

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Lepek a jeho spojitost s různými onemocněními a poruchami

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Anna Liberská**  
Osobní číslo: **C17248**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Lepek a jeho spojitost s různými onemocněními a poruchami**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

### **Zásady pro vypracování**

1. Popsat lepek – strukturu, výskyt, funkci, lepek ve vztahu ke střevní sliznici a její funkci.
2. Onemocnění a poruchy, které jsou spojovány s lepkem – celiakie, alergie, intolerance, autismus.
3. Metody stanovení lepku – přehled, principy.

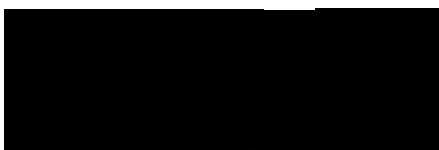
Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

**Seznam doporučené literatury:**

Recentní literatura dostupná v databázi WoS, MEDLINE, Sciencedirect; odborné knihy.  
Další dle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

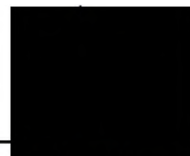
Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2020**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2020**



---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

L.S.



---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2020

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20. 7. 2020

Anna Liberská

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji své vedoucí bakalářské práce paní RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za pomoc, věcné připomínky a vynaložený čas. Dále děkuji mé rodině za podporu během celého studia.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce se zaměřuje na spojitost lepku s poruchami autistického spektra. První část se zabývá charakteristikou lepku a onemocněními s ním spojenými, funkcí tenkého střeva a popisem poruch autistického spektra. Další část je věnována samotné spojitosti autismu s lepkem a vztahu lepku ke střevní sliznici. V závěru práce jsou uvedeny analytické metody využívané pro stanovení obsahu lepku v potravinách.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

lepek, tenké střevo, bezlepková dieta, poruchy autistického spektra, opioidní peptidy

## **TITLE**

Gluten and its association with various diseases and disorders

## **ANNOTATION**

The Bachelor thesis focuses on the association of gluten and autism spectrum disorders. The first part deals with characteristics of gluten and diseases associated with it, the function of the small intestine and the description of autism spectrum disorders. The next part is devoted to the association of autism with gluten and the connection between gluten and the intestinal mucosa. Analytic methods used to determine the gluten content in food are presented at the end of the thesis.

## **KEYWORDS**

gluten, small intestine, gluten-free diet, autism spectrum disorder, opioid peptides

# OBSAH

Úvod .....	12
<b>1. Lepek.....</b>	<b>13</b>
1.1 Struktura lepku .....	13
1.2 Výskyt lepku v potravinách .....	14
<b>2. Trávení lepku .....</b>	<b>15</b>
2.1 Funkce tenkého střeva.....	17
<b>3. Onemocnění spojená s lepkem.....</b>	<b>18</b>
3.1 Celiakie .....	18
3.1.1 Příznaky celiakie .....	18
3.1.2 Diagnostika .....	19
3.1.3 Léčba .....	20
3.2 Alergie na lepek .....	20
3.2.1 Příznaky alergie na lepek.....	20
3.2.2 Diagnostika .....	21
3.2.3 Léčba .....	21
3.3 Citlivost na lepek.....	22
3.3.1 Příznaky citlivosti na lepek .....	22
3.3.2 Diagnostika .....	23
3.3.3 Léčba .....	23
<b>4. Bezlepková dieta .....</b>	<b>25</b>
<b>5. Legislativa a označování potravin .....</b>	<b>26</b>
<b>6. Poruchy autistického spektra .....</b>	<b>27</b>
6.1 Charakteristika .....	27
6.2 Příznaky.....	29
6.3 Diagnostika .....	29

6.4	Formy poruch autistického spektra .....	30
6.4.1	Dětský autismus.....	30
6.4.2	Atypický autismus .....	30
6.4.3	Aspergerův syndrom .....	30
6.4.4	Dětská dezintegrační porucha.....	31
6.4.5	Rettův syndrom .....	31
6.5	Léčba .....	32
<b>7.</b>	<b>Spojitost autismu s lepkem.....</b>	<b>33</b>
7.1	Gastrointestinální problémy .....	33
7.2	Zvýšená propustnost střeva .....	34
7.3	Střevní mikrobiota.....	36
7.4	Opioidní peptidy a jejich interakce v CNS .....	37
7.5	Bezlepková a bezkaseinová dieta u pacientů s poruchami autistického spektra.....	40
<b>8.</b>	<b>Metody stanovení lepku.....</b>	<b>43</b>
8.1	Imunochemické metody – ELISA.....	43
8.2	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu a western blotting .....	45
8.3	Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií.....	46
8.4	Polymerázová řetězová reakce .....	47
8.5	Biosenzory.....	49
<b>9.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>51</b>
<b>10.</b>	<b>Bibliografie .....</b>	<b>52</b>



## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Proteinové složky lepku neboli glutenu .....	13
Obrázek 2: Struktura gliadinu .....	13
Obrázek 3: Stavba obilného zrna .....	14
Obrázek 4: Části tenkého střeva .....	15
Obrázek 5: Struktura tenkého střeva .....	16
Obrázek 6: Metabolismus lepku v tenkém střevě .....	17
Obrázek 7: Nahoře - nepoškozené klky, dole - poškozené klky .....	18
Obrázek 8: Schématické znázornění těsného spoje .....	35
Obrázek 9: Princip rozvolnění těsných spojů .....	35
Obrázek 10: Struktura gluteomorfinu (gliadorfin) .....	38
Obrázek 11: Struktura kasomorfinu ( $\beta$ -kasomorfin-7) .....	38
Obrázek 12: Struktura dipeptidylpeptidázy IV .....	38
Obrázek 13: Teorie mechanismu působení opioidních peptidů na CNS .....	40
Obrázek 14: Schématické znázornění sendvičové ELISA metody .....	44
Obrázek 15: Schématické znázornění kompetitivní ELISA metody .....	45
Obrázek 16: Schématické znázornění elektroforézy SDS – PAGE .....	46
Obrázek 17: Schématické znázornění PCR .....	48
Obrázek 18: Schématické znázornění opakování cyklu .....	49

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Počet dětí s diagnostikovanou poruchou PAS na 10 000 dětí dle jednotlivých zemí .....	28
Tabulka 2: Změna zastoupení některých kmenů a rodů mikroorganismů ve střevě u dětí s PAS vůči zdravým dětem .....	37

## SEZNAM ZKRATEK

ADHD	porucha s deficitem pozornosti a hyperaktivita (Attention Deficit Hyperactivity Disorder)
FODMAP	fermentabilní oligosacharidy, disacharidy, monosacharidy a polyoly (Fermentable Oligosacharides, Disacharides, Monosacharides and Polyols)
PAS	porucha autistického spektra
ADI-R	diagnostický rozhovor (Autism Diagnostic Interview – Revised)
ADOS	pozorování autistických příznaků (Autism Diagnostic Observation Schedule)
GFCF	bez lepku, bez kaseinu (Gluten-free, Casein-free)
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné fázi (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
SDS – PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného (Sodium Dodecyl Sulphate-polyacrylamide Gel Electrophoresis)
2D – ELFO	dvojměrná gelová elektroforéza
IEF	izoelektrická fokusace (Isoelectric Focusing)
Da	Dalton
LC - MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography Mass Spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry)
LC – MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
RT – PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real-time Polymerase Chain Reaction)
HLA	hlavní histokompatibilitní komplex

IgA            protilátka izotopu A

IgG            protilátka izotopu G

IgE            protilátka izotopu E

## Úvod

Potraviny jsou nepostradatelnou součástí našeho života, ať už jsou rostlinného nebo živočišného původu. Představují pro nás zdroj proteinů, lipidů, sacharidů, vitamínů, minerálních látek, a v neposlední řadě také energie. V dřívějších dobách, kdy si lidé ještě obstarávali potravu lovem a sběrem byla potrava vnímána jako nezbytná součást pro přežití, zatímco v dnešní době je pro nás důležitý i prožitek z jídla. Na trhu nacházíme obrovské množství potravin, z kterých si můžeme vybírat. Někdo vybírá potraviny podle kvality, jiný zase podle ceny. Pak jsou tady lidé, kteří se musí v jídle omezovat na základě zdravotních obtíží a sledovat etikety na výrobcích. Jsou to právě alergeny, kterým se spousta lidí musí vyhýbat.

Ve své bakalářské práci se zabývám lepkem a jeho dopadem na lidské zdraví. Lepek je zařazen do seznamu alergenů, kde ve skupině čtrnácti alergenů zaujímá hned první místo. Jedná se o bílkovinu obsaženou v obilných zrnech pšenice, žita, ovsa a ječmene. U potravin patřících do skupiny pekařských a cukrářských výrobků, těstovin, kávových směsí a výrobků z mouky je zřejmé, že lepek obsahují. Větším rizikem je ale skrytý lepek, který bychom mnohdy ani v dané potravine neočekávali. Jedná se především o potraviny, jako jsou marmelády, kečupy, koření, jogurty, zmrzliny, cukrovinky, konzervy a další, ve kterých se nachází lepek například ve formě pšeničného škrobu.

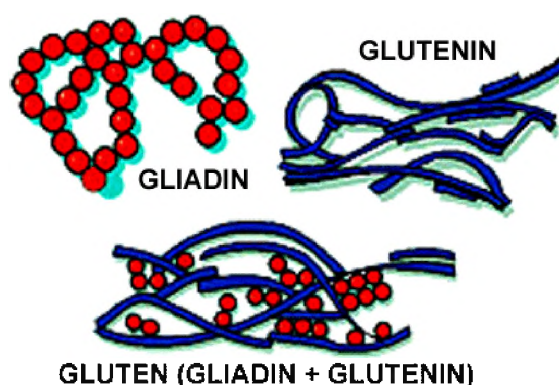
Mezi onemocnění, která souvisí s lepkem, se řadí celiakie, alergie na lepek, citlivost na lepek a v posledních letech i v mnoha jiných souvislostech skloňovaný autismus. Lidé s těmito onemocněními a poruchami by měli lepek ze své stravy zcela odstranit a dodržovat bezlepkovou dietu. V případě nedodržování bezlepkové diety mohou následovat různé zdravotní komplikace, mezi které se řadí především gastrointestinální obtíže, únava, kožní problémy, ale i bolesti kloubů či psychické problémy. Důležitá je včasná diagnostika daného onemocnění a včasné zahájení bezlepkové diety.

Nejčastější metody stanovení lepku jsou enzymová imunoanalýza na pevné fázi (ELISA), elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií, polymerázová řetězová reakce (PCR) či použití biosenzorů. Metody stanovení obsahu lepku jsou využívány především v potravinářském průmyslu pro kontrolu potravin. Na základě nařízení musí být spotřebiteli poskytována informace o přítomnosti lepku v potravinách, která je uvedena na obalech výrobku.

# 1. Lepek

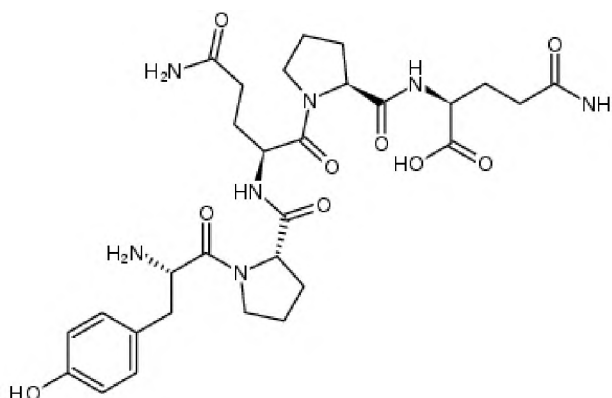
## 1.1 Struktura lepku

Lepek je bílkovina složená z prolaminu a glutelinu. V pšenici se prolamin nazývá gliadin a glutelin se nazývá glutenin (Obr. 1) [1]. Prolaminy obsažené v různých obilninách mají odlišné názvy – ječmen obsahuje hordein, žito secalin a oves avenin [2]. Zásobní proteiny kukuřice a rýže se také někdy označují jako lepek, ale od pšeničného lepku se liší chybějícím gliadinem [3, 4].



Obrázek 1: Proteinové složky lepku neboli glutenu; převzato z: [5]

Gliadiny (Obr. 2) jsou monomerní, vysoce viskózní proteiny bohaté na dvě aminokyseliny, prolin a glutamin [3, 4]. Obsahují také cystein, který má vliv na strukturu a funkci lepku. Cystein má ve své struktuře obsaženou thiolovou skupinu, a proto může uvnitř i mezi řetězci tvořit disulfidické vazby [6]. Gliadiny jsou molekuly o molekulové hmotnosti v rozmezí 25 - 100 kDa a jsou rozpustné ve zředěných alkoholech [7, 8].

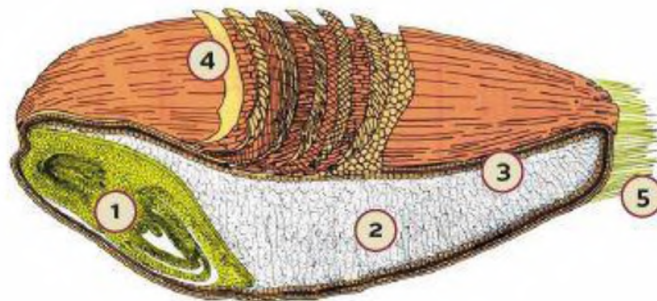


Obrázek 2: Struktura gliadinu; převzato z: [9]

Gluteniny jsou vysoce elastické proteiny tvořící polymerní síť, jejichž struktura je uvnitř stabilizována vodíkovými, iontovými a disulfidovými vazbami [3, 4]. Skládají se ze dvou podjednotek s vysokou molekulovou hmotností 70 - 90 kDa a s nízkou molekulovou hmotností 20 - 45 kDa a jsou rozpustné ve zředěných kyselinách a zásadách [7, 10, 11].

## 1.2 Výskyt lepku v potravinách

Lepek se nachází v endospermu různých obilných zrn jako je pšenice, žito, oves a ječmen (Obr. 3) [1]. Gliadin a glutenin společně tvoří okolo 80 % proteinu přítomného v pšeničném semeně [3].

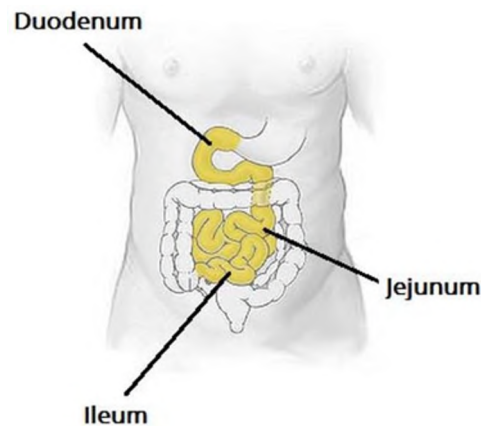


Obrázek 3: Stavba obilného zrna; převzato a upraveno z: [12] 1 - klíček, 2 - endosperm, 3 - aleuronová vrstva, 4 - obalové vrstvy, 5 - chlupy

Lepek se vyskytuje nejen v obilí a v obilných produktech, ale i v hotových potravinách. V potravinářském průmyslu se běžně využívá jako pojivo, stabilizátor nebo jako přídatná látka za účelem zlepšení textury či chuti potravin. Další jeho vlastností je tepelná stabilita [13].

