

Utjecaj gena za vitamin D receptor u razvoju celijakije

Pešut, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:486271>

Rights / Prava: [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Iva Pešut

UTJECAJ GENA ZA VITAMIN D RECEPTOR U RAZVOJU CELIJAKIJE

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Iva Pešut

UTJECAJ GENA ZA VITAMIN D RECEPTOR U RAZVOJU CELIJAKIJE

Diplomski rad

Rijeka, 2021.

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

Diplomski rad obranjen je dana 16.07.2021. na Medicinskom fakultetu u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad sadrži 49 stranica, 10 slika, 14 tablica, 28 literaturnih navoda.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Nada Starčević Čizmarević na nesebičnoj pomoći, prenesenom znanju i savjetima.

Također, se zahvaljujem svim zaposlenicima Zavoda za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci na pruženoj pomoći prilikom praktične izrade rada.

Na kraju, zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na neizmernoj podršci tijekom cijelog studija.

SAŽETAK

Celijakija je kronična imunološki posredovana enteropatija tankog crijeva koju pokreće izloženost glutenu kod osoba koje su genetski predisponirane. Međutim, zajedno s glutenom, i drugi čimbenici okoliša također su uključeni u nastanak celijakije.

U prijašnjim istraživanjima dokazano je da vitamin D utječe na imunološki odgovor modificirajući funkciju T limfocita, NK stanica, B stanica te antigen prezentirajućih stanica, na taj način da se veže za vitamin D receptor (VDR). Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj gena za vitamin D receptor u razvoju celijakije.

U istraživanju je sudjelovalo 196 oboljelih od celijakije koji su bili usklađeni po broju i spolu s kontrolnom skupinom. Istraživali smo učestalost genotipova i frekvenciju alela u FokI polimorfizmu VDR gena kod dvije skupine bolesnika. Ispitanici su uspoređeni po spolu, tipu bolesti i prisutnosti pridruženih bolesti. Za analizu FokI polimorfizma VDR gena korišten je PCR uređaj za umnožavanje ciljnog fragmenta DNA, nakon čega su uzorci podvrgnuti djelovanju FokI restrikcijskog enzima. Fragmenti su detektirani agaroznom gel-elektroforezom.

Istraživanje nije pokazalo statistički značajnu razliku u ispitivanim skupinama, međutim možemo napomenuti kako je od 33 ispitanika koji su imali neku od pridruženih bolesti njih pet imalo diabetes mellitus tipa I koji se povezuje s celijakijom te bi stoga bilo zanimljivo promatrati raspodjelu podataka na većem broju ispitanika ($p > 0,05$).

Na kraju istraživanja možemo zaključiti kako FokI polimorfizam VDR gena nema utjecaj u podložnosti za celijakiju dok bi za eventualnu povezanost s kliničkom slikom valjalo provesti istraživanje na većem broju bolesnika.

Ključne riječi: celijakija, vitamin D receptor, FokI polimorfizam VDR gena

SUMMARY

Celiac disease is a chronic immune-mediated small bowel enteropathy triggered by gluten exposure in a genetically predisposed person. However, along with gluten, other environmental factors are also involved in the development of celiac disease.

Previous research has shown that vitamin D affects the immune response by modifying the function of T lymphocytes, NK cells, B cells, and antigen presenting cells, by binding to the vitamin D receptor (VDR). This study aimed to determine the influence of the vitamin D receptor gene on the development of celiac disease.

The study involved 196 patients with celiac disease, who were matched in number and sex with the control group. We investigated the frequency of genotypes and allele frequency in the FokI polymorphism of the VDR gene in two groups of patients. Subjects were compared by gender, disease type, and the presence of associated diseases. A PCR device for amplifying the target DNA fragment was used to analyze the VDR FokI polymorphism, after which the samples were subjected to the FokI restriction enzyme overnight. Fragments were detected by gel electrophoresis.

The study did not show a statistically significant difference in the study groups, but we can note that of the 33 subjects who had any of the associated diseases, five had type 1 diabetes mellitus, which could be associated with celiac disease, and therefore it would be interesting to observe data on vulnerability subjects ($p > 0.05$).

At the end of the study, we can conclude that the FokI polymorphism of the VDR gene does not affect susceptibility to celiac disease, while for a possible association with the clinical picture, research should be performed on a larger number of patients.

Keywords: celiac disease, vitamin D receptor, FokI VDR gene polymorphism

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	CELJAKIJA.....	1
1.2.	POVIJEST CELJAKIJE.....	1
1.3.	EPIDEMIOLOGIJA.....	2
1.4.	GLUTEN.....	2
1.5.	OKOLIŠNI ČIMBENICI U NASTANKU CELJAKIJE.....	3
1.6.	KLINIČKA SLIKA I OBLICI CELJAKIJE.....	4
1.7.	MEHANIZAM DJELOVANJA I PATOGENEZA CELJAKIJE.....	5
1.8.	HLA GENI I CELJAKIJA.....	6
1.9.	DIJAGNOSTIKA CELJAKIJE.....	7
1.10.	KOMPLIKACIJE CELJAKIJE.....	9
1.11.	LIJEČENJE CELJAKIJE.....	9
1.12.	VITAMIN D I CELJAKIJA.....	11
1.13.	VDR GEN.....	12
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	15
3.	ISPITANICI I METODE RADA.....	16
3.1.	ISPITANICI.....	16
3.2.	METODE RADA.....	17
3.3.	IZOLACIJA DNA.....	17
3.4.	MOLEKULARNO-GENETIČKA ANALIZA FokI POLIMORFIZMA VDR GENA.....	17
3.4.1.	LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE.....	17
3.4.2.	AGAROSNA GEL-ELEKTROFOREZA.....	20
3.4.3.	RESTRIKCIJA FokI ENDONUKLEAZOM.....	20
3.5.	IDENTIFIKACIJA FokI POLIMORFIZMA VDR GENA.....	21
4.	STATISTIČKA OBRADA REZULTATA.....	22
5.	REZULTATI.....	23
5.1.	ANALIZA FokI POLIMORFIZMA VDR GENA U OBOLJELIH OD CELJAKIJE.....	23

5.2.	ANALIZA FokI POLIMORFIZMA VDR GENA PREMA TIPU CELIJAKIJE	26
5.3.	ANALIZA FokI POLIMORFIZMA VDR GENA U CELIJAKIJI S OBZIROM NA PRIDRUŽENE BOLESTI.....	28
5.4.	ANALIZA FokI POLIMORFIZMA VDR GENA U CELIJAKIJI S OBZIROM NA DOB DIJAGNOZE.....	30
5.5.	ANALIZA FokI POLIMORFIZMA VDR GENA U CELIJAKIJI S OBZIROM NA HLA GENOTIP	31
6.	RASPRAVA	32
7.	ZAKLJUČCI.....	35
8.	LITERATURA	36
9.	POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA	40
10.	ŽIVOTOPIS.....	41

1. UVOD

1.1. CELIJAKIJA

Celijakija (CD, engl. celiac disease) je kronična imunološki posredovana enteropatija koja zahvaća tanko crijevo u genetski predisponiranih osoba, a nastaje kao posljedica trajne nepodnošljivosti glutena. Bolest je u cijelosti opisao Samuel Gee još 1888. godine, naglasivši da se bolest može javiti u svakom periodu života, dok se do tada smatrala isključivo bolešću dječje dobi (1). Celijakija je rezultat složene interakcije između genetskih i okolišnih čimbenika, te imunološkog sustava koji dovode do neodgovarajućeg odgovora T stanica u mukozi tankog crijeva na gluten i na kraju do atrofije istoga (2).

Klinička slika celijakije je vrlo složena no neki od najčešćih simptoma su proljev, nadutost, bol u želucu, anemija, gubitak težine, bolovi u kostima i zglobovima. Međutim, specifičnost bolesti je da simptomi među bolesnicima mogu biti vrlo različiti, pa tako tako pojedini ne mora imati sve karakteristične simptome, već simptomi mogu djelomično ili potpuno izostati (3).

1.2. POVIJEST CELIJAKIJE

Žitarice su prvi put korištene za redovitu konzumaciju u ljudskoj prehrani tek prije otprilike 10 000 godina u Mezopotamiji i oko 3000 godina kasnije u srednjoj Europi. U drugom stoljeću naše ere Aretej iz Kapadokije opisao je bolest „trbuha“ koja je očito bila povezana s prehranom, ali se ipak Samuel Gee smatra prvim koji je opisao bolest koju danas znamo kao celijakiju. Celijakija je u prvoj polovici 20. stoljeća bila bolest visoke smrtnosti koja je dosezala čak 30%.

Pedijatar K. W. Dicke iz Utrechta i Haaga, početkom 1930-ih, prvi je povezo celijakiju s konzumacijom pšenice. Potvrdio je svoju hipotezu kada se simptomi njegovih pacijenata poboljšali tijekom nestašice žitarica koja je vladala pred kraj Drugog svjetskog rata.

Iako je precizna i racionalna dijagnostička procjena sada moguća, celijakija je i dalje nedovoljno istražena zbog širokog kliničkog spektra i nedovoljne upotrebe serološkog probira (2, 3).

1.3. EPIDEMIOLOGIJA

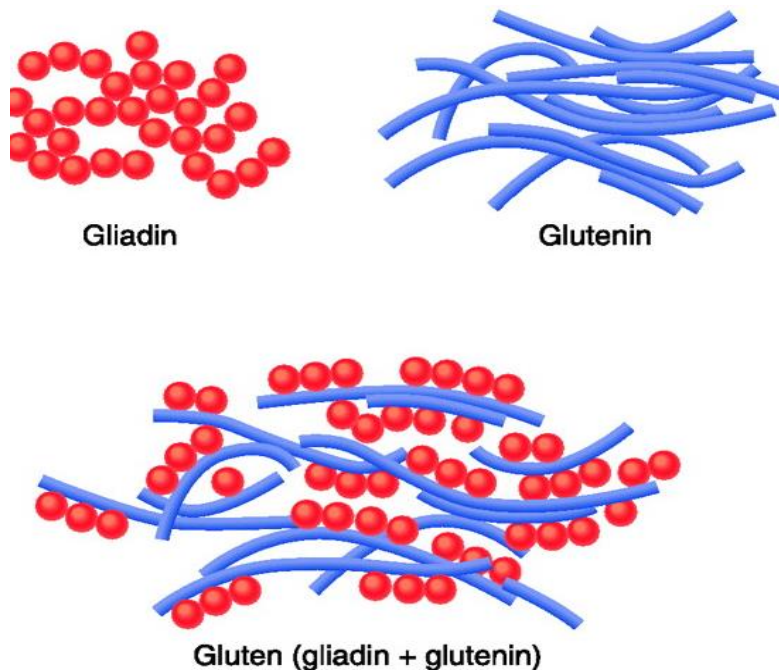
Prevalencija celijakije značajno varira, pa se tako do prije četrdesetak godina smatrala relativno rijetkom bolešću ograničenom isključivo na europski kontinent, dok je s razvojem dijagnostičkih metoda danas poznato kako je celijakija zapravo sveprisutna bolest s prevalencijom od oko 1-2%, pa se tako pretpostavlja kako su zapravo značajne promjene u prehranbenim navikama, a tu se prije svega misli na osobito povećani unos glutena glavni čimbenici za povećanje prevalencije bolesti (3). Odnos žena i muškaraca koji oboljevaju kreće se od 1:3 do 1,5:1. Celijakija je bolest koja pogađa sve dobne skupine no ipak istraživanja dokazuju kako čak 70% pacijenata ima dijagnozu stariju od 20 godina. Isto tako, rizik od nastanka celijakije u veći je kod srodnika u prvom koljenu nego kod drugog i trećeg koljena. Također, studije na blizancima pokazale su da je rizik za oboljenje mnogo veći kod monozigodnih blizanaca od dizigodnih blizanaca (4). Visoki rizik za pojavu celijakije imaju i stanja kao što je dijabetes tipa I, anemija, hepatitis, osteopenija, primarna bilijarna ciroza, Turnerov i Downov sindrom, autoimunosne endokrinopatije poput bolesti štitnjače i Addisonove bolesti, ataksija, miastenija, epilepsija i IgA-nefropatija (3).

