



**VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA
BRNO**

**Farmaceutická fakulta
Ústav humánní farmakologie a toxikologie**



Genetický screening predispozice k celiakii

*RNDr. Ladislava Bartošová, Ph.D.¹, PharmDr. Michal Kolorz¹,
Mgr. Kateřina Wróbllová¹, Mgr. Alicja Chýlková¹, ing. Radka
Burdychová².*

¹ *Ústav humánní farmakologie a toxikologie, FaF VFU Brno*

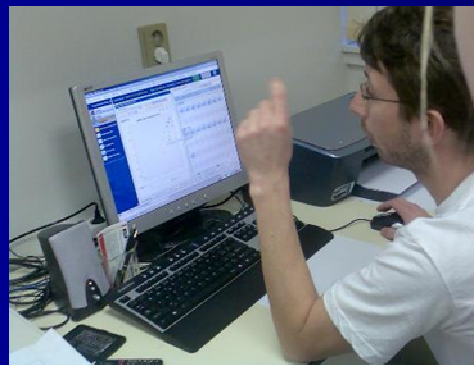
² *NutriAcademy s.r.o. , Dolnopolní 8, Brno- Maloměřice*

Forum veterinarium – Brno 26.11. 2010

LABORATOŘ FARMAKOGENOMIKY

*Ústav humánní farmakologie a toxikologie, FaF, VFU Brno
(vznikla v lednu 2006)*

Detekce polymorfismů v genech kódujících proteiny, které sehrávají významnou úlohu v patogenezi některých chorob nebo v metabolismu některých léčiv.



Geny, které umíme stanovit

Složky imunitního systému:

- ☺ **NOD2/CARD15** - Arg702Trp;
Gly908Arg; Leu1007fsinsC
- ☺ **ICAM-1** - Lys469Glu
- ☺ **TNF- α** - G-308A a G-376A
- ☺ **C4AQ0, C4BQ0**

Chemokin. receptor:

- ☺ **CCR5** - deleční
- ☺ mutace $\Delta 32$

Enzymy:

- ☺ **MTHFR** - C677T, A1298 C
- ☺ **VKORC1** - G-1639A
- ☺ **CYP2C9** - C430T, A1075C
- ☺ **TPMT** - G238C, G460A a A719G

Hemokoagulační faktory:

- ☺ **Faktor V** - mutace Leiden (G1691A)
- ☺ **Faktor II (protrombin)** - G20210A

Proč právě CELIAKIE ??

V laboratoři byla řešena problematika genetické predispozice k nespecifickým střevním zánětům a ke klinickému průběhu těchto onemocnění.

Celiakie je rovněž zánětlivé onemocnění střevní sliznice

CELIAKIE - definice

Celiakie = celiakální sprue
(glutenová enteropatie)

*je vrozené chronické zánětlivé
onemocnění tenkého střeva
charakteristické
morfologickými změnami
sliznice tenkého střeva
zapříčiněnými zánětem, jenž je
vyvolán intolerancí k lepku
(glutenu)*



CELIAKIE - etiologie

- ❖ Manifestuje se kdykoliv během života, nejčastěji v dětském věku . V dospělosti se první příznaky často vyskytují po duševní, či fyzické zátěži.*
- ❖ Prevalence v ČR je 1:200-1:250*
- ❖ Mnoho případů není diagnostikováno !*

CELIAKIE – projevy onemocnění

❖ Klasický typ celiakie (30 % případů)

s charakteristickými projevy:

průjmy, váhový úbytek, únavnost, zažívací obtíže, anémie, projevy nedostatků vitamínů a stopových prvků

❖ Monosymptomatická celiakie

projevující se netypickým symptomem - například anémií nereagující na terapii

❖ Asymptomatická celiakie

bez vyhraněných klinických příznaků, přesto je střevo poškozováno.

