

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Študijný program: Antropológia a genetika človeka



Bc. Katarína Selková

**Vplyv diétnej intervencie na zápalovú aktiváciu nešpecifickej imunity u pacientov so stabilizovanou celiakiou**

The effect of specific dietary intervention on inflammatory activation of innate immunity in patients with stabilized celiac disease

**Diplomová práca**

Školiteľka: RNDr. Pavlína Daňková, Ph.D.

Praha, 2024

## **Čestné prehlásenie**

Prehlasujem, že som záverečnú prácu písala samostatne, a že som uviedla všetky informačné zdroje a literatúru použité v tejto práci. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 23.04.2024

Bc. Katarína Selková

### *Podakovanie*

Touto cestou by som sa chcela v prvom rade poďakovať celiakom sledovaným na II. Internej klinike FNKV, ktorí sa rozhodli zúčastniť sa tejto klinickej štúdie, vydržali poctivo po dobu 14 dní konzumovať ovsené vločky a podstúpili odber biologického materiálu. Zároveň ďakujem doc. MUDr. Ive Hoffmanovej, Ph.D. a jej tímu z II. Internej kliniky FNKV a tímu z Výskumného ústavu rastlinnej výroby za spoluprácu, a že mi umožnili zapojiť sa do tak zaujímavého projektu. Poďakovanie patrí aj mojej školiteľke RNDr. Pavlíne Daňkovej, Ph.D. a Mgr. Patrikovi Škubicovi za dobre mienené rady, tipy na vylepšenie, zaučenie do laboratórnych metód, pomocnú ruku pri spracovávaní biologického materiálu a zasvätenie do štatistiky a práce s dátami. V neposlednom rade potom moja vďaka patrí rodine, priateľom a kolegom, ktorí pri mne počas celej doby práce na tomto projekte stáli a boli mi oporou, za čo Vám všetkým zo srdca veľmi pekne ďakujem.

## Abstrakt

**Úvod:** Celiakia je komplexná autoimunitná choroba vyvolaná u geneticky predisponovaných jedincov po požití obilnín obsahujúcich lepok. Monocyty ako hlavné efektorové bunky vrodenej imunity hrajú nezanedbateľnú úlohu v rozvoji imunitnej odpovede v reakcii na patogénne a cudzorodé agens i v rámci patogenézy celiakie. Jedinou efektívnou liečbou celiakie je prísne a celoživotné dodržiavanie bezlepkovej diéty, pričom stravovacie voľby majú kľúčový význam pri regulácii tohto ochorenia. Ovos sa objavil ako kontroverzná, no nutrične bohatá možnosť, ako rozšíriť bezlepkovú diétu o zdroj bohatý na vlákninu, mikro- a makroživiny. Preto sme sa v rámci tejto diplomovej práce zamerali na to, ako vrodenný imunitný systém, konkrétne monocyty, interagujú s avenínovými peptidmi vybraného kultivaru bezlepkového ovsa a či dochádza v reakcii na jeho konzumáciu k imunitnej reakcii detekovateľnej na molekulárnej úrovni.

**Materiál a metódy:** Do štúdie bolo zahrnutých 39 pacientov so stabilizovanou celiakiou, ktorí po dobu 14 dní konzumovali denne 50 g surových ovsených vločiek vybraného kultivaru. Z plnej krvi boli pred začiatkom štúdie a po jej ukončení vyizolované CD14<sup>+</sup> monocyty pomocou imunomagnetickkej separácie, u ktorých boli stanovované expresie mRNA TLR2, TLR4, TNF $\alpha$ , IL8 a IL1 $\beta$  pomocou kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie s mRNA génu *PGKI* ako endogénnou kontrolou. Z plnej krvi boli taktiež pomocou gradientovej centrifugácie vyizolované mononukleárne bunky periférnej krvi. Pomocou prietokovej cytometrie sme analyzovali počet lymfocytov a monocytov a hodnotenie expresie povrchových markerov TLR2, TLR4, HLA-DR, CD80 a CD86 umožnilo skúmať fenotyp leukocytov.

**Výsledky:** Analýzou a porovnaním mRNA expresií pred a po 14-dennej konzumácii ovsa bolo zistené mierne zvýšenie hladín expresie IL1 $\beta$  ( $p = 0,005$ ) a TNF $\alpha$  ( $p = 0,053$ ). U TLR2, TLR4 ani IL8 mRNA nebola detekovaná žiadna zmena v nadväznosti na 14-dennú diétu intervenciu, zatiaľ čo expresia TLR2 na povrchu CD14<sup>+</sup> monocytov slabo, ale štatisticky významne klesla. Celkové počty monocytov, ich jednotlivých subtypov aj lymfocytov separovaných z plnej krvi sa po diéte buď nezmenili, alebo sa dokonca nevýznamne snížili. Rovnaký efekt ovsenej diety bol pozorovaný aj v prípade leukocytov definovaných pomocou expresie povrchových markerov TLR2, TLR4, HLA-DR, CD80; iba pokles počtu buniek CD14<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> bol štatisticky významný ( $p = 0,029$ ).

**Záver:** Výsledky naznačujú, že na úrovni vrodenej imunitného systému pravdepodobne dochádza k slabej imunitnej reakcii prostredníctvom zvýšenia produkcie mRNA prozápalových cytokínov TNF $\alpha$  a IL1 $\beta$  monocytmi, a to pravdepodobne v súvislosti so 14-dennou konzumáciou ovsa. Zdá sa však, že na bunkovej a proteínovej úrovni túto aktiváciu imunitného systému prostredníctvom zmien v počte či fenotype monocytov po konzumácii ovsa u pacientov s celiakiou nedetekujeme.

**Kľúčové slová:** celiakia, monocyty, vrodenná imunita, ovos, prozápalové cytokíny

## Abstract

**Introduction:** Celiac disease is a complex autoimmune disease induced in genetically predisposed individuals after ingestion of cereals containing gluten. Monocytes, as the main effector cells of innate immunity, play a non-negligible role in the development of the immune response in response to pathogenic and foreign agents as well as in the pathogenesis of celiac disease. The only effective treatment for celiac disease is strict and lifelong adherence to a gluten-free diet, while dietary choices are of key importance in the regulation of this disease. Oats have emerged as a controversial but nutritionally rich option to supplement a gluten-free diet with a source rich in fiber, micro- and macronutrients. Therefore, in this thesis, we focused on how the innate immune system, specifically monocytes, interact with the avenin peptides of a selected gluten-free oat cultivar and whether an immune reaction detectable at the molecular level occurs in response to its consumption.

**Materials and methods:** 39 patients with stabilized celiac disease were included in the study, who consumed 50 g of raw oatmeal of the selected cultivar daily for 14 days. CD14<sup>+</sup> monocytes were isolated from whole blood before the start of the study and after its completion using immunomagnetic separation, in which TLR2, TLR4, TNF $\alpha$ , IL8 and IL1 $\beta$  mRNA expressions were determined using quantitative polymerase chain reaction with PGK1 gene mRNA as an endogenous control. Peripheral blood mononuclear cells were also isolated from whole blood using gradient centrifugation. Using flow cytometry, we analyzed the number of lymphocytes and monocytes, and the evaluation of the expression of surface markers TLR2, TLR4, HLA-DR, CD80 and CD86 made it possible to investigate the phenotype of leukocytes.

**Results:** Analysis and comparison of mRNA expressions before and after 14-day oat consumption revealed a slight increase in IL1 $\beta$  ( $p = 0,005$ ) and TNF $\alpha$  ( $p = 0,053$ ) expression levels. No change was detected in TLR2, TLR4, or IL8 mRNA following the 14-day dietary intervention, while TLR2 expression on the surface of CD14<sup>+</sup> monocytes decreased slightly but statistically significantly. The total number of monocytes, their individual subtypes and lymphocytes separated from whole blood either did not change after the diet or even decreased insignificantly. The same effect of the oat diet was also observed in leukocytes defined by the expression of surface markers TLR2, TLR4, HLA-DR, CD80; only the decrease in the number of CD14<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> cells was statistically significant ( $p = 0,029$ ).

**Conclusion:** The results suggest that at the level of the innate immune system, a weak immune response probably occurs through an increase in mRNA production of the pro-inflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  by monocytes, probably in connection with the 14-day oat consumption. However, it seems that at the cellular and protein level we do not detect this activation of the immune system through changes in the number or phenotype of monocytes after consuming oats in patients with celiac disease.

**Key words:** celiac disease, monocytes, innate immunity, oats, proinflammatory cytokines

# Obsah

1.	Teoretický úvod.....	1
1.1.	Celiakia a jej epidemiológia.....	1
1.2.	Problematika obilnín v rámci bezpečnej diéty.....	3
1.3.	Etiopatogenéza celiakie.....	6
1.3.1.	Vplyv genetických faktorov na rozvoj celiakie .....	6
1.3.2.	Environmentálne faktory .....	9
1.3.3.	Patogenéza celiakie.....	11
1.3.4.	Imunopatogenéza celiakie .....	12
2.	Hypotézy a cieľ práce.....	19
3.	Materiály a metódy.....	20
3.1.	Ovos .....	20
3.2.	Darcovia biologického materiálu .....	20
3.3.	Metódy izolácie a spracovania CD14 <sup>+</sup> monocytov z krvi a štúdium génovej expresie na úrovni mRNA.....	21
3.3.1.	Imunomagnetická separácia monocytov.....	21
3.3.2.	Izolácia RNA .....	22
3.3.3.	Reverzne transkriptázová PCR.....	23
3.3.4.	Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (qPCR) .....	24
3.4.	Metódy spracovania krvi na následnú analýzu zmien počtu leukocytov a expresie ich povrchových antigénov .....	26
3.4.1.	Izolácia mononukleárných buniek (PBMCs) z plnej krvi .....	26
3.4.2.	Analýza celkového počtu leukocytov a expresie ich povrchových antigénov prostredníctvom prietokovej cytometrie (FCM).....	27
3.5.	Izolácia séra z krvi .....	29
3.6.	Štatistické spracovanie výsledkov .....	29
4.	Výsledky.....	30
4.1.	Štúdium zmien génovej expresie na úrovni mRNA.....	30
4.1.1.	Zmeny expresie mRNA vybraných markerov CD14 <sup>+</sup> monocytov po diétnej intervencii	30
4.2.	Vplyv diétnej intervencie na kvantitatívne a kvalitatívne zmeny leukocytov vč. exprese ich vybraných povrchových markerov .....	34
4.2.1.	Zmeny v celkovom počte leukocytov.....	34
4.2.1.2.	Zmeny v rámci monocytárných subpopulácií.....	35
4.2.3.	Zmeny v počte lymfocytov exprimujúcich vybrané markery.....	40
5.	Diskusia.....	41
6.	Záver.....	45
7.	Zoznam použitých skratiek.....	46
8.	Zdroje .....	48

# 1. Teoretický úvod

## 1.1. Celiakia a jej epidemiológia

Celiakia je v populácii pomerne časté ochorenie, ktoré postihuje približne 1 z 200 ľudí európskeho pôvodu (Zdroj 1). Jedná sa o autoimunitné ochorenie kedy ľudské telo nesprávne reaguje na lepok prijatý z potravy, ktorý sa nachádza v obilninách ako je napríklad pšenica, jačmeň alebo raž. K manifestácii celiakie po požití lepku z potravy prispieva súhra genetických a environmentálnych faktorov. Imunitný systém pacientov s týmto ochorením vytvára špecifické IgA protilátky namierené proti enzýmu tkanivovej transglutamináze (tTG2), frakciám lepku (najmä gliadínu a glutenínu) a endomýziu (EMA, tenká vrstva spojivového tkaniva, obklopujúceho jednotlivé svalové vlákna). Tkanivová transglutamináza 2 je multifunkčný, na vápenatých katiónoch závislý enzým, ktorý sa nachádza v rôznych orgánoch a má významnú úlohu v bunecnej diferenciácii a proliferácii, stabilizácii extracelulárnej matrix, tkanivových opravách, pri bunecnej adhézii a receptorovej signalizácii. V sliznici tenkého čreva sa za fyziologických podmienok vyskytuje v neaktívnej forme (Nurminskaya & Belkin, 2012). Práve gliadínové peptidy sú vďaka hojnému obsahu glutamínu pre tTG2 vhodným a preferovaným substrátom, ktorý dokáže modifikovať deamidáciou a transamidáciou. Transamidované komplexy gliadín-tTG2 v patogenéze celiakie pôsobia ako autoantigény prispievajúce k zápalovému procesu a tvorbe autoprotlátok (Dieterich et al., 1998). Následne glutén-špecifické CD4<sup>+</sup> T-bunky v tenkom čreve celiakov reagujú na fragmenty lepku modifikované tTG2, ktoré sú viac imunoreaktívne a dochádza k deštrukcii a prestavbám črevného epitelu (Sollid, 2002).

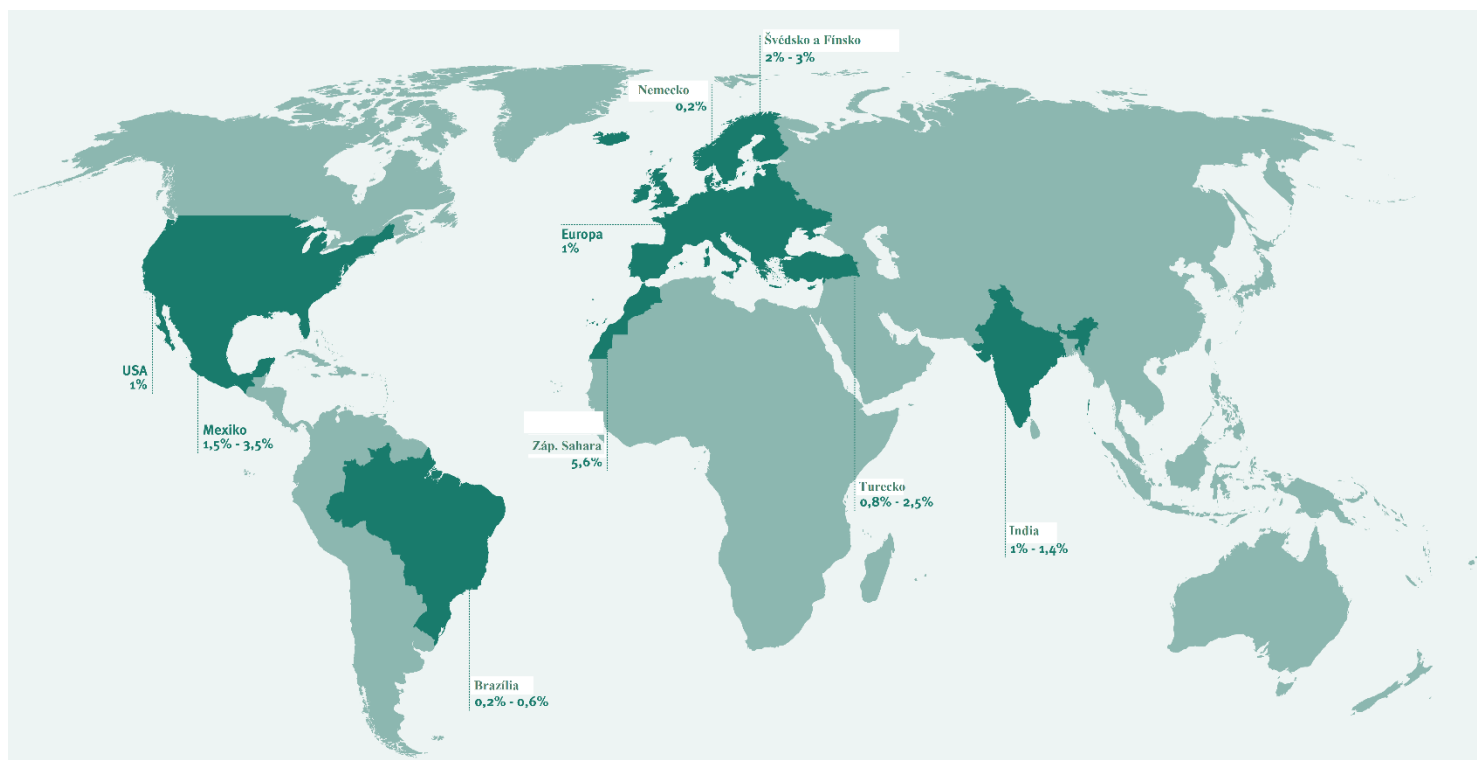
U väčšiny pacientov s celiakiou dochádza pri expozícii lepku ku črevným príznakom ochorenia, akými sú najčastejšie hnačka a poruchy vstrebávania živín, ale aj k variabilnej škále mimočrevných prejavov tohto ochorenia napríklad k anémii, diabetes mellitus 1. typu, zvýšenému výskytu osteoporózy, dermatitis herpetiformis a iným (Sollid, 2000). Jediným doposiaľ známym a zaručeným spôsobom schopným zastaviť imunopatologické deje spôsobené gluténom je striktné a celoživotné dodržiavanie bezlepkovej diéty, teda vyradiť akékoľvek potraviny lepok obsahujúce z jedálneho lístku.

Celiakia je diagnostikovaná komplexne a stanovenie diagnózy zahŕňa: prítomnosť klinických príznakov, sérologické vyšetrenie prítomnosti autoprotlátok anti-tTG2 a anti-EMA a biopsiu tenkého čreva hodnotenú podľa smerníc Európskej spoločnosti pre detskú gastroenterológiu, hepatológiu a výživu (ESPGHAN) (Husby et al., 2020). Nedávne smernice však navrhujú úpravu, minimálne u detí, tento diagnostický prístup upraviť a uplatniť „prístup bez biopsie“ pre deti s výrazne vysokými hladinami anti-tTG2, čo umožní eliminovať potrebu invazívnych vyšetrení (Losurdo et al., 2021). Na rozdiel od toho prístupu k detským pacientom, smernice stále odporúčajú vykonávať biopsiu u dospelých pacientov, kvôli novej nespoľahlivosti samotnej sérológie, keďže duodenálna biopsia poskytuje kľúčové diagnostické a prognostické informácie vrátane hodnotenia poškodenia črevného

epitelu, aktivity ochorenia a súvisiacich stavov či ďalších potenciálnych komplikácií (Ensari & Marsh, 2019).

Z historického hľadiska civilizačné faktory udávajúce predpoklad pre vznik celiakie pôsobili v 10. – 8. storočí pred našim letopočtom, kedy zmeny spôsobu života vtedajších populácií – z loveckého a zberačského typu na sedentárny spojený s rozvojom hospodárstva, viedli k rozmachu neolitckej diéty, pre ktorú je charakteristická potrava zložená najmä zo pšenice a jej príbuzných obilnín, mliečne výrobky a mäso hospodárskych zvierat. Postupne sa tento typ diéty rozšíril z Afriky a blízkeho Východu aj na ostatné kontinenty. Práve zavedenie nových zdrojov výživy umožnili imunitnému systému človeka stretnúť sa s novým potravinovým antigénom – gluténom, a na jeho imunitnú toleranciu neboli všetci jedinci pripravení. Tí geneticky predisponovaní si vyvinuli abnormálnu imunitnú odpoveď a následne jej obvykle podľahli ešte pred dosiahnutím reprodukčného veku. Z odlišného podielu zastúpenia gluténu v strave a zároveň populačnej variabilite v génoch kódujúcich ľudské leukocytárne antigény (HLA), konkrétne HLA-DQ2 a -DQ8, molekuly preferenčne viažuce frakcie gluténu, vyplývajú odlišné prevalencie celiakie v rôznych zemepisných šírkach (Guandalini, 2008).

Epidemiologické štúdie v posledných desaťročiach poukazujú na globálny nárast incidencie aj prevalencie celiakie. Podľa metaanalýzy vykonanej Singhom a kolektívom roku 2018 sa séroprevalencia celiakie v globálnom merítku pohybuje okolo 1,4 % a celiakia potvrdená biopticky okolo 0,7 %. Prevalencia celiakie sa líši do určitej miery podľa geografickej oblasti (**Obrázok 1**), pohlavia (u žien sa vyskytuje častejšie než u mužov, a to v pomere 2 - 3 : 1) a veku (častejšie je diagnostikovaná u detí než u dospelých), pričom geografické rozdiely súvisia s početnosťou výskytu génov kódujúcich molekuly HLA-DQ2 alebo HLA-DQ8 a typom stravy v danej populácii (Singh et al., 2018).





**Obrázok 1:** *Epidemiológia celiakie na príkladoch z niektorých krajín* (prevzaté a upravené podľa Zdroj 2)

V rámci Európy sa celiakia vyskytuje s vyššou prevalenciou než 1 % v škandinávskych krajinách, Írsku a Veľkej Británii, kopírujúc relatívne vyššiu prevalenciu haplotypov *HLA-DQ2 a*/alebo *HLA-DQ8* v severozápadnej Európe (Ciccocioppo et al., 2015; Gujral et al., 2012). Približne rovnaká prevalencia celiakie v populácii ako v Európe sa vyskytuje aj v Severnej Amerike (~1 %). Globálne je potom nižšiu prevalenciu než 1 % možné pozorovať v krajinách Južnej Ameriky (~0,4 %) a Karibiku, v krajinách subsaharskej Afriky (~0,5 %) či v juhovýchodnej Ázii, kde okrem nízkeho výskytu rizikových haplotypov zohrávajú svoj podiel aj odlišné stravovacie návyky – nízka konzumácia pšenice na úkor hlavnej zložky tunajšej kuchyne, ktorou je ryža (Gujral et al., 2012). Vysoká prevalencia u populácie žijúcej na území Západnej Sahary (prevalencia 5,6 %) sa odôvodňuje ako vysokým podielom *HLA-DQ2* génov v populácii, tak na pšenicu bohatou stravou zavedenou ešte počas kolonizácie severnej Afriky (Makharia et al., 2022).

V Českej republike a na Slovensku podľa vykázaných dát od poisťovní (ambulantná a hospitalizačná starostlivosť) trpelo v roku 2017 celiakiou zhruba 0,2 % z celkového počtu obyvateľov, pričom skutočná prevalencia bude oveľa vyššia vzhľadom k tomu, že v týchto údajoch nie sú započítaní ľudia, ktorí lekára v danom roku nenavštívili, alebo nemajú definitívne potvrdenú diagnózu celiakie (tj. klinické príznaky, sérológia a biopsia tenkého čreva). Predpokladaná prevalencia celiakie podľa dát Ústavu zdravotníckych informácií a štatistiky (ÚZIS) ČR z roku 2021 je u 1 pacienta zo 100, pričom diagnostikovaná je len štvrtina chorých (Zdroj 3).

