

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2020

Petra Malovaná

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Role aryluhlovodíkového receptoru
v patogenezi glutenové enteropatie
(celiakie)**

Bakalářská práce

Petra Malovaná

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2018/2019

Studijní program: Biologie
Forma: Prezenční
Obor/komb.: Molekulární a buněčná biologie (MBB)

Podklad pro zadání BAKALÁŘSKÉ práce studenta

PŘEDKLÁDÁ:	ADRESA	OSOBNÍ ČÍSLO
MALOVANÁ Petra	Kateřinice 296, Kateřinice	R17792

TÉMA ČESKY:

Role aryluhvodíkového receptoru v patogenezi glutenové enteropatie (celiakie)

TÉMA ANGLICKY:

The role of aryl hydrocarbon receptor in pathogenesis of gluten enteropathy (celiac disease)

VEDOUcí PRÁCE:

doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D. - KBB

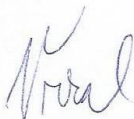
ZÁSADY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Vypracování bakalářské práce a multimediální prezentace k obhajobě

SEZNAM DOPORUČENÉ LITERATURY:

1. Sulentic C. E., Snyder A. D., Salisbury R. L. (2018): The Aryl Hydrocarbon receptor and Immunity. *Comprehensive Toxicology* (11): 238-271
2. Zhou L. (2016): AHR Function in Lymphocytes: Emerging Concepts. *Trends in Immunology* (37): 17-31
3. Murray A. J., Frey R. M., Olivia-Hemker M. (2018): Celiac Disease. *Gastroenterology* (154(8)): 2005-2008
4. Články v odborných publikacích

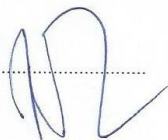
Podpis vedoucího práce:



Datum:

5. 10. 2018

Podpis vedoucího pracoviště:



Datum:

21. 11. 18

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc. et Ph.D.

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Petra Malovaná
Název práce:	Role aryluhlovodíkového receptoru v patogenezi glutenové enteropatie (celiakie)
Typ práce:	Bakalářská práce
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020
Klíčová slova:	glutenová enteropatie, Th17 lymfocyty, interleukin, aryluhlovodíkový receptor
Počet stran:	44
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Souhrn

Aryluhlovodíkový receptor je ligandy aktivovatelný transkripční faktor, k jehož vysoké expresi dochází v buňkách tkání tvořících bariéru ve styku s vnějším prostředím, v buňkách epitelu, imunitních buňkách či hepatocytech.

V předložené bakalářské práci byla provedena literární rešerše zaměřující se na roli tohoto receptoru v patogenezi glutenové enteropatie, což je autoimunitní onemocnění, které u jedinců s dědičnou predispozicí k tomuto onemocnění vyvolává požití lepku. V důsledku spuštění imunitní odpovědi v reakci na antigen dochází k produkci specifických cytokinů podílejících se na zánětu postihujícího sliznici tenkého střeva. Dlouhodobý zánět vede ke zploštění klků tenkého střeva a snížení schopnosti střeva vstřebávat živiny, což může vést k závažnějším zdravotním potížím.

Na základě dosud publikovaných poznatků byla vytvořena hypotéza role aryluhlovodíkového receptoru v patogenezi glutenové enteropatie. Aryluhlovodíkový receptor pravděpodobně u celiaků ovlivňuje pozitivně diferenciaci T-lymfocytů do subpopulace Th17. Zvýšená exprese aryluhlovodíkového receptoru v těchto buňkách vede pravděpodobně k zvýšení produkce interleukinů podporujících zánět sliznice tenkého střeva pacientů s glutenovou enteropatií, který je způsoben primárně reakcí imunitního systému na gliadin obsažený v lepku.

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Petra Malovaná
Title:	The role of aryl hydrocarbon receptor in pathogenesis of gluten enteropathy (celiac disease)
Type of thesis:	Bachelor thesis
Department:	Department of Cell Biology and Genetics, UP Olomouc
Supervisor:	doc. Ing. Radim Vrzal, Ph.D.
The year of presentation:	2020
Keywords:	celiac disease, Th17 lymphocytes, interleukin, aryl hydrocarbon receptor
Number of pages:	44
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Summary

The aryl hydrocarbon receptor is a ligand-activated transcription factor that is highly expressed in cells of barrier-forming tissues in contact with outside environment, in epithelial cells, immune cells, or hepatocytes.

In the bachelor thesis, a literature review was conducted with focus on the role of this receptor in the pathogenesis of gluten enteropathy, an autoimmune disease, that causes gluten ingestion in individuals with a hereditary predisposition to this disease. Immune response to an antigen results in the production of specific cytokines which are involved in the inflammation affecting the small intestinal mucosa. Long-term inflammation leads to flattening of the small intestine villi and decreased ability of small intestine to absorb nutrients, whose insufficiency may further lead to more serious health problems.

Based on the previously published findings, the role of the aryl hydrocarbon receptor in the pathogenesis of gluten enteropathy has been hypothesised. The aryl hydrocarbon receptor is likely to positively affect T-cell differentiation into the Th17 subpopulation. Overexpression of the aryl hydrocarbon receptor in these cells leads to an increase in the production of interleukins supporting small intestinal mucosal inflammation in patients with gluten enteropathy, which is caused primarily by the response of immune system to gliadin containing in gluten.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Ing. Radima Vrzala, Ph.D. a že jsem veškeré použité zdroje řádně citovala v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne 4. května 2020

Petra Malovaná

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Radimu Vrzalovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, cenné rady a připomínky při tvorbě této bakalářské práce. Ráda bych také poděkovala své rodině za podporu během studia.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce	2
3	Glutenová enteropatie.....	3
3.1	Lepek	3
3.1.1	Trávicí trakt a rozklad lepku v organismu.....	5
3.1.2	Bezlepková dieta	6
3.2	Formy onemocnění	7
3.3	Příznaky a průběh nemoci	8
3.3.1	Extraintestinální příznaky	8
3.3.2	Gastrointestinální příznaky a onemocnění spojená s celiakií.....	9
3.4	Diagnostika onemocnění	10
3.4.1	Sérologické testy	10
3.4.2	Biopsie tenkého střeva	11
3.4.3	Genetická predispozice a genetické vyšetření.....	14
4	Imunitní systém	16
4.1	Buňky a molekuly nespecifického imunitního systému a jejich vliv na rozvoj autoimunitní reakce	17
4.2	HLA systém.....	20
4.3	Buňky a molekuly specifického imunitního systému a jejich vliv na rozvoj autoimunitní reakce	20
4.3.1	T-lymfocyty.....	21
4.3.2	Th17 lymfocyty	23
4.3.2.1	Diferenciace Th17 lymfocytů	24
5	Vliv prostředí tenkého střeva na rozvoj onemocnění	25
5.1	Celistvost střevních slizniční bariéry a její proměny v patogenezi celiakie.....	25
5.2	Vliv střevní mikroflóry a virové infekce na rozvoj celiakie.....	26
6	Arylhydrovodíkový receptor	28
6.1	Struktura a aktivace AhR.....	28
6.2	Ligandy AhR	30
6.3	AhR v buňkách imunitního systému	32
6.3.1	Úloha AhR v Th17 lymfocytech	33
6.4	AhR ve střevě	34

7	Laboratorní <i>in vitro</i> metody při studiu patogeneze celiakie.....	35
8	Diskuze	37
9	Závěr.....	39
10	Seznam použité literatury.....	40

Seznam použitých zkratek

AhR	= Aryluhlovodíkový receptor
AhRE	= AhR responzivní element
AhRR	= Aryluhlovodíkový receptorový represorový protein
AIP	= Aryluhlovodíkový interagující protein
ARA	= Protein 9 asociovaný s AhR
ARNT	= Translokátor aryluhlovodíkového receptoru
APC	= Antigen-prezentující buňky (Antigen-presenting cells)
bHLH/PAS	= Basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim
CD	= Cluster of differentiation
CD4 ⁺ T-lymfocyty	= T-lymfocyty s koreceptorem CD4
DGP	= Deaminované gliadinové peptidy
DRE	= Dioxinový responzivní element
EDTA	= Ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	= Enzymová imunoabsorpční analýza
EMA	= Protilátky proti endomysiu
FICZ	= 6-formylindolo[3,2-b]karbazol
FoxP3	= Forkhead Box P3
GE	= Glutenová enteropatie
HLA	= Lidský leukocytární antigenní systém
HSP90	= Protein teplotního šoku
I3C	= Indol-3-karbinol
ICZ	= Indolo[3,2-b]karbazol
IDO	= Indolamin-2,3-dioxygenasa
Ig	= Imunoglobulin (A, E, G)
IL	= Interlukin
INF	= Interferon
IS	= Imunitní systém
JAM	= Spojovací adhezní molekuly

MHC	= Hlavní histokompatibilní komplex
NK buňky	= Žírné buňky (Natural killers)
p23	= Ko-chaperon pro HSP90
PAR2	= Proteinaseou aktivovaný receptor
ppm	= Parts per million
ROR γ T	= Retinoid-related Orphan Receptor γ T
RT-PCR	= Real-time polymerázová řetězová reakce
RunX1	= Runt-related transkripční faktor 1
SSP-PCR	= Single-specific primer polymerázová řetězová reakce
STAT	= Signální transduktor a aktivátor transkripce
TCDD	= 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TFH	= Pomocné folikulární T-lymfocyty
TGF	= Transformující růstový faktor
Th	= Pomocné T-lymfocyty
TNF	= Nádory nekrotizující faktor
T _{R1}	= Regulační T-lymfocyty typu 1
Treg	= Regulační T-lymfocyty
tTg	= Tkáňová transglutaminasa
XRE	= Xenobiotický responzivní element
ZO	= Zonula occludens
PAMPs	= Pathogen-associated molecular patterns
PAS	= Per-Arnt-Sim doména

Seznam obrázků

Obr. 1: Symbol označující bezlepkové potraviny

Obr. 2: *Dermatitis herpetiformis* postihující kůži v okolí loktů a kolen

Obr. 3: Vzorek sliznice zdravého tenkého střeva (nahore) a vzorek sliznice tenkého střeva s atrofií střevních klků (dole)

Obr. 4: Endoskopický obraz *duodena* s atrofií střevních klků a zvýrazněnou cévní kresbou u pacienta s GE

Obr. 5: Charakteristická mozaikovitá struktura sliznice v *jejunu* pacienta s GE

Obr. 6: Schéma signální dráhy AhR vedoucí k aktivaci cílových genů

Obr. 7: Strukturální vzorec 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinu

Seznam tabulek

Tab. 1: Imunogenní sekvence aminokyselin monomerních prolaminů v lepku

Tab. 2: Hodnocení histologických změn sliznice podle Marsh-Oberhuberovy klasifikace

1 Úvod

Glutenová enteropatie je autoimunitní onemocnění, které se může rozvinout u predisponovaných jedinců v reakci na lepek vyskytující se v potravinách vyrobených z běžně konzumovaných obilovin. Glutenová enteropatie se obvykle projevuje poměrně širokou škálou příznaků, které vznikají v důsledku autoimunitního poškození sliznice tenkého střeva a jeho následné neschopnosti vstřebávat dostatečné množství živin, minerálů a vitamínů z přijímané stravy. Jedná se o onemocnění, které v případě, že není u jedince diagnostikováno včas či léčeno, je život ohrožující.

Aryluhlovodíkový receptor ovlivňuje celou řadu buněčných procesů a vyskytuje se jak v buňkách imunitního systému, kde reguluje vývoj a funkci těchto buněk, tak v buňkách epitelu, které v tenkém střevě tvoří bariéru ve styku s vnějším prostředím. Každodenní konzumovaná strava obsahuje ligandy aryluhlovodíkového receptoru, které ovlivňují aktivitu zmíněného receptoru. Pochopení role aryluhlovodíkového receptoru v patogenezi glutenové enteropatie může vést k detailnějšímu objasnění vzniku patologických změn sliznice tenkého střeva a může přispět k nalezení nového způsobu léčby tohoto onemocnění.

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo provést literární rešerši na téma role aryluhlovodíkového receptoru v patogenezi glutenové enteropatie.

3 Glutenová enteropatie

Glutenová enteropatie (GE) je onemocnění trávicího traktu, s jehož diagnostikou se v dnešní době setkává stále více pacientů gastroenterologických ordinací. Autoimunitní onemocnění častěji označované jako celiakie nebo celiakální sprue vyvolává u jedinců s dědičnou predispozicí k tomuto onemocnění požití lepku, směsi bílkovin obsažených zejména v obilných zrnech. Přijímání stravy obsahující lepek vede u celiaka k zánětlivému poškození sliznice tenkého střeva, které není schopno v takovém případě vstřebávat dostatečné množství živin, minerálů a vitamínů z potravy a tělo pacienta strádá. Takový dlouhodobý stav může vést k závažnějším zdravotním potížím, a proto je včasná diagnostika celiakie nezbytně nutná, stejně jako jediná možná léčba, doživotní bezlepková dieta (Naheed, 2015).

Jak bylo zmíněno výše, celiakie je autoimunitním onemocněním, jedná se tedy o reakci imunitního systému člověka proti tělu vlastním složkám, které by imunitní systém zdravého člověka toleroval. Protilátky u celiaků, především třídy IgA, jsou produkovány hlavně proti komplexu složeném z enzymu, tkáňové transglutaminasy (EC 2.3.2.13), a gliadinu (viz. podkapitola 3.1). V případě požití lepku se v tenkém střevě dostane antigen přes buňky výstelky tenkého střeva, podnítl tvorbu protilátek IgG a IgA plazmatickými buňkami a zároveň dochází ke stimulaci T-lymfocytů, které následně produkují specifické cytokiny podílející se na zánětlivé reakci postihující stěnu tenkého střeva. Důsledkem zánětlivé reakce dochází ke zploštění klků tenkého střeva a tím ke snížení schopnosti střeva vstřebávat živiny (Lebwohl *et al.*, 2018).

Glutenová enteropatie postihuje osoby s genetickou predispozicí, tedy především jedince s genotypy nesoucími alely HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8. Projev onemocnění je však u těchto jedinců podmíněn také faktory vnějšího prostředí, a proto se onemocnění může rozvinout v dětství i dospělosti (Ortiz *et al.*, 2017, Cebolla *et al.*, 2018).

3.1 Lepek

Lepek je označení směsi zásobních proteinů obsažených v obilných zrnech (Cebolla *et al.*, 2018). Ve vodě nerozpustné prolaminy, také známy pod pojmem gluten, vyskytující se v pšenici, ječmeni a žitě vyvolávají autoimunitně zprostředkovanou reakci u osob citlivých na tyto makromolekuly. Prolaminy tvořené více proteiny se rozdělují na monomerní obsahující intramolekulární disulfidové vazby a polymerní, které obsahují intermolekulární disulfidové vazby. Pšenice obsahuje gliadiny a gluteliny, které tvoří 80 % celkového množství proteinů obsažených v zrnech. Monomerní prolaminy v pšenici zahrnují α -gliadiny, γ -gliadiny

a ω -gliadiny, z nichž α -gliadiny jsou pro svůj vysoký obsah glutaminových residuí pro celiaky nejškodlivější. Polymerní prolaminy jsou členěny na gluteniny s nízkou molekulovou hmotností a gluteniny s vysokou molekulovou hmotností (Kanerva, 2011).

Zásobní proteiny ječmene, hordeiny, jsou rozdělovány na monomerní C- a γ -hordeiny a polymerní B- a D-hordeiny. Prolaminy v žitě, sekaliny, zahrnují monomerní γ -40 a ω -sekaliny a polymerní γ -75 sekaliny a sekaliny s vyšší molekulovou hmotností. Typické imunogenní sekvence škodlivé pro celiaky obsahují velké množství prolinů a glutaminů a většina těchto sekvencí je obsažena v opakujících se doménách monomerních prolaminů, což můžeme vidět v tabulce 1 (Kanerva, 2011).

