

Doktorský studijní program

**Vnitřní nemoci**

**Ukazatele aktivity celiakie**

**Markers of coeliac disease activity**

**MUDr. Ladislav Douša**

Školitel: doc. MUDr. Ilja Tachecí, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

Doktorand: **MUDr. Ladislav Douša**

Pracoviště: Katedra interních oborů  
Subkatedra gastroenterologie  
2. interní gastroenterologická klinika,  
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové,  
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Typ doktorského studia: prezenční

Studijní program: vnitřní nemoci

Téma disertační práce: **Ukazatele aktivity celiakie**

Školitel: **doc. MUDr. Ilja Tachecí, Ph.D.**  
Katedra interních oborů  
Subkatedra gastroenterologie  
2. interní gastroenterologická klinika,  
Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové,  
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Zahájení práce: září 2018

Ukončení práce: únor 2024

## **Prohlášení autora:**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně, a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

V Hradci Králové, dne 14.2.2024

MUDr. Ladislav Douša

Práce vznikla v rámci projektu Cooperatio, vědní oblasti INDI a v rámci řešení výzkumného záměru MZO 00179906 a byla částečně z tohoto výzkumného záměru podpořena.

## **Poděkování:**

Na tomto místě děkuji zejména svému školiteli, doc. MUDr. Iljovi Tachecímu, Ph.D., za podporu, důsledný dohled, cenné podněty a rady v průběhu mého postgraduálního studia. Stejně tak patří veliký dík také prof. MUDr. Janu Burešovi, CSc. za významnou pomoc v průběhu mého celého postgraduálního projektu. Děkuji dále doc. MUDr. Radomíru Hyšplerovi, Ph.D., RNDr. Martinu Mžikovi, Ph.D., PharmDr. Doris Vokurkové, Ph.D., RNDr. Marcelu Drahošové, prim. MUDr. Vítu Řeháčkovi, Ph.D. a RNDr. Evě Čermákové za cenné rady a spolupráci v oblasti biochemie aminokyselin, buněčné a protilátkové imunologie, klinické hematologie a statistiky. Děkuji všem spolupracovníkům nejen z 2. interní gastroenterologické kliniky FNHK a LF UK v Hradci Králové, kteří jakoukoliv mírou pomohli k dokončení této disertační práce. S úctou děkuji své rodině a blízkým.

## **Obsah:**

<b>1. Úvod do problematiky</b>	11
<b>1.1. Úvod</b>	11
<b>1.2. Celiakie</b>	11
1.2.1. Historické poznámky	11
1.2.2. Definice	14
1.2.3. Etiopatogeneze	14
1.2.4. Epidemiologie	17
1.2.5. Diagnostika	17
1.2.5.1. Anamnéza	18
1.2.5.2. Klinické (fyzikální) vyšetření	20
1.2.5.3. Paraklinická vyšetření	20
1.2.5.4. Klinická klasifikace	26
1.2.5.5. Diferenciální diagnostika	27
1.2.6. Komplikace celiakie	29
1.2.7. Terapie	29
1.2.7.1. Bezlepková dieta	29
1.2.7.2. Nutriční podpora a suplementace nutrientů	29
1.2.7.3. Management „celiakie neodpovídající na léčbu a „těžce probíhající celiakie“	30
1.2.8. Dispenzarizace a ukazatele aktivity onemocnění	31
1.2.8.1. Markery adherence k bezlepkové dietě	35
<b>1.3. Citrulin a ornitin</b>	36
1.3.1. Historické poznámky	36
1.3.2. Fyziologické funkce	36
1.3.3. Význam v etiopatogenezi a klinice	39
1.3.4. Citrulin a enteropatie (včetně celiakie)	40
1.3.5. Ornitin a enteropatie (včetně celiakie)	40

<b>1.4. Hyposplenismus</b>	41
1.4.1. Hyposplenismus – definice, epidemiologie, anatomie a patofyziologie, diagnostika	41
1.4.2. Hyposplenismus u celiakie	45
<b>2. Klinické studie</b>	52
<b>3. Plazmatické hladiny citrulinu a ornitinu u nemocných s celiakií</b>	53
3.1. Úvod	53
3.2. Metodika	54
3.3. Výsledky	56
3.4. Diskuse	63
3.5. Závěr	67
<b>4. Funkční hyposplenismus u nemocných s celiakií</b>	69
4.1. Úvod	69
4.2. Metodika	70
4.3. Výsledky	72
4.4. Diskuse	105
4.5. Závěr	108
<b>5. Nové markery adherence k bezlepkové dietě u nemocných s celiakií</b>	110
5.1. Úvod	110
5.2. Metodika	111
5.3. Výsledky	112
5.4. Diskuse	116
5.5. Závěr	117
<b>6. Závěry</b>	118
<b>7. Seznam citací použité literatury</b>	119
<b>8. Přílohy</b>	131

## **Seznam použitých zkratk:**

ACDCs: associated celiac disease conditions, celiakie s přidruženými stavy

AGA: antigliadin antibodies, antigliadinové protilátky

AIDS: Acquired immunodeficiency syndrome, syndrom získaného selhání imunity

AP: aritmetický průměr

ARA: antireticuline antibodies, antiretikulinové protilátky

ASL: argininosukcinát lyáza

ASS: argininosukcinát syntáza

BCR: B-cell receptor, B-buněčný receptor

BLD: bezlepková dieta

BMI: body mass index, index tělesné hmotnosti

BSA: body surface area, tělesný povrch

CD: cluster of differentiation, diferenciační skupina

CI: confidence interval, interval spolehlivosti

CVID: Common variable immunodeficiency, běžná variabilní imunodeficeience

DGP: deamidovaný gliadinový peptid

EATL: Enteropathy associated T lymphoma, T-lymfom asociovaný s enteropatií

ELISA: enzyme-linked immunoabsorbent assay, heterogenní enzymová imunoanalýza

EMA: endomysial antibodies, endomyziální protilátky

FDA: Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

FOB: follicular B lymphocytes, folikulární B lymfocyty

GALT: gut associated lymphoid tissue, lymfatická tkáň asociovaná s gastrointestinálním traktem

GIP: gliadinové imunogenní/imunoreaktivní peptidy

GvHD: Graft versus Host Disease, nemoc štěpu proti hostiteli

HLA: human leukocyte antigen, lidský leukocytární antigen

IEL: intraepiteliální lymfocyty

Ig: imunoglobulin

INF: interferon

IQR: interquartile range, mezikvartilové rozpětí

MALT: mucosa associated lymphoid tissue, lymfatická tkáň asociovaná se sliznicí

MCV: mean corpuscular volume, střední objem erytrocytu

MZ: marginální zóna

MZB: marginal zone B lymphocytes, B lymfocyty marginální zóny  
NOS: NO-syntáza  
NS: nesignifikantní  
NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drugs, nesteroidní protizánětlivé léky  
OACD: ongoing active celiac disease, celiakie s trvající aktivitou  
OCT: ornitintraskarbamyláza  
OR: odds ratio, poměr šancí  
PPI: proton pump inhibitors, inhibitory protonové pumpy  
pVA: perzistující vilózní atrofie  
S: signifikantní  
SO: směrodatná odchylka  
TCR: T-cell receptor, T-buněčný receptor  
TGF: transformin growth factor, transformující růstový faktor  
TTG: tissue transglutaminase, tkáňová transglutamináza  
U: unit, jednotka  
WGO: World Gastroenterology Organisation, Světová gastroenterologická organizace



## Souhrn:

Celiakie je relativně časté onemocnění, které je v posledních dekádách spojeno celosvětově s rychlým vzestupem prevalence, a které má potenciálně závažné medicínské, ekonomické, psychologické i sociální důsledky. Současně s tím je všeobecně známý také vysoký podíl nediagnostikovaných případů, který s sebou nese další významná zdravotní rizika do budoucna. Vzhledem ke všem těmto faktům je zavádění nových diagnostických, monitorovacích a terapeutických možností do klinické praxe důležitým předpokladem úspěšného boje s tímto potenciálně závažným onemocněním. Cílem této práce bylo u pacientů sledovaných pro celiakii obecně popsat jejich základní demografické parametry a dále analyzovat plazmatické hladiny aminokyselin citrulinu a ornitinu jakožto potenciálních ukazatelů tenkostřevního postižení, hodnoty paměťových B lymfocytů marginální zóny jakožto ukazatele tíže hyposplenismu, a nakonec koncentrace gliadin 33-meru ve stolici jakožto ukazatele adherence k bezlepkové dietě.

Provedli jsme analýzu pacientů dispenzarizovaných v gastroenterologických poradnách 2. interní gastroenterologické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové. V rámci jednotlivých subanalýz jsme vyšetřili následující počet pacientů: pro plazmatický citrulin a ornitin 94 pacientů, pro hyposplenismus 100 pacientů, pro fekální gliadin 33-mer 109 pacientů. Uvedené kohorty pacientů s celiakií jsme porovnali s kontrolní skupinou 35 zdravých krevních dárců.

V první subanalýze byly jedním z našich hlavních zjištění statisticky významně nižší plazmatické koncentrace ornitinu u pacientů s nekomplikovanou formou celiakie léčených bezlepkovou dietou ve srovnání se zdravými kontrolami. Ornitin se tak zdá být nadějným a citlivějším ukazatelem ve skupině těchto nemocných. V druhé subanalýze jsme vyšetřili a stanovili koncentrace B lymfocytárních subpopulací v periferní krvi u pacientů s mírnou (nekomplikovanou) formou celiakie na bezlepkové dietě a prokázali jsme selektivní deficit paměťových B lymfocytů marginální zóny jako obraz funkčního hyposplenismu v této populaci. Paměťové B lymfocyty marginální zóny tak mohou být nástrojem k hodnocení funkční (imunologické) kapacity sleziny u pacientů s celiakií. V třetí subanalýze jsme se zaměřili na fekální gliadin 33-mer jakožto jeden z nových ukazatelů adherence k bezlepkové dietě a prokázali jsme, že tento marker je poměrně spolehlivým ukazatelem neadherence k bezlepkové dietě a současně, že ho lze využít jako nepřímý ukazatel hodnocení aktivity nemoci ve smyslu udržování zánětlivého stavu v tenkém střevě při trvajícím přísunu lepku.

Naše práce potvrzuje nutnost nacházení nových ukazatelů aktivity celiakie ve smyslu hodnocení tenkostěvních integrity a funkce, imunologického potenciálu sleziny u celiaků a sledování adherence k bezlepkové dietě. Výše uvedená zjištění by teoreticky mohla umožnit lepší selekci pacientů, u kterých (s ohledem na trvající určitou míru aktivity nemoci) přetrvává jednak riziko závažných komplikací celiakie a současně potenciálně závažné infekční konsekvence.

## Summary:

Coeliac disease is a relatively common disorder that has been associated with a rapid increase in prevalence worldwide in recent decades, with potentially serious medical, economic, psychological, and social consequences. At the same time, the high proportion of undiagnosed cases is well known and carries significant additional health risks for the future. In view of all these facts, the introduction of new diagnostic, monitoring and therapeutic options into clinical practice is an important prerequisite for the successful fight against this potentially serious disease. The aim of the present study was to describe the basic demographic parameters of patients followed for coeliac disease in general and to analyse plasma levels of the amino acids citrulline and ornithine as potential indicators of small intestinal involvement, the levels of memory marginal zone B lymphocytes as an indicator of the severity of hyposplenism, and finally the concentration of gliadin 33-mer in stool as an indicator of adherence to a gluten-free diet.

We performed an analysis of patients dispensed in the gastroenterology clinics of the Second internal gastroenterology clinic of the University Hospital Hradec Králové. We examined the following number of patients within individual subanalyses: for plasma citrulline and ornithine 94 patients, for hyposplenism 100 patients, for faecal gliadin 33-mer 109 patients. We compared these cohorts of celiac patients with a control group of 35 healthy blood donors. In the first subanalysis, one of our main findings was statistically significantly lower plasma ornithine concentrations in patients with uncomplicated coeliac disease treated with a gluten-free diet compared to healthy controls. Thus, ornithine seems to be a promising and more sensitive marker in this group of patients. In a second subanalysis, we examined and determined the concentrations of B cell subpopulations in the peripheral blood of patients with a mild (uncomplicated) form of coeliac disease on a gluten-free diet and demonstrated a selective deficiency of memory marginal zone B cells as a picture of functional hyposplenism in this population. Thus, memory marginal zone B lymphocytes may be a tool to assess the functional (immunological) capacity of the spleen in patients with coeliac disease. In a third subanalysis, we focused on faecal gliadin 33-mer as one of the novel markers of adherence to a gluten-free diet and demonstrated this marker is a relatively reliable indicator of non-adherence to a gluten-free diet and, at the same time, that it can be used as an indirect indicator to assess disease activity in terms of maintenance of an inflammatory state in the small intestine during sustained gluten intake.

# 1. Úvod do problematiky

## 1.1. Úvod

Rozvoj gastroenterologie přináší v posledních letech velké množství nových informací a dat o etiopatogeneze některých onemocnění, umožňujících významné zlepšování jejich diagnostiky a léčby. Toto platí také o skupině imunopatologicky založených enteropatií, které označujeme termínem celiakie. Tradiční laboratorní metody jsou doplňovány novými, senzitivnějšími a specifitějšími technikami, umožňujícími také monitoraci aktivity onemocnění.

Celiakie je relativně časté onemocnění, které je v posledních dekádách spojeno celosvětově s rychlým vzestupem prevalence. Tento trend bývá mediálně často chybně označován jako „epidemie“, čímž jsou naznačovány jeho potenciálně závažné medicínské, ekonomické, psychologické i sociální důsledky. Současně s tím je všeobecně známý také vysoký podíl nediagnostikovaných případů, který s sebou nese další významná zdravotní rizika do budoucna. Vzhledem ke všem těmto faktům je rychlé ověřování recentních vědeckých dat a zavádění nových diagnostických, monitorovacích a terapeutických možností do klinické praxe důležitým předpokladem úspěšného boje s tímto potenciálně závažným onemocněním.

## 1.2. Celiakie

### 1.2.1. Historické poznámky

Vznik celiakie lze dávat do souvislosti se změnou potravních zvyklostí, kterou s sebou přinesla změna lovce/sběrače v zemědělce zhruba 10 000 let před Kristem, v průběhu takzvané neolitické revoluce (1). Trávicí systém člověka se tak po cca 2 milionech let stabilního prostředí musel poměrně rychle adaptovat na široké spektrum nových potravních antigenů zahrnujících bílkoviny mléka domestikovaných savců, vajec a nových, šlechtěných obilovin. U menší části populace byly tyto změny provázeny vznikem různých potravinových intolerancí, včetně celiakie.

Ačkoliv bylo střevní onemocnění provázené malabsorpcí popisováno již v Indii v 15. století před našim letopočtem, za první písemnou zmínku o nemoci je tradičně považován

popis chronického střevního onemocnění s poruchou trávení („pepsis“) a vstřebávání („anadosis“) s odchodem nestrávené potravy stolicí, který byl publikován řeckým lékařem Aretaeem z Kappadokie (dnešní střední Turecko) v 2. století n.l. (2). Název celiakie pochází z řeckých slov koiliakós (κοιλιακός – břišní) nebo koilia (κοιλια – břicho). Texty (De Causis et Signis Morborum Acutorum et Diuturnorum a De Curatione Morborum Acutorum et Diuturnorum) sepsané v ionské řečtině byly až do 16. století zapomenuty. Další popisy onemocnění odpovídající celiakii pocházejí z pera aragonského lékaře Gerónima Soriana (1690) a skotského lékaře Matthewa Baillie (1793), který navrhoval léčebnou dietu s rýží (3).

Termín „sprue“ se v literatuře objevuje v roce 1669 jako výraz pro průjmovité onemocnění s afty v dutině ústní pozorované u dělníků ve Východní Indii, jedná se o poangličtěný výraz holandského „sprow“ = afta (4). Onemocnění je dnes označováno jako tropická sprue a je zřetelně od celiakie odděleno.

Za otce „moderní“ celiakie je možné považovat britského pediatra Samuela Gee, který Aerateovo dílo znal. Ten v roce 1888 definoval celiakii jako onemocnění s průjmy, indigescí a steatorheou, nejčastěji se projevující u dětí do 5 let věku. Prof. Gee byl přesvědčen o významu diety (5), doporučoval snížení příjmu mouky a popsal významné zlepšení obtíží po denní konzumaci holandských slávek. V roce 1908 zavádí americký lékař Christian Herter termín „intestinální infantilismus“ (6) označující chronický průjem způsobený perzistencí bifidobakterií v trávicím traktu novorozenců. Přínos obou lékařů byl reflektován v označování celiakie jako Gee-Herterova choroba (3).

Jména Sidney Haas (americký lékař) a Guido Fanconi jsou spojena s prvními dietními pokusy u nemocných s celiakií (7). Známa je takzvaná banánová dieta (založená na konzumaci zralých banánů, mléka, tvarohu, masa a zeleniny), kterou Sidney Haas úspěšně nasadil u 8 anorektických dětí s celiakií. Postupně se tato dieta stala v USA poměrně populární, z dnešního pohledu bylo zásadním prvkem vyloučení produktů z mouky. Fanconiova dieta byla založena na ovocných džusech a syrové zelenině.

Důležitým milníkem byl objev efektu bezlepkové diety. Významný je přínos holandského lékaře Willema Dicke, který již v roce 1936 pozoroval zlepšení kožních projevů celiakie (Duhringovy choroby) po vypuštění chleba z diety celiaka. Významným pozorováním byl pozitivní efekt nedostatku mouky v Nizozemsku na konci druhé světové války v průběhu takzvané „Winter of starvation“ (1944/1945) na klinický stav dětí s celiakií. Obtíže bohužel rychle relabovaly po znovuobnovení dodávek chleba. Poměrně přesný popis bezlepkové diety (vynechání potravin z pšenice, žita a ovsa) publikoval Dicke již v roce 1941 (8), teprve v padesátých letech 20. století se postupně bezlepková dieta stala základem úspěšné léčby

celiakie. Willem Dicke je také spojen se zaváděním prvních laboratorních technik sledování efektu bezlepkové diety (stanovování množství stolice, množství nestráveného tuku ve stolici, výpočet koeficientu absorpce tuku), které umožnily přesné nastavení jejího složení. Willem Dicke společně s J.H. van de Kamerem a H.A. Weyersem identifikovali lepek v pšenici, ječmeni i žitu (avenin – toxický prolamin ovsa – byl identifikován později) (9). Abnormality sliznice při vyšetření chirurgických resektátů dospělého pacienta s celiakií popsal v roce 1954 J.W. Paulley (10).

Relativní nedostupnost sliznice tenkého střeva endoskopickému a histopatologickému vyšetření (s výjimkou pitevních nálezů a/nebo chirurgických resektátů) neumožňovala delší dobu přesnější popis morfologických změn nemoci. Z tohoto pohledu byly v polovině 50. let 20. století významné objevy Margot Shinerové a Williama H. Crosbyho, kteří sestrojili zařízení (jejunální bioptický aparát a Crosbyho kapsle) umožňující odběr biopsie z hloubky tenkého střeva (jejuna) (11) a obě zařízení použili u nemocných s celiakií. Poprvé tak bylo možné nejen pozorovat specifické poškození sliznice tenkého střeva, ale také její regeneraci po zahájení bezlepkové diety.

Vzhledem k relativně vysoké invazivitě procedur (12) nebyly odběry z hlubších partií tenkého střeva běžně využívány a k diagnostice a dispenzarizaci nemocných s celiakií postačovala gastroskopie a odběr materiálu z duodena.

V roce 1992 byly Marshem rozlišeny různé stupně histopatologického poškození sliznice tenkého střeva (13), klasifikace byla v roce 1999 upravena Oberhuberem (14) a v roce 2005 byla vytvořena další, zjednodušená klasifikace Corazzova (15).

Se zavedením kapslové endoskopie do klinické praxe se v roce 2001 objevila minimálně invazivní metoda, která umožnila především diagnostiku závažných komplikací celiakie (ulcerativní jejunoileitida, lymfom) (16).

První diagnostická kritéria celiakie byla definována v Interlakenu Evropskou společností dětské gastroenterologie (European Society for Pediatric Gastroenterology) v roce 1968 a zahrnovala základní principy platné prakticky do konce 20. století (efekt bezlepkové diety a zhoršení po navrácení lepku do diety).

V 70. letech 20. století následovalo rozšíření sérologických metod využívaných v diagnostice a další subklasifikace forem onemocnění. V této době se o celiakii začalo hovořit jako o onemocnění autoimunitního charakteru.

### 1.2.2. Definice

Celiakie je chronické, multisystémové, imunitně podmíněné onemocnění u geneticky predisponovaných jedinců jakéhokoliv věku vyvolané v potravě obsaženým lepkem (glutenem) (17-20). V minulosti používané termíny sprue, celiakální sprue, gluten-senzitivní enteropatie, non-tropická sprue, intolerance lepku či idiopatická steatorea, by měly být opuštěny (20). Celiakie je spíše než jedna nemoc skupina nemocí/příznaků, vyvolaných lepkem, které nemusí postihovat jen gastrointestinální systém. Současně je známá asociace s řadou dalších imunitně podmíněných (autoimunitních) onemocnění (21) (blíže viz Tabulka 3).

Lepek (gluten) je ve vodě rozpustný proteinový komplex sestávající se z více než 100 glykoproteinů (obecně prolaminů a glutelinů) obsažený v obilninách (pšenici, žitu, ječmeni a ovsu) (22). Lepek je zásobní protein obilného zrna. Pšeničné prolaminy se nazývají gliadiny a jsou ve vodě rozpustné, pšeničné gluteliny (bez jiného označení) jsou ve vodě nerozpustné. Gliadiny zajišťují tažnost, gluteniny pružnost a bobtnavost těsta. Ječmenné prolaminy označujeme jako hordeiny, žitné prolaminy jako sekaliny a ovesné jako aveniny (23). U různých nemocí asociovaných s lepkem mohou být spouštěčem onemocnění různé součásti glutenového komplexu (pro celiakii jsou rozhodující alfa a gama gliadiny) (24).

### 1.2.3. Etiopatogeneze

Patogeneze celiakie je založena na souhře několika faktorů:

1. přítomnosti lepku (glutenu) v potravě
2. prolomení bariérové funkce tenkostěvné sliznice
3. imunoreaktivním potenciálu tenkostěvné sliznice

ad 1:

Gliadiny jsou štěpeny žaludečními a pankreatickými enzymy a enzymy kartáčového lemu tenkostěvné sliznice na peptidy (gliadinové štěpy), které mají imunoreaktivní potenciál, a proto jsou označovány termínem „gliadinové imunogenní/imunoreaktivní peptidy (GIP)”; jedná se o asi 200 peptidů (jedním z nich je gliadin 33-mer). V primární struktuře imunoreaktivních peptidů jsou ve velkém množství obsaženy aminokyseliny prolin a glutamin (až 40% zastoupení glutaminu), které jsou samy o sobě obtížně degradovatelné (25).

ad 2:

Za normálních okolností jsou gliadinové peptidy transportovány přes tenkostěvnou epitelovou vrstvu do lamina propria mucosae pomocí M-buněk (26) nebo jsou identifikovány v lumen výběžky dendritických buněk (27). Tímto způsobem je prakticky „přenesena informace“ o přítomnosti lepku v potravě, jsou aktivovány dosud naivní T-lymfocyty (Th0) a dochází k proliferaci klonu T-regulačních lymfocytů (Treg). Výsledkem je nastolení slizniční homeostázy a tolerance vůči imunoreaktivním gliadinovým štěpům (25). U jedinců s celiakií je bariérová funkce tenkostěvné sliznice porušena, průnik imunoreaktivních gliadinových peptidů do lamina propria mucosae je usnadněn a není řízený, antigenní nálož je výrazně zvýšená. Důvody porušení tenkostěvné integrity a bariérové funkce nejsou zcela jasné, nicméně role proběhlé střevní infekce (např. rotavirová infekce) nebo jiných nox (včetně medikamentózních) je pravděpodobná (19).

ad 3:

Po vstupu do lamina propria mucosae dochází k interakci mezi GIP a enzymem tkáňovou transglutaminázou (TTG). Imunoreaktivní gliadinové peptidy jsou při této interakci chemicky modifikovány.

Tkáňová transglutamináza (TTG; synonyma erytrocytární, buněčná, endoteliální, cytoplazmatická, typ II nebo 2, jaterní) (28) je intracelulární, kalcium-dependenční ubikviterní enzym. Jeho základní fyziologickou funkcí je vytváření kovalentních ireverzibilních vazeb („sítování“) mezi různými proteiny (29). Intracelulární aktivita TTG je zapojena do procesu apoptózy vedoucí k nezášlelivé likvidaci poškozených buněk. V případě buněčného poškození je TTG vyplavována do extracelulárního prostoru, zde váže např. fibronectin, osteonectin, kolagen II., V. a XI. typu, prokolagen III. typu, nidogen (30), aktivuje TGF beta (*transforming growth factor beta*) a tím se uplatňuje ve stabilizaci a hojení poškozené tkáně. Nabídka substrátů pro TTG je relativně limitována. Excelentní afinitu k TTG má GIP v lamina propria mucosae. Vazbou TTG-GIP dochází k jednomu z nejdůležitějších kroků v patogenezi celiakie – deamidaci gliadinových imunogenních štěpů. Deamidované gliadinové peptidy (DGP) jsou v komplexu s TTG pohlceny antigen prezentující dendritickou buňkou, antigeny s epitopy obou struktur (tedy gliadinu i TTG) jsou zpracovány a následně díky genetické výbavě dendritické buňky (v podobě molekul HLA DQ2 a HLA DQ8) jsou prezentovány dále. Tímto mechanismem je spuštěn imunoreaktivní proces („zánětlivý motor“) v tenkostěvné sliznici vedoucí ve výsledku k poškozujícímu zánětu.



Zjednodušeně lze imunopatologickou odpověď v lamina propria popsat pomocí dvou „směrů“.

Prvním směrem je T-buněčná odpověď. Antigen prezentující dendritické buňky prezentují imunogenní gliadinové peptidy v kontextu molekul HLA-DQ2 a HLA-DQ8 naivním Th0 lymfocytům, dochází k patologické aktivaci Th0 buněk s jejich následnou expanzí do dvou biologicky odlišných subsetů Th17 a Th1, které jsou odpovědné za lokální (střevní) i vzdálené (systémové) projevy zánětu. Subset Th17 je dominantním zdrojem prozánětlivých mediátorů interferonu gama (INF-gama) a interleukinu 15 (IL-15). Tyto mediátory přímo ovlivňují tenkostěvné epitelové buňky, dostávající je do stavu „buněčného stresu“ a nutí je k expresi povrchových molekul (ligandů) MIC-A a MIC-B (*MHC class I polypeptide-related sequence A /-B*). Tyto ligandy jsou následně rozpoznávány intraepiteliálními T lymfocyty (IEL) pomocí jejich aktivačních molekul KAR (*Killer Activation Receptors*) a tímto je zahájena jejich proliferace a destrukční cytotoxická aktivita, jejíž výsledkem je trvalé poškození tenkostěvné sliznice se vznikem atrofie klků (vilózní atrofie). Při dlouhodobé a silné proliferační aktivitě intraepiteliálních T lymfocytů (IEL) může docházet v jejich genomu k poruchám (přestavbám) vázaným k expresi povrchových T-buněčných receptorů (TcR gama a delta). Patologická genová přestavba pro TcR gama a delta svědčí pro maligní zvrát IEL a možný vznik T-buněčného lymfomu (25). Subset Th1 je zdrojem mediátoru interleukinu 21 (IL-21), jehož funkcí je stimulace endomyziálních fibroblastů k tvorbě proteolytických enzymů ze skupiny matrixových metaloproteináz (MMP typu 1, 3 a 12), které dále prohlubují tkáňové tenkostěvné poškození. Ztráta podpory vzniku subsetu T-regulačních lymfocytů (Treg) podporuje udržení a „stabilizaci“ imunopatologického mikroprostředí v lamina propria mucosae.

Druhým směrem je B-buněčná odpověď. Antigen prezentující dendritická buňka je v mezibuněčné interakci (přímé i humorální) také s pomocným T lymfocytům ze skupiny Th2, který významným způsobem podporuje autoreaktivní B lymfocyty. Tyto následně rozpoznávají lokálně přítomnou tkáňovou transglutaminázu a po vlastní aktivaci a klonální expanzi se diferencují do plazmatických buněk, které tvoří autoprotilátky proti tkáňové transglutamináze. Pool protilátek lze pomyslně rozdělit do dvou skupin. První skupina zůstává „in situ“ v lamina propria mucosae a zajišťuje stabilizaci molekul TTG (a tím umocňuje její v tuto chvíli pro organismus „neprospěšnou“ funkci ve smyslu deamidace gliadinových imunogenních peptidů – viz výše). Druhá skupina je „vyplavována“ do krevního oběhu a představuje protilátky, které jsou detekovány při krevním odběru v rámci diagnostiky nemoci. Přesto, že imunopatologické odpověď je dominantně spuštěna a udržována deamidovanými gliadinovými peptidy a současnou aktivitou tkáňové transglutaminázy, je přítomná i protilátková reakce proti

samotnému gliadinu (nativnímu i „deamidovanému“), komplexům mezi gliadinem a tkáňovou transglutaminázou, endomyziu a retikulinu. Tento proces lze označit jako „rozšiřování terčů imunopatologické reaktivity“ (29).

#### **1.2.4. Epidemiologie**

Celiakie je relativně časté onemocnění s 1 % průměrnou celosvětovou prevalencí a trvale stoupajícím trendem (31). Zajímavé jsou geografické rozdíly v prevalenci onemocnění, např. evropský severo-jihní gradient (Finsko 1:50, Slovensko 1:250, Itálie 1:400, Chorvatsko 1:500). Prevalence v České republice je odhadem na 1:200 - 1:250 (dle WGO 1:218) (21). U příbuzných celiaků 1. řádu je prevalence 5-10 % (32). Monozygotní a dizygotní dvojčata mají 70 %, resp. 9 % kumulativní riziko vzniku celiakie (33). Onemocnění může vzniknout v jakémkoliv věku (31), více než 70% pacientů je diagnostikováno starší 20 let (34). Poměr mužů a žen s diagnostikovanou celiakií je v rozmezí 1:3 – 1,5:1. Zajímavé je zjištění, že klinicky závažná může být manifestace celiakie post partum až u 15-20% žen (32). Pro vznik celiakie je nutná genetická predispozice, přičemž dominantní roli hrají HLA antigeny II. třídy. Asi v 90 % případů se jedná o HLA-DQ2, asi v 10% se jedná o HLA-DQ8. Výjimečně je diagnóza celiakie stanovena u pacientů s jejich absencí (19). Dědičnost je autozomálně dominantní s nekompletní penetrancí. Pozitivita HLA-DQ2 je popisována až u 25–35 % zdravé evropské populace a negativní prediktivní hodnota absence obou typů HLA je prakticky 100 % a tedy vylučuje vznik či přítomnost onemocnění (35, 36). Role non-HLA genetické predispozice je přídatná, nicméně ne zanedbatelná, a zasahuje mimo jiné do homeostázy vrozené i získané imunity, slizniční integrity a epitelových funkcí (37),

#### **1.2.5. Diagnostika**

Diagnostika celiakie je i přes pokroky v medicíně často pozdní (38) a nově diagnostikovaní celiaci představují pouze pomyslný vrchol ledovce (diagnóza je správně a včas stanovena pouze u 10 - 15 % nemocných) (39). Důvodem je častý oligosymptomatický a/nebo asymptomatický průběh onemocnění. Diagnostika celiakie je obecně založena na třech pilířích – 1. anamnéza, 2. klinické (fyzikální) vyšetření, 3. paraklinická vyšetření.

### 1.2.5.1.

V anamnéze cílíme zejména na rizikové stavy a onemocnění (včetně asociovaných imunitně podmíněných nemocí), které mohou být s celiakií sdružené (viz Tabulka 1-3). Příznaky a obtíže udávané pacientem nemusí být vždy klasicky gastrointestinální (obraz malasimilačního syndromu z destrukce tenkostřešní sliznice se snížením absorpční plochy a redukcí trávicích tenkostřešních i pankreatických enzymů) s průjmy, steatoreou, sideropenickou anémií a dalšími karečními deficity, hubnutím a u dětí s opožděným růstem) (20). Často se setkáváme s extraintestinálními projevy nemoci, resp. s oligosymptomatickými formami nemoci s normálním nebo prakticky normálním nálezem při fyzikálním vyšetření. Cílené otázky lékaře by měly směřovat na přítomnost distenze a bolesti břicha, nepřiměřenou únavu, nechutenství, zácpu, kožní projevy, migrenózní a psychické obtíže a neuropatie, poruchy chrupu, afty v ústní dutině, opožděnou pubertu a menarche, poruchu plodnosti včetně opakovaných spontánních potratů. Onemocnění se může projevit druhotně po operaci trávicí trubice (z jiné indikace), přičemž vysvětlením pro tento fenomén může být perioperační alterace slizniční absorpční schopnosti, gastrointestinální motility, stresu a hormonální dysregulace (18). V poslední době přibývá pacientů s nadváhou a obezitou (Zucotti et al. uvádí ve své práci z roku 2013 prevalenci nadváhy v době stanovení diagnózy u 40 % a obezity u 13 % jedinců) a metabolickým syndromem (40), a dále pacientů prakticky normostenických. Součástí anamnézy musí být otázka případného efektu v minulosti dodržované bezlepkové diety.

**Tabulka 1: Rizikové nemoci a stavy**

• Příbuzní celiaků 1. stupně, při jejich pozitivitě také 2. stupně
• Dermatitis herpetiformis (Duhring)
• Mikrocytární anemie nereagující na léčbu preparáty železa
• Předčasná osteoporóza
• Terapeuticky rezistentní průjmová forma syndromu dráždivého střeva
• Polyneuropatie a myopatie nejasné etiologie
• Ataxie nejasné etiologie, epilepsie, migrény, kognitivní deficit
• Deprese, poruchy chování/nálady/pozornosti
• Amenorhea, pozdní menarche
• Infertilita a poruchy reprodukce
• Downův a Turnerův syndrom
• Plicní hemosideróza
• Mikroskopická kolitida
• Akutní a chronická pankreatitida (s vyloučením jiných příčin)
• Hyposplenie, funkční asplenie

**Tabulka 2: Rizikové příznaky**

• Opožděný psychosomatický vývoj a neprospívání
• Nevysvětlený úbytek tělesné hmotnosti
• Nízké sérové železo
• Zvýšení sérových aminotransferáz
• Izolovaný deficit IgA
• Recidivující aftózní stomatitida
• Hypoplázie zubní skloviny
• Chronický únavový syndrom

**Tabulka 3: Přidružené imunitně podmíněné nemoci**

• Diabetes mellitus 1. typu
• Autoimunitní tyreoiditida a jiné autoimunitní endokrinopatie
• Autoimunitní hepatitida
• Systémový lupus erythematodes
• Primární sklerózující cholangitida
• Primární biliární cholangitida
• Sjögrenův syndrom
• Choroby pojiva
• IgA nefropatie
• Psoriáza a kožní afekce jiné než dermatitis herpetiformis (Duhring)
• Eozinofilní ezofagitida
• Achalázie
• Adisonova nemoc

#### 1.2.5.2

Klinický obraz celiakie může být velmi heterogenní – od zcela asymptomatického jedince, přes jedince s nespecifickými a často mimostřevními (nebo minoritními gastrointestinálními) obtížemi, až po pacienty s plně vyjádřenými komplikacemi celiakie včetně rozvinutého malasimilačního syndromu. Fyzikální nález může být (a často také je) zcela fyziologický bez jakýchkoliv známek malasimilačního syndromu a současně spíše výjimečně pozorujeme změny v souvislosti s malasimilačním syndromem.

#### 1.2.5.3.

Paraklinická vyšetření jsou ke stanovení diagnózy celiakie nutná. Konkrétně jde o kombinaci pozitivních sérologických a histologických nálezů. Metodou první volby v diagnostice celiakie je sérologie, primárně jde o vyšetření protilátek proti tkáňové transglutamináze v třídě IgA (dle možností jsou vhodné i protilátky proti endomyziu IgA – viz dále) a sérové koncentrace celkového IgA. Při pozitivitě výše uvedených protilátek následuje doplnění horní endoskopie s histologickým vyšetřením sliznice duodena (16).

### 1.2.5.3.1.

Sérologická diagnostika se využívá k průkazu specifických protilátek namířených v širším slova smyslu proti gliadinu (nativnímu gliadinu a/nebo deamidovaným gliadinovým peptidům) a/nebo proti vlastním strukturálním komponentám tenkostěvné sliznice (retikulinu, endomyziu, tkáňové transglutamináze) - Tabulka 4 (18).

**Tabulka 4: Charakteristiky jednotlivých sérologických testů**

ELISA – enzyme-linked immunoabsorbent assay

Název	Zkratka	Metoda	Popis	Senzitivita (IgA, IgG; %)	Specifická (IgA, IgG; %)
Anti-gliadinové protilátky	AGA IgA / IgG	ELISA	Mířeny proti nativnímu gliadinu. Uspokojivá senzitivita i specifická při vysoké suspekci na celiakii; riziko falešné pozitivita pro běžnou populaci v rámci screeningu; v současné době prakticky nevyužívány.	85, 80	90, 80
Anti-DGP protilátky	DGP IgA / IgG	ELISA	Mířeny proti deamidovaným gliadinovým peptidům vzniklým kontaktem s tkáňovou transglutaminázou; kombinace DGP-IgG a TTG-IgG je kombinací volby u jedinců se selektivním IgA deficitem.	88, 80	90, 98
Anti-retikulinové protilátky	ARA IgA	Nepřímá imuno-fluorescence	Mířeny proti retikulinu mezibuněčné hmoty hladké svaloviny trávicí trubice; v současné době prakticky nevyužívány.	100, -	65, -
Anti-endomyziální protilátky	EMA IgA / IgG	Nepřímá imuno-fluorescence	Mířeny proti endomyziu tenkostěvné sliznice; nejvyšší sérologická specifická.	95, 80	99, 97
Anti-transglutaminázové protilátky	TTG IgA / IgG	ELISA	Mířeny proti konkrétnímu endomyziálnímu antigenu – enzymu tkáňové transglutamináze; nejvyšší sérologická senzitivita.	98, 70	98, 95

Žádný ze sérologických testů není 100% senzitivní a/nebo specifický, a tudíž racionální interpretace vyžaduje kombinaci sérologických výsledků s ostatními nálezy (anamnestickými, klinickými a/nebo paraklinickými včetně endoskopického a histologického nálezu) (41). Z praktického pohledu je při diagnostice celiakie silně doporučeno provést v první vlně vyšetření anti-transglutaminázových protilátek v třídě IgA (TTG IgA) s anti-endomyziálními protilátkami v třídě IgA (EMA IgA) a současně vyšetřit celkovou hodnotu IgA protilátek. Při zjištěném selektivním IgA deficitu (který postihuje až 3% populace) (17, 21) je vhodné přejít k protilátkám v třídě IgG, tj. TTG IgG a EMA IgG. Připomeňme, že zjištění selektivního IgA deficitu může být spojeno s dalšími nemocemi vedoucími k atrofii tenkostřevních klků (vilózní atrofii), jako např. giardiáza, syndrom tenkostřevního bakteriálního přerůstání (*small intestinal bacterial overgrowth, SIBO*) či běžný variabilní imunodeficit (*common variable immunodeficiency, CVID*) (42).

#### 1.2.5.3.2.

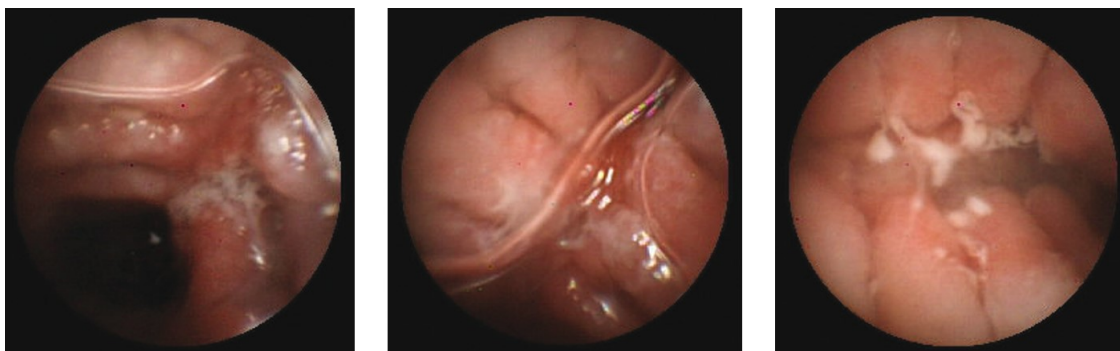
Endoskopický obraz celiakie v tenkém střevě je pestrý, od zcela normálního makroskopického nálezu (přítomného až u 1/3 nově diagnostikovaných pacientů s celiakií) až po obraz těžké enteropatie s vředy či s obrazem komplikací celiakie. Endoskopické změny jsou vyjádřeny více v duodenu a jejunu, méně v ileu. Pouze v některých případech jsou změny chudší v duodenu a jsou zvýrazněny až po hlubší jejunální intubaci aborálně od duodenojejunálního ohbí (43). Do endoskopického obrazu celiakie patří redukce počtu (až vymizení) a snížení výšky cirkulárních Kerkringových řas, atrofický (vyhlazený) vzhled sliznice s prosvítající cévní kresbou, dilatace tenkostřevních kliček s nápadně velkým objemem tenkostřevní tekutiny. Reliéfové změny bývají typické – vroubkování cirkulárních řas (*scalloping*), rýhování/brázdění (*furrows*), políčkování (obraz mozaiky) či nodulární reliéf (podmíněný hypertrofií podslizničních Brunnerových žlázek). Dalšími změnami je snížení či úplné chybění tenkostřevních klků (nejlépe pozorovatelné ve vodní imerzi a za použití zvětšovací endoskopických technik) (43, 44).

Endoskopický obraz komplikovaných forem celiakie, mezi které řadíme refrakterní celiakii, ulcerózní jejunoileitidu a zhoubné tenkostřevní nádory (především lymfom a adenokarcinom) může být rozmanitý. Refrakterní celiakie se často prezentuje jako mělké solitární okrouhlé nebo lineární vředy (16), ulcerózní jejunoileitida potom spíše působí jako mapovitě splývající hvězdicové vředy s bledě šedavou spodinou obklopené atrofickou sliznicí s vysokým rizikem iatrogenní, ale i spontánní perforace (43). Tenkostřevní lymfom (nejčastěji T-buněčný lymfom sdružený s enteropatií – *enteropathy-associated T-cell lymphoma, EATL*)

může mít v časných stádiích diskretní endoskopický nález ve formě ložiskově rigidní, infiltrované a křehké sliznice s granulárním reliéfem. V pokročilejších stádiích je vysoce rizikovým nálezem exulcerovaná masa a/nebo stenóza (45).

