

Gliadin 33-mer v patogenezi, terapii a monitorování celiakie

Kocna P.

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. Lékařské fakulty Karlovy University a Všeobecné fakulturní nemocnice, Praha

SOUHRN

Celiakie je onemocněním autoimunního charakteru s geneticky podmíněnou vazbou HLA třídy II DQ2 nebo DQ8 charakterizovanou reakcemi střevních T buněk na proteiny pšeničného lepku v potravě. Unikátní peptidový fragment α 2-gliadinu, gliadin-33mer, je považován za nejdůležitější imunogenní sekvenci v glutenu, peptid je zcela rezistentní na gastrointestinální peptidázy, a je zcela specifický pro prolaminu. Gliadin 33-mer je stimulatorem CD4-T buněk po deamidaci tkáňovou transglutaminázou. Jedinou ověřenou léčbou celiakie je celoživotní bezlepková dieta a v současné době se vyvíjí několik nových terapeutických přístupů. Enzymatické štěpení lepku pomocí glutenáz se zaměřením na cytotoxický gliadin 33-mer bylo ověřeno v řadě klinických studií. Detekce glutenových imunogenních peptidů, gliadin 33-meru, ve stolici a moči se stává novým neinvazivním biomarkerem a nabízí nový jednoduchý a objektivní způsob hodnocení příjmu lepku a ověření souladu s dodržováním bezlepkové diety u pacientů s celiakií. V diagnostice celiakie umožňuje spolehlivě ověřit non-responzivní celiakii.

Klíčová slova: Celiakie, bezlepková dieta, gliadin, gli-33mer, patogeneze, terapie, glutenázy, monitoring.

SUMMARY

Kocna P.: Gliadin 33-mer in coeliac disease pathogenesis, therapy and monitoring

Celiac disease is an autoimmune disease with genetically determined HLA class II binding DQ2 or DQ8 characterized by intestinal T cell responses to wheat gluten proteins in the diet. The unique α 2-gliadin peptide fragment, gliadin-33mer, is considered to be the most important immunogenic sequence in gluten, this peptide is completely resistant to gastrointestinal peptidases and is completely specific for prolamins. Gliadin 33-mer is a stimulator of CD4-T cells after deamidation by tissue transglutaminase. The only proven treatment for celiac disease is a lifelong gluten-free diet, and several new therapeutic approaches are currently being developed. The enzymatic cleavage of gluten by glutenases with a focus on the cytotoxic gliadin 33-mer has been verified in a number of clinical studies. Detection of gluten immunogenic peptides, gliadin 33-mer, in faeces and urine is becoming a new non-invasive biomarker and offers a new simple and objective way to assess gluten intake and verify compliance with a gluten-free diet in patients with celiac disease. In the diagnosis of celiac disease allows you to reliably verify non-responsive celiac disease.

Keywords: Celiac disease, gluten-free diet, gliadine, gli-33mer, pathogenesis, therapy, glutenase, monitoring.

Úvod

Celiakie (celiakální sprue) je onemocněním autoimunního charakteru s geneticky podmíněnou vazbou (HLA-DQ2/DQ8) a specifickou humorální odpovědí na spouštěcí faktor - peptidy pšeničného lepku (lepek) resp. zásobním proteinům (prolaminům) příbuzných obilovin, ječmene, žita a ovsa. Jedná se o jednu z nejčastějších chronických nemocí dětí i dospělých s celosvětovou prevalencí až 1%. Onemocnění bylo známo již v antické době a název celiakie se vztahuje k řeckému pojmu „koiliakos“, které popisoval Aretaeus. Klinickou formu celiakie včetně doporučené léčby dietou publikoval v roce 1988 Samuel Gee [1] a vztah k pšeničným proteinům popsal v roce 1953 Dicke [2].

Proteiny obsažené v pšenici rozdělil Osborne [3] do čtyř skupin - albuminy, globuliny, prolaminu a gluteliny v závislosti na jejich rozpustnosti ve vodě a alkoholu. Gluten (lepek) obilovin se skládá z polymerních gluteninů a monomerních prolaminů. Prolaminem pšenice jsou gliadiny, v žitu, ječmenu a ovsu jsou to secaliny, hordeiny a aveniny. Rozdělení gliadinů na skupiny alfa,

beta, gamma a omega vychází ze separace na škrobové elektroforóze v hliníko-laktátovém tlumiči [4] a tuto separační metodu jsme modifikovali na našem pracovišti pro horizontální LKB Multiphor System [5]. Výrazně nejvyšší cytotoxicita byla prokázána pro α -gliadin [6] jehož sekvence má 277 aminokyselin, a protilátky proti purifikovanému α -gliadinu vykazovaly významně vyšší senzitivitu a specifitu při serologickém screeningu celiakie [7]. α -gliadin jsme izolovali iontově výměnnou chromatografií na SP-Sephadex C-50 a naše laboratoř vyráběla mikrotitrační ELISA desky s vázaným α -gliadinem pro screening celiakie a nabízeli jsme je dalším pracovištím [8]. PTP (pepsin-trypsin-pankreatin) hydrolyzované peptidy α -gliadinu jsme separovali pomocí RP-HPLC na koloně Separon SGX-C18 (Tessek) [9] a experimentálně jsme prokázali jejich cytotoxicitu [10].

