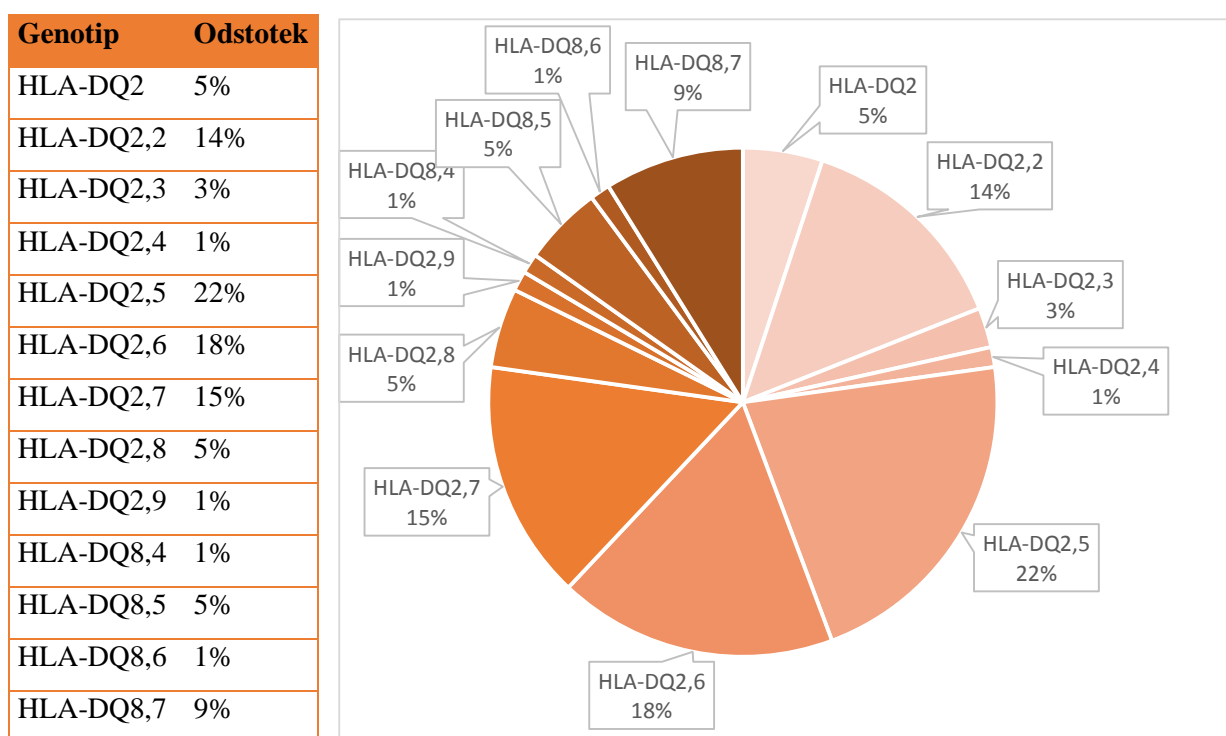
4 REZULTATI

4.1 Skupina preiskovancev

4.1.1 Tipi HLA

Rezultate HLA tipizacij smo pregledali in izbrali tiste osebe z genotipi značilnimi za bolezen (preiskovanci). Ugotovili smo, da je prisotnih več različnih genotipov, ki določajo homozigote in heterozigote med preiskovanci. Genotipi, prisotni v naši skupini 79 preiskovancev, in njihovi deleži so predstavljeni v Preglednica III in Graf 4).

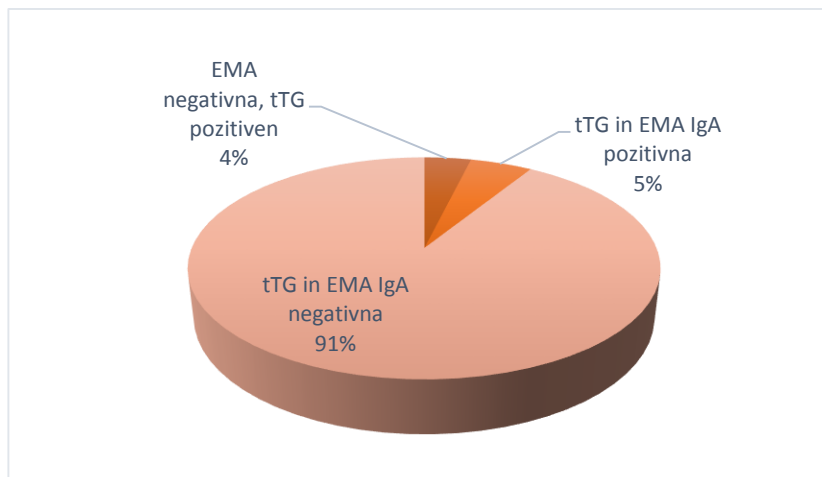
Preglednica III: Genotipi in njihov delež v skupini preiskovancev z genotipom značilnim za celiakijo.



Graf 4: Prikaz porazdelitve genotipov v skupini preiskovancev.

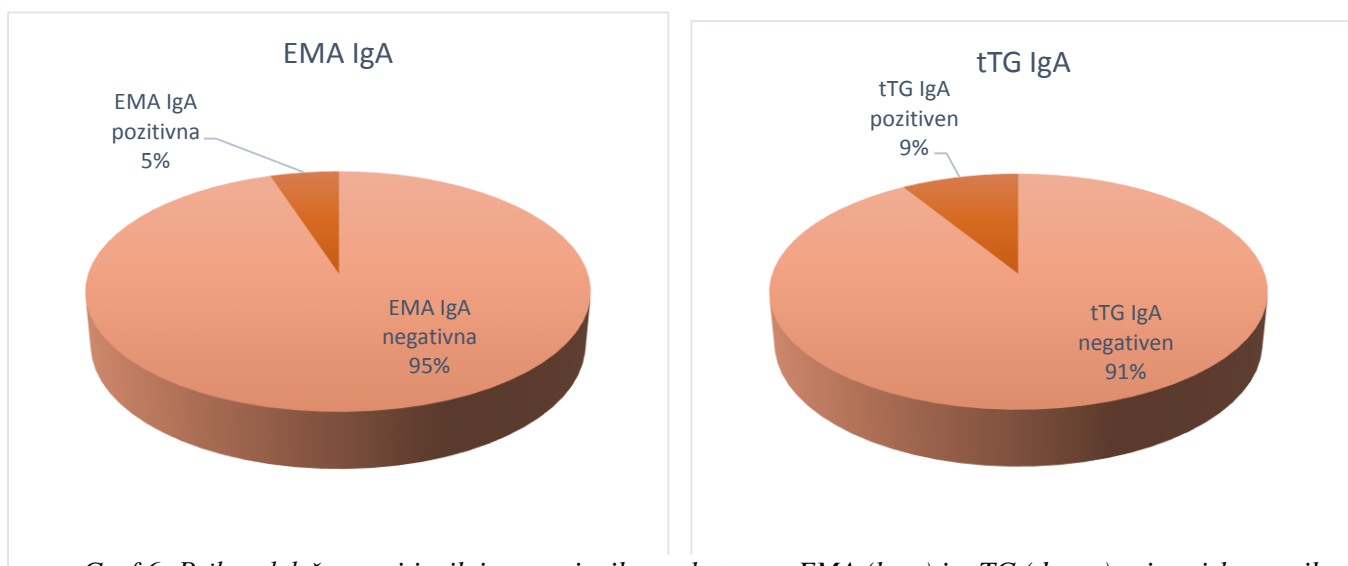
4.1.2 Vrednosti EMA IgA in tTG IgA

Za vse osebe, s HLA značilnim za celiakijo, smo izvedli testiranje za pridobitev vrednosti EMA in tTG protiteles. Pri večjem deležu preiskovancev (91%) so vrednosti EMA in tTG negativne, pri 5% so pozitivne, pri 4% pa je pozitivna samo vrednost tTG. Rezultati so predstavljeni z grafikoni 5 in 6.