Tab. 1: Imunogenní sekvence aminokyselin monomerních prolaminů v lepku

Jednopísmenné zkratky aminokyselin v opakujících se sekvencích: P=prolin, Q=glutamin, F=fenylalanin, Y=tyrosin, V=valin

Obilovina	Monomerní prolamin	Opakující se sekvence
Pšenice	α/β -gliadiny	PQPQFPF a PQQPY
	γ -gliadiny	PQQPFPQ
	ω -gliadiny	PQQPFPQQ
Ječmen	C-hordeiny	PQQPFPQQ
	γ -hordeiny	PQQPFPQ
Žito	ω -sekaliny	PQQPFPQQ
	γ -40 sekaliny	QPQQPFP
Oves	α -aveniny	PFVQQQ
	β -aveniny	PFVQQQ

Prolaminy obsažené v kukuřici (zein), čiroku (kafirin) a rýži (orzein), které jsou přirozeně bezpečnými potravinami, imunitní odpověď celiaka nevyvolávají (Cebolla *et al.*, 2018).

Aveniny, prolaminy obsažené v ovsu členěné na základě molekulové hmotnosti na α a β -aveniny, byly dlouhou dobu považovány za proteiny vyvolávající nežádoucí autoimunitní reakci celiaků, ukázalo se však, že problémy spojené s celiakií se objevují u pacientů po konzumaci ovsa kontaminovaného při výrobě jinou z výše uvedených obilovin. Jako bezpečné, a tedy vhodné pro pacienty s glutenovou enteropatií, jsou považovány produkty z ovsa, u nichž je koncentrace glutenu nižší než 20 ppm (Gilissen *et al.*, 2016). Nekontaminovaný oves je ke konzumaci vhodný především díky tomu, že obsah prolaminů v něm je na rozdíl od ostatních obilovin poměrně nízký a epitopy specifické pro avenin

podílející se na autoimunitní reakci se od epitopů výše uvedených antigenních prolaminů obilovin liší ve složení aminokyselinových residuí, což ovlivňuje vazbu T-lymfocytů (Gilissen *et al.*, 2016).

Prolaminy obsažené v lepku jsou v centrální části polypeptidu tvořeny velkým počtem prolinových a glutaminových zbytků, jejichž množství je v závislosti na typu obiloviny různé (Cebolla *et al.*, 2018). Enzym transglutaminasa (EC 2.3.2.19), systematicky označována jako protein-glutamin gamma-glutamyltransferasa, katalyzuje deaminaci gliadinu. Zajišťuje substituci primárních aminů a hydrolýzu amidové skupiny proteinu a peptidově vázaných glutaminových zbytků (Falini *et al.*, 2008).

3.1.1 Trávicí trakt a rozklad lepku v organismu

Trávicí trakt hraje klíčovou roli v zásobování těla živinami, jeho stěny jsou tvořeny čtyřmi vrstvami: sliznice (*tunica mucosa*), podslizniční vazivo (*tunica submucosa*), vrstva svalů (*tunica muscularis*) a povrchová vnější vrstva. Trávicí soustavu začíná dutinou ústní (*cavitas oris*), v níž dochází k mechanickému zpracování přijaté potravy, která je zároveň zvlhčována produkty hlenových žlázek a slinami produkovanými párovými podčelistními žlázami (*glandula submandibularis*), podjazykovými (*glandula sublingualis*) a příušními (*glandula parotis*) žlázami. Polykaná potrava dále putuje do hltanu (*pharynx*), 15 cm dlouhé trubice vystlané sliznicí. Hltanem prochází potrava dále do jícnu (*oesophagus*), 25 cm dlouhé trubice obsahující svalovinu, která peristaltikou posouvá polknutou potravu do žaludku (Abrahams *et al.*, 2002, Čihák, 2013).

Žaludek (*gaster*) tvoří rozšířenou část trávicí trubice a skládá se z částí: kardié, fundus, tělo, pylorická část a malého a velkého zakřivení. Stěnu žaludku vytváří epitel obsahující velké množství žlázek, které zajišťují produkci ochranného hlenu, trávicích enzymů a kyseliny, a vrstva svaloviny umožňující míchání natrávené potravy (Abrahams *et al.*, 2002, Čihák, 2013).

Tenké střevo (*intestinum tenue*) navazující na žaludek je orgán, v němž dochází k hlavnímu a poslednímu procesu štěpení polknuté stravy a vstřebávání vzniklých živin, a je tvořený částmi: *duodenum*, *jejunum*, *ileum*, *mesenterium* a *ostium ileale*, kde tenké střevo přechází do začátku tlustého střeva. Tvarově se jedná o trubici s průměrem 3–4 cm, která dosahuje délky nejčastěji 3–5 m. Sliznice v celém tenkém střevu vystupuje do příčných řas (*plicae circulares*) a pokrývá ji světle růžový, jednovrstevný epitel umožňující resorpci, mezi jehož buňkami jsou vmezeřeny pohárkovité buňky vytvářející a vylučující ochranný

hlen, enterocyty a další buňky, které se svou funkcí podílí jak na resorpci živin, tak na ochraně organismu před antigenními molekulami. Sliznici celého tenkého střeva pokrývají drobné výběžky epitelu a vaziva *lamina propria mucosae*, tzv. střevní klky (*villi intestinales*), které společně s mikroklky zvětšují absorpční plochu střeva. Středem klků procházejí drobné kapiláry, které přejímají od buněk epitelu živiny, které jsou přenášeny dále do krevního řečiště. Do oblastí mezi klky ústí Lieberkühnovy žlázy (*glandulae intestinales*) produkující isotonicnou tekutinu a vytvářející krypty sestupující téměř až k podslizničnímu vazivu. *Jejunum* obsahuje ve sliznici lymfatickou tkáň v podobě uzlíků, které však nejsou tak četné jako v *ileu*, kde vytváří shluky (tzv. Peyerovy plaky) podílející se na zprostředkování imunitní odezvy. Tekutý obsah tenkého střeva je následně zpracován v jednotlivých částech tlustého střeva. Zde dochází k zahušťování tráveniny a tvorby stolice, která se přes *rectum* vylučuje análním otvorem z těla (Abrahams *et al.*, 2002, Čihák, 2013).

Glutaminová residua gliadinu jsou po jeho přestupu přes výstelku tenkého střeva v reakci katalyzované transglutaminasou přeměny na kyselinu glutamovou, která nese záporný náboj a takto vzniklé peptidy jsou následně prezentovány MHC molekulami II. třídy (viz. kapitola 4.2) (HLA-DQ2, HLA-DQ8) na antigen-prezentujících buňkách (APC) T-lymfocytům (CD4⁺), které spustí na gliadinu-specifickou imunitní odpověď (Ortiz *et al.*, 2017).

3.1.2 Bezlepková dieta

Vyloučení lepku ze stravy je v současnosti nejefektivnější dostupnou léčbou tohoto autoimunitního onemocnění. V důsledku zavedení bezlepkové diety dochází k uzdravení sliznice tenkého střeva a tím k vymizení příznaků celiakie (Naheed, 2015).

Nevýhodou bezlepkové diety je nízký obsah vlákniny, některých vitamínů a minerálů ve speciálně vyrobených bezlepkových produktech (Vici *et al.*, 2015). Vypořádat se s tímto onemocněním a stejně tak s bezlepkovou dietou může být pro některé nově diagnostikované složitější, neboť bezlepkové stravování bývá někdy spojeno i se změnou životního stylu (Naheed, 2015) a bezlepková strava je ve srovnání s běžnými potravinami finančně náročná.

V souladu s bezlepkovou dietou je pro celiaka vhodná konzumace: pohanky, čiroku, brambor, rýže, kukuřice, amarantu, jáhel, luštěnin, quinoi, sóji, ovoce, zeleniny, ořechů, kaka, mléčných výrobků, vajec, ryb, masa, nealkoholických i alkoholických nápojů (v případě, že se jedná o nápoje vyrobené z obilovin, musí být před konzumací upraveny destilací), aj. Je zapotřebí se vyvarovat požití pšenice, ječmene, žita a ovsa kontaminovaného

uvedenými obilovinami a výrobků z těchto obilovin. Aby se předcházelo dietním chybám je zapotřebí konzumovat ověřené potraviny a číst složení potravin a obsah alergenů, jejichž povinnost zveřejnit ukládá nařízení Evropského parlamentu a rady (EU) č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011 (Celiak.cz, 2019).

Symbol přeškrtnutého klasu na obrázku 1, jehož ochrannou známku vlastní Association of European Coeliac Societies, označuje bezpečkové potraviny kromě produktů přirozeně bezpečkových, nezpracovaných jako obilná zrna z rýže a kukuřice, masa, ryb, vajec, mléka a mléčných výrobků, kojenecké výživy, zeleniny a luštěnin, ořechů, semena, ovoce, sladidel, tuků, octu a koření. Kompetence pro využití tohoto loga zavádí tzv. European Licensing System a potraviny s tímto označením je možno zakoupit ve všech evropských státech (Celiak.cz, 2019).



Obr. 1: Symbol označující bezpečkové potraviny

Obrázek byl převzat z internetové stránky <https://www.celiak.cz/pro-firmy/symbol-preskrtnuteho-klasu>

3.2 Formy onemocnění

Glutenová enteropatie se vyskytuje v několika patologických formách. Klasická celiakie se projevuje už u dětí a závažnost příznaků této formy je různá v závislosti na poškození střevní sliznice. Většina příznaků klasické formy celiakie zasahuje trávicí trakt pacienta. Atypická forma glutenové enteropatie se rozvíjí u dospělých a příznaky se projevují spíše mimo gastrointestinální trakt. Důsledkem špatného vstřebávání živin dochází k rozvoji dalších zdravotních potíží, které mohou být až život ohrožující. Nejnebezpečnější forma onemocnění, tichá celiakie, je bezpříznaková a stejně jako předchozí typ se rozvíjí v dospělosti. Tichá celiakie je většinou diagnostikována u člověka až ve chvíli, kdy se u něj rozvíjí jiná onemocnění, která ho ohrožují na životě. Latentní celiakie se rozvíjí u dospělých, není doprovázena žádnými příznaky a diagnostikována je na základě výsledků genetického

vyšetření. Jedinci s touto formou onemocnění nemají poškozený gastrointestinální trakt a individuálně reagují na snížení množství vstřebávaných živin (Naheed, 2015).

3.3 Příznaky a průběh nemoci

Diagnostikování celiakie je poměrně obtížné, jelikož se projevuje celou řadou různých příznaků, které zasahují přímo trávicí soustavu nebo se projevují mimo ni. Výskyt příznaků onemocnění je individuální u každého jedince. Obecně existují příznaky charakteristické pro dospělé a jiné charakteristické pro dětské pacienty (Jericho *et* Guandalini, 2018).

3.3.1 Extraintestinální příznaky

Mezi nejběžnější extraintestinální příznaky klasické formy celiakie u dětí patří hypoplazie zubní skloviny, která se projevuje hlavně skvrnami na zubech. V případě, že zasáhne trvalý chrup, po zavedení bezlepkové diety projevy nezmizí. Nízký vzrůst a váha dítěte mohou být další příznaky spojené s celiakií, kdy v důsledku sníženého vstřebávání živin dítě nedosahuje jeho očekávané tělesné váhy a výšky. Jedná se však o dočasný stav a po zavedení diety dítě opět normálně prospívá. Osteoporóza a osteomalacie zasahující kosti se mohou následkem probíhajícího zánětu a tedy snížené schopnosti vstřebávat minerály a vitamíny projevit u dětí i dospělých. Je-li včas zavedena bezlepková strava, dojde u dětí k obnově kostní tkáně i bez přidavku k tomu potřebných vitamínů a minerálů. Sideropenická anémie je dalším extraintestinálním příznakem, který postihuje více dospělé než děti. K anémii dochází v důsledku poškození sliznice hlavně *duodena*, která nevstřebává potřebné železo z potravy (Jericho *et* Guandalini, 2018).

Dermatitis herpetiformis je kožní onemocnění, které bývá často řazeno mezi příznaky celiakie. Jedná se o svědivou vyrážku v podobě drobných puchýřků, kterou můžeme vidět na obrázku 2 a která se vyskytuje nejčastěji v okolí loktů, kolen méně často také na břichu a horní části zad. *Dermatitis hypertiformis* shodně s celiakií může být charakterizována přítomností specifických protilátek v krevním séru, zploštěním klků tenkého střeva, které však nemusí být tolik rozsáhlé, a pozitivní reakcí na vysazení lepku. Po zavedení bezlepkové stravy může dojít k vymizení příznaků v řádu měsíců až let (Collin *et al.*, 2017, Jericho *et* Guandalini, 2018).



Obr. 2: *Dermatitis herpetiformis* postihující kůži v okolí loktů a kolien

Obrázek převzat z článku Collin *et al.*, 2017

Kromě kožních příznaků se snížení množství vstřebávaných živin projevuje také neurologickými potížemi, jako je například bolest hlavy. Způsob, jakým k ní dochází, není zcela objasněn, je však možné, že bolest hlavy souvisí se změnou složení krve při aktivaci imunitního systému po požití lepku. Včasným zavedením a dodržováním bezlepkové diety v dětství můžou tyto bolesti vymizet. Dalšími neurologickými potížemi spojenými s celiakií může být ataxie vyskytující se ve větší míře u dospělých nebo neuropatie. Méně často se glutenová enteropatie může také projevit duševními poruchami a změnami chování. Úzkost a deprese se může častěji projevit u dospělých osob (Jericho *et* Guandalini, 2018).

3.3.2 Gastrointestinální příznaky a onemocnění spojená s celiakií

Gastrointestinální příznaky se objevují u dětí i dospělých, v dětství však mají mnohem silnější projevy než v dospělosti. Mezi nejběžnější příznaky vedoucí k diagnostice celiakie zasahující přímo trávicí trakt patří zácpa, průjem a nadýmání, které se často pojí s nepříjemnými křečemi a bolestí břicha (Naheed, 2015).

Souvislost s glutenovou enteropatií mají i další onemocnění trávicího ústrojí jako je Crohnova nemoc nebo ulcerózní kolitida. Trvalý zánět sliznice tenkého střeva u nedagnostikované celiakie může vést k rozsáhlejším zánětům, které v případě Crohnovy choroby zasahují různé části trávicí soustavy a ulcerózní kolitidou je zasaženo hlavně tlusté střevo a konečník. Celiakie vykazuje vyšší výskyt u jedinců trpících syndromem dráždivého střeva, který se projevuje stejnými či podobnými gastrointestinálními příznaky, ale postihuje spíše tlusté střevo člověka (Naheed, 2015).

3.4 Diagnostika onemocnění

Přesto, že se metody umožňující rozpoznání celiakie stále vylepšují, je celiakie celosvětově u velkého množství nemocných nedagnostikována nebo k její diagnostice dojde u symptomatických pacientů se zpožděním až několik let (Lebwohl *et al.*, 2017, Cichewicz *et al.*, 2019). Po vyhodnocení anamnézy a příznaků pacienta se běžně v praxi pro stanovení diagnózy využívá dvou vyšetření, testu na detekci autoprotilátek specifických pro celiakii a biopsie vzorku sliznice tenkého střeva. Zavedením bezlepkové diety by u nemocného mělo dojít k vymizení klinických a sérologických příznaků onemocnění, což potvrzuje správné stanovení diagnózy u dětí i dospělých (Mudr. Dana Maňasková, 2019). U dětských pacientů, kteří trpí příznaky tohoto onemocnění, však k diagnóze postačí pouze pozitivní sérologické testy, které potvrdí 10x vyšší hodnotu normální koncentrace IgA protilátek proti tkáňové transglutaminase (EC 2.3.2.13, IgA-tTG), potvrzení přítomnosti rizikových alel HLA systému DQ2/DQ8 v genomu a gastrointestinální příznaky, které celiakii doprovází (Lebwohl *et al.*, 2017, Cichewicz *et al.*, 2019).