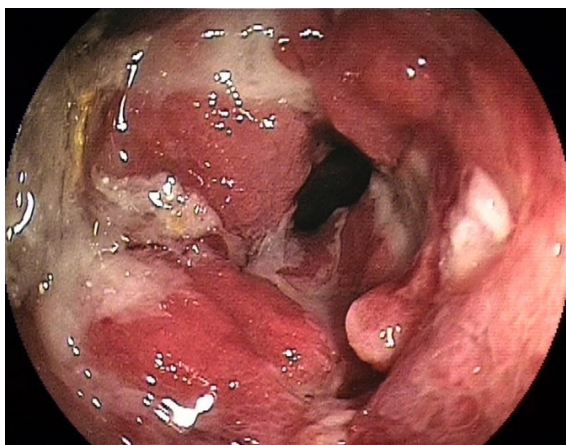


**Obrázek 1: Gastroskopie – typický obraz celiakie v aborálním duodenu zahrnuje snížení až vymizení klků, políčkování, nižší slizniční řasy**



**Obrázek 2: Kapslová endoskopie – ulcerózní jejunoileitida jako komplikace neléčené celiakie**





**Obrázek 3: Dvojbalonová enteroskopie – tenkostěvný lymfom jako komplikace neléčené celiakie**

#### 1.2.5.3.3.

Histopatologické změny u celiakie mohou být ložiskové s různě těžkým slizničním postižením. Při odběru klešťových biopsií je doporučeno odebrat minimálně 4 vzorky z postbulbárního duodena a 2 vzorky z duodenálního bulbu (18). Histologické vyšetření z duodenálního bulbu zvyšuje diagnostickou výtěžnost zejména v případě tzv. ultrakrátké celiakie, při které jsou slizniční změny omezeny na oblast bulbu a klinicky má nemoc mírný (oligosymptomatický) fenotyp (46).

První histologická klasifikace byla zavedena Marshem v roce 1992 (původní Marshova klasifikace) (47). Následně Rostami a poté Oberhuber upravili původní Marshovu klasifikaci tím, že stadium atrofie klků (vilózní atrofie, stadium 3) rozčlenili do 3 podskupin na atrofii mírnou (3a), výraznou (3b) a úplnou (kompletní, 3c) (modifikovaná Marshova-Oberhuberova klasifikace) (14). Tato modifikovaná verze původní Marshovy klasifikace zůstává zlatým standardem pro popis histologických změn v rámci diagnostiky i hodnocení efektu bezlepkové diety. Nejrecentnější zjednodušenou histologickou klasifikaci, jejíž cílem byla je minimalizace interindividuálních rozdílů v histologickém popisu, pak v roce 2004 navrhli Corazza a Villanacci (48).

Ke zlepšení endoskopického a/nebo histologického nálezu dochází dle různých zdrojů v intervalu 6-24 měsíců až několik let (18, 43, 45). Přestože až 75 % pacientů s minimálně 12měsíční adherencí k přísné bezlepkové dietě dosáhne symptomatické remise a vymizení vilózní atrofie, zůstává cca 50 – 70 % jedinců, u kterých i nadále přetrvává abnormálně zvýšený počet intraepiteliálních lymfocytů (49) a současně průměrná doba k plné restituci

tenkostřevních klků (vymizení vilózní atrofie) je okolo 3 let (31). Navíc, až u téměř 4 % séronegativních jedinců, je u celiakie přítomen vyšší počet intraepiteliálních lymfocytů odpovídající stadiu Marsh 1 (49) a naopak pouze u 16 % jedinců s histologickým nálezem abnormálně zvýšeného počtu intraepiteliálních lymfocytů je stanovena diagnóza celiakie (50).

Důležitým milníkem v terminologii byl v roce 2015 tzv. Bukurešťský konsenzus, který zavádí nový zastřešující histopatologický termín „mikroskopická enteritida“ (51). Korelace mezi sérologickými ukazateli celiakie a tíží slizničního poškození není vzájemná. Abrams a Donaldson prokázali pozitivní korelaci mezi zvýšenými hodnotami specifických autoprotilátek (TTG IgA a EMA IgA) a slizničním poškozením (vilózní atrofí) (52). Nicméně, Lanzini a Rubio-Tapia ve svých publikacích dokládají, že snížení a/nebo normalizace protilátkové odpovědi u celiakie nezaručuje normalizaci histologického nálezu, resp. vymizení vilózní atrofie (53).

#### 1.2.5.3.4.

Ostatní metody hrají v diagnostice celiakie spíše doplňkovou roli a/nebo jsou užívány v rámci diferenciatně diagnostické rozvahy.

Genetické vyšetření hlavního histokompatibilitního komplexu HLA-DQ2 a HLA-DQ8 přináší téměř 99 % negativní prediktivní hodnotu a je indikováno zejména u jedinců již léčených bezlepkovou dietou, dále při suspektním histologickém nálezů a současně negativní sérologii, případně u jedinců s jinými imunitně podmíněnými onemocněními, u který je indikován screening celiakie. V případě HLA-DQ2 je nutno rozlišovat mezi subtypem HLA-DQ2.5 nesoucím velmi vysokou predispozici pro celiakii a subtypem HLA-DQ2.2, u kterého je predispozice pro celiakii relativně nízká (18).

Kapslová enteroskopie není metodou první volby v diagnostice celiakie (16). Její význam je zejména v detekci komplikací celiakie (refrakterní celiakie, ulcerózní jejunoileitida, tenkostřevní zhoubný nádor) u pacientů s trvajícím a/nebo alarmujícími příznaky (břišní bolesti, průjmy, rozvinutý malasimilační syndrom, krvácení do gastrointestinálního traktu) přes přísné dodržování bezlepkové diety (44).

Testování střevní propustnosti (pomocí xylóзовého dechového nebo laktulózo-manitolového testu) a testy tkáňového poškození tenkého střeva (pomocí tzv. *intestinal fatty-acid binding protein, I-FABP*) nejsou pro jejich variabilní a nespolehlivou senzitivitu a specificitu v běžné klinické praxi doporučeny (54, 55).

Radiologické metody mohou být pomocnou metodou zejména v rámci širší diferenciatně diagnostiky malasimilačního syndromu a/nebo enteropatií. Podezření na celiakii může vzbudit

změna střevního reliéfu (vymizení řas jejunu – tzv. kolonizace jejunu, zvýraznění řas ilea – tzv. jejunizace ilea), dilatace tenkostřevních kliček (často doplněná stagnující tekutinou), ztlustění střevní stěny, intususcepce, lymfadenopatie, cévní změny, atrofie sleziny. Stejně jako v případě endoskopického nálezu je nález tkáňové masy a/nebo stenózy vysoce suspektní stran komplikace celiakie (lymfom, adenokarcinom) (44).

#### 1.2.5.4.

Dle klinického obrazu klasifikujeme celiakii podle jednotné mezinárodní terminologie (Oslo 2013) (20, 21). Rozlišuje formu symptomatickou (která se dále rozděluje na klasickou a neklasickou) a asymptomatickou (subklinickou; náhodně stanovenou u klinicky zcela asymptomatických jedinců, u kterých bylo na základě vyslovení podezření či rizika provedeno sérologické vyšetření). V rámci symptomatické formy mohou být přítomny jak příznaky střevní, tak mimostřevní, ale vlastní (a důležité) rozdělení symptomatické formy na podtyp klasický a neklasický je založeno pouze na přítomnosti či absenci známek malasimilačního syndromu (u klasické formy je přítomen, u neklasické chybí) (21). Z uvedených klasifikačních termínů lze vyčlenit několik variant celiakie. Anderson et al. (56) se v roce 2022 částečně vrací k termínu „potenciální celiakie“ (definuje ji jako izolovanou pozitivitu TTG IgA s normálním histologickým nálezem a bez ohledu na klinické příznaky) a současně ji obecněji označuje termínem „Potenciální celiakie nevyžadující bezlepkovou dietu“. Zda-li mají být pacienti s potenciální celiakií léčeni bezlepkovou dietu není jasné a toto rozhodnutí je přísně individuální jak ze strany indikujícího lékaře, tak ze strany pacienta (31). Ostatní formy celiakie dle výše uvedené WHO klasifikace pak označuje termínem „Celiakie vyžadující bezlepkovou dietu“ (56) (blíže viz Tabulka 2). Další pojem, se kterým se můžeme setkat je „ultrakrátká celiakie“, při níž jsou histologické změny zachyceny pouze v první části duodena (D1, bulbus) (57). Termín „séronegativní celiakie“ odkazuje na absenci sérologických ukazatelů typických pro celiakii a ukazuje na fakt, že celiakie není izolovaným onemocněním tenkého střeva, ale komplexním multisystémovým onemocněním, a stává se tak diagnózou per exclusionem (58).

V běžné klinické praxi lze pro stanovení diagnózy celiakie podle práce Catassi et al. použít „pravidlo čtyřech z pěti“ („*four out of five rule*“) (59), kdy při přítomnosti alespoň 4 z následujících kritérií může být diagnóza celiakie stanovena:

1. klinicky typické (terminologicky lépe „klasické“) známky a příznaky celiakie (odpovídající malasimilačnímu syndromu)
2. sérologická pozitivita
3. genetická pozitivita (HLA DQ2 a/nebo DQ8)
4. tenkostěvné poškození (vilózní atrofie a/nebo i minoritní slizniční postižení)
5. bezlepková dieta s dobrým efektem

Toto zjednodušené pravidlo též pomůže s terminologickým zpřesněním forem a případných variant nemoci – jako např. séronegativní celiakie (absence bodu 2), potenciální celiakie (absence bodu 4), neklasická forma celiakie (absence bodu 1), „non-responzivní“ celiakie (absence bodu 5).

#### **1.2.5.5.**

Diferenciální diagnostika celiakie je jednoduchá v případě symptomatické klasické formy nemoci s pozitivní sérologií a histologií. Ve všech ostatních případech je více či méně obtížná. Jedná se zejména o situace, kdy je nemoc asociována s jinými imunitními odchylkami (imunodeficiency, autoimunitní onemocnění), tenkostěvnými (super)infekcemi a dále formy ultrakrátké nebo u séronegativní celiakie (17). Samostatnou a klinicky velmi důležitou oblastí je diferenciální diagnostika zvýšeného počtu intraepiteliálních lymfocytů v tenkostěvné sliznici (tzv. „Marsh 1 histologie“) s či bez přidružené vilózní atrofie u séronegativních jedinců (18) (blíže viz Tabulka 5).

**Tabulka 5: Histologická diferenciální diagnostika stavů s přidruženou intraepiteliální lymfocytózou (IEL) a/nebo vilózní atrofií (VA)**

Stav	IEL	VA	Diagnostický krok
Potravinová hypersenzitivita (kravské mléko, sója, ryby, vejce, ...)	+		Anamnéza, imunologické /alergologické vyšetření
Vředová nemoc žaludku a/nebo duodena	+		Endoskopie
Léky (NSAID, PPI)	+		Anamnéza
Léky (mykofenolát mofetil, kolchicin, sartany)	+/-	+	Anamnéza
Infekce (virová enteritida, giardióza, kryptosporidióza, H. pylori)	+		Endoskopie, histologie, mikrobiologické vyšetření, dechový test na H. pylori
Infekce (tropická sprue, giardióza, Whippleova nemoc, mykobakteriíóza, AIDS)	+/-	+	Endoskopie, histologie, mikrobiologické vyšetření
Imunitně podmíněné nemoci (revmatoidní artritida, autoimunitní tyroiditida, systémový lupus erytematodes, autoimunitní enteropatie)	+		Anamnéza a cílené vyšetření dle dominujících příznaků
Běžný variabilní imunodeficit (CVID)	+	+	Endoskopie, sérologie imunologické vyšetření
Nemoc štěpu proti hostiteli (GvHD)	+	+	Anamnéza, hemato-onkologické vyšetření
Idiopatické střevní záněty – Crohnova nemoc	+/-	+	Anamnéza, endoskopie
Syndrom bakteriálního přerůstání	+	+	Anamnéza, dechový test
Mikroskopická kolitida	+		Endoskopie včetně etážových biopsií
Syndrom dráždivého tračníku	+		Anamnéza
Neceliakální glutenová senzitivita	+		Endoskopie, anamnéza, sérologie celiakie
Kolagenní sprue	+/-	+	Endoskopie a histologie
Chemoradioterapie	+/-	+	Anamnéza
Eozinofilní gastroenteritida	+/-	+	Endoskopie, histologie
Lymfocytární / kolagenní gastritida	+		Endoskopie, histologie
T-lymfom asociovaný s enteropatií (EATL)	+/-	+	Endoskopie, histologie, zobrazovací metody
Amyloidóza	+/-	+	Anamnéza, endoskopie, histologie

### **1.2.6. Komplikace celiakie**

Komplikacemi celiakie v širším slova smyslu jsou všechny stavy spojené s dlouhodobým postižením tenkého střeva včetně klinicky vyjádřeného malabsimilačního syndromu a jeho následků (60). V užším slova smyslu jsou komplikacemi preneoplastické (premaligní) stavy, které v čase vedou k rozvoji tenkostřevní malignity (refrakterní celiakie 2. typu, ulcerózní jejunoileitida, T-buněčný střevní lymfom a/nebo adenokarcinom) (18, 61).

### **1.2.7. Terapie**

#### **1.2.7.1. Bezlepková dieta**

Celoživotní a přísná bezlepková dieta je základem a aktuálně jedinou kauzální léčbou celiakie (18, 62). Vnímavost jedinců na kontaminaci potravy lepkem je vysoce individuální. Žádné morfologické slizniční změny nebyly pozorovány do množství pozřeného lepku 10 mg/d, ojedinělé změny při množství kolem 100 mg/d a jednoznačné (a jisté) změny nastávají při množství 500 mg/d a vyšším (63). Proto množství pozřeného lepku v rozsahu 10–100 mg/d lze považovat za bezpečné a množství do 10 mg/d za jistě bezpečné (18). Podle nařízení Evropské komise (EU 828/2014) mohou potraviny s označením „bez lepku“ obsahovat maximálně 20 mg lepku a s označením „velmi nízký obsah lepku“ maximálně 100 mg lepku na kilogram potraviny distribuované konečnému spotřebiteli (64). Plná adherence k bezlepkové dietě vede ve většině případů ke zmírnění a/nebo ústupu klinických obtíží, zlepšení až normalizaci tenkostřevního slizničního nálezu a poklesu rizika vzniku komplikací celiakie (65). Bezlepková dieta nesmí obsahovat všechny druhy pšenice, ječmene a žita a zprvu je nutno vyřadit i oves. Lepek obsahující obiloviny jsou nahrazovány rýží, kukuřicí, prosem, jáhly, aj.) a tzv. bezlepkovými pseudoobilovinami (pohanka, amarant, quinoa, aj.) (66).

#### **1.2.7.2. Nutriční podpora a suplementace nutrientů**

Přestože bezlepková dieta většinou vede ke zlepšení a/nebo normalizaci tenkostřevní absorpce živin (nutrientů), může být sama o sobě (také s ohledem na tenkostřevní postižení) spojena s nutričními / karencními deficity. Proto je nutná pravidelná monitorace mikro- i makronutrientů s jejich případnou suplementací (18). Snížení zásoby železa v organismu (s anebo bez anemie) je v době diagnózy uváděno v 7–80 % případů. Z pohledu diferenciální diagnózy sideropenie/sideropenické anemie je celiakie diagnostikována v 2 – 5 % případů a u těchto jedinců ukazuje na nutnost odběru biopsie z tenkostřevní sliznice i při

makroskopicky normálním nálezem (43, 67). Bezlepková dieta je často chudá na obsah kyseliny listové (folát) a její deficit společně s deficitem vitamínu B12 se uvádí u pacientů s neléčnou celiakií v 5 – 41 % (68). Na snížené hladině vitamínu D a vápníku se kromě vlastní poruchy tenkostřevní absorpce podílí i snížený příjem mléčných výrobků při často asociované sekundární laktóze intoleranci (69). Na karentní deficity stopových prvků zinku a mědi a pyridoxinu (vitamin B6) je nutné pomýšlet zejména při stanovení diagnózy a dosud nezačaté bezlepkové dietě a dále při hematologických odchylkách a/nebo neuropsychiatrických mimostřevních projevech (70). Snížené zastoupení vlákniny v bezlepkové dietě s jejím nahrazením cukry a tuky (zvyšujícími mimo jiné glykemický index) může vést jednak k zácpě a současně k hmotnostnímu nárůstu pacienta (71).

### 1.2.7.3. Management „celiakie neodpovídající na léčbu“ a „těžce probíhající celiakie“

Až u 30 % pacientů s celiakií se efekt bezlepkové diety přes plnou adherenci po dobu 6 – 12 měsíců nedostaví (v jednom či kombinaci níže uvedených klinických a/nebo paraklinických ukazatelů) (72). Tradičně je tento stav označován anglickým termínem „*non-responsive coeliac disease*“ (zkr. „*NRCD*“, překl. „celiakie neodpovídající / nereagující na bezlepkovou dietu“, „non-responzivní celiakie“, „neúplný efekt bezlepkové diety“) (73). Uvedený termín se však ukázal jako potenciálně zavádějící a buď je doporučeno ho nepoužívat vůbec, nebo používat s obezřetností (31), pro riziko možnosti špatného vedení diferenciální diagnostiky. Caio navrhuje změnu terminologie (31). Z pohledu běžné klinické praxe lze termín *NRCD* připustit pouze za podmínky, že bude následovat rozdělení pacientů do dvou skupin – celiakie s trvalou aktivitou (*angl. ongoing active coeliac disease, zkr. OACD*) a celiakie s přidruženými stavy (*angl. associated coeliac disease conditions, zkr. ACDCs*).

V rámci skupiny „celiakie s trvalou aktivitou“ (*OACD*) pak rozlišujeme tři stavy:

1. pokračující expozice lepku (*angl. continuous gluten exposure*). Jedná se o nejčastější příčinu trvajících známek/příznaků celiakie u pacientů s diagnostikovanou nemocí. Důvodem je buď neoptimální adherence pacienta k bezlepkové dietě a/nebo abnormálně vysoká senzitivita tenkostřevní sliznice k malým (stopovým) množstvím lepku.

2. pomalá odpověď na bezlepkovou dietu (*angl. slow-responders*), u kterých i při optimální adherenci k bezlepkové dietě dochází k pomalému zlepšení klinických i paraklinických (slizničních) příznaků, ale nedojde k jejich plné rezoluci v horizontu 1–2 let. Tento fakt má důležitou klinickou implikaci ve smyslu kontrol adherence k bezlepkové dietě nejen ve formě motivace pacienta a intervencí nutričním specialistou, ale v poslední době i využíváním laboratorních ukazatelů adherence k bezlepkové dietě – konkrétně stanovením

tzv. „glutenových imunogenních/imunoreaktivních peptidů“ (z angl. „gluten immunogenic peptides“, zkr. GIP) ve stolici a/nebo moči (74, 75) (blíže viz kapitoly 1.2.3. a 1.2.8.1.).

3. refrakterní celiakie – po 6-12 měsících trvají příznaky těžké klinicky i paraklinicky vyjádřené enteropatie (vilozní atrofie, malasimilační syndrom) a může vést k dalším komplikacím ve smyslu ulcerózní jejunoleitidy a/nebo tenkostřeční malignitě (lymfom, adenokarcinom) (76).

V rámci skupiny „celiakie s přidruženými stavy“ (ACDCs), kterou zvažujeme při nepotvrzení výše uvedených jednotek ze skupiny OACD, při žádném nebo minimálním postižení tenkostřeční sliznice a při vyloučení expozice lepkem, rozpoznáváme další jiné patologické stavy, se kterými se u pacientů s celiakií můžeme setkat. Jedná se o mikroskopickou kolitidu, dráždivý tračník, tenkostřeční bakteriální přerůstání, laktózovou či fruktózovou intoleranci, tenkostřeční divertikulární nemoc, Crohnovu nemoc, pankreatickou insuficienci, autoimunitní či polékovou enteropatii.

Celiakie se může manifestovat náhle vzniklým, „těžkým“ a více či méně rychle progredujícím stavem s významnými gastrointestinálními příznaky vyžadující hospitalizaci a/nebo parenterální výživu – tento stav lze označit jako celiakální krizi. Kromě plně vyjádřeného malasimilačního syndromu s deficitem základních makro- i mikronutrientů může být přítomna dehydratace s oběhovou nestabilitou či ortostatickou hypotenzí, ledvinným selháním, minerálovou dysbalancí, neurologickými příznaky (77). Spouštěčem celiakální krize je kombinace těžkého zánětlivého postižení tenkostřeční sliznice a současně povšechná imunitní aktivace. Přibližně u poloviny pacientů, u kterých se vyvine celiakální krize, má v předchorobí anamnézu provedené operace, prodělané infekce a/nebo probíhajícího těhotenství (78). Základem léčby těžkých stavů spojených s celiakií (probíhající za hospitalizace) je intravenózní hydratace, korekce minerálové dysbalance a zavedení bezlepkové diety. Kolem poloviny pacientů s celiakální krizí vyžaduje totální parenterální výživu a/nebo léčbu systémovými steroidy (79).

### **1.2.8. Dispenzarizace a ukazatele aktivity onemocnění**

Smyslem dispenzarizace pacientů s celiakií a systematické vedení jejich kontrol (*angl. follow-up*) je v první řadě prevence a/nebo časný záchyt případných komplikací celiakie a malasimilačního syndromu (ať již ve stadiu asymptomatických deficitů mikronutrientů nebo jeho plného vyjádření s mimo jiné přítomnou malnutricí, průjmy, anémií a/nebo metabolickou kostní nemocí). Dále pak pátrání po přidružených (asociovaných) imunitně podmíněných onemocnění (zejména tyreopatie, diabetes mellitus 1. typu, hepatopatie) a v neposlední řadě



i kontrola adherence a psychologická motivace k bezlepkové dietě a podpora v rámci seznámení pacienta s novou životní situací.

Opakované endoskopické kontroly s odběrem biopsií z tenkého střeva nejsou plošně doporučovány (blíže viz kapitola 1.2.8.1) (18), přesto se však v běžné klinické praxi často setkáváme s endoskopickými kontrolami běžně i po 12–36 měsících, a to bez relevantní klinické a/nebo paraklinické indikace. Klíčovým cílem dispenzarizace pacientů s celiakií je plný ústup klinických obtíží a normalizace slizničního nálezu (slizniční zhojení) (18). Při stanovení diagnózy je kromě revize anamnézy a fyzikálního vyšetření doporučen i screening rodinných příslušníků 1. stupně a při jejich pozitivitě i 2. stupně (sérologie, genetika) (18).

V prvním roce po stanovení diagnózy celiakie jsou vhodné častější klinické kontroly po 3–6 měsících. Jakmile dojde ke „stabilizaci nemoci“ (pacient nevykazuje a/nebo nejsou prokázány známky komplikací celiakie a malabsorpčního syndromu a současně pacient zvládá a dobře adheruje k bezlepkové dietě), lze prodloužit interval mezi klinickými kontrolami na 12–24 měsíců (18). Pacienty s celiakií dispenzarizuje gastroenterolog, internista nebo praktický lékař (17, 66). Z psychosociálního pohledu jsou pak důležité i patientské organizace, které mohou zprostředkovat mnoho praktických doporučení a rad pro život celiaka (66).

Přítomnost klinických příznaků ani pozitivní sérologie nejsou spolehlivými prediktory trvajících tenkostřevního postižení (80, 81). Otázka opakování horní endoskopie s odběrem tenkostřevní sliznice v rámci monitorace pacienta s celiakií je stále kontroverzní a aktuálně se evropská, americká i doporučení světové gastroenterologické organizace k tomu tématu striktně nevymezují (18, 21, 82). Časná bioptická kontrola v intervalu 6 měsíců od zahájení bezlepkové diety se zdá být neoptimální s ohledem na relativně vysoké riziko záhytu vilozní atrofie u pacientů, kteří ještě nestačili na absenci lepku v potravě dostatečně zareagovat (61). Jedním ze základních úkolů dispenzární péče u celiaků je rozdělení těchto pacientů do skupiny, která nebude vyžadovat opakované endoskopické kontroly s tenkostřevními biopsiemi (klinicky asymptomatictí a sérologicky negativní nebo v trendu klesající pacienti) a dále skupiny, která endoskopickou a histologickou dispenzarizaci vyžadovat bude (pacienti s protrahovanými klinickými obtížemi a/nebo trvajícím sérologickou pozitivitou, u kterých nutně předpokládáme zvýšené riziko vzniku komplikací celiakie, zejména pak tenkostřevní malignity) . Z pohledu běžné klinické praxe je nutné postupovat u pacientů individuálně. Jako přiměřený postup lze u skupiny „rizikových“ pacientů (věk nad 40 let, trvajícím klinické příznaky a/nebo pozitivní sérologie a/nebo vstupně těžká/závažná manifestace nemoci) nabídnout provedení kontrolní horní endoskopie s odběrem tenkostřevních bioptických vzorků v intervalu 1–2 let od zahájení bezlepkové diety a dále opět postupovat individuálně (18).

Dosud neexistuje všeobecně akceptovaný, spolehlivý, jednoduše a rychle proveditelný ukazatel aktivity celiakie jak pro klinické studie, tak pro běžnou klinickou praxi. V nejširším slova smyslu lze jako ukazatele aktivity celiakie použít kombinaci stejných klinických, laboratorních i endoskopických markerů, které používáme i pro stanovení diagnózy nemoci, jejichž použití i interpretace mohou být složité. Navíc, z praktického pohledu a s ohledem na relativně hojně zastoupení pacientů s celiakií nereagujících na bezlepkovou dietu, dosud chybí zařazení vhodného a objektivního ukazatele adherence pacientů k bezlepkové dietě.

Anamnestické a klinické ukazatele lze shrnout pod termín „Ukazatele aktivity založené na symptomech“. Nejčastěji jde o průjemy, břišní bolesti a/nebo křeče a nadýmání následované flatulencí, zácpou, nauzeou, pocitem na omdlení/slabostí, steatoreou, hmotnostním úbytkem a v neposlední řadě dráždivostí, otoky, bolestmi hlavy, svěděním kůže, refluxními obtížemi, borborygmy. Pro hodnocení subjektivních obtíží a kvality života pacientů s celiakií lze použít dva specifické dotazníky (*Celiac Disease Symptom Diary*, *Celiac Disease Patient-Reported Outcome*), které byly v USA schváleny Federálním úřadem pro kontrolu léčiv (FDA). Výhodou uvedených škál a dotazníkových indikátorů je jejich úplná neinvazivita, nevýhodou však může být jejich časová náročnost a tím i velice sporná uplatnitelnost v běžné klinické praxi.

Endoskopický obraz celiakie je popsán v kapitole 1.2.5.3.2. a je důležitý pro prvotní diagnostickou, resp. diferenciálně diagnostickou rozvahu. Nicméně z pohledu hodnocení aktivity již diagnostikované nemoci je nutno považovat nálezy za nespecifické (83). Tato nevýhoda (limitace) endoskopického hodnocení aktivity celiakie (alternativně lze připustit termín „endoskopické ukazatele aktivity celiakie“) je navíc podpořena zjištěním Tursiho, že po zahájení bezlepkové diety dochází v případně dobré odpovědávosti pacienta k endoskopické rezoluci (nebo alespoň trendu ke zlepšení) za přibližně 6 měsíců, avšak k histologické rezoluci (nebo alespoň trendu ke zlepšení) až za přibližně 12 měsíců (84). Navíc, běžná endoskopie je schopna odhalit pouze hrubší makroskopické slizniční poškození spojené s více pokročilými stádii nemoci (reliéfové změny, vilózní atrofie, případně komplikace celiakie).

Z pohledu „histologických ukazatelů aktivity celiakie“ je tenkostěvná slizniční histologie zlatým standardem ke stanovení diagnózy celiakie a v rámci diferenciální diagnostiky k vyloučení jiných příčin obtíží nesouvisejících s celiakií (kapitola 1.2.5.3.3.). Všechny histologické klasifikace jsou v obecném pohledu založeny na dvou ukazatelích – 1. počet intraepiteliálních lymfocytů (IEL), 2. poškození tenkostěvné sliznice (v podobě vilózní atrofie a/nebo kryptové hyperplázie) (13, 83, 85). Limitace histologických ukazatelů/klasifikací pro běžnou klinickou praxi lze sledovat v sekvenci již od samotného odběru histologického vzorku z tenkostěvné sliznice - samotná endoskopie je relativně invazivní a časově náročnou

procedurou, změny jsou/mohou být ložiskové a tudíž nemusí být při odběru kleštěmi zastiženy (*angl. sampling error*), pro správný odečet histologie je nutná optimální orientace vzorku a expertní erudice patologa (je riziko subjektivní chyby v popisu diskrétních lézí, zejména v oblasti stupňů vilózní atrofie) (83). Důležitým faktorem, který určitým způsobem upozadňuje možnost využití histologie jako ukazatele aktivity nemoci je i fakt, že u významné části pacientů nedojde i přes adekvátní adherenci k dietě k úplné normalizaci histologického nálezu (resp. normalizaci vilózní architektury) (86). Tato diskordance může být vysvětlena různým časovým intervalem ke zlepšení/zhojení tenkostěvních sliznic v rozmezí dnů, měsíců až let (87).

Pod pojmem „sérologické ukazatele aktivity celiakie“ rozumíme pravidelné stanovení sérových hladin autoprotilátek specifických pro celiakii. Vyšetření je nutnou součástí stanovení diagnózy, kdy sérologie dobře koreluje s histologií (88). Přesto, že jsou autoprotilátky přímo zapojeny do imunopatogenezy nemoci a tím nutně odrážejí její aktivitu, není jejich prognostický význam v monitoraci/dispensarizaci pacientů s celiakií jasný, a proto není tento postup pro monitoraci/dispensarizaci pacientů s celiakií doporučen (83). Na druhou stranu lze připustit (a pro běžnou klinickou praxi i doporučit) pravidelné měření sérových hladin autoprotilátek jako ukazatele adherence k bezlepkové dietě (avšak s vědomím, že po zahájení bezlepkové diety dochází k poklesu autoprotilátek s určitou prodlevou v porovnání se změnou (zlepšením) klinických obtíží a/nebo histologie) (89). Kromě anti-transglutaminázových protilátek v třídě IgA je vhodné pravidelně stanovovat i hladinu celkového IgA k vyloučení nově vzniklého IgA deficitu (při kterém zjišťujeme jejich nízké titry a/nebo absenci) (90).

K „ostatním ukazatelům aktivity celiakie“ patří vyšetření zaměřená na změny střevní propustnosti (např. poměr močové frakční exkrece laktulózy a manitolu), přítomnost imunologických komponent a/nebo genetických znaků v krvi (cytokiny, gluten-reaktivní T lymfocyty), ukazatele slizničního poškození a/nebo zánětu (mastné kyseliny vázající bílkovina (*angl. intestinal fatty acid-binding protein, I-FABP* a/nebo fekální kalprotektin). Žádný z uvedených ukazatelů však není v běžné klinické praxi ani v klinických studiích pevně ukotven pro svou složitost provedení, nízkou specificitu a/nebo interindividuální variabilitu a/nebo nízkou odpovídavost na léčbu (91).

### **1.2.8.1. Markery adherence k bezlepkové dietě**

Obecně lze hodnocení adherence k bezlepkové dietě rozdělit do čtyř navazujících kroků (ukazatelů), které v širším slova smyslu opět sledují obecný princip přístupu k pacientovi („anamnéza“ a „klinika“ – odp. kapitola 1.2.8.1.1.; „paraklinika“ – odp. kapitoly 1.2.8.1.2., 1.2.8.1.3 a 1.2.8.1.4.).

#### **1.2.8.1.1. Klinické zhodnocení**

Vlastní (subjektivní) výpověď pacienta o rozsahu a dodržování bezlepkové diety je základem pro další hodnocení. Základní klinické parametry nutrice (hmotnost, výška, BMI) jsou nutnou součástí vyšetření (18).

#### **1.2.8.1.2. Dietologická konzultace**

Vyšetření a konzultace nutričním specialistou (s výhodou za použití dotazníků) může přinést cennou informaci o případné nechtěné kontaminaci potravy lepkem a současně zaručuje doporučení vyvážené a nutričně bohaté stravy při přísné bezlepkové dietě (92) .

#### **1.2.8.1.3. Laboratorní ukazatele**

Všechny pro celiakii specifické autoprotilátky jsou gluten-dependentní a po zahájení přísné bezlepkové diety lze očekávat klesající trend nebo v optimálním případě normalizaci jejich titru. Sérologická pozitivita trvající déle než 1 rok svědčí s vysokou pravděpodobností pro přítomnost lepku v potravě (93).

Užitečným a objektivním ukazatelem adherence k bezlepkové dietě jsou glutenové imunogenní peptidy (GIP). Jedná se o štěpy původního lepku, které jsou odolné k žaludečním i střevním enzymům a lze je kvantitativně stanovit v moči a/nebo stolici. Pozitivní nález GIP v moči a/nebo stolici ukazuje na přítomnost lepku v potravě i tím na neoptimální adherenci k bezlepkové dietě (94).

### 1.3. Citrulin a ornitin

#### 1.3.1. Historické poznámky

Citrulin byl objeven a extrahován z vodního melounu (*Citrullus vulgaris*) v roce 1914 japonským biotechnologem Kogou (95, 96). Po mnoho let byl následně považován za pouhý intermediální meziprodukt močovinného (ureasyntetického, ornitinového) cyklu bez jiné/větší klinické významnosti (97, 98). První poznatky o biologické povaze a funkci citrulinu včetně jeho vztahu k tenkému střevu přinesl v roce 1981 Windmüller et al. (99) a od roku 2000 autoři Crenn, Curis a Cynober ve svých pracích začínají uvádět citrulin jako možný laboratorní ukazatel tenkostřevní funkce (100-104).

Ornitin byl objeven v roce 1932 Krebsem a Hanseleitem v rámci objevu močovinného cyklu (105, 106).

#### 1.3.2. Fyziologické poznámky

Citrulin je neesenciální (v organismu syntetizovatelná) a nebiogenní (neproteinogenní) aminokyselina. Citrulin se v těle vyskytuje ve dvou formách – jednak jako volný citrulin a dále jako vázaný v rámci tzv. citrulinovaných proteinů (103). Na buněčné úrovni je jeho metabolismus řízen těmito třemi základními enzymy – v rámci syntézy/anabolismu citrulinu je to ornitinkarbamoyltransferáza (OCT, syn. ornitintraskarbamyláza) a NO-syntáza (NOS), v rámci degradace/katabolismu citrulinu je to argininosukcinát syntáza (ASS, syn. citrulin-aspartát ligáza) a méně významná argininosukcinát lyáza (ASL). Na orgánové úrovni pak můžeme metabolismus citrulinu pozorovat ve třech oddělených biochemických drahách, které probíhají na různých úrovních – zaprvé v biosyntetické dráze (ose) argininu, zadruhé v rámci produkce NO (NO cyklus), zatřetí v rámci produkce močoviny v játrech (močovinný cyklus) (103, 107).

OCT přímo katalyzuje přeměnu ornitinu na citrulin. Jedná se o tzv. „anabolickou variantu OCT“ zapojenou do syntézy citrulinu (citrulin je v této reakci hlavním produktem) a tato reakce je proximální součástí homeostaticky významné biosyntetické dráhy, na jejímž konci je pro organismus (proteosyntézu) důležitá aminokyselina arginin (103). Některé bakteriální druhy obsahují i tzv. „katabolickou variantu OCT“, při jejíž činnosti je citrulin substrátem (tento enzym a reakce nejsou u savců a lidí významné (108)). Na buněčné úrovni je OCT lokalizována u prokaryot a nižších eukaryot v cytoplazmě, u vyšších eukaryot a savců se však nalézá

v mitochondriální matrix jako součást tzv. močovinnového (syn. ureasyntetického, ornitinového) cyklu (109). OCT je preferenčně lokalizována v játrech (hepatocytech) a střevní sliznici (enterocytech) (110).

NOS je zodpovědná za syntézu oxidu dusnatého (NO) a tato reakce probíhá ve všech tkáních (103). Existují tři základní rodiny NOS – nNOS přítomná v nervových buňkách, iNOS přítomná v imunocytech (zejména makrofázích) a eNOS přítomná v endotelových buňkách. Bez ohledu na lokalizaci je mechanismus účinku NOS identický – enzym katalyzuje přeměnu argininu na NO za vzniku citrulinu (citrulin je tedy v této reakci vedlejším produktem) (111). Takto vzniklý cytoplazmatický citrulin (ale i volný plazmatický citrulin) pak může být vhodným substrátem pro enzymy ASS a ALS za opětovného vzniku argininu. Tímto je uzavřen tzv. cyklus oxidu dusnatého (NO – cyklus, „parciální/poloviční močovinnový/ornitinový cyklus“) umožňující recirkulaci citrulinu a NO v rámci metabolismu oxidu dusnatého. Při nekontrolované aktivitě NO cyklu by docházelo k excesivní a nežádoucí produkci NO s poškozením okolních buněk a tkání, a proto je tento cyklus negativně zpětnovazebně regulován (molekula NO má inhibiční vliv na enzym ASS) (103, 112).

ASS je ubikviterním cytoplazmatickým enzymem přítomným prakticky u všech organismů. Je tzv. distální součástí již zmíněné biosyntetické dráhy argininu a přímo katalyzuje přeměnu citrulinu na arginin. Topograficky je enzym nejvíce přítomen v játrech (hepatocytech) a ledvinách (tubulární buňky), nejméně pak ve střevní sliznici (enterocytech) (113).

Dosud nebyl zjištěn specifický membránový přenašeč pro citrulin. Transport přes cytoplazmatickou membránu je zajišťován obvyklými aminokyselinovými transportéry (konkrétně na membráně enterocytu se jedná o natrium dependentní přenašeč) (114). Transport citrulinu z a do mitochondrie je pak zajišťován ornitin-citrulinovým proton- a kalcium-dependentním výměníkem lokalizovaným na vnitřní mitochondriální membráně (103, 115).

Volný citrulin obsažený v potravě (pouze ve vodním melounu) je absorbován enterocyty preferenčně v oblasti středního a aborálního ilea (103, 114). Tento dietní zdroj citrulinu je však u člověka minoritní. Majoritním zdrojem volného citrulinu je citrulin vzniklý primárně v enterocytech tenkého střeva (dominantně v jeho orálních částech – jejunum, duodenum) (100) ze svého hlavního prekurzoru glutaminu (který je obsažen v běžné potravě a ze střevního lumen přestupuje do enterocytární cytoplazmy) (116). Za určitých okolností (např. při protrahované nízkobílkovinné dietě, protrahovaném hladovění, u novorozenech savců) se prekurzorem citrulinu mohou stát i jiné (v lumen střeva přítomné) aminokyseliny (glutamát, prolin, arginin) (117, 118). Citrulin vstupuje do portální krve, obchází játra (hepatocyty nemají schopnost vychytávat citrulin z portální a prakticky ani z arteriální krve) (99) a směřuje do ledvin

(epitelové buňky proximálního tubulu), kde je pomocí enzymů ASS a ASL konvertován na arginin (119). Arginin následně vstupuje do systémové cirkulace a je k dispozici celému organismu pro proteosyntetické děje. Tímto způsobem citrulin poskytuje dospělému organismu dostatečný přísun argininu pro metabolické a homeostatické procesy (103). Vzhledem k deficitu argininu v mateřském mléku je u novorozenců aktivní i alternativní dráha konverze citrulinu na arginin přímo v enterocyty (120), která v dospělosti mizí. Uvedená osa glutamin – ornitin/citrulin – arginin je důležitým regulátorem dusíkové homeostázy. Zaprvé, citrulin de facto chrání játra před nadměrnou nabídkou argininu z potravy (teoreticky by játra byla schopna vychytat prakticky všechny potravou dodaný a následně v portální krvi přítomný arginin s výsledným deficitem argininu pro ostatní orgány a dále by samotný arginin jakožto silný pozitivní stimulant ureageneze vedl k depleci ostatních nadmetabolizovaných aminokyselin) (121). Citrulin lze tedy považovat za pomyslný „maskovaný arginin“ obcházející játra (jak uvedeno, játra nejsou schopna vychytávat citrulin). Zadruhé, při specifických situacích (např. nízkobílkovinná dieta nebo hladovění) dochází k nadměrné expresi (overexpresi) OCT v enterocyty s navýšením produkce citrulinu a druhotně k možnosti snížení intenzity (downregulaci) močovinového cyklu (122).

Vedle volného plazmatického citrulinu, jehož metabolismus je rozdělen mezi několik kompartmentů (střevo, portální krev, ledviny, systémová cirkulace, povšechný metabolismus oxidu dusnatého a tkáňová proteosyntéza), existuje i forma volného citrulinu, která je přísně kompartmentalizována do jater a není zapojena do ostatních (mimojaterních) metabolických drah. Játra (hepatocyty) nejsou schopna vychytávat ani uvolňovat volný citrulin z/do portální/systémové cirkulace (99). V hepatocyty (cytoplazmě i mitochondriích) je citrulin pevnou součástí již zmíněného močovinového cyklu (jehož základní funkcí je udržování dusíkové homeostázy odstraňováním nadbytečného a případně škodlivého dusíku v podobě amoniaku při současné syntéze močoviny).

Kromě volného citrulinu se v organismu vyskytuje citrulin v rámci citrulinovaných proteinů. Vzhledem k absenci specifického kodonu pro citrulin musí být jeho náleznost v jakémkoliv proteinu výsledkem posttranslační modifikace tohoto proteinu (103). Tato forma citrulinu je tedy zcela nezávislá na metabolických drahách volného citrulinu. Posttranslační modifikace je řízena specifickým kalcium-dependentním enzymem protein-arginyl deaminázou (PAD), který v rámci již hotového peptidu mění arginin na citrulin. Tento enzym je přítomen v mnoha tkáních, a proto i přítomnost citrulinovaných proteinů může být heterogenní (103) a spjata s různými patologickými stavy, zejména imunitně podmíněnými (autoimunitními). Citrulinace proteinů je obecným mechanismem, který zvyšuje proteinovou

antigenicitu. Příkladem imunitně podmíněné nemoci s vazbou na citrulinované proteiny je revmatoidní artritida, u níž citrulinované proteiny podněcují vznik autoprotilátek (*ACPA – anti-citrullinated peptide antibodies*) (123), dále psoriáza (124) a roztroušená skleróza (125).