Graf 5: Prikaz rezultatov seroloških testiranj in njihovi deleži pri preiskovancih.

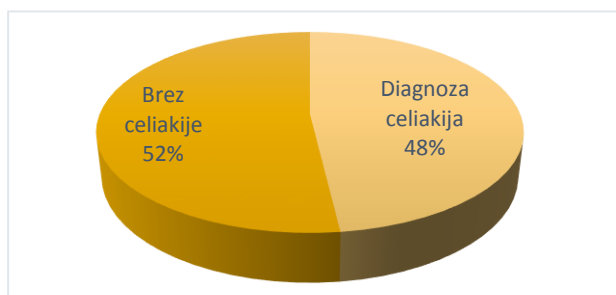
V skupini preiskovancev je 5% rezultatov za EMA in 9% rezultatov za tTG pozitivnih (Graf 6).



Graf 6: Prikaz deležev pozitivnih in negativnih rezultatov za EMA (levo) in tTG (desno) pri preiskovancih.

4.1.3 Diagnoza celiakije

Analizirali smo kartoteke preiskovancev in izbrali tiste, ki jim je bila celiakija histološko dokazana. Ugotovili smo, da je pri 48% preiskovancev bolezen prisotna. To je naša skupina bolnikov. (Graf 7)



Graf 7: Prikaz deleža bolnikov z dokazano celiakijo.

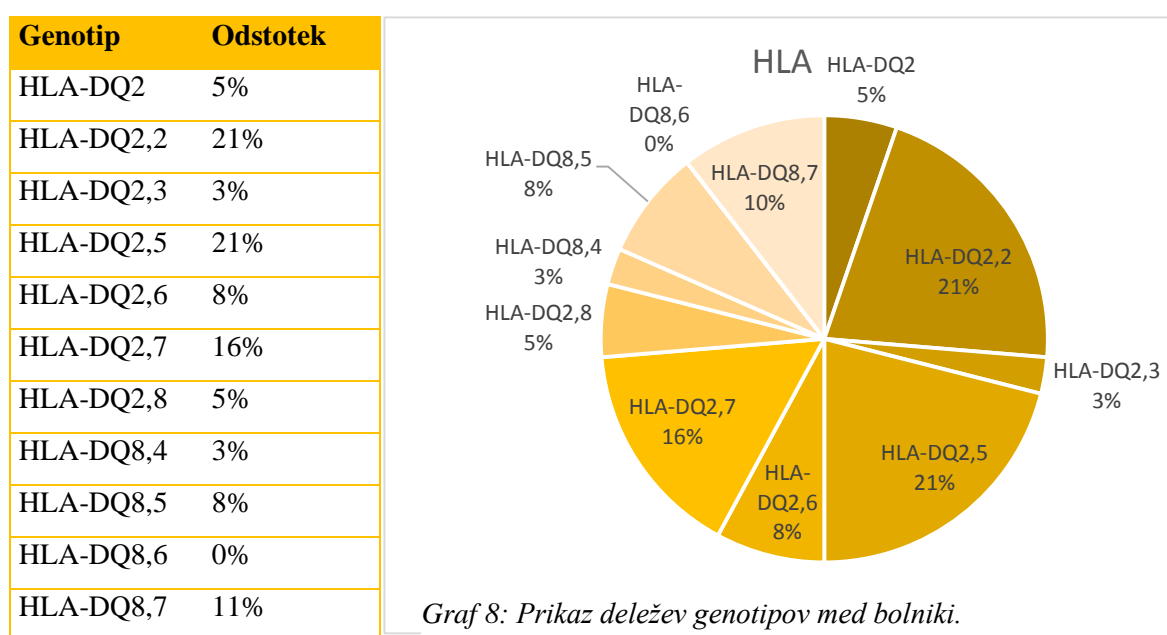
Podatke o seroloških in genetskih testiranjih bolnikov smo zbrali, jih analizirali, obdelali in primerjali z rezultati preiskovancev.

4.2 Skupina bolnikov

4.2.1 Tipi HLA pri bolnikih

Genotipi prisotni v naši skupini bolnikov in njihovi deleži so predstavljeni v tabeli in z grafikonom (Preglednica IV, Graf 8).

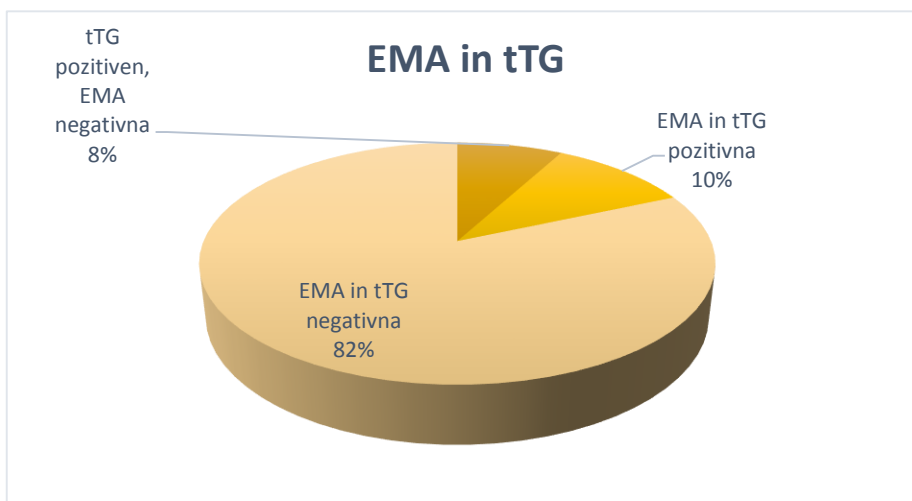
Preglednica IV: Genotipi in njihov delež v skupini bolnikov s celiakijo.



Graf 8: Prikaz deležev genotipov med bolniki.

