GEN ZA CC KEMOKINSKI RECEPTOR 5 U OBOLJELIH OD CELIJAKIJE

Lorencin Pucić, Anika

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:324424

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository

zir.nsk.hr

UNIRI DIGITALNA KNJIŽNICA

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Anika Lorencin Pucić

GEN ZA CC KEMOKINSKI RECEPTOR 5 U OBOLJELIH OD CELIJAKIJE

Završni rad

Rijeka, 2019.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Nada Starčević Čizmarević

Diplomski rad obranjen je dana _____ u/na _____

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1 CELIJAKIJA 2

1.1.1. PATOGENEZA 3

1.1.2 KLINIČKA SLIKA 5

1.1.3. DIJAGNOSTIKA I LIJEČENJE 6

1.2. GENETSKA PODLOŽNOST ZA CELIJAKIJU 7

1.2.1. HLA GENI U CELIJAKIJI……..8

1.2.2. CC KEMOKINSKI RECEPTOR 5…….…...9

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 11

3. ISPITANICI I METODE 12

3.1. ISPITANICI 12

3.2. METODE 13

3.2.1. IZOLACIJA DNA 13

3.2.2 LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR) 13

3.2.3. ELEKTROFOREZA 15

3.2.4. IDENTIFIKACIJA POLIMORFIZMA Δ32 CCR5 GENA…….……...15

3.2.5. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA 16

4. REZULTATI 17

4.1. ANALIZA POLIMORFIZMA CCR5 Δ32 GENA U OBOLJELIH OD CELIJAKIJE 17

4.2 ANALIZA POLIMORFIZMA Δ32 CCR5 GENA PREMA POJAVNOSTI BOLESTI…….19

5. RASPRAVA 22

6. ZAKLJUČCI 29

7. LITERATURA 30

8. ŽIVOTOPIS ……..... 28

SAŽETAK

Celijakija ili glutenska enteropatija je složena autoimunosna bolest s genetičkom predispozicijom pri kojoj organizam ne tolerira gluten te spada među gastroenterološke bolesti. Gluten se nalazi u svim oblicima zrna pšenice, raži i ječma. Celijakija se često dijagnosticira u prvim godinama života premda se bolest može pojaviti kod svih dobnih skupina a uz nju je nerijetko združeno i niz drugih bolesti. S obzirom na genetsku podložnost za bolesti dobro je poznata povezanost s HLA regijom, dok je interes ovog rada bio istražiti povezanost gena za CC kemokinskog receptora 5 (CCR5) s podložnosti i tijekom celijakije.

Istraživanje je provedeno na 175 ispitanika oboljelih od celijakije (67 muškaraca i 108 žena). Prema dobu, spolu i mjestu prebivanja ispitanika formirana je i usklađena kontrolna skupina od 175 zdravih osoba. Koristili smo metode izolacije DNA, lančanu reakciju polimeraze (PCR) i elektroforezu pomoću kojih su analizirani genotipovi za delecija Δ32 CCR5 gena. Statistički značaj ($p<0,05$) se pokazao kod usporedbe oboljelih i kontrolne skupine odnosno ispitanici oboljeli od celijakije češće imaju deleciju CCR5-Δ32 gena te je frekvencija ovog alela statistički značajno veća u bolesnika ($p=0.028$). Provedena je i usporeba između spolova pri čemu razlika u distribuciji genotipova i alela nije bila statistički značajna ($p>0,05$). Pojavnost bolesti s obzirom na tip celijakije, dob dijagnoze i pridružene bolesti obzirom na deleciju CCR5-Δ32 nije bila statistički značajna ($p>0,05$).

Zaključno možemo reći da bi CCR5-Δ32 polimorfizam mogao imati utjecaj na podložnost za celijakiju ali ne i utjecaj na razvoj bolesti.

Ključne riječi: celijakija, CC kemokinski receptor 5, genski polimorfizam

ABSTRACT

Celiac disease is a disease in which the body does not tolerate gluten and is one of the gastroenterological diseases. It is also called gluten enetropathy because it is associated with anti-protein gluten tolerance. Gluten is found in all forms of wheat,rye and barley grains. The disease occurs in all age groups and can be accompanied by a number of other diseases. Given the genetic susceptibility of the disease, it is of interest in this study to investigate the susceptibility of CC chemokine receptor 5 in patients with celiac disease.

The study was conducted on 175 subjects with celiac disease, of whom 67 were men and 108 were women. According to age, gender and place of residence of the respondents, a control group of 175 healthy persons joined. Methods of DNA isolation, polymerase chain reaction (PCR) and electrophoresis were used to examine the genotypes for deletion of CCR5-Δ32. Of celiac disease more often have a deletion of the CCR5-Δ32 gene. Based on these result, allele frequencies were also statistically significantly different (p=0,028). There was also a gender comparison, with the result that male gender is more likely to develop, but not statistically significant. According to the breakdown by age groups, the results also show that there is no statistical significance.

In conclusion, it could be said that although we have statistical significance in the first part of the study, but it does not show that CCR5 is certainly one of the factors in the development of celiac disease.