Ornitin je neesenciální aminokyselina, která vzniká jako meziproduct v močovinovém cyklu. Je klíčovým substrátem pro syntézu prolinu, polyaminů a právě výše zmiňovaného citrulinu. Hraje také důležitou roli v regulaci několika metabolických procesů, které vedou k onemocněním, jako je hyperornitinémie, hyperamonémie a gyrátová atrofie. Mechanismus účinku, který stojí za mnohostrannou úlohou ornitinu, dosud nebyl zcela objasněn. Několik typů nádorových onemocnění je také charakterizováno nadměrnou syntézou polyaminů z ornitinu (105).

### 1.3.3. Význam v etiopatogenezi a klinice

Etiopatogenetický a klinický význam citrulinu lze pozorovat ve třech oblastech:

1. vrozená onemocnění ve vztahu k defektnímu citrulinovému metabolismu
2. citrulin jako ukazatel tkáňové funkce
3. citrulin jako léčebný nástroj

Mutace pro kterýkoliv enzym a/nebo protein v metabolických drahách citrulinu ve výsledku vede ke zpomalení močovinového cyklu v játrech s výslednou hyperamonémií, jejíž progresse vede ke kómatu a smrti (103). Příkladem raritních nozologických jednotek jsou např. OCT deficiencie, citrulinémie nebo syndrom hyperornitinémie, hyperamonémie a homocitrulinémie (*angl. Triple H syndrome*) (126).

Metabolismus volného citrulinu je rozdělen mezi dva hlavní orgány – střevo (syntéza citrulinu) a ledviny (degradace citrulinu). Proto lze citrulin využít jako relativně spolehlivý ukazatel střevní (viz kapitola 1.3.4 a 1.3.5.) a/nebo ledvinné funkce (závažná renální dysfunkce je provázena hypercitrulinémií) (127).

Citrulin je přirozeným prekurzorem argininu, čehož lze využít v rámci suplementace např. u pacientů se syndromem krátkého střeva nebo u sarkopenických pacientů pokročilého věku (101, 103, 128, 129). Citrulin jako nástroj ovlivnění metabolismu oxidu dusnatého (ve vztahu k arteriální hypertenzi a imunostimulaci) byl zkoumán několika autory se slibnými výsledky (130). Dále byl u citrulinu popsán hypoamonemizující potenciál založený na obnovení a stabilizaci močovinového cyklu v játrech (131).



#### **1.3.4. Citrulin a enteropatie (včetně celiakie)**

Vzhledem k tomu, že citrulin je specifickým produktem enterocytů, lze jej s výhodou využít jako ukazatele celkové funkční enterocytární masy (103). První klinické zkušenosti se stanovením citrulinémie ve vztahu k funkci tenkého střeva přinesl Crenn (101). Od té doby byly publikovány práce, které využívají citrulin jako ukazatel tenkostřevní funkce u patologických stavů (tenkostřevní resekce se syndromem krátkého střeva, tenkostřevní transplantace, onemocnění spojená s vilózní atrofií, postiradiační enteropatie, enteropatie jako následek onkologické myeloablativní léčby, nekrotizující enterokolitida (100, 132-134). Normální plazmatická hladina citrulinu u zdravého dospělého člověka se uvádí 40 ( $\pm$ 10)  $\mu$ mol/L (96, 134).

#### **1.3.5. Ornitin a enteropatie (včetně celiakie)**

Roli ornitinu ve vztahu ke střevním onemocněním (včetně celiakie) lze z dostupné literatury hodnotit jako stále zcela nejasnou (105, 135, 136). Zajímavé výsledky přinesla naše recentní pilotní práce (137), která ukazuje signifikantně nižší plazmatické hladiny ornitinu u pacientů s nekomplikovanou celiakií ve srovnání se zdravými kontrolami. Jedná se prakticky o první publikaci, která popisuje vztah ornitinu k enteropatii (celiakii).

## **1.4. Hyposplenismus a celiakie**

### **1.4.1. Hyposplenismus – definice, epidemiologie, anatomie a patofyziologie, diagnostika**

#### **1.4.1.1. Definice**

Hyposplenismus je definován jako stav, kdy slezina neplní adekvátně své funkce (synonymem pro tento stav je též termín funkční hyposplenismus) (138). Pokud funkce sleziny vymizela zcela, hovoříme o asplonii (při zachované slezině se jedná o funkční asplonii, při chybějící slezině o anatomickou asplonii). Pro menší velikost sleziny používáme termín atrofie sleziny (splenická atrofie) (139).

#### **1.4.1.2. Epidemiologie**

Mnoho klinických stavů (vrozených, hematologických, imunologických, gastroenterologických a iatrogenních) (140, 141) je spojeno s určitým stupněm poruchy funkce sleziny od reverzibilního, mírného a klinicky němého hyposplenismu, až po nevratnou atrofii sleziny s možnou anatomickou asplenií (142). Prototypem nemoci, u které je hyposplenismus přítomen v těžké formě prakticky vždy, je srpkovitá anémie (142, 143). Celiakie je nejčastější (nejen gastroenterologickou) nemocí, se kterou je hyposplenismus (s nebo bez slezinné atrofie) asociován. Prevalence hyposplenismu je udávána až 20 % u nekomplikovaných a u 80 % komplikovaných forem celiakie (140, 144). Tato asociace byla rozpoznána již začátkem 80. let 20. století (145, 146). Hyposplenismus se nevyskytuje u dětí do cca 2 let věku, pravděpodobně vzhledem k nezralosti slezinné tkáně (resp. její marginální zóny) (147). Tíže hyposplenismu koreluje s délkou expozice lepku, přičemž bezlepková dieta je efektivní pro návrat (nebo alespoň zlepšení) slezinných funkcí (kromě pacientů s ireverzibilní slezinnou atrofií) (148).

#### **1.4.1.3. Anatomie a patofyziologie**

Slezina je periferní (sekundární) opouzdrěný imunitní orgán uložený v peritoneální dutině, který představuje největší nahromadění lymfatické tkáně v organismu (26). Je bohatě cévně zásobená (5 % minutového srdečního výdeje), což zaručuje trvalý a dostatečný přísun krevních elementů a antigenů potřebný pro správné plnění slezinných funkcí (149).

Anatomicky označujeme slezinný parenchym termínem pulpa (dřeň) a podle povahy převažujících buněk ji dělíme červenou a bílou. Funkce červené pulpy směřuje ke krevní filtraci a bílé pulpy k imunitním úlohám (z anglického „filter and fight“) (25).

Bílá pulpa je tvořena ostrůvky mízní tkáň zanořenými do červené pulpy s početně převažujícími buňkami bílé krevní řady. Mikroprostředí bílé pulpy je organizováno do několika kompartmentů (150). Rozlišujeme oblast s převahou T lymfocytů morfologicky vázanou na průběh arteria vaginata a oblast s převahou B lymfocytů, která je vázaná na průběh arteria centralis a obsahuje jednak mízní folikuly a dále marginální zónu (MZ), která vytváří pomyslnou hranici mezi červenou a bílou pulpou. Marginální zóna je ve slezině důležitou tranzitní zónou pro buňky opouštějící krevní tok a směřující do bílé pulpy.

Červená pulpa je tvořena systémem provazců (Billrothovy provazce) a sinusů (slezinné sinusoidy) s početně převažujícím zastoupením buňkami červené krevní řady. Krev přitékající do červené pulpy proudí buď přímo do slezinných sinusoid (představuje pouze asi 10 % krevního přítoku), nebo do extravaskulárního prostoru tvořeného slezinnými provazci a až poté se sbírá do sinusoid (90 % krevního přítoku). Oba oběhy umožňují látkovou výměnu a filtraci mezi pulpou a krví (26).

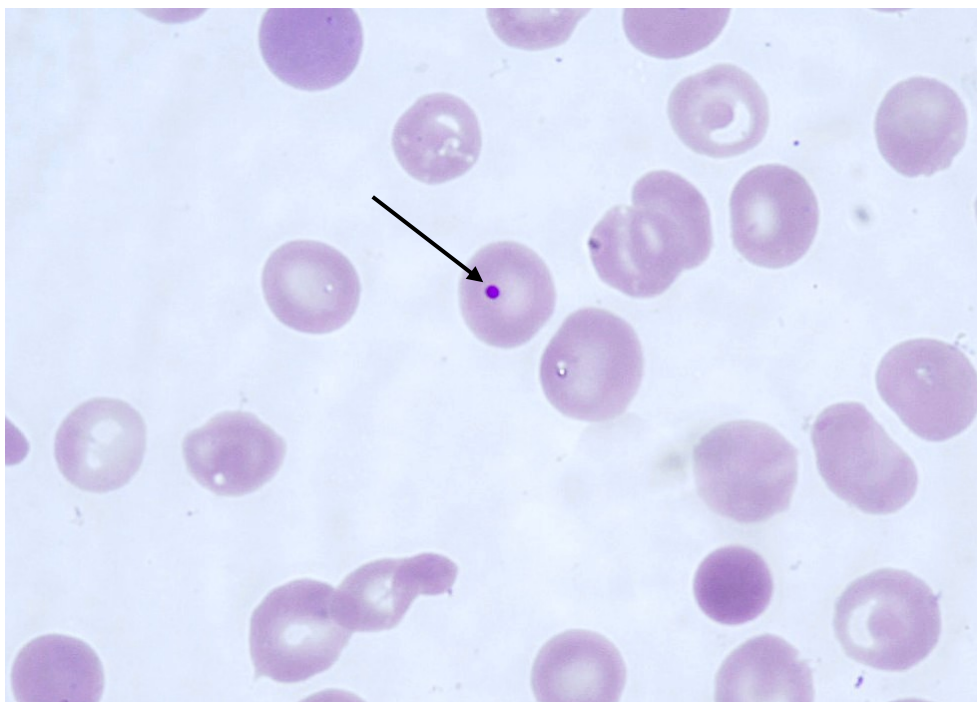
Funkčně tvoří červená pulpa, bílá pulpa a marginální zóna tři vzájemně komunikující kompartmenty, které v širším slova smyslu zajišťují propojení nespecifické a specifické imunity. Většina krevního toku slezinou probíhá přes marginální zónu a podél bílé pulpy a tím zajišťuje optimální „imunitní krevní monitoring“. Oponizované bakterie jsou efektivně odstraňovány makrofágy sleziny a jater. Nicméně, bakterie, které jsou oponizovány nedostatečně (zejména opouzdřené bakterie, např. *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* a *Haemophilus influenzae* typu b) a jejichž polysacharidové pouzdro znemožňuje vazbu komplementu a/nebo blokuje interakci se slezinnými makrofágy, mohou být eliminovány pouze ve slezině. Tato eliminace je zajištěna pomocí přirozených IgM protilátek tvořených B lymfocyty marginální zóny. Jedná se o unikátní B lymfocytární subpopulaci uloženou právě v marginální zóně sleziny. Slezina je tak svou bílou pulpou zapojena zejména do imunity získané (specifické) a marginální zónou zejména do imunity vrozené (nespecifické) (150).

#### **1.4.1.4.Diagnostika hyposplenismu**

Diagnostika snížené funkce sleziny se opírá o anamnézu, fyzikální a paraklinická vyšetření. Mezi ně patří metody založené na aplikaci radioizotopem (technecium-99m a/nebo rubidium 81) značeného nosiče po jeho vychytání a následně vyplavení ze sleziny. Tyto metody jsou obtížněji využitelné pro ekonomickou nákladnost, omezenou dostupnost a/nebo interpretovatelnost (151). Dále je možné využít metod detekce morfologicky alterovaných červených krvinek, které se při snížené filtrační (eliminační) funkci sleziny nechtěně dostávají zpět do systémového oběhu. Patří sem detekce tzv. Howell-Jollyho tělísek (Obrázek 4) – zbytků

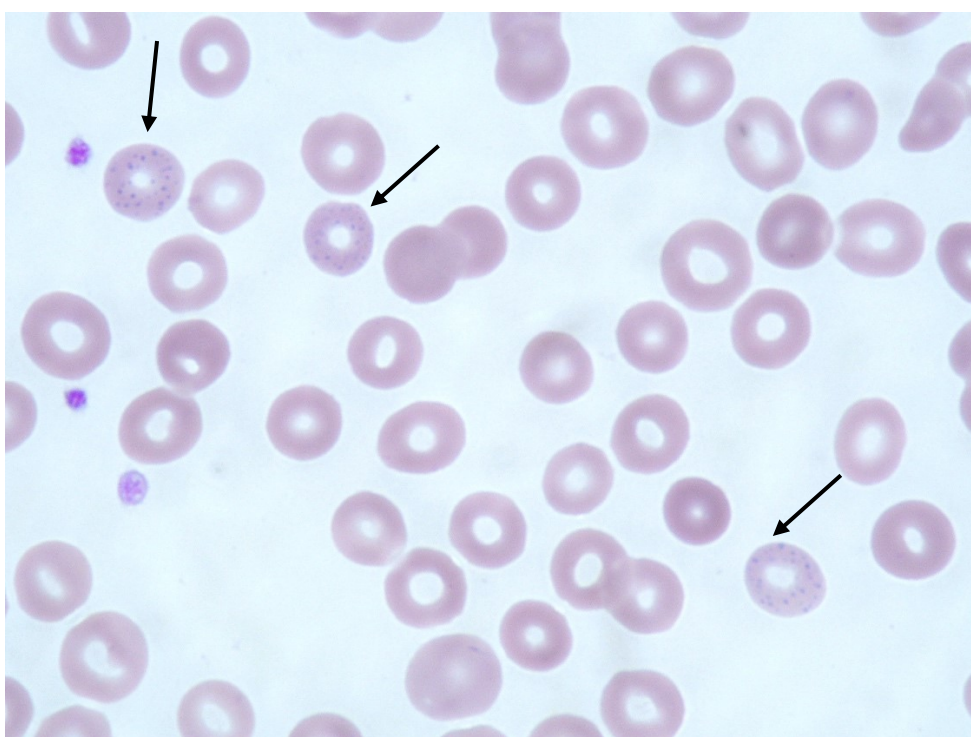
jaderné DNA erytrocytů v periferním krevním nátěru ( $> 1\%$  zastoupení těchto erytrocytů svědčí pro slezinnou dysfunkci) (152). Relativně nízká senzitivita a specifická (zejména v případech mírných forem hyposplenismu) však tuto metodu upozaďuje v rutinním využití (153, 154). Zlatým standardem pro hodnocení slezinné funkce a tíže hyposplenismu je kvantifikace tzv. tečkovaných erytrocytů (z anglického „pitted erythrocytes“) v periferním krevním nátěru (Obrázek 5) pomocí fázové interferenční mikroskopie. Tečkování je podmíněno vakuolami vyplněnými buněčným detritem (amorfní hmota se zbytky hemoglobinu, železa, feritinu, zbytky membrán a mitochondrií) (155, 156). Senzitivita, specifická i pozitivní prediktivní hodnota metody se pohybují v rozmezí 90-98% (157, 158), přičemž procentuální zastoupení tečkovaných erytrocytů v rozmezí 0-4% je považováno za normální (5-14% ukazuje na slezinnou dysfunkci,  $> 15\%$  na klinicky významný hyposplenismus, resp. asplénii) (159, 160). Hodnocení tečkovaných erytrocytů dobře koreluje s velikostí sleziny (161). Důležitým zjištěním je inverzní korelace mezi počtem tečkovaných erytrocytů odrážejícím sníženou filtrační/krevní funkci sleziny a počtem B lymfocytů marginální zóny odrážejícím poruchu obranného/imunitního kompartmentu sleziny (140).

V běžné klinické praxi lze vyzorovat dva směry indikace vyšetřování funkční schopnosti sleziny. První doporučuje vyšetřovat všechny jedince v riziku přítomnosti hyposplenismu buď pro přítomnost nemocí/diagnóz asociovaných s hyposplenismem a/nebo při zjištění zmenšené sleziny na zobrazovacím vyšetření (142, 162). Druhý, preferovaný v České republice, vychází z posledního doporučeného postupu Společnosti pro infekční lékařství a České vakcinologické společnosti České lékařské společnosti JEP pro péči o pacienty s porušenou či zaniklou funkcí sleziny (138) a využívá k výběru rizikových jedinců zjednodušená klinická kritéria. Tato zohledňují základní onemocnění, velikost sleziny, počet trombocytů a přítomnost Howell-Jollyho tělísek (163). V případě, že kritéria nejsou splněna, je vyšetření funkce sleziny indikováno u nemocí a stavů s vysokou pravděpodobností přidruženého hyposplenismu (srpkovitá anémie, lymfoproliferativní nemoci, talasémie, stav po ozáření sleziny). V ostatních případech je vyšetření přísně individuální a jeho indikace patří do rukou ošetřujícího lékaře (většinou se jedná i případy poruchy imunity bez jiného vysvětlení).



**Obrázek 4: Howell-Jollyho tělísko v erythrocytu (označeno šipkou, krevní nátěr)**

Zdroj: prof. MUDr. Pavel Žák, Ph.D. (IV. interní hematologická klinika FNHK)



**Obrázek 5: Tečkování erythrocytů (označeno šipkami, krevní nátěr)**

Zdroj: prof. MUDr. Pavel Žák, Ph.D. (IV. interní hematologická klinika FNHK)

## 1.4.2. Hyposplenismus u celiakie

### 1.4.2.1. Mechanismus vzniku hyposplenismu u gastrointestinálních onemocnění včetně celiakie

Mechanismus vzniku hyposplenismu u nemocí GIT není zcela objasněn, nicméně existují relevantní hypotézy, jež mohou vysvětlit vznik snížené funkce sleziny u těchto pacientů (164). Mechanismy se mohou vzájemně kombinovat, funkčně spolu přímo souvisejí a obecně je lze rozdělit na kvantitativní (se snížením objemu slezinné tkáně na mikroskopické a/nebo na makroskopické úrovni) a kvalitativní (se snížením slezinné funkce).

Prvním (kvanitativním) mechanismem je tzv. „retikuloendoteliální atrofie“. K tomuto stavu pravděpodobně vede přerušení (disrupce) lymfocytární recirkulace slezinou zapříčiněné deplecí lymfocytů enterální cestou (tj. únikem lymfocytů přímo do lumen patologicky změněnou tkání GIT). Menší nálož lymfocytů ve slezině vede k její retikuloendoteliální atrofii. V experimentálním modelu disrupce lymfocytární recirkulace slezinou, při které byla deplece lymfocytů zajištěna arteficiální drenáží hrudního mízovodu, se slezina makroskopicky podobá slezině pacientů s celiakií (164). K přechodnému narušení fyziologické recirkulace může dojít i po manipulaci se střevem např. během nitrobršišní operace (165). Pacienti s nekomplikovaným průběhem celiakie vykazují větší objemy sleziny než jedinci bez celiakie. Na druhou stranu, pacienti s komplikovanou formou celiakie ve smyslu refrakterní celiakie 2. typu s nebo bez přidruženého enteropatického lymfomu (EATL) mají většinou objem sleziny menší (166).

Druhým (kvanitativním) mechanismem je tzv. „slezinná atrofie“. Mechanismus vzniku atrofie sleziny je u celiakie pravděpodobně imunitního původu (167). Atrofií je postižena dominantně marginální zóna a bílá pulpa (164). Imunitní původ splenické atrofie podporuje též vazba k HLA-A8 histokompatibilnímu antigenu a odpovědnými autoprotilátkami jsou protilátky specifické pro celiakii používané v diagnostice a/nebo monitorování nemoci (149).

Třetím (kvalitativním) mechanismem je tzv. „retikuloendoteliální blokáda“. Určité, v plazmě cirkulující struktury (imunokomplexy, patogeny a/nebo jejich strukturální komponenty), mohou přímo interferovat s fyziologickou funkcí retikuloendotelového (monocytomakrofágového) systému ve slezině (164). Bylo zjištěno, že cirkulující imunokomplexy jsou příčinou funkčního hyposplenismu např. u revmatoidní artritidy (168), že plazmaferéza (s odstraněním cirkulujících imunokomplexů) u pacientů s nefritidou a/nebo vaskulitidou zlepšuje slezinnou funkci (169) a konečně, že u pacientů s celiakií (nebo idiopatickým střevním zánětem) byly prokázány vyšší hladiny komplement vázících a funkční hyposplenismus prohlubujících imunokomplexů (170).

V případě hyposplenismu (resp. retikuloendoteliální blokády) hraje významnou roli také integrita a bariérová funkce střevní stěny a střevní mikrobiom (164). Porušení bariérové funkce a integrity střevní stěny vede ke zvýšení její propustnosti (permeabilitě) a možnosti translokace například bakterií, toxinů a/nebo imunokomplexů do systémové cirkulace, ze kterého jsou tyto „nežádoucí“ struktury vychytávány mimo jiné ve slezině. Zde se uvedené substance mohou navázat na slezinné imunocyty a způsobit interferenci s jejich přirozenými funkcemi a tím způsobit právě zmiňovanou tzv. retikuloendoteliální blokádu (171). Ovlivnění základního střevního onemocnění s restitucí střevní bariéry vede na druhou stranu i ke zlepšení funkce sleziny (172). Vztah mikrobiomu a sleziny je významný zejména při vývoji v raném dětství, kdy mikrobiota a jejich diverzita hrají roli silného modulátora. Za kritické období jsou považovány 2 týdny od narození, kdy probíhající střevní kolonizace přirozenou flórou ovlivňuje vznik B buněčných slezinných kompartmentů včetně subpopulace splenických IgM pozitivních B lymfocytů. Tyto buňky hrají významnou roli nejen v antiinfekční imunitě proti opouzdřeným patogenům *per se*, kdy je slezina hlavním "motorem" imunitní odpovědi, ale jsou součástí i mechanismů vedoucích k vytvoření a udržení slizniční imunity gastrointestinálního traktu (173). IgM paměťové B lymfocyty lokalizované v marginální zóně sleziny mají mimo jiné schopnost migrace do střevní tkáně, kde jsou substrátem pro izotypový přesmyk (*angl. class switch*) s následnou tvorbou tzv. sekretorických imunoglobulinů třídy IgA (SIgA) a koordinací slizniční imunity, čímž je uzavřena pomyslná obousměrná „osa střevo – slezina / slezina – střevo“. Vychýlení této osy vede ke snížené slezinné funkci (kdy primárním inzultem je alterovaná střevní mikrobiota) nebo ke zvýšené vnímavosti ke střevním infekcím (kdy primárním inzultem je hyposplenismus) (25, 173, 174). K izotypovému přesmyku dochází ve střevní tkáni dvěma základními mechanismy. Zaprvé, cestou závislou na T lymfocytech (T-dependentní izotypový přesmyk) probíhající dominantně v zárodečném centru mezenteriální uzliny a/nebo v Peyerových placích (nahloučené slizniční lymfoidní tkáni, jež je součástí tzv. GALT systému, *angl. gut associated lymphoid tissue*) (175), a zadruhé, cestou nezávislou na T-lymfocytech (T-independentní izotypový přesmyk) probíhající dominantně v lamina propria mucosae střevní sliznice (176). Funkční osa střevo – slezina / slezina – střevo je evolučně stará a je přítomná např. i u různých druhů obratlovců (např. ryb) (177).

#### 1.4.2.2. Vývoj B lymfocytů a jejich subpopulací ve vztahu k hyposplenismu a marginální zóně sleziny

Z obecného pohledu lze vývoj B lymfocytu pozorovat ve třech kompartmentech – v kostní dřeni (primární/centrální orgán imunitního systému, ve kterém vývoj začíná na úrovni pluripotentní kmenové buňky), v periferní krvi (tranzitní kompartment) a ve slezině, lymfatických uzlinách, tonzilách a lymfatické tkáni v blízkosti epitelu řady orgánů – *angl. mucosa associated lymphatic tissue, MALT* (sekundární/periferní orgány imunitního systému, ve kterých dochází k vyžívání B lymfocytů až do konečného stadia plazmatické a/nebo paměťové buňky) (25, 178).

Vývojová stádia B lymfocytu jsou provázena změnami v repertoáru povrchových antigenů (znaků označovaných zkratkou CD s přiřazenou číslicí, *angl. CD – cluster of differentiation*) (179). Imunofenotypový profil B lymfocytů lze sledovat pomocí mnohobarevné průtokové cytometrie v primárních i sekundárních imunitních orgánech, nicméně nejdostupnějším materiálem k získání vyšetřovaného materiálu je periferní žilní krev (178). Sledování zastoupení jednotlivých subpopulací B lymfocytů pomocí výše uvedené metody je využíváno nejen pro diagnostiku, ale i monitoraci aktivity a/nebo efektu léčby imunitně podmíněných (autoimunitních, imunodeficitních), krevních a infekčních nemocí (zejména virových včetně stavů po očkování) (180, 181). K základním povrchovým buněčným znakům stanovovaným při průtokové cytometrii patří CD45 (panleukocytární antigen – odlišení leukocytů od ostatních krevních elementů) (182), CD19 (specifický B lymfocytární antigen) (183), CD21 (znak zralého B lymfocytu) (184), CD27 (znak paměťového B lymfocytu) (185). Dále je možné stanovit imunoglobulin třídy IgM (je součástí specifického B lymfocytárního receptoru *BCR*, ve vývojové posloupnosti je vytvářen jako první a jeho vystavením na povrchu buňky v kostní dřeni definujeme stadium nezralého B lymfocytu připraveného k vyplavení do periferní krve; izotypově přesmyknuté paměťové B lymfocyty a plazmatické buňky tento membránový znak ztrácejí) (186) a imunoglobulin třídy IgD (je též součástí specifického B lymfocytárního receptoru *BCR*, proti IgM je vytvářen a na povrch buňky vystavován v pozdějších vývojových stádiích tzv. T2 tranzientního lymfocytu a stejně jako IgM ho izotypově přesmyknuté paměťové B lymfocyty a plazmatické buňky ztrácejí) (186).

První buňkou ve vývojové řadě B lymfocytu je pluripotentní hematopoetická kmenová buňka v kostní dřeni, která pokračuje přes stádium společného lymfoidního progenitoru do stádia pro-B lymfocytu a následně pre-B lymfocytu. Již ve vývojovém stádiu pro-B lymfocytu začíná proces genového přeskupení (náhodné kombinace genových segmentů kódujících řetězce imunoglobulinu, který bude v dalším vývoji vystaven jako *BCR* receptor na povrchu



B lymfocytu, resp. uvolněn v podobě cirkulující protilátky) – jedná se kritický bod v celé vývojové kaskádě B lymfocytu, který zajišťuje širokou rozmanitost (diverzitu) produkovaných imunoglobulinů (25). Navazující stádium nezralého B lymfocytu je definováno vystavením povrchového imunoglobulinu třídy IgM a současně je také posledním stádiem lokalizovaným do kostní dřeně. Po vstupu nezralého B lymfocytu do periferní krve tento označujeme jako tranzientní B lymfocyt (178, 187), u kterého je silicí exprese znaku IgM (188). Tranzientní B lymfocyty vstupují do sleziny (a ostatních sekundárních imunitních orgánů), kde část z nich pod vlivem vysokoafinitní BCR signalizace reaguje s tělu vlastními solubilními autoantigeny přinášenými krví a stávají se terčem negativní selekce s následnou apoptózou (189). Zbylé přeživší tranzientní B lymfocyty jsou atrahovány do slezinných folikulů bílé pulpy, kde jsou chráněny před cirkulujícími autoantigeny a pomocí nízkofinitní (prahové) BCR signalizace zde dávají vzniknout buňkám již exprimujícím „znaky zralosti“ IgD a i CD21 (186). V lymfatickém folikulu bílé pulpy sleziny dochází následně k důležitému vývojovému kroku, při kterém ze zralého tranzientního B lymfocytu vznikají dva morfologicky, imunofenotypicky, funkčně i topograficky odlišné typy B lymfocytů – folikulární B lymfocyty (naivní buňka, která bude následně v dalším vývoji setrávat v lymfatickém folikulu bílé pulpy sleziny) a prekurzor B lymfocytu marginální zóny (naivní buňka, která bude následně k dalšímu vývoji směřována mimo lymfatický folikul do slezinné marginální zóny) (187, 190).

Folikulární B lymfocyty (FOB) jsou malé recirkulující naivní buňky, které z větší části vytvářejí B buněčné folikuly v bílé pulpě sleziny a jsou v konečném důsledku určené k produkci vysoce specifických a vysoce afinitních protilátek (dominantně proti proteinovým antigenům) ve spolupráci s pomocnými T lymfocyty (tzv. T-dependentní tvorba protilátek, zejména při sekundární protilátkové odpovědi). Jedná se o nejpočetnější subpopulaci B lymfocytů.

V dalším pokračování B lymfocytární řady se FOB podílejí na tvorbě primárního lymfatického folikulu, kde vytvářejí zárodečné centrum, a po další buněčné proliferaci vytvářejí sekundární lymfatický folikul. Tato struktura je polarizována na tmavou zónu obsahující aktivně se dělící buňky, které snižují expresi svých typických povrchových imunoglobulinů a současně v nich dochází k tzv. somatické hypermutaci (intenzivní mutace v genech pro variabilní segmenty imunoglobulinů jejichž cílem je zvýšení afinity receptoru k danému antigenu) a světlou zónu, do které buňka postupuje po ukončení somatické hypermutace a při které dochází znovu k reexpresi povrchových (již somaticky hypermutovaných) imunoglobulinů (178, 187). FOB dále postupují ve vývoji a ve spolupráci s aktivovanými pomocnými T lymfocyty dochází k záměně konstantní části produkovaného imunoglobulinu (místo původního IgM jsou produkovány jiné izotypy – IgG, IgE, IgA) – tuto změnu v imunoglobulinové výbavě

označujeme jako tzv. izotypový přesmyk (*angl. class switch*). Izotypově přesmyknutý folikulární B lymfocyt již není naivní buňkou, protože se v předchozích vývojových stádiích již setkal s antigenem a lze ho tedy označit jako „paměťový“ s odpovídajícím povrchovým znakem CD27. Je současně konečným produktem „klasického“ vývoje B lymfocytu přes zárodečné centrum lymfatického folikulu. Při průtokové cytometrii jsou tyto buňky identifikovány jako CD27+IgM-IgD-. Jedná se o dlouhodobě žijící buňky, které mohou cirkulovat periferní krví a průběžně osídlivat sekundární imunitní orgány i kostní dřeň. V pozdějších stádiích se pak tyto buňky mohou vyvíjet podle síly afinity jeho povrchového imunoglobulinového receptoru (BCR) třemi cestami. Zprv, vysoce afinitní buňky pokračují do stádia plazmablastů (proliferující buňky produkující IgM nebo izotypově přesmyknuté produkující IgG, IgA, IgE nebo výjimečně IgD), které se následně usazují zpět v kostní dřeni v podobě plazmatických buněk (neproliferující buňky produkující protilátky, které však postupně ztrácejí své povrchové imunoglobuliny). Zadruhé, středně afinitní buňky se transformují do stádia paměťových buněk (konkrétně izotypově přesmyknutých paměťových B lymfocytů), které zajišťují imunologickou paměť s rychlou tvorbou specifických protilátek (izotypově přesmyknutých protilátek) při sekundárním setkání s antigenem. Zatřetí, níže afinitní buňky umírají apoptózou (187).

B lymfocyty marginální zóny (MZB), vzniklé ze své naivní prekurzorové buňky, jsou středně velké buňky z větší části a typicky rezidentní ve slezinné marginální zóně a jsou v konečném důsledku určeny k zajištění intenzivní primární protilátkové odpovědi (jedná se o první obrannou linii dominantně proti polysacharidovým antigenům) bez spolupráce s pomocnými T lymfocyty (tzv. T-independentní tvorba protilátek) (190). Přesto, že MZB jsou považovány za primárně rezidentní buňky marginální zóny sleziny, lze je detekovat i v periferní krví (191, 192), kde bývají označovány jako tzv. lymfocytům marginální zóny podobné B lymfocyty (*angl. marginal zone-like B lymphocytes*) s identickým imunofenotypem CD27+IgM+IgD+. Analýzou tohoto periferního cirkulujícího subsetu B lymfocytů u dětí do 2 let věku bylo zjištěno, že geny povrchový BCR jsou mutovány již v průběhu ontogeneze samotné buňky (tedy bez antigenního vlivu a ještě před stádiem T-independentní protilátkové produkce) (193). Pro vznik MZB je striktně nutné prostředí marginální zóny sleziny. Jedná se o unikátní část sleziny na rozhraní červené a bílé pulpy, která se nenachází nikde jinde v organismu. Při hyposplenismu a/nebo asplénii jakékoliv etiologie dochází k poruše zrání a vývoje MZB, jejich depleci a ve výsledku zvýšenému riziku infekcí opouzdřenými patogeny. U dětí do dvou let, u kterých je oblast marginální zóny přirozeně nezralá, je procentuální zastoupení MZB v periferní krví z celkového počtu B lymfocytů asi 6 % ve srovnání s až 20 %

v období po dozrání marginální zóny a jejich zastoupení opět klesá v pokročilém věku (164). Po setkání s antigenem u MZB dochází na rozdíl od FOB k podstatně méně intenzivní somatické hypermutaci (představují substrát pro extrafolikulární somatické hypermutace) i k dalším kroků zvyšujícím jejich antigenní afinitu a diverzitu (selekční procesy, izotypový přesmyk), a proto tyto buňky ve stádiu plazmablastů produkují původní ve vývoji B lymfocytu zakotvený imunoglobulin třídy IgM (184). Imunofenotypově je pro MZB typická vysoká hustota povrchového imunoglobulinu IgM, střední hustota znaku IgD a znaku CD21. MZB není naivním lymfocyt (již se setkal s antigenem) a lze ho označit (stejně jako izotypově přesmyknutý folikulární B lymfocyt) jako „paměťovou“ buňku opět s odpovídajícím povrchovým znakem CD27. MZB je finálním produktem „alternativního“ vývoje B lymfocytu, který neprochází přes zárodečné centrum lymfatického folikulu (jedná se tedy o separátní extrafolikulární vývojovou cestu B lymfocytu) (193, 194). MZB jsou po setkání s antigenem schopny velmi rychlé aktivace a tento děj je dále umocněn, pokud je na antigen navázán komplementový fragment C3d (který je rozpoznán povrchovým znakem CD21) (195). Jedná se o nejreaktivnější subpopulaci B lymfocytů (196). Relativně pomalý krevní průtok marginální zónou sleziny prodlužuje čas kontaktu antigenu s MZB a tím ve svém důsledku intenzifikuje mohutnost protilátkové odpovědi (178). Při analýze průtokovou cytometrií jsou obvykle MZB gatovány pomocí znaků IgD (nebo IgM) a CD27 a jsou identifikovány jako buňky s fenotypem IgD+CD27+ (nebo IgM+CD27+).

Souhrnně řečeno rozeznáváme dva typy paměťových B lymfocytů, které jsou imunofenotypově určeny svým povrchovým znakem CD27. Zaprvé, izotypově přesmyknuté paměťové B lymfocyty, které jsou finálním produktem „klasického“ vývoje původně naivního folikulárního B lymfocytu přes germinální centrum lymfatického folikulu a jako dlouho žijící buňky usazené v kostní dřeni zajišťují konstantní produkci vysoce specifických a afinitních protilátek (nejčastěji třídy IgG) v reakci na již sekundární setkání s antigenem (sekundární infekci). Zadruhé, izotypově nepřesmyknuté paměťové B lymfocyty, které odpovídají B lymfocytům marginální zóny a které vznikají „alternativní“ vývojovou cestou přes T2 prekurzor B lymfocytu marginální zóny (vzniklý v lymfatickém folikulu z T2 tranzientního lymfocytu) a jsou směřovány do oblasti marginální zóny sleziny, kterou průběžně osídlují. Marginální zóna sleziny je pro jejich vývoj a přežití nezbytná a hraje tak nezastupitelnou roli v iniciaci imunitní odpovědi nezávislé na T lymfocytech při infekci nebo vakcinaci kapsulárním polysacharidovým antigenem (142). Produkci přirozených antibakteriálních protilátek třídy IgM tyto buňky představují první obrannou linii proti infekcím (197). U nemocných s chybějící

či dysfunkční slezinou tedy hladina těchto lymfocytů koreluje s poruchou funkce tohoto orgánu a tyto lymfocyty mohou být nepřímým ukazatelem hyposplenismu.

Stěžejními pracemi zabývajícími se hyposplenismem u celiakie jsou práce Di Sabatina et al. z roku 1998, 2007, 2011 a 2013 (142, 144, 198, 199). Jako jeden z prvních ukazuje na imunologické odchylky u pacientů s celiakií nejen v oblasti tenkého střeva (v jeho stěně), ale i v periferní krvi za použití metod nepřímé fluorescence a průtokové cytometrie. Na konci 20. století ještě přímo nedefinuje abnormality v B lymfocytárních subpopulacích, ale ukazuje na odchylky na úrovni celkových lymfocytů, které mohou souviset s rozvojem přidružených autoimunitních onemocnění a/nebo malignit. Ve svých dalších pracích ukazuje na možné tromboembolické a zejména infekční komplikace hyposplenismu u celiakie a současně na význam prevence ve smyslu vakcinace a časně antibiotické léčby u rizikových pacientů. Jednoznačný přínos a metodiku stanovování hyposplenismu u pacientů s celiakií pak dokládá v posledních dvou uvedených publikacích, zejména pak u pacientů s komplikovanými formami celiakie. Naše předkládaná práce je pak první, která se zabývá problematikou hyposplenismu u pacientů s nekomplikovanou celiakií.

## 2. Klinické studie

Výzkumná část disertační práce se zabývá řešením jejích tří hlavních cílů formou tří samostatných klinických studií.

Cíle:

- Ověřit možné využití stanovení plazmatických koncentrací aminokyselin citrulinu a ornitinu jako ukazatelů aktivity celiakie
- Určit možné využití jednotlivých subpopulací B lymfocytů v jejich vývojové řadě jako ukazatelů funkčního hyposplenismu, resp. aktivity celiakie
- Stanovit potenciální využití koncentrací gliadin 33-meru ve stolici jako ukazatele adherence k bezlepkové dietě u pacientů s celiakií

### 3. Plazmatické hladiny citrulinu a ornitinu u nemocných s celiakií

#### 3.1. Úvod

Celiakie patří v naší populaci k relativně častým onemocněním s potenciálně závažnými dopady při pozdní diagnostice a léčbě (včetně maligních komplikací). Diagnostický přístup u pacientů se suspektní celiakií je v běžné klinické praxi jasně definován a založen na stanovení sérových hladin protilátek proti tkáňové transglutamináze v třídě IgA a na histologickém vyšetření bioptických vzorků duodenální sliznice (17-19, 21). Postižení tenkého střeva hraje dominantní roli v diagnostice a klinické manifestaci onemocnění (18, 43). Charakteristickým histologickým obrazem neléčené celiakie je zvýšený počet intraepiteliálních lymfocytů, hyperplázie krypt a zejména atrofie sliznice tenkého střeva (13, 14). Atrfie klků není specifická pouze pro celiakii a může doprovázet i řadu dalších enteropatií (18, 19, 200, 201). Ačkoli nekomplikované formy celiakie obvykle nevedou k významné střevní dysfunkci (202, 203), může vést onemocnění k malasimilárnímu syndromu. Pacienti s celiakií mají zvýšené riziko vzniku závažných komplikací – refrakterní celiakie, ulcerózní jejunoileitida a/nebo zhoubný tenkostřevní nádor (lymfom, adenokarcinom). V případě přítomnosti alespoň jednoho z výše uvedených stavů hovoříme o "komplikované" celiakii a při jejich absenci o "nekomplikované" celiakii (17, 20, 204).

Na rozdíl od diagnostiky neléčeného onemocnění není dosud k dispozici spolehlivý ukazatel pro hodnocení funkce tenkého střeva u pacientů léčených bezlepkovou dietou s nekomplikovanou celiakií v klinické remisi (17, 83, 137). U těchto nemocných jsou kontroly a dispenzarizace založeny kromě klinického stavu na stanovení sérologických markerů a v některých případech také na kontrolní endoskopii s biopsií tenkého střeva. Tento přístup však není v hodnocení aktivity choroby zcela spolehlivý, klinické, laboratorní i endoskopické ukazatele spolu korelují pouze částečně, a endoskopický přístup navíc snižuje adherenci nemocných ke kontrolám a je relativně invazivní s nenulovým rizikem komplikací. Přesto může u části nemocných přetrvávat nerozpoznaná histologická aktivita celiakie a tím i riziko vzniku komplikací. Vzhledem k tomu je nalezení nových, neinvazivních markerů aktivity onemocnění (respektive odpovědi na bezlepkovou dietu při kontrole jejího dodržování) zásadní. Jedním z možných kandidátních markerů aktivity choroby je citrulin. Jedná se o neesenciální a nebiogenní aminokyselinu, jejíž biologický potenciál byl po mnoho let považován za nízký a v lidském těle byla identifikována pouze jako meziprodukt v močovinovém cyklu

a metabolismu aminokyselin. Od roku 2000 se v literatuře objevují některé údaje o úloze cirkulujícího citrulinu jako možného markeru funkční integrity tenkého střeva a vilózní atrofie u dalších enteropatií, včetně celiakie (98, 100-102, 104). Bylo zjištěno, že úloha citrulinu v organismu je komplexní, včetně jeho vlivu na kardiovaskulární systém (205), jeho antioxidačních a imunomodulačních účinků (206, 207) a zejména jeho role při udržování dusíkové homeostázy (128, 208). Většina publikovaných prací je pro využití citrulinu k monitorování celkové enterocytární masy u stavů se závažnou poruchou funkce tenkého střeva navozenou buď chirurgicky (syndrom krátkého střeva) nebo současně probíhající enteropatií (komplikované formy celiakie). Data o využitelnosti citrulinu k monitoraci aktivity nekomplikované celiakie v klinické remisi jsou nedostatečná (209). Vzhledem k tomu jsme se v naší práci zaměřili na změny plazmatických hladin citrulinu v populaci nemocných s nekomplikovanou formou celiakie, na bezlepkové dietě a v klinické remisi. V této souvislosti je další otázkou možnost využití některých prekurzorů citrulinu (ornitinu) a jejich korelace s hladinou citrulinu v monitoraci aktivity celiakie. Pro ornitin v této indikaci konkrétní data v recentní literatuře stále chybí.