## 2. Trávení lepku

Trávení lepku probíhá v tenkém střevě, což je trubice vedoucí od žaludku do tlustého střeva [14]. Je složené ze tří anatomických úseků (Obr. 4): duodenum, jejunum a ileum [15]. Délka tenkého střeva je variabilní a pohybuje se v rozmezí 3 – 10 metrů a šířka kolem 2,5 - 3 cm [16].

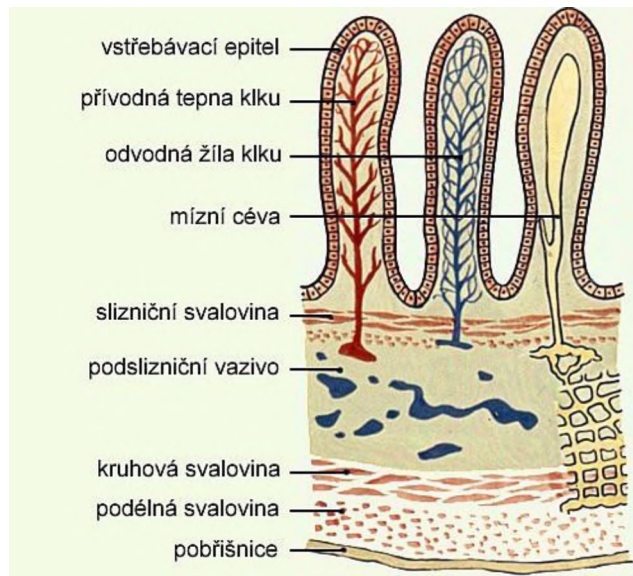


Obrázek 4: Části tenkého střeva; převzato a upraveno z: [14]

Duodenum (dvanáctník) je 25 cm dlouhá trubice formovaná do tvaru písmene C. Tato část tenkého střeva je srostlá s pobřišnicí, což je blána, která pokrývá stěnu dutiny břišní. Do dvanáctníku vede vývod slinivky břišní a žlučovod, proto zde dochází k chemickému trávení potravy [17, 18].

Dalšími částmi tenkého střeva jsou jejunum (lačník) a ileum (kyčelník). Obě tyto části jsou připojeny mesenteriem, vějířovitou dvojvrstvou tkání k zadní břišní stěně. Celková délka jejuna a ilea je 5 - 6 metrů, přičemž jejunum odpovídá dvěma pětinaám této délky [140]. Hranice mezi jejunem a ileem je těžko stanovitelná, avšak jejunum má silnější stěnu a je více prokrvené než je tomu u ilea [16].

Stěna tenkého střeva se skládá ze čtyř vrstev: sliznice, podslizničního vaziva, svaloviny a povrchového vaziva (Obr. 5). Sliznice tenkého střeva je tvořena epitelovou tkání, jejíž funkcí je vstřebávání živin z tráveniny. Podslizniční vazivo je inervované a obsahuje krevní a lymfatické cévy. Svalovina umožňuje pohyb střev a povrchové vazivo spojuje střevo s mesenteriem [18]. Vnitřní stěna tenkého střeva je zvrásněna v klky a mikrokšky, které několikanásobně zvětšují povrch sliznice a umožňují tak lepší vstřebatelnost živin [18, 19].



Obrázek 5: Struktura tenkého střeva; převzato z: [20]

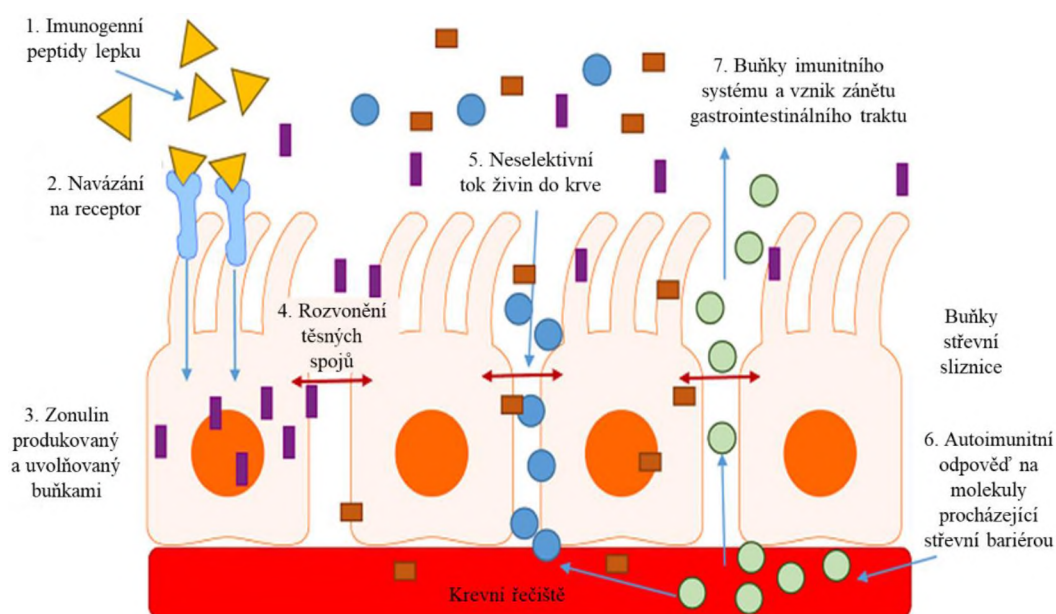
Motilita tenkého střeva spočívá v koordinovaném zúžení a rozšíření kruhové a vnější podélné svaloviny, což znamená, že v jedné oblasti střeva dojde k zúžení a v následující oblasti k rozšíření svaloviny. Těmito pohyby dochází k mísení obsahu střev s trávicími šťávami a posouvání tráveniny směrem k tlustému střevu. Mezi ileem a tlustým střevem se nachází ileocekální svěrač, přes který za vyššího tlaku přechází trávenina z tenkého střeva do tlustého. Přítomný vyšší tlak znemožňuje zpětný tok tráveniny do ilea [21].

V případě bílkovin dochází při trávení potravy k rozkladu na základní stavební jednotky, tedy aminokyseliny. Trávicí enzymy štěpí bílkoviny na jednotlivé aminokyseliny, které jsou resorbovány ve střevní sliznici a transportovány do celého těla jako zdroj energie nebo stavební jednotky k syntéze nových bílkovin. Takto jsou zpracovány všechny bílkoviny, které trávíme, až na lepek [22].

Trávení lepku, konkrétně gliadinu a gluteninu je obtížnější v tom, že obsahuje větší množství prolinu a glutaminu, které jsou rezistentnější vůči enzymům produkovaným v žaludku, pankreatu a ve střevní sliznici, jelikož tyto enzymy mají sníženou propyl-endopeptidázovou aktivitu [23, 24, 25, 26]. Propyl-endopeptidáza je enzym hydrolyzující peptidové vazby na karboxylovém konci prolinu nacházejícího se uvnitř oligopeptidu [27]. Neúplným štěpením lepku vznikají imunogenní peptidy s vysokou molekulovou hmotností (Obr. 6) bohaté na prolin a glutamin, které se kumulují v tenkém střevě (kapitola 5.2) [25]. Po resorpci ve střevní sliznici je lepek náchylný k deamidaci tkáňovou transglutaminázou, která zvyšuje možnost rozpoznání



glutenových peptidů imunitním systémem [23, 28]. U citlivých jedinců se lepek po post-translační úpravě chová agresivněji a spouští řadu reakcí vedoucích ke střevním a mimostřevním příznakům. V tomto procesu rozpoznává oslabený imunitní systém u geneticky predisponovaných jedinců tkáňovou transglutaminázu a vyvolává proti ní autoimunitní odpověď [28].



Obrázek 6: Metabolismus lepků v tenkém střevě; převzato a upraveno z: [29]

## 2.1 Funkce tenkého střeva

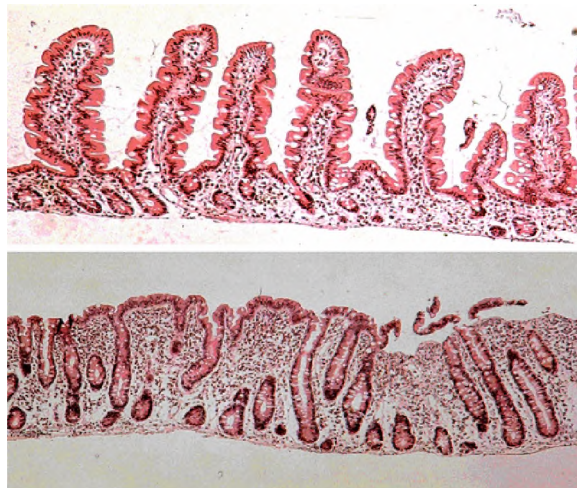
Hlavní funkcí tenkého střeva je finální trávení a vstřebávání živin, vody a elektrolytů [17]. Tyto procesy jsou usnadněny jeho specifickou strukturou, která zahrnuje několik úrovní záhybů neboli klků, díky kterým má sliznice velký specifický povrch a je dosaženo maximální absorpce živin [30].

V tenkém střevě probíhá 90 % absorpce živin [30]. Ze žaludku přechází trávenina do duodena, kde dochází k neutralizaci žaludečních šťáv a chemickému trávení, na kterém se podílí enzymy pankreatické šťávy (trypsin, lipáza a amyláza) a žluč sloužící k odbourávání a vstřebávání lipidů [19, 31, 32]. Primární funkcí jejunu je absorbovat cukry, aminokyseliny a mastné kyseliny do krevního řečiště, zatímco ileum absorbuje zbývající živiny, především vitamin B12 [31].

## 3. Onemocnění spojená s lepem

### 3.1 Celiakie

Celiakie je dědičné autoimunitní onemocnění tenkého střeva, které postihuje 0,5 - 1 % populace [33]. Hlavní predispoziční geny jsou umístěny v hlavním histokompatibilitním komplexu (HLA) na chromozomu 6, konkrétně HLA - DQ2 a DQ8 geny [34]. Lepek obsažený v pšenici, žitu nebo ječmeni vyvolává u geneticky náchylných jedinců [33] reakci autoimunitního systému, která vede k poškození střevních klků (Obr. 7) [22]. Konkrétně dochází ke ztrátě drobných výčnělků na výstelce tenkého střeva, zvaných villi. Normálně jsou živiny z potravy absorbovány do krevního řečiště prostřednictvím těchto klků [35].



Obrázek 7: Nahoře - nepoškozené klky, dole - poškozené klky; převzato z: [33]

Existují tři faktory, které jsou propojeny a způsobují vznik celiakie – přecitlivělý imunitní systém, genetická predispozice a faktory vnějšího prostředí. Celiakie se proto u někoho vyvíjí v dětství a u jiných až v dospělosti [36].

#### 3.1.1 Příznaky celiakie

Existuje více než 200 příznaků a symptomů celiakie, ale většina lidí s celiakií nemá žádné příznaky. Tito lidé bez příznaků jsou však stále ohroženi některými komplikacemi spojenými s touto nemocí. Příznaky se mohou nebo nemusí projevit v zažívacím systému. Například jedna osoba může mít průjem a bolesti břicha, zatímco jinou osobu postihuje neplodnost nebo anemie [36].

Mezi příznaky celiakie u dětí patří především zažívací potíže – průjem, zvracení a bolesti břicha. U dospělých jsou zažívací obtíže méně pravděpodobné a mezi časté mimostřevní příznaky se řadí chronická únava, anemie, kožní vyrážka, bolesti kloubů a hlavy či úzkost [37].

U nediodagnostikované či špatně léčené celiakie je zvýšené riziko dlouhodobých zdravotních komplikací, které mohou vést až k rozvoji rakoviny tenkého střeva, osteoporózy, neplodnosti a depresí [38].

### **3.1.2 Diagnostika**

Celiakie je diagnostikována dvěma způsoby. Jednak séropozitivitou specifických autoprotilátek proti tkáňové transglutamináze 2 a proti deamidovaným gliadinovým peptidům, kdy se vyšetřují protilátky ve třídě IgG a IgA a jednak průkazem charakteristických změn histologických preparátů biopsií sliznice duodena [39]. K podezření na celiakii mohou vést i rutinní krevní testy, při kterých je zjištěna nízká hladina hemoglobinu, vápníku, draslíku, hořčíku a fosforu [40].

Diagnostika celiakie je založena také na detekci zvýšených hladin výše zmíněných autoprotilátek pomocí enzymové imunoanalýzy na pevné fázi (ELISA) [39].

Biopsie se provádí endoskopicky pomocí dlouhé tenké trubice s malou kamerou na konci. Pomocí chirurgického nástroje vloženého do endoskopické trubice je z duodena odebrán vzorek tkáně, který je následně mikroskopicky hodnocen [36]. Další možností je chromoendoskopie, která je založena na vizualizaci sliznice duodena barvivy indigokarmín nebo methylenová modř, po jejichž aplikaci jsou případné změny na sliznici lépe viditelné [41]. Na základě nálezu je stanovena definitivní diagnóza celiakie [36].

Je důležité, aby jedinec před samotnou biopsií konzumoval stravu obsahující lepek po dobu nejméně 2 – 8 týdnů před zákrokem. V případě vynechání lepku ze stravy před plánovanou biopsií může zkreslit výsledky, které se mohou jevit jako negativní [42].

Časná diagnóza celiakie může zabránit rozvoji dalších autoimunitních poruch a dalších komplikací. [36].

### 3.1.3 Léčba

Jakmile je diagnóza celiakie potvrzena biopsií, je zahájena léčba spočívající v celoživotním dodržování bezlepkové diety [43]. U většiny lidí po této dietě vymizí příznaky, poškozené tenké střevo se začne regenerovat a zabrání se dalšímu poškozování střeva. Zlepšení nastává již od prvního týdne eliminace lepku ze stravy [36]. K úplné regeneraci sliznice tenkého střeva dochází v rozmezí šesti měsíců až dvou let, avšak nutností je již výše zmíněné celoživotní dodržování bezlepkové diety [44].

K poklesu hladiny protilátek v krvi dochází po vysazení lepku se zpožděním, může to trvat i více než rok [36].

## 3.2 Alergie na lepek

Mezi osm nejvýznamnějších potravinových alergenů patří pšeničná mouka. Často je spouštěčem alergické reakce s trávicími, respiračními a kožními projevy, ale i celkovými a anafylaktickými reakcemi [45]. K alergické reakci dochází především u dětí po požití moučné bílkoviny, která může způsobit i u dospělých IgE – zprostředkovanou alergii na pšenici [45, 46]. Alergie na pšenici, jejíž podstatou je reakce imunitního systému na lepek, se u citlivých jedinců projeví během několika minut až hodin po expozici [47].

