

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

studijního oboru Imunologie

Možnosti ovlivnění odpovědi buněk přirozené imunity na gliadin

The possibilities to influence the response of innate immune cells to gliadin

Hana Drašarová

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

Sektor imunologie a gnotobiologie

Praha 2010

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Ludmila Tučková, DrSc.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením Doc. RNDr. Ludmily Tučkové, DrSc.

Hana Drašarová

V Praze, dne 31.srpna 2010.

Děkuji Doc. RNDr. Ludmile Tučkové, DrSc. a Mgr. Janě Cinové, PhD. za vše, co jsem se díky nim v laboratoři naučila.

Děkuji celému kolektivu laboratoře za vstřícné prostředí.

Děkuji svým rodičům, že mě vydrželi podporovat po celou dobu mého studia.

OBSAH

ABSTRAKT	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1. ÚVOD A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	10
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1. Celiakie	11
2.2. Lepek (gluten)	13
2.3. Patogeneze celiakie	14
2.3.1. Epiteliální translokace gliadinových peptidů	14
2.3.2. Modifikace a prezentace gliadinových peptidů	15
2.3.3. Účinky gliadinu na antigen prezentující buňky (APC)	15
2.3.4. Aktivace přirozené a adaptivní imunitní odpovědi na gliadin	16
2.4. Alternativní možnosti terapie	18
2.4.1. Úprava či selekce lepku přijímaného potravou	19
2.4.1.1. Použití původních druhů či geneticky modifikovaných druhů obilovin se sníženým obsahem lepku	19
2.4.1.2. Enzymatické předzpracování mouky	20
2.4.2. Intraluminální terapie	20
2.4.2.1. Orální enzymová terapie	20
2.4.2.2. Intraluminální vyvázání gliadinových peptidů	21
2.4.3. Inhibice intestinální permeability	22
2.4.4. Tlumení adaptivní imunitní odpovědi – suprese aktivace gliadin- specifických T-lymfocytů	22
2.4.4.1. Inhibitory tkáňové transglutaminázy	22
2.4.4.2. HLA-DQ2 inhibitory	23
2.4.5. Indukce glutenové tolerance	24
2.4.6. Imunomodulace probiotiky	24
2.4.7. Ostatní možnosti terapie	26
2.4.7.1. Inhibice leukocytární adheze a migrace leukocytů do zánětlivé tkáně	26
2.4.7.2. Cytokinová terapie	26
3. METODY A MATERIÁL	27
3.1. Testování účinku P(HEMA-co-SS)	27
3.1.1. Enzymatické štěpení	27
3.1.2. Účinek P(HEMA-co-SS) na PBMC	28

3.1.2.1. Izolace PBMC gradientovou centrifugací	28
3.1.2.2. Stimulace PBMC	29
3.1.2.3. ELISA stanovení cytokinové produkce IL-10 a TNF- α	31
3.1.3. Účinek P(HEMA-co-SS) na biopsie	32
3.1.3.1. Odběr biopsie duodenální sliznice	32
3.1.3.2. Stimulace biopsií	32
3.1.3.3. ELISA stanovení cytokinové produkce IL-10 a TNF- α	34
3.2. Účinek střevních bakterií na DC	34
3.2.1. Diferenciace DC z PBMC	34
3.2.2. Stimulace DC	35
3.2.3. Stanovení cytokinové produkce DC	36
3.2.3.1. ELISA stanovení IL-10, TNF- α	36
3.2.3.2. ELISA stanovení IL-12	36
3.2.4. Analýza DC průtokovou cytometrií	37
3.3. Seznam použitých chemikálií	38
4. VÝSLEDKY	39
4.1. Účinek P(HEMA-co-SS) na PBMC	39
4.1.1. Varianta pokusu A)	39
4.1.1.1. Cytokinová produkce PBMC zdravých dárců	39
4.1.1.2. Cytokinová produkce PBMC pacientů	41
4.1.2. Varianta pokusu B)	43
4.1.2.1. Cytokinová produkce PBMC zdravých dárců	43
4.1.2.2. Cytokinová produkce PBMC pacientů	45
4.2. Účinek P(HEMA-co-SS) na střevní biopsie	47
4.2.1. Cytokinová produkce biopsií - varianta pokusu A)	47
4.2.2. Cytokinová produkce biopsií - varianta pokusu B)	48
4.3. Účinek střevních bakterií na DC	50
4.3.1. Cytokinová produkce DC	50
4.3.2. Analýza DC průtokovou cytometrií	53
5. DISKUZE	61
5.1. Potenciální terapeutický účinek P(HEMA-co-SS).....	61
5.2. Imunomodulační účinek střevních bakterií	64
6. ZÁVĚR	67
PŘEHLED CITOVANÉ LITERATURY	68

ABSTRAKT

Celiakie je chronické zánětlivé onemocnění sliznice tenkého střeva, které se projevuje u geneticky predisponovaných jedinců po požití stravy obsahující lepek. Doposud zůstává jedinou možnou léčbou celiakie celoživotní vyloučení lepku ze stravy.

Jednou ze zcela nových terapeutických strategií je použití syntetického polymeru P(HEMA-co-SS), který v gastrointestinálním traktu specificky vyvazuje gliadin a ruší tak jeho škodlivé působení na střevní sliznici. Provedené *in vitro* testy účinků P(HEMA-co-SS) na lidské PBMC a střevní biopsie ukázaly, že potenciální terapeutická schopnost P(HEMA-co-SS) je velmi ovlivněna stupněm proteolytického zpracování obou komponent a také rozdílnou časovou aplikací P(HEMA-co-SS) do organismu oproti lepku.

Další uvažovanou podpůrnou léčbou celiakie je používání prospěšných probiotických bakteriálních kmenů. Naše pokusy vycházely z poznatku skupiny Prof. Y. Sánz, že se liší složení bakteriální flory u pacientů s aktivní formou celiakie, u pacientů léčených bezlepkovou dietou a u zdravých jedinců. Ve spolupráci s touto skupinou jsme testovali účinek vybraných bakteriálních kmenů izolovaných z pacientů s celiakií a probiotických bakteriálních kmenů na odpověď buněk přirozené imunity na gliadin. Provedené *in vitro* pokusy s lidskými dendritickými buňkami ukázaly, že přítomnost různých bakteriálních kmenů významně ovlivňuje odpověď lidských dendritických buněk na gliadin a míra ovlivnění zcela závisí na použitém bakteriálním kmenu.

ABSTRACT

Gluten sensitive enteropathy – celiac disease is a lifelong, genetically predisposed, immunologically mediated susceptibility to dietary wheat gluten, most frequently demonstrated by small-bowel damage and malabsorption syndrome. Strict adherence to gluten-free diet is the sole rational therapy of the disease.

One of the possible therapeutic strategy for the treating of celiac disease is to utilize the synthetic polymer P(HEMA-co-SS). This polymer is capable specifically bound gliadin in gastrointestinal tract and by this way to neutralize the damaging effect of this alimentary protein on mucosa of small intestine in celiac patients. The *in vitro* study on human PBMC and specimens of small intestinal biopsies of celiac patients in our laboratory demonstrated that putative therapeutic ability of P(HEMA-co-SS) is substantially influenced by degree of proteolytic processing of gliadin and P(HEMA-co-SS) and also by different timing of *per os* administration of both components in organism.

Another putative adjuvant therapy of celiac disease is employing of the beneficial probiotic bacterial strains. Our experiments were based on the findings of Prof. Y Sáenz and her group demonstrating the significant differences in the composition of bacterial microflora in patients with active form of celiac disease, patient treated by gluten-free diet and healthy control. In cooperation with this group we tested the effect of selected bacterial strains isolated from celiac patients and potentially probiotic strains on the response of innate immunity cells to gliadin. The *in vitro* experiments demonstrated that the various bacterial strains significantly modified the response of human peripheral blood derived dendritic cells to gliadin, measured by the production of cytokines and in the expression of functional surface molecules and that the degree of influence significantly depended on the bacterial strain applied.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APC	buňka prezentující antigen (antigen presenting cell)
GFD	bezlepková dieta (gluten free diet)
BSA	bovinní sérový albumin (bovine serum albumin)
Ca ²⁺	vápenatý kation
Caco-2/15	nádorová linie odvozená z lidského kolorektálního karcinomu (human colon cancer cell line)
CCL25	chemokin (chemokine C-C motif ligand 25)
CCR9	chemokinový receptor (chemokine C-C motif receptor 9)
CD	diferenční antigen (cluster of differentiation)
CXCR3	chemokinový receptor (chemokine C-X-C motif receptor 3)
DC	dendritická buňka (dendritic cell)
DMFA	N,N-dimethylformamid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
F	aminokyselina fenylalanin
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)
Foxp3	transkripční faktor (forkhead box P3)
FSC	přímý rozptyl světla (forward scatter)
G	aminokyselina glycin
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (granulocyte and macrophage colony-stimulating factor)
HLA	lidský leukocytární antigen (human leukocyte antigen)
IEC-6	linie střevních epitelových buněk (intestinal epithelial cell line)
IEL	intraepiteliální lymfocyt (intraepithelial lymphocyte)
IFN	interferon
IgA, IgG	imunoglobulin třídy A, G
IL	interleukin
iNOs	inducibilní syntáza oxidu dusnatého (inducible nitric oxide synthase)
L	aminokyselina leucin

LPMC	monomukleární buňka v lamina propria (lamina propria mononuclear cell)
LPS	lipopolysacharid
MadCam	adresinová molekula střevní tkáně (mucosal vascular addressin cell adhesion molecule)
MCP-1	monocytový chemotaktický protein (monocyte chemoattractant protein 1)
MFI	medián florescenční intenzity
MICA	stresová molekula buněk střevního epitelu, ligand pro NKG2D (MHC class I polypeptide-related sequence A)
MMP	matrix metaloproteináza (matrix metalloproteinases)
NF- κ B	jaderný faktor κ B (nuclear factor- κ B)
NKG2D	lymfocytární receptor (natural killer group 2 member D receptor)
P	aminokyselina prolin
P(HEMA-co-SS)	kopolymer hydroxyethylmethakrylátu a styrenulfonátu
PBMC	mononukleární buňka periferní krve (peripheral blood mononuclear cell)
PBS	fosfáty pufovaný fyziologický roztok (phosphate buffered saline)
PEP	prolyl-endopeptidáza
Q	aminokyselina glutamin
RANTES	chemotaktický faktor (regulated upon activation normally T-cell expressed and secreted)
RPM	počet otáček za minutu (revolutions per minute)
sIgA	sekreční IgA (slizniční)
SSC	boční rozptyl světla (side scatter)
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
Th	pomocný T-lymfocyt (helper T-cell)
THP-1	buněčná linie lidské akutní monocytické leukemie
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin
TNF	faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)
TTG2	tkáňová transglutamináza izoenzym 2
Y	aminokyselina tyrozin
ZOT	toxin sekretovaný <i>Vibrio cholerae</i> (zonula occludens toxin)
α 4 β 7	usídlovací střevní integrinový receptor

1. ÚVOD A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Celiakie je chronické zánětlivé onemocnění sliznice tenkého střeva, které se projevuje u geneticky predisponovaných jedinců po požití stravy obsahující lepek. Permanentní intolerance lepku je v současné době léčitelná pouze celoživotním vyloučením lepku ze stravy. Striktní bezlepková dieta je u většiny pacientů účinná, nemocné však finančně i sociálně diskriminuje. Pro zkvalitnění života celiaků je proto nezbytné zavedení nové alternativní terapie doplňující či nahrazující bezlepkovou dietu. Jednou ze zcela nových potenciálních terapeutických strategií je použití syntetického polymeru P(HEMA-co-SS), který v gastrointestinálním traktu specificky vyvazuje gliadin a ruší tak jeho škodlivé působení na střevní sliznici. Další uvažovanou podpůrnou léčbou celiakie je používání prospěšných probiotických bakteriálních kmenů.

Na základě těchto uvedených skutečností byly stanoveny následující cíle pokusů:

- 1) *In vitro* otestovat a porovnat potenciální terapeutické účinky P(HEMA-co-SS) na lidských PBMC izolovaných z krve zdravých dárců a celiakálních pacientů a na střevních biopsiích získaných od těchto pacientů. Pokusy provést ve dvou různých uspořádáních simulujících různé stupně proteolytického zpracování a interakce gliadinu s P(HEMA-co-SS) odpovídající rozdílné časové aplikaci P(HEMA-co-SS) do organismu po požití lepku. Při pokusech měřit ELISA metodou koncentraci IL-10 a TNF- α produkovaných PBMC a biopsiemi po stimulaci gliadinem, P(HEMA-co-SS) a jejich kombinací.
- 2) *In vitro* otestovat a porovnat, jak může přítomnost různých bakteriálních kmenů ovlivnit odpověď lidských dendritických buněk (získaných od zdravých dárců) na gliadin. Při pokusech měřit ELISA metodou koncentraci IL-10, TNF- α a IL-12 produkovaných DC a FACS-analýzou měřit expresi povrchových markerů DC po stimulaci gliadinem, různými bakteriálními kmeny a jejich kombinací.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Celiakie

Celiakie (celiakální sprue, gluten sensitivní enteropatie) je chronické zánětlivé onemocnění sliznice tenkého střeva, které se projevuje u geneticky predisponovaných jedinců po požití stravy obsahující lepek (gluten), zásobní protein pšenice, žita a ječmene (SOLLID 2002).

Celiakie patří k multifaktoriálním onemocněním, rozvoj permanentní intolerance lepku je následkem spolupůsobení faktorů genetických, imunitních i environmentálních. Až 95% postižených exprimuje na svých antigen prezentujících buňkách molekuly HLA-DQ2 či HLA-DQ8, které se vyskytují u 20-30% evropské populace. K faktorům prostředí ovlivňujícím nástup celiakie se řadí doba kojení, začátek podávání potravy obsahující gluten, střevní infekce, užívání léků či složení střevní mikroflóry (DI SABATINO a CORAZZA 2009).

U geneticky predisponovaných jedinců dochází k porušení orální tolerance štěpných produktů lepku a následné abnormální imunitní CD4 T-buněčné odpovědi a humorální reakci (IgA, IgG) na tyto peptidy i proti vlastním tkáním, což má za následek poškození střevní sliznice.

Celiakie je časté, celosvětově rozšířené onemocnění s vysokou prevalencí ve všech věkových kategoriích. V České republice dle odhadů trpí celiakií až 0,5% populace, což představuje asi 40 000 až 50 000 lidí při prevalenci 1:200-1:250. Skutečnost, že ženy trpí celiakií častěji než muži, podporuje úvahy o autoimunitní povaze onemocnění.

Klinický obraz celiakie je velmi různorodý a bývá přirovnáván k ledovci, jehož vrchol vyčnívající nad vodní hladinu tvoří léčené klinicky nápadné formy, nediodagnostikovaní nemocní s méně nápadnými nebo žádnými symptomy představují převažující ponořenou část ledovce (MÄKI a COLLIN 1997). Všichni postižení však vykazují charakteristické změny sliznice tenkého střeva, tj. atrofii klků, hyperplasii krypt a infiltraci lamina propria zánětlivými buňkami. Následkem těchto patologických změn střevní sliznice jsou poruchy absorpce živin, vitamínů a minerálních látek,

vyvolávající především u dětí typické (gastrointestinální) příznaky celiakie. K nim patří chronické průjmy, steatorea, obstipace, bolesti břicha, nechutenství, zvracení, úbytek váhy, únava. Atypickými (extraintestinálními) příznaky, které se projevují především u dospělých osob, mohou být artritidy, bolesti kloubů, anemie, poruchy plodnosti, zvýšená kazivost zubů, afty, menší vzrůst, padání vlasů, jaterní či neurologické poruchy (ALAEDINI a GREEN 2005, FASANO a CATASSI 2001).

U 20-30% pacientů se celiakie manifestuje kožní formou jako tzv. Duhringova herpetiformní dermatitida svědicí vyrážkou na loktech, hýždích a zádech. Tito pacienti nemusí mít současné typické gastrointestinální příznaky celiakie, ovšem hladina sérových protilátek a poškození střevní sliznice je identické jako u klasických celiaků (REUNALA 2001).

Při dodržování bezlepkové diety (GFD) dochází během 2-3 měsíců k normalizaci sliznice tenkého střeva, k poklesu titru sérových protilátek a k vymizení klinických příznaků choroby (SEE a MURRAY 2006). Výjimkou je vzácná ale život ohrožující forma celiakie, tzv. refraktorní sprue, která se projevuje stejnými příznaky jako klasická celiakie, pacienti však nereagují na léčbu bezlepkovou dietou (RUBIO-TAPIA a MURRAY 2010).

Diagnostika onemocnění je snadná, ale díky rozmanitým, nenápadným, často atypickým klinickým symptomům je diagnostikováno a léčeno pouze 10-15% nemocných. Serologické markery celiakie zahrnují protilátky proti gliadinu, tkáňové transglutamináze a antiendomyziální protilátky. Stanovují se ve třídách IgA a IgG. Rozhodujícím diagnostickým ukazatelem celiakie je však histologický obraz biopsie sliznice tenkého střeva odebrané endoskopicky z dolní části duodena perorální sondou. Histologické hodnocení biopsie se řídí dle Marshovi klasifikační stupnice, která zohledňuje míru poškození klků, krypt a infiltrace sliznice intraepiteliálními lymfocyty (MARSH a CROWE 1995). V rámci diagnostických vyšetření lze provést také stanovení specifických alel kódujících molekuly HLA-DQ2/DQ8. Součástí definitivní diagnózy je také sledování poklesu klinické a serologické odpovědi pacienta na bezlepkovou dietu.

Často bývá celiakie sdružena s jinými autoimunitními chorobami, typicky s diabetem 1. typu (3-8%) a autoimunitními onemocněními štítné žlázy (více než 10%), další chorobou asociovanou s celiakií bývá také Downův syndrom, IgA deficeience, revmatoidní artritida či roztroušená skleróza. Dlouhodobě neléčená celiakie může navíc vést k rozvoji maligních T-buněčných lymfomů a adenokarcinomů. Toto riziko lze

velmi výrazně snížit dodržováním bezlepkové diety, která je doposud stále jedinou možnou léčbou celiakie (SILANO et al. 2007, SILANO et al. 2008b).

2.2. Lepek (gluten)

Lepek (gluten), prokázaný exogenní spouštěč celiakie, je směsí zásobních bílkovin v endospermu obilných zrn. Ethanolovou extrakcí lze lepek rozdělit na v alkoholu rozpustné prolaminy a nerozpustné gluteniny. Prolaminy, hrající klíčovou úlohu v patogenezi celiakie, se u pšenice nazývají gliadiny, u žita sekaliny, u ječmene hordeiny a u ovesa aveniny. Všechny tyto příbuzné obiloviny čeledi lipnicovité (podčeď *Triticeae*) jsou schopny vyvolávat celiakii, jelikož jejich prolaminy obsahují homologní imunogenní epitopy (VADER et al. 2003). Toxicita prolaminů spočívá jednak v jejich přímém cytotoxickém působení na sliznici a jednak v jejich schopnosti aktivovat specifickou T-buněčnou odpověď, schopnosti indukovat epiteliální apoptózu a spouštět tak ve střevě zánětlivý proces.

Pšeničné gliadiny se dle elektroforetické pohyblivosti dělí na α , β , γ a ω -gliadiny. Pro celiaky nejtoxičtější α -gliadin je heterogenní monomerní polypeptid tvořený různým počtem aminokyselin (260-800) s celkovou molekulovou hmotností 30-40 kDa. Součástí aminokyselinového řetězce je šest molekul cysteinu, které tvoří intramolekulární disulfidové vazby. Obsahuje vysoký podíl prolinu (až 15%), který je zodpovědný za extrémní rezistenci gliadinu k trávicím enzymům gastrointestinálního traktu a tvoří významné imunogenní epitopy s vysokou afinitou k molekulám HLA-DQ2/DQ8. Vysoký obsah glutaminu (až 35%) způsobuje, že je gliadin dobrým substrátem pro enzym tkáňovou transglutaminázu 2 (TTG2), která zvyšuje imunogenicitu glutenových fragmentů deamidací glutaminu. Vysoký obsah prolinu a glutaminu je společným rysem všech prolaminů (FUCHS 2005, SHEWRY a TATHAM 1990).

Působením proteáz žaludku, pankreatu a membránových peptidáz kartáčkového lemu tenkého střeva je gliadin v gastrointestinálním traktu enzymaticky tráven na dále neštěpitelné fragmenty (HAUSCH et al. 2002). Tyto vznikající peptidy mohou prostupovat přes bariéru střevního epitelu do lamina propria, přicházet zde do kontaktu s imunitními buňkami a indukovat prostřednictvím antigen prezentujících buněk

proliferaci a aktivaci specifických T-lymfocytů. T-lymfocyty mohou být aktivovány nativními peptidy či peptidy modifikovanými TTG2.

Dobře definovaným imunodominantním peptidem α -gliadinu, který vyvolává silnou T-buněčnou odpověď, je 33mer (amk 57-89) o aminokyselinové sekvenci LQLQPFPPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF. Tento peptid obsahuje 6 částečně se překrývajících HLA-DQ2-vazebných epitopů (QIAO et al. 2004, SHAN et al. 2002). Dalším dobře charakterizovaným fragmentem α -gliadinu je neimunogenní peptid 31-43 o sekvenci LGQQQPFPPQQPY, který je považován za neschopný stimulovat gluten reaktivní CD4 T-lymfocyty. Peptid 31-43 ovšem indukuje v celiakální sliznici přirozenou imunitní odpověď na gliadin, jelikož zvyšuje produkci IL-15, typického cytokinu přirozené imunity, který inhibuje účinky TGF- β , zvyšuje leukocytární infiltraci lamina propria, podporuje maturaci dendritických buněk a způsobuje epiteliální stres (BENAHMED et al. 2007, MAIURI et al. 2000, MAIURI et al. 2001, MAIURI et al. 2003).

Ve vodě lepek bobtná a je příčinou jedinečných pekařských vlastností pšeničného těsta, jeho tažnosti, pružnosti a lepivosti (WIESE 2007). Tento fakt zajišťuje bílkovinám pšenice výjimečný technologický význam v potravinářském průmyslu.

2.3. Patogeneze celiakie

2.3.1. Epiteliální translokace gliadinových peptidů

V gastrointestinálním traktu je gliadin hydrolyzován působením žaludečního pepsinu, pankreatickými proteázami a membránovými peptidázami kartáčkového lemu enterocytů tenkého střeva na dále neštěpitelné fragmenty (HAUSCH et al. 2002). Některé gliadinové peptidy (neimunogenní peptid 31-43) mohou působit přímo cytotoxicky na střevní epitel prostřednictvím mechanismů přirozené imunity, jiné (imunogenní peptid 33mer) jsou schopny aktivovat adaptivní imunitní odpověď (CICCOCIOPPO et al. 2005).