### **3.2. Metodika**

Studie „Plazmatické hladiny citrulinu a ornitinu u nemocných s celiakií“ byla koncipována jako prospektivní, srovnávací studie (případů a kontrol). V rámci projektu jsme porovnávali skupinu nemocných konsekutivně sledovaných v naší gastroenterologické poradně pro dříve diagnostikovanou celiakii se skupinou zdravých dobrovolníků získanou z kohorty dárců krve.

Mezi zařazovací kritéria studie patřila diagnóza celiakie (stanovená kombinací pozitivní sérologie, která vždy zahrnovala protilátky proti tkáňové transglutamináze v třídě IgA a v některých případech i další) a kompatibilní histologický nálezn v biopsických vzorcích získaných z duodena v průběhu gastroscopického vyšetření před zahájením bezlepkové diety. Nemocní byli léčeni bezlepkovou dietou, celiakie byla v klinické remisi, bez projevů komplikací onemocnění.

Vyřazovací kritéria zahrnovala věk <18 let, graviditu, jiné aktivní onemocnění gastrointestinálního traktu a pankreatobiliární soustavy, aktivní onkologické onemocnění, komplikace celiakie, jiné formy enteropatie včetně potenciálně enterotoxické medikace (NSAID) a přítomnost onemocnění potenciálně ovlivňujícího plazmatické koncentrace

citrulinu a/nebo ornitinu (např. renální insuficience). Nemocní nebyli na dietě obsahující vodní meloun.

Ve skupině zdravých kontrol (dárci krve) byla celiakie vyloučena provedením extenzivního sérologického protokolu zahrnujícího nejen protilátky proti tkáňové transglutamináze v třídě IgA, ale i v třídě IgG, a dále endomyziální protilátky v třídách IgA a IgG, protilátky proti deamidovanému gliadinovému peptidu v třídách IgA a IgG a antiretikulinové protilátky v třídách IgA a IgG. Zdravé kontroly byly klinicky bez jakýchkoliv obtíží.

Všem pacientům i zdravým kontrolám byl po zařazení do studie odebrán vzorek žilní krve (3,5 ml, bez ohledu na lačnění) a ten byl aplikován na separační gel, následně centrifugován (násobek gravitačního zrychlení 2000 g, teplota 20 stupňů Celsia) a zamražen na -80 stupňů Celsia. Nakonec bylo pomocí vysokoúčinné tekutinové chromatografie (Ultimate 3000 RS pump Dionex, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) kombinované s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií s orbitrap analyzátozem (Q-Exactive Focus, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) provedeno kvantitativní stanovení plazmatických hladin citrulinu a ornitinu. Hodnocení bylo provedeno na základě dříve publikované metody používající pentafluorobenzoylchlorid jako derivační reagent (210). Izotopově označený citrulin-d<sub>4</sub> and ornitin-d<sub>6</sub> byly použity jako vnitřní standard. Chromatografická separace s hmotnostní spektrometrickou analýzou byly dříve vyvinuty, optimalizovány a následně validovány podle Doporučení pro bioanalytickou metodologickou validaci (211). Během studie byly použity Certifikovaná lyofilizovaná kalibrace a materiálová kontrola (RECIPE Chemicals + Instruments GmbH, Munich, Germany).

Získaná data byla zpracována pomocí metod deskriptivní statistiky. Data s normálním rozdělením hodnot byla dále analyzována parametrickým dvouvýběrovým t-testem a data s nenormálním rozdělením byla testována neparametrickým Mann-Whitneyho a Kolmogorov-Smirnovovým testem. Pro kvalitativní parametry byl použit Fisherův přesný test. Pro korelační analýzu byl použit Spearmanův korelační koeficient. Pro výše uvedenou statistickou analýzu byl použit program NCSS 2021 Statistical Software (NCSS, LLC, Kaysville, Utah, USA, 2021: [ncss.com/software/ncss](http://ncss.com/software/ncss)).

Klinická studie byla schválena společnou univerzitní etickou komisí (referenční číslo: 202 107 PO6). Všechny postupy byly v souladu s etickými normami institucionální výzkumné komise a s Helsinskou deklarácí z roku 1964 a jejími pozdějšími změnami (212). Všichni pacienti byli před zařazením do studie plně informováni a podepsali písemný souhlas. U všech získaných údajů byly vymazány všechny osobní identifikační údaje.



### 3.3. Výsledky

Do studie byly zařazeny dvě skupiny účastníků: studijní skupinu tvořilo celkem 94 pacientů s dříve diagnostikovanou celiakií a kontrolní skupinu 35 zdravých jedinců z kohorty dárců krve. Základní demografická data studijní skupiny byla následující: 29 mužů (31 %), průměrný věk  $53 \pm 18$  let (medián: 47 let, mezikvartilové rozpětí: 31 let) a 65 žen (69 %), průměrný věk  $44 \pm 14$  let (medián: 41 let, mezikvartilové rozpětí: 20 let) - podrobnosti v tabulce 1. Základní demografická data studijní skupiny byla následující: 10 mužů (29 %), průměrný věk  $51 \pm 14$  let (medián 47 let, mezikvartilové rozpětí 19 let) a 25 žen (71 %), průměrný věk  $46 \pm 12$  let (medián 45 let, mezikvartilové rozpětí 18 let) - detaily v tabulce 1.

Průměrná doba trvání onemocnění byla ve skupině pacientů s celiakií  $160 \pm 144$  měsíců, medián: 118 měsíců (mezikvartilové rozpětí: 181 měsíců). Nejčastějším vstupním histologickým nálezem byl u pacientů s celiakií typ 3a podle Marsh-Oberhuberovy klasifikace (14) v 24 případech (24 %). Žádný z pacientů nepodstoupil resekci tenkého střeva.

Ve skupině pacientů se vyskytovala některá další imunitně podmíněná onemocnění: revmatoidní artritida (1 případ), autoimunitní tyreopatie (19 případů), atopická dermatitida (4 případy), vitiligo (3 případy), autoimunitní hepatitida (1 případ), IgM nefropatie (1 případ), diabetes mellitus (5 případů), asthma bronchiale (12 případů), polyserositida (1 případ), antifosfolipidový syndrom (1 případ), systémová skleróza (2 případy), autoimunitní gastritida (1 případ), spondylartritida (1 případ), psoriáza (2 případy), eozinofilní ezofagitida (1 případ), hereditární angioedém (1 případ). U žádného pacienta se nevyskytl přidružený Sjögrenův syndrom. Deficit IgA byl zjištěn u 4 pacientů, nebyl pozorován u žádné zdravé kontroly. Genotypizace HLA nebyla pro upřesnění diagnostiky nutná u žádného z pacientů, nebyla vyšetřována ani u zdravých kontrol.

Při statistickém hodnocení pacientů s celiakií a skupiny zdravých kontrol (dárců krve) byly sledovány a porovnávány kvantitativní a kvalitativní znaky. Při sledování kvantitativních znaků byl kladen důraz na plazmatické koncentrace citrulinu a ornitinu jako možných ukazatelů tenkostřevní funkce a/nebo celkové funkční enterocytární masy.

Koncentrace ornitinu v séru nemocných s celiakií byly ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků statisticky významně nižší ( $p < 0,001$ ). Statisticky významné rozdíly byly dále zjištěny také v parametrech BMI, BSA, MCV a v sérové koncentraci tkáňové transglutaminázy IgA (detaily v tabulce 1) – tyto výsledky však nebyly hodnoceny jako klinicky významné. Vzhledem k většinou zamítnuté normalitě byly k vyjádření míry variability kromě hodnot aritmetického průměru a směrodatné odchylky použity také medián a mezikvartilové

rozpětí (75. percentil mínus 25. percentil). Korelační analýza pomocí neparametrického Spearmanova koeficientu pořadové korelace prokázala statisticky významně silnější korelaci mezi plazmatickými koncentracemi citrulinu a ornitinu ve skupině pacientů s celiakií (Spearmanův koeficient = 0,723) oproti skupině zdravých kontrol, kde byla korelace slabá (0,723 vs. 0,313; tabulka 2, graf 1) (31). Nezjistili jsme silnou korelaci mezi dobou trvání onemocnění a plazmatickými koncentracemi citrulinu a/nebo ornitinu. U ostatních kvantitativních znaků nebyla zjištěna silná míra korelace ve skupině pacientů s celiakií a zdravých kontrol (tabulka 3).

Hlavním sledovaným kvalitativním znakem bylo kouření. Ve skupině pacientů bylo celkem 13 kuřáků (14 %), z toho 5 mužů (39 %) a 8 žen (61 %). V kontrolní skupině bylo přítomno celkem 5 kuřáků (14 %), z toho 2 muži (40 %) a 3 ženy (60 %). Nezjistili jsme žádné významné rozdíly v plazmatických koncentracích citrulinu a ornitinu u kuřáků a nekuřáků v obou sledovaných skupinách (tabulka 4 a 5).

**Tabulka 1. Základní kvantitativní ukazatele u pacientů s celiakií a u zdravých kontrol (dárců krve)**

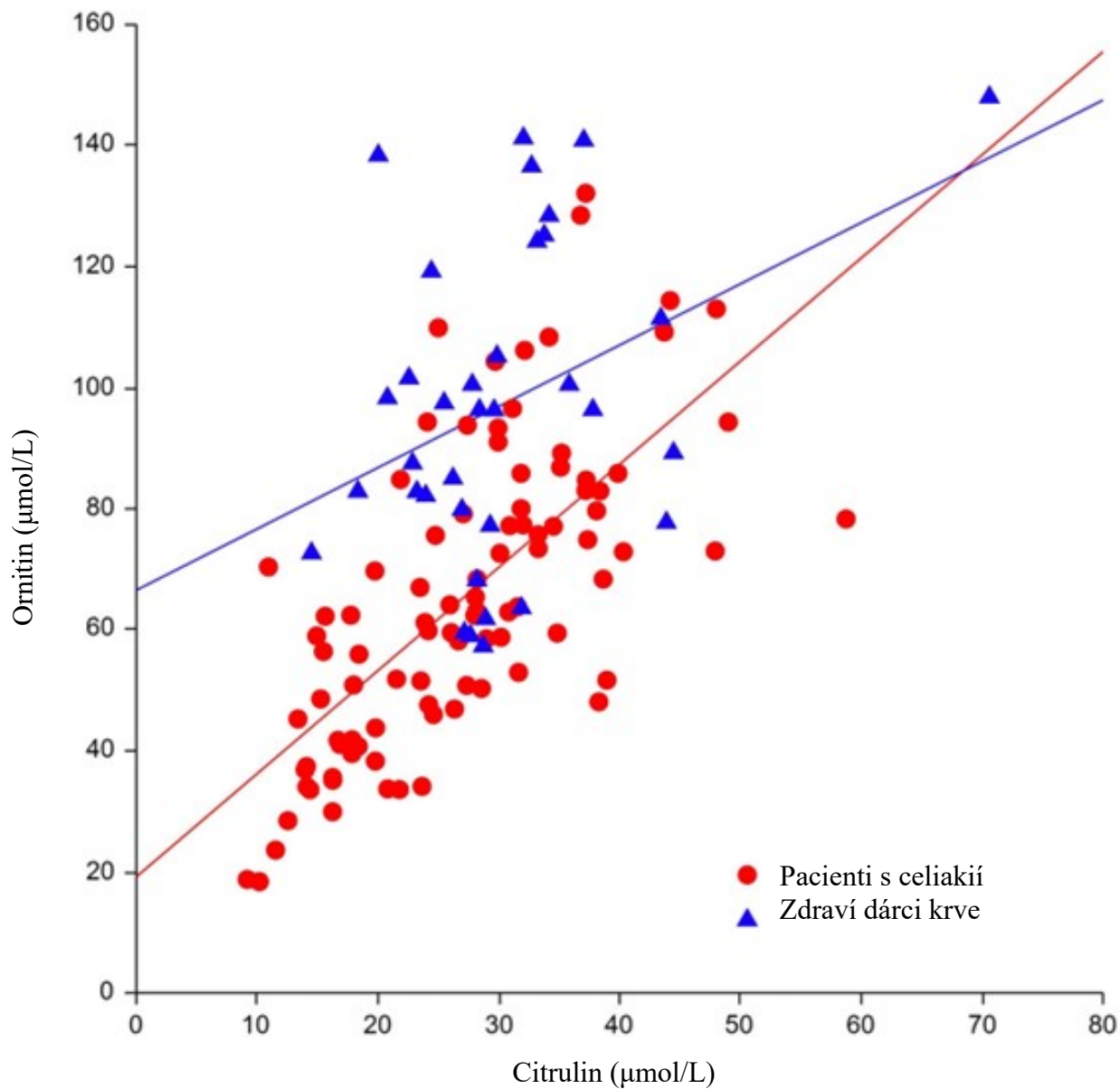
Ukazatel	Kontroly (35 subjektů) AP ± SO; medián; IQR)	Celiakie (94 subjektů) AP ± SO; medián; IQR)	Statistická významnost
Věk (roky)	47 ± 13. 47; 18	46 ± 16. 43; 21	p = 0,372
Hmotnost (kilogramy)	82 ± 22. 75; 23	70 ± 16. 68; 21	p = 0,062
BMI	27 ± 4. 27; 6	25 ± 5. 24; 6	<b>p = 0,006</b>
BSA (m <sup>2</sup> )	1,8 ± 0,2. 1,8; 0,3	1,7 ± 0,2. 1,7; 0,3	<b>p = 0,011</b>
Hemoglobin (g/L)	142 ± 10. 141; 13	137 ± 13. 138; 15	p = 0,072
Leukocyty (10 <sup>9</sup> /L)	7 ± 2. 6; 2	7 ± 2. 7; 3	p = 0,814
MCV (fL)	90 ± 4. 91; 5	87 ± 5. 87; 5	<b>p = 0,002</b>
Transglutamináza IgA (U/mL)	2 ± 2. 2; 1	n = 90 (4 nemocní s IgA deficitem z analýzy vyřazení) 12 ± 42. 3; 4	<b>p = 0,024</b>
Citrulin (μmol/L)	30 ± 10. 29; 10	27 ± 10. 27; 15	p = 0,136
Ornitin (μmol/L)	97 ± 26. 97; 42	25 ± 3. 63; 34	<b>p &lt; 0,001</b>

AP – aritmetický průměr, SO – směrodatná odchylka, μmol – mikromol, U – unit (jednotka), L – litr, fL – femtolitr, IQR – mezikvartilové rozpětí, n = počet subjektů, BMI = body mass index (index tělesné hmotnosti), BSA = body surface area (tělesný povrch), MCV = mean corpuscular volume (střední objem erytrocytu)

**Tabulka 2. Korelace mezi ostatními kvantitativními ukazateli a plazmatickou koncentrací citrulinu a ornitinu ve skupině pacientů s celiakií (vyjádřeno pomocí Spearmanova koeficientu pořadové korelace)**

Ukazatel	Citrulin – total (M / Ž)	Síla korelace	Ornitin – total (M / Ž)	Síla korelace
Věk (roky)	0,215 (0,081 / 0,261)	slabá (velmi slabá / slabá)	0,303 (– 0,002 / 0,431)	slabá (velmi slabá / střední)
Hmotnost (kilogramy)	– 0,066 (–0,079 / –0,105)	velmi slabá (velmi slabá / velmi slabá)	0,093 (0,007 / 0,082)	velmi slabá (velmi slabá / velmi slabá)
BMI	0,027 (0,126 / –0,001)	velmi slabá (velmi slabá / velmi slabá)	0,138 (0,149 / 0,124)	velmi slabá (velmi slabá / velmi slabá)
BSA (m <sup>2</sup> )	–0,132 (–0,185 / –0,169)	velmi slabá (velmi slabá / velmi slabá)	0,072 (–0,062 / 0,055)	velmi slabá (velmi slabá / velmi slabá)
Hemoglobin (g/L)	0,111	velmi slabá	0,042	velmi slabá
Leukocyty (10 <sup>9</sup> /L)	–0,0445	velmi slabá	–0,074	velmi slabá
MCV (fL)	–0,064	velmi slabá	0,028	velmi slabá
Transglutamináza IgA (U/mL)	–0,206	slabá	–0,065	velmi slabá
Doba trvání nemoci (měsíce)	–0,0305	velmi slabá	0,0047	velmi slabá

M – muži, Ž – ženy,  $\mu\text{mol}$  – mikromol, U – unit (jednotka), L – litr, IQR – mezikvartilové rozpětí, n = počet subjektů



**Graf 1. Korelace mezi plazmatickou koncentrací citrulinu a ornitinu u pacientů s celiakií**  
 (u nemocných s celiakií je Spearmanův koeficient pořadové korelace = 0,723,  
 u zdravých kontrol je Spearmanův koeficient pořadové korelace = 0,313)

**Tabulka 3. Korelace mezi ostatními kvantitativními ukazateli a plazmatickou koncentrací citrulinu a ornitinu ve skupině zdravých kontrol (vyjádřeno pomocí Spearmanova koeficientu pořadové korelace)**

Ukazatel	Citrulin – total (M / Ž)	Síla korelace	Ornitin – total (M / Ž)	Síla korelace
Věk (roky)	0,375 (0,610 / 0,204)	slabá (silná / slabá)	0,132 (–0,553 / 0,345)	velmi slabá (střední / slabá)
Hmotnost (kilogramy)	0,101 (–0,330 / 0,073)	velmi slabá (velmi slabá / velmi slabá)	0,119 (–0,128 / 0,144)	velmi slabá (velmi slabá / velmi slabá)
BMI	0,027 (–0,430 / 0,002)	velmi slabá (střední / velmi slabá)	0,232 (0,139 / 0,233)	slabá (velmi slabá / slabá)
BSA (m <sup>2</sup> )	0,128 (–0,321 / 0,070)	velmi slabá (slabá / velmi slabá)	0,221 (–0,079 / 0,284)	slabá (velmi slabá / slabá)
Hemoglobin (g/L)	0,105	velmi slabá	–0,125	velmi slabá
Leukocyty (10 <sup>9</sup> /L)	–0,510	střední	–0,245	slabá
MCV (fL)	0,092	velmi slabá	–0,086	velmi slabá
Transglutamináza IgA (U/mL)	–0,175	velmi slabá	–0,027	velmi slabá

M – muži, Ž – ženy,  $\mu\text{mol}$  – mikromol, U – unit (jednotka), L – litr, IQR – mezikvartilové rozpětí, n = počet subjektů

**Tabulka 4. Plazmatické koncentrace citrulinu a ornitinu ve skupině pacientů s celiakií ve vztahu ke kouření**

<b>Ukazatel</b>	<b>Kouření – ANO</b> (n = počet subjektů; AP ± SO; medián; IQR)	<b>Kouření – NE</b> (n = počet subjektů; AP ± SD; medián; IQR)	<b>Statistická významnost</b>
Citrulin (μmol/L)	n = 13 26 ± 10 22; 15	n = 81 27 ± 10 27; 15	NS (p = 0,579)
Ornitin (μmol/L)	n = 13 69 ± 29 62; 41	n = 81 65 ± 24 63; 33	NS (p = 0,550)

AP – aritmetický průměr, SO – směrodatná odchylka, NS – nesignifikantní, S – signifikantní, μmol – mikromol, L – litr, IQR – mezikvartilové rozpětí, n = počet subjektů

**Tabulka 5. Plazmatické koncentrace citrulinu a ornitinu ve skupině pacientů s celiakií ve vztahu ke kouření**

<b>Ukazatel</b>	<b>Kouření – ANO</b> (n = počet subjektů; AP ± SO; medián; IQR)	<b>Kouření – NE</b> (n = počet subjektů; AP ± SO; medián; IQR)	<b>Statistická významnost</b>
Citrulin (μmol/L)	n = 5 28 ± 4 28; 7	n = 30 31 ± 10 29; 11	NS (p = 0,588)
Ornitin (μmol/L)	n = 5 97 ± 29 98; 50	n = 30 97 ± 26 97; 43	NS (p = 0,948)

AP – aritmetický průměr, SO – směrodatná odchylka, NS – nesignifikantní, S – signifikantní, μmol – mikromol, L – litr, IQR – mezikvartilové rozpětí, n = počet subjektů

### 3.4. Diskuse

Cílem této části naší práce bylo ověřit význam některých plazmatických aminokyselin (citrulinu a ornitinu) jako potenciálních neinvazivních markerů poškození struktury a funkce tenkého střeva. Do studie byly úmyslně zařazeni pacienti na bezlepkové dietě s nekomplikovanou formou celiakie, kteří dosáhli klinické remise a u kterých je další vyšetřování (včetně endoskopického) velice diskutabilní. Naším hlavním zjištěním, dosud v literatuře nepopsaným, jsou statisticky významně nižší plazmatické koncentrace ornitinu u pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami. Na druhé straně, statisticky významný rozdíl v plazmatických koncentracích citrulinu mezi oběma skupinami respondentů zjištěn nebyl. Ornitin jsme do práce zařadili jako potenciálně citlivější prekurzor citrulinu. Citrulin je poměrně široce akceptován jako marker funkčního selhávání tenkého střeva, především u těžších forem enteropatií. Z tohoto pohledu a na základě našich dat citrulin u nekomplikovaných forem léčené celiakie v klinické remisi využitelný není, ornitin je naopak jako marker nadějný.

Ačkoliv je v současnosti diagnostika celiakie dobře definována na základě kombinace klinických projevů, pozitivních sérologických markerů (pozitivní protilátky proti tkáňové transglutamináze v třídě IgA, TTG IgA) a typického histologického obrazu ve sliznici tenkého střeva (18, 19, 21), spolehlivé neinvazivní markery aktivity choroby chybějí (17). Právě tato skupina nemocných je často asymptomatická či oligosymptomatická a je ohrožena (v případě trvající zánětlivé aktivity a atrofie sliznice tenkého střeva) vznikem závažných komplikací (refrakterní celiakie 2. typu, ulcerativní jejunoileitida, lymfom) (213). V reálné klinické praxi zůstává "zlatým" standardem monitorování onemocnění opakovaným stanovením specifických autoprotilátek a invazivní histologické vyšetření bioptických vzorků z duodenální sliznice (17-19, 21) – tento přístup má však několik problematických momentů a v některých případech dokonce selhává.

Sérologická aktivita autoprotilátek specifických pro celiakii může být obtížně interpretovatelná u imunokompromitovaných pacientů (např. imunodeficitní stavy včetně deficitu IgA, imunomodulační léčba pro jinou diagnózu). Dalšími oblastmi snižujícími užitečnost sérologických markerů při sledování aktivity celiakie jsou imunitní dysregulace, o čemž svědčí např. s celiakií často spojený funkční hyposplenismus a deficit selektivních paměťových B lymfocytů (191) či tzv. séronegativní celiakie (17) s neschopností TTG IgA opustit sliznici do krevního oběhu (214). Dynamika sérologické odpovědi může být navíc zavádějící. Ačkoli snížení sérových koncentrací TTG IgA ukazuje na účinek bezlepkové diety



a je markerem snížené aktivity onemocnění (200), protilátková odpověď (a tedy sérologická detekce TTG IgA) nemusí být přítomna, pokud je lepku opětovně konzumováno méně. V těchto případech citlivost TTG IgA klesá a neodráží závažnost histologických změn na sliznici tenkého střeva (19). Také v našem souboru byl průměr hladin TTG IgA pouze mírně nad horní hranicí normy a medián hluboko v normálním rozmezí.

Ani změny histologického nálezu v tenkém střevě nejsou spolehlivým ukazatelem průběhu onemocnění. Histologické změny napodobující celiakii se objevují např. u běžně dostupných a užívaných léků (např. nesteroidní antiflogistika nebo inhibitory protonové pumpy), vzhledem k fokálnímu výskytu atrofických změn u některých pacientů je endoskopie spojena i s rizikem falešně negativních nálezů, a je spojena nepochybně také s nemalými ekonomickými náklady vzhledem k množství nemocných s touto chorobou léčených. Histologické sledování založené na opakovaných gastrokopiích v analgosedaci u převážně asymptomatických nemocných navíc stále představuje relativně invazivní postup s rizikem určitých komplikací. Tento přístup dále významně snižuje compliance nemocných k doporučení ošetřujících lékařů a je spojen s rizikem komplikací endoskopického vyšetření a současné analgosedace.

Identifikace nových neinvazivních markerů funkčního stavu tenkého střeva je tedy logickou snahou klinického výzkumu. Vzhledem ke vztahům metabolismu citrulinu a ornitinu k enterocytům a funkci tenkého střeva (detailně popsáným v kapitole 1.3) jsme se rozhodli testovat změny plazmatických hladin právě těchto dvou aminokyselin u nemocných s celiakií ve srovnání se zdravými dobrovolníky.

Literární údaje naznačují užitečnost stanovení plazmatických koncentrací citrulinu pro sledování závažnosti tenkostřevního onemocnění u pacientů s rozsáhlým a/nebo destruktivním postižením sliznice tenkého střeva (včetně komplikovaných forem celiakie, jako je refrakterní celiakie, ulcerózní jejunoileitida a/nebo enteropatie asociovaná s T-buněčným lymfomem), kdy tyto stavy mohou vést až k selhání tenkého střeva a/nebo malasimilačnímu syndromu (202, 203, 215), spíše než u pacientů s nekomplikovanými formami celiakie (100, 216). Na rozdíl od těchto poměrně závažných klinických stavů, vyžadujících intenzivní a metabolickou péči, měli všichni nemocní zařazení do naší studie již dříve diagnostikovanou celiakii s dobrou klinickou a laboratorní odpovědí na bezlepkovou dietu (žádný pacient neměl klinicky aktivní a/nebo komplikované onemocnění) a žádný z pacientů neměl známky střevního selhání a/nebo malasimilačního syndromu. Přestože jsme vzhledem k literárním údajům i našim předchozím zkušenostem předpokládali minimálně 20 % nemocných s trvalou atrofií tenkého střeva, a tedy s určitou poruchou funkce tenkého střeva a trvalým zvýšeným rizikem pozdních komplikací,

statisticky významné změny plazmatických hladin citrulinu jsme u nekomplikovaných celiaků v remisi ve srovnání se zdravými kontrolami nezjistili. V této souvislosti je zajímavá retrospektivní analýza autorů Schieppatti et al. z roku 2023 (213). Autorům se podařilo identifikovat fenotyp pacienta s celiakií, u kterého je i přes dodržování bezlepkové diety zvýšené riziko trvalé vilózní atrofie (perzistující vilózní atrofie, pVA) a to v době diagnózy i v průběhu dispenzarizace. Tato práce potvrdila asociaci mezi trvalou vilózní atrofií a rizikem závažných komplikací včetně tenkostřevních malignit. Hodnotícími kritérii byly: 1. klasický průběh nemoci (přítomen malasimilační syndrom; 1 bod), 2. věk v době diagnózy  $\geq 45$  let (1 bod), 3. nedostatečná klinická odpověď na bezlepkovou dietu (1 bod), 4. špatná adherence k bezlepkové dietě (2 body). Pacienty je následně možno označit za nízkorizikové (skóre 0-1, 5% riziko pVA, kontrolní tenkostřevní biopsie nemusí být provedena), středněrizikové (skóre 2, 16% riziko pVA, biopsie je indikována po individuálním zhodnocení jejího benefitu) a vysokorizikové (skóre 3, 73% riziko pVA, biopsie by měla být provedena). Z tohoto pohledu byli naši pacienti ve skupině nízkorizikových (max. riziko plynoucí z věku) a tedy absence statisticky významných změn plazmatických hladin citrulinu v této kohortě není takovým překvapením. Další studie zařazující korelaci mezi Schieppattiho skóre, hladinou citrulinu a histologickými změnami tenkého střeva u nemocných nedosahujících remise onemocnění mohou přinést zajímavější zjištění a odhalit případný potenciál citrulinu jako markeru snížené funkce u těžších forem atrofie tenkého střeva.

Vzhledem k nedostatečné citlivosti změn plazmatických hladin citrulinu ve skupině léčených celiaků v klinické remisi (viz výše) jsme hledali další podobný marker, citlivější k poškození tenkého střeva již na úrovni pouhé zánětlivé infiltrace či počínající atrofie sliznice. Jedním z nich by podle našeho názoru mohl být metabolický prekurzor citrulinu – ornitin. V literatuře jsme nenašli žádnou dosud publikovanou práci, která by hodnotila aminokyselinu ornitin jako ukazatel tenkostřevního poškození, resp. ukazatele aktivity celiakie v dospělé populaci. Zdá se, že naše recentně publikovaná studie (137) je v tomto ohledu vůbec první. Studie autorů Torinsson et al. z roku 2018 (217) se zabývá periferním spektrem aminokyselin u dětských pacientů s neléčenou celiakií a jedním z několika jejích zjištění je zvýšení hladiny ornitinu u těchto pacientů. Prakticky se tedy jedná o výsledky překvapivě zcela opačné proti naší práci. Možným vysvětlením jsou odlišnosti obou studovaných populací (studie Torinsson et al. zahrnovala nemocné s neléčenou / aktivní celiakií). Možným, byť spíše hypotetickým, vysvětlením zvýšení ornitinu v těchto případech by mohl být pasivní přestup aminokyseliny přes zánětem poškozenou tenkostřevní sliznici při jeho bohatém výskytu v dietě a dále možný relativní deficit aminokyselin u dospělých pacientů s dlouhotrvajícím

onemocněním (217). Statisticky významně nižší plazmatické koncentrace ornitinu u dospělých pacientů s nekomplikovanou celiakií ( $p < 0,001$ ) ve srovnání se zdravými kontrolami, zjištěné v naší studii, mohou naznačovat skutečně jeho větší citlivost ve srovnání s citrulinem, jako markeru poškození sliznice tenkého střeva. Přesto nelze ignorovat také jiná alternativní vysvětlení tohoto fenoménu. Jedním z nich mohou být například změny plazmatických hladin aminokyselin způsobené rozdíly mezi respondenty na základě dietních odlišností (celiakie: bezlepková dieta vs. dárci krve: běžná racionální strava). Ačkoliv je citrulin specifickým produktem enterocytů a ve stravě, s výjimkou melounů, není téměř přítomen (218) a není uvolňován také jinými buňkami, jeho metabolit ornitin je ve stravě poměrně běžný a jeho denní příjem může být až několik gramů. Další důležitou skutečností je také metabolické spojení ornitinu s argininem, který je substrátem pro jeho tvorbu. Snížený obsah argininu v bezlepkové dietě může teoreticky také přispívat k zjištěným nižším hladinám v plazmě pacientů (22, 219). Vliv lepku na metabolismus ornitinu může být dalším z faktorů vstupujících do problematiky. Z tohoto pohledu nelze vyloučit také možný vliv bezlepkové diety na zjištěná data a určitý vliv na hladiny ornitinu v séru u celiaků. Samotný lepek kromě toho stimuluje aktivitu arginázy (enzym potřebný k přeměně argininu na ornitin), a proto může bezlepková dieta vést k relativnímu snížení aktivity arginázy a tím i k nižší produkci a snížení plazmatických koncentrací ornitinu u celiaků (220). Toto by mohlo být dalším z vysvětlení diametrálně odlišných nálezů u dospělých celiaků ve srovnání s dětskou populací (která byla bez bezlepkové diety). K dokreslení složitosti interpretace výsledků byly hladiny obou aminokyselin (citrulinu a ornitinu) zkoumány u jedinců bez projevů malnutrice či nízkobílkovinné diety. Další studie budou muset naše pozorování potvrdit i u nemocných s přetrvávající klinickou, sérologickou či histologickou aktivitou celiakie.

Je otázkou (či spíše spekulací), zda lze výše uvedenými tvrzeními vysvětlit překvapivou, statisticky významnou korelaci mezi plazmatickými koncentracemi citrulinu a ornitinu ve skupině pacientů s celiakií oproti skupině zdravých kontrol, kde byla jejich korelace slabá (tabulka 2 a obrázek 1). Hypoteticky by k vysvětlení statisticky signifikantně silnější korelace mohla přispět podrobnější analýza obsahu aminokyselin ve stravě (bezlepkové dietě, racionální střeoevropské výživě) a metabolických změn v jejich produkci. Naše práce má také některé další limitace. Hlavní z nich je absence longitudinálního sledování pozorovaných změn plazmatických hladin aminokyselin v čase a absence korelace s invazivními testy (histologické změny sliznice tenkého střeva) spolu podrobnější analýzou nutričních parametrů (včetně sérových hladin železa, feritinu a ostatních). Další, spíše méně významnou limitací, je absence

genotypizace HLA ve skupině zdravých kontrol, která by definitivně vyloučila séronegativní celiakii, ačkoli její pravděpodobnost je v této skupině velmi nízká.

Přes statisticky významné rozdíly zjištěné v indexu tělesné hmotnosti (BMI,  $p = 0,006$ ), tělesném povrchu (BSA,  $p = 0,011$ ) a středním objemu erytrocytů (MCV,  $p = 0,002$ ) mezi pacienty s celiakií a zdravými kontrolami, nelze tato zjištění považovat za klinicky významná vzhledem k relativně nízkým rozdílům absolutních hodnot (detaily v tabulce 1). Vzhledem k předpokládané absenci závažné formy tenkostřevního selhávání a malasimilačního syndromu jsme tento výsledek též předpokládali.

Přesto, že jsme v našem souboru nezjistili signifikantní rozdíly v plazmatických koncentracích citrulinu nebo ornitinu ve vztahu ke kouření, jsou z hlediska vztahu kouření a rizika vzniku celiakie zajímavé výsledky metaanalýzy autorů Wijarnpreecha et al. (221). Zaprvé, signifikantně nižší riziko vzniku celiakie mají současní kuřáci proti jedincům, kteří nikdy nekouřili (OR 0,52, 95 % CI, 0,32–0,84). Zadruhé, riziko vzniku celiakie mezi bývalými kuřáky a jedinci, kteří nikdy nekouřili není signifikantně rozdílné (OR 1,10, 95 % CI, 0,76–1,60). Obecně tedy z uvedené metaanalýzy vyplývá určitá favorizace kouření ve vztahu k riziku vzniku celiakie a autoři dokonce kouření opatrně označili za možný environmentální protektivní faktor. Metaanalýza uvádí též dvě hypotézy, které mohou vysvětlit uvedená tvrzení o vztahu kouření (resp. biologického účinku cigaretového kouře) a celiakie. Zaprvé, cigaretový kouř může mít negativní imunomodulační efekt na klíčové buněčné a/nebo humorální komponenty tenkostřevního zánětu ve smyslu snížení reaktivity T lymfocytů a/nebo snížení exprese tkáňové transglutaminázy (222). Zadruhé, cigaretový kouř může způsobovat snížení permeability střevní stěny (223) a tím hned v úvodu patogenetické kaskády celiakie snižovat nálož imunoreaktivních gliadinových štěpů v lamina propria tenkostřevní sliznice.

### **3.5. Závěr**

V současné době neexistuje univerzální, všeobecně přijatý a validní ukazatel aktivity celiakie v oblasti tenkého střeva. Zejména u pacientů s nekomplikovanou celiakií na bezlepkové dietě je stanovení perzistující zánětlivé aktivity nemoci obtížné vzhledem k časté absenci klinických příznaků. Na druhou stranu by identifikace tohoto (ideálně neinvasivního) markeru umožnila selektovat nemocné v trvajícím zvýšeném riziku závažných (včetně maligních) komplikací a umožnila jejich intenzivnější dispenzarizaci (včetně endoskopické a histologické).

Vhodným kandidátem na takový ukazatel se zdá být dle našich nových (dříve nepublikovaných) dat u nemocných s nekomplikovanou celiakií především neesenciální neproteinogenní aminokyselina ornitin a její stanovení v plazmě. Výsledky naší práce ukazují, že právě plazmatické koncentrace ornitinu by mohly být citlivější pro posouzení aktivity onemocnění a poškození tenkého střeva nedosahující intenzity těžké atrofie či tenkostřevního selhání (zde dominuje citrulin). K potvrzení našich výsledků bude ale v budoucnu potřeba provést další studie, zejména se zaměřením na vliv diety a metabolických změn na plazmatické hladiny specifických aminokyselin a ověřit výsledky naší práce korelací s histopatologickými nálezy také longitudinálně.

## 4. Funkční hyposplenismus u nemocných s celiakií

### 4.1. Úvod

Enteropatie (včetně celiakie) mohou být (podle dostupných dat) spojeny s poruchou funkce sleziny (140, 141). Hyposplenismus je stav, kdy je orgán anatomicky zachován, ale neplní svou fyziologickou funkci. U komplikovaných a těžších forem celiakie je udávaná prevalence funkčního hyposplenismu až 80 %, kdy může být spojen se závažnými klinickými následky, zejména ve formě těžkých bakteriálních infekcí (140, 144).

Porucha funkce sleziny se může projevit alterací dvou základních mechanismů, kterými orgán disponuje – filtračním a obranným. V případě poruchy filtrační slezinné funkce dochází k sekundární trombocytóze (se zvýšením rizika tromboembolismu), nedostatečné sekvestraci erytrocytů nebo jiných organismů škodlivých a/nebo nepotřebných struktur (149, 224). Sledování konsekvencí poruchy filtrační funkce sleziny (radioizotopové metody, detekce erytrocytárních Howel-Jollyho tělísek či tečkovaných erytrocytů) je v současné době zlatým standardem pro diagnostiku a sledování tíže hyposplenismu (152, 156, 225, 226). V případě poruchy obranné funkce sleziny však nejsou diagnostické a sledovací postupy ustálené, a to přesto, že klinické následky slezinné imunitní dysfunkce mohou u pacientů (zejména s komplikovanými formami celiakie) být závažné až fatální. Obávané jsou bakteriální infekce opouzdřenými pneumokokovými, meningokokovými a/nebo hemofilovými patogeny (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae typ b*). Syndrom fulminantně probíhající sepse u splenektomovaných (tzv. OPSI syndrom, *angl. Overwhelming PostSplenectomy Syndrome*) se týká nejen pacientů po chirurgické splenektomii, ale i pacientů s anatomicky zachovanou, ale funkčně významně alterovanou slezinou (138, 142, 227).

Literární data prokazují korelaci mezi tíží enteropatie, respektive poruchou funkce tenkého střeva u nemocných s komplikovanou či těžkou formou enteropatie a snížením slezinných funkcí (144, 198, 199). Z tohoto pohledu funguje průkaz snížení slezinné funkce jako nepřímý marker poškození tenkého střeva.

Cílem naší studie bylo ověřit přítomnost hyposplenismu jako potenciálního markeru aktivity celiakie pomocí stanovení zastoupení B lymfocytů a jejich subpopulací v kohortě léčených nemocných s nekomplikovanou, asymptomatickou celiakií. Nepřímá identifikace hyposplenismu by v této populaci mohla významně přispět jednak k její těsnější dispenzarizaci

a dále k edukaci pacientů i ošetřujících lékařů a tím k prevenci vzniku závažných (zejména infekčních) komplikací funkčního hyposplenismu (142, 145).

## 4.2. Metodika

Studie „Funkční hyposplenismus u nemocných s celiakií“ byla organizována jako prospektivní, srovnávací (studie případů a kontrol). V rámci projektu jsme porovnávali skupinu nemocných konsekutivně sledovaných v naší gastroenterologické poradně pro dříve diagnostikovanou celiakii se skupinou zdravých dobrovolníků získanou z kohorty dárců krve.

Mezi zařazovací kritéria studie patřila diagnóza celiakie stanovená kombinací pozitivní sérologie (která vždy zahrnovala protilátky proti tkáňové transglutamináze v třídě IgA a v některých případech i další) a kompatibilní histologický nálezn v biopsických vzorcích získaných z duodena v průběhu gastroscopického vyšetření před zahájením bezlepkové diety. Nemocní byli léčeni bezlepkovou dietou, celiakie byla v klinické remisi, bez projevů komplikací onemocnění.

Vyřazovací kritéria zahrnovala věk <18 let, graviditu, jiné aktivní onemocnění gastrointestinálního traktu a pankreatobiliární soustavy, aktivní onkologické onemocnění, komplikace celiakie, jiné formy enteropatie včetně potenciálně enterotoxické medikace (NSAID) a přítomnost onemocnění potenciálně ovlivňujícího plazmatické koncentrace citrulinu a/nebo ornitinu (např. renální insuficience).

Ve skupině zdravých dobrovolníků (dárci krve) byla celiakie vyloučena provedením extenzivního sérologického protokolu zahrnujícího nejen protilátky proti tkáňové transglutamináze v třídě IgA, ale i v třídě IgG a dále endomyziální protilátky v třídách IgA a IgG, protilátky proti deamidovanému gliadinovému peptidu v třídách IgA a IgG a antiretikulinové protilátky v třídách IgA a IgG. Zdravé kontroly byly klinicky bez jakýchkoliv obtíží.

Funkce sleziny byla monitorována nepřímo pomocí stanovení jednotlivých B lymfocytárních subpopulací s použitím panelu DuraClone IM B cell (Beckman Coulter), který umožňuje identifikaci jednotlivých vývojových stádií zrání B buněk. K fenotypizaci buněk byla použita metoda průtokové cytometrie. Princip této metody spočívá v průkazu povrchových markerů lymfocytů v periferní krvi pomocí přímo značených monoklonálních protilátek. Protilátky jsou značeny barevnými fluorochromy, z nichž každý je konjugován k jiné protilátce. Různé vlnové délky umožňují současnou vícebarevnou fluorescenci jednotlivých buněk, takže z jednoho měření můžeme zjistit více znaků najednou. Měření se

provádí na průtokovém cytometru, který je schopen analyzovat vlastnosti jednotlivých buněk při rychlém průchodu malým otvorem. Tyto vlastnosti jsou zjišťovány pomocí měření rozptylu světla, objemu částice či její fluorescence. K analýze naměřených dat byl použit software Kaluza (Beckman Coulter). K fenotypizaci B lymfocytů se používá nesražená periferní krev, která se před značením monoklonálními protilátkami centrifuguje a promyje dvakrát fyziologickým roztokem, aby se odstranily sérové imunoglobuliny přítomné v plazmě. Ty by se mohly navázat na monoklonální protilátky anti-IgD a anti-IgM obsažené v koktejlu Duraclone ke stanovení imunoglobulinů na povrchu B lymfocytů jako BCR receptoru.

Následným a důležitým krokem je tzv. gatování. Jedná se o postupné zařazování a specifikaci jednotlivých B lymfocytárních subpopulací pomocí série podaných monoklonálních protilátek namířených proti povrchovým znakům sledovaných subpopulací (ve smyslu od obecného ke konkrétnímu, resp. od všech leukocytů ve vzorku získaných reakcí s anti-CD45 protilátkou, přes B lymfocyty pozitivní na anti-CD19 až po jednotlivé konkrétní subpopulace definované příslušným imunofenotypem). Základní strategií při gatování je v prvním kroku odstranění tzv. dubletů (buněk, které prošly laserovým paprskem přístroje jako shluky dvou a více buněk) a ponechání tzv. singletů (jednotlivých buněk), ze kterých vychází následná podrobnější analýza.