1.4. GLUTEN

Uzgoj divljih žitarica započela su nomadska plemena u Aziji još prije 10.000 godina od kuda se ta kultura proširila po cijelom svijetu, a razvojem tehnike pravljenja kruha izabirale su se sve kvalitetnije žitarice s većim udjelom glutena koji je pridonosio boljoj elastičnosti tijesta. Gluten je smjesa dvije bjelančevine (glijadin i glutenin) koja se nalazi u pšenici. Bjelančevina glijadin čini prolaminski dio bjelančevine, a glutenin tvori glutelinski dio. Ove dvije bjelančevine karakteristične su za pšenicu, međutim i žitarice kao što je raž, ječam i zob sadrže bjelančevine koje izazivaju intoleranciju u genski predisponiranih osoba. Prolaminski dio, glijadin odgovoran je za upalu sluznice tankog crijeva kod takvih osoba.

Svojstva poput viskoznosti i elastičnosti glutenske smjese omogućavaju postizanje zadovoljavajuće teksture tijesta i okusa tijesta. Gluten više nije samo sastojak kruha, kolača i tjestenina, već je razvojem prehrambene industrije dospio u razne namirnice kao što su industrijski pripremljene juhe, slatkiši, umaci i suhomesnati proizvod u kojima gluten nije izvorna bjelančevina već je tamo dospio ili križnom kontaminacijom ili pak namjernim dodavanjem kako bi proizvod obogatio svojim svojstvima. Zbog svih navedenih činjenica

unos glutena u prehrani, osobito u zapadnoj populaciji, stalno raste te se procjenjuje da jedan stanovnik dnevno konzumira 15–50 grama (3, 6).



Slika 1. Struktura glutena (Preuzeto: <https://www.fittijelo.com/sto-je-gluten/>)

Gluten je glavni okolišni čimbenik koji uzrokuje različite poremećaje koji su konsenzusom održanom 2012. godine podijeljeni na tri osnovna oblika. Uz celijakiju kao autoimuni poremećaj, moguća je i alergijska reakcija na gluten, te imunološki posredovana preosjetljivost na gluten (6).

1.5. OKOLIŠNI ČIMBENICI U NASTANKU CELIJAKIJE

Načini hranjenja u prvoj godini života i potencijalne virusne infekcije mogu biti uključeni u razvoj celijakije. Prospektivna studija istraživala je ulogu određenog zaraznog agensa u celijakiji, a autori su otkrili da povećana učestalost infekcije rotavirusom predviđa povećani rizik od celijakije u djece. Gluten, jedan od najčešćih sastojaka u ljudskoj prehrani, uglavnom čine prolamini i glutenin. Prolamini u pšenici su gliadini, u raži sekalini i u ječmu hordeini. Catassi i suradnici (28) predložili su da je 50 mg glutena dnevno minimalna količina koja može utvrditi evidentne promjene sluznice tankog crijeva u ispitanika s celijakijom. Drugi ključni okolišni čimbenici koji se navode su trajanje dojenja, te vrijeme uvođenja glutena u prehranu djeteta. Uz to, kod ispitanika koji su oboljeli od celijakije pronađen je povećani broj

gram-negativnih bakterija i smanjen broj bifidobakterija. Ostali raspravljani čimbenici okoliša mogli bi biti teški metali i bakterijska transglutaminaza prisutna u hrani (11).

1.6. KLINIČKA SLIKA I OBLICI CELIJAKIJE

Gluten može izazvati čitav niz poremećaja u preosjetljivih osoba. Pa tako uz glutensku enteropatiju može dovesti i do kožnih promjena uzrokovanih konzumacijom istog, također kod nekih osoba javlja se alergija i preosjetljivost na gluten.

Svaki od tri osnovna oblika poremećaja glutena pojavljuje se kod određenih pojedinaca u više tipova, pa se upravo tako i celijakija može podijeliti u dva osnovna tipa (6).

Svjetska gastroenterološka organizacija definirala je dva tipa celijakije: klasični i neklasični tip. Kod klasičnog tipa bolesti kliničku sliku karakteriziraju znakovi i simptomi uključujući proljev, malapsorpciju, steatoreju te gubitak tjelesne mase. Klasični tip celijakije se obično javlja u djece do druge godine života pa se stoga može primijetiti i zaostalost u rastu i razvoju uz ostale kliničke znakove uzrokovane manjkom apsorpcije makro i mirkonutrijenata (1-6). U neklasičnom tipu celijakije bolesnici najčešće imaju blage gastrointestinalne simptome. Isto tako, nerijetko su to ne povezani simptomi te bez jasnih znakova malapsorpcije.

Kod takvih bolesnika se mogu javiti i drugi simptomi kao što su anemija zbog nedovoljno željeza, nedostatak vitamina (folne kiseline i B12), iscrpljenost, kronična migrena, periferna neuropatija, oštećenje zubne cakline, smanjenje koštane mase, rana menopauza, prijelomi kostiju, neplodnost, depresija, te dermatitis herpetiformis. Neklasični tip celijakije se javlja u odraslih osoba (1, 5, 6).

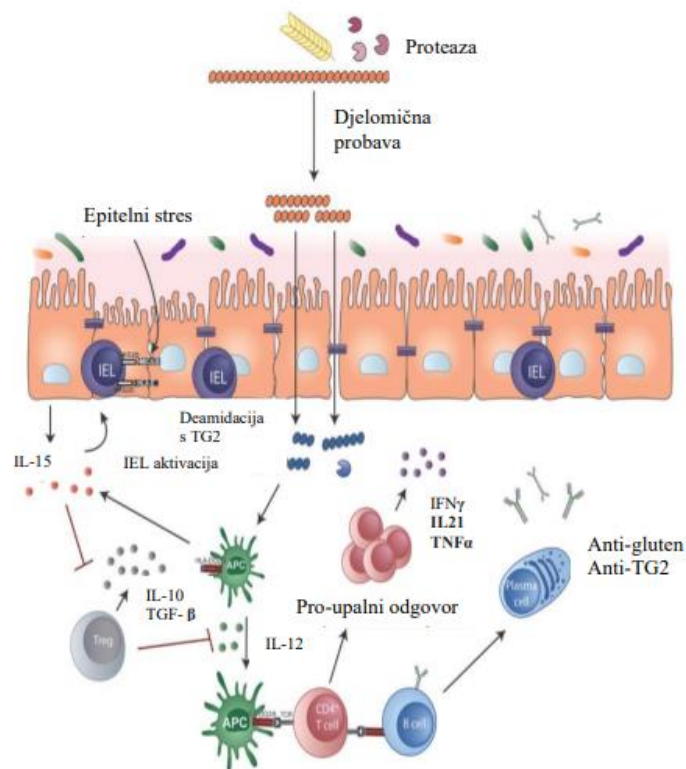
Uz celijakiju kao osnovnu bolest pacijenti nerijetko mogu imati i pridružene bolesti, a najčešće su to autoimune bolesti. Dokazana je genska povezanost glutenske enteropatije s nekolicinom autoimunih bolesti koje se zajedno nasljeđuju. Najčešće bolesti koje se povezuju s celijakijom su diabetes mellitus tipa 1, zatim autoimune bolesti štitnjače i jetre, sindromi kao što je Turner i Down, upalne bolesti crijeva, IgA deficijencija te Sjogrenova bolest. Glutenska enteropatija zahvaća tanko crijevo pa se stoga povezuje kao uzrok egzokrine pankreasne insuficijencije s posljedičnom atrofijom acinarnih stanica te fibrozom gušterače (5).

1.7. MEHANIZAM DJELOVANJA I PATOGENEZA CELIJAKIJE

Tri elementa ključna za nastanak celijakije su gluten, genska predispozicija i imunosni odgovor.

Osnovini mehanizam kojim gluten utječe na pojavu upalne reakcije je posredovan glutaminom i prolaminom koji sprječavaju želučanu i pankreasnu peptidazu, te peptidazu crijevnih resica da probave gluten u potpunosti. Uslijed toga veliki peptidi prolaze kroz epitel crijeva i ulaze u laminu propriju transcelularnim ili paracelularnim putem, te tamo dolazi u kontakt s tkivnom transglutaminazom (tTG) koja deaminacijom pretvara glutamin u glutaminsku kiselinu (5).

Nakon procesa deaminacije u lamini propriji dolazi do porasta afiniteta glijadinskih peptida za HLA receptore na antigen prezentirajućim stanicama (APS, te na taj način interakcijom deaminiranog glijadina i HLA receptora dolazi do aktivacije stečenog imunosnog odgovora posredovanog intestinalnim CD4+ T-limfocitima (1).



Slika 2. Mehanizam djelovanja imunološkog odgovora prilikom unosa glutena (Preuzeto: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6258800/>)

Međutim, bez genetske predispozicije pojavnost bolesti nije moguća. Istraživanja su dokazala kako 10-15% srodnika prvog koljena osoba koje imaju celijakiju imaju je i sami pa je tako u jednojajčanih blizanaca visok postotak oboljelih, dok se kod dvojajčanih blizanaca bolest javlja u oko 30%. Isto tako istraživanja su dokazala kako više od devedeset i pet posto bolesnika s celijakijom nosi DQ2 ili DQ8 haplotip humanog leukocitnog antigena (HLA), dok ga u općoj populaciji ima 30-40% osoba od kojih će oko 3% razviti celijakiju.

Isto tako, kako je jedan od elemenata potrebnih za nastanak celijakije imunosni odgovor, te je već opisano na koji način stečeni imunitet sudjeluje u nastanku celijakije, važno je još napomenuti kako se smatra da u imunosnoj reakciji na gluten uz stečeni sudjeluje i urođeni imunosni sustav (3, 5).

1.8. HLA GENI I CELIJAKIJA

Mehanizam razvoja celijakije ovisi o međusobnoj povezanosti okolišnih i genetskih čimbenika. Najvažniji čimbenik okoliša u razvoju CD-a je konzumacija glutena, što se odražava u svjetskoj distribuciji CD-a. Genetska osjetljivost je, međutim, ključni faktor, jer će samo osobe s genetskom predispozicijom razviti bolest. Čimbenici okoliša u kontekstu genetske osjetljivosti pokreću imunološki sustav, koji je osnovni uzrok patogeneze CD-a (3).

Najvažniji genetski čimbenik u razvoju CD-a je prisutnost specifičnih HLA molekula klase II HLA-DQ2 ili HLA-DQ8, za koje je dokazano da su odgovorni za oko 40% genskog rizika za razvoj celijakije koji su prema HUGO (*Gene Nomenclature Committee*) svrstani u skupinu CELIAC1 (3). HLA razreda II. građeni su od jednog α i jednog β lanca koji se međusobno razlikuju u slijedu aminokiselina (1). HLA-DQ2 i HLA-DQ8 kodirane su HLA sustavom koji je lociran na kratkom kraku kromosoma 6, u regiji 6p21.3 (1,7).

Pored CD-a, prisutnost DQ2 i DQ8 haplotipova povezana je i s drugim autoimunim bolestima kao što su dijabetes tipa I.

Devedeset do devedeset i pet posto bolesnika s CD-om izražava određeni HLA-DQ2 heterodimer kodiran alelom HLA-DQA1*05 u kombinaciji s alelom HLA-DQB1*02, a još se naziva i HLA-DQ2.5. Ovaj se heterodimer može kodirati u cis konformaciju, kada su oba alela smještena na istom kromosomu, prisutan kod osoba koje imaju haplotip HLA-DQA1*05:01/HLA-DQB1*02:01. Heterodimer HLA-DQ2.5 također se može kodirati

alelima u trans konformaciju u oni koji izražavaju HLA-DQA1*05:05 s HLA-DQB1*03:01 (DQ7) na jednom kromosomu. Uz HLA-DQ2, 5% do 10% bolesnika s CD-om nosi i HLA-DQ8 kodiran alelom HLA-DQB1*03:02, najčešće u kombinaciji s HLA-DQA1*03:01 (3).

1.9. DIJAGNOSTIKA CELIJAKIJE

Pravovremena dijagnoza i stroga bezglutenska prehrana omogućuju bolesnicima lagodan život, bez komplikacija bolesti te smanjen rizik od smrti. U dijagnostici celijakije postoji pet važnih koraka koji omogućavaju odgovarajuće provođenje dijagnostičkog postupka. Klinička sumnja na celijakiju prvi je korak u dijagnostici celijakije. S obzirom na raznolikost simptoma postavljanje kliničke slike može biti otežano. Serološki testovi, biopsija tankog crijeva i genska analiza DQ2DQ8-heterodimera smatraju se isključnim testovima u postavljanju dijagnoze (3, 5, 8).

