

UNIVERZITA KARLOVA V PRAHE

Prírodovedecká fakulta



Dizertačná práca

**Úloha monocytov v patogenetických
mechanizmoch celiakie**

Mgr. Jana Cinová



Vedúci dizertačnej práce: Doc. RNDr. Ludmila Tučková, DrSc.

Oddelenie Imunológie a gnotobiológie

Mikrobiologický ústav

Akadémia vied Českej republiky

Praha, Júl 2007

Týmto by som chcela vyjadriť svoje poďakovanie predovšetkým mojej školiteľke Doc. RNDr. Ludmile Tučkovej, DrSc. za jej odborné vedenie mojej dizertačnej práce, za cenné rady a pripomienky.

Moje poďakovanie patrí všetkým pracovníkom oddelenia imunológie a gnotobiológie Mikrobiologického ústavu AV ČR, osobne by som chcela poďakovať kolegom z nášho laboratória, RNDr. Lenke Palovej-Jelínkovej, PhD., Ing. Danielovi Sánchezovi, PhD., Ing. Barbare Pecharovej, MUDr. Anree Kitanovičovej a pani Pavle Kašparovej za ich rady, neoceniteľnú pomoc a vytvorenie príjemného pracovného zázemia.

Vrelé poďakovanie patrí mojej rodine, blízkym a priateľom za ich podporu.

Praha, Júl 2007

Jana Cinová

Dizertačná práca bola vypracovaná na základe nasledujúcich publikácií:

Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF- α through a mechanism involving NF- κ B.

Jelínková L, Tučková L, Cinová J, Flegelová Z, Tlaskalová-Hogenová H.

FEBS Letters; 571: 81-85, 2004

Involvement of innate immunity in the development of inflammatory and autoimmune diseases.

Tlaskalová-Hogenová H, Tučková L, Štěpánková R, Hudcovič T, Palová-Jelínková L, Kozáková H, Rossmann P, Sanchez D, Cinová J, Hrnčíř T, Kverka M, Froňová L, Uhlig H, Powrie F, Bland P.

Ann NY Acad Sci; 1051: 1-12, 2005

Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease.

Cinová J, Palová-Jelínková L, Smythies LE, Černá M, Pecharová B, Dvořák M, Fruhauf P, Tlaskalová-Hogenová H, Smith PD, Tučková L.

J Clin Immunol; 27:201-209, 2007

Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array.

Kverka M, Burianová J., Lodinová-Žadníková R, Kocourková I, Cinová J, Tučková L, Tlaskalová-Hogenová H.

Clin Chem; 53:955-962, 2007

Zoznam použitých skratiek:

AGA	antigliadinové protilátky
AJA	antijejunálne protilátky
APC	antigén prezentujúce bunky
ARA	antiretikulinové protilátky
CD	aktívni celiaci
CTLA-4	cytotoxický leukocytárny antigén
CXCL13	B lymfocytárny chemoatraktant
DCs	dendritické bunky
EGF	rastový epidermový faktor
EMA	antiendomomyziálne protilátky
FGF-4	rastový faktor fibroblastov
GFD	bezlepková diéta
GM-CSF	faktor stimulujúci rast kolóni granulocytov a makrofágov
GRO	s proliferáciou súvisiaci onkoproteín
HD	zdraví darci
ICAM-1	intracelulárna adhezívna molekula
IELs	intraepitelové lymfocyty
IFN- γ	interferón gamma
LP	lamina propria
LPS	lipopolysacharid
MALT	lymfoidné tkanivo asociované s mukózou
MCP	proteín atrahujúci monocyty
MDC	chemokín odvodený od makrofágov
MHC	hlavný histokompatibilný komplex
MIP-1 α	zápalový proteín makrofágov
NK	prírodzeni zabijáči
PAMPs	s patogénom asociovaná molekula
PDTC	pyrrolidine dithiocarbamate
PIGF	rastový faktor placenty
PRRs	pattern recognition receptors

RS	refraktórna sprue
TGF- β	transformujúci rastový faktor
TIMP	tkanivový inhibítor metaloproteináz
TLRs	toll-like receptors
TNF- α	faktor nekrotizujúci nádory
TPCK	L-1-tosyloamido-2-phenyl chloromethyl ketone
tTG2	tkanivová transglutamináza
VCAM-1	adhezívna molekúla ciev

OBSAH:

1. CELIAKIA	2
1.1 Klinické príznaky	2
1.2 Glutén.....	3
1.3. Genetické pozadie celiakie.....	4
1.4 Celiakia ako autoimunitné ochorenie.....	4
1.4.1 Tkanivová transglutamináza	5
1.4.2. Kalretikulin	6
1.5. Diagnostika	7
1.5.1 Sérologické vyšetrenie	7
1.5.2. Biopsia - histologický obraz celiakie	8
1.5.3. Liečba a obnova črevnej sliznice	9
1.5.3.1. Formy celiakie	9
2. SLIZNIČNÝ IMUNITNÝ SYSTÉM.....	11
2.1 Adaptívna imunita.....	11
2.1.1 T- lymfocyty	11
2.1.1.1. Intraepitelové lymfocyty	12
2.1.1.2. CD4 ⁺ T- lymfocyty v lamina propria (LP).....	13
2.1.2. B lymfocyty	16
2.2. Zložky prirodzenej imunity.....	17
2.2.1. Epitelové bunky	17
2.2.2. Antigén prezentujúce bunky	19
2.2.2.1. Mononukleárno-fagocytový systém.....	19
2.2.2.2. Dendritické bunky.....	20
2.2.3. NF-κB systém	21
3. CIEĽ PRÁCE	22
4.VÝSLEDKY	23
5. DISKUSIA	30
6. ZÁVER.....	35
7. ZOZNAM LITERATÚRY	36

1. CELIAKIA

Celiakia je imunologicky mediované ochorenie tenkého čreva, ktoré je vyvolané u geneticky predisponovaných jedincov po požití pšeničného gluténu/lepku a jemu príbuzných prolamínov, ako sú hordeíny v jačmeni a sekalíny v žite. Skrinigové štúdie v Európe a v USA poukazujú na to, že prevalencia celiakie v populácii je 1:100/200, čo sú oveľa vyššie hodnoty než sa vo všeobecnosti predpokladalo (Catassi et al., 1994; Csizmadia et al., 1999; Hill et al., 2000).

V počiatočnej fáze ochorenia dochádza k infiltrácii tenkého čreva T a B lymfocytmi, makrofágmi, dendritickými bunkami a k ich aktivácii. Chronický zápal tenkého čreva vedie k atrofii klkov a k splošteniu črevnej sliznice. Celiakia je úspešne liečená nasadením bezlepkovej diéty (Trier, 1991; Marsh, 1992; Mäki a Collin, 1997; Sollid, 2002; Fasano a Catassi, 2001).

1.1 Klinické príznaky

Na základe prítomnosti klinických symptómov sa celiakia môže klasifikovať na symptomatickú a asymptomatickú. Symptomatická, aktívna forma je prezentovaná klasickými gastrointestinálnymi príznakmi, ako je diarhoea, abdominálna distenzia, zatiaľ čo u asymptomatickej, tichej formy, tieto príznaky chýbajú (Green a Jabri, 2003).

Celiakia je často diagnostikovaná v rannom detstve. V dôsledku sploštenia črevnej sliznice je znížená absorpcia živín, u detí sú prítomne gastrointestinálne problémy, poruchy rastu, anémia, a celkové neprospievanie (deficit kys. listovej, vápnika, železa, vitamínu D a ďalších vitamínov a minerálov) (Wahab et al., 2002 a). V dospelosti sa môže celiakia prejaviť širším spektrom príznakov. V poslednej dobe je až 60% novo diagnostikovaných pacientov dospelých, z toho 15-20% je nad 60 rokov (Mulder a Cellier, 2005; Jansen et al., 1993). Môže byť pozorovaná zvýšená únava, úbytok na hmotnosti, osteoporóza, neplodnosť, môže byť postihnutý aj endokrinný, nervový a pohybový systém. U pacientov sa môžu nešpecificky

vyvinúť neurologické symptómy ako je neuropatia, ataxia, alebo epilepsia. U niektorých pacientov sú pozorované afty a defekty zubnej skloviny (Lahteenoja et al., 1998; Lepore et al., 1996; Aine et al., 1990 Wierink et al., 2007). Celiakia môže byť asociovaná s ďalšími autoimunitnými ochoreniami. Ak je postihnutá len proximálna časť tenkého čreva, pacienti sa nezvyknú sťažovať na diarrhoeu, pretože absorpčné straty tukov a karbohydrátov sú kompenzované distálnou časťou tenkého čreva (Green et al., 2003), diarrhoea je pozorovaná u pacientov u ktorých choroba zasiahla aj distálnu časť tenkého čreva (Rubin, 1960).

1.2 Glutén

Vyvolávací agens - glutén/lepek predstavuje zložitú zmes bielkovín. Podľa rozpustnosti vo vodnom roztoku alkoholu sa glutén delí na 2 frakcie: nerozpustné gluteníny a rozpustné gliadiny. Gliadiny sú monoméry, zatiaľ čo gluteníny tvoria polymérne frakcie tvorené z podjednotiek navzájom viazaných S-S väzbou. Podľa pohyblivosti v elektrickom poli sa gliadiny delia na α/β , γ a ω typy (~250-300 aminokyselinových zvyškov, molekulová hmotnosť 20-75 kDa). Gluteníny sa podľa molekulovej hmotnosti delia na nízkomolekulové (~270-330 aminokyselinových zvyškov) a vysokomolekulové (~650-800 aminokyselinových zvyškov). Glutén patrí do skupiny prolaminov, je bohatý na prolín a glutamín (Sollid et al., 2002). V gastrointestinálnom trakte sú gliadiny a gluteníny pôsobením tráviacich enzýmov (pepsín, trypsín, chymotrypsín) degradované. Alfa-gliadiny s vysokým zastúpením prolínu sú viac odolné proti enzymatickému pôsobeniu pankreatických a žalúdočných proteáz. Všetky uvedené zložky gluténu a gliadinové peptidy prispievajú k poškodeniu črevnej sliznice. Shan a spolupracovníci opísali α -gliadinový peptid 33-mér o sekvencii LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF, ktorý indukoval T-bunkové klony izolované z čreva celiakálnych pacientov. Tento peptid ostáva stabilný aj po pôsobení proteáz tráviaceho traktu. Nachádzajú sa v ňom 3 gliadinové epitopy, ktoré boli rozpoznávané T-bunkami pacientov (PFPQPQLPY, PQPQLPYPQ, PYPQPQLPY) (Shan et al., 2002). Boli opísané bakteriálne a rastlinné enzýmy, ktoré štiepia tieto odolné peptidy na menšie fragmenty, strácajú väzobnú aktivitu na HLA-

DQ2 a HLA-DQ8 a tým aj schopnosť stimulovať T-bunky. Vhodnou kombináciou týchto bakteriálnych a rastlinných enzýmov by mohli byť zavedené nové terapeutické postupy v celiakii (Stepniak et al., 2006; Shan et al., 2002; 2004; Siegel et al., 2006).

1.3. Genetické pozadie celiakie

Asociácia celiakie s HLA komplexom bola po prvý krát opísaná v roku 1972 (Falchuk et al., 1972). Väčšina celiakov má DR3-DQ2 haplotyp alebo sú DR5-DQ7/DR7-DQ2 heterozygoti. Približne 95% celiakov exprimuje HLA-DQ2 heterodimér (DQA1*0501/DQB1*0201), zvyšných 5% pripadá na DQ8 heterodimér (DQA1*0301/DQB1*0302) (Green a Jabri, 2003; Sollid et al., 1989; Mazzarella et al., 2003; Karell et al., 2003). Až 30% kaukaziánskej populácie je nositeľom HLA-DQ2 alel (Sollid et al., 1989). V prípade heterodimérov sa alely môžu vyskytovať v *cis* alebo vzácnejšie v *trans* konfigurácii. *Cis* a *trans* forma sa líšia jednou aminokyselinou v každej podjednotke (van Heel et al., 2005). U nositeľov homodimérov kódujúcich alelami DQA1*05 alebo DQB1*02 v *cis* pozícii je vyššie riziko vzniku ochorenia (Vader et al., 2003).

Polanco a spoluprac. (1984) popisujú 70% výskyt celiakie u jednovaječných dvojčiat. Štúdie u monozygotných a dizygotných dvojčiat, ktoré majú 100% a 50% genetickú variabilitu a rovnaké okolité podmienky poukazujú na to, že prítomnosť DQ2 je nevyhnutný, ale nie postačujúci faktor pre vznik celiakie. Určitý podiel na rozvoji celiakie majú aj gény pre neklasické-HLA molekuly (Greco et al., 2002; van Heel et al., 2005). Niektoré práce opisujú vplyv génov kódujúcich kostimulačné molekuly cytotoxických T-lymfocytov CTLA4/CD28/ICOS na chromozóme 2q33, ale ich všeobecný efekt je slabý (Djilali-Saiah et al., 1998; King et al., 2002; Haimila et al., 2004). Typizácia DQ2/8 by mohla byť nápomocná pri stanovení diagnózy, v prípade negativity sa diagnóza celiakie môže vylúčiť.

1.4 Celiakia ako autoimunitné ochorenie

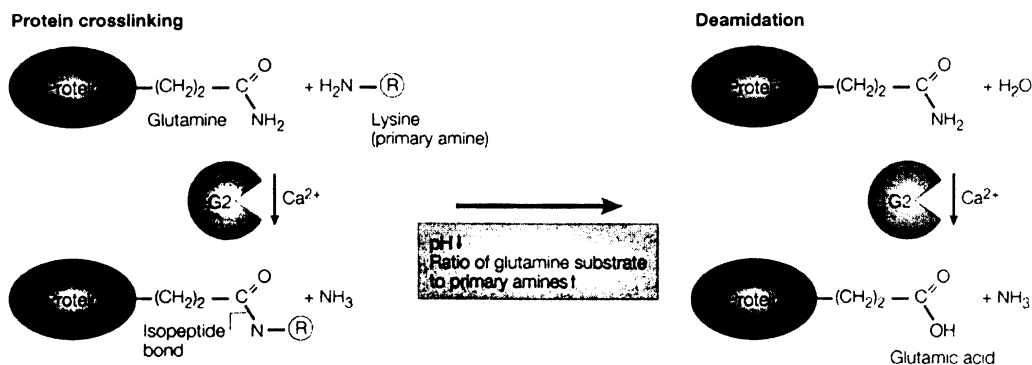
Celiakia spĺňa kritéria autoimunitných ochorení (Rose, 1998):

- v sére je zvýšená hladina IgG, IgA protilátok proti gliadinu, autoprotilátok proti endomyziálnemu autoantigénu tkanivovej transglutamináze a proti kalretikulínu (Karská et al., 1995; Dietrich et al., 1997)
- je asociovaná s ďalšími autoimunitnými ochoreniami ako je napr. autoimunitná tyreoidída, diabetes mellitus I typu, reumatoidná artritída, systémový lupus erytematodes, sarkoidóza, Sjögrenov syndróm, primárna biliárna cirhóza. Vysoko riziková sú aj pacienti s neurologickými symptómami, epilepsiou, pacienti s Downovým a Turnerovým syndrómom (Chin et al., 2003; Bonamico et al., 1998, 2001; Ventura et al., 1999; Cronin et al., 1997; Luft et al., 2003; Dickey et al., 1997; Collin a Mäki, 1994).
- ochorenie bolo prenesené intraepitelovými lymfocytmi u krysieho modelu celiakie a neúmyselne bunkami pri transplantácii kostnej drene medzi jednovaječnými dvojčatami (Štěpánková et al., 1989; Bargetzi et al., 1997)
- polygénny spôsob dedičnosti celiakie je viazaný na MHC komplex (Sollid 1997; Troncone et al., 1996)
- častejší je výskyt u žien než u mužov (Marsh, 1992)

1.4.1 Tkanivová transglutamináza

Dietrich a spoluprac. (1997) identifikovali endomysialný autoantigén - tkanivovú transglutaminázu (tTG2), ktorá sa exprimuje vo všetkých orgánoch, vrátane tenkého čreva, intracelulárne alebo extracelulárne. Z buniek sa uvoľňuje počas mechanického poškodenia, stresu, pri infekcii, zápale alebo apoptózou. Je to kalcium dependentný enzým (76-85 kDa) s transaminačnou a GTPázovou aktivitou. Transamináciou alebo deamidáciou glutamínu zodpovedá za posttranslačné modifikácie proteínov. U celiakálnych pacientov je zvýšená expresia subepitelovej tTG2 (Molberg et al., 1998; Greenberg et al., 1991). Spôsobuje prekríženie proteínov, vznikom ϵ -(γ -glutamyl)-lysín kovalentných väzieb medzi vedľajším reťazcom glutamínu na jednom proteíne s aminoskupinou na lysíne druhého proteínu. Za neprítomnosti lysínu a pri nízkom pH (v tenkom čreve), glutamín interaguje s vodou a je deamidovaný na kyselinu glutámovú (Obr. č.1) (Sollid et al., 2002). V procese

demidácie významnú úlohu zohráva vzdialenosť glutamínu a prolínu v gluténových peptidoch (Vader et al., 2002).