Promytá krev byla inkubována 15 minut ve tmě s monoklonálními protilátkami panelu Duraclone. Jde o koktejl protilátek anti-IgD-FITC, anti-CD21-PE, anti-CD19-ECD, anti-CD27-PC7, anti-CD24-APC, anti-CD38-APC-A750, anti – IgM-PB a anti-CD45-KO. Během inkubace došlo k navázání specifických monoklonálních protilátek na antigenní determinanty exprimované na B lymfocytech. Následně se provedlo odstranění erytrocytů pomocí lyzačního činidla OptiLyseC (Beckman Coulter) a vzorek se změřil na průtokovém cytometru. Analýza umožňuje 5000 B lymfocytů pomocí softwaru Kaluza (Beckman Coulter).

Použitím panleukocytárního znaku CD45 proti hodnotě *Side scatter* (zkr. *SS*, parametr bočního lomu a rozptylu světla po průchodu buňky laserovým paprskem, který je indikátorem vnitřní buněčné struktury, resp. granularity) byly odděleny leukocyty od ostatních částic ve vzorku (erytrocyty, prachové částice, debris). Navazující krok využívá identických znaků (CD45 a *SS*) k získání samotných lymfocytů, které odpovídají rozměrově nejmenším buňkám ve vzorku. Následným použitím znaku CD19 (nebo CD20) opět proti znaku *SS* bylo dosaženo zisku již pouze populace B lymfocytů a v dalších gatovacích krocích bylo již pracováno pouze s touto B lymfocytární subpopulací. B lymfocyty se dále podle exprese anti-IgD a anti-IgM rozdělili na 4 kvadranty (subpopulace) – IgD+IgM+, z nichž byl dále vyčleněn pomocí negativní anti-CD27 naivní buňky (CD27-IgD+IgM+), pokud se na jejich povrchu exprimuje



znak CD27, šlo o primárně efektorové B lymfocyty (fenotyp CD27+IgD+IgM+). Z dalšího kvadrantu dvojité negativních IgD-IgM- se pomocí exprese anti-CD27 určily paměťové izotypově přesmyknuté B lymfocyty (fenotyp CD27+IgD-IgM-) a z nich další analýzou plazmablasty pomocí vysoké exprese anti-CD38 (CD27+CD38+++). Další analýzou se určily populace tranzientních B lymfocytů, které opouštějí kostní dřeň a vyznačují se vysokou expresí znaku anti-IgM, anti-CD38 a anti-CD24 (fenotyp CD27-IgM++CD38++CD24++).

Získané údaje byly statisticky vyhodnoceny pomocí metod deskriptivní statistiky. Data s normálním rozložením byla dále analyzována parametrickým nepárovým t-testem a data s nenormálním rozložením byla testována neparametrickým Mann-Whitneyho testem.

Studie byla schválena společnou univerzitní etickou komisí. Všechny postupy byly v souladu s etickými normami institucionální výzkumné komise a s Helsinskou deklarací z roku 1964 a jejími pozdějšími dodatky. Všichni pacienti podepsali písemný souhlas. U všech získaných údajů byly vymazány všechny osobní identifikační údaje v souladu se zákony na ochranu důvěrnosti České republiky.

### 4.3. Výsledky

Do studie byla zařazena studijní skupina 100 pacientů s nekomplikovanou celiakií na bezlepkové dietě a kontrolní skupina 35 zdravých dárců krve. Složení studijní skupiny dle věku a pohlaví bylo: 30 mužů (30 %), průměrný věk  $52 \pm 16$  let (medián: 44 let, mezikvartilové rozpětí: 31 let) a 70 žen (70 %), průměrný věk  $45 \pm 14$  let (medián: 43 let, mezikvartilové rozpětí: 21 let). V kontrolní skupině bylo 10 mužů (29 %), průměrný věk  $51 \pm 14$  let (medián 47 let, mezikvartilové rozpětí 19 let) a 25 žen (71 %), průměrný věk  $46 \pm 12$  let (medián 45 let, mezikvartilové rozpětí 18 let).

Průměrná doba trvání onemocnění (a tedy i léčby bezlepkovou dietou) byla ve studijní skupině nemocných s celiakií  $153 \pm 143$  měsíců, medián: 111 měsíců (mezikvartilové rozpětí 174 měsíců). Nejčastějším vstupním histologickým nálezem byl v této skupině typ 3a podle Marsh-Oberhuberovy klasifikace. Žádný z pacientů nepodstoupil resekci tenkého střeva a/nebo splenektomii. Ve skupině pacientů se vyskytovala dále některá autoimunitní onemocnění: revmatoidní artritida (1 případ), autoimunitní tyreopatie (19 případů), atopická dermatitida (4 případy), vitiligo (3 případy), autoimunitní hepatitida (1 případ), IgM nefropatie (1 případ), diabetes mellitus 1. typu (5 případů), astma bronchiale (12 případů), polyserositida (1 případ), antifosfolipidový syndrom (1 případ), systémová skleróza (2 případy), autoimunitní gastritida (1 případ), spondylartritida (1 případ), psoriáza (2 případy), eozinofilní ezofagitida (1 případ),

hereditární angioedém (1 případ). Projevy herpetiformní dermatitidy (Duhringova nemoc) byly zaznamenány u 10 pacientů. Nebyl zaznamenán žádný pacient s přidruženým Sjögrenovým syndromem. Deficit IgA byl zjištěn u čtyř pacientů, ale u žádného dobrovolníka ve skupině zdravých kontrol. V anamnéze pacientů i kontrolní skupině nebyla zaznamenána závažná infekce způsobená *Streptococcus pneumoniae*. Genotypizace HLA nebyla v rámci projektu prováděna.

Ve statistickém šetření pacientů s celiakií a ve skupině zdravých kontrol (dárců krve) byly sledovány a porovnávány kvantitativní a kvalitativní znaky. Při sledování kvantitativních znaků byl kladen důraz na krevní hodnoty leukocytů a jejich subpopulací v jejich vývojové řadě jako možných ukazatelů snížené funkce sleziny (hyposplenismu). Ve skupině kvalitativních znaků jsme se zaměřily na ty s možnou souvislostí s celiakií a její aktivitou. Základní parametry krevního obrazu v bílé řadě (leukocyty, celková hladina lymfocytů, B lymfocytů) byly u obou porovnávaných skupin normální a nebyly mezi nimi zjištěny statisticky významné rozdíly. Hodnota celkových leukocytů byla u pacientů s celiakií průměrně  $6,66 \pm 1,69 \times 10^9/L$  a ve skupině zdravých kontrol  $6,55 \pm 1,56 \times 10^9/L$  ( $p = 0,74$ , podrobněji viz tabulky 1-3 a tabulka 4 a graf 1). Relativní hodnoty celkových lymfocytů byly u pacientů s celiakií průměrně  $29,21 \pm 9,12 \%$  a ve skupině zdravých kontrol  $30,63 \pm 7,18 \%$  ( $p = 0,4044$ , podrobněji viz tabulky 1-3 a tabulka 5 a graf 2). Absolutní hodnoty hladiny lymfocytů byly u pacientů s celiakií průměrně  $1,93 \pm 0,75 \times 10^9/L$  a ve skupině zdravých kontrol  $1,98 \pm 0,58 \times 10^9/L$  ( $p = 0,5042$ , podrobněji viz tabulky 1-3 a tabulka 6 a graf 3).

Relativní hodnoty B lymfocytů byly u pacientů s celiakií průměrně  $9,24 \pm 4,19 \%$  a ve skupině zdravých kontrol  $9,09 \pm 3,76 \%$  ( $p = 0,8533$ , podrobněji viz tabulky 1-3 a tabulka 7 a graf 4). Absolutní hodnoty B lymfocytů byly u pacientů s celiakií průměrně  $0,18 \pm 0,10 \times 10^9/L$  a ve skupině zdravých kontrol  $0,18 \pm 0,10 \times 10^9/L$  ( $p = 0,9082$ , podrobněji viz tabulky 1-3 a tabulka 8 a graf 5).

**Tabulka 1.****Hodnoty základních krevních parametrů u pacientů s celiakií**

IQR – mezikvartilové rozpětí (interquartile range)

Ukazatel (počet pacientů n = 100)	Minimum	Maximum	Aritmetický průměr	Medián	95% interval spolehlivosti	Směrodatná odchylka	Relativní směrodatná odchylka	25-75 percentil (IQR)	p-hodnota
Leukocyty (10 <sup>9</sup> /L)	2,55	10,20	6,66	6,93	6,46 až 7,15	1,69	0,25	5,31 – 8,06 (2,72)	0,1351
Lymfocyty (relativní četnost, %)	10,09	53,70	29,21	27,50	26,11 až 31,48	9,12	0,31	22,75 – 34,55 (11,80)	0,2853
Lymfocyty (absolutní četnost, (10 <sup>9</sup> /L)	0,49	4,26	1,93	1,87	1,64 až 2,08	0,75	0,39	1,39 – 2,36 (0,98)	0,0232
B lymfocyty (relativní četnost, %)	0,90	19,00	9,24	8,80	7,60 až 10,26	4,94	0,45	5,85 – 11,55 (5,7)	0,1805
B lymfocyty (absolutní četnost, (10 <sup>9</sup> /L)	0,010	0,45	0,18	0,16	0,14 až 0,19	0,10	0,57	0,10 – 0,24 (0,14)	0,0835

**Tabulka 2.****Hodnoty základních krevních parametrů u zdravých kontrol (dárců krve)**

IQR – mezikvartilové rozpětí (interquartile range)

Ukazatel (počet kontrol n = 35)	Minimum	Maximum	Aritmetický průměr	Medián	95% interval spolehlivosti	Směrodatná odchylka	Relativní směrodatná odchylka	25-75 percentil (IQR)	p-hodnota
Leukocyty (10 <sup>9</sup> /L)	3,05	9,70	6,55	6,01	5,74 až 6,95	1,56	0,24	5,70 – 7,64 (1,93)	0,5389
Lymfocyty (relativní četnost, %)	17,30	49,50	30,63	30,50	27,17 až 32,90	7,18	0,23	25,26 – 35,58 (10,35)	0,3660
Lymfocyty (absolutní četnost, 10 <sup>9</sup> /L)	1,00	3,12	1,98	1,91	1,63 až 2,24	0,58	0,29	1,47 – 2,38 (0,91)	0,1631
B lymfocyty (relativní četnost, %)	2,40	16,90	9,09	9,40	7,91 až 11,05	3,76	0,41	5,50 – 12,45 (6,95)	0,3208
B lymfocyty (absolutní četnost, 10 <sup>9</sup> /L)	0,04	0,39	0,18	0,18	0,13 až 0,23	0,10	0,52	0,10 – 0,26 (0,16)	0,5008

**Tabulka 3.**

**Srovnání hodnot základních krevních parametrů mezi skupinou pacientů s celiakií a skupinou zdravých dárců krve (T-test)**

	Pacienti s celiakií n = 100		Zdraví dárci krve n = 35		Rozdíl aritmetických průměrů	95% interval spolehlivosti	p – hodnota
	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka	Aritmetický průměr	Směrodatná odchylka			
Leukocyty ( $10^9/L$ )	6,67	1,69	6,55	1,56	-0,11	-0,75 až 0,54	0,7382
Lymfocyty (relativní četnost, %)	29,21	9,12	30,63	7,18	1,42	-1,94 až 4,79	0,4044
B lymfocyty (relativní četnost, %)	9,24	4,19	9,09	3,76	-0,15	-1,74 až 1,44	0,8533
B lymfocyty (absolutní četnost, $10^9/L$ )	0,18	0,10	0,18	0,10	0,00	-0,03 až 0,04	0,9082

**Tabulka 4.****Nezávislý výběrový T-test pro četnost leukocytů ( $10^9/L$ ) u pacientů s celiakií a u zdravých dárců krve**

	Pacienti s celiakií	Zdraví dárci krve
Počet	100	35
Aritmetický průměr	6,66	6,55
95% interval spolehlivosti	6,32 až 7,00	6,02 až 7,09
Rozptyl	2,86	2,42
Směrodatná odchylka	1,69	1,56
Směrodatná odchylka průměru	0,17	0,26

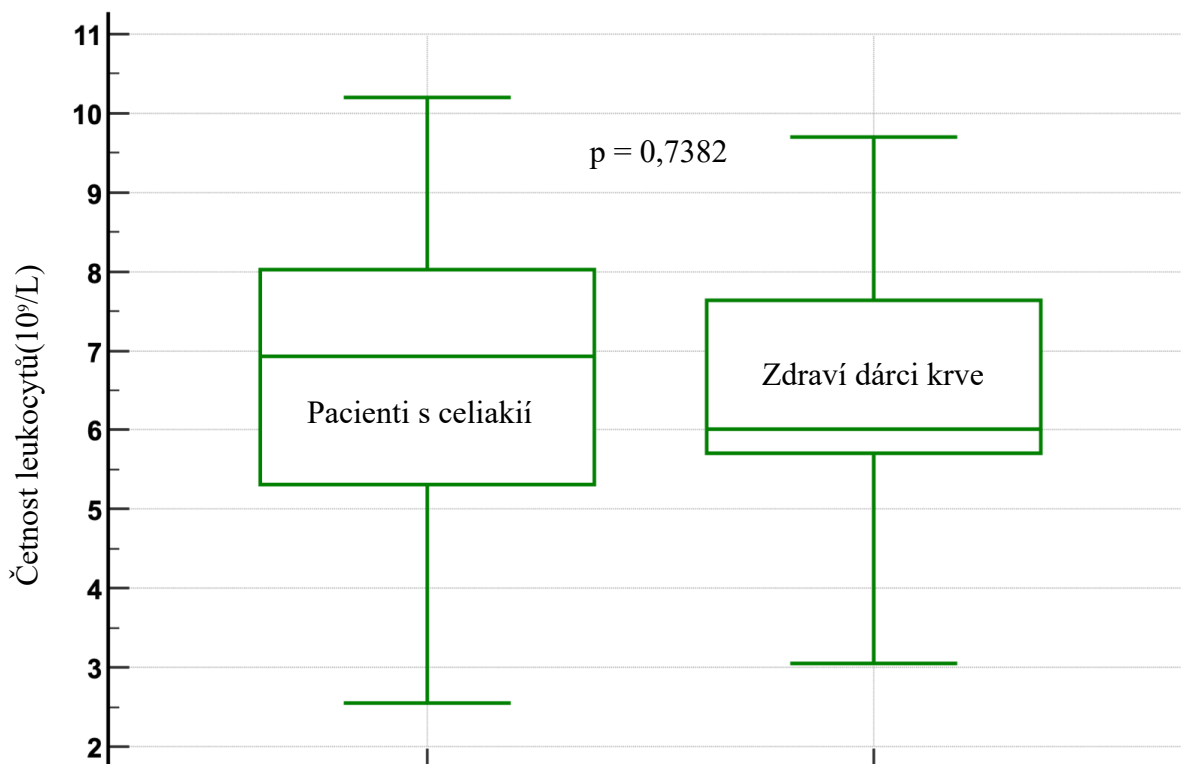
F-test shody rozptylů	p = 0,589
-----------------------	-----------

**T-test (za předpokladu rovnosti rozptylů)**

Rozdíl	-0,11
Sdružená směrodatná odchylka	1,66
Standardní chyba	0,33
95% interval spolehlivosti	-0,75 až 0,54
Studentův t-test	-0,34
Stupně volnosti	133
Oboustranná pravděpodobnost	p = 0,74

**Zbytkové hodnoty**

D'Agostino-Pearsonův test pro normální rozdělení	Normalita akceptována (p = 0,2855)
--	------------------------------------



**Graf 1.**

**Krabicový graf pro četnost leukocytů ( $10^9/L$ )**

Vlevo: pacienti s celiakií; vpravo: zdraví dárci krve

**Tabulka 5.**

**Nezávislý výběrový T-test pro relativní četnost celkových lymfocytů (%) u pacientů s celiakií a zdravých dárců krve**

	Pacienti s celiakií	Zdraví dárci krve
Počet	100	35
Aritmetický průměr	29,21	30,63
95% interval spolehlivosti	27,40 až 31,02	28,17 až 33,10
Rozptyl	83,19	51,48
Směrodatná odchylka	9,12	7,18
Směrodatná odchylka průměru	0,91	1,21

F-test shody rozptylů	p = 0,113
-----------------------	-----------

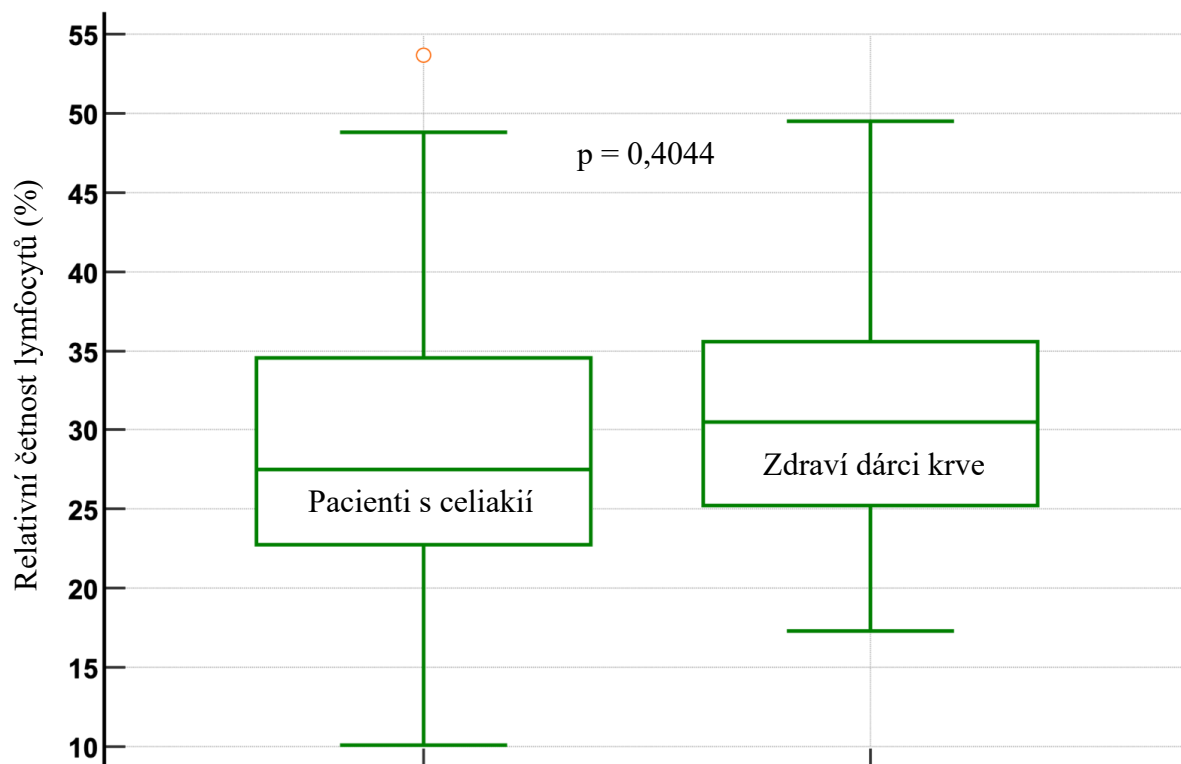
T-test (za předpokladu rovnosti rozptylů)

Rozdíl	1,42
Sdružená směrodatná odchylka	8,67
Standardní chyba	1,70
95% interval spolehlivosti	-1,94 až 4,79
Studentův t-test	0,83
Stupně volnosti	133
Oboustranná pravděpodobnost	p = 0,4044

Zbytkové hodnoty

D'Agostino-Pearsonův test pro normální rozdělení	Normalita akceptována (p = 0,1745)
--	------------------------------------





**Graf 2.**

**Krabicový graf pro relativní četnost lymfocytů (%)**

Vlevo: pacienti s celiakií; vpravo: zdraví dárci krve

## Tabulka 6.

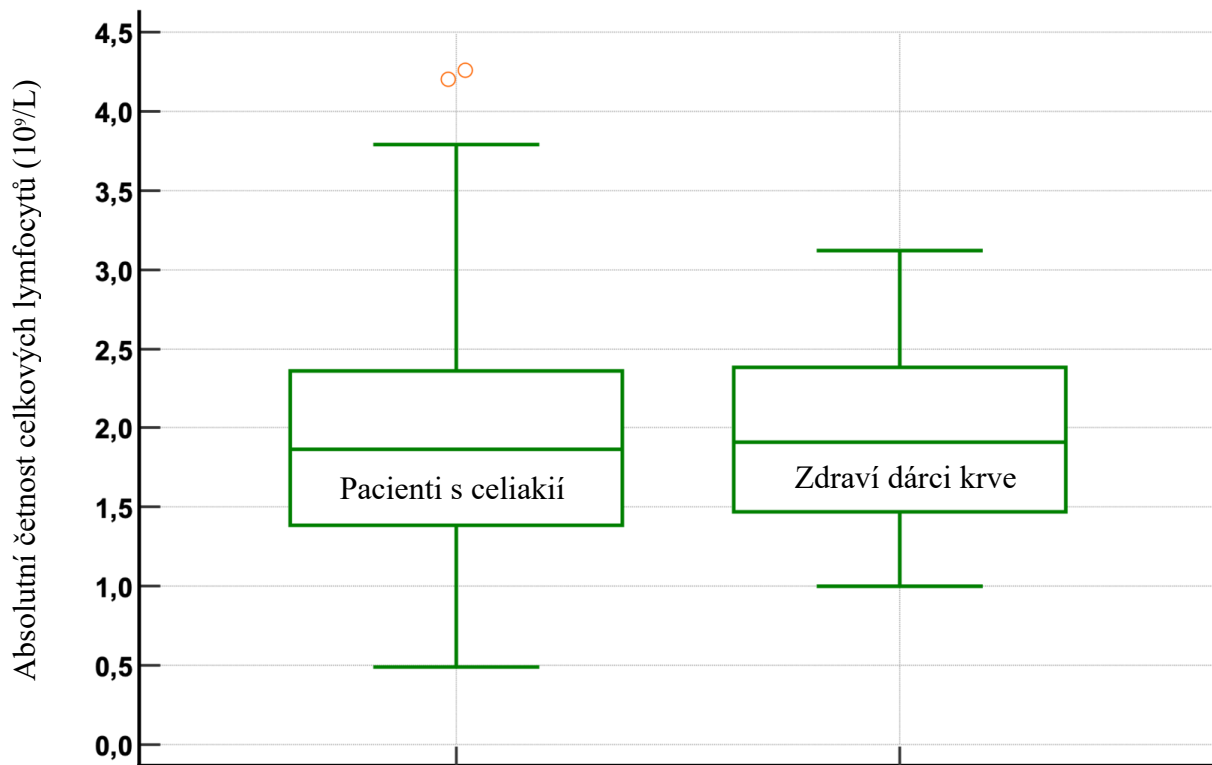
### Mann – Whitneyho test pro absolutní četnost celkových lymfocytů ( $10^9/L$ )

	Pacienti s celiakií	Zdraví dárce krve
Počet	100	35
Nejnižší hodnota	0,49	1,00
Nejvyšší hodnota	4,26	3,12
Medián	1,87	1,91
95% interval spolehlivosti pro medián	1,64 až 2,08	1,63 až 2,24
Mezikvartilové rozpětí	1,39 to 2,36	1,47 až 2,38

Hodges-Lehmannův mediánový rozdíl	0,07
95% interval spolehlivosti	-0,17 až 0,35

### Mann-Whitneyho test

Průměrná hodnota u pacientů s celiakií	66,67
Průměrná hodnota u zdravých dárců krve	71,80
Mann-Whitneyho U-test	1617,00
Test statistic Z (corrected for ties)	-0,67



**Graf 3.**

**Krabicový graf pro absolutní četnost celkových lymfocytů ( $10^9/L$ )**

Vlevo: pacienti s celiakií; vpravo: zdraví dárce krve

**Tabulka 7.****Nezávislý výběrový T-test pro relativní četnost B lymfocytů (%) u pacientů s celiakií a zdravých dárců krve**

	Pacienti s celiakií	Zdraví dárci krve
Počet	100	35
Aritmetický průměr	9,24	9,09
95% interval spolehlivosti	8,41 až 10,08	7,80 až 10,39
Rozptyl	17,59	14,14
Směrodatná odchylka	4,19	3,76
Směrodatná odchylka průměru	0,42	0,64

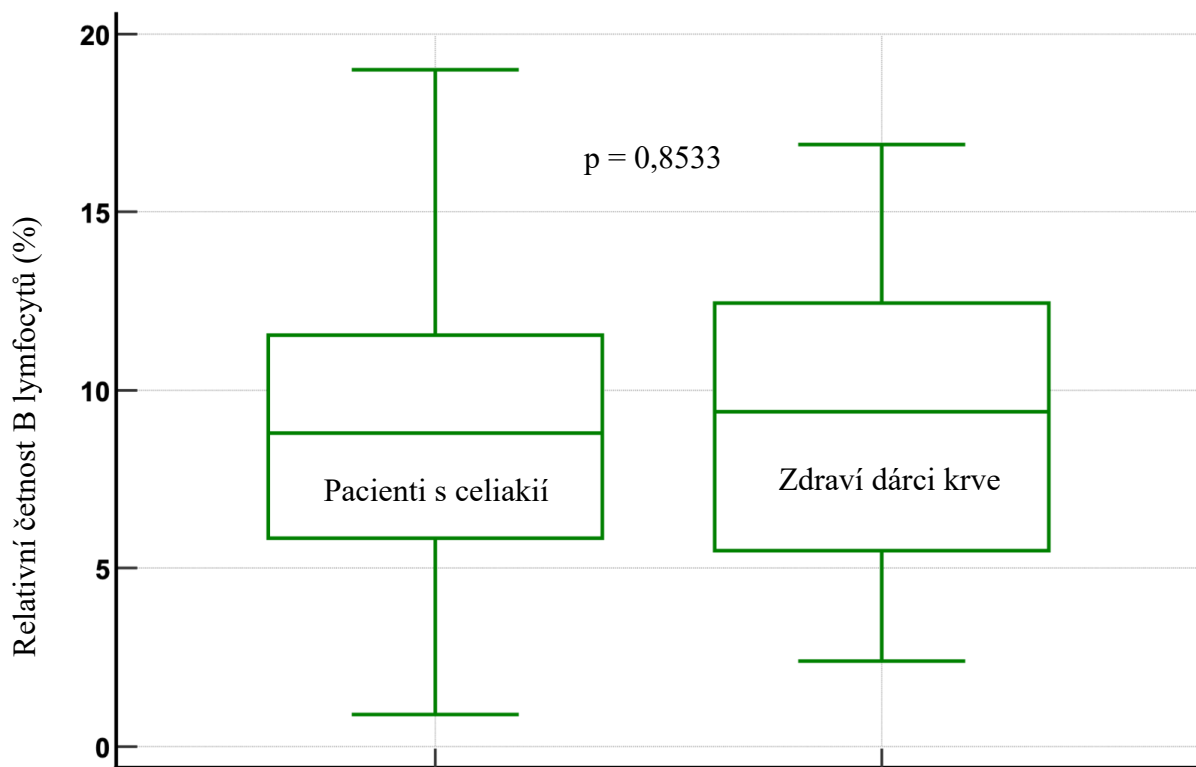
F-test shody rozptylů	p = 0,476
-----------------------	-----------

**T-test (za předpokladu rovnosti rozptylů)**

Rozdíl	-0,15
Sdružená směrodatná odchylka	4,09
Standardní chyba	0,80
95% interval spolehlivosti	-1,74 až 1,44
Studentův t-test	-0,19
Stupně volnosti	133
Oboustranná pravděpodobnost	p = 0,8533

**Zbytkové hodnoty**

D'Agostino-Pearsonův test pro normální rozdělení	Normalita akceptována (p = 0,1153)
--	------------------------------------



**Graf 4.**

**Krabicový graf pro relativní četnost B lymfocytů (%)**

Vlevo: pacienti s celiakií; vpravo: zdraví dárči krve

**Tabulka 8.****Nezávislý výběrový T-test pro absolutní četnost B lymfocytů ( $10^9/L$ ) u pacientů s celiakií a zdravých dárců krve**

	Pacienti s celiakií	Zdraví dárci krve
Počet	100	35
Aritmetický průměr	0,18	0,18
95% interval spolehlivosti	0,16 až 0,20	0,15 až 0,22
Rozptyl	0,01	0,01
Směrodatná odchylka	0,10	0,10
Směrodatná odchylka průměru	0,01	0,02

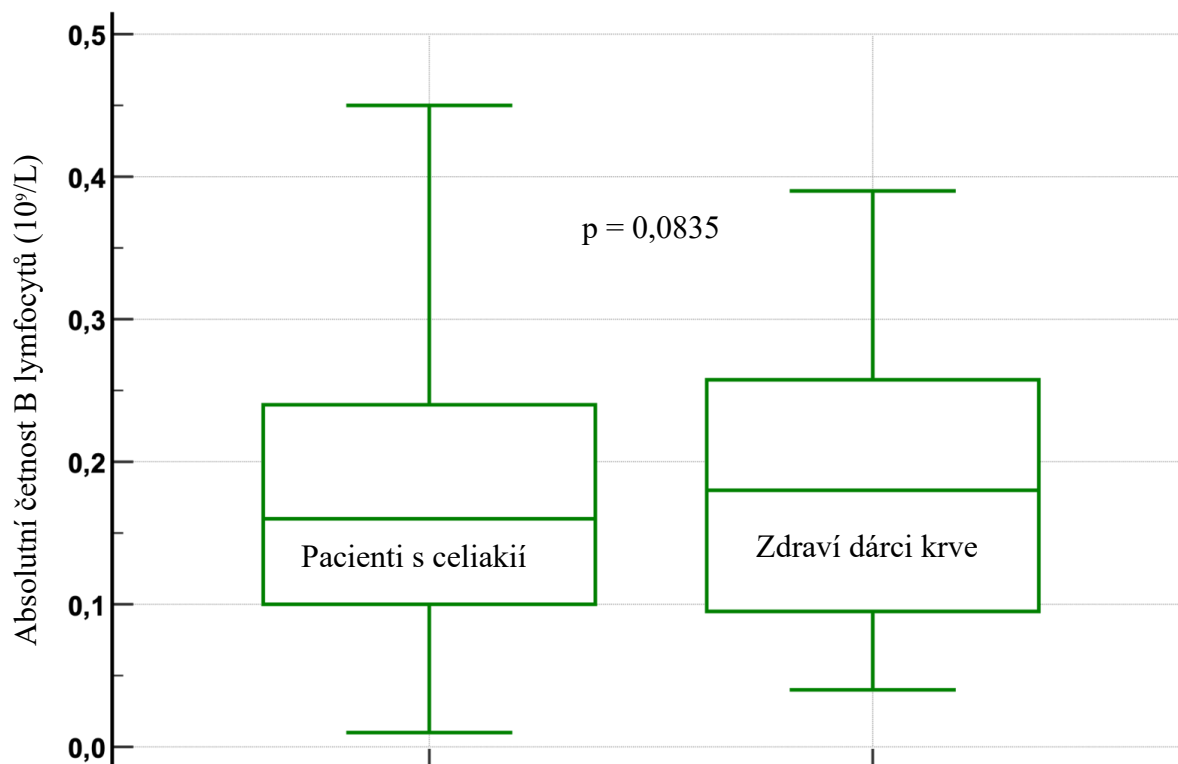
F-test shody rozptylů	p = 0,654
-----------------------	-----------

**T-test (za předpokladu rovnosti rozptylů)**

Rozdíl	0,00
Sdružená směrodatná odchylka	0,10
Standardní chyba	0,02
95% interval spolehlivosti	-0,04 až 0,04
Studentův t-test	0,12
Stupně volnosti	133
Oboustranná pravděpodobnost	p = 0,9082

**Zbytkové hodnoty**

D'Agostino-Pearsonův test pro normální rozdělení	Normalita akceptována (p = 0,0648)
--	------------------------------------



**Graf 5.**

**Krabicový graf pro absolutní četnost B lymfocytů ( $10^9/L$ )**

Vlevo: pacienti s celiakií; vpravo: zdraví dárci krve

V rámci analýzy B lymfocytárních subpopulací jsme našli statisticky významný rozdíl mezi skupinou pacientů s celiakií a skupinou zdravých kontrol v subpopulaci B lymfocytů marginální zóny. Relativní hodnoty paměťových B lymfocytů marginální zóny byly u pacientů s celiakií průměrně  $0,91 \pm 0,74$  % a ve skupině zdravých kontrol  $1,63 \pm 1,09$  % ( $p < 0,0001$ , podrobněji viz tabulky 9-11 a graf 6). Absolutní hodnoty paměťových B lymfocytů marginální zóny byly u pacientů s celiakií průměrně  $17,37 \pm 14,55 \times 10^9/L$  a ve skupině zdravých kontrol  $31,77 \pm 22,65 \times 10^9/L$  ( $p = 0,0002$ , podrobněji viz tabulky 9-11 a graf 7).

**Tabulka 9.****Hodnoty jednotlivých subpopulací B lymfocytů u pacientů s celiakií**

	Počet subjektů	Min	Max	Aritmetický průměr	Medián	95% interval spolehlivosti	Směrodatná odchylka	Relativní směrodatná odchylka	25-75 percentil (IQR)	p – hodnota
B lymfocyty marginální zóny – relativní četnost (%)	100	0,00	4,50	0,88	0,70	0,50 až 0,83	0,72	0,82	0,40-1,15 (0,75)	<b>&lt;0,0001</b>
B lymfocyty marginální zóny – absolutní četnost (10 <sup>9</sup> /L)	100	0,21	81,76	16,785	13,67	10,83 až 15,28	14,61	0,87	6,70-20,78 (14,09)	<b>&lt;0,0001</b>
Naivní B lymfocyty – relativní četnost (%)	100	0,10	14,40	5,94	5,40	4,47 až 6,46	3,36	0,57	3,30-8,05 (4,75)	0,1323
Naivní B lymfocyty – absolutní četnost (10 <sup>9</sup> /L)	100	2,43	328,40	114,04	101,77	87,94 až 121,32	74,15	0,65	57,00-158,03 (101,04)	<b>0,0406</b>
Izotypově přesmyknuté B lymfocyty – relativní četnost (%)	100	0,00	3,90	1,07	0,95	0,80 až 1,10	0,74	0,69	0,60-1,35 (0,75)	<b>&lt;0,0001</b>
Izotypově přesmyknuté B lymfocyty – absolutní četnost (10 <sup>9</sup> /L)	100	0,07	91,15	22,08	15,14	13,90 až 19,24	19,64	0,89	8,22-28,66 (20,44)	<b>&lt;0,0001</b>



„IgM only“ B lymfocyty – relativní četnost (%)	100	0,00	1,80	0,37	0,30	0,30 až 0,40	0,27	0,73	0,20- 0,45 (0,25)	< <b>0,0001</b>
„IgM only“ B lymfocyty – absolutní četnost (10 <sup>9</sup> /L)	100	0,04	43,93	7,12	5,58	4,58 až 6,89	5,94	0,84	3,43- 9,60 (6,17)	< <b>0,0001</b>
Tranzientní B lymfocyty – relativní četnost (%)	100	0,00	0,85	0,18	0,12	0,08 až 0,16	0,19	1,02	0,05- 0,25 (0,20)	< <b>0,0001</b>
Tranzientní B lymfocyty – absolutní četnost (10 <sup>9</sup> /L)	100	0,00	14,72	3,34	2,02	1,53 až 3,34	3,37	1,01	0,87- 5,06 (4,20)	< <b>0,0001</b>
Plazmablasty – relativní četnost (%)	100	0,00	0,07	0,01	0,01	0,01 až 0,01	0,012	1,22	0,00 až 0,01 (0,01)	< <b>0,0001</b>
Plazmablasty – absolutní četnost (10 <sup>9</sup> /L)	100	0,00	0,96	0,17	0,12	0,09 až 0,15	0,18	1,05	0,04 až 0,20 (0,21)	< <b>0,0001</b>
Věk (roky)	100	20,00	87,00	46,86	43,50	39,72 až 47,00	15,50	0,33	35,00 až 58,00 (23)	< <b>0,0291</b>

**Tabulka 10.****Hodnoty jednotlivých subpopulací B lymfocytů u zdravých dárců krve**

	Počet subjektů	Min	Max	Aritmetický průměr	Medián	95% interval spolehlivosti	Směrodatná odchylka	Relativní směrodatná odchylka	25-75 percentil (IQR)	p-hodnota
B lymfocyty marginální zóny – relativní četnost (%)	35	0,30	4,40	1,55	1,30	0,82 až 1,78	1,07	0,69	0,70-2,08 (1,38)	<b>0,0256</b>
B lymfocyty marginální zóny – absolutní četnost (10 <sup>9</sup> /L)	35	4,28	109,60	30,28	25,54	15,40 až 36,04	22,25	0,73	14,18-43,17 (28,99)	<b>0,0002</b>
Naivní B lymfocyty – relativní četnost (%)	35	0,70	9,80	4,95	5,10	3,65 až 6,15	2,51	0,51	2,78-6,78 (4)	0,2941
Naivní B lymfocyty – absolutní četnost (10 <sup>9</sup> /L)	35	11,88	291,88	101,61	108,87	61,11 až 126,73	65,04	0,64	43,68-151,13 (107,45)	0,1240
Izotypově přesmyknuté B lymfocyty – relativní četnost (%)	35	0,40	3,70	1,32	1,00	0,90 až 1,38	0,81	0,61	0,70-1,55 (0,85)	<b>0,0031</b>
Izotypově přesmyknuté B lymfocyty – absolutní četnost (10 <sup>9</sup> /L)	35	6,28	90,16	25,66	21,21	16,24 až 26,63	17,03	0,66	14,12-31,00 (16,88)	<b>&lt;0,0001</b>
„IgM only“ B lymfocyty –	35	0,10	1,80	0,43	0,30	0,20 až 0,48	0,36	0,83	0,20-0,58	<b>&lt;0,0001</b>

relativní četnost (%)									(0,38)	
„IgM only“ B lymfocyty – absolutní četnost (10 <sup>9</sup> /L)	35	1,43	45,28	8,14	5,95	4,56 až 8,43	7,95	0,98	3,55- 9,15 (5,61)	< <b>0,0001</b>
Tranzientní B lymfocyty – relativní četnost (%)	35	0,02	0,37	0,13	0,12	0,06 až 0,15	0,10	0,75	0,05- 0,17 (0,12)	<b>0,0178</b>
Tranzientní B lymfocyty – absolutní četnost (10 <sup>9</sup> /L)	35	0,21	10,16	2,67	2,13	1,34 až 2,89	2,24	0,84	1,14- 3,90 (2,76)	<b>0,0002</b>
Plazmablasty – relativní četnost (%)	35	0,00	0,04	0,01	0,00	0,00 až 0,01	0,01	1,55	0,00- 0,01 (0,01)	< <b>0,0001</b>
Plazmablasty – absolutní četnost (10 <sup>9</sup> /L)	35	0,00	1,28	0,14	0,06	0,05 až 0,14	0,22	1,59	0,04- 0,18 (0,14)	< <b>0,0001</b>

**Tabulka 11.**

**Srovnání hodnot jednotlivých subpopulací B lymfocytů mezi skupinou pacientů s celiakií a skupinou zdravých dárců krve**

	Pacienti s celiakií			Zdraví dárci krve			p - hodnota
	Počet	Medián	Průměrné pořadí	Počet	Medián	Průměrné pořadí	
B lymfocyty marginální zóny – relativní četnost (%)	100	0,70	60,47	35	1,30	89,51	<b>0,0002</b>
B lymfocyty marginální zóny – absolutní četnost ( $10^9/L$ )	100	13,67	60,70	35	25,54	88,86	<b>0,0002</b>
Naivní B lymfocyty – absolutní četnost ( $10^9/l$ )	100	101,77	69,38	35	108,87	64,06	0,4884
Izotypově přesmyknuté B lymfocyty – relativní četnost (%)	100	0,95	64,76	35	1,00	77,26	0,1030
Izotypově přesmyknuté B lymfocyty – absolutní četnost ( $10^9/L$ )	100	15,14	64,14	35	21,21	79,04	0,0523
„IgM only“	100	0,30	67,14	35	0,30	70,46	0,6617

B lymfocyty – relativní četnost (%)							
„IgM only“ B lymfocyty – absolutní četnost (10 <sup>9</sup> /L)	100	5,58	66,89	35	5,95	71,17	0,5773
Tranzientní B lymfocyty – relativní četnost (%)	100	0,12	69,50	35	0,12	63,73	0,4526
Tranzientní B lymfocyty – absolutní četnost (10 <sup>9</sup> /L)	100	2,02	68,64	35	2,13	66,19	0,7498
Plazmablasty – relativní četnost (%)	100	0,01	71,91	35	0,00	56,84	<b>0,0342</b>
Plazmablasty – absolutní četnost (10 <sup>9</sup> /L)	100	0,12	70,79	35	0,06	60,04	0,1610

**Tabulka 12.****Mann-Whitneyho test pro relativní četnost naivních B lymfocytů (%) u pacientů s celiakií a ve skupině zdravých dárců krve**

	Pacienti s celiakií	Zdraví dárci krve
Počet	100	35
Aritmetický průměr	5,94	4,95
95% interval spolehlivosti	5,27 až 6,60	4,09 až 5,81
Rozptyl	11,28	6,2767
Směrodatná odchylka	3,36	2,51
Směrodatná odchylka průměru	0,36	0,42