Při oslabení bariérové funkce sliznice pronikají gliadinové peptidy přes epiteliální vrstvu do lamina propria, kde přicházejí do kontaktu s buňkami imunitního systému. Způsob, jakým se dostávají gliadinové peptidy ze střevního lumen do lamina

propria není znám. Předpokládá se paracelulární průnik usnadněný porušením těsných spojů či intracelulární transport epiteliální transcytózou (SCHUMANN et al. 2008). Uvažuje se také o „samplerování“ gliadinových peptidů dendritickými buňkami přítomnými v lamina propria, jejichž výčnělky zasahují mezi střevními epiteliálními buňkami až do lumen střeva, kde odebírají vzorky peptidů, které následně prezentují T-lymfocytům.

2.3.2. Modifikace a prezentace gliadinových peptidů

Proniknou-li u celiaků gliadinové peptidy přes poškozenou zvýšeně propustnou epitelovou vrstvu střevní sliznice, stávají se díky vysokému obsahu glutaminu velmi afinním substrátem pro enzym tkáňovou transglutaminázu 2 (TTG2), jejíž exprese v organismu (především fibroblasty) je při celiakii zvýšena (ESPOSITO et al. 2003). TTG2 je všudypřítomná Ca^{2+} dependentní protein-glutamin: amin- γ -glutamyltransferáza katalyzující posttranslační deamidaci a transamidační modifikace proteinů. V patogenezi celiakie má dvě zásadní role. Jednak je TTG2 cílovým autoantigenem pro antiendomyziální a anti-TTG protilátky (DIETERICH et al. 1997) a dále v lamina propria TTG2 katalyzuje deamidaci glutaminu obsaženého v peptidech na glutamát nebo prokřížení gliadinových peptidů intramolekulární vazbou glutaminu na další primární aminy, např. lyzin. Deamidací získávají peptidy záporný náboj, který zesiluje jejich vazbu na HLA-DQ2/DQ8 glykoproteiny na antigen prezentujících buňkách (APC) a tím zvyšuje i imunostimulační efekt těchto peptidů (ARENZ-HANSEN et al. 2000, MOLBERG et al. 1998, VAN DE WAL et al. 1998).

2.3.3. Účinky gliadinu na antigen prezentující buňky (APC)

Morfologické a funkční změny APC (monocytů, makrofágů, dendritických buněk) vyvolané gliadinem byly popsány v mnoha studiích. Myší peritoneální makrofágy stimulované gliadinovými peptidy v přítomnosti $IFN-\gamma$ produkují zvýšené množství $TNF-\alpha$, IL-10, RANTES a iNOs (TUČKOVÁ et al. 2000, TUČKOVÁ et al. 2002). Gliadin v přítomnosti $IFN-\gamma$ také aktivuje lidské monocytární buňky linie THP-1 ke

zvýšené produkci IL-8 (NF- κ B aktivační drahou) a TNF- α (JELÍNKOVÁ et al. 2004). Při dalších pokusech byl porovnáván účinek gliadinu na lidské periferní monocyty (PBMC) izolované z krve aktivních neléčených celiaků, celiaků dodržujících GFD a zdravých dárců. Gliadin indukoval znatelně vyšší cytokinovou produkci (TNF- α a IL-8) a expresi povrchových aktivačních markerů (CD80, CD86, CD83, CD40) u PBMC aktivních celiakálních pacientů než u PBMC od pacientů na GFD a od zdravých dárců (CINOVÁ et al. 2007). Také lidské dendritické buňky, derivované z PBMC, procházejí po stimulaci gliadinem morfologickými, fenotypovými a funkčními změnami. Gliadinem maturované dendritické buňky zvyšují expresi povrchových maturačních markerů (CD83, CD80, CD86, CD40, HLA-DR), ztrácí schopnost fagocytózy a zvyšují produkci cytokinů a chemokinů (IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α , RANTES). Gliadinem stimulované dendritické buňky mají také vyšší schopnost aktivovat T-lymfocyty (PALOVÁ-JELÍNKOVÁ et al. 2005, RAKHIMOVA et al. 2009). V nedávné studii byla potvrzena schopnost gliadinových peptidů indukovat migraci dendritických buněk, doprovázenou strukturálními změnami jejich cytoskeletu (rozpad adhezivních struktur, podozomů) (CHLÁDKOVÁ et al. 2010).

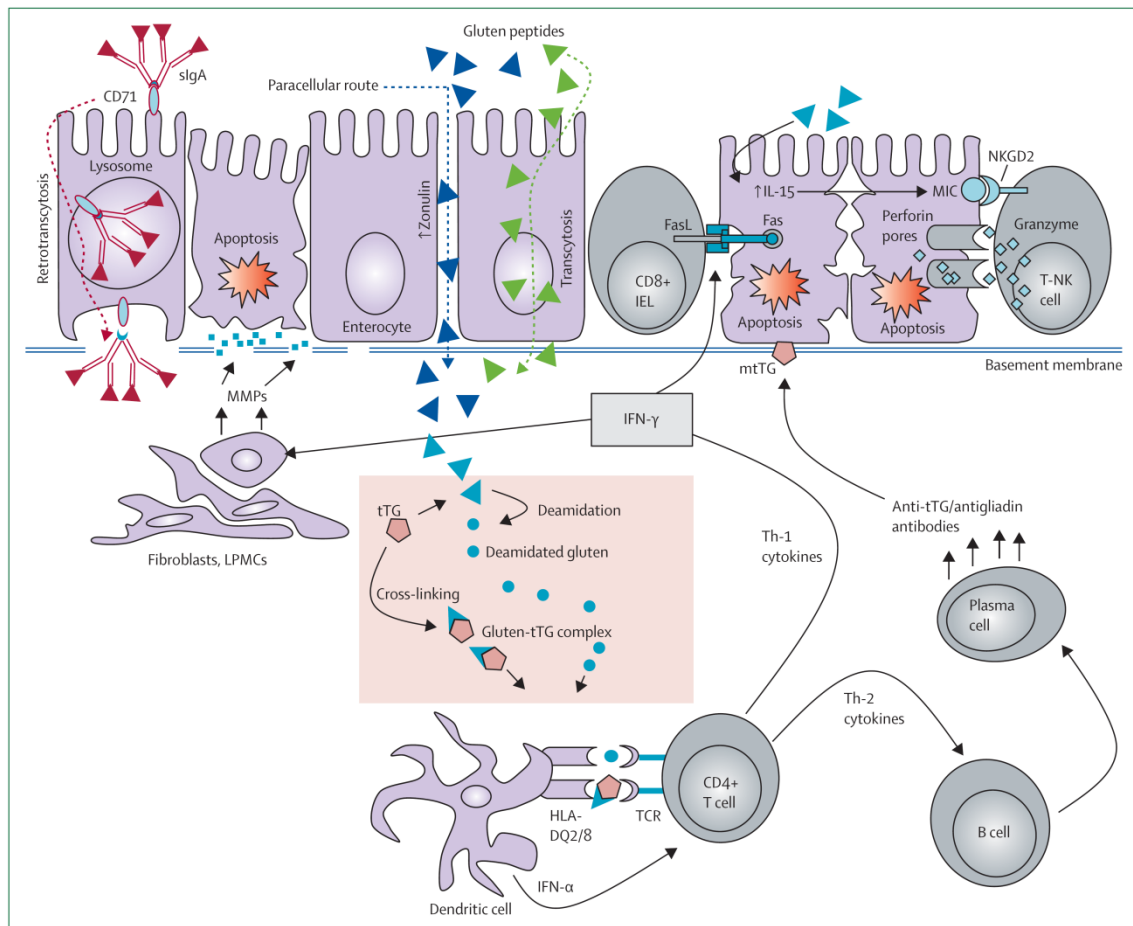
2.3.4. Aktivace přirozené a adaptivní imunitní odpovědi na gliadin

Prezentace TTG2 modifikovaných gliadinových fragmentů HLA-DQ2/DQ8 pozitivními APC T-lymfocytům vede k aktivaci gliadin-specifických CD4⁺ Th-lymfocytů, efektorových buněk adaptivní imunity. Aktivované Th1-lymfocyty produkují vysoké hladiny prozáněťových cytokinů (především IFN- γ , dále TNF- α , IL-2, IL-6, IL-18, IL-21), které aktivují další buněčné populace a buněčné enzymy podílející se na poškození střevní tkáně. (FINA et al. 2008, NILSEN et al. 1998, PRZEMIOSLO et al. 1994, SALVATI et al. 2002). Ve střevních biopsiích celiakálních pacientů byla prokázána zvýšená aktivita metaloproteáz poškozujících extracelulární matrix (MOHAMED et al. 2006). Cytokiny produkované aktivovanými Th2-lymfocyty řídí aktivaci a klonální expanzi B-lymfocytů a jejich diferenciaci do plasmatických buněk produkujících specifické IgA a IgG protilátky, které jsou namířeny proti exogennímu gliadinu i endogenním autoantigenům včetně TTG2 a endomyzia. Účast těchto protilátek

v patogenezi celiakie není zcela jasná, v současnosti mají především diagnostický význam.

Gliadin specifická T-buněčná aktivace je součástí adaptivní imunity a je hlavním patologickým mechanismem celiakie. Některé epitopy gliadinu (peptid 31-43) ale nejsou rozpoznávány T-lymfocyty a poškozují střevní sliznici indukcí přirozené imunitní odpovědi na gliadin bez aktivace T-buněk (MAIURI et al. 2003, STEPNIAK a KONING 2006). Peptid 31-43 stimuluje enterocyty a APC v lamina propria k produkci IL-15, typického cytokinu přirozené imunity. IL-15 zvyšuje intraepiteliální infiltraci lamina propria cytotoxickými T-lymfocyty (MAIURI et al. 2001) a indukuje expresi stresových molekul MICA na buňkách střevního epitelu a expresi NKG2D receptorů na CD8+ intraepiteliálních T-lymfocytech. Interakce mezi MICA a NKG2D vede k buněčné smrti enterocytů a postupné atrofii klků střevní sliznice (HÜE et al. 2004, MAIURI et al. 2000). Dále IL-15 inhibuje imunoregulační účinky TGF- β a podporuje maturaci dendrických buněk (BENAHMED et al. 2007).

Obrázek č.1: Mechanismy poškození střevní sliznice při celiakii:



(DI SABATINO a CORAZZA. Lancet 2009)

2.4. Alternativní možnosti terapie

Celiakie je celoživotní onemocnění v současné době léčitelné pouze bezlepkovou dietou (GFD). Naprostým vyloučením pšenice, žita, ječmene a ovsa ze stravy dochází u nemocných s klasickou formou celiakie k remisi, ústupu klinických obtíží, poklesu sérových protilátek a normalizaci histologického obrazu střevní sliznice. Při přísném dodržování je tedy GFD u většiny pacientů účinná, nemocným však velmi komplikuje život. Stravovat se plnohodnotně mimo domov, v zaměstnání, ve školách nebo na dovolené je pro celiaky stále dosti obtížné (LEE A NEWMAN 2003).

Existuje mnoho důvodů, proč je v současnosti GFD terapií ne zcela vyhovující. GFD je bezpochyby velkým zásahem do životního stylu. Kvalitu života pacientů snižují zejména níže uvedená fakta. Bezlepkové potraviny nejsou běžně dostupné a jsou finančně nákladné (LEE et al. 2007). GFD je málo chutná a pestrá. Škodlivý lepek je aditivem celé řady běžných potravin (uzeniny, jogurty apod.) a kontaminuje potraviny také během výrobního technologického procesu (při zpracování a dopravě surovin), takže potraviny označené jako bezlepkové nezřídka obsahují stopová množství lepku a absolutní vyloučení glutenu z přijímané stravy je tak téměř nemožné. Citlivost celiaků k lepku je značně individuální, nelze tedy stanovit hranici povoleného množství lepku v potravě. Ochota dodržovat GFD se mění individuálně i s věkem a speciálně mládež těžko odolává silnému sociálnímu tlaku společnosti konzumovat lepek. Kromě toho, GFD není účinná u pacientů s refraktorní formou celiakie. Pro zkvalitnění života celiaků je proto nezbytné zavedení cenově dostupné, bezpečné a účinné terapie celiakie, která by doplnila či nahradila léčbu GFD (LERNER 2010, SOLLID a KHOSLA 2005, BENAHMED et al. 2003, ZINGONE et al. 2010).

Nové terapeutické metody doplňující GFD musí být cenově přijatelné, s nízkým rizikem vedlejších účinků a musí vykazovat vysoký účinek u většiny pacientů. Měly by být zaměřeny na neutralizaci nízkého množství lepku jako ochrana pacientů před neúmyslným či nevyhnutelným požitím lepku v potravinách kontaminovaných lepku při průmyslové výrobě. Přímo k léčbě klasické celiakie či refraktorní sprue, při které GFD není účinná, by mohly být použity finančně náročnější a rizikovější alternativní terapie nahrazující GFD (SCHUPPAN et al. 2009). Léčiva musí být velmi dobře orálně i systémově tolerována, neantigenní, se selektivní lokalizací účinku.

Během posledních desetiletí byl učiněn obrovský pokrok v porozumění patofyziologickým procesům souvisejícím s celiakií. Každý jednotlivý krok v patogenezi celiakie je potenciálním cílem nových terapeutických strategií v léčbě celiakie, od výběru vhodného pšeničného druhu, přes postup gliadinových fragmentů do lumen a jejich průnik přes střevní epitel do lamina propria, až po imunomodulaci imunitních reakcí vyvolaných gliadinem (LERNER 2010, ZINGONE et al. 2010).

Problémem při testování terapeutických strategií zůstává možnost použití zvířecích modelů pro celiakii. Hodnocení preklinických studií je tak ve většině případů omezeno na *in vitro* testy.

2.4.1. Úprava či selekce lepku přijímaného potravou

2.4.1.1. Použití původních druhů či geneticky modifikovaných druhů obilovin se sníženým obsahem lepku

Šlechtěním obilovin na tetra- či hexaploidní druhy za účelem růstu zemědělské výnosnosti a využití v potravinářském průmyslu bylo dosaženo záměrného zvýšení obsahu lepku v pšenici a tím došlo k nárůstu náchylnosti populace k celiakii. Lepek izolovaný z původního primitivního diploidního druhu pšenice *Triticum monococcum* opravdu obsahuje méně imunodominantních epitopů než lepek izolovaný z hexaploidního druhu pšenice *Triticum aestivum*, který je nejpoužívanějším pšeničným druhem v potravinářském průmyslu a vyvolává silnou T-buněčnou odpověď ve srovnání s *Triticum monococcum*. Snížit toxicitu stravy pro celiaky je tedy možné výběrem obilných druhů se sníženým obsahem imunogenních sekvencí lepku (MOLBERG et al. 2005). Pšeničné druhy neobsahující imunogenní sekvence lze také získat metodami genetického inženýrství. Problematické ale může být zachování potravinářsky důležitých vlastností těsta vytvořeného z mouky získané z pšeničných druhů s nízkým obsahem lepku.

2.4.1.2. Enzymatické předzpracování mouky

Laktobacily přidané ke kvásku dokáží proteolyzovat prolin/glutamin-bohaté prolaminové peptidy a tak snižovat jejich toxicitu (RIZZELLO et al. 2007). Podobnou schopnost degradovat imunogenní T-buněčné epitopy lepku mají i pšeničné glutamin-specifické endoproteázy produkované během klíčení pšenice, kdy umožňují rostlině pro růst využívat aminokyseliny ze zásobních glutenových proteinů. To otevírá možnost vytvářet pro celiaky netoxické obilné produkty z mouky získané z klíčící pšenice (KIYOSAKI et al. 2007). Další možností předzpracování mouky je inkubace s mikrobiální tkáňovou transglutaminázou a netoxickým substrátem, se kterým je gliadin po deaminace prokřížen a ztrácí tak vazebnou afinitu k HLA-DQ2/8 (YOKOYAMA et al. 2004, PASTERNAK et al. 1998).

Teprve budoucí studie rozhodnou, jaká z těchto strategií je nejvhodnější jak pro pacienty tak pro průmyslovou výrobu. Produkty získané z takto upravené mouky musí mít zachované požadované potravinářské vlastnosti, konzistenci a nutriční hodnotu a jejich průmyslová výroba musí být dostatečně finančně efektivní (SCHUPPAN et al. 2009).

2.4.2. Intraluminální terapie

2.4.2.1. Orální enzymová terapie

Jednou z dalších možností jak zrušit škodlivé účinky gliadinových peptidů je podpořit degradaci těchto peptidů ještě před jejich průnikem do lamina propria. Mikrobiální či plísňové prolyl-endoropeptidázy (PEP) získané například z *Flavobacterium meningosepticum*, *Sphingomonas capsulata*, *Aspergillus niger* nebo *Myxococcus xanthus* urychlují destrukci prolin-bohatých imunogenních peptidů gliadinu (STEPNIAK et al. 2006, MITEA et al. 2008). Sama mikrobiální PEP však není dostatečně účinná, proto byl v *in vitro* modelu i *in vivo* na krysím modelu účinek PEP ze *Sphingomonas capsulata* podpořen současnou aplikací endoproteázy z klíčící

pšenice. Synergistickým účinkem obou enzymů je možné zvýšit bezpečné množství lepku, které by mohli pacienti využívající tuto terapii pozřít. Oba enzymy mohou být podávány jako lyofilizovaný prášek či tableta (GASS et al. 2007). Kombinovaná orální enzymová terapie je nyní v první fázi klinických studií. Stejně jako většina alternativních terapeutických strategií nebude ale ani kombinovaná orální enzymová terapie schopná dostatečně degradovat veškeré množství glutenu přijímané denně v klasické stravě (desítky gramů), ale spíše bude sloužit k eliminaci škodlivého účinku několika stovek miligramů až gramů glutenu, jako doplněk GFD u vysoce sensitivních pacientů.

2.4.2.2. Intraluminální vyvázání gliadinových peptidů

Pinier a spol. objevili polymerní sloučeninu P(HEMA-co-SS), která vyvazuje a inaktivuje gliadin v gastrointestinálním traktu a ruší tak jeho toxický efekt na střevní sliznici (PINIER et al. 2009). Tento syntetický lineární kopolymer hydroxyethylmethakrylátu (HEMA) a 4-styrensulfonátu sodného (SS) o molekulové hmotnosti 45kDa nese negativní náboj a silně specificky váže gliadin při žaludečním (1,2) i střevním pH (6,8) prostřednictvím elektrostatických interakcí a vodíkových vazeb (LIANG et al. 2009, LIANG et al. 2010).

Vyvazováním gliadinu P(HEMA-co-SS) blokuje jeho natrávení a zabraňuje tak formování menších toxických imunogenních peptidů. Pinier a spol. prokázali, že tímto dochází ke snížení permeability střevního epitelu indukované gliadinem a ke snížení aktivace T-lymfocytů u gliadin-sensitivních HLA-HCD4/DQ8 transgenních myši, které P(HEMA-co-SS) velmi dobře tolerovaly i ve vysokých dávkách (830 mg/kg/den) (PINIER et al. 2009). Navíc bylo na krysím modelu prokázáno, že převážná část P(HEMA-co-SS) (93%) je vylučována z těla ve stolici a že P(HEMA-co-SS) není vstřebáván do systému ve velké míře dokonce ani při mírných zánětlivých změnách střevní sliznice a za podmínek zvýšené intestinální permeability (PINIER et al., odesláno do tisku). P(HEMA-co-SS) má tedy slibné terapeutické schopnosti a je považován za vhodnou potenciální podpůrnou (doplňkovou) terapii celiakie. Prvotní studie prozatím vyvolávají nadšení. V dalších pokusech je však třeba důkladně prověřit mechanismy účinku P(HEMA-co-SS) *in vitro* i na *in vivo* modelech a také ohodnotit jeho účinnost

v přítomnosti celého lepku a jiných složek potravy. Dále by měly následovat první fáze klinických zkoušek.

2.4.3. Inhibice intestinální permeability

K pronikání glutenových peptidů do lamina propria výrazně přispívá porušení těsných spojů střevního epitelu. Enterocyty střevního epitelu celiaků uvolňují po stimulaci gliadinem a jeho vazbě na membránový receptor CXCR3 parakrinní protein zonulin, který narušení epitelu amplifikuje a zvyšuje tak intestinální permeabilitu. Na membránový zonulinový receptor enterocytů se váže také toxin sekretovaný bakterií *Vibrio cholerae*, označovaný jako ZOT (zonula occludens toxin), vykazující stejné účinky jako zonulin (FASANO et al. 2000, LAMMERS et al. 2008). Velmi slibným a v současné době nejlépe prostudovaným farmakologickým prostředkem pro léčbu celiakie je oktapeptid AT-1001, syntetický homolog ZOT, jenž je schopen blokovat zonulinové receptory a zamezovat tak porušení těsných spojů střevního epitelu a následnému paracelulárnímu prostupu gliadinových fragmentů. Dosavadní klinické studie prokazují, že AT-1001 je pacienty velmi dobře tolerován a jeho užívání zlepšuje gastrointestinální příznaky celiakie (PATERSON et al. 2007). Ale i v tomto případě samotný terapeutický efekt AT-1001 nebude pravděpodobně dostatečný pro úplnou náhradu GFD, proto je považován za potenciální lék doplňující GFD.

2.4.4. Tlumení adaptivní imunitní odpovědi – suprese aktivace gliadin-specifických T-lymfocytů

2.4.4.1. Inhibitory tkáňové transglutaminázy

Tkáňová transglutamináza (izoenzym TTG2) je Ca^{2+} dependentní transferázou. Tento enzym v lamina propria deamiduje glutamin obsažený v gliadinových peptidech

na glutamát, čímž zvyšuje negativní náboj a následně také afinitu modifikovaných gliadinových peptidů k molekulám HLA-DQ2/DQ8 na antigen prezentujících buňkách. Inhibicí deamidace gliadinu je snižována schopnost vazby gliadinových peptidů na HLA-DQ2/DQ8 molekuly a zároveň tlumena aktivace T-buněčné odpovědi. Činnost TTG2 je možno účinně inhibovat různými typy strukturních analogů gliadinových peptidů. Potenciálně velmi atraktivní způsob terapie je ale dosti rizikový, jelikož TTG2 je multifunkčním enzymem, který je v organismu zapojen do řady důležitých fyziologických procesů jako je diferenciaci a růst buněk, apoptóza, buněčná adheze, endocytóza či hojení tkání. Lze tedy očekávat, že pokud by inhibitor TTG nepůsobil striktně lokálně ve střevní sliznici, mohly by být inhibovány i jiné transglutaminázy a docházelo by k poruchám tkáňové homeostázy. Kromě toho je znám fakt, že některé gliadinové epitopy mohou být rozpoznávány i bez modifikací TTG2 (SCHUPPAN et al. 2009, SIEGEL a KHOSLA 2007).