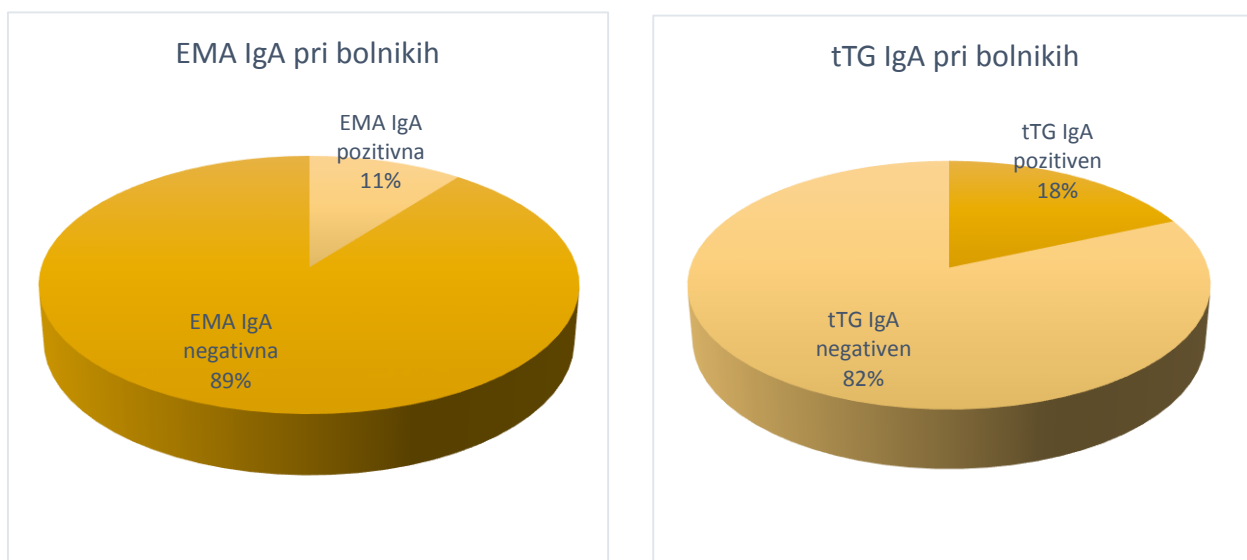
4.2.2 Vrednosti EMA IgA in tTG IgA pri bolnikih

Zbrali smo naše rezultate opravljenih seroloških testiranj za skupino bolnikov. Pri deležu bolnikov je rezultat negativen za EMA in tTG (82%), pri deležu pozitiven (10%) in pri ostalih negativen za EMA in pozitiven za tTG (8%) (Graf 9).



Graf 9: Prikaz rezultatov seroloških testiranj in njihovi deleži pri bolnikih.

V skupini bolnikov je rezultat za EMA pri 11% in za tTG pri 18% pozitiven (Graf 10).



Graf 10: Prikaz deležev pozitivnih in negativnih rezultatov za EMA (levo) in tTG (desno) pri bolnikih.

4.3 OBDELAVA REZULTATOV

4.3.1 HLA tipizacija

Dobljene podatke smo analizirali in določili značilnosti genetskih predispozicij. HLA-DQ2 je prisoten v višjem odstotku kot HLA-DQ8. V celotni skupini preiskovancev je odstotek homozigotov HLA-DQ2,2 14%, med bolniki pa 21%. Heterozigotov med preiskovanci je 76% in 70% med bolniki. Heterozigotov HLA-DQ2,8 je v obeh primerih 5%. Med bolniki se genotipi HLA-DQ2,4, HLA-DQ2,9 in HLA-DQ8,6 ne pojavijo.

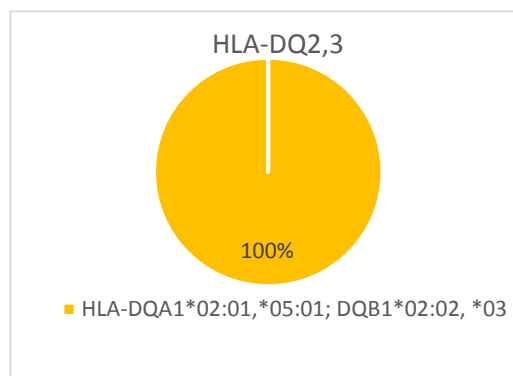
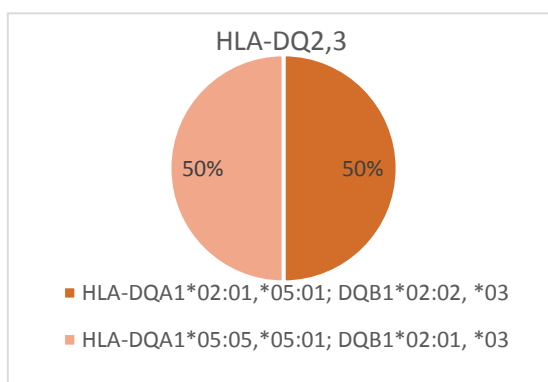
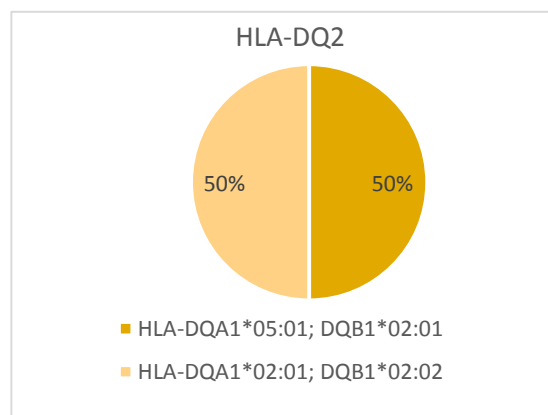
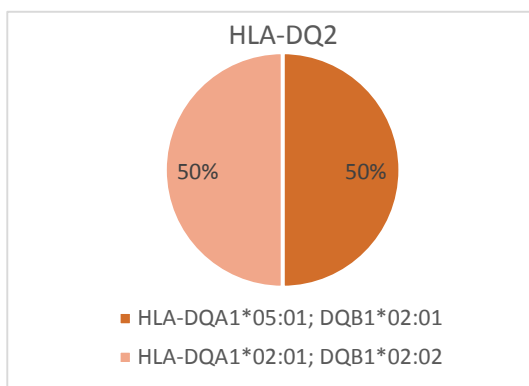
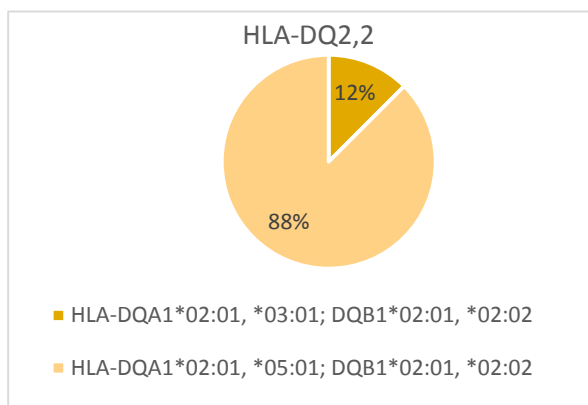
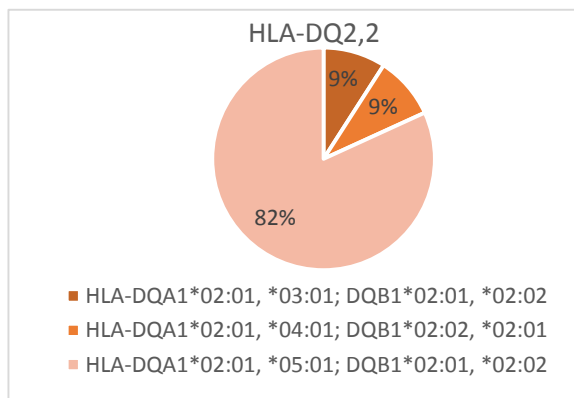
V najvišjem odstotku se pri osebah nagnjenih k celiakiji pojavlja HLA-DQ2,5, HLA-DQ2,6 in HLA-DQ2,7. Pri bolnikih so to HLA-DQ2,2, HLA-DQ2,5 in HLA-DQ2,7 (Preglednica V).