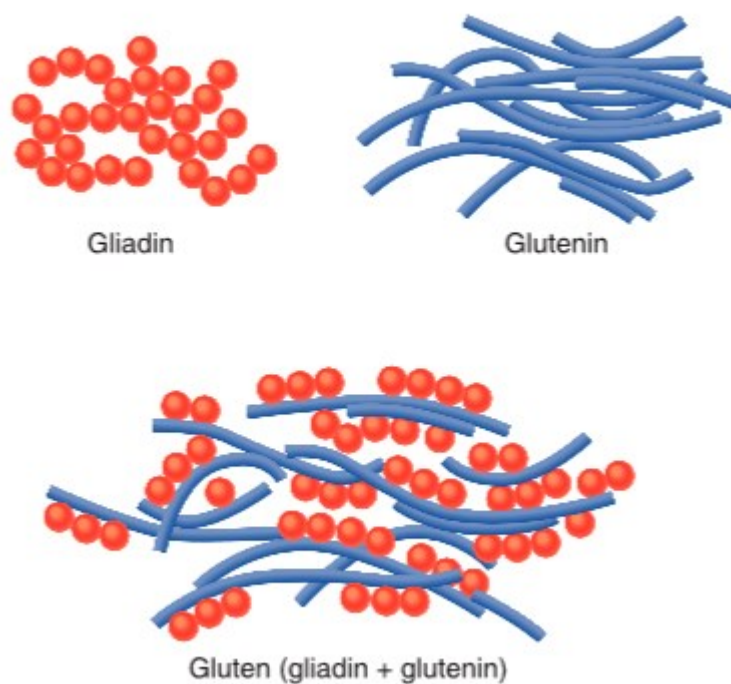
## 1.2. Problematika obilnín v rámci bezlepkovej diéty

Predtým než budú v ďalších kapitolách rozobrané mechanizmy patogenézy celiakie, jej genetický podklad a environmentálne faktory, ktoré prispievajú k jej rozvinutiu u predisponovaných jedincov, je dôležité pochopiť, ako vyzerá a pôsobí hlavný spúšťač tohto ochorenia – glutén. V tejto kapitole bude venovaná pozornosť imunogenicite gluténu, ktorý sa nachádza v obilninách, najmä v pšenici, jačmeni, raži a ovsí, ktorý je v kontexte bezlepkovej diéty ešte stále kontroverzná téma. Cieľom tejto kapitoly je uviesť do problematiky obilnín v kontexte celiakie a zároveň poukázať na odlišnosti u imunogenicity ovsa a jeho potenciálne prínosy v bezlepkovej diéte.

Rod *Triticeae* patrí do podčeláde lipnicovitých (*Poaceae*) Na zahŕňa rody s mnohými domestikovanými druhmi plodín ako je pšenica, jačmeň a raž. Tieto obilniny majú vysokú nutričnú hodnotu a potraviny z nich vyrobené sú chutné. Mimo to sú z poľnohospodárskeho hľadiska pomerne adaptabilné a dobre skladovateľné. Avšak všetky odrody pšenice, jačmeňa a raže obsahujú vo svojich zrnách imunostimulačné gluténové i negluténové peptidy, ktoré sa podieľajú na rôznych potravinových alergiách a intoleranciách (Sapone et al., 2012). V posledných desaťročiach

pozorujeme s konzumáciou pšenice a jej príbuzných obilnín dva trendy: 1. nárast ochorení vyvolaných týmito obilninami, ktorý nemožno vysvetľovať len zlepšením diagnostických možností a 2. stravovanie sa bezlepkovou diétou (alebo diétou so zníženým obsahom lepku), ktorú konzumuje viac jedincov, než by odpovedalo prevalencii celiakie a alergií na pšenicu (Fasano et al., 2015).

Lepok (latinsky glutén) je vo vode nerozpustná zmes zásobných proteínov obilného zrna - pšenice, raži, jačmeňa a ovsa, ktorá zostáva po vymytí zrna (Naik et al., 2018). V prípade pšeničného gluténu sa jedná o gliadíny a gluteníny, ktoré sú pre pacientov s celiakiou toxické (Fasano, 2011). Gliadíny sú v rámci svojho aminokyselinového reťazca schopné vytvárať intramolekulárne disulfidické mostíky, prostredníctvom ktorých sú schopné sa rovnako viazať aj ku glutenínom, a tým proteín stabilizovať (**Obrázok 2**) (Shewry & Tatham, 1997).



**Obrázok 2:** Štruktúrne zobrazenie pšeničného gluténu (prevzaté od (Fasano, 2011))

Proteíny endospermu obilného zrna rozpustné v etanole - prolamíny; pre pšenicu známe ako gliadíny, pre raž sekalíny, pre jačmeň hordeíny a pre ovos aveníny, sa v rôznom pomere podieľajú na svojom zastúpení v zrne, čo je jeden z kľúčových faktorov odlišnej imunotoxicity týchto obilnín. Pšenica obsahuje najviac prolamínov (80 – 85 % z celkových proteínov), naopak, v ovsí je ich obsah najnižší (10 – 15 % zo zrna) (Biesiekierski, 2017; Shewry et al., 1995). Prolamíny majú vo svojej primárnej štruktúre vysoký obsah prolínu (10 – 29 %) a glutamínu (26 – 53 %), ktoré ich robia odolnými voči ľudským gastrointestinálnym enzýmom. Naštiepané peptidy obilnín zahŕňajú imunogénne a toxické varianty, na ktoré reaguje imunitný systém celiaka dvomi typmi odpovedí -

rýchlou odpoveďou vrodeneho imunitneho systému a pomalšou adaptívnou imunitnou reakciou spojenou s aktiváciou T-buniek v lamina propria mucosae (Maiuri, 1972) . Tieto peptidy v duodenu celiakov spúšťajú kaskádu dejov, ktorá sa ďalej podieľa na patogenéze celiakie (Scherf et al., 2018).

Review z roku 2016 zahŕňa i popis imunogenicity gluténových peptidov u jačmeňa a raže (podobných molekule pšeničného  $\alpha 2$ -gliadínu). Tá do značnej miery záleží na obsahu prolínu, ktorý zaistuje rezistenciu voči štiepeniu gastrointestinálnymi peptidázami (Balakireva & Zamyatnin, 2016). Skrížená reaktivita medzi  $\alpha$ -gliadín špecifickými T-bunkami pacientov s celiakiou a imunogénnymi aminokyselinovými sekvenciami hordeínov a sekalínov otestovaná *in vitro* dokazuje, že nie len pšenica, ale aj jačmeň a raž sú pre pacientov s celiakiou imunogénne. Táto *in vitro* „cross-reaktivita“ však nebola dokázaná pre aveníny v ovsí (Comino et al., 2016; Wahab et al., 2016).

Z podčeľade lipnicovitých patrí ovos do iného rodu než pšenica, jačmeň a raž. Ovos sa od týchto obilnín mimo iné líši v štruktúre a percentuálnom zastúpení svojich prolamínov, ktoré majú v porovnaní s gliadínmi, sekalínmi a hordeínmi menší obsah prolínu (Arentz-Hansen et al., 2004). Okrem menšieho obsahu prolínu obsahuje ovos také sekvencie aminokyselín, ktoré sú *in vitro* lepšie štiepiteľné gastrointestinálnymi proteázami a vykazujú len slabú väzbu na HLA-DQ2 antigény (Comino et al., 2016). Nízky imunoreaktívny potenciál ovsá a jeho kultivarov vyplývajúci z doterajších skúmaní ukazuje dobré predpoklady na začlenenie tejto obilniny do bezlepkovej diéty celiakov, avšak bezpečnosť a vhodnosť jeho konzumácie celiakmi zostáva ešte stále kontroverzná.

Zatiaľ čo niektoré štúdie naznačujú, že ovos je tolerovaný celiakmi bez nepriaznivých účinkov (Holm et al., 2006; Størsrud et al., 2003), iné ukazujú, že určité kultivary ovsá môžu vyvolať imunitnú reakciu a viesť k pretrvávajúcej intraepiteliálnej lymfocytóze (Tuire et al., 2012) a zápalu v duodenu (Lundin et al., 2003). Štúdia z roku 2014 poukázala na to, že u celiakov môže ovos zmeniť u intestinálnych buniek expresie mRNA pre imunitné zápalové faktory tak, že dôjde k aktivácii T-buniek a zvýšenej permeabilite intestinálnych tesných spojov (Sjöberg et al., 2014).

Tieto protichodné zistenia odkrývajú individuálnu variabilitu citlivosti pacientov s celiakiou na ovos a zdôrazňujú dôležitosť rozlišovania medzi rôznymi skupinami pacientov s celiakiou na základe ich citlivosti na obilné zrná. Výskum v posledných dekádach naznačil, že medzi jednotlivými kultivarmi ovsá existujú rozdiely v schopnosti avenínov vyvolať *in vitro* reakciu T-lymfocytov celiakov (Silano et al., 2007; Silano et al., 2014). Pri začlenení ovsá do bezlepkovej diéty je teda dôležité zvažovať faktory ako je najmenej imunogénny kultivar ovsá, metódy spracovania ovsených zŕn a možná krížová kontaminácia z pôdy obilninami lepok obsahujúcimi, alebo následne pri spracovaní zožatých ovsených zŕn a následnej distribúcii (Comino et al., 2011; Comino et al., 2012).

Metaanalýza z roku 2016 taktiež vyhodnotila, že zavedenie nekontaminovaného ovsá do bezlepkovej diéty nie je u stabilizovaných celiakov spojené so žiadnymi rizikami od symptomatológie, cez sérologické hladiny autoprotilátok až po histologické nálezy (La Vieille et al., 2016) a rovnako

bola v randomizovanej klinickej štúdií preukázaná aj bezpečnosť konzumácie bezlepkového ovsa deťmi s celiakou (Lionetti et al., 2018). U zhruba 8 % celiakov konzumujúcich ovos síce dochádza k vzniku avenín-reaktívnych T-lymfocytov, avšak konzumácia bežných denných dávok ovsa (100 g/deň) spôsobuje len veľmi slabú reakciu týchto buniek na avenín (Hardy et al., 2015). Je dôležité taktiež zmieniť, že doposiaľ nebola *in vivo* preukázaná skrížená aktivácia glutén-reaktívnych T-lymfocytov po konzumácii bezlepkového ovsa (Comino et al., 2016). Väčšina pacientov s celiakiou je teda schopná tolerovať ovos vo svojej diéte (pokiaľ nie sú na ovos alergickí alebo voči nemu imunosenzitívni). Je však naozaj dôležité, aby pacienti s celiakiou, ktorí chcú zaradiť ovos do svojej stravy, dbali na výber skutočne bezlepkového nekontaminovaného ovsa (Haboubi et al., 2006).

Síce sa kvalita bezlepkových potravín v posledných desaťročiach výrazne zlepšila a stala sa dostupnejšou, dodržiavanie bezlepkovej diéty aj napriek tomu nemusí nevyhnutne zabezpečiť dostatočný nutričný a vyvážený príjem živín. Keďže ovos je dôležitým zdrojom bielkovín, lipidov, vitamínov, minerálov a vlákniny, jeho bezpečné zaradenie do bezlepkovej diéty by mohlo zlepšiť nutričný stav a diverzitu stravy celiakov.

### 1.3. Etiopatogenéza celiakie

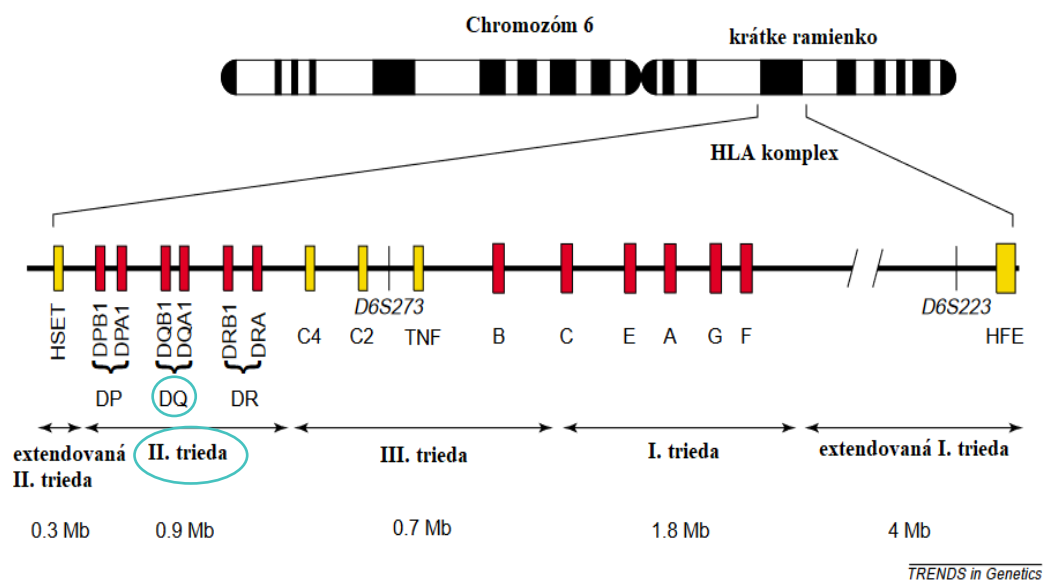
Ako už bolo na úvod zmienené, na rozvinutí celiakie a jej etiopatogenéze sa podieľa viacero faktorov pričom zásadným je genetická predispozícia v kombinácii s konzumáciou lepku z potravy, nasledovaná abnormálnou reakciou imunitného systému. Pretože nie u každého jedinca, ktorý je nositeľom rizikových HLA alel (25 – 40 % bežnej populácie je nositeľmi týchto HLA genotypov) sa celiakia rozvinie, je zrejmé, že sa na rozvoji a patogenéze tohto ochorenia podieľajú aj iné gény a environmentálne faktory, ktoré tiež zohrávajú dôležitú úlohu pri rozvoji tohto ochorenia. Súhra medzi genetickou náchylnosťou a environmentálnymi spúšťačmi je zložitá a ešte stále nie je úplne pochopená. Predpokladá sa, že určité faktory prostredia môžu interagovať s genetickou náchylnosťou a vyvolať celiakiu u citlivejších jedincov (Lebwohl et al., 2018). Genetické a environmentálne faktory, patogenéza a imunopatogenéza v rámci celiakie budú postupne detailnejšie rozobraté v nasledujúcich podkapitolách.

#### 1.3.1. Vplyv genetických faktorov na rozvoj celiakie

Celiakia je rovnako ako iné autoimunitné ochorenia polygénne dedičná. Štúdie v rodinách s výskytom celiakie a štúdie s dvojčatami konzistentne preukázali vyššie riziko (10 – 15 %) rozvinutia celiakie u príbuzných prvého stupňa diagnostikovaných jedincov (Corazza et al., 1992). Na dedičnosti sa podieľajú ako HLA gény, ktoré sú hlavným predisponujúcim faktorom, tak neopomenuteľnú úlohu zohrávajú aj non-HLA gény identifikované hlavne prostredníctvom celogenómových asociačných štúdií (GWAS) (Lebwohl et al., 2018). V súvislosti s predispozíciou k celiakii boli skúmané najmä gény zapojené do imunitnej regulácie, ktoré hrajú úlohu pri modulácii imunitnej odpovede na glutén

či gény udržiujúce integritu črevnej bariéry (Coleman, Quinn, Ryan, Conroy, Trimble, Mahmud, Kennedy, Corvin, Morris, Donohoe, O'Morain, et al., 2016; Hunt et al., 2008; van Heel et al., 2007).

Gény pre ľudské leukocytárne antigény sa nachádzajú na krátkom ramienku 6. chromozómu (**Obrázok 3**). Funkciou týchto génov je riadiť tvorbu proteínov, ktoré pomáhajú imunitnému systému rozlišovať medzi telu vlastnými a cudzorodými látkami. To umožňuje imunitnému systému efektívne identifikovať a chrániť organizmus pred patogénmi a poškodením. S celiakiou asociované sú najmä HLA molekuly 2. triedy, ktoré sú lokalizované na povrchu buniek imunitného systému (napríklad na B-bunkách, antigén prezentujúcich bunkách a aktivovaných T-bunkách) alebo na povrchu niektorých epitelových buniek, akými sú napríklad enterocyty (Choo, 2007).



**Obrázok 3:** Lokalizácia génov HLA na krátkom ramienku 6. chromozómu (prevzaté a upravené podľa (Undlien et al., 2001))

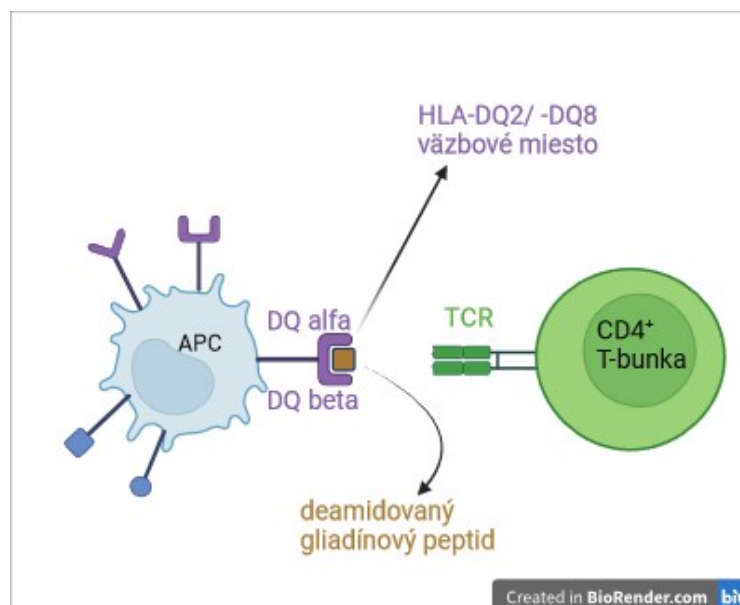
Ako už bolo spomenuté vyššie, hlavným faktorom predisponujúcim k vzniku celiakie sú špecifické varianty v oblasti HLA génov. Konkrétne sa jedná o haplotypy HLA-DQ2 a HLA-DQ8, ktoré sú prítomné u väčšiny jedincov s celiakiou a ich prítomnosť výrazne zvyšuje riziko vzniku ochorenia. Až 90 – 95 % celiakov má haplotyp HLA-DQ2, zatiaľ čo celiakov s HLA-DQ8 je 5 – 10 % (Taylor et al., 2019). Lebowhl a kolektív (2018) uvádzajú, že prítomnosť haplotypu HLA-DQ2 alebo HLA-DQ8 je zodpovedná až za 40 % genetického rizika celiakie. Molekuly HLA-DQ2/ -DQ8 sú heterodiméry zložené z alfa a beta podjednotiek, pričom každá podjednotka môže byť kódovaná viacerými alelickými variantami génu *DQA1* v prípade alfa reťazca, tak *DQB1* v prípade beta reťazca. Rizikové alely pre ich alfa a beta podjednotky môžu byť prítomné na jednom alebo oboch chromozómoch a ich dedičnosť sa riadi pravidlami mendelovskej genetiky. Konkrétne kombinácie alelických variant pre alfa a beta podjednotky na jednom chromozóme tvoria haplotyp. Každý

haplotyp potom kóduje určitý sérotyp povrchových HLA-DQ molekúl (Choo, 2007). Až 99 % celiakov má gény kódujúce sérotypy HLA-DQ2.2, HLA-DQ2.5 alebo HLA-DQ8 (**Tabuľka 1**). Tieto sérotypy sa od seba líšia väzbou konkrétnych aminokyselín gliadínového reťazca a zároveň v miere následnej reaktivity CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov. HLA-DQ2.5 má najvyššiu schopnosť aktivácie CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov, preto jedinci s týmto haplotypom, obzvlášť homozygotní, majú najvyššie genetické riziko pre vznik celiakie (du Pré & Sollid, 2015; Liu et al., 2014). Je to tiež najčastejší sérotyp vyskytujúci sa takmer u 95 % celiakov (Ricaño-Ponce et al., 2015). Naopak jedinci s HLA-DQ2.2 na jednom chromozóme majú najnižšie riziko rozvoja celiakie. Všeobecne platí že čím vyššia je „dávka“ génov predisponujúcim k celiakii, tým vyššie je riziko jej rozvinutia, avšak klinická manifestácia s konkrétnym haplotypom nekoreluje (Lundin & Wijmenga, 2015).

**Tabuľka 1:** prevzaté a upravené podľa (Taylor et al., 2019)

<i>Závislosti genetického rizika na prítomnosti konkrétnych HLA haplotypov</i>	
Diployp HLA-DQ2/DQ8	Genetické riziko
DQ2+DQ8	1:7 (14,3 %)
DQ2 + DQ2 alebo DQ2 homozygot DQB1*02	1:10 (10 %)
DQ8 + DQ8	1:12 (8,4 %)
DQ8 + DQB1*02	1:24 (4,2 %)
homozygot DQB1*02	1:26 (3,8 %)
DQ2 na jednej alele	1:35 (2,9 %)
DQ8 na jednej alele	1:89 (1,1 %)
½ DQ2 : DQB1*02	1:210 (0,5 %)
½ DQ2 : DQA1*05	1:1842 (0,05 %)

Prítomnosť haplotypov HLA-DQ2 či -DQ8 na povrchu antigén prezentujúcich buniek celiakov je rozhodujúca pre rozpoznávanie gluténových zložiek ako cudzorodých antigénov. Špecifické aminokyselinové zloženie HLA-DQ2 a HLA-DQ8 molekúl vo svojom väzobnom mieste vytvára pozitívny náboj, ktorý umožňuje účinnú väzbu negatívne nabitých aminokyselín (prolínu a kys. glutámovej) v peptidoch gliadínu (a glutenínu). Väzba týchto deamidovaných peptidov do väzobných miest HLA-DQ2/ -DQ8 umožní ich rozpoznanie CD4<sup>+</sup> T-bunkami, čo u celiakov vedie k charakteristickej imunopatologickej reakcii v duodenálnej sliznici (Du Pré & Sollid, 2015) (**Obrázok 4**).



**Obrázok 4:** Schematické znázornenie HLA-DQ2/ -DQ8 molekuly na povrchu APC, jej väzbové miesto skladajúce sa z alfa a beta podjednotky (fialová) má vysokú afinitu viazať deamidované peptidy gliadínu (hnedá) a tým umožní jeho rozpoznanie T bunecnému receptoru (TCR) vyskytujúcemu sa na povrchu v tomto prípade CD4<sup>+</sup> T-buniek.

Čo sa týka non-HLA génov spájaných so zvýšenou predipozíciou k celiakii, zatiaľ bolo identifikovaných najmenej 42 génových lokusov na rôznych chromozómoch prostredníctvom celogenómových asociačných štúdií (Sharma et al., 2016) a tento počet sa s prebiehajúcim výskumom neustále zvyšuje. Množstvo z týchto non-HLA génov je tiež asociovaných aj s inými autoimunitnými poruchami. Vo väčšine prípadov sa jedná o gény zodpovedné za reguláciu buniek imunitného systému jak vrodenej tak špecifickej imunity (napr. *IL2*, *IL21*, *IL18RAP*, *SH2B3*, *CCR5*, *ZNF335*...) a o gény zodpovedné za udržiavanie bariérovej funkcie čreva (Coleman et al., 2016; Hunt et al., 2008; Ricaño-Ponce et al., 2015; van Heel et al., 2007).

### 1.3.2. Environmentálne faktory

Genetické pozadie celiakie je schopné vysvetliť riziko jej rozvinutia len z 55 % (Zdroj 4). Ako bolo pojednávané v predošlej kapitole, haplotypy HLA-DQ2 a HLA-DQ8 sa v populácii vyskytujú často, avšak celiakia sa rozvinie len u zhruba 3 % ich nositeľov (Abadie & Jabri, 2015). Medzi environmentálne faktory potenciálne prispievajúce k vzniku celiakie patrí dojčenie, načasovanie zavádzania a množstva lepku do stravy dojčiat a batoliat, vírusové infekcie či črevný mikrobióm (Lionetti & Catassi, 2015).

