

Abstrakt

Úvod: Celiakia je komplexná autoimunitná choroba vyvolaná u geneticky predisponovaných jedincov po požití obilnín obsahujúcich lepok. Monocyty ako hlavné efektorové bunky vrodenej imunity hrajú nezanedbateľnú úlohu v rozvoji imunitnej odpovede v reakcii na patogénne a cudzorodé agens i v rámci patogenézy celiakie. Jedinou efektívnou liečbou celiakie je prísne a celoživotné dodržiavanie bezlepkovej diéty, pričom stravovacie voľby majú kľúčový význam pri regulácii tohto ochorenia. Ovos sa objavil ako kontroverzná, no nutrične bohatá možnosť, ako rozšíriť bezlepkovú diétu o zdroj bohatý na vlákninu, mikro- a makroživiny. Preto sme sa v rámci tejto diplomovej práce zamerali na to, ako vrodenný imunitný systém, konkrétne monocyty, interagujú s avenínovými peptidmi vybraného kultivaru bezlepkového ovsu a či dochádza v reakcii na jeho konzumáciu k imunitnej reakcii detekovateľnej na molekulárnej úrovni.

Materiál a metódy: Do štúdie bolo zahrnutých 39 pacientov so stabilizovanou celiakiou, ktorí po dobu 14 dní konzumovali denne 50 g surových ovsených vločiek vybraného kultivaru. Z plnej krvi boli pred začiatkom štúdie a po jej ukončení vyizolované CD14⁺ monocyty pomocou imunomagnetickej separácie, u ktorých boli stanovované expresie mRNA TLR2, TLR4, TNF α , IL8 a IL1 β pomocou kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie s mRNA génu *PGKI* ako endogénnou kontrolou. Z plnej krvi boli taktiež pomocou gradientovej centrifugácie vyizolované mononukleárne bunky periférnej krvi. Pomocou prietokovej cytometrie sme analyzovali počet lymfocytov a monocytov a hodnotenie expresie povrchových markerov TLR2, TLR4, HLA-DR, CD80 a CD86 umožnilo skúmať fenotyp leukocytov.

Výsledky: Analýzou a porovnaním mRNA expresií pred a po 14-dennej konzumácii ovsu bolo zistené mierne zvýšenie hladín expresie IL1 β ($p = 0,005$) a TNF α ($p = 0,053$). U TLR2, TLR4 ani IL8 mRNA nebola detekovaná žiadna zmena v nadväznosti na 14-dennú diétu intervenciu, zatiaľ čo expresia TLR2 na povrchu CD14⁺ monocytov slabo, ale štatisticky významne klesla.

Errata. Predošlé dve vety sú opravené nasledovne: Analýzou a porovnaním mRNA expresií pred a po 14-dennej konzumácii ovsu bolo zistené štatisticky významné, mierne zvýšenie hladín mRNA expresie IL1 β ($p = 0,005$) a TLR2 ($p = 0,028$), zatiaľ čo expresia TLR2 na povrchu CD14⁺ monocytov klesla ($p = 0,002$). U TNF α , TLR4 ani IL8 mRNA nebola detekovaná žiadna štatisticky významná zmena.

Celkové počty monocytov, ich jednotlivých subtypov aj lymfocytov separovaných z plnej krvi sa po diéte buď nezmenili, alebo sa dokonca nevýznamne snížili. Rovnaký efekt ovsenej diéty bol pozorovaný aj v prípade leukocytov definovaných pomocou expresie povrchových markerov TLR2, TLR4, HLA-DR, CD80; iba pokles počtu buniek CD14⁺CD86⁺ bol štatisticky významný ($p = 0,029$).

Záver: Výsledky naznačujú, že na úrovni vrodeného imunitného systému pravdepodobne dochádza k slabej imunitnej reakcii prostredníctvom zvýšenia produkcie mRNA prozápalových cytokínov TNF α a IL1 β monocytmi, a to pravdepodobne v súvislosti so 14-dennou konzumáciou ovsa.