Netypické projevy, které mohou mít souvislost s CELIAKIÍ

- ❖ infertilita a poruchy reprodukce*
- ❖ osteoporóza nepřiměřená věku*
- ❖ únavový syndrom*
- ❖ neurologické projevy (cerebrální ataxie, parestézie, periferní neuropatie,..)*

Častý výskyt u jedinců s jinými autoimunitními onemocněními např. DM – I. typu, autoimunitní onemocnění štítné žlázy, revmatoidní artritida, příp. u osob s Downovým syndromem

Netypické projevy, které mohou mít souvislost s CELIAKIÍ

- ❖ *Neléčeným (nediagnostikovaným) pacientům hrozí **atrofie střevní sliznice** a tím neschopnost příjmu živin. Doživotně jsou odkázáni na parenterální výživu.*
- ❖ ***Výskyt nádorového bujení** (non-Hodgkinský lymfom, rakovina střeva) u cca 15 % pacientů s více než desetiletým trváním choroby*

CELIAKIE - diagnostika

- ❖ **Enterobiopsie a histologický nále**
- ❖ **Sérologie** - průkaz specifických protilátek – proti gliadinu, tkáňové transglutamináze (tTGA), endomyziu (EMA)
- ❖ **Klinická reakce na bezlepkovou dietu**
- ❖ **Genetická determinace** (Sourozenci pacienta s celiakií mají **20x** větší riziko než člen běžné populace)

Genetická determinace k CELIAKII

HLA-haplotyp predisponující k intoleranci lepku

Molekula HLA -DQ2 (cca 90 %)

Gen kódující α -řetězec HLA-DQA1 Alela: *0501

Gen kódující β -řetězec HLA-DQB1 Alela: *0201

Molekula HLA DQ8 (cca 5-10 %)

Gen kódující α -řetězec HLA-DQA1 Alela: *0301

Gen kódující β -řetězec HLA-DQB1 Alela: *0302

Gen: HLA DRB1 (cca 5 %)

Alela: HLA DRB1*04

Podstata genetické predispozice k CELIAKII

HLA molekuly

- ❖ jsou v lidském organismu nejvíce polymorfní*
- ❖ jsou tvořeny řetězcem alfa a beta*
- ❖ patří mezi antigen prezentující buňky – prezentují antigen CD4+ T-lymfocytům, příp. B-lymfocytům.*

- ❖ Molekuly HLA-DQ2 a HLA-DQ8 patří mezi HLA molekuly II. třídy (vyskytují se na povrchu T-buněk, B-buněk a makrofágů.*

Podstata genetické predispozice k CELIAKII

- ❖ U predisponovaných osob dochází ke změně v nukleotidové sekvenci HLA genu DQ2 a DQ8
 - změna v primární struktuře HLA proteinu
 - změna sekundární struktury
 - změna terciární struktury.
- ❖ Odlišná konformace proteinu umožní vazbu komplexu TG / gliadin na tuto pozměněnou HLA molekulu.

TG = tkáňová transglutamináza

Gliadin =antigenní složka lepku

Podstata genetické predispozice k CELIAKII

- ❖ *Navázaný komplex funguje jako antigen. HLA – DQ2 (DQ8) molekula jej předkládá*
 - T-lymfocytům → aktivace Tc-lymfocytů*
 - B-lymfocytům → tvorba protilátek*



Tím dochází poškození sliznice střeva.

Metodika práce

POSTUP DETEKCE

- 1. Odběr vzorku a izolace DNA*
- 2. PCR amplifikace*
- 3. Detekce a určení výsledku*

Metodika práce

1. ODBĚR VZORKU A IZOLACE GENOMOVÉ DNA

1) z leukocytů periferní venózní krve

Quick Gene DNA whole blood kit S
(FujiFilm)



2) z bukálního stěru

QIAmp DNA
Investigator kit



Metodika práce

2. PCR DETEKCE

1) PCR multiplex

Pět reakcí provedeno ve dvou multiplexech



2) Real time PCR

Pomocí komerčního kitu
EliGene® Coeliac RT

IMA Diagnostics EliGene®

CE **EliGene® Coeliac RT**
(DQA1, DQB1, DRB1)

REF 900-IS-RT (for 96 samples)

Intended use:
EliGene® Coeliac RT is intended for the genotyping of HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) and HLA-DQB1*04 genes from isolated DNA.

