

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd



Diagnostika defektů enzymové aktivity u pacientů s celiakální sprue

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. MUDr. Josef Herink, DrSc.

Konzultant: Mgr. Zuzana Manhartová

Hradec Králové, 2014

Simona Bartoňová, DiS.

Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 30. 4. 2014

.....
Simona Bartoňová

Velice ráda bych chtěla poděkovat MUDr. Markétě Trnkové, společnosti Biolab Praha k.s. za vstřícnost, ochotu a za poskytnutí cenných záznamů z archivu histochemických preparátů.

Děkuji své konzultantce Mgr. Zuzaně Manhartové a celému kolektivu v histochemické a imunohistochemické laboratoři Biolab Praha k.s. za odborné vedení a poskytnutí informací při vypracování bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat Doc. MUDr. Josefu Herinkovi, DrSc. za odbornou spolupráci v průběhu zpracování bakalářské práce na Farmaceutické Fakultě v Hradci Králové.

OBSAH:

ABSTRAKT	1
ABSTRACT.....	2
CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE - ZADÁNÍ	3
SEZNAM ZKRATEK	4
1. ÚVOD.....	5
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	6
2.1. Celiakální sprue	6
2.1.1. Genetika.....	7
2.1.2. Lepek	7
2.1.3. Mechanismus vzniku zánětlivé reakce u celiakální sprue.....	8
2.1.4. Klinické projevy onemocnění.....	10
2.1.4.1. Formy CS	12
2.1.4.2. Malabsorpční syndrom	13
2.1.5. Asociovaná onemocnění a komplikace u celiakální sprue	14
2.2. Diagnostika celiakální sprue	14
2.2.1. Vyšetření protilátek	15
2.2.2. Bioptické vyšetření	16
2.2.2.1. Základní histologické vyšetření	16
2.2.2.2. Histochemické vyšetření.....	18
2.3. Léčba celiakální sprue	21

3. PRAKTICKÁ ČÁST	22
3.1. Marshova klasifikace	22
3.2. Stanovení a hodnocení aktivity enzymů v bioptickém vzorku	22
3.2.1. Zpracování bioptické tkáně.....	23
3.2.1.1. Pomůcky a přístroje	23
3.2.1.2. Chemikálie	23
3.2.1.3. Odběr a příprava bioptického vzorku	23
3.2.2. Metoda průkazu enzymů.....	24
3.2.2.1. Pomůcky a přístroje	24
3.2.2.2. Zásobní roztoky	24
3.2.3. Průkaz a hodnocení aktivity laktázy	26
3.2.3.1. Provedení reakce.....	26
3.2.4. Průkaz a hodnocení aktivity trehalázy	27
3.2.4.1. Provedení reakce.....	27
3.2.5. Průkaz a hodnocení aktivity dipeptidylpeptidázy IV.....	28
3.2.5.1. Provedení reakce.....	28
4. VÝSLEDKY	29
4.1. Soubor vyšetřovaných pacientů.....	29
4.1.1. Výskyt nově diagnostikovaných případů celiakie u pacientů nad 50 let...30	
4.1.2. Změny na sliznici po bezlepkové dietě u pacientů nad 50 let	31
5. DISKUZE	33
6. ZÁVĚR	35
7. SEZNAM LITERATURY.....	36

ABSTRAKT

Celiakální sprue je chronické celoživotní onemocnění, charakterizované trvalou nesnášenlivostí lepku (glutenu). Sliznice tenkého střeva těchto pacientů vykazuje typické zánětlivé změny. Tyto změny vedou k poruše vstřebávání všech živin, minerálů a vitaminů, které se mohou projevit malabsorpčním syndromem. Diagnostika celiakie musí být komplexním hodnocením výsledku imunologického vyšetření autoprotilátek a mikroskopického hodnocení stavu střevní sliznice.

Bakalářská práce se zabývá histochemickým vyšetřením střevních biopsií, které umožňuje lépe rozlišit malabsorpční syndromy různého původu. Cílem práce bylo zjistit u pacientů nad 50 let ze vzorků přijatých za rok 2013 frekvenci výskytu celiakální sprue a vyhodnotit kompletnost remise u pacientů na bezlepkové dietě. Přísná dieta vede ke zhojení sliznice a obnově enzymové aktivity kartáčového lemu. Biopsie byly po odběru rychle zmrazeny, aby se zachovala integrita tkáně a enzymová aktivita kartáčového lemu. Reakce, prokazující enzymovou aktivitu laktázy, trehalázy a dipeptidylpeptidázy IV, byly provedeny na řezech již dříve popsány histochemickými postupy. Alterace reliéfu byla hodnocena Marshovým skóre.

V roce 2013 bylo přijato na odd. histochemie 691 biopsických vzorků. Z tohoto počtu bylo 141 pacientů ve věku nad 50 let. Jako celiakální sprue bylo uzavřeno 19 vzorků. U pacientů s nově diagnostikovanou celiakií 9 se jednalo o poškození slizničního reliéfu s různým stupněm snížení aktivit enzymů kartáčového lemu. U pacientů již prokázanou celiakií, kteří dodržovali bezlepkovou dietu, byly změny na sliznici závislé na době dodržování diety. K úplné remisi došlo pouze u 6 pacientů. Jedním z nejčastějších důvodů nedostatečného zhojení sliznice u těchto pacientů je nedodržování přísné bezlepkové diety, která naruší dlouhodobé stravovací návyky starších pacientů. Nicméně vyšší věk při diagnóze celiakie nemusí vést i při přísném dodržování bezlepkové diety k úplnému obnovení aktivit enzymů kartáčového lemu.

ABSTRACT

Celiac sprue is a chronic, lifelong disease characterized by permanent intolerance to gluten. Small intestinal mucosa of these patients shows typical inflammatory changes. These changes lead to reduced absorption of nutrients, minerals and vitamins that may result malabsorption syndrome. Diagnosis of celiac disease must be a comprehensive evaluation of the results of immunological testing of autoantibodies and microscopic evaluation of the intestinal mucosa state. The bachelor thesis deals with the histochemical examination of intestinal biopsies, which allows better distinguish malabsorption syndromes of different origin. The aim of the study was to determine incidence of celiac sprue and evaluate the completeness of remission in patients on a gluten - free diet in patients aged over 50 years in intestinal biopsies samples taken in 2013. Strict gluten - free diet leads to reparation of mucosa and brush border enzyme activity. Biopsies were snap frozen immediately after collection, to preserve the morphology of tissue and the brush border enzyme activity. Reactions, demonstrating the enzymatic activity of the lactase, trehalase and dipeptidylpeptidase IV, were exercised on sections by previously described histochemical methods. Alteration of relief was assessed by Marsh score.

In 2013 was recieved to the histochemistry dept. 691 biopsies. Of this number 141 patients was aged over 50 years. Celiac sprue was concluded in 19 samples. In patients with newly diagnosed celiac disease 9 was found damage of mucosal relief with varying degrees of reduced brush border enzyme activities. In patients with already proven celiac disease, who adhere to a gluten - free diet, changes in the mucosa depended on the duration of the diet. A complete remission was seen only in 6 patients. One of the most common reason for lack of complete mucosal healing in is insufficient adherence to strict gluten - free diet, that disrupts long - term eating habits of the matured patients. However, higher age at diagnosis of celiac disease may not lead to full restoration of the brush border enzyme activities, even with strict adherence to a gluten - free diet.

CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE - ZADÁNÍ

V teoretické části nejprve popíši celiakální onemocnění, diagnostické postupy a léčbu, v praktické části pak použité histochemické metody a charakteristiku vyšetřovaného souboru pacientů.

Cílem práce je vyhodnotit v bioptických vzorcích střevní sliznice pacientů nad 50 let, přijatých za rok 2013, defekty enzymů kartáčového lemu laktázy, trehalázy a dipeptidylpeptidázy IV histochemickými metodami. Vyhodnotit reliéf sliznice a počet IEL v bioptickém vzorku střevní sliznice a následně stanovit Marshovo skóre. Ověřit výskyt nově diagnostikovaných případů celiakie u pacientů nad 50 let a zhodnotit změnu aktivit enzymů kartáčového lemu u pacientů nad 50 let po bezlepkové dietě a za rok 2013 z celkového počtu přijatých bioptických vzorků.

SEZNAM ZKRATEK

Ab	protilátka
Ag	antigen
AEA	protilátky proti endomysiu
APC	antigen - prezentující buňky
atTG – A	protilátky třídy IgA proti tkáňové transglutamináze
CS	celiakální sprue
CD4, CD8	komplementární znaky buněk
DAB	3,3 ´ diaminobenzidin tetrahydrochlorid
DM	diabetes mellitus
DPP IV	dipeptidylpeptidáza IV
EATL	Enteropathy Associated T – lymphoma
EMA	protilátky proti endomysiu
ELISA	enzyme - linked immuno sorbent assay, enzymimunoanalýza
Fas ligand	transmembránový protein typu II
Fas receptor	transmembránový protein typu I
GIT	gastrointestinální trakt
GO - PO – DAB	glukózaoxidáza - peroxidáza – diaminobenzidin
HE	hematoxylin – eosin
HLA	Human Leukocyte Antigen, hlavní histokompatibilní komplex
HLA - DQ2, DQ8, DQw2, DR3	molekulové produkty třídy II: antigeny HLA – DQ, DR
HLA - B8	molekulové produkty třídy I: antigeny HLA – B
IEL	intraepiteliální lymfocyty
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
MAS	malabsorpční syndrom
NK – buňky	Natural Killers, přirození zabíječi
TCR	T - receptor na povrchu T - lymfocytů
TG2	enzym tkáňová transglutamináza 2
Th ₁ , Th ₂	pomocné T – lymfocyty

1. ÚVOD

Celiakální sprue je chronické autoimunitní onemocnění střevního traktu. V České republice se jeho prevalence odhaduje na 1:100. Antigenem pro spuštění patologické imunitní reakce je gluten – protein, který je součástí všech obilných zrn. Celiakie se manifestuje pouze u pacientů s určitými genetickými predispozicemi a mohou k ní být přidruženy i další autoimunitní choroby. Obvyklý věk pro diagnostiku tohoto onemocnění je doba, kdy do potravy přibývá lepek. To vedlo k mylné představě, že se jedná o onemocnění dětí, které v pubertě pomíjí. Nyní je však zřejmé, že u starších dětí a dospělých může probíhat i bez typických příznaků.

Zánětlivá reakce ve střevní sliznici redukuje vstřebávací plochu střeva. Epitel je poškozován zánětlivou reakcí a nestačí se obnovovat. Nezralé enterocyty nemají dostatečnou enzymovou výbavu a tak nedochází ke štěpení živin. Poškození této části tenkého střeva tedy vede k poruše štěpení a vstřebávání živin, což se projevuje malabsorpčním syndromem - MAS (hubnutí, u dětí neprospívání, anémie, osteoporóza). Nedostatečně natrávená potrava, která pokračuje do distální části trávicího traktu, může způsobovat sekundární příznaky choroby (průjem, nadýmání).