Cytotoxický peptid gliadin 33-mer v patogenezi celiakie

V sekvenci gliadinů bylo popsáno nejméně 50 epitopů stimulujících T-buňky nemocných s celiakií. Jedi-

imunitní odpověď - anti-IL15, anti-IFN- γ nebo antagonista CCR9: CCX282B blokující chemokinový receptor [16-18]. V tomto sdělení se věnují pouze dvěma přístupům souvisejícím s gliadin 33-merem.

Rozhodujícím krokem v patogenezi celiakie je prezentace deamidovaného gliadin 33-meru (LQLQPFPPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF) HLA-DQ2/DQ8 makrofágy nebo antigen-prezentujícími buňkami (APC) T lymfocytům. Blokování této cesty tedy představuje výborný terapeutický přístup. Ideální antagonist by měl vykazovat velmi vysokou afinitní doménu pro vazbu HLA-DQ2/DQ8 exprimovanou APC a potlačení aktivace T-buněk stimulovaných gliadinem s produkcí IFN- γ . Pro blokování vazby gliadinu na HLA-DQ2 byly navrženy cyklické peptidy strukturou podobné gliadinu kompetující s vazbou na HLA-DQ2. Peptidy mají epitopy podobné gliadin 33-meru - LQPFPPQPELPY, KQPFPEKELPY nebo LQLQPFPPQPEKYPQPEKPY a jsou cyklizovány za použití sulfidových nebo polyethylenglykolových můstků [19, 20].

Nejrozšířenější skupinou pro terapii celiakie jsou enzymy degradující lepek (glutenázy), které štěpí gliadin na peptidy s devíti nebo méně aminokyselinovými zbytky. Většina z nich jsou glutamin a prolin specifické enzymy, nejčastějších aminokyselin imunogenních epitopů lepku. Cornell popsal enzymatickou hydrolyzu gliadin 33-meru v pozici 79 a 81 v sekvenci QQPYPQPQ za prolinem caricainem [21]. Caricain je cysteinovou prolylendopeptidázou (EC 3.4.22.30) v papáji (*Carica papaya*). Purifikovaný extrakt je distribuován firmou Glutagen (Melbourne, Austrálie) s označením Glute-Guard jako potravinový doplněk. Cornel ověřil účinnost po podání 900 mg extraktu na souboru nemocných s celiakií v randomizované, placebem kontrolované studii [22]. Glutenáza EP-B2 (endoproteáza B, izoforma 2) je glutamin specifická cysteinová proteáza z ječmenu (*Hordeum vulgare*) se sekvencí Cys-His-Asn ve svém aktivním místě. Glutenáza EP-B2 přirozeně slouží k trávení hordeinu, analogu gliadinu, je optimálně aktivní při nízkém pH, odolná vůči pepsinu a má dobrou specifitu pro sekvenci QXP vyskytující se v gliadin 33-meru [23]. Dalšími testovanými glutenázami jsou prolin-specifické endoproteázy (PEP) z *Flavobacterium meningosepticum* (FM-PEP), *Sphingomonas capsulata* (SC-PEP), a *Myxococcus xanthus* (MX-PEP).

Velmi perspektivní je kombinace dvou peptidáz vyvíjené firmou Alvine Pharmaceuticals (San Carlos, USA) ALV-003, současný název je latiglutenáza a firma nyní patří pod ImmunogenX (Newport Beach, USA). Peptidázy ALV003 jsou vysoce efektivní v žaludku při štěpení potravin s vysokým obsahem lepku před dosažením dvanáctníku [24]. Latiglutenáza je patentovanou kombinací EP-B2 (ALV-001) a SC-PEP (ALV-002) a schéma zobrazuje sekvenci gliadin 33-meru s pozicemi, které jsou štěpeny uvedenými peptidázami (obr. 2). Randomizovaná kontrolní studie s pacienty s celiakií na bezlepkové dietě, kteří dostávali dietu obsahující lepek (16 g/den po dobu 3 dní) vykazovala významně nižší imunologickou aktivaci podle IFN- γ odpovědi periferních T buněk na gliadin [25]. Rozsáhlé studie [26,27] neprokázaly pozitivní efekt ALV-003 na histologické ani serologické markery celiakie. Poslední 12týdenní studie