Aby výsledky testů odpovídaly skutečnému stavu pacienta, doporučovalo se, aby pacient nevyřadil potraviny obsahující lepek z jídelníčku a přijímal jej v množství nejméně 10 g lepku za den po dobu 6 týdnů před provedením vyšetření. Nově však bylo zjištěno, že i nižší dávka 3 g glutenu za den po dobu 14 dní je dostačující k tomu, aby u pacienta vyvolala změny ve sliznici tenkého střeva, přičemž tyto histologické změny narůstají rychleji než koncentrace sérologických markerů v krvi pacienta (Lebwohl *et al.*, 2017, Cichewicz *et al.*, 2019).

3.4.1 Sérologické testy

Sérologický test je prvním orientačně prováděným vyšetřením po zhodnocení anamnézy vyšetřovaného a v případě jeho positivity, přítomnosti či zvýšené koncentraci určitých specifických protilátek, se dále vyšetřují histologické změny ve sliznici tenkého střeva (Lebwohl *et al.*, 2017).

Při imunologickém vyšetření celiakie se detekují autoprotilátky proti gliadinu, endomysální protilátky (EMA), protilátky proti deaminovaným gliadinovým peptidům (DGP) a pro diagnostiku celiakie se jako nejvhodnější ukázala detekce protilátek proti tkáňové transglutaminase (tTG), které vykazují téměř 100% citlivost a specifitu (Al-Toma *et al.*, 2019).

Primárně se tedy vyšetřuje množství IgA-tTG protilátek v krvi pacienta a jedná se také o test, který je ve srovnání s měřením EMA protilátek i méně nákladný (Lebwohl *et al.*, 2017,

Cichewicz *et al.*, 2019). Pozitivita protilátek proti gliadinu může vést k odhalení i jiného patologického stavu, a proto je v případě positivity těchto protilátek nutno ke stanovení diagnózy celiakie stanovit i IgA-tTG (Malíčková *et al.*, 2005). Také zvýšené hodnoty protilátek proti deaminovaným gliadinovým peptidům (DGP), které vykazují afinitu k antigen prezentujícím buňkám celiaků a spouští zánětlivou reakci, je pozitivním výsledkem, který společně s pozitivním endoskopickým nálezem vede k diagnostice glutenové enteropatie. Přesto, že protilátky proti DGP vykazují podobnou citlivost a specifitu jako protilátky IgA-tTG, zůstává IgA-tTG levnější a využívanější variantou sérologického testu (Al-Toma *et al.*, 2019).

U jedinců s nedostatkem IgA protilátek a u případů s velkou pravděpodobností výskytu celiakie i přes normální hodnoty IgA-tTG protilátek se sérologickými testy stanovuje hladina protilátek IgG-tTG, IgG-EMA a IgG-DGP (Lebwohl *et al.*, 2017).

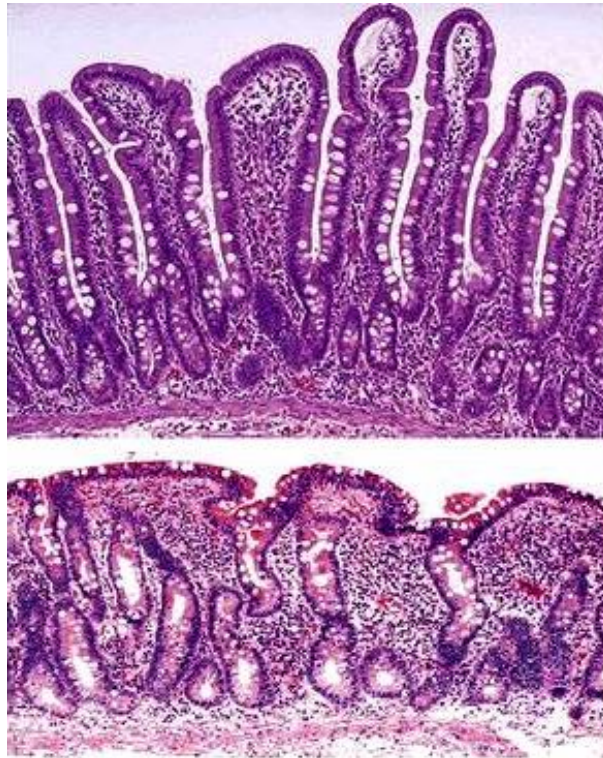
Nejběžněji využívanou metodou ke stanovení těchto specifických protilátek je enzymová imunoabsorpční analýza (ELISA), kvalitativní heterogenní enzymatická metoda, která v případě positivity naředěného krevního séra na protilátky, které se vážou na antigen na povrchu jamek mikrotitrační desky, detekuje změnu zbarvení roztoku po přidání substrátu k danému enzymu (Al-Toma *et al.*, 2019). Pro stanovení EMA protilátek se dále využívá technika nepřímé fluorescence, kdy jako antigen slouží buď hladká svalovina okrajové části opičího jícnu, nebo lidský pupečník. Jedná se o dražší metodu, která se využívá hlavně pro ověření pozitivních výsledků přítomnosti IgA-tTG a IgG-tTG (Lebwohl *et al.*, 2017, Malíčková *et al.*, 2005).

3.4.2 Biopsie tenkého střeva

Endoskopie je podstatnou součástí vyšetření, které potvrzuje diagnózu glutenové enteropatie, a dochází při něm k odběru reprezentativních vzorků sliznice pacienta, které dále podléhají histologickému vyšetření, kdy patolog posuzuje anatomické odlišnosti vzorků. Ve výjimečných případech se histologické vyšetření provádí i u jedinců s negativními výsledky sérologických testů, neboť nepřítomnost protilátek a patologické změny sliznice mohou u rizikových skupin signalizovat celiakální sprue (Al-Toma *et al.*, 2019).

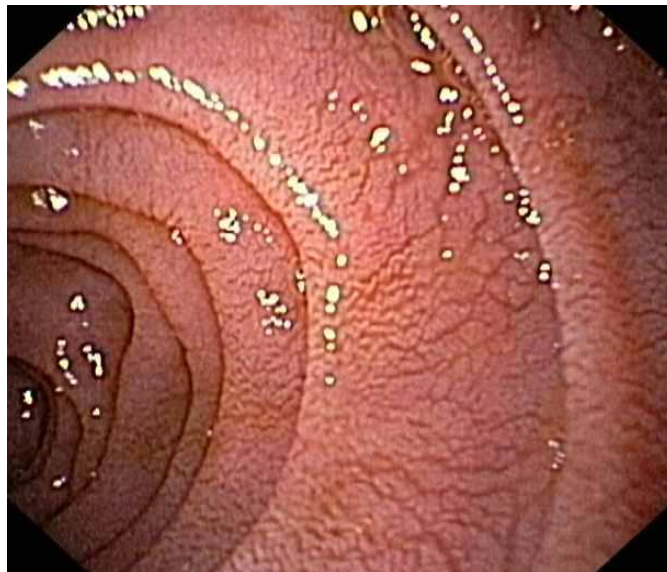
Neléčená glutenová enteropatie je spojena s histologickými změnami, které zahrnují nárůst intraepiteliální lymfocytů, zmenšení střevních klků a zvětšení Lieberkühnových krypt, které můžeme vidět na obrázku 3 (Lebwohl *et al.*, 2017). Při endoskopickém vyšetření jsou v makroskopickém měřítku pozorovatelné absence příčných kruhových řas (*plicae circulares*),

lépe viditelná je cévní kresba, jako na obrázku 4, a sliznice může vytvářet mozaikovitou strukturu, kterou je možné vidět na obrázku 5 (Mudr. Dana Maňasková, 2019).



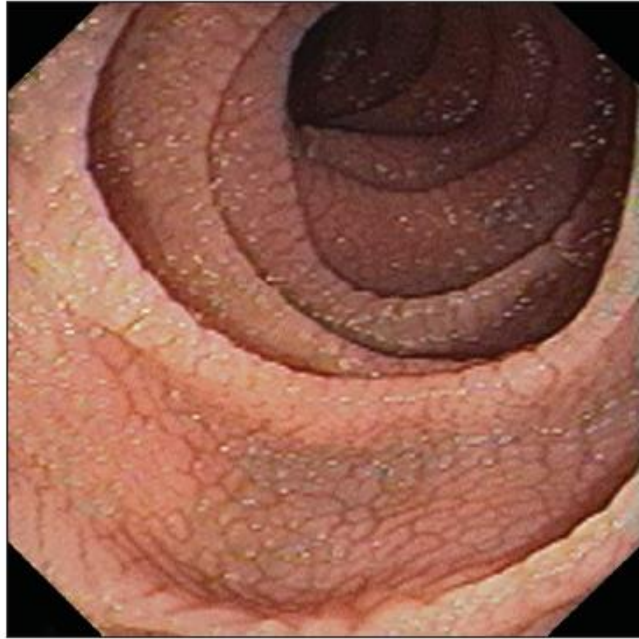
Obr. 3: Vzorek sliznice zdravého tenkého střeva (nahore) a vzorek sliznice tenkého střeva s atrofií střevních klků (dole)

Obrázek byl převzat z internetové stránky: <https://celiac.org/about-the-foundation/featured-news/2015/03/biopsy-samples-diagnosis-celiac-disease/> [Navštíveno 15. 11. 2019]



Obr. 4: Endoskopický obraz duodena s atrofií střevních klků a zvýrazněnou cévní kresbou u pacienta s GE

Obrázek byl převzat z internetové stránky: <http://www.gastrolab.net/pa-198.htm> [Navštíveno 15. 11. 2019]



Obr. 5: Charakteristická mozaikovitá struktura sliznice v jejunu pacienta s GE
Obrázek převzat z článku Bureš *et al.*, 2005

Histologické změny jsou ve střevě neléčeného celiaka rozloženy nerovnoměrně, místa s atrofií klků sousedí s místy bez atrofie, a proto se vzorky tkáně při endoskopickém vyšetření odebírají jak z první části dvanáctníku (*pars superior*), což je místo prvního kontaktu tenkého střeva s lepem, tak ze 4 míst druhé poloviny dvanáctníku (Kowalski *et al.*, 2017).

Pro zhodnocení závažnosti nemocnění je pro patologa klíčový počet biopsií a jejich orientace, přičemž jeden ze vzorků musí být z oblasti *pars superior*, dále pak změny ve struktuře sliznice zahrnující přítomnost či atrofii střevních klků, zvětšení krypt, změny poměru výšky klků:hloubky krypt, změny složení řídké vazivové vrstvy tenkého střeva pod epitelem, obsah Brunnerových žláz či procentuální zastoupení intraepiteliálních lymfocytů (Al-Toma *et al.*, 2019).

Morfologické abnormality střevních vzorků a tedy závažnost onemocnění pacienta je možné zhodnotit na základě několika klasifikací. Nejprve spektrum patologických nálezů ve sliznicích celiaků rozčlenila Marshova klasifikace, později se objevila detailněji rozpracovaná Oberhuberova klasifikace, která typ 3 v Marshově klasifikaci rozčleňuje na tři podtypy na základě míry atrofie střevních klků. Histologické změny střevní sliznice a stav nemoci později klasifikovaly do tří skupin Corrazova Villanaciho klasifikace a Ensariho klasifikace (Walker *et al.*, 2017, Al-Toma *et al.*, 2019), které členění histologického poškození střevní sliznice pacientů zjednodušily. Přesto zůstává Marsh-Oberhuberova

klasifikace, jejíž přehled můžeme vidět v tabulce 2, lékaři nejpoužívanějším systémem pro stanovení stupně histologického poškození sliznice tenkého střeva u pacientů s GE.

Tab. 2: Hodnocení histologických změn sliznice podle Marsh-Oberhuberovy klasifikace

Marsh (Oberhuber) typ	Atrofie klků	Zvětšení krypt	Intraep. lymfocytů/100 enterocytů
0	v normě	NE	<40
1	v normě	NE	>40
2	v normě	ANO	>40
3a	mírná	ANO	>40
3b	částečná	ANO	>40
3c	totální	ANO	>40

Biopsie sliznice tenkého střeva je sice vyšetřením potvrzujícím diagnózu glutenové enteropatie, můžou se však při něm objevit nedostatky ztěžující její stanovení. Atrofie střevních klků bez zvýšené hladiny intraepiteliálních lymfocytů či normální sliznice se zachovanými klky a navýšeným množstvím intraepiteliálních lymfocytů může být způsobena infekcí, imunitním onemocněním či užíváním určitých léků (Walker *et al.*, 2017).

3.4.3 Genetická predispozice a genetické vyšetření

Za faktory ovlivňující genetickou predispozici k tomuto onemocnění jsou považovány lokusy na krátkém raménku 19. chromozomu a dlouhém raménku 2. a 5. chromozomu kódující molekuly zapojené do imunitní odpovědi organismu. Na rozvoj onemocnění mají však velmi malý vliv na rozdíl od genů HLA systému (viz. kapitola 4.2) (Megiorni *et Pizzuti*, 2012).

Pro drtivou většinu pacientů s GE je typická přítomnost specifické varianty genů HLA-DQA1 a HLA-DQB1, které kódují α a β řetězec glykoproteinů na povrchu antigen prezentujících buněk. Tyto specifické alely, nejčastěji HLA-DQA1*05-DQB1*02 (HLA-DQ2) a HLA-DQA1*03-DQB1*0302 (HLA-DQ8) jsou lokalizovány na krátkém raménku 6. chromozomu a jejich expresí vzniká heterodimer, který asociací s glutenovými peptidy podnítl buňky imunitního systému ke spuštění imunitní odpovědi (Megiorni *et al.*, 2009, Lebwohl *et al.*, 2018).

U nositelů určitých kombinací zmíněných alel je riziko vzniku onemocnění vyšší ve srovnání s jedinci nesoucími jiné varianty rizikových forem genů. Konkrétně osoby

s alelami DQA1*05-DQB1*02 a HLA-DQA1*03-DQB1*0302 nebo DQA1*05-DQB1*02 s alelou obsahující DQB1*02 jsou vystavení velmi vysokému riziku propuknutí onemocnění, zatímco nižší pravděpodobnost propuknutí nemoci mají osoby s HLA-DQA1-DQB1*02, u nichž jediná alela obsahuje DQB1*02 (Megiorni *et al.*, 2009).

Ukážou-li se výsledky dvou výše uvedených a běžně prováděných vyšetření u pacienta sporná či u rizikových skupin, jako jsou příímí příbuzní pacienta, využívá se k potvrzení diagnózy glutenové enteropatie HLA genotypizace. Pozitivní výsledek tohoto testu, tedy přítomnost alely HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8, či obou, však samostatně nedokazuje u vyšetřovaného diagnózu celiakie, neboť výše uvedené haplotypy se vyskytují i u zdravých osob, u které se celiakie zatím neprojevila. Negativní výsledek tohoto testování má pro diagnostiku větší význam, protože v případě rozporuplných výsledků biopsie tenkého střeva a sérologických testů, může HLA typizace onemocnění u jedince zcela vyloučit (Lebwohl *et al.*, 2018).

HLA typizací se nejčastěji zpracovává vzorek nesrážlivé krve pacienta s EDTA a pro určení HLA genotypu se obvykle využívá polymerázová řetězová reakce (SSP-PCR, RT-PCR) nebo reverzní dot blot metoda (Megiorni *et Pizzuti*, 2012).

4 Imunitní systém

Nedílnou součástí životaschopnosti organismu je jeho neustálá schopnost reagovat na podněty a přizpůsobit se měnícím se podmínkám okolního prostředí, s čímž souvisí i obrana organismu před cizorodými patogenními částicemi. Jedním ze systému schopných přijmu informací s následnou reakcí, který současně rozpozná škodlivinu od tělu nezávadné částice, je imunitní systém (IS). Kromě ochrany před vnějšími patogeny jsou jeho důležitými vlastnostmi tolerance vlastních buněk a odstranění starých či poškozených buněk.