Obrázok č.1 (Sollid et al., 2002)

Aktívna forma tTG2 sa exprimuje na povrchu aktivovaných makrofágov, monocytov a DCs (Murtaugh et al., 1984; Akimov a Belkin; 2001; Le Noaur et al.; 2001). Nedávno bola preukázaná GTP-ázová aktivita tTG2 a jej ovplyvnenie multifunkčnou molekulou kalretikulinu (Mhaouty-Kodja, 2004).

1.4.2. Kalretikulin

Kalretikulin je všadeprítomný, kalcium viažúci proteín a molekulárny chaperón o molekulovej hmotnosti 46 kDa (pI=4.2), migrujúci v SDS-PAGE ako molekula o hmotnosti 60-63 kDa. Je lokalizovaný v endoplazmatickom retikule, ale bol opísaný aj v jadre, v lýtických granulách T-lymfocytov, na povrchu buniek a bol detekovaný aj v krvnom sére (extracelulárne) (Zhu et al, 1997; Andrin et al., 1998; Kishore et al., 1997).

Na základe krížovej reaktivity antigliadinových protilátok izolovaných zo séra celiakálnych pacientov i myších monoklonálnych protilátok bol v našom laboratóriu identifikovaný kalretikulin ako autoantigén u celiakie (Karská et al., 1995; Tučková et al., 1997). Po prvý krát boli opísané antikalretikulinové protilátky izotypu IgA (Tučková et al., 1997). Až 93% pacientov s celiakiou má signifikantne zvýšené hladiny IgA a IgG antikalretikulinových protilátok v sére (Sánchez et al., 2000).

Antikalretikulínové protilátky izotypu IgA boli zvýšené aj v sére pacientov s primárnou biliárnou cirhózou, autoimunitnou hepatitídou a alkoholickou cirhózou pečene (Sánchez et al., 2003). Autoprotilátky (IgG a IgM) proti kalretikulínu boli nájdené tiež u niektorých pacientov so systémovým lupus erytematodes, lupus neonatalis a cutaneus, Sjögrenovým syndrómom, reumatoidnou artritídou, hepatocelulárnym karcinómom, halotanovou hepatitídou a u pacientov infikovaných parazitmi (Gut et al., 2005; Rokeach et al., 1991; Routsias et al., 1993; Le Naour et al., 2002; McKhalife et al., 1993).

1.5. Diagnostika

Kritéria pre diagnózu celiakie boli schválené v r. 1974, a korigované v r. 1979 a 1990 Európskou spoločnosťou pediatrickej gastroenterológie a výživy (ESPGAN) (McNeish et al., 1979; Walker-Smith et al., 1990).

1.5.1 Sérologické vyšetrenie

Pri podozrení na celiakiu sa testuje prítomnosť IgA antigliadinových (AGA) a antiendomyziálnych (EMA) protilátok, protilátky proti tTG2, prípadne antiobjekunálnych (AJA) a antiretikulinových (ARA) protilátok a celková hladina IgA v sére (Karpati et al., 1990; Troncone a Ferguson, 1991).

Pre klinické využitie sa začali prednostne stanovovať EMA protilátky, ktoré majú vyše 90% sensitivitu (percento pacientov, ktorí boli v teste pozitívni) a až 100% špecifickosť (percento zdravých kontrol, ktorí boli v teste negatívni) (Fernandez et al., 2005). Viaceré štúdie poukazujú na fakt, že u neliečených celiakov hladina EMA protilátok koreluje s mierou atrofie klkov (Rossi et al., 1988; Dickey et al., 2000). Stanovujú sa metódou nepriamej imunofluorescencie na tkanivových rezoch opičieho ezofágu a ľudského pupočníka (Ladinser et al., 1994).

Protilátky proti tTG2 sa stanovujú ELISA testom, použitím tTG z pečene morčiat alebo rekombinantnej ľudskej tTG (Wong et al., 2002). U pediatrických

pacientov hladina IgA protilátok proti tTG2 a EMA korelovala s histopatologickým nálezom (Donaldson et al., 2007).

U pacientov s normálnym histologickým nálezom alebo s miernym poškodením sa citlivosť detekcie tTG2 protilátok znižuje. U pacientov s čiastočnou atrofiou klkov, nemusia byť tieto protilátky detekované, ale zvyčajne sú pozitívni na AGA protilátky (Tursi et al., 2003). Ak sú sérologické testy negatívne, ale všetky klinické symptómy silne poukazujú na celiakiu, môže ísť o imunoglobulinové deficiencie. U pacientov so selektívnym deficitom IgA až 1,7-2,6 % postihnutých má celiakiu. V takom prípade sa odporúča merať tTG2 protilátky triedy IgG (Cataldo et al., 1998).

1.5.2. Biopsia - histologický obraz celiakie

Pozitívne sérologické testy poukazujú na celiakiu, ich detekcia je významná pri záchypte potenciálnych pacientov, avšak nie sú konečnou diagnostikou. Histologické vyšetrenie biopsie z jejuna či duodena čreva sa pokladá za konečnú metódu diagnostiky celiakie (Green a Jabri, 2003; Murray a Green, 1999).

Podľa rozsahu poškodenia črevnej sliznice Marsh (1992) klasifikoval štyri stupne celiakie. U typu I (Marsh I) sa opisuje normálna architektúra klkov, v sliznici je zvýšená infiltrácia intraepitelových lymfocytov (IELs). Za fyziologickú hodnotu sa pokladá, ak na 100 enterocytov pripadá 25 lymfocytov (Hayat et al., 2002). Keď je počet vyšší než 30 IELs/100 enterocytov, považuje sa tento stav za abnormálny. Zvýšený počet IELs sa považuje za citlivý, aj keď nešpecifický marker celiakie. Zvýšená infiltrácia IELs môže byť zaznamenaná aj u ďalších autoimunitných ochorení, u tropickej sprue, u Crohnovej choroby, pri giardióze, akútnej infekčnej enteropatii (Marsh 1992; Lebwohl et al. 2003; Shah et al., 2000; Kakar et al., 2003; Ferguson a Murray, 1971). Marsh II je definovaný, ak je v histologickom náleze zvýšená infiltrácia lymfocytmi sprevádzaná hyperpláziou krypt. Marsh III bol podrobnejšie klasifikovaný do troch podskupín A až C, podľa miery atrofie klkov (Wahab, 2002). Väčšina diagnostikovaných pacientov (50-60%) spadá do tejto kategórie (Green et al., 2005). Marsh IIIA - čiastočná atrofia kĺkov, kĺky sú tupé a skrútené, pomer kĺkov a krypt je pod 1:1. Marsh IIIB - kĺky sú silne atrofické, avšak stále rozpoznateľné, pretrvávajú lymfocytóza, krypty sú rozšírené s patrnou mitotickou

aktivitou. Typ IIIC - totálna atrofia kĺvkov, hyperplastické krypty s ťažkou lymfocytózou, mukóza tenkého čreva je podobná rektálnej mukóze. Marsh charakterizoval aj stupeň IV- celková atrofia sliznice s hyperpláziou krypt (Marsh, 1992).

1.5.3. Liečba a obnova črevnej sliznice

K regenerácii architektúry črevnej sliznice dochádza pri dôslednom dodržiavaní bezlepkovej diéty. Minimálne 6-12 mesiacov po jej nasadení vymiznú sprievodné symptómy a znižuje sa hladina všetkých protilátok. Obnova sliznice môže trvať aj niekoľko rokov, závisí to od stupňa a rozsahu poškodenia. U detí je uzdravenie rýchlejšie než u dospelých (Uil et al.,1996; Grefte et al., 1988). U 65% pacientov došlo k zlepšeniu počas 2 rokov dodržiavania bezlepkovej diéty, u 85,3% do 5 rokov a u 89,9% u dlhodobejšie liečených. U pacientov so silným poškodením (Marsh IIIC) je obnova pomalšia a neúplná, i naďalej môžu pretrvávajú abnormality črevnej sliznice (Wahab, 2002a).

Stanovenie protilátok v sére je vhodnou skríningovou metódou v populácii rizikových skupín pre celiakiu. Do tejto skupiny spadajú jednostupňoví príbuzní pacientov s celiakiou, s diabetes mellitus 1. typu, s Downovým syndrómom a primárnou biliárnou cirhózou. Napomáhajú tiež monitorovať dodržiavanie bezlepkovej diéty.

1.5.3.1. Formy celiakie

Dermatitis herpetiformis (Duhringova choroba) sa pokladá za kožnú formu celiakie. Prejavuje sa svrbivými pl'uzgierovitými vyrážkami na vonkajšej strane kolena, laktí, na zápästí a na temene hlavy. Pacienti majú zvýšenú hladinu protilátok proti gliadínu a tTG2. Histologický nález z tenkého čreva poukazuje na rovnaké funkčné a morfológické zmeny ako u celiakie. Nasadením bezlepkovej diéty dochádza po niekoľkých mesiacoch k zlepšeniu slizničných aj kožných prejavov (Rodrigo, 2006).

Asi u 5% pacientov nedochádza k obnove črevnej sliznice. Ak pri dlhodobom dodržiavaní bezlepkovej diéty (vyše 12 mesiacov) naďalej pretrváva atrofia klkov, hyperplázia krypt a infiltrácia IELs, ide o *refraktórnu sprue (RS)*. Podľa fenotypu IELs sa rozlišujú 2 typy RS: typ I. s IELs $CD3^+CD8^+ TCR\beta^+$, u typu II. je 50% IELs aberantných s $CD3^+CD8^-TCR\beta^+$ fenotypom. Diagnóza sa musí potvrdiť histologickým nálezom (Cellier et al., 1998; 2000).

2. SLIZNIČNÝ IMUNITNÝ SYSTÉM

Povrch gastrointestinálneho, respiračného a urogenitálneho traktu, očnej spojivky a vývodov exokrinných žliaz tvorí asi 300m². Sliznice majú vytvorený vysoko účinný obranný systém, ktorého úlohou je rozlíšiť škodlivé antigény od neškodných.

Celiakia sa vyvíja v prostredí slizničného systému, ktorého integrálnou súčasťou sú rezidentné cirkulujúce zložky imunitného systému. Sliznica čreva je anatomicky tvorená jednou vrstvou epitelových buniek a v nej prítomných imunitných bunkách. Hlavnou úlohou slizničného imunitného systému je zabrániť vniknutiu patogénnych mikroorganizmov a patogénnych zložiek z povrchu sliznice do vnútorného prostredia organizmu. Slizničný imunitný systém má vyvinuté regulačné mechanizmy, ktoré eliminujú nebezpečné antigény (mechanizmom antigénnej exklúzie), alebo navodzujú orálnu toleranciu proti komenzálnym mikroorganizmom a potravinovým antigénom (Singh et al., 2001). Pri celiakii nastáva porušenie orálnej tolerancie proti gluténu.

Do patogenetických mechanizmov celiakie sú zapojené obe zložky imunitného systému, jak adaptívna (T a B-bunkami mediovaná), tak aj prirodzená imunita (Maiuri et al., 2003; Hüe et al., 2004; Meresse et al., 2004).

2.1 Adaptívna imunita

MALT (lymfoidné tkanivo asociované s mukózou) je tvorený T a B lymfocytmi, ktoré môžu byť zoskupené v lymfoidných folikuloch (Payerove plaky v čreve), alebo sú rozptýlené v epiteli (IELs) a v lamina propria (Ogra et al., 1999).

2.1.1 T- lymfocyty

T-lymfocyty sa vyvíjajú v týmuse, do krvi prestupujú ako naivné T-lymfocyty, migrujú do lymfoidných tkanív, kde sú aktivované cudzorodými antigénmi v komplexe s MHC predkladanými na povrchu antigén prezentujúcich buniek. Vzniká subpopulácia efektorových a pamäťových buniek.

T-lymfocyty recirkulujúce v krvi aj v tkanive sa rozdeľujú na pomocné T_H ($CD3^+CD4^+$) a cytotoxické T_C ($CD3^+CD8^+$) bunky. Podľa typu nesúceho TCR receptoru sa rozdeľujú na $\alpha\beta$ alebo $\gamma\delta$. Až 95% lymfocytov je $\alpha\beta$ typu, zvyšných 5% nesie $\gamma\delta$ reťazec. Minoritná subpopulácia $\gamma\delta$ T-lymfocytov je zväčša fenotypu $CD3^+CD4^-$, $CD8^-$ a rozpoznáva antigény nepeptidovej povahy bez účasti antigén prezentujúcich buniek (APC) a HLA molekúl. Na základe rozdielnej distribúcie a funkcie sa môžu T-bunky deliť do 2 skupín: jedna skupina sa nachádza v lymfatickom tkanive a druhá medzi epitelovými bunkami kože a čreva a zrejme sú súčasťou imunologického dohľadu (Buc, 2001). Ich zvýšený počet je pozorovaný pri autoimunitných chorobách.

2.1.1.1. Intraepitelové lymfocyty

IELs sa nachádzajú v epiteli kože a slizníc. Sú fenotypovo heterogénne. Rozlišujú sa 2 základné populácie, jedna nesie $\alpha\beta^+$ T bunkový receptor, druhá $\gamma\delta^+$ T-receptor. Počet $\alpha\beta^+$ T-buniek sa zvyšuje pri reakcii na antigénny podnet alebo pri strese. Úloha $\gamma\delta^+$ buniek nie je úplne objasnená, mohli by zohrávať určitú regulačnú úlohu pri imunitných reakciách. (Collin et al., 2005).

Väčšina IELs je $CD3^+CD8^+$, nesú $\alpha\beta^+$ T-receptor, s $CD45R0^+$ fenotypom, s adhezívnymi molekulami typu integrínov ($\alpha4\beta7$) a cytoplazmatickými granulami s perforínom, ktoré sa podieľajú na bunkami mediovanej cytotoxicite. U myši bola opísaná subpopulácia nesúca homodimér $CD8\alpha\alpha$, ktorá sa bežne nevyskytuje v cirkulácii (Ogra et al., 1999; McDonald, 1998; Štěpánková et al., 1998).

Intraepitelové T-lymfocyty spolu s epitelovými bunkami sa podieľajú na zápalových reakciách, ako sú nešpecifické črevné zápaly, Crohnova choroba a celiakia (Tlaskalová-Hogenová et al., 1995). Charakteristickým znakom celiakie je zvýšený počet intraepitelových TCR $\alpha\beta^+$ a $\gamma\delta^+$ T-buniek. Zvýšený počet $\gamma\delta^+$ T-buniek nie je typický fenomén len u celiakie, bol pozorovaný aj pri alergii na mlieko, post-enteritíde ale aj u zdravých jedincov (Spencer et al., 1991; Brandtzaeg et al., 1998; Collin et al., 2005). Napriek tomu, v prípade chýbajúcej atrofie, je vyšetrenie ich počtu nápomocné pri stanovení diagnózy celiakie (Mäki et al., 1991).