F-test shody rozptylů	p = 0,054
-----------------------	-----------

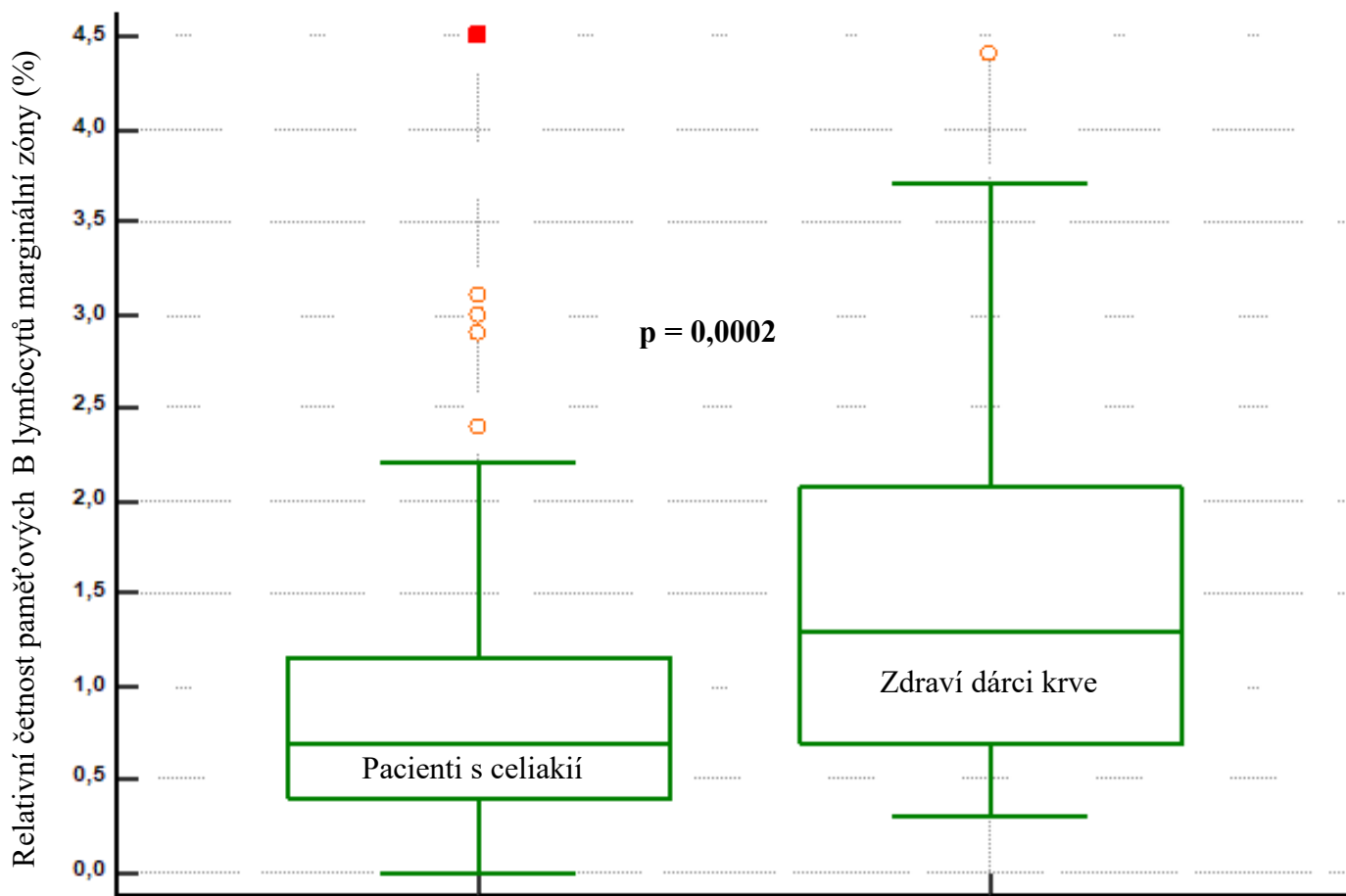
**Tabulka 13.****Nezávislý výběrový T-test pro relativní četnost subpopulace naivních B lymfocytů (%) u pacientů s celiakií a zdravých dárců krve**

T-test (za předpokladu rovnosti rozptylů)

Rozdíl	-0,99
Sdružená směrodatná odchylka	3,16
Standardní chyba	0,62
95% interval spolehlivosti	-2,21 až 0,24
Studentův t-test	-1,59
Stupně volnosti	133
Oboustranná pravděpodobnost	p = 0,11

Zbytkové hodnoty

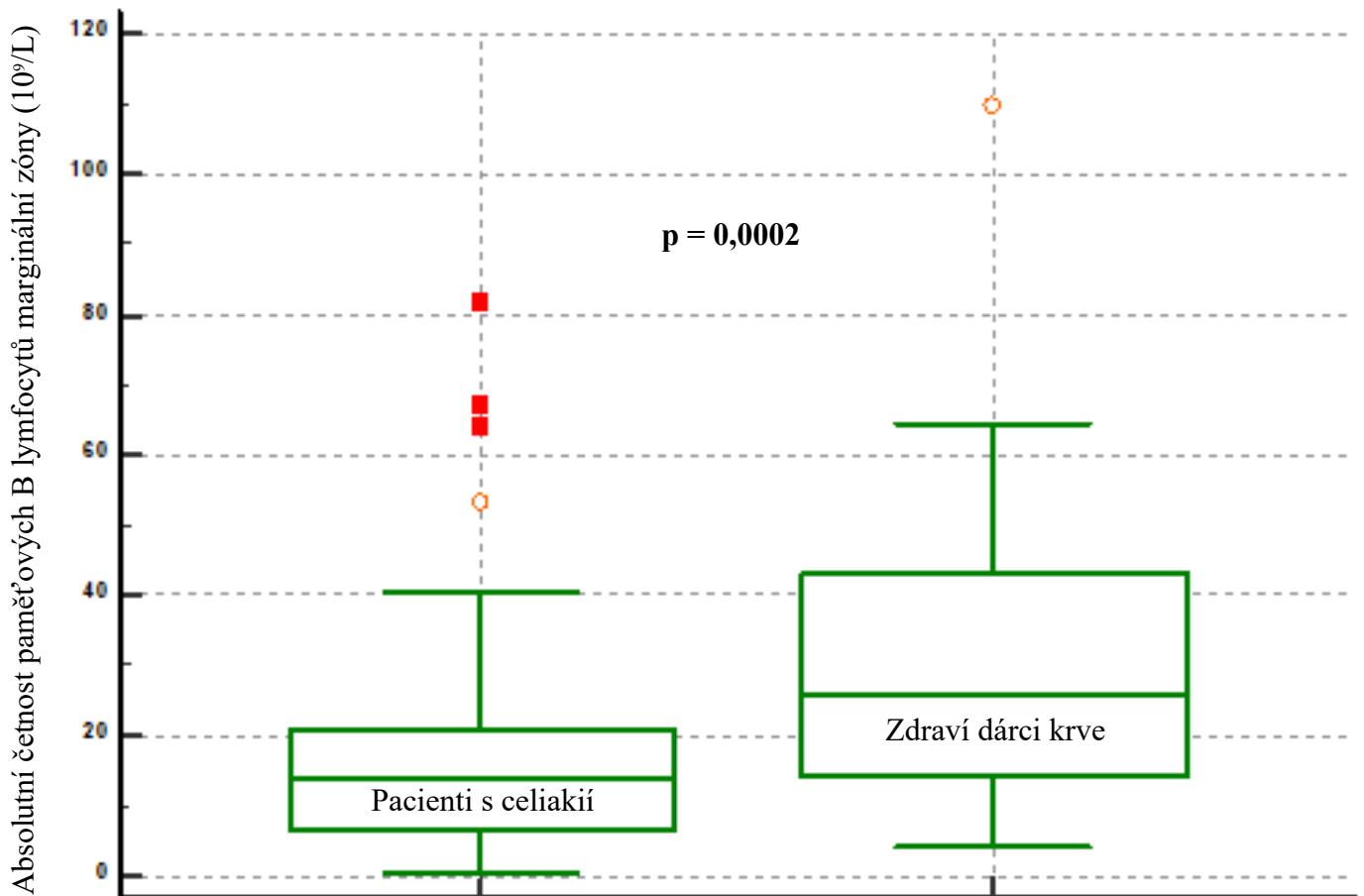
D'Agostino-Pearsonův test pro normální rozdělení	Normalita akceptována (p = 0,1179)
--	------------------------------------



**Graf 6. Krabicový graf pro relativní četnost B lymfocytů marginální zóny (%)**

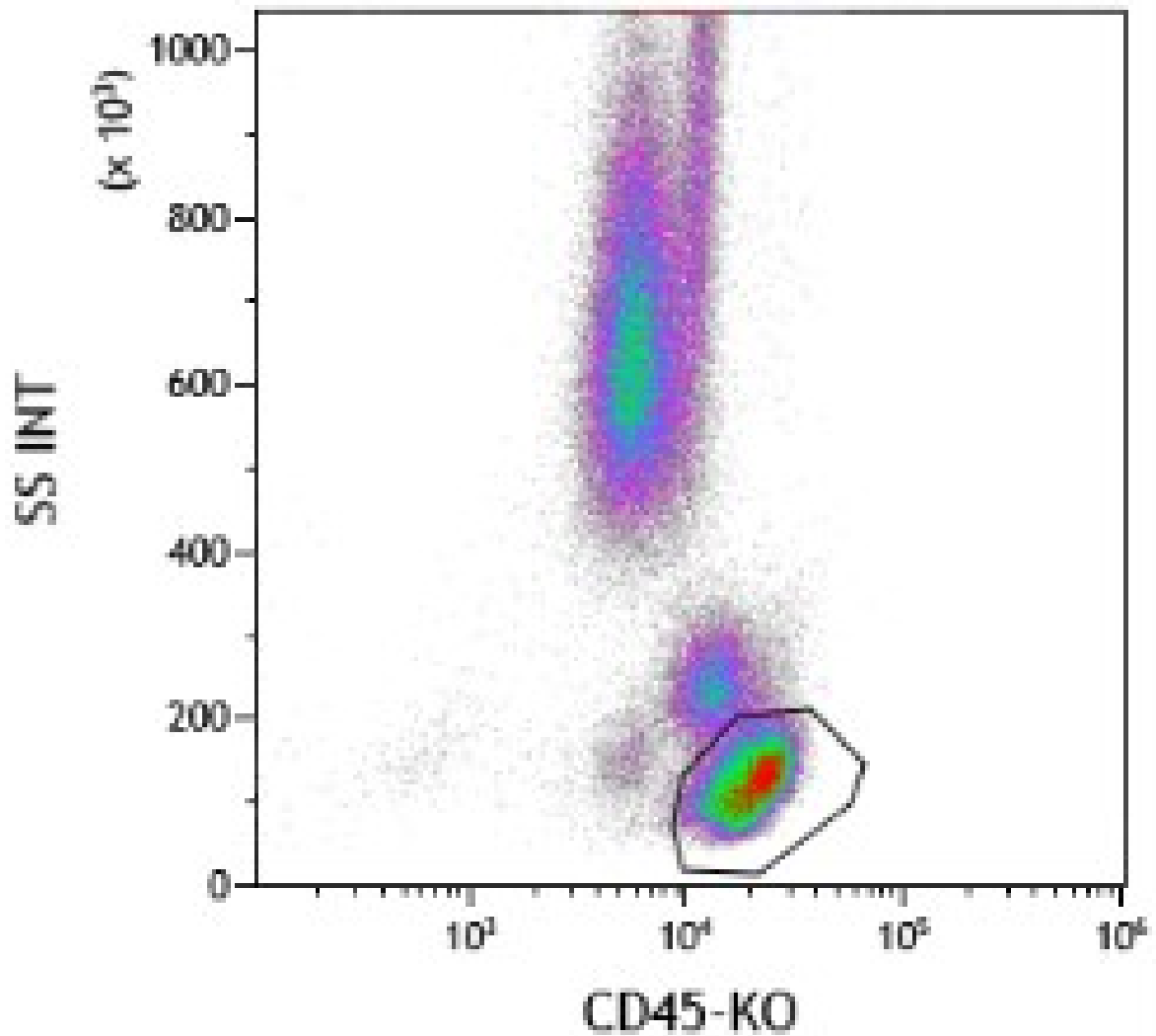
Vlevo: pacienti s celiakií; vpravo: zdraví dárci krve





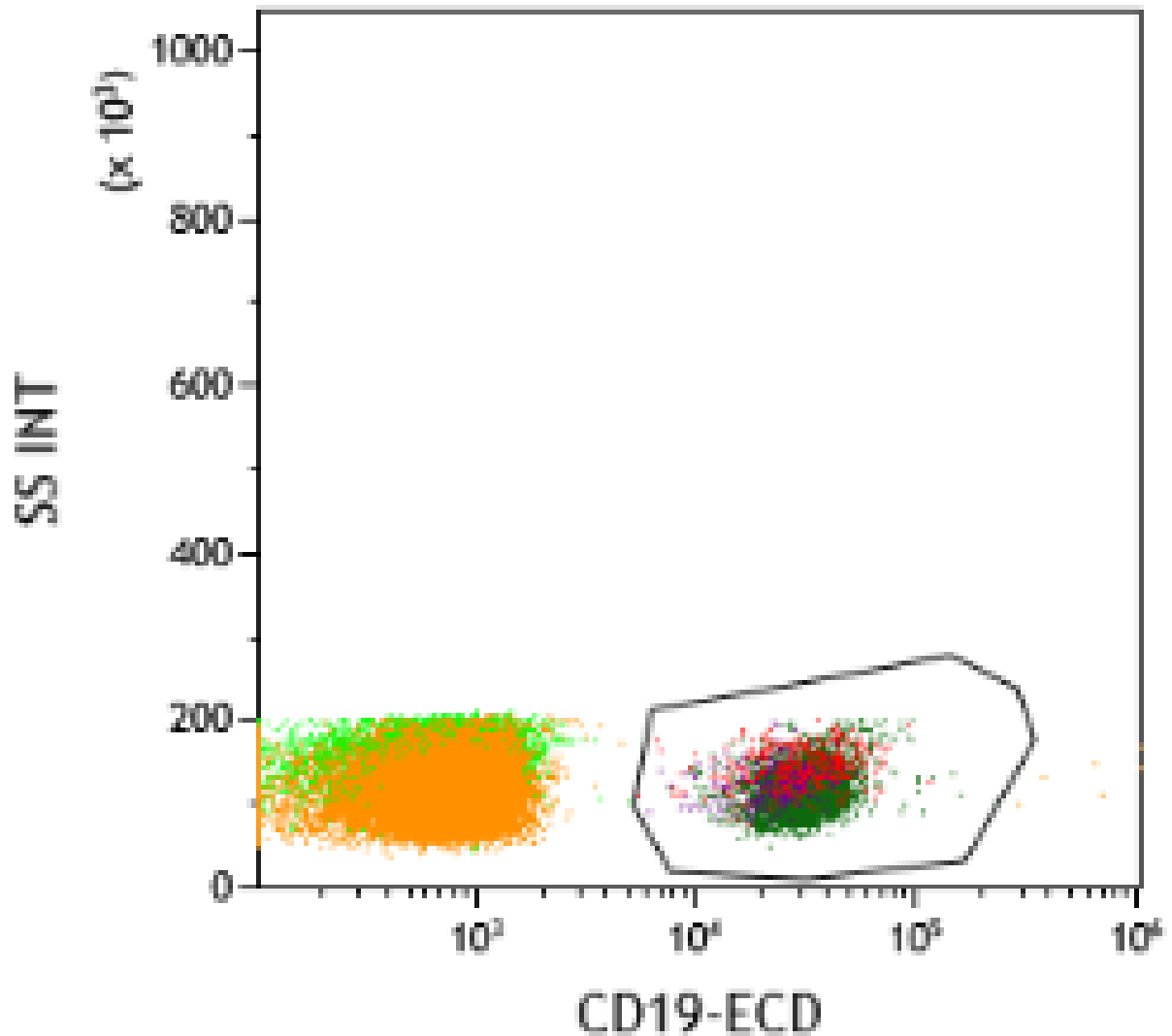
**Graf 7. Krabicový graf pro absolutní četnost B lymfocytů marginální zóny ( $10^9/L$ )**

Vlevo: pacienti s celiakií; vpravo: zdraví dárci krve



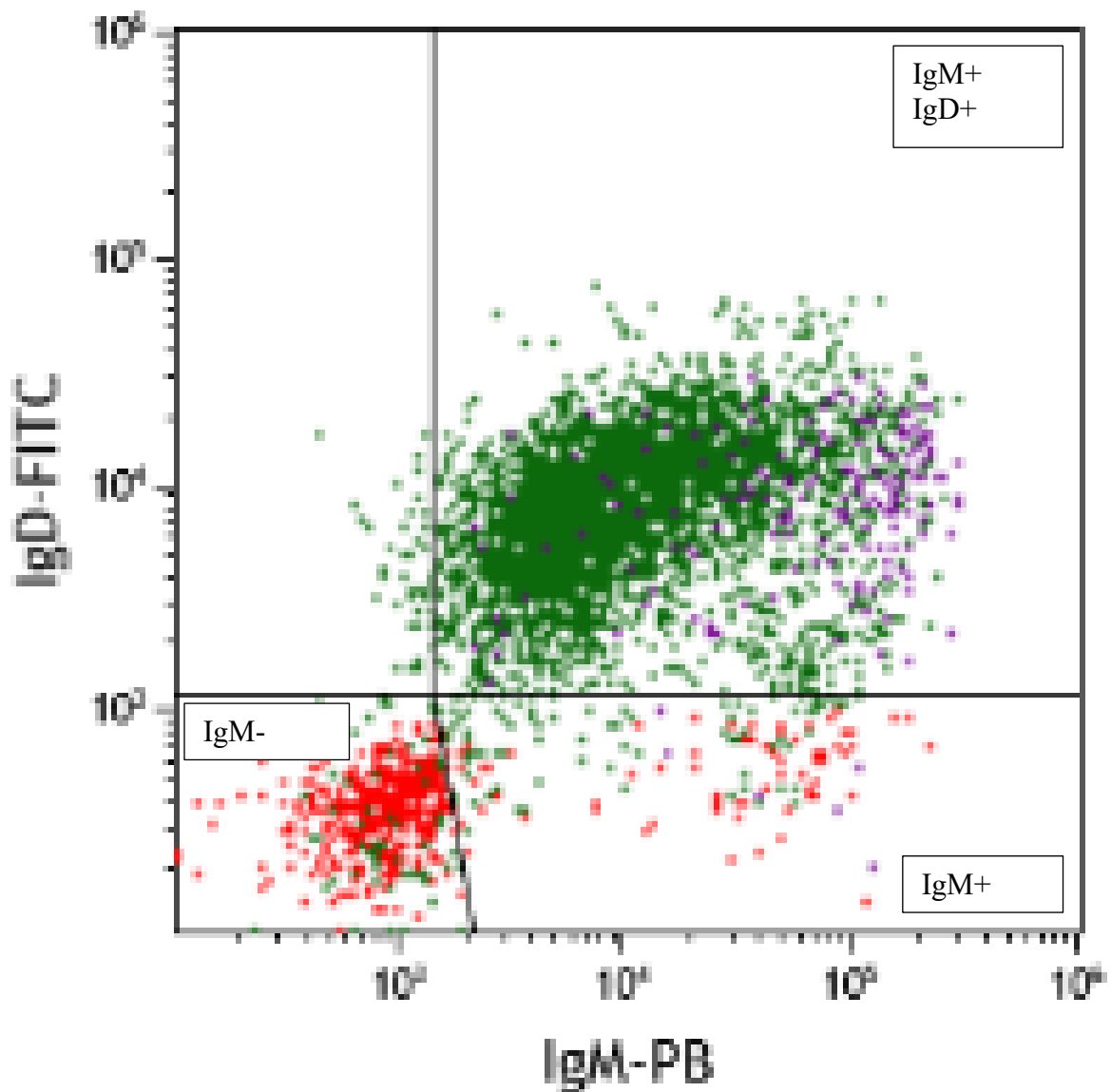
**Obrázek 1. Průtoková cytometrie**

Celková leukocytární populace (zobrazená jako tečky všech barev) získaná kombinací panleukocytárního znaku CD45 (monoklonální protilátka CD45-KO) vůči parametru Side Scatter (SS INT). Celková lymfocytární populace (zobrazená jako zelené a červené tečky a ohraničená černou linkou) odpovídá leukocytům s nejmenší velikostí podle SS



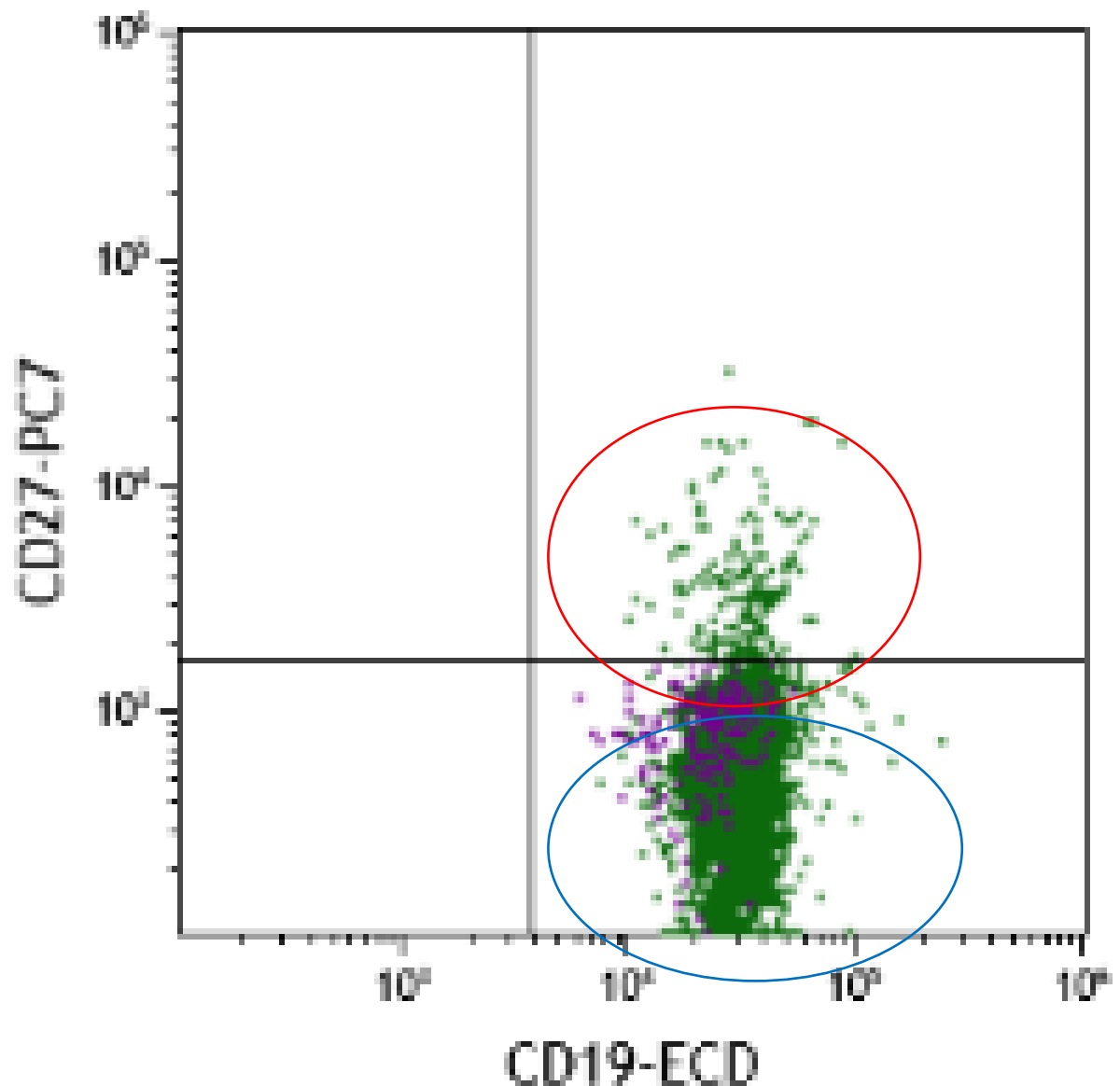
### Obrázek 2. Průtoková cytometrie

Celková B lymfocytární populace (zobrazená jako tmavě zelené a červené tečky a ohraničená černou linkou) získaná kombinací B lymfocytárního znaku CD19 (monoklonální protilátka CD19-ECD) vůči parametru Side Scatter (SS INT). Ostatní buňky lymfocytární řady (non-B buňky) jsou zobrazeny jako oranžové a světle zelené tečky



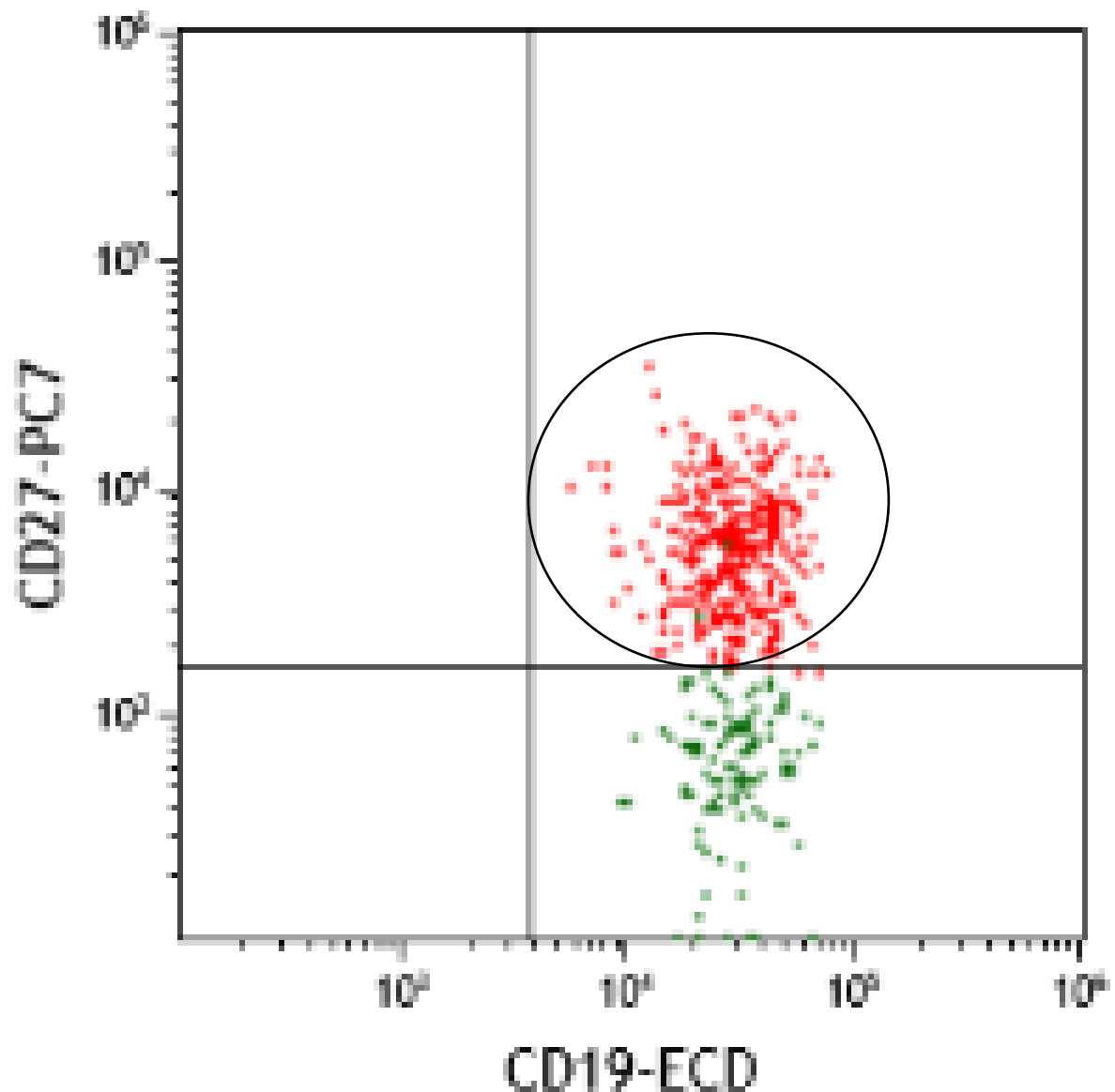
### Obrázek 3. Průtoková cytometrie

Jednotlivé subpopulace B lymfocytů získané kombinací znaků IgM (monoklonální protilátka IgM-PB) vůči IgD (monoklonální protilátka IgD-FITC). Buňky s imunofenotypem IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> (zobrazené jako tmavě zelené a fialové tečky) odpovídají souboru zatím nerozlišených B lymfocytů marginální zóny spolu s naivními B lymfocyty. Buňky s imunofenotypem IgM<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup> (zobrazené jako červené tečky) odpovídají souhrnu převážně izotypově přesmyknutých paměťových B lymfocytů s plazmablasty. Buňky s imunofenotypem IgM<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> (zobrazené jako řídce vykreslené tmavě zelené, fialové i červené tečky) odpovídají subpopulaci „IgM only“



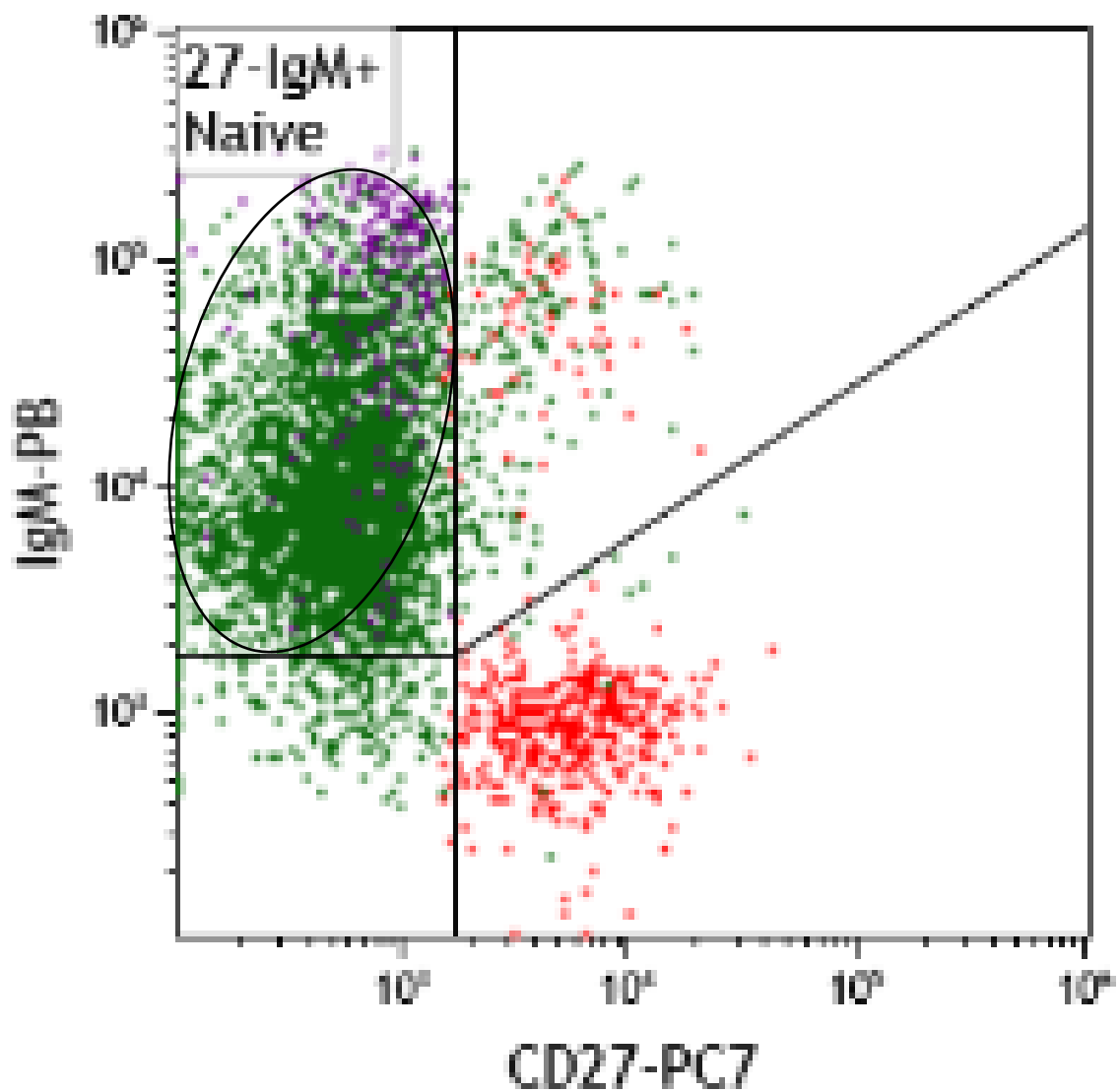
**Obrázek 4. Průtoková cytometrie**

B lymfocyty marginální zóny s imunofenotypem CD19+IgM+IgD+CD27+ získané kombinací znaků CD19 (monoklonální protilátka CD19-ECD) vůči CD27 (monoklonální protilátka CD27-PC7) ze souboru zatím nerozlišených IgM+IgD+ B lymfocytů (viz obrázek 3) jsou zobrazeny jako relativně řidce vykreslené tmavě zelené tečky (ohraničeno červenou linkou). Naivní B lymfocyty s imunofenotypem CD19+IgM+IgD+CD27- jsou zobrazeny jako hustě vykreslené tmavě zelené a fialové tečky (ohraničeno modrou linkou)



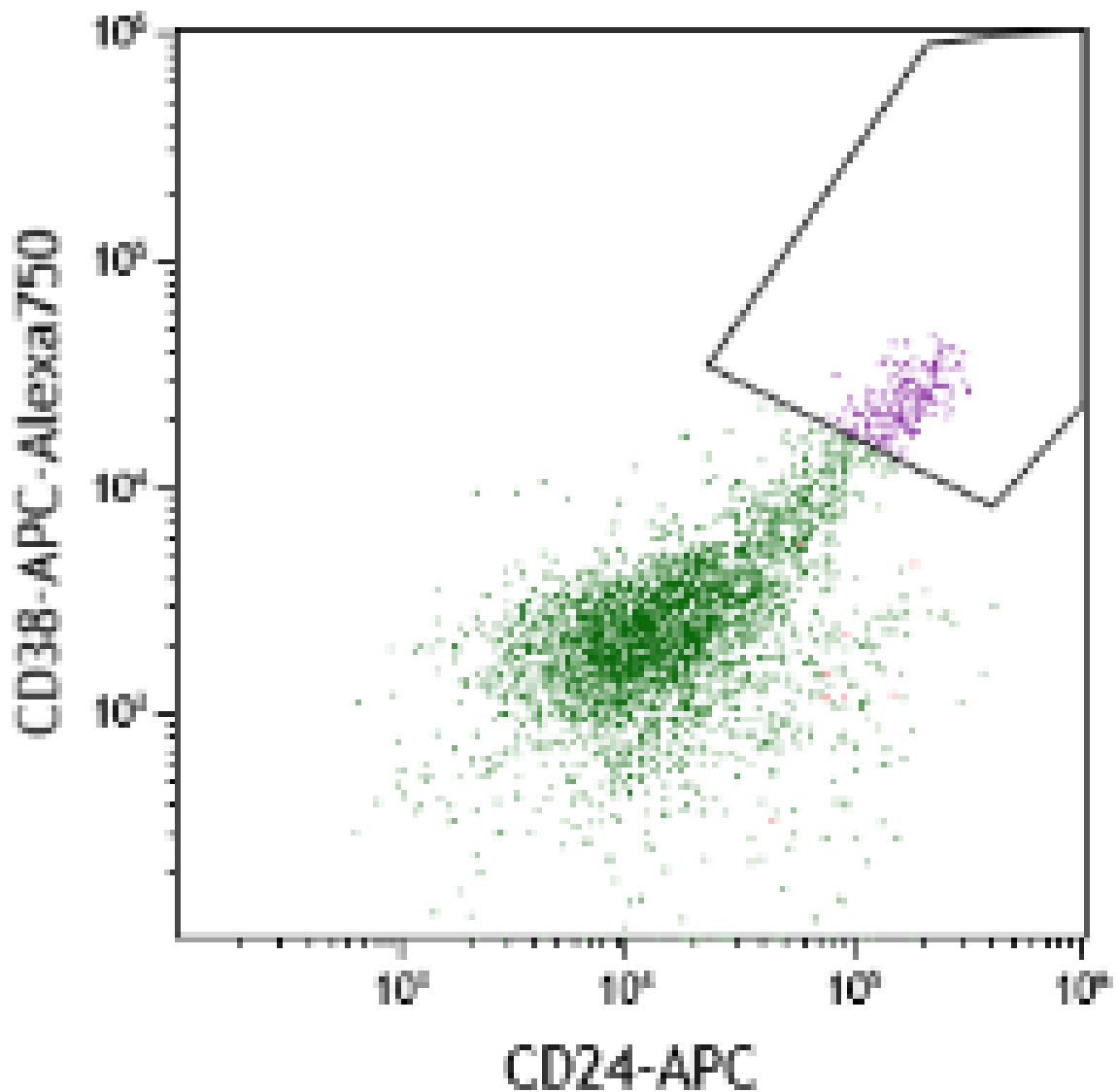
**Obrázek 5. Průtoková cytometrie**

Izotypově přesmyknuté paměťové B lymfocyty s imunofenotypem CD19+IgM-IgD-CD27+ získané kombinací znaků CD19 (monoklonální protilátka CD19-ECD) vůči CD27 (monoklonální protilátka CD27-PC7) ze souboru IgM-IgD- B lymfocytů (viz obrázek 3) jsou zobrazeny jako červené tečky (ohraňováno černou linkou)



**Obrázek 6. Průtoková cytometrie**

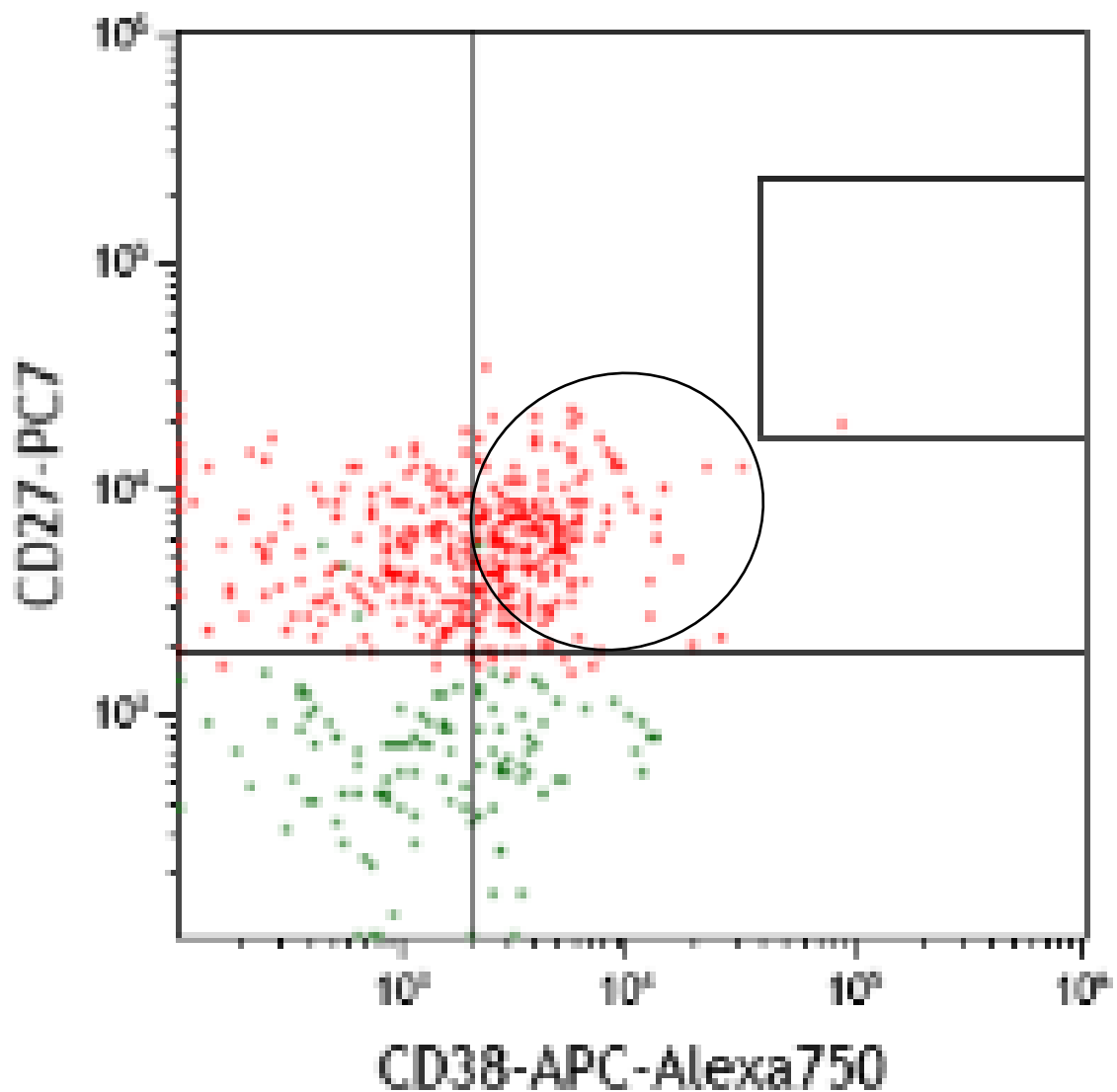
Jednotlivé subpopulace B lymfocytů získané kombinací znaků CD27 (monoklonální protilátka CD27-PC7) vůči IgM (monoklonální protilátka IgM-PB). Buňky s imunofenotypem CD27-IgM+ (zobrazené jako tmavě zelené a fialové tečky a ohraničeny černou linkou) odpovídají subpopulaci obsahující mimo jiné tranzitní B lymfocyty (viz obrázek 7)



**Obrázek 7. Průtoková cytometrie**

Tranzientní B lymfocyty s imunofenotypem CD19+IgM+CD27-CD24+CD38+ získané kombinací znaků CD24 (monoklonální protilátka CD24-APC) vůči CD38 (monoklonální protilátka CD38-APC-Alexa750) ze souboru CD27-IgM+ B lymfocytů (viz obrázek 6) jsou zobrazeny jako fialové tečky (ohraňeno černou linkou)





**Obrázek 8. Průtoková cytometrie**

Plazmablasty s imunofenotypem CD19+IgM-IgD-CD27+CD38+ získané kombinací znaků CD38 (monoklonální protilátka CD38-APC-Alexa750) vůči CD27 (monoklonální protilátka CD27-PC7) ze souboru IgM-IgD- B lymfocytů (viz obrázek 3) jsou zobrazeny jako červené tečky (ohraničeno černou linkou)

#### 4.4. Diskuse

Základním cílem této části práce bylo ověřit přítomnost hyposplenismu v populaci asymptomatických nemocných s nekomplikovanou celiakií léčených bezlepkovou dietou jako možného nepřímého markeru aktivity celiakie. Pro průkaz hyposplenismu byla zvolena metoda stanovení subpopulací B lymfocytů v periferní krvi pomocí průtokové cytometrie. Konkrétně byly stanovovány B lymfocyty marginální zóny, které byly v minulosti prokázány jako potenciální marker hyposplenismu u nemocných s komplikovanými formami celiakie (198, 199).