Diagnostika se v prvním stupni provádí stanovením autoprotilátek. Při jejich pozitivitě nebo u pacientů s trvajícím podezřením na MAS se přistupuje k odběru biopsie tenkého střeva. K základním histologickým vyšetřením patří hodnocení stupně atrofie sliznice a infiltrace epitelu lymfocyty, jež patří k typickému, ne však zcela specifickému histologickému obrazu celiakie. Toto hodnocení se skóruje tzv. Marshovou klasifikací, která však neodráží funkční stav sliznice a v některých případech může vést k mylné diagnóze. Přesnější způsob hodnocení rozsahu poškození sliznice a přesnější diagnostiku celiakie poskytuje komplexní histochemické vyšetření enzymů kartáčového lemu a dalších parametrů, které se provádí ze zmrazeného vzorku střevní sliznice. Diagnózu je nutné stanovit před podáním bezlepkové diety, která je jedinou a kauzální léčbou tohoto onemocnění. Po nasazení diety dochází v různé době k obnově reliéfu a diagnostika je pak obtížná.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Celiakální sprue

Celiakální sprue (CS), nebo také celiakie či gluten - senzitivní enteropatie patří mezi nejrozšířenější chronická onemocnění, postihující všechny věkové skupiny. Jak již bylo uvedeno, spouštěcím faktorem autoimunitní reakce je gluten. Mechanismus vzniku této patologické imunitní reakce byl již popsán. Jako u ostatních autoimunitních chorob, i u celiakie dochází k napadení struktur vlastního těla, zde střevní sliznice, vlastními imunitními buňkami a k tvorbě autoprotilátek. Etiologicky se tedy nejedná o alergii, jak někdy bývá mylně uváděno. Toto onemocnění nelze v současné době možné vyléčit a jedinou kauzální léčbou je bezpodmínečné dodržování bezlepkové diety.

Epidemiologické studie prováděné v Evropě, USA i dalších zemích poukázaly na vysokou prevalenci tohoto onemocnění. Díky zlepšení diagnostických metod – zejména průkazu autoprotilátek, bylo možné provést rozsáhlé screeningové studie s výsledným odhadem prevalence CS na 1:100, tedy u 1 % populace. U žen se vyskytuje 2 - 3x častěji než u mužů. ⁽¹⁾ Přes vysoký výskyt tohoto onemocnění v populaci je povědomí o této chorobě poměrně malé, léčeno bývá jen 10 % těchto pacientů a pacient dospěje ke své diagnóze často i po 10 letech táhlých nebo nespecifických příznaků. ⁽²⁾

CS je často diagnostikována ve věku 1 do 6 let, kdy je do stravy zaváděno větší množství lepku a projevuje se retardací růstu. U starších pacientů se jedná především o atypické příznaky, které také mohou maskovat základní onemocnění a diagnóza CS v pozdějším věku není výjimečná. ⁽³⁾

2.1.1. Genetika

Na genetické úrovni je vznik CS spojen s HLA antigeny II. třídy (Human Leukocyte Antigens), které nacházíme na antigen - prezentujících buňkách (APC). Za normálního stavu HLA antigeny II. třídy vážou peptidové fragmenty fagocytovaných exogenních antigenů a vystavují je na svém povrchu, aby mohly být identifikovány pomocnými T - lymfocyty (CD4). Tyto v případě potřeby spouští obrannou imunitní reakci. Vzhledem k tomu, že se tato práce nezabývá genetickým podkladem choroby, je tato kapitola jen stručným souhrnem. HLA II. třídy je na genetické úrovni kódován geny DQ, DR, DP. ^(1, 4 - 6) Silná asociace s CS byla prokázána u genu DQ a DR. Konkrétně u DQ2 genu (alely DQA1*05/DQB1*02), která se vyskytuje u cca 95 %, ostatní pacienti pak nesou variantu genu DQ8 (alely DQA1*03/DQB1*03), či jen jednu z rizikových DQ2 alel. ⁽⁷⁾ Jako screeningová metoda se toto vyšetření však použít nedá, protože rizikové alely nese asi 25 - 30 % populace a z tohoto počtu jen asi 3 - 5 % onemocní CS. ⁽⁸⁾ Spouštěcím faktorem u rozvoje CS se u predisponovaných osob může stát např. střevní viróza či těhotenství. ^(1,9)

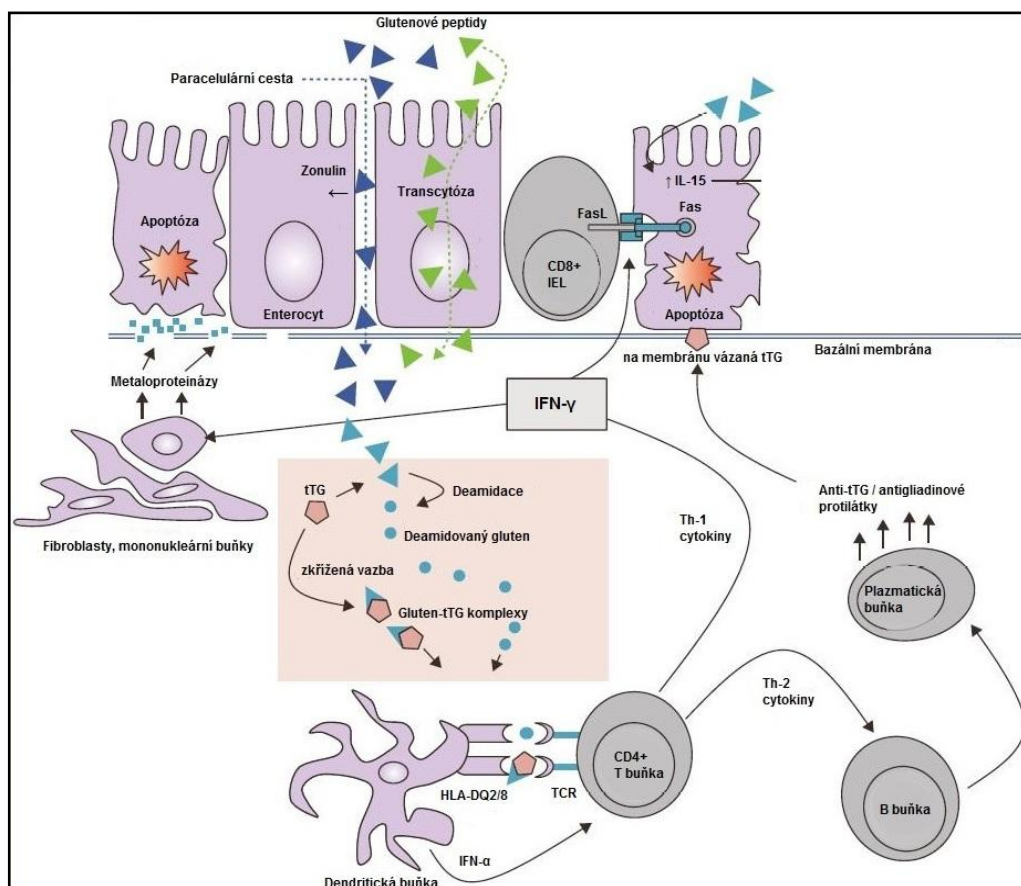
2.1.2. Lepek

Lepek – gluten je obsažen v povrchových částech všech obilných zrn a podle druhu obilniny se jeho frakce, která je odpovědná za vznik autoimunitní reakce, nazývá gliadin (pšenice), hordein (ječmen), sekalín (žito) a avenin (oves). Aveniny jsou některými celiaky snášeny dobře a proto se někdy jako vnější faktor neuvádí. Společným znakem těchto proteinů je vysoký obsah aminokyselin prolinu a glutaminu, rozpustnost v 70% alkoholu a společně se nazývají prolaminy. Přesný mechanismus působení lepku na střevní sliznici není zcela objasněn. Velice pravděpodobně dochází přes „glutensenzitivní“ APC ke spuštění imunologické kaskády, vedoucí k zánětlivé reakci. ⁽⁸⁾

2.1.3. Mechanismus vzniku zánětlivé reakce u celiakální sprue

Podstatou celiakální sprue je geneticky podmíněná porucha imunity sliznice tenkého střeva, spočívající v abnormální reakci na gluten. Za normálních okolností jsou polypeptidy štěpeny žaludečními peptidázami a pankreatickými enzymy. Kratší fragmenty peptidů jsou dále zpracovány peptidázami kartáčového lemu tenkého střeva. Díky vysokému obsahu prolinu a glutaminu v prolaminech, jsou tyto štěpitelné jen částečně. Vznikají peptidové fragmenty, které za určitých okolností se mohou stát spouštěčem zánětlivé autoimunitní reakce.

Zásadním enzymem, který hraje velkou roli v etiologii tohoto onemocnění je tkáňová transglutamináza 2 (tTG2) v lamina propria tenkého střeva. Je to intracelulární enzym, který lze najít v mnoha různých typech buněk. V tenkém střevě je součástí endomysia - obalu svalových vláken. Jeho fyziologická role je při reparačních procesech buněk. Je to ale enzym, který dokáže deamidovat glutaminy, bohatě zastoupené v glutenových peptidech. Existuje několik teorií, jakou cestou se peptidové fragmenty prolaminů dostanou do lamina propria, aby mohlo dojít k jejich deamidaci. Nejběžnější cestou je pravděpodobně transytóza nebo paracelulárním transportem, kdy u predisponovaných osob po destruktivním střevním onemocnění (rotaviry, *Campylobacter...*) dochází ve střevní sliznici k rozvolnění mezibuněčných spojů (zonulae occludentes) a díky tomu jsou tyto prostory prostupné pro větší molekuly. ^(1, 10)



Vysvětlivky: Fas Ligand (transmembránový protein typu II), Fas receptor (transmembránový protein typu I), IL (interleukin), CD4+, CD8+ (znaky na T - buňkách), INF (Interferon), TCR (receptor na povrchu T - buněk), HLA - DQ2/8 (molekulové produkty třídy II), Th - 1, 2 cytokiny (imunitní odpověď pro regulaci cytokinů).

Obr. 1: Schéma patogeneze CS (upraveno dle 1)

V lamina propria jsou gliadinové peptidy deamidovány tTG2. Deamidace vede ke zvýšení afinity k HLA DQ2 či 8 na APC. Dalším dějem, ke kterému dochází při kontaktu lepku a tTG2 je transaminace. Při té se navazuje peptidový fragment glutenu na nějaký volný protein – zde slouží tTG2 nebo endomysium a vytváří se tak další potenciální „cizí“ antigen, vhodný pro rozpoznání HLA receptorem „glutensenzitivní“ APC. APC předkládá „cizí“ antigen CD4+ T - lymfocytům, což vede k produkci cytokinů a klonální expanzi B - lymfocytů s přeměnou na plazmatické buňky produkující IgA a IgG protilátky zejména proti gliadinu, tTG2 a endomysiu (EMA). Dalším zásadním jevem je aktivace CD8+ T - lymfocytů (zejména jejich $\gamma\delta$ frakce), vymezených mezi enterocyty.