Key words: Celiac disease, CC chemokine receptor 5, gene polymorphism

1. UVOD

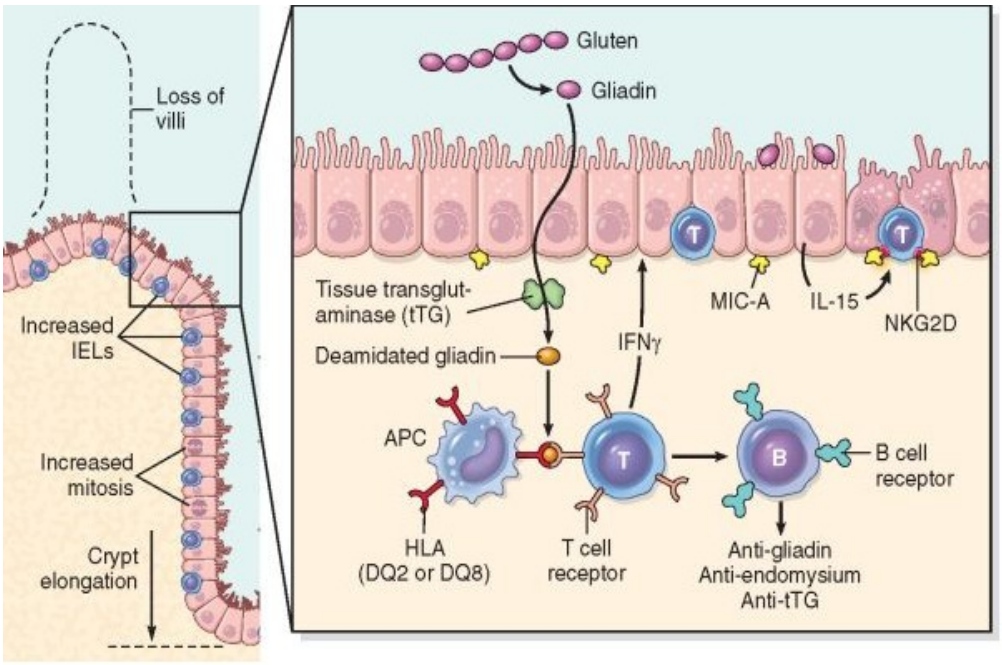
Prevalencija celijakije prema istraživanjima u populacijama diljem svijeta iznosi od 0,5 do 1% (1). U Republici Hrvatskoj ustanovljeno je da jedna osoba na osamdeset ljudi boluje od kronične bolesti celijakije. Veliki broj oboljelih ni ne zna da boluje od te bolesti te to može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema. Vjeruje se da preko milijun Europljana boluje od celijakije što je potaknulo Europsku komisiju da od 2000. godine provode istraživanja pri kojem sudjeluju šesnaest laboratorija iz sedam europskih zemalja. Istraživanje se fokusira na praćenju bioloških i genskih sastavnica te na mjere prevencije bolesti. Uzrok celijakije može biti genetski povezan s anti-tolerancijom na prehranu koja sadrži gluten, međutim značajan može biti i doprinos neke infekcije ili stresa (2). Celijakija je bolest koju obilježava imunosni odgovor na gluten iz pšenice, raži i ječma te dovodi do oštećenja tankog crijeva. Prema dosadašnjim spoznajama, celijakija je autoimunosna bolest pri kojoj važnu ulogu imaju urođeni i stečeni imunosni odgovor zbog kojih dolazi do eneropatije. Njen etiološki čimbenik je poznat te je donekle poznata i genetska predispozicija. Aktivacija stečenog imunosnog odgovora dovodi do aktiviranja B-limfocita i citokina koji se stvaraju kao odgovor na autoantitijela i uništavaju resice tankog crijeva. Bolest se može razviti kod inače zdravih ljudi, no i neke ostale bolesti mogu biti povezane s celijakijom, te se može reći da osobe oboljele od drugih bolesti imaju veći rizik za obolijevanje od celijakije i obrnuto. Tako npr. osobe koje boluju od celijakije imaju i do tri puta veći rizik od obolijevanja od dijabetesa tipa jedan. Bolesti koje još mogu biti povezane s celijakijom su autoimunosne bolesti štitnjače, autoimunosne bolesti jetre, upalne bolne bolesti crijeva, bolesti pluća i srca, te mogu biti povezane i s nekim sindromima kao što su Downov i Turnerov sindrom (1).

1.1 CELIJAKIJA

Celijakija je jedna od najčešćih gastroenterološkihbolesti. Još se naziva i glutenska enetropatija jer je vezana uz anti-toleranciju na bjelančevinu gluten (2). Opisana je prvi put u drugom stoljeću prije Krista od strane Areteja, a 1887. godine opisana je kod djece s tipičinom kliničkom slikom te se krenula liječiti dijetom. Nakon poboljšanja u djece na dijeti krenula su istraživanja te su ustanovljena patogeneza bolesti, klinička slika i tijek bolesti. Autoantigen koji je „dokaz“ da je celijakija autoimunosna bolest je tkivna transglutaminaza (tTG) koja deaminira protein gluten te je potaknuta njegovim unosom. Gluten se nalazi u svim oblicima zrna pšenice, raži i ječma. Gluten u pšenici sastoji se od glutenina i glijadina. Glijadin je bitan dio što se tiče patogeneze celijakije međutim samo jedan dio tog proteina potiče imunosni odgovor (3). Taj protein je bitan u proizvodnji pekarskih proizvoda jer poboljšava njihovu strukturu i kvalitetu. Osim pekarskih proizvoda ima i širu primjenu zbog svojstva elastičnosti i vezivanja. Celijakija se najčešće razvija kod djece prilikom prelaska s majčinog mlijeka na svakodnevnu hranu (4). Danas se celijakija pojavljuje kod svih dobnih skupina te se zna uz nju paralelno pojaviti i niz pridruženih bolesti kao što su bolesti kože, bolesti žlijezda s unutarnjim izlučivanjem, kardiovaskularne bolesti te bolesti živčanog sustava.[2] Osobe bolesne od nekih drugih bolesti, osobe koje su bile izložene virusnim infekcijama, osobe sklone stresu te i osobe koje imaju lošije socioekonomske uvjete imaju povećani rizik razvoju celijakije, dok suprotno očekivanju, pušenje smanjuje rizik od razvijanja celijakije premda provedene studije daju nekonzistentne rezultate (3,5).

1.1.1. PATOGENEZA

U današnje vrijeme se zna da je celijakija autoimuna bolest koju potiče i aktivira gluten. Gluten je glavni čimbenik u patogenezi celijakije, a ostali čimbenici su genetska predispozicija, sluznična barijera, stečeni i urođeni imunosni odgovor (3). Kod zdravih osoba gluten ne predstavlja problem jer prilikom probave se razgradi do manjih podjedinica te se iskorištava u metaboličkim putevima dok kod osoba oboljelih od celijakije organizam gluten prepoznaje kao stranu i štetnu bjelančevinu pri kojoj se pokreće imunološki odgovor (Slika 1). Imunološkim odgovorom smatra se stvaranje antitijela koja inače štite organizam od opasnosti kao npr. pri unosu virusa ili bakterija koji bi uzrokovali neku infekciju. Najveći dio razgradnje se odvija u tankom crijevu te se tamo odvija i imunološka reakcija što dovodi do oštećenja crijevne sluznice tj. crijevne resice postaju sve manje i površina tankog crijeva postaje sve tanja (6). Prema istraživanjima dokazano je da je kod celijakije izražena genetska predispozicija tako što postoji povezanost s alelima humanog leukocitnog antigena (engl. *human leukocyte antigen* – HLA) razreda II. koji je glavni kompleks tkivne snošljivosti. Sluznična barijera je bitna za kontrolu transporta transcelularnog i paracelularnog antigena te i održavanja ravnoteže tolerancije i reakcije na strane antigene. Crijevni epitel je kod zdravih osoba nepropustan za glijadin. Kod oboljelih od celijakije pojačana je paracelularna propusnost. Propusnost se poveća uz djelovanje zonulina (intestinalni peptid) i citokina što dovodi do spajanja alfa-glijadina na kemokin receptor CXCR3 i do imunološkog odgovora, reakcije (4).



Slika 1. Patogeneza celijakije

(https://www.studyblue.com/notes/note/n/robbins-gi/deck/12008614)

1.1.2 KLINIČKA SLIKA

Kliničku sliku celijakije možemo podijeliti na dve dobne vrste simptoma: simptomi kod djece te simptomi kod odraslih. Simptomi kod djece su klasični tj. učestala povraćanja, proljevi, mršavljenje, umor, usporeni rast i razvoj, povećanje trbuha te mlitavost muskulature što je niz godina bilo uvjerenje da je celijakija pedijatrijski sindrom. Simptomi kod odraslih osoba mnogo su brojniji i raznoliki (3,4). Prema kliničkoj formi celijakiju možemo podijeliti na pet podtipova: tipična, atipična, tiha, latentna i potencijalna celijakija. Pod tipičnu klničku sliku pripadaju simptomi kod djece tzv. pedijatrijski sindrom, kod atipične su simptomi kod odraslih kao što su: nizak krvni tlak, gubitak tjelesne mase, gastrointestinalni simptomi (nadutost, bolovi u trbuhu, proljevi, mučnine i povraćanje, anoreksija), metabolički (anemija, učestalo krvarenje), mišićno-koštani (bolovi u kostima, artritis), neurološko-psihijatrijski (glavobolja, anksioznost, depresija, epilepsija), reprodukcijski (smetnje kod menstrualnog ciklusa, smanjenje plodnosti) te kožne (osipi, crvenila, hematomi). Kod tihe celijakije prisutna su pozitivna protutijela bez tipičnih znakova, dok se latentna celijakija procijeni prilikom pozitivne genetske predispozicije, te potencijalnu celijakiju obilježavaju lezije na tankom crijevu što s vremenom može dovesti do potpune crijevne atrofije. Na temelju kliničkih slika napravljena je glavna podjela celijakije na tipičnu i atipičnu celijakiju (3,4).

Celijakija se nerijetko javlja u kombinaciji s drugim autoimunosnim bolestima te je u oboljelih od celijakije prevalencija autoimunosnih bolesti veća nego u općoj populaciji. Iako nije u potpunosti poznat uzrok takvog komorbiditeta, povezanost je moguća uslijed zajedničke genetske podložnosti, premda se može raditi i o ubrzanoj apsorpciji antigena uslijed veće permeabilnost crijeva. Najčešće bolesti povezane s celijakijom su: šećerna bolest tip 1, autoimunosne bolesti štitnjače, autoimunosne bolesti jetre, upalne bolesti crijeva, te Sjoegrenova bolest i IgA deficijencija (7).

1.1.3. DIJAGNOSTIKA I LIJEČENJE

Celijakija je složena bolest a u bolesnika postoji veća učestalost pojave autoimunih bolesti nego li u općoj populaciji. Dijagnostika prvenstveno kreće od kliničke slike, te na temelju nje slijedi daljnje testiranje. Inicijalno je testiranje serološkim metodama tj. određivanje imunoglobulina A i protutijela na tkivnu transglutaminazu, te endomizijskih antitijela (EMA). Ukoliko testiranje bude pozitivno, bolesnik se upućuje na pregled gastroenterologa te na biopsiju sluznice dvanaesnika. Konačna se dijagnoza postavlja nakon pozitivnih nalaza uz kliničku sliku te uz pozitivan oporavak tijekom bezglutenske dijete. Novooboljele osobe nakon dijagnostike trebali bi se držati doživotno bezglutenske dijete i velikog unosa vode i elektrolita zbog moguće dehidracije te unos nutritivnih vrijednosti (3). Celijakija ne mora biti neugodna ili otežavajuća u slučaju ako se na vrijeme otkrije. Ujedno uz pravilnu prehranu tijekom života (bezglutenska dijeta) sluznica tankog crijeva se može u potpunosti oporaviti te se može mnogo poboljšati zdravstveno stanje i klinička slika (6).

1.2.GENETSKA PODLOŽNOST ZA CELIJAKIJU

Brojna istraživanja dokazuju da je celijakija genetska bolest. Trećina populacije nosi rizični gen za celijakiju te do njegove "aktivacije" dolazi uslijed glutenske prehrane ili se "aktivira" nakon nekog velikog zahvata kao što je operacija, porođaj, trudnoća ili čak virusna infekcija ili teški emocionalni stres(2). Celijakija je složena bolest multifaktorske etiologije koja nastaje djelovanjem brojnih genetičkih čimbenika u interakciji s glavnim okolišnim čimbenikom glutenom kao okidačem bolesti. Danas je genetski utjecaj djelomično razjašnjen. Celijakija je složena bolest determinirana velikim brojem gena dijagnosticirana kod raznih dobnih skupina (2,3). Istraživanja su dokazala ispitujući rodbinu bolesnika da kod jednojajčanih blizanaca postoji oko 80% mogućnosti pojave bolesti dok kod dvojajčanih rizik iznosi oko 30% a kod prvih srodnika nešto je manji od 10-15%. Poznato je 95% da oboljeli nose gene za HLA DQ2 i HLA DQ8 molekule, međutim od 25% oboljelih koji imaju HLA DQ2 bolest će razviti njih samo 4%. To je stoga što rizični HLA aleli doprinose svega oko 40% podložnosti za bolest, a veći broj rizičnih genskih varijanti još nije utvrđen (8). Mnoga dosadašnja istraživanja pokazuju da je celijakija povezana za HLA lokusom kao dominantnim genetičkog elementom koji doprinosi heritabilnosti celijakije oko navedenih 40% što ostavlja mogućnost djelovanja brojnih drugih gena s manjim učinkom pa tako i kemokinskih gena kao što je gen za CC kemokinski receptor 5 (CCR5).

1.2.1. HUMANI LEUKOCITNI ANTIGEN (HLA)

Celijakija je multifaktorska bolest koja je usko povezana s alelima humanog leukocitnog antigena koji se prikazuje kao glavni genetički čimbenik etiopatogeneze celijakije (4). Humani leukocitni antigen je skup proteina koji su smješteni na površini stanice te imaju funkciju reguliranja imunosnog odgovora kod ljudi(2). HLA sustav (stotine gena imunološkog sustava) lociran je na kratkom kraku kromosoma šest (6p21.3) i između ostalih kodira i molekule DQ2 i DQ8 i sintezu proteina koji su povezani s antigenima imunosno kompetentnih stanica. Područje HLA sustava obuhvaća oko 0,12% ljudskog genoma. Dokazano je da se rizični HLA DQ2 ili DQ8 haplotip nalaze kod više od 95% oboljelih od celijakije. Prisutnost HLA-DQ alela je nužna, ali ne i dovoljna za razvoj bolesti. HLA DQ2 se sastoji od alfa lanca kojeg determinira alel HLA-DQA1*05 i beta lanca kojeg određuje HLA-DQB1*02 alel, te je prisutan kod 90-95% oboljelih (8,9). Bolesnici za rizične alele mogu biti homozigoti ili heterozigoti, na temelju čega se može procijeniti veći rizik ili progresija bolesti povezana s jačinom kliničke slike u homozigota zbog većeg broja rizičnih alela. Proteini koji su kodirani na HLA lokusu su jedinstveni kod svake osobe te je HLA sistem vrlo polimorfna regija (4). HLA na šestom kromosomu se dijeli na tri razreda, od kojih prvi i drugi razred imaju ulogu prerade i predočavanje antigena na stanicama limfocita T. Dokazano je da je drugi razred humanog leukocitnog gena povezan s celijakijom a upravo u njemu su smjeteni rizični geni za HLA DQ2 i DQ8 molekule (2,10).

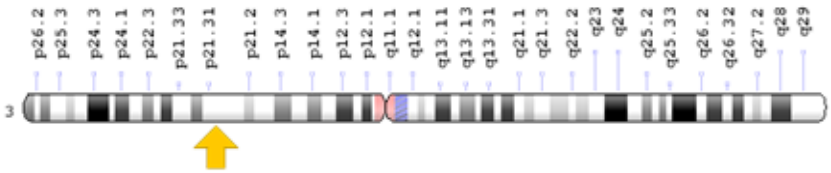
1.2.2 CC KEMOKINSKI RECEPTOR 5

Do danas je otkriveno oko 50 kemokina koji su povezani s imunološkim sustavom. To su sekretorni proteini koje proizvode leukociti i tkivne stanice. Funkcija kemokina je usmjeravanje leukocita prema upalnim mjestima putem njihovog gradijenta koji se povećava

prema mjestu upale. Kemokini su vrlo mali naspram citokina te djeluju preko receptora koji se povezuje s G-proteinom što utječe na privlačenje leukocita. Kemokini su proteini koji se sastoje od niza aminokiselina te su im sekvence vrlo slične, tj. različitost im je vrlo mala. Cistein je aminokiselina koja je vrlo bitna kod podjele kemokina jer prevladava kod većine kemokina (11). S obzirom na položaj dva cisteina, kemokine možemo podijeliti na četiri skupine: CXC, CC, C i CX3C. Skupina CC tzv. beta kemokini sadrže osamnaest različitih kemokina. Ciljno mjesto beta kemokina jesu mononuklearne stanice preko kojih posreduju potuupalne i homeostatske mehanizme. Kemokine te skupine možemo još podijeliti i na podskupine: alergenske, protuupalne, hemofiltrirajuće, razvojne i ostale. Kemokinski receptori pripadaju receptorima vezanih s G-proteinom i smješteni su u membrani. Kemokini se vežu za kemokinske receptore te ovisno o kemokinima dijelimo ih na: CXCR1 do CXCR6, CCR1 do CCR10, XCR1 i CXXXCR1. Nakon vezanja kemokina i kemokinskog receptora dolazi do vezanja s G-proteinom što dovodi do signalnih putova i aktivacije upalnih gena i promjena staničnog metabolizma.

Izraženost kemokinskih receptora je vrlo važan biljeg stanice jer primjerice CCR5 ima veliki značaj zbog toga što služi kao koreceptor za ulaz HIV virusa u stanicu. CCR5 se veže za G-protein te djeluje kao kemokinski receptor što vjerojatno ima neku određenu ulogu u upalnim procesima, no međutim njegova točna funkcija još nije razjašnjena. Taj kemokinski receptor ispoljava se na membranama T-stanica, makrofazima i dendritičkim stanicama. Gen koji kodira CCR5 protein nalazi se na kraku trećeg kromosoma, genski lokus 3p21.31 (slika 2.) te se sastoji od četiri egzona i dva introna (12). Delecijom CCR5-Δ32 dolazi do pomaka okvira čitanja nakon 174. aminokiseline i na kodonu 206 dolazi do prekida polipeptidnog lanca što dovodi do neizraženosti proteina na površini stanice (11). Uslijed CCR5-Δ32 je genska mutacija CCR5 protein postaje nefunkcionalni. Osobe mogu biti homozigoti i

heterozigoti za mutirani gen. Homozigoti imaju mutaciju na oba dva kromosoma, dok heterozigoti imaju mutaciju samo na jednom kromosomu.



Slika 2. Lokacija CCR5 gena na kromosomu 3p21.31

(https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CCR5#location)

Do sada je opisano više rizičnih regija podložnosti za celijakiju od kojih je najznačajnija regija CELIAC1 u kojoj se nalazi HLA lokus. CCR5 gen također se nalazi u jednoj od rizičnih regija označenih u OMIM bazi podataka kao CELIAC9 regija (13).

Do sada je publicirano svega nekoliko radova o povezanosti CCR5 regije u bolesnika s celijakijom i pridruženim bolestima od čega je analiza delecije Δ32 provedena u dvije studije. U jednoj studiji probira širom genoma (engl. Genome Wide Association Studies – GWAS) regija CCR5-Δ32 polimorfizma pokazala se kao zajednička regija utjecaja u celijakiji i dijabetesu tipa 1 (14) dok je u drugom radu ispitivana moguća povezanost CCR5-Δ32 genske varijante s celijakijom i autoimunosnom bolesti štitnjače u bolesnika s dijabetesom tipa 1 (15).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Kod oboljelih od celijakije postoji genetska predispozicija pri čemu su pojedine varijante HLA gena nužne, ali ne i dovoljne za razvoj bolesti. S obzirom na autoimunosnu prirodu

bolesti, genetskoj podložnosti i tijeku bolesti mogu doprinijeti geni uključeni u imunološki odgovor. Gen CCR5 jedan je od kemokinskih gena čiji je produkt ko-receptor za ulaz virusa u stanice i ima ulogu u upalnom odgovoru

Stoga je cilj našega istraživanja bio procijeniti mogući učinak Δ32 polimorfizma CCR5 gena u podložnost za celijakiju ovisno o spolu bolesnika, tipu bolesti (tipičina i atipična celijakija) te o drugim združenim bolestima.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. ISPITANICI

Istraživanjem su obuhvaćene dvije skupine ispitanika: oboljeli od celijakije i kontrolna skupina zdravih osoba. Ukupni broj ispitanika oboljelih od celijakije je 175 od koji je 67 muškaraca i 108 žena. Prema revidiranim ESPGHAN (European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition) kriterijima bolesnicima je dijagnosticirana celijakija a pregledani su i obrađeni na Klinici za internu medicinu ili na Klinici za pedijatriju KBC-a Rijeka. Oboljeli od celijakije, podijeljeni su u dvije skupine ovisno o tipu celijakije (tipična i atipična celijakija). Skupinu s tipičnom celijakijom najčešće čine djeca do druge godine života, dok skupinu s atipičnom celijakijom čine osobe kasnije dobi tako da je prosjek godina te skupine 24,9±8,8 godina. Kontrolna skupina se sastoji od 175 zdravih dobrovoljnih davatelja krvi koji su nesrodni međusobno i s bolesnicima. Kontrolna skupina je usklađena prema dobi, spolu te mjestu prebivanja prema oboljelim od celijakije. DNA ispitanika kontrolne skupine pohranjena je na Zavoda za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci u DNA banci Laboratorija za molekularnu genetiku.

Sudionici ovog istraživanja bili su upoznati s ciljevima istraživanja, anketirani i nakon pristanka im je uzeta krv za molekularno–genetičku analizu u skladu s bioetičkim principima.

3.2. METODE

Ispitanicima istraživanja izvađeno je po 3 ml periferne venske krvi. Krv je zamrznuta u epruvetama s antikoagulansom (EDTA) na -20ºC. Prilikom molekularno-genetičke analize provedena je izolacija DNA, potom lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction* - PCR) te elektroforeza i utvrđivanje genotipova za svakog ispitanika. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni.

3.2.1. IZOLACIJA DNA

Za molekularno-genetičku analizu izolirana je genomska DNA iz periferne krvi ispitanika pomoću komercijalnih kitova za izolaciju (FlexiGene DNA Kit, Qiagen), prema uputama proizvođača. Izolirana DNA pohranjena je na -20°C na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci.

3.2.2 LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE

Lančana reakcija polimeraze, skraćeno PCR, je metoda prilikom koje se mali dio DNA umnaža u veliki broj identičnih kopija. Metoda se bazira na sintezi DNA molekula *in vitro* uz pomoć specifične DNA termostabilne polimeraze. Najčešće je to *Taq* polimeraza (iz bakterije *Thermus aquaticus*), koja za svoju aktivnost treba DNA slobodne nukleotide, magnezijeve ione i kratke odsječke DNA odnosno početnice (engl. *primeri*). Početnice su kratki oligonukleotidni lanci komplementarni početnom i završnom dijelu DNA koji želimo umnožiti. Početnice koje smo koristili u analizi CCR5 delta32 polimorfizma navedene su u Tablici 1, a sadržaj reakcijske smjese koja sadrži PCR pufer uz dodatak MgCl2, početnice F-*forward* i R-*reverse*, vodu za molekularne analize, enzim *Taq* polimerazu te DNA ispitanika u Tablici 2. Uvjeti reakcije - PCR program prikazan je u Tablici 3. Potrebno je izvršiti pripremu

reakcijske smjese uz dodatak izolirane DNA za svakog ispitanika posebno. Analiza se provodi uz pozitivnu (poznati uzorak heterozigota) i negativnu kontrolu (PCR smjesa bez DNA).

Tablica 1. Slijed početnih oligonukleotida za analizu CCR5-Δ32 polimorfizma

Početnice	**Sekvenca početnih oligonukleotida (5´- 3´)**
CCR5-F	CAA AAA GAA GGT CTT CAT TAC ACC
CCR5-R	CCT GTG CCT CTT CTT CTC ATT TCG

Tablica 2. Reakcijska smjesa u konačnom volumenu od 15 µl

	Količina (za 1 uzorak)	**Konačna koncentracija**
10 x PCR pufer	1,5 µl	1 x PCR pufer
50 Mm MgCl	0,45 µl	1 mM
10 mM dNTP	0,3 µl	0,05 mM
10 x primer CCR5- F	0,75 µl	0,2 µM
10 x primer CCR5- R	0,75 µl	0,2 µM
Bidestilirana voda	10,1 µl	
Taq polimeraza	0,15 µl	1,5 U
DNA	1 µl	

Tablica 3. Temperaturni ciklusi, PCR-program CCR5-Δ32

Korak	**Temperatura**	**Vrijeme**	**Broj ciklusa**
1.	94 ºC 55 ºC 72 ºC	1 minuta 1 minuta 1 minuta	5 x
2.	94 ºC 60 ºC 72 ºC	30 sekundi 30 sekundi 45 sekundi	35 x

3.2.3. ELEKTROFOREZA

Elektroforeza je metoda temeljena na kretanju električnih nabijenih čestica zbog djelovanja električnog polja. U istraživanju se koristila agarozna gel elektroforeza u kojoj je 3% gel napravljen od 1,5 g agaroze otopljenog u 50mL pufera TAE uz dodatak 2,5 µl etidij bromida. PCR produkt dobiven lančanom reakcijom polimeraze nanešen je u jažice na gelu gdje se elektroforeza odvijala na 86V i 10mA tijekom 45min. Potom se na transluminatoru očitavalo prisustvo i veličina PCR produkta.

3.2.4. IDENTIFIKACIJA POLIMORFIZMA Δ32 CCR5 GENA

U prisustvu polimorfizma Δ32 CCR5 gena dolazi do delecije 32 bp u genu za CC kemokinski receptor 5. S obzirom na ovaj polimorfizam postoje tri moguća genotipa: wt/wt, wt/Δ32 i Δ32/Δ32 (Tablica 4.).

Tablica 4. Veličina PCR produkata pri utvrđivanju CCR5-Δ32 genotipova

GENOTIP	**PCR PRODUKT** (bp)
wt/wt	137
wt/Δ32	105, 137
Δ32/Δ32	105

Wt – divlji tip (engl – *wild type*)

3.2.4. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Dobivene rezultate obradili smo pomoću računalnog programa Statistica for Windows 13.3 – licenca za Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci. Za provjeru razlika učestalosti alela i genotipova između skupina bolesnika s celijakijom i kontrolnih ispitanika korišten je χ^2 - test i Fisherov egzaktni test. Ispitivanje kliničkih karakteristika bolesti (dob dijagnoze i tip celijakije) u bolesnika različitih genotipova proveli smo jednosmjernim ANOVA testom.

4. REZULTATI

4.1. ANALIZA POLIMORFIZMA Δ32 CCR5 GENA U OBOLJELIH OD CELIJAKIJE

U analizi delecije Δ32 CCR5 gena sudjelovalo je 175 ispitanika oboljelih od celijakije (67 muškaraca i 108 žena), te 175 kontrolnih ispitanika (67 muškaraca i 108 žena). Analiza delecije CCR5-Δ32 prikazana je u Tablici 5. Kod oboljelih od celijakije, od 175 osoba, njih 141 (80,6%) je bez delecije CCR5-Δ32, a s delecijom ima 32 heterozigota (18,3%) i samo 2 homozigota (1,1%). Ukupni rezultat na temelju dobivenih podataka pokazuju da je delecija CCR5-Δ32 gena kod ispitanika oboljelih od celijakije (19,4%) statistički značajno češća ($p<0,05$) nego li kod zdravih ispitanika (10,3%). U skladu s tim i frekvencija alela između bolesnika s celijakijom i kontrolnih ispitanika statistički se značajno razlikuje ($p = 0,028$).

Tablica 5. Učestalost genotipova i frekvancija alela (%) za deleciju CCR5-Δ32 u oboljelih od celijakije (N=175) i kontrolnih ispitanika (N=175)

CCR5-Δ32 / **Genotip**	**Oboljeli od celijakije N (%)**	**Kontrolna skupina N (%)**	**OR (95% CI)**	**p**
wt/wt	141 (80,6)	157 (89,7)	0,48 (0,26– 0,88)	0,018
wt/Δ32	32 (18,3)	16 (9,2)	2,22 (1,17– 4,22)	0,015
Δ32/Δ32	2 (1,1)	2 (1,1)	1,00 (0,14– 7,18)	1,000
Ukupno	**175**	**175**		
Aleli (%)				
wt	89,7	94,3	0,53 (0,30-0,93)	0,028
Δ32	10,3	5,7	1,90 (1,07-3,34)	0,028

Wt – divlji tip (engl – *wild type*)

U tablici 6. navedeni su podaci kod oboljelih od celijakije prema spolu. Učestalost nosioca CCR5-Δ32 alela u muških bolesnika (23,9%) nešto je veća nego li u žena oboljelih od celijakije (16,7%) ali bez statistički značajne razlike (p>0,05). Isto vrijedi i za frekvenciju CCR5-Δ32 alela koja kod muških bolesnika iznosi 12,7% a u žena oboljelih od celijakije iznosi 11,4% (p>0,05). Na temelju tih podataka iz tablice 6. može se zaključiti da se učestalost delecije CCR5-Δ32 s obzirom na spol nije statistički značajno razlikovala (p>0,05) u našem uzorku bolesnika od 67 muškaraca i 108 žena.

Tablica 6. Učestalost delecije CCR5-Δ32 genotipova i alela u oboljelih od celijakije prema spolu

CCR5-Δ32	**Oboljeli od celijakije**			
Genotip	**Muškarci N (%)**	**Žene N (%)**	**OR (95% CI)**	**p**
wt/wt	51 (76,1)	90 (83,3)	0,64 (0,30-1,36)	0,243
wt/Δ32	15 (22,4)	17 (15,8)	1,54 (0,71-3,35)	0,271
Δ32/Δ32	1 (1,5)	1 (0,9)	1,62 (0,10-26,36)	0,734
Ukupno	**67**	**108**		
Aleli (%)				
wt	87,3	91,2	0,67 (0,33-1,33)	0,253
Δ32	12,7	8,8	1,50 (0,75-3,00)	0,253

Wt – divlji tip (engl – *wild type*)

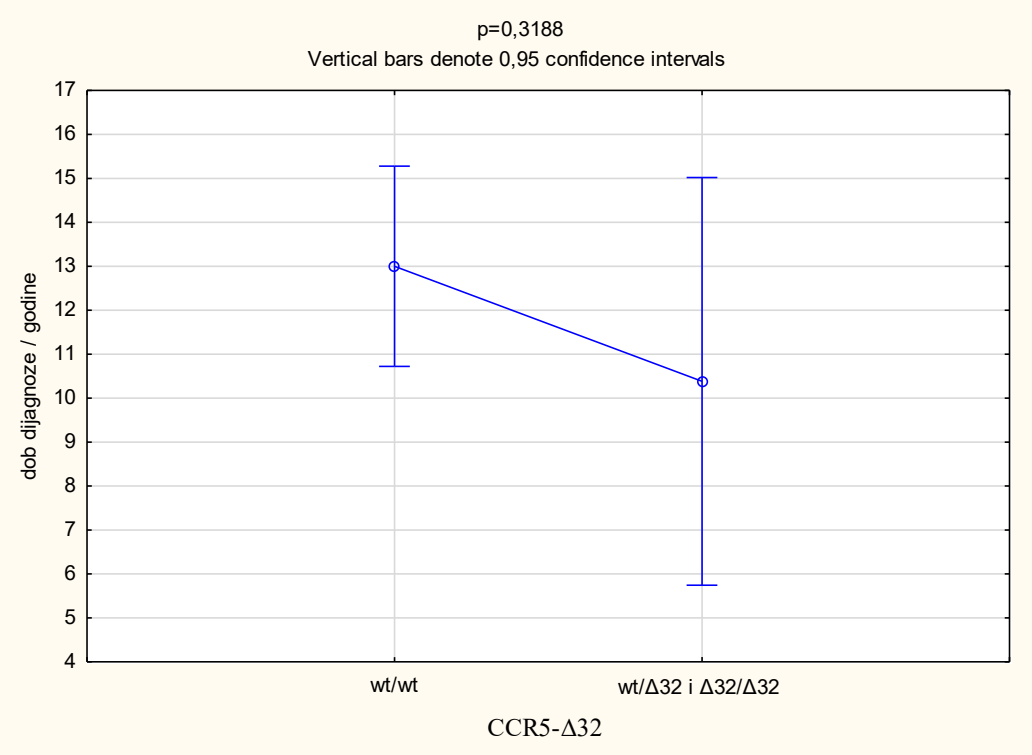
4.2 ANALIZA POLIMORFIZMA Δ32 CCR5 GENA PREMA POJAVNOSTI BOLESTI

Nakon što smo bolesnike podijelili prema pojavnosti bolesti na one s tipičnom kliničkom slikom (N=92) koja se razvija tijekom prve dvije godine života djeteta i na bolesnike s atipičnom kliničkom slikom celijakije (N=83) koja se dijagnosticira u kasnijoj životnoj dobi, kao što je prikazano u tablici 7, nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti pojedinih genotipova (p=0,23).

Tablica 7. Učestalost delecije CCR5-Δ32 u bolesnika s tipičnom (N=92) i atipičnom kliničkom slikom celijakije (N=83)

CCR5-Δ32	**Tipična celijakija N (%)**	**Atipična celijakija N (%)**
Bez delecije	71 (77,2)	70 (84,2)
S delecijom	21 (22,8)	13 (15,8)
UKUPNO	**92**	**83**

Dob bolesnika prilikom dijagnoze bolesti u odnosu na različite CCR5Δ32 genotipove prikazana je na slici 3. Rezultati su pokazali da iako je dob dijagnoze za gotovo 3 godine ranija u bolesnika s CCR5-Δ32 alelom nego li bez tog alela, nije bilo statistički značajne razlike (p = 0,32). U dva bolesnika koji su homozigoti za CCR5-Δ32 bolest je s tipičnom kliničkom slikom dijagnosticirana tijekom prve dvije godine života djeteta.



Slika 3. Dob nastupa bolesti u bolesnika s obzirom na prisutvo CCR5-Δ32 alela

Nakon podijelile bolesnika u tablici 7. na one koji uz celijakiju imaju i pridružene bolesti (N=34) poput anemije, dermatitisa, osteopenije, diabetes melitusa, glavobolje, psorijaze, Chronove bolesti i dr., te na one bolesnike bez pridruženih bolesti (N=141), također nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti pojedinih genotipova (p=0,50).

Tablica 8. Učestalost delecije CCR5-Δ32 u oboljelih s celijakijom i sa združenim bolestima (N=34) odnosno bez združenih bolesti (N=141)

CCR5-Δ32	**Bez združenih bolesti N (%)**	**Sa združenim bolestima N (%)**
Bez delecije	115 (81,5)	26 (76,5)
S delecijom	26 (18,5)	8 (23,5)
UKUPNO	**141**	**34**

5. RASPRAVA

Velik broj različitih istraživanja je dokazalo da je celijakija složena bolest koja se javlja u osoba s genetskom predispozicijom pri čemu je gluten poznat kao okidač bolesti. Što se genetičke podložnosti tiče, 40% heritabilnosti otpada na dobro opisane HLA-DQA1 i –DQB1 gene dok 60% genetici celijakije doprinose drugi uglavnom neistraženi rizični geni od kojih svaki ima samo blagi učinak (9). Prilikom kliničke obrade bolesnika u našem uzorku genska analiza provedena je u njih 85% koji su ujedno imali barem jedan rizični HLA-DQA1 i/ili –DQB1 alel.

Neki slučajevi celijakije povezani su i s drugim, u prvom redu autoimunim bolestima ili dodatnim komplikacijama. Tako je i u naših bolesnika njih 19,5% imalo združene bolesti. Celijakija je složena autoimunosna bolest s izraženom upalnom komponentom. Opisani su putevi urođenog i stečenog imunološkog odgovora a istraživanja upućuju na ulogu citokina i kemokina u regrutiranju stanica imunološkog sustava što vodi patološkim procesima. Migraciju proupalnih memorijskih T-stanica i monocita u upalnim tkivima pokreću Th1-povezani kemokini i njihovi receptori (15). To uključuje i kemokinski receptor 5, transmembranski protein uključen u unutarstaničnu signalizaciju. Interakcije između CCR5 i njegovih liganda igraju važnu ulogu ne samo u biologiji leukocita, već i u patogenezi različitih autoimunosnih bolesti (16). Polimorfizam CCR5 gena s delecijom od 32 parova baza CCR5-Δ32 mijenja okvir čitanja gena i posljedično dolazi do gubitka ekspresije ovog receptora u homozigota.

Nekoliko studija navelo je mogući doprinos CCR5-Δ32 polimorfizma s različitim imuno-posredovanim bolestima. Dosadašnji analize CCR5 gena u korelaciji s bolestima združenim s celijakijom publicirane su u pet studija a svega dvije od njih pratile su povezanost upravo CCR5-Δ32 genske varijante s celijakijom i/ili autoimunosnom bolesti štitnjače u bolesnika s dijabetesom tipa 1 (15,16). Naši rezultati pokazali su statistički značajnu ($p<0,05$) razliku u ferkvenciji CCR5 genotipova divljeg tipa i heterozigota između oboljelih od celijakije i

kontrolnih ispitanika, što je potvrdila i analiza frekvencijie alela CCR5-Δ32 (p=0,028). Veća učestalost CCR5-Δ32 alela u oboljelih nego kod kontrolne skupine ukazuje na potencijalnu ulogu CCR5-Δ32 delecije kao rizičnog čimbenika u podložnosti za celijakiju. Udio homozigota za ovaj alel nije se razlikovao između bolesnika i kontrole ali obzirom da se radi o svega dva bolesnika, odnosno kontrolana ispitanika koji su homozigoti, za konačan zaključak broj svih ispitanika uključenih u analizu trebalo bi povećati. Słomiński i sur (15) analizirali su CCR5-Δ32 polimorfizam u bolesnika s dijabetesom tipa 1 (T1D) koji imaju i celijakijt te autoimunosnu bolest štitnjače obzirom da u patogenezi sva tri poremećaja dijele zajedničku HLA predispoziciju u vidu rizičnih HLA-DQA1*0501 i DQB1*0201 alela. Međutim, njihov interes bio je usmjeren na bolesnike s T1D za koje se pokazalo da ovaj polimorfizam ima moguć protektivan učinak. Ipak u T1D bolesnika s celijakijom incidencija CCR5-Δ32 polimorfizma bila je viša nego li u T1D bolesnika bez celijakije.

Obzirom na kliničku pojavnost bolesti nakon podijele bolesnika na one koji uz celijakiju imaju i pridružene bolesti uključujući i *diabetes mellitus* te na one bolesnike bez pridruženih bolesti (tablica 8) nismo uočili značajne razlike u distribuciji pojedinih CCR5-Δ32 genotipova (p=0,50). Bolesnika s celijakijom uz druge pridružene bolesti u našem uzorku bilo je 34 (19,4%) a od tog broja samo njih 5 (2,8%) imalo je *diabetes mellitus*. Epidemiološke studije prijavljuju da oko 4% bolesnika s tipom 1 šećerne bolesti ima celijakiju kao pridruženu bolest.