Errata. Predošlá veta bola upravená nasledovne: Z hľadiska biologickej významnosti výsledky naznačujú, že na úrovni vrodeného imunitného systému pravdepodobne dochádza k iba slabej imunitnej reakcii prostredníctvom zvýšenia produkcie mRNA prozápalových cytokínov TNF α a IL1 β monocytmi, a to pravdepodobne v súvislosti so 14-dennou konzumáciou ovsa.

Zdá sa však, že na bunkovej a proteínovej úrovni túto aktiváciu imunitného systému prostredníctvom zmien v počte či fenotype monocytov po konzumácii ovsa u pacientov s celiakiou nedetekujeme.

Kľúčové slová: celiakia, monocyty, vrodená imunita, ovos, prozápalové cytokíny

Abstract

Introduction: Celiac disease is a complex autoimmune disease induced in genetically predisposed individuals after ingestion of cereals containing gluten. Monocytes, as the main effector cells of innate immunity, play a non-negligible role in the development of the immune response in response to pathogenic and foreign agents as well as in the pathogenesis of celiac disease. The only effective treatment for celiac disease is strict and lifelong adherence to a gluten-free diet, while dietary choices are of key importance in the regulation of this disease. Oats have emerged as a controversial but nutritionally rich option to supplement a gluten-free diet with a source rich in fiber, micro- and macronutrients. Therefore, in this thesis, we focused on how the innate immune system, specifically monocytes, interact with the avenin peptides of a selected gluten-free oat cultivar and whether an immune reaction detectable at the molecular level occurs in response to its consumption.

Materials and methods: 39 patients with stabilized celiac disease were included in the study, who consumed 50 g of raw oatmeal of the selected cultivar daily for 14 days. CD14⁺ monocytes were isolated from whole blood before the start of the study and after its completion using immunomagnetic separation, in which TLR2, TLR4, TNF α , IL8 and IL1 β mRNA expressions were determined using quantitative polymerase chain reaction with PGK1 gene mRNA as an endogenous control. Peripheral blood mononuclear cells were also isolated from whole blood using gradient centrifugation. Using flow cytometry, we analyzed the number of lymphocytes and monocytes, and the evaluation of the expression of surface markers TLR2, TLR4, HLA-DR, CD80 and CD86 made it possible to investigate the phenotype of leukocytes.

Results: Analysis and comparison of mRNA expressions before and after 14-day oat consumption revealed a slight increase in IL1 β ($p = 0,005$) and TNF α ($p = 0,053$) expression levels. No change was detected in TLR2, TLR4, or IL8 mRNA following the 14-day dietary intervention, while TLR2 expression on the surface of CD14⁺ monocytes decreased slightly but statistically significantly.

Errata. The previous two sentences are corrected as follows: Analysis and comparison of mRNA expressions before and after 14 days of oat consumption revealed a statistically significant, slight increase in mRNA expression levels of IL1 β ($p = 0,005$) and TLR2 ($p = 0,028$), while TLR2 expression on the surface CD14⁺ monocytes decreased ($p = 0,002$). No statistically significant change was detected in TNF α , TLR4, or IL8 mRNA.

The total number of monocytes, their individual subtypes and lymphocytes separated from whole blood either did not change after the diet or even decreased insignificantly. The same effect of the oat diet was

also observed in leukocytes defined by the expression of surface markers TLR2, TLR4, HLA-DR, CD80; only the decrease in the number of CD14⁺CD86⁺ cells was statistically significant ($p = 0,029$).

Conclusion: The results suggest that at the level of the innate immune system, a weak immune response probably occurs through an increase in mRNA production of the pro-inflammatory cytokines TNF α and IL1 β by monocytes, probably in connection with the 14-day oat consumption.

Errata. The previous sentence was corrected as follows: From the point of view of biological significance, the results suggest that at the level of the innate immune system, a weak immune response probably occurs through an increase in mRNA production of the pro-inflammatory cytokines TNF α and IL1 β by monocytes, probably in connection with the 14-day oat consumption.

However, it seems that at the cellular and protein level we do not detect this activation of the immune system through changes in the number or phenotype of monocytes after consuming oats in patients with celiac disease.

Key words: celiac disease, monocytes, innate immunity, oats, proinflammatory cytokines