na souboru 398 nemocných s celiakií prokazuje symptomatický přínos a zvýšení QoL při užívání latiglutenázy [28]. Synteticky vyrobený enzym Kuma030 (Protein Design, Seattle - USA) je modifikací přirozeně se vyskytujícího enzymu z acidofilního mikrobu *Alicyclobacillus sendaiensis*, zvaný kumamolisin-As (KumaWT). Jedná se o serinovou endoproteázu s optimální aktivitou v rozmezí pH 2 až 4, vhodná pro digesti gliadinů v žaludku [29]. Kuma030 je efektivnější než ALV-003, při nejvyšší testované koncentraci EP B2 (1:10 na hmotnost lepku) byl lepek degradován o 84,4%, Kuma030 degradoval gliadin nad 99,9 % při výrazně nižší koncentraci 1:40 a výsledný obsah lepku se snížil na 3 ppm, což je výrazně pod prahovou hodnotou 20 ppm, kritériem bezlepkových potravin. Kuma030 signifikantně redukuje produkci IFN- γ T-buňkami izolovanými od nemocných s celiakií [30].

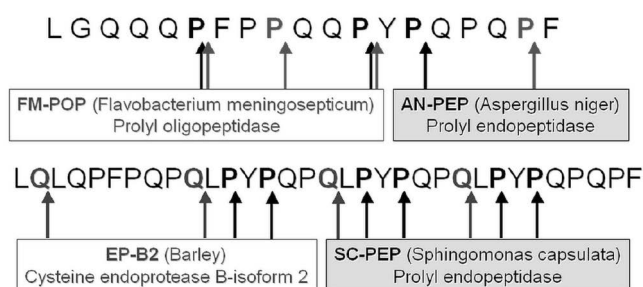


Fig. 2: Overview of enzymatic cleavage sites of the gliadin 33-mer from α 2-gliadin sequence 57-89 by *Flavobacterium meningosepticum* prolyl oligopeptidase (FM-POP), *Aspergillus niger* prolyl endopeptidase (AN-PEP), glutamine-specific cysteine endopeptidase B, isoform 2 from barley (EP-B2) and *Sphingomonas capsulata* prolyl endopeptidase (SC-PEP).

AN-PEP (*Aspergillus niger* - prolyl endopeptidáza) je stejně jako SC-PEP glutenázou s optimální aktivitou při pH 3 - 5, je rezistentní na proteolýzu pepsinem, ale má 60krát rychlejší účinek ve srovnání s prolyl endopeptidázou MX-PEP [31]. Současné podávání AN-PEP s lepkem pacientům s celiakií vedlo k úplné eliminaci stimulačních peptidů gliadinu pro T-buňky během dvou hodin při stanovení v žaludečním aspirátu [32]. Glutenáza AN-PEP, komerčně dostupná s označením Tolerase-G (výrobce je DSM - Kaiseraugst, Švýcarsko), byla v roce 2017 schválena evropskou komisí EFSA (European Food Safety Authority) jako potravinový doplněk [33]. Další testovanou kombinací je STAN1, který obsahuje aspergillopepsin z *Aspergillus niger* a dipeptidyl peptidázu IV z *Aspergillus oryzae*. Dipeptidyl peptidáza-IV (DPP-IV) je exopeptidáza, která uvolňuje X-Pro dipeptidy v gliadinu a přirozeně se vyskytuje v kartáčovém lemu enterocytů. STAN1 byl studován v randomizované klinické studii zahrnující 35 pacientů s celiakií na bezlepkové dietě, kteří dostávali po dobu 12 týdnů 1 g lepku. Tato studie neprokázala významné rozdíly mezi skupinami dostávající STAN1 nebo placebo [34]. Nejnověji popsanou glutenázou je rekombinantně připravená endopeptidáza 40 izolovaná z půdní aktinomycety *Actinoallomurus A8*. Enzym je aktivní při nízkých hodnotách pH 3 až 6 a vykazuje odolnost pro-

ti pepsinu a trypsinu. V žaludku dochází k degradaci gliadin 33-meru, vzniklé peptidy nestimulují T lymfocyty z duodenálních biopsií pacientů s celiakií a uvolňování IFN- γ je výrazně sníženo až k nulovým hodnotám [35]. Glutenáza E40 je navržena jako nový kandidát v orální enzymatické terapii pro nemocné s celiakií.