Cizorodé částice vyvolávající imunitní odpověď organismu jsou označovány jako imunogeny. Imunoglobuliny neboli protilátky produkované B-lymfocyty nebo povrchové receptory T-lymfocytů se vážou specifickými vazebnými místy na strukturu na povrchu imunogenu tedy epitop nebo antigenní determinantu. Těsnost vazby mezi antigenní determinantou a variabilní oblastí protilátky podmiňuje její schopnost neutralizovat škodlivé částice a toxiny a tuto vazbu zprostředkovávají vodíkové můstky, Van der Waalsovy síly, elektrostatické síly nebo hydrofobní interakce. Specificita protilátek vůči antigenům může být velmi vysoká, a to především díky schopnosti rozlišit malé detaily v chemickém složení antigenu, v případě peptidových antigenů se může jednat o rozdíl až v jedné aminokyselině (Peakman *et* Vergani, 2009, Abbas *et al.*, 2017).

Jestli buňky specifického imunitního systému spustí imunitní reakci, nebo budou týž antigen tolerovat, závisí na okolnostech, při jakých je organismu vystaven, a na přítomnosti stimulujících faktorů. Selhání tolerance vůči vlastním složkám, a tedy vznik imunitní reakce proti organismu vlastním buňkám a molekulám vede k rozvoji autoimunitního onemocnění. Důležitou roli v rozvoji těchto patologických stavů mají určité skupiny genů nebo infekce, která aktivuje buňky imunitního systému, které poškodí vlastní tkáň, dvěma mechanismy. V prvním případě, rozsáhlá infekce v určité tkáni spustí lokální imunitní odezvu, dojde k nahromadění leukocytů v dané tkáni a antigen-prezentující buňky zahájí expresi stimulujících látek a cytokinů aktivujících T-lymfocyty, které však nejsou specifické pro patogeny vyvolávající infekci, což vede k selhání tolerance T-lymfocytů. Druhým mechanismem rozvoje autoimunity prostřednictvím infekčních patogenů je křížovou reakcí, kdy po prodělané infekci protilátky reagují proti vlastním proteinům, které jsou tvořeny krátkými shodnými úseky jako proteiny patogenů (Abbas *et al.*, 2017).

Buněčné složky vrozené imunity, která tvoří první ochranou bariéru před vnějšími patogeny, jsou aktivovány v řádu několika hodin a nevykazují téměř žádnou paměť a specifitu (Peakman *et* Vergani, 2009, Abbas *et al.*, 2017). Vrozený imunitní systém rozeznává

struktury sdílené více mikroorganismy, které jsou nezbytné pro jejich život, označované jako PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) (Hato *et al.*, 2015). Součástí vrozené imunitní odpovědi je jak fyzická bariéra, kterou představují buňky kůže, sliznice a ochranný hlen, tak humorální složky, komplement, lektiny, aglutininy, a buněčné složky zahrnující fagocytující, dendritické, NK a žírné buňky (Peakman *et al.*, 2009, Abbas *et al.*, 2017)

V řádu dní od proniknutí infekce do organismu se aktivuje získaná neboli specifická imunitní odpověď, která rozpozná antigeny prostřednictvím lymfocytů, které produkcí specifických molekul zajistí jejich likvidaci. Somatickou rekombinací genových segmentů uvnitř B-lymfocytů vzniká obrovská variabilita protilátek, díky které je specifický imunitní systém schopen rozeznat a zneškodnit velké množství různých antigenů. Opětovné vystavení organismu identické patogenní částici vyvolá silnější a masivnější imunitní odpověď, a to především díky nahromadění paměťových buněk, které se ve chvíli vystavení antigenu nachází v organismu ve větším množství než nativní lymfocyty (Abbas *et al.*, 2017).

4.1 Buňky a molekuly nespecifického imunitního systému a jejich vliv na rozvoj autoimunitní reakce

Ať už je imunitní reakce zacílená proti patogenům z vnějšího prostředí nebo namířená proti organismu vlastním molekulám či strukturám, jsou do ní v menší či větší míře zapojeny buňky a molekuly vrozené i získané imunity.

Jedněmi z nejdůležitějších molekul imunitního systému jsou cytokiny, polypeptidy s molekulovou hmotností 15–20 kDa, sloužící jako prostředek ke změně funkce buňky, kterou jsou produkovány, nebo buněk jiných. Každá molekula cytokinu má různý efekt na různé buňky a jejich spolupůsobením vyvolají mnohem větší efekt než každá samostatně. Hlavními dvěma typy těchto molekul podílejících se na imunitní odpovědi v gastrointestinálním traktu jsou interferony a interleukiny (Peakman *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2015).

Imunitní odpověď vrozeného systému zprostředkovává také komplement, skupina sérových proteinů cirkulujících v krevním řečišti v nefunkčním stavu, které vytváří aktivační kaskádu. Více než 40 proteinů tvořící součást komplementu jsou produkovány v játrech a lokálně i v místech zánětu. Aktivace komplementu je spojená s produkcí molekul s prozánětlivými účinky, rozpustností komplexu antigenu a protilátky a lyzí buněk. V případech autoimunitních onemocnění je zapojená především alternativní dráha komplementu, který je finálním zprostředkovatelem poškození tkáně (Peakman *et al.*, 2009, Laurence *et al.*, 2014).

Z pluripotentní kmenové buňky se vyvíjí dvě linie buněk spojené s imunitním systémem, myeloidní a lymfoidní. Prekurzor myeloidní buněčné linie dává vzniku buňkám, mezi něž patří neutrofilny, eosinofily, basofily, monocyty a dendritické buňky, zprostředkovávajícím nespecifickou imunitní odpověď (Peakman *et Vergani*, 2009).

Neutrofilní, eozinofilní a bazofilní granulocyty jsou lokalizovány v krevním řečišti a po jejich aktivaci a přesně řízeném procesu přemístění do cílové tkáně obsahem granul zabijí a zneškodňují specifické druhy patogenů. Neutrofilní granulocyty aktivované produkty buněčné stěny bakterií, proteiny komplementu, leukotrieny nebo cytokiny likvidují bakterie a plísně dvěma způsoby, prostřednictvím baktericidních látek a enzymů nebo produkcí reaktivních forem kyslíku, které narušují buněčné struktury mikroorganismů. Podobný mechanismus likvidace cizorodých patogenů, který je však vyvolán odlišnými chemickými látkami v granulocytech, využívají eozinofilní a bazofilní granulocyty. Zatímco eozinofily se zaměřují na likvidaci červovitých parazitů, sehrávají bazofilní granulocyty roli při alergických reakcích a v extrémních případech mohou vyvolat anafylaktický šok (Peakman *et al.*, 2009). V patogenezi autoimunitních onemocnění hrají největší roli neutrofilny, a to především schopností tvorby hnisu a tvorbou interleukinů (IL), IL-8, IL-1, IL-17, faktoru nekrotizujícího nádory (TNF) a chemokinů (Laurence *et Aringer*, 2014).

Monocyty vyvinuté z prekurzoru myeloidní linie kolují krátkou dobu svého života, 1-3 dny, v krevním řečišti a po přestupu do tkáně se mění v průběhu zánětu v makrofágy likvidující jeho následky v podobě poškozených buněk. Jsou schopny fagocytózy, podílejí se také na prezentaci antigenu buňkám specifické imunity a produkci cytokinů. V některých tkáních jsou makrofágy specializovanější, například ve vazivové vrstvě střevní sliznici, kde jsou zaměřeny více proti bakteriím (Peakman *et Vergani*, 2009). Kromě tvorby zánětu při autoimunitních onemocnění se jedná o výkonné buňky likvidace poškozených buněk v patologické autoimunitní trombocytopenii a hemolytické anémii (Laurence *et Aringer*, 2014).

Žírné buňky, mastocyty, podobně jako bazofilní granulocyty uzpůsobeny k produkci nízkomolekulárních aminů fungují jako účinné buňky produkující prozánětlivé cytokiny IL-6 a TNF- α . Jejich aktivaci zajišťují hlavně IgE protilátky a v přítomnosti interleukinu IL-33 mohou jejich podíl na zprostředkování imunitní odpovědi spustit protilátky IgG (Peakman *et al.*, 2009, Laurence *et Aringer*, 2014).

Z prekurzoru lymfoidní buněčné linie se stejně jako lymfocyty vyvíjí NK buňky, které však tvoří součást vrozené imunitní odpovědi. Sekrecí regulačních molekul a rozpustných faktorů ovlivňují vývoj specifické imunitní odpovědi a uvolňováním cytotoxických granulí

zabíjí nádorové buňky, zajišťují obranu proti intracelulárním patogenům a udržují imunitní homeostázu likvidací několika typů aktivovaných imunitních buněk, čímž zabraňují nadměrné imunitní odpovědi a vzniku autoimunitní odezvy. V patologických autoimunitních stavech dochází však k změně jejich cytotoxické aktivity (Zitti *et Bryceson*, 2018). Necirkulující buňky označeny protilátkami jsou předurčeny k likvidaci NK buňkami (Laurence *et Aringer*, 2014).

Díky velkému množství podtypů dendritických buněk, do nichž se myeloidní prekurzor také vyvíjí, disponují dendritické buňky širokou škálou funkcí a vzájemnými morfologickými odlišnostmi. Myeloidní a plasmacytoidní dendritické buňky v nezralé formě se primárně vyskytují v tkáních, v minimálním množství se vyskytují také v krvi (Peakman *et al.*, 2009). Exprimují obrovské množství různých druhů receptorů, díky nimž nejúčinněji ze všech buněk vrozené imunity rozpoznávají a vážou molekulové struktury spojené s patogeny a molekulové struktury produkované poškozenými nebo odumřelými buňkami. Kromě produkce cytokinů je jejich důležitou funkcí schopnost aktivovat T-lymfocyty a řídit jejich diferenciaci do specifických buněčných podtypů, které dále zprostředkovávají imunitní odezvu (Abbas *et al.*, 2017).

V gastrointestinálním traktu představuje vrozená imunita primárně především fyzickou a chemickou bariéru, kterou ve střevě tvoří hlavně pohárkovité buňky produkující muciny na vrcholcích střevních klků, M buňky a Panethovy buňky v kryptech produkující antibakteriální peptidy. Dendritické buňky jsou jedinými buňkami vrozeného imunitního systému lokalizovanými ve střevní slizniční vrstvě, které se podílí na humorální imunitě v gastrointestinálním traktu a u zdravých jedinců společně s makrofágy, které jsou stejně jako mastocyty součástí podslizniční vazivové vrstvy, zabraňují vzniku zánětu a udržují imunitní homeostázu (Abbas *et al.*, 2017).

Na patogenezi glutenové enteropatie se buňky vrozeného imunitního systému, především dendritické buňky, podílí hlavně produkcí IL-15 a interferonů typu 1. IL-15 v přítomnosti kyseliny retinové, která vzniká v těle jako meziprodukt metabolismu vitamínu A, podporuje vývojové rozlišení T-lymfocytů v subpopulaci produkující interferon gama (INF- γ), což následně vede k podnícení regulačních T-lymfocytů. Neregulovaná exprese interferonu typu 1 u pacientů trpících GE, často v důsledku prodělané virové infekce, vede k neschopnosti dendritických buněk tolerovat glutenové peptidy nebo aktivaci tkáňové transglutaminasy (Kim *et al.*, 2015). Zvýšení množství mastocytů, aktivovaných neimunogenním fragmentem gliadinu p31–43, pozorovatelné ve střevních lezích celiaků v porovnání s ostatními skupinami leukocytů přímo souvisí se závažností propuknutého

onemocnění. Mastocyty exprimující CD40 ligand a schopné produkce IL-6 ovlivňujícího aktivaci T-lymfocytů zodpovídají za rozvoj B-lymfocytů a podporují uvolňování izotypu protilátky IgA (Frossi *et al.*, 2017).

4.2 HLA systém

Podstatnou roli ve spuštění specifické buněčné imunitní odpovědi má mechanismus rozpoznání antigenu na povrchu antigen-prezentujících buněk T-lymfocytů. Všechny jaderné buňky organismu a zmíněné antigen-prezentující buňky obsahují geny kódující proteiny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), které umožňují vystavit extracelulární nebo intracelulární proteiny ze svých vnitřních struktur na povrchu buněčné membrány, kde jsou rozeznávány specifickým podtypem diferenciovaných T-lymfocytů. MHC molekuly, které se u člověka označují jako molekuly lidského leukocytárního antigenu (HLA), jsou rozlišovány do dvou hlavních skupin, MHC molekuly I. a II. třídy, přičemž antigen-prezentující buňky (antigen-presenting cells, APC), jako dendritické buňky, makrofágy a B-lymfocyty, exprimují na svém povrchu MHC molekuly II. třídy. HLA geny proteinů II. třídy se nachází na 3 lokusech na krátkém raménku 6. chromozomu označovaných jako HLA-DP, HLA-DQ a HLA-DR. Alely těchto genů jsou děděny jako haplotyp a předurčují, proti jakým antigenům se bude jejich nositel bránit. Molekula MHC proteinu II. třídy je na povrchu APC složena z α a β nekovalentně spojených řetězců, které vytváří prostor, do něhož se váže peptid vzniklý většinou degradací extracelulárního proteinu v endozomech a lysozomech (Abbas *et al.*, 2017).

Jak bylo zmíněno dříve, GE postihuje nositele určitých haplotypů více než jiné, což souvisí s mírou afinity jejich HLA molekul k deaminovaným glutenovým peptidům. Deaminace gliadinu je klíčovou modifikací zvyšující jeho afinitu k molekulám HLA-DQ2 a HLA-DQ8. Vazba negativně nabitých aminokyselin v peptidu k těmto molekulám umožňuje prezentaci gliadinu T-lymfocytům a spuštění specifické imunitní odpovědi (Sollid, 2017, Bodis *et al.*, 2018).

4.3 Buňky a molekuly specifického imunitního systému a jejich vliv na rozvoj autoimunitní reakce

Prezentace antigenu příslušnými buňkami vrozeného imunitního systému vede k spuštění specifické imunitní odezvy organismu, kterou zprostředkovávají buňky vyvinuté z prekursoru lymfoidní buněčné linie, B-lymfocyty a T-lymfocyty. S výjimkou intraepiteliálních lymfocytů jsou buňky specifického imunitního systému lokalizovány v podslizniční vazivové vrstvě střeva.

Jednotlivé lymfocyty exprimují na svém povrchu různé typy receptorů rozlišujících drobné rozdíly ve strukturách jednotlivých epitopů antigenů, což zajišťuje obrovskou specifitu imunitní odpovědi. Aktivací existující buňky specifické pro daný antigen dojde k stimulaci a proliferaci daného klonu a spuštění masivní imunitní odezvy proti tomuto antigenu.

Nezralé B-lymfocyty putují z kostní dřeně krví do sleziny, kde přes marginální zónu prostupují do bílé pulpy. Po jejich dozrání v této oblasti se vrací zpět do krevního oběhu, kterým putují dále do sekundárních lymfatických orgánů, kde se na rozhraní oblasti bohaté na T-lymfocyty a oblasti soustřeďující B-lymfocyty a v zárodečných centrech folikul setkávají s antigeny, kterými jsou aktivovány. V případě proteinových antigenů jsou B-lymfocyty k dozrání a diferenciaci aktivovány prostřednictvím T-lymfocytů. Vzniklé plazmatické buňky se přemísťují jak zpět do kostní dřeně, kde se z nich stává paměťová buňka, tak do tkání, kdy v případě plasmatických buněk produkujících IgA protilátky dochází v gastrointestinálním traktu k jejich umístění do Peyerových plaků. Celý proces vedoucí k diferenciaci B-lymfocytů do zralých plazmatických buněk umožňují specifické chemokiny, molekuly zajišťující přemísťování buněk mezi tkáněmi (Abbas *et al.*, 2017). Důležitou vlastností B-lymfocytů je jejich rozpoznatelnost, která je nezbytná hlavně pro prezentaci antigenu T-lymfocytům a kterou zajišťují jejich povrchové molekuly. Příkladem umožňujícím vazbu specifického antigenu na povrchu molekul je receptor B-lymfocytů. Přenos signálu po vazbě antigenu umožňují molekuly CD79 α a CD79 β nebo CD22 podporující interakci buněk při přenosu signálu (Peakman *et Vergani*, 2009). V případě, že B-lymfocyt rozezná nezávisle na T-lymfocytech tělu vlastní složku za antigen, dojde k aktivaci inhibičních receptoru a apoptóze B-lymfocytů či ztrátě jejich schopnosti reakce (Abbas *et al.*, 2017).