Introduction:
Coeliac disease, also called celiac sprue, is one of the most common enteropathogenic disorders and is characterized by a lifelong hypersensitivity to gluten proteins found in wheat, rye, oat and barley. Coeliac disease does not belong to allergic disease but it is characterized by antibodies to gluten forming part of genes. In early childhood the immunological intolerance to gluten, leads to a chronic inflammatory response in the small-intestinal mucosa and subsequent malabsorption characterized by chronic diarrhea, osteoporosis and failure to thrive. Many adult patients can also show other typical signs such as, osteoporosis, fractures, weight loss, fatigue, skin and joint problems or autoimmune-like disorders. Indeed, others may remain largely asymptomatic. Non-treated coeliac disease increases the risk of NHL (non-Hodgkin's lymphoma) and probably small-intestinal cancer.

Until recently, coeliac disease was considered relatively uncommon with an estimated prevalence rate ranging from 1 to 1000 to 1:4000. However, the availability of new serologic tests have led to the observation that coeliac disease is much more common, affecting about 1 of 100-200 persons in Europe. The majority of patients showing little clinical symptoms.

Considerable evidence now indicates that coeliac disease has a strong genetic component. Coeliac disease is a multifactorial disorder associated with HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02) or DQ8 (DQA1*03/DQB1*0302) or HLA-DQB1*04. HLA-DQ2 is expressed in the majority (>90%) of those with coeliac disease and DQ8 in about 8%. The expression of these HLA-DQ2 or DQ8 molecules is necessary but not sufficient to develop coeliac disease and accounts for only about 50% of the genetic component of the disease. Studies in twins (10 recurrence risk for coeliac disease of 10%) and of identical twins (concordance of 70%) suggest that the contribution of HLA genes to coeliac disease is less than 50%. About 5%-7% of all coeliac patients possess this particular genotype compared to approximately 20% of the normal population. Of the few coeliac patients who are negative for HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02), a great majority are HLA-DQB1*04 positive. From this point of view, absence of these alleles is useful in excluding coeliac disease. However, at least one other non-HLA gene and some environmental factors are also likely to be involved in the disease.

EliGene® Coeliac RT kit detects genes: DQA1*05, DQB1*02 and DRB1*04. As an internal control the gene SYPC2 (synaptonemal-like 2) is used.

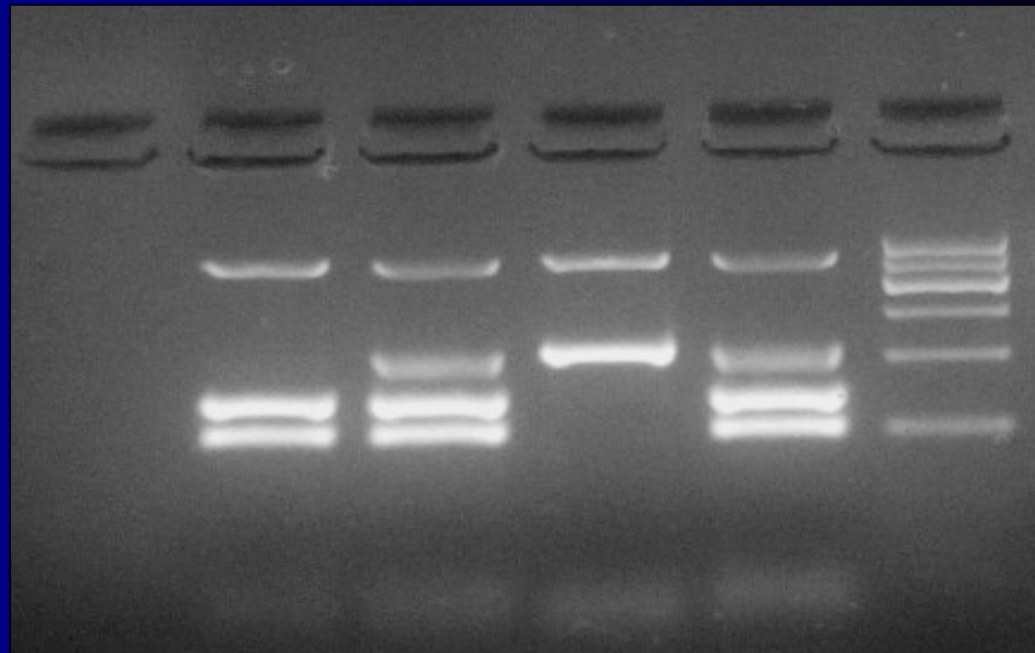
USA: IMA Diagnostics, Inc. 11, 505 10th Street, Germantown, MD 20878
Tel: +1 301 447 2101 USA Fax: +1 301 447 2102 E-mail: info@ima-diagnostics.com
Version: 0040681-004-2019A www.ima-diagnostics.com