Jsou to tzv. intraepiteliální lymfocyty (IEL). Tyto cytotoxické buňky zmnožují svůj počet a jejich aktivace vede k destrukci enterocytů spuštěním apoptotické kaskády, viz. obr. 1. ⁽¹⁾

Je jasné, že zánětlivá reakce tohoto typu vede z hlediska mikroskopické diagnózy k destrukci střevní sliznice v podobě snížení klků a změně jejich poměru k hloubce krypt, nedostatečnému dozrávání enterocytů, které nemají dostatečnou enzymovou výbavu. Často je přítomen edém. Zvýšení počtu IEL bylo již zmíněno. Redukce plochy střevní sliznice vede k malabsorpci (viz. kap. 2.1.4.). Odstranění lepku z potravy pak tuto kaskádu pozastavuje. Potom dochází k obnově rovnováhy imunitního systému a k remisi onemocnění. Při opětovném podání lepku ve stravě však znovu nastartuje imunitní systém zánětlivou reakci a proto není možné celiakii léčit jinak než přísnou bezlepkovou dietou.

2.1.4. Klinické projevy onemocnění

Specifickým znakem tohoto střevního onemocnění je přítomnost snížené vstřebávací plochy. Enterocyty za normálních okolností dozrávají postupně přechodem z Lieberkühnových krypt směrem k apexu klků. Tento proces trvá cca 5 - 7 dní. Rychlá obnova enterocytárního lemu vede k nedostatečnému dozrávání enterocytů. Zánětlivý proces jim nedovolí dosáhnout zralosti včetně plné enzymové výbavy kartáčového lemu (disacharidázy, aminopeptidázy, nukleosidázy, alkalická fosfatáza) ani schopnosti procesovat již tak omezené množství živin (hydrolyza di- a tripeptidů, resyntéza triacylglycerolů). To vše vede k malabsorpci všech živin, ale i vitamínů či minerálů. Posun nedostatečně natrávené stravy do distální části GIT může vést k průjmům a nadýmání. Poškození sliznice může být pouze fokální a tak ne u všech pacientů můžeme pozorovat střevní příznaky.

Příznaky provázející toto onemocnění mohou být střevní a mimostřevní. Liší se u dětí a dospělých. U malých dětí obvykle přetrvávají střevní symptomy: ubývání na váze, nechutenství, nadýmání, zvracení, zácpa, kolikovitá bolest břicha a větší nafouklé břicho.

Tyto obtíže mají období exacerbací a remisí. Objevují se průjmy s objemnou mastnou stolicí. ⁽¹¹⁾ Tyto děti neprospívají, může se objevit anémie (nedostatek vitamínu B₁₂ nebo železa) a zvýšená dráždivost. ⁽¹²⁾

U starších dětí a adolescentů se jedná spíše o retardace růstu, opoždění puberty, únava, neurologické potíže a anémie. ⁽¹³⁾ Dospělý mohou trpět gastrointestinálními i mimostřevními příznaky. Většinou se onemocnění manifestuje mezi 30 - 40 rokem a zpravidla následuje po nějaké zátěžové situaci (gravidita, laktace, infekce, operace...). Typickými gastrointestinálními znaky patří: porušená resorpce všech základních živin způsobené deficitem střevní laktázy a dalších disacharidáz, který se projevuje pocitem plnosti v dutině břišní a meteorismem, i zde může být objemná mastná stolice, ztráta na váze, abdominální bolesti, dyspepsie. Pacienti ale také mohou trpět v době diagnózy častými zácpami. Střevní příznaky mívá ale jen cca 43 % pacientů. ⁽³⁾

Mimostřevní příznaky jsou mnohem častější. Nedostatek vitamínu D a minerálů (vápník, železo, hořčík) se projevuje pocitem únavy, bolestí kostí, kloubů, zvýšenou kazivostí zubů a gingivitidami, lomivostí nehtů, suchou šupinatou kůží a alopecií, u obou pohlaví vzniká osteoporóza dříve než u ostatní populace. U žen bývá porucha menstruačního cyklu, u obou pohlaví infertilita či poruchy centrálního a periferního systému (křeče, psychické problémy, migrény). ^(12, 14 - 15) U všech pacientů se mohou vyskytovat jen některé ze jmenovaných příznaků a proto bývá diagnostika velice obtížná. Po nasazení bezlepkové diety problémy ustupují a pacienti obvykle z tohoto pohledu cítí úlevu.

Z laboratorního hlediska je prokázána: snížená plazmatická koncentrace bílkovin (hypoalbuminémie, hypoproteinémie), snížená koncentrace cholesterolu a žlučových kyselin, snížená hladina minerálů: Na, K, Cl, Fe, Mg a vitamínu: B₁₂, karotenu. Porucha koagulace, anémie, zvýšená koncentrace aminotransferáz a alkalické fosfatázy. ^(14, 16)

2.1.4.1. Formy CS

V současné době se popisuje pět forem. ⁽²⁾ Liší se příznaky typickými, mimostřevními nebo je zcela bez příznaků. Důležitou roli hraje rodinná anamnéza. Všechny formy mají specifický histologický obraz střešní biopsie – zvýšený počet IEL a pozitivitu protilátek proti tTG2 a EMA.

- Forma klasická: jde o aktivní formu, typický mikroskopický obraz subtotální až totální atrofie, zvýšený počet IEL. Pacient trpí střešními i mimostřešními příznaky.
- Forma subklinická: je aktivní forma nemoci avšak s převažujícími mimostřešními příznaky. Histologický obraz je shodný s klasickou formou. Tato forma se obvykle těžko diagnostikuje.
- Forma silentní: je tichá forma CS, která se neprojevuje žádnými příznaky. Biopsický nález je shodný s klasickou formou nemoci. U těchto pacientů se často objevuje pozitivní rodinná anamnéza a jsou diagnostikováni jako příbuzní pacienta s diagnostikovanou CS. Může se také jednat o náhodný nález změn v duodenu při gastrokopii či screeningovém vyšetření séra. Většina pacientů si ale později uvědomí přítomnost některých klasických nebo mimostřešních příznaků, např. v dětství, u kterých se nevěnovalo dostatek pozornosti.
- Forma latentní: jde o skrytou formu CS, tato forma je bez příznaků s normálním nálezem při biopsickém vyšetření, ale se zvýšeným počtem IEL. Jedná se o dříve diagnostikované pacienty s celiakií s příznivou odpovědí na bezlepkovou dietu nebo osoby, u kterých se celiakie může teprve rozvinout.
- Forma potenciální: Forma CS bez klinických příznaků, bez přítomnosti poškození epitelu střeva, bez zvýšení IEL, nemusí být přítomny protilátky. Někdy se jejich vyšší titr najde jen ojediněle a další odběr již zvýšení neukazuje. Tato forma je spojena s genetickou predispozicí, zejména HLA DQ2 a imunologickými abnormalitami. ^(17 - 18)

2.1.4.2. Malabsorpční syndrom

Malabsorpční syndrom (MAS) je stav, při kterém dochází k poruše trávení, vstřebávání základních živin a některých vitamínů, např. folátů. Primární MAS je charakterizován jako porucha funkce enterocytů. A to buď jako defekt globální – porušení vstřebávání všech živin, defekt parciální – blokáda resorpce a štěpení určité látky v potravě (např. laktázy) nebo molekulární defekt.

Sekundární MAS je popisován u funkčních poruch různých orgánů GIT, této práce se netýká a dále se jím nezabývá. CS se řadí do skupiny primárních MAS.

Deficit disacharidáz lokalizovaných v kartáčovém lemu enterocytů může být vzácně vrozený nebo získaný. Nejčastější je deficit enzymu laktázy, jehož přítomnost směrem k dospělosti přirozeně klesá. Tento deficit se projevuje jako nesnášenlivost mléka tzv. laktózovou intolerancí.⁽¹²⁾ Získaný deficit enzymu v přechodném nebo trvalém stavu může vzniknout např. po léčbě jiného onemocnění (chemoterapeutika) nebo bakteriálními či virovými infekcemi.⁽¹⁹⁾ Po těchto stavech může dojít k obnově funkce tohoto enzymu. Jako terapie slouží vysazení potravin obsahující laktózu.⁽¹²⁾ Laktóza (mléčný cukr) není v tenkém střevě dostatečně hydrolyzována a pokračuje do distálních částí GIT, kde je zpracována střevní mikroflórou za vzniku množství plynů (H₂) – což vede k meteorismu a flatulenci. Gradient laktózy váže vodu a způsobuje průjmy.⁽²⁰⁾

MAS může být i kombinovaným defektem disacharidáz (laktáza, sacharáza, trehaláza a další). Izolované deficity sacharázy nebo trehalázy jsou poměrně vzácné. Při snížení aktivity těchto enzymů může docházet k problémům s trávením větších množství sacharázy nebo trehalózy (houby). Potíže, které pacient udává, jsou většinou shodné se selektivní alaktázií, avšak obvykle mírnější. Histologický nález u těchto pacientů bývá normální.^(12, 21)

2.1.5. Asociovaná onemocnění a komplikace u celiakální sprue

Vzhledem k tomu, že je CS geneticky podmíněnou nemocí, bývá sdružena s jinými autoimunitními chorobami. Tato asociace nebyla zatím objasněna. Mezi onemocnění, která doprovází CS, patří zejména jiné autoimunitní choroby. Nejčastěji Duhringova herpetiformní dermatitida (chronická kožní vyrážka, ustupující po nasazení bezlepkové diety s typickou lokalizací), diabetes mellitus I. typu a autoimunitní thyreoiditida. K dalším potom patří autoimunitní hepatitida, IgA nefropatie či Sjörgenův syndrom (chronický destruktivní zánět exokrinních žláz). Z neautoimunitních chorob se pak jedná o selektivní deficit IgA, metabolickou osteopatii, mikrocytární anémii, polyneuropatii, různé myopatie, Downův syndrom, Turnerův syndrom a další.

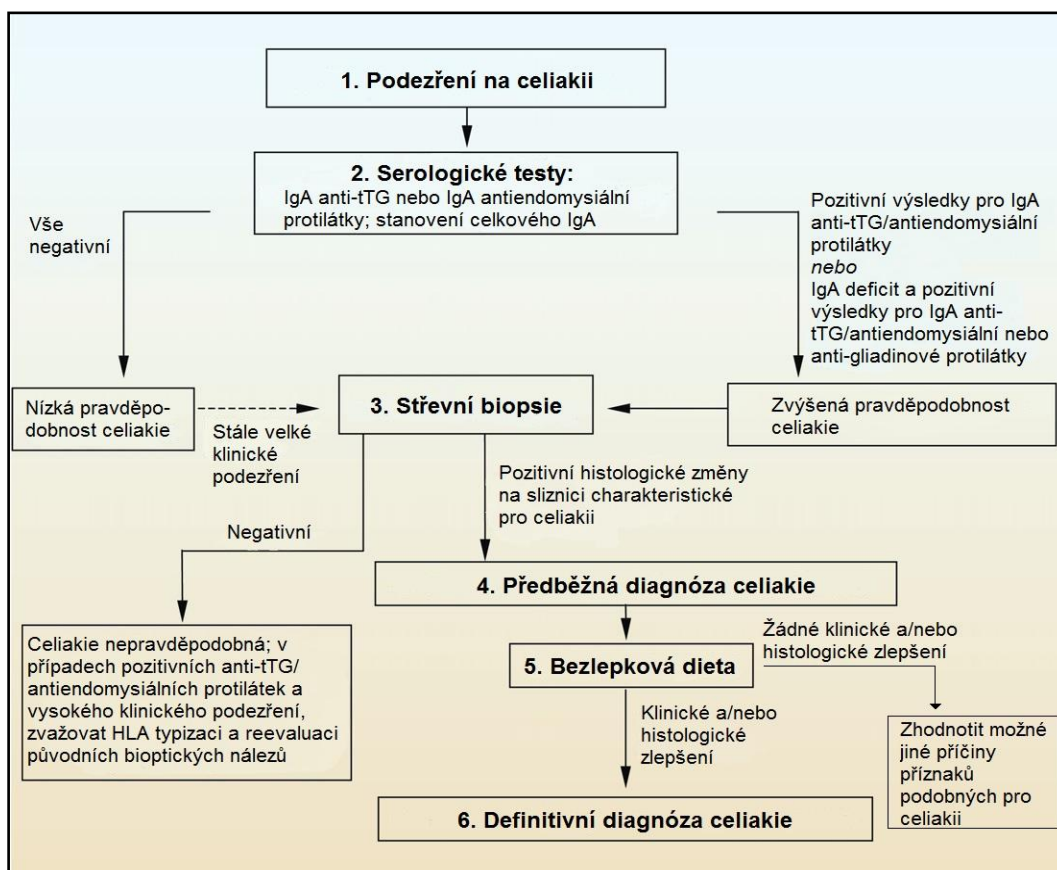
U mužů dochází k poklesu konverze testosteronu a snížené plodnosti. U žen v těhotenství nadměrný výskyt anémií, nízká porodní hmotnost plodu, předčasný porod či krátká doba laktace.