O prospešnosti dojčenia na zdravie a vývoj detí dnes už niet pochyb. Okrem priaznivého vplyvu na črevnú sliznicu a vyzrievanie jak slizničnej tak aj systémovej imunity, je dojčenie dobrý

spôsob, akým sa cez materské mlieko dostávajú k dojčatú gluténové peptidy, ktoré mu napomáhajú k vzniku orálnej tolerancie gluténu (Zdroj 4). Materské mlieko ďalej obsahuje množstvo bioaktívnych látok, ktoré sú substrátom pre rast prospešných črevných baktérií. Vplyv dojčenia a načasovanie doby zavádzania lepku do stravy dojčiat sú už roky predmetom výskumov. Zo začiatku sa predpokladalo, že dojčenie by mohlo mať protektívny efekt na vznik celiakie (Akobeng et al., 2006; Auricchio et al., 1983). Táto hypotéza však bola neskôr vyvrátená viacerými štúdiami ako vo svojom review zhrnuli Lionetti & Catassi (2015). O rok skôr Lionetti a kolektív priniesli v rámci svojich výskumov aj nový pohľad na úlohu dojčenia pri vzniku celiakie. U dojčiat s familiárnym rizikom vzniku celiakie nebol pozorovaný žiadny protektívny účinok dojčenia. Dĺžka dojčenia bola podobná medzi deťmi, u ktorých sa celiakia vyvinula, a tými, u ktorých sa nevyskytla (5,6 a 5,8 mesiaca). Taktiež nebol zistený významný rozdiel v percente detí, u ktorých sa vyvinula celiakia, bez ohľadu na to, či boli dojčené, neboli dojčené alebo mali rôznu dĺžku dojčenia. Okrem toho zavádzanie lepku počas dojčenia alebo na umelej výžive významne neovplyvnilo pravdepodobnosť vzniku celiakie (Lionetti et al., 2014). Hoci teda existujú opodstatnené dôvody na odporúčanie predĺženého dojčenia, prospektívne štúdie nezaznamenali žiadne protektívne účinky dojčenia proti celiakii, pretože u detí s rizikom celiakie sa ukazuje, že genetická predispozícia má väčší vplyv na riziko rozvinutia celiakie než doba dojčenia a načasovanie zavádzania lepku do stravy a jeho množstvo.

Fenoménom výskumov v posledných rokoch sa stal taktiež mikrobióm a jeho úloha v rôznych patológiách a ochoreniach. Všeobecne hrá črevný mikrobióm dôležitú úlohu pri vyzrievaní imunitného systému v postnatálnom období, vo vývoji orálnej tolerancie antigénov, ale aj v samotnej absorpcii a metabolizme živín prijatých v potrave. Mikrobióm sa skladá z baktérií (podporujúcich regulačnú imunitnú odpoveď ale aj podporujúcich zápalovú imunitnú odpoveď), vírusov, plesní a parazitov (Hogenová et al., 2019). Významná bakteriálna kolonizácia prebieha napríklad už pri pôrode, preto sa kladie dôraz na spôsob pôrodu – prirodzený alebo cisársky rez, ktorý následne ovplyvní zloženie črevnej mikrobioty do života. Žiadne recentné štúdie však nedokázali nájsť presvedčivú asociáciu medzi typom pôrodu a zvýšením/ znížením rizika vzniku celiakie (Sander et al., 2018). Čo sa týka vplyvu užívania antibiotík na črevný mikrobióm, jedná sa síce o preukázané disruptory nášho mikrobiómu, ale ani výsledky štúdií spájajúcich vplyv užívania antibiotík na rozvoj celiakie doposiaľ neprinesli žiadne definitívne závery (Cenit et al., 2015; Mårild et al., 2013). Ukazuje sa však, že celiakia je spojená s črevnou dysbiózou, ktorú nedokáže napraviť ani bezlepková diéta. Dysbióza, nerovnováha v črevnej mikrobióme, môže byť ovplyvnená ako genetickými, tak aj environmentálnymi faktormi. Zistilo sa, že genetická výbava, najmä u dojčiat s familiárnym výskytom celiakie nesúcich haplotypy HLA-DQ2, ovplyvňuje skoré zloženie črevnej mikrobioty (Lionetti et al., 2014). To naznačuje, že genotyp náchylný k vzniku ochorenia môže ovplyvniť výber počiatočných kolonizátorov čreva a prispieť k riziku vzniku ochorenia postupom času. Črevná dysbióza taktiež môže podporovaním tvorby toxických a imunogénnych peptidov z lepku prostredníctvom proteolytických aktivít intestinálnych enzýmov prispievať k rozvoju celiakie. Okrem toho môže

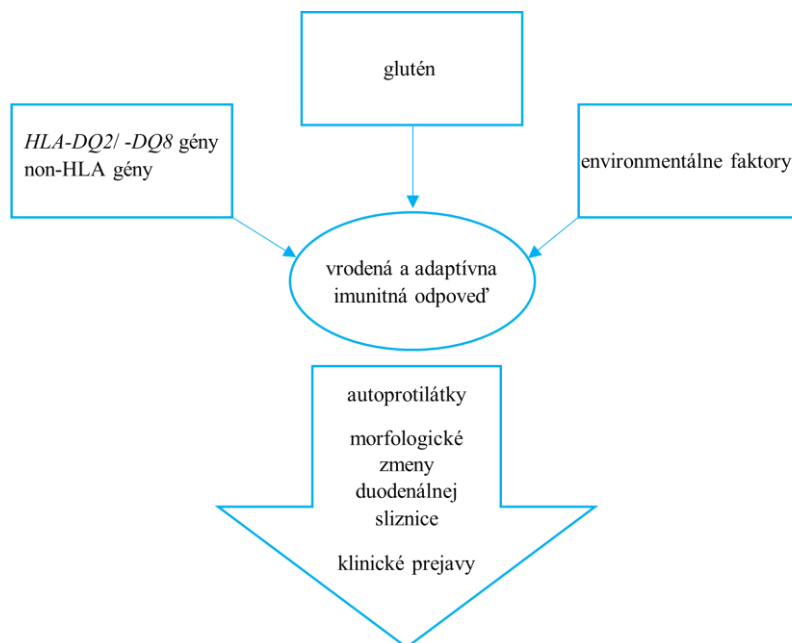


ovplyvniť interakcie nositeľ-mikroorganizmus a tým potenciálne ovplyvňovať funkčnosť a priepustnosť črevnej bariéry a imunitné funkcie zahŕňajúc napríklad reguláciu cytokínovej siete s jej pro- a protizápalovými faktormi. Síce doteraz nebola definovaná dysbióza typická pre pacientov s celiakiou, výskumy naznačujú že mikrobióm môže prispievať k patogenéze a klinickej manifestácii celiakie (Mårild et al., 2015). Pochopenie úlohy dysbiózy v patogenéze celiakie si vyžaduje ďalšie skúmanie jej vplyvu na tvorbu peptidov a ich účinky na črevnú bariéru a imunitný systém (Cenit et al., 2015; Verdu et al., 2015).

Infekcie, obzvlášť gastrointestinálne, ovplyvňujú permeabilitu čreva, čo umožňuje imunogénnym gluténovým peptidom prechádzať cez intestinálnu bariéru. Sú tiež spájané so zvýšeným rizikom rozvoja celiakie (Stene et al., 2006). Prechodu vírusov (najmä rotavírusov, ale i adenovírusov, enterovírusov, vírusov hepatitídy, EBV,...) cez intestinálnu bariéru tiež môžu napomôcť sekvenčné podobnosti medzi vírusovými a gluténovými peptidmi. Vírusové infekcie môžu tiež modifikovať expresie tzv. pattern recognition receptorov (PRR), čo je rozhodujúce pre interakcie hosťiteľ-prostredie. Síce na túto problematiku existuje výskum enterocytov, je ale značne obmedzený. Štúdie s inými bunecnými líniami však tieto poznatky o zmenách expresie PRR poskytujú, napríklad u pediatrickej celiakie boli hlásené prípady, kedy došlo v črevnej mukóze k zmenám génovej expresie toll-like receptorov (TLR) a ich regulátorov (Hernández et al., 2012; Jiang et al., 2008; Mårild et al., 2015; O'Hara et al., 2012). Na pochopenie vplyvu a závislosti medzi mikrobiómom, dysbiózou a infekciami i ich úlohou u celiakie je však potrebný ďalší výskum.

### 1.3.3. Patogenéza celiakie

Ako už zhrnuli predošlé kapitoly, k rozvoju celiakie sú nevyhnutné dva faktory – genetická predispozícia a konzumácia lepku v strave. Súhra týchto faktorov u daného jedinca spustí kaskádu imunopatologických procesov vedúcich k tvorbe autoprotílátok, morfológickým zmenám črevného epitelu a klinickým prejavom, ako intestinálnym tak neintestinálnym (**Schéma 1**). Reakcia je sprevádzaná narušením črevnej bariéry a zvýšenou priepustnosťou duodena pre antigény prítomné v jeho lumen. Patofyziologické dôsledky nie sú limitované len na duodenum, kde dochádza k autoimunitnému zápalu a procesom deštrukcie črevnej sliznice, ale aj extraintestinálne (Koning et al., 2005).



**Schéma 1:** Príčiny a následky celiakie (upravené podľa (Naik et al., 2018))

Celiakia je teda dnes v známa ako systémové ochorenie so široko variabilnými klinickými prejavmi, ktoré sú výsledkom malabsorpcie a/alebo imunologického poškodenia. Medzi klasické črevné príznaky patria chronické alebo periodické hnačky alebo v opačnom prípade zápcha, steatorea (nadmerné množstvo tuku v stolici), chronické bolesti brucha a brušné koliky, nafukovanie, nechutenstvo alebo zvracanie. Medzi časté extraintestinálne prejavy celiakie patrí dermatitis herpetiformis, únava, anémia a celková malnutrícia, osteoporóza či osteopénia a poruchy rozmnožovacej sústavy, v krajných prípadoch vedúce k neplodnosti (Barker & Liu, 2008). U detí potom môže v rámci extraintestinálnych prejavov ďalej dochádzať k poruchám rastu, hmotnostným úbytkom, neskoršou pubertou, defektom zubnej skloviny, poruchám správania a neurologickým problémom (Fasano, 2005).

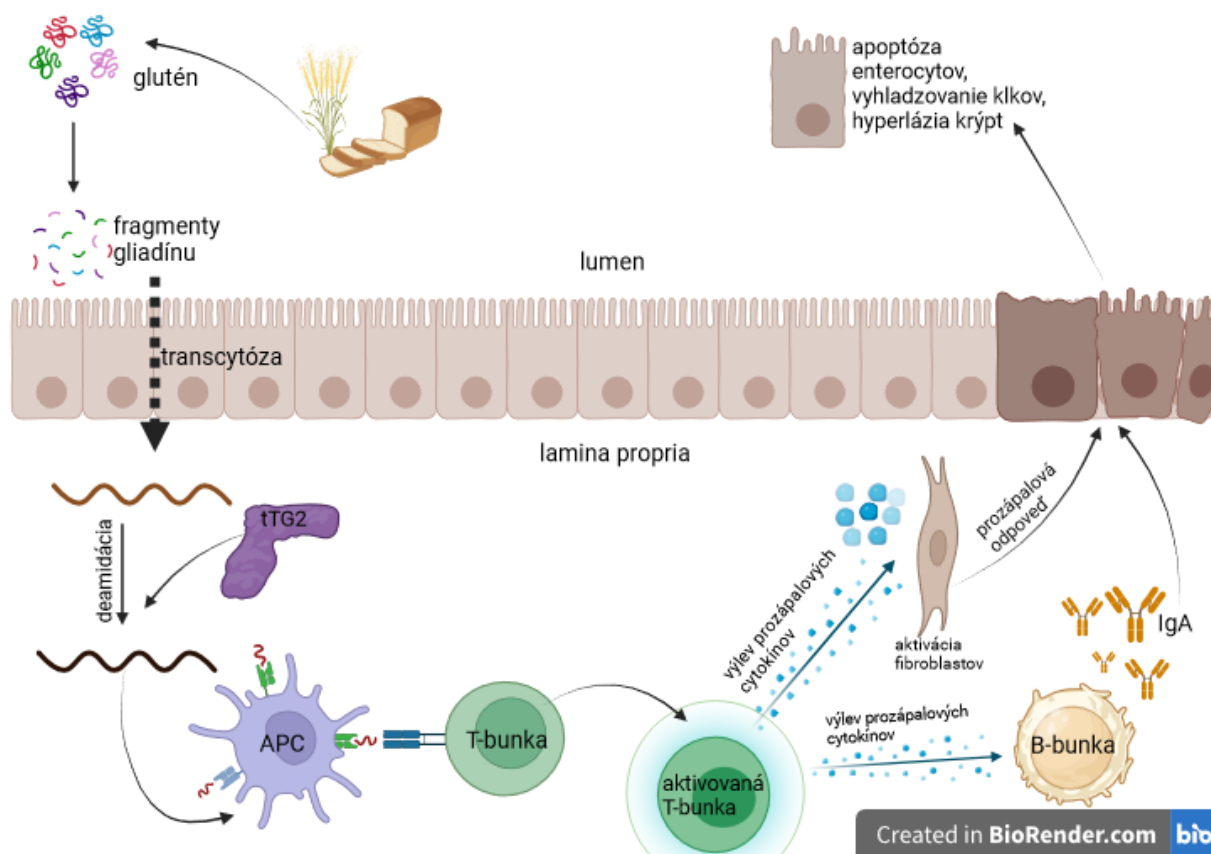
#### 1.3.4. Imunopatogenéza celiakie

Keďže je celiakia autoimunitné ochorenie, rada by som v tejto práci zdôraznila zvlášť v tejto samostatnej kapitole patologické procesy prebiehajúce na imunitnej úrovni špecifickej (adaptívnej) imunity, tak na úrovni nešpecifickej (vrodenej) imunity, a potom sa zamerala na úlohu monocytov.

Toxické a imunogénne gluténové peptidy spúšťajú dve imunopatologické dráhy u celiakie. Prvou je odpoveď nešpecifickej imunity, ktorá vedie k aktivácii zložiek adaptívnej imunity a k priamemu poškodeniu duodenálneho epitelu a druhou je odpoveď adaptívneho imunitného systému, ktorá prebieha v *lamina propria mucosae* duodena .

Keď u celiaka dôjde k požitiu lepku z potravy, v tráviacom trakte dochádza k jeho naštípeniu na kratšie peptidy pomocou gastrointestinálnych peptidáz. Frakcie gluténu, vrátane glutenínu a gliadínu (predominantne jeho 33-méru) sú rozpoznávané ako škodlivé cudzorodé agens APC bunkami v črevnej sliznici. APC spracujú gliadínové peptidy a začnú ich vystavovať na svojom povrchu prostredníctvom HLA-DQ2 a/ alebo HLA-DQ8 molekúl CD4<sup>+</sup> T-lymfocytom. Interakcia

medzi gliadínovými peptidmi naviazanými cez HLA molekuly na APC a  $CD4^+$  T-bunkami vedie k aktivácii T-buniek a uvoľneniu prozápalových cytokínov, ako je interferón-gama ( $IFN\gamma$ ) a interleukín (IL)15, IL17, IL21, IL8 či tumornekrotizujúci faktor alfa ( $TNF\alpha$ ). Tieto cytokíny prispievajú jednak k zápalu, a jednak k povolávaniu ďalších zložiek imunitného systému poškodzujúcich črevnú sliznicu. Okrem toho aktivované T-bunky stimulujú B-bunky k tvorbe protilátok imunoglobulínu A (IgA) a imunoglobulínu G (IgG), cieľiacim na vlastnú tTG2, endomýzium a gliadín. Tvorba týchto protilátok a ich ukladanie v sliznici čreva a krvnej cirkulácii ďalej udržiava a podporuje patologickú imunitnú odpoveď a prispieva k poškodzovaniu črevného tkaniva (Koning et al., 2005). Pre grafické znázornenie popisovanej patologickej reakcie je nižšie priložený **Obrázok 5**.



**Obrázok 5:** Zjednodušená schéma patogenézy celiakie (upravené podľa Kochhar et al., 2016)).

#### 1.3.4.1. Úloha špecifickej imunity v patogenéze celiakie

Ako bolo postupne priblížené v predošlých kapitolách, patogenéza celiakie je silne asociovaná s glutén-špecifickými  $CD4^+$  T-bunkami, ktoré sa k nej prispievajú hneď na niekoľkých úrovniach. Sú schopné proliferovať a diferencovať sa do mnohých bunčných podtypov v závislosti od antigénnej a cytokínovej stimulácie, sú taktiež veľkým producentom prozápalového  $IFN\gamma$ . Tento prozápalový cytokín ďalej podporuje ich diferenciaciu na T-helper 1 bunky (Th1), ktoré podporujú zmenu produkcie triedy imunoglobulínu B-bunkami a prezentáciu HLA, a na Th17 bunky.  $IFN\gamma$  má tiež

tlmivú aktivitu na T-regulačné lymfocyty (Tregs) (Larkin et al., 2013), ktoré zodpovedajú za imunitnú toleranciu, a podporuje diferenciáciu a aktivitu cytotoxických CD8<sup>+</sup> T-lymfocytov (Tau et al., 2001). Cytotoxické T-lymfocyty mimo iné poškodzujú pri celiakii duodenálnu sliznicu. IFN $\gamma$  indukuje uvoľnenie matrixových metaloproteáz a ďalších enzýmov z myofibroblastov v *lamina propria mucosae*, ktoré vedie k deštrukcii medzibunkovej hmoty a remodeláciám intestinálnej sliznice (De Re et al., 2017; Quinn et al., 2015; Roychoudhuri et al., 2013).

Okrem toho majú CD4<sup>+</sup> T-bunky priamy cytotoxický efekt prostredníctvom sekrécie cytotoxických granúl obsahujúcich granzým B a perforín (Takeuchi & Saito, 2017). Dokážu priamo usmrťovať cieľové bunky spôsobom väzby antigénu s HLA molekulami II triedy pri priamom kontakte. Glutén-špecifické CD4<sup>+</sup> T-bunky sa podieľajú aj na indukcii Th2 tak, že poskytujú podporu B-bunkám. Komplexy gliadín-tTG2 sú prostredníctvom B-bunkového receptora (BCR) internalizované a následne sú na povrchu týchto B-buniek prezentované gliadínové peptidy vo väzbe na HLA molekuly (Abadie & Jabri, 2015; Fleckenstein et al., 2004). Týmto spôsobom je gliadín opäť prezentovaný CD4<sup>+</sup> T-bunkám, to vedie k zosilneniu T-bunečnej odpovede. Dochádza k aktivácii B-buniek, ktoré začnú klonálne expandovať a diferencovať sa do plazmatických buniek, ktoré následne produkujú IgA a IgG protilátky smerujúce proti vlastnej tTG. Dochádza i k tvorbe autoprotilátok namierených proti endomýziu a samotnému gliadínu (Sollid et al., 1997).

Podľa pozorovaní môžu anti-tTG2 protilátky narúšať angiogézu a vaskulárnu permeabilitu, negatívne ovplyvňovať proliferáciu a diferenciáciu enterocytov, modulovať funkciu a permeabilitu intestinálnej bariéry, čím dochádza k väčšiemu množstvu vtoku gliadínu prenikajúceho do *lamina propria mucosae* (Zdroj 5). V každom prípade sa ale prítomnosť IgA protilátok proti tTG2 (a endomýziu) začala využívať ako spoľahlivá diagnostická metóda, ktorá dnes predstavuje zlatý štandard v neinvazívnej diagnostike celiakie. Najčastejšie stanovovanými protilátkami sú anti-tTG2 IgA a endomyziálne (EMA) IgA protilátky. Špecifickosť týchto testov je pomerne vysoká, pohybuje sa od 90 % do 98 %, čo znamená, že presne identifikujú jedincov bez celiakie, ale citlivosť (schopnosť testu správne identifikovať jedincov s celiakiou) týchto testov sa však môže líšiť. Pre anti-tTG2 IgA sa citlivosť pohybuje od 80 % do 95 % a pre EMA IgA je ešte vyššia, od 90 % do 98 % (Rostom et al., 2005).

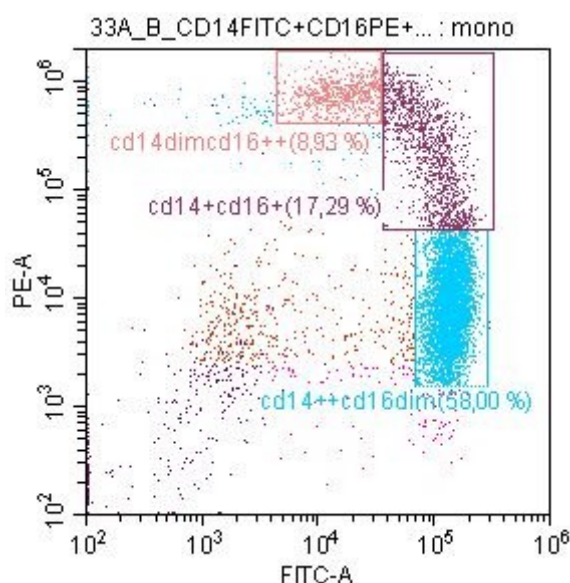
#### 1.3.4.2. Úloha nešpecifickej imunity v patogenéze celiakie

Vrodená imunita tvorí prvú, rýchlu a nešpecifickú líniu obrany tela pred patogénmi a cudzorodými látkami. Je nevyhnutná pre udržiavanie homeostázy a prevenciu infekcií. Hlavné funkcie nešpecifickej imunity zabezpečujú jej efektorové bunky (medzi ktoré patria monocyty, makrofágy, dendritické bunky (DC), neutrofily, a natural killer bunky) a zahŕňajú rozpoznávanie patogénov, fagocytózu, iniciáciu zápalových procesov, aktiváciu komplementu a bariérovú ochranu. Vrodená imunita taktiež hrá kľúčovú úlohu pri iniciovaní imunitnej odpovede v spolupráci so zložkami adaptívnej imunity (Beutler, 2004).

Pre celkové pochopenie celiakie je nevyhnutné dôkladne preskúmať úlohu vrodeneho imunitného systému v patogenéze tohto ochorenia, najmä v jeho indukčnej a efektorovej fáze. Vrodená imunita sa v kontexte celiakie zapája do dvoch zásadných procesov: na jednej strane pôsobí ako spúšťač, ktorý sa podieľa na strate tolerancie voči gluténu, zároveň však pôsobí ako faktor, ktorý aktivuje tzv. bunky s prirodzenou schopnosťou zabíjať. V rámci tenkého čreva tak prebiehajú dynamické vzájomné interakcie medzi zložkami vrodeneho imunitného systému vrátane cytokínov a APC buniek, mikrobiómom, epitelovými bunkami čreva a intraepiteliálnymi lymfocytmi (Kim et al., 2015).

#### 1.3.4.3. Monocyty ako základná zložka nešpecifickej imunity v patogenéze celiakie

Monocyty, základná zložka nešpecifického imunitného systému, pochádzajú z myelomonocytových kmeňových buniek z kostnej drene. Postupne potom monoblasty, odvodené z týchto myelomových buniek, dozrievajú v monocyty. Zrelé monocyty prechádzajú do krvného obehu, kde cirkulujú 1 - 3 dni pred svojou migráciou do rôznych tkanív, kde sa ďalej diferencujú a špecializujú ako makrofágy (Ziegler-Heitbrock, 2000). Ziegler-Heitbrock navrhol na definíciu krvných monocytov použitie protilátok CD14 a CD16. Použitím týchto markerov je možné identifikovať dve „hlavné“, odlišné, populácie monocytov. Jedna populácia pozostáva zo silne CD14-pozitívnych monocytov (označovaných ako klasické monocyty alebo CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> monocyty), zatiaľ čo minoritnú populáciu tvoria CD16-pozitívne monocyty, ktoré exprimujú CD14 na nižšej úrovni (známe ako neklasické CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocyty). Následne bola ešte popísaná tretia skupina takzvaných intermediárnych monocytov, ktorá exprimuje relatívne vyššie hladiny CD14 spojené s nižšou expresiou CD16 (označovaná ako CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) (**Obrázok 6**).