Metodika práce

- 3. POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ OBOU METOD*
- 4. POTVRZENÍ SPRÁVNOSTI VÝSLEDKU SEKVENOVÁNÍM*

Výsledky

Multiplex – 1. reakce Stanovení HLA-DQ2 a DRB1*04



Velikosti amplikonů

A1*050101 **149bp**

B1*020101 **108bp**

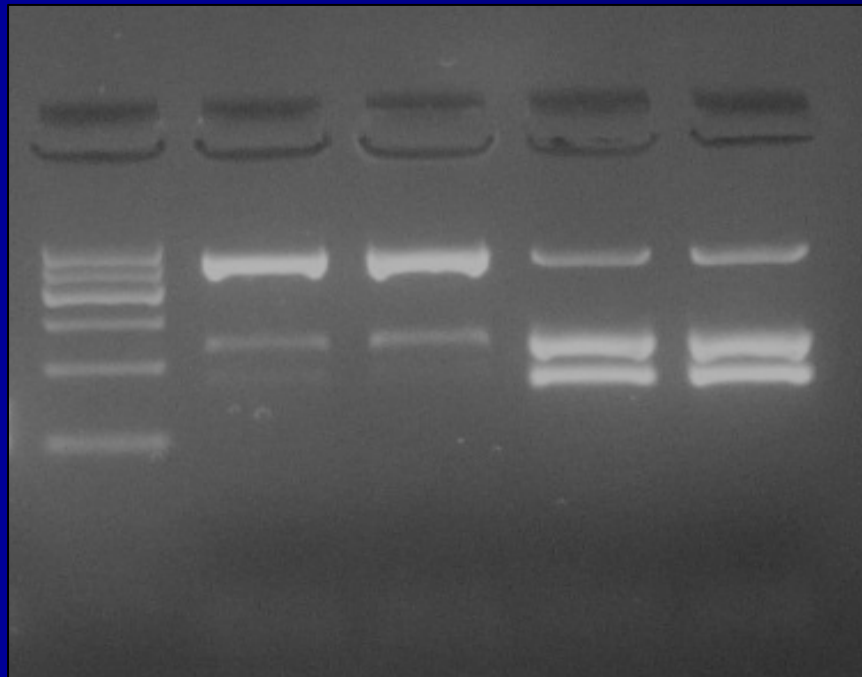
DRB1*04 **217bp**

TNF G-376A **536bp**

| | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|--------|
| | 523 | 524 | 540 | 545 | Ladder |
| | | | | | 100 bp |

Výsledky

Multiplex – 2. reakce Stanovení HLA-DQ8



| | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|
| Ladder | 523 | 524 | 540 | 545 |
| 100 bp | | | | |