U pacientů postižených těmito onemocněními by se mělo pamatovat na CS a provést u nich screening protilátek, případně biopsii tenkého střeva. ^(1 - 2, 22) Tyto odchylky jsou reverzibilní a po zavedení bezlepkové diety do několika měsíců ustupují. ⁽²³⁾

V souvislosti s celiakií se vyskytuje i tzv. refrakterní sprue. Je to stav, kdy po dobrém efektu bezlepkové diety dojde k relapsu příznaků i mikroskopického nálezu a protilátek v séru. U takových pacientů je nutné zahájit medikamentózní léčbu kortikoidní terapií. Starší pacienti (> 50 let) s dlouhodobě neléčenou CS nebo s refrakterní CS mají vyšší riziko vzniku adenokarcinomů či T - buněčného lymfomu z frakce IEL – Enteropathy Associated T - Lymphoma – EATL. ^(12, 20)

2.2. Diagnostika celiakální sprue

Diagnostické schéma (obr. 2), které se u celiakie doporučuje, zahrnuje anamnézu, sérologické vyšetření na autoprotiátky a střevní biopsii s popsáním typickým nálezem. Diagnóza se musí stanovovat při plném zatížení lepkiem, aby vyšetření nebylo zkresleno.



Obr. 2: Schéma diagnostického algoritmu vyšetření při podezření na celiakii podle doporučení společnosti ESPGAN. (upraveno dle 24)

2.2.1. Vyšetření protilátek

V současné době jsou sérologické metody stanovení protilátek zaměřeny na stanovení anti - tTG2 a anti - EMA protilátek. Dříve bylo využíváno ještě stanovení anti - gliadinových protilátek, ale vzhledem k jejich nízké specificitě a senzitivitě se z jejich používání pro diagnostiku CS upouští.

Zároveň se sérologickým vyšetřením by se měla stanovit hladina celkového IgA, protože s CS bývá asociován selektivní deficit IgA. Detekce autoprotlátek proti tTG2 se z tohoto důvodu provádí ve třídě IgA i IgG metodou ELISA. Toto vyšetření je vysoce senzitivní a poměrně specifické.

Vyšší hladiny však mohou být i u jiných střevních poruch, u kterých dochází k narušení integrity střevního povrchu (střevní infekce, m. Crohn, apod.). Druhým vysoce specifickým vyšetřením je vyšetření protilátek proti endomysiu – EMA. Toto vyšetření se provádí pouze ve třídě IgA na tkáňovém řezu opičího jícnu imunofluorescencí. Senzitivita je u EMA nižší, ale pozitivní výsledek kombinace markerů anti - tTG2 a anti - EMA je vysoce citlivým a specifickým nálezem typickým pro CS. Negativní výsledek tohoto vyšetření CS téměř vylučuje. ⁽²⁵⁾

Hladina titru protilátek se používá i pro monitoring dodržování bezlepkové diety stanovuje se dále pravidelně, zpravidla po půl roce. Slouží ke kontrole compliance pacienta a v neposlední řadě k odhalení refrakterní celiakální sprue. ⁽²⁶⁾

Sérologické vyšetření krve ovšem k potvrzení celiakie nepostačuje a pouze na jeho základě tedy diagnózu stanovit nelze. Při pozitivitě protilátek je nutné provést biopsii střevní sliznice.

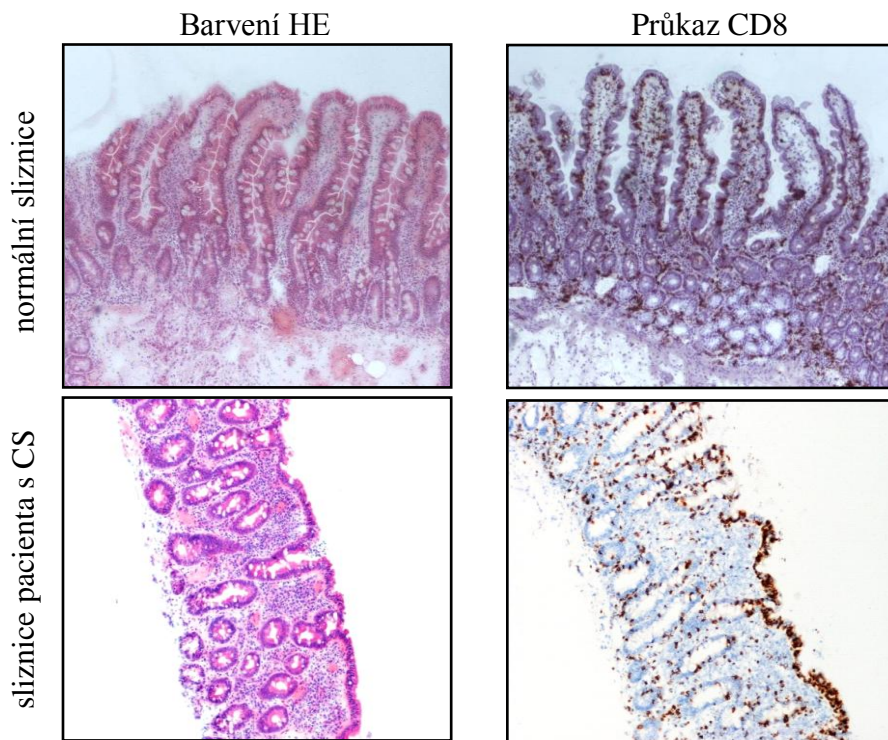
2.2.2. Bioptické vyšetření

Rozhodující metodou pro definitivní diagnózu je následná enterobiopsie. Ta se u dospělých provádí obvykle při gastrokopii z distální části duodena, u dětí pak kapslí, protože odběr není tak traumatizující. Odběr vzorku se provádí v době, kdy pacient konzumuje stravu s lepem. ⁽²⁷⁾ Při odběru se doporučuje odeslat na vyšetření alespoň dva, lépe však více vzorků, protože jak již bylo uvedeno, CS se někdy na sliznici prezentuje ve fokusech.

2.2.2.1. Základní histologické vyšetření

Základním vyšetřením v histologii je vzorek fixovaný ve formolu, který se po zalití do parafínu krájí na tenké řezy a barví metodou Hematoxylin - eosin (HE). Z barvení HE se hodnotí reliéf sliznice, poměr klků a krypt, známky zánětu v lamina propria. Sliznice pacienta s celiakií vykazuje alteraci reliéfu – snížení až vymizení klků, prohloubení krypt a zánětlivý infiltrát v proprii, viz. obr. 3.

Jako základní metodu při histologickém zpracování vzorku pro diagnostiku CS se imunohistochemická typizace CD8+ T - lymfocytů, ze které je stanoven počet IEL, viz. obr. 3. Jako norma byl stanoven počet 40 IEL na 100 enterocytů. Tato norma se ale nedá u hraničních nálezů přesně dodržovat a je nutné přihlížet i k ostatním parametrům vyšetření. ⁽²¹⁾



Obr. 3: Barvení HE a imunohistochemický průkaz CD8 lymfocytů u pacienta s normálním nálezem a pacienta s CS. Zvětšeno 40x.

Údaj o reliéfu a počet IEL dávají dohromady cennou informaci o stavu reliéfu ve vztahu k CS a jsou hodnoceny tzv. Marshovou klasifikací (viz. tab. 1).

Tab. 1: Hodnocení stádií CS Marshovou klasifikací

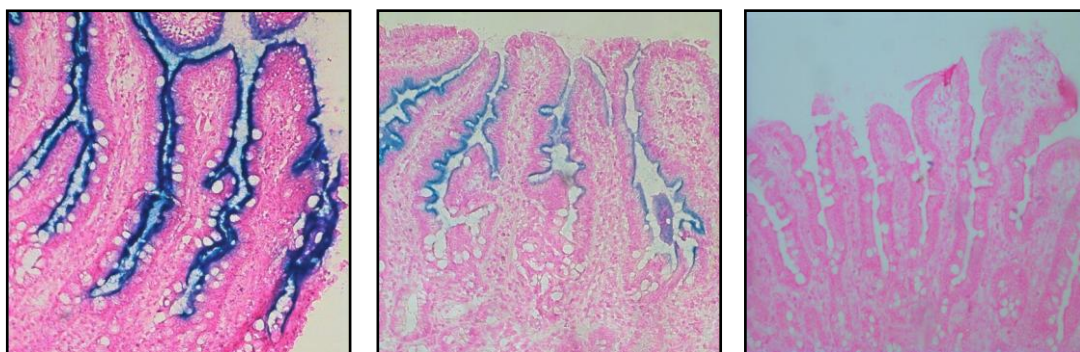
MARSH	Počet IEL	Reliéf sliznice
0	IEL < 40	Nezměněn (dlouhé, štíhlé klky)
1 (infiltrativní typ)	IEL > 40	Normální struktura sliznice, není výrazná celulizace stromatu
2 (hyperplastický typ)	IEL > 40	Hyperplazie krypt, snížení klků a krypt, lymfocytární infiltrace stromatu
3 (destruktivní typ)	IEL > 40	Mírná, výrazná až totální atrofie klků, zvýšený počet IEL, chronické zánětlivé změny proprie
4	IEL < 40	Úplné vyhlazení slizničního reliéfu, nezvýšený počet IEL s těžkou zánětlivou celulizací.

2.2.2.2. Histochemické vyšetření

Histochemické vyšetření je cíleno na průkaz enzymové aktivity ve vzorku střevní sliznice. Aby bylo toto vyšetření možné, je nutné zachovat enzymovou aktivitu ve tkáni. Toho se dosahuje rychlým, hlubokým zmražením ihned po odběru biopsie. Kromě odlišného zpracování tkáně, které se i následně děje při nízkých teplotách (viz. kap. 3.2.1.) se s řezy zachází stejně jako s řezy fixovanými formolem. Zpracovávají se běžnými histologickými a imunohistochemickými metodami (HE, CD8), ale je možné z nich přesněji určit funkční stav sliznice. Aktivita enzymu se zde prokazuje strukturálně vázaná.