**Obrázok 6:** Znáznornenie zastúpenia jednotlivých populácií monocytov z periférnej krvi pomocou prietokovej cytometrie, ružová – populácia neklasických monocytov, fialová – populácia

*intermediárnych monocytov, svetlomodrá – populácia klasických monocytov. Poznámka: autorka používa iný formát označovania populácií monocytov než Ziegler-Heitbrock.*

Nielen klasické monocyty, ale aj neklasické monocyty môžu fungovať ako prekursori dendritických buniek, ktoré slúžia ako hlavná spojka medzi vrodenným a adaptívnym imunitným systémom práve vďaka svojej schopnosti spracovať antigénny materiál a prezentovať ho na svojom bunkovom povrchu (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Pokiaľ ide pri skúmaní populácie monocytov pomocou prietokovej cytometrie o vylúčenie ďalších buniek, ktoré by mohli na povrchu exprimovať CD14 alebo CD16, ako sú napríklad natural killer bunky (NK), výsledky možno zlepšiť pridaním anti-HLA-DR ku kombinácii protilátok CD14 a CD16. Pri analýze plnej krvi pridanie tejto protilátky taktiež vylúči DR-negatívne, CD16-pozitívne granulocyty (Ziegler-Heitbrock, 2000).

Prevládajúcou podskupinou monocytov sú klasické monocyty (u zdravých jedincov tvoria okolo 80 – 90 % z celkovej populácie monocytov), ktoré hrajú kľúčovú úlohu ako tzv. „scavengerové“ - vychytávacie bunky. Intermediárne a neklasické monocyty sú spájané s prozápalovým fenotypom v dôsledku ich mobilizácie počas chorobných stavov a ich schopnosti vylučovať kľúčové zápalové cytokíny, ako sú napríklad  $\text{INF}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  a  $\text{IL1}\beta$  (Belge et al., 2002; Frankenberger et al., 1996). Taktiež bolo *in vivo* štúdiu skúmajúcej stimuláciu klasických monocytov faktorom stimulujúcim kolónie makrofágov (M-CSF) preukázané, že po stimulácii M-CSF dochádza k počiatkovej expanzii intermediárnych monocytov v krvnom obeh, po ktorej nasleduje zvýšenie frekvencie neklasických monocytov (Korkosz et al., 2012).

Rozpoznávanie patogénnych agens prebieha prostredníctvom Toll-like receptorov (TLRs), čo sú proteíny rozpoznávajúce molekulárne vzory spojené s patogénmi (PAMPs). Sú hojne exprimované na monocytoch, makrofágoch, ale aj dendritických bunkách a neutrofiloch, ale môžeme ich nájsť aj na fibroblastoch či epiteliálnych bunkách. Ako zhrnuli vo svojom review Kawasaki a Kawai, ľudské monocyty exprimujú rad Toll-like receptorov, čo im umožňuje rozpoznanie rôznych PAMPs a iniciáciu imunitných reakcií proti rôznym patogénom vrátane baktérií, vírusov, húb a parazitov. Aktiváciou TLRs dochádza k spusteniu signálnej kaskády, ktorá vedie k produkcii cytokínov a imunomediátorov, podporujúcich zápalové procesy a nábor ďalších buniek imunitného systému. TLRs majú rôzne rozpoznávacie schopnosti, napríklad TLR4 identifikuje lipopolysacharidy (LPS) gramnegatívnych baktérií, TLR2 a TLR1 tvoria heterodiméry, ktoré rozpoznávajú bakteriálne lipoproteíny a peptidoglykány, TLR6 tvorí tiež heterodiméry s TLR2, pričom rozpoznáva diacylované lipoproteíny a TLR9 rozpoznáva nemetylované motívy CpG DNA bežne sa vyskytujúce v bakteriálnej a vírusovej DNA (Kawasaki & Kawai, 2014).

Keď monocyty identifikujú patogén pomocou svojich PRRs alebo sa stretnú s poškodeným tkanivom, môžu sa diferencovať na makrofágy alebo dendritické bunky. V nadväznosti na stretnutie s patogénom alebo poškodeným tkanivom tiež monocyty začnú produkovať cytokíny, ktoré môžu podporovať zápal a aktivovať iné imunitné bunky (**Schéma 2**). Monocyty sú schopné produkovať viacero prozápalových cytokínov, mimo iné TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 či IL8. Tieto cytokíny hrajú dôležitú úlohu v imunitných odpovediach a zápaloch. TNF $\alpha$  sa podieľa na podpore zápalu a aktivácii imunitných buniek (Cinova et al., 2007; Jelínková et al., 2004). IL1 $\beta$  je silný prozápalový cytokín, ktorý stimuluje imunitnú odpoveď (Palová-Jelínková et al., 2013), IL6 hrá úlohu pri regulácii imunitnej a zápalovej odpovede (Larkin et al., 2013) a IL8 je chemokín, ktorý atrahuje a aktivuje najmä neutrofile do miesta zápalu (Mukaida et al., 1998). Týmto spôsobom pôsobia monocyty ako základná zložka vrodenej imunitnej odpovede, ktorá poskytuje prvú líniu obrany proti patogénnym agens.



**Schéma 2:** Kaskáda signalizácie a patologického imunitného procesu na úrovni monocytov

Monocyty zohrávajú dôležitú úlohu v autoimunitných ochoreniach, ako je napríklad reumatoidná artritída, systémový lupus erythematosus alebo celiakia, kde prispievajú k tvorbe autoprotílátok a pretrvávajúcemu zápalu (Ma et al., 2019).

Predošlé výskumy ukázali, že gliadín môže viesť k upregulácii TLR2 a TLR4 u pacientov s celiakiou: napríklad štúdia publikovaná v časopise PLOS One od českých kolegov z Mikrobiologického ústavu AV ČR zistila, že pepsínom natrávená frakcia pšeničného gliadínu zvýšila expresiu TLR4 u pacientov s celiakiou, čo viedlo k produkcii IL-1 $\beta$  (Palová-Jelínková et al., 2013). Štúdia ďalej uvádza, že tento súbor pacientov s celiakiou vykazuje v sére vyššiu prevalenciu krvných dendritických buniek a monocytov pozitívnych na TLR2 a TLR4 v porovnaní so zdravými kontrolami. Ďalšie štúdie naznačujú, že gliadínové peptidy môžu ovplyvniť produkciu prozápalových cytokínov prostredníctvom dráh závislých od TLR, čo naznačuje potenciálnu úlohu TLR2 a TLR4 v imunopatogenéze celiakie (Serena et al., 2019). Na duodenálnych preparátoch z biopsií detí s celiakiou bolo preukázané, že expresia mRNA pre TLR2, TLR4 (a TLR3) bola zvýšená oproti

zdravým jedincom, a u detí so stabilizovanou celiakiou bola expresia týchto povrchových molekúl vyššia, než u detí s neliečenou celiakiou (Szebeni et al., 2007). Výsledky týchto štúdií zdôrazňujú prepojenie medzi stimuláciou imunitného systému celiakov gliadínom a upreguláciou TLR2 a TLR4, čo prispieva k lepšiemu pochopeniu zápalovej aktivácie imunitného systému pri celiakii. Makrofágy pacientov s celiakiou taktiež vykazujú väčšiu schopnosť prezentovať antigény, a to zvýšením expresie kostimulačných molekúl CD80, CD86 a CD40, čo sa v konečnom dôsledku prejaví aj aktívnejším stavom ich T lymfocytov (Molaaghaee-Rouzbahani et al., 2022).

Aktiváciou týchto receptorov dochádza mimo iné k zvýšeniu produkcie prozápalových cytokínov, ako sú napríklad TNF $\alpha$  a IL6. Monocyty taktiež produkujú prolaktín, ktorý u autoimunitných ochorení stimuluje priebeh imunitnej reakcie (De Bellis et al., 2005) a podporuje ďalšiu produkciu cytokínov, ako sú TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL10 a IL12, čomu sa už v minulosti v kontexte celiakie venoval tím nášho laboratória (Brynychova et al., 2016b; Němečková, 2010). Iná štúdia kolegov z AV ČR skúmala moduláciu podskupín makrofágov v patogenéze celiakie a zistila, že makrofágy izolované od pacientov s celiakiou výraznejšie reagovali na gliadínové peptidy v porovnaní s makrofágmi zdravých jedincov. Pri tejto reakcii bolo zároveň pozorované zvýšenie produkcie prozápalových cytokínov IL8 a TNF $\alpha$  (Cinova et al., 2007).

Niekoľko ďalších *in vitro* štúdií taktiež preukázalo, že je možné aktivovať monocyty pridaním frakcií gliadínu, čo vedie k produkcii už vyššie spomenutých TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 a IL8 cytokínov a iných zápalových mediátorov (Tučková et al., 2000; Tučková et al., 2002; Jelínková et al., 2004; Cinová et al., 2007), čo pravdepodobne prispieva k poškodeniu a zápalu v črevnej sliznici u pacientov s celiakiou.



## 2. Hypotézy a cieľ práce

Cieľom tejto práce bolo overiť na molekulárnej úrovni či na vybraný vyšľachtený kultivar ovsu pacienti so stabilizovanou celiakiou zareagujú zmenou expresie vybraných povrchových markerov a produkciou zápalových cytokínov na úrovni vrodenej imunity. Na základe poznatkov z doterajších štúdií boli formulované nasledujúce predpoklady:

- Vybrané kultivary ovsu majú vďaka nízkemu obsahu Pro pre väčšinu celiakov nízky imunoreaktívny potenciál a jeho konzumácia u stabilizovaných celiakov nie vo väčšine prípadov spájaná so zmenami sérových autoprotílátok či prozápalových markerov
- Frakcie prolamínov sú schopné aktivovať zložky vrodenej i získanej imunity celiakov
- Imunitná dysbalancia vedie k zvýšeniu expresie ako povrchových molekúl (TLR2, TLR4, CD80, CD86), tak k zvýšeniu produkcie prozápalových cytokínov (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL8...) bunkami vrodeneho imunitného systému

Na základe doterajších poznatkov boli teda formulované ciele práce:

- Porovnať zmeny mRNA expresie vybraných markerov produkovaných CD14<sup>+</sup> monocytmi – TLR2, TLR4, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL8 – pred a po diétnej intervencii
- Zhodnotiť počty leukocytov u pacientov so stabilizovanou celiakiou a porovnať zmeny v počte leukocytov (monocytov a lymfocytov) s vybranými povrchovými antigénmi – TLR2, TLR4, HLA-DR, CD80, CD86 – pred a po diétnej intervencii

### 3. Materiály a metódy

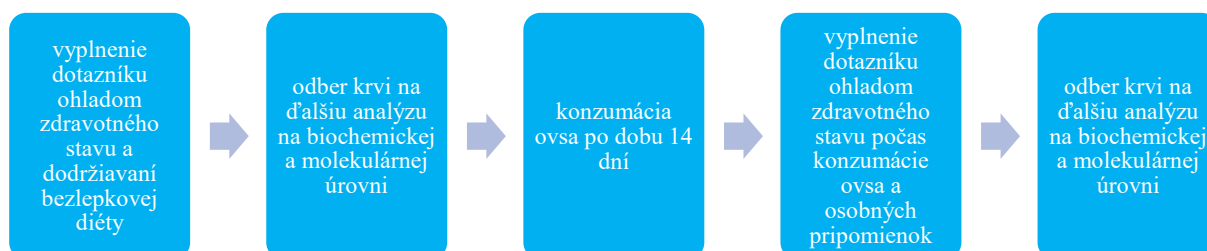
#### 3.1. Ovos

Súčasná úroveň vedeckého poznania umožňuje v rámci bezpečkovej diéty u jedincov so stabilizovanou celiakiou konzumovať tzv. „bezpečkový ovos“, čo je čistý ovos, ktorý nie je kontaminovaný ostatnými lepok obsahujúcimi obilninami akými sú pšenica, jačmeň a raž.

V šľachtiteľskej stanici špecializovanej na šľachtenie ovsa (Selgen, a. s. v Krukaniciach) boli vypestované odrody ovsa s nízkou „celiakálnou reaktivitou“ - majúce obsah gluténu v koncentrácii, ktorá nepresahuje 20 mg/kg. Jedná sa o odrody: Ovos siaty (*Avena sativa L.*) konkrétne dve odrody: SG-K 16370 a Azur a ďalej o Ovos bezduchý (*Avena nuda L.*) a jeho dve odrody Saul a Hynek. Z uvedených odrôd bola vybraná tá s najnižším detekčným obsahom gluténu, ideálne pod jeho detekčným limitom. Zo zrn tejto odrody boli vo Výskumnom ústave rastlinnej výroby (VÚRV) pripravené celozrnné ovsené vločky pomocou laboratórneho vložkovača a splnenie legislatívneho limitu pre bezpečkovú potravinu – teda obsah gluténu pod 20 mg/kg ovsených vločiek - bolo u týchto vločiek overené v akreditovanom laboratóriu (VÚPP, Praha). Ovsené vločky boli následne vákuovo zabalené podľa jednotlivých denných porcií (50 g) zvlášť pre každého respondenta (14 balíčkov, celkom 700 g vločiek). Rozporciované vločky boli do začiatku štúdie skladované v papierovej krabici v sklade VÚRV pri 6 °C. Vo Fakultnej nemocnici Kráľovské Vinohrady (FNKV) boli vločky skladované v suchej miestnosti pri izbovej teplote na II. Internej klinike FNKV.

#### 3.2. Darcovia biologického materiálu

Pre účely tejto diplomovej práce bolo vybraných 39 pacientov (4 muži a 35 žien) v priemernom veku 41 rokov (min. 20 rokov, max. 77 rokov), ktorí sú dlhodobo sledovaní v ambulancii pre celiakiu II. Internej kliniky FNKV, a u ktorých je dlhodobo dokumentovaná remisia celiakie (minimálne 2 roky), a zároveň nemajú alergiu či senzitivitu na ovos. Pacienti konzumovali ovsené vločky v dennej dávke 50 g po dobu 14 po sebe nasledujúcich dní. Vločky boli konzumované buď za surova s prípadným dochutením jogurtom, mlieka, či ovocia alebo v podobe povarenej ovsenej kaše. Pred začatím konzumácie ovsa a po jej skončení bol v ambulancii pre celiakiu II. Internej kliniky FNKV hodnotený klinický stav účastníkov štúdie prostredníctvom osobného dotazníku a následne vykonaný krvný odber na stanovenie experimentálnych markerov imunitnej aktivácie. Design štúdie je schématicky znázornený na **Schéme 3**.



### **Schéma 3:** Dizajn štúdie, odberov a spracovania krvného materiálu.

Východiskovým materiálom pre metódy použité v tejto práci bola plná krv získaná od pacientov so stabilizovanou celiakiou. Pacientom boli odobraté 3 vakuety (dve s citrátom sodným proti zrážaniu krvi a jedna bez citrátu sodného) o objeme 8 ml, ktoré boli riadne označené kódovacím systémom „nA“ (n – číslo pridelené pacientovi podľa poradia) pre vzorky odoberané pred začiatkom konzumácie ovsa a „nB“ po skončení užívania ovsa. Pod príslušnými kódovými označeniami boli vzorky ďalej laboratórne i štatisticky spracovávané. Metódy spracovania krvi sú pre účely tejto práce rozdelené na metódy založené na izoláciu CD14<sup>+</sup> monocytov z krvi a štúdium génovej expresie na úrovni mRNA, metódy spracovania krvi na následnú analýzu zmien počtu leukocytov a porovnanie zmien v počte leukocytov s vybranými povrchovými antigénmi, metóda na izoláciu séra z krvi pre izoláciu a analýzu tzv. voľnej DNA (cfDNA) a metódy štatistického spracovania výsledkov.

#### 3.3. Metódy izolácie a spracovania CD14<sup>+</sup> monocytov z krvi a štúdium génovej expresie na úrovni mRNA

Na štúdium génovej expresie na úrovni mRNA boli použité monocyty, ktoré boli vyizolované z periférnej krvi pacientov pomocou imunomagnetickkej separácie. Z týchto monocytov bola následne vyizolovaná RNA, ktorá bola reverzne transkriptázovou reakciou prepísaná do cDNA, a tá bola ďalej použitá pre kvantitatívnu polymerázovú reťazovú reakciu (qPCR) na relatívne kvantitatívne vyhodnotenie expresie mRNA génov pre TLR2, TLR4, TNF $\alpha$ , IL-8 a IL-1 $\beta$ . Ako endogénna kontrola bola použitá mRNA pre fosfoglycerát kinázu 1 (PGK1). Dáta získané prostredníctvom qPCR boli prepočítané na hodnotu 2<sup>-dCt</sup> a štatisticky vyhodnotené pomocou programu GraphPad Prism 8.

##### 3.3.1. Imunomagnetická separácia monocytov

Separácia monocytov z periférnej krvi prebiehala na ľade prostredníctvom imunomagnetických guľôčok Dynabeads™ CD14, ktoré majú na sebe naviazanú protilátku anti-CD14. Vyizolované monocyty boli bezprostredne po izolácii z plnej krvi zlyzované a uchovávané v mrazničke pri – 80 °C. Neskôr bola z lyzátov izolovaná RNA. Kvôli nízkym výťažkom a nízkym hodnotám absorbancie A260/230 bola následne zvolená metóda na purifikáciu vzoriek precipitáciou etanolom, ktorá nepriniesla očakávané zlepšenie, a preto sa ďalej pracovalo s nepurifikovanou RNA. Táto RNA bola prepísaná pomocou reverzne transkriptázovej reakcie do cDNA a následne uchovávaná pri teplote – 20 °C. Protokol použitý k imunomagnetickkej separácii bol nasledovný:

##### Chemikálie:

Dynabeads™ CD14, Invitrogen by ThermoFisher Scientific, USA

Lyzačný roztok (súčasť kitu GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit), Sigma-Aldrich, Nemecko

PBS s pH = 7,4

### Postup:

1. V 50 ml centrifugačnej skúmavke sa zmieša v pomere 1:1 8 ml krvi a vychladené PBS.
2. Na 1 ml krvi sa pridáva do centrifugačnej skúmavky 25 µl magnetických guľôčok Dynabeads.
3. 50 ml centrifugačná skúmavka sa nechá za občasného premiešavania 20 min inkubovať na ľade.
4. Následne sa centrifugačná skúmavka vloží do magnetického stojana, ktorý je tiež vložený do ľadu a nechá sa inkubovať 3 min.
5. Po 3 minútach sa sérologickou pipetou odpipetuje zmes krvi a PBS do Sava.
6. Centrifugačná skúmavka je doliata do 15 ml PBS, krátko a dôkladne sa premieša obsah a centrifugačná skúmavka sa opäť vloží na 3 min do magnetického stojanu.
7. Krok 5. a 6. sa zopakuje ešte 2 × .
8. Je pripravený lyzačný roztok, kedy je 500 µl lyzačného roztoku napipetovaných do 1,7 ml mikroskúmavky a následne pripipetovaných 5 µl Merkptoetanolu.
9. Po poslednom premytí sa odsaje všetka tekutina z 50 ml centrifugačnej skúmavky v magnetickom stojane. Následne sa do nej napipetuje lyzačný roztok a suspenzia sa prepipetuje do mikroskúmavky, ktorá sje ďalej uchovávaná v mrazničke na – 80 °C.

### 3.3.2. Izolácia RNA

RNA bola izolovaná zo zamrazeného lyzátu CD14<sup>+</sup> monocytov. Izolácia bola vykonávaná v laminárnom boxe na kolónkach so silikagelovou membránou, ktoré sú súčasťou vyššie uvedeného izolačného kitu tej istej šarže (GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit). Na silikagelovej membráne bola RNA zachytená a následne bola premývaná premývacími roztokmi. Tým došlo k zbaveniu sa rôznych možných RNA kontaminujúcich látok. RNA bola na konci izolácie uvoľnená z membrány pomocou deionizovanej vody.

### Chemikálie použité na izoláciu RNA:

GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit, Sigma-Aldrich, Nemecko

- premývací roztok 1
- premývací roztok 2

70 % etanol, pripravený nariadením z 96 % etanolu, P-LAB a.s., Praha

Voda z MILLIPORE Gradient systému; Milli-Q

### Postup:

1. Vzorky boli vytiahnuté dostatočne vopred z mrazničky, rozmrazené pri izbovej teplote a následne zvertexované.
2. Bunečný lyzát bol napipetovaný do modrej filtračnej kolonky a tá bola centrifugovaná na 14000 rpm po dobu 2 min.
3. Modrá kolonka bola vyhodенá a do filtrátu pridaných 500 µl chladeného 70 % etanolu, roztok bol následne zvertexovaný.
4. V dvoch opakujúcich sa krokoch bolo na červenú RNA binding kolonku prepipetovaných vždy 500 µl vzniknutého roztoku a centrifugované na 14000 rpm 15 s a následne filtrát odliaty.
5. Do kolonky bolo napipetovaných 500 µl premývacieho roztoku 1 (WASH 1) a centrifugované na 14000 rpm 15 s.
6. Filtrát bol následne odliaty a na kolonku bolo napipetovaných 500 µl premývacieho roztoku 2 (WASH 2), centrifugované na 14000 rpm 15 s.
7. Opakovanie kroku 6. pri 14000 rpm po dobu 2 min.
8. Nakoniec po odstránení filtrátu bola mikroskúmavka s kolonkou ešte raz centrifugovaná na 14000 rpm po dobu 1 min.
9. Kolonka bola prenesená do čistej zbernej mikroskúmavky a bolo pridaných 40 µl Milipore vody, následne prebehla inkubácia pri izbovej teplote po dobu 1 min.
10. Mikroskúmavka bola centrifugovaná na 14000 rpm po dobu 1 min. Vo filtráte bola obsiahnutá RNA, ktorá bola následne zvertexovaná a uchovávaná na ľade. Koncentráciu a čistotu vyizolovanej RNA bola zmeraná na prístroji NanoPhotometer Pearl (Implen).

### 3.3.3. Reverzne transkriptázová PCR

Prostredníctvom reverzne transkriptázovej polymerázovej reťazovej reakcie (RT-PCR) bola vyizolovaná RNA prepísaná do cDNA, ktorá bola ďalej využitá pre qPCR. Príprava RT reakcie prebiehala v laminárnom boxe podľa laboratórne zaužívaného protokolu.