IgE – zprostředkovaná reakce je typická rychlým nástupem po požití či inhalaci lepku [48]. První expozice alergenu vyvolává imunologickou reakci, při které se neprojevují žádné klinické příznaky, ale dochází k aktivaci B – lymfocytů, které jsou aktivovány k produkci sIgE protilátek, a tím dojde k tzv. senzibilizaci. K alergii dochází až po opakovaném kontaktu s alergenem, který způsobuje IgE – zprostředkovaný alergický zánět s klinickými příznaky [45].

### 3.2.1 Příznaky alergie na lepek

Alergická reakce na lepek může spustit celou řadu klinický projevů, které se mohou projevit ihned po expozici lepku nebo až později a jejich závažnost může být mírná až život ohrožující [49]. U většiny dětí se alergie na pšenici projevuje středně těžkou až těžkou atopickou dermatitidou. Požití pšenice může vyvolat kopřivku, respirační obtíže, nevolnost, bolesti břicha, svědění očí, alergickou rýmu nebo v krajním případě i anafylaktickou reakci [46, 50].

Při anafylaxi často dochází k otoku krku, obtížnému polykání, bolesti na hrudi, potížím s dýcháním, blednutí nebo namodráním kůže, slabému pulsu až životu ohrožujícímu poklesu tlaku. V tomto případě je nezbytné vyhledat lékařskou pomoc [50].

Projevy u dospělých jsou nejčastěji ve formě respirační alergie [22, 51]. Mezi další projevy se řadí anafylaktický šok, syndrom dráždivého tračníku či zánětlivé onemocnění jícnu [51].

### **3.2.2 Diagnostika**

Diagnostika potravinové alergie se opírá o anamnézu jedince, která vypovídá o tom, zda příznaky souvisejí s alergií na lepek. Současně se provádí tzv. kožní prick testy a krevní testy, které alergii potvrdí či vyvrátí [52]. Zásadní je zjištění příčiny alergie. Proto je důležité, aby jedinec vyloučil ze své stravy všechny pšeničné produkty, které bude postupně po několika dnech opět zařazovat do své stravy a sledovat vznikající obtíže [50].

Další možností je testování alergie přímo užíváním tobolek se známými alergeny. Zpočátku jsou podávány tablety s malými dávkami, které se postupně navyšují. Poté se sledují případné příznaky [50].

V neposlední řadě lze provést kožní test, který spočívá v umístění kapky extraktu alergenu na paži nebo záda, která je následně lékařem vpíchnuta do kůže [50]. Používá se komerční pšeničný extrakt [53]. Jakékoliv svědění, zarudnutí nebo otok prokazuje alergii na pšenici. Tento test není zcela průkazný a je třeba provést i další testy [50].

Poslední možností jsou krevní testy, kterými lze detekovat hladinu protilátek sIgG pro specifické potraviny. Pokud jsou v krvi přítomny určité protilátky, znamená to, že osoba je alergická na danou potravinu. Tyto testy se kombinují s kožními prick testy pro potvrzení výsledků [54].

### **3.2.3 Léčba**

U lidí trpících alergií na lepek je důležité, aby se vyhýbali konzumaci lepku a inhalaci pšenice či jiných obilovin [47].

V případě nevědomé expozice a následné anafylaktické reakce je nutné podání adrenalinu v injekci v množství 0,15 – 0,3 mg, který se aplikuje do stehenního svalu.

Dlouhodobá léčba spočívá v pravidelném podávání antihistaminik nebo glukokortikoidů [55].

### **3.3 Citlivost na lepek**

Citlivost na lepek je charakterizována střevními a mimostřevními příznaky souvisejícími s požitím potravin obsahujících lepek u lidí, kteří však netrpí celiakií nebo alergií na lepek [34]. Jedná se tedy o neceliakální citlivost na lepek, avšak symptomy mohou být totožné jako u celiakie, zatímco klinický obraz se liší [22]. Užívány jsou různé názvy jako glutenová senzitivita, glutenová intolerance, neceliakální glutenová senzitivita, pšeničná senzitivita, pšeničná intolerance nebo neceliakální pšeničná senzitivita [39].

Citlivost na lepek nevede k zánětům tenkého střeva, následnému zplošťování klků a zvýšené permeabilitě sliznic. Nevznikají ani autoprotilátky proti tkáňové transglutamináze. Reakci způsobuje zcela jiný imunitní mechanismus než u celiakie a dochází tedy k reakci přirozeného imunitního systému [22].

V poslední době se ukazuje, že jediným spouštěčem obtíží nemusí být lepek. Pšenice a další obiloviny mimo lepek obsahují i další imunogenní proteiny, a to inhibitory amyláz a trypsinu, nebo aglutininy z pšeničných klíčků, které jsou schopny aktivovat střevní imunitní systém. FODMAP (Fermentable Oligosacharides, Disacharides, Monosacharides and Polyols) je zkratka označující fermentabilní oligosacharidy, disacharidy, monosacharidy a polyoly, které se také nacházejí v obilných zrnech a jsou obtížně vstřebatelné. Potraviny obsahující velké množství fruktózy, fruktanů, laktózy, galaktanů a polyolů jsou zdrojem FODMAP, kam se řadí i potraviny obsahující pšenici, žito a ječmen [39].

#### **3.3.1 Příznaky citlivosti na lepek**

U citlivosti na lepek se nežádoucí příznaky objevují několik hodin až dnů po konzumaci lepku, zatímco u alergie na lepek je to do dvou hodin po konzumaci lepku [56].

Mezi nejčastější symptomy patří zácpa, průjem, křeče, bolesti břicha, nadýmavost, pálení žáhy a říhání [22, 39]. Mimo jiné lze zařadit symptomy, které se týkají chování a to deprese, zatmění mysli, porucha s deficitem pozornosti a hyperaktivita (ADHD) nebo jiná podobná chování [22]. Mimostřevní obtíže postihují především svaly, klouby,

nervový systém, kůži či sliznice [39]. Zahrnují ekzém, afty v ústech, poruchy rovnováhy, pocity na omdlení, únavu, poruchy spánku, chudokrevnost, osteoporóza, bolesti kloubů a hlavy nebo znečitlivění v nohou, pažích a prstech [22, 39].

### **3.3.2 Diagnostika**

Diagnostika citlivosti na lepek je komplikovaná, jelikož neexistuje žádný diagnostický test, který by ji jednoznačně prokázala [57]. Nejdříve se vylučuje alergie na pšenicí negativními alergologickými testy, poté se vyloučí celiakie specifickým stanovením protilátek a histologickým vyšetřením duodena, a nakonec ostatní nemoci s podobnými symptomy [39].

Diagnóza je založena na potvrzení spojitosti mezi konzumací lepku a projevem nežádoucích příznaků. Stanovení diagnózy citlivosti na lepek se provádí až po vyloučení celiakie a alergie na lepek. U jedinců trpících citlivostí na lepek nedochází ke změnám na sliznici tenkého střeva [58]. Diagnóza je potvrzena vylučovací metodou [56]. Mezi důležité kroky patří eliminace potravin obsahující lepek a následné znovuzavedení do jídelníčku. Na základě toho lze pozorovat, zda dochází ke zhoršení zdravotního stavu po opětovné konzumaci lepku [22].

Citlivost na lepek, která se projevuje pouze intestinálními příznaky je prakticky neodlišitelná od funkčních gastrointestinálních symptomů, především od syndromu dráždivého tračníku [39].

### **3.3.3 Léčba**

Jedincům s citlivostí na lepek je doporučena nejdříve eliminace lepku z potravy a následně jeho opětovné zavedení do jídelníčku v omezeném množství, aby došlo k nastavení tolerované hladiny lepku [59]. Dieta musí být sestavena tak, aby byl dodržen vyvážený příjem cukrů, tuků, bílkovin, minerálů, vitamínů a vlákniny. Individuálně vytvořený dietní plán je upřednostňován před striktní bezlepkovou dietou nebo dietou obsahující nízká množství FODMAP. Obě tyto diety lze vyzkoušet v rámci 4 – 6 týdnů k eliminaci symptomů [39].

Pokud má jedinec po potravině obsahující lepek mimostřevní příznaky nebo pozitivní protilátky proti nativnímu gliadinu, je na místě zavést na zkoušku bezlepkovou dietu. V případě střevních obtíží podobných syndromu dráždivého tračníku lze vyzkoušet dietu s nízkým obsahem FODMAP [60].

Po úlevě po bezlepkové dietě se doporučuje podle tolerance pomalé přidávání lepku do stravy. Každý jedinec může být k lepku odlišně tolerantní, ale nemusí se obávat kontaminace potravin lepkem, jelikož tolerance k stopovému množství je většinou vysoká. To samé platí pro přidávání potravin s nízkým obsahem FODMAP [39].



## 4. Bezlepková dieta

V současné době je pro jedince citlivé na lepek jedinou účinnou léčbou bezlepková dieta. Přesné množství lepku, který je jedinec schopen tolerovat bez projevení příznaků, je obtížné stanovit. Denní příjem lepku by však neměl přesáhnout 10 mg [61].

Potraviny vyrobené z pšenice, ječmene, žita a ovsu je nutné z jídelníčku vynechat [2]. Mezi tyto potraviny se například řadí: pečivo, sladké pečivo, sušenky, strouhanka, tortilly, těstoviny, cereálie, pizza, puding, omáčky, dresinky, kávové náhražky či pivo [62, 63].

Některé potraviny mohou obsahovat skrytý lepek ve formě aditiv a konzervantů, a proto mohou být rizikové. Do této skupiny patří například: prášek do pečiva, droždí, moučkový cukr, polevy, likéry, sójové omáčky, kakao, ořechová másla, dresinky, koření, zmrzlina, džemy, tofu, uzeniny, konzervy nebo mražená zelenina [62].

Povolené jsou potraviny a suroviny, které jsou označené jako bezlepkové. Mezi přirozeně bezlepkové suroviny patří rýže, sója, kukuřice, brambory, amarant, pohanka, quinoa, jáhly, ořechy a luštěniny. Povolené potraviny jsou například: mléko, čaj, káva, víno, whisky, rum, tequilla, ocet, čerstvé bylinky, ovoce, zelenina, máslo, oleje, maso a ryby [62, 64].

Důležité je vyhnout se křížové kontaminaci bezlepkových potravin nebo surovin lepkem. Ke křížové kontaminaci může dojít v průběhu výrobního procesu, kdy nejsou od sebe odděleny linky vyrábějící bezlepkové potraviny a potraviny obsahující lepek. Ke kontaminaci může dojít i v případě, kdy není používáno odlišné kuchyňské nádobí pro přípravu bezlepkových pokrmů [65].

Cílem bezlepkové diety je udržení zdravého stavu pomocí vyvážené stravy vylučující lepek. Avšak přísná a nevyvážená bezlepková dieta může vést k nedostatku vitaminů B a D, vápníku, železa, zinku, hořčíku a vlákniny [66].

## 5. Legislativa a označování potravin

Jelikož je pro jedince citlivé na lepek jedinou možnou léčbou bezlepková dieta, je důležité, aby byly spotřebiteli poskytovány informace o přítomnosti či nepřítomnosti lepku v potravinách [67]. Každý jedinec je schopen tolerovat jiný obsah lepku v potravinách [63]. Proto bylo v České republice vydáno „nařízení č. 828/2014 o požadavcích na poskytování informací o nepřítomnosti či sníženém obsahu lepku v potravinách spotřebitelům“ [68].

Potraviny mohou být označeny „*bez lepku*“ v případě, kdy obsah lepku nepřekročí limit 20 mg/kg. Pokud obsah lepku v potravině nepřekročí hranici 100 mg/kg, lze použít označení „*velmi nízký obsah lepku*“ [2, 69].

Oves se doporučuje konzumovat v případě, kdy je označen „*bez lepku*“, čímž je deklarována jeho čistota a vyloučena křížová kontaminace. Čistota je zajištěna průběžným stanovováním obsahu lepku v bezlepkovém ovsu. Tato kontrola probíhá během pěstování, přepravy, zpracování a skladování [69].

Na obalech potravinářských výrobků může být uvedeno označení „*může obsahovat lepek*“. Toto označení se používá jako prevence v případě, kdy mohou být v potravině přítomny stopy lepku vzniklé v důsledku křížové kontaminace [70].

## 6. Poruchy autistického spektra

V poslední době je citlivost na lepek spojována i s poruchami autistického spektra. Na základě této možné spojitosti byly provedeny různé studie, jejichž výsledky ale nejsou dosud zcela jednoznačné.

### 6.1 Charakteristika

Porucha autistického spektra (PAS) je komplexní vývojová porucha, která zahrnuje přetrvávající potíže v sociální interakci, řeči a neverbální komunikaci, a omezené či opakující se chování, jehož závažnost se u každého jedince liší [71].

PAS je obvykle poprvé diagnostikována ve věku mezi 2 – 3 rokem, kdy se projevují mnohé typické příznaky. Ovšem u některých dětí se první známky autismu objeví až v pozdějším dětském věku, kdy dochází ke ztracení dříve získaných dovedností. PAS je také třikrát až čtyřikrát častější u chlapců než u dívek a mnoho dívek s PAS vykazuje méně zjevné příznaky ve srovnání s chlapci. Přesto mnoho dětí s diagnózou poruchy autistického spektra žije nezávislý, produktivní a plnohodnotný život [71].

Vzhledem ke komplikovanosti poruchy a k různorodým příznakům existuje pravděpodobně mnoho příčin, avšak žádná není dosud přesně známa. Přispívat k tomu může jak genetická predispozice, tak i vliv prostředí. U některých dětí může být PAS spojena s genetickou poruchou jako je tomu u Rettova syndromu nebo na základě genetické změny může dojít ke zvýšenému riziku výskytu poruchy autistického spektra. Některé geny mohou ovlivnit vývoj mozku, způsob jakým mozkové buňky komunikují nebo ovlivnit závažnost symptomů. V současné době je předmětem zkoumání vliv virové infekce, léků, komplikací během těhotenství nebo látek znečišťujících prostředí na spouštění PAS [72].

Přesná příčina není známa, ale spojitost výskytu PAS s gastrointestinálními poruchami byla zjištěna až u 91,4 % případů a některé studie uvádějí míru okolo 50 %. První příznaky autismu se objevují ve věku 1 – 3 let, kdy dochází k přechodu mezi nestabilním a stabilním mikrobiomem (kapitola 5.3) podobným jako u dospělých. Proto lze považovat mikrobiom za potenciální faktor rozvoje PAS [73].

Stanovení celkového počtu dětí s PAS je poněkud obtížné, jelikož většina zemí tyto statistiky nemá, a navíc u spousty dětí není PAS diagnostikována. V následující tabulce

(Tab. 1) je uveden počet dětí s diagnostikovanou PAS na 10 000 dětí k roku 2020 [74]. Odhaduje se, že na celém světě trpí jedno ze 160 dětí poruchou autistického spektra. Na základě epidemiologických studií provedených za posledních padesát let je zřejmé, že počet dětí s PAS stále celosvětově roste [75].