Kao prvi dijagnostički korak u dijagnostici celijakije savjetuje se odrediti titar specifičnih protutijela IgA-razreda.

Prvi serološki test koji se počeo koristiti je onaj za određivanje antiglijadinskih protutijela (AGA-IgG). Ovi testovi imaju visoku osjetljivost i 90-95 % oboljelih od celijakije je pozitivno na ova protutijela, međutim ima nisku specifičnost (oko 50 %) jer je prisutan i kod drugih bolesti tankog crijeva, dok antiglijadinska protutijela IgA-razreda (AGA-IgA) imaju znatno nižu osjetljivost u odnosu na AGA-IgG, ali im je specifičnost znatno viša. Međutim, danas se ova dva testa ne koriste u dijagnostičke svrhe (3, 5, 9-11).

Danas se od seroloških testova koristi jedino onaj za određivanje specifičnog protutijela na tTG (tkivna transglutaminaza). Prisustvo glutena u tankom crijevu dovodi do stvaranja Anti tTG protutijela IgA tTG protutijela imaju visoku osjetljivosti (94%) i specifičnosti (94-95%) te se stoga koriste u dijagnostici glutenske enteropatije (3, 9, 11).

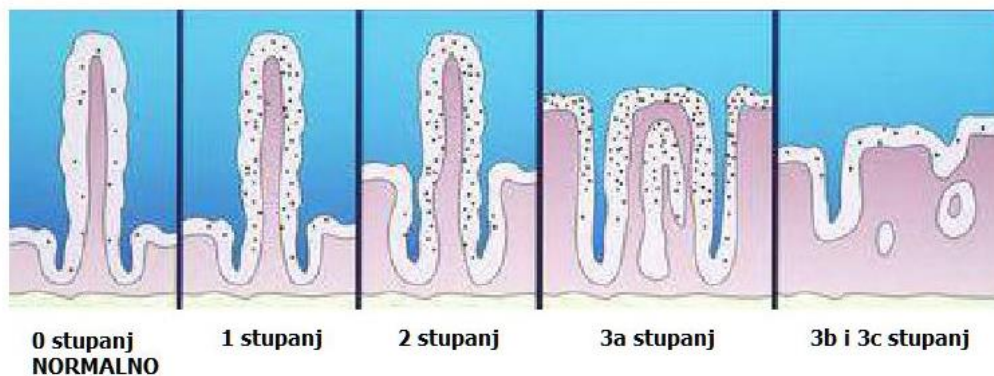
Biopsija sluznice dvanaesnika glavni je dijagnostički postupak za postavljanje dijagnoze celijakije. Uzorci tkiva uzimaju se u drugom i trećem odsječku dvanaesnika na takav način da se dobije najmanje 4-6 uzoraka tkiva za analizu. Endoskopski pregled dvanaesnika s uzimanjem uzoraka omogućuje postavljanje dijagnoze, međutim razvojem endoskopske tehnologije omogućiti će se mnogo detaljnija vizualizacija (2). Marsh-Oberhuber klasifikacija

razlikuje 4 stadija patohistoloških promjena s obzirom na glavne značajke analize celijakije koje su dane u Tablici 1. (3, 11).

Tablica 1. Marsh-Oberhuber klasifikacija 4 stadija patohistoloških promjena u celijakiji; IEL- intraepitelni limfociti

STADIJ 0	Normalne crijevne resice
STADIJ I	IEL > 40/100 stanica
STADIJ II	Hiperplazijakripati, povećan broj IEL, skraćenje resica
STADIJ III	Parcijalna, suptotalna i totalna atrofija resica

Genska analiza DQ2DQ8-heterodimera važan je korak u dijagnostici celijakije. S obzirom na zastupljenost ovog HLA tipa u općoj populaciji (40%), ova analiza smatra se isključnim testom u dijagnostičkom postupku (1, 3, 9-11). Povrh toga, prema smjernicama ESPGHAN-a iz 2012. godine predlaže se izostavljanje duodenalne biopsije kod djece koja imaju visoku kliničku sumnju na celijakiju, te im je vrijednost tTG protutijela deset puta veća od normale, a imaju i pozitivan nalaz EMA i HLA DQ2 i/ili DQ8 heterodimer (1).



Slika 3. Crijevne resice i stupnjevi oštećenja prema Marsh-Oberhuber klasifikacija (Preuzeto: <https://bez-glutena.hr/dijagnoza-celijakije-biopsija/>)

1.10. KOMPLIKACIJE CELIJAKIJE

Istraživanja su dokazala da kasna dijagnoza CD-a i nepoštivanje stroge bezglutenske dijeta može dovesti do komplikacija bolesti i veće smrtnosti u odnosu na opću populaciju.

Osteoporoza predstavlja najčešću komplikaciju koja proizlazi iz abnormalne apsorpcije kalcija uslijed neispravnog transporta kalcija u bolestima tankog crijeva, ali i zbog nedostatka vitamina D. Ranom prehranom bez glutena u djece moguće je spriječiti bolest kostiju u starijoj životnoj dobi. Limfom crijevnih T stanica povezan s enteropatijom predstavlja jednu od najvažnijih komplikacija. Kolagenska celijakija se javlja u pacijenata koji ne reagiraju na prehranu, a histologija pokazuje komponente izvanstaničnog matriksa u crijevnom zidu na razini površinskog sloja sub-epitela. Ovaj morfološki obrazac vrlo je sličan stanju kolagenskog kolitisa opisanog u debelom crijevu, gdje je debljina vezivnog pojasa koji je najbolje istaknut Massonovim trikromom veća od 15 nm, iako je ovo vrlo rijedak događaj opisan u literaturi. Tvrdokorna celijakija je stanje prikazano kao kod kolagenske celijakije, pacijenti ne odgovaraju na bezglutensku prehranu, te se poseže za medikamatoznom terapijom. Ukoliko terapija ne poboljša stanje bolesnika, prelazi se na potpuno parenteralnu prehranu, te u tom slučaju prognoza nije dobra. Ulcerozni jejunoileitis predstavlja opsežnu ulceraciju crijevne sluznice, koja uključuje ileum i jejunum. Celijakija bi mogla biti povezana i sa smanjenom plodnošću kod muškaraca i žena (8, 10).

Bolesti koje mogu biti posljedica neliječenja celijakije mogu biti i maligne prirode. Etiološki čimbenici koji predisponiraju malignost u celijakiji nisu sigurni. Mogućnosti uključuju imunološke poremećaje povezane s infiltracijom limfocita u sluznicu, premaligne promjene u oštećenim površinskim epitelnim stanicama, povećanu propusnost za onkogene čimbenike i abnormalnu apsorpciju zaštitnih tvari kao što su vitamini A i E (11).

1.11. LIJEČENJE CELIJAKIJE

Celijakiju je moguće izliječiti isključivo striktnom bezglutenskom prehranom. Iz prehrane je potrebno isključiti žitarice koje sadržavaju – pšenicu, raž, ječam i zob s obzirom na to da često dolazi do kontaminacije iste u procesu skladištenja i obrade (6, 9-12).

Bezglutenska prehrana uključuje namirnice koje prirodno ne sadrže gluten. Takve namirnice moraju biti označene simbolom prekrštenog klasa pšenice koji je vidljiv na slici 1. ili

deklaracija proizvoda mora u nazivu sadržavati „bez glutena“. Namirnice koje ne sadrže gluten su voće i povrće, riba, meso, riža, kukuruz i sl. (3).



Slika 4. Oznaka kojom se označava hrana bez glutena (Preuzeto sa:

<http://www.alergijaija.com/2017/05/10/gluten-free-kupovina/>)

Kod osoba s celijakijom nerijetko dolazi do deficita mikronutrijenata. Najčešće nedostaje folna kiselina, željezo, vitamini B skupine, kalcij, vitamin K i magnezij (8).

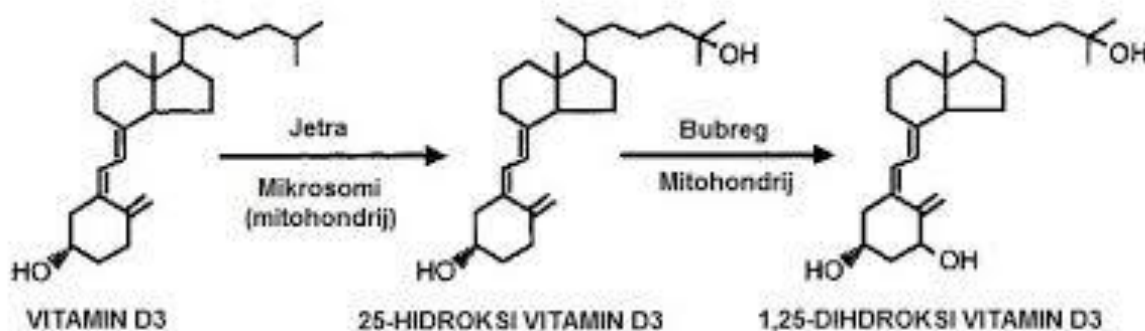
U posljednje vrijeme razmatraju se još neke vrste terapija pa je tako jedna od mogućnosti peroralna enzimaska terapija (prolil endopeptidaza). Ovom terapijom bi se bolesniku s celijakijom u probavnom traktu ubrzala razgradnja glutena, te bi se bolesnicima omogućila povremena konzumacija manje količine glutena. Nadalje, moguće vrste terapija podrazumijevaju inhibiciju intestinalne tkivne transglutaminaze i blokiranje vezanja peptida glutena za HLA-DQ2 ili DQ8 molekule te citokinsku terapiju (3, 9-13).

Također, kliničko ispitivanje započelo je prototipskim cjepivom na bazi skupa glutenskih peptida koje HLA-DQ2 prepoznaje na imunodominantan način, a faza I nedavno je završena. Veliki je interes usmjeren na cijepljenje, posebno za povećanje kompatibilnosti mnogih pacijenata koji bi mogli imati koristi od primjene jedne doze, umjesto dnevnog unosa drugih mogućnosti liječenja. Rizik od aktivacije imunološkog sustava povezan s terapijom cjepivom i njegove nuspojave i dalje su otvoreno pitanje koje treba dalje istražiti. Još uvijek je potrebno više studija također za veći dio prethodno spomenutih alternativnih mogućnosti liječenja, s velikim dugoročnim kliničkim ispitivanjima koja bi mogla odgovoriti na neriješena pitanja u

vezi s njihovom stvarnom kliničkom učinkovitošću, njihovom sigurnošću i realnom mogućnosti primjene (11, 14).

1.12. VITAMIN D I CELIJAKIJA

Vitamin D pripada obitelji steroidnih hormona. Ima dva glavna oblika, vitamin D₃ (kolekalciferol) i vitamin D₂ (ergokalciferol), koje u organizam možemo unijeti putem hrane ili dodacima, dok se u koži sintetizira samo vitamin D₃. Kolekalciferol se proizvodi endogeno u koži pretvaranjem 7-dehidrokolesterola djelovanjem ultraljubičastih zraka (UVB) sunca ili drugih UVB izvora. Preteča steroidnog hormona vitamin D₃ sintetizira se unutar kože i biološki je neaktivan. Za njegovo aktiviranje potrebne su dvije reakcije hidroksilacije. Prvi tvori 25-hidroksivitamin D₃ [25(OH)D ili kalcidiol] u jetri, tada se 25(OH)D pretvara u 1,25-dihidroksivitamin D₃ [1,25(OH)₂D ili kalcitriol] pomoću 1 α -hidroksilaze (CYP27B1) u bubregu. Vitamin D je poznat po njegovoj ulozi u održavanju i zaštiti koštanog sustava. Također, biološki aktivan vitamin D pojačava apsorpciju kalcija u crijevima, regulirajući transport proteina kalcija u tanko crijevo (15, 16).