### Chemikálie:

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems by Thermofisher Scientific, USA

- 10× RT pufr
- 25× dNTP Mix (100mM)
- 10× RT náhodné primery
- MultiScribe Reverse Transcriptase (MultiScribe reverzní transkriptáza)

Voda zo systému MILLIPORE Gradient; Milli-Q

### Postup:

1. Všetky komponenty kitu, okrem reverznej transkriptázy, sa nechali roztopiť na ľade, zvertexovať a stočiť.

2. Podľa počtu reakcií bolo pripravené požadované množstvo reakčnej zmesi +2 rezervné reakcie. Uvedené množstvo je na jednu reakciu:

10× RT pufr ..... 2 µl  
25× dNTP mix ..... 0,8 µl  
10× RT náhodné primery ..... 2 µl  
Reverzná transkriptáza ..... 1 µl  
Milipore H<sub>2</sub>O ..... 4,2 µl

3. Po namiešaní reakčnej zmesi bola reakčná zmes udržiavaná na ľade.
4. Do 200 µl mikroskúmaviek bolo napipetovaných 10 µl reakčnej zmesi.
5. Zmes bola doplnená vodou a príslušnou RNA tak, aby výsledný objem reakcie bol 20 µl a obsah RNA 20 ng.
6. Mikroskúmvky boli krátko centrifugované a následne vložené do Professional Thermocycleru (Biometra, An Analytik Jena Company), kde bol nastavený program:
  1. krok (hybridizácia s primermi) ..... 10 min / 25 °C
  2. krok (predlžovanie vlákna) ..... 120 min / 37 °C
  3. krok (denaturácia enzýmov) ..... 5 s / 85 °C
7. Po skončení programu bola prepísaná cDNA uchovávaná v mrazničke pri – 20 °C.

### 3.3.4. Kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (qPCR)

Kvantitatívna PCR (qPCR) využíva TaqMan® sondy na stanovenie množstva templátu cDNA v reálnom čase. Tieto sondy sú navrhnuté tak, aby sa viazali na špecifickú sekvenciu DNA. Počas qPCR, keď sa sonda naviaže na cieľovú sekvenciu, dochádza k štiepeniu DNA polymerázou, kedy sa reportér z 5' konca sondy dostáva z dosahu zhášača, ktorý je na 3' konci. Tým reportér prestane byť zhášaný a začne svietiť. Intenzita fluorescencie je zaznamenávaná LED lampou zabudovanou v špeciálnych cykléroch. Signál z lampy je prevádzaný do amplifikačných kriviek pomocou softvéru. Nárast fluorescenčného signálu v exponenciálnej fáze je priamo úmerný počtu kópií vstupného materiálu, teda našej cDNA.

Výstupom z qPCR pre každú vzorku, ktorú sme robili v technických tripletoch, sú hodnoty Ct. Tie udávajú PCR cyklus, v ktorom fluorescencia amplifikovaného templátu prekročí prah detekovateľnosti fluorescencie - pre každý sledovaný gén a endogénnu kontrolou. Z týchto hodnôt bolo vypočítané priemerné Ct pre danú vzorku. Ďalej sa vypočítala hodnota dCt, ktorá udáva rozdiel expresie medzi sledovaným génom a endogénnou kontrolou v rámci jednej vzorky. Táto vypočítaná hodnota dCt poslúžila ďalej na výpočet  $2^{-dCt}$ , ktorý udáva relatívne množstvo templátu normalizované ku génu pre endogénnu kontrolu v rámci vzorky. Získané údaje vypovedajú o miere expresie jednotlivých sledovaných génov u pacientov pred a po diétnej intervencii ovsom. Tieto

údaje boli štatisticky spracované pomocou programu GraphPad Prism 8 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

Prístroje:

LightCycler® 480 II /384, Roche Applied Science, Švajčiarsko

Chemikálie:

qPCR Probe Mix No-ROX, PCR Biosystems Ltd, Spojené kráľovstvo

TaqMan Gene Expression Assays-on-Demand, Applied Biosystems by Thermofisher Scientific, USA

- PGK1: Hs99999906\_m1
- TLR2: Hs00152932\_m1
- TLR4: Hs00152939\_m1
- TNF $\alpha$ : Hs01113624\_g1
- CXCL8 (IL-8): Hs00174103\_m1
- IL-1 $\beta$ : Hs01555410\_m1

Voda zo systému MILLIPORE Gradient; Milli-Q

Postup:

1. Zmrazená cDNA o objeme 20  $\mu$ l po RT-PCR sa nechala roztopiť pri izbovej teplote a následne bola nariadená 60  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Zriedená cDNA bola uchovávaná v mraziacom stojančeku.
2. qRPC Probe mix sa nechal roztopiť pri izbovej teplote a zmes sondy a primerov pre jednotlivé gény sa roztápala v tme (prikryté alobalom) pri izbovej teplote.
3. Na základe počtu reakcií bolo pripravené potrebné množstvo zmesi master mixu a sondy (+2 rezervné reakcie). Jedna reakčná zmes obsahuje:
  - 7  $\mu$ l Master mix-u
  - 0,7  $\mu$ l príslušnej sondy a primeru
  - 2,3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
4. Na 384 jamkovej doštičke (Lightcycler 480 multi-well Plate 384) bolo vždy do jamky napipetovaných 10  $\mu$ l reakčnej zmesi.
5. Do príslušných jamiek boli pridané 4  $\mu$ l určitej cDNA.
6. Doštička bola prelepená optickou fóliou a následne bola po dobu 2 min centrifugovaná pri 1500 $\times$  g.
7. Zcentrifugovaná doštička bola vložená do prístroja LightCycler® 480 II /384 od firmy Roche a pomocou inštalovaného software-u bol nastavený protokol podľa nasledujúcich parametrov:
  1. Krok: 2 min pri 50 °C
  2. Krok (hot start): 10 min pri 95 °C
  3. Krok (denaturácia): 15 s pri 95 °C
  4. Krok (hybridizácia, extenzia): 1 min, 60 °C
  5. Krok (chladenie): 30 s, 40 °C

} Kroky 3. a 4. sa opakujú 50  $\times$

Po dokončení reakcie boli pomocou metódy „second derivative maximum“ získané dáta Ct, mean Ct a smerodatná odchýlka, ktoré boli neskôr štatisticky spracované a vyhodnotené v programe GraphPad Prism 8.

### 3.4. Metódy spracovania krvi na následnú analýzu zmien počtu leukocytov a expresie ich povrchových antigénov

#### 3.4.1. Izolácia mononukleárných buniek (PBMCs) z plnej krvi

Izolácia PBMCs bola vykonaná prostredníctvom gradientovej centrifugácie cez Ficoll-Paque. Ficoll-Paque je bezfarebná hustá tekutina, ktorá umožňuje rozvrstvenie krvných elementov na základe ich odlišnej hustoty. Plná krv nariadená PBS je navrstvená na Ficoll-Paque a po polhodinovej centrifugácii pri izbovej teplote sa vytvorí viditeľné rozvrstvenie krvných elementov na vrstvu plazmy, vrstvu mononukleárných buniek (PBMC), pod nimi je Ficoll-Paque a na spodku skúmavky sa držia erytrocyty a granulocyty, ktoré by mali byť prítomné vo forme peliet.

#### Chemikálie:

Ficoll-Paque PLUS, Cytiva Sweden AB, Švédsko

PBS s pH = 7,4

FACS staining pufr = 1 % BSA, 0,01 % azid sodný, PBS

#### Postup:

1. Do vakuet s citrátom sodným sa odobralo 8 ml krvi. Tá bola preliata do 50 ml centrifugačnej skúmavky a vakueta bola potom premytá 8 ml PBS.
2. Zmes krvi zriedenej PBS v pomere 1:1 bola sérologickou pipetou vrstvená na 3 ml Ficoll-u po 4 ml.
3. Centrifugovalo sa na 360 ref pri izbovej teplote 20 °C po dobu 30 minút.
4. Do 50 ml centrifugačnej skúmavky bolo naliatych 5 ml PBS.
5. Po centrifugácii boli pipetou odobraté prstence mononukleárných buniek a prenesené do 50 ml centrifugačnej skúmavky pripravenej v kroku 4. Následne bolo do 50 ml centrifugačnej skúmavky doliate PBS na výsledný objem 20 ml.
6. Následne sa centrifugovalo na 1500 rpm pri izbovej teplote po dobu 10 minút.
7. PBS bolo odliate do Sava, vzniknutá peleta buniek bola jemne zvortexovaná, doplnená o PBS do objemu 20 ml a opäť sa centrifugovalo, tentokrát na 1250 rpm pri izbovej teplote 10 minút.
8. PBS bolo opäť odliate do Sava a následne bol k pelete PBMCs dopipetovaný 1 ml FACS staining pufru. Do mikroskúmavky bolo odobratých 10 µl bunečnej suspenzie a pridaných ešte 40 µl PBS na nariadenie. V Burkerovej komôrke boli pod mikroskopom spočítané monocyty.



9. 50 ml centrifugačné skúmavky s PMBCs a FACS staining pufrom boli udržiavané v chlade až do momentu prípravy preparátov na prietokovú cytometriu.

### 3.4.2. Analýza celkového počtu leukocytov a expresie ich povrchových antigénov prostredníctvom prietokovej cytometrie (FCM)

Prietoková cytometria umožňuje rýchle kvantitatívne a kvalitatívne charakterizovanie veľkých heterogénnych bunčných populácií v suspenzii alebo disociovaných pevných tkanivách. Dokáže merať veľkosti buniek, ich granularitu či expresiu povrchových a intracelulárnych molekúl. Metóda spočíva vo vložení suspenzie buniek do cytometra, pričom tieto bunky veľmi úzkym a rýchlym prietokom pretekajú cez laserový lúč. Rozptyl svetla je detekovaný dvoma optickými detektormi. Jeden detekuje rozptyl svetla pozdĺž dráhy lasera, známy ako priamy rozptyl (FSc) a druhý detekuje rozptyl pod uhlom deväťdesiatich stupňov, inak nazývaný ako bočný rozptyl (SSc). Spoločne tieto dva parametre pomáhajú diferencovať bunky v rámci bunčnej populácie na základe veľkosti a vnútornej zložitosti. FSc rozlišuje bunky podľa veľkosti a SSc poskytuje informácie o vnútornej zložitosti bunky ovplyvnenej organelami, ako sú granule a jadro. V prípade identifikácie kvalitatívnych hodnôt, napríklad povrchových markerov proces zahŕňa značenie buniek fluorescenčnými farbivami alebo protilátkami, ktoré sa viažu na špecifický bunčný povrch. Označené bunky potom opäť prechádzajú cez prietokový cytometer, ktorý využíva laserové svetlo na excitáciu fluorescenčných farbív a detekciu výsledných fluorescenčných signálov a intenzita fluorescenčných signálov je úmerná množstvu cieľového proteínu exprimovaného bunkami.

#### Prístroj:

CytoFLEX S, model B75442, Suzhou Xitogen Biotechnologies Co. , Ltd, Čína

#### Chemikálie:

FACS staining pufr = 1 % BSA, 0,01 % azid sodný, PBS

Fluorescenčne značené protilátky:

Anti-Human CD282 (TLR2) (APC), eBioscience by Thermofisher Scientific, USA

Anti-Human CD284 (TLR4) (APC), eBioscience by Thermofisher Scientific, USA

Anti-Hu CD80 (APC), EXBIO Praha a.s., Česká republika

Anti-Hu CD86 (PerCP), EXBIO Praha a.s., Česká republika

Anti-HLA-DR (FITC), EXBIO Praha a.s., Česká republika

Anti-Hu CD14 (FITC), EXBIO Praha a.s., Česká republika

Anti-Hu CD16 (PE), EXBIO Praha a.s., Česká republika

Conjugated antibody CD14/PE, EXBIO Praha a.s., Česká republika

### Postup:

1. Pre každého pacienta boli pripravené 4 skúmavky značené A – D. Ďalej boli nachystané ďalšie 2 skúmavky na zmes buniek od všetkých pacientov a skúmavky jednofarebne značené (8 ks, jednofarebné kontroly).
2. Do nachystaných skúmaviek pre pacientov bolo napipetovaných  $1 \times 10^6$  buniek v FACS staining pufrí. Zostatok buniek bol rozdelený do dvoch skúmaviek, kde bola zmes buniek od všetkých pacientov, ktorá poslúžila pri optimalizácii nastavenia cytometra.
3. Nachystané skúmavky boli scentrifugované na 1800 rpm po dobu 2 min. Následne bol FACS staining pufr odstrieknutý do výlevky. K zvortexovaným bunkám bol pridaný opäť staining pufr o objeme 100  $\mu$ l a nasledovalo zvortexovanie.
4. Do skúmaviek „A“ bolo odpipetovaných 400  $\mu$ l bunečnej suspenzie a staining pufru. Skúmavky „A“ neboli fluorescenčne značené, pretože slúžia ako neznačená kontrola, a po dobu prípravy ostatných vzoriek boli uchovávané v chladničke. Protilátky na značenie buniek boli najprv jemne zvortexované a následne podľa schémy (viď nižšie) rozpipetované príslušné fluorescenčne značené protilátky v príslušných objemoch do nachystaných označených skúmaviek.

#### **B**

CD14 (FITC) ..... 7  $\mu$ l  
CD16 (PE)..... 4  $\mu$ l  
TLR4 (APC) ..... 3,5  $\mu$ l

#### **C**

CD14 (FITC) ..... 7  $\mu$ l  
CD16 (PE)..... 4  $\mu$ l  
TLR2 (APC) ..... 4  $\mu$ l

#### **D**

CD14 (PE) ..... 5  $\mu$ l  
HLA-DR (FITC) ..... 8  $\mu$ l  
CD80 (APC) ..... 10  $\mu$ l  
CD86 (PerCP) ..... 10  $\mu$ l

5. Nachystané skúmavky s bunkami a fluorescenčne značenými protilátkami boli inkubované po dobu 45min v chladničke prikryté alobalom.
6. Po uplynutí inkubačnej doby boli skúmavky zcentrifugované, FACS staining pufr bol odstrieknutý, nasledovalo zvortexovanie, dopipetovanie staining pufru o objeme 500  $\mu$ l a centrifugácia.
7. Oplachovací krok po odmytí protilátok sa opakoval celkom ešte 3  $\times$ .
8. Po poslednom opláchnutí buniek bolo do všetkých skúmaviek dopipetovaných 400  $\mu$ l staining pufru a vzorky premerané na prístroji CytoFlex S. Výsledky boli vyhodnotené prostredníctvom softvéru CytExpert.

Pri vyhodnocovaní výstupov z prietokovej cytometrie bola použitá nasledovná gate-ovacia stratégia (stratégia založená na ohraničovaní bunečných populácií podľa vybraných parametrov); z východiskového počtu 50 000 udalostí zaznamenaných cytometrom došlo najprv k odstráneniu

mŕtvých a nahlučených buniek tvoriacich duplety, triplety atp. pomocou FSc (plocha)  $\times$  FSc (výška). Zo vzniknutého gate-u tzv. „singletov“ boli ďalej na základe fyzických parametrov (SSc  $\times$  FSc) definované bunecné populácie monocytov a lymfocytov. Monocyty sú väčšie ako lymfocyty a vykazujú FSc vyššej intenzity. Táto charakterizácia leukocytárnych bunecných populácií umožnila ďalšie vyhodnocovanie výsledkov porovnávajúcich zmeny v počtoch monocytov, CD14<sup>+</sup> a CD16<sup>+</sup> značených monocytov či lymfocytov s fluorescenčne značenými povrchovými markermi v návaznosti na 14-dennú konzumáciu ovsa.

### 3.5. Izolácia séra z krvi

Sérum bolo izolované z krvi, ktorá bola odobraná do vakuety bez protizrážanlivých faktorov. Táto krv bude ďalej uchovávaná v mrazničke pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a následne použitá na izoláciu a analýzu cell-free DNA (cfDNA), čo už nie je súčasťou tejto diplomovej práce.

#### Postup:

1. Vakuety so zrazenou krvou boli centrifugované na 1800 rpm pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 10 minút.
2. Sérum bolo odobrané pipetou bez porušenia pelety krvných elementov do mikroskúmaviek o objeme 1,7 ml.
3. Mikroskúmavky s odobratým sérom boli stočené na malej centrifúge na maximálnych otáčkach po dobu 5 min.
4. Všetko sérum od každého pacienta bolo prepipetované bez porušenia pelety do jednej zbernej 15 ml centrifugačnej skúmavky.
5. Následne boli mikroskúmavky o objeme 1,7 ml označené príslušným kódom pacienta, do každej bolo rozalikvotované sérum o objeme 520  $\mu\text{l}$ .
6. Sérum je uchovávané v mrazničke pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.6. Štatistické spracovanie výsledkov

Štatistické spracovanie výsledkov jednotlivých analýz bolo vyhodnotené v programe GraphPad Prism 8. Najprv bola vždy overená normalita dát pomocou 4 testov: Anderson-Darling testom, D'Agostino & Pearson testom, Shapiro-Wilk testom a Kolmogorov-Smirnov testom. Následne boli odstránené odľahlé hodnoty so smerodajnou odchýlkou väčšou než 3. V prípade normálneho parametrického rozloženia dát u oboch skupín (pred diétou i po diéte) boli použité párové t-testy a u neparametrického rozloženia dát bol použitý Wilcoxonov test. U štatisticky významného výsledku je u normálneho rozloženia dát vo výsledkoch uvádzaný priemer a smerodatná odchýlka (SD) a v prípade neparametrického rozloženia dát je uvádzaný medián a interkvartilový rozsah (IQR) s príslušným označením údaju prináležiacemu hodnote pred diétou ako „A“ a po diéte „B“. Hranica štatistickej významnosti bola  $p < 0,05$ .

## 4. Výsledky

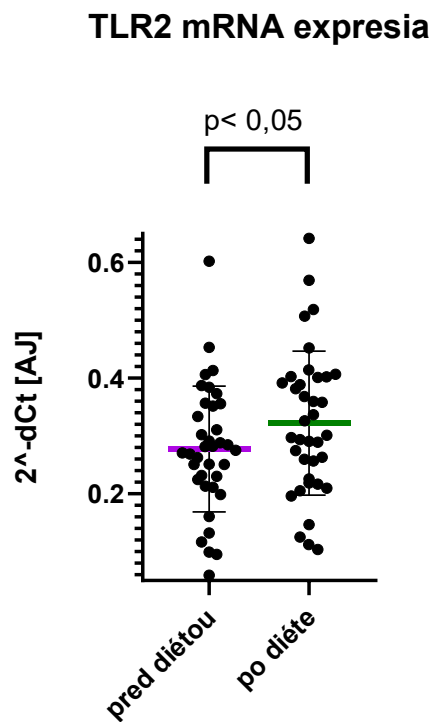
### 4.1. Štúdium zmien génovej expresie na úrovni mRNA

Ct hodnoty získané prostredníctvom kvantitatívnej PCR boli prepočítané na tzv. hodnoty  $2^{-dCt}$ , ktoré boli ďalej štatisticky spracovávané podľa postupu popísaného vyššie (viď 3.6. Štatistické spracovanie výsledkov). Získané výstupy ukazujú prehľad o zmenách génovej expresie vybraných markerov u 37 pacientov, a teda o imunitnom nastavení ich monocytov.

#### 4.1.1. Zmeny expresie mRNA vybraných markerov CD14<sup>+</sup> monocytov po diétnej intervencii

##### Toll-like receptor 2

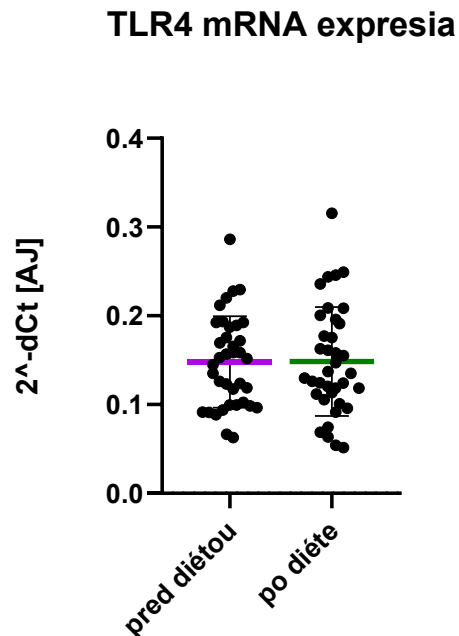
Na porovnanie mRNA expresie TLR2 pred požívaním ovsa a po požívaní ovsa bol použitý párový t-test, ktorým bola zistená zvýšená expresia TLR2 mRNA u pacientov po diéte (priemer A = 0,28 (SD = 0,11), priemer B = 0,32 (SD = 0,12);  $p = 0,028$ ), a to konkrétne  $1,1 \times$  (**Obrázok 7**).



**Obrázok 7:** *Expresia TLR2 mRNA v monocytoch pred diétou (fialová) a po diéte (zelená), čiary rovnobežné s osou x značia priemer, miera signifikancie  $p = 0,0281$ .*

## Toll-like receptor 4

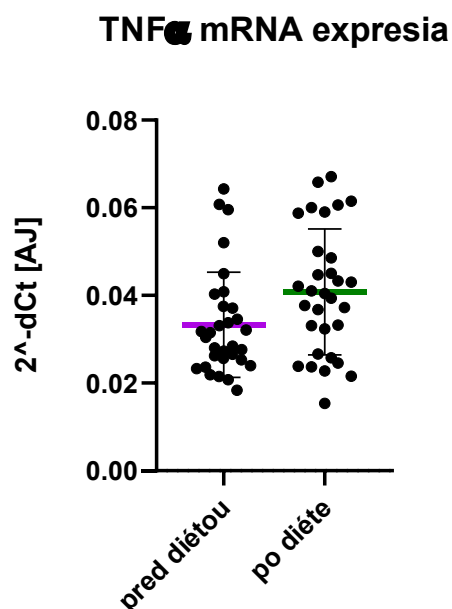
Na porovnanie mRNA expresie TLR4 pred požívaním ovsu a po požívaní ovsu bol použitý párový t-test, ktorým nebola zistená žiadna štatisticky významná zmena gémovej expresie TLR4 mRNA u pacientov po diéte (**Obrázok 8**).



**Obrázok 8:** *Expresia TLR4 mRNA v monocytoch pred diétou (fialová) a po diéte (zelená), čiary rovnobežné s osou x značia priemer, miera signifikancie  $p = 0,9554$ .*

## Tumornekrotizujúci faktor alfa

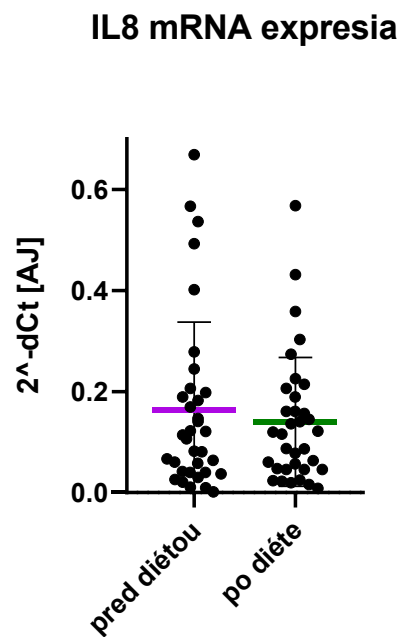
Na porovnanie mRNA expresie TNF $\alpha$  bol použitý Wilcoxonov test. V porovnaní s mierou expresie pred začatím diétnej intervencie sme po jej ukončení detekovali 1,4-násobný, avšak štatisticky nevýznamný, nárast expresie mRNA TNF $\alpha$  (medián A = 0,03 (IQR = 0,01), medián B = 0,04 (IQR = 0,02),  $p = 0,0527$ ) (**Obrázok 9**).