Velikosti amplikonů

A1*030101 **243bp**

B1*030201 **171bp**

TNF G-376A **536bp**

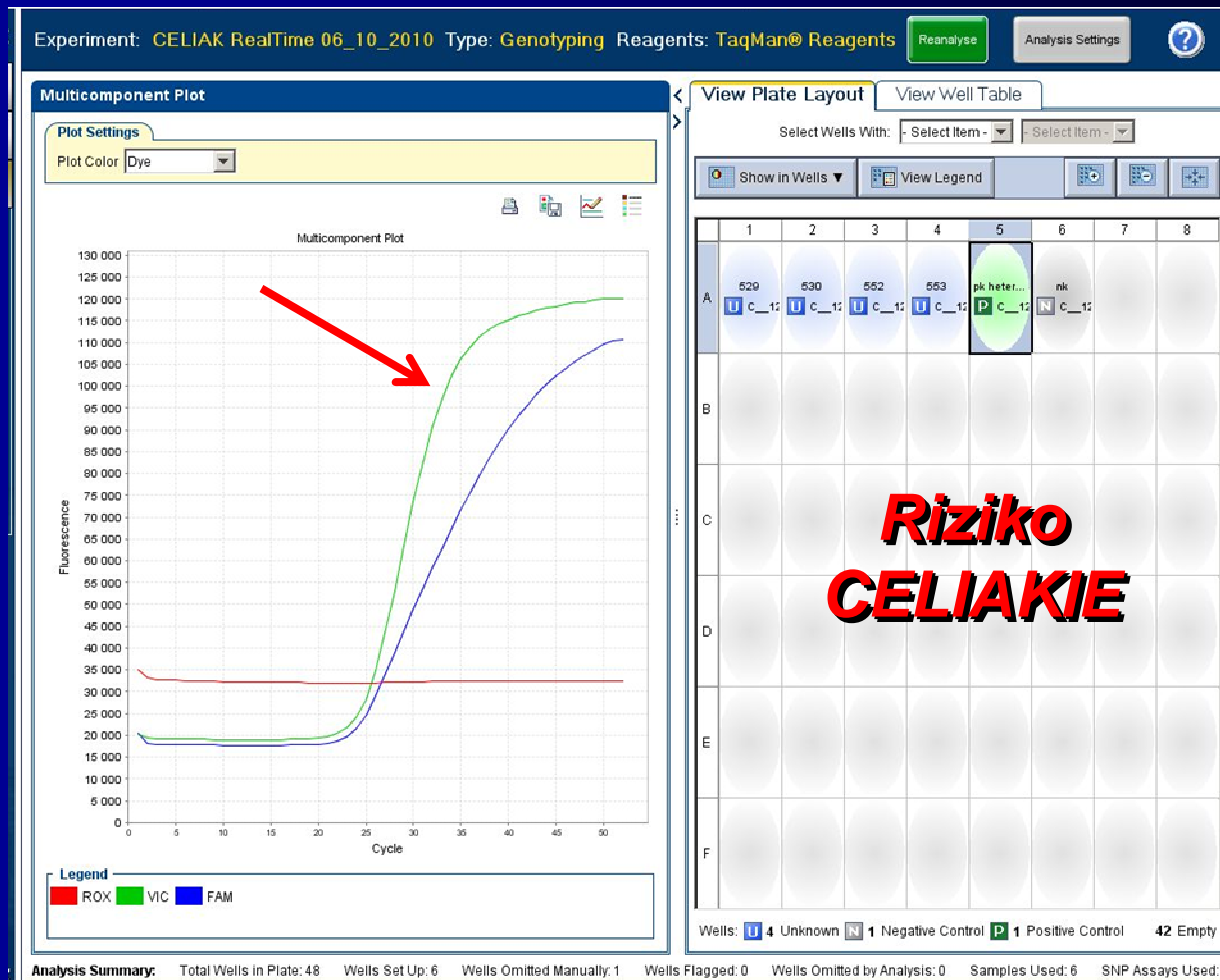
Výsledky

| Alely → Vzorek | A1 *050101 | B1 *020101 | A1 *030101 | B1 *030201 | *04 |
|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------|
| 523 | X | X | X | --- | --- |
| 524 | X | X | X | --- | X |
| 540 | --- | --- | X | X | X |
| 545 | X | X | X | X | X |
| Geny → | DQ2 | | DQ8 | | DRB1 |

Haplotyp DQ2 je v 90% celiaků → vysoká pravděpodobnost, že tyto osoby trpí nebo budou trpět celiakií.