Tabulka 1: Počet dětí s diagnostikovanou poruchou PAS na 10 000 dětí dle jednotlivých zemí; převzato a upraveno z: [74]

<b>Země</b>	<b>Počet dětí s diagnostikovanou poruchou PAS na 10 000 dětí</b>
Hongkong	327
Jižní Korea	263
Spojené státy	222
Japonsko	181
Irsko	153
Švýcarsko	145
Kanada	106
Dánsko	69
Singapur	67
Estonsko	60
Belgie	60
Finsko	54
Norsko	51
Holandsko	48
Německo	38
Čína	23
Tchaj-wan	5
Polsko	3

Dosud nebyl uveden přesný počet lidí s PAS v České republice. V roce 2016 bylo odhadnuto, že poruchou autistického spektra trpí až 1 % populace, což by odpovídalo přibližně počtu 100 000 lidí v České republice [76]. V roce 2019 se odhad zvýšil na 2,5 % populace, tedy zhruba 250 000 lidí trpících poruchou autistického spektra v České republice [77].

## 6.2 Příznaky

Poruchy autistického spektra zahrnují různé příznaky, jako je například snížená schopnost komunikace, potíže se socializací, opakující se zájmy, potřeba pravidelné denní rutiny a zvýšená reakce na vnější podněty [73]. Vážnost poruchy a vyskytující se symptomy jsou u každého člověka rozdílné. U řady lidí jsou některé dovednosti opožděné nebo zcela chybí [76].

Zejména u dětí jsou znatelné rozdíly v řeči, kdy děti nemluví, mají dobrou slovní zásobu nebo jsou výrazněji jazykově nadané. Stejně tak je tomu i u intelektu. Jsou děti, které mají poruchu intelektu, průměrné schopnosti nebo jsou nadprůměrně nadané. Co se týká sociálního kontaktu, zde lze pozorovat pasivní přístup dětí, fixaci na blízké osoby, netečnost, ale neovládají a nedodržují pravidla sociálního chování. Všechny tyto symptomy se různě kombinují a existuje tak velké množství variant, proto v podstatě neexistují dvě děti se stejnými projevy [76].

## 6.3 Diagnostika

Včasná diagnostika a léčba je důležitá pro zmírnění příznaků autismu a zlepšení kvality života lidí s autismem a jejich rodin. Dosud neexistuje žádný lékařský test na autismus. Diagnostika probíhá na základě pozorování, jak dítě mluví a jedná ve srovnání s ostatními dětmi ve stejném věku [71].

Existuje univerzální diagnostický model skládající se ze tří fází, a to fáze podezření, fáze diagnostické a fáze postdiagnostické. V první fázi podezření se používá screeningový test, jehož pomocí se sledují typické příznaky, které se následně vyhodnotí. V diagnostické fázi se provádějí další podrobnější psychologická vyšetření důležitá pro určení správné diagnózy. V poslední fázi postdiagnostické je jedinec seznámen s aktuálním stavem poruchy [76].

Nejčastěji používanými nástroji pro diagnostiku PAS jsou dva screeningové testy: Autism Diagnostic Interview – Revised (ADI-R) a Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS). ADI-R je strukturovaný rozhovor, který je důležitý pro zjištění informací o vývoji dítěte, osvojení a ztrátách jazykových dovedností, komunikaci, sociálním rozvoji, zájmech a chování [78]. Pomocí testu ADOS se sleduje chování a komunikace pacienta a jeho reakce na jednání jiného [76]. Screeningových testů však existuje celá řada. Těmito testy lze kvantifikovat závažnost PAS [78].

## **6.4 Formy poruch autistického spektra**

### **6.4.1 Dětský autismus**

Mezi typické znaky se řadí snížená reakce na emoce druhých lidí, poruchy sociálního a emočního chování či averze vůči změnám v běžném životě. Často je dětský autismus doprovázen abnormálním až bizarním chováním. Míra závažnosti poruchy se odvíjí v rozmezí od mírných symptomů až po větší počet závažnějších symptomů. Všechny tyto příznaky se s věkem mění, přesto je možné autismus diagnostikovat v každém věku [76].

V období třetího až pátého roku života jsou příznaky dětského autismu projeveny nejvýrazněji. Po nástupu do školy lze pozorovat odlišnosti mezi vztahem k cizím lidem a k rodičům. Někdy u dětí s méně závažnou poruchou může dojít během školní docházky ke zlepšení komunikačních a sociálních dovedností. V dospělosti stále přetrvávají problémy se sociální komunikací i u jedinců s méně závažnou poruchou [79].

### **6.4.2 Atypický autismus**

Atypický autismus se projevuje určitými příznaky autismu, ale nespĺňuje všechna kritéria pro diagnostiku dětského autismu. Proto je atypický autismus mnohdy špatně diagnostikován [80]. Mezi kritéria patří již výše zmíněné kvalitativní narušení sociální interakce, komunikace a omezené, opakující se stereotypní způsoby chování, zájmů a aktivit. Avšak s řadou specifických emocionálních, sociálních symptomů a symptomů týkajících se chování se shodují s dětským autismem. Typickými příznaky v této kategorii je neobvyklá přecitlivělost na některé vnější podněty nebo problémy s navazováním vztahů s vrstevníky, ale sociální dovednosti nebývají tolik narušené, jako je tomu u dětského autismu [76].

### **6.4.3 Aspergerův syndrom**

Aspergerův syndrom je pervazivní vývojová porucha. Tato porucha se kromě problémů s představivostí vyznačuje narušenou sociální komunikací, sociální interakcí a flexibilitou myšlení. Mezi viditelné nedostatky se řadí omezená schopnost zapojit se do vzájemné sociální interakce a opakující se specifické zájmy [81]. Nevykazuje opoždění řeči ani opoždění kognitivního vývoje, ale projevuje se specifickými poruchami v určitých oblastech a tím se liší od dětského autismu [82]. U jedinců

s Aspergerovým syndromem se intelekt pohybuje v normě, avšak není podmínkou, že v dospělosti povedou plně samostatný život [76].

Klinické projevy jsou velmi různorodé a liší se v každé věkové kategorii, a proto je diagnostika velice obtížná. Aspergerův syndrom je většinou diagnostikován u dětí předškolního věku, ale v některých případech dokonce až v dospělosti. Tato pozdní diagnóza má významný dopad na psychiku a kvalitu života jedince [82].

#### **6.4.4 Dětská dezintegrační porucha**

K nástupu dětské dezintegrační poruše dochází z pravidla mezi druhým až desátým rokem a následně dochází ke ztrátě již získaných dovedností. Do doby, než dojde ke ztrátě dovedností je dítě schopno mluvit v krátkých větách, gestikulovat, interagovat s okolím a sdílet pozornost [76]. Typickými příznaky jsou neschopnost rozvíjet vzájemné vztahy nebo zahájit a udržovat konverzaci s ostatními lidmi [83]. Poté může dojít k následnému zlepšení těchto dovedností, ale není to vždy pravidlem [76].

Rozdíl mezi dětskou dezintegrační poruchou a dětským autismem je v tom, že dezintegrační porucha má pozdější nástup příznaků a ztráta již osvojených dovedností je rychlejší a více znatelná. Hranice mezi autismem a dezintegrační poruchou ale není zcela jednoznačná [76].

#### **6.4.5 Rettův syndrom**

Rettův syndrom je závažná vývojová porucha mozku postihující 1 z 10 000 žen. Je způsoben mutací genu nacházejícího se na dlouhém raménku chromozomu X. Vývoj dítěte je přibližně do osmnáctého měsíce věku normální. Poté následuje částečná nebo úplná ztráta jemné motoriky rukou a řeči dále pak porucha obratnosti při chůzi a stereotypní pohyby rukou. Mezi další časté příznaky patří dechová nepravidelnost, skřípání zubů, zpomalení růstu, skolióza a nezájem o sociální kontakt [84].

Rettův syndrom se objevuje pouze u dívek. U chlapců tato mutace genu způsobuje globální dysfunkci mozku, která vede k úmrtí plodu nebo novorozence. Na základě různorodých symptomů a jejich závažnosti je definováno několik variant od mírnějších až po velmi těžké. Dívky, které splňují všechna diagnostická kritéria, trpí klasickým Rettovým syndromem, zatímco ostatním dívkám majícím jen část symptomů je diagnostikován atypický Rettův syndrom, který je jeho mírnější formou [76].

## 6.5 Léčba

Přestože není dosud možno autismus vyléčit, lze alespoň potlačit příznaky včasnou diagnostikou a podpůrnými prostředky. Ty zahrnují intenzivní budování dovedností, ale také logopedickou a jazykovou terapii či ergoterapii [71].

Některé děti a dospělí s PAS mohou trpět v určitém období života i psychickými obtížemi, jako je úzkost, ADHD nebo deprese. Tyto obtíže lze léčit či potlačit příslušnými léky. V současné době však neexistuje žádný lék, který by léčil hlavní rysy PAS [71].

Aplikování doplňkové a alternativní léčby je u dětí s autismem běžné a spadá do ní speciální výživové doplňky a diety [71]. Některé studie prokázaly u dětí s autismem zvýšené vylučování peptidů získaných z některých bílkovin v mléce a pšenici. Dále dospěly k závěru, že autistické děti, které dodržují bezlepkovou a bezkaseinovou dietu se během jednoho roku vyvíjely výrazně lépe než ostatní děti, které tuto dietu nedodržovaly [85, 86, 87].



## 7. Spojitost autismu s lepkem

### 7.1 Gastrointestinální problémy

Je známo několik možných příčin vzniku PAS, mezi které patří genetické faktory, autoimunita, metabolické poruchy nebo vliv prostředí, ale také stravy [88].

Identifikace gastrointestinálních problémů souvisejících s PAS je velice složitá. U každého autistického pacienta se mohou lišit, což je překážkou pro určení univerzálních diagnostických metod a léčebných postupů. 9 – 91 % pacientů s PAS může trpět různými gastrointestinálními problémy, které souvisejí se závažností PAS [89]. Mezi časté trávicí obtíže patří zácpa a průjem často doprovázené bolestmi břicha, zvracením či jícnovým refluxem, což může vést k neobvyklému chování, špatnému držení těla či odmítání určitých potravin [90].

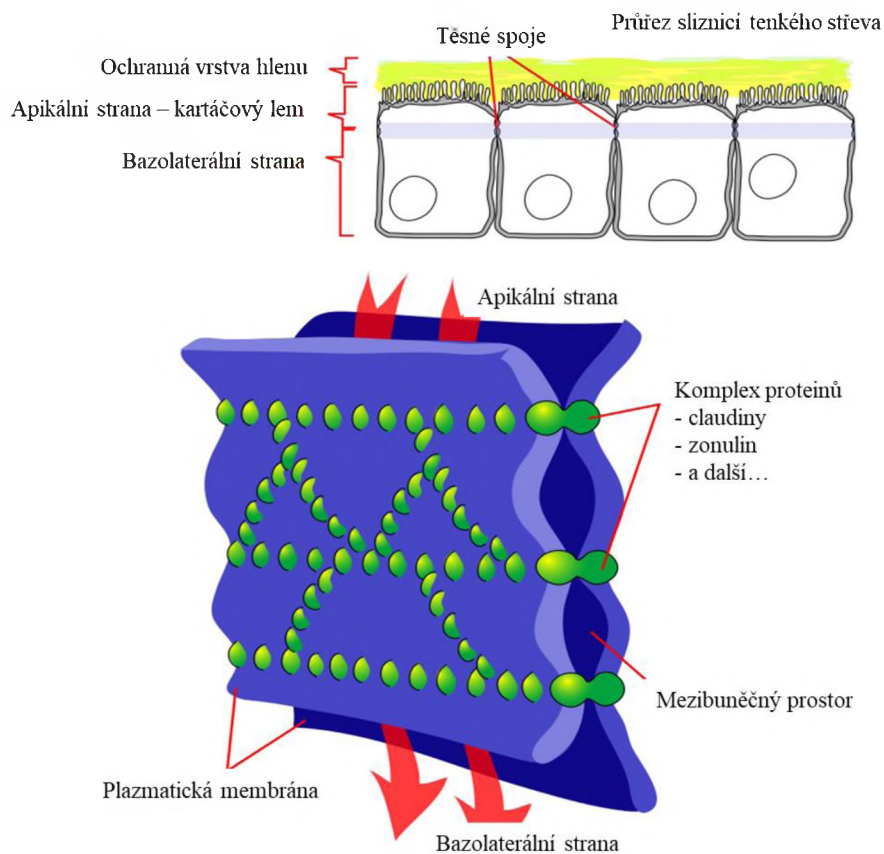
Příznaky trávicích obtíží a odlišného chování při stravování mohou souviset se změnami zažívání a metabolickými funkcemi střevní mikrobioty. Jednou z hlavních funkcí zdravého mikrobiomu je rozklad polysacharidů získaných z rostlin a dalších nestravitelných bioaktivních látek [89]. Odmítání konzumace určité potraviny za účelem vyvarovat se bolesti břicha je jedním ze znaků trávicích obtíží u dětí, které nejsou schopny svůj problém popsat [89, 91]. Odlišné mikrobiální složení střevní mikroflóry u dětí s PAS, které také může podpořit strava, může vést k bolestem břicha, ale také k zánětlivým procesům, oxidačnímu stresu nebo nadýmání [89, 92].

Až 90 % dětí s autismem vykazuje odlišné chování při stravování [89]. Jsou často vybíravé a jejich strava je obvykle omezena na velmi úzký okruh potravin v závislosti na jejich struktuře a vzhledu. Tyto děti preferují škrobová, mastná, zpracovaná jídla a jednoduché sacharidy před ovocem, zeleninou a bílkovinami nacházejících se v mase, rybách a vejcích [93]. Děti s PAS vykazují extrémní citlivost na jednotlivé živiny a jejich chování se odvíjí od konzumace určitého pokrmu. Toto spojení u zdravých dětí není tak zřejmé jako u dětí s autismem, které jsou náchylnější k mikrobiálním účinkům a účinkům metabolitů. Nealergická nesnášenlivost lepku se projevuje hyperaktivitou, agresí, letargií či ospalostí. Kravské mléko hydrolyzované na kasomorfíny s opioidním účinkem na nervový systém vyvolává obdobné chování jako lepek. Proto někdy vyloučení potravin obsahující lepek a kasein ze stravy u těchto dětí může pomoci zmírnit výše uvedené příznaky [89, 94].