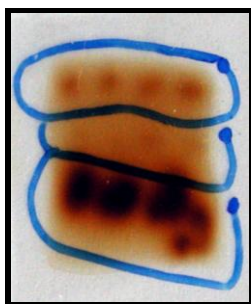
Nejdůležitějším laboratorním vyšetřením používaným při diagnostice CS je zejména stanovení aktivity disacharidáz a také peptidáz, které jsou lokalizovány v kartáčovém lemu enterocytů. Histochemický průkaz disacharidáz a peptidáz nevyžaduje mnoho materiálu, současně posoudí morfologický obraz a u většiny metod i lokalizaci enzymové aktivity na intracelulární úrovni. Jejich deficit ve střevní sliznici je příčinou malabsorpce disacharidů, které se vstřebávají z potravy a jsou štěpeny na monosacharidy. ⁽²⁸⁾ Tato práce se zabývá stanovením disacharidáz laktázy a trehalázy. Jako zástupce peptidáz kartáčového lemu bude dále popsána dipeptidylpeptidáza IV (DPP IV).

Laktáza – štěpí laktózu a jak již bylo popsáno (kap. 2.1.4.2.) laktóza je mléčný cukr, skládá se z jedné molekuly glukózy a jedné molekuly galaktózy, spojené β -1,4 vazbou. Laktóza se vyskytuje ve všech nekvašených mléčných produktech. Výhodou hodnocení aktivity laktázy je možnost její lokalizace v kartáčovém lemu a semikvantitativní hodnocení v procentech v porovnání s kontrolou, obr. 4. Nevýhodou je její častý, byť i částečný deficit u dospělých osob.



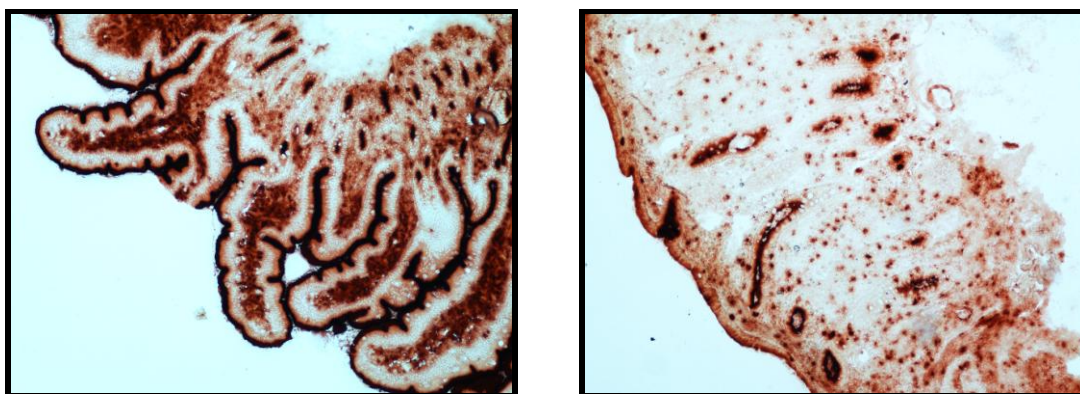
Obr. 4: Mikroskopické hodnocení aktivity laktázy ve vzorcích střevní sliznice. Zleva: pacient s 100% aktivitou laktázy, s 50% aktivitou laktázy a pacient s úplnou alaktázií.

Trehaláza – štěpí trehalózu, cukr tvořený dvěma molekulami glukózy spojené vazbou 1,1 a který je součástí např. stěny hub. Oba tyto enzymy se jeví jako citlivé markery poškození sliznice a oba se jako první obnovují svojí aktivitu při remisi onemocnění a oba se vyskytují pouze v kartáčovém lemu. ⁽²¹⁾ Výhodou stanovení aktivity trehalázy je její velmi vzácný izolovaný deficit a proto téměř nedochází k vymizení aktivity u jiných než závažných střevních onemocnění. Nevýhodou je difuze substrátu pro vizualizační krok reakce a nemožnost hodnocení mikroskopicky. Avšak i tato metoda se semikvantitativně hodnotí v porovnání s kontrolou, obr. 5. ⁽²¹⁾



Obr. 5: Makroskopické hodnocení aktivity trehalázy ve vzorcích střevní sliznice. První řádek pacient s 10% aktivitou trehalázy, druhý řádek 0% aktivitou trehalázy, třetí řádek 100% aktivita trehalázy.

DPP IV – je prolinová endopeptidáza, která není příliš specifická, sama o sobě štěpí na 62 různých substrátů. ⁽²⁹⁾ Byla vybrána pro demonstraci změny aktivity peptidáz kartáčového lemu u CS. DPP IV je přítomna v mnoha různých buňkách. Kromě kartáčového lemu se nachází i v T - lymfocytech, buňkách lamina propria (obr. 6) a její vyšší výskyt byl také prokázán v určitých typech nádorů. ⁽³⁰⁾ Aktivita tohoto enzymu u CS klesá pomaleji než aktivity disacharidáz. Její význam spočívá při remisi onemocnění, neboť její aktivita se plně obnovuje až po delším dodržování bezlepkové diety. Zajímavým poznatkem u CS je snížení až vymizení aktivity DPP IV v proprii u CS, ale i dalších autoimunitních onemocnění (DM I.typu, m. Crohn). ⁽²¹⁾



Obr. 6: Mikroskopické hodnocení aktivity DPP IV ve vzorcích střevní sliznice. Zleva: pacient s normální aktivitou DPP IV v kartáčovém lemu a pacient s CS s vymizením aktivity nejen v kartáčovém lemu, ale i v lamina propria.

2.3. Léčba celiakální sprue

Léčbou celiakální sprue je celoživotní bezlepková dieta zahrnující úplné a trvalé vyloučení lepku obsaženého v obilných surovinách (mouka, škrob, zrna - žito, pšenice, ječmen, oves). Po dobu bezlepkové diety se užívá kukuřice, brambory, amarant, rýže, sója, pohanka.

Na základě imunologického stanovení (AEA, atTG-A) ověřuje lékař správné dodržování bezlepkové diety. Bezlepková dieta je nezbytná i u atypických forem celiakální sprue, jejichčasné léčení je prevencí výskytu přidružených chorob a komplikací.⁽²⁰⁾

Prostřednictvím diety lze projevy celiakie úspěšně potlačit a předejít nebezpečným komplikacím. Bezpečná denní dávka glutenu < 50 mg. Po několika měsících bez lepku dochází až k úplné obnově střevní sliznice. Každý další kontakt však hrozí zhoršením stavu. Přísnou dietu je proto třeba dodržovat po celý život.

Potraviny jsou řazeny jako: zakázané, rizikové a povolené. Mezi zakázané potraviny se řadí: obiloviny - pšenice, ječmen, žito, oves, suroviny vyrobené z obilovin mouka, krupice, kroupy, krupky, lámanka, vločky, další výrobky z obilovin - pekařské a cukrářské, těstoviny, noky, knedlíky, strouhanka, kávovinová směs - caro, melta.

Rizikové potraviny: instantní pokrmy - polévky, omáčky, hotová jídla, kečupy, dresinky, majonézy, tatarské omáčky, kypřící prášky, paštiky, konzervy, bonbóny, čokolády, zmrzliny, dezerty, pivo. Povolené potraviny: rýže, brambory, kukuřice, pohanka, luštěniny, sója, tuhy, mléko, vejce, maso, zelenina, ovoce, víno.⁽²⁷⁾

Jestliže jsou přítomny opakované nebo trvalé příznaky u pacientů s celiakií, došlo k dietní chybě nebo nechtěné konzumaci stravy obsahující lepek.

Prognóza onemocnění je při včasné diagnostice a při dodržování bezlepkové diety velmi dobrá. Vývoj u dětí probíhá normálně. U dospělých se upravují funkce tenkého střeva, obnovuje se obvykle hormonální rovnováha a ustupují i další projevy celiakie.⁽³¹⁾ Přesto, že v současné době existují poměrně přesné nástroje k diagnostice tohoto onemocnění je nemoc poddiagnostikovaná a cesta ke správné diagnóze někdy trvá i více jak 10 let.⁽³⁾

3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1. Marshova klasifikace

Marshova klasifikace je prováděna ze základního histologického barvení hematoxylin - eosin. Z těchto preparátů byl zhodnocen stav sliznice (viz. tab. 1). Počet IEL byl hodnocen z preparátů značených protilátkou proti znaku CD8 na T - lymfocytech (viz. obr. 3). Pro účely této práce byly hodnoceny již hotové diagnostické preparáty pacientů.

3.2. Stanovení a hodnocení aktivity enzymů v bioptickém vzorku

Úkolem histochemického průkazu enzymů je lokalizovat jejich aktivitu – tedy lokalizovat funkční enzym. Jde o histocytochemické vyšetření, prováděné na kryostatových tkáňových řezech odebraných z distálního duodena nebo lépe proximálního jejunu.

Mezi hlavní faktory, které ovlivňují průběh histochemické reakce jsou: koncentrace substrátu, tloušťka řezu a doba inkubace. Kvalita strukturálního obrazu závisí na rychlosti zmrazení bioptické tkáně. Pro správnou aplikaci histochemické metodiky je třeba celkového dodržování laboratorního postupu od odběru vzorku až po zamontování bioptického preparátu. ⁽³²⁾ Po odběru musí být bioptické vzorky transportovány na suchém ledu do laboratoře. ⁽³³⁾

3.2.1. Zpracování bioptické tkáně

3.2.1.1. Pomůcky a přístroje

Kovová zmrazovací nádobka, kovové nosiče, termoska, kádinka 50 ml, pinzeta, kryostat, podložní skla, skleněná kyveta, tužka na popisování podložních skel.

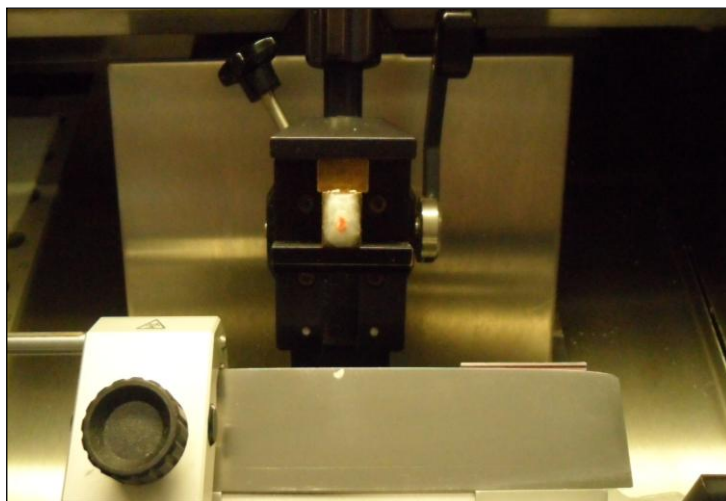
3.2.1.2. Chemikálie

Aceton, petroléter, nasekaný suchý led, destilovaná voda.

3.2.1.3. Odběr a příprava bioptického vzorku

Odběr probíhá na gastroenterologickém nebo endoskopickém oddělení. Nejlépe z několika míst se odebere sací sondou bioptická tkáň o velikosti 0,5 x 0,5 x 0,3 cm. Aby nedošlo k strukturálnímu poškození tkáně autolýzou je tkáň rychle a hluboce zmrazena v kádince s petroléterem, jenž je chlazený směsí acetonu a suchého ledu. Bioptický materiál je transportován v termoskách se suchým ledem do laboratoře.