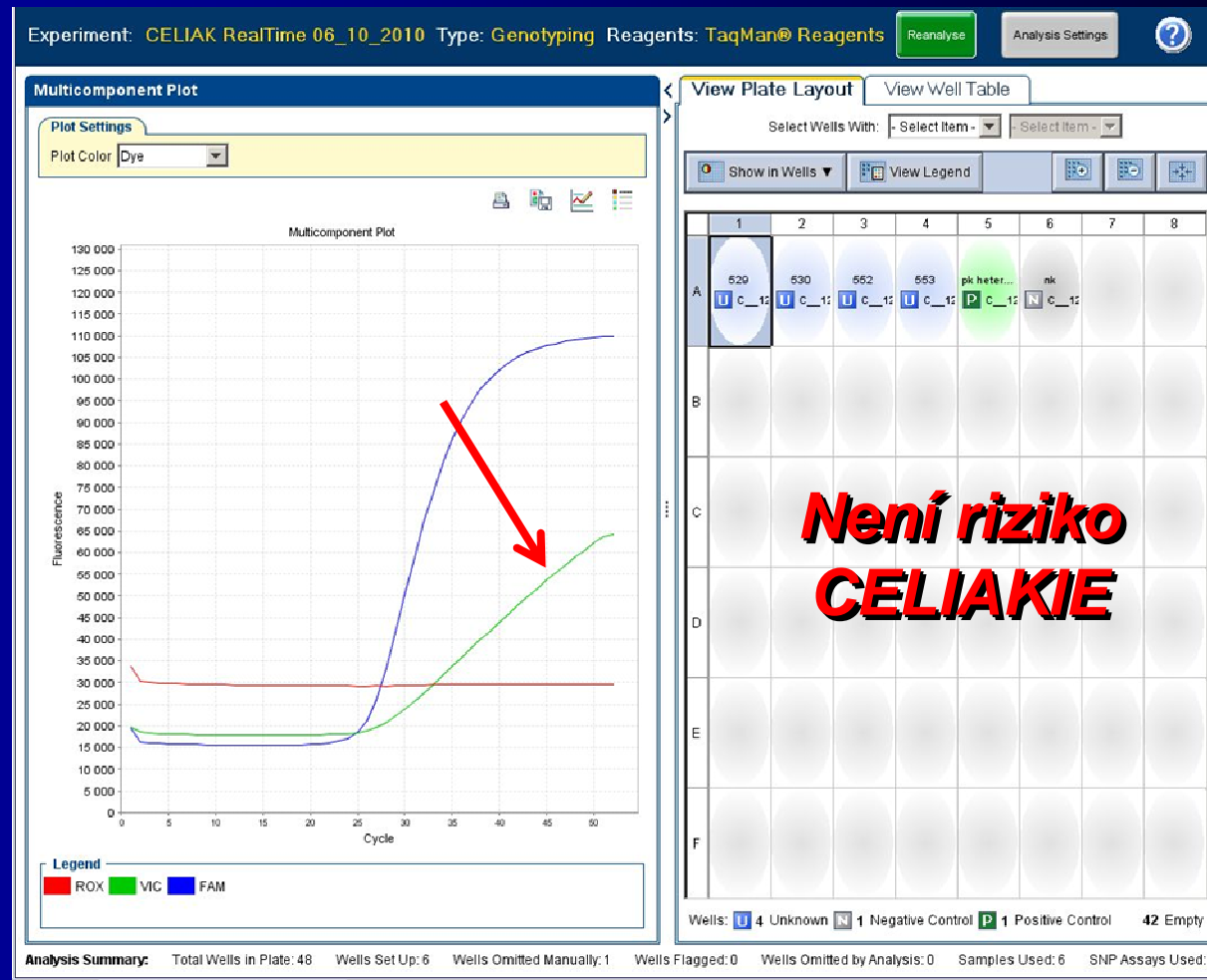
Výsledky

Real time PCR: Stanovení DQ2, DQ8 a DRB1



Výsledky

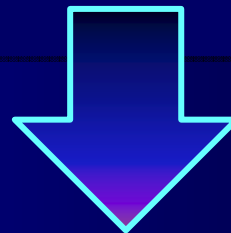
Real time PCR: Stanovení DQ2, DQ8 a DRB1