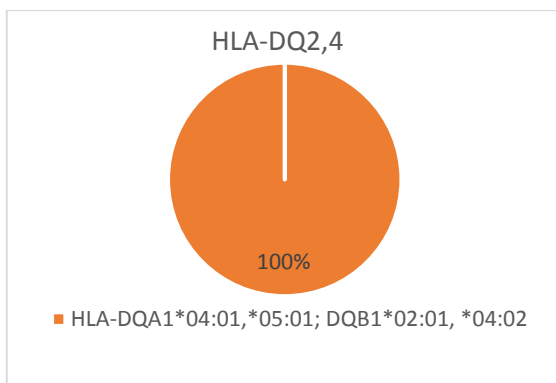
Preglednica V: Prikaz genotipov in njihovih deležev med preiskovanci (levo) in bolniki (desno).

| Genotip | Odstotek |
|-----------|----------|
| HLA-DQ2 | 5% |
| HLA-DQ2,2 | 14% |
| HLA-DQ2,3 | 3% |
| HLA-DQ2,4 | 1% |
| HLA-DQ2,5 | 22% |
| HLA-DQ2,6 | 18% |
| HLA-DQ2,7 | 15% |
| HLA-DQ2,8 | 5% |
| HLA-DQ2,9 | 1% |
| HLA-DQ8,4 | 1% |
| HLA-DQ8,5 | 5% |
| HLA-DQ8,6 | 1% |
| HLA-DQ8,7 | 9% |

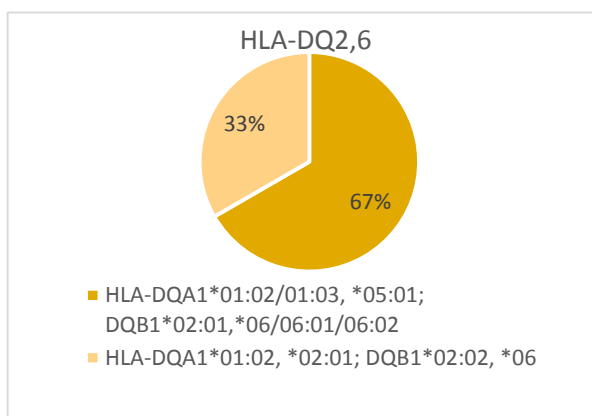
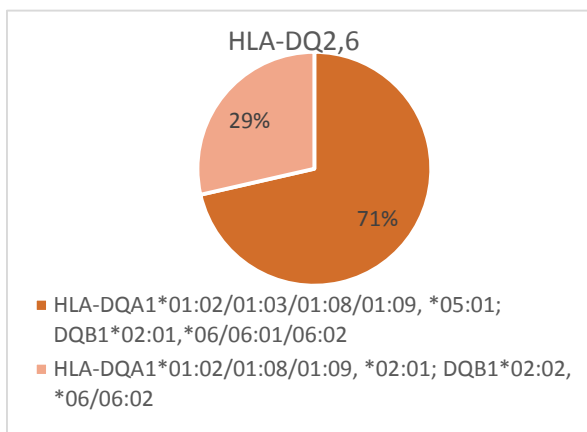
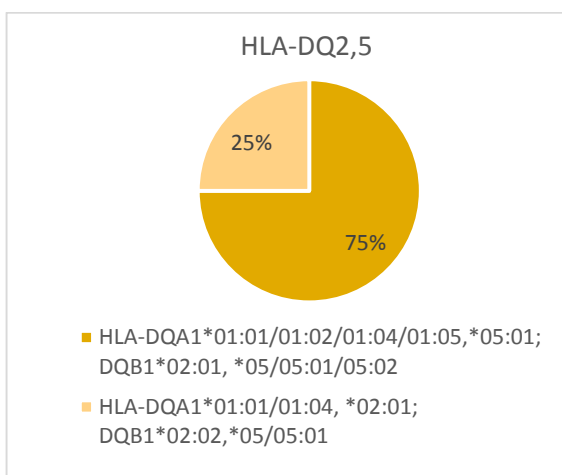
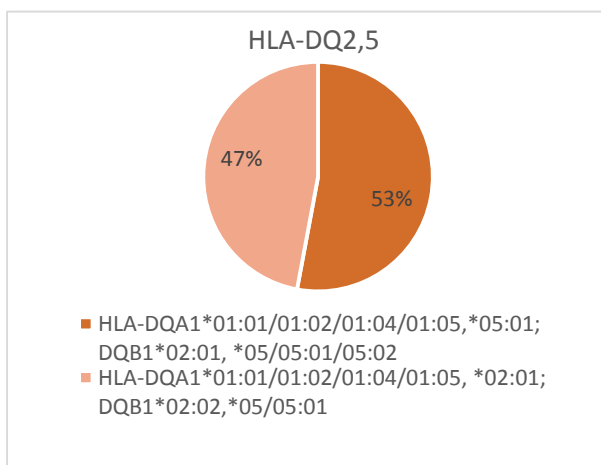
| Genotip | Odstotek |
|-----------|----------|
| HLA-DQ2 | 5% |
| HLA-DQ2,2 | 21% |
| HLA-DQ2,3 | 3% |
| HLA-DQ2,5 | 21% |
| HLA-DQ2,6 | 8% |
| HLA-DQ2,7 | 16% |
| HLA-DQ2,8 | 5% |
| HLA-DQ8,4 | 3% |
| HLA-DQ8,5 | 8% |
| HLA-DQ8,7 | 11% |