Kromě glutenáz, které jsou klinicky testovány, existuje na trhu celá řada potravinových doplňků, které podle výrobce štěpí lepek, což vyplývá i z jejich názvů - Digest Gluten, Gluten-Ade, Gluten Cutter, Gluten Defense, Gluten Digest, Gluten Enzyme, Gluten-Zyme, Glutenaid, GlutenEase [36]. Tyto potravinové doplňky obsahují nejrůznější enzymy - proteázy, karboanhydrázy, lipázy nebo glukoamylázy, které sice hydrolyzují lepek, ale nebylo u nich prokázáno, že degradují cytotoxické epitopy gliadinu. Většina výrobců uvádí, že výrobek nebyl schválen FDA, že není určen k prevenci ani léčení konkrétního onemocnění, a že není určen k náhradě bezlepkové diety u nemocných s celiakií.

Detekce gliadin 33-meru ve stolici a moči - monitorování bezlepkové diety

Bezlepková dieta (GFD) je v současné době jedinou a úspěšnou terapií celiakie. Přísné dodržování bezlepkové diety vede k úplné klinické i histologické remisi onemocnění a snižuje riziko dlouhodobých komplikací. Pro monitorování nemocných s celiakií a dodržování GFD lze použít různé postupy. Kritéria ESPGAN v roce 1990 vyžadovala pro ověření efektu GFD další biopsii tenkého střeva s průkazem obnovení slizniční architektury. Rozvoj neinvazivních markerů, především specifických protilátek, nahradilo pro monitorování GFD opakované enterobiopsie. Nejčastějším markerem je dnes stanovení protilátek ke tkáňové transglutamináze nebo deamidovaným gliadinovým peptidům, které vykazují především v dětském věku vyšší senzitivitu. Signifikantní pokles hladiny protilátek je markerem dlouhodobým a výrazně rychlejší pokles byl prokázán pro hladinu I-FABP (Fatty-acid-binding-protein). Střevní typ I-FABP je exprimován především ve zralých enterocytech a je vhodným markerem destrukce enterocytů. Efekt GFD a monitorování diety lze dále sledovat rozvojem střevních funkcí, např. vodíkovým dechovým testem a posuzováním laktózy aktivitu, výjimečně je rovněž používána metoda hodnocení střevní propustnosti absorpcí sacharidů s rozdílným mechanismem absorpce [37, 38].

Zcela novým markerem, který umožňuje posuzovat dodržování GFD je detekce rezistentního, gliadin 33-meru. Výše uvedené markery monitorují efekt bezlepkové diety na patogenetické procesy celiakie. Kvantifikace gliadin 33-meru ve stolici nebo v moči je přímým ukazatelem přítomnosti lepku v potravě a mírou nedodržování bezlepkové diety. Laboratorní metody jsou založeny na detekci se specifickou protilátkou ke gliadin 33-meru. Protilátky ke gliadinu jsou již mnoho let používány v detekci lepku v potravinách k ověření bezlepkového limitu 20ppm definovaného Codex Alimentarius komisí, která rovněž schválila standardizovanou metodou detekce gliadinu ELISA-R5 [39]. Od polyklonálních protilátek ke

gliadinu se přechází k monoklonálním protilátkám [40] a v přehledu 36 komerčních testů jsou použity polyklonální protilátky 9x, monoklonální protilátky R5 -10x, 401.21 - 10x a G12 - 5x [41]. Detekované sekvence gliadinu v komerčně dostupných monoklonálních protilátkách jsou následující: R5 [QQFPF], α 20 [F-RPQQ-PYP-Q], 401.21 [PQ-(PQ/QP)-PFP-(QE/EES)], G12 [QPQ-(L/Q)-P-(Y/F)], A1 [Q-(Q/L)-P-(Y/F)-PQP], 14G11 [gliadin 33-mer] a 13F6 [gliadin 33-mer] [42]. Protilátky proti gliadin 33-meru 14G11 a 13F6 jsou použity v přenosném, osobním detektoru Nima Sensor, který umožňuje ověřování bezlepkového limitu v potravinách [43], a jsou významně citlivější než R5.