Slika 5. Transformacija vitamina D (Preuzeto: <https://hr.weblogographic.com/difference-between-vitamin-d>)

Vitamin D receptor (VDR) je nuklearni transkripcijski faktor koji pripada porodici receptora za steroidne hormone i koji posreduje u biološkoj aktivnosti 1,25(OH)₂D. 1,25(OH)₂D modulira direktno ili indirektno funkciju brojnih gena. Studije su pokazale kako je više od 900 različitih gena pod utjecajem 1,25(OH)₂D i da gotovo sva tkiva posjeduju VDR (17).

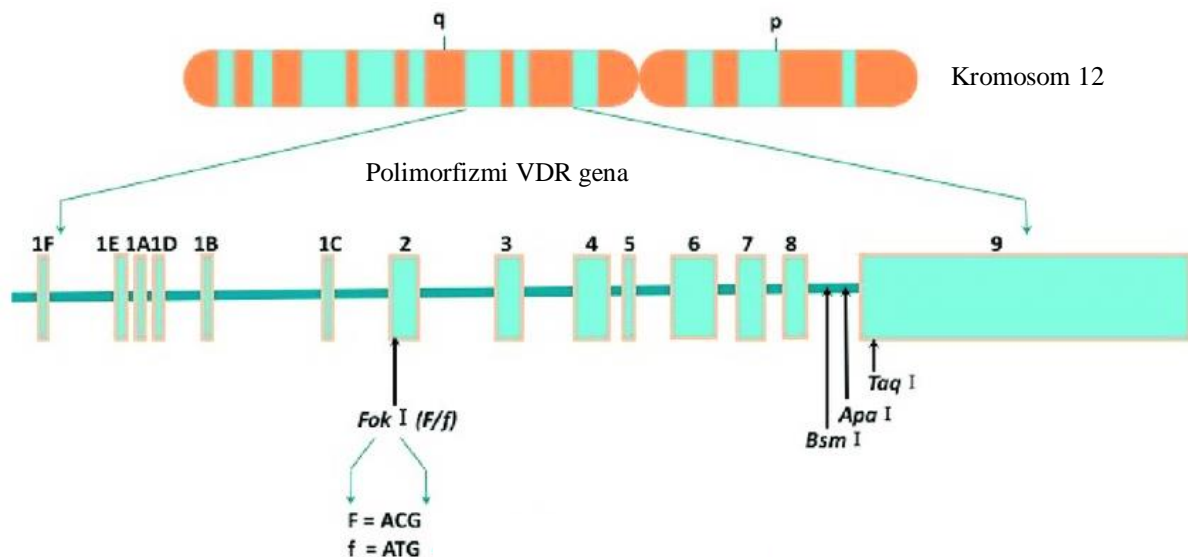
Aktivnost vitamina D ostvaruje se putem genskog i negenskog učinka. Negenski učinak nastaje vezanjem vitamina D za membranski VDR i time se aktiviraju intracelularni enzimi ili ionski kanali, a u konačnici se modulira aktivnost stanice. Genski učinak nastaje kada se $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ veže za VDR na jezgri stanice, te tvori kompleks ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$ -VDR-RXR) s retinoidnim X-receptorom (RXR). Kompleks se translocira u jezgru gdje se veže na mjesto osjetljivo za vitamin D (VDRE – vitamin D response elements) na DNA i regulira gensku transkripciju (5, 17).

Vitamin D utječe na imunološki odgovor modificirajući funkciju T limfocita, NK stanica, B stanica te antigen prezentirajućih stanica. Visoka VDR ekspresija utvrđena je na dendritičkim stanicama, makrofazima, monocitima, aktiviranim T i B limfocitima (15, 17).

Isto tako, genetski čimbenici imaju važnu ulogu u razini $25(\text{OH})\text{D}$ u serumu, stoga se može povezati kako je nedostatak vitamina D u nekih bolesnika s crijevinim sindromom malapsorpcije posljedica genetskih polimorfizama u enzimima koji metaboliziraju vitamin D, transportnom proteinu vitamina D ili VDR genu. Prema tome, cilj budućih istraživanja će zasigurno biti kako genetski čimbenici, poput polimorfizama u GC, CYP2R1, CYP27B1, CYP24A1 i VDR, utječu na status vitamina D kod pacijenata s crijevnim sindromom malapsorpcije, te na to kako genetski čimbenici utječu na način na koji pacijenti reagiraju na izlaganje sunčevoj svjetlosti ili dodatak vitamina D (16).

1.13. VDR GEN

VDR gen smješten je na dugom kraku kromosomu 12 u regiji 12q13.11. Gen sadrži 8 introna i 9 egzona i obuhvaća približno 100 kb. Prvi egzon sadrži promotorsku regiju gena, egzoni 2 i 3 kod za domenu vezanja DNA i egzoni 6–9 za domenu vezanja liganda. Uz VDR gen vezana su četiri glavna polimorfizma (BsmI, ApaI, TaqI i FokI). Polimorfizmi ApaI, BsmI i TaqI smješteni su blizu 3' kraja VDR gena. ApaI (G / T zamjena) i BsmI (A / G supstitucija) nalaze se u intronu između egzona 8–9 i ti polimorfizmi nemaju posljedica za VDR strukturu proteina. FokI polimorfizam (rs2228570) nalazi se na početku translacijskog dijela egzona 2 VDR gena, a istraživanja su dokazala da ovaj polimorfizam ima posljedice kako za strukturu VDR proteina, tako i za transkripcijsku aktivnost (18).

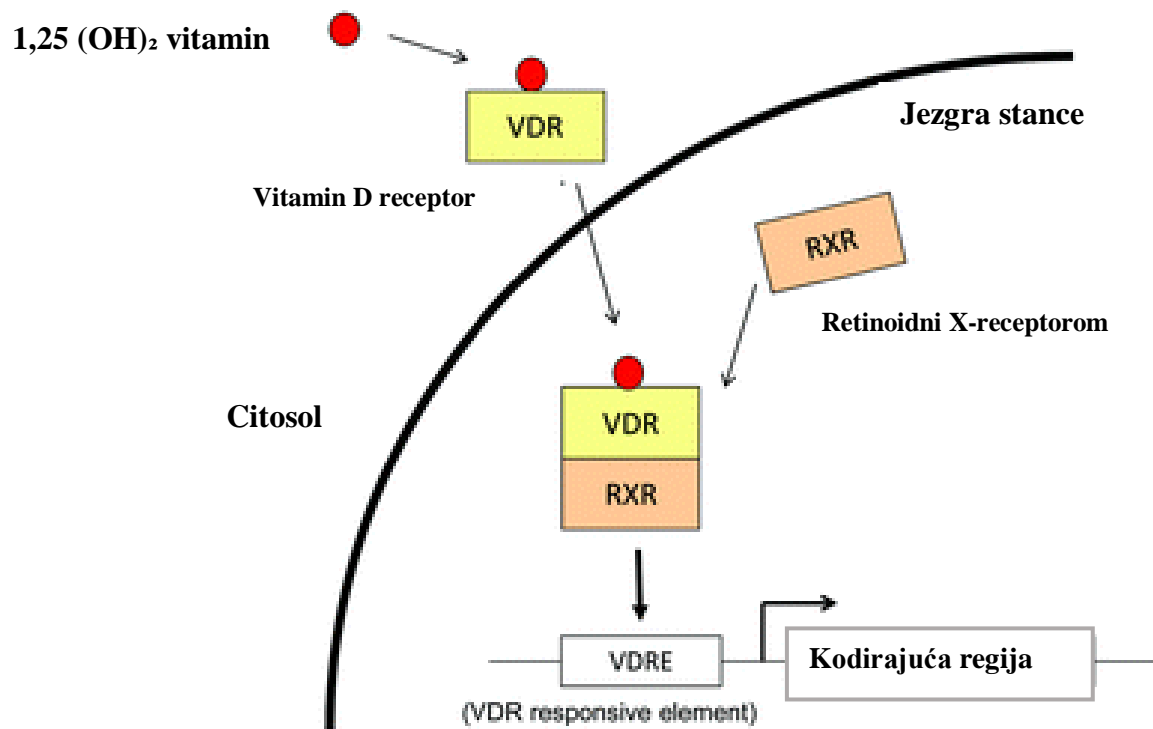


Slika 6. Smještaj VDR gena na kromosomu 12 (Preuzeto sa: https://www.researchgate.net/figure/VDR-polymorphisms-in-ovarian-cancer-The-VDR-gene-spans-75-kb-of-DNA-and-is-located-on_fig2_321212073)

Većinu bioloških aktivnosti vitamina D posreduje VDR. Genetske varijacije na VDR genu mogu dovesti do značajne disfunkcije receptora, što bi moglo utjecati na metabolizam kalcija, proliferaciju stanica i imunološki odgovor. Polimorfizmi u VDR genu povezani su sa zdravstvenim stanjima koja uključuju nisku gustoću kostiju, kardiovaskularne bolesti, karcinom, autoimune reakcije i infekcije, ali učinci ovih polimorfizama na funkciju VDR proteina moraju se dodatno istražiti (19).

Biološki efekt aktivne forme vitamina D (1,25 – dihidroksivitamin D₃) je posredovan VDR receptorima. Ovaj receptor je dio obitelji steroidnih receptora i utječe na transkripciju gena pod utjecajem vitamina, vežući se na VDRE elemente (20).

Istraživanjem u drugoj autoimunoj bolesti otkriven je VDRE na HLA-DRB1 promotorskoj regiji, a funkcionalnim je ispitivanjima utvrđeno da taj VDRE utječe na gensku ekspresiju, potvrđujući hipotezu utjecaja 1,25 dihidroksiamina D₃ na HLA-DRB1. Moguće su i varijante VDRE prisutne u drugim haplotipovima HLA II regije što bi ukazalo na značaj vitamina D u raznim autoimunskim poremećajima (21).



Slika 7. Mehanizam genske aktivnosti vitamina D (Preuzeto sa: <https://vitaminwalls.blogspot.com/1988/07/vitamin-d-receptor-gene.html>)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ranije provedena istraživanja naglasila su moguću ulogu vitamina D kao ključnog modulatora imunoloških i upalnih mehanizama, sugerirajući polimorfizme VDR gena kao markere zaštite od ili osjetljivosti na autoimune bolesti. Jedno istraživanje ukazalo je na povezanost „ff“ (TT) genotipa FokI VDR gena s rizikom od razvoja bolesti u ispitanika oboljelih od celijakije.

Stoga je osnovni cilj ovog istraživanja bio utvrditi utječe li FokI polimorfizam VDR gena na podložnost za celijakiju i razvoj bolesti. Navedenu hipotezu testirali smo kroz specifične ciljeve:

- Postoji li razlika u frekvenciji genotipova i alela FokI VDR gena između ispitanika oboljelih od celijakije i kontrolne skupine ispitanika;
- Postoji li razlika između oboljelih muškaraca i žena za polimorfizam FokI VDR gena;
- Razlikuju li se međusobno bolesnici s obzirom na tip celijakije i dob dijagnoze kod netipičnog tipa celijakije;
- Postoji li značajna razlika u pojavnosti pridruženih bolesti u oboljelih od celijakije ovisno o polimorfizmu FokI VDR gena;
- Postoji li razlika u oboljelih ispitanika s obzirom na HLA genotip i polimorfizam FokI VDR gena.

3. ISPITANICI I METODE RADA

3.1. ISPITANICI

Istraživanje je obuhvatilo 196 ispitanika oboljelih od celijakije, od toga 75 (38,3%) muškaraca, te 121 (61,7%) žena. Svi ispitanici zaprimljeni su na odjel Klinike za internu medicinu ili u Kliniku za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Rijeka. U sklopu kliničke dijagnostičke obrade u 168 ispitanika provedena je HLA genotipizacija.

Oboljeli od celijakije podijeljeni su u dvije skupine s obzirom na tip celijakije (klasični i neklasični tip). Skupinu bolesnika s klasičnim tipom celijakije čine djeca do druge godine života, dok skupinu bolesnika s neklasičnim tipom celijakije čine bolesnici kasnije životne dobi, prosječne starosti $25,09 \pm 9,04$ godina. Oboljeli od celijakije podijeljeni su i s obzirom na prisutnost nekih od pridruženih bolesti, te je ista podjela primijenjena i s obzirom na spol bolesnika. Od 196 oboljelih od celijakije 33 ispitanika imala su neku od čestih pridruženih bolesti povezanih s celijakijom.