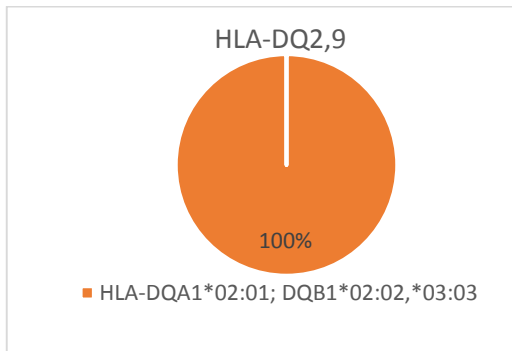
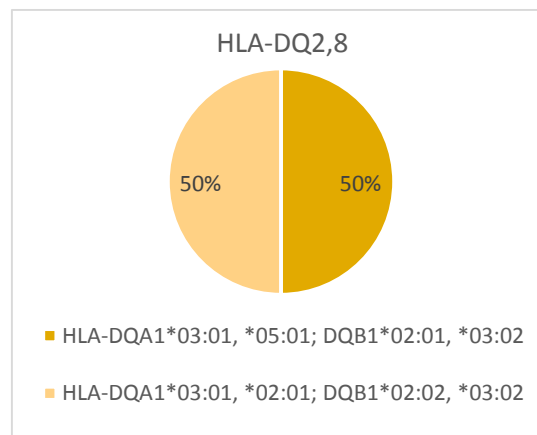
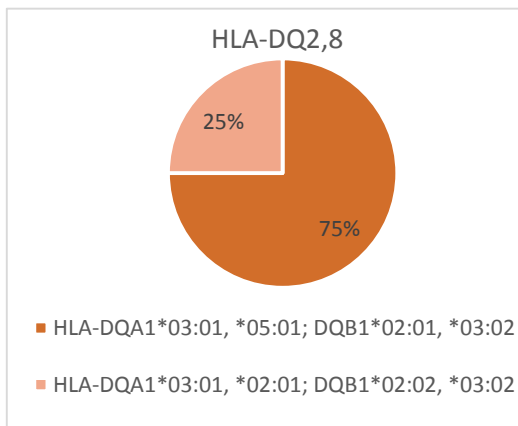
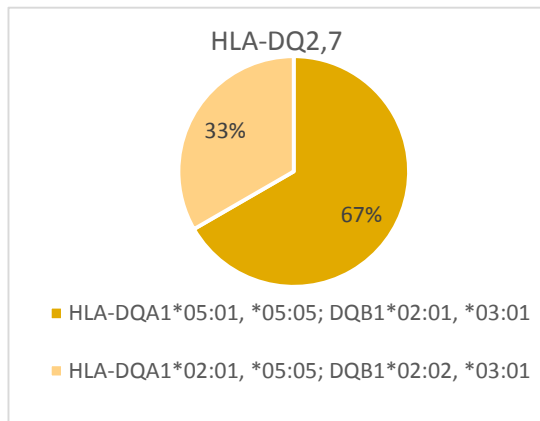
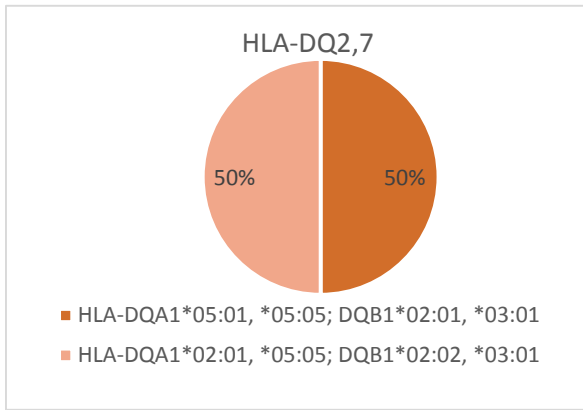
Nekatere izmed genotipov določajo različne kombinacije haplotipov. Rezultate smo razvrstili glede na genotip posebej za skupino preiskovancev in bolnikov ter pogostnost posameznih haplotipov prikazali na grafikonih (Graf 11).



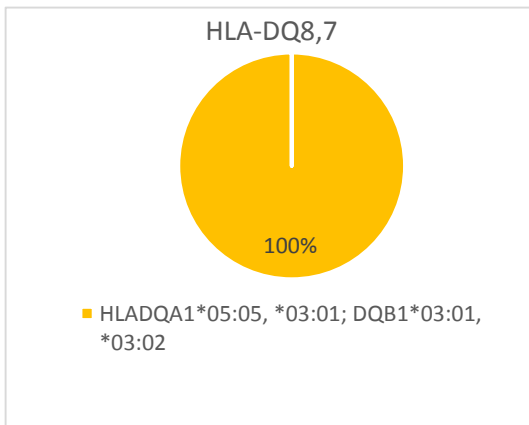
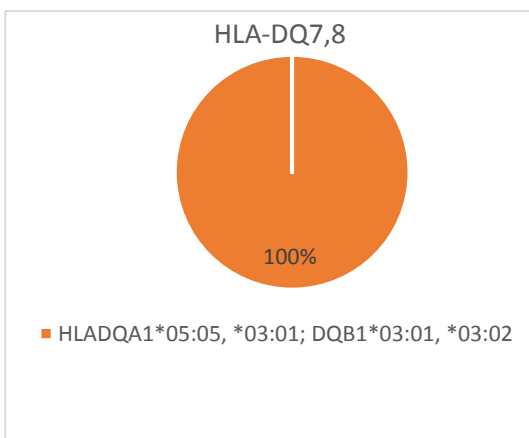


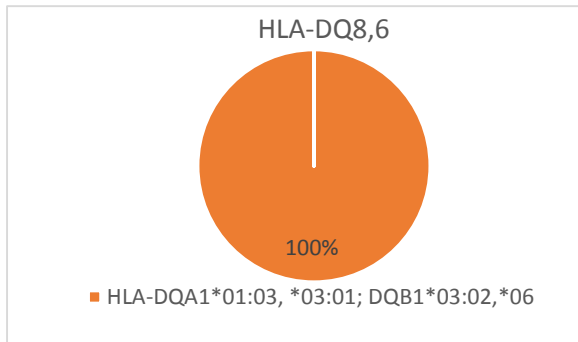
HLA-DQ2,4 genotip pri bolnikih ni prisoten.



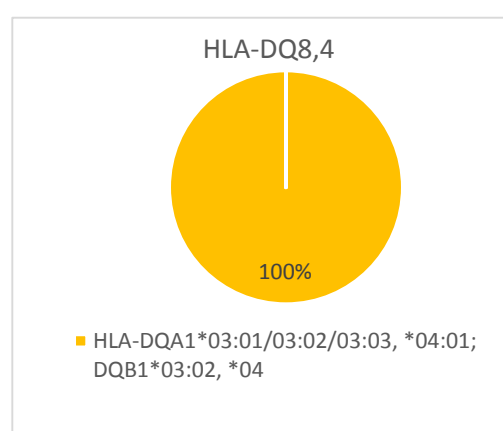
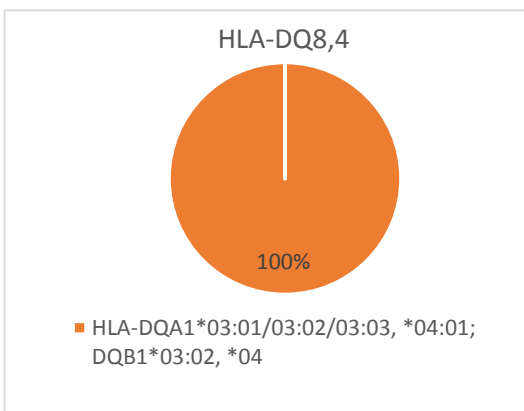
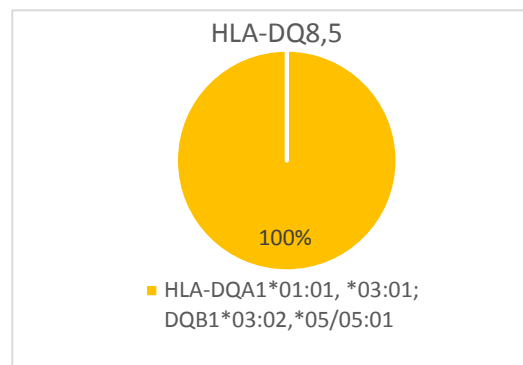
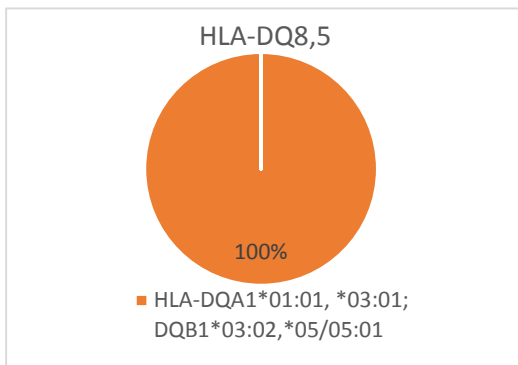


HLA-DQ2,9 genotip pri bolnikih ni prisoten.





HLA-DQ8,6 genotip pri bolnikih ni prisoten.



Graf 11: Prikaz deležev posameznih kombinacij haplotipov po genotipih pri preiskovancih (levi stolpec) in bolnikih (desni stolpec).

Analizirali smo alele znotraj skupine bolnikov in izračunali v kakšnem odstotku je posamezen alel prisoten med njimi (Graf 12).

Ugotovili smo, da so vse izmed naslednjih 4 kombinacij alelov prisotne samo pri bolnikih:

- **HLA-DQ2,2** (A1*02:01,*03:01; DQB1*02:01,*02:02),
- **HLA-DQ2,3** (A1*02:01,*05:01; DQB1*02:02,*03),

- **HLA-DQ2,8** (A1*03:01,*02:01; DQB1*02:02,*03:02) in
- **HLA-DQ8,4** (A1*03:01/03:02/03:03,*04:01; DQB1*03:02,*04).

Naslednjih kombinacij alelov pa med bolniki ni:

- **HLA-DQ2,2** (A1*02:01,*04:01; DQB1*02:02,*02:01),
- **HLA-DQ2,4** (A1*04:01,*05:01; DQB1*02:01,*04:02),
- **HLA-DQ2,3** (A1*05:05,*05:01; DQB1*02:01,*03),
- **HLA-DQ2,9** (A1*02:01; DQB1*02:02,*03:03) in
- **HLA-DQ8,6** (A1*01:03,*03:01; DQB1*03:02,*06).



Graf 12: Prikaz deležev kombinacij haplotipov med bolniki.

V visokem odstotku (nad 60%) so pri bolnikih tudi:

- **HLA-DQ2,2** (A1*02:01,*05:01; DQB1*02:01,*02:02),
- **HLA-DQ8,5** (A1*01:01,*03:01; DQB1*03:02,*05/05:01),
- **HLA-DQ2,5** (A1*01:01/01:02/01:04/01:05,*05:01;DQB1*02:01,*05/05:01/05:02)
in
- **HLA-DQ2,7** (A1*05:01,*05:05; DQB1*02:01,*03:01).

4.3.2 Vrednosti EMA in tTG

Rezultate testiranj za EMA in tTG smo analizirali glede na celotno skupino preiskovancev ter nato še znotraj bolnikov.

Rezultati za EMA so podani kot negativen ali pozitiven rezultat, za tTG pa je določena referenčna vrednost, glede na katero je rezultat podan kot pozitiven ali negativen. Rezultati se pojavljajo na tri načine: EMA in tTG sta negativna, EMA in tTG sta oba pozitivna, pri nekaterih pa je EMA negativna in tTG pozitiven.

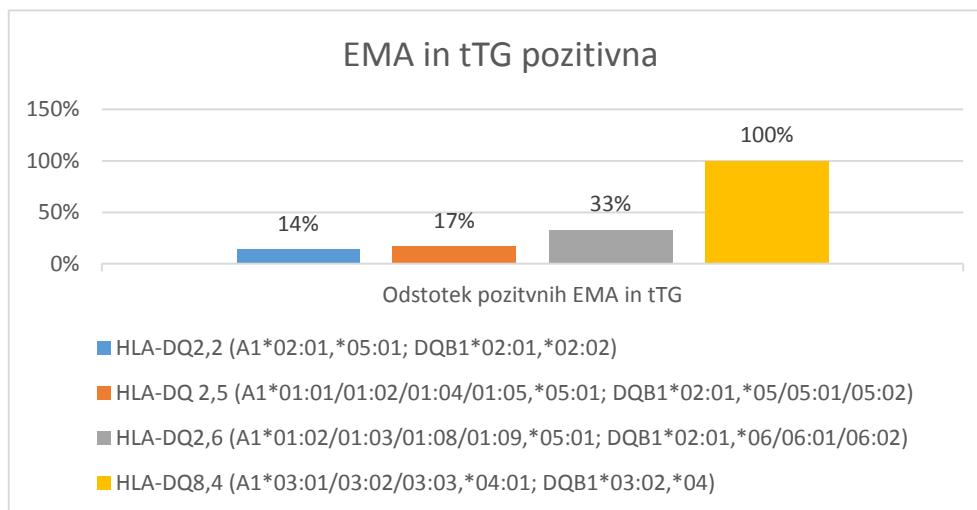
Pri osebah brez dokazane celiakije so vsa serološka testiranja negativna. Pozitivni rezultati so samo med bolniki z določenimi kombinacijami alelov.

Tako EMA in tTG sta pozitivna pri:

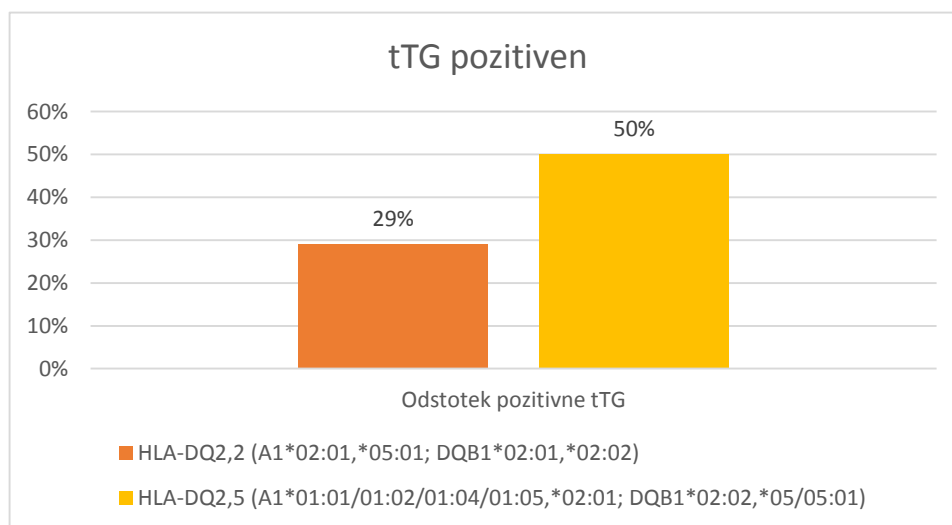
- **HLA-DQ2,2** (A1*02:01,*05:01; DQB1*02:01,*02:02)
- **HLA-DQ2,5** (A1*01:01/01:02/01:04/01:05,*05:01; DQB1*02:01,*05/05:01/05:02)
- **HLA-DQ2,6** (A1*01:02/01:03/01:08/01:09,*05:01; DQB1*02:01,*06/06:01/06:02)
in
- **HLA-DQ8,4** (A1*03:01/03:02/03:03,*04:01; DQB1*03:02,*04) (Graf 13).

Samo tTG je pozitiven pri naslednjih alelih:

- **HLA-DQ2,2** (A1*02:01,*05:01; DQB1*02:01,*02:02) in
- **HLA-DQ2,5** (A1*01:01/01:02/01:04/01:05,*02:01; DQB1*02:02,*05/05:01) (Graf 14).



