Biokemijska podloga celijakije

Kušec, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:662752

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Iva Kušec

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

BIOKEMIJSKA PODLOGA CELIJAKIJE

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2019.

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 14. srpnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 20. rujna 2019.

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK VIII
§ 1. UVOD 1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME II
2.1. Celijakija ii
2.2. Gluten iii
2.3. Odgovor na unos glutena iv
2.3.1. Transglutaminaza 2 ..... *iv*
2.3.2. Mehanizam imunološkog odgovora ..... *v*
2.3.3. Anti-TG2 antitijela ..... *vi*
2.3.4. Nastanak atrofije vila ..... *vii*
2.4. Vanjske manifestacije celijakije viii
2.4.1. Transglutaminaza 3 ..... *viii*
2.4.2. Transglutaminaza 6 ..... *ix*
2.5. Utjecaj okolinskih faktora na razvoj bolesti x
2.5.1. Utjecaj ranog uvođenja glutena u prehranu ..... *x*
2.5.2. Utjecaj crijevnih infekcija ..... *xi*
2.5.3. Utjecaj načina porođaja ..... *xi*
2.5.4. Utjecaj upotrebe antibiotika ..... *xii*
2.5.5. Utjecaj mikrobioma ..... *xii*
2.6. Utjecaj genetskih faktora na razvoj bolesti xiii
2.7. Načini dijagnoze celijakije xiv
2.8. Načini liječenja celijakije xv
2.8.1. Bezglutenska prehrana ..... *xv*
2.8.2. Larazotid Acetat ..... *xv*
2.8.3. Endopeptidaze ..... *xvi*
2.8.4. Terapija desenzibilizacijom ..... *xvi*
§ 3. LITERATURNI IZVORI XVII

§ Sažetak

Celijakija ili glutenska enteropatija je autoimuna bolest koja se sve češće pojavljuje u svim dobnim skupinama. Do pojave celijakije dolazi konzumiranjem glutena kod pojedinaca s genetskom predispozicijom. Kod pojedinaca s HLA halotipom se ne mora razvitim celijakija iako takvi pojedinci imaju genetsku predispoziciju. Glutenski peptidi djelomično razgrađeni prolaze kroz epitel nakon čega se deamidiraju pomoću enzima transglutaminaze 2. Deamidacijom glutenskih peptida dolazi do nastanka kompleksa koji aktivira proizvodnju specifičnih CD4 T+ stanica. Za celijakiju karakteristična je pojava antitijela anti-TG2 i specifičnih T stanica u serumu bolesnika. Na pojavu celijakije utjecaj imaju i okolinski faktori, no njihov točni utjecaj mora se još dodatno istražiti. Dijagnoza celijakije temelji se na biopsiji sluznice tankog crijeva. Do danas nije otkriven lijek koji bi izliječio pojedince od celijakije. Jedina provjerena terapija je bezglutenska prehrana. Nadalje nije otkriven niti točni mehanizam koji uzrokuje promjene u tankom crijevu bolesnika. Potrebna su dodatna istraživanja cjelokupnog mehanizma nastanka celijakije kako bi se poboljšalo liječenje i život pacijenata.

§ 1. UVOD

Primarna uloga imunološkog sustava je zaštita organizma domačina od invazije stranih organizama, no imunološki sustav ponekad griješi u raspoznavanju vlastitih i stranih stanica. Autoimune bolesti pripadaju u kategoriju bolesti izazvanih imunološkim odgovorom organizma na vlastite antigene. Imunološki odgovor na vlastite antigene rezultira oštećenjem tkiva koji eksprimira antigen. Reumatoidni artritis, celijakija, Chronova bolest, dijabetes tipa 1 i multipla skleroza samo su neke od mnogih autoimunih bolesti. U mnogim autoimunim bolestima razlog odgovora na vlastite antigene nije u potpunosti razjašnjen, no postoje određene spoznaje o nastanku imunoloških stanica koje prepoznaju vlastite antigene.

Imunološke stanice koje prepoznaju vlastite antigene se generiraju u organizmu, ali postoji selektivni mehanizam koji ih eliminira kod zdravih osoba. T stanice koje sudjeluju u tom mehanizmu nastaju u timusu. Timus je organ smješten iznad srca. T stanice nastaju sazrijevanjem timocita. Selekcijski mehanizam temelji se na uništavanju 98% timocita tijekom procesa sazrijevanja.[3] Populacija timocita prvo je podvrgnuta pozitivnoj selekciji kako bi se uklonile stanice koje izražavaju receptore T satnica koje se ne vežu na glavni kompleks histokompatibilnosti (eng. *Major histocompatibility complex*, MHC). Kod ljudi se MHC naziva ljudski leukocitni antigen (eng. *Human Leukocyte Antigen*, HLA) o kojem će biti riječi u kasnijim poglavljima. Nakon pozitivne selekcije dolazi do negativne. Negativnom selekcijom uklanjaju se stanice koje se vežu s velikim afinitetom na MHC kompleks vezan na površinu antigen prezentirajućih stanica (eng. *Antigen Presenting Cells*, APC). Negativna selekcija omogućuje prepoznavanje vlastitih antigena od strane imunološkoh sustava. Poremećaji u ovim mehanizmima dovode do pojave autoimunih bolesti.

Ovaj rad daje sažet opis autoimune bolesti pod nazivom celijakija poznate i kao glutenska enteropatija. Razjasnit će se i utjecaj okolinskih i genetskih faktora u njezinoj pojavi. Nadalje u ovom radu će biti objašnjena i klinička slika celijakije te nastanak same bolesti na biokemijskoj razini u stanicama. Pojasnit će se i nastajanje stanica specifičnih za celijakiju i antitijela. Na kraju, obradit će se načini dijagnoze celijakije i njezinog liječenja, a sve to s ciljem boljeg razumijevanja celijakije kao autoimune bolesti modernog doba.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Celijakija

Celijakija ili glutenska enteropatija je kronična autoimuna bolest koja nastaje kao odgovor na unos glutena u organizam kod individualaca s genetskom predispozicijom za njezin razvoj. Za razvitak celijakije neophodan je unos glutena. Osobe s genetskom predispozicijom ne moraju razviti glutensku enteropatiju. Pojavi bolesti doprinose i okolinski faktori uz genetsku predispoziciju. Celijakija je danas vrlo rasprostranjena bolest te je prisutna kod ljudi različite životne dobi. Broj oboljelih je u stalnom porastu u posljednjim desetljećima, čemu doprinose novi testovi razvijeni za dijagnosticiranje celijakije, ali i pojačana svijest o samoj bolesti. Celijakija se češće javlja kod žena i u područjima s velikom konzumacijom glutena.[2]

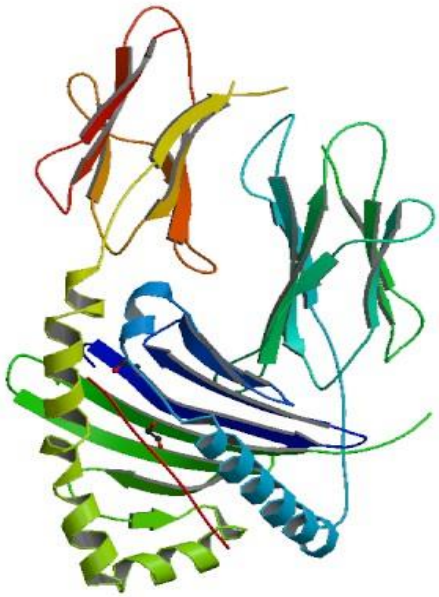
Celijakija se prvenstveno manifestira u tankom crijevu u kojem dolazi do atrofijecrijevnih resica i hiperplazije kripti to jest do oštećenja sluznice tankog crijeva. Klinička slika oboljelih je široka te uključuje gastrointestinalni poremećaj, kronični umor, slabu apsorpciju hranjivih tvari i slab rast.[2] U serumu oboljelih prisutna su i specifična antitijela te deamidirani peptidi proteina glijadina.

Vanjske manifestacije celijakije vidljive su kod odraslih i kod djece. Kod neliječene djece dolazi do pojave anemije, zakašnjelog puberteta, smanjene gustoće kosti i pojave oralnih ulkusa.[2] Simptomi koji se pojavljuju neliječenjem bolesti manifestiraju se i na neurološkoj razini. U takvim slučajevima dolazi do poremećaja u ponašanju te smanjenja učinkovitosti u školi.

Celijakija je povezana s povećanim rizikom pojave autoimunih bolesti, kao što je dijabetes tipa 1, Gravesova bolest i Hashimoto tireoiditis. Istraživanje Danske populacije pokazalo je povećanje obolijevanja od ostalih autoimunih bolesti kod osoba s celijakijom. 16,4% osoba s celijakijom razvija dodatni autoimuni poremećaj. Postoji i dodatna povezanost celijakije i dijabetesa tipa 1. Prosječno 5% pacijenata s celijakijom ima dijabetes tipa 1 i 6% oboljelih od dijabetesa tipa 1 ima celijakiju. Zajednička pojava autoimunih bolesti podupire teoriju o zajedničkim imunološkim putevima koji doprinose gubitku tolerancije na vlastite antigene. Danas nije poznato da li celijakija direktno dovodi do pojave ostalih autoimunih bolesti. [2]

2.2. Gluten

Gluten je kompleksna mješavina oko 70 proteina koji se mogu naći u pšenici, ječmu i raži. Proteini od kojih je građen gluten bogati su aminokiselinama prolinom i glutaminom što ih čini netopljivima u vodi i teško probavljivima. Djelomičnom razgradnjom nastaju pepti koji pokreću imunološki odgovor. Visok udio prolina i glutamina, u proteinima koji grade gluten, doprinosi i lakšoj deamidaciji enzimom transglutaminazom 2 (TG2). Najveći udio u glutenu zauzimaju proteini glijadini i glutenini. Glutenini su proteini netopivi u alkoholu dok su glijadini topivi u alkoholu. Glijadini se mogu podijeliti u skupine na temelju njihove elektroforetske mobilnosti. Prvu skupin čine α i β glijadini, drugu skupinu čine γ-glijadini i posljednju ω-glijadini.[4] Aminokiselina prolin štiti glijadinske i gluteninske epitope od razgradnje u probavnom sustavu. Deamidacijom glutamina, koji se nalazi u peptidima nastalim djelomičnom razgradnjom glutena u tankom crijevu, nastaje glutamat u glutenskim peptidima. Deamidirani glutenski peptidi posjeduju veći afinitet za vezanje na HLA-DQ2 ili HLA-DQ8 proteine.



Slika 1. Kristalna struktura HLA-DQ2 u kompleksu s deamidiranim peptidom gliadina[11]

Postoje stotine peptida koji mogu pokrenuti imunološki odgovor, no nisu svi jednako štetni. Imunogeni peptidi glutena određuju se izolacijom T stanica pacijenata nakon kratkog oralnog glutenskog izazova. Istraživanjima se pokušavaju odrediti epitopi T stanica. Glavna dva peptida koji ostaju neprobavljeni su polimeri 33 (od 55. aminokiseline do 87. aminokiseline) i 25 (od

31. aminokiseline do 55. aminokiseline). Peptid lociran na poziciji 31-43 α-glijadina, koji je sadržan u polimeru od 25 aminokiselina, predstavlja toksični peptid. Peptid koji se nalazu na poziciji 56-68 α-glijadina, a sadržan je u polimeru od 33 aminokiseline, smatra se najvažnijom imunogenom sekvencom u glutenu. Novijim istraživanjima pokazano je da α-glijadini i ω-glijadin uzrokuju snažan odgovor u većini pacijenata koji pate od celijakije. Moguće je da određeni imunogeni glutenski epitopi mogu biti tolerirani kod određenih pacijenata ovisno o osjetljivosti. Zanimljivo je da kod nekih pacijenata dolazi do nastajanja T stanica nakon probave zobi odnosno aveninskih peptida koji se nalaze u sastavu zobi.[4]

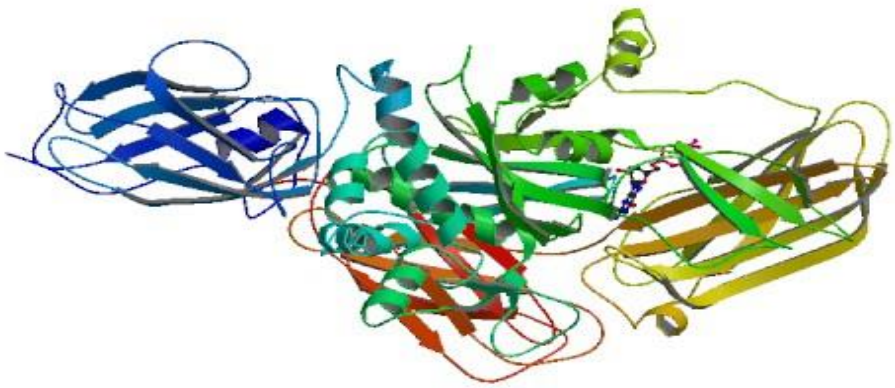
2.3. Odgovor na unos glutena

2.3.1. Transglutaminaza 2

Transglutaminaza 2 (TG2), enzim je koji igra centralnu ulogu u inicijaciji imunološkog odgovora na prehrambeni gluten. TG2 je prva transglutaminaza otkrivena u ljudskom organizmu.[1] Transglutaminaza 2 pripada velikoj obitelji proteina koja katalizira stvaranje kovalentnih veza između amino grupe i karboksiamidne grupe glutamina. Identificirano je 8 različitih transglutaminaza u sisavcima. Svih osam enzima posjeduju sličnost u sekvencama iako se razlikuju u regulaciji i specifičnosti supstrata.

Enzim se sastoji se od 687 aminokiselina i četiri domene.[10] Vezanjem gvanozin trifosfata na transglutaminazu 2 dolazi do konformacijske promjene čime se enzim inhibira. Enzim transglutaminaza 2 eksprimiran je u različitim tkivima i tipovima stanica.

Izvanstanična transglutaminaza 2 ima ulogu u regulaciji citoskeleta umreženjem izvanstaničnih proteina kao što su fibronektini. Unutarstanični enzim sudjeluje u prijenosu signala tijekom procesa opasnih za stanicu kao što su ranjavanje, hipoksija i oksidacijski stres. Uloga transglutaminaze 2 tijekom probave glutena je deamidacija aminokiseline glutamina u glutamat pri čemu nastali peptidi mogu proći kroz epitel tankog crijeva. Radi se o reakciji u kojoj enzim transglutaminaza 2 reagira s vodom. Anti-TG2 antitijela su autoantitijela na antigen proteina transglutaminaze 2. Važnost anti-TG2 antitijela bit će objašnjena u naknadnom poglavlju.



Slika 2. Kompleks enzima transglutaminaze 2 i GTP-a[9]

2.3.2. Mehanizam imunološkog odgovora

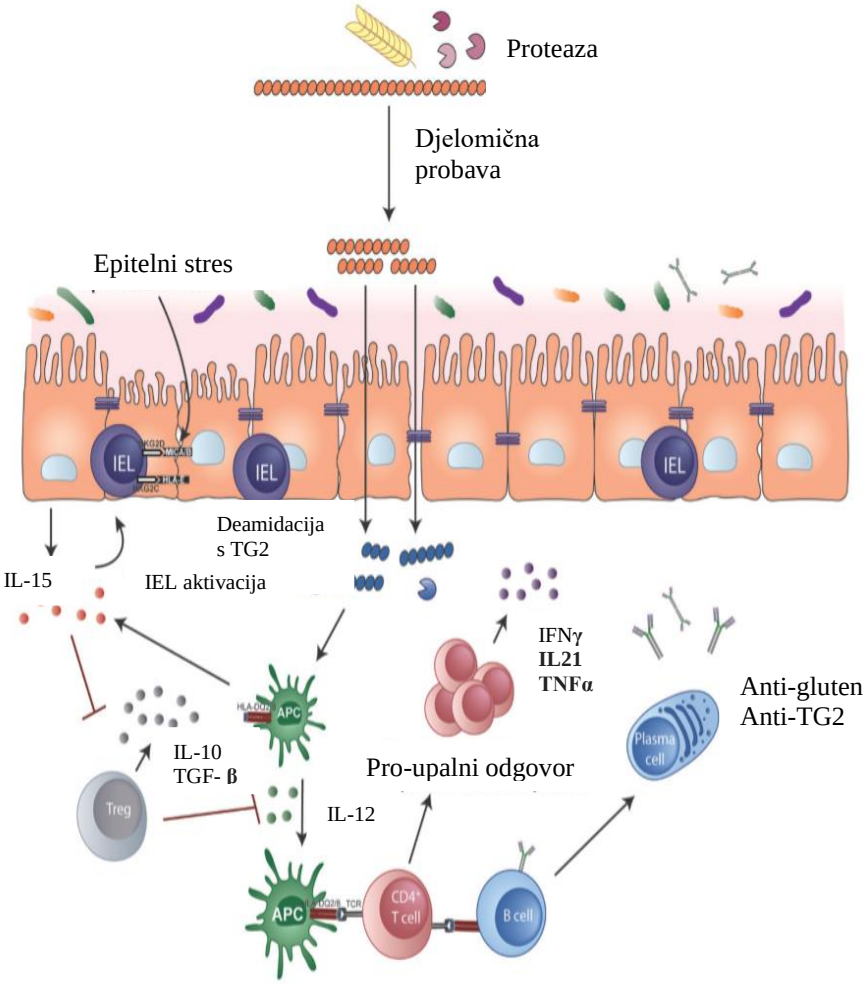
Deamidacijom peptida glutena, koji sadrže epitope T stanica, enzimom transglutaminaza 2 dolazi do aktivacije T stanica. Glutaminske aminokiseline iz peptida deamidacijom se prevode u glutamat. Modifikacijom prvobitnih peptida glutena povećava se njihov afinitet za vezanje na HLA dimere. HLA-DQ molekule vezane su na antigen prezentirajuće stanice.

Nastali kompleks aktivira specifične glutenske stanice CD4+ T stanice. Aktivacija T stanica popraćena je proizvodnjom citokina što zazuzvrat promovira upalu i oštećenje crijevnih resica unutar tankog crijeva. Citokini koji promoviraju upalu tankog crijeva i odgovor B stanica su IFN-γ i IL-21. Imunosupresivni citokini IL-10 i TGF- β mogu se detektirati u visokim koncentracijama kod imunološkog odgovora, ali nedovoljnima da spriječe aktivni oblik bolesti.[2] Visoke koncentracije citokina koji promoviraju upalne procese čine imunosupresivne citokine neadekvatnima za inhibiciju.

IL-15 je citokin koji ima potencijal da omogući aktivaciju specifičnih CD4+ T stanica. IL-15 promovira akumulaciju citotoksičnih intraepitelnih limfocita (eng. IEL, *Intraepithelial Lymphocyte*) . IL-15 citokini interferiraju sa aktivnošću regulacijskih T stanica (*Tregs*) to jest

komponenata koje doprinose crijevnoj homeostazi. Regulacijske T stanice imaju supresivnu aktivnost. IL-15 citokini stoga su meta u razvijanju novih lijekova za liječenje celijakije. Trenutno se razvijaju anti-IL-15 biološki agensi.

Nastanak antitijela specifičnih za celijakiju proces je ovisan o T stanicama. Nastanak antitijela na enzim transglutaminazu 2 i deaminirane glijadinske peptide strogo ovisi o prisutnosti HLA kao i o prisutnosti glutena.[2]



Slika 3. Mehanizam imunološkog odgovora kod celijakije (preuzeto i prilagođeno)[2]

2.3.3. Anti-TG2 antitijela

Anti-TG2 i anti-gluten antitijela nastaju djelovanjem B stanica to jest limfocita u tankom crijevu. Nastanak autoantitijela anti-TG2 ovisan je o unosu glutena. Do njihovog smanjenja u organizmu oboljelih dolazi nakon eliminacije glutena iz prehrane. Anti-TG2 antitijela vrlo su specifična (>90%) za celijakiju stoga se koriste kod dijagnostičkih postupaka.[1] Anti-TG2 antitijela se vežu u srž enzima TG2 i na nekoliko njegovih epitopa, čime utječu na njegovu

aktivnost. Transglutaminaza 2 nalazi se u skoro svim stanicama tijela stoga nastanak autoantitijela imaju potencijal negativnog utjecaja na aktivnost enzima izvan tankog crijeva. Enzim transglutaminaza 2 sudjeluje u diferencijaciji stanica epitela preko transformirajućeg faktora rasta (TGF-β). Vezanjem antitijela na transglutaminazu 2 dolazi do smanjenja diferencijacije stanica epitela i povećanja permeabilnosti epitela. Podaci novijih in vitro istraživanja ukazuju na moguća oštećenja posredovana anti-TG2 antitijelima.[1] Anti-TG2 antitijela prema tim istraživanjima sudjeluju u nastanku atrofije crijevnih resica i hiperplaziji kripti.

IgA anti-TG2 autotantitijela prisutna su u jetri, mišićima, limfnim čvorovima, kostima i mozgu . Prisustvo autoantitijela u dijelovima organizma izvan tankog crijeva ukazuje da cirkulirajuća autoantitijela koja potječu iz tankog crijeva mogu pristupiti autoantigenu u cijelom tijelu i potencijalno mogu imati određene patogene učinke. Disfunkcija štitnjače i smanjena gustoća kostiju neki su od simptoma celijakije za koje se smatra da su posredovani upravo anti-TG2 antitijelima. Za autoantitijela nađena u mozgu predviđa se da uzrokuju poremećaj krvno-moždane barijere, što uzrokuje dodatno izlaganje središnjeg živčanog sustava ostalim autoantitijelima i ostalim toksinima. Kod miševa je pokazano da injektiranje anti-TG2 antitijela u mozak uzrokuje nedostatke u motoričkoj koordinaciji. Budući da u tijelu postoje i drugi enzimi slični TG2, anti-TG2 antitijela imaju potencijal da interferiraju i s njihovim funkcijama i tako još više doprinose simptomima izvan područja probanog sustava. Potrebna su dodatna istraživanja o autoantitijelima koja se pojavljuju tijekom probave glutena kako bi se celijakija i njezine vanjske manifestacije bolje shvatile.[6]

2.3.4. Nastanak atrofije crijevnih resica

Histološke promjene glutenske enteropatije nisu u potpunosti objašnjene. Ulaskom glutena u probavni sustav dolazi do njegove djelomične razgradnje u peptide pomoću proteaza. Gluten se djelomično razgrađuje zbog visoke koncentracije aminokiseline prolina. Nastali peptidi prolaze kroz epitel nakon čega dolazi do deamidacije. Povećana permeabilnost epitela tankog crijeva, za koju se smatra da je posredovana direktnim efektom djelovanja glijadina, karakteristična je za celijakiju. Vezanjem deamidiranih peptida za kompleks HLA i APC-a dolazi do aktivacije CD4+ T. CD4+ T stanice karakteristične su za celijakiju. CD4+ T stanice proizvode citokine IFN-γ, IL-17, IL-17A i IL-21. IFN-γ mogu prouzročiti citotoksičnost intraepitalnih limfocita kao i IL-21 citokini. IL-21 citokini imaju ulogu u odgovoru B stanica

koji je posredovan nastankom T stanica. CD4+ T stanice koje proizvode IL-17 citokini zabilježeni su kod pacijenata s netretiranom celijakijom. Uloga IL-17 i IL-17A citokina u patogenezi celijakije trenutno nije poznata. IL-15 i IFN-α stanice nađene su također u upaljenom tkivu pacijenata. Za intraepitalne limfocite (IEL) vjeruje se da imaju važnu ulogu u uništavanju stanica epitela to jest enterocita. Intraepitalni limfociti aktiviraju se epitalnim stresom pri čemu izražavaju veliku razinu aktivacijskih receptora NK (*Natural Killer*) kako što je NKG2D i CD94/NK62C.[2] Citokini IL-15 povećavaju ekspresiju NKG2D recptora djelujući kao dodatna stimulirajuća molekula. Toksični intraepitalni limfociti tada uništavaju stanice epitela koje izražavaju molekule izazvane stresom.

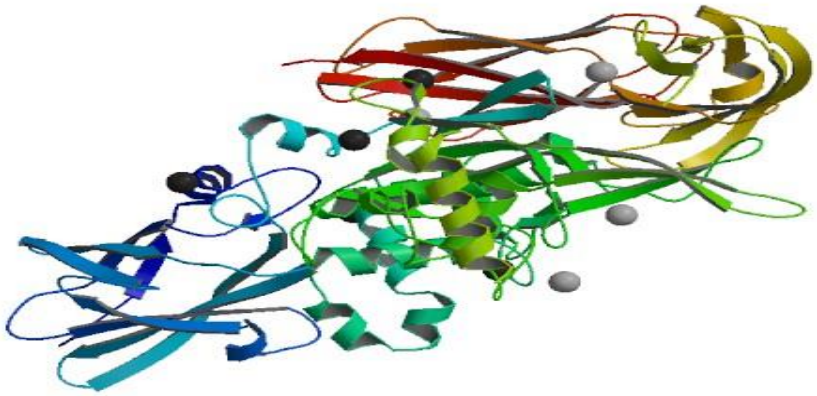
Uzroci epitelnog stresa koji pokreće aktivaciju IEL-a i transformaciju, u celijakiji nisu poznati. Postoje hipoteze kojima se pretpostavlja da je aktivacija intraepitalnih limfocita posredovana direktno glutenom ili sadržajem mikroba u tankom crijevu. Pretpostavlja se da glijadin funkcionira kao signal za stres koji na kraju omogućuje aktivaciju IEL-a.

2.4. Vanjske manifestacije celijakije

2.4.1. Transglutaminaza 3

Antitijela koja se pojavljuju kod vanjskih manifestacija nastaju na enzime transglutaminazu 6 i transglutaminazu 3. Transglutaminaza 3 poznata i kao epidermalna transglutaminaza uglavnom se eksprimira u gornjem sloju epiderma. TG3 esencijalan je enzim za održavanje homeostaze kože. Povišene razine anti-TG3 antitijela pojavljuju se u 95% pacijenata s dermatitis herpetiformis.[1] Dermatitis herpetiformis kožna je manifestacija celijakije. Antitijela na TG3 stoga služe u dijagnostičkim postupcima.

Reakcijom anti-TG2 antitijela s enzimom transglutaminazom 3 mogu nastati anti-TG3 antitijela. Daljnjim unošenjem glutena u organizam čime dolazi do nastajanja anti-TG2 rezultira u nastajanju specifičnih anti-TG3 antitijela. Uvođenjem bezglutenske prehrane kod pacijenata dolazi do sporog smanjenja anti-TG3 antitijela za razliku od anti-TG2 antitijela čija se koncentracija smanjuje većom brzinom.[1]

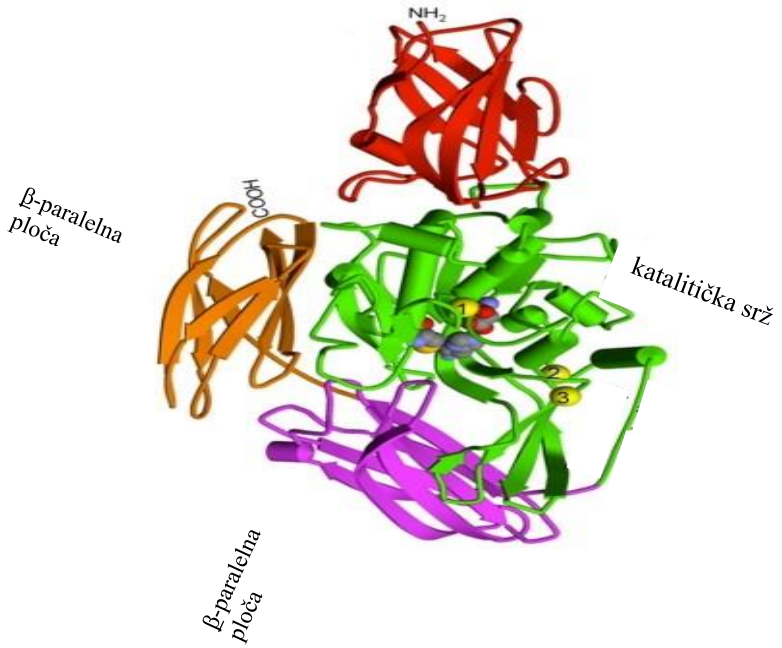


Slika 4. Struktura enzima transglutaminaze 3[13]

2.4.2. Transglutaminaza 6

Vanjske manifestacije celijakije pojavljuju se i na neurološkoj razini. Periferna neuropatija i cerebelarna ataksija su neki od neuroloških simptoma vezanih uz celijakiju. Antitijela na TG6 detektirana su kod pacijenata s glutenskom neuropatijom. Anti-TG6 antitijela vezanjem na enzim transglutaminazu 6 mogu utjecati na njegovu biološku aktivnost. Istraživanje u kojem su miševima injektirana TG2 antitijela osoba s celijakijom pokazala su da tada dolazi do deficita u motoričkoj koordinaciji.[1] No, potrebna su dodatna istraživanja specifičnosti anti-TG6 antitijela budući da su nađena i kod pacijenata s drugom stanjima.

Transglutaminaza 6 poznata i kao neuronska transglutaminaza, eksprimira se u podskupini neurona te je važna u procesu neurogeneze. TG6 posebno je važna u razvoju živčanog sustava i motoričkih funkcija. Transglutaminaza 6 i transglutaminaza 2 posjeduju mnogo sličnosti. Transglutaminaza 6 kodirana je na istom kromosomu kao i TG2 kod ljudi.[1] Nadalje TG6 može deamidirati peptide glutena i stvarati komplekse s glutenom kao i TG2, ali u manjoj mjeri. Za razliku od anti-TG2 antitijela koja se smanjuju na bezglutenskoj prehrani, kod anti-TG6 antitijela nije primijećeno smanjenje. Novijim istraživanjima na pedijatrijskoj skupini pacijenata utvrđena je korelacija između reaktivnosti anti-TG6 antitijela i trajanja izlaganja glutenu.[1]



Slika 5. Struktura enzima transglutaminaze 6 (preuzeto i prilagođeno)[12]

2.5. Utjecaj okolinskih faktora na razvoj bolesti

2.5.1. Utjecaj ranog uvođenja glutena u prehranu

Tijekom sredine osamdesetih godina prošlog stoljeća u Švedskoj, došlo je do povećanja broja djece s razvijenom celijakijom.[2] Povećanjem broja oboljelih dovedena je u pitanje povezanost vremena uvođenja glutena u prehranu djece i razvijanja celijakije. Povećanje broja oboljelih zabilježeno je nakon uvođenja novih preporuka o hranjenju dojenčadi, ali i povećanja sadržaja glutena u hrani za djecu. Nove preporuke su sugerirale odgodu uvođenja glutena između dobi od četiri do šest mjeseci života. Hipoteza o povezanosti prvog unosa glutena i razvijanja celijakije potvrđena je u istraživanju koje je pokazalo da prerani unos, ali i prekasni unos glutena povećavaju rizik od razvijanja celijakije.[2,6] Studija koja je provjeravala hipotezu o povezanosti razvijanja celijakije i količine glutena konzumiranog prije 2 godine života, pokazala je da djeca koja unose veće količine imaju veću vjerojatnost razvitka celijakije. Djeca koja su unosila manje količine glutena imala su manju vjerojatnost kasnijeg razvijanja celijakije. Istraživanja na ovu temu su izrazito kontroverzna.[2] Novije istraživanje u kojoj su sudjelovale europske države nije pokazalo povezanost između ranog unosa glutena ili količine unosa glutena u ranijoj dobi i celijakije. Povezanost je pokazana samo kod djece s HLA-DQ2/DQ7 halotipovima.[2] Nova istraživanja na tu temu su još uvijek u nastajanju.

2.5.2. Utjecaj crijevnih infekcija

Znanstvena istraživanja pokazala su određenu povezanost pojave celijakije s raznim infekcijama tijekom ranog razvoja. Razvijanje celijakije je povezano s virusnim infekcijama koje pogađaju organizam tijekom važnog perioda u razvoju imunološkog sustava. Rotavirus je posebno doveden u asocijaciju s pojavom celijakije. Nekoliko je studija pokazalo da antitijela na adenovirus i rotavirusne peptide cirkuliraju u serumima pacijenata sa celijakijom.[2] Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se odredio značaj tih povezanosti s patogenezom bolesti u ovome slučaju.

Do sada nije objašnjeno na koji način infekcije povećavaju mogućnost pojave celijakije, no postoje određene teorije. Infekcije koje pogađaju gastrointestinalni trak mogu povećati permeabilnost tankog crijeva. Povećanjem permeabilnosti dolazi do povećanja prolaznosti glutena preko sluznice tankog crijeva, poveća se razina enzima tkivne transglutaminaze 2 što povećava stvaranje deaminiranih glutenskih peptida. Postoji mogućnost da strani antigen posjeduje sličnosti sa sekvencama glijadina čime bi se inicirao odgovor na gluten u zaraženom organizmu. Adenovirus tipa 12 i glijadin posjeduju homologne sekvence.[6] Zaraza adenovirusom tipa 12 stoga može promovirati autoimunost kod osoba s genetskom predispozicijom pojave celijakije.

Novija istraživanja o povezanosti virusnih infekcija s celijakijom na miševima, ukazala su na gubitak tolerancije prema antigenima proteina iz hrane nakon zaraze. Miševi zaraženi reovirusima gube toleranciju prema antigenima iz hrane čime dolazi do patogenog odgovora T stanica. Reovirusi blokiraju konverziju T stanica u regulacijske T stanice (*Tregs*) i promoviraju upalni odgovor na antigene u hrani. Zanimljivo je da su pacijenati oboljeli od celijakije imali povećanu koncentraciju anti-reovirusnih antitijela u organizmu. Iako su neka istraživanja pokazala povezanost između virusnih i bakterijskih interakcija ili infekcija s celijakijom, potrebna su dodatna istraživanja koja bi utvrdila kako se celijakija posljedično aktivira.[2]

2.5.3. Utjecaj načina porođaja

Proturječni rezultati dobiveni su i u istraživanjima povezanosti načina porođaja s kasnijim razvijanjem celijakije. Ranija istraživanja pokazala su vezu između porođaja carskim rezom i razvijanja celijakije kasnije u životu. Vrsta porođaja ima jaki utjecaj na oblikovanje početnog sadržaja mikrobioma crijeva. Djeca rođena na carski rez imaju drugačiji sadržaj crijevnih bakterija od onih rođenih vaginalnim putem. Način carskog reza to jest izborni ili hitni, isto

utječe na početni sadržaj mikrobioma. Djeca rođena hitnim carskim rezom ili vaginalnim putem su izloženi fekalnim i vaginalnim bakterijama dok su djeca rođena izbornim carskim rezom prvotno izložena bakterijama osoblja i bolnice u kojima su rođena. Takve razlike mogu utjecati na razvoj imunološkog sustava kod djece. Međutim, novija istraživanja nisu pronašla asocijaciju između načina porođaja i razvoja celijakije. Potreban su dodatna istraživanja kako bi se točno odredilo postoji li asocijacija između naćina porođaja i pojave celijakije.[6]

2.5.4. Utjecaj upotrebe antibiotika

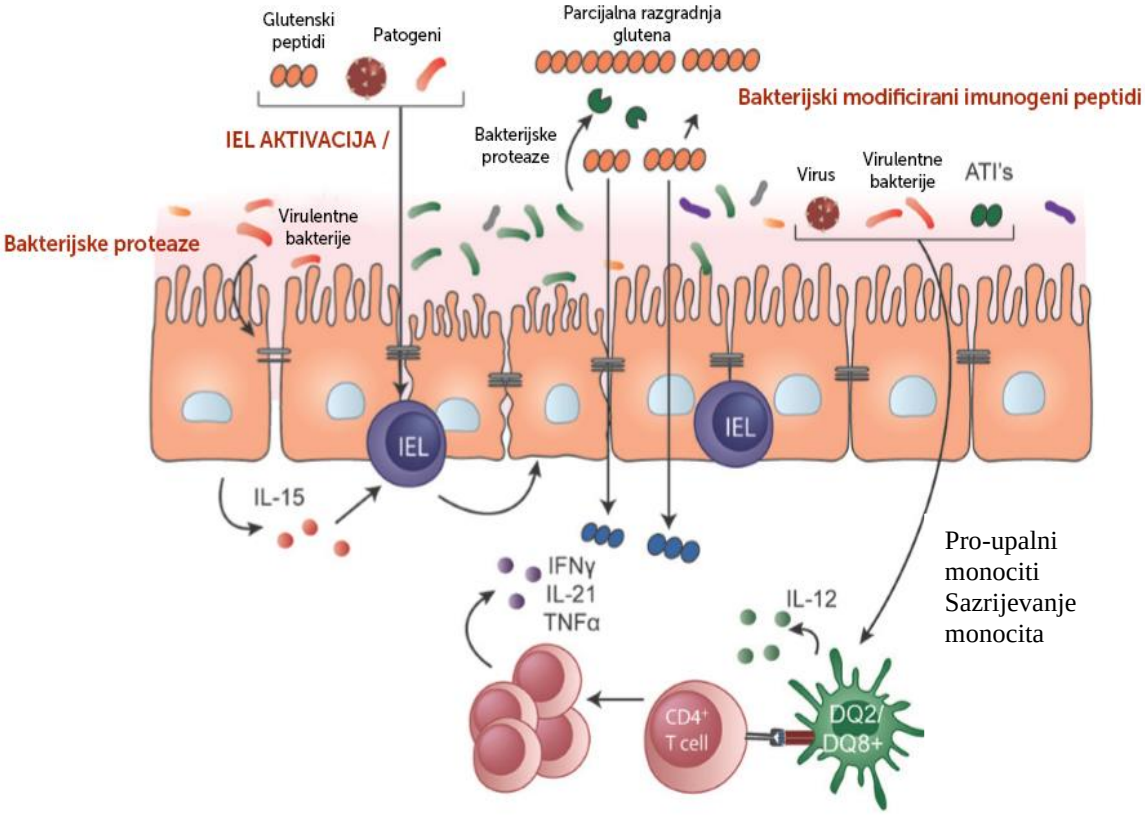
Antibiotici mogu promijeniti sadržaj mikrobiote to jest crijevne mikroflore. Istraživanja provedena kako bi se utvrdila veza između korištenja antibiotika i pojave celijakije dala su proturječne podatke. Rana istraživanja na tu temu povezala su korištenje antibiotika s pojavom celijakije kod djece i kod odraslih. Novija istraživanja nisu pronašla vezu između korištenja antibiotika tijekom prve ili druge godine života i pojave celijakije kasnije.[2] Iako su podaci dobiveni raznim studijama proturječni potrebna su dodatna istraživanja budući da antibiotici mogu promijeniti sadržaj mikrobiote.

2.5.5. Utjecaj mikrobioma

Mikrobiom je važan za normalni razvoj imunološkog sustava i oralne tolerancije.[6] Razvitak crijevne mikroflore događa se pri rođenju. Interakcije koje tada nastaju između domaćina i mikroorganizama nastavljaju se tijekom života. Promjene u kompoziciji crijevne mikroflore dovedene su u pitanje s razvitkom autoimunosti. Promjene u sastavu mikrobiota primijećene su kod pacijenata s celijakijom. Kliničke studije ukazale su i na razliku u mikrobnom sastavu pacijenata u aktivnom stadiju bolesti i pacijenata u remisiji. Genotipovi kod kojih je zabilježen veći rizik razvitka bolesti asocirani su sa smanjenim brojem bakterija *Bifidobacterium* i *B. longum* i povečani broj *B. fragilis* i *Staphylococcus app*. bakterija.[2,6] Razlike u mikrobiomu zamijećene su kod različitog načina hranjenja dojenčadi s genotipovima koji imaju povećani rizik oboljevanja od celijakije. Različit sastav mikrobioma zamijećen je između pacijenata kojima se bolest pojavljuje asimptomatski i pacijenata sa stalnim simptomima. Pacijenti s učestalim simptomima imali su povečanu koncentraciju bakterije *Proteobacteria*.

Novija istraživanja ukazala su na povećanje patogenih i upalnih bakterija kod pacijenata s celijakijom. U različitim istraživanjima nađene su bakterije za koje se smatra da štite organizam od nastajanja celijakije i bakterije nakon čijih infekcija dolazi do razvitka celijakije. Infekcije

tankog crijeva s bakterijom roda *Campylobacter* povezane su kasnijim razvijanjem celijakije. Suprotni efekt pokazala je bakterija *Helicobacter pylori* čijom infekcijom se organizam štiti od razvitka celijakije. U istraživanjima su izolirane bakterije koje obitavaju u probavnom sustavu. Bakterijski sojevi izolirani iz pacijenata s celijakijom imali su veći broj virulentnih gena od bakterijskih sojeva zdrave osobe.[2]



Slika 6. Potencijalna uloga mikroba i okolinskih faktora u patogenezi celijakije (preuzeto i prilagođeno)[2]

2.6. Utjecaj genetskih faktora na razvoj bolesti

Celijakija je autoimuni poremećaj induciran uzimanjem glutena kod genetski predodređenih pojedinaca. Mali postotak osoba s genetskim rizikom razvija celijakiju. Ljudski leukocitni antigeni (eng. *Human Leukocyte Antigens*, HLA) otkriveni su u 20. stoljeću.[5] Otkriće ljudskih leukocitnih antigena doprinijelo je razumijevanju imunološkog sustava i nekolicine bolesti. Najpoznatija uloga HLA odnosi se na određivanje imunološke kompatibilnosti primatelja s donorom u procesu transplatacije organa. HLA sustav ima važnu ulogu u regulaciji urođenog i adaptivnog imunološkog odgovora.

Devedeset posto pacijenata bijele rase s celijakijom posjeduju HLA-DQ2.5 haplotip.[2] Ostali posjeduju ili HLA-DQ8 ili HLA-DQ2.2 ili HLA-DQ7 haplotip. HLA-DQ2.5 haplotip kodiran je s DQA1*05:01 i DQB1*2:1 alelima. Broj kopija alela DQB1*02 utječe na rizik pojave celijakije. Homozigoti, to jest osobe s dva para alela DQB1*02, stvaraju četiri puta jači odgovor na gluten posredovan nastankom T stanica od heterozigota.[2] Heterozigoti za razliku od homozigota posjeduju samo jednu kopiju alela DQB1*02. Osobe sa dva para alela DQB1*02 imaju i do pet puta veći rizik razvitka celijakije od heterozigota.[2] Nadalje HLA-DQ2.5 homozigoti s razvijenom celijakijom imaju izraženije simptome.[2] Razvitak bolesti kod homozigota događa se ranije, atrofija crijevnih resica je jače izražena te je njihoca regeneracija sporija.

Doprinos ostalih gena razvitku celijakije je puno manja. Pronađeno je oko 70 gena koji su uključeni u nasljednost celijakije.[2] Pronađen je samo jedan gen koji je specifičan za crijeva a to je RGS1. Danas nema dokaza koji bi sugerirali postojanje specifičnih alela koji kodiraju crijevne proteaze i enzim tTG.[2]

Između određenih autoimunih bolesti i celijakije postoje određena genetska preklapanja u rizičnosti nastajanja. Takva preklapanja nađena su između multiple skleroze, dijabetesa tipa 1 i reumatoidnog artritisa.[2] Preklapanja lokusa genetskih rizika nađeni su i u autoimunim bolestima koje su puno manje povezane sa samom celijakijom. Upalne bolesti crijeva kao što je Chronova bolest pokazuju takva preklapanja. Većina pronađenih lokusa povezanih s rizikom nalaze se na nekodirajućim regijama DNA kao što su promotorske regije. Iz toga slijedi da je za razvitak celijakije puno važnija regulacija ekspresije gena od promjena na razini kodiranja proteina.

2.7. Načini dijagnoze celijakije

Standardna metoda kod dijagnoze celijakije je biopsija sluznice tankog crijeva. Histološka ispitivanja kod oboljelih pokazuju atrofiju crijevnih resica, hiperplaziju kripti, povećan broj bijelih krvnih stanica, prisutnost specifičnih antitijela na tkivnu transglutaminazu i deamidirane glijadinske peptide. Biopsija sluznice ima svojih nedostataka. Rezultati biopsije ovise o broju uzoraka koji je prikupljen. Atrofija crijevnih resica može biti prisutna samo u određenom dijelu tankom crijeva što otežava dijagnozu. Nadalje, atrofija crijevnih resica prisutna je kod drugih stanja kao što je imunodeficijencija ili tumora.

Razvijanjem serogenetskog pristupa kod određene skupine pacijenata dovoljna su samo serološka testiranja za dijagnozu bolesti. Točnost serološkog i histološkog pristupa ovisi o

unosu glutena. Pacijenti moraju pristupiti glutenskom izazovu kako bi se sa sigurnošću mogla dijagnosticirati celijakija. Gluten se kod testiranih osoba uvodi ponovno u prehranu na određeno vrijeme kako bi došlo do razvijanja antitijela i ostalih simptoma. Uvođenje glutena u prehranu kod osoba sa sumnjom na celijakiju izaziva probleme budući da ga ne mogu tolerirati. Dodatni problem u dijagnostici predstavlja današnji način prehrane koju usvaja sve veća populacija ljudi. Bezglutenska prehrana danas je vrlo popularna, ali i nepotrebna u većini slučajeva. Napredna imunološka dijagnostika nezahtjeva unos glutena u organizam ili zahtjeva kratkotrajno izlaganje organizma glutenu. Cilj imunološke dijagnostike je identificirati T stanice inducirane u krvi nakon kratkotrajnog unosa glutena. Ovakav način dijagnostike je izrazito specifičan za celijakiju i uz to privlačan pacijentima budući da ne moraju prolaziti glutenski izazov.

2.8. Načini liječenja celijakije

2.8.1. Bezglutenska prehrana

Doživotna bezglutenska prehrana je za sada jedini efektivni tretman za celijakiju. Bezglutenska prehrana temelji se na kombinaciji hrane bez naznaka glutena što je izrazito teško postići. Gluten može biti skriven u industrijski procesiranoj hrani. Peptidi glutena mogu biti skriveni u pivu i dječjoj hrani.[6] Gluten se može naći i u farmaceutskim proizvodima i hrani koja služi u religijske svrhe. Već i male količine glutena u prehrani, kao što je 50 mg konzumirana tijekom tri mjeseca kod odraslih pacijenata, uzrokuje oštećenje tankog crijeva. Sigurna doza glutena još nije određena u kontrolnim ispitivanjima. Nadalje žitarice bogate glutenom važan su izvor željeza, kalcija, folata i vitamina B12. Stoga bezglutenska prehrana može kod pacijenata dovesti do nutritivnih nedostataka. Stroga bezglutenska prehrana utječe na ukupnu kvalitetu života pacijenata. Najčešći uzrok ponovne pojave simptoma je upravo nepoštivanje bezglutenske prehrane što može biti namjerno ili slučajno uzimanjem glutenom kontaminirane hrane. U većini pacijenata doživotna bezglutenska prehrana poboljšava histološke simptome, krvnu sliku i sveukupnu kliničku manifestaciju celijakije. [2,6]

2.8.2. Larazotid acetat

Najviše istraživanja danas posvećeno je larazotid acetatu. Radi se oktapeptidu koji inhibira povećanu perbmeabilnost tankog crijeva. Povećana permeabilnost posljedica je prekomjerno izraženog zonulina. Otpuštanje zonulina nastaje kao odgovor vezanja glijadinskih peptida i specifičnih citokinskih receptora. Kod pacijenata koji su koristili larazotid acetat primijećeno

je smanjenje simptoma u usporedbi s pacijentima koji su primali placebo. Loša strana larazotida kao lijeka je što ne utječe na razinu antitijela koja su specifična za celijakiju. Larazotid je prošao prvu i drugu fazu kliničkih ispitivanja, no ne i treću. Potrebna su još mnoga istraživanja na temu larazotida i njegovog utjecaja na celijakiju.[6]

2.8.3. Endopeptidaze

Endopeptidaze su enzimi koji degradiraju gluten *in vitro*. Latiglutenaza je lijek koji se sastoji od mješavine dviju endopeptidaza cistein proteaze i prolil endopeptidaze. Obje endopeptidaze su stabilne pri želučanom pH. Cilj lijeka je razgraditi gliadinske peptide bogate prolinom prije nego stignu do sluznice tankog crijeva. Provedena su dva ispitivanja učinkovitosti lijeka u drugoj fazi kliničkih ispitivanja. Ispitanici su podijeljeni u dvije grupe pri čemu je jedna grupa primala lijek i 2 g glutena dnevno, a druga je primala placebo i uzimala 2 g glutena dnevno. U skupini koja je primala lijek nije došlo do histološki promjena u tankom crijevu. Kod skupine koja je primala placebo došlo je do nastanka oštećenja sluznice tankog crijeva. Nasuprot tome, nisu uočene razlike u simptomima i serološkim markerima kod obje skupine. Ispitivanje je provedeno i na pacijentima s histološkim dokazima oštećenja sluznice. Rezultati uzimanja lijeka nisu pokazali poboljšanje u simptomima u usporedbi s grupom koja je primala placebo. No, analiza podgrupe pokazala je statistički važno smanjenje u jačini i frekvenciji simptoma.

Endopeptidaza izolirana iz gljiva *Aspergillus niger* je enzim čiji se utjecaj klinički ispituje. Enzim je aktivan između pH 2 i 8. Maksimalna aktivnost ostvaruje se pri pH 4-5. U istraživanju ispitanici su konzumirali dvije tablete visoke ili niske doze AN-PEP i 0.5 g glutena dnevno. Kontrolna skupina primala je placebo. Istraživanjem je zaključeno da enzim AN-PEP efektivno degradira male količine glutena. U daljnjim istraživanjima potvrđena je sigurnost uzimanja AN-PEP-a, no endopeptidaze za sada ne mogu zamijeniti učinkovitu bezglutensku prehranu.[6]

2.8.4. Terapija desenzibilizacijom

Terapija desenzibilizacije je novija metoda liječenja koja je tek prošla prvu fazu kliničkih testiranja. Kliničkim testiranjima potvrđena je sigurnost NexVax2 cjepiva.[6] Ovakav oblik terapije temelji se na korištenju glutenskih peptida kako bi se odgovor T stanica, koji inducira upalne procese, pretvorio u regulacijski odgovor. Svrha korištenja ovakvog oblika terapije je obnavljanje imunološke tolerancije prema glutenu.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. X. B. Yu, M. D. Uhde, P. H. Green, A. Alaedini, *Autoantibodies in the Extraintestinal Manifestations of Celiac Disease*, Nutrients, 2018
2. J. A. Tye-Din, H. J. Galipeau, D. Agardh, *Celiac Disease: A Review of Current Concepts in Pathogenesis, Prevention, and Novel*, Frontiers in Pediatrics, 2018
3. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, Sedmo izdanje, W. H. Freeman and Company, New York, 2012, str. 1040–1041
4. Á. Cebolla, M. De Lourdes Moreno, L. Coto, C. Sousa, *Gluten Immunogenic Peptides as Standard for the Evaluation of Potential Harmful Prolamin Content in Food and Human Specime*, Nutrients, 2018
5. G. Bodis, V. Toth, A. Schwarting, *Role of Human Leukocyte Antigens (HLA) in Autoimmune Diseases*, volume 5, Rheumatol Ther (2018) 5-20
6. C. Meijer, R. Shamir, H. Szajewska, L. Mearin, *Celiac Disease Prevention*, Frontiers in Pediatric, 2018.
7. I. S. Cohen, A. S. Day, R. Shaoul, *Gluten in Celiac Disease—More or Less?*, volume 10, Rambam Maimondes Med Journal, January 2019
8. D. Luongo, R. Bonavita, S. Rossi, V. R. Aufiero, N. R. Feliciello, F. Maurano, G. Iaquinto, G. Mazzarella, M. Rossi, *Tailoring the immune response to wheat gliadin enzymatic transamidation*, Cytokine (2019) 23-29
9. B.G. Han, J.W. Cho, Y.D. Cho, K.C. Jeong, S.Y. Kim, B.I. Lee,Crystal structure of human transglutaminase 2 in complex with adenosine triphosphate, volume 47, International Journal of Biological Macromolecules, August 2010 190-195
10. T.H. Jang, D.S. Lee, K. Choi, E. M. Jeong, I.G. Kim, Y. W. Kim, J. N. Chun, J.H.Jeon, H. H. Park , *Crystal Structure of Transglutaminase 2 with GTP Complex and Amino Acid Sequence Evidence of Evolution of GTP Binding Site*, Plos one, 2014
11. C.-Y. Kim, H. Quarsten, E. Bergseng, C. Khosla, L. M. Sollid, *Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease*, PNAS, 2004
12. H.Thomas, K. Beck, M. Adamczyk, P. Aeschlimann, M. Langley, R. C. Oita, L.Thiebach, M. Hils, D. Aeschlimanna,*Transglutaminase 6: a protein associated with central nervous system development and motor function*, January 2013 161-177

13. B. Ahvazi, K. M. Boeshans, W. Idler, U. Baxa, P. M. Steinert, *Roles of Calcium Ions in the Activation and Activity of the Transglutaminase 3 Enzyme,* 2003