Atrofia kľkov súvisí s apoptózou enterocytov vedúcou k deštrukcii epitelu (Ciccocioppo et al., 2001). Jedným z možných mechanizmov je zabíjanie epitelových buniek cez systém perforín/granzým (Di Sabatino et al., 2001). Apoptóza môže byť spustená interakciou NKG2D receptora a CD94 na povrchu NK buniek a CD8⁺ cytotoxických T-lymfocytov a jeho ligandu MICA (neklasická-HLA molekula) a HLA-E na povrchu epitelových buniek. U zdravých jedincov len veľmi malé percento enterocytov exprimuje na svojom povrchu MICA, jeho nízka expresia chráni epitelové bunky pred IELs. MICA a HLA-E môžu byť indukované stresom a interferénom (IFN)- γ (Jabri et al., 2000; Maiuri et al., 2001). Hüe a spoluprac. (2004) potvrdili, že MICA je po *in vitro* stimulácií gliadinom a jeho peptidom (p31-49) silne exprimovaný na povrchu epitelových buniek u celiakálnych pacientov a je rozpoznávaná NKG2D receptorom na povrchu cytotoxických IELs. Až 87% epitelových buniek u pacientov s RS je MICA pozitívnych, interakcia NKG2D/MICA je zrejme hlavným mechanizmom masívneho poškodenia črevného epitelu (Hüe et al., 2004). IELs izolované z pacientov s RS (aberantné CD3⁻CD7⁺NKG2D⁺) zabíjali MICA-pozitívne HT-29 a HeLa epitelové línie (Di Sabatino et al., 2001). U refraktórnej spruce pretrvávajú aktivácia IELs aj po nasadení bezlepkovej diéty, u týchto pacientov je vysoké riziko vzniku T- bunkových lymfómov (Meijer et al., 2004).

2.1.1.2. CD4⁺ T- lymfocyty v lamina propria (LP)

CD4⁺ T-lymfocyty sú prekursorom pomocných T-buniek, ktoré sa podľa produkovaných cytokínov rozdeľujú na T_{H1} (IL-2, IFN- γ , lymfotoxín), T_{H2} (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13), T_{H3} (IL-10, TGF- β). Subpopulácie sa polarizujú z T_{H0} klonov (produkujú zmes cytokínov obidvoch typov).

Hlavnú úlohu v imunopatogenetickom mechanizme celiakie zohrávajú mukózne CD4⁺ α/β T-lymfocyty v LP, ktoré produkujú zápalové cytokíny T-bunkového typu s T_{H1}/T_{H0} profilom (Sollid et al., 2002; Schuppan et al., 2003; Cerf-Bensussan et al., 2003). Zvyšuje sa počet gluténom aktivovaných CD4⁺ T-buniek v lamina propria a CD8⁺ T-buniek v epiteli (Shan et al., 2002; Sollid et al., 2002). V tkanive tenkého čreva sa zvyšuje hladina cytokínov, najmä IFN- γ , ktorý aktivuje ďalšie typy buniek zahrňujúcich i bunky prirodzenej imunity (Nilsen et al., 1995). IFN- γ spolu s tumor

nekrotizujúcim faktorom (TNF)- α výrazne prispieva k zvýšeniu epitelovej permeability (Madara a Stafford, 1989). Glutén-špecifické T-bunky boli izolované z periférnej krvi celiakálnych pacientov (Ráki et al., 2007).

Väčšina glutén-špecifických T-buniek rozpoznáva v alkohole rozpustné frakcie gliadinu. Na základe štúdií na T-bunkových klonoch izolovaných z črevnej mukózy celiakálnych pacientov boli opísané imunogénne gliadinové epitopy (Sjöström et al., 1998; Molberg et al., 1998; Arentz-Hansen et al., 2000; 2002; Sollid et al., 2000). Dva z nich sú HLA-DQ2 restričné peptidy α -9(QLQPFQQLPY) a α -2(PQPQLPYPQPQLPY), zdieľajú spoločný motív 7 aminokyselín (PQPQLPY). T-lymfocyty z celiakálnych pacientov rozpoznávajú prevažne peptidy na N-terminálnom konci α -gliadinu (prezentované HLA-DQ2 alebo DR7 molekulami) (Franco et al., 1994; Johansen et al., 1996).

Prehľad známych peptidov, ktoré sú schopné stimulovať T-bunky je uvedený v tab. č. 1 (Koning, 2005; Stepniak a Koning, 2005).

Gliadinové peptidy stimulujúce T-bunky

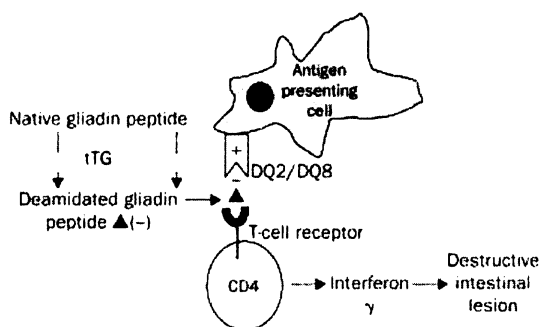
Peptid	Sekvencia	Zdroj proteínu	HLA-DQ	tTG závislosť
Glia- α 2	PQPQLPYPQ	α -gliadin	DQ2	+++
Glia- α 9	PFQPFQQLPY	α -gliadin	DQ2	+++
Glia- α 20	FRPQQPYPQ	α -gliadin	DQ2	+++
Glia- α	QGSFQPSQQ	α -gliadin	DQ8	+
Glia- γ 2	FPQQPQQPF	γ -gliadin	DQ2	+++
Glia- γ 1	PQQSFPQQQ	γ -gliadin	DQ2	+++
Glia- γ 30	IIQPQQPAQ	γ -gliadin	DQ2	+
Glt-156	FSQQQQSPF	LMW-glutenin	DQ2	+++
Glt-17	FSQQQQQPL	LMW-glutenin	DQ2	+++
Glt	QGYYP TSPQ	HMW-glutenin	DQ8	-
Glu-5	QLPQQPQQF	Unknown	DQ2	+++

Tabuľka č.1: Deamidované aminokyseliny sú zvýraznené. +++ peptidy sú rozpoznávané T-bunkami po demidácii tTG2; + deamidácia tTG2 zvyšuje T-stimulačnú kapacitu, - peptid je rozpoznávaný T-bunkami nezávisle na deamidácii tTG2 (Koning, 2005; Stepniak a Koning, 2005)

Peptid p31-43 pochádzajúci z α -gliadinu nie je rozpoznávaný CD4⁺ intestinálnymi T-lymfocytmi, ale vyvoláva poškodenie tenkého čreva u celiakálnych

pacientv a u pacientov v remisii (Maiuri et al., 2003; Fraser et al., 2003; Sturgess et al., 1994). Stimuluje makrofágy k produkcii cytokínov a aktivuje dendritické bunky v lamina propria, zvyšuje u nich expresiu IL-15, ktorý je podstatný pre aktiváciu a zachovanie pamäťových T- buniek (Maiuri et al., 1996; 2000; 2003; Jelínková et al., 2004).

Peptidy prestupujú do lamina propria tenkého čreva pravdepodobne cez porušené medzibunkové spoje. Glutamín týchto peptidov je pôsobením tTG2 v čreve deamidovaný na kyselinu glutámovú. Deamidáciou glutamínových zvyškov získavajú gliadinové peptidy negatívny náboj a zvyšuje sa ich väzobná aktivita na HLA-DQ2 alebo HLA-DQ8 a tým sa zvyšuje aj ich T-stimulačná kapacita (Obr. č 2) (Green a Jabri, 2003; van de Wal et al., 1998; Sollid, 1998; Sjöstrom et al., 1998; Molberg et al., 1998; Shan et al., 2002; Stepniak a Koning, 2005).



Obrázok č. 2 (Green a Jabri, 2003)

Nedávno bola opísaná ďalšia efektorová subpopulácia lymfocytv $CD4^+ T_H17$, ktorá sa diferencuje pod vplyvom IL-23, IL-6 a transformujúceho rastového faktora (TGF)- β 1. Tieto bunky produkujú IL-6, TNF- α , IL-17A a IL-17F cytokíny a sú pravdepodobne zodpovedné za zápalovú imunitnú odpoveď u mnohých autoimunitných ochorení (Kikly et al., 2006). IL-17 produkovaný hlavne aktivovanými T-bunkami stimuluje fibroblasty, endotelové bunky, makrofágy a epitelové bunky k produkcii prozápalových mediátorov (IL-1, IL-6, TNF- α , metaloproteínáz a chemokínov), ktoré indukujú zápal (Kolls a Linden, 2004; Nakae et al., 2003).

Zvláštnu skupinu tvoria regulačné T bunky - Treg ($CD4^+CD25^+$), T_H3 a Tr1, ktoré majú tlmivý účinok na vznik autoimunitných reakcií, regulujú autoreaktívne lymfocyty, ktoré unikli negatívnej selekcii v týmuse (Thornton a Shevach, 2000).

Produkujú prevažne IL-10, TGF- β a prostaglandíny. Inhibujú hlavne T_H1 imunitnú odpoveď. Regulujú cez neznámy mechanizmus, vyžadujú priamy kontakt bunka-bunka, alebo cez účinok produkovaných cytokínov (Sakaguchi et al., 1995; Akbari et al., 2003; Kretschmer et al., 2005). Gianfrani a spoluprac. izolovali z črevnej mukózy celiakálnych pacientov v remisii gliadin-špecifické T-bunky, ktoré kultivovali v prostredí s gliadinom a s IL-10. Získali klon T-buniek s T_H0 cytokínovým profilom. Z biopsii sa im podarilo izolovať aj T-regulačné bunky Tr1, ktoré boli anergické, po stimulácii gliadinom produkovali IL-10 a IFN- γ , ale len málo IL-2 a IL-4 a potlačali proliferáciu izolovaných patogénnych T_H0 bunkových klonov, zistenie prítomnosti Tr1 buniek v čreve by mohlo viesť k novým terapeutickým prístupom v celiakii (Gianfrani et al., 2006).

2.1.2. B lymfocyty

Diferencujúce sa B-lymfocyty sú prítomné v germinálnych centrách lymfoidných folikulov. V lamina propria sú prezentované hlavne plazmatickými bunkami produkujúcimi prevažne IgA, v menšej miere aj IgM a IgG. B lymfocyty môžu fungovať aj ako APC, komplexy tTG-gliadin sú endocytované a prezentované s HLA-DQ príbuzným T-lymfocytom (Sollid et al, 1997; Tlaskalová-Hogenová et al., 2002).

Boli charakterizované imunodominantné B bunkové epitopy α/β a γ -gliadinu rozpoznávané IgA a IgG protilátkami pacientov s celiakiou (Kasarda et al., 1984; Okita et al., 1985; Krupičková et al, 1999, Osman et al., 2000). Osman a spoluprac. použitím syntetických peptidov identifikovali niekoľko epitopov α -gliadinu charakterizovaných prítomnosťou spoločného motívu QQQPFP a jeden repetitívny epitop v γ -gliadine (Osman et al, 2000).

V našom laboratóriu boli študované B-bunkové epitopy gliadinu a autoantigénu kalretikulínu, ktoré boli rozpoznávané IgA autoprotiátkami v sére celiakálnych pacientov a pacientov s asociovanými autoimunitnými a črevnými ochoreniami (Karská et al., 1995, Krupičková et al., 1999, Sánchez et al., 2000). Sánchez a spoluprac. (2003) ďalej metódou PEPSCAN, použitím dodekapeptidov kalretikulínu,

mapovali epitopy B-lymfocytov pacientov s celiakiou a s autoimunitnými ochoreniami pečene a preukázali radu spoločných a pre nemoc špecifických imunodominantných epitopov kalretikulínu.

2.2. Zložky prirodzenej imunity

Prirodzená zložka imunitného systému je v mukóze zastúpená epitelovými bunkami, makrofágmi, dendritickými bunkami, NK bunkami, mastocytmi, fibroblastami, neutrofilmi, eozinofilmi a ich humorálnymi produktmi (cytokíny, chemokíny, zložky komplementu, lyzozým, laktoferín), charakteristická je aj produkcia antimikrobiálnych proteínov a peptidov (Mestecký et al., 2005; Tlaskalová-Hogenová, 2002).

2.2.1. Epitelové bunky

Epitelové bunky tenkého čreva sú vysoko polarizované bunky s apikálnym a bazolaterálnym koncom. Sú to krátko žijúce bunky, ich obnova sa uskutočňuje každých 3-5 dní. Základným predpokladom pre ich správnu funkciu je celistvosť epitelovej vrstvy (Tlaskalová-Hogenová, 1995). Úzko kooperujú s intraepitelovými T-lymfocytmi a spoločne tvoria prvú obrannú líniu pred vstupom cudzorodých antigénov do organizmu. Reagujú navzájom prostredníctvom E-kadherínových adhezívnych molekúl epitelových buniek a integrínov z podrodiny β_7 ($\alpha_E\beta_7$) lymfocytov. Zabezpečujú interakciu organizmu s vonkajším prostredím a extracelulárnou matrix, konštitutívne exprimujú MHC molekuly I. aj II. triedy, ich expresia sa zvyšuje po stimulácii napr. IFN- γ . Produkujú široké spektrum cytokínov a chemokínov (IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, faktor stimulujúci rast kolónií granulocytov a makrofágov (GM-CSF), TGF- β), ktoré napomáhajú pri regulácii slizničnej imunity. Majú určitú úlohu pri edukácii IELs nezávislých na týmuse (Eckmann, 1993; Stadnyk, 2004; Sartor, 1994). Intestinálne epitelové bunky exprimujú aj neklasické molekuly MHC I, ktoré napomáhajú prenosu signálov z lúmenu čreva k lymfocytom v lamina propria a robia z nich tak unikátne APC

v čreve. Spoločne s molekulami CD1d, MICA/B, HLA-E, FcRn, MR1 a UL16-viažúcim proteínom sa podieľajú na aktivácii lamina propria T-lymfocytov a na regulácii zápalu (Dahan et al., 2007).

Enterocyty viažu polymérne imunoglobulíny (IgA, IgM) produkované plazmatickými bunkami v lamina propria a transportujú ich do lúmenu čрева ako sekrečné imunoglobulíny (Brandtzaeg, 1995).

Zvláštnu úlohu medzi epitelovými bunkami majú Panethove bunky a membránové epitelové bunky (M-bunky). Panethové bunky sú sekrečné epitelové bunky produkujúce látky s antimikróbnyimi účinkami (lyzozým, fosfolipáza A2, defenzíny) (Huttner a Bevins, 1999). M-bunky, pohlcujú antigén z lúmenu čрева a transportujú ho do lymfatických folikulov, kde aktivujú T-lymfocyty a tým indukujú slizničnú imunitu.

Aktivované T-lymfocyty v epiteli tenkého čрева prostredníctvom produkovaných cytokínov priamo pôsobia na epitelové bunky. V poslednej dobe sa pozornosť zameriava na úlohu IL-15, ktorý zrejme zohráva jednu z významných úloh v patogenéze celiakie. IL-15 je pleiotropný cytokín, ktorý spoločne zdieľa s IL-2 dva receptorové reťazce (IL-2R β a γ reťazec) (Giri et al., 1994). Exprimujú sa však na rozdielnych bunkách, zatiaľ čo IL-2 je exprimovaný na povrchu aktivovaných T-lymfocytov, IL-15 je exprimovaný viacerými typmi buniek, vrátane monocytov, makrofágov a epitelových buniek (Waldmann a Tagaya, 1999; Perera et al., 2000). IL-15 stimuluje produkciu IFN- γ intraepitelovými lymfocytmi, zvyšuje ich cytotoxicitu a prispieva k poškodeniu epitelu (Meresse et al., 2004). Súčasne oba cytokíny (IL-2 a IL-15) stimulujú T-bunkovú proliferáciu (Li et al., 2001).