Graf 13: Prikaz odstotka pozitivnih seroloških rezultatov EMA in tTG glede na kombinacije haplotipov.



Graf 14: Prikaz odstotka pozitivnih seroloških rezultatov za tTG glede na kombinacije haplotipov.

5 RAZPRAVA

Prepoznavanje celiakije in določevanje diagnoze je kompleksen proces. Z analizo v okviru našega raziskovalnega dela smo želeli podrobno preučiti predvsem genetske značilnosti in razlike pri bolnikih s celiakijo v Sloveniji, hkrati pa opredeliti serološke značilnosti bolnikov in določiti uporabnost vseh v klinični praksi.

Vpogled v kartoteke preiskovancev nam je razkril podatek, da so celiakijo pri bolnikih s sumljivo klinično sliko histološko dokazali pri 48% preiskovancev.

Pri obdelavi izvidov HLA tipizacij smo v skladu z našimi pričakovanji ugotovili, da je HLA-DQ2 prisoten pogosteje kot HLA-DQ8. Med vsemi preiskovanci je odstotek HLA-DQ2 84%, pri bolnikih pa 78% (Preglednica VI). Ta rezultat je sicer nižji kot v literaturi, ki pravi, da ima 90-95% bolnikov s celiakijo HLA-DQ2 genotip. Predvidevamo, da je višji delež HLA-DQ8 posledica genetskih razlik med narodi.

Preglednica VI: Prikaz deležev homozigotov in heterozigotov.

| | Preiskovanci | Bolniki |
|-----------------------------------|---------------------|----------------|
| Prisotnost HLA-DQ2 | 84% | 78% |
| Prisotnost HLA-DQ8 | 16% | 22% |
| Homozigoti s HLA-DQ2,2 | 14% | 21% |
| Bolniki s HLA-DQ2 | 5% | 5% |
| Heterozigoti HLA-DQ2,X, HLA-DQ8,X | 81% | 74% |

Podrobneje smo pregledali izvide in določili alele, ki definirajo posamezne genotipe. Po ena kombinacija haplotipov določa heterozigote genotipe HLA-DQ8, X in HLA-DQ2,9 in 2,4. Ostale določata 2 ali 3 kombinacije haplotipov (Preglednica VII).

Preglednica VII: Kombinacije alelov, ki definirajo posamezne genotipe.

| | |
|------------------|--|
| HLA-DQ2 | HLA-DQA1*05:01; DQB1*02:01 |
| | HLA-DQA1*02:01; DQB1*02:02 |
| HLA-DQ2,2 | HLA-DQA1*02:01, *03:01; DQB1*02:01, *02:02 |
| | HLA-DQA1*02:01, *05:01; DQB1*02:01, *02:02 |
| HLA-DQ2,3 | HLA-DQA1*02:01,*05:01; DQB1*02:02, *03 |
| HLA-DQ2,5 | HLA-DQA1*01:01/01:02/01:04/01:05,*05:01; DQB1*02:01, *05/05:01/05:02 |
| | HLA-DQA1*01:01/01:04, *02:01; DQB1*02:02,*05/05:01 |
| HLA-DQ2,6 | HLA-DQA1*01:02/01:03, *05:01; DQB1*02:01,*06/06:01/06:02 |
| | HLA-DQA1*01:02, *02:01; DQB1*02:02, *06 |
| HLA-DQ2,7 | HLA-DQA1*05:01, *05:05; DQB1*02:01, *03:01 |
| | HLA-DQA1*02:01, *05:05; DQB1*02:02, *03:01 |
| HLA-DQ2,8 | HLA-DQA1*03:01, *05:01; DQB1*02:01, *03:02 |
| | HLA-DQA1*03:01, *02:01; DQB1*02:02, *03:02 |
| HLA-DQ8,7 | HLADQA1*05:05, *03:01; DQB1*03:01, *03:02 |
| HLA-DQ8,6 | HLA-DQA1*01:03, *03:01; DQB1*03:02,*06 |
| HLA-DQ8,5 | HLA-DQA1*01:01, *03:01; DQB1*03:02,*05/05:01 |
| HLA-DQ8,4 | HLA-DQA1*03:01/03:02/03:03, *04:01; DQB1*03:02, *04 |

HLA-DQ2 bolnikov določata v 43% A1*02:01,B1*02:02 ali A1*05:01,B1*02:01 v 57%. HLA-DQ8 pa A1*03:01,B1*03:02 v 100%.

Zanimalo nas je v kolikšnem deležu (glede na vse preiskovance) so določene kombinacije haplotipov prisotne pri bolnikih. Ugotovili smo, da so naslednje 4 kombinacije haplotipov prisotne zgolj pri bolnikih:

- **HLA-DQ2,2** (A1*02:01,*03:01; DQB1*02:01,*02:02),
- **HLA-DQ2,3** (A1*02:01,*05:01; DQB1*02:02,*03),
- **HLA-DQ2,8** (A1*03:01,*02:01; DQB1*02:02,*03:02) in
- **HLA-DQ8,4** (A1*03:01/03:02/03:03,*04:01; DQB1*03:02,*04)

Iz tega bi bilo možno sklepati, da lahko osebam s takšno kombinacijo haplotipov, z veliko verjetnostjo napovemo celiakijo. Vendar so posamezniki s takšnimi kombinacijami haplotipov samo 4 (po eden na vsako kombinacijo haplotipov), zato bi za takšne zaključke

potrebovali večjo, bolj homogeno, reprezentativnejšo skupino bolnikov. Vsekakor pa se tudi pri tej analizi kažejo razlike rezultatov pri različnih narodih.

Pregledali smo še haplotipe, ki jih ima večje število bolnikov (med 4 in 9). Najpogostejše so naslednje kombinacije haplotipov:

- **HLA-DQ2,2** (A1*02:01,*05:01; DQB1*02:01,*02:02) – **78%**
- **HLA-DQ2,5**(A1*01:01/01:02/01:04/01:05,*05:01; DQB1*02:01,*05/05:01/05:02) – **67%**
- **HLA-DQ2,7** (A1*05:01,*05:05; DQB1*02:01,*03:01) – **67%**
- **HLA-DQ8,5** (A1*01:01,*03:01; DQB1*03:02,*05/05:01) – **75%** in
- **HLA-DQ8,7** (A1*05:05,*03:01; DQB1*03:01,*03:02) – **57%**.

Glede na podatke ugotavljamo, da je pri osebah s HLA-DQ2,2 (A1*02:01,*05:01; DQB1*02:01,*02:02) in HLA-DQ8,5 (A1*01:01,*03:01; DQB1*03:02,*05/05:01) najvišja verjetnost (78% in 75%) za razvoj celiakije, na kar opozarjajo tudi v literaturi.

V diagnostičnem postopku moramo upoštevati tudi serološke značilnosti in s tem podrobneje prikazati medsebojno povezanost pri bolnikih.

V skladu s pričakovanji, serološke vrednosti niso bile povišane med osebami brez celiakije. Delež pozitivnih rezultatov je sicer nizek tudi med bolniki. 10% bolnikov ima pozitiven rezultat za EMA in tTG, pri 8% pa je pozitiven samo tTG. Zanimalo nas je, kako so serološki rezultati porazdeljeni med genotipi. Po obdelavi podatkov smo ugotovili, da je serologija pozitivna le pri naslednjih kombinacijah haplotipov in v navedenem odstotku (glede na vse rezultate tega haplotipa).