4.3.1 T-lymfocyty

Buněčně zprostředkovanou odpověď získaného imunitního systému vykonávají T-lymfocyty rozeznávající prostřednictvím svých receptorů (TCR) pouze antigeny vázané na povrchu jiných buněk molekulami MHC systému. Hlavní dvě skupiny těchto lymfocytů členěné na základě exprese povrchového proteinu představují CD4⁺ a CD8⁺ lymfocyty. Populace CD4⁺ lymfocytů produkuje cytokiny napomáhající makrofágům k fagocytóze a B-lymfocytům k tvorbě protilátek. Naopak CD8⁺ jsou uzpůsobeny k usmrcení buněk s intracelulárními patogeny (Abbas *et al.*, 2017).

Aktivace nativních T-lymfocytů, které dozrávají v brzlíku, probíhá v lymfatických uzlinách, skrz které kolují a kam jsou antigeny transportovány dendritickými buňkami. Spolu s molekulami prezentujícími antigen na povrchu buněk je k aktivaci T-lymfocytů zapotřebí

také přítomnost kostimulačních molekul. Zatím nejlépe popsanou skupinou těchto molekul exprimovaných na povrchu antigen prezentujících buněk umožňujících aktivaci nativních lymfocytů jsou ligandy CD28 povrchového receptoru T-lymfocytů, označované jako B7 (CD80 a CD86). Umocnění imunitní odpovědi zprostředkované těmito buňkami posílením jejich účinku vyvolává ligand receptoru CD40 exprimovaný na povrch CD4⁺ T-lymfocytů. Aktivované T-lymfocyty zůstávají buď v lymfatických orgánech, kde napomáhají diferenciaci B-lymfocytů, nebo putují do místa infekce, kde po opětovném vystavení antigenu vykonávají svou funkci (Abbas *et al.*, 2017).

Dlouhotrvající zánětlivá onemocnění vznikají důsledkem poruchy imunitního systému, k němuž obvykle dochází působením faktorů vnějšího prostředí společně s genetickými aspekty. Změny a poškození vzniklé při diferenciaci T-lymfocytů vedou k vzniku zánětlivých autoimunitních onemocnění (Zenewicz *et al.* 2009, Kim *et al.*, 2015). Patogeneze glutenové enteropatie je spojena s populací CD4⁺ T-lymfocytů, které zajišťují imunitní odpověď pacientů proti zmiňovanému imunogenu (Kim *et al.*, 2015).

V prostředí cytokinů produkovaných nejčastěji antigen-prezentujícími buňkami, TCR vyvolává změny v buňce vedoucí k diferenciaci v buněčné podtypy exprimující odlišné povrchové receptory. Pomocné T-lymfocyty (Th), jak je také CD4⁺ populace T-lymfocytů označována, se dále rozlišují do podtypů produkujících odlišné cytokiny, které dále rozvíjí imunitní odpověď nebo přímo uplatňují svoje účinky na tkáň (Zenewicz *et al.*, 2009).

V prostředí IL-12 a INF- γ se nativní T-lymfocyt vyvíjí do subpopulace označované jako Th1 eliminující vnitrobuněčné patogeny. Produkci velkého množství INF- γ aktivují makrofágy a sekrecí IL-2 se podílí na řízení imunitní odpovědi zprostředkované cytotoxickými CD8⁺ T-lymfocyty. Jedná se o subpopulaci, která je důležitá pro rozvoj některých autoimunitních a zánětlivých onemocnění, jehož příkladem je Crohnova nemoc. Ve spojení se zánětlivými střevními chorobami se nativní CD4⁺ T-lymfocyty vyvíjí také do subpopulací Th2, Th17, Th22 a regulačních T-lymfocytů (Treg) (Zenewicz *et al.*, 2009, Kamali *et al.*, 2019).

Diferenciaci do populace Th2 podněcují IL-4 a IL-2. Jedná se o populaci buněk sekretující IL-5, IL-6 a IL-13 a zlepšující produkci cytokinu IL-4, který řídí B-lymfocyty k tvorbě protilátek IgE umožňujících obranu organismu proti parazitům. Zesílením produkce toho cytokinu dochází k inhibici vývoje populací Th1 a Th17 (Kamali *et al.*, 2019, Abbas *et al.*, 2017).

Th22 subpopulaci, vznikající v přítomnosti TNF- α a IL-6 a jejíž vývoj je zprostředkován přes aryluhlovodíkový receptor (AhR), charakterizuje produkce IL-22, IL-13

a TNF- α . Th22 a IL-22 hrají důležitou roli v obraně proti virové infekci a ochraně střevní sliznice proti zánětu. Patogenní vlastnosti tohoto interleukinu se mohou projevit v případě, dochází-li k jeho sekreci společně s jiným prozánětlivým cytokinem, kterým je zejména IL-17 (Azizi *et al.*, 2015, Kamali *et al.*, 2019).

Regulační FoxP3⁺ T-lymfocyty jsou podskupinou CD4⁺ T-lymfocytů vyvíjející se v prostředí transformujícího růstového faktoru (TGF) β a IL-12 (Zenewicz *et al.*, 2009, Kamali *et al.*, 2019). Ligandem aktivovaný AhR je schopný aktivace této podskupiny FoxP3⁺ Treg (Maddur *et al.*, 2012). Mezi nejdůležitější produkované cytokiny patří IL-10 a TGF- β podílející se na navození a udržení imunologické tolerance, potlačují zánět, regulují imunitní odpověď, udržují střevní rovnováhu a modulují funkci dendritických buněk (Zenewicz *et al.*, 2009, Kamali *et al.*, 2019).

4.3.2 Th17 lymfocyty

Th17 lymfocyty mají rozhodující roli ve vyvolání zánětu v tkáni, který je znakem mnoha autoimunitních a střevních zánětlivých onemocnění (Zenewicz *et al.*, 2009, Kamali *et al.*, 2019). Jedná se o důležité zprostředkovatele imunitní odpovědi proti extracelulárním a intracelulárním bakteriím, plísním, virům a hrají rozhodující roli v ochraně slizniční rovnováhy. Vývojová linie Th17 lymfocytů není pevně stanovená a vlivem prostředí je schopna přeměny do jiné vývojové subpopulace. Jejich přeměna je umožněna do linií Th1, Th2, Treg a pomocných folikulárních T-lymfocytů (TFH), čímž poskytují rozmanitou funkční odpověď. Th17 vývojová linie může vyvolat vznik linie označované jako Th17-1 schopné nápomoci k sekreci IgM, IgG a IgA protilátek B-lymfocyty s minimální cytotoxicitou ve srovnání s Th1, čímž jsou zapojeny do zánětlivých imunitních odpovědí a aktivně se podílí na rozvoji některých autoimunitních onemocnění (Kamali *et al.*, 2019).

Mezi hlavní produkované cytokiny patří IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNF- α , INF- γ a faktor stimulující granulocyty a makrofágy. IL-17 zajišťují aktivaci a migraci neutrofilů a mohou se zaměřit na buňky endotelu, buňky hladkého svalstva dýchacích cest a buňky epitelu, u kterých vyvolají tvorbu molekul podporujících tvorbu zánětu. Jejich funkcí je také regulace zárodečného centra tvorby a produkce vlastních protilátek. IL-22 produkovaný také v závěrečné fázi diferenciaci Th17 lymfocytu vytváří antimikrobiální účinné látky a je klíčový pro vytvoření imunologické bariéry epiteliálních buněk (Maddur *et al.*, 2012). Kromě jeho sekrece buňkami T-lymfocytů, zejména Th17 populace, se na jejich produkci podílí také NK buňky a intraepiteliální lymfocyty a dochází k ní v epiteliálních tkáních, hlavně kůže a gastrointestinálního traktu (Abbas *et al.*, 2017). Důležitou roli v jeho expresi zastává AhR.

IL-21 v kombinaci s IL-7 a IL-15 podněcuje tvorbu a diferenciaci CD8⁺ T-lymfocytů, zajišťuje diferenciaci B-lymfocytů, ovlivňuje diferenciaci a cytotoxicitu NK buněk a produkci IL-8 dendritickými buňkami a makrofágy. Chemokin označovaný jako CCL20, jehož receptory jsou exprimovány dendritickými buňkami, B-lymfocyty a podskupinami T-lymfocytů, slouží jako antimikrobiální a chemoatraktivní faktor v místě zánětu. IL-17 může navodit produkci CCL20 v tkáních a Th17 populace, která exprimuje receptor pro tento chemokin, může podpořit vývoj zánětu (Maddur *et al.*, 2012).

4.3.2.1 Diferenciace Th17 lymfocytů

Diferenciace CD4⁺ do Th17 subpopulace umožňují IL-6, IL-1 a IL-23 produkované dendritickými buňkami v reakci na výše zmíněné patogeny. Zatímco IL-1 a IL-6 jsou nezbytnými cytokiny v první fázi diferenciaci, IL-23 je podstatný při dotvoření a udržení rozlišených Th17 lymfocytů. Běžně protizánětlivý TGF- β v prostředí IL-1 a IL-6 se stává faktorem podporujícím rozvoj prozánětlivých Th17 lymfocytů. Zmíněné cytokiny aktivují molekuly transkripčních faktorů ROR γ T (Retinoid-related Orphan Receptor γ T) a STAT3 (Signal Transducer and Activator Transcription 3) (Abbas *et al.*, 2017). TGF- β je také současně nezbytný pro aktivaci signální dráhy vedoucí k expresi transkripčního faktoru FoxP3 (Forkhead Box P 3) umožňujícího produkci regulačních T-lymfocytů udržujících imunitní toleranci. V nepřítomnosti zánětu dochází k potlačení specifického transkripčního faktoru ROR γ T a prosazení exprese FoxP3. Přítomnost výše zmíněných interleukinů umožňuje fosforylaci STAT3 a inhibici tlumivého účinku FoxP3 na ROR γ T, což následně vede k vývoji Th17 lymfocytů. Vazba transkripčních faktorů STAT3, ROR γ T a Runx1 (Runt-related transcription factor 1) do promotorových oblastí specifických genů vede k expresi IL-17, IL-21 a chemokinu CCL20. INF- γ , IL-2 a IL-27 se naopak podílí na inhibici a blokaci zmíněných transkripčních faktorů a potlačují vývoj Th17 lymfocytů. IL-2 a IL-27 zodpovídají za aktivaci STAT5 a STAT1, čímž inhibují STAT3. INF- γ se naopak podílí na blokaci transkripčního faktoru blokujícího ROR γ T (Maddur *et al.*, 2012).

5 Vliv prostředí tenkého střeva na rozvoj onemocnění

Glutenová enteropatie je onemocnění, které primárně poškozuje tenké střevo, a proto je jeho prostředí klíčovým faktorem v rozvoji a průběhu onemocnění.

Tenké střevo ohraničuje vrstva epitelálních buněk spojených těsnými spoji, která reguluje absorpci živin a iontů a brání organismus před toxiny, mikroorganismy a antigeny přítomnými v lumenu střeva. Těsné spoje mezi sousedními buňkami tvoří interagující transmembránové proteiny, které zahrnují occludiny, claudiny, spojovací adhezní molekuly (JAM), tricelluliny a anguliny, s intracelulárními zonula occludens (ZO) proteiny, které vytváří strukturní podporu těsných spojů. Skrz mimobuněčný prostor prostupuje asi 10 % všech proteinů, a to buď v neporušeném stavu, nebo jako částečně natrávené peptidy, což je spojeno s modulací těsných spojů (Sturgeon *et Fasano*, 2016).

5.1 Celistvost střevních slizniční bariéry a její proměny v patogenezi celiakie

Prekurzor haptoglobinu 2, zonulin, k jehož expresi dochází v buňkách střevní epitelální vrstvy, ovlivňuje propustnost těsných spojů mezibuněčných prostor v *jejunu* a *ileu*. Narušení běžného složení střevního mikrobiomu může vyvolat uvolnění zonulinu a zvýšit střevní propustnost. K vylučování zonulinu ze střevních epitelálních buněk dochází i v přítomnosti gliadinu, který vazbou na chemokinový receptor CXCR3 exprimovaný na povrch membrány enterocytů směrem do lumenu střeva spustí signální dráhu vedoucí k jeho uvolňování. Nevhodná produkce zvýšeného množství zonulinu vede k rozrušení těsného spojení buněk a narušení bariéry, po němž následuje nekontrolovatelný transport gliadinu skrz slizniční bariéru a spuštění odpovědi vrozeného imunitního systému, s čímž souvisí produkce prozánětlivých cytokinů INF- γ a TNF- α , které způsobují další narušování těsných spojení buněk a nekontrolovatelný prostup antigenu. TNF- α ovlivňuje a narušuje střevní bariéru prostřednictvím kinázy lehkého řetězce myosinu (EC 2.7.11.18). INF- γ zvyšuje střevní propustnost změnami exprese a umístěním proteinů těsného spojení a přeuspořádáním cytoskeletu (Sturgeon *et Fasano*, 2016, Yoosuf *et Makharia*, 2019).

Zonulin je ligandem pro receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR). Tento faktor může modulovat aktin cytoskeletu a díky podobnému strukturálnímu a sekvenčnímu motivu má zonulin podobné účinky. Zonulin obsahuje sekvenci aktivující proteinasou aktivovaný receptor 2 (PAR2), který zvyšuje propustnost přemístěním ZO proteinů a occludinu z mezibuněčného prostoru (Sturgeon *et Fasano*, 2016).

5.2 Vliv střevní mikroflóry a virové infekce na rozvoj celiakie

Ve fyziologii trávicí soustavy hraje důležitou roli střevní mikroflóra. Kromě jejího přispívání k trávení potravy se také podílí na tvorbě některých vitamínů skupiny B a vitamínu K (LeBlanck *et al.*, 2013), zachování strukturní celistvosti střevní slizniční bariéry, ovlivnění střevní propustnosti prostřednictvím zonulinu (Cristofori *et al.*, 2018) a vývoji buněk imunitního systému nebo formování například Peyerových plaků (Krishnareddy, 2019). Funkcí střevních mikroflóry je i schopnost předcházet nenormální zánětlivé reakci zabráněním aktivace makrofágů a regulovat poměr některých subpopulací T-lymfocytů (Sacchetti *et Nardelli*, 2019).

Složení střevního mikrobiomu není u všech jedinců zcela identické. Skladba mikroorganismů nejen v našich střevech je ovlivněna hlavně životním stylem a stravou, užíváním léků a dalšími faktory prostředí. I přes odlišnosti ve složení střevní mikroflóry mezi jednotlivci jsou u dětí i dospělých trpících GE pozorovatelné absence nebo snížené množství či naopak zvýšený výskyt některých běžně se vyskytujících druhů bakterií ve srovnání se zdravými jedinci (Sacchetti *et Nardelli*, 2019). Narušení výskytu některých mikroorganismů ve střevě přetrvává a není ovlivněno dodržováním bezlepkové diety, zatímco přítomnost jiných se vrátí k normálnímu stavu jedince (Cristofori *et al.*, 2018). Příkladem sníženého množství bakterií v dvanáctníku tenkého střeva celiaka jsou bakterie rodu *Streptococcus*, *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, v nadbytku v porovnání se zdravými jedinci se vyskytují některé bakterie řazené do kmene *Proteobacteria* (Scher, 2016, Sacchetti *et Nardelli*, 2019).