Mention a spoluprac. (2003) detekovali zvýšenú expresiu IL-15 v čreve pacientov s aktívnou formou celiakie, ale nebola zaznamenaná u Crohnovej choroby. IL-15 indukuje expresiu MICA v biopsiách pacientov aj zdravých kontrol, a tým neustále aktivuje adaptívnu imunitu (Maiuri et al., 2000).

Intestinálne epitelové bunky sú rozpoznávané IgA i IgG autoprotílátkami v sére pacientov a v kultivačnom médiu z jejunálnych biopsií (Tlaskalová et al., 1990; Krupičková et al., 1999; Sanchez et al. 2000).

2.2.2. Antigén prezentujúce bunky

Profesionálne antigén prezentujúce bunky, medzi ktoré patria monocyty, makrofágy a dendritické bunky, zohrávajú v lamina propria významnú úlohu pri udržiavaní orálnej tolerancie. Za fyziologických podmienok exprimujú nízku hladinu povrchových molekúl B7 (CD80) a B7.2 (CD86), ktoré sú kostimulačnými molekulami T-buniek (Qiao et al., 1996).

2.2.2.1. Mononukleárno-fagocytový systém

Zástupcami mononukleárno-fagocytového systému sú makrofágy. Za nezrelú formu makrofágov sa označujú monocyty, ktoré sú prítomné v krvnom obeh. Na základe povrchovej expresie diferenciačných znakov sa monocyty rozdeľujú na „klasické“ (CD14^{hi}CD16⁻), ktoré tvoria 90-95% z celkového množstva monocytov u zdravých jedincov a „neklasické“, alebo tiež označované ako „prozápalové“ (CD14⁺CD16⁺(FcγIII pozitívne)), ktoré produkujú menej IL-10 a viac TNF-α. V porovnaní s klasickými monocytmi majú vyššiu expresiu HLA-DR. U zdravých jedincov táto subpopulácia predstavuje 5-10% z celkového počtu krvných monocytov a sú akýmsi prekursorom migrujúcich DCs (Frankenberger et al., 1996; Belge et al., 2002; Randolph et al., 2002). Jednotlivé subpopulácie sa líšia aj expresiou povrchových molekúl. Receptory pre CCR5 a CX3CR1 sú silne exprimované u CD14⁺CD16⁺ buniek, expresia CCR2 a nízka expresia CX3CR1 sú typické pre CD14^{hi}CD16⁻ bunky. Expresia rozdielnych chemokínových receptorov a adhezívnych molekúl v jednotlivých subpopuláciách môže mať významnú úlohu v ich odlišnej migrácii a citlivosti na jednotlivé infekcie (Weber et al., 2000; Geissmann et al., 2003).

Makrofágy sa nachádzajú v celom organizme, v rôznych tkanivách a orgánoch, majú spoločný pôvod a rovnakú funkciu. Tvoria asi 5% z celkovej populácie leukocytov. Makrofágy sa vyvíjajú z prekursorovej bunky z kostnej drene (monoblast). Pod vplyvom rastových faktorov sa diferencujú na promonocyty a ďalej

na monocyty. Po 3 dňoch v cirkulácii sa monocyty usídľujú v tkanivách kde diferencujú na makrofágy. Sú to dlho žijúce bunky schopné lokálnej proliferácie.

Makrofágy patria medzi prvé bunky, ktoré sa infiltrujú na miesto zápalu. V odpovedi na mikrobiálne stimuly a IFN- γ produkujú prozápalové cytokíny a chemokíny (IL-12, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, zápalový proteín makrofágov (MIP)-1 α). Zohrávajú dôležitú imunoregulačnú úlohu jak v prirodzených, tak aj v adaptívnych imunitných obranných mechanizmoch. Zúčastňujú sa fagocytózy, syntetizujú imunoregulačné látky (monokíny), zložky komplementu a fungujú ako APC (Buc, 2001).

2.2.2.2. Dendritické bunky

Dendritické bunky sa vyvíjajú z progenitorovej bunky CD34⁺ v kostnej dreni, ktoré diferencujú na krvné prekurzory DCs (CD11⁺CD14⁺). Pod vplyvom IL-4 a GM-CSF alebo TNF- α sa diferencujú na nezrelé DCs (CD11⁻,CD11⁺CD14⁻). Nezrelé tkanivové DCs majú vysokú fagocytárnu schopnosť a po aktivácii migrujú do lymfatických uzlín, kde aktivujú T-lymfocyty. Prostredníctvom špecifických receptorov reagujú na široké spektrum chemokínov. Po stimulácii antigénom podliehajú funkčným a fenotypovým zmenám. V priebehu vyzrievania zvyšujú expresiu molekúl CD80, CD86, CD40, HLA-DR, CCR7, znižuje sa ich fagocytárna schopnosť. V lymfatických folikuloch slizníc sa nachádzajú dva typy DCs: subpopulácia nezrelých DCs tesne pod epitelom folikulov a subpopulácia diferencovaných DCs v interfolikulárnej oblasti, kde sú v kontakte s T-bunkami. Dendritické bunky prispievajú k polarizácii naivných T-lymfocytov. Štúdie v poslednej dobe ukazujú, že výsledná imunitná odpoveď na antigén (indukcia tolerancie alebo stimulácia) závisí od zúčastnených subpopulácii DCs (Banchereau et al., 2000). Neinfekčné antigény sú prezentované nezrelými DCs, ktoré indukujú T_H2 alebo T_H3 polarizáciu a navodzujú orálnu toleranciu. Patogénne antigény sú prezentované diferencovanými DCs, indukujúcimi T_H1 imunitnú odpoveď, vedúcu k zápalu alebo k rezistencii proti intracelulárnym infekciám (Tlaskalová-Hogenová et al. 2007).

2.2.3. NF- κ B systém

Signálne dráhy predstavujú sieť kaskád, ktoré zabezpečujú odpoveď bunky na rozličné stimuly, ako sú napr. cytokíny, rastové faktory alebo stres. Jedna z významných signálnych dráh vedie cez NF- κ B transkripčný faktor, ktorý indukuje expresiu mnohých génov. Reguluje apoptózu, migráciu buniek, produkciu zápalových cytokínov (IL-1 β , TNF- α , GM-CSF, IL-2, IL-11, IL-17), chemokínov (IL-8, RANTES, MIP-1 α , proteín atrahujúci monocyty (MCP)-2), enzýmov (indukovateľnú NO syntázu, cyklooxygenázu) a adhezívne molekuly (VCAM-1, ICAM-1, E-slektin) a receptory (receptor pre IL-2). Pozostáva z 5 podjednotiek: NF- κ B1 (p105/p50), NF- κ B2 (p100/p52), RelA (p65), RelB a c-Rel. Najčastejšie sú do signálnych dráh zapájené diméry z podjednotiek p65 a p50 alebo s p52 (Siebenlist et al., 1994; Baeuerle a Baltimore, 1996). V cytoplazme buniek sa diméry nachádzajú v neaktívnom komplexe spoločne s inhibítorom I κ B. Po stimulácii je I κ B podjednotka fosforylovaná, ubikvitinovaná a následne degradovaná v proteázovom komplexe. Uvoľnený dimér translokuje do jadra a viaže sa na DNA špecifický promótor, čím spúšťa transkripciu génov (Barnes, 1997).

3. CIEĽ PRÁCE

1. Analyzovať a porovnať stimulačný účinok gliadinu a jeho peptidov a iných potravinových antigénov (ako je sója a ovalbumín) na bunky ľudských monocytárných línií, ktoré sa od seba líšia stupňom diferenciácie. Sledovať produkciu cytokínov a chemokínov a charakterizovať signálnu dráhu indukovanú gliadinom.
2. Študovať odpoveď monocytov izolovaných z periférnej krvi pacientov s aktívnou formou celiakie (CD), pacientov na bezlepkovej diéte (GFD) a zdravých darcov (HD) na peptické fragmenty gliadinu. Porovnať produkciu cytokínov a chemokínov medzi jednotlivými skupinami monocytov a analyzovať vplyv pridaného IFN- γ . Určiť vplyv genetickej predispozície na kvantitu produkovaných cytokínov u zdravých jedincov a expresiu aktivačných a maturačných znakov buniek. U pacientov liečených bezlepkovou diétou charakterizovať vzťah výšky hladiny produkovaných protilátok proti gliadinu a tTG2 na hladiny gliadinom indukovaných cytokínov.
3. Analyzovať ochranný účinok materského mlieka na vznik celiakie. Charakterizovať a monitorovať zmeny cytokínového profilu materského mlieka odoberaného od matiek v rôznych časových intervaloch po pôrode.

4. VÝSLEDKY

Zložky prirodzenej a adaptívnej imunity spolu úzko kooperujú. Antigen prezentujúce bunky na základe povahy antigénov rozhodujú, ktorým smerom bude imunitná odpoveď indukovaná. V našom laboratóriu sme zistili, že peptické štepy gliadinu a jeho peptidy majú výnimočnú schopnosť stimulovať myšie peritoneálne makrofágy k produkcii chemokínov, cytokínov a indukovateľnej NO syntázy. Bol identifikovaný dodekapeptid B (FQQPQQQYPSSQ), ktorý výrazne indukoval makrofágy k produkcii TNF- α , IL-10, a RANTES (Tučková et al., 2002).

Zaujímalo nás, či má gliadin rovnaký vplyv aj na ľudské monocyty. V našej práci sme sledovali stimulačný účinok potravinových proteínov (sója, ovalbumínu, gliadinu a jeho peptidov) na produkciu cytokínov a chemokínov (IL-8 a TNF- α) ľudskými monocytárnymi líniami THP-1 a U937 a ovplynenie tejto aktivity IFN- γ , ktorý je hlavným cytokínom pri celiakii. IL-8 a TNF- α boli stanovené v kultivačnom médiu metódou ELISA testu. Aby sme sa čo najviac priblížili podmienkam, aké sú v gastrointestinálnom trakte, použité proteíny boli opracované pepsínom (naviazaným na agarózou) v kyslom prostredí (pH 1.8). Monocytové/makrofágové línie THP-1 (CD14⁺CD68⁺) a U937 (CD14⁺CD68⁺) sa líšia od seba stupňom diferenciácie. Neštiepený gliadin má len slabý vplyv na produkciu IL-8 a TNF- α línou THP-1. Jeho peptické štepy vyvolávali signifikantne vyššiu produkciu oboch cytokínov (100-500 μ g/ml), po stimulácii spoločne s IFN- γ (150 U/ml) sa produkcia ešte viac zvýšila. Naštiepená sója a ovalbumín nemali žiaden účinok na produkciu IL-8 a TNF- α ani v kombinácii s IFN- γ . Sledovali sme aj vplyv prestimulácie IFN- γ . Produkcia IL-8 a TNF- α bola najvyššia po stimulácii gliadinovými fragmentami v kombinácii s IFN- γ , po 2h a 24h prestimulácii IFN- γ v porovnaní s neprestimulovanými bunkami sa ešte viac zvýšila.

Menej diferencované U937 bunky produkovali po stimulácii gliadinovými fragmentami len veľmi nízku hladinu IL-8, ktorá sa zvýšila po 24h prestimulácii IFN- γ . Produkcia TNF- α nebola detekovateľná.

Súčasne s celou zmesou gliadinových peptidov sme sledovali produkciu IL-8 THP-1 bunkami po stimulácii syntetickým peptidom 33-mérom, peptidom p31-43, a B-peptidom. Produkcia IL-8 stimulovaná 33-mérom dosahovala len 20% a B

peptidom 60% odpoveď zo stimulačnej kapacity celkovej zmesi gliadinu a p31-43. TNF- α produkcia po stimulácii B peptidom dosiahla len 10% a u p31-43 len 40% účinnosť v porovnaní s gliadinovými fragmentami. 33-mér neindukoval produkciu TNF- α ani po stimulácii spoločne s IFN- γ . Jednotlivé gliadinové peptidy sa líšia svojou stimulačnou kapacitou, najsilnejším aktivátorom ľudskej monocytárnej línie THP-1 je celá zmes gliadinu.

Ako pozitívnu kontrolu sme použili LPS (1 μ g/ml). Odpoveď na LPS (obdobne ako na gliadin) bola u línie THP-1 a U937 odlišná. THP-1 produkovali signifikantne vyššiu hladinu IL-8 (558.7 \pm 23.7 pg/ml) a TNF- α (107.3 \pm 13.0 pg/ml) než U937 línia (IL-8: 322.6 \pm 16.1 pg/ml; TNF- α : 33.5 \pm 5.2 pg/ml). Zaujímalo nás, či expresia CD14 molekuly, ktorá je vysoko exprimovaná u THP-1, ale nie u U937 línie, má vplyv na produkciu cytokínov. Monoklonálna protilátka anti-CD14 znižovala produkciu IL-8 u THP-1 buniek po stimulácii LPS, ale nemala žiaden efekt na aktiváciu buniek gliadinovými fragmentami.

Po stimulácii THP-1 buniek gliadinovými fragmentami (500 μ g/ml) sa zvyšovala väzobná aktivita podjednotiek (p50 a p65) NF- κ B signálnej dráhy. Pre potvrdenie zapojenia NF- κ B do signalizačných mechanizmov po stimulácii gliadinom (500 μ g/ml) sme sledovali efekt inhibítorov NF- κ B: sulfasalazinu, PDTC a TPCK. Sulfasalazin inhibuje fosforyláciu I κ -B (Wahl et al., 1998), PDTC (pyrrolidone dithiocarbamate) blokuje disociáciu NF- κ B/I κ -B komplexu (Snyder et al., 2002), TPCK (L-1-tosyloamido-2-phenyl chloromethyl ketone) bráni degradácii I κ -B (Baldwin, 1996). PDTC (0.5 μ M) a sulfasalazin (2 mM) inhibovali väzobnú aktivitu p65 podjednotky, ale len slabo p50; TPCK (5 μ M) inhiboval väzobnú aktivitu podjednotky p50 výraznejšie než p65 podjednotky.

Sulfasalazin znižoval produkciu IL-8 THP1-bunkami, jeho efekt bol dávkovo závislý, v koncentrácii 0,1 mM bola pozorovaná 15% inhibícia a 2 mM mal až 90% účinnosť. PDTC pôsobil už pri koncentrácii 0,1 μ M. TPCK mal pri koncentrácii 1 μ M 32% efekt a 25 μ M úplne inhiboval produkciu IL-8.

Pri aktivácii NF- κ B sa I κ B α fosforyluje a degraduje. Pomocou Western Blotu sme sledovali fosforyláciu I κ B α u THP1-buniek po stimulácii štiepeným gliadinom samotným a v kombinácii s IFN- γ , v porovnaní s nestimulovanými bunkami sa

fosforylácia I κ B α zvyšovala. Tieto výsledky potvrdzujú zapojenie NF- κ B do signalizačnej dráhy ľudských monocytov po stimulácii gliadinom.

Naše výsledky ukázali, že gliadin na rozdiel od iných potravinových antigénov, ako je sója a ovalbumín, je schopný priamo stimulovať ľudské monocyty k produkcii IL-8 a TNF- α . T-bunkový cytokín IFN- γ , ktorý je hlavný cytokín u celiakálnych pacientov, má synergistický účinok na produkciu cytokínov a chemokínov. Zvýšená produkcia IL-8 (chemoatraktant imunitných buniek) a TNF- α (vyvoláva produkciu metaloproteináz) aktivovanými monocytmi/makrofágmi prispievajú k poškodeniu črevnej sliznice.

Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF- α through a mechanism involving NF- κ B. Jelínková L, Tučková L, Cinová J, Flegelová Z, Tlaskalová-Hogenová H. *FEBS Letters*; 571: 81-85, 2004

Aby sme lepšie pochopili úlohu prirodzenej imunity v celiakii, porovnávali sme odpoveď na gliadin medzi ľudskými monocytmi izolovanými z periférnej krvi zdravých darcov, aktívnych celiakov a pacientov na bezlepkovej diéte.