**Obrázok 9:** *Expresia TNF $\alpha$  mRNA v monocytoch pred diétou (fialová) a po diéte (zelená), čiary rovnobežné s osou x značia medián, miera signifikancie  $p = 0,0527$ .*

### Interleukín 8

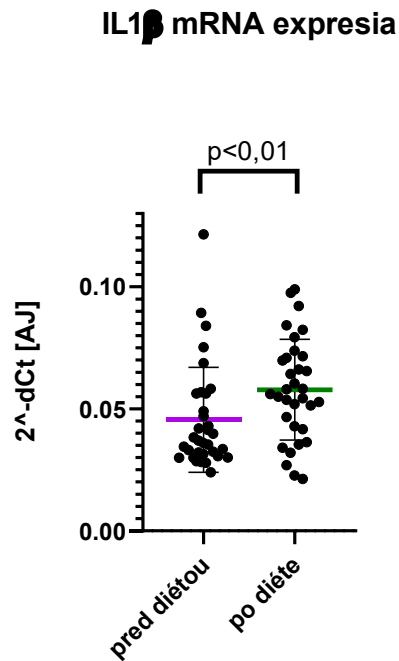
Na porovnanie mRNA expresie IL8 pred požívaním ovsa a po požívaní ovsa bol použitý Wilcoxonov test, ktorým nebola zistená žiadna štatisticky signifikantná zmena expresie IL8 mRNA u pacientov po diéte (**Obrázok 10**).



**Obrázok 10:** *Expresia IL8 mRNA v monocytoch pred diétou (fialová) a po diéte (zelená), čiary rovnobežné s osou x značia medián, miera signifikancie  $p = 0,9596$ .*

## Interleukín 1 beta

Na porovnanie mRNA expresie IL1 $\beta$  pred požívaním ovsa a po požívaní ovsa bol použitý Wilcoxonov test, ktorým bolo zistené štatisticky signifikantné ( $p < 0,01$ ) zvýšenie expresie IL1 $\beta$  mRNA u pacientov po diéte (medián A = 0,04 (IQR = 0,03), medián B = 0,06 (IQR = 0,03),  $p = 0,0052$ ) a to celkom  $1,5 \times$  (Obrázok 11).

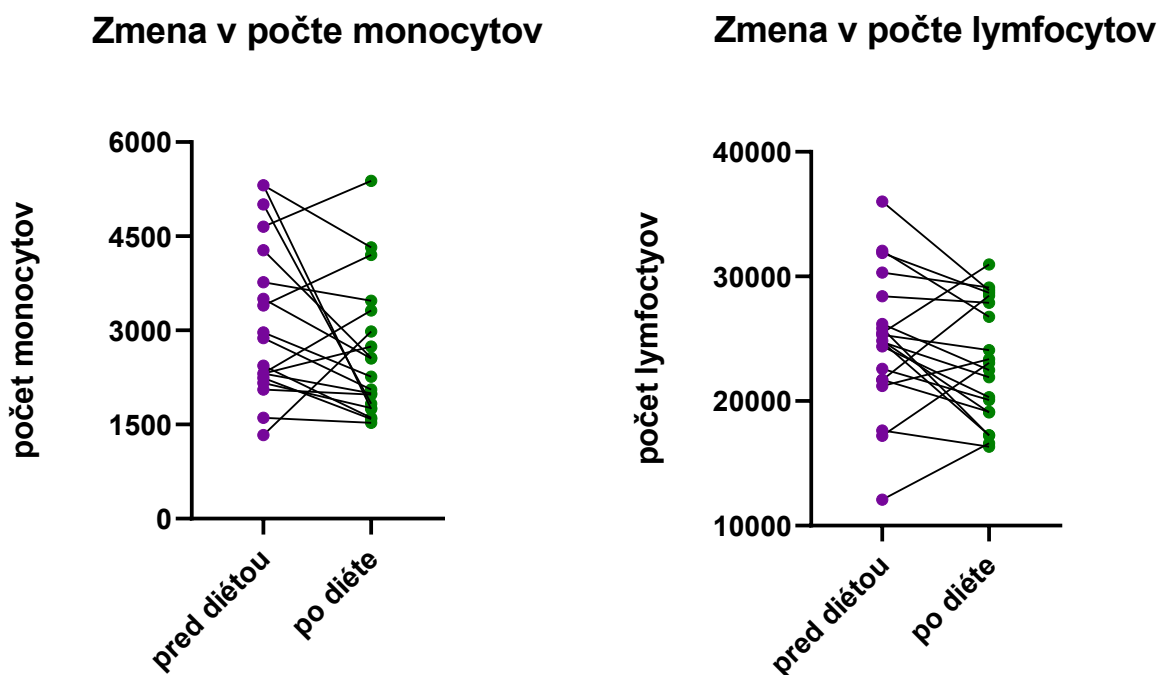


**Obrázok 11:** Expresia IL1 $\beta$  mRNA v monocytoch pred diétou (fialová) a po diéte (zelená), čiary rovnobežné s osou x značia medián, miera signifikancie  $p = 0,0052$ .

## 4.2. Vplyv diétnej intervencie na kvantitatívne a kvalitatívne zmeny leukocytov vrátane exprese ich vybraných povrchových markerov

### 4.2.1. Zmeny v celkovom počte leukocytov

Výstupy získané z prietokovej cytometrie umožnili skúmať absolútne počty a rôzne fenotypy bunecných populácií leukocytov, vrátane monocytov a lymfocytov a ich povrchových antigénov. Dáta z prietokovej cytometrie boli dostupné a vyhodnotené na 20 pároch vzoriek. Na porovnanie zmeny celkového počtu monocytov bol použitý Wilcoxonov test a na porovnanie zmeny počtu lymfocytov bol použitý párový t-test. Celkovo bol po diéte u väčšiny pacientov pozorovaný štatisticky nevýznamný pokles počtu monocytov (medián A = 2876 (IQR = 829), medián B = 2264 (IQR = 1556),  $p = \text{NS}$ ) i lymfocytov (priemer A = 24714 (SD = 5541), priemer B = 23087 (SD = 4788),  $p = \text{NS}$ ) (Obrázok 12) s výnimkou piatich pacientov, ktorí sa odlišujú následne aj u ostatných analýz.

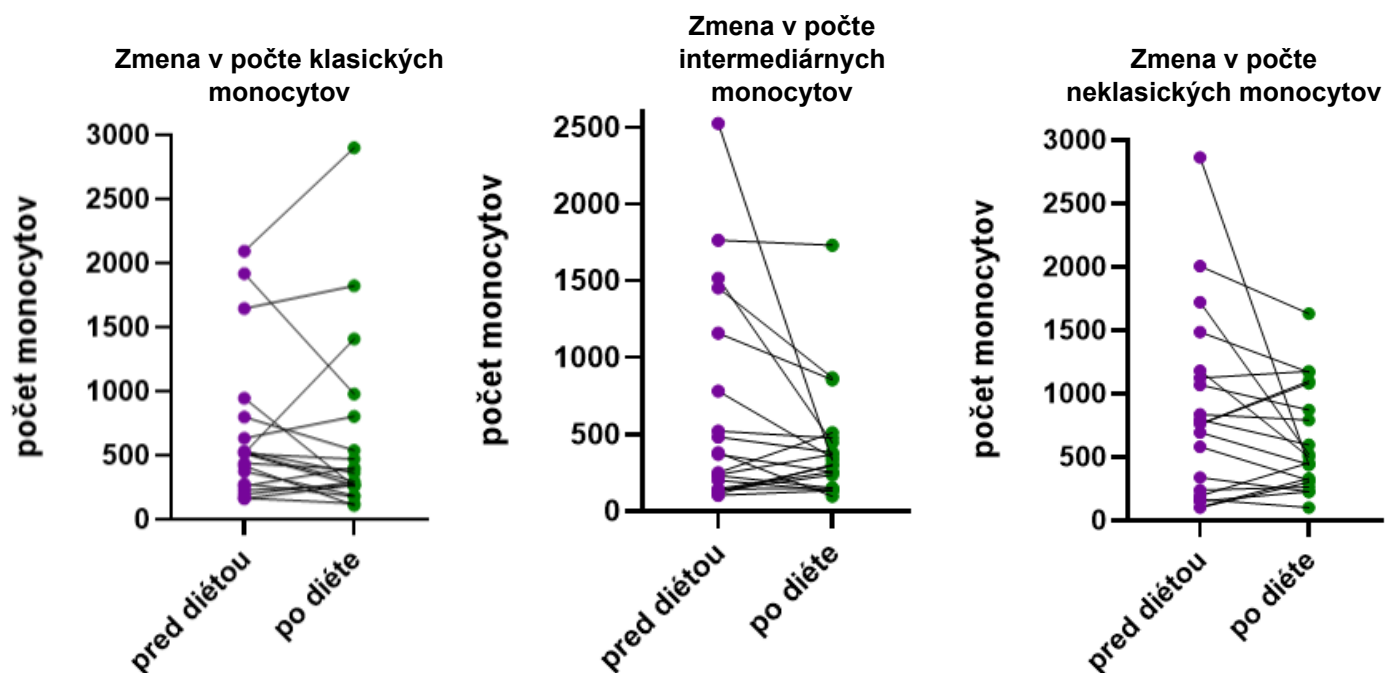


**Obrázok 12:** Zmeny v celkovom počte monocytov ( $p = 0,1232$ ) i lymfocytov ( $p = 0,1248$ ) pred diétou (fialová) a po diéte (zelená). Populácie monocytov a lymfocytov boli definované na základe monocytárneho a lymfocytárneho gate-u pomocou FSc a SSc.



#### 4.2.1.2. Zmeny v rámci monocytárných subpopulácií

V rámci sledovania zmien v počte monocytov na úrovni monocytárných subpopulácií pomocou Wilcoxonovho testu neboli pozorované žiadne významné zmeny (**Obrázok 13**). Znovu sme po diéte pozorovali štatisticky nevýznamný pokles počtu monocytov v rámci každej z monocytárných subpopulácií definovaných na základe prítomnosti CD14 a CD16 povrchových antigénov: klasické monocyty (medián A = 512 (IQR = 492), medián B = 329 (IQR = 477),  $p = \text{NS}$ ); intermediárne monocyty (medián A = 309 (IQR = 921), medián B = 316 (IQR = 297),  $p = \text{NS}$ ); neklasické monocyty (medián A = 759 (IQR = 961), medián B = 478 (IQR = 724),  $p = \text{NS}$ ).



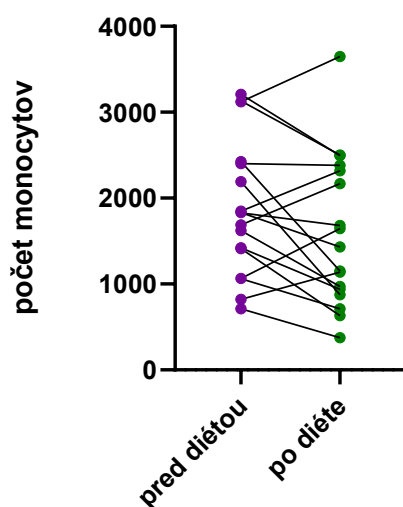
**Obrázok 13:** Zmeny v rámci monocytárných subpopulácií pred diétou (fialová) a po diéte (zelená). Klasické monocyty ( $p = 0,3536$ ), intermediárne monocyty ( $p = 0,2024$ ), neklasické monocyty ( $p = 0,2162$ ).

#### 4.2.2. Zmeny v počte CD14<sup>+</sup> monocytov exprimujúcich vybrané povrchové markery

##### Toll-like receptor 2

Na porovnanie počtu monocytov exprimujúcich na svojom povrchu TLR2 pred požívaním ovsa a po požívaní ovsu bol použitý Wilcoxonov test. Nebol pozorovaný štatisticky významný trend v zmene počtu monocytov vystavujúcich na svojom povrchu tento Toll-like receptor (**Obrázok 14**).

##### Zmeny v počte CD14<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> monocytov

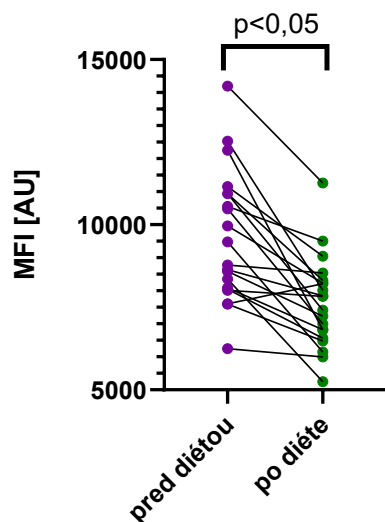


**Obrázok 14:** Zmeny v počte CD14<sup>+</sup> monocytov exprimujúcich na svojom povrchu TLR2 pred diétou (fialová) a po diéte (zelená), miera štatistickej významnosti  $p = 0,4749$ .

## Stredná hodnota intenzity fluorescencie (MFI) pre Toll-like receptor 2

Na zistenie zmien v hodnotách MFI pre TLR2 na povrchu monocytov bol použitý párový t-test, ktorým bola zistená štatisticky signifikantne znížená ( $p < 0,05$ ) miera fluorescencie TLR2 u pacientov po diéte (priemer A = 9350 (SD = 1987), priemer B = 7362 (SD = 1376),  $p = 0,0021$ ), a to konkrétne  $0,8 \times$  (Obrázok 15).

### Zmena MFI TLR2 na povrchu CD14<sup>+</sup> monocytov

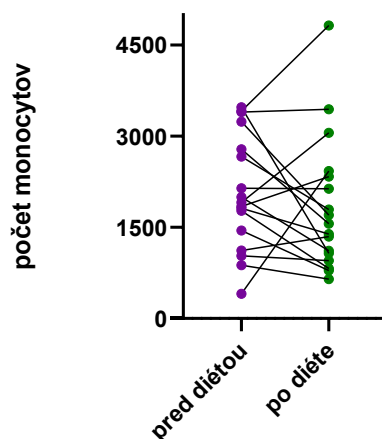


**Obrázok 15:** Zmeny MFI TLR2 na povrchu CD14<sup>+</sup> monocytov pred diétou (fialová) a po diéte (zelená), miera štatistickej významnosti  $p = 0,0021$ .

## Toll-like receptor 4

Na porovnanie počtu monocytov exprimujúcich na svojom povrchu TLR4 pred požívaním ovsu a po požívaní ovsu bol použitý Wilcoxonov test. Znovu nebol pozorovaný žiadny štatisticky významný trend v zmene počtu monocytov vystavujúcich na svojom povrchu tento receptor (Obrázok 16) a ani miera fluorescenčnej intenzity sa po diéte nelíšila (dáta neprezentované).

### Zmeny v počte CD14<sup>+</sup>TLR4<sup>+</sup> monocytov po diéte

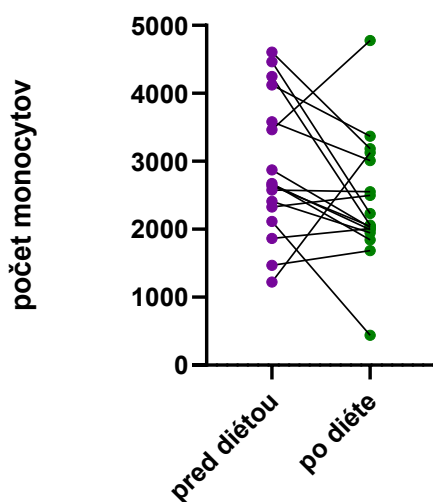


**Obrázok 16:** Zmeny v počte  $CD14^+$  monocytov exprimujúcich na svojom povrchu TLR4 pred diétou (fialová) a po diéte (zelená), miera štatistickej významnosti  $p = 0,3289$ .

### HLA-DR

Na porovnanie počtu monocytov exprimujúcich na svojom povrchu molekuly HLA-DR pred požívaním ovsu a po požívaní ovsu bol použitý Wilcoxonov test. V prípade tohto markeru sa pohybuje na hranici štatistickej významnej zmeny (medián A = 2665 (IQR = 1632), medián B = 2062 (IQR = 1098),  $p = 0,057$ ) v poklese počtu monocytov a to  $1,25 \times$  (**Obrázok 17**).

### Zmena v počte $CD14^+HLA-DR^+$ monocytov

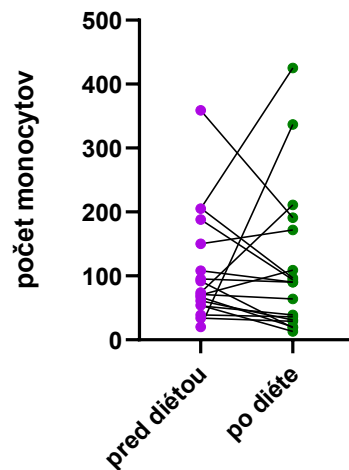


**Obrázok 17:** Zmeny v počte  $CD14^+$  monocytov exprimujúcich na svojom povrchu HLA-DR pred diétou (fialová) a po diéte (zelená), miera štatistickej významnosti  $p = 0,057$ .

## CD80

Na porovnanie počtu monocytov exprimujúcich na svojom povrchu CD80 molekuly pred požívaním ovsu a po požívaní ovsu bol použitý Wilcoxonov test. U tohto markeru nebol pozorovaný žiadny štatisticky významný rozdiel (**Obrázok 18**).

### Zmena v počte CD14<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup> monocytov

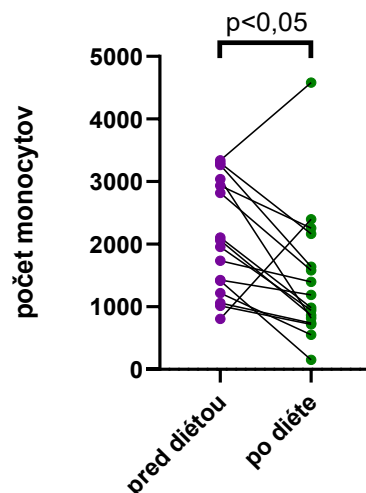


**Obrázok 18:** Zmeny v počte CD14<sup>+</sup> monocytov exprimujúcich na svojom povrchu CD80 pred diétou (fialová) a po diéte (zelená), miera štatistickej významnosti  $p = 0,4109$ .

## CD86

Na porovnanie počtu monocytov exprimujúcich na svojom povrchu CD86 pred požívaním ovsu a po požívaní ovsu bol použitý Wilcoxonov test. U tohto markeru pozorujeme štatisticky významný pokles (medián A = 2009 (IQR = 1748), medián B = 1087 (IQR = 1274),  $p = 0,029$ ) v počte monocytov po diétnej intervencii, konkrétne  $1,85 \times$  (**Obrázok 19**).

### Zmena v počte CD14<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> monocytov



**Obrázok 19:** Zmeny v počte monocytov exprimujúcich na svojom povrchu CD86 pred diétou (fialová) a po diéte (zelená), miera štatistickej významnosti  $p = 0,029$ .

#### 4.2.3. Zmeny v počte lymfocytov exprimujúcich vybrané markery

Analýza zmien v počtoch buniek s vybranými povrchovými markeromí pomocou prietokovej cytometrie umožnila získať dáta nielen o monocytoch, ale aj o lymfocytoch definovaných pomocou FSc a SSc gate-ov a expresie povrchových antigénov. Zozbierané dáta boli u lymfocytárnych populácií HLA-DR<sup>+</sup> alebo CD80<sup>+</sup> vyhodnocované párovým t-testom a u CD86<sup>+</sup> lymfocytárnych populácií pomocou Wilcoxonovho testu. Analýzy týchto dát priniesli štatisticky nevýznamné výsledky, preto boli iba zhrnuté do nasledujúcej tabuľky (**Tabuľka 2**).

**Tabuľka 2:** Zmeny v počte lymfocytov exprimujúcich vybrané povrchové antigény,  $p = NS$ .

<i>Zmeny v počte lymfocytov exprimujúcich vybrané povrchové antigény</i>								
Antigénne markery lymfocytov	Priemer		SD		Medián		IQR	
	pred diétou	po diéte	pred diétou	po diéte	pred diétou	po diéte	pred diétou	po diéte
HLA-DR <sup>+</sup>	318	288	95	54,5	307	299	148	80
CD80 <sup>+</sup>	394	397	244	196	342	351	256	243
CD86 <sup>+</sup>	702	381	765	171	413	370	423	273

## 5. Diskusia

Táto diplomová práca nadväzujúca na klinickú štúdiu Fakultnej nemocnice Kráľovské Vinohrady a Výskumného ústavu rastlinnej výroby mala za úlohu zistiť, či 14-denná konzumácia vybraného kultivaru ovsa aktivuje vrodenu imunitu u pacientov so stabilizovanou celiakiou, a či táto zmena bude detekovateľná na bunkovej a molekulárnej úrovni.

V tejto práci som sa zamerala na: 1) analýzu mRNA expresie vybraných markerov produkovaných CD14<sup>+</sup> monocytmi, ktoré predstavujú základnú zložku vrodenej imunity a produkujú pre svoje fungovanie dôležité PAMPs (TLR2 a TLR4), a prozápalové cytokíny (TNF $\alpha$ , IL8 a IL1 $\beta$ ). Hladiny expresie mRNA týchto markerov sme stanovovali u 37 jedincov, nakoľko z pôvodných 39 boli 2 účastníci zo štúdie vyradení skrz zdravotné problémy (COVID-19) a 2) zmeny v počte a fenotype leukocytov, špecificky monocytov a lymfocytov, a zmeny v expresii ich povrchových molekúl TLR2, TLR4, HLA-DR, CD80, CD86, ktoré boli merané u 20 pacientov, nakoľko u ostatných pacientov nebol materiál v dostatočnej kvalite na použitie pre ďalšie párové analýzy.

Bolo pozorované, že u expresie mRNA pre TLR2 došlo k štatisticky významnému zvýšeniu produkcie tejto mRNA monocytmi po 14-dennej konzumácii ovsa, a to celkom 1,1  $\times$ . Z biologického hľadiska možno toto pozorované zvýšenie expresie mRNA TLR2 hodnotiť ako nevýznamné. Následne bola vyhodnotená aj prítomnosť týchto receptorov na povrchu monocytov po diétnej intervencii. V porovnaní s výsledkami z qPCR analýz sme pomocou FCM u vzoriek po diéte detekovali skôr štatisticky nevýznamný pokles v počte monocytov s týmto povrchovým markerom. Tento nesúlad by mohol byť spôsobený napríklad tým, že síce sa nezmenil počet TLR2<sup>+</sup> monocytov, ale mohlo dôjsť k zvýšeniu množstva TLR2 receptorov na povrchu monocytov. Túto hypotézu sme sa rozhodli overiť pomocou stanovenia hodnôt tzv. strednej fluorescenčnej intenzity (MFI). Tá síce preukázala štatisticky významný pokles TLR2 na monocytoch po diéte, avšak biologický význam ostáva otázný. Ďalším vysvetlením by mohlo byť, že monocyty síce zareagujú na stimul zvýšením produkcie mRNA pre *TLR2* gén, avšak kvôli rôznym post-transkripčným mechanizmom (napr. splicing alebo RNA interferencia) sa nevytvorí adekvátne odpovedajúce množstvo produktu tohto génu, ktorý by následne monocyty vystavovali na svojom povrchu (Carpenter et al., 2014). To ako sa po stimulácii pozápalovými cytokínmi v priebehu času mení mRNA expresia TLR2 a TLR4, bolo stanovované už v minulosti napríklad na myších bunčných líniách makrofágov Matsuguchim a kolektívom (2000). Tí prišli na to, že do 2 hodín po stimulácii týchto makrofágov napríklad tumornekrotizujúcim faktorom alfa či interleukínom 1 $\beta$  dochádza k významnému zvýšeniu produkcie mRNA pre TLR2, ktorá však po 8 hodinách od stimulácie začína ustávať a do 12 h klesá pod bazálnu hladinu (Matsuguchi et al., 2000). My sme však vychádzali z predpokladu, že pokiaľ by avenín z ovsa stimuloval monocytárnu produkciu mRNA TNF $\alpha$  či IL1 $\beta$ , a tieto cytokíny by mali schopnosť ďalej spúšťať produkciu mRNA

TLR2 ako to popisuje Matsuguchi a kolektív, tak by táto reakcia bola *in vivo* do istej miery opozdená, a teda odbery 24 h po poslednej konzumácii ovsa by ju ešte pravdepodobne dokázali zachytiť.