V laboratoři je zpracování takového vzorku podmíněno použitím velmi nízkých teplot. Rozmražení má za následek destrukci tkáně. V kryostatu na suchém ledu se provede namražení vzorku na kovové nosiče, které se následně upínají do krájecí hlavy kryostatu. Namražený vzorek je nutné uchovávat nadále v hlubokomrazícím boxu. Bioptický vzorek se krájí na hlubokomrazícím kryostatu na řezy o síle 7 μm na běžná podložní skla, obr. 7.



Obr. 7: *Krájení enterobiopsie v hlubokomrazícím kryostatu*

3.2.2. Metoda průkazu enzymů

3.2.2.1. Pomůcky a přístroje

Pinzety, skleněné kyvety, odměrné válce (250 ml), Erlenmayerovy baňky (50 - 100 ml), automatické pipety (nastavitelné 300 - 1000 μ l a 1000 - 5000 μ l), jednorázové špičky na pipety, předvážky, analytické váhy, váženky, filtrační papíry, stopky, parafínový fix, vlhká komůrka, termostat, pH metr, pH papírky, krycí skla, mikroskop.

3.2.2.2. Zásobní roztoky

Chemikálie pro zásobní roztoky - Kyselina citronová, hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), ferrokyanid draselný $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, ferrikyanid draselný $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, paraformaldehyd, hydroxid sodný, jádrová červeň, síran hlinitý $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3]$, diaminobenzidin, trehalóza, bactoagar, chloroform, aceton, dihydrogenfosforečnan draselný dekahydrát, glycerin, fenol, želatina, destilovaná voda.

Příprava roztoků:

Citrátfosfátový pufr o pH 6 - 0,78 g kyseliny citronové; 4,51 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, doplní se do 100 ml destilovanou vodou. pH ověřit pH metrem.

Roztok 0,05M ferrykyanidu draselného – naváží se 1,05 g a doplní se v odměrné baňce do 50 ml destilovanou vodou.

Roztok 0,05M ferrokyanidu draselného draselného – naváží se 0,82 g a doplní se v odměrné baňce do 50 ml destilovanou vodou.

1N roztok NaOH – 4 g, se nasype do odměrné baňky a doplní se do 100 ml destilovanou vodou.

Fixační roztok 4% paraformaldehydu - ve vodní lázni se zahřívá směs 4 g paraformaldehydu a 96 ml destilované vody k tomu se pomalu přikapává 1N roztoku NaOH, dokud se paraformaldehyd nerozpustí.

Jádrová červeň (Kernecht - rot) - ve vodní lázni se zahřívá směs 1 g jádrové červeně; 5 g síranu hlinitého a 100 ml destilované vody. Směs se míchá až do rozpuštění. Po ochlazení se barvicí roztok zfiltruje.

4% roztok trehalózy - 4 g trehalózy se doplní do 100 ml destilovanou vodou.

1% roztok bactoagaru o pH 6,4 - 1 g bactoagaru se doplní do 100 ml destilovanou vodou, pH se zkontroluje pH papírkem.

0,2M fosfátový pufr o pH 7,2 - 5,01 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; 0,82 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ se doplní do 100 ml destilovanou vodou, pH se ověří pH metrem.

Montovací médium glycerin - želatina - 7 g želatiny se nechá bobtnat ve 42 ml destilované vody po dobu 2 hodin. Přidá se 40 ml glycerinu a 0,5 g fenolu. Ve vodní lázni se směs 15 min zahřívá. Horký roztok se přecedí přes gázu.

3.2.3. Průkaz a hodnocení aktivity laktázy

In vivo se disacharid laktóza hydrolyticky štěpí účinkem enzymu laktázy (β -D-galaktozid-galaktohydrolázy), který je lokalizován v kartáčovém lemu enterocytů, na monosacharidy D - galaktózu a D - glukózu. Jako substrát pro stimulaci přirozené reakce je použit 5-Br-4-Cl-3-indoxyl- β -D-fukosid. Po hydrolýze β -glykosidové vazby substrátu se uvolněný indoxyl oxiduje kyslíkem na modročerné indigo. Oxidace musí být rychlá, a proto se k inkubační tekutině přidává směs ferrikyanidu a ferrokyanidu draselného. Aktivita enzymu je tak v kartáčovém lemu znázorněna modročerně. Pokud je aktivita enzymu nízká, dochází k snížení sytosti barviva. Pokud aktivita laktázy v bioptickém vzorku zcela chybí, nedojde k obarvení vůbec. ^(32, 34)

Hodnocení se provádí pod světelným mikroskopem, při zvětšení 20x. Aktivita laktázy se hodnotí v procentech vůči kontrolnímu vzorku se 100% aktivitou laktázy.

3.2.3.1. Provedení reakce

Roztok A - 12 ml citrátfosfátového pufru o pH 6; 1 ml 0,05M $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ a 1 ml 0,05M $K_3[Fe(CN)_6]$.

Roztok B - 4 mg 5-Br-4-Cl-3-indoxyl- β -D-fukosidu se rozpustí v 0,3 ml dimethylformamidu.

Inkubační roztok se připraví smícháním zásobního roztoku A a roztoku B.

Sklo s řezy se vloží do inkubačního roztoku na 2 hod při 37 °C. Po uplynutí inkubační doby se řezy oplachují v destilované vodě. Následně se provádí fixace 10 min ve 4% paraformaldehydu a další praní v destilované vodě. Řezy se dobarví jádrovou červení po dobu 15 min a opláchnou v destilované vodě. Odvodní se v acetonu a projasní v xylenu. Z xylenu se montují do solakrylu.

3.2.4. Průkaz a hodnocení aktivity trehalázy

In vivo se disacharid trehalóza z potravy hydrolyticky štěpí účinkem enzymu trehalázy, který je lokalizován v kartáčovém lemu enterocytů na monosacharid D - glukózu. Metodou volby je zde metoda glukózaoxidáza - peroxidáza se substrátem 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochloridem (DAB).

Jako substrát pro prokazovaný enzym je použita trehalóza. Glukóza vzniklá štěpením trehalózy trehalázou je oxidována glukózaoxidázou na glukonolakton. Při této reakci vzniká ekvimolární množství peroxidu vodíku. Ten je zpracován peroxidázou, která katalyzuje reakci s DAB. Oxidací DAB vzniká nerozpustné hnědé stabilní zbarvení v místě reakce. ^(32, 34)

Hodnocení se provádí makroskopicky. Difuze glukózy v řezu nedovoluje hodnocení s přesnější lokalizací. Protože se ale enzym nachází pouze v kartáčovém lemu enterocytů, přesná lokalizace není k diagnostice nezbytně nutná. Aktivita trehalázy se posuzuje v procentech vůči kontrolnímu vzorku se 100% aktivitou trehalázy.

3.2.4.1. Provedení reakce

Roztok DAB - 2,5 mg diaminobenzidinu; 0,3 ml dimethylformamidu; 0,6 ml destilované vody a 2,8 ml citrátfosfátového pufru o pH 6.

Roztok E - 1 mg glukózaoxidázy; 0,3 mg peroxidázy; 1,2 ml citrátfosfátového pufru o pH 6

Inkubační roztok se připraví smícháním 0,5 ml roztoku DAB; 0,3 ml roztoku E; 0,5 ml 4% roztoku trehalózy a 1,6 ml roztoku 1% bactoagaru o pH 6,4.

Řezy se orámuji parafínovým fixem, aby inkubační roztok nestékal ze skla. Inkubační roztok se nakape na řezy a skla se vloží do vlhké komůrky a do termostatu na 2 hod při 37 °C. Následně se skla s řezy umístí do tmy a při laboratorní teplotě se nechají vysychat po dobu 24 h.

3.2.5. Průkaz a hodnocení aktivity dipeptidylpeptidázy IV

DPP IV je serinová peptidáza, která vyštěpuje dipeptidy za prolinem. Jako metoda volby je použita simultánní azokopulační reakce s diazoniovou solí. Jako substrát je použit glycyl-prolin-4-methoxy- β -naftylamid. DPP IV štěpí substrát za prolinem a uvolněný β -naftylamin dává azokopulační reakci s diazoniovou solí Fast Blue B červenohnědé azobarvivo. ^(32, 34)

Hodnocení se provádí pod světelným mikroskopem, při zvětšení 20x. Aktivita laktázy se hodnotí v procentech vůči kontrolnímu vzorku se 100% aktivitou laktázy.

3.2.5.1. Provedení reakce

Roztok substrátu - 3 mg glycyl-prolin-4-methoxy- β -naftylamidu a 1 ml dimethylformamidu.

Roztok Fast Blue B - 3 mg Fast Blue B, 5 ml 0,2M fosfátového pufru pH 7,2 a 5 ml destilované vody.

Inkubační roztok se připraví smícháním připraveného množství roztoku substrátu a roztoku Fast Blue B a přefiltruje se přes filtrační papír.

Řezy se fixují vychlazenou směsí chloroform - aceton 5 min při 4 °C. Při laboratorní teplotě se vysuší. Vloží se do inkubačního roztoku na 24 hod a inkubují při 4 °C. Následně se řezy vypírají v pramenité vodě po dobu 10 min a fixují se 4% paraformaldehydem 24 hod. Po postfixaci se skla oplachují v destilované vodě 10 min. Bioptický preparát se montuje do glycerin - želatiny. Hodnocení se provádí na škále, která byla pro tyto účely stanovena v Biolab Praha, (tab. 2).