V jednotlivých skupinách monocytov sme použitím ELISA metódy v kultivačnom médiu merali spontánnu a gliadinom indukovanú produkciu IL-8 a TNF- α . Spontánnu produkciu IL-8 bola v skupine aktívnych celiakov a pacientov liečených bezlepkovou diétou vyššia (525 ± 404 pg/ml a 965 ± 682 pg/ml, $P > 0.05$) než u monocytov zdravých darcov (131 ± 202 pg/ml, $P < 0.001$). Po stimulácii IFN- γ (150U/ml) samotným nedošlo k výraznejšiemu zvýšeniu produkcie, v kombinácii spoločne s gliadinom (100 μ g/ml) sa zvýšila produkcia IL-8 u všetkých troch skupín. Monocyty celiakálnych pacientov produkujú viac IL-8 než monocyty zdravých darcov. Najvyššia produkcia bola v skupine aktívnych celiakov (3365 ± 2451 pg/ml). U pacientov na bezlepkovej diéte poklesla produkcia IL-8 (2645 ± 1723 pg/ml), avšak v porovnaní s produkciou monocytov u zdravých darcov (1046 ± 783 pg/ml) ostala štatisticky významne zvýšená ($P < 0.001$). Obdobné rozdiely medzi skupinami boli nájdené i v prípade produkcie TNF- α . Zaujímavé je, že pridaný IFN- γ nemal vplyv na produkciu IL-8, ale výrazne zvýšil produkciu TNF- α .

U krvných monocytov zdravých jedincov sme sledovali vplyv gliadinových fragmentov na fenotypové zmeny. Po kultivácii monocytov s gliadinovými fragmentami (100µg/ml) alebo s IFN-γ (150 U/ml), v porovnaní s nestimulovanými monocytmi, sa len mierne zvýšila expresia maturačných (CD83) a aktivačných (CD80, CD40) molekúl, ktoré predstavujú znaky dendritických buniek. Po stimulácii gliadinom v kombinácii s IFN-γ sa u monocytov výrazne zvýšila povrchová expresia molekúl CD80, CD86, CD40, a hlavne CD83. Inkubácia buniek v prítomnosti sóje a jej proteolytických fragmentov, na rozdiel od gliadinu, nevyvolala fenotypové zmeny na bunkovom povrchu, ani v kombinácii s IFN-γ.

Väčšina celiakálnych pacientov (95%) exprimuje antigén HLA-DQ2⁺. Zaujímal nás vplyv genotypu na produkciu IL-8 monocytmi zdravých darcov. Po stimulácii gliadinom a IFN-γ monocyty HLA-DQ2⁺ zdravých darcov produkovali 2 až 3-krát viac IL-8 než monocyty HLA-DQ2⁻ jedincov. Výsledky poukazujú na to, že monocyty s HLA-DQ2⁺ genotypom sú predisponovaní k vyššej produkcii IL-8.

Podobne ako u THP-1 línie, zaujímalo nás, či gliadinom indukovaná produkcia cytokínov monocytmi z periférnej krvi vedie tiež cez NF-κB signálnu dráhu. U monocytov aktívnych celiakov sa po stimulácii gliadinom zvýšila väzobná aktivita podjednotiek p50 a p65 ($P < 0.05$). Po inkubácii s inhibítorom TPCK sa väzobná aktivita redukovala u p50 podjednotky na 20% a u podjednotky p65 na 54%. NF-κB inhibítory TPCK (1-25 µM) a PDTC (1-10 µM) znižovali produkciu IL-8 a TNF-α. U monocytov zdravých darcov bola po stimulácii gliadinom zaznamenaná len slabá väzobná aktivita oboch podjednotiek, ktorú TPCK (25 µM/ml) úplne redukoval. Produkciu IL-8 a TNF-α inhiboval až na úroveň pozadia.

V tejto práci sme ukázali, že gliadinové fragmenty aktivujú monocyty celiakálnych pacientov a monocyty HLA-DQ2⁺ zdravých jedincov k zvýšenej produkcii prozápalových cytokínov a chemokínov. Zvýšené hladiny cytokínov aktivujú bunky prirodzenej imunity a tým ich zapájajú do patogenetických mechanizmov celiakie.

Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease.

Cinová J., Palová-Jelínková L, Smythies LE, Černá M, Pecharová B, Dvořák M, Fruhauf P, Tlaskalová-Hogenová H, Smith PD, Tučková L. *J Clin Immunol*; 27:201-209, 2007

Materské mlieko obsahuje veľa imunologických špecifických aj nešpecifických faktorov, vrátane imunitných buniek. U kojencov, ktorí ešte nemajú plne vyvinutý imunitný systém zabezpečujú ochranu pred infekčnými agens (Ogra, 1999; Tlaskalová-Hogenová et al., 1982). V materskom mlieku sa nachádzajú imunologicky aktívne zložky, ako je sekrečný IgA, antimikróbne faktory, cytokíny a rastové faktory. Jedným z nich je aj rastový epidermový faktor (EGF), ktorý sa podieľa na proliferácii a diferenciacii epitelových buniek. EGF bol detekovaný v rôznych telových tekutinách, vrátane kolostra a materského mlieka (Goodland et al, 1996; Xu, 1996). Štěpánková a spoluprac. vypracovali experimentálny model celiakie na krysách, ktoré boli kŕmené včasne po narodení gliadinom spolu s IFN- γ . Na tomto modeli demonštrovali ochranný vplyv materského mlieka pred rozvojom celiakie a ukázali, že jeden z faktorov, ktorý je v tomto mechanizme významný je EGF (Štěpánková et al., 2003). Zdá sa, že kojenie má vplyv na nástup celiakie a ukazuje sa, že u detí, ktoré sú prikrmované a zároveň aj kojené je nižšie riziko vzniku celiakie. Pre nás bolo zaujímavé vedieť, aké je zloženie kolostra a materského mlieka, či sa ich zloženie postupom času mení a či by jednotlivé zložky mohli mať ochranný účinok pred rozvojom celiakie.

Podieľali sme sa na pokusoch, v ktorých bolo odobraných 31 vzoriek kolostra (prvých 72 h po pôrode), alebo 22 vzoriek mlieka (72 h po pôrode) odobraných počas prvých 4 dní po pôrode. Použitím testov na stanovenie cytokínov (RayBio Human Cytokine Array V) sme sledovali zastúpenie jednotlivých proteínov v kolostre a v mlieku, ich koncentráciu a zmeny v časovo postupne odoberaných vzorkách. Jedna skupina vzoriek (17) bola odobraná počas prvých 2 dní po pôrode a boli použité array (na ktorých je možné detekovať až 79 rôznych proteínov v jednej vzorke. V druhej skupine bolo testovaných 42 proteínov (RayBio Human Cytokine Array III), pozostávala zo 14 vzoriek kolostra, kde od jednej matky bolo niekoľko odberov v rôznych časových intervaloch. Použitím cytokínových testov pre 79 proteínov, sme detekovali 68 rôznych proteínov, z toho 32 z nich boli opísané v ľudskom kolostre alebo v mlieku po prvý krát. Tri cytokíny (EGF, IL-8, a GRO-s proliferáciou súvisiaci onkoproteín) boli prítomné vo všetkých testovaných vzorkách, 19 proteínov malo veľmi častý výskyt (u vyše 50 % vzoriek). Priemerný počet cytokínov detekovaný

v jednej vzorke je 20. Zastúpenie jednotlivých cytokínov v kolostre a v mlieku matiek vykazuje individuálne rozdiely a zmena koncentrácie v čase nie je jednotná, ale väčšinou sa znižuje, preto sme súčasne so stanovením cytokínov prevádzali aj meranie celkovej hladiny bielkovín v týchto vzorkách.

V našej štúdií bola po prvý krát v kolostre a v mlieku preukázaná prítomnosť rastových faktorov (rastový faktor fibroblastov (FGF)-4, rastový faktor placenty (PIGF)), chemotaktických faktorov (B lymfocytárny chemoatraktant/CXCL13, zápalový proteín makrofágov (MIP)-1 δ -1 β /CCL4, MIP-1 δ /CCL15, MIP-3 α /CCL20, (PARC)/CCL18, faktor inhibujúci leukémiu, oncostatin M) a protizápalové faktory (tkanivový inhibitor metaloproteináz (TIMP)-1, TIMP-2, chemokín odvodený od makrofágov (MDC)/CCL22). Všeobecnou črtou bol pokles koncentrácie IL-12 a MIP-1 δ /CCL15 a nárast koncentrácie MCP-1/CCL2 v materskom mlieku.

Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array. Kverka M, Burianová J., Lodinová-Žadníková R, Kocourková I, Cinová J, Tučková L, Tlaskalová-Hogenová H. *Clin Chem*; 53:955-962, 2007

Časť výsledkov z našej práce je uvedených v prehľadnom článku, ktorý opisuje úlohu slizničného imunitného systému a jeho vplyv na celkový vývoj imunitného systému. Hneď po narodení, keď ešte nie je dokonale vyvinutý imunitný systém, je organizmus chránený pred infekciou prirodzenou zložkou imunitného systému. Významným znakom prirodzenej imunity je schopnosť rozlíšiť patogénne mikroorganizmy pomocou pattern recognition receptors (PRRs). Tieto molekuly sú tiež známe aj ako Toll-like receptors (TLRs), ktoré rozpoznávajú charakteristické, s patogénom asociované molekuly na povrchu mikroorganizmov (pathogen-associated molecular patterns-PAMPs) (Medzhitov a Janeway, 2000; Aderem a Ulevitch, 2000; Akira a Takeda, 2004), ich interakcia vedie k signalizácii a k aktivácii transkripčného faktoru NF- κ B, ktorý zodpovedá za aktiváciu génov kódujúcich produkciu cytokínov, chemokínov a ďalších mediátorov zápalu. Baktérie črevnej mikroflóry sú v úzkom kontakte s epitelovými bunkami. Po narodení sa osídľuje črevná sliznica mikroorganizmami ($\sim 1 \times 10^4$). Je otázne, akými mechanizmami je zabezpečené, že tieto komenzálne baktérie u zdravých jedincov nevyvolávajú na rozdiel od patogénnych baktérií zápal sliznice. Väčšina týchto komenzálnych baktérií je nekultivovateľná,

preto presné zloženie črevnej mikroflóry je neustále predmetom mnohých štúdií. Použitím gnotobiologických zvieracích modelov sa potvrdilo, že jednotlivé zložky črevnej mikroflóry majú rozhodujúcu úlohu pri postnatálnom vývoji imunitného systému.

Zistenie, ktoré baktérie a bunky, a akým spôsobom sa podieľajú na indukci a udržiavaní chronického zápalu čreva, by mohlo priniesť nové prístupy v terapii a v prevenci nešpecifických črevných zápalov medzi ktoré patrí Crohnova choroba, ulcerózna kolitída a celiakia.

Involvement of innate immunity in the development of inflammatory and autoimmune diseases. Tlaskalová-Hogenová H, Tučková L, Štěpánková R, Hudcovič T, Palová-Jelínková L, Kozáková H, Rossmann P, Sanchez D, Cinová J, Hrnčíř T, Kverka M, Frolová L, Uhlig H, Powrie F, Bland P. *Ann NY Acad Sci*; 1051: 1-12, 2005

5. DISKUSIA

Celiakia je multifaktoriálne ochorenie sliznice tenkého čreva, ktoré je u geneticky vnímavých jedincov vyvolané pšeničným lepkom - gluténom a jeho hlavnými zložkami. Z ďalších faktorov, ktoré môžu mať vplyv na nástup celiakie, je vplyv vonkajšieho prostredia, prekonaných infekčných ochorení a výživy. Aj keď je známy vyvolávajúci agens celiakie, patogenetický mechanizmus tohoto ochorenia nie je doposiaľ dostatočne objasnený. Veľká pozornosť bola venovaná úlohe CD4⁺ T-buniek, ktoré rozpoznávajú gliadinové peptidy prezentované APC. Aktivované špecifické T bunky stimulujú aj B-bunkovú produkciu špecifických protilátok, tak aj odpoveď T_H1 buniek, sú zapojené do produkcie celej rady cytokínov a chemokínov, ktoré ovplyvňujú ďalšie bunky adaptívnej aj prirodzenej imunity. V poslednej dobe sa predmetom intenzívnych štúdií stáva úloha buniek prirodzenej imunity v patogenéze ochorení. Je študovaná aktivácia monocytov, črevných epitelových buniek a makrofágov, expresia povrchových molekúl ako sú HLA-DR, CD95/Fas, intracelulárnych adhezívnych molekúl (ICAM-1), produkcia cytokínov a ich podiel v mechanizmoch zapojených do morfológických a funkčných zmien črevnej sliznice (Maiuri et al., 2003; 2003a; Mention et al., 2003; Giovannini et al., 2003; Shuppan et al., 2003).

V našom laboratóriu sme sa zapojili do tejto štúdie a ukázali sme, že peptické štepy gliadinu, na rozdiel od intaktného gliadinu a obdobne spracovaných ostatných testovaných potravinových proteínov (sója, ovalbumín, kasein) stimuloval v prítomnosti IFN- γ (hlavného cytokínu celiakie) myšie peritoneálne makrofágy (*in vitro*) k produkcii cytokínov a NO (Tučková et al., 2000).

Zaujímalo nás, či podobný efekt budú mať gliadinové štepy aj na ľudské monocyty. Použili sme ľudské monocytárne línie U937 (CD14⁻CD68⁻) a THP-1 (CD14⁺CD68⁺), ktoré predstavujú odlišné stupne diferenciácie monocytov/makrofágov. Ukázali sme, že viac diferencované bunky ľudskej monocytárnej línie THP-1 odpovedali na gliadinové fragmenty zvýšenou produkciou IL-8 a TNF- α a ich produkcia je významne zvyšovaná v prítomnosti exogenného IFN- γ .

V tkanive jejuna aktívnych celiakov bola detekovaná vysoká hladina mRNA pre IFN- γ (Nilsen et al., 1998). Jeho hlavným producentom sú gliadin-senzitívne T-lymfocyty (Nilsen et al., 1995). IFN- γ spolu s TNF- α prispievajú k zvýšenej permeabilite črevného epitelu (Deem et al, 1991; Madara a Stafford, 1989). Odpoveď THP-1 buniek na gliadin bola signifikantne vyššia, jak v prípade, keď bunky boli inkubované spoločne s gliadinom a IFN- γ , tak aj u buniek prestimulovaných IFN- γ a následne stimulovaných gliadinovými fragmentami samotnými alebo v kombinácii s IFN- γ . Neštiepený gliadin, sója a ovalbumín mali len veľmi slabý vplyv na aktiváciu monocytov, ktorý sa nezvyšoval ani po pridaní INF- γ . Odpoveď U-937 monocytov bola veľmi nízka, známky produkcie IL-8 boli pozorované po stimulácii gliadinom a IFN- γ a to len v prípade buniek prestimulovaných IFN- γ (24h), zatiaľ čo TNF- α produkcia nebola detekovaná. THP-1 monocytárna línia reagovala intenzívnejšie nielen na stimuláciu gliadinom, ale tiež na bakteriálny LPS signifikantne vyššiou produkciou IL-8 a TNF- α než línia U-937. Rozdielna odpoveď THP-1 a U-937 monocytov bola dokumentovaná aj inými autormi po stimulácii *E. Coli* LPS a *Shiga*-toxínmi (Eperon a Jungi, 1996; Ramegowda a Tesh, 1996). Imunohistochemické štúdie poukazujú na zvýšený počet CD14 pozitívnych makrofágov a vyššiu expresiu iNOS v biopsiách z aktívnych celiakov, na rozdiel od zdravých jedincov (Steege et al., 1997). THP-1 bunky sú charakterizované vysokou expresiou CD14, použitím anti-CD14 monoklonálnej protilátky bola LPS-indukovaná produkcia IL-8 redukovaná, avšak na gliadinom indukovanú odpoveď to nemalo žiaden efekt. Účasť CD14 molekuly na aktivácii buniek gliadinom sa v týchto experimentoch nepotvrdila.