Tablica 2. Klinički parametri osoba oboljelih od celijakije (N=196)

	Ukupno (N=196)	Klasični tip (N=104)	Neklasični tip (N=92)
Žene/muškarci	1,61:1	1,26:1	2,17:1
Dob dijagnoze bolesti^a	-	< 2	25,09 ± 9,04
Pridružene bolesti	33	18	15
HLA rizični aleli^b	163	101	90

^asrednja vrijednost (godine) ± SD

^bgenotipizirano je 168 bolesnika

Skupinu kontrolnih ispitanika činilo je 196 zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi koji nisu u rodu međusobno ili s bolesnicima. Kontrolni ispitanici klinički su zdravi bez poremećaja vezanih uz gluten. Ispitanici kontrolne skupine usklađeni su prema spolu s oboljelima od celijakije, a njihovi DNA uzorci čuvaju se u DNA bazi Zavoda za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Ispitanici koji su sudjelovali u istraživanju bili su upoznati s ciljevima istraživanja te im je nakon pristanka izvađena krv za molekularno-genetičku analizu.

3.2. METODE RADA

Metode rada korištene u ovom istraživanju su molekularno-genetička analiza lančanom reakcijom polimeraze – PCR, restrikcija pomoću restrikcijskog enzima FokI, te agarozna gel-elektroforeza.

3.3. IZOLACIJA DNA

Izolacija DNA je postupak kojim se iz bioloških uzoraka izdvaja DNA. Smanjenu kvalitetu, stabilnost molekule te ometanje analize DNA može se pripisati prisutnosti organskih i anorganskih komponenti. Izolacija DNA prethodi svim molekularnim analizama koje danas imaju široku primjenu u znanosti.

U ovom istraživanju genomska DNA izolirana je iz periferne krvi ispitanika pomoću komercijalnog kita za izolaciju (FlexiGene DNA Kit, Qiagen). Ovaj kit omogućuje brzo i jednostavno pročišćavanje DNA. Za izolaciju DNA potrebna je samo jedna epruveta što smanjuje rizik od zamjene i onečišćenja uzorka. Izolirana DNA je visoke koncentracije i čistoće s minimalno prisutnih kontaminanata.

FlexiGene DNA Kit sadrži pufer za lizu, denaturacijski pufer, hidracijski pufer i QIAGEN proteazu. Prvi korak u izolaciji DNA je dodavanje pufera za lizu, zatim se centrifugiranjem postiže taloženje stanične jezgre i mitohondrija. Talog se resuspendira i inkubira u denaturacijskom puferu i QIAGEN proteazi. Denaturacijski pufer omogućuje kidanje vodikovih veza među molekulama vode jer sadrži kaotropne soli i tako oslabljuje hidrofobni efekt te učinkovito uklanjaju proteine. Taloženje DNA postiže se izopropanolom i centrifugiranjem. Izolirana DNA se tada ispiru s 70% etanolom, suši i resuspendira u hidracijskom puferu (22). Nakon izolacije, DNA je pohranjena na -20 °C na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci.

3.4. MOLEKULARNO-GENETIČKA ANALIZA FokI POLIMORFIZMA VDR GENA

3.4.1. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE

Lančana reakcija polimeraze (PCR) standardna je laboratorijska tehnika koja se koristi za umnožavanje specifičnih ili ciljanih dijelova DNA.

Za molekulanu analizu FokI polimorfizma VDR gena korišten je PCR uređaj – termocikler (Mastercycle Personal, Eppendorf, Hamburg, Germany and 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Za reakcijsku smjesu od 15 µl korištene su količine sastojaka dane u Tablici 3.

Tablica 3. Reakcijska smjesa za PCR reakciju za konačni volumen od 15 µl

Stok	Količina za 1 uzorak (15 µl)
10 x PCR pufer	1,50 µl
25 mM MgCl	1,00 µl
10 mM dNTP	0,30 µl
10 x primer VDR - F	0,60 µl
10 x primer VDR - R	0,60 µl
Bidestilirana voda	9,80 µl
Taq polimeraza	0,20 µl
DNA	0,50 µl

Svaka PCR mora imati dvije odgovarajuće kratke DNA sekvence odnosno početnice koje se vežu na početak i kraj DNA od interesa, te je njihov slijed prikazan u Tablici 4.

Tablica 4. Slijed oligonukleotida u početnicama i njihova temperatura vezivanja

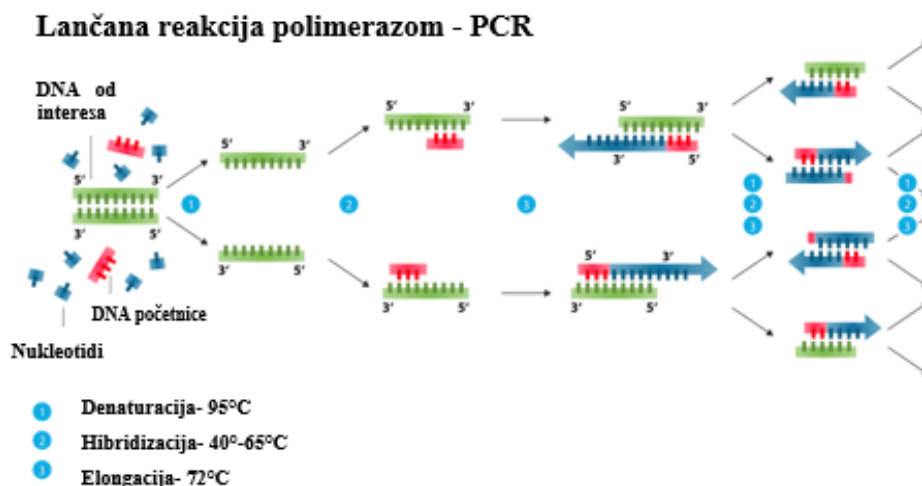
POČETNICE	SLIJED OLIGONUKLEOTIDA (5' - 3')	Ts (°C)
VDR - <i>forward</i>	5'AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT3'	61,0
VDR - <i>reverse</i>	5'ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC3'	61,0

Sljedeći korak je dodavanje slobodnih nukleotida i magnezijevih iona koji za svoju aktivnost trebaju enzim nazvan DNA polimeraza te reakcijski pufer. DNA polimeraza korištena u istraživanju je *Taq* polimeraza. *Taq* polimeraza je termostabilna polimeraza izolirana iz termofilnih bakterija. PCR reakcija odvija se po točno određenim uvjetima danim u Tablici 5.

Tablica 5. Uvjeti programa umnažanja za VDR – temperaturni ciklusi

1.	94 °C (5 min) x 1 ciklus	
2.	94 °C (35 s)	} x 35 ciklusa
3.	61 °C (35 s)	
4.	72 °C (1 min)	
5.	72 °C (7 min) x 1 ciklus	

PCR reakcija se odvijala u tri koraka, te 35 ciklusa. Prvi korak odvija se pri 95°C gdje se dvostruka uzvojnica DNA razdvaja na dvije jednolančane uzvojnice pod utjecajem visoke temperature, te se taj postupak naziva denaturacija. Sljedeći korak PCR reakcije je hibridizacija, odnosno u ovom koraku se početnice iz reakcijske smjese, na temperaturi od 40°C do 65°C vežu na 3' kraj denaturirane jednolančane uzvojnice DNA. Zadnji, treći korak PCR reakcije je elongacija koja se odvija pri 72°C, te u ovom koraku *Taq* polimeraza počinje sintetizirati novi lanac DNA.



Slika 8. Prikaz PCR reakcije (Preuzeto: https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction)

3.4.2. AGAROZNA GEL-ELEKTROFOREZA

Nakon što je PCR reakcija završila uslijedila je provjera reakcije. Za kontrolu PCR reakcije ispipetirano je 4 μ l uzorka, te je dodano 2 μ l boje za vizualizaciju brom-fenol modrilo te se tako pripremljen uzorak unosi u jažice gela zajedno sa pozitivnom ili negativnom kontrolom.. Uzorci su uneseni u jažice na 1% agaroznom gelu u kojeg je također dodano 13 μ l boje za vizualizaciju GelRed. Kontrola PCR reakcije odvijala se pomoću metode gel elektroforeze 30 minuta na 80 V u 1x TBE puferu nakon čega se gel izvadi iz pufera i fotografira pod UV svjetlom.

Elektroforeza na agaroznom gelu je jedna od najpopularnijih tehnika za razdvajanje ciljnih fragmenata DNA molekule. Fragmenti DNA razdvajaju se na temelju njihove veličine, pa se tako kraće molekule lakše i brže kreću kroz pore gela od dužih fragmenata. Vizualizacija fragmenata se može postići dodavanjem etidij bromida ili drugih komercijalnih boja u gel koji postaje vidljiv nakon što gel obasjamo ultraljubičastim svjetlom.

3.4.3. RESTRIKCIJA FokI ENDONUKLEAZOM

Nakon provjere PCR reakcije uslijedila je restrikcija. Restrikcija se odvijala pomoću restrikcijskog enzima FokI. Restrikcijski enzimi su katalitički proteini koji su odgovorni za cijepanje fosfodiesterskih veza unutar lanca DNA u vrlo specifičnim sekvencama.

U Tablici 6. prikazana je reakcijska smjesa za 20 μ l uzorka za restrikciju.

Tablica 6. Reakcijska smjesa za restrikciju za konačni volumen od 20 μ l

Stok	Količina za 1 uzorak (μl)
Pufer Cut Smart	2,00
Enzim FokI	0,50
Bidestilirana voda	7,50
PCR produkt	10,0

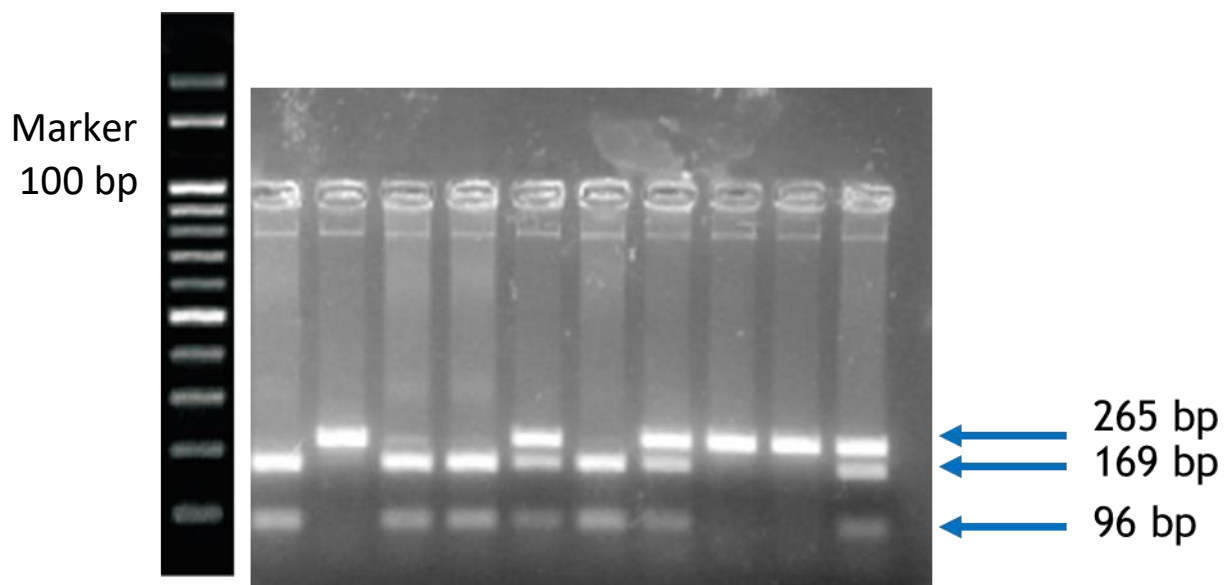
Restrikcija se odvijala u vodenoj kupelji na temperaturi od 37°C preko noći.

Nakon restrikcije uslijedila je provjera dobivenih rezultata. Kontrola se odvijala pomoću metode prethodno opisane gel-elektroforeze. Ispitirano je 8 μ l uzorka i pomiješano s 2 μ l boje za vizualizaciju brom-fenol modrilo (BPB) te su zatim uzorci unijeti u ježice na 1% agarozni gel u kojeg je dodano 13 μ l boje za vizualizaciju GelRed. Elektroforeza se odvijala 45 minuta na 85 V u 1xTBE puferu nakon čega su očitani rezultati.