Výsledky analýz týchto mRNA vybraných prozápalových cytokínov poukázali na nasledujúce rozdiely v ich expresii monocytmi po diétnej intervencii: u TNF $\alpha$  bolo pozorované 1,4  $\times$  zvýšenie (na hranici štatistickej významnosti  $p = 0,0527$ ) po konzumácii ovsa a v prípade mRNA expresie IL1 $\beta$  sme pozorovali štatisticky významné zvýšenie produkcie tohto cytokínu a to 1,5  $\times$ . Z biologického hľadiska sa jedná však skôr len o malé zvýšenie produkcie mRNA TNF $\alpha$  a IL1 $\beta$ , čo nemusí korešpondovať s hladinami proteínov, do ktorých sa táto zmena mRNA expresie premietne, a tým ďalej ovplyvňovať expresie mRNA TLR2 či TLR4, ktoré v prípade našich vzoriek po diéte ostali prakticky nezmenené.

Zvýšenie hladín TNF $\alpha$  a IL1 $\beta$  by mohlo byť vysvetlené napríklad zmenou v rámci populácie monocytov, a to zväčšením počtu neklasických monocytov na úkor klasických. Neklasické monocyty sú totiž známe tým, že tvoria zvýšené množstvo práve týchto zápalových cytokínov (Wong et al., 2012). Analýza v počte zastúpení jednotlivých bunčných populácií však toto vysvetlenie nepotvrdila nakoľko v prípade našich monocytov nedošlo k zväčšeniu populácie neklasických monocytov v súvislosti s konzumáciou ovsa a takisto korelačná analýza ukázala nevýznamný, negatívny, vzťah medzi populáciou neklasických monocytov a produkciou IL1 $\beta$  a TNF $\alpha$  po diétnej intervencii (sklon regresnej priamky =  $-817,1$ ; R square hodnota =  $0,01011$ , dáta neprezentované).

U mRNA IL8 nebola pozorovaná žiadna zmena v expresii v náväznosti na konzumáciu ovsa. Tieto výsledky budú overené výstupom analýz VÚRV stanovením sérových hladín tohto prozápalového cytokínu pomocou Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).

Klinická štúdia z roku 2007 ukázala, že mRNA expresia TLR2 a TLR4 buniek duodenálnej sliznice bola u pacientov ako s liečenou, tak neliečenou celiakiou vyššia než u zdravých kontrol. Zároveň bola v biopsiách duodenálnej sliznice u detí so stabilizovanou celiakiou pozorovaná i vyššia expresia mRNA týchto markerov než u neliečených pacientov (Szebeni et al., 2007). Kolegyňa Brynychová a kolektív taktiež zaznamenali trend vyššej expresie mRNA TLR2 u monocytov pacientov s aktívnou celiakiou oproti pacientom, ktorí sú na bezlepkovej diéte. V prípade mRNA expresie TLR4 nebol pozorovaný rozdiel medzi monocytmi z aktívnych pacientov a pacientov na bezlepkovej diéte (Brynychova et al., 2016b). Ciccocioppo a jeho tím tiež zistili, že gliadín spôsobuje významnú upreguláciu hladín mRNA TLR4 (a TLR7, TLR8) v dendritických bunkách odvodených z kostnej drene z HLA-DQ8 transgénnych myší (Ciccocioppo et al., 2008), takže by sme očakávali, že v prípade imunogenicity vybraného kultivaru ovsa by došlo k upregulácii mRNA týchto PRRs. Čo sa týka nami pozorovaných zmien v expresii TLR4 po 14-dennej konzumácii ovsa ako na úrovni mRNA, tak na úrovni povrchovej expresie neboli pozorované žiadne významné zmeny. To by odpovedalo



výsledkom, ktoré získali viaceré tímy zaoberajúce sa skúmaním zmien v súvislosti so stimuláciou tohto Toll-like receptoru pšeničným gliadínom ako na myšiach, tak na ľudských modeloch (Armstrong et al., 2004; Matsuguchi et al., 2000), nakoľko aveníny v ovsí sú menej imunogénne než gliadíny pšenice.

To ako spolu interagujú monocyty, ich PRRs a prozápalové cytokíny bolo popísané už v predošlých kapitolách (1.3.4.3). Český tím z Akadémie vied poukázal na viacerých štúdiách, že monocyty je možné aktivovať pridaním frakcií pšeničného gliadínu, čo vedie k produkcii prozápalových cytokínov ako  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL1}\beta$ ,  $\text{IL8}$  cytokínov a iných zápalových mediátorov (Cinova et al., 2007; Jelínková et al., 2004; Tučková et al., 2002). Zároveň však bolo v teoretickom úvode tejto práce poukázané na zásadné rozdiely medzi imunogenicitou gliadínových a avenínových peptidov.

Celkovo sme po 14-dennej konzumácii ovsá u väčšiny pacientov pozorovali skôr pokles v celkovom počte monocytov (i lymfocytov) zo singlet gate-u. Zároveň klesol aj počet  $\text{CD14}^+$  monocytov, ktoré na svojom povrchu vystavujú nami sledované markery TLR2 a TLR4, HLA-DR, CD80 a CD86. V prípade  $\text{CD14}^+\text{HLA-DR}^+$  monocytov sa ich pokles  $1,25 \times$  pohyboval na hranici štatistickej významnosti ( $p = 0,057$ ) a v prípade  $\text{CD14}^+\text{CD86}^+$  monocytov sa jednalo o štatisticky významný pokles  $1,8 \times$  ( $p = 0,029$ ). Jedná sa opäť však o zanedbateľný biologický význam. Očakávaná by pritom bola opačná reakcia v nadväznosti na 14-dennú konzumáciu ovsá v prípade jeho potenciálnej imunogenicity, pretože podľa recentnej štúdie českého tímu Hudca a kolektívu z roku 2021, dochádza po stimulácii zrelých dendritických buniek odvodených z monocytov celiakov frakciami pšeničného gliadínu naopak k nárastu povrchovej expzie CD86 u týchto buniek (Hudec et al., 2021).

Z testov stanovujúcich hladiny sérového IgA vykonaných vo FNKV vyplynulo, že u žiadneho pacienta nedošlo po 14 dňoch konzumácie ovsá k produkcii týchto autoimunitných protilátok (Príloha 1). Zároveň nám boli poskytnuté výsledky osobných dotazníkov, ktoré účastníci štúdie vyplňali pred vstupom do štúdie, aj po doužívaní ovsá. Dotazník (Príloha 2) hodnotil hlavne subjektívne zdravotné problémy pociťované počas konzumácie ovsá a to najmä nárast či ústup zdravotných problémov po užívaní ovsá na bodovej škále od 0 (žiadne problémy) do 6 (najväčšie problémy).

Ostáva otázne, či je 14 dní dostačujúca doba na to, aby došlo k vzniku imunitnej odpovede na avenín v bezlepkových ovsených vločkách, ktorá by bola detekovateľná pomocou sérových hladín anti-tTG2 IgA protilátok. Na základe predošlých výskumov totiž 14-denná konzumácia určitého množstva pšeničného lepku a následná analýza sérových protilátok nepreukázala zmeny hladín tohto markeru ani po 14, ani po 28 dňoch a ani významné zmeny na duodenálnom tkanive získanom biopsiou (Lähdeaho et al., 2011; Leffler et al., 2013; Sarna et al., 2018). Zároveň neboli detekované významné zmeny v produkcii prozápalových cytokínov ako  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{INF}\gamma$  či fibroblast growth faktor

špecifické pre gluténovú prozápalovú odpoveď. Klinická štúdia Sarnu a kolektívu však preukázala postupné významné zhoršenie intestinálnych príznakov celiakie hlavne zmeny v konzistencii stolice, plynatosti a celkovom subjektívnom pociťovaní (Sarna et al., 2018; Stammaes et al., 2021).

Výsledky dotazníkov (z FNKV) od pacientov, poukazujúce na nárast ťažkostí pri konzumácii ovsa, zaznamenali hlavne prítomnosť pálenia žáhy, nadúvanie, flatulanciu a bolesť v epigastriu, no podľa pacientov samotných sa jednalo iba o minimálnu zmenu (v rozmedzí 0 = žiadne ťažkosti do 3 = stredné ťažkosti (najhoršie ťažkosti = 6)) oproti stavu pred užívaním ovsa. Čo sa týkalo zmien v konzistencii stolice – bola pozorovaná značná variabilita. Zatiaľ čo niektorí pacienti reagovali na konzumáciu ovsa tuhou stolicou či výskytom zácpy, iní mali po ovsených vločkách stolicu redšiu, ale znovu šlo len o minimálne zmeny oproti stavu pred konzumáciou (v rozmedzí 0 = žiadne ťažkosti do 3 = stredné ťažkosti). Väčšina pacientov (~76 %) však hodnotila konzumáciu ovsených vločiek pozitívne ako po kvalitatívnej stránke, tak aj po subjektívnej fyziologickej stránke (ústup bolesti v epigastriu, menej nadúvania, neprítomnosť zácpy a zdravá konzistencia stolice).

Zároveň na predošlých štúdiách zaoberajúcich sa konzumáciou ovsa celiakmi bolo zistené, že iba niektoré kultivary sú imunogénne a výsledné pôsobenie na organizmus pacienta je individuálne (Comino et al., 2011; Comino et al., 2012; Silano et al., 2007, Silano et al., 2014). Ďalšie faktory, ktoré by mohli ovplyvniť reakciu imunitného systému na vybraný kultivar ovsa sú napríklad rôzne iné pridružené autoimunity k celiakii alebo alergije. Je totiž známe, že tieto faktory by mohli ovplyvniť či objasniť niektoré nami pozorované trendy, ako napríklad prečo výsledky analýz tých istých 7 pacientov vychádzajú naopak než u väčšiny (po diéte u nich dochádzalo skôr k veľkému nárastu expresií mRNA a zvyšovaniu počtu leukocytov). Po nahliadnutí do zdravotných záznamov týchto pacientov bola u 5 pacientov zistená liečba hypotyreózy (pri autoimunitnej tyreoidite) a zároveň u 3 pacientov sú záznamy o alergiách na sezónne pely, roztoče či potravinové alergije hlavne na orechy, jablká a marhule; nie je tak možné vylúčiť, že ich atypická reakcia na konzumáciu testovaného kultivaru bezlepkového ovsa bola v dôsledku týchto skutočností.

Z doteraz zozbieraných výsledkov tejto štúdie tak po 14-dennej konzumácii vybraného kultivaru ovsa pozorujeme na molekulárnej úrovni u buniek nešpecifickej imunity len slabú reakciu imunitného systému. S možným biologickým významom bolo detekované iba štatisticky významné, ale len mierne zvýšenie mRNA expresie TNF $\alpha$  a IL1 $\beta$ , a naopak pokles v zastúpení CD14<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> monocytov.

## 6. Záver

V tejto diplomovej práci sme skúmali vrodennú imunitnú odpoveď pacientov so stabilizovanou celiakiou na 14-dennú konzumáciu vybraného bezpečného kultivaru ovsa na bunenej a molekulárnej úrovni. Konkrétne sme sa zamerali na zmeny mRNA expresie vybraných markerov produkovaných CD14<sup>+</sup> monocytmi (TLR2, TLR4, TNF $\alpha$ , IL8, IL1 $\beta$ ) a zmenu v počte leukocytov s vybranými povrchovými molekulami (TLR2, TLR4, HLA-DR, CD80, CD86) pred a po diétnej intervencii.

Zistili sme, že po 14-dennej konzumácii ovsených vločiek vybraného kultivaru došlo len k slabej reakcii imunitného systému, ktorú sme detekovali iba na úrovni mRNA expresie TNF $\alpha$  a IL1 $\beta$ . Tieto zmeny sú však z biologického hľadiska skôr malé. Zdá sa však, že na bunkovej a proteínovej úrovni aktiváciu imunitného systému prostredníctvom zmien v počte či fenotype leukocytov po konzumácii ovsa u pacientov s celiakiou nedetekujeme, až na prípad CD14<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> monocytov, kde bol pozorovaný štatisticky významný pokles v ich počte.

## 7. Zoznam použitých skratiek

APC – antigén prezentujúca bunka

AV ČR – Akadémie vied Českej republiky

BCR – B bunecný receptor

CD (napr. CD14) – diferenciacný antigén

cDNA – komplementárna DNA

cfDNA – cell-free DNA

Ct – prahový cyklus

dNTP – deoxyribonukleotidtrifosrát

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

EMA – endomýzium

ESPGHAN – European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition

FCM – prietoková cytometria

FNKV – Fakultní nemocnice Královské Vinohrady

FSc – z anglického „forward scatter“, priamy rozptyl

GWAS – celogenómová asociačná štúdia

HLA – ľudský leukocytárny antigén

IgA /-G – imonoglobulín A/ -G

INF $\gamma$  – interferón gama

LPS – lipopolysacharid

M - CSF – Faktor stimulujúci kolónie makrofágov

MFI – mean fluorescent intensity

PAMPs – Molekulárne vzory asociované s patogénom

PBMCs – mononukleárne bunky periférnej krvi

PBS – fosfátom pufovaný fyziologický roztok

PRR – vzorec rozpoznávajúce receptory

qPCR – kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia

RT-PCR – reverzne transkriptázová polymerázová reťazová reakcia

Ssc – z anglického „side scatter“, bočný rozptyl

TCR – T bunecný receptor

TLR – toll-like receptor

Th1/ -2 – subpopulácia pomocných T lymfocytov -1/ -2

Treg – regulačný T lymfocyt

tTG2 – tkanivová transglutamináza 2

VÚRV – Výskumní ústav rostlinné výroby

ÚZIS ČR – Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky

## 8. Zdroje

- Zdroj 1 - Alkalay, M. J. (2020). Update on celiac disease [Online]. *Current Opinion In Pediatrics*, 32(5), 654-660. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000936>
- Zdroj 2 - Prevalencia celiakie vo svete. *Dr. Schär Institute* [online]. [cit. 2023-04-09]. Dostupné z: <https://www.drschaer.com/us/institute/a/prevalence-celiac-disease>
- Zdroj 3 - Počty celiakov v Českej republike v roku 2021. *Celiak.cz* [online]. [cit. 2023-04-09]. Dostupné z: <https://celiak.cz/2022/06/01/pocty-celiaku-v-ceske-republice-v-roce-2021/>
- Zdroj 4 - Hoffmanová , Iva. *Celiakie*. Praha: Mladá fronta, (2019). Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-802-0454-140.
- Zdroj 5 - Městecký, J., Strober, W., Russell, M., Cheroutre, H., Lambrecht, B. N., & Kelsall, B. (2013). *Mucosal Immunology* (4th Edition). Academic Press.
- Abadie, V., & Jabri, B. (2015). Immunopathology of Celiac Disease. In *Mucosal Immunology: Fourth Edition* (Fourth Edi, Vols. 2–2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00080-X>
- Akobeng, A. K., Ramanan, A. V, & Buchan, I. (2006). Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Arch Dis Child*, 91, 39–43. <https://doi.org/10.1136/adc.2005.082016>
- Arentz-Hansen, H., Fleckenstein, B., Molberg, Ø., Scott, H., Koning, F., Jung, G., Roepstorff, P., Lundin, K. E. A., & Sollid, L. M. (2004). The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Medicine*, 1, 084–095. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.0010001>
- Armstrong, L., Medford, A. R. L., Hunter, K. J., Uppington, K. M., & Millar, A. B. (2004). Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clinical and Experimental Immunology*, 136(2), 312–319. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02433.x>
- Auricchio, S., Follo, D., De Ritis, G., Giunta, A., Marzorati, D., Prampolini, L., Ansaldi, N., Levi, P., Dall’Olio, D., Bossi, A., Cortinovis, I., & Marubini, E. (1983). Does breast feeding protect against the development of clinical symptoms of celiac disease in children? *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2(3), 428–433. <https://doi.org/10.1097/00005176-198302030-00006>
- Balakireva, A. V., & Zamyatnin, A. A. (2016). Properties of gluten intolerance: Gluten structure, evolution, pathogenicity and detoxification capabilities. In *Nutrients* (Vol. 8, Issue 10). Nutrients. <https://doi.org/10.3390/nu8100644>
- Barker, J. M., & Liu, E. (2008). Celiac Disease: Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Associated Autoimmune Conditions. In *Advances in Pediatrics* (Vol. 55, Issue 1, pp. 349–365). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2008.07.001>

- Belge, K.-U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., & Ziegler-Heitbrock, L. (2002). The Proinflammatory CD14+CD16+DR++ Monocytes Are a Major Source of TNF. *The Journal of Immunology*, *168*(7), 3536–3542. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3536>
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, *40*(12), 845–859. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2003.10.005>
- Brynychova, I., Hoffmanova, I., Dvorak, M., & Dankova, P. (2016a). Increased Expression of TLR4 and TLR7 but Not Prolactin mRNA by Peripheral Blood Monocytes in Active Celiac Disease. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, *25*(5), 887–893. <https://doi.org/10.17219/acem/39940>
- Brynychova, I., Hoffmanova, I., Dvorak, M., & Dankova, P. (2016b). Increased expression of TLR4 and TLR7 but not prolactin mRNA by peripheral blood monocytes in active celiac disease. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, *25*(5), 887–893. <https://doi.org/10.17219/acem/39940>
- Carpenter, S., Ricci, E. P., Mercier, B. C., Moore, M. J., & Fitzgerald, K. A. (2014). Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 14, Issue 6, pp. 361–376). <https://doi.org/10.1038/nri3682>
- Cenit, M. C., Olivares, M., Codoñer-Franch, P., & Sanz, Y. (2015). Intestinal microbiota and celiac disease: Cause, consequence or co-evolution? In *Nutrients* (Vol. 7, Issue 8, pp. 6900–6923). <https://doi.org/10.3390/nu7085314>
- Choo, S. Y. (2007). The HLA system: Genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Medical Journal*, *48*(1), 11–23. <https://doi.org/10.3349/ymj.2007.48.1.11>
- Ciccocioppo, R., Kruzliak, P., Cangemi, G. C., Pohanka, M., Betti, E., Lauret, E., & Rodrigo, L. (2015). The Spectrum of Differences between Childhood and Adulthood Celiac Disease. *Nutrients*, *7*(10), 8733. <https://doi.org/10.3390/NU7105426>
- Ciccocioppo, R., Rossi, M., Pesce, I., Ricci, G., Millimaggi, D., Maurano, F., & Corazza, G. R. (2008). Effects of gliadin stimulation on bone marrow-derived dendritic cells from HLA-DQ8 transgenic MICE. *Digestive and Liver Disease*, *40*(12), 927–935. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2008.05.005>
- Cinova, J., Palová-Jelínková, L., Smythies, L. E., Černá, M., Pecharová, B., Dvořák, M., Fruhauf, P., Tlaskalová-Hogenová, H., Smith, P. D., & Tučková, L. (2007). Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *Journal of Clinical Immunology*, *27*(2), 201–209. <https://doi.org/10.1007/S10875-006-9061-Z>

- Coleman, C., Quinn, E. M., Ryan, A. W., Conroy, J., Trimble, V., Mahmud, N., Kennedy, N., Corvin, A. P., Morris, D. W., Donohoe, G., MacMathuna, P., Byrnes, V., Kiat, C., Trynka, G., Wijmenga, C., Kelleher, D., Ennis, S., Anney, R. J., & McManus, R. (2016). Common polygenic variation in coeliac disease and confirmation of ZNF335 and NIFA as disease susceptibility loci. *European Journal of Human Genetics*, *24*, 291–297. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.87>
- Comino, I., Bernardo, D., Bancel, E., De Lourdes Moreno, M., Sánchez, B., Barro, F., Šuligoj, T., Ciclitira, P. J., Cebolla, Á., Knight, S. C., Branlard, G., & Sousa, C. (2016). Identification and molecular characterization of oat peptides implicated on coeliac immune response. *Food and Nutrition Research*, *60*. <https://doi.org/10.3402/fnr.v60.30324>
- Comino, I., Real, A., De Lorenzo, L., Cornell, H., López-Casado, M. Á., Barro, F., Lorite, P., Torres, M. I., Cebolla, Á., & Sousa, C. (2011). Diversity in oat potential immunogenicity: Basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease. *Gut*, *60*(7), 915–922. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.225268>
- Corazza, G., Valentini, R. A., Frisoni, M., Volta, U., Corrao, G., Bianchi, F. B., & Gasbarrini, G. (1992). Gliadin immune reactivity is associated with overt and latent enteropathy in relatives of celiac patients. *Gastroenterology*, *103*(5), 1517–1522. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)91172-Z](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)91172-Z)
- De Bellis, A., Bizzarro, A., Pivonello, R., Lombardi, G., & Bellastella, A. (2005). Prolactin and autoimmunity. *Pituitary*, *8*(1), 25–30. <https://doi.org/10.1007/s11102-005-5082-5>
- De Re, V., Magris, R., & Cannizzaro, R. (2017). New insights into the pathogenesis of celiac disease. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 4, Issue AUG, p. 1). <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00137>
- Dieterich, W., Laag, E., Schopper, H., Volta, U., Ferguson, A., Gillett, H., Riecken, E. O., & Schuppan, D. (1998). Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology*, *115*(6), 1317–1321. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70007-1](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70007-1)
- du Pré, M. F., & Sollid, L. M. (2015). T-cell and B-cell immunity in celiac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, *29*(3), 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.04.001>
- Ensari, A., & Marsh, M. N. (2019). Diagnosing celiac disease: A critical overview. *Turkish Journal of Gastroenterology*, *30*(5), 389–397. <https://doi.org/10.5152/TJG.2018.18635>
- Fasano, A. (2005). Clinical presentation of celiac disease in the pediatric population. *Gastroenterology*, *128*(4 SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.02.015>
- Fasano, A. (2011). Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiological Reviews*, *91*(1), 151–175. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00003.2008>