Genotyp HLA ovlivňuje prvotní kolonizaci střeva mikroorganismy a hraje roli v narušení složení střevní mikroflóry (Girbovan *et al.*, 2017). Protizánětlivá reakce jedince je spjata s mikroorganismy jejich produkcí krátkých řetězců mastných kyselin, které mohou ovlivnit diferenciaci prekurzové buňky v subpopulaci regulačních T-lymfocytů. Role mikroorganismů spočívá také v regulaci rovnováhy mezi dalšími subpopulacemi CD4⁺ T-lymfocytů, její mechanismus však není zcela objasněn. Složení mikroorganismů tedy specificky ovlivňuje i diferenciaci Th17 lymfocytů zapojených do zánětlivé reakce vůči deaminovaným gliadinovým peptidům (Krishnareddy, 2019).

Jako možný faktor rozvoje patogeneze GE zodpovědný za pozměnění imunitní odpovědi a rozeznání deaminovaných gliadinových peptidů jako antigen je považovaná virová infekce gastrointestinálního traktu, která může narušit střevní imunitní homeostázu. Kromě výše zmíněných dvou mechanismů rozvoje autoimunitního onemocnění (viz. kapitola 4), může dojít také k produkci vlastních antigenů tkání, jež byla poškozena virovou infekcí

(Smatti *et al.*, 2019). Složení střevního mikrobiomu je tedy neopomenutelným faktorem, jehož změny mohou přispívat k rozvoji celiakie (Girbovan *et al.*, 2017).

6 Aryluhlovodíkový receptor

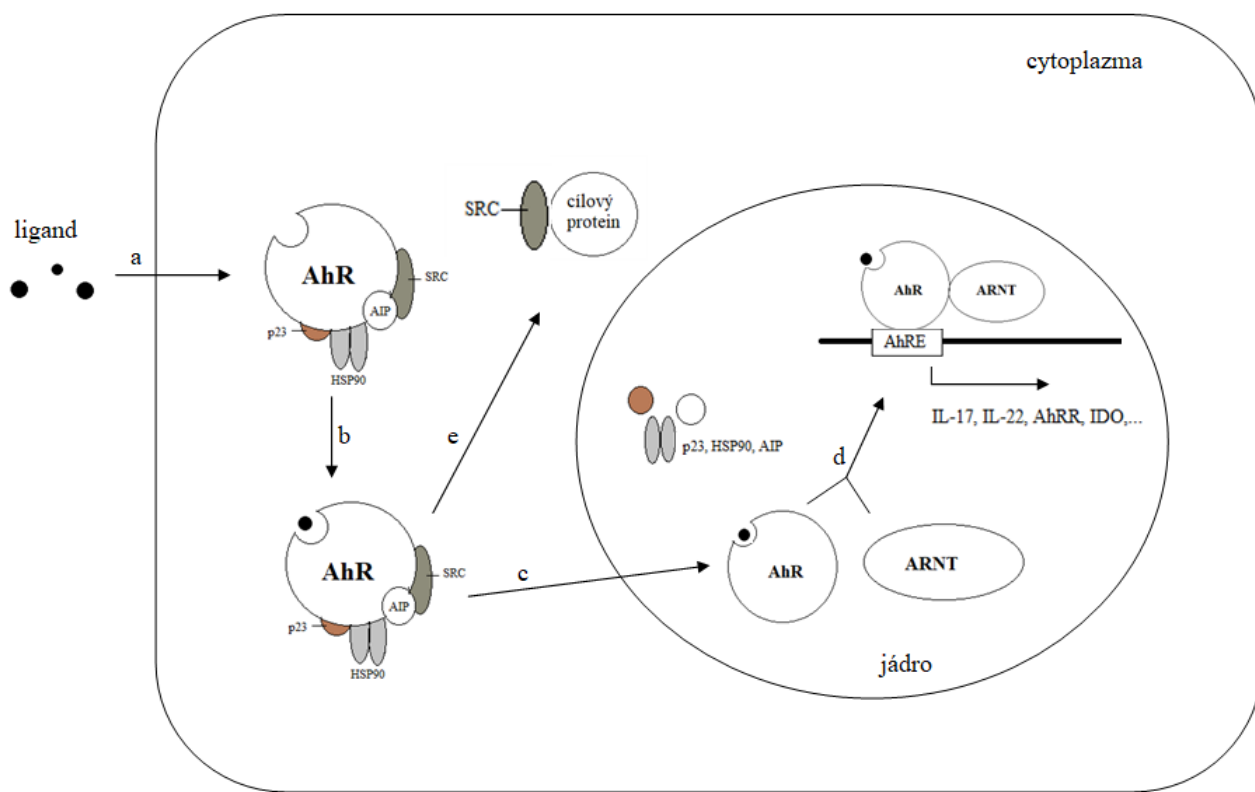
Aryluhlovodíkový receptor (AhR) je transkripční faktor řazený k bHLH/PAS (basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim) rodině proteinů, který moduluje odpověď na podněty z okolního prostředí a je aktivovatelný exogenními i endogenními ligandy (Esser *et al.*, 2009, Zhou, 2016, Cervantes-Barragan *et Colonna*, 2018, Neavin *et al.*, 2018). AhR reguluje expresi enzymů cytochromu P450, které se podílí na metabolismu xenobiotik (Esser *et al.*, 2018, Cervantes-Barragan *et Colonna*, 2018). Další důležitou funkcí AhR je regulace vývoje a funkce buněk vrozené a specifické imunitní odpovědi (Zhou, 2016, Esser *et al.*, 2018). AhR je také zapojen do reprodukce, vývinu orgánů, do chemické a mikrobiální obrany organismu a funguje také jako ubiquitin E3 ligasa zajišťující proteasomální degradaci vybraných proteinů (Busbee *et al.*, 2013, Bock 2019).

K vysoké expresi AhR dochází v tkáních tvořících bariéru ve styku s vnějším prostředím, u buněk imunitního systému a strukturních buněk epitelu nebo také v hepatocytech. Podněty z okolí, kterými jsou u buněk imunitního systému například cytokiny IL-6, IL-21 nebo TNF- β , regulují expresi AhR (Zhou, 2016).

6.1 Struktura a aktivace AhR

Jak bylo výše zmíněno, AhR je řazen do rodiny proteinu bHLH/PAS. PAS doména je v centrální oblasti tvořena dvěma repetitivními sousedícími oblastmi, PAS A a PAS B. Doména PAS A je zapojena do vazby s ARNT (aryl hydrocarbon receptor translocator) a PAS B umožňuje vazbu ligandů. Doména bHLH blíže k N-terminálnímu konci se váže k specifickým oblastem DNA, je zapojena do vazby s ARNT a interaguje s chaperony (Kewley *et al.*, 2004, Laringot *et al.*, 2018). Koaktivátory interagují s AhR prostřednictvím C-terminální oblasti bohaté na glutamát, aspartát, glutamin, serin, threonin a prolin (Laringot *et al.*, 2018). V neaktivovaném stavu je AhR lokalizován v cytoplazmě, kde vytváří komplex s chaperony, dvěma HSP90 (heat-shock protein 90 kDa), AIP (aryl hydrocarbon interacting protein), p23 a ARA9 (AhR-associated protein 9) (Larigot *et al.*, 2018, Busbee *et al.*, 2013). Po vazbě ligandu dojde k uvolnění AhR z komplexu s uvedenými proteiny a jeho přemístění do jádra, kde vazbou s dalším transkripčním faktorem z rodiny bHLH/PAS ARNT, vytváří heterodimer AhR-ARNT, který se váže do specifických oblastí DNA 5'-GCGTG-3' označovaných jako AhRE (AhR responsive elements), DRE (dioxin-responsive elements) nebo XRE (xenobiotic response elements), které se nachází v promotorových oblastech

velkého množství cílových genů, a vyvolá nebo reguluje jejich transkripci (obr. 6) (Neavin *et al.*, 2018, Zhou 2016).



Obr. 6: Schéma signální dráhy AhR vedoucí k aktivaci cílových genů

(a) Ligand AhR je přes buněčnou membránu transportován do cytoplazmy. (b) Ligand se naváže do komplexu AhR s chaperony v cytoplasmě. (c) Dojde k transportu vzniklého komplexu do jádra. (d) Ligandem aktivovaný AhR se uvolní z komplexu s proteiny, naváže ARNT a vzniklý komplex AhR-ARNT se naváže do specifických oblastí AhRE (DRE/XRE) v DNA. (e) V cytoplasmě dojde k uvolnění SRC kinázy a fosforylaci cílových proteinů.

Vlastní zpracování na základě informací z citovaných literárních zdrojů.

Po skončení transkripce příslušných genů dochází k transportu AhR-ARNT z jádra a následné postupné proteosomální degradaci ubiquitinovaného AhR v cytoplasmě. Jedním z cílových genů komplexu AhR-ARNT je i gen pro represorový protein aryluhlovodíkového receptoru (AhRR), který je strukturně podobný AhR. Obsahuje bHLH doménu, kterou se váže na DNA, PAS A doménu zajišťující vznik dimeru, ale liší se absencí PAS B domény, díky čemuž není schopný vázat ligand, a v C-terminální oblasti obsahuje doménu pro vazbu korepresorů. Transkripční aktivita AhR je potlačena vazbou AhRR k ARNT a XRE (Busbee *et al.*, 2013, Laringot *et al.*, 2018).

AhR může řídit genovou expresi i nepřímo prostřednictvím dalších proteinů a regulačních RNA. AhR interaguje s jinými transkripčními faktory, například NF- κ B (nuclear factor κ), c-Maf, receptorem pro kyselinu retinovou (RAR), estrogenovým

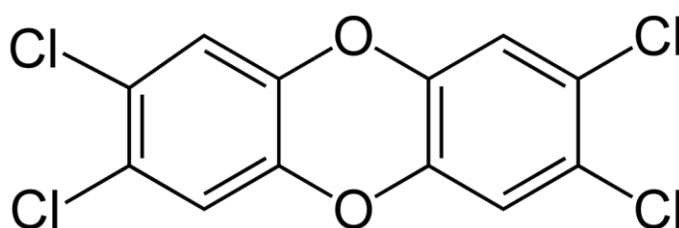
receptorem (ER), E2F a retinoblastomovým proteinem (Rb1), může modulovat jejich aktivitu, a tedy i expresi jejich cílových genů (Esser *et al.*, 2009, Gutiérrez-Vázquez *et Quintana*, 2018, Rothhammer *et Quintana*, 2019).

Prostřednictvím SRC kinázy uvolněné z komplexu AhR s proteiny může dojít k fosforylaci řady cílových proteinů, které mohou ovlivnit jiné signální dráhy (Gutiérrez-Vázquez *et Quintana*, 2018, Rothhammer *et Quintana*, 2019).

6.2 Ligandy AhR

Aryluhlovodíkový receptor může vázat širokou škálu různorodých chemických látek, které se liší strukturou a afinitou (Busbee *et al.*, 2014, Neavin *et al.*, 2018). Syntetické exogenní ligandy vznikají nebiologickými procesy, zatímco přírodní exogenní ligandy AhR jsou součástí přijímané stravy. Endogenní ligandy vytváří organismy přirozenými procesy v těle (Burezq, 2018).

Velké množství studií se zaměřuje na působnost exogenních ligandů, které jsou obvykle součástí látek znečišťujících životní prostředí, na aktivaci AhR. K těmto ligandům jsou řazeny polycyklické aromatické uhlovodíky a halogenované aromatické uhlovodíky, mezi něž patří 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), jehož strukturální vzorec vidíme na obrázku 7, první objevený ligand AhR považovaný za jeden z agonistů s největší potencí (Gutiérrez-Vázquez *et Quintana*, 2018, Burezq, 2018). TCDD je ligand s imunotoxickými a imunosupresivními účinky podporující vývoj regulačních T-lymfocytů a díky své afinitě se stal prototypem pro studium aktivity AhR (Busbee *et al.*, 2014).



Obr. 7: Strukturální vzorec 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

Převzato z internetové stránky: <https://cymitquimica.com/products/04-GA09011171TO/1746-01-6/2378-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-10-gml-in-toluene/>

Střevo je orgánem, který je primárně vystaven požitým exogenním ligandům i v těle vznikajícím endogenním ligandům AhR stejně jako potencionálním patogenům. Jak bylo zmíněno výše, střevní imunitní systém odděluje od těchto vnějších vlivů jednovrstevný epitel s vrstvou ochranného hlenu.

Přírodní ligandy jsou méně toxické a ve srovnání se syntetickými ligandy vykazují nižší afinitu k aryluhlovodíkovému receptoru (Busbee *et al.*, 2013). Příkladem ligandů AhR důležitých pro imunitní systém jsou metabolity tryptofanu, sloučeniny obsažené v rostlinách, bilirubin, biliverdin a metabolity kyseliny arachidonové. Velké množství těchto agonistů pochází ze stravy a některé z nich jsou produkty enzymatické aktivity organismu či produkty metabolismu střevních mikroorganismů (Cervantes-Barragan *et Colonna*, 2018, Gutiérrez-Vázquez *et Quintana*, 2018).

Ovoce, zelenina a nápoje rostlinného původu obsahují polyfenolické látky, flavonoidy a další sloučeniny, jako například kurkumin a resveratrol (3,4',5-trihydroxystilben), které aktivují AhR a modulují odezvu imunitního systému potlačením prozánětlivých cytokinů, jako je TNF- α , IL-6 a IL-1 β (Busbee *et al.*, 2013). S výjimkou některých, například quercetinu či tangeritinu, je většina flavonoidů antagonisty AhR (Denison *et Navy*, 2003).

Indol-3-karbinol (I3C) a indol-3-acetonitril jsou příklady prekursorů ligandů vznikajících enzymatickým rozkladem glukobrassicinu obsaženého například v brokolici nebo kvěťáku. Deriváty I3C, 3,3'-diindolylmethan a indolo[3,2-b]karbazol (ICZ) jsou klíčové pro vývoj střevních intraepiteliálních lymfocytů a udržení celistvosti střevní slizniční bariéry (Cervantes-Barragan *et Colonna*, 2018, Gutiérrez-Vázquez *et Quintana*, 2018). Oba kondenzační produkty I3C působí agonisticky k AhR, přičemž ICZ je ligandem s nejvyšší potencí ze všech objevených přírodních ligandů AhR (Denison *et Navy*, 2003).

Významným zdrojem endogenních ligandů AhR, které jsou zapojeny v imunitní a zánětlivé odpovědi organismu a udržení funkce střevní slizniční bariéry, je esenciální aminokyselina tryptofan (Neavin *et al.*, 2018). Tryptofan je v těle metabolizován několika degradačními dráhami, které vytváří převážně agonisty AhR (Denison *et Nagy*, 2003, Stockinger *et al.*, 2014). Hlavní dráha je zprostředkována enzymy indolamin-2,3-dioxygenasou (IDO) a tryptofan 2,3-dioxygenasou, které přeměňují většinu tryptofanu až na kynurenin, který v organismu dále podléhá degradaci. *In vitro* kynurenin podporuje TGF- β indukovanou diferenciaci Treg a potlačuje produkci prozánětlivých cytokinů dendritickými buňkami (Gutiérrez-Vázquez *et Quintana*, 2018, Snide *et McGaha*, 2018, Zhou, 2016). Malá část tryptofanu je prostřednictvím tryptofan hydroxylasy 1 přeměněna na serotonin (Taleb, 2019).