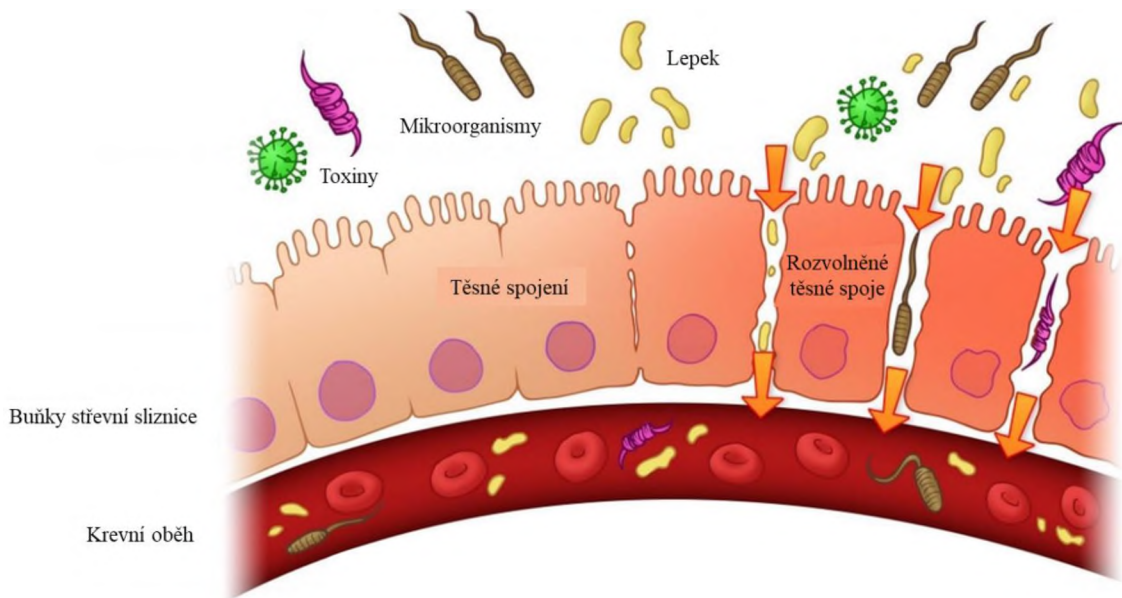
## 7.2 Zvýšená propustnost střeva

Hlavní funkcí střevní sliznice je zabránit vstupu mikroorganismů a některých molekul přes epiteliální vrstvu sliznice, a naopak umožňuje absorpci živin. Sekrece mucinu, imunoglobulinu A a antimikrobiálních peptidů chrání vnější vrstvu střevní sliznice, zatímco uvnitř sliznice se nacházejí buňky imunitního systému. Sliznice má vlastnosti imunitního systému, fyzikální i biochemické, které umožňují tok látek přes paracelulární dráhy, které zprostředkovávají transport látek přes mezibuněčný prostor [95].

Propustnost střeva pro malé molekuly rozpustné ve vodě je umožněna díky těsným spojům, které se otevírají a uzavírají v souvislosti reakce na podněty jako je strava, humorální nebo neuronální signalizace [95]. Těsné spoje (Obr. 8) tvoří komplex o více než padesáti proteinech, z nichž transmembránové proteiny, zejména claudiny a zonulin, jsou důležité pro regulaci selektivní propustnosti závisící na náboji a velikosti molekuly [95, 96]. Tato propustnost bývá vlivem patologických stavů často narušena. Při autoimunitních onemocněních či při expozici střeva některým bakteriím či lepku se zvyšuje produkce zonulinu, což má za následek dysfunkci těsných spojů [95]. Rozvolněním těchto těsných spojů (Obr. 9) mezi epiteliálními buňkami střevní sliznice dochází k deregulovanému toku iontů, metabolitů a mikrobů do krevního oběhu. Zvýšená propustnost může následně vést k trvalému zánětu gastrointestinálního traktu a aktivaci imunitních reakcí vlivem metabolitů a mikrobů [96].



Obrázek 8: Schématické znázornění těsného spoje; převzato a upraveno z: [97]



Obrázek 9: Princip rozvolnění těsných spojů; převzato a upraveno z: [98]

Esnafoğlu (2017) publikoval studii, která byla založena na stanovení sérové hladiny zonulinu u pacientů s PAS bylo dokázáno, že zvýšená hladina tohoto proteinu souvisí s vývojem symptomů PAS. Hladiny zonulinu v séru byly stanoveny u 32 pacientů s PAS

a 33 zdravých jedinců a závažnost symptomů PAS byla hodnocena dle škály hodnocení používané pro dětský autismus. Výsledek ukázal, že hladina zonulinu v séru byla u pacientů s PAS výrazně vyšší než u zdravých jedinců. Při hodnocení spojitosti výskytu symptomů autismu s hladinou zonulinu byl zjištěn vzájemný vztah [99].

### 7.3 Střevní mikrobiota

Mikrobiota je definována jako soubor mikrobů včetně bakterií, virů a hub. Bilióny mikrobů a 500 – 1000 druhů mikroorganismů jsou přirozenými obyvateli našeho gastrointestinálního traktu [100]. Střevní mikrobiota symbioticky interaguje s různými orgánovými systémy našeho těla a podílí se také na mnoha důležitých biologických a metabolických funkcích od syntézy a metabolismu živin, hormonů a vitamínů až po odbourávání léčiv a toxinů a od přísunu nedostupné energie pro hostitele získané z potravy až po modulaci mozkové aktivity a chování vedoucí v ose střevo – mozek [100, 101].

Střevní mikrobiota je také jedním z faktorů ovlivňující propustnost střevní sliznice jelikož reguluje funkci střevní sliznice změnou propustnosti a distribuce proteinů těsným spojením [101]. Tato normální interakce může být narušena řadou událostí, jako jsou infekce, gastrointestinální onemocnění, změny ve stravování, neurologické poruchy a stres. Nerušení normálního stavu střevní mikroflóry přispívá k mnoha gastrointestinálním stavům, jako je zánětlivé onemocnění střev a jiná gastrointestinální onemocnění, mezi něž patří i zvýšená propustnost střeva [100]. Podle jedné studie byla abnormální propustnost střeva zjištěna u 36,7 % pacientů s PAS, zatímco v případě zdravých dětí jen u 4,8 % [102].

Střevní mikrobiota dětí s PAS (Tab. 2) je odlišná a méně rozmanitá od mikrobioty zdravých dětí [100, 102]. Množství některých bakterií ve střevě je výrazně sníženo nebo zvýšeno v porovnání se zdravým mikrobiomem. Vyšší výskyt bakterií rodu *Clostridium* a *Desulfovibrio* a snížený poměr mezi bakteriálními kmeny *Bacteroidetes* a *Firmicutes* mají vliv na míru závažnosti PAS [100].

Tabulka 2: Změna zastoupení některých kmenů a rodů mikroorganismů ve střevě u dětí s PAS vůči zdravým dětem; převzato a upraveno z: [103]

Kmen	Rod	Zastoupení u dětí s PAS vůči zdravým dětem
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prevotella</i>	↑
		↓
<i>Firmicutes</i>	<i>Enterococcus</i>	↓
		↓
	<i>Lactobacillus</i>	↓
	<i>Lactococcus</i>	↓
	<i>Streptococcus</i>	↓
	<i>Staphylococcus</i>	↓
	<i>Coprococcus</i>	↓
	<i>Ruminococcus</i>	↓
	<i>Clostridium</i>	↑
<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacterium</i>	↓
		↓
<i>Proteobacteria</i>	<i>Sutterella</i>	↑
		↑
		↑
	<i>Desulfovibrio</i>	↑

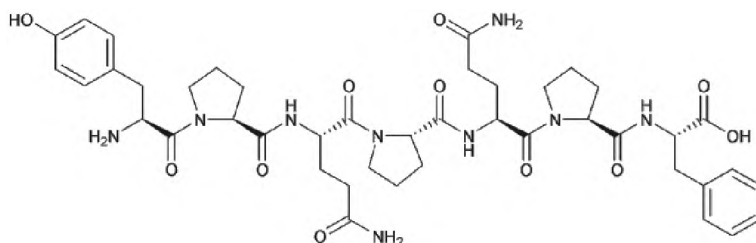
## 7.4 Opioidní peptidy a jejich interakce v CNS

Podle hypotézy zaměřující se na přebytek opioidů se vývoj autismu vyvíjí na základě genetické predispozice a brzké expozice stresovému prostředí, které vedou k funkčním změnám střeva, snížené proteolytické aktivitě střeva, zvýšené propustnosti střevní sliznice, nízké hladině mikrobiot a zvýšené propustnosti hematoencefalické bariéry [88].

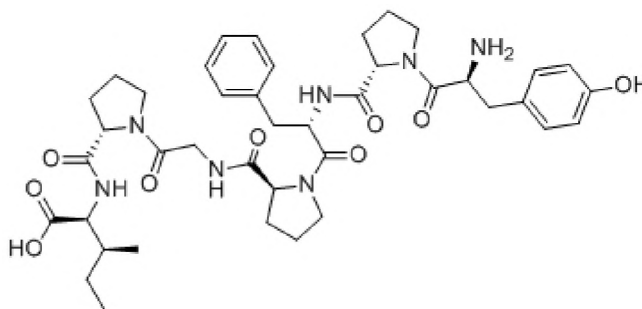
Hlavní funkcí opioidního systému je kontrola a následná ztráta vnímání bolesti zprostředkovaná opioidními receptory. Nejdůležitější součástí tohoto systému jsou opioidní receptory a enzymy peptidázy, které degradaci peptidů ovlivňují koncentraci aktivních opioidů v lidském těle. Autistické děti a v některých případech i jejich matky

vykazují zvýšené hladiny opioidních peptidů v séru, moči, buňkách imunitního systému a mozkomíšním moku [88].

U jedinců s PAS dochází k neúplnému štěpení peptidů zejména lepku a kaseinu na aminokyseliny, což vede ke vzniku gluteomorfinů (Obr. 10) a kasomorfinů (Obr. 11), které mají podobný peptidový řetězec jako opiáty [92, 104, 105].

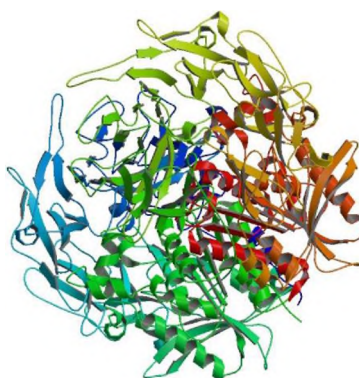


Obrázek 10: Struktura gluteomorfinu (gliadorfin); převzato a upraveno z: [106]



Obrázek 11: Struktura kasomorfinu ( $\beta$ -kasomorfin-7); převzato z: [107]

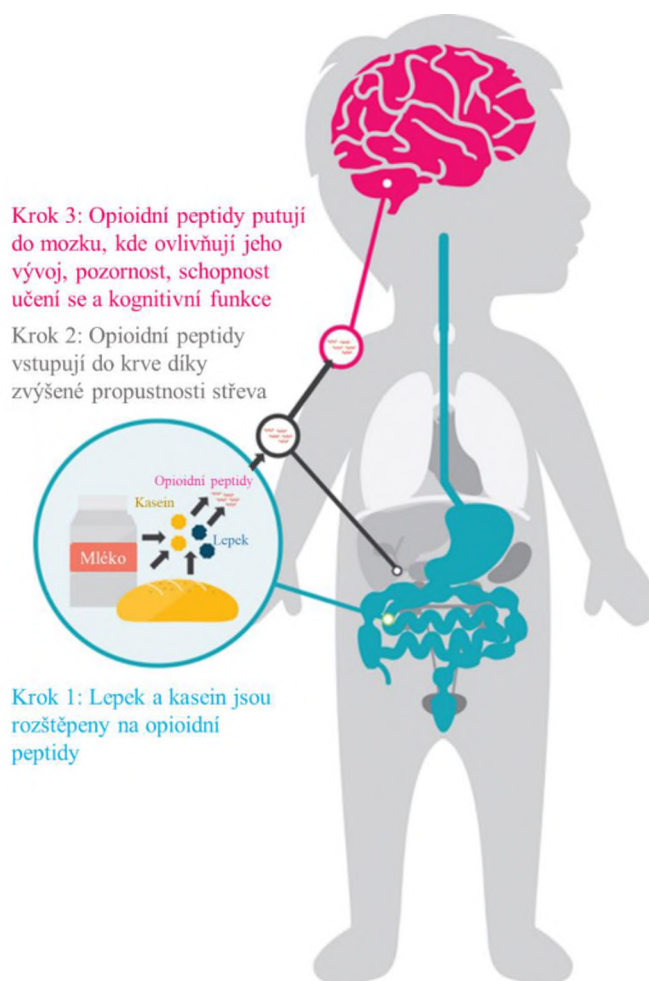
$\beta$ -kasomorfin-7 reaguje s  $\mu$ -opioidním receptorem a dále je degradován dipeptidylpeptidázou IV (Obr. 12) [105]. Biologická role opioidu  $\beta$ -kasomorfin-7 je nejasná, ale dle důkazů mohou tyto peptidy ovlivňovat gastrointestinální, nervový a imunitní systém. Konzumace kravského mléka obsahující  $\beta$ -kasomorfin-7 může tedy v rámci imunitní odpovědi vyvolat zánět střev [88].



Obrázek 12: Struktura dipeptidylpeptidázy IV; převzato z: [108]

Jak je uvedeno výše, biologická aktivita  $\beta$ -kasomorfinu-7 závisí na aktivitě dipeptidylpeptidázy IV. Tento enzym štěpí peptidy, jako je  $\beta$ -kasomorfin-7 a gluteomorfin [105], za vzniku di- a tri- peptidů, které pak mohou být transportovány střevní sliznicí. Degradace těchto peptidů pomocí enzymu dipeptidylpeptidázy IV může vést k deaktivaci jejich opioidních schopností. Přítomnost těchto opioidů v krvi, moči a mozkomíšním moku u pacientů s PAS je spojena s defektním enzymem dipeptidylpeptidázy IV [88, 109].

Zvýšená propustnost střevního epitelu pro strávené potravinové bílkoviny a přítomnost defektního enzymu dipeptidylpeptidázy IV může vést k cirkulaci biologicky aktivních peptidů krevním řečištěm a následně se opioidní peptidy mohou dostat přes hematoencefalickou bariéru až do centrálního nervového systému (Obr. 13) [88, 90, 92]. To může následně způsobit řadu neuropsychiatrických příznaků projevující se změnou chování dítěte, kterému se krátce po konzumaci potravy obsahující lepek nebo kasein zhorší autistické symptomy [88, 90]. Tyto symptomy jsou podobné jako u vlivu opioidů, jako je nespolečenkost a svéhlavé chování, nepříznivé účinky na pozornost, sociální interakci a učení dětí [92, 110].



Obrázek 13: Teorie mechanismu působení opioidních peptidů na CNS; převzato a upraveno z: [111]

## 7.5 Bezlepková a bezkaseinová dieta u pacientů s poruchami autistického spektra

Jak bylo již uvedeno, bezlepková a bezkaseinová (GFCF) dieta vylučuje ze stravy dva proteiny: kasein, který se nachází v mléce a mléčných výrobcích, a lepek, který je obsažen v pšenici, ječmeni, žitu a ovsu. GFCF dieta se využívá ke zmírnění některých příznaků a gastrointestinálních problémů jako je nadýmání a průjem, které mohou ovlivnit chování autistických dětí a částečně zlepšit některé autistické příznaky [112]. Předpoklady, které podporují zavedení GFCF diety u dětí s PAS jsou již výše zmíněny [110].