Tab. 2: Hodnocení aktivity DPP IV v bioptických vzorcích

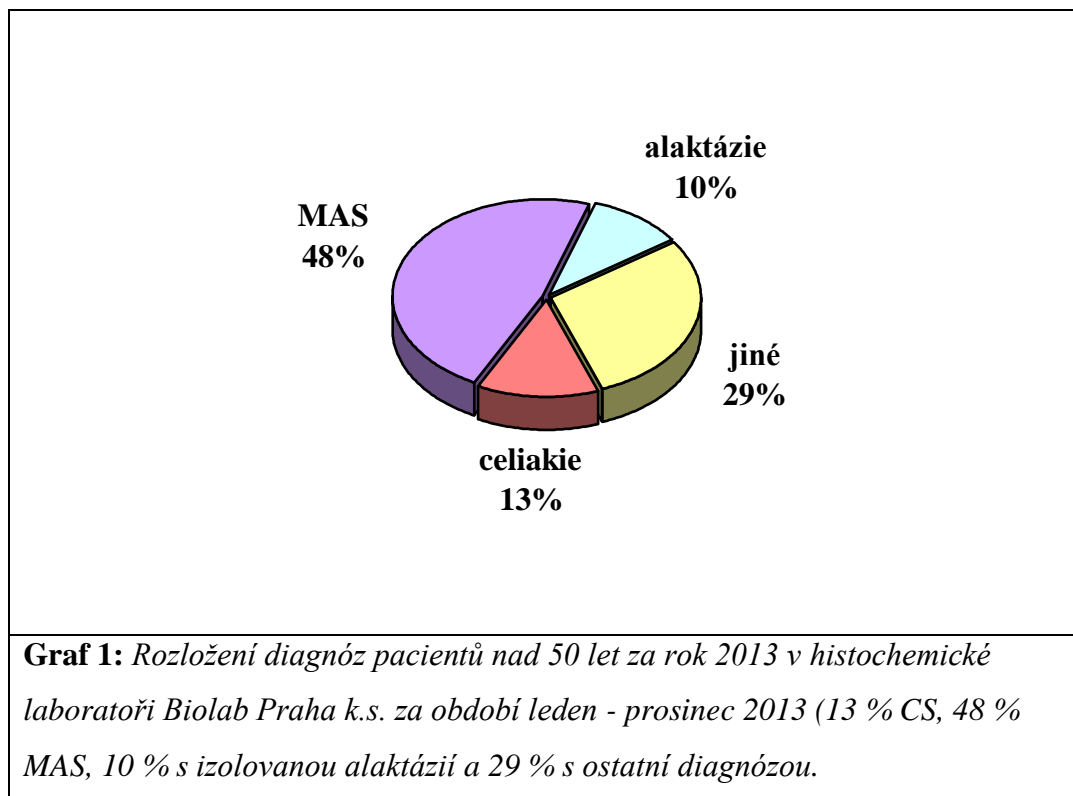
N	normální aktivita
S1	středně snížená aktivita
S2	snížená aktivita
S3	silně snížená aktivita
neg.	aktivita enzymu zcela chybí

4. VÝSLEDKY

4.1. Soubor vyšetřovaných pacientů

Retrospektivní analýza výsledků bioptických vzorků tenkého střeva přijatých za rok 2013 k histochemickému vyšetření do laboratoře Biolab Praha zahrnovala 691 bioptických vzorků. Tato práce se zaměřuje na pacienty starší 50 let. Z celkového počtu pacientů bylo 141 pacientů nad 50 let. Z tohoto souboru byla mikroskopická diagnóza celiakie určena u 19 pacientů (13 %). Tito pacienti byli dále podle získaných dat rozdělení na skupinu pacientů bez bezlepkové diety – 10 pacientů (7 %) a skupinu pacientů s bezlepkovou dietou – 9 pacientů (6 %). U všech pacientů byla hodnocena aktivita laktázy, trehalázy a DPP IV v kartáčovém lemu a Marshovo skóre. V grafu 1 je uvedeno rozložení diagnóz.

Celkově bylo přijato 19 pacientů (13 %) se závěrem CS, 67 pacientů (48 %) bylo uzavřeno jako MAS – kombinovaný defekt laktázy, sacharázy a v některých případech i trehalázy a 14 pacientů (10 %) mělo pouze izolovaný deficit laktázy. Do jednotky „jiná diagnóza“ je zahrnuto 41 pacientů (29 %) s normálním nálezem nebo nezávažným zánětlivým onemocněním (převážný výskyt chronické duodenitidy).



4.1.1. Výskyt nově diagnostikovaných případů celiakie u pacientů nad 50 let

Z celkového počtu 141 pacientů nad 50 let, nedodržujících bezpečnou dietu bylo nově diagnostikováno 8 pacientů s rozvinutou CS (6 %). Jednotlivé výsledky jsou uvedeny v tab. 3. U všech pacientů bylo zjevné typické poškození reliéfu se zmnožením IEL. Všichni pacienti s nově diagnostikovanou CS měli silně snížené až negativní aktivity stanovovaných enzymů kartáčového lemu. Pacient č. 5 je typickým příkladem vzorku s mezní hodnotou IEL. Z histochemického vyšetření je ale patrná silná alterace enzymů kartáčového lemu, která odpovídá CS. V tomto vzorku byl navíc přítomen těžký chronický neaktivní zánět, který také svědčí pro CS. Širší anamnéza u tohoto pacienta chyběla.

Pacient č. 12 s Marshovým skóre I je hraničním nálezem. Objektivně se jedná o alaktázi, částečně se zachovala aktivita trehalázy a nedotčena byla i aktivita DPP IV. Dalším nálezem byl těžký chronický neaktivní zánět v lamina propria.

U takových případů je vhodné posoudit i další parametry histochemického vyšetření, které nejsou ale součástí této práce. Klinicky se vyskytovaly pacientovy obtíže, zejména dyspepsie, protahované průjmy a celkové neprospívání. Hodnota autoprotilátek nebyla známa, proto bylo sérologické vyšetření doporučeno k definitivnímu určení diagnózy.

Tab. 3: Hodnocení aktivity enzymů (laktázy, trehalázy a DPP IV) a Marshovy klasifikace (reliéf sliznice a počet IEL) u pacientů nad 50 let s nově diagnostikovanou CS. Hodnocení probíhalo na souboru 141 pacientů nad 50 let věku bez dietních opatření.

Bioptický vzorek	Reliéf sliznice	Počet IEL	Marshova klasifikace	Aktivita enzymů kartáčového lemu			Bezlepková dieta
				laktáza (%)	trehaláza (%)	DPP IV	
vzorek č. 2	parciální	40	IIIa	10	40	S1	N
vzorek č. 5	parciální	35	IIIa	0	0	S2	N
vzorek č. 8	parciální	52	IIIa	0	0	S1	N
vzorek č. 9	parciální	43	IIIa	0	0	S1	N
vzorek č. 10	totální	48	IIIb	0	0	S2	N
vzorek č. 12	nepřavidelný	39	I	0	60	N	N
vzorek č. 13	parciální	41	IIIa	0	0	S2	N
vzorek č. 17	parciální	40	IIIa	0	10	S2	N
vzorek č. 18	totální	48	IIIb	0	0	S2	N

4.1.2. Změny na sliznici po bezlepkové dietě u pacientů nad 50 let

Z celkového počtu 141 pacientů nad 50 let, bylo ke kontrole remise odesláno 10 pacientů (7 %) dodržující bezlepkovou dietu pro předchozí diagnózu CS. Jednotlivé výsledky jsou uvedeny v tab. 4. Perzistující známky CS byly nalezeny u třech pacientů.

U všech bylo zjevné typické poškození reliéfu se zmnožením IEL, téměř shodné s nálezem v prvním odběru, kdy se diagnóza stanovovala. Měli silně snížené až negativní aktivity stanovovaných enzymů kartáčového lemu. U pacientů č. 3 a č. 15 byla dieta dodržována cca 8 měsíců, pacient č. 19 by měl dietu dle klinika dodržovat již dva roky, čemuž však nález zdaleka neodpovídá.

U pacientů č. 1, 6, 7, 11 a 14 nedošlo k úplné reparaci slizničního povrchu. Toto v praxi pozorujeme zejména u později diagnostikovaných pacientů s CS. Aktivita laktázy nemusí být 100% ani u zdravých jedinců. Pacienti č. 4 a 14 byli v kompletní remisi, s normalizací všech parametrů.

Tab. 4: Hodnocení aktivity enzymů (laktázy, trehalázy a DPP IV) a Marshovy klasifikace (reliéf sliznice a počet IEL) u pacientů nad 50 let s již dříve diagnostikovanou CS. Hodnocení probíhalo na souboru 141 pacientů nad 50 let věku dodržujících bezlepkovou dietu.

Bioptický vzorek	Reliéf sliznice	Počet IEL	Marshova klasifikace	Aktivita enzymů kartáčového lemu			Bezlepková dieta
				laktáza (%)	trehaláza (%)	DPP IV	
vzorek č. 1	nepřavidelný	20	-	0	60	S1	D
vzorek č. 3	parciální	31	IIIa	0	0	S2	D
vzorek č. 4	nepřavidelný	6	-	80	100	N	D
vzorek č. 6	nepřavidelný	24	-	10	10	N	D
vzorek č. 7	nepřavidelný	19	-	40	100	N	D
vzorek č. 11	nepřavidelný	36	I	0	10	S1	D
vzorek č. 14	nepřavidelný	22	-	0	100	N	D
vzorek č. 15	parciální	41	IIIa	0	0	S1	D
vzorek č. 16	nepřavidelný	18	-	80	100	N	D
vzorek č. 19	parciální	45	IIIa	0	0	S1	D

5. DISKUZE

Bakalářská práce se zabývá histochemickým vyšetřením střevních biopsií u pacientů nad 50 let s diagnostikovanou celiakií. Vyšetření je založeno na průkazu enzymové aktivity laktázy (aktivita byla znázorněna modročerně, v případě nízké aktivity došlo ke snížení sytosti barviva nebo úplně vymizela), trehalázy (aktivita byla prokázána nerozpustným hnědým stabilním zbarvením, jako jediná se hodnotila makroskopicky) a dipeptidylpeptidázy IV (její aktivita se prokázala červenohnědě). Všechny enzymy kartáčového lemu se při CS snižují, až zcela vymizí. U kombinovaných i selektivních MAS (deficit laktázy) se zpravidla nemění aktivita DPP IV, takže je možné je od CS lépe rozlišit.

Byla provedena retrospektivní analýza výsledků biopsických vzorků tenkého střeva přijatých za rok 2013 k histochemickému vyšetření do laboratoře Biolab Praha. Celkový počet vzorků byl 691, z tohoto počtu bylo 141 pacientů nad 50 let. U těchto pacientů bylo vysloveno klinickým lékařem podezření na CS či MAS. Pacienti trpěli obvykle nespecifickými příznaky. Některé žádanky nebyly dostatečně vyplněné a proto u některých pacientů nebylo známo sérologické vyšetření či celý rozsah klinických potíží pacienta. Zaměřila jsem se na pacienty s diagnózou celiakie, kterých bylo celkem 19 (13 %). Soubor zahrnoval pacienty s nově diagnostikovanou CS – 10 pacientů (7 %) a pacienty na bezlepkové dietě, kteří by měli být v remisi – 9 pacientů (6 %). I zde se potvrdil vyšší výskyt CS u žen než u mužů (15/5), (viz. kap. 2).

U všech pacientů byla hodnocena aktivita laktázy, trehalázy a DPP IV v kartáčovém lemu a Marshovo skóre. Histochemické vyšetření přesněji popisuje funkční stav sliznice, zejména u pacientů s hypolaktázií/alaktázií či kombinovanými defekty disacharidáz je velice přínosné. Histochemické vyšetření se u CS využívá zejména u případů, kde nestačí Marshovo skóre a dobře koreluje s dodržováním bezlepkové diety.

Věková skupina pacientů nad 50 let byla vybrána z důvodu vyšších rizik u nediodagnostikovaných celiaků. Jedná se hlavně o osteoporózu, anémii, apod. Dalším důvodem byl fakt, že diagnóza v tak pozdním věku může být spojena se zvýšeným rizikem malignit, (viz. kap. 2).

Zajímavým nálezem k diskuzi je pacient č. 5. Nově diagnostikovaný pacient je typickým příkladem mezní hodnoty IEL (norma do 40 IEL/100 enterocytů), (viz. kap. 2). U takových případů je vhodné toto histochemické vyšetření, které jemněji rozliší stav sliznice. Pokud by měl patolog k dispozici jen hodnocení Marshovým skóre, mohl by mylně uzavřít jako nespecifický zánět, protože u tohoto pacienta nebylo v době histopatologické diagnózy dostatek informací o sérologickém vyšetření a anamnéze.