Protilátky G12 a A1 jsou navrženy jako nový standard pro detekci lepku v potravinách [42]. Sendvičová ELISA vykazuje detekční limit pro pšenici/gliadinu, ječmen/hordeiny a žito/secaliny <1 ppm prolaminu, pro oves/avenin >1 ppm, v kukuřici/zein a rýži/oryzin byla detekce nulová [44], příkladem je detekce epitopu gliadin 33-meru v pivu [45]. Gliadin 33-mer je rezistentní k proteolytické hydrolyze v gastrointestinálním traktu jak in vivo, tak in vitro. ELISA test s monoklonální protilátkou G12 konjugovanou s křenuvou peroxidázou umožňuje detekci ve stolici při požití 100 mg lepku denně [46]. Koncentrace gliadin 33-meru ve stolici je u zdravých osob s dietou obsahující lepek v rozmezí 200-30 000 ng/g stolice. U nemocných s celiakií, dodržujících bezlepkovou dietu, není gliadin 33-mer ve stolici prokazatelný a při porušení diety jej lze prokázat během tří dnů (fyziologické rozmezí pasáže je 30 - 120 hodin). Rezistentní gliadin 33-mer je střevní sliznicí absorbován a z cirkulace je glomerulární filtrací vylučován do moče. Koncentrace v moči je při běžné stravě v rozmezí 5-200 μ g/L a při porušení bezlepkové diety je gliadin 33-mer prokazatelný již během 2-16 hodin. Detekce gliadin 33-meru v moči je výhodnějším postupem pro klinická sledování nemocných s celiakií nevyžadující odběr stolice. Koncentrace gliadin 33-meru v moči pacientů s celiakií korelovala se stavem atrofie tenkého střeva [47]. Laboratorní metody detekce gliadin 33-meru ve stolici nebo moči používají ELISA technologii, pro POCT detekci v moči byla vyvinuta metoda se SPR (Surface plasmon resonance) biosensorem, umožňující přímou kvantifikaci gliadin 33-meru bez předchozí purifikace. Principem je kompetitivní immunoassay s monoklonální protilátkou G12 a citlivostí metody 1.7 gliadin 33-mer μ g/L [48,49]. Monitoring dodržování bezlepkové diety detekcí gliadin 33-meru ve stolici je zcela zásadní u dětí. Multicentrickou studii byl gliadin 33-mer ve stolici stanoven v souboru 64 dětí při stanovení diagnózy a po následujících 6, 12 a 24 měsících. V době stanovení diagnózy byl gluten detekován u 97 % dětí při průměrné hodnotě 5543 mg lepku/den. Po 6 měsících klesl počet na 13 % s průměrem 144 mg lepku/den a za dva roky opět stoupl na 25 % s hodnotou 606 mg lepku/den [50]. Negativní prediktivní hodnota (97 %) detekce gliadin 33-meru v moči ve vztahu k výsledku biopsie duodena byla testována na souboru 77 nemocných s celiakií dodržujících bezlepkovou dietu [51]. Pozitivní výsledek biopsie s poškozením sliznice (Marsh II-III) byl nalezen u 24 % nemocných, u 94 % z nich byl prokázán lepek v moči, 60 % bylo asymptomatických

a 80 % mělo negativní sérologické markery. U 31 celiaků z 32 bez poškození sliznice s normální biopsií (97 %) nebyl lepek v moči detekovatelný. Refrakterní celiakie je formou onemocnění, kdy dochází k aktivaci T-lymfocytů navzdory předpokládané absenci lepku v potravě. Detekce gliadin 33-meru ve stolici nebo moči nemocných s diagnózou refrakterní celiakie je významným klinickým indikátorem. Tři ze čtyř pacientů s refrakterní celiakií měli během tříměsíčního sledování alespoň dva pozitivní vzorky prokazující gliadin 33-mer v moči prokazující expozici lepkem [52]. Gliadin 33-mer ve stolici jsme stanovili v souboru 75 osob - 20 nemocných s nově zachycenou celiakií, 27 celiakie v remisi, pěti non-responsibilní formy celiakie a tří nemocných s neceliakální glutenovou senzitivitou [53]. Dietu s velmi nízkým obsahem lepku jsme našli pouze u dvou z 20 pacientů s aktivní celiakií a u 13 z 27 celiaků v remisi. U všech pěti osob s non-responsibilní celiakií jsme negativní detekcí gliadin 33-meru ve stolici potvrdili dodržování bezlepkové diety. U dvou osob ze tří s neceliakální glutenovou senzitivitou jsme prokázali dietu s normálním obsahem lepku, prokazující, že bezlepkovou dietu nedodržují (obr. 3). Diskutovanou otázkou bezlepkové diety je význam kojení. Gastroenterologové doporučují kojení do jednoho roku věku dítěte jako významný prostředek prevence celiakie a mateřské mléko v porovnání s náhradním mléčným přípravkem chrání před vznikem celiakie. Gliadinové peptidy se dostávají do mateřského mléka v nepatrném množství - 5 až 1200 µg/L což odpovídá koncentraci 0,005 - 1,2 ppm, a mateřské mléko splňuje bezlepková kritéria 20 ppm [54]. Španělská studie testovala přítomnost gliadin 33-meru ve stolici dětí a ve skupině kojených nemluvnat ve věku 0-6 měsíců byla detekce gliadin 33-meru zcela negativní [55].

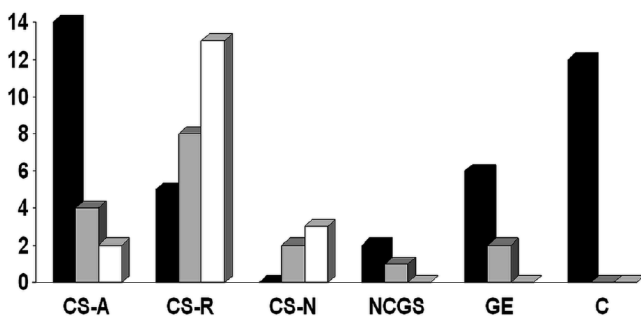


Fig. 2: Number of subjects on a normal gluten diet (black box), low gluten consumption diet (gray box) and a gluten-free diet (white box). Groups of subjects are active celiac disease (CS-A), coeliac disease in remission (CS-R), unresponsive celiac disease (CS-N), non-coeliac gluten sensitivity (NCGS), other gastroenterological diseases (GE), and healthy controls (C).

Literatura

- Gee, S. J.** On the coeliac affection. *St Bartholomew's Hospital Report*, 1988, 24: s. 17-20.
- Dicke, W. K., Weijers, H. A., van de Kamer, J. H.** Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr.*, 1953, 42(1): s. 34-42.
- Osborne, T. B.** The proteins of the wheat kernel. Carnegie Institution of Washington, D. C. Publication No. 84, 1907.
- Woychik, J. H., Boundy, J. A., Dimler, R. J.** Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Arch. Biochem. Biophys.* 1961, 94: s. 477-482.
- Kocna, P., Holáková-Kočová, M., Šašek, A.** Simple starch-gel electrophoresis of gliadin proteins using the LKB-multiphor system. *Z. Lebens. Unters. Forsch.*, 1983, 177(6): s. 454 - 456.
- O'Farrelly, C., Whelan, C. A., Feighery, C. F., Weir, D. G.** Suppressor-cell activity in coeliac disease induced by alpha-gliadin, a dietary antigen. *Lancet*, 1984, 2(8415): s. 1305-1307.
- O'Farrelly, C., Kelly, J., Hekkens, W. et al.** Alpha gliadin antibody levels: a serological test for coeliac disease. *Br. Med. J (Clin. Res. Ed.)*, 1983, 286(6383): s. 2007-2010.
- Tlaskalová, H., Hanikýřová, M., Chýlková, V. et al.** Stanovení antigliadinových protilátek testem ELISA. *Immunol. zpravodaj*, 1990, 19(1): s. 80-84.
- Kocna, P., Frič, P., Kočová-Holáková, M. et al.** Isolation and analysis of alpha-gliadin peptidic fragments using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chrom. Biomed. Appl.*, 1988, 434(2): s. 429-438.
- Kocna, P., Mothes, T., Krchňák, V., Frič, P.** Relationship between gliadin peptide structure and their effect on the fetal chick duodenum. *Z. Lebens. Unters. Forsch.*, 1991, 192(1): s. 116-119.
- Shan, L., Molberg, O., Parrot, I. et al.** Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 2002, 297(5590): s. 2275-2279.
- Molberg, O., Mcadam, S. N., Körner, R. et al.** Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat. Med.*, 1998, 4(6): s. 713-717.
- Arentz-Hansen, H., Körner, R., Molberg, O. et al.** The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp. Med.*, 2000, 191(4): s. 603-612.
- Schumann, M., Siegmund, B., Schulzke, J. D., Fromm, M.** Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 2017, 3(2): s. 150-162.
- Bruun, S. W., Josefsen, K., Tanassi, J. T. et al.** Large Gliadin Peptides Detected in the Pancreas of NOD and Healthy Mice following Oral Administration. *J Diabet. Res.*, 2016, e2424306.
- Alhassan, E., Yadav, A., Kelly, C. P. et al.** Novel Nondietary Therapies for Celiac Disease. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 2019, 8(3): s. 335-345.
- Yoosuf, S., Makharia, G. K.** Evolving Therapy for Celiac Disease. *Front. Pediatr.*, 2019, 14(7): e193.
- Caio, G., Ciccocioppo, R., Zoli, G. et al.** Therapeutic options for coeliac disease: What else beyond gluten-free diet? *Dig. Liver Dis.*, 2020, 52(2): s. 130-137.
- Xia, J., Bergseng, E., Fleckenstein, B. et al.** Cyclic and dimeric gluten peptide analogues inhibiting DQ2-mediated antigen presentation in celiac disease. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, 15: s. 6565-6573.
- Kapoerchan, V. V., Wiesner, M., Hillaert, U. et al.** Design, synthesis and evaluation of high-affinity binders for the celiac disease associated HLA-DQ2 molecule. *Mol. Immunol.*, 2010, 47(5): s. 1091-1097.
- Cornell, H. J., Stelmasiak, T.** The Significance of Key Amino Acid Sequences in the Digestibility and Toxicity of

- Gladin Peptides in Celiac Disease. *Intern.J Celiac. Dis.*, 2016, 4(4): s. 113-120.
22. **Cornell, H. J., Macrae, F. A., Melny, J. et al.** Enzyme therapy for management of coeliac disease. *Scand. J Gastroenterol.*, 2005, 40(11): s. 1304-1312.
 23. **Bethune, M. T., Strop, P., Tang, Y. et al.** Heterologous expression, purification, refolding, and structural-functional characterization of EP-B2, a self-activating barley cysteine endoprotease. *Chem. Biol.*, 2006, 13(6): s. 637-647.
 24. **Siegel, M., Garber, M. E., Spencer, A. G. et al.** Safety, tolerability, and activity of ALV003: results from two phase 1 single, escalating-dose clinical trials. *Dig. Dis. Sci.*, 2012, 57(2): s. 440-450.
 25. **Tye-Din, J. A., Anderson, R. P., Ffrench, R. A. et al.** The effects of ALV003 pre-digestion of gluten on immune response and symptoms in celiac disease in vivo. *Clin. Immunol.*, 2010, 134(3): s. 289-295.
 26. **Lähdeaho, M. L., Kaukinen, K., Laurila, K. et al.** Glutenase ALV003 attenuates gluten-induced mucosal injury in patients with celiac disease. *Gastroenterology*, 2014, 146(7): s. 1649-1658.
 27. **Murray, J. A., Kelly, C. P., Green, P. H. R. et al.** No Difference Between Latiglutenase and Placebo in Reducing Villous Atrophy or Improving Symptoms in Patients With Symptomatic Celiac Disease. *Gastroenterology*, 2017, 152(4): s. 787-798.
 28. **Syage, J. A., Murray, J. A., Green, P. H. R. et al.** Latiglutenase Improves Symptoms in Seropositive Celiac Disease Patients While on a Gluten-Free Diet. *Dig. Dis. Sci.*, 2017, 62(9): s. 2428-2432.
 29. **Gordon, S. R., Stanley, E. J., Wolf, S. et al.** Computational design of an α -gliadin peptidase. Computational design of an α -gliadin peptidase. *J Am. Chem. Soc.*, 2012, 134(50): s. 20513-20520.
 30. **Wolf, C., Siegel, J. B., Tinberg, C. et al.** Engineering of Kuma030: A Gliadin Peptidase That Rapidly Degrades Immunogenic Gliadin Peptides in Gastric Conditions. *J Am. Chem. Soc.*, 2015, 137(40): s. 13106-13113.
 31. **Mitea, C., Havenaar, R., Drijfhout, J. W. et al.** Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut*, 2008, 57(1): s. 25-32.
 32. **Salden, B. N., Monserrat, V., Troost, F. J. et al.** Randomised clinical study: *Aspergillus niger*-derived enzyme digests gluten in the stomach of healthy volunteers. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2015, 42(3): s. 273-285.
 33. **Turck, D., Bresson, J. L., Burlingame, B. et al.** Safety of proline-specific oligopeptidase as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97. *EFSA J.* 2017, 15(2): e04681.
 34. **Ehren, J., Morón, B., Martin, E. et al.** A food-grade enzyme preparation with modest gluten detoxification properties. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6313.
 35. **Cavaletti, L., Taravella, A., Carrano, L. et al.** E40, a novel microbial protease efficiently detoxifying gluten proteins, for the dietary management of gluten intolerance. *Sci. Rep.*, 2019, 9(1): s. 1-11.
 36. **Krishnareddy, S., Stier, K., Recanati, M. et al.** Commercially available glutenases: a potential hazard in coeliac disease. *Therap. Adv. Gastroenterol.*, 2017, 10(6): s. 473-481.
 37. **Moreno, M. L., Rodríguez-Herrera, A., Sousa, C., Comino, I.** Biomarkers to Monitor Gluten-Free Diet Compliance in Celiac Patients. *Nutrients*, 2017, 9(1): e46.
 38. **Rodrigo, L., Pérez-Martínez, I., Lauret-Braña, E., Suárez-González, A.** Descriptive Study of the Different Tools Used to Evaluate the Adherence to a Gluten-Free Diet in Celiac Disease Patients. *Nutrients*, 2018, 10(11): e1777.
 39. **Lester, D. R.** Gluten measurement and its relationship to food toxicity for celiac disease patients. *Plant Methods*, 2008, 4: e26.
 40. **García-Calvo, E., García-García, A., Madrid, R. et al.** From Polyclonal Sera to Recombinant Antibodies: A Review of Immunological Detection of Gluten in Foodstuff. *Foods*, 2021, 10(1): e66.
 41. **Scherf, K. A., Poms, R. E.** Recent developments in analytical methods for tracing gluten. *J Cereal. Sci.*, 2016, 67: s. 112-122.
 42. **Cebolla, Á., Moreno, M. 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): e1927.
 43. **Zhang, J., Portela, S. B., Horrell, J. B. et al.** An integrated, accurate, rapid, and economical handheld consumer gluten detector. *Food Chem.*, 2019, 275: s. 446-456.
 44. **Morón, B., Cebolla, A., Manyani, H. et al.** Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *Am. J Clin. Nutr.*, 2008, 87(2): s. 405-414.
 45. **Comino, I., Real, A., Moreno, M. L. et al.** Immunological determination of gliadin 33-mer equivalent peptides in beers as a specific and practical analytical method to assess safety for celiac patients. *J Sci. Food Agric.*, 2013, 93(4): s. 933-943.
 46. **Comino, I., Real, A., Vivas, S. 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): s. 670-677.
 47. **Moreno, M. L., Cebolla, Á., Muñoz-Suano, A. et al.** Detection of gluten immunogenic peptides in the urine of patients with coeliac disease reveals transgressions in the gluten-free diet and incomplete mucosal healing. *Gut*, 2017, 66(2): s. 250-257.
 48. **Soler, M., Estevez, M. C., Moreno, M. L. et al.** SPR detection of gluten peptides in urine for non-invasive celiac disease follow-up. *Biosens. Bioelectron.*, 2016, 79: s. 158-164.
 49. **Peláez, E. C., Estevez, M. C., Domínguez, R. et al.** A compact SPR biosensor device for the rapid and efficient monitoring of gluten-free diet directly in human urine. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, 412(24): s. 6407-6417.
 50. **Comino, I., Segura, V., Ortigosa, L. et al.** Prospective longitudinal study: use of faecal gluten immunogenic peptides to monitor children diagnosed with coeliac disease during transition to a gluten-free diet. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2019, 49(12): s. 1484-1492.
 51. **Ruiz-Carnicer, Á., Garzón-Benavides, M., Fombuena, B. et al.** Negative predictive value of the repeated absence of gluten immunogenic peptides in the urine of treated celiac patients in predicting mucosal healing: new proposals for follow-up in celiac disease. *Am. J Clin. Nutr.*, 2020, 112(5): s. 1240-1251.
 52. **Moreno, M. L., Sánchez-Munoz, D., Sanders, D. et al.** Verifying Diagnosis of Refractory Celiac Disease With Urine Gluten Immunogenic Peptides as Biomarker. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 7: e601854.
 53. **Kocna, P., Vaničková, Z., Dvořák, M., Kohout, P.** Monitorování nemocných s celiakií, dodržování bezlepkové diety – vlastní zkušenosti s testem detekce 33mer-gliadinu ve stolici. Sborník - XXII. Hradecké gastroenterologické a hepatologické dny, Hradec

Králové. 2018; s. 37-38; Mařatkova gastroenterologie-
videoknihovna - [https://video.endoscopy.cz/prezentace/
monitorovani-nemocnych-s-celiakii-dodrzovani-
bezlepkove-diety-vlastni-zkusenosti-s-testem-detekce-
33mer-gliadinu-ve-stolici](https://video.endoscopy.cz/prezentace/monitorovani-nemocnych-s-celiakii-dodrzovani-bezlepkove-diety-vlastni-zkusenosti-s-testem-detekce-33mer-gliadinu-ve-stolici)

54. **Chirido, F. G., Rumbo, M., Añón, M. C., Fossati, C. A.** Presence of high levels of non-degraded gliadin in breast milk from healthy mothers. *Scand. J Gastroenterol.*, 1998, 33(11): s. 1186-1192.
55. **Roca, M., Donat, E., Masip, E. et al.** Detection and quantification of gluten immunogenic peptides in feces of infants and their relationship with diet. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 2019, 111(2): s. 106-110.

Autor prohlašuje, že není ve střetu zájmů.

Do redakce došlo 17. 3. 2021

Adresa pro korespondenci
MUDr. Petr Kocna CSc.
Laboratoř gastroenterologie
Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky
1. LF UK a VFN Praha
Na Bojišti 3
Praha-2, 121-08
email: kocna@lf1.cuni.cz