2.4.4.2. HLA-DQ2 inhibitory

U celiakálních pacientů je aktivována adaptivní imunita prezentací gliadinových peptidů na HLA-DQ2/DQ8 následovaná aktivací CD4+ T-lymfocytů, které iniciují a udržují zánětlivou odpověď. Proto se nabízí terapie na principu blokování prezentace peptidů T-lymfocytům pomocí analogů imunogenních gliadinových peptidů, které by obsazovaly vazebná místa na HLA-DQ2 molekulách ale nebyly rozpoznávány gluten-specifickými T-lymfocyty. Většina doposud testovaných peptidů ovšem stále vykazuje spíše agonistický účinek s imunogenními gliadinovými peptidy a také nízkou vazebnou afinitu k HLA-DQ2. Kromě toho není doposud stále zcela jasné, jakým mechanismem prostupují gliadinové peptidy skrze epitel do lamina propria a je tedy velmi obtížné zajistit přednostní prostup analogů gliadinu, aby mohly v lamina propria kompetovat s imunogenními peptidy o vazebná místa na cílových buňkách (SCHUPPAN et al. 2009, SILANO et al. 2008a, XIA et al. 2006).

2.4.5. Indukce glutenové tolerance

Nejoptimálnější kauzální terapií celiakie je obnovení glutenové tolerance. Navození tolerance bylo studováno intranasální aplikací gliadinových peptidů gliadin-sensitivním transgenním HLA-DQ8 myším a vedlo ke snížení T-buněčné odpovědi na gliadin a snížení produkce prozánětlivých cytokinů (SENGER et al. 2003, MAURANO et al. 2001).

Subkutánními injekcemi podávané imunogenní gliadinové peptidy navodily toleranci u gliadinem imunizovaných HLA-DQ2 transgenních myší. Touto „glutenovou vakcinací“ došlo k potlačení CD4 T-buněčné proliferace, snížení produkce prozánětlivých cytokinů a zvýšení exprese T-regulačních markerů na slezinných CD4+ buňkách při odpovědi na stimulaci gliadinem (KEECH et al. 2009).

Podstatným rizikem této vakcinační strategie je ale nebezpečí posílení imunizace namísto navození tolerance.

2.4.6. Imunomodulace probiotiky

Za jeden z environmentálních faktorů ovlivňujících vznik a vývoj celiakie je v současné době považována střevní mikroflóra. Fyziologická rovnováha střevní mikroflóry a určité probiotické kmeny mohou posilovat funkci střevní bariéry a mít protektivní vliv na vznik onemocnění. Naopak, bakteriální infekce či přerůstání oportunních patogenů může přispívat k patologickým procesům onemocnění stimulací produkce prozánětlivých cytokinů a zvyšováním intestinální permeability. Jednoduchou, bezpečnou a finančně dostupnou metodou terapie celiakie by se tedy mohlo stát užívání probiotik, preparátů obsahujících mikroorganismy, které prostřednictvím potravní kompetice a tvorby bakteriocinů potlačují růst patogenní mikroflóry v tenkém střevě pacientů, zajišťují využití pro člověka nedostupných živin a mají tak pozitivní účinky na zdraví organismu (KREJSEK et al. 2007).

Složení střevní mikroflóry celiaků se liší od zdravých jedinců vyšším podílem rodů *Bacteroides*, *Clostridium*, *Staphylococcus* a *Eubacterium* a nižším počtem prospěšných bakterií rodu *Bifidobacterium* (COLLADO et al. 2007, SANZ et al. 2007).

Medina a kol. testovali schopnost probiotických kmenů *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium bifidum* regulovat cytokinovou produkci a expresi povrchových markerů lidských periferních mononukleárních buněk (PBMC) koinkubovaných s extrakty bakterií získanými ze stolice pacientů s aktivní celiakií. Snížení produkce prozánětlivých cytokinů TNF- α a IFN- γ a zvýšení produkce IL-10 podpořilo úvahy o pozitivní imunoregulační roli použitých probiotických kmenů (MEDINA et al. 2008).

Také PBMC stimulované gliadinem za přítomnosti gram-negativních bakterií *Escherichia coli* a *Shigella* izolovaných ze stolice celiakálních pacientů produkují vyšší množství prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-12, IFN- γ) než za přítomnosti probiotických kmenů *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium longum*. Tyto prospěšné kmeny navíc indukují produkci IL-10 s protizánětlivým účinkem. Exprese povrchových aktivačních markerů PBMC je taktéž více ovlivněna v přítomnosti bakterií *Escherichia coli* a *Shigella* (DE PALMA et al. 2010).

Prospěšný vliv kmene *Bifidobacterium bifidum* je zřejmý také z *in vivo* pokusů, kdy byly výše uvedené gram-negativní bakteriální kmeny aplikovány v různých kombinacích do podvázaných střevních kliček bezmikrobních krys za současné stimulace gliadinem a IFN- γ . Působení gliadinu s potenciálními patogeny *Escherichia coli* nebo *Shigella* vedlo k výraznému snížení počtu střevních pohárkových buněk a ke zvýšené sekreci mucinu. Současnou aplikací probiotického kmene *Bifidobacterium bifidum* k těmto potenciálním patogenům a gliadinu bylo dosaženo částečné redukce patologických změn střevní sliznice (CINOVA et al., odesláno do tisku).

V jiné studii byly probiotické bakterie *Lactococcus lactis* podávány HLA-DQ8 transgenním myším po parenterální sensibilizaci imunogenním deaminovaným gliadinem. Výsledkem bylo snížení T-buněčné odpovědi na gliadin a zvýšení Foxp3 pozitivních T-regulačních lymfocytů v mezenterálních lymfatických uzlinách (HUIBREGTSE et al. 2009).

2.4.7. Ostatní možnosti terapie

2.4.7.1. Inhibice leukocytární adheze a migrace leukocytů do zánětlivé tkáně

Migrace leukocytů z cirkulace do cílové tkáně („homing“) je zajišťována molekulami, které řídí osídlení tkání určitou buněčnou populací. „Homing“ střevních efektorových T-lymfocytů do lamina propria je zajišťován vazbou leukocytárního receptoru CCR9 k chemokinovému ligandu CCL25, který je sekretován střevním epitelem, a vazbou leukocytárního integrinu $\alpha 4\beta 7$ k adresinové molekule MadCam-1 na střevním vysokém cévním endotelu. Nabízí se tedy další možná metoda terapie založená na principu blokování homingu lymfocytů do tenkého střeva použitím antagonistů CCR9 či protilátek proti integrinu $\alpha 4\beta 7$, které jsou v současnosti testovány pro léčbu roztroušené sklerózy a zánětlivých střevních onemocnění. Nevýhodou však zůstává současné blokování homingu T-regulačních lymfocytů s imunosupresivním působením a následné zvýšení náchylnosti ke gastrointestinálním infekcím a poruchám orální tolerance potravinových proteinů (SOLLID a KHOSLA 2005).

2.4.7.2. Cytokinová terapie

Stejně jako u řady jiných autoimunitních a chronických zánětlivých chorob se také při léčbě celiakie uvažuje o terapii pomocí cytokinů. V úvahu připadá například rekombinantní IL-10 (Tenovil) tlumící Th1 imunitní odpověď na gliadin potlačením aktivace gliadin-specifických T-lymfocytů (SALVATI et al. 2005). Dalšími kandidáty jsou například protilátky neutralizující IFN- γ (Fontolizumab), který je dominantním prozánětlivým cytokinem produkovaným gluten-specifickými T-lymfocyty (PRZEMIOSLO et al. 1995), či anti IL-15 protilátky (HuMax-IL-15 a CRB-15). Uvedené protilátky jsou v současnosti klinicky testovány pro léčbu Crohnovy choroby (anti IFN- γ) a revmatoidní artritidy (anti IL-15).

3. METODY A MATERIÁL

3.1. Testování účinku P(HEMA-co-SS)

3.1.1. Enzymatické štěpení

Účinkům pepsinu vázaného na agarózový gel (MP Biomedicals) byl podroben:

- 1) gliadin (from wheat gluten, SIGMA)
- 2) P(HEMA-co-SS)
- 3) gliadin v přítomnosti P(HEMA-co-SS)

Z pepsin-agarózového gelu byl centrifugací (4000 rpm., 5 min., 20°C) odstraněn skladovací pufr a gel byl třikrát promyt sterilní vodou a poté třikrát roztokem 0,1 M HCl. Za intenzivního třepání bylo při 37°C 45 minut s 5 ml promyтого pepsin-agarózového gelu inkubováno:

- 1) 7 ml roztoku surového gliadinu o koncentraci 10 mg/ml v 0,1M HCl (pH 1,8)
- 2) 7 ml roztoku P(HEMA-co-SS) o koncentraci 10 mg/ml v 0,1M HCl (pH 1,8)
- 3) 7 ml směsi obsahující:
 - 3,5 ml roztoku surového gliadinu o koncentraci 10mg/ml v 0,1M HCl (pH 1,8)
 - 3,5 ml roztoku P(HEMA-co-SS) o koncentraci 30mg/ml v 0,1M HCl (pH 1,8)

Štěpení bylo poté zastaveno odstraněním pepsin-agarózového gelu centrifugací (4000 rpm, 5 min., 4°C). Supernatant obsahující naštěpený gliadin/P(HEMA-co-SS) byl znovu centrifugován kvůli odstranění zbytků gelu, rozdělen do alikvotů a skladován při -20°C. Naštěpené vzorky byly testovány RNDr. Zdeňkem Zídkem, DrSc. z ÚEM AVČR E-toxate testem k vyloučení kontaminace LPS. V pokusech byly použity pouze vzorky s hodnotami LPS pod detekčním limitem (2 pg/ml).

Skladovací pufr pro pepsin-agarózový gel :

50 ml H₂O, 430 mg NaCl, 29,5 µl CH₃COOH (99% ředěné 1/100)
pH 4,5 (upraveno konc.CH₃COOH)

Označení produktů štěpení:

- 1) štěpený gliadin: *gl
- 2) opracovaný P(HEMA-co-SS): *P
- 3) gliadin štěpený v přítomnosti P(HEMA-co-SS): *(gl + P)

3.1.2. Účinek P(HEMA-co-SS) na PBMC

3.1.2.1. Izolace PBMC gradientovou centrifugací

Krevní „buffy coaty“ od zdravých dárců pro pokusy poskytlo Transfúzní oddělení Fakultní Thomayerovi nemocnice v Praze.

Krev od pacientů s aktivní celiakií poskytla v rámci společného projektu tato zdravotnická pracoviště (krev byla odebrána do zkumavek obsahujících citrát sodný zabraňující srážení krve):

Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Gastroenterologická ambulance 4. interní kliniky, Doc. MUDr. Miloš Dvořák

Poliklinika Zelený Pruh, Praha 4 - Braník, Gastroenterologická ambulance, MUDr. Daniela Tůmová

Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Gastroenterologická ambulance, as. MUDr. Iva Hoffmanová

Krev z „buffy coatů“ / nesrážlivá krev od pacientů byla naředěna PBS v objemovém poměru 3:2 a opatrně navrstvena na 20 ml roztoku Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). Po centrifugaci (1800 rpm, 30 min., 4°C), kdy došlo k rozdělení krve na jednotlivé vrstvy, byl odebrán hustý bílý prstenec nad roztokem Ficoll-Paque PLUS obsahující lymfocyty, monocyty a trombocyty. Buňky obsažené v odebraném prstenci byly třikrát promyty 30 ml PBS, přičemž byly při jednotlivých promytích postupně snižovány rpm centrifugy (1200 rpm, 1000 rpm, 800 rpm, 10 min., 4°C). Po posledním promytí a odstranění PBS byly buňky resuspendovány v 10 ml kompletního RPMI-1640 media (LONZA) a spočítány pod mikroskopem za použití Bürkerovi komůrky (při počítání byly buňky barveny Trypan Blue (SIGMA) v objemovém poměru 1:1).

Do 24-jamkové desky (IWAKI) bylo nasazeno $2 \cdot 10^6$ buněk v 1 ml kompletního RPMI-1640 media do 1 jamky. Desky byly ponechány 2 hodiny při 37°C a 5% CO_2 , aby PBMC adherovaly ke dnu jamek. Neadherované buňky byly odstraněny odsátím media a následným promytím jamek 0,5 ml PBS. Adherovaným PBMC byl do každé jamky dodán 1 ml kompletního RPMI-1640 media a poté byly 24 hodin stimulovány při 37°C a 5% CO_2 ve dvou různých variantách pokusu (Tabulka č.1 a č.2). Každá z variant pokusu byla provedena u zdravých dárců i u celiakálních pacientů.

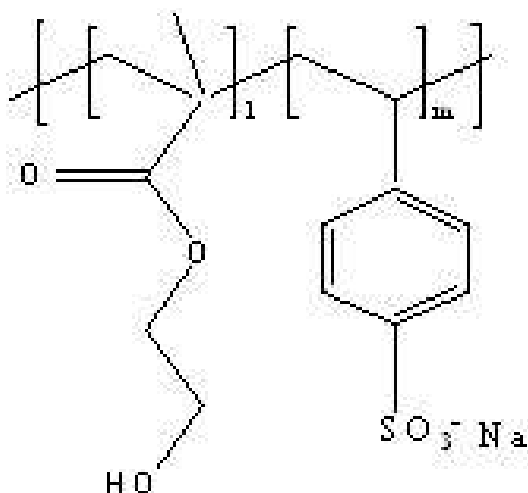
Kompletní RPMI-1640 medium obsahuje:

- 10% FBS inaktivované 30 min, 56°C (LONZA)
- 2 mM L-glutamin (SIGMA)
- 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 100 U/ml penicillin (SIGMA)

3.1.2.2. Stimulace PBMC

P(HEMA-co-SS) použitý v pokusech (Obrázek č.2) byl syntetizován na tomto pracovišti spolupracujícím s naší laboratoří: Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Canada.

Obrázek č.2: Struktura P(HEMA-co-SS):



Tabulka č.1: Stimulace PBMC – varianta pokusu A)

V této variantě pokusu byl použit ke stimulaci PBMC štěpený gliadin a P(HEMA-co-SS).

K PBMC byl přidán:	Označení:	Dávka na 1 ml media:
----- (nestimulované PBMC)	Negativní kontrola	-----
P(HEMA-co-SS) 30 µl	P	300 µg/ml
štěpený gliadin 20 µl	*gl	200 µg/ml
20 µl (200 µg) štěpeného gliadinu bylo preinkubováno s 30µl (300µg) P(HEMA-co-SS) 30 min. při 37°C a 5% CO ₂ . K PBMC bylo přidáno 20 µl preinkub. směsi.	*gl + P	20 µl směsi
štěpený gliadin 20 µl IFN-γ 15 µl	*gl + IFN-g	200 µg/ml (*gl) 150 U/ml (IFN-γ)
20 µl (200 µg) štěpeného gliadinu bylo preinkubováno s 30µl (300µg) P(HEMA-co-SS) 30 min. při 37°C a 5% CO ₂ . K PBMC bylo přidáno 20 µl preinkub. směsi, IFN-γ 15 µl.	*gl + P + IFN-g	20 µl směsi 150 U/ml (IFN-γ)

* produkt po opracování pepsinem

Tabulka č.2: Stimulace PBMC – varianta pokusu B)

V této variantě pokusu byl ke stimulaci PBMC použit gliadin štěpený v přítomnosti P(HEMA-co-SS) a P(HEMA-co-SS) opracovaný pepsinem.

K PBMC byl přidán:	Označení:	Dávka na 1 ml media:
----- (nestimulované PBMC)	Negativní kontrola	-----
LPS (<i>Salmonella typhimurium</i> SIGMA) 1 µl	LPS	1 µg/ml
opracovaný P(HEMA-co-SS) 25 µl	*P	250 µg/ml
štěpený gliadin 25 µl	*gl	250 µg/ml
gliadin štěpený v přítomnosti P(HEMA-co-SS) 25 µl	*(gl + P)	25 µl směsi
opracovaný P(HEMA-co-SS) 25 µl IFN-γ 15 µl	*P + IFN-g	250 µg/ml (*P) 150 U/ml (IFN-γ)
štěpený gliadin 25 µl IFN-γ 15 µl	*gl + IFN-g	250 µg/ml (*gl) 150 U/ml (IFN-γ)
gliadin štěpený v přítomnosti P(HEMA-co-SS) 25 µl IFN-γ 15 µl	*(gl + P) + IFN-g	25 µl směsi 150 U/ml (IFN-γ)

* produkt po opracování pepsinem

Po 24-hodinové stimulaci byly odebrány buněčné supernatanty pro stanovení cytokinové produkce ELISA metodou a uloženy při -20°C.

3.1.2.3. ELISA stanovení cytokinové produkce IL-10 a TNF- α

Koncentrace IL-10 a TNF- α v buněčných supernatantech byly stanoveny s použitím těchto komerčních ELISA-kitů: DuoSet Human IL-10 (R&D Systems)

DuoSet Human TNF- α (R&D Systems)

Roztoky:

PBS: do 1000 ml H₂O: 90g NaCl
2g NaH₂PO₄ · H₂O
12 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O
pH 7,2-7,4 (upravit 1 M NaOH)
před použitím ředit 1/10 v H₂O

Promývací pufr: 0,05% Tween v PBS (pH 7,2-7,4)

Ředící roztok: 1% BSA v PBS (pH 7,2-7,4)

Substrátový roztok: TMB: 40 mg TMB do 27 ml DMFA
pipetou vnést do 73 ml H₂O
citronan sodný: 2,94 g do 100 ml H₂O
pH 4,2 (upravit kys.citronovou)
TMB + citronan sodný smísit v objemovém poměru 1:1
přidat 2 μ l H₂O₂ na 10 ml substrátového roztoku

Protilátky a standard byly naředěny v ředícím roztoku do pracovních koncentrací dle návodu, který byl součástí kitu. 96-jamková deska (MaxiSorp NUNC) byla pokryta 100 μ l Capture-antibody a inkubována přes noc při pokojové teplotě. Po vytřepnutí byla deska třikrát promyta 400 μ l promývacího pufru a blokována 300 μ l ředícího roztoku 1 hodinu při pokojové teplotě. Po vytřepnutí byla deska třikrát promyta a bylo přidáno

100 µl vzorku (standardu) na jamku, vždy v duplikátech. Jako blank byl použit ředící roztok. Po 2-hodinové inkubaci byla deska třikrát promyta a bylo přidáno 100 µl Detection-antibody. Po 2-hodinové inkubaci byla deska třikrát promyta, bylo přidáno 100 µl roztoku streptavidinu konjugovaného s křenovou peroxidázou a deska byla inkubována 20 minut ve tmě. Po třech promytích bylo přidáno 100 µl substrátového roztoku a po 20-minutové inkubaci ve tmě byla ELISA zastavena přidávkem 50 µl 2M H₂SO₄. Optická denzita vzorků byla změřena na ELISA-readeru (EL 800 BioTek) při vlnové délce 450 nm. Naměřené hodnoty byly zpracovány a vyhodnoceny s použitím Gen5 softwaru.

3.1.3. Účinek P(HEMA-co-SS) na biopsie

3.1.3.1. Odběr biopsie duodenální sliznice

Biopsické vzorky sliznice byly odebírány pacientům za účelem diagnostiky na těchto pracovištích:

Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Gastroenterologická ambulance 4. interní kliniky, Doc. MUDr. Miloš Dvořák

Poliklinika Zelený Pruh, Praha 4 - Braník, Gastroenterologická ambulance, MUDr. Daniela Tůmová

Vzorek sliznice se odebírá tenkým a plně ohebným endoskopem pro vyšetření horní části trávicí trubice. Výkon se provádí nalačno, v leže na boku, s použitím vhodného lokálního sedativa. Odběr vzorků je nebolestivý a trvá většinou 10 minut.

3.1.3.2. Stimulace biopsií

Íhned po odběru byly biopsie vloženy do 0,5 ml kompletního RPMI-1640 media obsahujícího 0,001% inhibitoru proteáz (CYTOSKELETON) a na suchém ledu transportovány do laboratoře. Zde byly opláchnuty v PBS, vloženy do jamek 24-

jamkové desky do 0,5 ml kompletního RPMI-1640 media s inhibitorem proteáz (0,001%) a stimulovány ve dvou různých variantách pokusu dle Tabulky č.3 a č.4.

Tabulka č.3: Stimulace biopsií – varianta pokusu A)

V této variantě pokusu byl použit ke stimulaci biopsií štěpený gliadin a P(HEMA-co-SS).

K biopsiím byl přidán:	Označení:	Dávka na 0,5 ml media:
----- (nestimulovaná biopsie)	negative control	-----
P(HEMA-co-SS) 30 µl	P(HEMA-co-SS)	300 µg/ml
štěpený gliadin 20 µl	gliadin digest	200 µg/ml
20 µl (200 µg) štěpeného gliadinu bylo preinkubováno s 30µl (300µg) P(HEMA-co-SS) 30 min. při 37°C a 5% CO ₂ . K biopsii bylo přidáno 20 µl preinkubované směsi.	gliadin digest + P(HEMA-coSS)	20 µl směsi

Tabulka č.4: Stimulace biopsií – varianta pokusu B)

V této variantě pokusu byl ke stimulaci biopsií použit gliadin štěpený v přítomnosti P(HEMA-co-SS) a P(HEMA-co-SS) opracovaný pepsinem.

K biopsiím byl přidán:	Označení:	Dávka na 0,5 ml media :
----- (nestimulovaná biopsie)	negative control	-----
opracovaný P(HEMA-co-SS) 25 µl	*P(HEMA-co-SS)	250 µg/ml
štěpený gliadin 25 µl	gliadin digest	250 µg/ml
gliadin štěpený v přítomnosti P(HEMA-co-SS) 25 µl	P-digest (gliadin + P(HEMA-co-SS))	25 µl směsi

* produkt po opracování pepsinem

Po 24-hodinové stimulaci byly odebrány buněčné supernatanty pro stanovení cytokinové produkce ELISA metodou.