Analýzou povrchového receptora pre gliadin sa zaoberal aj Fasano a spoluprac., na myších bunkách sledovali možnú úlohu povrchových TLR2 a TLR4 pri aktivácii gliadinom. Autori ukázali, že u myší s defektom v expresii týchto molekúl nie je ovplyvnená produkcia cytokínov po aktivácii gliadinovými peptidmi a s najväčšou pravdepodobnosťou nepredstavujú receptorové molekuly pre gliadin na povrchu týchto buniek (Thomas et al., 2006).

Súbežne s pokusmi na monocytoch prebiehali v našom laboratóriu v spolupráci s oddelením Imonológie 2.LF v Motole pokusy testujúce účinok gliadinových fragmentov na dendritické bunky pripravené z ľudskej periférnej krvi. Pokusy boli inšpirované výsledkami Nikulina a kol, ktorí na dendritických bunkách odvodených

z kostnej drene myši ukázali, že gliadinové fragmenty indukujú expresiu maturationých znakov MHC II, CD40, CD54 a CD86 (Nikulina et al., 2004). V našej pracovnej skupine boli dendritické bunky pripravené v prostredí IL-4 a GM-CSF. Bolo ukázané, že gliadinové fragmenty majú nielen stimulačnú schopnosť, opísanú v predošlých pokusoch, ale navodzujú aj funkčné a fenotypové vyzrievanie DCs. Gliadinové fragmenty zvyšovali povrchovú expresiu maturationých znakov CD83, CD80, CD86, CD40 a HLA-DR a znižovali fagocytárnu kapacitu DCs. Podobne ako aj u monocytov, proteolytické fragmenty sóje a ovalumínu nemali žiaden zreteľný efekt na maturáciu DCs. Maturácia DCs súvisí s produkciou širokého spektra cytokínov a chemokínov (McColl, 2002). U gliadinom stimulovaných DCs buniek bola nameraná vysoká produkcia IL-6, IL-8, TNF- α . Produkcia regulačných cytokínov (IL-4, IL-10) bola nízka, gliadin dokonca znížil produkciu TGF- β v porovnaní s nestimulovanými DCs. Zaujímavé bolo zistenie, že LPS-stimulované a gliadinom-stimulované DCs sa líšia spektrom produkovaných cytokínov, hlavne v produkcii IL-12, ktorá nebola zaznamenaná u DCs stimulovaných gliadinom. Neprítomnosť IL-12 je charakteristickým znakom u celiakie, IL-12 nebol detekovaný ani na úrovni mRNA izolovanej z tkaniva celiakálnych pacientov (Nilsen et al., 1998). Domnievame sa, že úloha IL-12 pri T_H1 polarizácii by mohla byť zastúpena IL-23 alebo IL-18 molekulami.

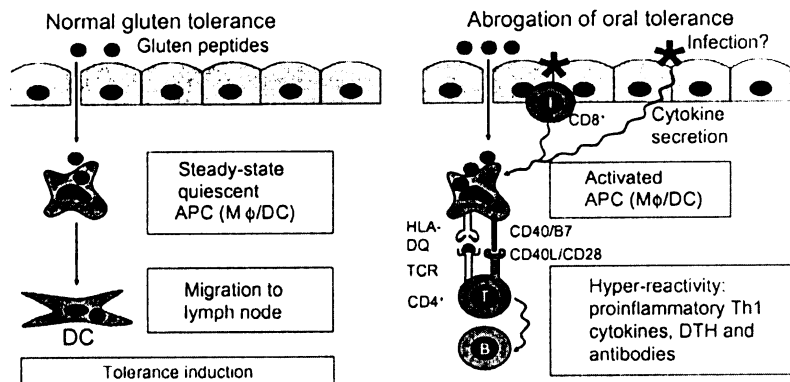
Výsledky našich, už spomínaných experimentov zameraných na analýzu signálnej dráhy aktivovanej gliadinovými peptidmi u ľudských monocytárných línií THP-1 a U937 a ľudských monocytov izolovaných z perifernej krvi, tak aj pozorovanie ďalších autorov (De Stefano et al., 2006; Palová-Jelínková et al., 2005) poukazujú na významnú účasť molekúl NF- κ B komplexu. U všetkých týchto buniek bolo potvrdené zapojenie dvoch hlavných väzobných podjednotiek (p50 a p65) NF- κ B signálnej dráhy. Gauss a spoluprac. zistili, že ľudské monocyty po kultivácii s TNF- α zvyšujú aktivitu NADPH oxidázy, to vedie k zvýšenej produkcii kyslíkových radikálov a k aktivácii NF- κ B, čím TNF- α eventulálne podporuje zápal (Gauss et al, 2007)

Subepitelové ľudské (Rugtveit et al., 1997) aj myšie (Chirido et al., 2005) črevné makrofágy a DCs exprimujú za fyziologických podmienok len nízke hladiny kostimulačných molekúl CD80 a CD86 a nie sú schopné navodiť stimuláciu T-

lymfocytov (Qiao, 1996). Keďže črevné makrofágy sú odvodené od krvných monocytov (Smythies et al., 2006), mikroprostredie čreva pravdepodobne znižuje schopnosť novo osídlených monocytov odpovedať na gliadin.

Monocyty zdravých jedincov po stimulácii gliadinom samotným nezvyšovali povrchovú expresiu znakov CD80, CD86, CD83 a CD40, avšak po pridaní gliadinu spoločne s IFN- γ sa prejavil synergistický účinok IFN- γ na aktiváciu monocytov. V rámci skupiny monocytov zdravých jedincov sme v produkcii IL-8 zaznamenali široký rozptyl hodnôt, preto sme na základe HLA-DQ2 typizácie monocyty rozdelili na HLA-DQ2⁺ a HLA-DQ2⁻. Monocyty HLA-DQ2⁺ jedincov spontánne uvoľňovali viac IL-8, než monocyty HLA-DQ2⁻. Výsledky naznačili, že zvýšená produkcia cytokínov u celiakálnych pacientov je asociovaná s expresiou HLA-DQ2, avšak toto spojenie môže byť súčasťou doposiaľ neobjasnených genetických faktorov a komplexných mechanizmov pri vzniku tohoto ochorenia.

Naše výsledky zapadajú do hypotézy navrhovanej Brantzaegom (2006), podľa ktorej väčšina APC, ktoré sú prítomné v čreve za fyziologických podmienok v nezrelej forme, vedie skôr k indukcii tolerancie než k aktivácii T-buniek. Jedným z možných mechanizmov vzniku celiakie je porušenie orálnej tolerancie za spoluúčasti ďalších, doteraz neznámych činiteľov, ako je napr. infekcia a mikroprostredie v tkanive. Gliadinové peptidy prestupujúce črevnou sliznicou stimulujú epitelové bunky a CD8⁺ IELs k produkcii cytokínov. Kombinácia týchto cytokínov s gliadinovými peptidmi stimuluje makrofágy a vedie k maturácii dendritických buniek. Na DCs sa zvyšuje expresia kostimulačných molekúl a dochádza k vzniku gluten-špecifických CD4⁺ T_H1 lymfocytov (Obr. č. 3). Gliadin navodzuje aktiváciu a maturáciu dendritických buniek a tak zvyšuje celkový počet buniek prezentujúcich jeho peptidy. Predstavu o vplyve mikroprostredia v tkanive na reaktivitu buniek podporujú aj nálezy L. Smythies, ktorá ukázala, že makrofágy izolované z črevného tkaniva zdravých jedincov nenesú znaky umožňujúce ich aktiváciu bakteriálnymi antigénmi. (Smythies et al., 2005; Smith et al, 1991; 2005). V rámci spolupráce s touto skupinou bol testovaný aj efekt gliadinu, ktorý nenavodil v *in vitro* podmienkach aktiváciu makrofágov izolovaných z čreva zdravých jedincov, na rozdiel od ich krvných monocytov, ktoré boli gliadinom aktivované k produkcii širokého spektra cytokínov a chemokínov (viď naša spoločná publikácia).



Obrázok č. 3 (Brandtzaeg et al., 2006)

Keďže súhrn činiteľov podieľajúcich sa na vzniku celiakie je stále otáznym, do istej miery by mohli určitú úlohu zohrávať aj baktérie mikrobiálnej flóry. V súčasnej dobe niekoľko pracovných skupín sa zaoberá porovnaním bakteriálnej flóry u zdravých jedincov a u detí s celiakiou (Tjellström et al., 2005, Sanz et al., 2007). Do tejto štúdie sme sa zapojili spoločne s pracovnou skupinou Y. Sanz z Valencie, kde v rámci spoločného grantového projektu sme zahájili štúdium vplyvu vybraných bakteriálnych kmeňov, (ktorými sa líšili zdraví a celiakálni pacienti) na bunky prirodzenej imunity. Bude testovaný ich samotný účinok na bunky prirodzenej imunity a ich vplyv spoločne s gliadinom na monocyty a makrofágy izolované zo zdravých jedincov a pacientov s celiakiou.

6. ZÁVER

Záverom by som zhrnula, že našou štúdiou sa nám podarilo prispieť k objasneniu účasti buniek prirodzenej imunity pri vzniku a vývoji celiakie. Ukázali sme, že gliadin, na rozdiel od ostatných potravinových antigénov má schopnosť aktivovať jak ľudské monocytárne línie, tak aj monocyty izolované z periférnej krvi celiakálnych pacientov a zdravých jedincov k produkcii cytokínov a chemokínov, pričom odpoveď monocytov z celiakálnych pacientov je vyššia v porovnaní s monocytmi zdravých jedincov. Podarilo sa nám čiastočne analyzovať gliadinom aktivované signálne dráhy stimulované gliadinovými fragmentami. Stále ostáva kľúčovou otázkou v patogenéze celiakie, čím je glutén tak výnimočný, že navodzuje rozsiahlu bunkami mediovanú imunitnú odpoveď, aké receptorové molekuly viažu gliadinové fragmenty na povrch buniek a ktoré z týchto fragmentov sú patogenetické pre celiakiu.

Podieľali sme sa na štúdiu, ktorá v návaznosti na preukázaný protektívny vplyv kojenia na rozvoj celiakie, charakterizovala cytokínové zloženie kolostra a materského mlieka. V našej štúdiu bola po prvý krát opísaná celá rada cytokínov a ďalších faktorov a ich zmeny v čase, ktoré by mohli byť zodpovedné za ochranu črevnej sliznice u kojencov.

Tieto výsledky sú len malou súčasťou zložitého mechanizmu vzniku celiakie. Vedú k celej rade ďalších otázok, ktoré je potrebné ďalej analyzovať. Patrí sem aj identifikácia gliadinových peptidov, ktoré stimulujú bunky prirodzenej imunity, identifikácia receptoru pre tieto imunogénne peptidy, podrobnejšia analýza signálnych dráh a potenciálna účasť baktérií pri tomto ochorení.

7. ZOZNAM LITERATÚRY

Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*; 406: 782–787, 2000

Aine L, Maki M, Collin P, Keyrilainen O. Dental enamel defects in celiac disease. *J Oral Pathol Med*; 19: 241-245, 1990

Akimov SS, Belkin AM. Cell-surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells in fibronectin. *Blood*; 98: 1567-1576, 2001

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Na. Rev Immunol* 4: 499–511. 2004

Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol*; 15:627-633, 2003

Andrin C, Pinkoski MJ, Burns K, Atkinson EA, Krahenbuhl O, Hudig D, Fraser SA, Winkler U, Tschopp J, Opas M, Bleackley RC, Michalak M. Interaction between a Ca²⁺-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. *Biochemistry*; 37: 10386-10394, 1998

Arentz-Hansen H, Korner R, Molberg Ø, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Noren O, Roepstorff P, Lundin KE, Sjoström H, Sollid LM. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J EXP Med*; 191:603-612, 2000

Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg Ø, Fleckenstein B, Lundin KE, Jorgenson Tj, Jung G, Roepstorff, Sollid LM. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*; 123: 803-809, 2002

Askling J, Linet M, Gridley G, Halstensen T, Ekstrom K, Ekborn A. Cancer incidence in a population-based cohort of individuals hospitalized with coeliac disease and dermatitis herpetiformis in Sweden. *Gastroenterology*; 123: 1428-1452, 2002

Baeuerle PA, Baltimore D. NF-κB: ten years after. *Cell*; 87: 13-20, 1996

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immun*; 55: 97-179, 1994

Baldwin AS. The NF-κappa B and Ikappa B Proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*; 14: 649-683, 1996

Banchereau J, Briere Caux Ch, Davoust J, Lebecque S, Liu Ym Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18: 767-811, 2000

- Bargetzi M, Schöenberger A, Tichelli A, Fried R, Cathoma SG, Grawohl A. Celiac disease transmitted by allogeneic non-T cell-dependent bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*; 20:607-609, 1997
- Barnes PJ. Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol*; 29: 867-70, 1997
- Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*; 168: 3536-3542, 2002
- Bonamico M, Bottaro G, Pasquino AM, Caruso-Nicoletti M, Mariani P, Gemme G, Paradiso E, Ragusa MC, Spina M. Celiac disease and Turner syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 26: 496-499, 1998
- Bonamico M, Mariani P, Danesi HM, Crisogianni M, Failla P, Gemme G, Quartino AR, Giannotti A, Castro M, Balli F, Lecora M, Andria G, Guariso G, Gabrielli O, Catassi C, Lazzari R, Balocco NA, De Virgiliis S, Culasso F, Romano C, SIGEP (Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology) and Medical Genetic Group. Prevalence and clinical picture of celiac disease in Italian Down syndrome patients: a multicenter study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 33: 139-143, 2001
- Brandtzaeg P, Farstad IN, Helgeland L. Phenotypes of T cells in the gut. In: MacDonald TT, editor. Mucosal T cells. *Chem Immunol Basel: Karger*, 71: 1-26, 1998
- Brandtzaeg P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS*; 103: 1-19, 1995
- Brandtzaeg P. The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunol Letters*; 105: 127-139, 2006
- Buc M. Imunológia. Slovenská akadémia vied; vyd. VEDA, 2001
- Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza GR. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) and "Club del Tenue" Working Groups on Coeliac Disease. *Gut*; 42: 362-365, 1998
- Catassi C, Fabiani E, Corrao G, Barbato M, De Renzo A, Carella AM, Gabrielli A, Leoni P, Carroccio A, Baldassarre M, Bertolani P, Caramaschi P, Sozzi M, Guariso G, Volta U, Corazza GR; Italian Working Group on Coeliac Disease and Non-Hodgkin's-Lymphoma. Risk of non-Hodgkin lymphoma in coeliac disease. *Jama*; 287: 1413-1419, 2002
- Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela GV, Giorgi PL. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet*; 343: 200-203, 1994

Cellier C, Delabesse E, Helmer C, Patey N, Matuchansky C, Jabri B, Macintyre E, Cerf-Bensussan N, Brousse N. Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Lancet*; 256: 203-208, 2000

Cellier C, Patey N, Mauvieux L, Jabri B, Delabesse E, Cervoni JP, Burtin ML, Guy-Grand D, Bouhnik Y, Modigliani R, Barbier JP, Macintyre E, Brousse N, Cerf-Bensussan N. Abnormal intestinal intraepithelial lymphocytes in refractory sprue. *Gastroenterology*; 114: 471-481, 1998

Cerf-Bensussan N, Brousse N, Caillat-Zucman C...Coeliac Disease. *John Libbey Eurotext. Esber UK*, 2003

Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Parroni R, Muzi P, D'Alo S, Ventura T, Pistoia MA, Cifone MG, Corazza GR. Increased enterocyte apoptosis and Fas-Fas ligand system in celiac disease. *Am J Clin Pathol*; 115: 494-503, 2001

Collin P, Mäki M. Associated disorders in coeliac disease: clinical aspects. *Scand J Gastroenterol*; 29:769-775, 1994

Collin P, Wahab PJ, Murray JA. Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease. *Best Practice and Research*; 19: 341-350, 2005

Cronin CC, Feighery A, Ferriss JB, Liddy C, Shanahan F, Feighery C. High prevalence of celiac disease among patients with insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. *Am J Gastroenterol*; 92: 2210-2212, 1997