Výsledky

Porovnání výsledků obou použitých metod

- ❖ Stanovení DQ2 **byla shodná** při použití obou PCR metod.
- ❖ Haplotyp DQ8 není možno kitem pro Real time PCR stanovit
- ❖ Mezi výsledky stanovení genotypu DRB1 nalezen rozdíl - výsledky ze stanovení metodou real-time PCR *byly* všechny negativní.

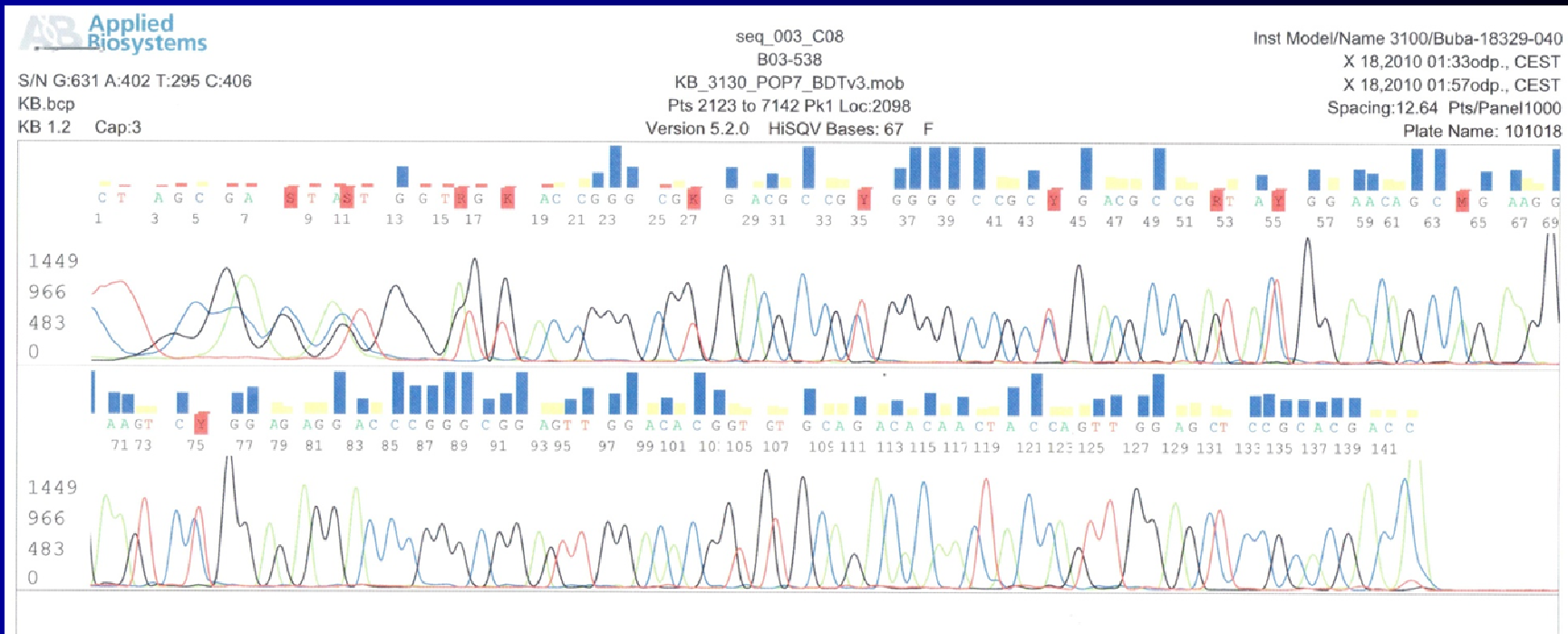


NUTNO PROVÉST SEKVENOVÁNÍ

Výsledky

OSEKVENOVÁNÍ SPORNÝCH ÚSEKŮ

ukázalo, že námi vyvinutá metoda klasické PCR reakce je vede k přesnějšímu určení DRB1 genotypu než komerční kit v real-time PCR reakci.