3.1.3.3. ELISA stanovení cytokinové produkce IL-10 a TNF- α

viz. 3.1.2.3.

3.2. Účinek střevních bakterií na DC

3.2.1. Diferenciace DC z PBMC

Pro pokusy byly použity DC z „buffy coatů“ od zdravých dárců.

Buňky získané při gradientové centrifugaci po promytí prstence byly nasazeny do plastových kultivačních lahví (75 cm² NUNC) v počtu 50.10⁶ buněk v 10 ml kompletního RPMI-1640 media na 1 láhev a ponechány 2 hodiny při 37°C a 5% CO₂, aby PBMC adherovaly ke dnu láhve. Neadherované buňky byly odstraněny odsátím media a následných promytím lahví silným proudem 10 ml PBS z pipety. Adherovaným PBMC (CD11+, CD14+) bylo dodáno do každé lahve 10 ml kompletního RPMI-1640 media a v přítomnosti GM-CSF (500U/ml media, GENTAUR) a IL-4 (20ng/ml media, PEPROTECH) byly ponechány 5 dní při 37°C a 5% CO₂. Diferencované DC (CD11+, CD14-) uvolněné ze dna byly z lahví získány v odsátém mediu a následným promytím silným proudem PBS byl ze dna odstraněn zbylý podíl DC, které mohly zůstat přichyceny ke dnu. Buněčná suspenze byla centrifugována (1200 rpm, 10 min., 4°C), po odstranění media byly buňky resuspendovány v 10 ml kompletního RPMI-1640 media a spočítány pod mikroskopem za použití Bürkerovi komůrky (při počítání byly buňky barveny Trypan Blue v objemovém poměru 1:1).

Dno jamek 24-jamkové desky bylo potaženo 4% roztokem poly(2-hydroxyethylmethakrylátu) (SIGMA) v absolutním ethanolu pro zábranu adherence DC. Do každé jamky bylo nasazeno 1.10⁶ DC v 1 ml kompletního RPMI-1640 media a poté byly DC 24 hodin stimulovány dle Tabulky č.5.

3.2.2. Stimulace DC

Bakterie použité při pokusech byly izolovány a vypěstovány na tomto pracovišti spolupracujícím s naší laboratoří: Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA), National Spanish Research Council (CSIC), Valencia, Spain.

Kmeny *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium bifidum* pocházejí ze střevních exkrementů zdravých dárců, *Escherichia coli* byla izolována ze střevních exkrementů celiakálních pacientů dodržujících GFD a *Shigella* byla získána ze střevních exkrementů aktivních celiaků. Kmen *Bacteroides fragilis* byl získán komerčně. Alikvoty suspenze bakterií v PBS byly skladovány při -80°C.

Tabulka č.5: Stimulace DC:

K DC byl přidán:	Označení:	Dávka na 1 ml media:
----- (nestimulované DC)	Negativní kontrola	-----
štěpený gliadin 20 µl	*gl	200 µg/ml
LPS (<i>Escherichia coli</i> SIGMA) 1 µl	LPS	1 µg/ml
<i>Bifidobacterium longum</i> 100 µl	B.LONG	3,45.10 ⁶ bakterií/ml
<i>Bifidobacterium longum</i> 100 µl štěpený gliadin 20 µl	B.LONG + *gl	3,45.10 ⁶ bakterií/ml 200 µg/ml (gl)
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 100 µl	B.BIF	2,10.10 ⁶ bakterií/ml
<i>Bifidobacterium bifidum</i> 100 µl štěpený gliadin 20 µl	B.BIF + *gl	2,10.10 ⁶ bakterií/ml 200 µg/ml (gl)
<i>Bacteroides fragilis</i> 100 µl	B.FRAG	5,55.10 ⁶ bakterií/ml
<i>Bacteroides fragilis</i> 100 µl štěpený gliadin 20 µl	B.FRAG + *gl	5,55.10 ⁶ bakterií/ml 200 µg/ml (gl)
<i>Escherichia coli</i> 100 µl	EC	8,60.10 ⁶ bakterií/ml
<i>Escherichia coli</i> 100 µl štěpený gliadin 20 µl	EC + *gl	8,60.10 ⁶ bakterií/ml 200 µg/ml (gl)
<i>Shigella</i> 100 µl	SHIG	8,20.10 ⁶ bakterií/ml
<i>Shigella</i> 100 µl štěpený gliadin 20 µl	SHIG + *gl	8,20.10 ⁶ bakterií/ml 200 µg/ml (gl)

* produkt po opracování pepsinem

Po 24-hodinové stimulaci byly odebrány buněčné supernatanty pro stanovení cytokinové produkce ELISA metodou a uloženy při -20°C. DC byly ihned podrobeny FACS analýze.

3.2.3. Stanovení cytokinové produkce DC

Koncentrace IL-10, TNF- α a IL-12 v buněčných supernatantech byly stanoveny s použitím těchto komerčních ELISA-kitů: DuoSet Human IL-10 (R&D Systems)

DuoSet Human TNF- α (R&D Systems)

IL-12 Eli-pair Kit (DIACLONE)

3.2.3.1. ELISA stanovení IL-10, TNF- α

viz 3.1.2.3.

3.2.3.2. ELISA stanovení IL-12

Roztoky:

PBS: do 1000 ml H₂O: 90g NaCl
2g NaH₂PO₄ · H₂O
12 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O
pH 7,2-7,4 (upravit 1 M NaOH)
před použitím ředit 1/10 v H₂O

Promývací pufr: 0,05% Tween v PBS

Blokovací roztok: 5% BSA v PBS

Ředící roztok: 1% BSA v PBS

Protilátky a standard byly naředěny v ředícím roztoku do pracovních koncentrací dle návodu, který byl součástí kitu. 96-jamková deska byla pokryta 100 μ l Capture-antibody a inkubována přes noc při 4°C. Po vytřepnutí obsahu jamek byla deska dvakrát promyta 400 μ l promývacího pufru a blokována 250 μ l blokovacího roztoku 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po vytřepnutí byla deska ponechána 24 hodin při laboratorní

teplotě vyschnout. Do jamek bylo vneseno 100 μ l vzorku (standardu) v duplikátech a současně 50 μ l Detection-antibody. Jako blank byl použit ředící roztok. Po 3-hodinové inkubaci při laboratorní teplotě byla deska třikrát promyta a bylo přidáno 100 μ l roztoku streptavidinu konjugovaného s křenovou peroxidázou. Po 20-minutové inkubaci ve tmě a třech promytích bylo přidáno 100 μ l roztoku TMB a deska byla inkubována 15 minut ve tmě. ELISA byla zastavena přidávkem 100 μ l 1 M H_2SO_4 a optická densita vzorků byla změřena při vlnové délce 450 nm na ELISA-readeru.

3.2.4. Analýza DC průtokovou cytometrií

DC resuspendované ve 100 μ l media byly vloženy do 96-jamkové desky (NUNC) umístěné na ledu a značeny 20 minut ve tmě 10 μ l těchto monoklonálních protilátek (v příslušném ředění):

- CD11c-Allophycocyanin (Invitrogen)
- CD14-AlexaFluor700 (EXBIO)
- CD83-Phycoerythrin (Invitrogen)
- CD86-Phycoerythrin (IMMUNOTECH)
- CD40-FITC (BD BIOSCIENCES)
- HLA-DR-FITC (BD BIOSCIENCES).

Deska byla centrifugována (2000 rpm, 2 min., 4°C) a medium vytřepnutím odstraněno. Buňky v desce byly dvakrát promyty 200 μ l vychlazeného PBS s 0,1% obsahem NaN_3 a pro analýzu resuspendovány ve 100 μ l tohoto roztoku. Do všech jamek bylo přidáno 10 μ l Hoechst 33258 (v příslušném ředění, Invitrogen) pro označení mrtvých buněk a poté byly DC podrobeny FACS-analýze na průtokovém cytometru BD LSR II (BD Biosciences). Pro analýzu povrchových markerů byly buňky postupně vybrány („gating“) podle těchto parametrů:

1. buňky singletové
2. buňky živé (Hoechst negativní)
3. buňky standartní velikosti a granularity (dle FSC a SSC)
4. buňky CD11+CD14-

U vyselektované populace singletových, živých, standartních a CD11+CD14- buněk byla analyzována míra exprese povrchových markerů CD83, CD86, CD40 a HLA-DR. Výsledky měření byly zpracovány a vyhodnoceny BD FACS DiVa6 softwarem.

3.3. Seznam použitých chemikálií

3,3,5,5-tetramethylbenzidin (SIGMA)
citronan sodný dihydrát (LACHEMA)
dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (LACHEMA)
ethanol absolutní (MERCK)
hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (LACHNER)
hydroxid sodný (LACHEMA)
chlorid sodný (LACHNER)
kyselina citronová monohydrát (LACHEMA)
kyselina chlorovodíková (LACHEMA)
kyselina octová (LACHNER)
kyselina sírová (LACHEMA)
N,N-dimethylformamid (LACHEMA)
peroxid vodíku (LACHNER)
phosphate buffer saline (0,9% NaCl, FRESENIUS)
Tween-20 (DUCHEFA)

4. VÝSLEDKY

4.1. Účinek P(HEMA-co-SS) na PBMC

Pokusy byly provedeny ve dvou variantách. Ve variantě A) byly PBMC stimulovány P(HEMA-co-SS), štěpeným gliadinem a kombinací obou po předchozí 30ti-minutové preinkubaci. Ve variantě B) byly všechny komponenty použité pro stimulaci PBMC opracovány pepsinem, ke stimulaci PBMC byl tedy použit P(HEMA-co-SS) opracovaný pepsinem, štěpený gliadin a gliadin štěpený v přítomnosti P(HEMA-co-SS).

Naměřená data byla statisticky zpracována v programu PRISM použitím t-testu (* odpovídá $P < 0,05$; ** odpovídá $P < 0,01$; *** odpovídá $P < 0,001$).

4.1.1. Varianta pokusu A)

Při první variantě pokusu A) byly PBMC stimulovány neštěpeným P(HEMA-co-SS), štěpeným gliadinem a kombinací obou po předchozí 30ti-minutové preinkubaci. V kultivačním medium přitom nebyl/byl přítomen IFN- γ . Jako negativní kontrola byly použity nestimulované PBMC v mediu. Produkce cytokinů IL-10 a TNF- α byla stanovena ELISA metodou u 9 zdravých dárců a u 5 celiakálních pacientů. Hodnoty v grafu jsou uvedeny jako průměrná hodnota koncentrace +/- hodnota směrodatné odchylky v pikogramech cytokinu na 1 mililitr media.

4.1.1.1. Cytokinová produkce PBMC zdravých dárců

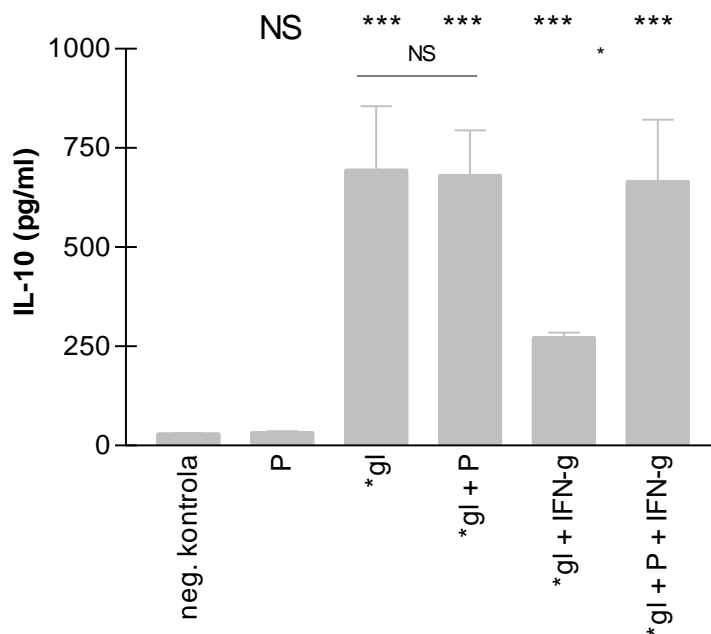
Naměřené hodnoty produkce IL-10 a TNF- α u PBMC od zdravých dárců stimulovaných podle varianty pokusu A) ukazují Grafy č.1 a č.2.

Hodnoty obou stanovovaných cytokinů byly u negativních kontrol i po stimulaci samotným P(HEMA-co-SS) velmi nízké. Po stimulaci štěpeným gliadinem výrazně

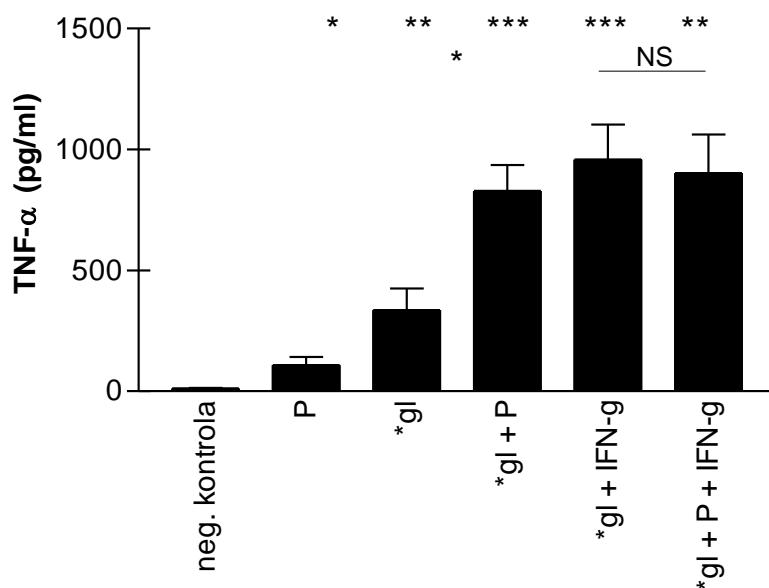
vzrostla hladina IL-10 i TNF- α . Při současné stimulaci štěpeným gliadinem a P(HEMA-co-SS) se hladina TNF- α ještě zvýšila, zatímco hladina IL-10 zůstala na téměř stejné hodnotě jako při stimulaci samotným štěpeným gliadinem.

Při stimulaci štěpeným gliadinem společně s IFN- γ byla produkce IL-10 nižší než při stimulaci štěpeným gliadinem bez přítomnosti IFN- γ . Hodnota TNF- α po stimulaci štěpeným gliadinem v přítomnosti IFN- γ dvojnásobně vzrostla oproti stimulaci štěpeným gliadinem v mediu bez IFN- γ . Při současné stimulaci štěpeným gliadinem a P(HEMA-co-SS) v přítomnosti IFN- γ sice hodnota IL-10 oproti stimulaci samotným štěpeným gliadinem v přítomnosti IFN- γ dvojnásobně vzrostla, oproti stimulaci samotným štěpeným gliadinem a současné stimulaci štěpeným gliadinem a P(HEMA-co-SS) se však nezměnila. Produkce TNF- α po současné stimulaci štěpeným gliadinem a P(HEMA-co-SS) v přítomnosti IFN- γ se oproti stejné stimulaci bez přítomnosti IFN- γ téměř nezměnila a oproti hodnotě TNF- α po stimulaci samotným štěpeným gliadinem v přítomnosti IFN- γ ještě dokonce mírně klesla.

Graf č.1: Varianta pokusu A), stimulace PBMC zdravých dárců, produkce IL-10:



Graf č.2: Varianta pokusu A), stimulace PBMC zdravých dárců, produkce TNF- α :



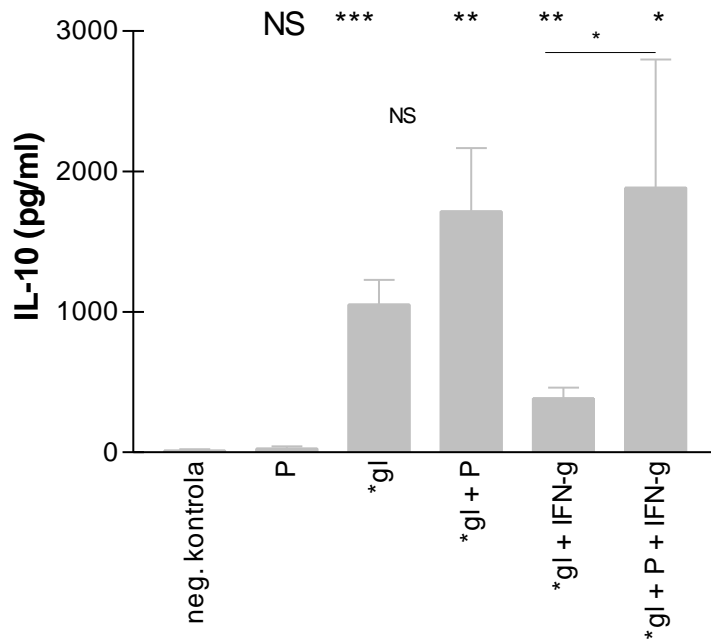
4.1.1.2. Cytokinová produkce PBMC pacientů

Naměřené hodnoty produkce IL-10 a TNF- α u PBMC od pacientů stimulovaných podle varianty pokusu A) ukazují Grafy č.3 a č.4.

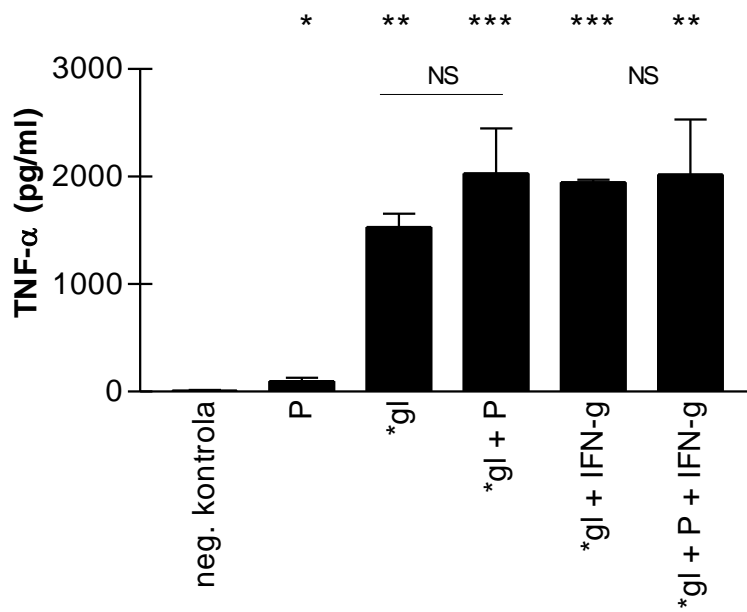
Celkové hladiny stanovovaných cytokinů byly u pacientů zhruba dvojnásobně vyšší než u zdravých dárců. Negativní kontroly ani stimulace samotným P(HEMA-co-SS) nevykazovaly výraznou produkci ani jednoho ze stanovovaných cytokinů. Po stimulaci štěpeným gliadinem výrazně vzrostla hladina IL-10 i TNF- α . Po současné stimulaci štěpeným gliadinem a P(HEMA-co-SS) se zvýšila hladina IL-10, méně výrazně se zvýšila také hladina TNF- α .

IL-10 odpověď na štěpený gliadin v přítomnosti IFN- γ byla velmi výrazně nižší než odpověď na štěpený gliadin samotný. TNF- α odpověď na štěpený gliadin v přítomnosti IFN- γ byla mírně vyšší než odpověď na samotný štěpený gliadin. Při současné stimulaci štěpeným gliadinem a P(HEMA-co-SS) za přítomnosti IFN- γ se produkce IL-10 mnohonásobně zvýšila oproti produkci IL-10 po stimulaci štěpeným gliadinem v přítomnosti IFN- γ zatímco produkce TNF- α zůstala téměř nezměněna.

Graf č.3: Varianta pokusu A), stimulace PBMC pacientů, produkce IL-10:



Graf č.4: Varianta pokusu A), stimulace PBMC pacientů, produkce TNF-α:



4.1.2. Varianta pokusu B)

V druhé variantě pokusu B) byly PBMC stimulovány P(HEMA-co-SS) opracovaným pepsinem, štěpeným gliadinem a gliadinem štěpeným v přítomnosti P(HEMA-co-SS). U části pokusů byl v kultivačním medium přítomen IFN- γ . Jako negativní kontrola byly použity nestimulované PBMC v mediu a jako pozitivní kontrola byla použita stimulace pomocí LPS. Produkce cytokinů IL-10 a TNF- α byla stanovena ELISA metodou u 8 zdravých dárců a u 14 celiakálních pacientů. Hodnoty v grafu jsou uvedeny jako průměrná hodnota koncentrace +/- hodnota směrodatné odchylky v pikogramech cytokinu na 1 mililitr media.

4.1.2.1. Cytokinová produkce PBMC zdravých dárců

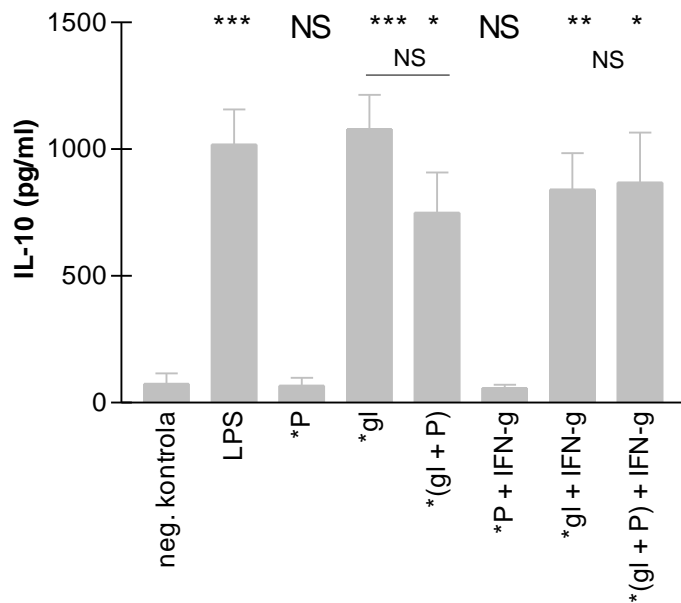
Naměřené hodnoty produkce IL-10 a TNF- α u PBMC zdravých dárců stimulovaných podle varianty pokusu B) ukazují Grafy č.5 a č.6.