Klíčovými výsledky naší práce bylo zjištění, že pacienti s léčenou, nekomplikovanou celiakií, mají ve srovnání se skupinou zdravých kontrol také statisticky významně snížené hladiny B lymfocytů marginální zóny v periferní krvi. V ostatních parametrech bílého krevního obrazu (základních u subpopulačních) jsme statisticky významné rozdíly neprokázali. Nález je ve shodě s nálezy u komplikovaných a těžkých forem celiakie a podporuje hypotézu přetrvávání imunologických abnormalit i u nemocných v klinické remisi na bezlepkové dietě. Toto zjištění je dle našeho nejlepšího vědomí jedno z prvních v této populaci celiaků. V budoucnu bude potřeba ověřit hypotézu možného využití těchto nálezů jako neinvazivních metod stanovení aktivity celiakie korelací především s histologickými nálezy v oblasti tenkého střeva (se stanovováním subpopulací lymfocytů při perzistenci lymfocytární enteritidy a přítomností/absencí atrofie sliznice tenkého střeva). V tuto chvíli je absenci těchto korelací nutno přiznat jako jednu z limitací naší práce.

Metodicky jsme ke stanovování B lymfocytárních subpopulací v periferní krvi zvolili průtokovou cytometrii pomocí kombinace monoklonálních protilátek proti povrchovým znakům B lymfocytů. B lymfocyty marginální zóny v periferní krvi jsou imunofenotypově CD27+ IgM+ IgD +. Přesto, že dominantním znakem buněk této subpopulace je jejich povrchový imunoglobulin třídy IgM, který nese její funkční význam (vzhledem k tomu, že právě IgM bude v dalších fázích časné imunitní reakce hrát dominantní roli), je pro rozlišení této subpopulace od ostatních (zejména od izotypově přesmyknutých paměťových B lymfocytů) spolehlivější použití znaků CD27 a IgD. Při gatování pomocí CD27 a IgM může docházet k chybám při odečtu u jedinců, kteří vytvářejí B lymfocyty s imunofenotypem CD27+ IgM+ IgD-.

Na buňku s imunofenotypem CD27+ IgM+ IgD- můžeme pohlížet ze dvou perspektiv. Zaprvé, pokud buňku popisujeme jako prekurzor budoucího B lymfocytu marginální zóny, kdy pozitivní znak CD27 ukazuje obecně na paměťovou buňku, pozitivní znak IgM na vývojovou

větev v marginální zóně, avšak negativita znaku IgD ukazuje na jakousi „buněčnou nedozrálou“ (obecně tedy můžeme hovořit o nedozrálém B lymfocytu marginální zóny, kdy je „opoždění ve vývoji“). Zadruhé, pokud buňku pozorujeme jako součást vývoje směřujícího k izotypově přesmyknutému paměťovému B lymfocytu, ukazuje znak CD27 opět obecně na paměťovou buňku, negativita znaku IgD ukazuje na správně proběhlý izotypový přesmyk v této třídě, avšak trvajících pozitivita znaku IgM ukazuje na určité opoždění v izotypovém přesmyku (nebo eventuální vyhnutí se izotypovému přesmyku a ponechání si exprese IgM zapříčiněné antigenním tlakem) v této třídě (obecně bychom tedy mohli hovořit o nekompletně izotypově přesmyknutém paměťovém B lymfocytu). Při použití gatování CD27 a IgD mohou buňky s fenotypem CD27+ IgM+ IgD- nesprávně spadat do oblasti izotypově přesmyknutých paměťových buněk. Proto jsme v k ověření případné výše uvedené chyby doplnili gatování se znaky IgM a IgD, kdy zvýšené procento buněk IgM+ IgD- ukazuje na přítomnost klonu CD27+ IgM+ IgD- a tím i na uvedenou chybu (viz Obrázek 3) (108).

Stran detekce funkčního hyposplenismu je běžná klinická praxe dosud založena na sadě vyšetření, která hodnotí spíše filtrační schopnosti sleziny v oblasti červené pulpy. Zlatým standardem je pak stanovení tzv. tečkovaných erytrocytů v krevním nátěru pomocí fázové interferenční mikroskopie. Okrajovými metodami jsou radioizotopové vyšetření sleziny a detekce tzv. Howel-Jollyho tělísek v periferním krevním nátěru (164). Stanovení B lymfocytů marginální zóny v periferní krvi lze považovat v současné době jako jednu z přesnějších metod hodnotících funkční hyposplenismus z pohledu imunitního potenciálu (na rozdíl od vyšetření tečkovaných erytrocytů, které je i dnes zlatým standardem pro hodnocení hyposplenismu z pohledu filtrační funkce sleziny). Podle našich zkušeností není sonografické měření objemu sleziny v tomto ohledu vhodnou metodou hodnotící funkční hyposplenismus, především vzhledem k velkým interindividuálním rozdílům jak na straně pacientů, tak k nízké shodě mezi vyšetřujícími lékaři, a to i přesto, že se jedná o metodu dostupnou a relativně nenákladnou. Vzhledem k tomu jsme UZ zobrazení k morfologické korelaci našich nálezů ne zvolili (a dále pak hodnocení pomocí MRI či CT je spojeno s vysokými náklady a radiační zátěží nemocných).

Diagnostika a hodnocení funkčního hyposplenismu z pohledu imunitního potenciálu sleziny (který je „lokalizován“ do oblasti její bílé pulpy) pomocí metodiky, kterou jsme použili v naší práci, není v klinické praxi dosud zcela etablována. Vyšetření subpopulace B lymfocytů marginální zóny může detekovat hyposplenismus s potenciálně významnými klinickými konsekvencemi (poruchy primární imunitní odpovědi zejména proti opouzdřeným bakteriím).

Z literárních údajů jsou patrné práce, které ukazují význam hyposplenismu u pacientů s celiakií. Jednou z klíčových prací ve smyslu vysvětlení mechanismu vzniku funkčního hyposplenismu u pacientů s gastrointestinálními onemocněními, resp. celiakií, je práce autorů Mathur et al. z roku 2022 (164). Ludvigsson et al. (141) zaznamenal ve švédském národním zdravotním registru s více než 15 000 pacienty s celiakií významně vyšší riziko sepse (způsobené zejména *S. pneumoniae*) ve srovnání s referenční skupinou hospitalizovaných pacientů i s obecnou populací. Podobné výsledky ukazují i práce Thomase et al. (228), Röckert Tjernberga et al. (145) i Simonsova metaanalýza z roku 2018 (146). Z českých autorů se otázce deficientních B lymfocytárních populací věnoval Hrnčíř et al. (192), který ukázal trvalou depleci B lymfocytů marginální zóny u pacientů se systémovým lupus erythematoses. Dle literárních údajů však dosud nebyla publikována práce, která by přímo popisovala využití (ať již experimentální a/nebo klinické) imunologických biomarkerů slezinné funkce.

Naše výsledky, které ukazují na signifikantně snížené hodnoty paměťových B lymfocytů marginální zóny u pacientů s celiakií ve srovnání se skupinou zdravých kontrol, dokládají nutnost považovat pacienty s celiakií obecně jako populaci rizikovou z hlediska možných superinfecí (včetně obávaného a potenciálně fatálně probíhajícího tzv. OPSI syndromu) i přesto, že jsou na bezlepkové dietě v klinické remisi bez dalších komplikací. Dalším důležitým výstupem našich výsledků pro klinickou praxi je jednoznačná podpora stávajících doporučení týkajících se vakcinace pacientů s celiakií, resp. s funkčním hyposplenismem. Důležitým zjištěním je to, že signifikantně nižší hladiny byly prokázány u paměťových B lymfocytů marginální zóny (tj. lymfocytů, které neprošly izotypovým přesmykem) na rozdíl od paměťových B lymfocytů, které izotypovým přesmykem prošly.

Funkční osa střevo – slezina / slezina – střevo, která byla detailně popsána v kapitole 1.4.2.1, a její potenciální vychýlení ať směrem k alterované střevní a/nebo slezinné funkci dále ukazuje na důležitost hodnocení imunologického potenciálu slezinné tkáně. Zajímavým zjištěním je, že pokud do funkčního modelu „osa střevo – slezina / slezina – střevo“ dosadíme námi stanovované ukazatele potenciální aktivity celiakie (tedy z pohledu střevní tkáně aminokyseliny citrulin a ornitin a z pohledu slezinné tkáně B lymfocyty marginální zóny), získáme komplexní obraz funkční aktivity obou orgánů jako projevu aktivity celiakie. Výsledky obou částí naší práce, tedy stanovování koncentrací plazmatického citrulinu a ornitinu a hodnoty paměťových B lymfocytů marginální zóny jsou v souladu s našimi předchozími výsledky v našich pilotních pracích (137, 191) a podle našich nejlepších znalostí je naše práce (včetně uvedených pilotních studií) v literatuře první, která se cíleně věnuje ukazatelům aktivity

celiakie u pacientů s nekomplikovanou formou nemoci. Naše výsledky směřují k citlivějšímu, neinvazivnímu a stratifikovanějšímu hodnocení aktivity celiakie u pacientů v klinické remisi.

Naše práce má několik významných limitací, kterých si je autor vědom. Hlavní limitace (přesto, že práce byla vedena jako prospektivní) je absence korelace mezi našimi výsledky a jedním ze stěžejních ukazatelů aktivity nemoci, který je obecně používán – k endoskopickým a/nebo histologickým nálezem. Další limitací je absence prospektivního sledování změn hodnot paměťových B lymfocytů marginální zóny u pacientů s celiakií v čase. V neposlední řadě lze připustit limitaci práce v absenci průkazu Howell-Jollyho tělísek a tečkování erytrocytů jakožto ukazatelů filtrační schopnosti sleziny.

#### 4.5. Závěr

V kontextu známého a v klinické praxi používaného hodnocení aktivity celiakie z pohledu klinického, laboratorního (sérologického), endoskopického a histopatologického jsme se v naší práci zaměřili na hodnocení imunologické, které není dosud v běžné klinické praxi pevně zakotveno.

Stanovení přítomnosti hyposplenismu není (nejen u pacientů s celiakií) v současné době v klinické praxi rutinně etablováno. Již v minulosti bylo ale prokázáno, že riziko funkčního hyposplenismu u nemocných s celiakií je reálné a může mít závažné klinické konsekvence. Vzhledem k tomu a k výsledkům naší práce prokazujícím přítomnost funkčního hyposplenismu ve skupině nemocných s léčenou celiakií v klinické remisi se domníváme, že monitorace funkce sleziny by měla u nemocných s celiakií patřit k základním indikátorům aktivity onemocnění.

Možnosti, jak funkci sleziny hodnotit existují, mají ovšem své limitace. Zlatým standardem zůstává hodnocení filtrační (eliminační) funkce sleziny, jejímž morfoloogickým podkladem je červená pulpa. Pro tato vyšetření je k dispozici několik laboratorních vyšetření, zejména pak detekce tzv. tečkových erytrocytů v krevním nátěru. Mnohem menší pozornost je věnována měření imunologické funkce sleziny. Jedním z kandidátních postupů, jak tuto funkci stanovit, je vyšetření B lymfocytárních subpopulací v periferní krvi (a z pohledu funkčního hyposplenismu pak konkrétní subpopulace paměťových B lymfocytů marginální zóny, které jsou pilířem vrozené imunity a jsou první linií obrany proti opouzdřeným bakteriím). Naše práce prezentuje použitelnou metodiku v tomto hodnocení u nemocných s celiakií.

Celiakie je nejčastější gastrointestinální nemocí, která je s funkčním hyposplenismem asociována. Praktickými výstupy ze stanovení imunologické kapacity sleziny u pacientů s celiakií je včasná a cílená léčba bakteriálních infekcí a důsledné vedení prevence ve smyslu vakcinace. Výsledky naší práce naznačují, že právě hodnoty paměťových B lymfocytů marginální zóny by teoreticky mohly být velmi citlivým ukazatelem k posouzení imunologické kapacity sleziny u pacientů s celiakií obecně a tím i nepřímo ukazatelem aktivity celiakie.

K potvrzení našich výsledků bude třeba provést další studie, zejména se zaměřením na studování vývoje hodnot jednotlivých B lymfocytárních subpopulací v čase včetně stavů po provedených očkováních.

## 5. Nové markery adherence k bezlepkové dietě u nemocných s celiakií

### 5.1. Úvod

Dlouhodobá a striktní bezlepková dieta je aktuálně jedinou spolehlivou léčbou pro pacienty s celiakií. Porušování bezlepkové diety (úmyslné nebo neúmyslné) je však relativně časté. Právě rozlišení mezi možnými chybami v bezlepkové dietě a rozvojem takzvané refrakterní celiakie je poměrně zásadním krokem vzhledem k potenciálně závažným následkům a komplikacím těchto forem celiakie včetně vzniku obtížně léčitelných, maligních komplikací zahrnujících lymfom i adenokarcinom.

Inovativním a dosud v klinické praxi nezavedeným způsobem monitorace dodržování (adherence) bezlepkové diety je stanovení koncentrace gliadin 33-meru ve stolici.

Spouštěcím faktorem v imunopatogenezi celiakie je lepek (gluten) obsažený v pšenici i ostatních obilovinách (ječmeni, žitu, ovsu). Jednotlivými peptidy pšeničného lepku jsou albuminy, globuliny, gluteliny a prolaminy. Důležitými pšeničnými prolaminami jsou pak konkrétně gliadiny (méně důležitými skupinami z pohledu imunopatogeneze celiakie jsou prolaminy žita – secaliny, ječmene – hordeiny a ovsa – aveniny), které lze následně podle chemických vlastností rozdělit na alfa, beta, gama a delta podskupinu. Z hlediska imunopatogeneze celiakie je jedinečným peptidem alfa-2-gliadin 33-mer (dále gliadin 33-mer), který nepodléhá degradaci žaludečními šťávami, ani pankreatickými či střevními enzymy (229). Tento glutenový imunoreaktivní peptid (GIP) lze detekovat ve stolici a je tudíž přímým důkazem o přítomnosti lepku v dietě. Gliadin 33-mer je částečně absorbován střevní sliznicí do cirkulace a následně ledvinami vylučován do moče, kde ho lze též detekovat a monitorovat – tento postup však nebyl předmětem naší práce.

U zdravých osob nedodržujících bezlepkovou dietu je koncentrace gliadin 33-meru ve stolici v rozmezí 200-30 000 ng/g (0,2-30 µg/g). U osob dodržujících bezlepkovou dietu není gliadin 33-mer ve stolici detekovatelný. Při porušení bezlepkové diety je gliadin 33-mer detekovatelný ve stolici v následujících třech dnech (230).

Cílem projektu byla objektivizace anamnestických dat o striktním dodržování bezlepkové diety u nemocných sledovaných s celiakií a analýza příčin positivity gliadin 33-meru ve stolici.

## 5.2. Metodika

Studie „Nové markery adherence k bezlepkové dietě u nemocných s celiakií“ byla provedena jako prospektivní studie. Do studie byly zařazeni pacienti konsektivně vyšetřovaní v gastroenterologických poradnách 2. interní gastroenterologické kliniky FNHK s celiakií na bezlepkové dietě. Mezi zařazovací kritéria studie patřila předchozí diagnóza celiakie (stanovená kombinací pozitivní sérologie, která vždy zahrnovala protilátky proti tkáňové transglutamináze v třídě IgA a v některých případech i další) a kompatibilní histologický nálezn v bioptických vzorcích získaných z duodena v průběhu gastroskopického vyšetření před zahájením bezlepkové diety. Nemocní byli léčeni bezlepkovou dietou, celiakie byla v klinické remisi, bez projevů komplikací onemocnění. Všichni nemocní deklarovali poučení o bezlepkové dietě před jejím zahájením lékařem ev. sestrou, nevyžadovali žádné vysvětlení a dietě podle svého přesvědčení rozuměli. V den vyšetření vyplnili dotazník „Gluten-free diet compliance score“ autorů Biagi et al. z roku 2012 (231).

Vyřazovací kritéria zahrnovala věk <18 let, graviditu, jiné aktivní onemocnění gastrointestinálního traktu a pankreatobiliární soustavy, aktivní onkologické onemocnění, komplikace celiakie, jiné formy enteropatie včetně potenciálně enterotoxické medikace (NSAID).

Dodržování bezlepkové diety bylo objektivizováno stanovením gliadin 33-meru ve stolici. K detekci a stanovení koncentrace gliadin 33-meru ve stolici byla použita metoda imunoabsorbčního stanovení ve formátu sendvičové ELISA. Diagnostická senzitivita metody je 97,1 %, specifická 83,3 %, pozitivní prediktivní hodnota 91,9 % a negativní prediktivní hodnota 93,75 %. Pozitivní výsledek, a tudíž přímý průkaz lepku v potravě odpovídá dolnímu limitu detekce a je 0,3 ug GIP/g stolice (dynamické rozmezí je 0,3-1,25 ug GIP/g stolice), hodnoty 0,15-0,3 ug/g jsou hodnoceny jako slabě pozitivní, hodnoty menší nebo rovny 0,15 ug/g jsou interpretovány jako negativní.

K vyšetření byl použit vzorek stolice o objemu 1-2 gramy vložený do čistého a suchého kontejneru bez jakékoliv chemické přísady nebo konzervačních látek. Vzorek byl následně zamražen na teplotu -20 stupňů Celsia a uložen k dalšímu zpracování pomocí dodávaného kitu iVYLISA GIP Stool firmy BIOMEDIAL, S.L. (Camas-Sevilla, Spain, [www.biomedial.com](http://www.biomedial.com)). Po přípravě reagensů (promývací pufr v podobě 10násobného koncentrátu naředěného před použitím 1:10 destilovanou vodou a extrakční roztok připravený k použití po sloučení s 60 ml 100 % etanolu) a vzorků (homogenizáty stolice vzniklé mícháním lžičkou a laboratorní třepačkou po předchozím přidání extrakčního roztoku a následně inkubované při 50 stupních



Celsia po dobu 60 minut) byla suspenze následně odstředěna při 2 500 g po dobu 10 minut. Před započítím vlastního stanovení byla veškerá činidla a vzorky ponechána k dosažení pokojové teploty 20-28 stupňů Celsia a konjugovaná protilátka byla ponechána uložena při teplotě 4-8 stupňů Celsia až do použití. Následně pomocí mikrocentrifugačních zkumavek typu Eppendorf® bylo postupně připraveno příslušné ředění a objem vzorku (300 mikrolitrů) a bylo přidáno 100 mikrolitrů konjugátu protilátky za pokojové teploty po dobu 60 minut (232). Absorbance byla odečítána pomocí přístroje Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Microplate Photometer ([www.fishersci.at](http://www.fishersci.at)) při vlnové délce 450 nm.

Získané údaje byly porovnány s referenčními hodnotami udávanými výrobcem komerčního vyšetřovacího kitu uvedeno v textu výše. Skupina nemocných s pozitivitou gliadin 33-meru ve stolici byla dále analyzována. Pacienti byli konfrontováni s výsledkem a měli se pokusit najít vysvětlení přítomnosti lepku diety.

Všechny postupy byly v souladu s etickými normami institucionální výzkumné komise a s Helsinskou deklarací z roku 1964 a jejími pozdějšími dodatky (212). Všichni pacienti podepsali písemný souhlas. U všech získaných údajů byly vymazány všechny osobní identifikační údaje v souladu se zákony na ochranu důvěrnosti České republiky.

### 5.3. Výsledky

Do studie bylo zařazeno celkem 109 nemocných léčených pro celiakii indikovaných k trvalé a striktní bezlepkové dietě v klinické remisi onemocnění. Základní demografická data studijní skupiny byla následující: 29 mužů (27 %), průměrný věk  $55 \pm 16$  let (medián: 49 let, mezikvartilové rozpětí: 29 let) a 80 žen (73 %), průměrný věk  $47 \pm 14$  let (medián: 45 let, mezikvartilové rozpětí: 20 let).

Z hlediska subjektivně udávaného dodržování bezlepkové diety byla v den odběru vzorku na vyšetření přímým dotazem založeném na dotazníku „Gluten-free diet compliance score“ autorů Biagi et al. z roku 2012 (231) zjištěna následující fakta: úplnou adherenci k bezlepkové dietě udávalo 96 pacientů (88 %), částečnou adherenci s významnými pochybeními vyžadujícími nápravu udávalo 12 pacientů (11 %) a žádnou adherenci referoval pouze 1 pacient (1 %).

Při statistickém hodnocení jsme získaná data porovnali s referenčními hodnotami pro detekci gliadin 33-meru ve stolici (referenční hodnoty:  $\leq 0,15$   $\mu\text{g/g}$  = negativní,  $0,16 - 0,29$   $\mu\text{g/g}$  = slabě pozitivní,  $\geq 0,3$   $\mu\text{g/g}$  = pozitivní) a současně konfrontovali s udávanou deklarací stran dodržování bezlepkové diety.

Z pohledu referenčních hodnot gliadin 33-meru detekovaného ve stolici se v námi studovaném souboru podařilo prokázat celkově 78 negativních výsledků (72 %), 11 slabě pozitivních výsledků (10 %) a 20 pozitivních výsledků (18 %). Bez ohledu na pohlaví a věk jsme tím ve studijní skupině zjistili nedodržování (nonadherenci) bezlepkové diety námi definovanou jako pozitivní či slabě pozitivní výsledek u 31 pacientů (28 %).

Číselné hodnoty koncentrací u detekovaného gliadin 33-meru ve stolici byly následující: negativní výsledek byl v detekovatelném rozmezí zachycen 38krát s průměrnou hodnotou  $0,08 \pm 0,03 \mu\text{g/g}$  a mediánem  $0,08 \mu\text{g/g}$  a v ostatních negativních případech byl výsledek 40krát označen jako nedetekovatelný. U 11 slabě pozitivních nálezů byla průměrná hodnota  $0,21 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$  a medián  $0,24 \mu\text{g/g}$  a u 20 pozitivních nálezů byla průměrná hodnota  $0,67 \pm 0,38 \mu\text{g/g}$  a medián  $0,51 \mu\text{g/g}$ .

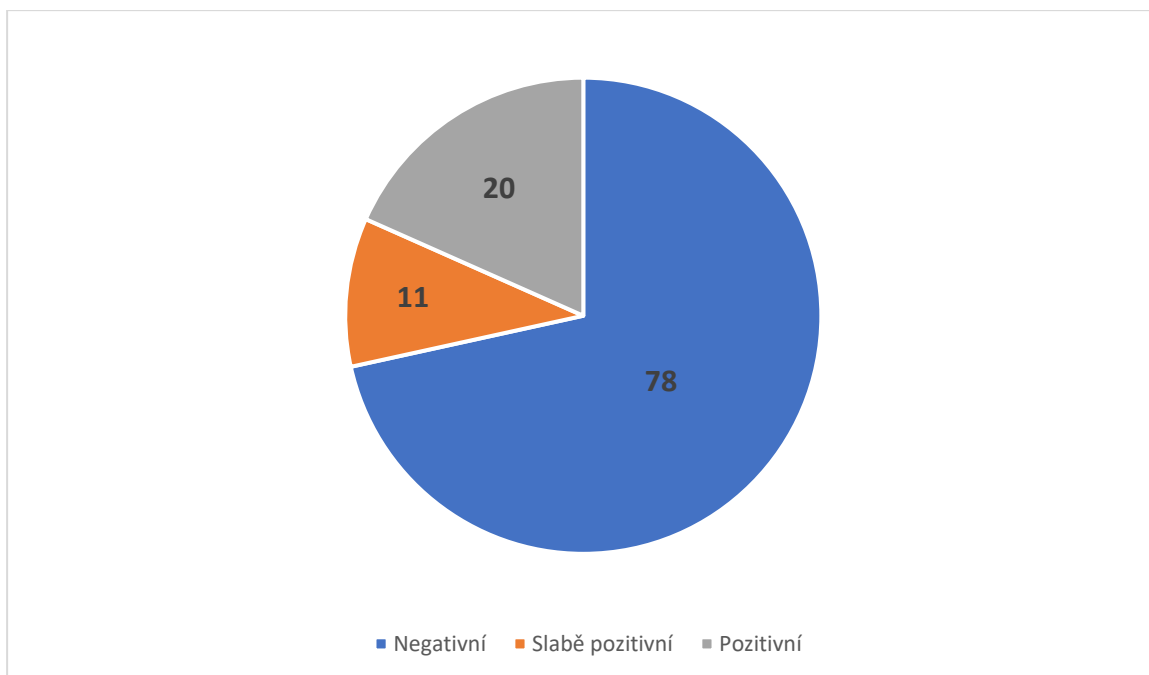
Po vyhodnocení odběru vzorku stolice byli pacienti seznámeni s jejich výsledky. Se znalostí výsledku koncentrace gliadin 33-meru ve stolici 8 % pacientů změnilo svou předchozí výpověď a připustilo občasné porušování bezlepkové diety (20 % celkem).

**Tabulka 1. Výsledky stanovení GIP ve stolici u pacientů s celiakií**

GIP – gliadinové imunogenní/imunoreaktivní peptidy, AP – aritmetický průměr,

SO – směrodatná odchylka,  $\mu\text{g}$  – mikrogram, g – gram, n – počet subjektů

<b>Ukazatel</b> (výsledek GIP)	<b>Počet</b> bez ohledu na detekovatelné rozmezí (n)	<b>Procentuální zastoupení</b> bez ohledu na detekovatelné rozmezí (%)	<b>Číselné hodnoty</b> v detekovatelném rozmezí (n = počet subjektů; AP $\pm$ SO; medián; jednotky: $\mu\text{g/g}$ stolice)
Negativní	78	72	n = 38; 0,08 $\pm$ 0,03; 0,08
Slabě pozitivní	11	10	n = 11; 0,21 $\pm$ 0,06; 0,24
Pozitivní	20	18	n = 20; 0,67 $\pm$ 0,38; 0,51



**Graf 1. Procentuální rozložení výsledků detekce gliadin 33-meru ve stolici u pacientů s celiakií**

**Tabulka 2. Změna v deklaraci adherence/nonadherence u pacientů s celiakií po jejich konfrontaci s výsledkem GIP**

Ukazatel	Adherence k BLD (%)	Nonadherence k BLD (%)
Deklarace před stanovením GIP	88	12
Deklarace po stanovení GIP	80	20

GIP – gliadinové imunogenní/imunoreaktivní peptidy, BLD – bezlepková dieta,  $\mu\text{g}$  – mikrogram, g – gramf

## 5.4. Diskuse

Cílem naší práce bylo ověřit využitelnost stanovení štěpného produktu lepku (gliadin 33-meru) ve stolici u pacientů s již dříve diagnostikovanou celiakií k objektivizaci adherence či nonadherence k bezlepkové dietě.

Klíčovým výsledkem naší práce je laboratorně (pomocí fekálního gliadin 33-meru) potvrzená adherence k bezlepkové dietě u více než 2/3 pacientů ve studijní kohortě. U 8 % pacientů došlo po konfrontaci s výsledkem fekálního gliadin 33-meru ke změně výpovědi stran dodržování bezlepkové diety (připustili nonadherenci).

Intepretaci výsledků považujeme i přes absenci kontrolní skupiny za klinicky významnou. Význam adherence k bezlepkové dietě u pacientů s celiakií je vysoký. Lepek je hlavním spouštěčem imunopatologické reakce v tenkostěvním sliznici a jeho přísun do střeva při nedodržování bezlepkové diety tuto reakci dále udržuje, a navíc v čase fixuje a akcentuje. Nejobávanější komplikací celiakie je vznik tenkostěvného zhoubného nádoru (zejména lymfomu, méně často adenokarcinomu), resp. premaligních stavů (refrakterní celiakie, ulcerózní jejunoileitida). Samotné laboratorní stanovení gliadin 33-meru ve stolici není průkazem tenkostěvného poškození, ale je přímým důkazem o přítomnosti lepku v lumen trávicí trubice. Oproti standardně používanému sérologickému vyšetření pro celiakii specifických protilátek (které odráží až druhotnou reakci imunitního systému na přítomnost lepku v lumen GIT a na aktivitu nemoci „hledí ze strany tenkostěvné tkáně“ a je ukazatelem dlouhodobým), je fekální gliadin 33-mer ukazatelem přímým a v tomto ohledu jediným (a na aktivitu nemoci „hledí ze strany pacienta“, resp. jeho rozhodnutí o adherenci k bezlepkové dietě a je ukazatelem krátkodobým). Význam stanovení fekálního gliadin 33-meru u pacientů s celiakií není pouze lékařský nebo laboratorní, ale i společenský, resp. motivační. Při pozitivním výsledku (který dokazuje nonadherenci k bezlepkové dietě) u pacienta deklarujícího striktní dodržování, se lékař dostává do potenciálně konfliktní situace, kdy je nucen pacientovi předložit důkaz o přítomnosti lepku v jeho trávicí trubici. Z praktického pohledu je tedy vhodné, resp. nutné, pacientovi přínos vyšetření fekálního gliadin 33-meru vysvětlit a komentovat ještě před vlastním odběrem vzorku, s cílem zbavit ho obavy ze ztráty důvěry lékaře při případném zjištění positivity a v dodržování bezlepkové diety ho náležitě a opakovaně motivovat.

Vysvětlení 8 % nemocných trvajících na adherenci ke striktní bezlepkové dietě a pozitivitou gliadin 33-meru ve stolici je dvojitý. Test nemá 100 % specificitu a je tedy možná falešná pozitivita, která by měla být korigována opakovaným testováním. U části nemocných

se může jednat skutečně o určitý strach přiznat lékaři vědomé porušování bezlepkové diety, další část ale může být způsobena nejasností při poučení o dietních opatřeních, ale také přítomností lepku v potravinách deklarovaných jako bezlepkové. Všechny tyto faktory je potřeba v případě rozporu bezí anamnézou a průkazem gliadin 33-meru ve stolici zvažovat a s nemocným v klidu a podrobně probrat.

Adherenci k bezlepkové dietě u pacientů s celiakií se zabývá recentní práce Biagiho et al. (231) a dále např. přehledová práce Wiesera et al. (233). Z českých autorů vyzdvihují význam adherence k bezlepkové dietě, resp. monitorování adherence pomocí fekálního gliadin 33-meru, autoři Kocna et al. (230), Vyhnánek et al. (234) a ve své disertační práci též Packová (235). Naše výsledky jsou obecně v souladu (zejména stran významu bezlepkové diety a jejího monitorování mimo jiné pomocí neinvazivních ukazatelů, kterým fekální gliadin 33-mer je) s výše uvedenými literárními rešeršemi. Naše práce též poukazuje na výhodu neinvazivního a rychlého stanovení (oproti sérologii a/nebo histologii) případného porušení bezlepkové diety.

Výsledky naší práce představují významný argument pro podporu zařazení vyšetřování fekálního gliadin 33-meru jakožto citlivého ukazatele adherence k bezlepkově dietě do běžného dispenzárního procesu pacientů s celiakií. Nejedná se však o náhradu stávajících ukazatelů (zejména sérologických), ale o jejich doplněk.

Naše práce má několik důležitých limitací. Hlavní limitací je absence kontrolní skupiny a následného sledování koncentrací fekálního gliadin 33-meru v čase a absence korelace s invazivními testy (zejména histologickými změnami sliznice tenkého střeva).

## **5.5. Závěr**

Inovativním a poměrně spolehlivým ukazatelem dodržování bezlepkové diety je stanovení koncentrace gliadin 33-meru ve stolici. Jedná se o přímý průkaz přítomnosti lepku v lumen trávicí trubice. Tento citlivý ukazatel tak doplňuje již zavedené dotazníkové a dále většinou invazivní metody k monitoraci adherence k bezlepkové dietě (sérologie, histologie) a v běžné klinické praxi by měl podle našeho názoru zaujmout své místo.

K potvrzení našich výsledků bude třeba provést další studie, zejména se zaměřením na dlouhodobé sledování dynamiky koncentrací fekálního gliadin 33-meru a přesnější stanovení senzitivity a specifity testu při testování s různým množstvím konzumovaného lepku a u zdravých dobrovolníků

## 6. Závěry

- 6.1. Ověřili jsme možnost využití stanovení plazmatických koncentrací aminokyselin ornitinu a citrulinu jako neinvazivních ukazatelů aktivity celiakie. Naším hlavním zjištěním, dosud v literatuře nepopsaným, jsou statisticky významně nižší plazmatické koncentrace ornitinu u pacientů s nekomplikovanou formou celiakie léčených bezlepkovou dietou ve srovnání se zdravými kontrolami. Neesenciální nebiogenní aminokyselina ornitin se tedy zdá být nadějným ukazatelem zejména v této skupině nemocných. Plazmatické koncentrace ornitinu by mohly být citlivějším markerem pro posouzení aktivity onemocnění a tenkostřevního poškození, které nedosahuje těžké vilózní atrofie a/nebo tenkostřevního selhání (v těchto případech dominuje dle literatury citrulin). Citrulin byl v našem souboru pravděpodobně vzhledem k remisi onemocnění ve srovnání s kontrolním souborem v normálních mezích. Naše zjištění by mohlo teoreticky umožnit lepší selekci pacientů, u kterých (s ohledem na trvající určitou míru aktivity nemoci) přetrvává též riziko závažných komplikací celiakie.
- 6.2. Vyšetřili a stanovili jsme koncentrace B lymfocytárních subpopulací v periferní krvi u pacientů s mírnou (nekomplikovanou) formou celiakie na bezlepkové dietě a prokázali jsme selektivní deficit paměťových B lymfocytů marginální zóny jako obraz funkčního hyposplenismu v této populaci. Vedle v klinické praxi relativně běžně používaného klinického, laboratorního a endoskopicko-histologického hodnocení aktivity celiakie jsme prezentovali možnost hodnocení založeného na vyšetření funkční (imunologické) kapacity sleziny. Hodnocení a sledování funkce sleziny by mělo patřit vzhledem k možným závažným (zejména infekčním) konsekvencím i u těchto pacientů k základním vyšetřením v rámci jejich dispenzarizace.
- 6.3. Stanovili jsme koncentrace gliadin 33-meru ve stolici u pacientů s celiakií a ověřili tak jejich adherenci k bezlepkové dietě. Konfrontací výsledků s anamnézou nemocných jsme prokázali, že gliadin 33-mer ve stolici je poměrně spolehlivým ukazatelem neadherence k bezlepkové dietě a současně, že ho lze využít jako nepřímý marker hodnocení aktivity nemoci ve smyslu udržování zánětlivého stavu v tenkém střevě při trvajícím přísunu lepku.

## 7. Seznam citací použité literatury

1. Greco L. From the neolithic revolution to gluten intolerance: benefits and problems associated with the cultivation of wheat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997;24(5):S14-6; discussion S6-7.
2. Tekiner H. Aretaeus of Cappadocia and his treatises on diseases. *Turk Neurosurg.* 2015;25(3):508-12.
3. García Nieto V. A History of Celiac Disease In: Rodrigo L, Peña AS, eds *Celiac Disease and Non-Celiac Gluten Sensitivity* Barcelona: OmniaScience, 2014 45-59.
4. Cluysenaer OJJ vTJ. *Malabsorption in Coeliac Sprue.* Dordrecht: Springer Science & Business Media, 2012.
5. Gee S. On the coeliac affection. *St Bartholomew's Hospital Reports* 1888;24:17-20.
6. Herter C. On infantilism from chronic intestinal infection, characterized by the over growth and persistence of flora of the nursing period. A study of the clinical course, bacteriology, chemistry and therapeutics of arrested development in infancy. New York: The Macmillan Company, 1908 45-59.
7. Haas SV. Value of banane treatment in celiac disease. . *Am J Dis Child* 1924;28:421-37
8. Dicke WK. Eenvoudig dieet bij het syndroom van Gee-Herter. *Ned Tijdschr Geneeskd* 1941;85:1715-21.
9. Van De Kamer JH, Weijers HA, Dicke WK. Coeliac disease. IV. An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with coeliac disease. *Acta Paediatr.* 1953;42(3):223-31.
10. Kotalová R, Nevoral J, Valtrová V, et al. Prevalence celiakie mezi rodiči a sourozenci dětí s celiakií. *Čes-Slov Pediatr* 2002; 57: 415–418.
11. Crosby WH, Kugler HW. Intraluminal biopsy of the small intestine; the intestinal biopsy capsule. *Am J Dig Dis.* 1957;2(5):236-41.
12. Tada M, Akasaka Y, Misaki F, Kwaie K. Clinical evaluation of a sonde-type small intestinal fiberscope. *Endoscopy.* 1977;9(1):33-8.
13. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology.* 1992;102(1):330-54.
14. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999;11(10):1185-94.
15. Corazza GR, Villanacci V. Coeliac disease. *J Clin Pathol.* 2005;58(6):573-4.
16. Tacheci I, Bureš J, al. e. *Kapslová endoskopie.* Hradec Králové: Nucleus HK 2008.
17. Bureš J. *Celiakie a další s glutenem asociované choroby.* 2017.
18. Al-Toma A, Volta U, Auricchio R, Castillejo G, Sanders DS, Cellier C, et al. European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. *United European Gastroenterol J.* 2019;7(5):583-613.
19. Leibold B, Green PHR. New Developments in Celiac Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2019;48(1):xv-xvi.
20. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PHR, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut.* 2013;62(1):43-52.
21. Bai J, Ciacci C, Corazza G, Fried M, Olano C, Rostami-Nejad M, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Celiac disease. . Milwaukee: World Gastroenterology Organisation, 2016 <http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/celiac-disease/celiac-disease-english> (accessed 2017-08-08). 2016.



22. Šetinová I. Obilné mouky (p 291-302). In: Fuchs M et al. Potravinová alergie a intolerance. Praha: Mladá fronta, 2016.
23. Shewry PR, Hey SJ. Do we need to worry about eating wheat? *Nutr Bull* 2016; 41: 6-13.
24. Shewry PR, Tatham AS. Improving wheat to remove coeliac epitopes but retain functionality. *J Cereal Sci* 2016; 67: 12-21.
25. Krejsek J, Andrýs C, Krčmová I. *Imunologie člověka*. 1. vydání ed. Hradec Králové: Garamon s.r.o.; 2016.
26. Balko J, Tonar Z, Varga I. *Memorix histologie*. 3. vydání ed. Praha: Triton; 2021.
27. Escudero-Hernández C, Peña AS, Bernardo D. Immunogenetic Pathogenesis of Celiac Disease and Non-celiac Gluten Sensitivity. *Curr Gastroenterol Rep* 2016;18: 36.
28. Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *Faseb j*. 1991;5(15):3071-7.
29. Kuřátková K., 2017: *Imunopatogeneze celiakální sprue a její genetické aspekty*. (Immunopathogenesis of celiac disease and its genetic aspects. Bc. Thesis, in Czech.) - 52 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
30. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine*. 1997;3(7):797-801.
31. Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med*. 2019;17(1):142.
32. Book L, Zone JJ, Neuhausen SL. Prevalence of celiac disease among relatives of sib pairs with celiac disease in U.S. families. *Am J Gastroenterol*. 2003;98(2):377-381. doi:10.1111/j.1572-0241.2003.07238.x.
33. Nisticò L, Fagnani C, Coto I, et al. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut*. 2006;55(6):803-808. doi:10.1136/gut.2005.083964.
34. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, et al. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med*. 2003;163(3):286-292.
35. Romanos J, van Diemen CC, Nolte IM et al. Analysis of HLA and non-HLA alleles can identify individuals at high risk for celiac disease. *Gastroenterology* 2009; 137: 834–840. doi: 10.1053/j.gastro.2009.05.040.
36. Falt P, Šmajstrla V. Celiakie – současný pohled na etiopatogenezi, dia gnostiku a terapii. *Kardiol Rev Int Med*. 2014;16(3):219–23.
37. Castellanos-Rubio A, Fernandez-Jimenez N, Kratchmarov R, Luo X, Bhagat G, Green PHR, et al. A long noncoding RNA associated with susceptibility to celiac disease. *Science*. 2016;352(6281):91-5.
38. *Věstník Ministerstva zdravotnictví ČR*; 28.2.2011; částka 3. Cílený screening celiakie (metodický pokyn). Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2011.
39. Frič P. Celiakální sprue (p 219-238). In: Bureš J a kol. *Gastroenterologie 2006*. *Collectio novissima*. Praha: Triton, 2006.
40. Zuccotti G, Fabiano V, Dilillo D, et al. Intakes of nutrients in Italian children with celiac disease and the role of commercially available gluten-free products. *J Hum Nutr Diet*. 2013;26(5):436-444. doi:10.1111/jhn.12026.
41. Rashtak S, Ettore MW, Homburger HA et al. Combination testing for antibodies in the diagnosis of coeliac disease: comparison of multiplex immunoassay and ELISA methods. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;28(6):805-813.
42. Malamut G, Verkarre V, Suarez F, et al. The Enteropathy Associated With Common Variable Immunodeficiency: The Delineated Frontiers With Celiac Disease. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(10):2262-2275. doi:10.1038/ajg.2010.214.