Závěr

- ❖ *podařilo se nám vyvinout a optimalizovat metodu klasické PCR reakce pro detekci genů HLA –DQ2, HLA-DQ8 a HLA-DRB1, které zodpovídají za genetickou predispozici k celiakii*
- ❖ *při porovnání s komerčně dodávaným kitem a následné kontrole sekvenováním se ukázalo, že záchyt alely HLA-DRB1* 04 je spolehlivější v naší vyvinuté metodě.*
- ❖ *Námí vyvinutou metodou lze také stanovit haplotyp DQR8 (cca 5 % celiaků).*

Závěr

- ❖ *V současné době zahájíme genotypizaci větší série vzorků osob*
 - a) s klinicky ověřenou diagnózou celiakie*
 - b) bez této diagnózy*
- ❖ *Poté budeme testovat osob bez znalosti diagnózy.*

Komu je genetický screening na CELIAKII určen?

- ❖ *pro osoby s pozitivní rodinnou anamnézou*
- ❖ *pro osoby s podezřením na celiakii (typické i atypické příznaky)*
- ❖ *potvrzení nebo vyloučení diagnózy celiakie v klinicky sporných případech*

Kdo má zájem o genetický screening CELIAKIE ?

LÉKAŘI

*MUDr. František
Jimramovský,
gastroenterolog
Pediatrická klinika
FN Brno*



Doplnění škály diagnostických metod zvl. ve sporných případech

Kdo má zájem o genetický screening CELIAKIE ?

Nutriční poradci

HOME Centrum zdravé výživy - rekvalifikační kurzy, vzdělávání, poradenství

- Hlavní stránka
- Kurzy
- O nás
- Naši absolventi
- Obchodní partneři
- Centrum výživy a zdraví
- Kontakty

NutriAcademy, s.r.o.
akademie výživy a sportu

Novinky v NutriAcademy

Právě byly vypsané nové termíny kurzů na rok 2011. Přihlásit se můžete již teď. Pokračujte výběrem města, ve kterém byste rádi kurz studovali. Vybrat si můžete z nabídky níže pod tímto textem.

Centrum výživy a zdraví nové na Lidické 75 v Brně, najdete tam i naši kancelář.

Rekvalifikační kurzy

PORADCE PRO VÝŽIVU

Smluvní podmínky kurzů
Přihláška na kurz: Poradce pro výživu

Místa a termíny konání kurzů:

- BRNO
- PRAHA
- OSTRAVA
- PISEK

Kurzy v NutriAcademy

NAŠIM MOTTEM JE: BUĎ VÝŽIVOVÝM PORADCEM PŘEDEVŠÍM SÁM SOBĚ!

Organizační pokyny:

- Osvědčení o rekvalifikaci
- Čím se lišíme?
- Úhrada kurzu Úřadem práce

Dokumenty, které se mohou hodit:

- Přihláška na rekvalifikační kurz

S kým spolupracujeme

hany bany

Koho podporujeme

projekt - Regionální potraviny

Koho sponzorujeme

Votejbal Náchodsko
Kajakář Jan Busta

Rychlé odkazy

Navštivte nás [facebook](#)

Potravinářská komora ČR
Bezpečnost potravin
Výchova ke zdraví

NutriAcademy s.r.o

Rekvalifikační kurz
„Poradce pro
výživu“ (akreditace
MŠMT)

Genetický screening osob s příznaky, které by mohly souviset s celiakií

***DĚKUJI VÁM VŠEM ZA
POZORNOST***



***... přeji
krásný
den***