Další skupina ligandů z tryptofanu přijímaného v potravě je produkována mikrobiálním metabolismem. Působením enzymu tryptofanasy, který je exprimovaný řadou bakterií, které jsou součástí mikroflóry osídlující gastrointestinální trakt, dochází k přeměně tryptofanu na tryptamin a deriváty indolu. Jako endogenní ligandy AhR, tryptamin, kyselina

indol-3-octová a indol-3-aldehyd udržují integritu střevní slizniční bariéry a homeostázu buněk imunitního systému (Taleb, 2019). Kromě udržování střevní homeostázy je indol-3-aldehyd zodpovědný za zhoršování zánětu postihujícího trávicí trakt při střevních zánětlivých onemocněních (Gutiérrez-Vázquez *et* Quintana, 2018).

Působením ultrafialového záření dochází k přeměně tryptofanu na 6-formylindolo[3,2-b]karbazol (FICZ), ligand s vysokou afinitou k AhR. FICZ může v organismu vzniknout také enzymatickou deaminací tryptaminu nebo oxidací intracelulárními oxidanty. Jedná se o ligand, který prostřednictvím AhR podporuje diferenciaci subpopulace Th17 lymfocytů (Zhou, 2016, Gutiérrez-Vázquez *et* Quintana, 2018).

V závislosti na typu ligandu aktivujícího AhR, může tento receptor ovlivňovat buněčnou odpověď s rozlišným efektem na zánět zprostředkovaný T-lymfocyty (Busbee *et al.* 2014, Rothhammer *et* Quintana, 2019).

6.3 AhR v buňkách imunitního systému

AhR je klíčovým transkripčním faktorem modulujícím fyziologickou funkci IS a podílí se na vývoji či funkci buněk získaného imunitního systému, vrozených lymfoidních buněk, obraně proti bakteriím a na dalších funkcích jako je prezentace antigenu či migraci buněk skrz tkáň (Esser *et al.*, 2018). AhR má důležitou roli v regulaci autoimunitního zánětu střeva, pojivové tkáně či kůže (Wheeler *et al.*, 2017). Důsledkem jeho aktivace je pozměněna diferenciaci buněk IS v brzlíku vedoucí k zvýšení výskytu určitých subpopulací nebo například nenormální sekreci cytokinů (Esser, 2009).

AhR je exprimován některými buňkami vrozené i získané imunity, a to makrofágy, neutrofilními granulocyty, mastocyty, dendritickými buňkami a B- i T-lymfocyty (Busbee *et al.*, 2013, Lamas *et al.*, 2018, Bock, 2019). Nejvyšší exprese AhR byla zaznamenána u CD4⁺ T-lymfocytů v subpopulaci Th17 a regulačních T-lymfocytech a téměř nedetekovatelná v subpopulacích Th1 nebo Th2 (Zhou, 2016, Rothhammer *et* Quintana, 2019).

Jak bylo zmíněno výše, za prezentaci antigenu buňkám specifického IS a vývojovému rozlišení T-lymfocytů do subpopulace Th17 jsou zodpovědné v největší míře dendritické buňky. V těchto buňkách ligandem aktivovaný AhR ovlivňuje expresiIDO produkující kynurenin degradací tryptofanu, čímž podporuje diferenciaci v regulační FoxP3⁺ T-lymfocyty (Cella *et* Colonna, 2015, Rothhammer *et* Quintana, 2019). AhR v těchto buňkách tlumí

produkcii cytokinů podporujících vývoj patogenních populací T-lymfocytů a redukuje expresi molekul MHC II (Rothhammer *et* Quintana, 2019). *In vivo* studie ukázala, že I3C má imunosupresivní a protizánětlivý efekt na dendritické buňky (Burezq, 2018).

K vysoké expresi AhR dochází hlavně v regulačních T-lymfocytech, FoxP3⁺ Treg a regulačních T-lymfocytech typu 1 (T_{R1}). Vazbou aktivovaného AhR prostřednictvím TCDD do FoxP3 lokusu dochází v regulačních FoxP3⁺ T-lymfocytech k ovlivnění transkripce faktoru FoxP3 a zlepšení diferenciaci FoxP3⁺ Treg. AhR řídí v těchto buňkách také expresi IL-10, IL-21 a CD39 (Rothhammer *et* Quintana, 2019). Aktivace buněk ve střevní slizniční vazivové vrstvě, mezi něž spadá i FoxP3⁺ Treg, prostřednictvím AhR vede k omezení prozánětlivých cytokinů (Zhou, 2016). AhR podporuje také diferenciaci T_{R1} a jejich supresivní aktivitu v reakci na IL-27 (Rothhammer *et* Quintana, 2019). AhR v přítomnosti IL-27 společně s transkripčním faktorem c-Maf aktivuje IL-21 a IL-10, což vede ke vzniku T_{R1} a potlačení autoimunity (Cella *et* Colonna, 2015, Zhou, 2016, Cervantes-Barragan *et* Colonna, 2018).

V populaci Th22 CD4⁺ T-lymfocytů, jejíž diferenciaci je zahájena v přítomnosti IL-6, IL-21 nebo IL-23, ovlivňuje AhR především produkci IL-22 a dalších faktorů modulujících jejich funkci (Gutiérrez-Vázquez *et* Quintana, 2018).

6.3.1 Úloha AhR v Th17 lymfocytech

Subpopulace Th17 lymfocytů je považována za patogenní v autoimunitních onemocněních a produkcí IL-17 a IL-22 podporuje zánět v tkáni a její poškození (Qui *et* Zhou, 2013). FICZ, jako agonista AhR, zlepšuje rozvoj lidských Th17 lymfocytů a u *in vivo* modelů autoimunitního onemocnění došlo vlivem účinku FICZ k zhoršení jejich průběhu (Rothhammer *et* Quintana, 2019). Expresi AhR řídí STAT3 aktivovaný IL-6 a IL-21 při vývojovém rozlišení zmíněné subpopulace.

Diferencující se subpopulace lymfocytů Th17 exprimuje vysokou hladinu aryluhlovodíkového receptoru a u těchto buněk dochází ke zvýšené expresi IL-17A, IL-17F (Rothhammer *et* Quintana, 2019), pro jejichž produkci je vazba AhR do promotorových oblastí nezbytná (Esser, 2009, Gutiérrez-Vázquez *et* Quintana, 2018).

Společně s transkripčním faktorem ROR γ T se AhR váže do promotorových oblastí a indukuje expresi IL-22 subpopulací Th17. AhR také inhibuje aktivaci STAT1 a STAT5 a ve spojení se STAT3 indukuje expresi transkripčního faktoru Aiolos, který tlumí expresi IL-2, a tak omezuje jeho rušivý efekt na diferenciaci Th17 linie přes transkripční faktor

STAT5 (Zhou, 2016, Gutiérrez-Vázquez *et* Quintana, 2018, Cervantes-Barragan *et* Colonna, 2018, Rothhammer *et* Quintana, 2019).

6.4 AhR ve střevě

Kromě zmíněných buněk imunitního systému, v nichž je AhR nejvíce exprimován, je AhR ve střevě exprimovaný také epiteliálními buňkami, intraepiteliálními lymfocyty a vrozenými lymfoidními buňkami (Rothhammer *et* Quintana, 2019).

Expresi AhR ve střevních epiteliálních buňkách podporuje proliferaci těchto buněk, zlepšuje expresi proteinu těsných spojů epiteliálních buněk, čímž zlepšuje integritu střevní bariéry, a ovlivňuje produkci antimikrobiálních proteinů. Střevní epiteliální buňky také ovlivňují dostupnost ligandů AhR střevním imunitním buňkám (Lamas *et al.*, 2018).

V epiteliální vrstvě tenkého střeva je AhR signální dráha nezbytná k vývoji a zachování různorodých populací T-lymfocytů, které regulují první obrannou imunitní reakci a udržují homeostázu v tkáni (Gutiérrez-Vázquez *et* Quintana, 2018, Cervantes-Barragan *et* Colonna, 2018). Intraepiteliální lymfocyty exprimující na svém povrchu $\gamma\delta$ T receptor jsou dalším hlavním producentem IL-22, u něhož je AhR pro expresi tohoto interleukinu klíčový (Qiu *et* Zhou, 2013, Gutiérrez-Vázquez *et* Quintana, 2018).

Vrozené lymfoidní buňky typu 3 jsou další střevní obrannou linií a jedná se také o heterogenní populaci imunitních buněk zajišťující homeostázu. AhR se významně podílí na regulaci těchto buněk a ovlivňuje jejich produkci IL-22. U *in vivo* modelů s deficiencí AhR došlo k redukci této lymfoidní linie produkující IL-22 (Rothhammer *et* Quintana, 2019).

7 Laboratorní *in vitro* metody při studiu patogeneze celiakie

Současné studie zabývající se patogenezi glutenové enteropatie využívá jako biologický materiál ke studiu nejčastěji vzorky pacientů, u nichž došlo k rozvoji onemocnění.

Vliv změny vnitrobuněčného vezikulárního transportu na citlivost buněk celiaků k zánětlivé odpovědi na gliadinové peptidy byla v nedávné době studována na tkáňových kulturách, fragmentech *duodena* získaných od pacientů s glutenovou enteropatií a pacientů s glutenovou enteropatií dodržujících bezlepkovou dietu. Pro studii byly využity také primární kultury fibroblastů získané biopsií z kůže pacientů bez léčby a léčených bezlepkovou dietou a zdravých osob k potvrzení změn endocytotické dráhy v buňkách celiaků. Pro studium specifických proteinů zapojených do vezikulárního transportu byla využita metoda imunofluorescenčního značení a Western blotting. Ve studii byly provedeny experimenty s interferující RNA pro klíčovou molekulu regulující endocytózu a následně byla zkoumána citlivost buněk ke gliadinovému peptidu (Lania *et al.*, 2019).

K pochopení počáteční události vedoucí k ztrátě tolerance imunitního systému jedince ke glutenu a role střevní slizniční vrstvy a molekul produkovaných střevními mikroorganismy na modulaci epiteliální odpovědi na gluten byl v nedávno publikované studii využity organoidy, experimentální *in vitro* modely odvozené z buněk lidského střeva (Freire *et al.*, 2019). K založení kultury organoidů byly využity vzorky tkáně odebrané při biopsii *duodena*, metodě běžně prováděné při diagnostice GE, pacientům s GE a zdravým jedincům. V experimentu byla srovnávána také genová exprese v obou typech organoidů (odvozených z duodenální biopsie pacientů s GE a bez) za použití RNA sekvenování. Vybrané geny odlišně exprimované v celiakálních organoidech byly ověřeny využitím metody qRT-PCR a RNA sekvenování. Studium účinku štěpeného α -gliadinu na jednovrstevné deriváty obou typů organoidů a prokázání zvýšení mezibuněčné permeability u organoidů odvozených od pacientů s GE bylo ve studii ověřeno měřením difúze dvou neutrálních molekul s odlišnou molekulovou vahou, FITC-dextran a FITC-PEG, podaných apikálně. Následně byla fluorescence měřena po 4 hod inkubace v basolaterálním médiu (Freire *et al.*, 2019).

Dosud publikované studie vedly k pokrokům v porozumění patogeneze celiakie, ale přesná úloha genetické predispozice, nespecifické i specifické imunity v rozvoji poškození tkáně nebyla přímo prokázána. V prvním patofyziologickém myším modelu celiakie vhodném pro ověření nových léčebných postupů je požití lepku imunokompetentním jedincem dostačující k atrofii střevních klků stejně jako u pacientů s aktivní celiakií (Abadle *et al.*, 2020). Tato nově publikovaná studie ukazuje rozvoj celiakie jako výsledek interakce IL-15,

HLA-DQ8, tTG, CD4⁺ T lymfocytů, cytotoxických intraepiteliálních T-lymfocytů a glutenu, které společně podporují atrofii střevních klků navýšením množství INF- γ a navýšením počtu plně aktivovaných cytotoxických T-lymfocytů. Pro experimenty byly využity DQ8-D^d-villin-IL-15tg myši se zvýšenou expresí IL-15 ve střevních epitheliálních buňkách a *lamina propria*, krmeny pouze bezlepkovou stravou, myši vystaveny glutenu po dobu 60 dní a myši krmeny stravou s glutenem 30 dní s následnou bezlepkovou stravou po dobu 30 dní (Abadle *et al.*, 2020).

Histologické změny ve sliznici byly studovány na preparátech zhotovených z 5 μ m řezů *ile*a fixovaných v parafínu barvených hematoxilin-eosinem. Množství protilátek v krevním séru myši krmných stravou obsahující gluten bylo měřeno metodou ELISA. Buněčné suspenze pro experimenty byly získány ze střevního epitelu, lymfatických uzlin a krve. Určení množství intraepiteliálních lymfocytů a analýza povrchových molekul těchto buněk byla provedena pomocí flow cytometrie. K analýze exprese konkrétních genů byla využita metoda qPCR (Abadle *et al.*, 2020).

8 Diskuze

Tato bakalářská se zaměřuje na možný vliv aryluhlovodíkového receptoru v patogenezi glutenové enteropatie, což je autoimunitní onemocnění vyvolané u geneticky predisponovaných jedinců požitím lepku, směsi zásobních proteinů obsažených v obilných zrnech. Přítomnost gliadinu nebo narušení běžného složení střevního mikrobiomu aktivuje signální dráhu, která vede k uvolňování zonulinu do lumenu tenkého střeva. Zonulin naruší těsná spojení enterocytů, v důsledku čehož dochází k nekontrolovatelnému transportu gliadinu skrz střevní slizniční vrstvu a spuštění odpovědi vrozeného imunitního systému. Specifické cytokiny podporují vývoj prozánětlivých Th17 lymfocytů, které exprimují vysokou hladinu aryluhlovodíkového receptoru. Aktivovaný AhR inhibuje aktivaci STAT1 a STAT5, které omezují diferenciaci Th17 lymfocytů. Dále aktivovaný AhR společně se STAT3 indukuje expresi IL-2, čímž omezuje jeho rušivý efekt na diferenciaci Th17 linie přes transkripční faktor STAT5. Diferencující se Th17 lymfocyty produkují díky zvýšené expresi a následné vazbě AhR s transkripčním faktorem ROR γ T do specifických promotorových oblastí zvýšené množství IL-17A, IL-17F a IL-22, což jsou zánět podporující cytokiny.

Pokud se tedy aryluhlovodíkový receptor podílí na patogenezi celiakie produkcí interleukinů podporujících zánět, který u pacientů s GE vzniká primárně ve střevě v důsledku požití lepku, bylo by vhodné vyzkoušet, zdali by potlačení aktivity AhR mělo vliv na snížení koncentrace těchto interleukinů produkovaných imunitními buňkami. Pokud by během léčby založené na potlačení aktivity AhR byly současně organismu dodávány látky inhibující interleukiny důležité pro rozvoj Th17 lymfocytů, nedocházelo by jednak k vývoji této subpopulace a také by účinkem TGF- β docházelo k aktivaci signální dráhy vedoucí k expresi transkripčního faktoru FoxP3 umožňujícího produkci regulačních T-lymfocytů udržujících imunitní toleranci. Jak již bylo výše zmíněno, běžně konzumovaná strava obsahuje agonistické ligandy AhR, které by AhR opět aktivovaly. Většina těchto ligandů však podporuje integritu střevní slizniční bariéry.

V současné době jsou známy faktory, které mohou přispívat k rozvoji onemocnění, ale není znám přesný mechanismus, jakým dochází ke vzniku onemocnění. Aktivní celiakie se tedy u jedince může spustit v jakémkoliv věku, anebo nemusí k rozvoji onemocnění vůbec dojít. Změny ve složení střevní mikroflóry jsou prokázanou skutečností u jedinců trpících GE. A jelikož molekuly produkované při metabolismu střevního mikrobiomu mohou působit jako ligandy AhR, mohla by náhlá změna složení střevní mikroflóry (např. způsobená léčbou jiného zánětlivého onemocnění) a s ní spojený výskyt konkrétního ligandu AhR ve střevě souviset s aktivací AhR vedoucí k podpoření vývoje linie Th17 lymfocytů a produkcí

prozánětlivých interleukinů a tedy vznikajícího patologického stavu u jedinců s genetickou predispozicí k GE. Pokud by výše uvedené bylo příčinou spuštění celiakie a vzniku patologického stavu, mohlo by být jistou prevencí před propuknutím nemoci užívání vhodných doplňků stravy podporujících rozvoj běžné střevní mikroflóry u jedinců s genetickou predispozicí k onemocnění.