43. Bureš J. Endoscopic features of coeliac disease. *Folia Gastroenterol Hepatol.* 2005.
44. Keuchel M. *Atlas of Video Capsule Endoscopy.* Springer, 2006. ISBN 9783540231288.
45. Bureš J, Rejchrt S et al. *Small Bowel Investigation & Atlas of Enteroscopy.* Praha: Grada Publishing, 2000: 480.
46. Kurien M, Evans KE, Hopper AD, et al. Duodenal bulb biopsies for diagnosing adult celiac disease: is there an optimal biopsy site? *Gastrointest Endosc.* 2012;75(6):1190-1196. doi:10.1016/j.gie.2012.02.025.
47. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology.* 1992;102(1):330-354.
48. Corazza GR, Villanacci V (2005) Coeliac disease. *J Clin Pathol* 58:573-574
49. Aziz I, Evans KE, Hopper AD, et al. A prospective study into the aetiology of lymphocytic duodenitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;32(11-12):1392-1397. doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04477.x.
50. Green PH, Rostami K, Marsh MN. Diagnosis of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005;19(3):389-400. doi:10.1016/j.bpg.2005.02.006.
51. Rostami K, Aldulaimi D, Holmes G, Johnson MW, Robert M, Srivastava A, et al. Microscopic enteritis: Bucharest consensus. *World J Gastroenterol.* 2015;21(9):2593-604.
52. Abrams JA, Diamond B, Rotterdam H et al. Seronegative celiac disease: increased prevalence with lesser degrees of villous atrophy. *Dig Dis Sci.* 2004;49(4):546-550.
53. Lanzini A, Lanzarotto F, Villanacci V, et al. Complete recovery of intestinal mucosa occurs very rarely in adult coeliac patients despite adherence to gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;29(12):1299-1308. doi:10.1111/j.1365-2036.2009.03992.x.
54. Dastyč M, Hyšpler R, Dastyč M, Novotná H, Číhalová J. LAMA-test střevní propustnosti; srovnání GC a enzymatické metody. *Klin Biochem Metab,* 15 (36), 2007, No 1, p 35–38.
55. Heyman M, Abed J, Lebreton C, Cerf-Bensussan N. Intestinal permeability in coeliac disease: insight into mechanisms and relevance to pathogenesis. *Gut.* 2012;61(9):1355-1364. doi:10.1136/gutjnl-2011-300327.
56. Anderson RP. Review article: Diagnosis of coeliac disease: a perspective on current and future approaches. *Aliment Pharmacol Ther.* 2022;56 Suppl 1:S18-s37.
57. Mooney PD, Kurien M, Evans KE, et al. Clinical and Immunologic Features of Ultra-Short Celiac Disease. *Gastroenterology.* 2016;150(5):1125-1134. doi:10.1053/j.gastro.2016.01.029.
58. Volta U, Caio G, Boschetti E et al. Seronegative celiac disease: Shedding light on an obscure clinical entity. *Dig Liver Dis* 2016; 48: 1018-1022.
59. Catassi C, Fasano A. Celiac disease diagnosis: simple rules are better than complicated algorithms. *Am J Med.* 2010;123:691–3.
60. Lata J, Bureš J, Vaňásek T. *Gastroenterologie.* 1. vyd. ed. Praha: Galén; 2010.
61. Pinto-Sanchez MI, Silvester JA, Lebwohl B, Leffler DA, Anderson RP, Therrien A, et al. Society for the Study of Celiac Disease position statement on gaps and opportunities in coeliac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18(12):875-84.
62. Madden AM, Riordan AM, Knowles L. Outcomes in coeliac disease: a qualitative exploration of patients' views on what they want to achieve when seeing a dietitian. *J Hum Nutr Diet.* 2016;29(5):607-616. doi:10.1111/jhn.12378.
63. Hisehuber C, Crevel R, Jarry B, et al. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23(5):559-575. doi:10.1111/j.1365-2036.2006.02768.x.
64. Commission Implementing Regulation (EU) No 828/2014 of 30 July 2014 on the requirements for the provision of information to consumers on the absence or reduced presence

of gluten in food Text with EEA relevance. [https://eur-lex.europa.eu/eli/reg\\_impl/2014/828](https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2014/828) (accessed Feb 10, 2023).

65. Khashan AS, Henriksen TB, Mortensen PB, et al. The impact of maternal celiac disease on birthweight and preterm birth: a Danish population-based cohort study. *Hum Reprod.* 2010;25(2):528-534. doi:10.1093/humrep/dep409.
66. Hofmannová I. Celiakie v ordinaci praktického lékaře: diagnostika, léčba a komplikace. *Med praxi* 2022;19(2):92-97. 2022.
67. Theethira TG, Dennis M, Leffler DA. Nutritional consequences of celiac disease and the gluten-free diet. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;8(2):123-129. doi:10.1586/17474124.2014.876360.
68. Hallert C, Svensson M, Tholstrup J et al. Clinical trial: B vitamins improve health in patients with coeliac disease living on a gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;29(8):811-816. doi:10.1111/j.1365-2036.2009.03945.x.
69. García-Manzanares Á, Tenias JM, Lucendo AJ. Bone mineral density directly correlates with duodenal Marsh stage in newly diagnosed adult celiac patients. *Scand J Gastroenterol.* 2012;47(8-9):927-936. doi:10.3109/00365521.2012.688217.
70. Singhal N, Alam S, Sherwani R et al. Serum zinc levels in celiac disease. *Indian Pediatr.* 2008;45(4):319-321.
71. Wild D, Robins GG, Burley VJ et al. Evidence of high sugar intake, and low fibre and mineral intake, in the gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;32(4):573-581. doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04386.x.
72. Al-Toma A, Verbeek WHM, Mulder CJJ. The Management of Complicated Celiac Disease. *Digestive Diseases.* 2007;25(3):230-6.
73. Mooney PD, Evans KE, Singh S et al. Treatment failure in coeliac disease: a practical guide to investigation and treatment of non-responsive and refractory coeliac disease. *J Gastrointest Liver Dis.* 2012;21:197–203.
74. Moreno ML, Rodriguez-Herrera A, Sousa C, Comino I. Biomarkers to Monitor Gluten-Free Diet Compliance in Celiac Patients. *Nutrients.* 2017;9(1).
75. Comino I, Real A, Vivas S, Siglez MA, Caminero A, Nistal E, et al. Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(3):670-7.
76. Volta U CGaDGR. Mistakes in refractory coeliac disease and how to avoid them. . *UEG Education.* 2019;19:15–8.
77. Jamma S, Rubio-Tapia A, Kelly CP, et al. Celiac crisis is a rare but serious complication of celiac disease in adults. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010;8(7):587-590. doi:10.1016/j.cgh.2010.04.009.
78. de Almeida Menezes M, Cabral V, Silva Lorena SL. Celiac crisis in adults: a case report and review of the literature focusing in the prevention of refeeding syndrome. *Rev Esp Enferm Dig.* 2017;109(1):67-68. doi:10.17235/reed.2016.4073/2015.
79. Vospělová, J. Celiakální krize u batolete. *Pediatr. pro Praxi* 2008, 9(4), 253–256.
80. Kaukinen K, Peraaho M, Lindfors K, et al. Persistent small bowel mucosal villous atrophy without symptoms in coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;25(10):1237-1245. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03311.x.
81. Dickey W, Hughes DF, McMillan SA. Disappearance of endomysial antibodies in treated celiac disease does not indicate histological recovery. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(3):712-714. doi:10.1111/j.1572-0241.2000.01838.x.
82. Husby S, Murray JA, Katzka DA. AGA Clinical Practice Update on Diagnosis and Monitoring of Celiac Disease-Changing Utility of Serology and Histologic Measures: Expert Review. *Gastroenterology.* 2019;156(4):885-9.

83. Hindryckx P, Levesque BG, Holvoet T, Durand S, Tang CM, Parker C, et al. Disease activity indices in coeliac disease: systematic review and recommendations for clinical trials. *Gut*. 2018;67(1):61-9.
84. Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM, et al. Endoscopic and histological findings in the duodenum of adults with celiac disease before and after changing to a gluten-free diet: A 2-year prospective study. *Endoscopy* 2006;38:702-7.
85. Villanacci V, Ciacci C, Salviato T, Leoncini G, Bonetti LR, Ragazzini T, et al. Histopathology of Celiac Disease. Position Statements of the Italian Group of Gastrointestinal Pathologists (GIPAD-SIAPEC). *Transl Med UniSa*. 2020;23:28-36.
86. See JA, Kaukinen K, Makharia GK, et al. Practical insights into gluten-free diets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;12:580-91.
87. Freeman HJ. Pearls and pitfalls in the diagnosis of adult celiac disease. *Can J Gastroenterol* 2008;22:273-80.
88. United States of America Food and Drug Administration. [http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/reviews/K032571.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K032571.pdf) (accessed 16 Jun 2016).
89. Leffler DA, Schuppan D. Update on Serologic Testing in Celiac Disease. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(12):2520-2524. doi:10.1038/ajg.2010.276.
90. Malamut G, Cording S, Cerf-Bensussan N. Recent advances in celiac disease and refractory celiac disease. *F1000Res*. 2019;8.
91. Leffler D, Schuppan D, Pallav K, et al. Kinetics of the histological, serological and symptomatic responses to gluten challenge in adults with coeliac disease. *Gut* 2013;62:996-1004.
92. Biagi F, Bianchi PI, Marchese A, et al. A score that verifies adherence to a gluten-free diet: a cross-sectional, multicentre validation in real clinical life. *Br J Nutr*. 2012;108(10):1884-1888. doi:10.1017/S0007114511007367.
93. Nachman F, Sugai E, Vázquez H, et al. Serological tests for celiac disease as indicators of long-term compliance with the gluten-free diet. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011;23(6):473-480. doi:10.1097/MEG.0b013e328346e0f1.
94. Cebolla Á, Moreno M de L, Coto L, Sousa C. Gluten Immunogenic Peptides as Standard for the Evaluation of Potential Harmful Prolamin Content in Food and Human Specimen. *Nutrients*. 2018;10(12):1927. doi:10.3390/nu10121927.
95. Koga, Y. Study report on the constituents of squeezed watermelon. *Tokyo Kagaku Kaishi J. Tokyo Chem. Soc.* 1914, 35, 519-528.
96. Maric S, Restin T, Muff JL, Camargo SM, Guglielmetti LC, Holland-Cunz SG, et al. Citrulline, Biomarker of Enterocyte Functional Mass and Dietary Supplement. *Metabolism, Transport, and Current Evidence for Clinical Use*. *Nutrients*. 2021;13(8).
97. Zádák Z, Hyšpler R, Tichá A. Pharmaconutrition in intensive and perioperative care. *Časopis lékařů českých*. 2015;154(5):212-5.
98. Bahri S, Zerrouk N, Aussel C, Moinard C, Crenn P, Curis E, et al. Citrulline: from metabolism to therapeutic use. *Nutrition*. 2013;29(3):479-84.
99. Windmueller HG, Spaeth AE. Source and fate of circulating citrulline. *Am J Physiol*. 1981;241(6):E473-80.
100. Crenn P, Vahedi K, Lavergne-Slove A, Cynober L, Matuchansky C, Messing B. Plasma citrulline: A marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1210-9.
101. Crenn P, Coudray-Lucas C, Thuillier F, Cynober L, Messing B. Postabsorptive plasma citrulline concentration is a marker of absorptive enterocyte mass and intestinal failure in humans. *Gastroenterology*. 2000;119(6):1496-505.
102. Crenn P. [Intestinal failure]. *Rev Prat*. 2001;51(9):977-82.

103. Curis E, Nicolis I, Moinard C, Osowska S, Zerrouk N, Bénazeth S, et al. Almost all about citrulline in mammals. *Amino Acids*. 2005;29(3):177-205.
104. Curis E, Crenn P, Cynober L. Citrulline and the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(5):620-6.
105. Sivashanmugam M, J J, V U, K NS. Ornithine and its role in metabolic diseases: An appraisal. *Biomed Pharmacother*. 2017;86:185-94.
106. Krebs HA. The discovery of the ornithine cycle of urea synthesis. *Biochemical Education*. 1973;1(2):19-23.
107. Murray, Robert K. Harperova biochemie. 2. vydání. Jinočany : H&H, 2002. 0 s. s. 312-315. ISBN 80-7319-013-3.
108. Baur H, Stalon V, Falmagne P et al. (1987) Primary and quaternary structure of the catabolic ornithine carbamoyltransferase from *Pseudomonas aeruginosa*. Extensive sequence homology with the anabolic ornithine carbamoyltransferases of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 166: 111–117.
109. Takiguchi M, Matsubasa T, Amaya Y et al. (1989) Evolutionary aspects of urea cycle enzyme genes. *Bioessays* 10: 163–166 Tesmer JJ, Klem TJ, Deras ML, Davisson VJ, Smith JL (1996) The.
110. Takiguchi M, Mori M (1995) Transcriptional regulation of genes for ornithine cycle enzymes. *Biochem J* 312: 649–659.
111. Lirk P, Hoffmann G, Rieder J (2002) Inducible nitric oxide synthase – time for reappraisal. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1: 89–108.
112. Hao G, Xie L, Gross SS (2004) Argininosuccinate synthetase is reversibly inactivated by S-nitrosylation in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 279: 36192–36200.
113. Husson A, Brasse-Lagnel C, Fairand A et al. (2003) Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *Eur J Biochem* 270: 1887–1899.
114. Vadgama JV, Evered DF (1992) Characteristics of L-citrulline transport across rat small intestine in vitro. *Pediatr Res* 32: 472–478.
115. Porter RK (2000) Mammalian mitochondrial inner membrane cationic and neutral amino acid carriers. *Biochim Biophys Acta Bioenergetics* 1459: 356–362.
116. Wu G (1998) Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutr* 128: 1249–1252.
117. Cynober L (2002) Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition* 18: 761–766.
118. Dillon EL, Knabe DA, Wu G (1999) Lactate inhibits citrulline and arginine synthesis from proline in pig enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 276: G1079–G1086.
119. Levillain O, Hus-Citharel A, Morel F et al. (1990) Localization of arginine synthesis along rat nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 259: F916–F923.
120. Le Floch N, Seve B (2000) Le Devenir des proteines et des acides amines dans l'intestin du porc: de la digestion a l'apparition dans la veine porte. *INRA Prod Anim* 13: 303–314.
121. Meijer AJ, Lamers WH, Chamuleau RAFM (1990) Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiol Rev* 70: 701–748.
122. Cynober L, Le Boucher J, Vasson MP (1995) Arginine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 6: 402–413.
123. Pavelka K, Vencovský J, Horák P, Šenolt L, Mann H, Štěpán J. *Revmatologie*. 2. aktualizované a rozšířené vydání ed. Praha: Maxdorf Praha; 2018.
124. Ishigami A, Ohsawa T, Asaga H et al. (2002) Human peptidylarginine deiminase type II: molecular cloning, gene organization, and expression in human skin. *Arch Biochem Biophys* 382: 25–31.
125. Nicholas AP, Sambandam T, Echols JD et al. (2004) Increased citrullinated glial fibrillary acidic protein in secondary progressive multiple sclerosis. *J Comp Neurol* 473: 128–136.

126. Camacho JA, Obie C, Biery B et al. (1999) Hyperornithinaemia-hyperammonaemia-homocitrullinuria syndrome is caused by mutations in a gene encoding a mitochondrial ornithine transporter. *Nat Genet* 22: 151–158.
127. Lau T, Owen W, Yu YM et al. (2000) Arginine, citrulline, and nitric oxide metabolism in end-stage renal disease patients. *J Clin Invest* 105: 1217–1225.
128. Osowska S. Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection. *Gut*. 2004;53(12):1781-6.
129. Duchemann T, Osowska S, Walrand S et al. (2004) La Citrulline améliore l'accrétion protéique musculaire chez le rat âgé dénutri via une stimulation de la synthèse protéique. *Nut Clin Metabol* 18: S20 (abstract).
130. Bansal V, Rodriguez P, Wu G et al. (2004) Citrulline can preserve proliferation and prevent the loss of CD3<sup>+</sup> chain under conditions of low arginine. *J Parenter Enteral Nutr* 28: 423–430.
131. Bendahan D, Mattei JP, Ghattas B et al. (2002) Citrulline malate promotes aerobic energy production in human exercising muscle. *Br J Sports Med* 36: 282–289.
132. Gondolesi GE, Kaufman SS, Sansaricq C et al. (2004) Defining normal plasma citrulline in intestinal transplant recipients. *Am J Transplant* 4: 414–418.
133. Pappas PA, Tzakis AG, Saudubray JM et al. (2004) Trends in serum citrulline and acute rejection among recipients of small bowel transplants. *Transplant Proc* 36: 345–347.
134. Crenn P, Messing B, Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin Nutr*. 2008;27(3):328-39.
135. Cynober L. Can arginine and ornithine support gut functions? *Gut*. 1994;35(1 Suppl):S42-5.
136. Cynober L. Ornithine alpha-ketoglutarate as a potent precursor of arginine and nitric oxide: a new job for an old friend. *J Nutr*. 2004;134(10 Suppl):2858S-62S; discussion 95S.
137. Douda L, Hyšpler R, Mžík M, Vokurková D, Drahošová M, Řeháček V, et al. Serum Citrulline and Ornithine: Potential Markers of Coeliac Disease Activity. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2022;65(3):75-82.
138. Kosina P. Doporučený postup péče o pacienty s porušenou či zaniklou funkcí sleziny (hyposplenism/asplenií). Aktualizace Doporučeného postupu Společnosti infekčního lékařství a České vakcinologické společnosti České lékařské společnosti J E Purkyně. 2019.
139. Gaillard F, Shah V, Altadill A, et al. Splenomegaly. Reference article, Radiopaedia.org (Accessed on 08 May 2023) <https://doi.org/10.53347/rID-6003>.
140. Di Sabatino A, Rosado MM, Cazzola P, et al. Splenic hypofunction and the spectrum of autoimmune and malignant complications in celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 179–86.
141. Ludvigsson JF, Olén O, Bell M, Ekbohm A, Montgomery SM. Coeliac disease and risk of sepsis. *Gut*. 2008;57(8):1074-80.
142. Di Sabatino A, Carsetti R, Corazza GR. Post-splenectomy and hyposplenic states. *Lancet*. 2011;378(9785):86-97.
143. Sheikha AK, Salih ZT, Kasnazan KH, et al. Prevention of overwhelming postsplenectomy infection in thalassemia patients by partial rather than total splenectomy. *Can J Surg* 2007; 50: 382–86.
144. Di Sabatino A, Brunetti L, Carnevale Maffè G, Giuffrida P, Corazza GR. Is it worth investigating splenic function in patients with celiac disease? *World J Gastroenterol*. 2013;19(15):2313-8.
145. Röckert Tjernberg A, Bonnedahl J, Inghammar M, Egesten A, Kahlmeter G, Naucmér P, et al. Coeliac disease and invasive pneumococcal disease: a population-based cohort study. *Epidemiol Infect*. 2017;145(6):1203-9.

146. Simons M, Scott-Sheldon LAJ, Risech-Neyman Y, Moss SF, Ludvigsson JF, Green PHR. Celiac Disease and Increased Risk of Pneumococcal Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Med.* 2018;131(1):83-9.
147. Corazza GR, Zoli G, Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Gasbarrini G. A reassessment of splenic hypofunction in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 391–97.
148. Freeman HJ. Mesenteric lymph node cavitation syndrome. *World J Gastroenterol.* 2010;16(24):2991-3.
149. William BM, Corazza GR. Hyposplenism: a comprehensive review. Part I: basic concepts and causes. *Hematology.* 2007;12(1):1-13.
150. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(8):606-16.
151. Spencer RP, Gupta SM. The spleen: diagnosis of splenic diseases using radiolabeled tracers. *Crit Rev Lab Sci* 1989; 27: 299–318.
152. El Hoss S, Dussiot M, Renaud O, Brousse V, El Nemer W. A novel non-invasive method to measure splenic filtration function in humans. *Haematologica.* 2018;103(10):e436-e9.
153. Corazza GR, Ginaldi L, Zoli G, et al. Howell-Jolly body counting as a measure of splenic function. A reassessment. *Clin Lab Haematol* 1990; 12: 269–75.
154. Sills RH. Splenic function: physiology and splenic hypofunction. *Crit Rev Oncol Hematol* 1987; 7: 1–36.
155. Koyama S, Kihira H, Aoki S et al. Postsplenectomy vacuole: a new erythrocytic inclusion body. *Mie Medical journal* 1962, 11, 425437.
156. Schnitzer B, Rucknagel D, Spencer H et al. Erythrocytes: pits and vacuoles as seen with transmission and scanning electron microscopy. *Science*, 173, 251- 252. 1971.
157. Corazza GR, Bullen AW, Hall R, et al. Simple method of assessing splenic function in coeliac disease. *Clin Sci (Lond)* 1981;60(1):109–13.
158. Pearson HA, Gallagher D, Chilcote R, et al. Developmental pattern of splenic dysfunction in sickle cell disorders. *Pediatrics* 1985;76(3):392–7.
159. Lammers AJ, de Porto AP, Bennink RJ, et al. Hyposplenism: comparison of different methods for determining splenic function. *Am J Hematol* 2012;87(5):484–9.
160. Squire JD, Sher M. Asplenia and Hyposplenism: An Underrecognized Immune Deficiency. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2020;40(3):471-83.
161. Lane PA, O’Connell JL, Lear JL, et al. Functional asplenia in hemoglobin SC disease. *Blood* 1995; 85: 2238–44.
162. de Porto AP, Lammers AJ, Bennink RJ, et al. Assessment of splenic function. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29(12):1465–73.
163. Kirkineska L, Perifanis V, Vasiliadis T. Functional hyposplenism. *Hippokratia* 2014;18(1):7-11.
164. Mathur A, McLean MH, Cao H, Vickers MA. Hyposplenism and Gastrointestinal Diseases: Significance and Mechanisms. *Dig Dis.* 2022;40(3):290-8.
165. Costes LM, van der Vliet J, Farro G, Matteoli G, van Bree SH, Olivier BJ, et al. The spleen responds to intestinal manipulation but does not participate in the inflammatory response in a mouse model of postoperative ileus. *PLoS One.* 2014;9(7):e102211.
166. van Gils T, Nijeboer P, van Waesberghe JHT, Coupé VM, Janssen K, Zegers JA, et al. Splenic volume differentiates complicated and non-complicated celiac disease. *United European Gastroenterol J.* 2017;5(3):374-9.
167. Coppo P, Saadoun D, Varet B. Autoimmune manifestations in acquired idiopathic splenic atrophy: A puzzling association. *Eur J Intern Med.* 2006;17(8):580-2.
168. Williams BD, Pussell BA, Lockwood CM, Cotton C. Defective reticuloendothelial system function in rheumatoid arthritis. *Lancet.* 1979;1(8130):1311-4.



169. Lockwood CM, Worlledge S, Nicholas A, Cotton C, Peters DK. Reversal of impaired splenic function in patients with nephritis or vasculitis (or both) by plasma exchange. *N Engl J Med.* 1979;300(10):524-30.
170. Doe WF, Booth CC, Brown DL. Evidence for complement-binding immune complexes in adult coeliac disease, Crohn's disease, and ulcerative colitis. *Lancet.* 1973;1(7800):402-3.
171. König J, Wells J, Cani PD, García-Ródenas CL, MacDonald T, Mercenier A, et al. Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clin Transl Gastroenterol.* 2016;7(10):e196.
172. Khailova L, Baird CH, Rush AA, Barnes C, Wischmeyer PE. Lactobacillus rhamnosus GG treatment improves intestinal permeability and modulates inflammatory response and homeostasis of spleen and colon in experimental model of Pseudomonas aeruginosa pneumonia. *Clin Nutr.* 2017;36(6):1549-57.
173. Carsetti R, Di Sabatino A, Rosado MM, Cascioli S, Piano Mortari E, Milito C, et al. Lack of Gut Secretory Immunoglobulin A in Memory B-Cell Dysfunction-Associated Disorders: A Possible Gut-Spleen Axis. *Front Immunol.* 2019;10:2937.
174. Weiberg D, Basic M, Smoczek M, Bode U, Bornemann M, Buettner M. Participation of the spleen in the IgA immune response in the gut. *PLoS One.* 2018;13(10):e0205247.
175. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science.* (2004) 303:1662–65. doi: 10.1126/science.1091334.
176. Barone F, Patel P, Sanderson JD, Spencer J. Gut-associated lymphoid tissue contains the molecular machinery to support T-cell-dependent and T-cell-independent class switch recombination. *Mucosal Immunol.* (2009) 2:495–503. doi: 10.1038/mi.2009.106.
177. Zhang YA, Salinas I, Li J, Parra D, Bjork S, Xu Z, et al. IgT, a Primitive Immunoglobulin Class Specialized in Mucosal Immunity. *Nat Immunol* (2010) 11:827–35. doi: 10.1038/NI.1913.
178. Štichová J, Nechvátalová J, Litzman J, Vlková M. Possibilities for the analysis of peripheral blood B cell subpopulations in a routine immunological laboratory. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2021;70(4):264-80.
179. Chan JK, Ng CS, Hui PK. A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. *Histopathology.* 1988;12(5):461-80.
180. Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. *J Clin Immunol,* 2020;40(1):66–81.
181. Hansen A, Daridon C, Dörner T. What do we know about memory B cells in primary Sjögren's syndrome? *Autoimmun Rev,* 2010;9(9):600–603.
182. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol,* 2003;21:107–137.
183. Depoil D, Fleire S, Treanor BL, et al. CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor–antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand. *Nat Immunol,* 2008;9(1):63–72.
184. Murphy K, Weaver C. *Janeway's immunobiology.* New York and London: Garland Science; 2017.
185. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, et al. CD27: a memory B-cell marker. *Immunol Today,* 2000;21(5):204–206.
186. Loder BF, Bettina B, Ray JR, et al. B Cell Development in the Spleen Takes Place in Discrete Steps and Is Determined by the Quality of B Cell Receptor–Derived Signals. *J Exp Med,* 1999;190(1):75–90.
187. Vlková. Flowcytometrická analýza T a B lymfocytárních subpopulací u pacientů s humorálními imunodeficiencemi (disertační práce). Masarykova Univerzita - Lékařská fakulta. 2008.



188. Wehr C, Kivioja T, Schmitt Ch, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 2008; 111(1):77–85.
189. Su TT, Guo B, Wei B, Braun J, Rawlings DJ. Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development. *Immunol Rev*. 2004;197:161-78.
190. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(5):323-35.
191. Douda L, Vokurková D, Douda T, Tachecí I, Jirkovský V, Fejfar T, et al. Memory B lymphocytes in peripheral blood in coeliac disease: a pilot study. *Gastroenterologie a hepatologie*. 2019;73(4):296-302.
192. Hrcir Z, Vokurkova D, Drahosova M, Soukup T, Toms J, editors. PS5:93 Marginal-zone-like b cells deficiency repeatedly detected in peripheral blood as a possible biomarker of hyposplenism/asplenia in sle2018 2018: Lupus Foundation of America.
193. Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, et al. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*. 2004;104(12):3647-54.
194. Rossi CM, Lenti MV, Merli S, Di Sabatino A. Role of IgM Memory B Cells and Spleen Function in COVID-19. *Front Immunol*. 2022;13:889876.
195. Timens W, Boes A, Poppema S. Human marginal zone B cells are not an activated B cell subset: strong expression of CD21 as a putative mediator for rapid B cell activation. *Eur J Immunol*. 1989;19:2163-6.
196. Ticha O, Moos L, Wajant H, et al. 2018. Expression of Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Characterizes TLR9-Driven Formation of Interleukin-10-Producing B Cells. *Front Immunol*, 2018;8:1951.
197. Capolunghi F, Rosado MM, Sinibaldi M, Aranburu A, Carsetti R. Why do we need IgM memory B cells? *Immunol Lett*. 2013;152(2):114-20.
198. Di Sabatino A, Rosado MM, Miele L, Capolunghi F, Cazzola P, Biancheri P, et al. Impairment of splenic IgM-memory but not switched-memory B cells in a patient with celiac disease and splenic atrophy. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(6):1461-3.
199. Di Sabatino A, Bertrandi E, Casadei Maldini M, Pennese F, Proietti F, Corazza GR. Phenotyping of peripheral blood lymphocytes in adult coeliac disease. *Immunology*. 1998;95(4):572-6.
200. Lebwohl B, Michaëlsson K, Green PHR, Ludvigsson JF. Persistent Mucosal Damage and Risk of Fracture in Celiac Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014;99(2):609-16.
201. Lebwohl B, Granath F, Ekbom A, et al. Mucosal healing and mortality in coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;37(3):332-339. doi:10.1111/apt.12164.
202. Pironi L, Konrad D, Brandt C, Joly F, Wanten G, Agostini F, et al. Clinical classification of adult patients with chronic intestinal failure due to benign disease: An international multicenter cross-sectional survey. *Clin Nutr*. 2018;37(2):728-38.
203. Ng KYB, Mehta R, Mohamed S, Mohamed Z, Arnold J. Severe Refractory Coeliac Disease with Response Only to Parenteral Nutrition. *Case Reports in Gastroenterology*. 2014;8(3):297-303.
204. Penny HA, Schieppatti A, Sanders DS. Chapter 5 - Nonresponsive and complicated coeliac disease. In: Schieptti A, Sanders D, editors. *Coeliac Disease and Gluten-Related Disorders*: Academic Press; 2022. p. 87-100.
205. Romero MJ, Platt DH, Caldwell RB, Caldwell RW. Therapeutic use of citrulline in cardiovascular disease. *Cardiovasc Drug Rev*. 2006;24(3-4):275-90.
206. Akashi K, Miyake C, Yokota A. Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Lett*. 2001;508(3):438-42.

207. Norris KA, Schrimpf JE, Flynn JL, Morris SM Jr (1995) Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* 63:2793–2796.
208. Osowska S, Duchemann T, Walrand S, Paillard A, Boirie Y, Cynober L, et al. Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(3):E582-6.
209. Grover J, Chhuneja P, Midha V. An open-label randomised pilot trial on safety of wheat variety C273 in patients with adult celiac disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2020;13:1756284820944089.
210. Wiśniewski J, Fleszar MG, Piechowicz J, Krzystek-Korpacka M, Chachaj A, Szuba A, et al. A novel mass spectrometry-based method for simultaneous determination of asymmetric and symmetric dimethylarginine, l-arginine and l-citrulline optimized for LC-MS-TOF and LC-MS/MS. *Biomed Chromatogr*. 2017;31(11).
211. European Medicines Agency: Guideline on Bioanalytical Method Validation. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf). 2021.
212. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *Jama*. 2013;310(20):2191-4.
213. Schieppatti A, Maimaris S, Raju SA, Green OL, Mantica G, Therrien A, et al. Persistent villous atrophy predicts development of complications and mortality in adult patients with coeliac disease: a multicentre longitudinal cohort study and development of a score to identify high-risk patients. *Gut*. 2023;72(11):2095-102.
214. Salmi TT, Collin P, Korponay-Szabó IR, Laurila K, Partanen J, Huhtala H, et al. Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. *Gut*. 2006;55(12):1746-53.
215. Pironi L, Arends J, Bozzetti F, Cuerda C, Gillanders L, Jeppesen PB, et al. ESPEN guidelines on chronic intestinal failure in adults. *Clin Nutr*. 2016;35(2):247-307.
216. Hozyasz KK, Szaflarska-Popławska A, Ołtarzewski M, Mazur J, Müller L, Jabłońska E, et al. [Whole blood citrulline levels in patients with coeliac disease]. *Pol Merkuri Lekarski*. 2006;20(116):173-5.
217. Torinsson Naluai Å, Saadat Vafa L, Gudjonsdottir AH, Arnell H, Browaldh L, Nilsson S, et al. Altered peripheral amino acid profile indicate a systemic impact of active celiac disease and a possible role of amino acids in disease pathogenesis. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193764.
218. Mandel H, Levy N, Izkovitch S, Korman SH. Elevated plasma citrulline and arginine due to consumption of *Citrullus vulgaris* (watermelon). *J Inher Metab Dis*. 2005;28(4):467-72.
219. Wang T, Steel G, Milam AH, Valle D. Correction of ornithine accumulation prevents retinal degeneration in a mouse model of gyrate atrophy of the choroid and retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(3):1224-9.
220. Barilli A, Rotoli BM, Visigalli R, Dall'Asta V. Gliadin activates arginase pathway in RAW264.7 cells and in human monocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(9):1364-71.
221. Wijarnpreecha K, Lou S, Panjawatnan P, Cheungpasitporn W, Pungpapong S, Lukens FJ, et al. Cigarette smoking and risk of celiac disease: A systematic review and meta-analysis. *United European Gastroenterol J*. 2018;6(9):1285-93.
222. Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(5):372-7.
223. Prytz H, Benoni C, Tagesson C. Does smoking tighten the gut? *Scand J Gastroenterol*. 1989;24(9):1084-8.

224. Ketfi C, Boutigny A, Mohamedi N, Bouajil S, Magnan B, Amah G, et al. Risk of venous thromboembolism in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2021;88(3):105122.
225. Peters AM, Ryan PFJ, Klonizakis I, Elkon KB, Lewis SM, Hughes GRW. Measurement of splenic function in humans using heat damaged autologous red blood cells. *Scand J Haematol* 1981; 27: 374–80.
226. Dhawan V, Spencer RP, Pearson HA, Sziklas JJ. Functional asplenia in the absence of circulating Howell-Jolly bodies. *Clin Nucl Med* 1977; 2: 395–96.
227. Hurych J, Štícha R. *Lékařská mikrobiologie : repetitorium*. 2. vydání ed. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton; 2021.
228. Thomas HJ, Wotton CJ, Yeates D, Ahmad T, Jewell DP, Goldacre MJ. Pneumococcal infection in patients with coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20(7):624-8.
229. O'Farrelly C, Whelan CA, Feighery CF, Weir DG. Suppressor-cell activity in coeliac disease induced by alpha-gliadin, a dietary antigen. *Lancet*. 1984;2(8415):1305-7.
230. Kocna P. Gliadin 33-mer v patogenezi, terapii a monitorování celiakie. *Klin Biochem Metab*, 29 (50), 2021, No 2, p 64 - 70. 2021.
231. Biagi F, Bianchi PI, Marchese A, Trotta L, Vattiato C, Balduzzi D, et al. A score that verifies adherence to a gluten-free diet: a cross-sectional, multicentre validation in real clinical life. *Br J Nutr*. 2012;108(10):1884-8.
232. Biomedal. <https://ivydal.biomedal.com/en/professional-use-tests/ivylisa-gip-stool/> (accessed Sept 18, 2023).
233. Wieser H, Ruiz-Carnicer Á, Segura V, Comino I, Sousa C. Challenges of Monitoring the Gluten-Free Diet Adherence in the Management and Follow-Up of Patients with Celiac Disease. *Nutrients*. 2021;13(7).
234. Vyhnánek R KZ, Vyhnánek R, Paulík M. Stanovení lepku ve stolici jako metoda k ověření compliance s bezlepkovou dietou u dětí s nově diagnostikovanou celiakií. *Gastroent Hepatol*. 2021;75(6): 519– 523.
235. Packová, B. Markery v diagnostice přetrvávající slizniční atrofie, refrakterní celiakie a maligních komplikací u pacientů s celiakií (disertační práce). Masarykova Univerzita - Lékařská fakulta, 2020.

## 8. Přílohy

Etická komise, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové  
Ethics Committee, University Hospital Hradec Kralove, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

STANOVISKO ETICKÉ KOMISE  
Opinion of the Ethics Committee

Vážený pan  
MUDr. Ladislav Douša  
II. interní gastroenterologická klinika  
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Číslo jednací/Reference number: 202107 I12P

Název studie/Full Title of study: Ukazatele aktivity celiakie – vytvoření kontrolní skupiny pacientů

Datum doručení žádosti/Date of submission of the Application Form: 21JUN2021

Místo hodnocení/ Jméno zkoušejícího /Trial Site / Name of Investigator:  
> MUDr. Ladislav Douša, II. interní gastroenterologická klinika, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Seznam hodnocených dokumentů/List of all submitted documents:  
> Informace pro dárce a informovaný souhlas (ze dne 21.7.2021)

Vyjádření EK/ Ethics Committee's opinion:  
EK vydává / EC issues

Souhlasné stanovisko/Favourable opinion  
 Nesouhlasné stanovisko/Unfavourable opinion

University Hospital Hradec Králové  
Ethics Committee  
Sokolská 581  
500 05 Hradec Králové  
Czech Republic

Datum/Date: 22JUN2021

MUDr. Jiří Vortel, předseda EK  
Signature of Chairperson of the EC

## **INFORMACE PRO PACIENTY A INFORMOVANÝ SOUHLAS**

II. interní gastroenterologická klinika LF UK a FN

Sokolská 581, Fakultní nemocnice, 500 05 Hradec Králové

tel: +420 495 834240, fax: +420 495 834785

**Název studie:** Marginální zóně podobné B lymfocyty v periferní krvi u pacientů s celiakií

**Koordinátor výzkumu:** MUDr. Ladislav Douđa

### **Souhlas nemocného**

**Jméno a příjmení:** .....

**Rodné číslo:** .....

1. Souhlasím, aby osobní údaje o mé osobě (jméno a příjmení, rodné číslo, adresa, zdravotní pojišťovna) byly trvale zpracovány do dokumentace II. interní gastroenterologické kliniky Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Hradec Králové, pro účely vědecké a výzkumné
2. V rámci standardního odběru krve pro laboratorní kontrolu ve specializované poradně bude jedna zkumavka (objemem odpovídající 3/4 polévkové lžíce) bude použita pro vyšetření pro vědecké účely
3. V krvi budou analyzovány jednotlivé typy bílých krvinek (B-lymfocytů)

**Údaje uvedené v bodě 1 poskytují dobrovolně a jsem si vědom toho, že svůj souhlas se zpracováním osobních údajů mohu kdykoliv odvolat.**

### **Doplňk k informaci pro pacienta / pacientku**

Při zařazení do studie budou Vaše osobní data uchována s plnou ochranou důvěrnosti. Do Vaší dokumentace budou moci na základě Vámi uděleného souhlasu nahlédnout za účelem ověření získaných údajů zástupci nezávislých etických komisí a zahraničních nebo místních kompetentních úřadů. Pro tyto případy je zaručena ochrana důvěrnosti Vašich osobních dat. Při vlastním provádění studie mohou být osobní údaje poskytnuty jiným než výše uvedeným subjektům pouze bez identifikačních údajů, to je anonymní data pod číselným kódem. Rovněž pro výzkumné a vědecké účely mohou být Vaše osobní údaje poskytnuty pouze bez identifikačních údajů (anonymní data) nebo s Vaším výslovným souhlasem.

*(s odvoláním na Metodický návod Ministerstva zdravotnictví ČR k zabezpečení a ochraně údajů v informačních systémech provozovaných ve zdravotnictví ČR k zabezpečení a ochraně údajů v informačních systémech provozovaných ve zdravotnických zařízeních uveřejněný ve Věstníku MZČR, částka 6/1994 s odvoláním na ustanovení paragrafu 55 odstavec 2, písmeno d) zákona 230/1996 Sbírky o péči o zdraví lidu v platném znění).*

Datum

Podpis nemocného

Podpis lékaře

## INFORMACE PRO DÁRCE A INFORMOVANÝ SOUHLAS

II. interní gastroenterologická klinika LF UK a FN v Hradci Králové, Sokolská 581, 500 05

Hradec Králové

tel: +420 495 834240, fax: +420 495 834785

**Název studie:** Ukazatelé aktivity celiakie – stanovení kontrolní skupiny

**Koordinátor výzkumu:** MUDr. Ladislav Douda

### Souhlas dárkyně/dárce

**Jméno a příjmení:** .....

**Rodné číslo:** .....

1. Souhlasím, že mi při darování krve/krevní složky bude navíc odebráno 16 ml krve, která bude odeslána k imunologickému a biochemickému vyšetření (stanovení sérologických ukazatelů celiakie včetně protilátek proti tkáňové transglutamináze, hladiny citrulinu a ornitinu a vyšetření paměťových B lymfocytů). Výsledky vyšetření dárkyň a dárců (vzorků zdravé populace) budou využity pro porovnání s výsledky pacientů s celiakií. Odběrem 16 ml krve nebude překročeno povolené množství odebrané krve v souvislosti s dárcovstvím krve/krevní složek. Ze vzorků nebudou prováděna žádná genetická vyšetření, vzorky budou po skončení analýzy zlikvidovány (nebudou uchovávány).
2. V případě zjištění abnormálního nálezu budete informováni prostřednictvím Transfuzního oddělení Fakultní nemocnice Hradec Králové, případně Vám budou nabídnuta doplňující vyšetření na II. interní gastroenterologické klinice FN HK.

**Údaje uvedené v bodě 1 poskytují dobrovolně a jsem si vědom/a toho, že svůj souhlas se zpracováním osobních údajů mohu kdykoliv odvolat.**

### **Doplňěk k informaci pro dárce / dárkyni**

Při zařazení do studie nebudou Vaše osobní data předávána mimo Transfuzní oddělení FN Hradec Králové. Transfuzní oddělení FN HK shromažďuje a uchovává osobní údaje a údaje o zdravotním stavu dárců v souladu s platnou legislativou (zákon č. 110/2019 Sb., Zákon

o zpracování osobních údajů; zákon. č. 378/2007 Sb., Zákon o léčivech; vyhláška č. 143/2008 Sb., Vyhláška o lidské krvi; vše ve znění pozdějších předpisů).

.....

Datum

.....

Podpis dárkyně/dárce

.....

Podpis lékaře



## Gluten-free diet compliance score

Biagi F. *Brit J Nutrition*. 2012;108, 1884-8

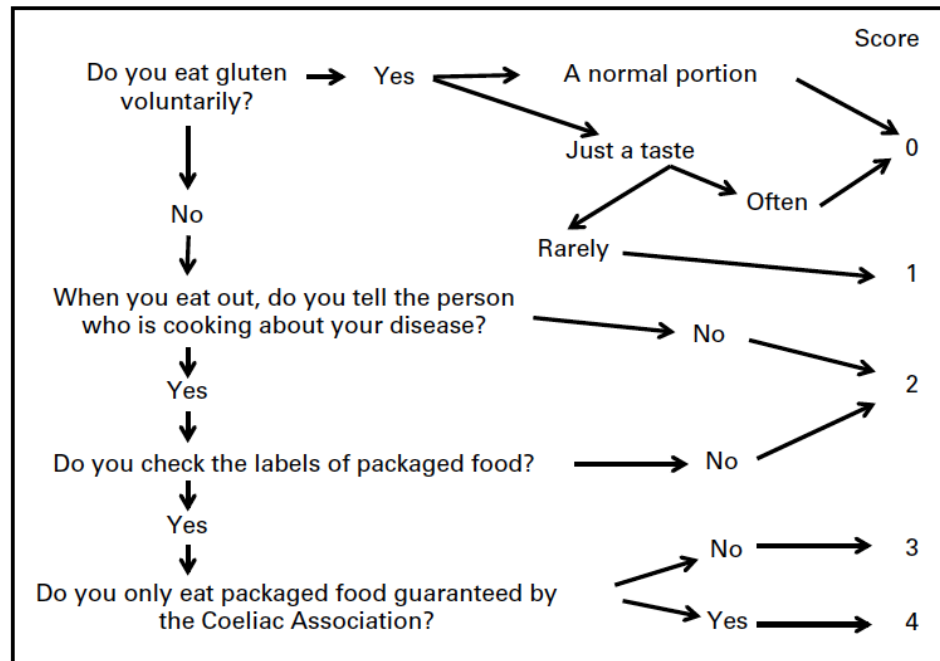


Figure. Questionnaire and scoring system to assess compliance in celiac patients.

“**Often**”: The patient consumes gluten so often that he/she cannot remember when or how many times this happened.

“**Rarely**”: The patient consumes gluten only occasionally that he/she can remember when or how many times this happened.

The final score of the questionnaire is made up of five levels (**0–4**), which, from a clinical point of view, can be grouped into three levels.

1. Patients with a score of **0 or 1** do not follow a strict GFD.
2. Patients with a score of **2** follow a GFD, but with important errors that require correction.
3. Patients with a score of **3 or 4** follow a strict GFD.

The CCA thanks Dr. Biagi and his co-authors for permission to use this tool for Canadians with celiac disease.