Hodnoty obou stanovovaných cytokinů byly u negativních kontrol velmi nízké v porovnání s ostatními stimulovanými PBMC. IL-10 odpověď po stimulaci opracovaným P(HEMA-co-SS) se nezměnila oproti negativní kontrole, TNF- α odpověď na opracovaný P(HEMA-co-SS) byla však dvojnásobná oproti negativní kontrole. Po stimulaci štěpeným gliadinem velmi výrazně vzrostla produkce IL-10 i produkce TNF- α oproti negativním kontrolám. Produkce obou cytokinů po stimulaci štěpeným gliadinem byla shodná s produkcí po stimulaci LPS (pozitivní kontroly). Po stimulaci gliadinem štěpeným v přítomnosti P(HEMA-co-SS) výrazně klesla hodnota IL-10 a výrazně stoupla hodnota TNF- α ve srovnání se stimulací samotným štěpeným gliadinem.

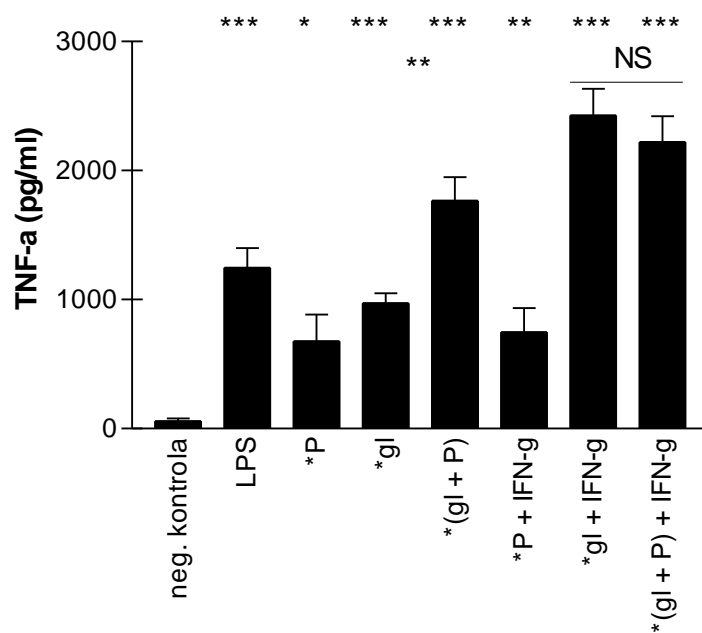
Produkce IL-10 i TNF- α po stimulaci samotným opracovaným P(HEMA-co-SS) se po přidavku IFN- γ nezměnila. Při stimulaci štěpeným gliadinem a v přítomnosti IFN- γ se snížila odpověď IL-10 a zvýšila odpověď TNF- α oproti stimulaci samotným štěpeným gliadinem. Po stimulaci gliadinem štěpeným v přítomnosti P(HEMA-co-SS) v prostředí IFN- γ se hodnota IL-10 nezměnila oproti stimulaci gliadinem štěpeným v přítomnosti P(HEMA-co-SS) a oproti stimulaci štěpeným gliadinem v prostředí IFN- γ . Hladina TNF- α po stimulaci gliadinem štěpeným v přítomnosti P(HEMA-co-SS) v prostředí IFN- γ byla mírně vyšší než hladina TNF- α po stimulaci gliadinem štěpeným

v přítomnosti P(HEMA-co-SS) a mírně nižší než hladina TNF- α po stimulaci štěpeným gliadinem v prostředí IFN- γ .

Graf č.5: Varianta pokusu B), stimulace PBMC zdravých dárců, produkce IL-10:



Graf č.6: Varianta pokusu B), stimulace PBMC zdravých dárců, produkce TNF- α :



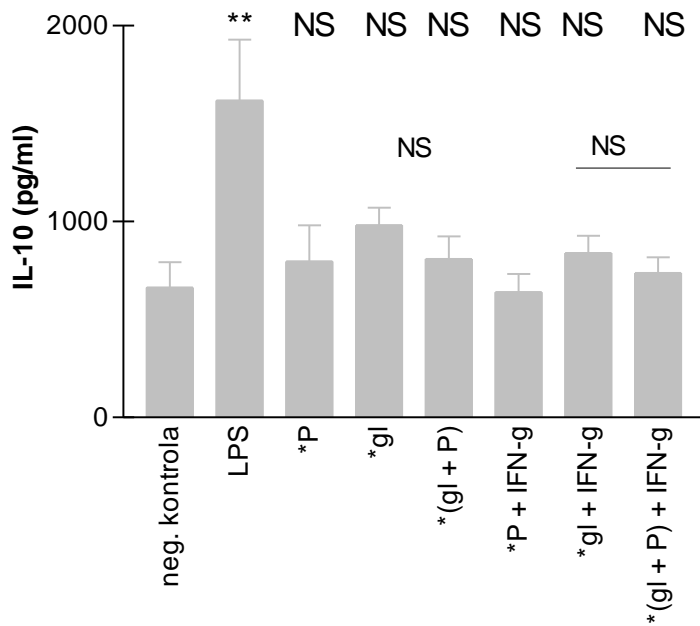
4.1.2.2. Cytokinová produkce PBMC pacientů

Naměřené hodnoty produkce IL-10 a TNF- α u PBMC od pacientů stimulovaných podle varianty pokusu B) ukazují Grafy č.7 a č.8.

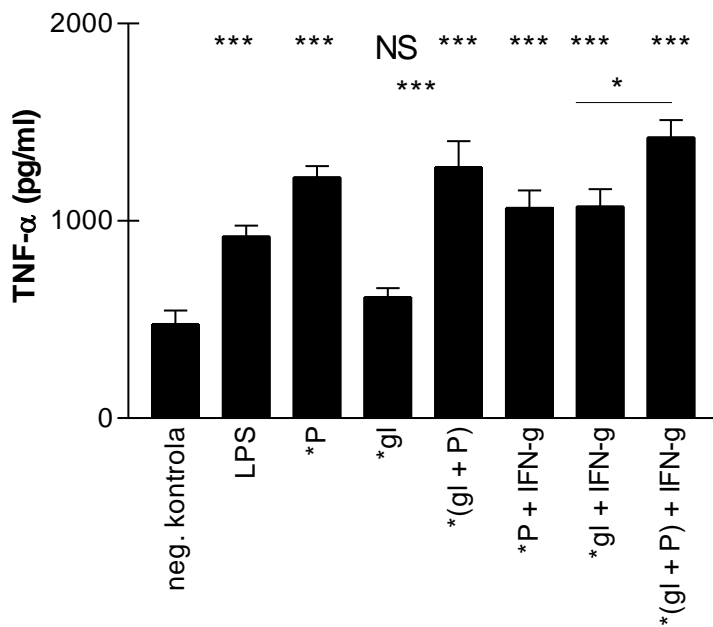
Hladiny obou stanovovaných cytokinů u negativních kontrol byly u pacientů výrazně vyšší než u negativních kontrol zdravých dárců. Oproti zdravým dárcům také velmi výrazně vzrostla produkce IL-10 i TNF- α vyvolaná samotným opracovaným P(HEMA-co-SS). Dosažená hodnota TNF- α byla dokonce dvojnásobně vyšší než hodnota TNF- α po stimulaci PBMC pacientů štěpeným gliadinem a také vyšší než po stimulaci LPS (pozitivní kontrola). Produkce IL-10 po stimulaci štěpeným gliadinem byla jen mírně vyšší než po stimulaci opracovaným P(HEMA-co-SS). Po stimulaci gliadinem štěpeným za přítomnosti P(HEMA-co-SS) došlo k poklesu produkce IL-10 a výraznému zvýšení produkce TNF- α oproti stimulaci samotným štěpeným gliadinem.

I opracovaný P(HEMA-co-SS) v prostředí s IFN- γ stimuloval PBMC pacientů k vysoké produkci IL-10 i TNF- α oproti zdravým dárcům. PBMC stimulované gliadinem štěpeným v přítomnosti P(HEMA-co-SS) v prostředí IFN- γ produkovaly mírně nižší množství IL-10 a vyšší množství TNF- α než PBMC stimulované štěpeným gliadinem v prostředí IFN- γ .

Graf č.7: Varianta pokusu B), stimulace PBMC pacientů, produkce IL-10:



Graf č.8: Varianta pokusu B), stimulace PBMC pacientů, produkce TNF- α :



4.2. Účinek P(HEMA-co-SS) na střevní biopsie

Pokusy byly provedeny ve dvou variantách. Ve variantě A) byly biopsie stimulovány P(HEMA-co-SS), štěpeným gliadinem a kombinací obou po předchozí 30ti-minutové preinkubaci. Ve variantě B) byly všechny komponenty použité pro stimulaci biopsií opracovány pepsinem, ke stimulaci PBMC byl tedy použit P(HEMA-co-SS) opracovaný pepsinem, štěpený gliadin a gliadin štěpený v přítomnosti P(HEMA-co-SS).

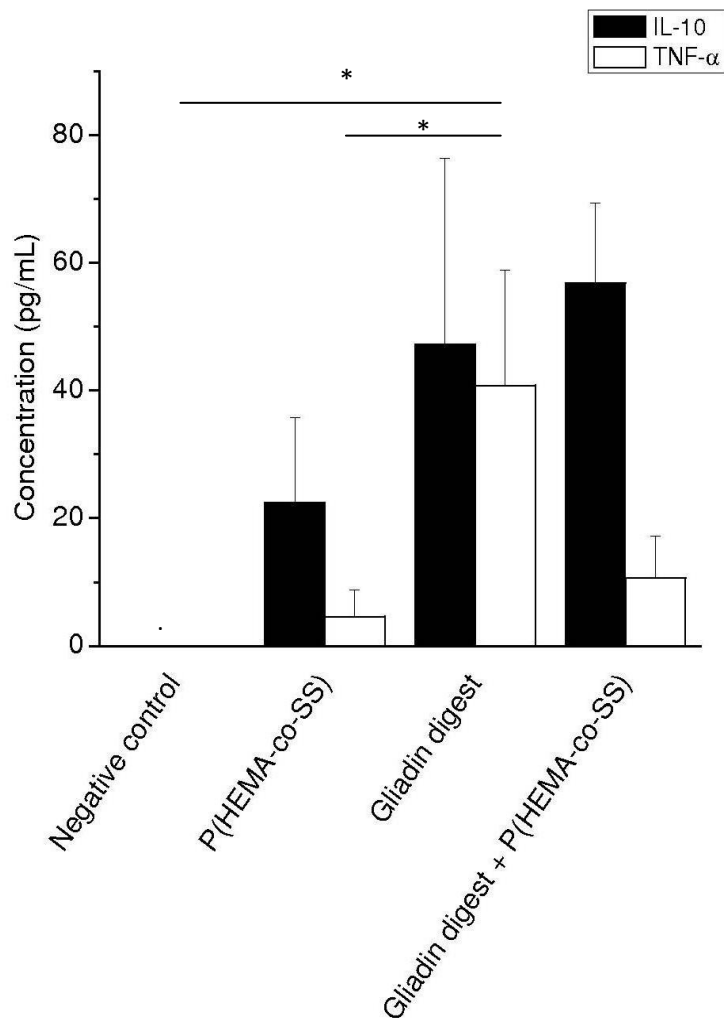
Naměřená data byla statisticky zpracována v programu PRISM použitím t-testu (* odpovídá $P < 0,05$; ** odpovídá $P < 0,01$; *** odpovídá $P < 0,001$).

4.2.1. Cytokinová produkce biopsií - varianta pokusu A)

Při první variantě pokusu A) byly biopsie odebrané 5 neléčeným celiakálním pacientům stimulovány P(HEMA-co-SS), štěpeným gliadinem a kombinací obou po předchozí 30ti-minutové preinkubaci. Jako negativní kontroly byly použity nestimulované biopsie v mediu. Produkce cytokinů IL-10 a TNF- α byla stanovena ELISA metodou. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Grafu č.9 jako průměrné hodnoty koncentrace +/- hodnota směrodatné odchylky v pikogramech cytokinu na 1 mililitr media.

Negativní kontroly (nestimulované biopsie) neprodukovaly detekovatelné množství ani jednoho ze stanovovaných cytokinů. Biopsie inkubované s P(HEMA-co-SS) produkovaly nízké hladiny obou cytokinů. Po stimulaci štěpeným gliadinem se výrazně zvýšila produkce obou cytokinů, především TNF- α . Při současné inkubaci biopsií se štěpeným gliadinem a P(HEMA-co-SS) se produkce IL-10 ještě o něco zvýšila a produkce TNF- α výrazně klesla.

Graf č.9: Varianta pokusu A), stimulace biopsií pacientů, produkce IL-10 a TNF- α :

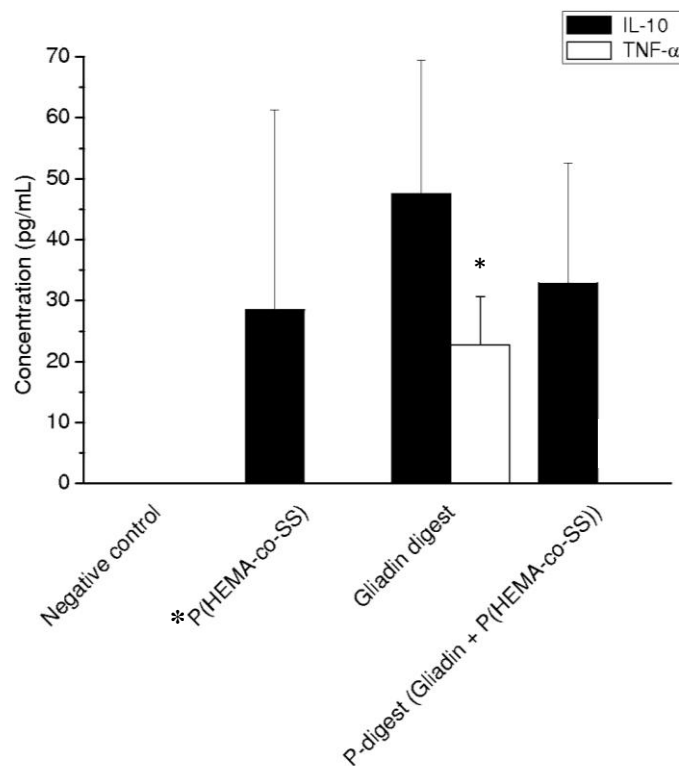


4.2.2. Cytokinová produkce biopsií - varianta pokusu B)

V druhé variantě pokusu B) byly biopsie odebrané 4 neléčeným celiakálním pacientům stimulovány P(HEMA-co-SS) opracovaným pepsinem, štěpeným gliadinem a gliadinem štěpeným v přítomnosti P(HEMA-co-SS). Jako negativní kontrola byly použity nestimulované biopsie v mediu. Produkce cytokinů IL-10 a TNF- α byla stanovena ELISA metodou. Získané hodnoty jsou uvedeny v Grafu č.10 jako průměrné hodnoty koncentrace +/- hodnota směrodatné odchylky v pikogramech cytokinu na 1 mililitr media.

Negativní kontroly (nestimulované biopsie) neprodukovaly detekovatelné množství ani jednoho ze stanovovaných cytokinů. Biopsie inkubované se opracovaným P(HEMA-co-SS) produkovaly nízké hladiny IL-10 a neprodukovaly detekovatelné množství TNF- α . Po stimulaci štěpeným gliadinem se výrazně zvýšila produkce obou cytokinů, především TNF- α . Při inkubaci biopsií s gliadinem štěpeným v přítomnosti P(HEMA-co-SS) se snížila produkce obou cytokinů, u TNF- α poklesla až pod hranici detekce.

Graf č.10: Varianta pokusu B), stimulace biopsií pacientů, produkce IL-10 a TNF- α :



4.3. Účinek střevních bakterií na DC

V tomto pokusu bylo testováno, jak může být odpověď dendritických buněk na gliadin ovlivněna přítomností různých bakteriálních kmenů. Studován byl imunomodulační vliv různých bakteriálních kmenů na produkci cytokinů a expresi povrchových maturačních markerů dendritických buněk získaných z krve 10 zdravých dárců.

4.3.1. Cytokinová produkce DC

Dendritické buňky získané z krve 10 zdravých dárců byly stimulovány štěpeným gliadinem, různými bakteriálními kmeny nebo kombinací bakteriálních kmenů s gliadinem. Produkce IL-10, TNF- α a IL-12 byla stanovena ELISA metodou. Naměřené hladiny cytokinů jsou uvedeny v Grafech č.11 (IL-10), č.12 (TNF- α) a č.13 (IL-12) jako průměrné hodnoty koncentrace +/- hodnota směrodatné odchylky v pikogramech cytokinu na 1 mililitr media.

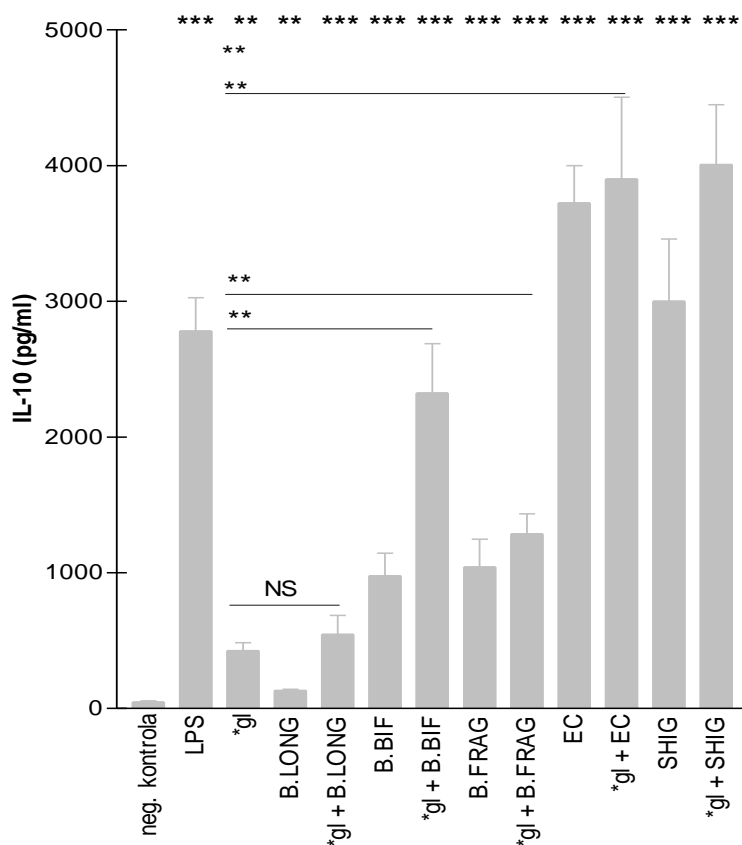
Všechny bakteriální kmeny i samotný gliadin indukovaly u DC zvýšenou produkci IL-10 ve srovnání s negativní kontrolou (nestimulovanými DC). Nejvyšší hodnoty IL-10 produkovaly DC po stimulaci bakteriálními kmeny *Escherichia coli* a *Shigella*, a to i oproti pozitivní kontrole (DC stimulovaným LPS). Kmen *Bifidobacterium longum* jako jediný indukoval nižší produkci IL-10 než samotný gliadin. Při kostimulaci DC gliadinem a bakteriálními kmeny byly hodnoty IL-10 u všech bakteriálních kmenů ještě zvýšeny oproti stimulaci samotnými bakteriálními kmeny bez gliadinu, přičemž nejvyšší nárůst hodnoty IL-10 indukovala kostimulace gliadinem s kmenem *Bifidobacterium bifidum*.

Zvýšenou produkci TNF- α oproti negativní kontrole (nestimulovaným DC) vyvolaly u DC všechny bakteriální kmeny i samotný gliadin. Kmen *Bifidobacterium longum* jako jediný stimuloval DC k nižší produkci TNF- α než samotný gliadin. Stimulační účinek gliadinu na DC byl srovnatelný s účinkem kmene *Bifidobacterium longum* při kostimulaci s gliadinem. Velmi výrazné zvýšení produkce TNF- α ve srovnání s ostatními kmeny indukovaly u DC samotné kmeny *Escherichia coli* a *Shigella*, přičemž při kostimulaci těchto dvou kmenů s gliadinem už nedošlo k dalšímu

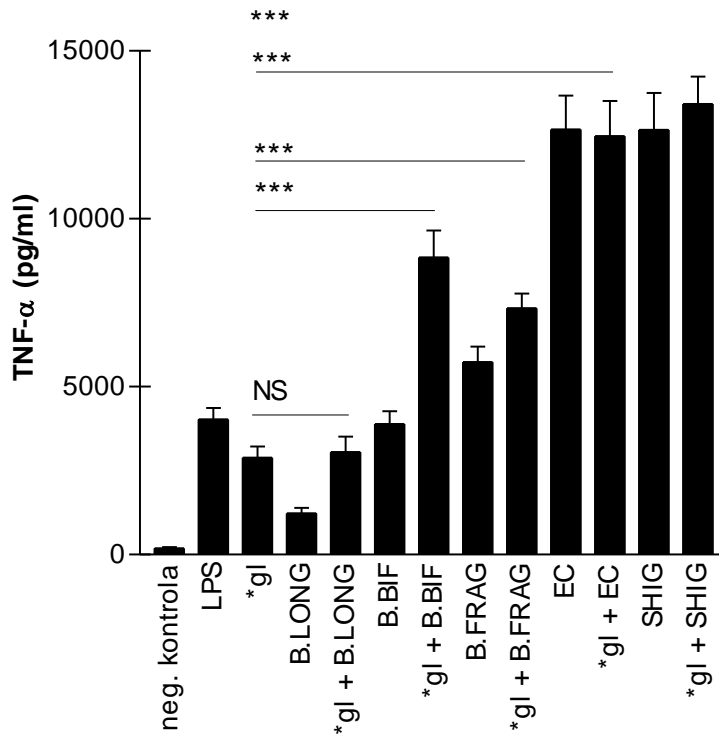
zvýšení produkce TNF- α . Všechny ostatní kmeny koinkubované s gliadinem indukovaly zvýšení produkce TNF- α . Nejvýrazněji (dvojnásobně) se zvýšila produkce TNF- α po kostimulaci gliadinem s kmenem *Bifidobacterium bifidum*.

Nestimulované DC (negativní kontrola) a DC stimulované kmenem *Bifidobacterium longum* neprodukovaly detekovatelné množství IL-12. Stimulační účinek *Bifidobacterium longum* v kombinaci s gliadinem byl však vyšší ve srovnání se stimulačním účinkem LPS (pozitivní kontrola). Všechny ostatní bakteriální kmeny indukovaly u DC vyšší produkci IL-12 než samotný gliadin, přičemž nejméně byly DC stimulovány k tvorbě IL-12 kmenem *Bifidobacterium bifidum*, po přidavku gliadinu ovšem produkce IL-12 několikanásobně vzrostla. Nejvyšší produkce IL-12 byla indukována kmeny *Escherichia coli* a *Shigella*. Přídavek gliadinu k *Escherichia coli* zvýšil stimulační účinek tohoto kmene, zatímco kostimulace DC kmenem *Shigella* v kombinaci s gliadinem vedla k mírnému snížení produkce IL-12 oproti stimulaci samotným kmenem *Shigella*. Produkce IL-12 vyvolaná kmenem *Bacteroides fragilis* se po přidavku gliadinu mírně zvýšila.