Tako EMA in tTG sta pozitivna pri:

- HLA-DQ2,2 (A1*02:01,*05:01; DQB1*02:01,*02:02) – 14%,
- HLA-DQ2,5 (A1*01:01/01:02/01:04/01:05,*05:01; DQB1*02:01,*05/05:01/05:02) – 17%,
- HLA-DQ2,6 (A1*01:02/01:03/01:08/01:09,*05:01; DQB1*02:01,*06/06:01/06:02) – 33% in
- HLA-DQ8,4 (A1*03:01/03:02/03:03,*04:01; DQB1*03:02,*04) – 100%.

Samo tTG je pozitiven pri naslednjih alelih:

- HLA-DQ2,2 (A1*02:01,*05:01; DQB1*02:01,*02:02) – 29% in
- HLA-DQ2,5 (A1*01:01/01:02/01:04/01:05,*02:01; DQB1*02:02,*05/05:01) 50%.

Pri interpretaciji omenjenih rezultatov moramo nujno upoštevati še faktor okolja - to je uživanje glutena. Večina bolnikov, ki smo jih analizirali, je že upoštevalo brezglutensko dieto.

Če povzamemo naše rezultate lahko sklepamo, da ima oseba največjo verjetnost za celiakijo kot homozigot HLA-DQ2,2 (A1*02:01,*05:01; DQB1*02:01,*02:02) ali heterozigot HLA-DQ2,5 (obe kombinaciji haplotipov). To se delno sklada s podatki v literaturah, ki navajajo HLA-DQ2,2 in HLA-DQ8 kot najpogostejša haplotipa. HLA-DQ5 pa navajajo kot dejavnik za razvoj občutljivosti na gluten.

Vendar nam ti odstotki ponovno ne odražajo realnega stanja, saj je število preiskovancev prenizko. Rezultati raziskave nam tako niso omogočili postavitve podrobnejše povezave med serološkimi in genetskimi značilnostmi, s katero bi lahko zagotovili večjo uporabnost v klinični praksi z namenom hitrejše in pravilnejše diagnoze.

Smotno bi bilo vključiti še preiskovance drugih zdravstvenih ustanov, s tem povečati obseg bolnikov in posledično njihovo reprezentativnost. Večji obseg seroloških rezultatov bolnikov bi nam omogočil tudi prikaz porazdelitve koncentracij specifičnih protiteles in določitev njihovih razredov oziroma nivojev. Le-to bi lahko zdravnikom že pri analizi krvne slike predstavljalo prvo smernico pri določitvi diagnoze.

6 SKLEP

Diagnosticiranje celiakije pri osebah s sumljivo klinično sliko vključuje analizo krvne slike, histološko testiranje in po potrebi tudi genetsko tipizacijo. Diagnosticiranje je pomemben in kompleksen proces, vendar je pravočasna in pravilna postavitve diagnoze ključnega pomena za preprečevanje ostalih s celiakijo povezanih bolezni in zapletov. V diplomski nalogi smo analizirali vrednosti neinvazivnih preiskav slovenskih bolnikov.

Rezultati raziskave so pokazali:

- Genotip HLA-DQ2 je prisoten pogosteje kot HLA-DQ8. 78 % bolnikov ima HLA-DQ2.
- Med bolniki so homozigoti HLA-DQ2,2 v 21 %, heterozigoti HLA-DQ2,X in HLA-DQ8,X v 74 % in bolniki samo s HLA-DQ2 v 5 %.
- Nekatere izmed genotipov določajo različne kombinacije haplotipov.
- HLA-DQ2 bolnikov določajo v 43 % aleli DQA1*02:01, DQB1*02:02 ali DQA1*05:01, DQB1*02:01 v 57%. HLA-DQ8 pa DQA1*03:01, DQB1*03:02 v 100%.
- 10 % bolnikov ima pozitiven rezultat za EMA in tTG, pri 8% pa je pozitiven samo tTG.
- Najvišja verjetnost (78% in 75%) za razvoj celiakije je pri osebah s HLA-DQ2,2 (DQA1*02:01,*05:01;DQB1*02:01,*02:02) in HLA-DQ8,5 (DQA1*01:01,*03:01; DQB1*03:02,*05/05:01).

Zastavljene hipoteze diplomske naloge ne moremo niti potrditi niti ovreči. Glede na naše rezultate nismo uspeli postaviti podrobnejše povezave med serološkimi in genetskimi značilnostmi. Vsekakor ponujajo genetski in serološki testi prednosti za bolnike, zato bi bilo smiselno raziskavo nadaljevati na večji skupini slovenskih preiskovancev. To bi nam omogočilo pridobitev večje, bolj homogene, reprezentativnejše skupine in zanesljivejše rezultate za možnost določitve smernic napovedovanja razvoja celiakije in večje uporabnosti v klinični praksi. Kljub temu pa nam analiza prikazuje razlike v prevalenci celiakije med narodi oziroma področjem bivanja.

LITERATURA

1. Košnik M, Mrevlje F, Štajer D, Černelč P, Koželj M. Interna medicina Ljubljana: Založba Littera Picta, d. o. o.; Slovensko medicinsko društvo; 2011.
2. Petras RE. Normal small intestine: anatomy, specimen dissection and histology relevant to pathological practice. *Morson and Dawson's Gastrointestinal Pathology*. 2012:281.
3. Wakim–Fleming J, Pagadala MR, Lemyre MS, Lopez R, Kumaravel A, Carey WD, et al. Diagnosis of celiac disease in adults based on serology test results, without small-bowel biopsy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2013;11(5):511-6.
4. Francesca M, Antonio P. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing *Journal of Biomedical Science*. 2012 19:88.
5. Detlef S, Klaus-Peter Z. The Diagnosis and Treatment of Celiac Disease *Dtsch Arztebl Int*. 2013 835-46.
6. Tomašić V, Lerotić I. COELIAC DISEASE. 2013; 1-12
7. Reilly NR, Green PH, editors. Epidemiology and clinical presentations of celiac disease. *Seminars in immunopathology*; 2012: Springer.
8. Bhatnagar S, Tandon N. Diagnosis of celiac disease. *The Indian Journal of Pediatrics*. 2006;73(8):703-9.
9. Villanacci V, Ceppa P, Tavani E, Vindigni C, Volta U. Coeliac disease: the histology report. *Digestive and Liver Disease*. 2011;43:S385-S95.
10. Bao F, Green PH, Bhagat G. An update on celiac disease histopathology and the road ahead. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2012;136(7):735-45.
11. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA. ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *The American journal of gastroenterology*. 2013;108(5):656-76.
12. Clouzeau-Girard H, Rebouissoux L, Taupin J-L, Le Bail B, Kalach N, Michaud L, et al. HLA-DQ genotyping combined with serological markers for the diagnosis of celiac disease: is intestinal biopsy still mandatory? *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2011;52(6):729-33.
13. <http://labtestsonline.org/understanding/analytes/hla-testing/tab/test/>.
14. Lampič M. Vpliv polimorfizma genov HLA na dovzetnost za Hashimotov tiroiditis pri otrocih s sladkorno boleznijo tipa I: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta; 2012.
15. www.abbottmolecular.com/technologies/ssp.html.