Csizmadia CG, Mearin ML, von Blomberg BM, Brand R, Verloove-Vanhorick SP. An iceberg of childhood coeliac disease in the Netherlands. *Lancet*; 353: 813-814, 1999

Dahan S, Roth-Walter F, Arnaboldi P, Agarwal S, Mayer L. Epithelia: lymphocyte interactions in the gut. *Immuno Rev*; 215: 243-253, 2007

De Stefano D, Maiuri MC, Iovine B, Ialenti A, Bevilacqua MA, Carnuccio R. The role of NF-kappaB, IRF-1, and STAT-1alpha transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN-gamma in RAW 264.7 macrophages. *J Mol Med*; 84: 65-74, 2006

Deem RL, Shanahan F, Targan SROV. Triggered human mucosal T cells release tumor necrosis factor- α and interferon- γ which kill human colonic epithelial cells. *Clin Exp Immunol*; 83: 79-84, 1991

Di Sabatino A, Ciccocioppo R, D'Alo S, Parroni R, Millimaggi D, Cifone MG, Corazza GR. Intraepithelial and lamina propria lymphocytes show distinct patterns of apoptosis whereas both populations are active in Fas based cytotoxicity in coeliac disease. *Gut*; 49:380-386, 2001

Dickey W, Hughes DF, McMillan SA. Reliance on serum endomysial antibody testing underestimates the true prevalence of coeliac disease by one fifth. *Scand J Gastroenterol*; 35: 181-183, 2000

Dickey W, McMillan SA, Callender ME. High prevalence of celiac sprue among patients with primary biliary cirrhosis. *J Clin Gastroenterol*; 25: 328-329, 1997

Dietrich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Med*; 3: 797- 801, 1997

Djilali-Saiah I, Schmitz J, Harfouch-Hammoud E, Mougenot JF, Bach JF, Caillat-Zucman S. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease. *Gut*; 43: 187-189, 1998

Donaldson MR, Firth SD, Wimpee H, Leiferman KM, Zone JJ, Horsley W, O'gorman MA, Jackson WD, Neuhausen SL, Hull CM, Book LS. Correlation of duodenal histology with tissue transglutaminase and endomysial antibody levels in pediatric celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5:567-73, 2007

Eckman L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun*; 63:4569-4574, 1993

Eperon S, Jungi TW. The use of human monocytoid lines as indicators of endotoxin. *J Immunol Methods*; 194: 121-129, 1996

Falchuk ZM, Rogentine GN, Strober W. Predominance of histocompatibility antigen HL-A8 in patients with gluten-sensitive enteropathy. *J Clin Invest*; 51: 1602-1605, 1972

Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an avolving spectrum. *Gastroenterology*; 120: 636-651, 2001

Ferguson A, Murray D. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut*; 12: 988-994, 1971

Fernandez E, Riestra S, Rodrigo L, Blanco C, Lopez Vazquez A, Fuentes D, Moreno M, Lopez-Larrea C. Comparison of six human anti-transglutaminase ELISA-tests in the diagnosis of celiac disease in the Saharawi population. *World J Gastroenterol*; 11: 3762-3766, 2005

Franco A, Appella E, Kagnoff MF, Chowars Y, Sakaguchi K, Grey HM, Sette A. Peripheral T-cell response to A-gliadin in celiac disease: differential processing and presentation capacities of Epstein-Barr-transformed B cells and fibroblasts. *Clin Immunol Immunopathol* 71:75-81, 1994

Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood*; 87: 373-377, 1996

Fraser JS, Engel W, Ellis HJ, Moodie SJ, Pollock EL, Wieser H, Ciclitira PJ. Coeliac disease: in vivo toxicity of the putative immunodominant epitope. *Gut*; 52: 57-62, 2003

Gauss KA, Nelson-Overton LK, Siemsen DW, Gao Y, Deleo FR, Quinn MT. Role of NF- κ B in transcriptional regulation of the phagocyte NADPH oxidase by tumor necrosis factor- α , *J Leukoc Biol*; 30: 2007 [Epub ahead of print]

Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*; 19: 71-82, 2003

Gianfrani C, Levings MK, Sartirana C, Mazzarella G, Barba G, Zanzi D, Camarca A, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Troncone R, Roncarolo MG. Gliadin-specific type-1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol*; 177: 4178-4186, 2006

Giovannini C, Matarrese P, Scazzocchio B, Vari R, D'Archivio M, Straface E, Masella R, Malorni W, De Vincenzi M. Wheat gliadin induces apoptosis of intestinal cells via an autocrine mechanism involving Fas-Fas ligand pathway. *FEBS Lett*; 540: 117-124, 2003

Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, Namen, Park LS, Cosman D, Anderson D. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J*; 264: 965-968, 1994

Goodland RA, Wright NA. Epidermal growth factor (EGF). *Baillieres Clin Gastroenterol*; 10:33-47, 1996

Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, Paparo F, Gasperi V, Limongelli MG, Cotichini R, D'Agate C, Tinto N, Sacchetti L, Tosi R, Stazi MA. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*; 50: 624-628, 2002

Green PHR, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet*; 362: 383-391, 2003

Green PHR, Rostami K, Marsh MN. Diagnosis of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*; 19: 389-400, 2005

Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminase: Multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J*; 5:3071-3077, 1991

Grefte JM, Bouman JG, Grond J, Jansen W, Kleibeuker JH. Slow and incomplete histological and functional recovery in adult gluten sensitive enteropathy. *J Clin Pathol*; 41: 886-891, 1988

Gut J, Christen U, Fey N, Koch V, Stoffer D. Molecular mimicry in halothane hepatitis. Biochemical and structural characterization of lipoyled autoantigens. *Toxicol*; 97: 199-224, 1995

Haimila K, Smedberg T, Mustalahti K, Mäki M, Partanen J, Holopainen P. Genetic association of coeliac disease susceptibility to polymorphisms in the ICOS gene on chromosome 2q33. *Genes Immun*; 5: 85-92, 2004

Hayat M, Cairns A, Dixon MF, O'Mahony S. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human duodenum: what is normal? *J Clin Pathol*; 55: 393-394, 2002

Hill I, Fasano A, Schwartz R, Counts D, Glock M, Horvath K. The prevalence of celiac disease in at-risk groups of children in the United States. *J Pediatr*; 136: 86-90, 2000

Hüe S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*; 21: 367-377, 2004

Huttner S, Bevins C. Antimicrobial peptides as mediator of epithelial host defense. *Pediatr Res*; 45:785-794, 1999

Chin RL, Sander HW, Brannagan TH, Green PH, Hays AP, Alaedini A, Latov N. Celiac neuropathy. *Neurology*; 60:1581-1585, 2003

Jabri NP, deSerre, Cellier, Evans, Gache C, Carvalho C, Mougenot JF, Allez M, Jian R, Desreumaux P, Colombel JF, Matuchansky C, Cugnenc H, Lopez-Botet M, Vivier E, Moretta A, Roberts AI, Ebert EC, Guy-Grand D, Brousse N, Schmitz J, Cerf-Bensussan N. Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E specific natural killer receptor CD94 in coeliac disease. *Gastroenterology*, 118:867-79, 2000

Jansen TL, Mulder CJJ, Karszen PHZ, Wagenaar CGJ. Epidemiological survey of the Dutch Coeliac Disease Society: an update 1992. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 5: 73-78, 1993

Jelínková L, Tučková L, Cinová J, Flegelová Z, Tlaskalová-Hogenová H. Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF- α through a mechanism involving NF- κ B. *FEBS Lett*; 571:81-85, 2004

Jelínková L, Tučková L, Sánchez D, Krupičková S, Pozler O, Nevorál J, Kotalová R, Tlaskalová-Hogenová H. Increased levels of circulating ICAM-1, E-selectin, and IL-2 receptors in celiac disease. *Dig Dis Sci*; 45: 398-402, 2000

Johansen BH, Gjertsen HA, Vartdal F, Buus S, Thorsby E, Lundin KE, Sollid LM. Binding of peptides from the N-terminal region of α -gliadin to the celiac disease associated HLA-DQ2 molecule assessed in biochemical and T cell assays. *Clin Immunol Immunopathol*; 79: 288-293, 1996

Kakar S, Nehra V, Murray JA, Dayharsh GA, Burgart LJ. Significance of intraepithelial lymphocytosis in small bowel biopsy samples with normal mucosal architecture. *Am J Gastroenterol*; 98: 2027-2033, 2003

Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, Ciclitira PJ, Sollid LM, Partanen J, members of European genetics cluster on celiac disease. European genetics cluster on celiac disease. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02(DQ2) heterodimer: results from the European genetics cluster on celiac disease. *Hum Immunol*; 64: 469-477, 2003

Karpati S, Burgin-Wolf A, Krieg T, Meuer M, Stolz W, Braun-Falco O. Binding to human jejunum of serum IgA antibody from children with coeliac disease. *Lancet*; 36: 1335-1338, 1990

Karská K, Tučková L, Steiner L, Tlaskalová-Hogenová H, Michalak M. Calreticulin the potential autoantigen in celiac disease. *Biochem Biophys Res Commun*; 209:597-605, 1995

Kasarda DD, Okita TW, Bernardin JE, Baecker PA, Nimmo CC, Lew EJ, Dietler MD, Greene FC. Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences of alpha-type gliadins from wheat (*Triticum aestivum*). *Proc Natl Acad Sci USA*; 81: 4712-4716, 1984

Kikly K, Liu L, Na S, Sedgewick JD. The IL-23/Th17 axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol*; 18: 670-675, 2006

King AL, Moodie SJ, Fraser JS, Curtis D, Reid E, Dearlove AM, Ellis HJ, Ciclitira PJ. CTLA4/CD28 gene region is associated with genetic susceptibility to coeliac disease in UK families. *J Med Genet*; 39: 51-54, 2002

Kishore U, Sontheimer RD, Sastry KN, Zappi EG, Hughes GRV, Khamashta MA, Reid KB, Eggleton P. The systemic lupus erythematosus (SLE) disease autoantigen-calreticulin can inhibit C1q association with immune complexes. *Clin Exp Immunol*; 108: 181-190, 1997

Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*; 21: 467-476, 2004

Koning F. Disease: Caught between a rock and a hard place. *Gastroenterol*; 129: 1294-1301, 2005

Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*; 6: 1219-1227, 2005

Krupičková S, Tučková L, Flegelová Z, Michalak m, Walters JR, Whelan A, Harries J, Vencovský J, Tlaskalová-Hogenová H. Identification of common epitopes on

gliadin enterocytes, and calreticulin recognised by antigliadin antibodies of patients with celiac disease. *Gut*; 44: 168-173, 1999

Ladinsler B, Rossipal E, Pittschieler K. Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. *Gut*; 35: 776-778, 1994

Lahteenoja H, Toivanen A, Viander M, Maki M, Irjala K, Raiha I, Syrjanen S. Oral mucosal changes in coeliac patients on a gluten-free diet. *Eur J Oral Sci*; 106: 899-906, 1998

Le Naour F, Brichory F, Misek DE, Bréchet C, Hanash SM, Beretta L. A distinct repertoire of autoantibodies in hepatocellular carcinoma identified by proteomic analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*; 1: 197-203, 2002

Le Naour F, Hohenkirk L, Grolleau A, Misek DE, Lescure P, Geiger JD, Hanash S, Beretta L. Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J Biol Chem*; 276: 17920-17931, 2001

Lebwohl B, Deckelbaum RJ, Green PH. Giardiasis. *Gastrointest Endosc*; 57: 906-913, 2003

Lepore L, Martellosi S, Pennesi M, Falcini F, Ermini ML, Ferrari R, Perticarari S, Presani G, Lucchesi A, Lapini M, Ventura A. Prevalence of celiac disease in patients with juvenile chronic arthritis. *J Pediatr*; 129: 311-313, 1996

Li XC, Demirci G, Ferrari-Lacraz S, Groves C, Coyle A, Malek TR, Strom TB. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med*; 7: 114-118, 2001

Luft LM, Barr SG, Martin LO, Chan EK, Fritzler MJ. Autoantibodies to tissue transglutaminase in Sjogren's syndrome and related rheumatic disease. *J Rheumatol*; 30: 2613-2619, 2003

Madara JL, Stafford J. Interferon- γ directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest*; 83: 724-727, 1989

Maiuri L, Troncone R, Mayer M, Coletta S, Picarelli A, De Vincenzi M, Pavone V, Auricchio S. In vitro activities of A-gliadin related synthetic peptides: damaging effect on the atrophic coeliac mucosa and activation of mucosal immune response in the treated coeliac mucosa. *Scand J Gastroenterol*; 31:247-253, 1996

Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quarantino S, Londei M. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*; 119:996-1006, 2000

Maiuri L, Ciacci C, Raia V, Vacca L, Ricciardelli I, Raimondi F, Auricchio S, Quarantino S, Londei M. FAS engagement drives apoptosis of enterocytes of coeliac patients. *Gut*; 48: 418-424, 2001

Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quarantino S, Londei M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T-cells in coeliac disease. *Lancet*; 362: 30-37, 2003

Maiuri L, Picarelli A, Boirivant M, Coletta S, Mazzilli MC, De Vincezi M, Londei M, Auricchio S. Definition of the initial immunologic modifications upon in vitro gliadin challenge in the small intestine of celiac patients. *Gastroenterology*; 110: 1368-1378, 1996

^aMaiuri MC, De Stefano D, Mele G, Iovine B, Bevilaqua MA, Greco L, Auricchio S, Carnuccio R. Gliadin increases iNOS gene expression in interferon-gamma-stimulated RAW 264.7 cells through a mechanism involving NF-kappa B *Nuanyn-Schmied Arch Pharmacol*; 368: 63-71, 2003

Mäki M, Collin P. Coeliac disease. *Lancet*; 349: 1755-1759, 1997

Mäki M, Holm K, Collin P, Hallstrom O, Viander M, Collin P, Savilahti E, Koskimies S. Increase in gamma/delta T cell receptor bearing lymphocytes in normal small mucosa in latent coeliac disease. *Gut*; 32: 1412-1414, 1991

Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (celiac sprue). *Gastroenterology*; 102: 330-354, 1992

Mazzarella G, Maglio M, Paparo F, Nardone G, Stefanile R, Greco L, van de Wal Y, Kooy Y, Koning F, Auricchio S, Troncone R. An immunodominant DQ8 restricted gliadin peptide activates small intestinal immune response in in vitro cultured mucosa from HLA-DQ8 positive but not HLA-DQ8 negative coeliac patients. *Gut*; 52: 57-62, 2003

McColl. Chemokines and dendritic cells: a crucial alliance. *Immunol Cell Biol*, 80: 489-496, 2002

McDonald TT. Mucosal T cells. *Basel*, Karger, 1998

McKhalife J, Trottei F, Schacht AM, Godin C, Pierce RJ, Capron A. Cloning of the gene encoding a *Schistosoma mansoni* antigen homologous to human Ro/SS-A autoantigen. *Mol Biochem Parasitol*; 57: 193-202, 1993

McNeish AS, Harms JK, Rey J. The diagnosis of coeliac disease. A commentary on the current practise of members of the European Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN). *Arch Dis Child*; 54: 629-637, 1979

Medzhitov R a Janeway JR. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev*; 173: 89-97, 2000

Meijer JW, Mulder CJ, Goerres MG, Boot H, Schweizer JJ. Coeliac disease and (extra) intestinal T-cell lymphomas: definition, diagnosis and treatment. *Scand J Gastroenterol Suppl*; 78: 2004

Mention JJ, Ben AM, Begue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, Colombel JF, Cugnenc PH, Ruemmele FM, McIntyre E, Brousse N, Cellier C, Cerf-Bensussan N. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostases and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*; 125: 730-745, 2003

Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, Raulet DH, Lanier LL, Groh V, Spies T, Ebert EC, Green PH, Jabri B. Coordinated induction by IL-15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*; 21:357-366, 2004

Městecký J, Lamm ME, Strober W at al. *Mucosal Immunology* 3rd ed. Elsevier Academic Press Amsterdam, 2005