- Fasano, A., Sapone, A., Zavallos, V., & Schuppan, D. (2015). Nonceliac Gluten Sensitivity. *Gastroenterology*, *148*(6), 1195–1204. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2014.12.049>
- Frankenberger, M., Sternsdorf, T., Pechumer, H., Pforte, A., & Ziegler-Heitbrock, H. (1996). Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood*, *87*(1), 373–377. <https://doi.org/10.1182/blood.v87.1.373.373>
- Greco, L., Romino, R., Coto, I., Di Cosmo, N., Percopo, S., Maglio, M., Paparo, F., Gasperi, V., Limongelli, M. G., Cotichini, R., D'Agate, C., Tinto, N., Sacchetti, L., Tosi, R., & Stazi, M. A. (2002). The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*, *50*(5), 624–628. <https://doi.org/10.1136/gut.50.5.624>
- Guandalini, S. (2008). Historical perspective of celiac disease. *Pediatric and Adolescent Medicine*, *12*(May), 1–11. <https://doi.org/10.1159/000128267>
- Gujral, N., Freeman, H. J., & Thomson, A. B. R. (2012). Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, *18*(42), 6036–6059. <https://doi.org/10.3748/WJG.V18.I42.6036>
- Haboubi, N. Y., Taylor, S., & Jones, S. (2006). Coeliac disease and oats: A systematic review. *Postgraduate Medical Journal*, *82*(972), 672–678. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.045443>
- Hardy, M. Y., Tye-Din, J. A., Stewart, J. A., Schmitz, F., Dudek, N. L., Hanchapola, I., Purcell, A. W., & Anderson, R. P. (2015). Ingestion of oats and barley in patients with celiac disease mobilizes cross-reactive T cells activated by avenin peptides and immuno-dominant hordein peptides. *Journal of Autoimmunity*, *56*, 56–65. <https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2014.10.003>
- Hernández, J. C., Stevenson, M., Latz, E., & Urcuqui-Inchima, S. (2012). HIV type 1 infection up-regulates TLR2 and TLR4 expression and function in vivo and in vitro. *AIDS Research and Human Retroviruses*, *28*(10), 1313–1328. <https://doi.org/10.1089/aid.2011.0297>
- Hogenová, H. T., Zákostelská, Z. J., Petanová, J., & Kverka, M. (2019). Microbiota, immunity and immunologically-mediated diseases. *Vnitřní Lekarství*, *65*(2), 98–107. <https://doi.org/10.36290/vnl.2019.022>
- Holm, K., Mäki, M., Vuolteenaho, N., Mustalahti, K., Ashorn, M., Ruuska, T., & Kaukinen, K. (2006). Oats in the treatment of childhood coeliac disease: A 2-year controlled trial and a long-term clinical follow-up study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, *23*(10), 1463–1472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02908.x>
- Hudec, M., Riegerová, K., Pala, J., Kútna, V., Cerná, M., Oleary, V. B., Gras, S., Le Nours, J., Szeto, C., & Chatzileontiadou, D. (2021). Celiac Disease Defined by Over-Sensitivity to Gliadin Activation and Superior Antigen Presentation of Dendritic Cells. *International Journal of*

- Hunt, K. A., Zhernakova, A., Turner, G., Heap, G. A. R., Franke, L., Bruinenberg, M., Romanos, J., Dinesen, L. C., Ryan, A. W., Panesar, D., Gwilliam, R., Takeuchi, F., McLaren, W. M., Holmes, G. K. T., Howdle, P. D., Walters, J. R. F., Sanders, D. S., Playford, R. J., Trynka, G., ... Van Heel, D. A. (2008). Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nature Genetics*, 40(4), 395–402. <https://doi.org/10.1038/ng.102>
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I., Kurppa, K., Mearin, M. L., Ribes-Koninckx, C., Shamir, R., Troncone, R., Auricchio, R., Castillejo, G., Christensen, R., Dolinsek, J., Gillett, P., Hróbjartsson, A., Koltai, T., Maki, M., Nielsen, S. M., Popp, A., Størdal, K., ... Wessels, M. (2020). European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 70(1), 141–156. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002497>
- Jelínková, L., Tučková, L., Cinová, J., Flegelová, Z., & Tlaskalová-Hogenová, H. (2004). Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF- $\alpha$  through a mechanism involving NF- $\kappa$ B. *FEBS Letters*, 571(1–3), 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.057>
- Jiang, H., Wang, P. Z., Zhang, Y., Xu, Z., Sun, L., Wang, L. M., Huang, C. X., Lian, J. Q., Jia, Z. S., Li, Z. D., & Bai, X. F. (2008). Hantaan virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. *Virology*, 380(1), 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.07.002>
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, 5(SEP), 461. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00461/BIBTEX>
- Kim, S. M., Mayassi, T., & Jabri, B. (2015). Innate immunity: Actuating the gears of celiac disease pathogenesis. In *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* (Vol. 29, Issue 3, pp. 425–435). <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.05.001>
- Kochhar, G. S., Singh, T., Gill, A., & Kirby, D. F. (2016). Celiac disease: Managing a multisystem disorder. In *Cleveland Clinic Journal of Medicine* (Vol. 83, Issue 3, pp. 217–227). Cleveland Clinic Journal of Medicine. <https://doi.org/10.3949/ccjm.83a.14158>
- Koning, F., Schuppan, D., Cerf-Bensussan, N., & Sollid, L. M. (2005). Pathomechanisms in celiac disease. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 19(3 SPEC. ISS.), 373–387. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2005.02.003>
- Korkosz, M., Bukowska-Strakova, K., Sadis, S., Grodzicki, T., & Siedlar, M. (2012). Monoclonal antibodies against macrophage colony-stimulating factor diminish the number of circulating intermediate and nonclassical (CD14 ++CD16+/CD14+CD16++) monocytes in rheumatoid

- arthritis patient. In *Blood* (Vol. 119, Issue 22, pp. 5329–5330). *Blood*.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-412551>
- La Vieille, S., Pulido, O. M., Abbott, M., Koerner, T. B., & Godefroy, S. (2016). *Celiac Disease and Gluten-Free Oats: A Canadian Position Based on a Literature Review*.  
<https://doi.org/10.1155/2016/1870305>
- Lähdeaho, M. L., Mäki, M., Laurila, K., Huhtala, H., & Kaukinen, K. (2011). Small- bowel mucosal changes and antibody responses after low- and moderate-dose gluten challenge in celiac disease. *BMC Gastroenterology*, *11*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-129/FIGURES/5>
- Larkin, J., Ahmed, C. M., Wilson, T. D., & Johnson, H. M. (2013). Regulation of interferon gamma signaling by suppressors of cytokine signaling and regulatory T cells. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 4, Issue DEC). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00469>
- Lebwohl, B., Sanders, D. S., & Green, P. H. R. (2018). Coeliac disease. *The Lancet*, *391*(10115), 70–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31796-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31796-8)
- Leffler, D., Schuppan, D., Pallav, K., Najarian, R., Goldsmith, J. D., Hansen, J., Kabbani, T., Dennis, M., & Kelly, C. P. (2013). Kinetics of the histological, serological and symptomatic responses to gluten challenge in adults with coeliac disease. *Gut*, *62*(7), 996–1004. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2012-302196>
- Lionetti, E., Castellaneta, S., Francavilla, R., Pulvirenti, A., Tonutti, E., Amarri, S., Barbato, M., Barbera, C., Barera, G., Bellantoni, A., Castellano, E., Guariso, G., Limongelli, M. G., Pellegrino, S., Polloni, C., Ughi, C., Zuin, G., Fasano, A., & Catassi, C. (2014). Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. *The New England Journal of Medicine*, *371*(14), 1295–1303. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1400697>
- Lionetti, E., & Catassi, C. (2015). The Role of Environmental Factors in the Development of Celiac Disease: What Is New? *Diseases*, *3*(4), 282–293. <https://doi.org/10.3390/diseases3040282>
- Lionetti, E., Gatti, S., Galeazzi, T., Caporelli, N., Francavilla, R., Cucchiara, S., Roggero, P., Malamisura, B., Iacono, G., Tomarchio, S., Kleon, W., Restani, P., Brusca, I., Budelli, A., Gesuita, R., Carle, F., & Catassi, C. (2018). Safety of Oats in Children with Celiac Disease: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *The Journal of Pediatrics*, *194*, 116–122.e2. <https://doi.org/10.1016/J.JPEDS.2017.10.062>
- Liu, E., Lee, H.-S., Aronsson, C. A., Hagopian, W. A., Koletzko, S., Rewers, M. J., Eisenbarth, G. S., Bingley, P. J., Bonifacio, E., Simell, V., & Agardh, D. (2014). Risk of Pediatric Celiac Disease According to HLA Haplotype and Country. *New England Journal of Medicine*, *371*(1), 42–49. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1313977>

- Losurdo, G., Leo, M. Di, Santamato, E., Arena, M., Rendina, M., Luigiano, C., Ierardi, E., & Leo, A. Di. (2021). Serologic diagnosis of celiac disease: May it be suitable for adults? *World Journal of Gastroenterology*, 27(42), 7233. <https://doi.org/10.3748/WJG.V27.I42.7233>
- Maiuri L. (1972). Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *The Journal of Physiology*, 221(3), 707–714. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1972.sp009777>
- Lundin, K. E. A., Nilsen, E. M., Scott, H. G., Løberg, E. M., Gjøen, A., Bratlie, J., Skar, V., & Mendez, E. (2003). Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut*, 52, 1649–1652. <https://doi.org/10.1136/gut.52.11.1649>
- Lundin, K. E. A., & Wijmenga, C. (2015). Coeliac disease and autoimmune disease - Genetic overlap and screening. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 12, Issue 9, pp. 507–515). Nat Rev Gastroenterol Hepatol. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.136>
- Ma, W.-T., Gao, F., Gu, K., & Chen, D.-K. (2019). The Role of Monocytes and Macrophages in Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review. *Frontiers in Immunology*, 10(MAY), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01140>
- Makharia, G. K., Chauhan, A., Singh, P., & Ahuja, V. (2022). Review article: Epidemiology of coeliac disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 56(S1), S3–S17. <https://doi.org/10.1111/apt.16787>
- Mårild, K., Kahrs, C. R., Tapia, G., Stene, L. C., & Størdal, K. (2015). Infections and risk of celiac disease in childhood: A prospective nationwide cohort study. *American Journal of Gastroenterology*, 110(10), 1475–1484. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.287>
- Mårild, K., Ye, W., Lebwohl, B., Green, P. H. R., Blaser, M. J., Card, T., & Ludvigsson, J. F. (2013). Antibiotic exposure and the development of coeliac disease: A nationwide case-control study. *BMC Gastroenterology*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-13-109>
- Matsuguchi, T., Musikachoen, T., Ogawa, T., & Yoshikai, Y. (2000). Gene Expressions of Toll-Like Receptor 2, But Not Toll-Like Receptor 4, Is Induced by LPS and Inflammatory Cytokines in Mouse Macrophages. *The Journal of Immunology*, 165(10), 5767–5772. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.10.5767>
- Molaaghaee-Rouzbahani, S., Asri, N., Jahani-Sherafat, S., Amani, D., Masotti, A., Baghaei, K., Yadegar, A., Mirjalali, H., & Rostami-Nejad, M. (2022). The modulation of macrophage subsets in celiac disease pathogenesis. In *Immunity, Inflammation and Disease* (Vol. 10, Issue 12). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/iid3.741>

- Mukaida, N., Harada, A., & Matsushima, K. (1998). Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 9(1), 9–23. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(97\)00022-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(97)00022-1)
- Naik, R. D., Seidner, D. L., & Adams, D. W. (2018). Nutritional Consideration in Celiac Disease and Nonceliac Gluten Sensitivity. *Gastroenterology Clinics of North America*, 47(1), 139–154. <https://doi.org/10.1016/J.GTC.2017.09.006>
- Němečková, I. (2010). *VROZENÁ IMUNITA A CIRKULUJÍCÍ MONOCYTY - VÝZNAM A FUNKCE V PATOGENEZI CELIAKIE*.
- Nesticò, L., Fagnani, C., Coto, I., Percopo, S., Cotichini, R., Limongelli, M. G., Paparo, F., D'Alfonso, S., Giordano, M., Sferlazzas, C., Magazzù, G., Momigliano-Richiardi, P., Greco, L., & Stazi, M. A. (2006). Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut*, 55(6), 803–804. <https://doi.org/10.1136/GUT.2005.083964>
- Nurminskaya, M. V., & Belkin, A. M. (2012). Cellular Functions of Tissue Transglutaminase. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 294, pp. 1–97). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394305-7.00001-X>
- O'Hara, J. R., Feener, T. D., Fischer, C. D., & Buret, A. G. (2012). *Campylobacter jejuni* disrupts protective toll-like receptor 9 signaling in colonic epithelial cells and increases the severity of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Infection and Immunity*, 80(4), 1563–1571. <https://doi.org/10.1128/IAI.06066-11>
- Palová-Jelínková, L., Dáňová, K., Drašarová, H., Dvořák, M., Funda, D. P., Fundová, P., Kotrbová-Kozak, A., Černá, M., Kamanová, J., Martin, S. F., Freudenberg, M., & Tučková, L. (2013). Pepsin Digest of Wheat Gliadin Fraction Increases Production of IL-1 $\beta$  via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway and an NLRP3 Inflammasome Activation. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062426>
- Quinn, E. M., Coleman, C., Molloy, B., Castro, P. D., Cormican, P., Trimble, V., Mahmud, N., & McManus, R. (2015). Transcriptome analysis of CD4<sup>+</sup> T cells in coeliac disease reveals imprint of BACH2 and IFN $\gamma$  regulation. *PLoS ONE*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140049>
- Real, A., Comino, I., De, L., López, L., Merchá, F., Gil-Humanes, J., Gimé Nez, M. J., Ngel Ló Pez-Casado, M. A., Torres, I., Ngel Cebolla, A., Sousa, C., Barro, F., & Pistó, F. (2012). *Molecular and Immunological Characterization of Gluten Proteins Isolated from Oat Cultivars That Differ in Toxicity for Celiac Disease*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048365>

- Real, A., Comino, I., de Lorenzo, L., Merchán, F., Gil-Humanes, J., Giménez, M. J., López-Casado, M. Á., Isabel Torres, M., Cebolla, Á., Sousa, C., Barro, F., & Pistón, F. (2012). Molecular and Immunological Characterization of Gluten Proteins Isolated from Oat Cultivars That Differ in Toxicity for Celiac Disease. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048365>
- Ricaño-Ponce, I., Wijmenga, C., & Gutierrez-Achury, J. (2015). Genetics of celiac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 29(3), 399–412. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.04.004>
- Rostom, A., Dubé, C., Cranney, A., Saloojee, N., Sy, R., Garritty, C., Sampson, M., Zhang, L., Yazdi, F., Mamaladze, V., Pan, I., Macneil, J., Mack, D., Patel, D., & Moher, D. (2005). The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: A systematic review. *Gastroenterology*, 128(4 SUPPL. 1), 38–46. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.02.028>
- Roy, B., Neumann, R. S., Snir, O., Iversen, R., Sandve, G. K., Lundin, K. E. A., & Sollid, L. M. (2017). High-Throughput Single-Cell Analysis of B Cell Receptor Usage among Autoantigen-Specific Plasma Cells in Celiac Disease. *The Journal of Immunology*, 199(2), 782–791. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700169>
- Roychoudhuri, R., Hirahara, K., Mousavi, K., Clever, D., Klebanoff, C. A., Bonelli, M., Sciumè, G., Zare, H., Vahedi, G., Dema, B., Yu, Z., Liu, H., Takahashi, H., Rao, M., Muranski, P., Crompton, J. G., Punkosdy, G., Bedognetti, D., Wang, E., ... Restifo, N. P. (2013). BACH2 represses effector programs to stabilize T reg-mediated immune homeostasis. *Nature*, 498(7455), 506–510. <https://doi.org/10.1038/nature12199>
- Sander, S. D., Hansen, A. V., Størdal, K., Andersen, A. M. N., Murray, J. A., & Husby, S. (2018). Mode of delivery is not associated with celiac disease. *Clinical Epidemiology*, 10, 323–332. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S152168>
- Sapone, A., Bai, J. C., Ciacci, C., Dolinsek, J., Green, P. H. R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Rostami, K., Sanders, D. S., Schumann, M., Ullrich, R., Villalta, D., Volta, U., Catassi, C., & Fasano, A. (2012). Spectrum of gluten-related disorders: Consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-13/FIGURES/4>
- Sarna, V. K., Skodje, G. I., Reims, H. M., Risnes, L. F., Dahal-Koirala, S., Sollid, L. M., & Lundin, K. E. A. (2018). HLA-DQ:gluten tetramer test in blood gives better detection of coeliac patients than biopsy after 14-day gluten challenge. *Gut*, 67(9), 1606–1613. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314461>

- Scherf, K. A., Wieser, H., & Koehler, P. (2018). Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products. *Food Research International*, *110*, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.021>
- Serena, G., Huynh, D., Lima, R. S., Vise, L. M., Freire, R., Ingano, L., Leonard, M. M., Senger, S., & Fasano, A. (2019). Intestinal Epithelium Modulates Macrophage Response to Gliadin in Celiac Disease. *Frontiers in Nutrition*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00167>
- Sharma, A., Liu, X., Hadley, D., Hagopian, W., Liu, E., Chen, W. M., Onengut-Gumuscu, S., Simell, V., Rewers, M., Ziegler, A. G., Lernmark, Å., Simell, O., Toppari, J., Krischer, J. P., Akolkar, B., Rich, S. S., Agardh, D., & She, J. X. (2016). Identification of non-HLA genes associated with celiac disease and country-specific differences in a large, international pediatric cohort. *PLoS ONE*, *11*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152476>
- Shewry, P. R., & Tatham, A. S. (1997). Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. *Journal of Cereal Science*, *25*(3), 207–227. <https://doi.org/10.1006/JCRS.1996.0100>
- Silano, M., Benedetto, R. Di, Maialetti, F., De Vincenzi, A., Calcaterra, R., Cornell, H. J., & De Vincenzi, M. (2007). Avenins from different cultivars of oats elicit response by coeliac peripheral lymphocytes. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *42*(11), 1302–1305. <https://doi.org/10.1080/00365520701420750>
- Silano, M., Penas Pozo, E., Uberti, F., Manferdelli, S., Del Pinto, T., Felli, C., Budelli, A., Vincentini, O., & Restani, P. (2014). Diversity of oat varieties in eliciting the early inflammatory events in celiac disease. *European Journal of Nutrition*, *53*(5), 1177–1186. <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0617-4>
- Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Catassi, C., Green, P. H., Kelly, C. P., Ahuja, V., & Makharia, G. K. (2018). Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, *16*(6), 823-836.e2. <https://doi.org/10.1016/J.CGH.2017.06.037>
- Sjöberg, V., Hollén, E., Pietz, G., Magnusson, K. E., Fälth-Magnusson, K., Sundström, M., Holmgren Peterson, K., Sandström, O., Hernell, O., Hammarström, S., Högberg, L., & Hammarström, M. L. (2014). Noncontaminated dietary oats may hamper normalization of the intestinal immune status in childhood celiac disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*, *5*(6). <https://doi.org/10.1038/CTG.2014.9>
- Sollid, L. M. (2000). MOLECULAR BASIS OF CELIAC DISEASE. *Annu. Rev. Immunol.* *2000*, *18*:53–81, *1*, 53–81.
- Sollid, L. M. (2002). Coeliac disease: Dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Reviews Immunology*, *2*(9), 647–655. <https://doi.org/10.1038/nri885>

- Sollid, L. M., Molberg, M., McAdam, S., & Lundin, K. E. A. (1997). Autoantibodies in coeliac disease: Tissue transglutaminase: guilty by association? In *Gut* (Vol. 41, Issue 6, pp. 851–852). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/gut.41.6.851>
- Stamnaes, J., Stray, D., Stensland, M., Sarna, V. K., Nyman, T. A., Lundin, K. E. A., & Sollid, L. M. (2021). In Well-Treated Celiac Patients Low-Level Mucosal Inflammation Predicts Response to 14-day Gluten Challenge. *Advanced Science*, *8*(4), 1–7. <https://doi.org/10.1002/advs.202003526>
- Stene, L. C., Honeyman, M. C., Hoffenberg, E. J., Haas, J. E., Sokol, R. J., Emery, L., Taki, I., Norris, J. M., Erlich, H. A., Eisenbarth, G. S., & Rewers, M. (2006). Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: A longitudinal study. *American Journal of Gastroenterology*, *101*(10), 2333–2340. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00741.x>
- Størsrud, S., Olsson, M., Arvidsson Lenner, R., Nilsson, L. Å., Nilsson, O., & Kilander, A. (2003). Adult coeliac patients do tolerate large amounts of oats. *European Journal of Clinical Nutrition*, *57*(1), 163–169. <https://doi.org/10.1038/SJ.EJCN.1601525>
- Szebeni, B., Veres, G., Dezsőfi, A., Rusai, K., Vannay, Á., Bokodi, G., Vásárhelyi, B., Korponay-Szabó, I., Tulassay, T., & Arató, A. (2007). Increased Mucosal Expression of Toll-like Receptor (TLR)2 and TLR4 in Coeliac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, *45*(2), 187–193. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318064514a>
- Takeuchi, A., & Saito, T. (2017). CD4 CTL, a cytotoxic subset of CD4+ T cells, their differentiation and function. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue FEB). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00194>
- Tau, G. Z., Cowan, S. N., Weisburg, J., Braunstein, N. S., & Rothman, P. B. (2001). Regulation of IFN- $\gamma$  Signaling Is Essential for the Cytotoxic Activity of CD8+ T Cells. *The Journal of Immunology*, *167*(10), 5574–5582. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.167.10.5574>
- Taylor, A. K., Lebowitz, B., Snyder, C. L., & Green, P. H. (2019). Celiac Disease. *Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease*, 395-404.e5.
- Tučková, L., Novotná, J., Novák, P., Flegelová, Z., Květoň, T., Jelínková, L., Zidek, Z., Man, P., & Tlaskalová-Hogenová, H. (2002). Activation of macrophages by gliadin fragments: isolation and characterization of active peptide. *Journal of Leukocyte Biology*, *71*(4), 625–631. <https://doi.org/10.1189/jlb.71.4.625>
- Tuire, I., Marja-Leena, L., Teea, S., Katri, H., Jukka, P., Päivi, S., Heini, H., Markku, M., Pekka, C., & Katri, K. (2012). Persistent duodenal intraepithelial lymphocytosis despite a long-term strict gluten-free diet in celiac disease. *The American Journal of Gastroenterology*, *107*(10), 1563–1569. <https://doi.org/10.1038/AJG.2012.220>



- Undlien, D. E., Lie, B. A., & Thorsby, E. (2001). HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved? *Trends in Genetics*, *17*(2), 93–100. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02180-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02180-6)
- van Heel, D. A., Franke, L., Hunt, K. A., Gwilliam, R., Zhernakova, A., Inouye, M., Wapenaar, M. C., Barnardo, M. C. N. M., Bethel, G., Holmes, G. K. T., Feighery, C., Jewell, D., Kelleher, D., Kumar, P., Travis, S., Walters, J. R. F., Sanders, D. S., Howdle, P., Swift, J., ... Wijmenga, C. (2007). A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nature Genetics*, *39*(7), 827–829. <https://doi.org/10.1038/ng2058>
- Verdu, E. F., Galipeau, H. J., & Jabri, B. (2015). Novel players in coeliac disease pathogenesis: Role of the gut microbiota. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 12, Issue 9, pp. 497–506). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.90>
- Wahab, W. A., Šuligoj, T., Ellis, J., Côrtez-Real, B., & Ciclitira, P. J. (2016). Coeliac disease: immunogenicity studies of barley hordein and rye secalin-derived peptides. *International Journal of Experimental Pathology*, *97*(4), 303–309. <https://doi.org/10.1111/iep.12199>
- Wong, K. L., Yeap, W. H., Tai, J. J. Y., Ong, S. M., Dang, T. M., & Wong, S. C. (2012). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunologic Research*, *53*(1–3), 41–57. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8297-3>
- Ziegler-Heitbrock, H. W. L. (2000). Definition of human blood monocytes. In *Journal of Leukocyte Biology* (Vol. 67, Issue 5, pp. 603–606). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/jlb.67.5.603>
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J. M., Liu, Y. J., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., & Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, *116*(16). <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-02-258558>