3.5. IDENTIFIKACIJA FokI POLIMORFIZMA VDR GENA

FokI polimorfizam VDR gena predstavlja supstituciju timina s citozinom (T/C) u startnom kodonu egzona 2. Enzim FokI endonukleaza prepoznaje specifičnu sekvencu nukleotida i izrezuje ga na mjestu timina. Prisustvo FokI restrikcionog mjesta (T) rezultira nastajanjem VDR proteina izgrađenog od 427 aminokiselina (M1 forma receptora), dok odsustvo restrikcionog mjesta (C) rezultira sintezom kraćeg proteina koji se sastoji od 424 aminokiseline (M4 forma receptora), te je povezan s većom transkripcijskom aktivnošću.

FokI polimorfizam rezultira s tri različita genotipa: TT genotip koji je na gelu vidljiv u dva fragmenta od 169 bp i 96 bp, TC genotip vidljiv je u sva tri moguća fragmenta od 265, 169 i 96 bp, te CC genotip vidljiv kao dva fragmenta od 265 bp i 96 bp.



Slika 9. PCR produkt i restrikcijski fragmenti u analizi FokI polimorfizma gena za receptor vitamina D

4. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Rezultati istraživanja obrađeni su računalnim programom Statistica 13.3 za koju Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci posjeduje licencu.

χ^2 - test i Fisherov egzaktni test korišten je kako bi odredili učestalost pojedinog genotipa te frekvenciju alela u oboljelih od celijakije. Isto tako, navedeni testovi korišteni su kako bi usporedili dvije ispitivane skupine (oboljele i kontrolnu skupinu), te ih usporedili po spolu, tipu celijakije i pridruženim bolestima. Za analizu korelacije FokI polimorfizma VDR gena s dobi dijagnoze bolesti korišten je ANOVA test. Statistička značajnost razlika izražena je na razini 0,05.

5. REZULTATI

5.1. ANALIZA FokI POLIMORFIZMA VDR GENA U OBOLJELIH OD CELIJAKIJE

U analizi FokI polimorfizma VDR gena sudjelovalo je 196 ispitanika oboljelih od celijakije od kojih 75 muškaraca i 121 žena, te 196 kontrolnih ispitanika koji su usklađeni s oboljelima po spolu. Analiza FokI polimorfizma prikazana je u Tablici 7. Analizom je utvrđeno da su od 196 ispitanika oboljelih od celijakije njih 29 (14,8%) homozigotni nositelji CC genotipa, 103 (52,6%) je heterozigota nositelja genotipa TC te 64 (32,6%) homozigota za TT genotipa. Usporedbom ispitanika oboljelih od celijakije s kontrolnom skupinom nije utvrđena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) u prisutnosti FokI polimorfizma VDR gena. Također, analiza frekvencije alela među skupina nije pokazala značajnu razliku ($p = 0,77$).

Tablica 7. Učestalost određenog VDR FokI genotipa i frekvencija alela T i C kod oboljelih od celijakije (N=196) te kontrolnih ispitanika (N=196)

Genotip	Bolesnici		Kontrola		OR (95% CI)	p
	N	%	N	%		
TT	64	32,6	73	37,2	0,82 (0,54 – 1,24)	0,34
TC	103	52,6	92	46,9	1,25 (0,84 – 1,86)	0,27
CC	29	14,8	31	15,8	0,92 (0,53 – 1,60)	0,78
Ukupno	196		196			
Aleli	Bolesnici %		Kontrola %		OR (95% CI)	p
T	59,0		61,0			
C	41,0		39,0		1,09 (0,62 – 1,91)	0,77

U Tablici 8. prikazani su rezultati analize ispitivane skupine bolesnika uspoređujući ih prema spolu. Od 75 muškaraca oboljelih od celijakije koji su sudjelovali u istraživanju njih 18,7% nositelji su CC genotipa, 48,0% nositelji su oba alela genotipa CT, dok 33,3% ispitivanih muškaraca ima TT genotipa. Kod ispitivanih bolesnika nema statistički značajne razlike u distribuciji genotipova između muškaraca i žena ($p>0,05$). Frekvencija alela između spolova također nije statistički značajna ($p=0,67$).

Tablica 8. Učestalost određenog VDR FokI genotipa i frekvencija T i C alela u oboljelih od celijakije prema spolu

Genotip VDR FokI	Muškarci		Žene		Ukupno		OR (95% CI)	p
	N	%	N	%	N	%		
TT	25	33,3	39	32,2	64	32,7	1,05 (0,56 – 1,94)	0,8730
TC	36	48,0	67	55,3	103	52,5	0,74 (0,42 – 1,33)	0,3156
CC	14	18,7	15	12,4	29	14,8	1,62 (0,73 – 3,59)	0,2323
Ukupno	75 (38,3%)		121 (61,7%)		196 (100%)			
Aleli	Muškarci %		Žene %		Ukupno %		OR (95% CI)	p
T	57,0		60,0		58,5		0,88 (0,50 – 1,55)	0,67
C	43,0		40,0		41,5		1,13 (0,64 – 1,99)	0,67

Analizom učestalosti VDR genotipova u kontroloj skupini nisu utvrđeni znatno drugačiji i statistički značajni rezultati od onih u ispitanika s celijakijom. Rezultati su dani u Tablici 9.

Tablica 9. Učestalost određenog VDR FokI genotipa i frekvencija T i C alela u kontrolnih ispitanika prema spolu

Genotip VDR FokI	Muškarci		Žene		Ukupno		OR (95% CI)	P
	N	%	N	%	N	%		
TT	27	36,0	46	38,0	73	37,2	0,92 (0,50 – 1,67)	0,78
TC	33	44,0	59	48,8	92	46,9	0,83 (0,46 – 1,47)	0,52
CC	15	2,0	16	13,2	31	15,8	1,64 (0,76 – 3,55)	0,21
Ukupno	75 (38,3%)		121 (61,7%)		196 (100%)			
Aleli	Muškarci %		Žene %		Ukupno %		OR (95% CI)	P
T	58,0		62,0		60,0		0,85 (0,48 – 1,49)	0,56
C	42,0		38,0		40,0		1,18 (0,67 – 2,08)	0,56

Usporedbom podataka iz tablica 8. i 9. provedena je analiza učestalosti genotipova i alela FokI polimorfizma VDR gena između muškarca oboljelih od celijakije te kontrolnih muškaraca (genotip TT: $p = 0,73$; genotip TC: $p = 0,62$; genotip CC: $p = 0,83$) a potom i između žena oboljelih od celijakije te kontrolnih žena (genotip TT: $p = 0,34$; genotip TC: $p = 0,30$; genotip CC: $p = 0,84$). Razlike u distribuciji genotipova i alela nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$)

5.2. ANALIZA FokI POLIMORFIZMA VDR GENA PREMA TIPU CELIJAKIJE

U Tablici 10. prikazana je usporedba oboljelih od celijakije prema tipu bolesti. Klasični tip bolesti javlja se kod djece do 2. godine života, te je utvrđen kod 53,1% ispitanika istraživanja. Ovim istraživanjem nije utvrđena statistički značajna razlika između pojedinog genotipa i pojavnosti određenog tipa celijakije u ispitanika. Također, frekvencija alela se znatno ne razlikuje među tipovima celijakije ($p=0,77$).

Tablica 10. Učestalost određenog VDR FokI genotipa kod klasičnog i neklasičnog tipa celijakije

Genotip VDR FokI	Klasični tip celijakije		Neklasični tip celijakije		Ukupno		OR (95% CI)	P
	N	%	N	%	N	%		
TT	33	31,7	31	33,7	64	32,6	0,91 (0,50 – 1,66)	0,77
TC	55	52,9	48	52,2	103	52,6	1,03 (0,59 – 1,80)	0,92
CC	16	15,4	13	14,1	29	14,8	1,10 (0,50 – 2,44)	0,81
Ukupno	104 (53,1%)		92 (46,9%)		196 (100%)			
Aleli	Klasični tip celijakije %		Neklasični tip celijakije %		Ukupno %		OR (95% CI)	P
T	58,0		60,0		59,0		0,92 (0,52 – 1,62)	0,77
C	42,0		40,0		41,0		1,09 (0,62 – 1,91)	0,77

Tablica 11. prikazuje raspodjelu genotipova kod klasičnog i neklasičnog tipa celijakije kod muškaraca i žena pri čemu razlika među skupinama nije statistički značajna ($p > 0,05$).

Tablica 11. Učestalost određenog VDR FokI genotipa kod klasičnog i neklasičnog tipa celijakije po spolu

Genotip VDR FokI	Klasični tip celijakije (N = 104)				Neklasični tip celijakije (N = 92)				OR (95% CI)		P	
	Muškarci		Žene		Muškarci		Žene		OR ₁	OR ₂	p ₁	p ₂
	N	%	N	%	N	%	N	%				
TT	15	32,6	18	31,0	10	34,5	21	33,3	0,92 (0,34 – 2,48)	0,90 (0,42 – 1,93)	0,87	0,79
TC	23	50,0	32	55,2	13	44,8	35	55,6	1,23 (0,48 – 3,13)	0,98 (0,48 – 2,02)	0,66	0,97
CC	8	17,4	8	13,8	6	20,7	7	11,1	0,81 (0,25 – 2,62)	1,28 (0,43 – 3,78)	0,72	0,65
Ukupno	46 (44,2%)		58 (55,8%)		29 (31,5%)		63 (68,5%)					

p₁ - statistička značajnost između muškaraca i žena s klasičnim tipom celijakije

p₂ - statistička značajnost između muškaraca i žena s neklasičnim tipom celijakije

5.3. ANALIZA FokI POLIMORFIZMA VDR GENA U CELIJAKIJI S OBZIROM NA PRIDRUŽENE BOLESTI

U Tablici 12. prikazani su rezultati istraživanja učestalosti određenog VDR genotipa kod oboljelih od celijakije ali s obzirom na pridružene bolesti. Od 196 ispitanika njih 33 je imalo neku od pridruženih bolesti koje prate celijakiju. Bez obzira na uočenu razliku, pogotovo među ispitanicima za CC genotip, nije utvrđena statistički značajna razlika ($p > 0,05$). Frekvencija alela među ispitivanim skupinama također nije bila statistički značajna ($p = 0,31$).

Tablica 12. Učestalost određenog VDR FokI genotipa kod oboljelih od celijakije bez i sa združenim bolestima

Genotip VDR FokI	Bez združene bolesti		Združene bolesti		Ukupno		OR (95% CI)	p
	N	%	N	%	N	%		
TT	52	31,9	12	36,4	64	32,7	0,82 (0,78 – 1,79)	0,62
TC	84	51,5	19	57,6	103	52,5	0,78 (0,37 – 1,67)	0,53
CC	27	16,6	2	6,0	29	14,8	3,08 (0,69 – 13,63)	0,14
Ukupno	163 (83,2%)		33 (16,8%)		196 (100%)			
Aleli	Bez združenih bolesti %		Združene bolesti %		Ukupno %		OR (95% CI)	p
T	58,0		65,0		61,5			
C	42,0		35,0		38,5		1,34 (0,76 – 2,38)	0,31

Tablica 13. prikazuje usporedbu ispitanika oboljelih od celijakije s obzirom na pridružene bolesti ali po spolu. Može se primijetiti kako je udio žena s pridruženim bolestima nešto veći nego li u muškarca , međutim nije utvrđena značajna razlika između ispitivanih skupina ($p > 0,05$).