Na druhé straně, bezlepková strava u zdravých jedinců má za následek snížení množství prospěšných střevních bakterií, zvýšení podmíněných patogenů a potlačení



imunitního systému, což může vést ke zmírnění zánětu, ale může také dojít ke snížení obranných a regulačních mechanismů proti patogenům a chronickým zánětům. Z toho plyne, že GFCF dieta může mít i škodlivé účinky na složení střevní mikrobioty, která je důležitá pro odolnost a stabilitu střevního ekosystému [92].

GFCF dieta může také zhoršit již narušenou střevní mikroflóru u jedinců s PAS, kdy dojde ke snížení počtu prospěšných bakterií a naopak k nárůstu podmíněně patogenních bakterií. Navíc při této dietě hrozí snížený příjem vlákniny vzhledem k vyloučení obilných produktů a následný vznik zácpy. Dále bylo prokázáno, že s vlivem této diety je spojováno ztenčení kostní kůry na základě vynechání kaseinu ze stravy a nedostatek esenciálních aminokyselin [92]. Tyto poznatky vedou k tomu, že GFCF dieta nemusí mít za následek jen nedostatek bílkovin ve výživě a omezený růst kostí, ale také to, že vlivem nedostatku některých esenciálních aminokyselin, pod které spadají prekurzory transmiterů tyrosin a tryptofan, může dojít k ovlivnění signalizací mezi nervovými buňkami v mozku a ke změnám chování [92, 113].

Přestože byla provedeno několik studií zaměřených na vztah mezi dietetickým omezením a PAS, není závěr zcela jednoznačný [114]. Ghalichi (2016) ve své studii zkoumal vliv GFCF diety na zmírnění gastrointestinálních symptomů a typické chování dětí trpících PAS. Skupina o 80 dětech s diagnostikovanou PAS byla rozdělena na 40 dětí, které dodržovaly GFCF dietu a dalších 40 dětí, které se stravovaly normálně po dobu šesti týdnů. Na začátku a na konci byl vyplněn dotazník hodnotící gastrointestinální symptomy a psychometrické vlastnosti. Z 80 dětí mělo 53,9 % gastrointestinální obtíže. Výsledek studie ukázal, že ve skupině dětí dodržující GFCF dietu se četnost gastrointestinálních symptomů významně snížila ze 40,57 % na 17,10 % a u druhé skupiny dětí došlo k malému zhoršení. GFCF dieta měla za následek i snížení poruch chování z 80,03 % ± 14,07 % na 75,82 % ± 15,37 %, zatímco u druhé skupiny dětí došlo opět k mírnému zhoršení. Tato studie ukazuje, že GFCF dieta může být účinná při potlačování gastrointestinálních symptomů a chování u dětí s PAS [115].

Hyman (2016) provedl studii, ve které hodnotil účinnost GFCF diety u dětí s PAS. Čtrnáct dětí ve věku 3 – 5 let dodržovalo GFCF dietu po dobu 4 – 6 týdnů a poté byl proveden kontrolní pokus s placebem, který trval dalších 6 týdnů. V průběhu výzkumu byly dětem podávány potraviny s obsahem lepku, kaseinu, lepku a kaseinu nebo placebem. V tomto případě však dieta neměla statisticky významné účinky na

fyziologické funkce, na problematické chování ani na příznaky autismu. Přestože se tohoto výzkumu zúčastnilo jen málo dětí, studie neposkytuje důkazy, které by podpořily využití GFCF diety v rámci léčby dětí s PAS [116].

Při GFCF dietě dochází k odstranění dvou toxinů gluteomorfinů a kasomorfinů, ale k vyléčení střeva a zlepšení střevní mikrobioty nikoli. Tato dieta by měla být doporučována pouze těm jedincům s PAS, kterým je diagnostikována alergie nebo nesnášenlivost některých složek, které díky této dietě budou ze stravy vyloučeny [92].

## 8. Metody stanovení lepku

V současné době je k dispozici několik metod sloužících k detekci lepkových proteinů – gliadinu a gluteninu či peptidů. Mezi nejvíce využívané metody se řadí imunochemické metody, elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií, polymerázová řetězová reakce a biosenzory. Cílem všech metod je kvantifikovat celkový obsah lepku přítomný v potravinách, aby bylo možné produkty označovat jako bezlepkové za účelem ochrany spotřebitelů citlivých na lepek před jeho expozicí. Tyto metody se využívají v potravinářském průmyslu [117].

Požadavky na spolehlivost analytické metody pro kvantifikaci lepku v potravinách jsou dostatečná citlivost, specifická, reprodukovatelnost a validace, jelikož detekce lepku v tepelně upravených nebo extrudovaných produktech jako je chléb nebo těstoviny, či ve výrobcích obsahujících částečně hydrolyzovaný lepek je obzvláště náročná [118].

Prvním krokem je co nejdokonalejší extrakce lepkového proteinu z potravinové matrice. Samotná analýza musí být přesná a kalibrována proti vhodnému reprezentativnímu referenčnímu proteinu. Většina metod je založena na kvantifikaci rozpuštěné prolaminové frakce lepku v alkoholu. Frakce glutelinu, která je nerozpustná v alkoholu, není často podstatná, protože lepek je tvořen z 50 % prolaminem. Po vynásobení stanoveného obsahu prolaminu faktorem 2 se získá celkový obsah lepku. Pracujeme s předpokladem, že poměr prolaminu a glutelinu je 1:1 [118].

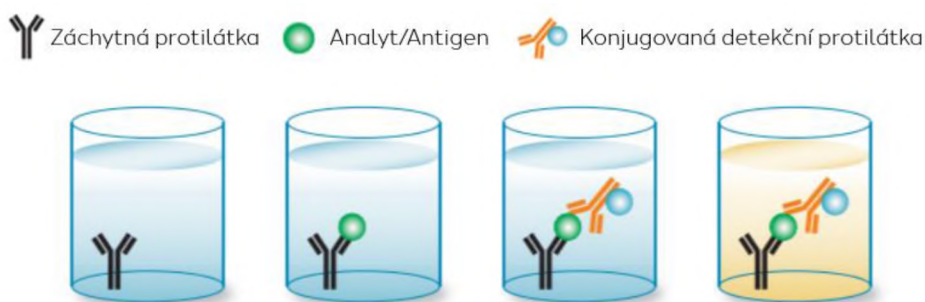
### 8.1 Imunochemické metody – ELISA

Imunochemické metody jsou nejčastěji využívané, jelikož jsou velice citlivé k detekci lepku na úrovni mg/kg. Výsledek poskytují relativně rychle, což umožňuje výrobcům potravin kontrolovat výrobky přímo na místě a jedná se tedy o rutinní metody [124, 155]. Testy ELISA se používají pro kvantitativní měření [117].

Imunochemické testy využívají specifickou protilátku (imunoglobulin) k detekci antigenu, což je látka, která je stanovována. V našem případě se jedná o lepek, respektive o jeho složky prolamin a glutelin [118].

ELISA testy jsou založeny na detekčních protilátkách, které jsou značeny enzymem, jako je například křenová peroxidáza nebo alkalická fosfatáza a dochází k vytvoření barevného chemiluminiscenčního nebo fluorescenčního produktu, který lze dále měřit. Pro analýzu lepku lze použít dva principy metody ELISA: sendvičová a kompetitivní [119].

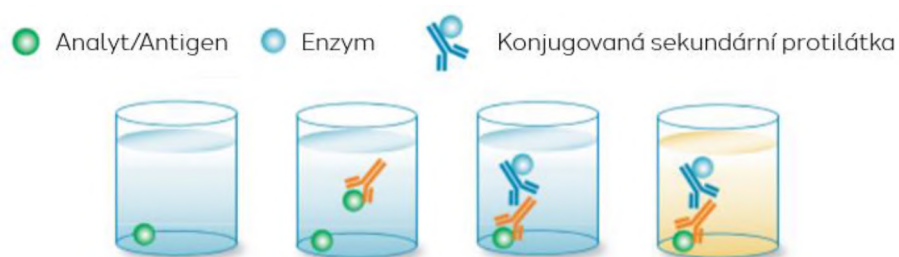
Sendvičová ELISA metoda (Obr. 14) je nejčastěji využívána k detekci potravinových alergenů tedy i lepku [119]. Princip této metody spočívá v tom, že povrch jamky v mikrotitrační polystyrenové destičce je potažen známým množstvím záchytné protilátky a nespecifická místa na povrchu jsou blokována [118, 120]. Poté se přidá vzorek obsahující antigen a vytvoří se komplex antigen – protilátka. Promytím se odstraní přebytek antigenu a přidá se detekční protilátka značená indikátorovým enzymem, která se naváže na druhé vazebné místo antigenu. Antigen je tedy vložen mezi záchytnou protilátku a detekční protilátku. Nenavázané detekční protilátky se vymývají a následně se přidá enzymatický substrát, který se transformuje na barevný produkt, jehož absorbance je vyhodnocována čtečkou destiček. Naměřená absorbance je přímo úměrná koncentraci antigenu v extraktu vzorku, který lze vypočítat z kalibrační křivky glutenového referenčního proteinu. Jelikož antigen musí mít dvě prostorově oddělená vazebná místa (epitopy) pro záchytnou a detekční protilátku je sendvičová ELISA metoda vhodná pouze pro větší antigeny, jako jsou neporušené lepkové proteiny [118]. Proto tato metoda není vhodná pro kvantifikaci lepku v hydrolyzovaných vzorcích (pivu, kváskových produktech nebo sladových výtažcích), protože proteinové fragmenty obsahují většinou jen jedno vazebné místo [118, 119].



Obrázek 14: Schématické znázornění sendvičové ELISA metody; převzato z: [121]

Kompetitivní ELISA metodu (Obr. 15) lze použít jak k detekci neporušených proteinů, tak i menších antigenů (glutenových peptidů), jelikož vyžaduje jen jedno vazebné místo. Znamé množství antigenu je imobilizováno na povrchu jamky

mikrotitrační destičky. Do jamky se přidá současně vzorek obsahující antigen a omezené konstantní množství protilátky značené enzymem. Během inkubace soutěží imobilizované a volné antigeny o vazebná místa protilátek. Následně se promytím odstraní nnavázané protilátky, antigeny a komplexy antigen – protilátka. Po přidání enzymatického substrátu se vytvoří barevný produkt. V tomto případě je změřená absorbance nepřímo úměrná koncentraci antigenu v extraktu vzorku. K výpočtu koncentrace antigenu v extraktu vzorku se opět použije kalibrační křivka glutenového peptidu nebo směsi peptidů [118].



Obrázek 15: Schématické znázornění kompetitivní ELISA metody; převzato z: [121]

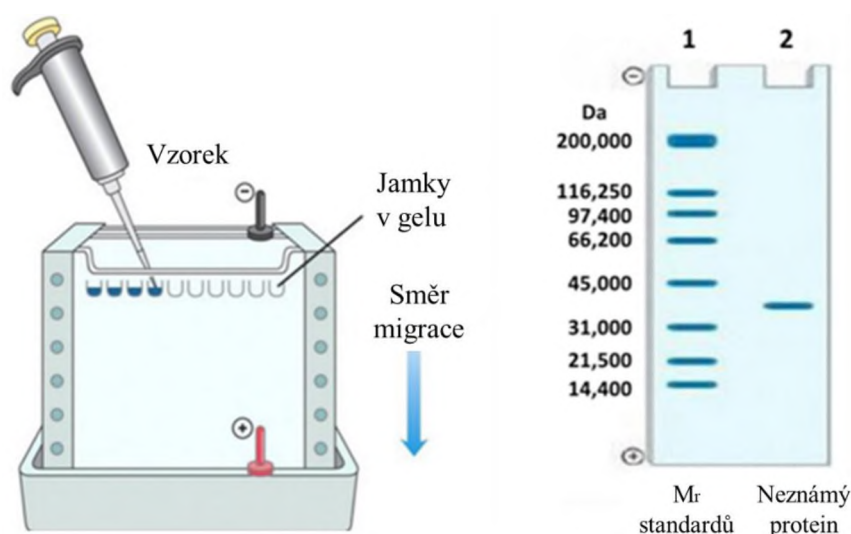
## 8.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu a western blotting

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu a western blotting může být využita k potvrzení přítomnosti lepku v potravinách například strouhance, pudingu, pečivu nebo těstovinách [122, 123]. Tato technika však není dostatečně citlivá k detekci stopových množství lepku v potravinách, a je i časově náročná, tudíž se nepoužívá jako rutinní metoda [122]. Tato metoda se používá spíše za účelem charakterizace proteinů pšenice, ječmene a žita [122, 124].

Elektroforéza zahrnuje separaci makromolekul v elektrickém poli [125]. Pro charakterizaci prolaminových frakcí na základě jejich mobility se široce využívá jednorozměrná (SDS – PAGE) a dvourozměrná gelová elektroforéza (2D - ELFO) [126].

SDS – PAGE (Obr. 16) je založena na dělení bílkovin podle molekulové hmotnosti a je široce používaná pro kvalitativní stanovení všech obilných bílkovin [127]. SDS neboli dodecylsulfát sodný je aniontový detergent, zajišťující separaci podle molekulové hmotnosti. Zkratka PAGE představuje elektroforézu v polyakrylamidovém gelu, který je nosným médiem se síťovitou strukturou [125, 128]. Denaturovaná proteinová směs je přidána do polyakrylamidového gelu za přítomnosti aplikovaného

elektrického pole a proteiny, které mají nyní záporný náboj, se pohybují směrem k anodě [128]. Větší molekuly se gelem pohybují pomaleji než menší molekuly a dochází tak k jejich separaci [125]. Po separaci jsou jednotlivé proteiny vizualizovány vhodným barvením, např. Coomassie Brilliant Blue, což je modré barvivo, které se naváže na separované proteiny a vytvoří se modré pruhy, které lze snadno vizuálně vyhodnotit [128]. Relativní migrační vzdálenost proteinu v gelu je nepřímo úměrná logaritmu molekulové hmotnosti stanovovaného proteinu, která je vyjádřena v Daltonech (Da) [125].



Obrázek 16: Schématické znázornění elektroforézy SDS – PAGE; převzato z: [129]

Kvalitativní stanovení proteinů pomocí SDS – PAGE je dále vylepšeno spojením s izoelektrickou fokusací (IEF), čímž se vytvoří dvourozměrný systém, který je na sebe kolmý a lze tak stanovit vyšší počet proteinů [126]. Princip této metody spočívá v tom, že separace proteinů v jednom směru probíhá pomocí IEF, která separuje proteiny podle jejich izoelektrického bodu a v druhém směru pomocí SDS – PAGE [130]. Tato technika ovšem není dostatečně citlivá na detekci nízkého obsahu lepek, proto došlo ke spojení technik SDS – PAGE a western blotting. Tato technika western blotting umožňuje kvalitativní nebo semikvantitativní analýzu těchto proteinů [126].

### 8.3 Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

Výhodou kapalinové chromatografie spojené s hmotností spektrometrií je, že lze detekovat lepek ve zpracovaných potravinách, například sušenkách, pečivu, pivu, těstovinách, nápojích či snídaňových cereáliích [131, 132]. Lze také na základě přítomných standardů ve vzorku stanovit, zda se jedná o lepek pšeničný, žitný, ovesný

či ječný. Tato metoda je velice citlivá a lze stanovit obsah lepku na úrovni 0,5 – 5 mg/kg [131].