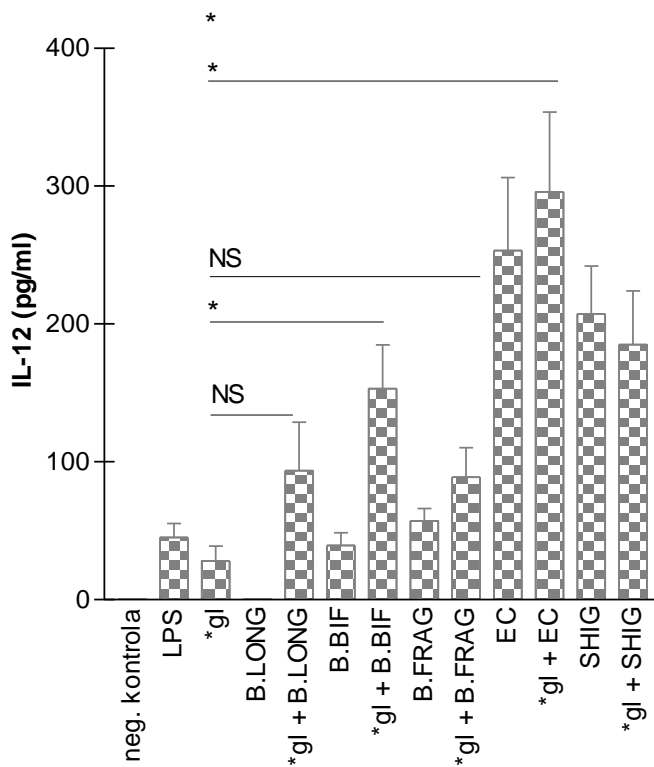
Graf č.11: Produkce IL-10 dendrickými buňkami po stimulaci bakt.kmeny:



Graf č.12: Produkce TNF- α dendritickými buňkami po stimulaci bakt.kmeny:



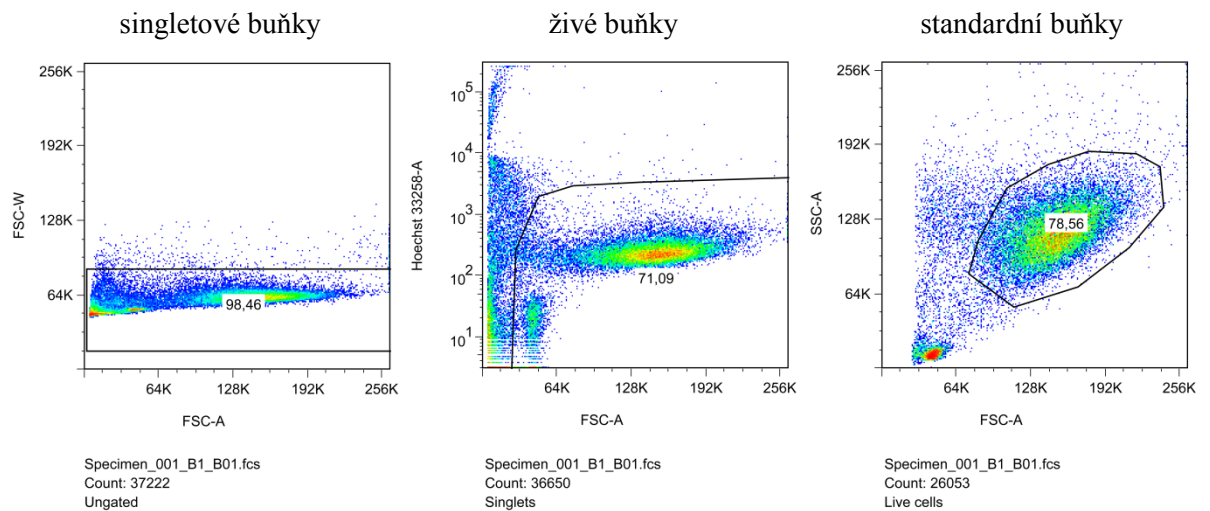
Graf č.13: Produkce IL-12 dendritickými buňkami po stimulaci bakt.kmeny:



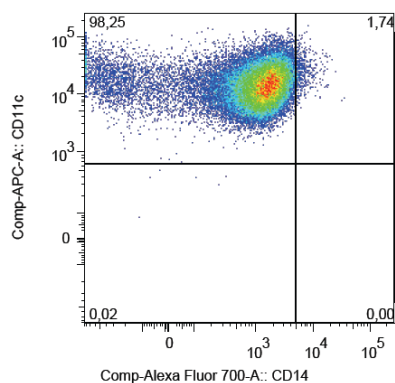
4.3.2. Analýza DC průtokovou cytometrií

Dendritické buňky získané z krve 10 zdravých dárců byly stimulovány štěpeným gliadinem, různými bakteriálními kmeny nebo kombinací bakteriálních kmenů s gliadinem. Pro FACS-analýzu byly stimulované buňky postupně vybrány („gating“) podle parametrů zobrazených na Obrázku č.3 a č.4. Exprese povrchových markerů takto vybrané populace buněk byla stanovena průtokovou cytometrií. Naměřené hodnoty exprese povrchových markerů jsou uvedeny v Grafech č.14 (HLA-DR), č.15 (CD86), č.16 (CD40) a č.17 (CD83) jako průměrné hodnoty MFI (medián fluorescenční intenzity) +/- směrodatná odchylka. Obrázek č.5, č.6, č.7. a č.8 ukazuje histogramy jednoho z dílčích pokusů. Histogramy zobrazují posun MFI stimulovaných DC (červeně) doprava oproti negativní kontrole – nestimulovaným DC (zeleně).

Obrázek č.3: Výběr buněk pro FACS-analýzu („gating“):



Obrázek č.4: Výběr dendritických buněk (CD11+CD14-) pro FACS-analýzu:



Specimen_001_C1_C01.fcs
Count: 39514
DC

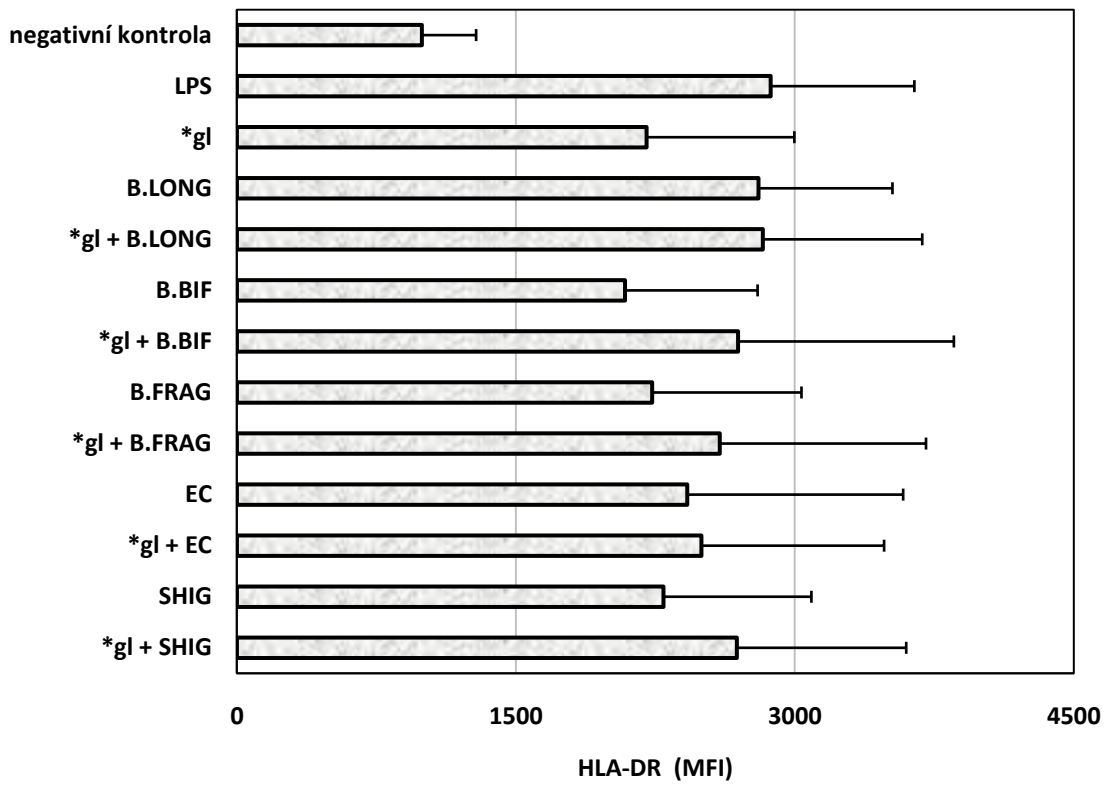
Po stimulaci gliadinem, LPS (pozitivní kontrola) i všemi bakteriálními kmeny zvyšovaly DC expresi všech sledovaných povrchových markerů. Nestimulované DC (negativní kontroly) exprimovaly oproti stimulovaným DC nejméně znaky CD83 a CD86. Znaky CD40 a HLA-DR byly výrazně zvýšeny všemi stimuly oproti negativní kontrole (nestimulovaným DC), zatímco výrazné změny exprese CD83 a CD86 vyvolávaly jen některé bakteriální kmeny.

Stimulační účinek žádného z použitých stimulantů na expresi CD40 a HLA-DR nebyl výrazně odlišný oproti ostatním. Přídavek gliadinu ke kmenům *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* a *Shigella* nevyvolal změnu exprese CD40 ani HLA-DR.

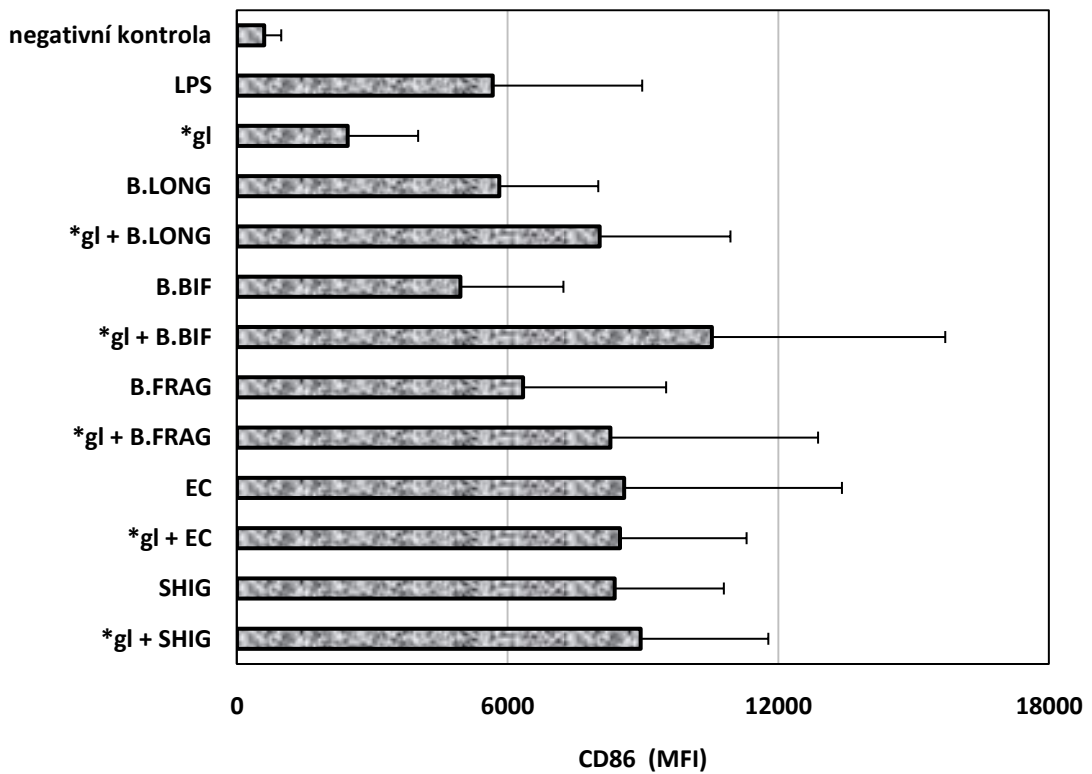
Expresi CD83 výrazně zvyšovaly oproti negativní kontrole (nestimulovaným DC) všechny použité kmeny bakterií s výjimkou *Bifidobacterium longum*, jehož stimulační účinek byl nízký, srovnatelný s nízkým stimulačním účinkem samotného gliadinu. Expresi CD83 po stimulaci LPS (pozitivní kontrola) byla také nízká, jen o málo vyšší než po stimulaci gliadinem. U všech bakteriálních kmenů vyvolal přídavek gliadinu zvýšení exprese CD83 s výjimkou *Bifidobacterium bifidum*, kde došlo naopak ke snížení.

Expresi CD86 byla zvýšena stimulací všemi bakteriálními kmeny oproti negativní kontrole (nestimulovaným DC) a gliadinu. V expresi CD 86 po stimulaci *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Shigella* nebyl téměř žádný rozdíl, a to ani po přídavku gliadinu k těmto bakteriálním kmenům. Celkově nejvyšší expresi CD 86 vykazovaly DC stimulované *Bifidobacterium bifidum* s gliadinem.

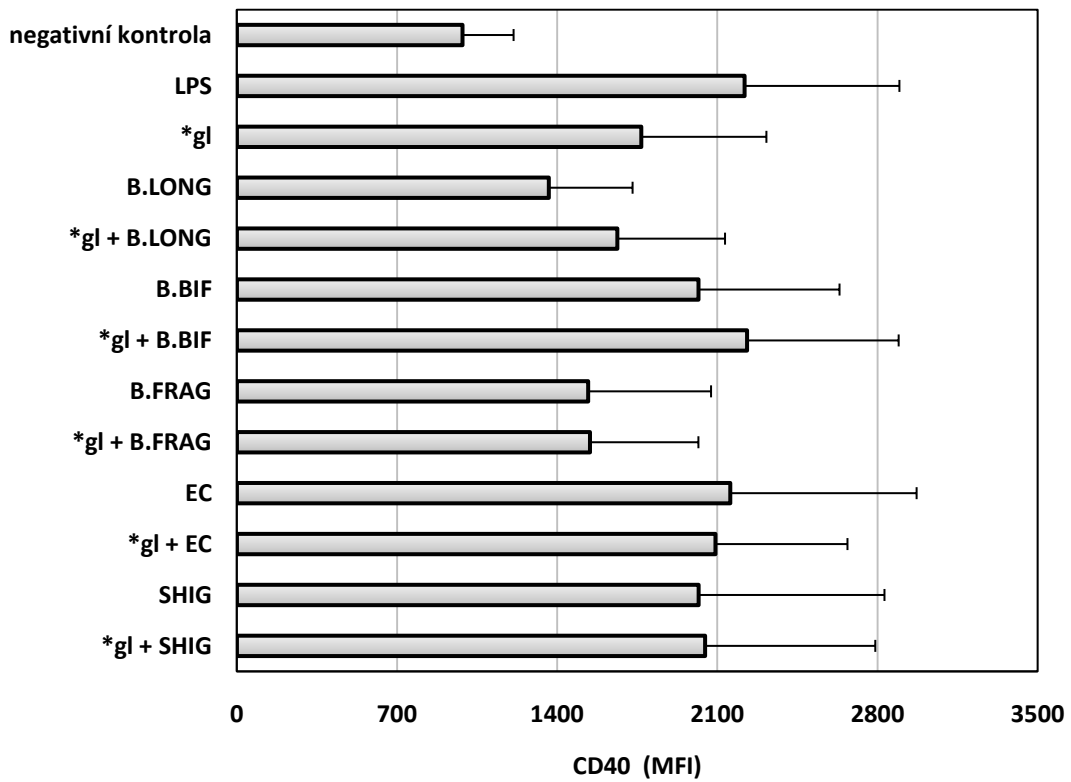
Graf č.14: Povrchová exprese HLA-DR stimulovalými DC:



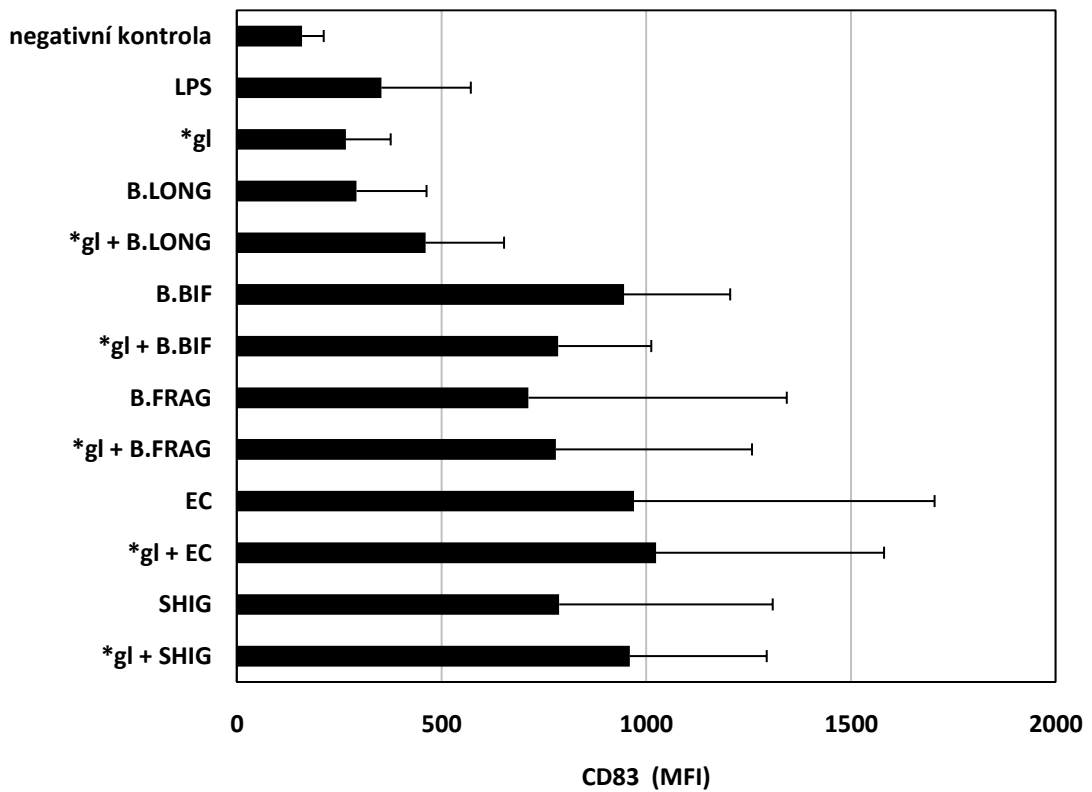
Graf č.15: Povrchová exprese CD 86 stimulovalými DC:



Graf č.16: Povrchová exprese CD 40 stimulovalými DC:

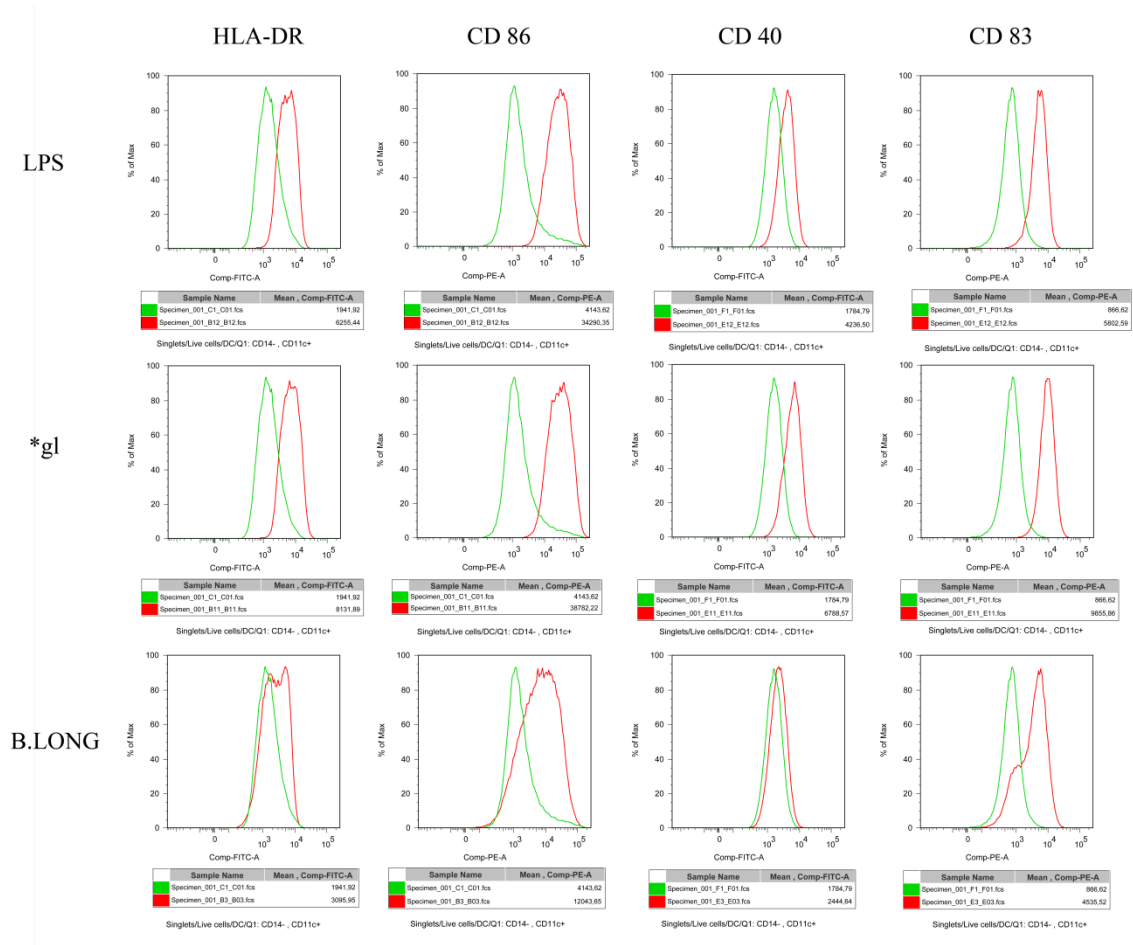


Graf č.17: Povrchová exprese CD 83 stimulovalými DC:



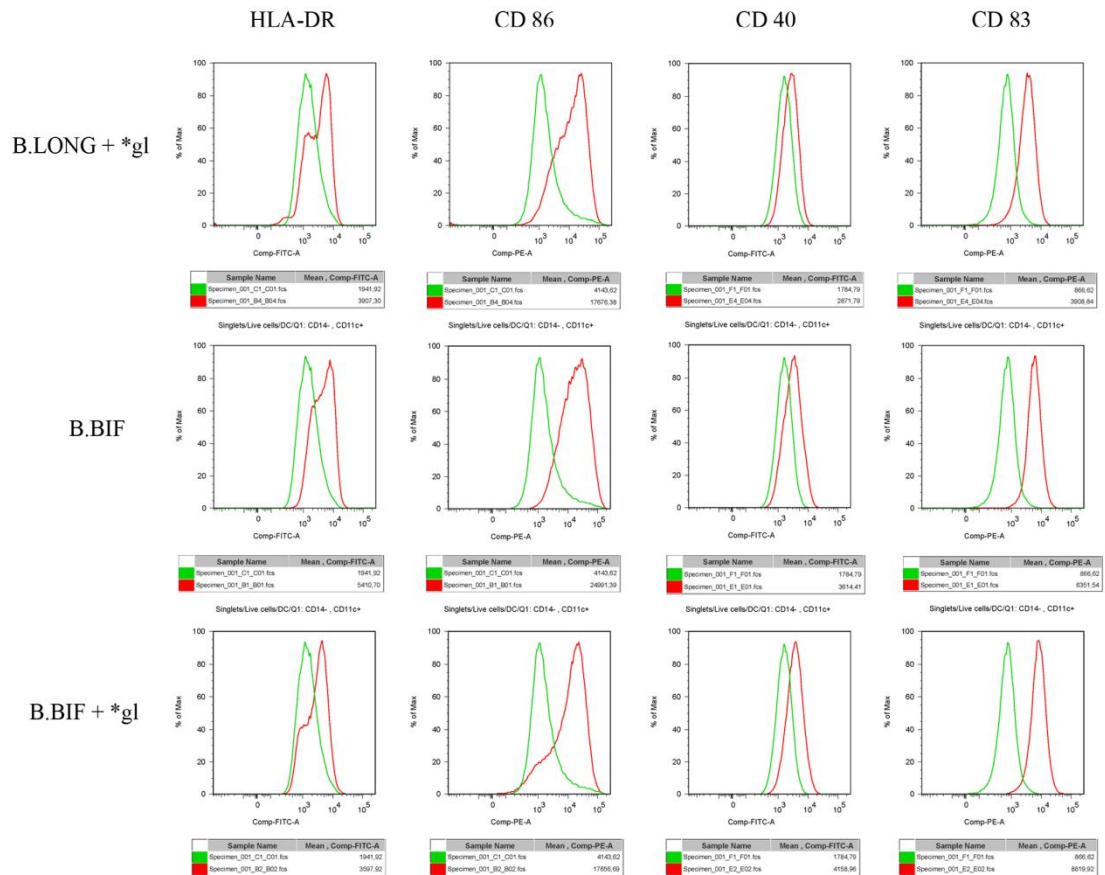
**Obrázek č.5: FACS-analýza dendritických buněk (exprese povrchových markerů):
(jeden z dílčích pokusů)**

negativní kontrola (nestimulované DC) - zelená
stimulované DC – červená



**Obrázek č.6: FACS-analýza dendritických buněk (exprese povrchových markerů):
(jeden z dílčích pokusů)**

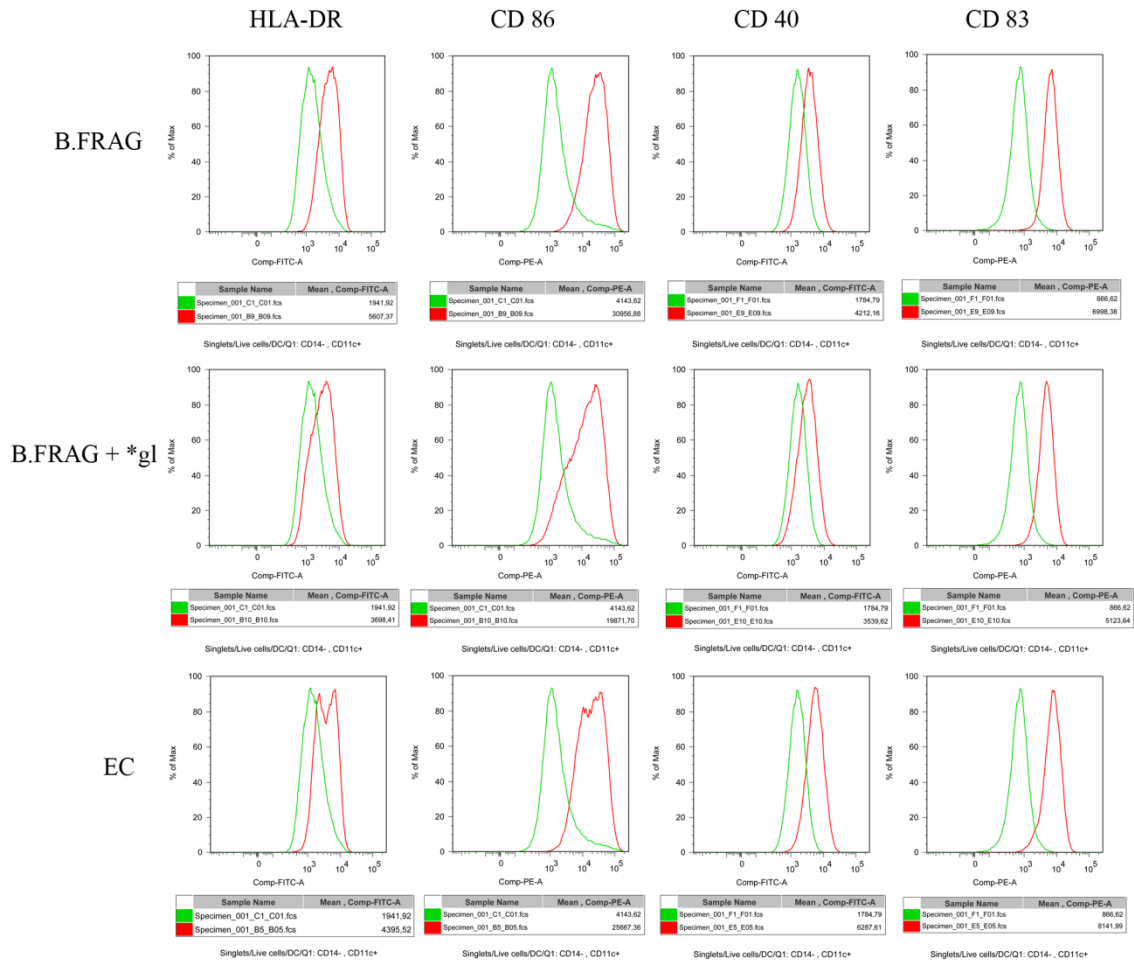
negativní kontrola (nestimulované DC) - zelená
stimulované DC - červená



**Obrázek č.7: FACS-analýza dendritických buněk (exprese povrchových markerů):
(jeden z dílčích pokusů)**

negativní kontrola (nestimulované DC) - zelená

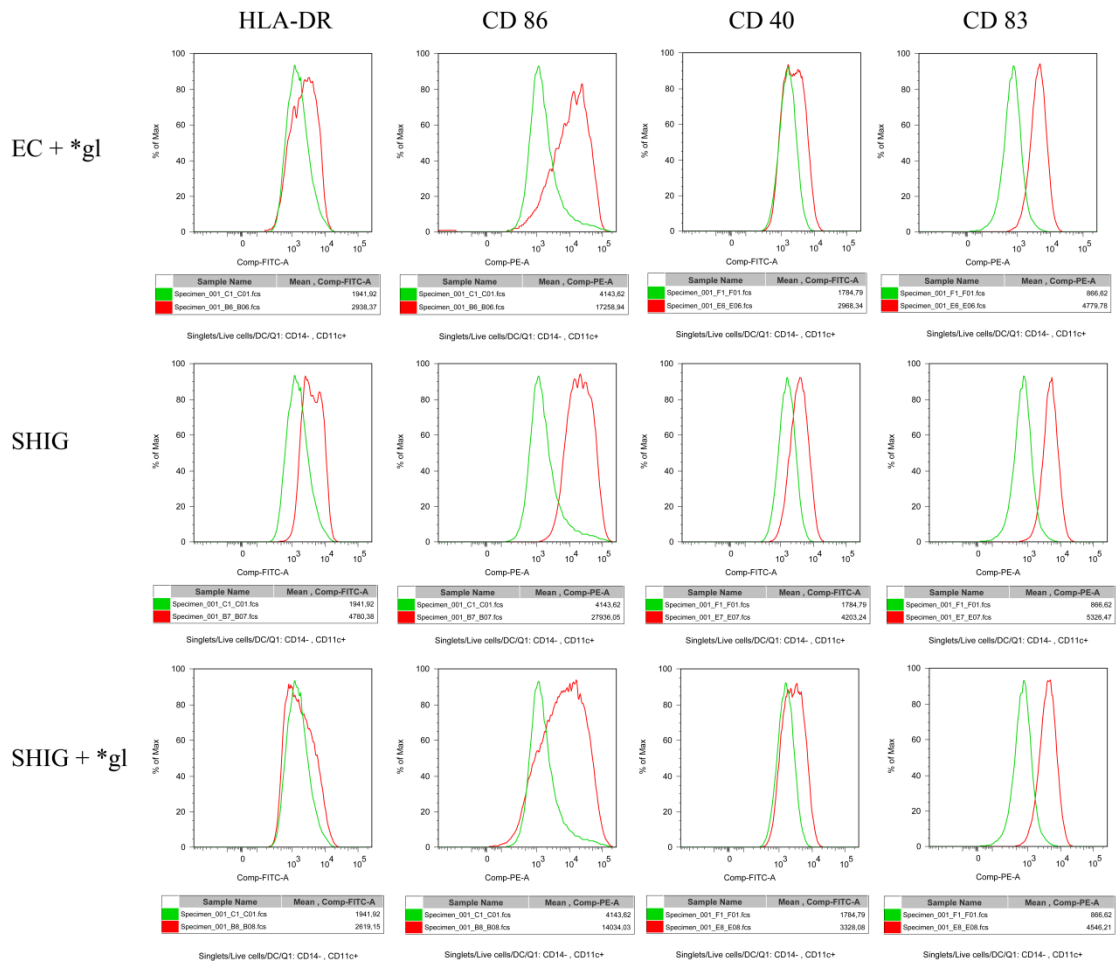
stimulované DC - červená



**Obrázek č.8: FACS-analýza dendritických buněk (exprese povrchových markerů):
(jeden z dílčích pokusů)**

negativní kontrola (nestimulované DC) - zelená

stimulované DC - červená



5. DISKUZE

U geneticky predisponovaných jedinců exprimujících HLA-DQ2/DQ8 vyvolává lepek, zásobní protein pšenice a příbuzných obilovin, abnormální imunitní CD4 T-buněčnou odpověď a tvorbu IgA a IgG protilátek, což vede ke spuštění mechanismů vedoucích k poškození střevní sliznice (SOLLID 2002).

Přestože se v posledním desetiletí objevilo mnoho nových možností terapie celiakie vycházejících z pokroků postupně objasňujících přesné mechanismy patogeneze tohoto onemocnění, je doposud stále jedinou možnou účinnou terapií celiakie celoživotní vyloučení lepku z potravy (LERNER 2010). Nejzávažnější komplikací dlouhodobého nedodržování bezlepkové diety (GFD) je rozvoj T-buněčného lymfomu. Pro zkvalitnění života celiaků je nezbytné zavedení nových alternativních metod terapie doplňujících či nahrazujících GFD (ZINGONE et al. 2010).

5.1. Potenciální terapeutický účinek P(HEMA-co-SS)

Gliadin, v ethanolu rozpustná frakce lepku, je v gastrointestinálním traktu enzymaticky hydrolyzován na dále neštěpitelné imunogenní fragmenty, které aktivují přirozenou i adaptivní imunitní odpověď na gliadin i vlastní tkáň a indukují tak patologické změny struktury střevního epitelu a porušení těsných spojů mezi enterocyty (LAMMERS et al. 2008). Liang a spol. syntetizovali polymerní sloučeninu P(HEMA-co-SS), která má schopnost selektivně vyvazovat gliadin v gastrointestinálním traktu a zabraňovat tak jeho natrávení na imunogenní fragmenty nebo neutralizovat již vzniklé fragmenty. Tento syntetický lineární kopolymer hydroxyethylmethakrylátu (HEMA) a 4-styrenulfonátu sodného (SS) o molekulové hmotnosti 45kDa nese negativní náboj a silně specificky váže gliadin při žaludečním (1,2) i střevním pH (6,8) prostřednictvím elektrostatických interakcí a vodíkových vazeb (LIANG et al. 2009, LIANG et al. 2010).

Skupina Maud Pinier prokázala schopnost P(HEMA-co-SS) rušit tyto škodlivé účinky gliadinu na střevní epitelové buňky *in vitro* (Caco-2/15 a IEC-6). Současným podáváním gliadinu s P(HEMA-co-SS) také dosáhli snížení permeability střevního epitelu indukované gliadinem a snížení aktivace T-lymfocytů u gliadin-senzitivních

HLA-DQ8/HCD4 transgenních myši, které P(HEMA-co-SS) velmi dobře tolerovaly i ve vysokých dávkách (PINIER et al. 2009). Navíc bylo na krysím modelu ověřeno, že převážná část P(HEMA-co-SS) (93%) je vylučována z těla ve stolici a že P(HEMA-co-SS) není vstřebáván do systému ve velké míře dokonce ani při mírných zánětlivých změnách střevní sliznice a za podmínek zvýšené intestinální permeability (PINIER et al., odesláno do tisku).

Na základě zjištěných vlastností se o P(HEMA-co-SS) uvažuje jako o vhodném budoucím léčivu doplňujícím GFD při provedení neúmyslných či nevyhnutelných dietních chyb.

Naše laboratoř byla vyzvána skupinou Maud Pinier ke spolupráci na *in vitro* pokusech testujících potenciální terapeutické účinky P(HEMA-co-SS) na PBMC izolovaných z krve zdravých dárců a celiakálních pacientů a na střevních biopsiích získaných od těchto pacientů. Pokusy byly realizovány ve dvou různých uspořádáních simulujících různé stupně proteolytického zpracování a interakce gliadinu s P(HEMA-co-SS) odpovídající rozdílné časové aplikaci P(HEMA-co-SS) do organismu po požití lepku. V první variantě pokusu (A) byl nejprve připraven pepsinem štěpený gliadin a poté byl k němu přidán P(HEMA-co-SS). Tato varianta napodobovala situaci, kdy se P(HEMA-co-SS) v trávicím traktu setká s již částečně natráveným gliadinem. Taková situace by mohla teoreticky nastat při následném podání P(HEMA-co-SS) až po příjmu potravy. V druhé variantě pokusu (B) byl gliadin štěpený už v přítomnosti P(HEMA-co-SS), což mělo napodobit situaci, kdy k vazbě P(HEMA-co-SS) s gliadinem dojde ještě před jeho natrávením v žaludku, tedy teoreticky za současného příjmu P(HEMA-co-SS) s potravou. Při obou variantách pokusu byla měřena koncentrace IL-10 a TNF- α produkovaných PBMC a biopsiemi po stimulaci gliadinem, P(HEMA-co-SS) a jejich kombinací. Imunomodulační účinek P(HEMA-co-SS) potvrdily jak kultivace PBMC tak i kultivace střevních biopsií. Polymer značně ovlivňoval produkci cytokinů v kultivačním mediu. Výsledky obou variant pokusu se ovšem lišily.

Samotný P(HEMA-co-SS) nevyvolával u PBMC zdravých dárců ani u PBMC pacientů zvýšenou produkci IL-10 ani TNF- α oproti negativním kontrolám (nestimulovaným PBMC), zatímco P(HEMA-co-SS) opracovaný pepsinem stimuloval PBMC zdravých dárců i pacientů k výrazně vyšší produkci poškozujícího TNF- α oproti negativním kontrolám (nestimulovaným PBMC). P(HEMA-co-SS) v nativní formě se tedy choval na rozdíl od P(HEMA-co-SS) opracovaného pepsinem velmi inertně a neindukoval sám o sobě produkci cytokinů. Příklad P(HEMA-co-SS) ke gliadinu

v přítomnosti IFN- γ (dominantního prozánětlivého cytokinu poškozené střevní sliznice při celiakii) výrazně zvýšil produkci protektivního IL-10 u zdravých dárců i u pacientů oproti stimulaci samotným gliadinem, zatímco hladina poškozujícího TNF- α zůstala zachována, což podporuje úvahy o pozitivním terapeutickém účinku P(HEMA-co-SS).

Při inkubaci PBMC s gliadinem štěpeným v přítomnosti P(HEMA-co-SS) došlo ke snížení produkce protektivního IL-10 a výraznému zvýšení produkce TNF- α oproti inkubaci se samotným gliadinem, a to u zdravých dárců i u pacientů. Působením pepsinu na P(HEMA-co-SS) se tedy zřejmě mění jeho biologické vlastnosti a snižují potenciální terapeutické schopnosti, jelikož sám opracovaný P(HEMA-co-SS) je schopen stimulovat tvorbu poškozujícího TNF- α a to zejména u pacientů. Tyto výsledky jasně ukazují jak významně ovlivňuje způsob aplikace P(HEMA-co-SS) imunitní odpověď PBMC na gliadin.

U biopsií odebraných pacientům vyvolával P(HEMA-co-SS) i P(HEMA-co-SS) opracovaný pepsinem vyšší produkci IL-10 i TNF- α ve srovnání s negativními kontrolami (nestimulovanými biopsiemi) ale nižší ve srovnání s gliadinem. Při současné inkubaci biopsií s gliadinem a P(HEMA-co-SS) se zvýšila produkce protektivního IL-10 a výrazně klesla produkce poškozujícího TNF- α oproti stimulaci samotným gliadinem. Navzdory zmíněným výsledkům pokusů s PBMC, biopsie stimulované gliadinem štěpeným v přítomnosti P(HEMA-co-SS) produkovaly sice nižší hladiny protektivního IL-10 avšak produkce poškozujícího TNF- α klesla pod hranici detekce.

Dospěli jsme tedy k závěru, že při provedení dietní chyby se prozatím jeví jako terapeuticky výhodnější varianta pokusu A), tedy použití enzymaticky neopracovaného P(HEMA-co-SS) v nativní podobě, odpovídající teoretické situace neutralizace již částečně natráveného gliadinu následným podáním P(HEMA-co-SS) jako antidota až po příjmu potravy.

V následujících pokusech je třeba prověřit další možné varianty simulující další způsoby aplikace P(HEMA-co-SS) do organismu. Následovat by měly také první fáze klinických zkoušek.

Jiné podobné studie zatím nebyly provedeny. Získaná data jsou součástí připravované publikace (PINIER et al., odesláno do tisku).

5.2. Imunomodulační účinek střevních bakterií

Vznik celiakie je výsledkem spolupůsobení faktorů genetických, imunitních a environmentálních. Klíčovým a nezbytným exogenním spouštěčem celiakie je gliadin (DI SABATINO a CORAZZA 2009). Za jeden z environmentálních faktorů ovlivňujících nástup celiakie je v současnosti považována střevní mikroflóra, jelikož bylo zjištěno, že její složení u celiaků se liší od zdravých osob a mění se i po dodržování bezlepkové diety. Střevní mikroflóra celiaků obsahuje ve srovnání se zdravými jedinci vyšší podíl rodů *Bacteroides*, *Clostridium*, *Staphylococcus* a *Eubacterium* a nižší počet prospěšných bakterií rodu *Bifidobacterium* (COLLADO et al. 2007, SANZ et al. 2007).

Fyziologická střevní mikroflóra a určité probiotické kmeny prostřednictvím potravní kompetice a tvorby bakteriocinů potlačují růst patogenní mikroflóry, posilují funkci střevní bariéry a působí protektivně na vznik onemocnění. Naopak, přerůstání oportunních patogenů může přispívat k patologickým procesům onemocnění stimulací produkce prozáněťových cytokinů a zvyšováním intestinální permeability (KREJSEK et al. 2007).

Pozitivní účinky probiotických kmenů *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium longum* byly již prokázány v mnoha studiích. Medina a kol. koinkubovali lidské PBMC s extrakty bakterií získanými ze stolice pacientů s aktivní celiakií. Současným přídatkem probiotických kmenů *Bifidobacterium bifidum* nebo *Bifidobacterium longum* dosáhli snížení koncentrace prozánětlivých cytokinů TNF- α a IFN- γ a zvýšení koncentrace protektivního IL-10 v kultivačním mediu (MEDINA et al. 2008). Také PBMC stimulované gliadinem za přítomnosti gram-negativních bakterií *Escherichia coli* a *Shigella* izolovaných ze stolice celiakálních pacientů produkovaly vyšší množství prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-12, IFN- γ) než za přítomnosti probiotických kmenů *Bifidobacterium bifidum* a *Bifidobacterium longum*. Tyto prospěšné kmeny navíc indukovaly produkci IL-10 s protizánětlivým účinkem. Přítomností bakterií *Escherichia coli* a *Shigella* byla taktéž více ovlivněna exprese povrchových aktivačních markerů PBMC (DE PALMA et al. 2010). Při *in vivo* pokusu, kdy byly výše uvedené gram-negativní bakteriální kmeny aplikovány do podvázaných střevních kliček bezmikrobních krys za současné stimulace gliadinem a IFN- γ , bylo přídatkem probiotického kmene *Bifidobacterium bifidum* k těmto potenciálním patogenům a gliadinu dosaženo částečné redukce patologických změn střevní sliznice

vyvolaných působením gliadinu a zmíněných gram-negativních bakteriálních kmenů (CINOVÁ et al., odesláno do tisku).

Jednoduchou a bezpečnou alternativní terapií celiakie by se tedy mohlo stát užívání probiotik.