Mhaouty-Kodja S. Galpha/tissue transglutaminase 2: an emerging G protein in signal transduction. *Biol Cell*; 96: 363-367, 2004

Molberg Ø, McAdam SN, Korner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Noren O, Roepstorff P, Lundin KE, Sjostrom H, Sollid LM. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognised by gut-derived T-cells in celiac disease. *Nat Med*; 4: 713-717, 1998

Mulder CJJ, Cellier C. Coeliac disease: changing views. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*; 19: 313-321, 2005

Murray JA, Green PH. Biopsy is the gold standard of diagnosis of coeliac sprue. *Gastroenterology*; 116: 1273-1274, 1999

Murtaugh MP, Arend WP, Davies PJ. Induction of tissue transglutaminase in human peripheral-blood monocytes. *J Exp Med*; 159: 114-125, 1984

Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, Iwakura Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*; 100: 5986-5990, 2003

Nikulina M, Habich C, Flohe SB, Scott FW, Kolb H. Wheat gluten causes dendritic cell maturation and chemokine secretion. *J Immunol*; 173:1925-1933, 2004

Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid LM, Jahnsen J, Scott H, Brandtzaeg P. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology*; 115: 551-63, 1998

Nilsen EM, Lundin KEA, Krajci P, Scott H, Sollid LM, Brandtzaeg P. Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon γ . *Gut*; 37: 766-776, 1995

Ogra PL, Městecký J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee J. *Mucosal Immunology*. New York, Academic Press, 1999

Okita TW, Cheesbrough V, Reeves CD. Evolution and heterogeneity of the alpha/beta type gliadin DNA sequences. *J Biol Chem*; 260: 8203-8213, 1985

Osman AA, Gunnel T, Dietl A, Uhlig HH, Amin M, Fleckenstein B, Richter T, Mothes T. B cell epitopes of gliadin. *Clin Exp Immunol*; 121: 284-254, 2000

Palová-Jelínková L, Rožková D, Pecharová B, Bartová J, Šedivá A, Tlaskalová-Hogenová H, Spišek R, Tučková L. Gliadin induce phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. *J Immunol*; 175: 7038-7045, 2005

Perera LP. Interleukin 15: its role in inflammation and immunity. *Arch Immunol Ther Exp*; 48:457-464, 2000

Polanco I, Biemond I, van Leeuwen A et al. Gluten sensitive enteropathy in Spain: genetic and environmental factors. In McConnell R: *The genetics of Coeliac Disease*. Lancaster, MTP Press; 211-231, 1984

Powrie F. Immune regulation in the intestine: a balancing act between effector and regulatory T cell responses. *Ann NY Acad Sci*; 1029: 132-141, 2004

Qiao L, Braunstein J, Golling M, Schurmann G, Autschbach F, Moller P, Meuer S. Differential regulation of human T cell responsiveness by mucosal versus blood monocytes. *Eur J Immunol*; 26: 922-927, 1996

Ráki M, Fallang LE, Brottvet M, Bergseng E, Quarsten H, Lundin KEA. Tetramer visualization of gut-homing gluten-specific T cells in the peripheral blood of celiac disease patients. *PNAS*; 104: 2831-2836, 2007

Ramegowda B, Tesh VL. Differentiation-associated toxin receptor modulation, cytokine production, and sensitivity to Shiga-like toxins in human monocytes and monocytic cell lines. *Infect Immun*; 64: 1173-1180, 1996

Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schakel KT. The CD16(+) (Fc γ RIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med*; 196:517-27, 2002. Erratum in: *J Exp Med*; 196:869, 2002

Rodrigo L. Celiac disease. *World J Of Gastroenterol*; 12: 6585-6593, 2006

Rokeach LA, Haselby JA, Meilof JF, Smeek RJT, Unnasch TR, Greene BM, Hoch SO. Characterization of the autoantigen calreticulin. *J Immunol*; 147: 3031-3039, 1991

Rose NR. Fundamental concepts of autoimmunity and autoimmune disease. V: Krawit EL, Wiesner RH, Nishioka M, editori. *Autoimmune liver diseases*. 2.vydanie New York, Elsevier, s. 1-120, 1998

Rossi TM, Kumar V, Lerner A, Heitlinger LA, Tucker N, Fisher J. Relationship of endomysial antibodies to jejunal mucosal pathology: Specificity towards both symptomatic and asymptomatic coeliacs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 7: 858-863, 1988

Routsias JG, Tzioufas AG, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Moutsopoulos HM. Calreticulin synthetic peptide analogues: anti-peptide antibodies in autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Immunol*; 91: 437-441, 1993

Rubin CE. Some reflections on reversibility, gluten and the intestine. *Gastroenterology*; 39: 260-261, 1960

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*; 155:1151-1164, 1995

Sánchez D, Tučková L, Mothes T, Kreisel W, Beneš Z, Tlaskalová-Hogenová H. Epitopes of calreticulin recognized by IgA autoantibodies from patients with hepatic and coeliac disease. *J Autoimmun*; 21: 383-392, 2003

Sánchez D, Tučková L, Šebo P, Michalak M, Whelan A, Šterzl I, Jelínková L, Havrdová E, Imramovská M, Beneš Z, Krupičková S, Tlaskalová-Hogenová H. Occurrence of IgA and IgG autoantibodies to calreticulin in coeliac disease and various autoimmune diseases. *J Autoimmune*; 15:441-449, 2000

Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: Pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology*; 106:523-539, 1994

Shah VH, Rotterdam H, Kotler DP, Fasano A, Green PH. All that scallops is not celiac disease. *Gastrointest Endosc*; 51: 717-720, 2000

Shan L, Marti T, Sollid LM, Gray GM, Khosla C. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochem J*; 383: 311-318, 2004

Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*; 297: 2275-2279, 2002

Schuppan D, Esslinger B, Dietrich W. Innate immunity and coeliac disease. *Lancet*; 362: 3-5, 2003

Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF- κ B. *Ann Rev Cell Biol*; 10: 405-455, 1994

Siegel M, Bethune MT, Gass J, Ehren J, Xia J, Johannsen A, Stuge TB, Gray GM, Lee PP, Khosla C. Rational design of combination enzyme therapy for celiac sprue. *Chem Biol*; 13: 649-658, 2006

Singh B, Read S, Asseman C, Malmstrom V, Mottet C, Stephens LA, Štěpánková R, Tlaskalová-Hogenová H, Powrie F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev*; 182:190-200, 2001

Sjöstrom H, Lundin KEA, Molberg Ø, Korner R, McAdam SN, Anthonen D, Quarsten H, Noren O, Roepstorff P, Thorsby E, Sollod LM. Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: generated importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. *Scand j Immunol*; 48: 111-115, 1998

Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev*; 206:149-59, 2005

Smith PD, Smythies LE, Mosteller-Barnum M, Sibley DA, Russell MW, Merger M, Sellers MT, Orenstein JM, Shimada T, Graham MF, Kubagawa H. Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J Immunol*; 167:2651-6, 2001

Smythies LE, Maheshwari A, Clements R, Eckhoff D, Novak L, Vu HL, Mosteller-Barnum LM, Sellers M, Smith PD. Mucosal IL-8 and TGF- β recruit blood monocytes: evidence for cross-talk between the lamina propria stroma and myeloid cells. *Leukoc Biol*; 80: 492-9, 2006

Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest*; 115: 66-75, 2005

Snyder JG, Prewit R, Campsen J, Britt LD. PDTC and Mg132, inhibitors of NF- κ B, block endotoxin induced vasodilation of isolated rat skeletal muscle arterioles. *Shock*; 17: 304-307, 2002

Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ α/β heterodimer. *J Exp Med*; 169: 345-350, 1989

Sollid LM, Molberg Ø, McAdam S, Lundin KE. Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase-guilt by association? *Gut*; 41: 851-852, 1997

Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol*; 2:647-655, 2002

Sollid LM. Molecular basis of coeliac disease. *Ann Rev Immunol*; 18: 53-81, 2000

Spencer J, Isaacson PG, MacDonald TT, Thomas AJ, Walker-Smith JA. Gamma/delta T cells and the diagnosis of coeliac disease. *Clin Exp Immunol*; 85: 109-113, 1991

Stadnyk AW. Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J*; 8: 1041-1047, 1994

Steege J, Buurman W, Areds JW, Forget P. Presence of inducible nitric oxid synthase, CD68 and CD14 in the small intestine in celiac disease. *Lab Invest*; 77: 29-36, 1997

Stepniak D, Koning F. Celiac disease- sandwiches between innate and adaptive immunity. *Human Immunol*; 67: 460-468, 2005

Stepniak D, Spaenij-Dekking L., Mitea C, Moester M, de Ru A, Baak-Pablo R, van Veelen P, Edens L, Koning F. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 291:621-629, 2006

Sturgess RP, Day P, Ellis HJ, Lundin KE, Gjertsen HA, Kontakou M, Ciclitira PJ, Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet*; 343: 758-761, 1994

Štěpánková R, Kofroňová O, Tučková L, Kozáková H, Cebra JJ, Tlaskalová-Hogenová H. Experimentally induced gluten enteropathy and protective effect of epidermal growth factor in artificially fed neonatal rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 36: 96-104, 2003

Štěpánková R, Šinkora J, Hudcovič T, Kozáková H, Tlaskalová-Hogneová H. Differences in development of lymphocyte subpopulations from gut-associated lymphatic tissue (GALT) of germfree and conventional rats: Effect of aging. *Folia Microbiol*; 43:531-534, 1998

Štěpánková R, Tlaskalová-Hogneová H, Frič P, Trebichavský I. Enteropathy induced in young rats by feeding with gliadin: similarity with coeliac disease. *Folia Biol*; 35:19-26, 1989

Šterzl J. The immune system and its physiological functions. *Czech Society for Immunology*, Prague, 1993

Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J Immunol*; 176:2512-21, 2006

Thornton A, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol*; 164: 183-190, 2000

Tjellström B, Stenhammar L, Högberg L, Fälth-Magnusson K, Magnusson KE, Midtvedt T, Sundqvist T, Norin E. Gut microflora associated characteristics in children with celiac disease. *Am J Gastroenterol*; 100: 2784-2788, 2005

Tlaskalová-Hogenová H, Farre-Castany MA, Štěpánková R, Kozáková H, Tučková L, Funda DP, Barot R, Cukrowska B, Šinkora J, Mandel L, Karská K, Kolínská J. The gut as a lymphoepithelial organ: the role of intestinal epithelial cells in mucosal immunity. *Folia Microbiol*; 40: 385-391, 1995

Tlaskalová-Hogneová H, Holáň V, Bilej M, a kol. Buněčné a molekulární základy imunologie. *Česká imunologická společnost*, 2007

Tlaskalova-Hogenova H, Vetvicka V, Sterzl J, Stepankova R. Development of immune potential and migration pattern of cells from germfree (GF) and conventionally(CONV) reared rats. *Adv Exp Med Biol*; 149:515-20, 1982

Tlaskalová-Hogneová H, Štěpánková R, Frič P, Kolínská J, Vančíková Z, Jílek M, Kocna P, Lipská L, Slabý J, Dvořák M. Lymphocyte activation by gliadin in coeliac disease and in experimentally induced enteropathy of germ-free rats, 781-784 in *MacDonald TT et. Al. Advances in Mucosal Immunology*. Kluwer, Dordrecht, 1990

Tlaskalová-Hogneová H, Tučková L, Lodinová-Žadníková R, Štěpánková R, Cukrowska B, Funda DP, Stríž I, Kozáková H, Třebichavský I, Sokol D, Řeháková Z, Šinkora J, Fundová P, Horáková D, Jelínková L, Sanchez D. Mucosal immunity: its role in defense and allergy. *Int Arch Allergy Immunol*; 128:77-89, 2002

Trier JS. Celiac sprue. *N Engl J Med*; 325: 1709-1719. 1991

Troncone R, Ferguson A. Anti-gliadin antibodies. *J Pediatr Gastroenterol*; 12: 150-158, 1991

Troncone R, Greco L, Auricchio S. Gluten-sensitive enteropathy. *Pediatr Clin North Am*; 43: 355-373, 1996

Tučková L, Flegelová Z, Tlaskalová-Hogenová H, Zidek Z. Activation of macrophages by food antigens: enhancing effect of gluten on nitric oxide and cytokine production. *J Leukoc Biol*; 71: 625-631, 2000

Tučková L, Karská K, Walters JR, Michalak M, Rossmann P, Krupičková S, Verdu EF, Saalman R, Hanson LA, Tlaskalová-Hogenová H. Anti-gliadin antibodies in patients with celiac disease cross-react with enterocytes and human calreticulin. *Clin Immunol Immunopathol*; 85: 289-96, 1997

Tučková L, Novotná J, Novak P, Flegelová Z, Kveton T, Jelinková L, Zidek Z, Man P, Tlaskalová-Hogenová H. Activation of macrophages by gliadin fragments: isolation and characterization of active peptide. *J Leukoc Biol*; 71:625-631, 2002

Tučková L, Tlaskalová-Hogenová H, Farré MA, Karská K, Rossmann P, Kolínska J, Kocna P. Molecular mimicry as a possible cause of autoimmune reactions in celiac disease? Antibodies to gliadin cross-react with epitopes on enterocytes. *Clin Immun Immunopathol*; 74: 170-176, 1995

Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM. Prevalence of antitissue transglutaminase antibodies in different degrees of intestinal damage in celiac disease. *J Clin Gastroenterol*; 36: 319-221, 2003

Uil JJ, van Elburg RM, van Overbeek FM, Meyer JW, Mulder CJ, Heymans HS. Follow-up of treated coeliac patients: sugar absorption test and intestinal biopsies compared. *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 8: 219-223, 1996

Vader W, de Ru A, Wal Y, van de Kooy, Benckhuijsen W, Mearin L, Drijfhout JW, van Veelen P, Koning F. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med*; 195: 643-649, 2002

Vader W, Stepniak D, Kooy Y, Mearin L, Thompson A, van Rood JJ, Spaenij L, Koning F. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific t cell responses. *PNAC*; 100: 12390-12395, 2003

Van Belzen MJ, Meijer JW, Sandkuijl LA, Bardoel AFJ, Mulder CHJJ, Pearson PL, Roderick H. J. Houwen RHJ, Wijmenga C. A major non-HLA locus in celiac disease maps to chromosome 19. *Gastroenterology*; 125: 1032-1041, 2003

Van de Wal Y, Kooy YMC, Veelen van P, Peña AS, Mearin ML, Papadopoulos GK, Koning F. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol*; 161: 1585-1588, 1998

Van Heel DA, Hunt K, Greco L, Wijmenga C. Genetics in celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*; 19: 323-339, 2005

Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology*; 117: 297-303, 1999

Wahab PJ, Meijer JW, Goerres MS, Mulder CJ. Coeliac disease: changing views on gluten-sensitive enteropathy. *Scand J Gastroenterol Suppl*; 236: 60-65, 2002

^aWahab PJ, Meijer JW, Mulder CJ. Histologic follow-up of people with celiac disease on a gluten-free diet: slow and incomplete recovery. *Am J Clin Pathol*; 118: 459-463, 2002

Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest*; 101: 1163-1174, 1998

Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol*; 17:19-49, 1999

Walker-Smith JA, Guandalini S, Smith J, Shmerling DH, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child*; 65: 909-911, 1990

Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, Frankenberger M, Weber KS, Ziegler-Heitbrock HW. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol*; 67: 699-704, 2000

Wierink CD, van Diermen DE, Aartman IH, Heymans HS. Dental enamel defects in children with coeliac disease. *Int J Paediatr Dent*; 17:163-168, 2007

Wong RC, Wilson RJ, Steele RH, Radford-Smith G, Adelstein S. A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits. *J Clin Pathol*; 55: 488-494, 2002

Xu RJ. Development of the newborn GI tract and its relation to colostrum/milk intake: a review. *Reprod Fertil Dev*; 8: 35-48, 1996

Zhu Q, Zelinka P, White T, Tanzer ML. Calreticulin-integrin bidirectional signaling complex. *Biochem Biophys Res Commun*; 232: 354-358, 1997