Před samotným stanovením je nutné izolovat prolaminy z matrice vzorku použitím hexanu pro odstranění tuků a redukčních a denaturačních činidel. Následně je provedeno štěpní prolaminu enzymy trypsin a chymotrypsin [132].

Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (LC – MS) je analytická technika, která je založená na ionizaci jednotlivých složek směsi, následně separaci na základě jejich poměru hmotnost/náboj ( $m/z$ ) a detekci iontů molekul [133].

Stanovení proteinů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi a gelové permeační chromatografie s UV detekcí se ukázaly jako nedostatečné pro detekci stopových množství lepku v potravinových maticích z důvodu nízké selektivity a citlivosti. Proto byly za účelem vylepšení analýzy prolaminů zavedeny nové metody, které kombinují chromatografii s hmotnostní spektrometrií. Pro dosažení vyšší citlivosti je MS často nahrazována tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) [126].

Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC – MS/MS) kombinuje separační principy kapalinové chromatografie s vysoce citlivým a selektivním hmotnostním spektrometrem pro kvantifikaci. Po separaci kapalinovou chromatografií přechází vzorek do hmotnostního spektrometru, který obsahuje zdroj ionizace. Kapalným vzorkem je rozprašován, desolvatován a ionizován za vzniku nabitých částic. Nejčastěji využívaným analyzátozem pro tyto aplikace je trojitý kvadrupól [133, 134].

## **8.4 Polymerázová řetězová reakce**

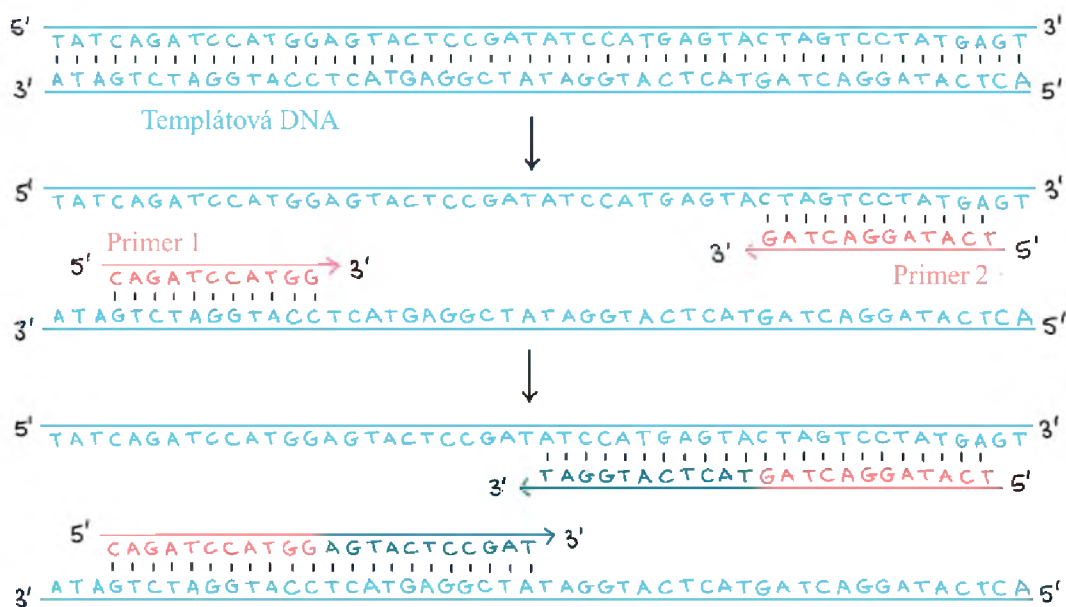
Pro detekci lepku byla uvedena metoda založená na DNA a to polymerázová řetězová reakce (PCR). PCR je technika, která vytváří velké množství kopií specifického segmentu DNA pomocí DNA polymerázy syntetizující nové řetězce DNA, jež lze dále analyzovat [126, 135].

Při detekci lepku je cílovou DNA jakákoliv specifická složka obilovin, která obsahuje lepek [126]. PCR se využívá pro detekci lepku v potravinách, ale je však nevhodná pro detekci lepku v hydrolyzovaných vzorcích jako je pivo, sirupy nebo

sladové extrakty kvůli vysoké degradaci DNA, která pak znemožňuje stanovení vztahu mezi množstvím DNA a lepku [118, 122].

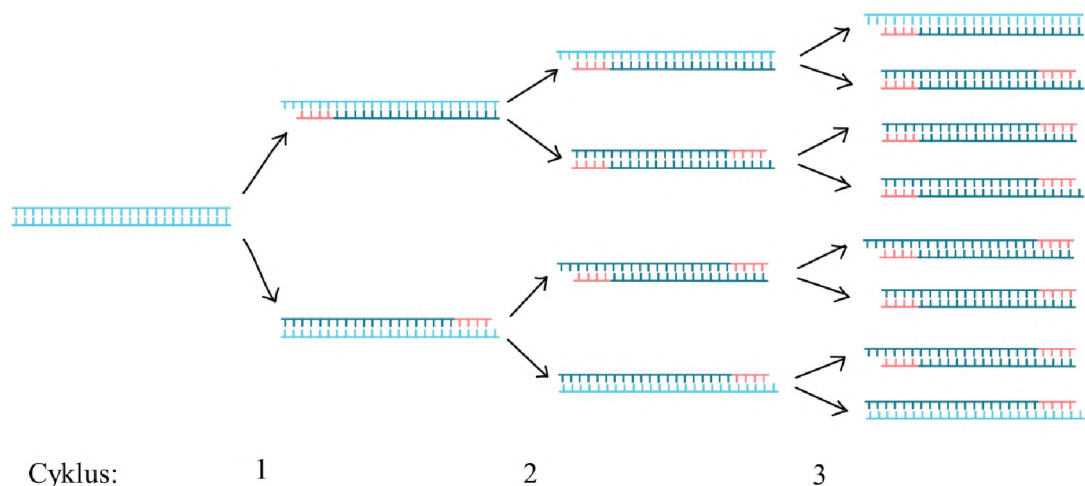
Tato metoda je vhodná pro rutinní stanovené obsahu lepku v pekárenských výrobcích, jako jsou chleby a koláče nebo v sušenkách, kojenecké výživě či uzeninách [136, 137].

Krátké úseky jednovláknové DNA neboli primery, které obsahují přibližně 20 nukleotidů, poskytují výchozí bod pro zahájení syntézy nových řetězců DNA, přičemž existující řetězce jsou používány jako templát. Tyto templáty vznikají denaturací řetězce DNA při teplotě 96 °C. Po ochlazení na 55 – 65 °C dochází k navázání primerů. Pro každou PCR (Obr. 17) jsou použité dva komplementární primery sloužící k detekci specifických oblastí DNA, které mají být kopírovány [126, 135]. To znamená, že obsahují sekvence, díky kterým se vážou na začátek a konec templátového vlákna DNA, které má být namnoženo. Po navázání na templát jsou primery pomocí polymerázy při teplotě 72 °C prodlouženy vždy ve směru 5' → 3' po celé délce kopírované oblasti. Tento cyklus se opakuje 25-35 krát v rámci jedné PCR (Obr. 18) [135]. Namnožený produkt je hodnocen pomocí gelové elektroforézy, kde jsou jednotlivé fragmenty odděleny podle velikosti (počtu párů bází) [126].



Obrázek 17: Schématické znázornění PCR; převzato z: [135]





Obrázek 18: Schématické znázornění opakování cyklu; převzato z: [135]

Pro kvantifikaci cílové DNA se také používá PCR v reálném čase (RT – PCR), která nevyžaduje v konečné fázi jinou metodu pro kvantifikaci jako PCR. V tomto případě se k detekci namnožené DNA v reálném čase používají fluorescenční barviva nebo sondy specifické pro cílovou DNA, které se navážou na její specifické místo. K fluorescenci dochází v průběhu PCR a je přímo úměrná cílové DNA přítomné ve vzorku [126].

## 8.5 Biosenzory

Biosenzory se stávají alternativou k ELISA testům díky jednoduché, rychlé, reprodukovatelné, citlivé a levné detekci analytů [138, 139]. Jsou to pokročilé detekční systémy, které poskytují mnohdy přesnější stanovení než jiné standardně používané metody. Lze je definovat jako analytická zařízení, která přeměňují biologickou odezvu na měřitelný elektrický signál. Biosenzor se obvykle skládá ze tří částí: bioreceptoru, převodníku a elektronického systému, který zahrnuje zesilovač signálu, procesor a displej. Bioreceptor interaguje se stanovovaným analytem ve vzorku biologického původu [140]. Převodník převádí interakci analyt – bioreceptor na měřitelný signál, který je úměrný koncentraci analytu ve vzorku [138]. Převodník může být optický, elektrochemický, termochemický či magnetický. Elektronický systém zesiluje převedený signál, následně ho zpracovává a zobrazuje výsledek [140]. V souvislosti s lepkem lze využít dva typy biosenzorů a to optické a elektrochemické [141].

Biosenzory jsou vhodné pro stavení obsahu lepku ve vzorku vysoce zpracovaných i hydrolyzovaných potravin jako je pivo, sirupy, nápoje, pečivo či cukrovinky [142].

Pro detekci stopových množství gliadinu ve vzorku je vhodný optický biosenzor na bázi porézního křemíku, který umožňuje citlivou a rychlou odezvu. Navíc je schopen pracovat za redukčních podmínek, což řeší některé problémy související s extrakcí prolaminu [141].

Elektrochemické senzory jsou nejčastěji používanými biosenzory při detekci lepku. Výhodou je, že díky rychlé odezvě lze lepek detekovat v každém úseku výrobního řetězce [138]. Nové elektrochemické imunosenzory, které jsou velice efektivní, uživatelsky přívětivé a vysoce citlivé se řadí k alternativám běžných imunochemických testů. Elektrochemické imunosenzory jsou samostatná zařízení, která jsou schopna poskytovat kvantitativní a semikvantitativní analytické informace pomocí imobilizovaného imunologického rozpoznávacího prvku a elektrochemického převodníku, který převádí biologickou interakci na měřitelný signál [141].

## 9. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo popsat vliv lepku na lidské zdraví. První část byla věnována popisu lepku a jeho výskytu v potravinách. Následně byly popsány principy bezlepkové diety a označování potravin, které je v dnešní době nezbytností. Lepek má vliv zejména na gastrointestinální trakt, konkrétně tenké střevo.

V druhé části byly popsány příznaky, diagnostika a léčba onemocnění spojených s lepkem, mezi které patří celiakie, alergie na lepek a citlivost na lepek. Z povahy těchto onemocnění je zřejmé, že se liší principem vzniku a některými příznaky, ačkoliv hlavní roli stále hraje lepek. V poslední době je vliv lepku dáván do souvislosti i s poruchami autistického spektra, jejichž projevy mohou být, podle některých studií, ovlivněny právě konzumací lepku. Pod tyto poruchy spadá několik forem, a to dětský autismus, atypický autismus, Aspergerův syndrom, dětská dezintegrační porucha nebo Rettův syndrom. Autismus nelze vyléčit, ale lze ho zmírnit podpůrnou léčbou a v některých případech i úpravou stravování.

Proto byla další část práce věnována spojitosti lepku s autismem týkající se gastrointestinálních problémů, zvýšené propustnosti střeva a střevní mikrobioty. Byl zde také popsán vliv opioidních peptidů na CNS a GFCE dieta. Vliv lepku a kaseinu na autismus není dodnes zcela prokázán. Existuje mnoho studií, které se touto spojitostí zabývají, avšak výsledky se mnohdy rozcházejí. Proto se zatím GFCE dieta doporučuje pouze těm dětem s autismem, kterým je diagnostikována celiakie, alergie na lepek, citlivost na lepek či kasein nebo vykazují-li viditelné zlepšení.

Závěrečná část se zabývá metodami vhodnými pro stanovení lepku, jednak rutinně využívanými pro kontrolu potravin, tak i např. biosenzory, které jsou vhodné i pro měření v terénu.

## 10. Bibliografie

- [1] CHEN J., ROSENTHA A., *Modifying Food Texture: Sensory Analysis, Consumer Requirements and Preferences*. 2nd ed. Cambridge (Sawston): Elsevier, 2015, s. 241. ISBN 978-1-78242-352-2.
- [2] HARASYM J., PODESZWA T., Towards sustainable de-growth – medical survey data as predictors for estimation of niche market value – gluten-free beer market case. *Journal of Cleaner Production*. 2015, **108**, 1232-1238. DOI: 10.1016/j.jclepro.2015.07.014.
- [3] BAINES D., SEAL R., *Natural food additives, ingredients and flavouring*. Cambridge (Sawston): Woodhead Publishing Limited, 2012, s. 203. ISBN 978-0-85709-572-5.
- [4] Lepek. *Medicinman.cz* [online]. 2010 [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: [http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt&p\\_sub=celiakie/a-lepek](http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt&p_sub=celiakie/a-lepek)
- [5] All About Gluten. *PrecisionNutrition* [online]. Toronto [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: <https://www.precisionnutrition.com/all-about-gluten>
- [6] TUNTACHON S., et al., Effect of kaolin content and sonication on the properties of wheat gluten composites. *Powder Technology*. 2019, **351**, 66-70. DOI: 10.1016/j.powtec.2019.04.007.
- [7] CHEN G., et al., Physicochemical properties and gluten structures of hard wheat flour doughs as affected by salt. *Food Chemistry*. 2019, **275**, 569-576. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.07.157.
- [8] WANG Q., et al., Interaction between wheat gliadin and quercetin under different pH conditions analyzed by multi-spectroscopy methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2020, **229**. DOI: 10.1016/j.saa.2019.117937.
- [9] *Celiac Disease and Hashimoto's* [online]. [cit. 2020-02-24]. Dostupné z: <https://hashimotoshealing.com/celiac-disease-and-hashimotos/>
- [10] RUIZ M., et al., An update of low molecular weight glutenin subunits in durum wheat relevant to breeding for quality. *Journal of Cereal Science*. 2018, **83**, 236-244. DOI: 10.1016/j.jcs.2018.09.005.
- [11] BALAKIREVA A., ZAMYATNIN A., Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities. *Nutrients*. 2016, **8**(10), 644. DOI: 10.3390/nu8100644.
- [12] Pekařina: Od obilky k mouce aneb jak vzniká mouka v českých mlýnech. *Vlastovička v elektronické podobě* [online]. [cit. 2020-02-24]. Dostupné z: <http://www.vlastovicka.cz/cz/pekarina/detail/od-obilky-k-mouce-aneb-jak-vznika-mouka-v-ceskych-mlynech/365>
- [13] BIESIEKIERSKI J. R., What is gluten? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2017, **32**(1), 78-81. DOI: 10.1111/jgh.13703.