Tablica 13. Učestalost određenog VDR FokI genotipa kod oboljelih od celijakije bez i sa združenim bolestima po spolu

Genotip VDR FokI	Bez združenih bolesti (N = 163)				Združene bolesti (N = 33)				OR (95% CI)		p	
	Muškarci		Žene		Muškarci		Žene		OR ₁	OR ₂	p ₁	p ₂
	N	%	N	%	N	%	N	%				
TT	20	32,2	32	31,7	5	38,5	7	35,0	0,76 (0,22- 2,63)	0,86 (0,31 – 2,36)	0,67	0,77
TC	28	45,2	56	55,4	8	61,5	11	55,0	0,51 (0,15- 1,75)	1,06 (0,41 – 2,80)	0,29	0,90
CC	14	22,6	13	12,9	0	0	2	10,0	8,07 (0,45 – 144,23)	1,33 (0,28 – 6,41)	0,16	0,72
Ukupno	62 (31,6%)		101 (51,5%)		13 (6,6%)		20 (10,2%)					

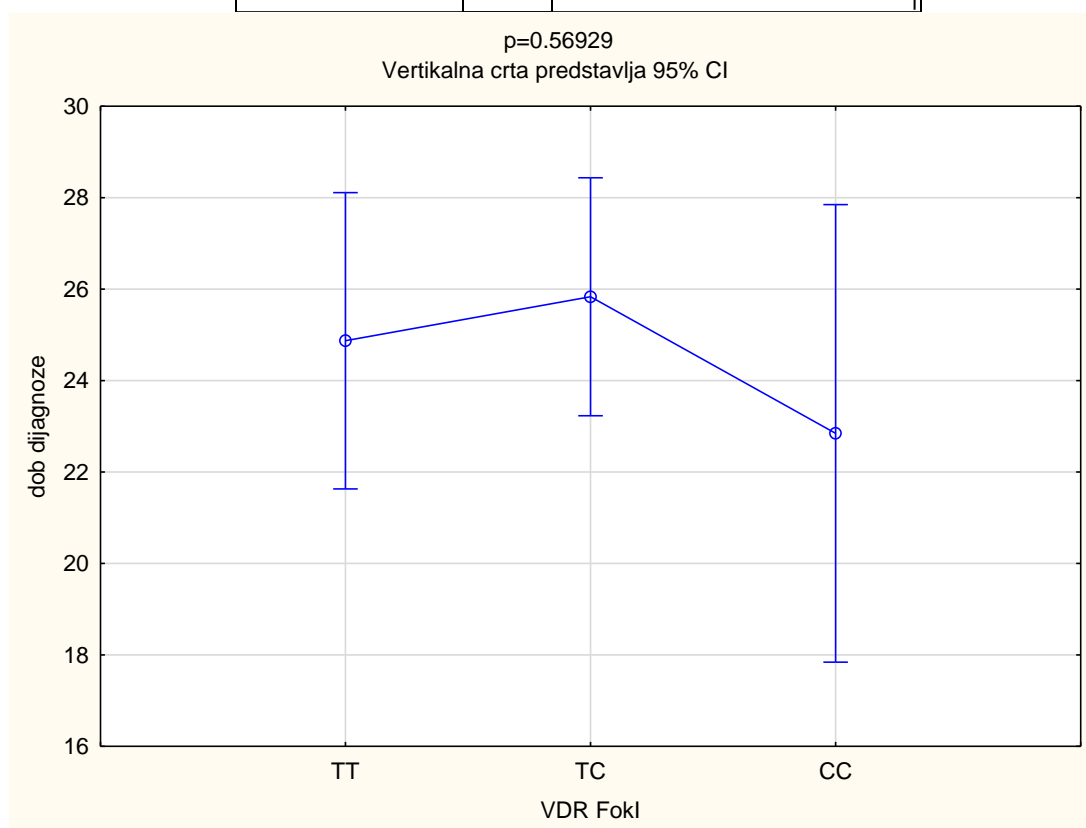
p₁ - statistička značajnost između muškaraca i žena bez združenih bolesti

p₂ - statistička značajnost između muškaraca i žena s združenim bolestima

5.4. ANALIZA FokI POLIMORFIZMA VDR GENA U CELIJAKIJI S OBZIROM NA DOB DIJAGNOZE

U skupini bolesnika s nekласičnim tipom celijakije provedena je usporedba za dob dijagnoze bolesti zavisno o VDR FokI genotipu. Iako je dob dijagnoze celijakije dvije do tri godine ranija u osoba s CC genotipom nije utvrđena statistički značajna razlika ($p = 0,57$) u dobi nastupa bolesti s obzirom na VDR FokI genotip (slika 10).

Genotip VDR FokI	N	dob dijagnoze ($\bar{x} \pm SD$)
TT	31	24,87 \pm 8,05
TC	48	25,83 \pm 9,85
CC	13	22,84 \pm 8,31



Slika 10. Dob nastupa bolesti u bolesnika s nekласičnim tipom celijakije s obzirom na VDR FokI genotip

5.5. ANALIZA FokI POLIMORFIZMA VDR GENA U CELIJAKIJI S OBZIROM NA HLA GENOTIP

Bolesnike (N = 168) smo podijelili ovisno o prisustvu prethodno testiranih HLA DQA-1 i HLA DQB-1 alela na homozigote za rizične alele (N = 56), heterozigote za rizične alele (N = 107) dok u pet bolesnika nisu utvrđeni analizirani rizični HLA aleli (7). Kako bismo procijenili utjecaj VDR FokI genotipova ovisno o HLA statusu zigoznosti za rizične alele u Tablici 14. prikazana učestalost VDR FokI genotipova u sve tri skupine bolesnika.

Tablica 14. Učestalost VDR FokI genotipova u homozigot za rizične HLA alele, heterozigota za rizične HLA alele i ispitanike bez rizičnih HLA alela

	Genotip VDR FokI		
	TT	TC	CC
HLA status	N (%)		
homozigot za rizične alele	15 (26,8)	33 (58,9)	8 (14,3)
heterozigot za rizične alele	38 (35,5)	52 (48,6)	17 (15,9)
bez rizičnih alela	2 (40,0)	2 (40,0)	1 (20,0)

6. RASPRAVA

Enteropatija osjetljiva na gluten ili celijakija kronični je autoimuni poremećaj uzrokovan netolerancijom na uneseni gluten, a javlja se u genetski osjetljivih osoba. Učestalost pojave celijakije je oko 1%, a najveći rizik za oboljenje imaju osobe kod kojih je prisutan jedan od rizičnih alela ili oba HLA DQA1 i HLA DQB1 gena. Celijakiju karakterizira veliki spektar kliničkih simptoma, zatim specifična antitijela i humani leukocitni antigen (HLA) koji igra ključnu ulogu u patogenezi same bolesti (17).

Osim navedenog smatra se kako i drugi okolišni i genetički čimbenici također imaju značajnu ulogu u pojavnosti celijakije. Osim glutena, koji je svakako najvažniji prepoznati čimbenik okoliša, istraživanja nameću moguće uloge mikrobiote, vrijeme uvođenja glutena u prehranu djece, povijest dojenja, akutne virusne gastrointestinalne infekcije i nedostatak mikronutrijenata u razvoju celijakije (28).

Vitamin D je sekosteroid koji ima niz bioloških učinaka, uključujući regulaciju apsorpcije kalcija i modulaciju imunološkog sustava. 1,25-dihidroksivitamin D [1,25(OH)₂D] je biološki aktivan oblik vitamina D, no kao indikator količine vitamina u plazmi češće se koristi njegov prekursor 25-hidroksivitamin D [25(OH)D]. Vitamin D djeluje kao imuno-regulatorni hormon koji svoje genomsko djelovanje provodi kroz visoko polimorfni receptor za vitamin D (VDR) koji pripada super-obitelji steroidnih receptora i izražava se u mnogi tipovi stanica, uključujući limfocite i stanice koje prezentiraju antigen (APC) (15).

Pedro i sur. (23) su u svom radu naglasili moguću ulogu vitamina D kao ključnog modulatora imunoloških i upalnih mehanizama, sugerirajući polimorfizme VDR gena kao markere zaštite od ili osjetljivosti na autoimune bolesti. Također, usporedbom ispitanika oboljelih od celijakije i kontrolne skupine pokazali su povezanost „ff“ genotipa polimorfizma FokI VDR gena (rs10735810) s rizikom od razvoja bolesti na malom broju ispitanika iz specifične Baskijske populacije.

Upravo zato smo u ovom radu htjeli istražiti postoji li utjecaj još jednog FokI polimorfizma u genu za vitamin D receptor u podložnosti za i razvoju celijakije kod 196 bolesnika iz hrvatske populacije.

Povrh toga, dosadašnja istraživanja pokazala su povezanost niske razine vitamina D s pojavom celijakije. Isto tako, utvrđeno je kako su razine vitamina D u plazmi bile veće kod pacijenata koji su konzumirali bezglutensku prehranu ili primali suplemente vitamina D od ne

liječenih bolesnika (25). Nedostatak naše studije je nedostupnost podataka o razini vitamina D u serumu, međutim pretpostavku o mogućoj povezanosti VDR gena s celijakijom temeljimo na prethodnim istraživanjima o poremećenoj serumskoj razini vitamina D. Dosad je provedena jedna meta-analiza o statusu vitamina D, no genotipovi receptora za vitamin D obuhvatile su svega tri studije te analizu drugih polimorfizama u ovom genu za receptor za vitamin D, uključujući već spomenuto istraživanje Pedra i sur (23). Provedena meta-analiza nije utvrdila značajnu razliku u VDR genotipovima, kao ni u frekvenciji alela među bolesnim i zdravim ispitanicima (25).

Usporedbom genotipova i alela (tablica 7.) za polimorfizam FokI VDR gena u našem istraživanju nismo utvrdili statistički značajnu razliku ($p > 0,05$) između oboljelih od celijakije i kontrolne skupine. Razlika nije bila prisutna ($p > 0,05$) niti među ispitivanim skupinama nakon podjele prema spolu (tablice 8 i 9).

S obzirom na različita klinička obilježja u klasičnom i neklasičnom tipu celijakije analizu učestalosti genotipova i alela proveli smo u obje skupine bolesnika i prema spolu te također nije utvrđena značajna razlika između ovih skupina (tablice 10, 11).

Rana dob pojavnosti celijakije do druge godine života izlučni je kriterij u postavljanju dijagnoze klasičnog tipa celijakije. U neklasičnom tipu celijakije korelirali smo dob postavljanja dijagnoze sa sva tri genotipa FokI VDR gena. Iako dob dijagnoze (22,8 godina) kod neklasičnog oblika celijakije u bolesnika s CC genotipom FokI VDR gena pokazuje trend ranijeg postavljanja dijagnoze od dvije do tri godine ranija nego li u onih s genotipovima TT ili TC, razlika nije statistički značajna ($p = 0,57$). Ipak valja napomenuti da je broj ispitanika s CC genotipom relativno mali (slika 10).

Još jedan važan pokazatelj koji uz disbalans nutrijenata često prate celijakiju jesu i pridružene bolesti. Jedna od pridruženih bolesti koja se povezuje s celijakijom je diabetes mellitus tip 1. U ovom istraživanju od 196 ispitanika 33 su imali neku od pridruženih bolesti dok je njih 5 imalo upravo diabetes tipa 1. Međutim, s obzirom na mali broj ispitanika s pridruženim bolestima nije uočena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) među ispitanicima (tablice 12, 13).

Ludvigsson i sur. (26) izvijestili su da dijabetes tipa 1 predstavlja 5 do 10 puta veći rizik od celijakije u vrlo velikoj skupini djece. Ovo povećanje rizika djelomično se može objasniti zajedničkim genetskim rizikom koji predstavlja HLA. Postotak od 5% -10% pacijenata pogođenih dijabetesom tipa 1 imao je antitijela povezana s celijakijom, a do 75% bolesnika

imalo je abnormalnosti na tkivu biopsije tankog crijeva. Auricchio i sur utvrdili su kako niska razina vitamina D u serumu nije povezana s pojavnošću dijabetesa kao pridružene bolesti u celijakiji (27). Međutim, u danjim istraživanjima koja bi obuhvaćala veći broj ispitanika zanimljivo bi bilo promatrati raspodjelu te pojavnost pridruženih bolesti.

Na temelju naših rezultata o učestalosti rizičnih HLA alela i VDR FokI genotipova prikazanih u tablici 12 ne možemo VDR FokI polimorfizmu pripisati ulogu u podložnosti za celijakiju. Obzirom na dosadašnje spoznaje o značaju HLA DQA1 i HLA DQB1 gena u podložnosti i razvoju celijakije, doprinos riziku za podložnost bolesti svakog pojedinog alela izvan HLA regije može biti vrlo mali te su za takve analize pogodne velike skupine bolesnika.