Celijakiju prema kliničkoj slici i dobi javljanja simptoma možemo podijeliti na tipični i atipčni tip, a usporedbom učestalosti CCR5-Δ32 genotipova također nije utvrđena statistički značajna razlika između tipova celijakije (tablica 7), premda je udio nositelja delecije CCR5-Δ32 veći kod tipčne celijakije (22,8%) naspram atipičnog oblika (15,8%) koji se razvija u kasnijoj životnoj dobi. Možemo napomenuti i da su oba homozigota za ovu deleciju u uzorku naših bolesnika zabilježena u skupini s tipičnim oblikom celijakije koja se javlja tijekom prve dvije godine života. U skladu s time i analiza varijance (ANOVA) (Slika 3) pokazala je da je

celijakija dijagnosticirana gotovo 3 godine ranije u bolesnika s CCR5-Δ32 alelom nego li u bolesnika bez ovog alela, također bez statistički značajne razlike ($p = 0,32$).

Iako se celijakija, kao i druge autoimunosne bolesti, češće javljaju u žena nego li u muškaraca, distribucija genotipova i frekvencija alela za CCR5-Δ32 gensku varijantu (tablica 6) nije se značajno razlikovala među spolovima ($p>0,05$). Omjer žena i muškaraca oboljelih od celijakije u našem uzorku bolesnika iznosio je 1,6 : 1, uzroci veće učestalosti celijakije u žena kriju se među drugim čimbenicima.

Ograničavajući čimbenik ovog istraživanja je relativno mali broj od 175 bolesnika, a uz to smo vezano s tijekom bolesti pratili svega nekoliko parametara. Unatoč tome, na osnovi iznesenih rezultata možemo zaključiti da CCR5-Δ32 genska varijanta može imati utjecaj u podložnosti kao rizični čimbenik u celijakiji, dok s druge strane ne utječe na pojavnost bolesti praćenu kroz dob postavljanja dijagnoze i tip celijakije te bolesti pridružene s celijakijom.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata istraživanja uloge CCR5-Δ32 polimorfizma u podložnosti i kliničkoj ekspresiji MS na području Gorskog kotara, došli smo do sljedećih zaključaka:

1. Distribucija CCR5-Δ32 genotipova divljeg tipa i heterozigota kao i CCR5-Δ32 alela između oboljelih od celijakije i zdravih ispitanika statistički se značajno razlikovala ($p<0,05$), osim u slučaju homozigota za CCR5-Δ32 genotip ($p>0,05$).

2. Nije bilo značajne razlike u distribuciji CCR5Δ32 genotipova i alela između muškaraca i žena oboljelih od celijakije (p>0,05).
3. Iako je učestalost delecije Δ32 CCR5 gena viša u bolesnika s tipičnom celijakijom (22,8%), nego što je u bolesnika s atipičnim oblikom bolesti (15,8%), te se bolest javlja 2,8 godina ranije u nosioca ovog alela, razlike nisu statistički značajne (p=0,23 i p=0,32).
4. Nije utvrđena statistički značajna razlika (p=0,50) u nosioca CCR5-Δ32 alela između oboljelih od celijakije s združenim bolestima i oboljelih samo od celijakije, iako je delecija češća u slučaju združenih bolesti (23,5% vs. 18,5%).
5. Na temelju svih dobivenih rezultata proizlazi da bi CCR5-Δ32 polimorfizam mogao imati utjecaj na podložnost za celijakiju što bi trebalo potvrditi na većem broju bolesnika u različitim populacijama.

7. LITERATURA

1. Mišak Z, Kolaček S, Percl M. Celijakija – bolest na koju treba misliti. Medix. 2007;72:157-161.
2. https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/22699/Celijakija-ili-glutenska-enteropatija.html
3. Vedran Tomašić, Ivan Lerotić. Celijakija (Coeliac disease). HDOD. 3-12. 2013
4. Mijandrušić Sinčić B. Definicija, patogeneza i klinička slika celijakije. U: Pulanić R, Čuković Čavka S i sur. Algoritmi u gastroenterološkoj endoskopiji i endoskopskom ultrazvuku. Endoskopska dijagnostika, liječenje i praćenje kroničnih bolesti crijeva. Zagreb: Medicinska naklada, 2012; str. 269-291.

5. Wijarnpreecha K, Lou S, Panjawatanan P i sur. Cigarette smoking and risk of celiac disease: A systematic review and meta-analysis. United European Gastroenterol J. 2018;6(9):1285-93.
6. De Re V, Magris R, Cannizzaro R. New Insights into the Pathogenesis of Celiac Disease. Front Med. 2017;4:137
7. Viljamaa M, Kaukinen K, Huhtala H i sur. Coeliac disease, autoimmune diseases and gluten exposure. Scand J Gastroenterol 2005;40:437-43.
8. Starčević Čizmarević N, Mijandrušić Sinčić B, Licul V, Kapović M, Ristić S. Geni i celijakija. Pediatr Croat 2015;59:88-94.
9. https://en.wikipedia.org/wiki/Human_leukocyte_antigen
10. Sollid M.V. The roles of MHC class II genes and post-translational modification in celiac disease. Immunogenetics. 2017;69(8-9):605-16.
11. Rastene W, Buckingham JC. Chemokines as modulators of neuroendocrine functions. J Mol Endocrinol. 2007;38(3):351-3
12. https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CCR5
13. https://omim.org/entry/612007
14. Smyth DJ, Plagnol V, Walker NM i sur. Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. N Engl J Med. 2008;359(26):2767-77.
15. Słomiński B, Ławrynowicz U, Myśliwska J i sur. J Diabetes Complications. CCR5-Δ32 gene polymorphism is related to celiac disease and autoimmune thyroiditis coincidence in patients with type 1 diabetes. 2017;31(3):615-618.
16. Marques RE, Guabiraba R, Russo RC, Teixeira MM. Targeting CCR5 in inflammation. Expert Opin Ther Targets. 2013;17(12):1439-60.

ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Anika Lorencin Pucić

Datum, mjesto i država rođenja: 04.01.1997., Rijeka, Hrvatska

Adresa: Umejčina 3, Šmrika

Državljanstvo: Hrvatsko

Osnovna škola: OŠ Kraljevica

Srednja škola: Prva sušačka hrvatska gimnazija (prirodoslovno-matematički smjer)