Dendritické buňky (profesionální APC), hrají klíčovou úlohu v aktivaci antigenně specifické T-buněčné odpovědi, která je v případě celiakie hlavní příčinou poškození sliznice tenkého střeva. Morfologické, fenotypové a funkční změny DC po stimulaci gliadinem byly již popsány v několika studiích, ze kterých je zřejmé, že gliadin indukuje maturaci DC. Gliadinem maturované DC zvyšují expresi povrchových maturačních markerů (CD83, CD80, CD86, CD40, HLA-DR), ztrácí schopnost fagocytózy a zvyšují produkci cytokinů a chemokinů (IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α , RANTES). Gliadinem stimulované DC mají také vyšší schopnost aktivovat T-lymfocyty (PALOVÁ-JELÍNKOVÁ et al. 2005, RAKHIMOVA et al. 2009).

Cílem naší studie bylo zjistit, zda a jak může přítomnost různých bakteriálních kmenů ovlivnit odpověď lidských dendritických buněk na gliadin. Metodou ELISA byla měřena produkce IL-10 a TNF- α dendritickými buňkami zdravých dárců po stimulaci gliadinem, bakteriálními kmeny nebo jejich kombinací. Současně s produkcí cytokinů byla měřena také exprese povrchových maturačních markerů DC průtokovou cytometrií.

Bakterie použité při pokusech byly izolovány a vypěstovány na pracovišti Yolandy Sanz ve Valencii. Kmeny *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium bifidum* pocházejí ze střevních exkrementů zdravých dárců, *Escherichia coli* byla izolována ze střevních exkrementů celiakálních pacientů dodržujících GFD a *Shigella* byla získána ze střevních exkrementů aktivních celiaků. Kmen *Bacteroides fragilis* byl získán komerčně.

Všechny bakteriální kmeny i samotný gliadin vyvolaly u DC zvýšení produkce protektivního IL-10 i protizánětlivého TNF- α oproti negativním kontrolám (nestimulovaným DC). K nejnižší produkci obou cytokinů stimuloval DC kmen *Bifidobacterium longum*, který také jako jediný z použitých stimulů indukoval u DC nižší produkci IL-10 i TNF- α než samotný gliadin. Nejvyšší hladiny obou cytokinů produkovaly DC po stimulaci gram-negativními kmeny *Escherichia coli* a *Shigella*, přičemž stimulační účinek těchto kmenů na DC již nebyl dále ovlivněn přítomností gliadinu v kultivačním mediu. Zvýšení produkce IL-10 i TNF- α po koinbuace bakteriálních kmenů s gliadinem bylo nejvýraznější u kmene *Bifidobacterium bifidum*.

Nestimulované DC (negativní kontroly) ani DC stimulované kmenem *Bifidobacterium longum* neprodukovaly IL-12, cytokin podporující Th1-zánětlivou buněčnou odpověď. I po stimulaci gliadinem byla produkce IL-12 u DC velmi nízká v porovnání s ostatními bakteriálními stimuly. Toto zjištění odpovídá výsledkům dosavadních studií, které ukázaly, že gliadin překvapivě nezvyšuje hladinu IL-12 v zánětlivém prostředí střevní sliznice a IL-12 pravděpodobně nehraje v patogenezi celiakie významnou roli (NILSEN et al. 1998, PALOVÁ-JELÍNKOVÁ et al. 2005). Výrazně vyšší produkci IL-12 než ostatní použité kmeny indukovaly u DC kmeny *Escherichia coli* a *Shigella*, jejichž stimulační schopnost byla dále jen málo ovlivněna přidavkem gliadinu.

Výsledky měření exprese povrchových markerů DC byly velmi individuálně variabilní a mezi stimulačními účinky jednotlivých bakteriálních kmenů nebyly zřejmé výrazné rozdíly. Tyto výsledky proto nevedly k jednoznačným zjištěním.

Nicméně ze získaných výsledků cytokinové produkce vyplývá, že jednoznačně nejmocnějšími bakteriálními stimulatory dendritických buněk byly potenciální patogeny *Escherichia coli* a *Shigella*. Kmen *Bacteroides fragilis* stimuloval DC vždy více než oba probiotické kmeny rodu *Bifidobacterium* ale méně než gram-negativní kmeny *Escherichia coli* a *Shigella*. Z obou testovaných probiotických kmenů stimuloval DC k výraznější produkci stanovovaných cytokinů kmen *Bifidobacterium bifidum* než *Bifidobacterium longum*. Právě kmen *Bifidobacterium bifidum* vykazoval ze všech testovaných kmenů nejvyšší synergistický účinek s účinkem gliadinu, tedy koinkubací s gliadinem se nejvíce zvyšovala jeho schopnost stimulovat DC k cytokinové produkci ve srovnání se všemi ostatními testovanými bakteriálními kmeny. Tyto výsledky potvrzují významné imunomodulační schopnosti probiotického kmene *Bifidobacterium bifidum* popsané v předchozích provedených studiích (MEDINA et al. 2008, DE PALMA et al. 2010, CÍNOVÁ et al., odesláno do tisku).

V další studii by měly být ke stimulacím DC použity kombinace jednotlivých bakteriálních kmenů mezi sebou a s gliadinem pro napodobení reálného složení střevní mikroflóry. Pro srovnání s reakcí DC zdravých dárců by také měly následovat pokusy na buňkách a tkáních získaných od celiakálních pacientů.

6. ZÁVĚR

- 1) Na základě porovnání výsledků získaných ze dvou různých variant pokusů, při kterých byly testovány účinky P(HEMA-co-SS) na lidské PBMC a střevní biopsie, jsme dospěli k závěru, že při provedení dietní chyby se jeví jako terapeuticky výhodnější varianta pokusu A), tedy použití enzymaticky neopracovaného P(HEMA-co-SS) v nativní podobě, odpovídající teoretické situaci, kdy je třeba neutralizovat již částečně natrávený gliadin následným podáním P(HEMA-co-SS) jako antidota až po příjmu potravy obsahující lepek. Z výsledků varianty pokusu B) vyplynulo, že působení pepsinu zřejmě mění biologické vlastnosti P(HEMA-co-SS) a snižuje tak jeho potenciální terapeutické schopnosti.
- 2) Při testování imunomodulačních účinků různých bakteriálních kmenů na lidské dendrické buňky stimulované gliadiem se potvrdilo, že jednoznačně nejmocnějšími stimulatory DC jsou potenciálně patogenní kmeny *Escherichia coli* a *Shigella*. Nejméně byly DC stimulovány probiotickým kmenem *Bifidobacterium longum*. Kmen *Bacteroides fragilis* stimuloval DC vždy více než oba kmeny *Bifidobacterium* ale méně než gram-negativní kmeny *Escherichia coli* a *Shigella*. Ze všech testovaných kmenů vykazoval nejvyšší synergistický účinek s účinkem gliadinu probiotický kmen *Bifidobacterium bifidum*.

PŘEHLED CITOVANÉ LITERATURY:

Alaedini A., Green P.H. (2005). Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Ann Intern Med.* 142(4):289-98.

Arentz-Hansen H., Körner R., Molberg O., Quarsten H., Vader W., Kooy Y.M., Lundin K.E., Koning F., Roepstorff P., Sollid L.M., McAdam S.N. (2000). 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(4):603-12.

Benahmed M., Mention J.J., Matysiak-Budnik T., Cerf-Bensussan N. (2003). Celiac disease: a future without gluten-free diet?? *Gastroenterology.* 125(4):1264-7.

Benahmed M., Meresse B., Arnulf B., Barbe U., Mention J.J., Verkarre V., Allez M., Cellier C., Hermine O., Cerf-Bensussan N. (2007). Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology.* 132(3):994-1008.

Ciccocioppo R., Di Sabatino A., Corazza G.R. (2005). The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol.* 140(3):408-16.

Cinová J., De Palma G., Štěpánková R., Kofronová O., Kverka M., Sanz Y., Tučková L. (2010, odesláno do tisku). Role of intestinal bacteria in gliadin-induced changes in intestinal mucosa: study in germ-free rats.

Cinová J., Palová-Jelínková L., Smythies L.E., Černá M., Pecharová B., Dvořák M., Fruhauf P., Tlaskalová-Hogenová H., Smith P.D., Tučková L. (2007). Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *J Clin Immunol.* 27(2):201-9

Collado M.C., Calabuig M., Sanz Y. (2007). Differences between the fecal microbiota of coeliac infants and healthy controls. *Curr Issues Intest Microbiol.* 8(1):9-14.

De Palma G., Cinova J., Stepankova R., Tuckova L., Sanz Y. (2010). Pivotal Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. *J Leukoc Biol.* 87(5):765-78.

Di Sabatino A., Corazza G.R. (2009). Coeliac disease. *Lancet.* 373(9673):1480-93.

Dieterich W., Ehnis T., Bauer M., Donner P., Volta U., Riecken E.O., Schuppan D. (1997). Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med.* 3(7):797-801.

Esposito C., Paparo F., Caputo I., Porta R., Salvati V.M., Mazzarella G., Auricchio S., Troncione R. (2003). Expression and enzymatic activity of small intestinal tissue transglutaminase in celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 98(8):1813-20.

Fasano A., Catassi C. (2001). Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*. 120(3):636-51.

Fasano A., Not T., Wang W., Uzzau S., Berti I., Tommasini A., Goldblum S.E. (2000). Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet*. 355(9214):1518-9.

Fina D., Sarra M., Caruso R., Del Vecchio Blanco G., Pallone F., MacDonald T.T., Monteleone G. (2008). Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in coeliac disease. *Gut*. 57(7):887-92.

Fuchs M. (2005). Mouka – imunologické reakce přecitlivělosti. *Alergie* 3:209-216.

Gass J., Bethune M.T., Siegel M., Spencer A., Khosla C. (2007). Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology*. 133(2):472-80.

Hausch F., Shan L., Santiago N.A., Gray G.M., Khosla C. (2002). Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 283(4):G996-G1003.

Hüe S., Mention J.J., Monteiro R.C., Zhang S., Cellier C., Schmitz J., Verkarre V., Fodil N., Bahram S., Cerf-Bensussan N., Caillat-Zucman S. (2004). A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*. 21(3):367-77.

Huibregtse I.L., Marietta E.V., Rashtak S., Koning F., Rottiers P., David C.S., van Deventer S.J., Murray J.A. (2009). Induction of antigen-specific tolerance by oral administration of *Lactococcus lactis* delivered immunodominant DQ8-restricted gliadin peptide in sensitized nonobese diabetic Abo Dq8 transgenic mice. *J Immunol*. 183(4):2390-6.

Chládková B., Kamanová J., Palová-Jelínková L., Cinová J., Šebo P., Tučková L. (2010). Gliadin fragments promote migration of dendritic cells. *J Cell Mol Med*. [Epub ahead of print]

Jelínková L., Tučková L., Cinová J., Flegelová Z., Tlaskalová-Hogenová H. (2004). Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF-alpha through a mechanism involving NF-kappaB. *FEBS Lett*. 571(1-3):81-5.

Keech C.L., Dromey J., Chen Z., et al. (2009). Immune tolerance induced by peptide immunotherapy in an HLA-DQ2-dependent mouse model of gluten immunity. *Gastroenterology* 136:A355.

Kiyosaki T., Matsumoto I., Asakura T., Funaki J., Kuroda M., Misaka T., Arai S., Abe K. (2007). Gliadin, a gibberellin-inducible cysteine proteinase occurring in germinating seeds of wheat, *Triticum aestivum* L., specifically digests gliadin and is regulated by intrinsic cystatins. *FEBS J*. 274(8):1908-17.

Krejsek J., Kudlová M., Kolářková M., Novosad J. (2007). Nutrice, probiotika a imunitní systém. II.část: Nutrice, přirozená slizniční mikroflóra a individuální imunitní reaktivita. *Pediatr. pro praxi*. 3:156–162.

- Lammers K.M., Lu R., Brownley J., Lu B., Gerard C., Thomas K., Rallabhandi P., Shea-Donohue T., Tamiz A., Alkan S., Netzel-Arnett S., Antalis T., Vogel S.N., Fasano A. (2008). Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology*. 135(1):194-204.
- Lee A., Newman J.M. (2003). Celiac diet: its impact on quality of life. *J Am Diet Assoc*. 103(11):1533-5.
- Lee A.R., Ng D.L., Zivin J., Green P.H. (2007). Economic burden of a gluten-free diet. *J Hum Nutr Diet*. 20(5):423-30.
- Lerner A. (2010). New therapeutic strategies for celiac disease. *Autoimmun Rev*. 9(3):144-7.
- Liang L., Pinier M., Leroux J.C., Subirade M. (2009). Interaction of alpha-gliadin with poly(HEMA-co-SS): structural characterization and biological implication. *Biopolymers*. 91(2):169-78.
- Liang L., Pinier M., Leroux J.C., Subirade M. (2010). Interaction of alpha-gliadin with polyanions: design considerations for sequestrants used in supportive treatment of celiac disease. *Biopolymers*. 93(5):418-28.
- Maiuri L., Ciacci C., Auricchio S., Brown V., Quaratino S., Londei M. (2000). Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*. 119(4):996-1006.
- Maiuri L., Ciacci C., Ricciardelli I., Vacca L., Raia V., Auricchio S., Picard J., Osman M., Quaratino S., Londei M. (2003). Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*. 362(9377):30-7.
- Maiuri L., Ciacci C., Vacca L., Ricciardelli I., Auricchio S., Quaratino S., Londei M. (2001). IL-15 drives the specific migration of CD94+ and TCR-gammadelta+ intraepithelial lymphocytes in organ cultures of treated celiac patients. *Am J Gastroenterol*. 96(1):150-6.
- Mäki M., Collin P. (1997). Coeliac disease. *Lancet*. 349(9067):1755-9.
- Marsh M.N., Crowe P.T. (1995). Morphology of the mucosal intestinal lesion in gluten sensitivity. *Baillieres Clin Gastroenterol* 9:273-293.
- Maurano F., Siciliano R.A., De Giulio B., Luongo D., Mazzeo M.F., Troncone R., Auricchio S., Rossi M. (2001). Intranasal administration of one alpha gliadin can downregulate the immune response to whole gliadin in mice. *Scand J Immunol*. 53(3):290-5.
- Medina M., De Palma G., Ribes-Koninckx C., Calabuig M., Sanz Y. (2008). Bifidobacterium strains suppress in vitro the pro-inflammatory milieu triggered by the large intestinal microbiota of coeliac patients. *J Inflamm*. 5:19.
- Mitea C., Havenaar R., Drijfhout J.W., Edens L., Dekking L., Koning F. (2008). Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut*. 57(1):25-32.

- Mohamed B.M., Feighery C., Kelly J., Coates C., O'Shea U., Barnes L., Abuzakouk M. (2006). Increased protein expression of matrix metalloproteinases -1, -3, and -9 and TIMP-1 in patients with gluten-sensitive enteropathy. *Dig Dis Sci.* 51(10):1862-8.
- Molberg O., Mcadam S.N., Körner R., Quarsten H., Kristiansen C., Madsen L., Fugger L., Scott H., Norén O., Roepstorff P., Lundin K.E., Sjöström H., Sollid L.M. (1998). Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med.* 4(6):713-7.
- Molberg O., Uhlen A.K., Jensen T., Flaete N.S., Fleckenstein B., Arentz-Hansen H., Raki M., Lundin K.E., Sollid L.M. (2005). Mapping of gluten T-cell epitopes in the bread wheat ancestors: implications for celiac disease. *Gastroenterology.* 128(2):393-401.
- Nilsen E.M., Jahnsen F.L., Lundin K.E., Johansen F.E., Fausa O., Sollid L.M., Jahnsen J., Scott H., Brandtzaeg P. (1998). Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology.* 115(3):551-63.
- Palová-Jelínková L., Rožková D., Pecharová B., Bártová J., Šedivá A., Tlaskalová-Hogenová H., Spíšek R., Tučková L. (2005). Gliadin fragments induce phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. *J Immunol.* 175(10):7038-45.
- Pasternack R., Dorsch S., Otterbach J.T., Robenek I.R., Wolf S., Fuchsbauer H.L. (1998). Bacterial pro-transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*--purification, characterisation and sequence of the zymogen. *Eur J Biochem.* 257(3):570-6.
- Paterson B.M., Lammers K.M., Arrieta M.C., Fasano A., Meddings J.B. (2007). The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther.* 26(5):757-66.
- Pinier M., Fuhrmann G., Rivard N., Murray J., Tuckova L., Drasarova H., Leroux J.C., Verdu E. (2010, odesláno do tisku). Gluten binders exhibit therapeutic benefits in gliadin-sensitive mice and in human tissues.
- Pinier M., Verdu E.F., Nasser-Eddine M., David C.S., Vézina A., Rivard N., Leroux J.C. (2009). Polymeric binders suppress gliadin-induced toxicity in the intestinal epithelium. *Gastroenterology.* 136(1):288-98.
- Przemioslo R.T., Kontakou M., Nobili V., Ciclitira P.J. (1994). Raised pro-inflammatory cytokines interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha in coeliac disease mucosa detected by immunohistochemistry. *Gut.* 35(10):1398-403.
- Przemioslo R.T., Lundin K.E., Sollid L.M., Nelufer J., Ciclitira P.J. (1995). Histological changes in small bowel mucosa induced by gliadin sensitive T lymphocytes can be blocked by anti-interferon gamma antibody. *Gut.* 36(6):874-9.
- Qiao S.W., Bergseng E., Molberg Ø., Xia J., Fleckenstein B., Khosla C., Sollid L.M. (2004). Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol.* 173(3):1757-62.

- Rakhimová M., Esslinger B., Schulze-Krebs A., Hahn E.G., Schuppan D., Dieterich W. (2009). In vitro differentiation of human monocytes into dendritic cells by peptic-tryptic digest of gliadin is independent of genetic predisposition and the presence of celiac disease. *J Clin Immunol.* 29(1):29-37.
- Reunala T.L. (2001). Dermatitis herpetiformis. *Clin Dermatol.* 19(6):728-36.
- Rizzello C.G., De Angelis M., Di Cagno R., Camarca A., Silano M., Losito I., De Vincenzi M., De Bari M.D., Palmisano F., Maurano F., Gianfrani C., Gobbetti M. (2007). Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol.* 73(14):4499-507.
- Rubio-Tapia A., Murray J.A. (2010). Classification and management of refractory coeliac disease. *Gut.* 59(4):547-57.
- Salvati V.M., MacDonald T.T., Bajaj-Elliott M., Borrelli M., Staiano A., Auricchio S., Troncone R., Monteleone G. (2002). Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. *Gut.* 50(2):186-90.
- Salvati V.M., Mazzarella G., Gianfrani C., Levings M.K., Stefanile R., De Giulio B., Iaquinto G., Giardullo N., Auricchio S., Roncarolo M.G., Troncone R. (2005). Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa. *Gut.* 54(1):46-53.
- Sanz Y., Sánchez E., Marzotto M., Calabuig M., Torriani S., Dellaglio F. (2007). Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 51(3):562-8.
- See J., Murray J.A. (2006). Gluten-free diet: the medical and nutrition management of celiac disease. *Nutr Clin Pract.* 21(1):1-15.
- Senger S., Luongo D., Maurano F., Mazzeo M.F., Siciliano R.A., Gianfrani C., David C., Troncone R., Auricchio S., Rossi M. (2003). Intranasal administration of a recombinant alpha-gliadin down-regulates the immune response to wheat gliadin in DQ8 transgenic mice. *Immunol Lett.* 88(2):127-34.
- Shan L., Molberg Ø., Parrot I., Hausch F., Filiz F., Gray G.M., Sollid L.M., Khosla C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science.* 297(5590):2275-9.
- Shewry P.R., Tatham A.S. (1990). The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem J.* 267(1):1-12.
- Schumann M., Richter J.F., Wedell I., Moos V., Zimmermann-Kordmann M., Schneider T., Daum S., Zeitz M., Fromm M., Schulzke J.D. (2008). Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut.* 57(6):747-54.
- Schuppan D., Junker Y., Barisani D. (2009). Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology.* 137(6):1912-33.

- Siegel M., Khosla C. (2007). Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in disease states. *Pharmacol Ther.* 115(2):232-45.
- Silano M., Vincentini O., Iapello A., Mancini E., De Vincenzi M. (2008). Antagonist peptides of the gliadin T-cell stimulatory sequences: a therapeutic strategy for celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 42(3/2):191-2.
- Silano M., Volta U., Mecchia A.M., Dessì M., Di Benedetto R., De Vincenzi M. (2007). Delayed diagnosis of coeliac disease increases cancer risk. *BMC Gastroenterol.* 7:8.
- Silano M., Volta U., Vincenzi A.D., Dessì M., Vincenzi M.D. (2008). Effect of a gluten-free diet on the risk of enteropathy-associated T-cell lymphoma in celiac disease. *Dig Dis Sci.* 53(4):972-6.
- Sollid L.M. (2002). Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol.* 2(9):647-55.
- Sollid L.M., Khosla C. (2005). Future therapeutic options for celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2(3):140-7.
- Stepniak D., Koning F. (2006). Celiac disease - sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol.* 67(6):460-8.
- Stepniak D., Spaenij-Dekking L., Mitea C., Moester M., de Ru A., Baak-Pablo R., van Veelen P., Edens L., Koning F. (2006). Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 291(4):G621-9.
- Tučková L., Flegelová Z., Tlaskalová-Hogenová H., Zídek Z. (2000). Activation of macrophages by food antigens: enhancing effect of gluten on nitric oxide and cytokine production. *J Leukoc Biol.* 67(3):312-8.
- Tučková L., Novotná J., Novák P., Flegelová Z., Květoň T., Jelínková L., Zídek Z., Man P., Tlaskalová-Hogenová H. (2002). Activation of macrophages by gliadin fragments: isolation and characterization of active peptide. *J Leukoc Biol.* 71(4):625-31.
- Vader L.W., Stepniak D.T., Bunnik E.M., Kooy Y.M., de Haan W., Drijfhout J.W., Van Veelen P.A., Koning F. (2003). Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology.* 125(4):1264-7.
- van de Wal Y., Kooy Y., van Veelen P., Peña S., Mearin L., Papadopoulos G., Koning F. (1998). Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol.* 161(4):1585-8.
- Wiese H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology.* 24(2):115-119.

Xia J., Siegel M., Bergseng E., Sollid L.M., Khosla C. (2006). Inhibition of HLA-DQ2-mediated antigen presentation by analogues of a high affinity 33-residue peptide from alpha2-gliadin. *J Am Chem Soc.* 128(6):1859-67.

Yokoyama K., Nio N., Kikuchi Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64(4):447-54.

Zingone F., Capone P., Ciacci C. (2010). Celiac disease: Alternatives to a gluten free diet. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 1(1):36-39.