První publikovaná studie využívající živý modelový organismus pro studium patogeneze GE ukazuje, že nadměrná exprese IL-15 ve střevní epitelální vrstvě a podslizniční vazivové vrstvě je nezbytná pro úplnou aktivaci cytotoxických intraepiteliálních T-lymfocytů, jejichž množství souvisí s mírou atrofie střevních klků. Nedostatek těchto plně aktivovaných lymfocytů pak vysvětluje, proč u některých jedinců s genetickou predispozicí nedochází ke spuštění onemocnění. Celiakie se vyvíjí jako výsledek komplexní interakce mezi vrozenou a specifickou imunitou (Abadie *et al.*, 2020). Narušení některé složky této interakce by tedy mohlo ovlivnit či pozastavit vývoj patologického poškození střevní sliznice. Pokud by u pacientů s GE byl narušen účinek zmiňovaného interleukinu, nemuselo by dojít k vývoji plně aktivních cytotoxických intraepiteliálních lymfocytů a tedy destrukci klků tenkého střeva.

9 Závěr

V předložené bakalářské práci byla provedena literární rešerše zabývající se rolí aryluhlovodíkového receptoru v patogenezi glutenové enteropatie. V první kapitole se věnuji popisu onemocnění, jeho formám, příznakům, způsobům diagnostiky a také dnes jediné dostupné léčbě tohoto onemocnění. Další kapitola se zaměřuje na imunitní systém a jeho složky, které se pojí s patogenezi autoimunitních onemocnění. Glutenová enteropatie poškozuje primárně sliznici tenkého střeva, a proto je další kapitola věnována celistvosti střevní slizniční bariéry a její proměně při patogenezi sledovaného onemocnění a vlivu střevní mikroflóry a virové infekce na rozvoj onemocnění.

V rešerši byl dále popsán aryluhlovodíkový receptor, jeho struktura a aktivace, ligandy vyskytující se ve stravě, výskyt a důsledek aktivace receptoru jak v imunitních buňkách, tak ve střevě. Byly popsány metody, které jsou v současné době využívány pro studium patogeneze GE. Při patogenezi glutenové enteropatie dochází v důsledku aktivace AhR u diferencující se subpopulace Th17 lymfocytů, které se podílí na autoimunitně zprostředkované reakci, pravděpodobně k inhibici transkripčních faktorů omezujících diferenciaci těchto buněk. AhR ve spojení s dalším faktorem tlumí expresi IL-2, který také omezuje diferenciaci Th17 lymfocytů. Zvýšená exprese AhR v těchto buňkách také pravděpodobně vede ke zvýšené produkci interleukinů podporujících zánět a poškození tkáně, který u pacientů s glutenovou enteropatií vzniká ve střevě v důsledku požití lepku.

10 Seznam použité literatury

Abadle, V., Kim, M., S., Lejeune, T., Palanski, A., B., Ernest, D., J., Tastet, O., Voisine, J., Discepolo, V., Marietta, V., E., Hawash, B., F., M., Ciszewski, C., Bouzlat, R., Panigrahi, K., Horwath I., Zurenski, M., A., Lawrence, I., Dmaine, A., Yotova, V., Grenier J-C., Murray, A., J., Khosla, C., Barreiri, B., L., Jabri, B. (2020): IL-15, gluten and HLA-DQ8 drive tissue destruction in coeliac disease. *Nature*:600–604

Abbas, K., A., Lichtman, H., A., Pillai, S. (2017): *Cellular and Molecular immunology*. Ninth edition. United States: Elsevier - Health Sciences Division. ISBN: 978-0-323-47978-3.

Abrahams, P., Druga, R. (2003): *LIDSKÉ TĚLO, Atlas anatomie člověka*. Ottovo nakladatelství, s.r.o., Praha 2. ISBN: 80-7181-955-7

Al-Toma, A., Volta, U., Auricchio, R., Castillejo, G., Sanders, S., D., Cellier, Ch., Mulder, J., Ch., Lundin, A., E., K. (2019): European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. *United European Gastroenterology Journal* 7 (5): 586–613

Azizi G., Yazdani R., Mirshafiey A. (2015): Th22 cells in autoimmunity: a review of current knowledge. *European annals of allergy and clinical immunology* 47(4): 108–117

Bock, W., K. (2019): Aryl hydrocarbon receptor (AHR): From selected human target genes and crosstalk with transcription factors to multiple AHR functions (168): 65–70

Bodis, G., Toth, V., Schwarting, A. (2018): Role of Human Leukocyte Antigens (HLA) in Autoimmune Diseases. *Rheumatology and Therapy* (5):5–20

Burezq H. (2018): Role of Aryl Hydrocarbon-Ligands in the Regulation of Autoimmunity. In: Tyagi R. (ed): *Immune Response Activation and Immunomodulation*. ISBN: 978-1-83962-135-2

Busbee, B., P., Rouse, M., Nagarkatti, M., Nagarkatti, S., P. (2013): Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *Nutrition reviews* (6): 353–369

Bureš, J., Rejchrt, S., Kopáčová, M., Tachecí, I., Papík, Z., Šíroky, M., Pozler, O. (2005): Endoscopic features of coeliac disease. *Folia Gastroel hepatol* 3(1):32–41

Cebolla, Á., Moreno, M., L., Coto, L., Sousa, C. (2018): Gluten Immunogenic Peptides as Standard for the Evaluation of Potential Harmful Prolamin Content in Food and Human Specimen. *Nutrients* (10): 1927

Celiak.cz. [online] [navštíveno 24. 1. 2019] Dostupné z <https://www.celiak.cz/o-diete/legislativa/provadecci-narizeni-c-828-2014>

Cella M., Colonna, M. (2015): Aryl hydrocarbon receptor: Linking environment to immunity. *Seminars in Immunology* 27: 30–314

- Cervantes-Barragan L., Colonna M. (2018): AHR signaling in the development and function of intestinal immune cells and beyond. *Seminars in Immunopathology* (40): 371–377
- Cichewicz B. A., Mearns S. E., Taylor A., Boulanger T., Gerber M. M., Leffler A.D., Drahos J., Sanders S. D., Craig T. J. K., Lebwohl B. (2019): Diagnosis and Treatment Patterns in Celiac Disease. *Digestive Diseases and Sciences. Cleveland clinic journal of medicine* 83 (3): 228–230
- Collin, P., Salmi, T., T., Hervonen, K., Kaukinen, K., Reunala, T. (2017): Dermatitis herpetiformis: a cutaneous manifestation of coeliac disease. *Annals of medicine* (49): 23–41
- Cristofori, F., Indrio, F., Maniello, L., V., De Angeles, M., Francavilla, R. (2018): Probiotics in Celiac Disease. *Nutrients* 10 (12): 1824
- Čihák, R. (2013): *Anatomie 2*. Grada Publishing, a.s., Praha 2013. ISBN: 978-80-247-4788-0
- Denison, S., M., Nagy, R., S. (2003): Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual review of pharmacology and toxicology* (43):309–334
- Esser, Ch., Haarmann-Stemman, T., Hochrath, K., Schikowski, T., Kurtmann, J. (2018): AHR and the issue of immunotoxicity. *Current opinion in Toxicology* (10):91–97
- Esser, Ch., Rannug, A., Stockinger, B.(2009): The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends in Immunology* 30 (9):447–454
- Falini, L., M., Elli, L., Caramanico, R., Bardella, M., T., Terrani ,C., Roncoroni, L., Doneda, L., Forlani, F. (2008): Immunoreactivity of Antibodies Against Transglutaminase Deamidated Gliadins in Adult Celiac Disease. *Digestive Disease and Sciences* (53):2697–2701
- Freire, R., Ingano, L., Serena, G., Cetinbas, M., Anselmo, A., Sapone, A., Sanreyev, I., R., Fasano, A., Senger, S. (2019): Human gut derived-organoids provide model to study gluten response and effects of microbiotaderivedmolecules in celiac disease. *Scientific Reports* 9: 7029
- Frossi, B., Tripodo, C., Guarnotta, C., Carroccio, A., De Carli, A., De Carli, S., Marino, M. Clabrò, A., Pucillo, C., E. (2017): Mast cells are associated with onset and progression of celiac disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* (4): 1266–1274
- Gilissen, L. J. W. J., Meer, I. M., Smulders, M.J.M. (2016): Why Oats Are Safe and Healthy for Celiac Disease Patients. *Medical science* (4): 21
- Girbovan, A., Sur, G., Samasca, G., Lupan, I. (2017): Dysbiosis a risk factor for celiac disease. *Medical microbiology and immunology* 206 (2):83–91
- Gutiérrez-Vázquez, C., Quintana, J. F. (2018): Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity* 48 (1):19–33
- Hato, T., Dagher, C. P. (2015): How the Innate System Senses Trouble and Causes Trouble. *Clinical Journal of American Society of Nephtology* (10): 1459–1469

- Jericho, H., Guandalini, S. (2018): Extra-Intestinal Manifestation of Celiac Disease in Children. *Nutrients* (10): 755
- Kamali, N. A., Noorbakhsh, M. S., Hamedifar, H., Jadidi-Niaragh F., Yazdani R., Bautista M. J., Azizi, G. (2019): A role for Th1-like Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune disorders. *Molecular Immunology* (105): 107–115
- Kanerva P. (2011): Immunochemical analysis of prolamins in gluten-free foods. Dissertation thesis. Department of Food and Environmental Sciences, University of Helsinki.
- Kewley, J. R., Whitelaw, L. M., Chapman-Smith, A. (2004): The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 189–204
- Kim, S., M., Mayassi, T., Jabri, B. (2015): Innate immunity: Actuating the gears of disease pathogenesis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* (29):425–435
- Kowalski, K., Mulak, A., Jasińska, M., Paradowski, L. (2017): Diagnostic challenges in celiac disease. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* (4): 729–737
- Krishnareddy S. (2019): The Microbiome in Celiac Disease. *Gastroenterology Clinics of North America* 48 (1): 115–126
- Lamas, B., Natividad, M. J., Sokol, H. (2018): Aryl hydrocarbon receptor and intestinal immunity. *Mucosal Immunology* 11: 1024–1038
- Lania, G., Nanayakkara, M., Maglio, M., Auricchio, R., Porpora, M., Conte, M., De Matteis, M., A., Rizzo, R., Luini, A., Discepolo, V., Troncone, R., Auricchio, S., Barone, M. V. (2019): Constitutive alterations in vesicular trafficking increase the sensitivity of cells from celiac disease patients to gliadin. *Communications biology* 2:190
- Laringot, L., Juricek, L., Dairou, J., Coumoul, X. (2018): AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open* (7): 1–9
- Laurence, A., Aringer, M. (2014): Effector Mechanisms in Autoimmunity. *The Autoimmune Diseases*. Academic Press. ISBN: 9780123849298
- LeBlanck, G. J., Milani, Ch., Giori, S. G., Sesma, F., van Sinderen, D., Ventura, M. (2013): Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology* (21): 160–168
- Lebwohl, B., Sanders, S. D., Green, H. R. P (2017): Coeliac disease. *Lancet* 2018 (391):70–81
- Maddur, S. M., Miossec, P., Kaveri, V. S., Bayry, J. (2012): Th17 Cells. *The American Journal of Pathology* (181):8–18

Megiorni, F., Mora, B., Bonamico, M., Barbato, M., Nenna, R., Maiella, G., Lulli, P., Mazzilli, C. R. (2009): HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Human Immunology* (70): 55–59

Megiorni, F., Pizzuti, A. (2012): HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *Journal of Biomedical Science* 2012 (19):88

Mudr. Dana Maňasková [online] [navštíveno 30. 7. 2019] Dostupné z http://medicinman.cz/?p=nemocisympt&p_sub=celiakie/fd
http://medicinman.cz/?p=nemocisympt&p_sub=celiakie/f-dg

MUDr. Karin Malíčková, RNDr. Ivana Janatková, Ing. Petra Šandová, prof. MUDr. Terezie Fučíková, DrSc. (2005): Imunologická laboratorní vyšetření při podezření na celiakii. *Interní medicína pro praxi* 7 (10): 440–443

Naheed, A. (2015): *Kniha pro celiaky- Nové poznatky pro lékaře, nemocné a pacienty.* Pragma, Hodkovičky. ISBN: 978-80-7349-434-6

Neavin, R. D., Liu, D., Ray, B., Weinshilboum, M. R. (2018): The Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) in Immune and Inflammatory Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (12): 3851

Ortiz, C., Valenzuela, R., Lucero, Y.A. (2017): Celiac disease, non celiac gluten sensitivity and wheat allergy: comparison of 3 different diseases triggered by the same food. *Revista Chilena de Pediatría*, 88(3): 417–423

Qui, J., Zhou, L. (2013): Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes ROR γ t⁺ ILCs and Controls Intestinal Immunity and Inflammation. *Seminars in immunopathology* 35 (6): 657–670

Peakma, V., Vergani, D. (2009): *BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY.* Second edition. London, United Kingdom: Elsevier Health Sciences. ISBN 978-0-443-10082-6.

Rothhammer, V., Quintana, J. F. (2019): The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nature reviews. Immunology* 13 (3): 184–194

Sacchetti, L., Nardelli, C. (2019): Gut microbiome investigation in celiac disease: from methods to its pathogenetic role. *Clinical chemistry and laboratory medicine*:340–349

Shinde, R., McGaha, L. T. (2018): The Aryl Hydrocarbon Receptor: Connecting Immunity to the Microenvironment. *Trends in Immunology* 39 (12): 1005–1020

Scher, U. J. (2016): The microbiome in celiac disease: Beyond diet-genetic interactions. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 83 (3): 228-230

Smatti, K. M., Cyprian, S. F., Nasrallah, K. G., Al Thani, A.A., Almishal, R.O., Yassine, M.H. (2019): Viruses and Autoimmunity: A Review on the Potential Interaction and Molecular Mechanisms. *Viruses* 11 (8):762

- Sollid, M. L. (2017): The roles of MHC class II genes and post-translational modification in celiac disease. *Immunogenetics* (69): 605–616
- Stockinger, B., Di Meglio, P., Gialitakis, M., Duarte, H. J. (2014): The Aryl Hydrocarbon Receptor: Multitasking in the Immune System. *The Annual Review of Immunology* (32):403–432
- Sturgeon, C., Fasano, A. (2016): Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier function, and its involvement in chronic inflammatory disease. *Tissue barriers* 4 (4)
- Taleb, S. (2019): Tryptophan Dietary Impacts Gut Barrier and Metabolic Diseases. *Frontiers in Immunology*(10):2113
- Vici, G., Belli, L., Biondi, M., Polzonetti, V. (2016): Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clinical nutrition* (35): 1236–1241
- Walker M., M., Ludvigsson J.. F., Sanders D., S. (2017): Coeliac disease: review of diagnosis and management. *The Medical journal of Australia* 207 (4): 173–178
- Wheeler, A. M., Rothhammer, V., Quintana, J. F. (2017): Control of immune-mediated via the aryl hydrocarbon receptor. *The Journal of biological chemistry* 292 (30):12383–12389
- Yoosuf, S., Makharia, K. G. (2019): Evolving Therapy for Celiac disease. *Frontiers in Pediatrics* (7):193
- Zenewicz, A. L., Antov, A., Flavell, A. R. (2009): CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. *Trends in Molecular Medicine* 15 (5): 199–207
- Zhou L. (2016): AHR Function in Lymphocytes: Emerging Concepts. *Trends in Immunology* 37 (1): 17–31
- Zitti, B., Bryceson, T. Y. (2018): Natural killer cells in inflammation and autoimmunity. *Cytokine and Growth Factor Reviews* (42): 37–46