Osvrnemo li se još jednom na studiju Pedra i sur (23) čini se da polimorfizmi VDR gena mogu biti markeri genetske osjetljivosti u pojedinim populacijama prije nego li uzročni lokus autoimunosti u celijakiji. S obzirom na različite rezultate u prethodnom i našem istraživanju moguća je i genetska heterogenost u združenosti s bolesti u različitim populacijama. Na temelju rezultata našeg istraživanja možemo zaključiti da polimorfizam FokI VDR gena ne predstavlja čimbenik podložnosti u razvoju celijakije u hrvatskoj populaciji.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju podataka dobivenih istraživanjem utjecaja polimorfizma FokI u genu za vitamin D receptor u razvoju celijakije zaključili smo:

- Ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$) u frekvenciji određenog genotipa i/ili alela FokI VDR gena između oboljelih od celijakije i kontrolne skupine.
- Statistički značajna razlika ne postoji ($p > 0,05$) niti među ispitivanim skupinama nakon podjele prema spolu.
- Ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$) u učestalosti određenog genotipa FokI VDR gena među bolesnicima koji imaju klasični tip celijakije naspram onih koji imaju neklasični tip celijakije.
- Iako je dob dijagnoze kod neklasičnog oblika celijakije u bolesnika s CC genotipom FokI VDR gena dvije do tri godine ranija nego li u onih s genotipovima TT ili TC, razlika nije statistički značajna ($p = 0,57$).
- Ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$) u učestalosti određenog genotipa FokI VDR gena između bolesnika bez pridružene bolesti i onih koji su imali pridruženu bolest.
- Rizični aleli HLA-DQA1 i -DQB1 gena glavni su genetički čimbenici u podložnosti za celijakiju te je distribucija FokI VDR genotipova u heterozigota i homozigota za HLA rizične alele podjednaka.

Uzevši u obzir ukupne rezultate dolazimo do zaključka da polimorfizam FokI VDR gena ne predstavlja čimbenik podložnosti u razvoju celijakije.

8. LITERATURA

- (1) Starčević Čizmarević N, Mijandrušić-Sinčić B, Licul V, Kapović M, Ristić S. Geni i celijakija. *Paediatrica Croatica* [Internet]. 2015 [citirano 01.04.2021.]; 59(2):88-94. Dostupno na: <https://doi.org/10.13112/PC.2015.14>
- (2) Auricchio R, Troncone R. Can Celiac Disease Be Prevented?. *Frontiers in Immunology*. [Internet]. 2021 [citirano 10.06.2021]; 12. 672148. Dostupno na: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.672148>.
- (3) Čuković-Čavka S, Crnčević Urek M, Brinar M, Turk N. Celijakija u odrasloj dobi. *Medicus* [Internet]. 2012 [citirano 07.04.2021.]; 21(2_Gastroenterologija):179-186. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/101973>
- (4) Al-Toma, A., Volta, U., Auricchio, R., Castillejo, G., Sanders, D. S., Cellier, C., Mulder, C. J., & Lundin, K. European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. *United European gastroenterology journal*. [Internet]. 2019. [citirano 10.06.2021.]; 7(5), 583–613. Dostupno na: <https://doi.org/10.1177/2050640619844125>
- (5) Sabljic T. Praćenje nutritivnog statusa i pridržavanja bezglutenske dijeta u odraslih bolesnika sa celijakijom [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-bioteknološki fakultet; 2018 [pristupljeno 25.05.2021.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:828157>
- (6) Mišak, Z. Gluten u prehrani: uzrok celijakije ili nešto više. *Paediatr Croat*. [Internet]. 2004. [citirano 11.04.2021] 58 (1),175-179. Dostupno na: <http://www.hpps.com.hr/sites/default/files/Dokumenti/2014/PDF/Dok38.pdf>
- (7) Mijandrušić Sinčić B, Starčević Čizmarević N, Licul V, Crnić-Martinović M, Ristić S, Kapović M. HLA-DQA1 i HLADQB1 geni u pacijenata s celijakijom. *Medicina Fluminensis* [Internet]. 2016 [pristupljeno 11.04.2021.];52(1):87-94. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/153001>
- (8) Nakić S. Određivanje rizika za pojavu celijakije na temelju genetskog biljega HLA-DRB1*0301 (rs2187668) [Diplomski rad]. Split: Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet; 2015 [pristupljeno 24.05.2021.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:735606>

- (9) Mišak Z, Kolaček S, Percl M. Celijakija-bolest na koju treba misliti. *Medix*. [Internet]. 2007 [citirano 12.04.2021.]; 2007;XIII, broj 72,157.-161. Dostupno na: <https://www.bib.irb.hr/328656>
- (10) Caio, G., Volta, U., Sapone, A. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med* [Internet]. 2019. [citirano 12.04.2021.]; 2019; 17, 142. Dostupno na: <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1380-z>
- (11) Parzanese, I., Qehajaj, D., Patrinoicola, F., Aralica, M., Chiriva-Internati, M., Stifter, S., Elli, L., Grizzi, F. Celiac disease: From pathophysiology to treatment. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*. [Internet]. 2017. [citirano 25.04.2021.]; 2017; 8(2), 27–38. Dostupno na: <https://doi.org/10.4291/wjgp.v8.i2.27>
- (12) Makovicky, P., Makovicky, P., Caja, F., Rimarova, K., Samasca, G., & Vannucci, L. Celiac disease and gluten-free diet: past, present, and future. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*. [Internet]. 2020. [citirano 01.05.2021]; 2020;13(1), 1–7. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7069540/>
- (13) Pietzak, M. Celiac Disease, Wheat Allergy, and Gluten Sensitivity. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. [Internet]. 2019. [citirano 06.05.2021.]; 2019;36, 68.-75. Dostupno na: doi:10.1177/01486071111426276
- (14) Sollid, L. M., & Khosla, C. Novel therapies for coeliac disease. *Journal of internal medicine*. [Internet]. 2011. [citirano 06.05.2021.]; 2011;269(6), 604-613.Dostupno na: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2796.2011.02376.x>
- (15) Vici, G., Camilletti, D., & Polzonetti, V. Possible Role of Vitamin D in Celiac Disease Onset. *Nutrients*. [Internet]. 2020. [citirano 20.05.2021.]; 2020;12(4), 1051. Dostupno na: <https://doi.org/10.3390/nu12041051>
- (16) Margulies, S. L., Kurian, D., Elliott, M. S., & Han, Z. Vitamin D deficiency in patients with intestinal malabsorption syndromes-think in and outside the gut. *Journal of digestive diseases*. [Internet]. 2015. [citirano 20.05.2021.]; 2015;16(11), 617–633. Dostupno na: <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12283>

- (17) Laktašić Žerjavić N, Koršić M, Crnčević Orlić Ž, Anić B. Vitamin D – vitamin prošlosti, hormon budućnosti. Liječnički vjesnik : glasilo Hrvatskoga liječničkog zbora [Internet]. 2011. [citirano 25.05.2021.]; 2011;133:194-204. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:770048>
- (18) Smolders, J., Peelen, E., Thewissen, M., Menheere, P., Tervaert, J. W., Hupperts, R., & Damoiseaux, J. The relevance of vitamin D receptor gene polymorphisms for vitamin D research in multiple sclerosis. *Autoimmunity reviews*. [Internet]. 2009. [citirano 14.06.2021.]; 2009; 8(7), 621–626. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.02.009>
- (19) Monticielo O, Brenol J, Chies J, Longo M, Rucatti G, Scalco R, Xavier R. The role of BsmI and FokI vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, [Internet]. 2011. [citirano 13.06.2021.]; 2011;21(1), 43–52. Dostupno na: <https://doi.org/10.1177/0961203311421798>
- (20) Valtuena J, Breidenassel C, Folle J, Gonzalez-Gross M. Retinol, β -carotene, α -tocopherol and vitamin D status in European adolescents; regional differences and variability: a review. *Nutr Hosp*. [Internet]. 2011. [citirano 13.06.2021.]; 2011;26(2):280-8. Dostupno na: doi: 10.1590/S0212-16112011000200006.
- (21) Handunnetthi L, Ramagopalan SV, Ebers GC. Multiple sclerosis, vitamin D and HLA-DRB1*15. *Neurology*. [Internet]. 2010. [citirano 13.06.2021.]; 2010;74(23):1905-10. Review. Dostupno na: <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181e24124>
- (22) FlexiGene DNA Kit – QIAGEN. [Internet]. Dostupno na: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/flexigene-dna-kit/>
- (23) San-Pedro, J.I., Bilbao, J.R., Perez de Nanclares, G., Vitoria, J.C., Martul, P., Castano, L. Heterogeneity of vitamin D receptor gene association with celiac disease and type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity*. [Internet]. 2005. [citirano 22.06.2021.]; 2005, 38, 439–444. Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/08916930500288455>

- (24) Chao L., Weihua Z., Xinjue H., Xinxin Z., Chaohui Y. Vitamin D status and vitamin D receptor genotypes in celiac disease: a meta-analysis, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. [Internet]. 2021. [citirano 22.06.2021.]; 2021;61:12, 2098-2106. Dostupno na: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1772716>
- (25) Bittker S. S. Elevated Levels of 1,25-Dihydroxyvitamin D in Plasma as a Missing Risk Factor for Celiac Disease. *Clinical and experimental gastroenterology*. [Internet]. 2020. [citirano 22.06.2021.]; 2020; 13, 1–15. Dostupno na: <https://doi.org/10.2147/CEG.S222353>
- (26) Auricchio R., Troncone R Can Celiac Disease Be Prevented? *Front. Immunol.* [Internet] 2021. [citirano 22.06.2021.]; 2021; Dostupno na: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.672148>
- (27) Ludvigsson JF, Ludvigsson J, Ekbom A, Montgomery SM. Celiac disease and risk of subsequent type 1 diabetes: a general population cohort study of children and adolescents. *Diabetes Care*. [Internet] 2006. [citirano 22.06.2021];2006; 29:2483–2488. Dostupno na: <https://doi.org/10.2337/dc06-0794>
- (28) Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., D'Agate, C., Francavilla, R., Biagi, F., Volta, U., Accomando, S., Picarelli, A., De Vitis, I., Pianelli, G., Gesuita, R., Carle, F., Mandolesi, A., Bearzi, I., & Fasano, A. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *The American journal of clinical nutrition*. [Internet] 2007. [citirano 22.06.2021.]; 2007 85(1), 160–166. Dostupno na: <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.1.160>

9. POPIS SKRAĆENICA I AKRONIMA

CD - engl. *celiac disease*, celijakija

HLA - engl. - *human leukocyte antigen*, humani leukocitni antigen

tTG – tkivna transglutaminaza

APS – antigen prezentirajuće stanice

MHC – engl. *major histocompatibility complex*, glavni humani sustav tkivne snošljivosti

HUGO - *Gene Nomenclature Committee*

ESPGHAN - *The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*

AGA-IgG - Antiglijadinska protutijela IgG-razreda

AGA-IgA - Antiglijadinska protutijela IgA-razreda

EMA-IgA - Endomizijskih protutijela

25-hidroksivitamin D3 ili kalcidiol - 25(OH)D

1,25-dihidroksivitamin D3 ili kalcitriol - 1,25(OH)₂D

VDR - vitamin D receptor

RXR - retinoidni X-receptor

VDRE – vitamin D response elements

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

PCR – engl. *polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom

10. ŽIVOTOPIS

Iva Pešut, rođena 1. ožujka 1997. godine, završila gimnaziju Andrije Mohorovičića u Rijeci 2015. godine, te iste godine upisala preddiplomski studij Sanitarnog inženjerstva. Godine 2019. završila preddiplomski studij i stekla titulu *bacc. sanit. ing.*, te upisala diplomski studij Sanitarnog inženjerstva. Tijekom 2017. godine sudjelovala kao pasivni sudionik na 1. kongresu Okolišnog zdravlja, u izradi Eko otoka na Medicinskom fakultetu u Rijeci, sudjelovala na Ljetnoj školi CSI na Medicinskom fakultetu u Rijeci. 2018. godine sudjelovala u organizaciji 2. kongresa Okolišnog zdravlja. 2019. godine predstavljala organizacijski odbor 3. kongresa Okolišnog zdravlja kao predsjednik odbora i sudjelovala kao pasivni sudionik na kongresu Sanitas. Tokom 2020. godine za vrijeme pandemije Covid-19 virusa aktivno volontirala u karanteni u sklopu civilne zaštite Primorsko-goranske županije, te u 2021. godini nastavila s aktivnim radom na Zavodu za mikrobiologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo.