

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Ukazatele aktivity celiakie

Ladislav Douša

Autoreferát disertační práce
Doktorský studijní program: Vnitřní nemoci

Hradec Králové

2023

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Vnitřní nemoci na II. interní gastroenterologické klinice Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Ladislav Douša
II. interní gastroenterologická klinika
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Školitel: doc. MUDr. Ilja Tachecí, Ph.D.
II. interní gastroenterologická klinika
Fakultní nemocnice Hradec Králové

Oponenti: prof. MUDr. Tomáš Hucl, Ph.D.
Klinika hepatogastroenterologie
Institut klinické a experimentální medicíny Praha

doc. MUDr. Přemysl Falt, Ph.D.
II. interní klinika – gastroenterologická a geriatrická
Fakultní nemocnice Olomouc

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Vnitřní nemoci dne
v budově č. 23, 3. podlaží, učebna č. 3.212, v areálu Fakultní nemocnice Hradec Králové od
..... hod.

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.
S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty
v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. MUDr. Pavel Žák, Ph.D.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Vnitřní nemoci
Garant studijního programu

Obsah

Souhrn	1
Summary	3
1. Úvod do problematiky	5
1.1 Definice, klasifikace a epidemiologie celiakie	5
1.2 Citrulin, ornitin a celiakie	6
1.3 Hyposplenismus a celiakie.....	7
1.4 Gliadin 33-mer a celiakie.....	8
2. Cíle práce	9
3. Metodika disertační práce	10
3.1 Soubor pacientů.....	10
3.2 Statistické zpracování dat	11
4. Výsledky	12
4.1 Výsledky v podkapitole „Plazmatické hladiny citrulinu a ornitinu u nemocných s celiakií“	12
4.2 Výsledky v podkapitole „Funkční hyposplenismus u nemocných s celiakií“	15
4.3 Výsledky v podkapitole „Gliadin 33-mer u nemocných s celiakií“	20
5. Diskuse.....	23
5.1 Diskuse k podkapitole „Plazmatické hladiny citrulinu a ornitinu u nemocných s celiakií“	23
5.2 Diskuse k podkapitole „Funkční hyposplenismus u nemocných s celiakií“	24
5.3 Diskuse k podkapitole „Gliadin 33-mer u nemocných s celiakií“	26
6. Limitace práce	27
Závěry	28
Literatura.....	29
Přehled publikační činnosti autora.....	34
Seznam tabulek.....	38
Seznam grafů.....	38

Souhrn

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

Provedli jsme analýzu pacientů dispenzarizovaných v gastroenterologických poradnách 2. interní gastroenterologické klinicky Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty UK v Hradci 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 dárců krve.

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 aktivity celiakie 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, jako jeden z nových ukazatelů adherence k bezlepkové dietě. 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 možnosti identifikace nových ukazatelů aktivity celiakie ve smyslu hodnocení tenkostřevní integrity a funkce, imunologického potenciálu sleziny a sledování adherence k bezlepkové dietě. Výše uvedená zjištění by teoreticky mohla umožnit přesnější selekci pacientů, u kterých (s ohledem na trvajících aktivitu nemoci) přetrvává jednak riziko závažných komplikací celiakie a současně rizika potenciálně závažných infekcí.

Summary

Coeliac disease is a relatively common disorder that has been associated with a worldwide increase in prevalence 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 this, the introduction of new diagnostic, monitoring and therapeutic options into clinical practice is an important prerequisite for successfully combating this potentially serious disease. The aim of this study was to analyze plasma levels of the amino acids citrulline and ornithine - as potential markers of small intestinal disease activity, marginal zone memory B cell levels - as an indicator of the severity of hyposplenism, and fecal gliadin 33-mer concentration - as an indicator of adherence to a gluten-free diet - in patients followed for celiac disease.

We performed an analysis of patients dispensed in gastroenterology outpatient clinics of the 2nd Dpt of Internal Medicine – Gastroenterology (University Hospital and Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University). 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 celiac disease treated with a gluten-free diet compared with healthy controls. Thus, ornithine seems to be a promising and more sensitive indicator of celiac disease activity in this group of patients. In a second subanalysis, we examined and determined the concentrations of B cell subpopulations in peripheral blood of patients with mild (uncomplicated) forms of celiac 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 celiac disease. In a third subanalysis, we focused on fecal gliadin 33-mers as one of the new markers of adherence to a gluten-free diet. We have shown that 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 marker to assess disease activity in terms of the maintenance of an inflammatory state in the small intestine during sustained gluten intake.

Our work confirms the possibility of identifying new indicators of celiac disease activity in terms of assessment of small intestinal integrity and function, immunological potential of the spleen and monitoring of adherence to a gluten-free diet. The above findings could theoretically allow a more accurate selection of patients who (given the ongoing disease activity) remain at risk of both severe complications of celiac disease and potentially serious infections.

1. Úvod do problematiky

1.1 Definice, klasifikace a epidemiologie celiakie

Celiakie je chronické, systémové, imunitně podmíněné onemocnění u geneticky predisponovaných jedinců jakéhokoliv věku, vyvolané v potravě obsaženým lepkem (glutenem) (1-4). Spíše než o jednu nemoc jde o skupinu nemocí/příznaků, které nemusí postihovat jen gastrointestinální systém. Současně je známá asociace s řadou dalších imunitně podmíněných (autoimunitních) onemocnění (5). 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 (6)). Lepek představuje zásobní protein obilného zrna. Pšeničné prolaminy se nazývají gliadiny a jsou ve vodě rozpustné, pšeničné gluteliny (bez jiného označení) jsou ve vodě nerozpustné. U různých nemocí asociovaných s lepkem mohou být spouštěčem onemocnění různé součásti glutenového komplexu (pro celiakii jsou rozhodující alfa a gama gliadiny) (7).

Dle klinického obrazu klasifikujeme celiakii podle jednotné mezinárodní terminologie (Oslo 2013) (4, 5). 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) (5). Z uvedených klasifikačních termínů lze vyčlenit několik variant celiakie. Anderson et al. (8) 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“. Zdali 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 (9). Ostatní formy celiakie dle výše uvedené WHO klasifikace pak označuje termínem „Celiakie vyžadující bezlepkovou dietu“ (8). Další pojem, se kterým se můžeme setkat je „uktrakrátká celiakie“, při níž jsou histologické změny zachyceny pouze v první části duodena (D1, bulbus) (10). Termín „séronegativní celiakie“ odkazuje na absenci serologických ukazatelů typických pro celiakii a ukazuje na fakt, že celiakie není izolovaným

onemocnění tenkého střeva ale komplexním systémovým onemocněním, a stává se tak diagnózou per exclusionem (11).

Průměrná celosvětová prevalence celiakie asi 1 % a je patrný její trvale stoupající trend (9). Prevalence v České republice je odhadem 1:200 - 1:250 (dle WGO 1:218) (5) a riziko postižení nemocí je vyšší u příbuzných celiaků 1. řádu s prevalencí 5-10 % (12). 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.

1.2 Citrulin, ornitin a celiakie

Citrulin je neesenciální (v organismu syntetizovatelná) a nebiogenní (neproteinogenní) aminokyselina a je specifickým produktem enterocytů. Z toho důvodu ho lze s výhodou využít jako ukazatele funkční enterocytární masy (13). První klinické zkušenosti se stanovením citrulinémie ve vztahu k funkci tenkého střeva přinesl *Crenn et al.* (14). Od té doby byly publikovány práce, které využívají citrulin jako ukazatel tenkostřevní funkce u závažných patologických stavů postihujících funkci tenkého střeva (např. tenkostřevní resekce se syndromem krátkého střeva, nekrotizující enterokolitida apod. (15-18)). Normální plazmatická hladina citrulinu u zdravého dospělého člověka se uvádí 40 (\pm 10) μ mol/L (18, 19). Roli ornitinu ve vztahu ke střevním onemocněním (včetně celiakie) lze z dostupné literatury hodnotit jako stále zcela nejasnou (20-22). Zajímavé výsledky přinesla naše recentní pilotní práce (23), 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).

1.3 Hyposplenismus a celiakie

Enteropatie (včetně celiakie) mohou být spojeny s poruchou funkce sleziny (24, 25). Důsledkem je hyposplenismus – situace, 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 komplikacemi, zejména ve formě těžkých bakteriálních infekcí (24, 26).

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 organismu škodlivých a/nebo nepotřebných struktur (27, 28). Sledování konsekvencí poruchy filtrační funkce sleziny (detekce erytrocytárních Howel-Jollyho tělísek či tečkovaných erytrocytů) je v současné době zlatým standardem pro diagnostiku a sledování tíže hyposplenismu (29-32). 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 (zejména infekce opouzdřenými pneumokokovými, meningokokovými a/nebo hemofilovými patogeny) (33-35). Literární data prokazují korelaci mezi tíží enteropatie, respektive poruchou funkce tenkého střeva u nemocných s komplikovanou či těžkou formou enteropatie a snížením slezinných funkcí (26, 36, 37). Z tohoto pohledu funguje průkaz snížení slezinné funkce jako nepřímý marker poškození tenkého střeva. Cílem naší práce 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 (35, 38).

1.4 Gliadin 33-mer a celiakie

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 sprue je poměrně zásadním krokem vzhledem k potenciálně závažným následkům a komplikacím těchto forem nemoci včetně vzniku obtížně léčitelných, maligních komplikací, zahrnujících lymfom i adenokarcinom. Inovativním 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, 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 (39). Tento glutenový imunoreaktivní peptid (GIP) lze detekovat ve stolici a je tudíž přímým důkazem o přítomnosti lepku v dietě. 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 (40). Cílem naší práce byla objektivizace anamnestických dat o striktním dodržování bezlepkové diety u nemocných sledovaných s celiakií a analýza příčin positivity gliadin 33-meru ve stolici.

2. Cíle práce

Tato práce se zabývá analýzou potenciálních ukazatelů aktivity celiakie u pacientů sledovaných v gastroenterologických poradnách terciárního zdravotnického zařízení. V obecném slova smyslu jsme zvolili trojici kandidátních ukazatelů, které lze označit jako „inovativní“, přičemž každý z nich odráží případnou aktivitu celiakie ve vztahu k jinému orgánu/kompartmentu: aminokyseliny citrulin a ornitin ve vztahu k integritě a funkci tenkostěvné sliznice, paměťové B lymfocyty marginální zóny ve vztahu k funkci sleziny, gliadin 33-mer ve stolici ve vztahu k adherenci k bezlepkové dietě.

Identifikace a správná interpretace ukazatelů aktivity nemoci je klíčová pro vedení dispenzární péče a prevenci potenciálně závažných komplikací, které v případě celiakie hrozí.

Nulová hypotéza naší práce zní takto: Inovativní ukazatele aktivity celiakie nelze použít k hodnocení projevů aktivity celiakie.

Cíle práce jsou:

- 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. Metodika disertační práce

3.1 Soubor pacientů

Naše práce byla organizována jako prospektivní, srovnávací (studie případů a kontrol). V rámci projektu jsme porovnávali skupinu nemocných konsekutivně sledovaných v gastroenterologických poradnách 2. interní gastroenterologické kliniky Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty UK v Hradci Králové 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 gastrokopického 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.

3.2 Statistické zpracování dat

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). Za statisticky významné byly považovány hodnoty $p < 0,05$. Střední hodnoty byly vyjádřeny průměrem a směrodatnou odchylkou u dat normálního rozdělení, mediánem a mezikvartilovým rozpětím u dat bez normálního rozdělení, eventuálně všemi hodnotami jak u dat z normálního, tak i nenormálního rozdělení a to proto, aby bylo možné výsledky srovnávat s dostupnými studiemi, které střední hodnoty z nenormálního rozdělení vyjadřují průměrem a směrodatnou odchylkou.

4. Výsledky

4.1 Výsledky v podkapitole „Plazmatické hladiny citrulinu a ornitinu u nemocných s celiakií“

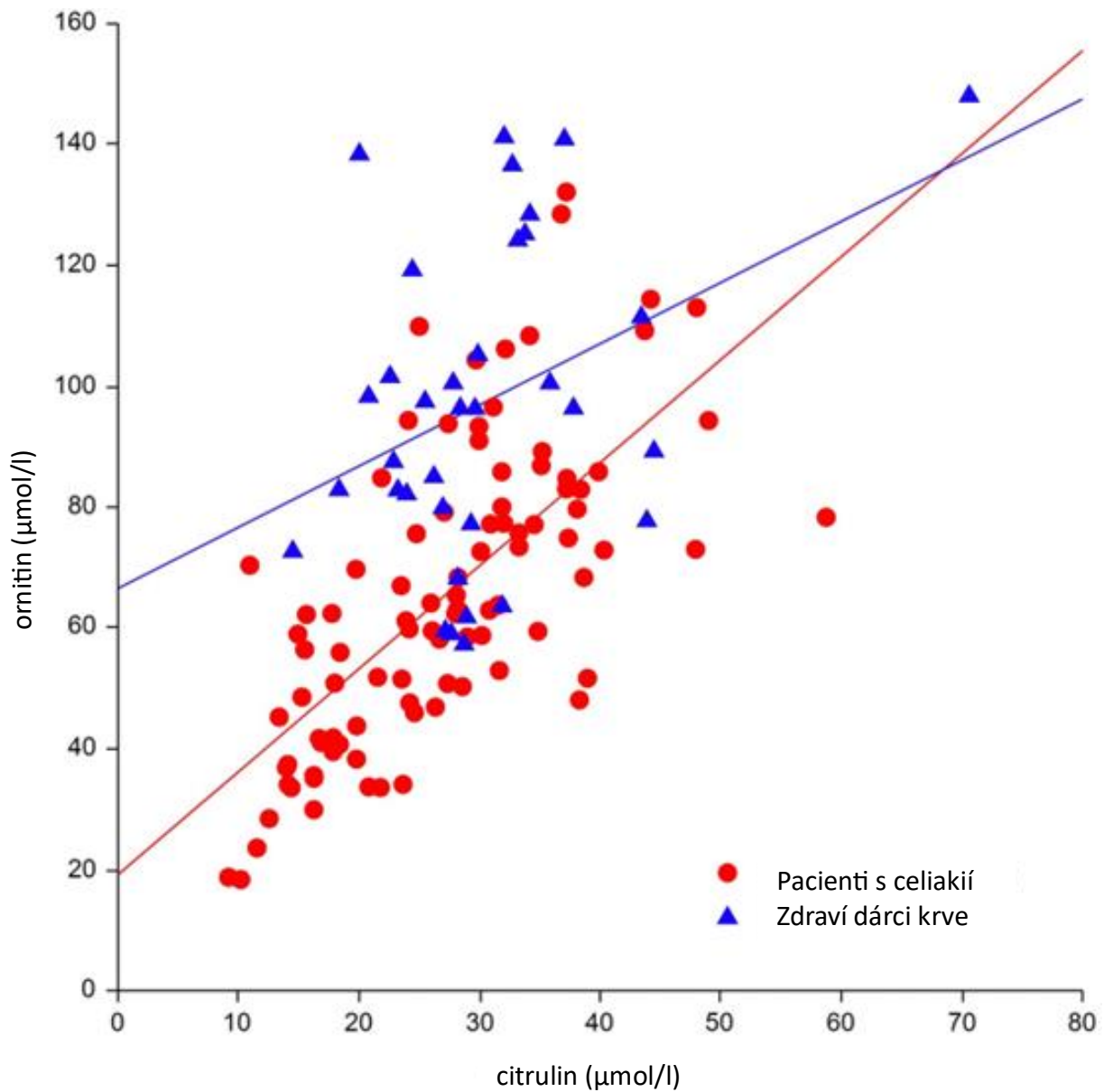
Do této části naší práce jsme zařadili 94 pacientů s celiakií a porovnali jsme je s 35 zdravými dárci krve. Základní demografická data studijní i kontrolní skupiny uvádí tabulka č. 1. Průměrná doba trvání onemocnění byla ve skupině pacientů s celiakií 160 ± 144 měsíců, medián: 118 měsíců (mezikvartilové rozpětí: 181 měsíců). Nejčastějším vstupním histologickým nálezem byl u pacientů s celiakií typ 3a podle Marsh-Oberhuberovy klasifikace (41) v 24 případech (24 %). Žádný z pacientů nepodstoupil resekci tenkého střeva.

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 zjištěny také v parametrech BMI ($p = 0,006$), BSA ($p = 0,011$), MCV ($p = 0,002$) a v koncentraci sérové transglutaminázy IgA ($p = 0,024$), nicméně jako klinicky významné tyto výsledky považovat nelze (ostatní sledované klinické a laboratorní markery v tabulce 1). Vzhledem k většinou zamítnuté normalitě byly k vyjádření míry variability kromě hodnot aritmetického průměru a směrodatné odchylky použity také medián a mezikvartilové rozpětí. 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; graf 1). Nejistili jsme silnou korelaci mezi délkou 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 č. 1: Základní kvantitativní ukazatele u pacientů s celiakií a u zdravých kontrol

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 (kg/m ²)	27 ± 4. 27; 6	25 ± 5. 24; 6	p = 0,006
BSA (m ²)	1,8 ± 0,2. 1,8; 0,3	1,7 ± 0,2. 1,7; 0,3	p = 0,011
Hemoglobin (g/L)	142 ± 10. 141; 13	137 ± 13. 138; 15	p = 0,072
Leukocyty (10 ⁹ /L)	7 ± 2. 6; 2	7 ± 2. 7; 3	p = 0,814
MCV (fL)	90 ± 4. 91; 5	87 ± 5. 87; 5	p = 0,002
Transglutamináza IgA (U/mL)	2 ± 2. 2; 1	n = 90 (4 nemocní s IgA deficitem z analýzy vyřazení) 12 ± 42. 3; 4	p = 0,024
Citrulin (μmol/L)	30 ± 10. 29; 10	27 ± 10. 27; 15	p = 0,136
Ornithine (μmol/L)	97 ± 26. 97; 42	25 ± 3. 63; 34	p < 0,001

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).



Graf č. 1: Korelace mezi plazmatickou koncentrací citrulinu a ornithinu 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)

4.2 Výsledky v podkapitole „Funkční hyposplenismus u nemocných s celiakií“

Do této části naší práce jsme zařadili 100 pacientů s celiakií a srovnali jsme je s kontrolní skupinou 35 zdravých dárců krve. Složení studijní skupiny dle věku a pohlaví bylo: 30 mužů (30 %), průměrný věk 52 ± 16 let (medián: 44 let, mezikvartilové rozpětí: 31 let) a 70 žen (70 %), průměrný věk 45 ± 14 let (medián: 43 let, mezikvartilové rozpětí: 21 let). V kontrolní skupině bylo 10 mužů (29 %), průměrný věk 51 ± 14 let (medián 47 let, mezikvartilové rozpětí 19 let) a 25 žen (71 %), průměrný věk 46 ± 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 ± 143 měsíců, medián: 111 měsíců (mezikvartilové rozpětí 174 měsíců). Žádný z pacientů nepodstoupil resekci tenkého střeva a/nebo splenektomii a neprodělal závažnou infekce způsobená *Streptococcus pneumoniae*.

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 (detaily v tabulce č. 2).

Tabulka č. 2: Srovnání hodnot základních krevních parametrů mezi skupinou pacientů a celiakií a skupinou zdravých dárců krve

	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

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 marginálních B lymfocytů 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 3-5 a graf 2). Absolutní hodnoty marginálních B lymfocytů 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 3-5 a graf 3).

Tabulka č. 3: Hodnoty konkrétní subpopulace B lymfocytů marginální zóny u pacientů s celiakií

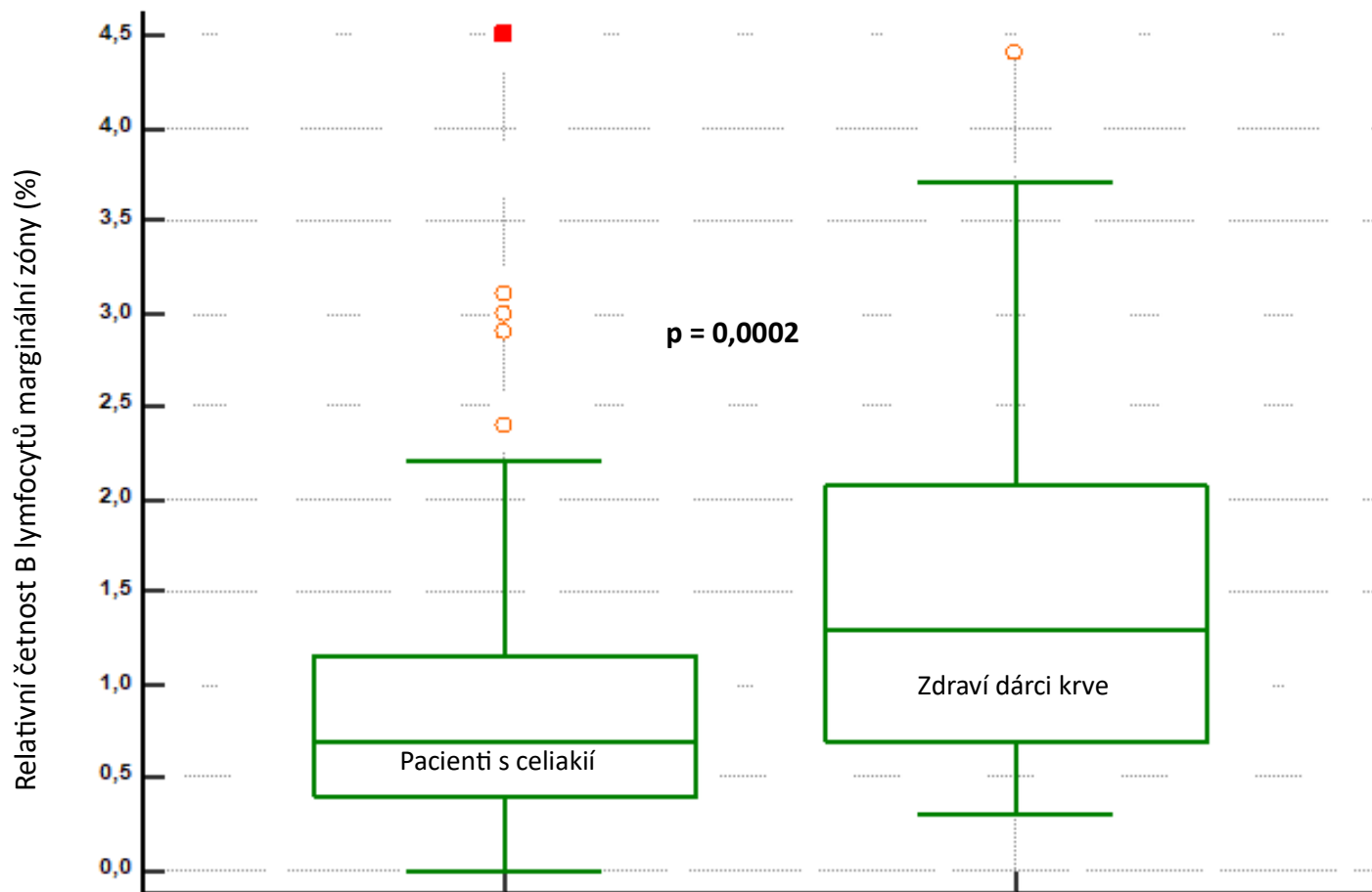
	Počet	Min	Max	Aritmetický průměr	Medián	95% interval spolehlivosti	Směrodatná odchylka	Relativní směrodatná odchylka	25 až 75 percentil (IQR)	p – hodnota
B lymfocyty marginální zóny – relativní četnost (%)	100	0,00	4,50	0,88	0,70	0,50 až 0,83	0,72	0,82	0,40 až 1,15 (0,75)	<0,0001
B lymfocyty marginální zóny – absolutní četnost (10 ⁹ /l)	100	0,21	81,76	16,785	13,67	10,83 až 15,28	14,61	0,87	6,70 až 20,78 (14,09)	<0,0001

Tabulka č. 4: Hodnoty konkrétní subpopulace B lymfocytů marginální zóny u zdravých dárců krve

	Počet	Min	Max	Aritmetický průměr	Medián	95% interval spolehlivosti	Směrodatná odchylka	Relativní směrodatná odchylka	25 až 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 až 2,08 (1,38)	0,0256
B lymfocyty marginální zóny – absolutní četnost (10 ⁹ /l)	35	4,28	109,60	30,28	25,54	15,40 až 36,04	22,25	0,73	14,18 až 43,17 (28,99)	0,0002

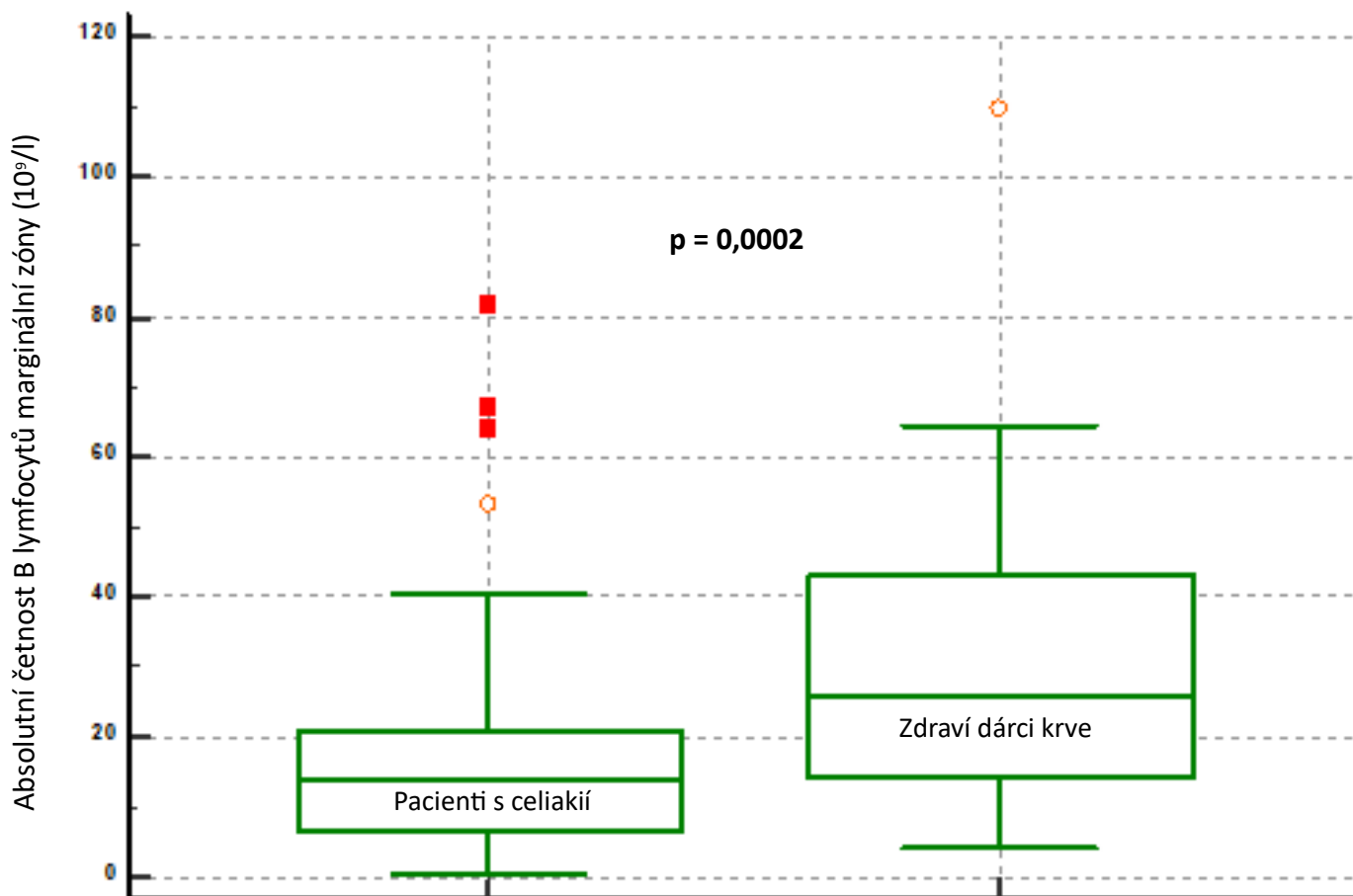
Tabulka č. 5: Srovnání hodnot konkrétní subpopulace B lymfocytů marginální zóny mezi skupinou pacientů s celiakií a skupinou zdravých dárců krve

	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	0,0002
B lymfocyty marginální zóny – absolutní četnost ($10^9/l$)	100	13,67	60,70	35	25,54	88,86	0,0002



Graf č. 2: Krabicový graf pro relativní četnost B lymfocytů marginální zóny (%)

Vlevo: pacienti s celiakií; vpravo: zdraví dárci krve



Graf č. 3: Krabicový graf pro absolutní četnost B lymfocytů marginální zóny ($10^9/l$)

Vlevo: pacienti s celiakií; vpravo: zdraví dárce krve

4.3 Výsledky v podkapitole „Gliadin 33-mer u nemocných s celiakií“

Do této části naší práce jsme zařadili 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 ± 16 let (medián: 49 let, mezikvartilové rozpětí: 29 let) a 80 žen (73 %), průměrný věk 47 ± 14 let (medián: 45 let, mezikvartilové rozpětí: 20 let). 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 se nám 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 %). Po vyhodnocení odběru vzorku stolice byli pacienti seznámeni s jejich výsledky. Se znalostí výsledku koncentrace gliadin 33méru ve stolici 8 % pacientů změnilo svou předchozí výpověď a připustilo občasné porušování bezlepkové diety (20 % celkem) – detaily v tabulce 6 a 7 a grafu č. 4.

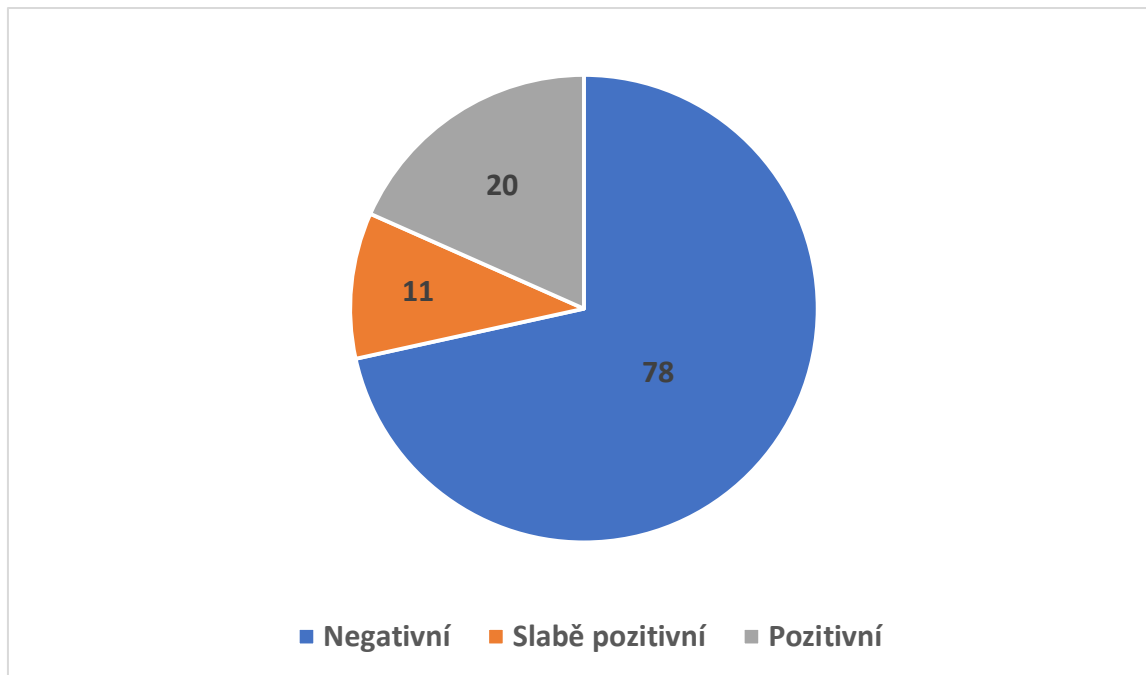
Tabulka č. 6: Výsledky stanovení GIP ve stolici u pacientů s celiakií

GIP – gliadinové imunogenní/imunoreaktivní peptidy, AP – aritmetický průměr, SO – směrodatná odchylka, μg – mikrogram, g – gram, n – počet subjektů.

Ukazatel (výsledek GIP)	Počet bez ohledu na detekovatelné rozmezí (n)	Procentuální zastoupení bez ohledu na detekovatelné rozmezí (%)	Číselné hodnoty 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

Tabulka č. 7: Změna v deklaraci adherence/nonadherence u pacientů s celiakií po jejich konfrontaci s výsledkem GIP. GIP – gliadinové imunogenní/imunoreaktivní peptidy, BLD – bezlepková dieta, µg – mikrogram, g – gram.

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



Graf č. 4: Procentuální rozložení výsledků detekce gliadin 33méru ve stolici u pacientů s celiakií

5. Diskuse

5.1 Diskuse k podkapitole „Plazmatické hladiny citrulinu a ornitinu u nemocných s celiakií“

Cílem této části naší práce bylo ověřit význam některých plazmatických aminokyselin (citrulinu a ornitinu), jako potenciálních neinvazivních markerů poškození struktury a funkce tenkého střeva. 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. 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.

Literární údaje naznačují užitečnost stanovení plazmatických koncentrací citrulinu pro sledování závažnosti tenkostřevního onemocnění u pacientů s rozsáhlým a/nebo destruktivním postižením sliznice tenkého střeva (42-44), spíše než u pacientů s nekomplikovanými formami celiakie (17, 45). Na rozdíl od těchto poměrně závažných klinických stavů, vyžadujících intenzivní a metabolickou péči, měli všichni nemocní zařazení do naší studie již dříve diagnostikovanou celiakií 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, 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 *Schiepatti et al.* z roku 2023 (46). 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 ≥ 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.

Vzhledem k nedostatečné citlivosti změn plazmatických hladin citrulinu ve skupině léčených celiaků v klinické remisi 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 (23) je v tomto ohledu vůbec první. 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.

5.2 Diskuse k podkapitole „Funkční hyposplenismus u nemocných s celiakií“

Clem 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 (36, 37).

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. 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.

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 (47). Ludvigsson et al. (25) zaznamenal ve švédském národním zdravotním registru u více než 15 000 pacientů 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 (48), Röckert Tjernberga (38) i Simonsova metaanalýza z roku 2018 (49). Z českých autorů se otázce deficientních B lymfocytárních populací věnoval Hrnčič et al. (50), 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 superinfencí 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 disertační práce, 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 (23, 51) 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 v klinické remisi.

5.3 Diskuse k podkapitole „Gliadin 33-mer u nemocných s celiakií“

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).

Samotné laboratorní stanovení gliadin 33-meru ve stolici není průkazem tenkostřevního 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 tenkostřevní 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). Vysvětlení 8 % nemocných trvajících na adherenci ke striktní bezlepkové dietě a pozitivitou gliadin 33-meru ve stolici je dvojitá. Adherenci k bezlepkové dietě u pacientů s celiakií se zabývá recentní práce Biagiho (52) a dále např. přehledová práce Wiesera (53). Z českých autorů vyzdvihují význam adherence k bezlepkové dietě, resp. monitorování adherence pomocí fekálního gliadin 33-meru, autoři Kocna (40), Vyhnánek (54) a ve své disertační práci též Packová (55). Naše výsledky jsou obecně s jejich daty 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 serologii 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 bezlepkové dietě do běžného dispenzárního procesu pacientů s celiakií. Nejedná se však o náhradu stávajících ukazatelů (zejména sérologických), ale o jejich doplněk.

6. Limitace práce

Naše práce má také některé limitace, který si je autor vědom. Hlavní z nich je absence longitudinálního sledování pozorovaných ukazatelů (plazmatického citrulinu a ornitinu, paměťových B lymfocytů marginální zóny v periferní krvi a fekálního gliadin 33-meru) v čase a absence korelace s invazivními testy (endoskopické a/nebo histologické změny sliznice tenkého střeva) spolu podrobnější analýzou nutričních parametrů (včetně sérových hladin železa, feritinu a ostatních). V neposlední řadě lze připustit limitaci práce v absenci průkazu Howell-Jollyho tělísek a tečkování erytrocytů jakožto ukazatelů filtrační schopnosti sleziny. 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.

Závěry

Ověřili jsme možnosti a limitace 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.

Dále 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. 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.

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.

Literatura

1. Bureš J. Celiakie a další s glutenem asociované choroby. 2017.
2. 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.
3. Lebowitz B, Green PHR. New Developments in Celiac Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2019;48(1):xv-xvi.
4. 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.
5. 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/ceeliac-disease/ceeliac-disease-english> (accessed 2017-08-08). 2016.
6. Šetinová I. Obilné mouky (p 291-302). In: Fuchs M et al. *Potravinová alergie a intolerance*. Praha: Mladá fronta, 2016.
7. Shewry PR, Tatham AS. Improving wheat to remove coeliac epitopes but retain functionality. *J Cereal Sci* 2016; 67: 12-21.
8. Anderson RP. Review article: Diagnosis of coeliac disease: a perspective on current and future approaches. *Aliment Pharmacol Ther*. 2022;56 Suppl 1:S18-s37.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Book L, Zane 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.
13. 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.

14. 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.
15. Gondolesi GE, Kaufman SS, Sansaricq C et al. (2004) Defining normal plasma citrulline in intestinal transplant recipients. *Am J Transplant* 4: 414–418.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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).
20. Cynober L. Can arginine and ornithine support gut functions? *Gut*. 1994;35(1 Suppl):S42-5.
21. 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.
22. Sivashanmugam M, J J, V U, K NS. Ornithine and its role in metabolic diseases: An appraisal. *Biomed Pharmacother*. 2017;86:185-94.
23. Douda L, Hyšpler R, Mžik 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.
24. 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.
25. Ludvigsson JF, Olén O, Bell M, Ekblom A, Montgomery SM. Coeliac disease and risk of sepsis. *Gut*. 2008;57(8):1074-80.

26. Di Sabatino A, Brunetti L, Carnevale Maffe G, Giuffrida P, Corazza GR. Is it worth investigating splenic function in patients with celiac disease? *World J Gastroenterol.* 2013;19(15):2313-8.
27. 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.
28. William BM, Corazza GR. Hyposplenism: a comprehensive review. Part I: basic concepts and causes. *Hematology.* 2007;12(1):1-13.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Hurych J, Štícha R. *Lékařská mikrobiologie : repetitorium. 2. vydání ed.* Praha: Stanislav Juhaňák - Triton; 2021.
34. Kosina P. Doporučený postup péče o pacienty s porušenou či zaniklou funkcí sleziny (hyposplenismem/asplenií). Aktualizace Doporučeného postupu Společnosti infekčního lékařství a České vakcinologické společnosti České lékařské společnosti J E Purkyně. 2019.
35. Di Sabatino A, Carsetti R, Corazza GR. Post-splenectomy and hyposplenic states. *Lancet.* 2011;378(9785):86-97.
36. 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.
37. Di Sabatino A, Brandi 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.

38. 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.
39. 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.
40. Kocna P. Gliadin 33-mer v patogenezi, terapii a monitorování celiakie. *Klin Biochem Metab,* 29 (50), 2021, No 2, p 64 - 70. 2021.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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 Merkur Lekarski.* 2006;20(116):173-5.
46. 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.
47. Mathur A, McLean MH, Cao H, Vickers MA. Hyposplenism and Gastrointestinal Diseases: Significance and Mechanisms. *Dig Dis.* 2022;40(3):290-8.
48. 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.
49. 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.

50. Hrnčíř Z, Vokurková D, Drahosová 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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).
54. 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.
55. Packová, B. Markery v diagnostice přetrvávající slizniční atrofie, refrakterní celiakie a maligních komplikací u pacientů s celiakií (disertační práce). Masarykova Univerzita - Lékařská fakulta, 2020.

Přehled publikační činnosti autora

a) Původní vědecké práce v impaktovaném časopise:

Melek J, **Douda L**, et al. Mucosal healing is not associated with better outcome during 7 years of follow-up in pediatric patients with Crohn's disease. *Minerva Pediatr (Torino)* 2021 (**IF = 2,378**).

Bures J, Kvetina J, **Douda L**, et al. The pharmacokinetic parameters and the effect of a single and repeated doses of memantine on gastric myoelectric activity in experimental pigs. *PLoS One* 2020;15:e0227781 (**IF = 3,240**).

Frybova B, Drabek J, **Douda L**, et al. Cholelithiasis and choledocholithiasis in children; risk factors for development. *PLoS One* 2018;13:e0196475 (**IF = 2,776**).

b) Ostatní práce v impaktovaném časopise: -

c) Původní vědecké práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise:

Douda L, Vokurková D, Douda T, et al. Memory B lymphocytes in peripheral blood in coeliac disease: a pilot study. *Gastroenterologie a hepatologie* 2019;73:296-302.

Douda L, Hyšpler R, Mžík M, et al. Serum Citrulline and Ornithine: Potential Markers of Coeliac Disease Activity. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2022;65:75-82.

d) Ostatní práce v recenzovaném neimpaktovaném časopise:

Zhychko K, **Douda L**, Soukup T, et al. An unusual case of systemic AA amyloidosis. *Gastroenterologie a hepatologie* 2021;75:331-334.

Tacheci I, Urban O, **Douda L**, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on endoscopy practice in the Czech Republic - Survey research. *Gastroenterologie a Hepatologie* 2020;74:195-203.

Keil R, **Douda L**. Novinky v léčbě akutního nevarikózního krvácení do horní části gastrointestinálního traktu [New trends in treatment of non-variceal bleeding in the upper gastrointestinal tract]. *Vnitr Lek*. 2015 Jul-Aug;61(7-8):686-90. Czech. PMID: 26375696.

Douda L, Keil R, Lochmannová J, et al. Complicated diagnostics of primary sclerosing cholangitis in a patient with recurrent episodes of acute bacterial cholangitis. *Gastroent Hepatol* 2015; 69(4): 368–377.

Lochmannová J, Keil R, **Douda L**, et al. The importance of endoscopic retrograde cholangiopancreatography in adolescent patient with traumatic rupture of pancreatic duct. *Gastroenterologie a Hepatologie* 2013;67:474-478.

Douda L, Cyrany J, Tachecí I. Early gastric cancer. *Vnitr Lek*. 2022;68(6):371-5.

e) Ostatní práce:

Douda, L. Subkutánní infliximab u mladého u obézního pacienta s Crohnovou nemocí. *Acta Medicinæ (Kazuistiky)* 2023; 17: 30–34.

Červená M, Marel M, **Douda L**, et al. Tracheoesophageal fistula. *Studia Pneumologica et Phthiseologica* 2015;75:145-147.

f) Kapitoly v učebnicích:

Keil R, **Douda L**. Léčba akutního nevarikózního krvácení do horní části gastrointestinálního traktu. In: Špičák J, Urban O. *Novinky v digestivní endoskopii*. 1. Vydání ed. Praha: Grada Publishing; 2015.

Keil R, **Douda L**. Akutní krvácení do dolní části trávicího traktu. In: Lukáš K, Hoch J. *Nemoci střev*. 1. Vydání ed. Praha: Grada Publishing; 2018.

Douda L, Kachlík D, Hudák R. Trávicí systém a Dýchací systém. Hudák R, Kachlík D. *Memorix Anatomie*. 1.-5. Vydání ed. Praha: Triton; 2013-2021.

Douda L, Kachlík D, Hudák R. Digestive system and Respiratory system. Hudák R, Kachlík D, Volný O, et al. *Memorix Anatomy : Comprehensive Book of Human Anatomy in English and Latin*. 1st and 2nd ed. Praha: Triton; 2015-2017.

g) Odborné přednášky:

Douda L.: Jyseleca – účinnost a bezpečnost v léčbě ulcerózní kolitidy. Hradecké gastroenterologické dny 2023, Hradec Králové, 23.3.2023.

Douda L.: Ustekinumab: mise dlouhodobá remise. XXIV. Hradecké gastroenterologické a hepatologické dny a XIV. Mezinárodní endoskopický workshop 2022, 8.9.2022.

Douda L.: Konfokální laserová endomikroskopie v diagnostice reakce štěpu proti hostiteli. 36. český a slovenský gastroenterologický kongres 2019, Praha, 29.11.2019.

Douda L.: Hormonálně indukovaná kolitida. XXIII. Hradecké gastroenterologické a hepatologické dny a XIII. Mezinárodní endoskopický workshop 2019, Hradec Králové, 21.3.2019.

Douda L.: Rektální tonzila. 6. kongres České gastroenterologické společnosti 2017, Ostrava, 1.12.2017.

Douda L.: Barrettův jícen a výtěžnost gastrokopie v jeho diagnostice. 5. kongres České gastroenterologické společnosti 2013, Karlovy Vary, 8.11.2013.

Douda L.: Boerhaaveův syndrom. Pracovní den Kazuistiky 2016, Praha, 25.2.2016.

Douda L.: Trombóza horní mezenterické žíly komplikovaná trombózou vena portae. Pracovní den Kazuistiky 2015, Praha, 28.2.2015.

Douda L.: Cholestáza nejasné etiologie. Pracovní den Kazuistiky 2014, Praha, 28.2.2014.
Roznětinská M., **Douda L.:** Urgentní gastrokopie – krvácení do gastrointestinálního traktu. 5. kongres České gastroenterologické společnosti 2013, Karlovy Vary, 8.11.2013.

Douda L. Fungal Infection in Immune Compromised Patients - The PATH Alliance Results. Northwestern University, Department of paediatric hematology and oncology and stem-cell transplantation, Chicago, USA, 26.8.2008.

h) Plakátová sdělení:

Douda L.: Serum citrulline and ornithine: non-invasive markers of the coeliac disease? United European Gastroenterology Week, Kodaň, 14-17.10.2023.

Douda L.: Neobvyklá komplikace fertilizace in vitro. 6. kongres České gastroenterologické společnosti 2017, Ostrava, 1.12.2017.

Hejnová V., **Douda L.:** Mesalazinem indukované poškození myokardu manifestující se srdečním selháním. XXXI. výroční sjezd české Kardiologické společnosti 2023, Brno, 16.5.2023.

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Základní kvantitativní ukazatele u pacientů s celiakií a u zdravých kontrol.....	13
Tabulka č. 2: Srovnání hodnot základních krevních parametrů mezi skupinou pacientů a celiakií a skupinou zdravých dárců krve	16
Tabulka č. 3: Hodnoty konkrétní subpopulace B lymfocytů marginální zóny u pacientů s celiakií	17
Tabulka č. 4: Hodnoty konkrétní subpopulace B lymfocytů marginální zóny u zdravých dárců krve	17
Tabulka č. 5: Srovnání hodnot konkrétní subpopulace B lymfocytů marginální zóny mezi skupinou pacientů s celiakií a skupinou zdravých dárců krve	18
Tabulka č. 6: Výsledky stanovení GIP ve stolici u pacientů s celiakií	21
Tabulka č. 7: Změna v deklaraci adherence/nonadherence u pacientů s celiakií po jejich konfrontaci s výsledkem GIP. GIP – gliadinové imunogenní/imunoreaktivní peptidy, BLD – bezlepková dieta, μg – mikrogram, g – gram.	22

Seznam grafů

Graf č. 1: Korelace mezi plazmatickou koncentrací citrulinu a ornitinu u pacientů s celiakií	14
Graf č. 2: Krabicový graf pro relativní četnost B lymfocytů marginální zóny (%)	19
Graf č. 3: Krabicový graf pro absolutní četnost B lymfocytů marginální zóny ($10^9/\text{l}$)	20
Graf č. 4: Procentuální rozložení výsledků detekce gliadin 33méru ve stolici u pacientů s celiakií	22