U pacientů na bezlepkové dietě, kterým se nález nijak nezlepšil, je nasnadě otázka o správném dodržování bezlepkové diety. Tato dieta je finančně velice náročná, potraviny stojí i desetinásobek běžných potravin s lepkem. Výběr se může zejména ze začátku dietního opatření zdát velmi omezený a nemocný je nucen zcela změnit stravovací návyky. Starší pacienti s CS mohou být ohroženi tzv. refrakterní sprue, která je charakterizována exacerbací onemocnění přes dodržování přísné diety a také zvýšeným výskytem malignit střevního traktu. ^(35 - 36) U pacientů dodržujících dietu s nálezem vyhlazené sliznice je vždy na místě myslet i na tato onemocnění. Úplné obnovení sliznice vyžaduje déle než 12 měsíců, proto případná kontrolní biopsie je vhodná až po delší době. S věkem se navíc reparační schopnosti střeva pacientů zhoršují, což nemusí vždy vést i přes klinickou remisi k úplné obnově enzymové výbavy kartáčového lemu. ⁽²¹⁾

Pravidelným sérologickým monitorováním pacienta se posoudí správné dodržování bezlepkové diety. Při zvýšení sérologických markerů je vhodné odebrat střevní biopsii a vyšetřit histochemicky stav sliznice.

6. ZÁVĚR

Celiakální sprue je chronické autoimunitní poškození střevní sliznice způsobující redukci vstřebávací plochy vedoucí k malabsorpci všech živin, vitamínů a minerálů. Při nedostatečně natrávené stravě dochází zejména k prufuzním průjmům, nadýmání a ubývání na váze nebo se projevuje zcela asymptomaticky. Onemocnění postihuje všechny věkové skupiny. Tato práce byla zaměřena na průkazu enzymatické aktivity laktázy, trehalázy a dipeptidylpeptidázy IV (DPP IV). Vyhodnocen byl soubor pacientů nad 50 let za rok 2013 s diagnózou CS a to jak před dietou tak po ní.

Kombinací klasického Marshova skórování a histochemického vyšetření se přesněji odlišují nálezy s nespecifickými změnami (MAS, alaktázie) a různých stádií CS (v rozvoji, aktivní CS i remise).

Všichni pacienti s nově diagnostikovanou CS vykazovali změny na sliznici: těžký deficit laktázy, trehalázy a snížení DPP IV v kartáčovém lemu enterocytů. Marshovým skóre se klasifikoval destruktivní typ stupeň III. Jeden pacient neměl tak zásadní poškození povrchu sliznice (Marsh I), ale histochemickým vyšetřením u něj byla CS potvrzena. U pacientů dodržujících bezlepkovou dietu bylo 7 z 10 pacientů v remisi, což odpovídalo i výsledkům histochemického vyšetření. Enzymová výbava enterocytů byla u většiny z nich obnovena. U těchto pacientů nemusí dojít k úplné obnově aktivity laktázy, neboť tato nemusí být fyziologicky přítomna ani u zdravých jedinců. U tří pacientů byly nalezeny typické známky CS (nízká aktivita enzymů, nepravidelný reliéf a zvýšený počet IEL). Známky maligního EATL nebo refrakterní sprue u nich nebyly prokázány a to vede ke skutečnosti, že pacienti s největší pravděpodobností nedodržují dietu bezpodmínečně.

Histochemické vyšetření je přínosným doplňujícím vyšetřením pro verifikaci diagnózy CS a to jak v raných fázích, tak v remisi a k odlišení typu MAS, protože dobře monitoruje funkční stav sliznice.

7. SEZNAM LITERATURY

- 1) DI SABATINO, A. - CORAZZA, G.R. Coeliac disease. *The Lancet*, 2009, roč. 373, č. 9673, s. 1480 – 1493.
- 2) KOHOUT, P. Diagnostika a léčba celiakie. *Interní medicína pro praxi*, 2006, roč. 8, č. 7, s. 324 - 326.
- 3) LEBENTHAL, E. - SHTEYER, E. - BRANSKI, D. The changing clinical presentation of celiac disease. *Frontiers in celiac disease*, 2008, roč. 12, s. 18 - 22.
- 4) HOŘEJŠÍ, V. - BARTŮŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. 3. vyd. Praha: Triton, 2005. 279 s. ISBN 80-7254-686-4.
- 5) SCHUPPAN, D. - JUNKER, Y. - BARISANI, D. Celiac disease: From pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology*, 2009, roč. 137, č. 6, s. 1912 - 1933.
- 6) HEAP, G.A. - VAN HEEL, D.A. Genetics and pathogenesis of coeliac disease. *Seminars in Immunology*, 2009, roč. 21, č. 6, s. 346 - 354.
- 7) MAŇASKOVÁ, D. „Genetika celiakie“ (2010) [cit. 2013-02-26] Dostupné na: http://www.medicinman.cz/?p=nemoci-sympt&p_sub=celiakie/e-genetika
- 8) PROKOPOVÁ, L. Celiakie - co má vědět ambulantní internista. *Interní medicína*, 2008, roč. 10, č. 5, s. 233 - 239.
- 9) MARTINELLI, P. - TRONCONE, R. - PAPARO, F. - TORRE, P. - TRAPANESE, E. - FASANO, C. - LAMBERTI, A - BUDILLON, G. - NARDONE, G. - GRECO, L. Coeliac disease and unfavourable outcome of pregnancy. *Gut*, 2000; 46: 332 – 335.
- 10) TYE-DIN, J. - ANDERSON, R. Immunopathogenesis of celiac disease. *Current Gastroenterology Reports*, 2008, roč. 10, č. 5, s. 458 - 465.
- 11) KOHOUT, P. - PAVLÍČKOVÁ, J. *Celiakie: dieta bezlepková*. Čestlice: Pavla Momčilová, 1994. 120 s. (Dieta, Sv. 1). ISBN 80-901137-6-1.

- 12) DÍTĚ, P. *Gastroenterologie: učební text pro studující lékařství*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000. 196 s. ISBN 80-210-2379-1.
- 13) GASBARRINI, G. - MALANDRINO, N. - GIORGIO, V. - FUNDARO, C. - CAMMAROTA, G. - MERRA, G. - ROCCARINA, D. - GASBARRINI, A. - CAPRISTO, E. Celiac disease: What's new about it? *Digestive Diseases*, 2008, roč. 26, č. 2, s. 121 - 127.
- 14) LATA, J. *Gastroenterologie*. 1. vyd. Praha: Galén, c2010. 256 s. ISBN 978-80-7262-692-2.
- 15) GREEN, P.H.R. - CELLIER, C. Celiac disease. *The New England Journal of Medicine*, 2007, roč. 357, č. 17, s. 1731 - 1743.
- 16) MICHAEL, M. Recognizing and Managing Celiac Disease in Primary Care. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 2003, 15.3, s. 108 – 114.
- 17) POZLER, O. *Gastroenterologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 1999. 274 s. (Trendy soudobé pediatrie, Sv. 1). ISBN 80-7262-016-9.
- 18) LATTA, J. Celiakie - od screeningu k diagnóze. *Interní medicína pro praxi*, 2012, roč. 14, č. 5, s. 221 - 223. ISSN 1212-7299.
- 19) DVOŘÁK, K. *Speciální patologie: neuropatologie, patologie kosterního svalstva, patologie novorozence, malabsorpční syndrom*. Brno: Masarykova univerzita, 1996. 51 s. ISBN 80-210-1340-0.
- 20) ZAVORAL, M. - VENEROVÁ, J. *Gastroenterologie a hepatologie*. 1. vyd. Praha: Triton, 2007. 212 s. (Postgraduální klinický projekt). ISBN 978- 80-7254-902-3.
- 21) Ústní sdělení: Mgr. Z. Manhartová – archivní data a statistika z cca 3000 bioptických vzorků přijatých k vyšetření do laboratoře Biolab Praha, k.s. v letech 2005 - 2010. Prezentováno: Sympozitorium o morfologii a funkci střeva Staré Splavy 2008.
- 22) CHVÁTALOVÁ, T. - VEPŘEKOVÁ, G. - HOUSKA, A. - FRIČ, P. Celiakie - opomíjená diagnóza. *Vnitřní lékařství*, 2012, roč. 58, č. 2, s. 99 - 103. ISSN 0042-773X.
- 23) KMENT, M. *Choroby gastrointestinálního traktu v graviditě*. 1. vyd. . Praha: Triton, 2003. 182 s. ISBN 80-7254-447-0.

- 24) BRIANI, C. - SAMAROO, D. - ALAEDINI, A. Celiac disease: From gluten to autoimmunity. *Autoimmun Rev*, 2008, 7(8): 664 – 650.
- 25) WEISS, B. - BUJANOVER, Y. - AVIDAN, B. - FRADKIN, A. - WEINTRAUB, I - SHAINBERG, B. "Positive tissue transglutaminase antibodies with negative endomysial antibodies: low rate of celiac disease." *Positive tTG Antibodies in Celiac Disease*, January 2004, Vol. 6, No. 17, pp. 9 - 12.
- 26) KUŽELA, L. - KMENT, M. *Gastroenterologie*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1985. 311 s. (Knižnice praktického lékaře). ISBN 735-21-08/9.
- 27) FRÜHAUF, P. *Celiakie v dětském věku*. 1. vyd. Olomouc: Solen, 2009. 48 s. ISBN 978-80-87290-00-2.
- 28) LOJDA, Z. - JODL, J. - FRIČ, P. Morfologie a histochemie jejunální sliznice u pacientů s deficitem laktázy. *Československá patologie*, 1974, roč. 10, č. 1, s. 10 - 17. ISSN 0009-0611.
- 29) CHen X. Biochemical properties of recombinant prolyl dipeptidases DPP IV and DPP 8. *Adv. Exp. Med. Biol.*. 2006, roč. 575, s. 27 - 32.
- 30) Pro B, Dang N.H. CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histol Histopathol*. 2004, roč. 19, č. 4. s. 1345 - 1351.
- 31) FRIČ, P. Celiakální sprue - současnost a perspektiva. *Postgraduální medicína*, 2006, roč. 8, č. 6, s. 588 - 593. ISSN 1212-4184.
- 32) LOJDA, Z. - PAPOUŠEK, F. *Základy histochemického průkazu enzymů: příprava roztoků a pufrů*. 3. nezměn. vyd. Brno: Ústav pro další vzdělávání středních zdravotnických pracovníků, 1978. 119 s.
- 33) LOJDA, Z. - ELLEDER, M. Possibilities for the cytochemical diagnosis of enzymopathies. *Enzymology and its clinical use: 19. scientific conference of the Medical Faculty of Charles University, Prague 25-27 June, 1974. part 3*. Praha: Univerzita Karlova, 1977. 1977, s. 71 - 76.

- 34) FRIČ, P. - LOJDA, Z. - MALIŠ, F. - JODL, J. Enzymy sliznice tenkého střeva u malabsorpčního syndromu. *Pokroky v gastroenterologii*. Praha: Avicenum, 1975. 1975, s. 225 - 251.
- 35) FREEMAN, H.J. Adult celiac disease in the elderly. *World Journal of Gastroenterology*, 2008, 14.45: 6911 – 6914. ISSN 1007-9327.
- 36) MULDER, C.J. "Does treatment of coeliac disease require full mucosal recovery?" *Romanian journal of gastroenterology*, June 2005, Vol. 14, No. 2, 147 - 149.