- [14] The Small Intestine. *TeachMe Anatomy* [online]. 2018 [cit. 2020-07-04]. Dostupné z: <https://teachmeanatomy.info/abdomen/gi-tract/small-intestine/>
- [15] BOUVILLE A., et al., *Evaluating the reliability of biokinetic and dosimetric models and parameters used to assess individual doses for risk assessment purposes: Kinetics of Gastrointestinal Tract Motility: Small Intestine*. Bethesda (Maryland): National Council on Radiation Protection and measurements, 1998, s. 8-10. ISBN 0-929600-58-4.
- [16] ELLIS H., Anatomy of the small intestine (jejunum and ileum). *Surgery*. 2011, **29**(8), 355-357. DOI: 10.1016/j.mpsur.2011.05.013.
- [17] MAHADEVAN V., Anatomy of the small intestine. *Surgery*. 2020, **38**(6), 283-288. DOI: 10.1016/j.mpsur.2020.03.012.
- [18] BARCLAY T., Duodenum. *Innerbody* [online]. 2019 [cit. 2020-07-06]. Dostupné z: [https://www.innerbody.com/image\\_dige02/dige21.html](https://www.innerbody.com/image_dige02/dige21.html)
- [19] BRADFORD A., How the Small Intestine Works. *Live Science* [online]. 2018 [cit. 2020-07-06]. Dostupné z: <https://www.livescience.com/52048-small-intestine.html>
- [20] Trávicí soustava. *StudujNet Učivo pro střední školy* [online]. 2019 [cit. 2020-03-07]. Dostupné z: <http://stredniskola.netstranky.cz/pedagogika-pro-asistenty-ve-skolstvi/1-rocnik/biologie/travici-soustava-12-2-2019.html>
- [21] FEHER J., *Quantitative human physiology: An introduction*. 1st ed. Waltham: Elsevier, 2012, s. 711-720. ISBN 978-0-12-382163-8.
- [22] FASANO A., FLAHERTY S., *Jak žít bez lepku: přední odborník nabízí praktický návod, jak se zbavit nemoci*. Hodkovičky: Pragma, 2015. ISBN 978-80-7349-433-9.
- [23] CURIEL J. A., et al., Manufacture and characterization of pasta made with wheat flour rendered gluten-free using fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria. *Journal of Cereal Science*. 2014, **59**(1), 79-87. DOI: 10.1016/j.jcs.2013.09.011.
- [24] MOHAN KUMAR B. V., et al., Targeted degradation of gluten proteins in wheat flour by prolyl endoprotease and its utilization in low immunogenic pasta for gluten sensitivity population. *Journal of Cereal Science*. 2019, **87**, 59-67. DOI: 10.1016/j.jcs.2019.03.001.
- [25] WATSON R. R., et al., *Wheat and rice in disease prevention and health: Benefits, risks, and mechanisms of whole grains in health promotion*. Amsterdam: Elsevier, 2014, s. 157-170. ISBN 01-240-1716-9.
- [26] CAMINERO A., et al., Differences in gluten metabolism among healthy volunteers, coeliac disease patients and first-degree relatives. *British Journal of Nutrition*. 2015, **114**(8), 1157-1167. DOI: 10.1017/S0007114515002767.
- [27] MORENO AMADOR M. de L., et al., A new microbial gluten-degrading prolyl endopeptidase: Potential application in celiac disease to reduce gluten immunogenic peptides. *Plos One*. 2019, **14**(6). DOI: 10.1371/journal.pone.0218346.

- [28] OSORIO C. E., et al., Gluten Detection Methods and their Critical Role in Assuring Safe Diets for Celiac Patients. *Nutrients*. 2019, **11**(12). DOI: 10.3390/nu11122920.
- [29] TARBET A., How Gluten Changes Gut Permeability. *Alpco* [online]. 2016 [cit. 2020-07-16]. Dostupné z: <https://www.alpco.com/how-gluten-changes-gut-permeability>
- [30] SARMENTO B., *Concepts and Models for Drug Permeability Studies: Cell and Tissue Based In Vitro Culture Models*. Cambridge (Sawston): Elsevier, 2016, s. 57-59. ISBN 978-0-08-100094-6.
- [31] COLLINS J. T., et al., Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine. *StatPearls*. 2020. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459366/>
- [32] AMINOFF M. J., DAROFF R. B., *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. 2nd ed. London: Elsevier, 2014, s. 411-416. ISBN 978-0-12-385158-1.
- [33] KHOSLA CH., Celiac Disease: Lessons for and from Chemical Biology. *ACS Chemical Biology*. 2017, **12**(6), 1455-1459. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsembio.6b01155>.
- [34] CATASSIC., et al., Non-Celiac Gluten Sensitivity: The New Frontier of Gluten Related Disorders. *Nutrients*. 2013, **5**(10), 3839-3853. DOI: 10.3390/nu5103839.
- [35] SCHUMANN M., et al., Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2017, **3**(2), 150-162. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2016.12.006.
- [36] What is Celiac Disease? *At the forefront Uchicago Medicine Celiac Disease Center* [online]. The University of Chicago, 2020 [cit. 2020-03-07]. Dostupné z: <http://www.cureceliacdisease.org/overview/>
- [37] TADA M., et al., Posterior Tibial Tendinopathy and Osteopenia as Primary Symptoms of Celiac Disease: A Case Report. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*. 2020, **59**(3), 553-559. DOI: 10.1053/j.jfas.2019.09.009.
- [38] SAINSBURY K., MARQUES M. M., The relationship between gluten free diet adherence and depressive symptoms in adults with coeliac disease: A systematic review with meta-analysis. *Appetite*. 2018, **120**, 578-588. DOI: 10.1016/j.appet.2017.10.017.
- [39] HOFFMANOVÁ I., *Celiakie*. 1. vyd. Praha: Mladá fronta, 2019. ISBN 978-80-204-5414-0.
- [40] CAIO G., et al., Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Medicine*. 2019, **17**(142). DOI: 10.1186/s12916-019-1380-z.
- [41] IANIRO G., et al., Current technologies for the endoscopic assessment of duodenal villous pattern in celiac disease. *Computers in Biology and Medicine*. 2015, **65**, 308-314. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2015.04.033.
- [42] GREEN P. H. R., et al., Celiac disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015, **135**(5), 1099-1106. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.01.044.
- [43] BARBERIS N., et al., Relationship between motivation, adherence to diet, anxiety symptoms, depression symptoms and quality of life in individuals with celiac

- disease. *Journal of Psychosomatic Research*. 2019, **124**. DOI: 10.1016/j.jpsychores.2019.109787.
- [44] FREEMAN H. J., Dietary compliance in celiac disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2017, **23**(15), 2635–2639. DOI: 10.3748/wjg.v23.i15.2635.
- [45] FUCHS M., et al., *Potravinová alergie a intolerance*. Praha: Mladá fronta, 2016. ISBN 978-80-204-3757-0.
- [46] ELLI L., et al., Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World Journal of Gastroenterology*. 2015, **21**(23), 7110-7119. DOI: 10.3748/wjg.v21.i23.7110
- [47] SCHERF K. A., Immunoreactive cereal proteins in wheat allergy, non-celiac gluten/wheat sensitivity (NCGS) and celiac disease. *Current Opinion in Food Science*. 2019, **25**, 35-41. DOI: 10.1016/j.cofs.2019.02.003.
- [48] CIANFERONI A., Wheat allergy: diagnosis and management. *Journal of Asthma and Allergy*. 2016, **9**, 13–25. DOI: 10.2147/JAA.S81550.
- [49] SCIBILIA J., et al., Wheat allergy: A double-blind, placebo-controlled study in adults. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006, **117**(2), 433-439. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.10.014.
- [50] BRAZIER Y., What to know about wheat allergy. *Medical News Today* [online]. 2020 [cit. 2020-03-08]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/174405>
- [51] HISCHENHUBER C., et al., Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2006, **23**(5), 559-575. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2006.02768.x
- [52] LOPES J. P., SICHERER S., Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and treatment. *Current Opinion in Immunology*. 2020, **66**, 57-64. DOI: 10.1016/j.coi.2020.03.014.
- [53] CZAJA-BULSA G., BULSA M., What Do We Know Now about IgE-Mediated Wheat Allergy in Children? *Nutrients*. 2017, **9**(1). DOI: 10.3390/nu9010035.
- [54] SAMASCA G., et al., Current Trends and Investigative Developments in Wheat Allergy. *International Reviews of Immunology*. 2015, **34**(6), 538-541. DOI: 10.3109/08830185.2015.1065827.
- [55] CIANFERONI A., Wheat allergy: diagnosis and management. *Journal of Asthma and Allergy*. 2016, **9**(13-25). DOI: 10.2147/JAA.S81550
- [56] CZAJA-BULSA G., Non coeliac gluten sensitivity – A new disease with gluten intolerance. *Clinical Nutrition*. 2015, **34**(2), 189-194. DOI: 10.1016/j.clnu.2014.08.012.
- [57] ISASI C., et al., Non-celiac Gluten Sensitivity and Rheumatic Diseases. *Reumatologia Clinica*. 2016, **12**(1), 4-10. DOI: 10.1016/j.reumae.2015.11.004.

- [58] HENGGELER J. C., et al., Non-coeliac gluten sensitivity: A review of the literature. *Trends in Food Science & Technology*. 2017, **66**, 84-92. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.05.018.
- [59] NUCERA E., et al., Wheat desensitization treatment in patients with gluten sensitivity. *Advances in Dermatology and Allergology*. 2018, **35**(3), 320-322. DOI: 10.5114/ada.2018.76229.
- [60] NILAND B., BROOKS D. C., Health Benefits and Adverse Effects of a Gluten-Free Diet in Non-Celiac Disease Patients. *Gastroenterology & hepatology*. 2018, **14**(2), 82-91. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5866307/>
- [61] GOBBETTI M., et al., How to improve the gluten-free diet: The state of the art from a food science perspective. *Food Research International*. 2018, **110**, 22-32. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.04.010.
- [62] SALISBURY C., Gluten Free Diet for Coeliac Disease. *Gastronet* [online]. [cit. 2020-07-04]. Dostupné z: <https://www.gastro.net.au/diets/glutenfree.html>
- [63] SCHERF K. A., et al., Gluten and wheat sensitivities – An overview. *Journal of Cereal Science*. 2016, **67**, 2-11. DOI: 10.1016/j.jcs.2015.07.008.
- [64] BRUINS SLOT I. D., et al., Part of celiac population still at risk despite current gluten thresholds. *Trends in Food Science & Technology*. 2015, **43**(2), 219-226. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.02.011.
- [65] FARAGE P., et al., Content Validation and Semantic Evaluation of a Check-List Elaborated for the Prevention of Gluten Cross-Contamination in Food Services. *Nutrients*. 2017, **9**(1), 36. DOI: 10.3390/nu9010036.
- [66] ARENDT E. K., BELLO F. D., *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*. Burlington: Academic Press, 2008, s. 290. ISBN 978-0-12-373739-7.
- [67] FALCOMER A. L., et al., Gluten contamination in food services and industry: A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020, **60**(3), 479-493. DOI: 10.1080/10408398.2018.1541864.
- [68] Označování potravin z hlediska obsahu lepku. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-02-18]. Dostupné z: <https://www.szpi.gov.cz/clanek/oznacovani-potravin-z-hlediska-obsahu-lepku.aspx>
- [69] WELSTEAD L., The Gluten-Free Diet in the 3rd Millennium: Rules, Risks and Opportunities. *Diseases*. 2015, **3**(3), 136-149. DOI: 10.3390/diseases3030136.
- [70] ALLEN K. J., TAYLOR S. L., The Consequences of Precautionary Allergen Labeling: Safe Haven or Unjustifiable Burden? *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2018, **6**(2), 400-407. DOI: 10.1016/j.jaip.2017.12.025.
- [71] COPELAND J. N., et al., What Is Autism Spectrum Disorder? *American Psychiatric Association* [online]. 2018 [cit. 2020-03-10]. Dostupné z: <https://www.psychiatry.org/patients-families/autism/what-is-autism-spectrum-disorder>



- [72] Autism spectrum disorder. *Mayo Clinic* [online]. 2018 [cit. 2020-03-10]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/autism-spectrum-disorder/symptoms-causes/syc-20352928>
- [73] HOSSEINIAN F., OOMAH B. D., et al., *Dietary Fiber Functionality in Food and Nutraceuticals*. 1st ed. Chichester: Wiley, 2017, s. 229. ISBN 9781119138075.
- [74] Autism Rates By Country 2020. *World Population Review* [online]. 2020 [cit. 2020-03-25]. Dostupné z: <https://worldpopulationreview.com/countries/autism-rates-by-country/>
- [75] Autism spectrum disorders. *World Health Organization* [online]. 2019 [cit. 2020-03-25]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>
- [76] THOROVÁ K., *Poruchy autistického spektra*. 3. rozšířené a přeprac. Vyd. Praha: Portál, 2016. ISBN 978-80-262-0768-9.
- [77] New studies estimate autism prevalence at 1 in 40. *Organization for autism research* [online]. Arlington, 2019 [cit. 2020-07-16]. Dostupné z: <https://researchautism.org/new-studies-estimate-autism-prevalence-at-1-in-40/>
- [78] MUGZACH O., et al., An ontology for Autism Spectrum Disorder (ASD) to infer ASD phenotypes from Autism Diagnostic Interview-Revised data. *Journal of Biomedical Informatics*. 2015, **56**, 333-347. DOI: 10.1016/j.jbi.2015.06.026.
- [79] HRDLIČKA M., KOMÁREK V., *Dětský autismus: přehled současných poznatků*. 1. vyd. Praha: Portál, 2004, s. 41-42. ISBN 80-7178-813-9.
- [80] GRAY K.M., Atypical Autism. *Encyclopedia of Autism Spectrum Disorders*. 2018, 1-9. DOI: 10.1007/978-1-4614-6435-8\_1635-3.
- [81] CLARKE T., et al., Substance use disorder in Asperger syndrome: An investigation into the development and maintenance of substance use disorder by individuals with a diagnosis of Asperger syndrome. *International Journal of Drug Policy*. 2016, **27**, 154-163. DOI: 10.1016/j.drugpo.2015.06.003.
- [82] MIRKOVIC B., GÉRARDIN P., Asperger's syndrome: What to consider? *L'Encéphale*. 2019, **45**(2), 169-174. DOI: 10.1016/j.encep.2018.11.005.
- [83] CHARAN S. H., Childhood disintegrative disorder. *Journal of Pediatric Neurosciences*. 2012, **7**(1), 55-57. DOI: 10.4103/1817-1745.97627.
- [84] ROSE S. A., et al., Impaired Visual Search in Children with Rett Syndrome. *Pediatric Neurology*. 2019, **92**, 26-31. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2018.10.002.
- [85] GIBSON G. R., et al., *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. 1st ed. Shinfield: IFIS Publishing, 2005, s. 2. ISBN 0 86014 193 4.
- [86] JARMOŁOWSKA B., et al., Role of Milk-Derived Opioid Peptides and Proline Dipeptidyl Peptidase-4 in Autism Spectrum Disorders. *Nutrients*. 2019, **11**(1). DOI: 10.3390/nu11010087.

- [87] SOKOLOV O., et al., Autistic children display elevated urine levels of bovine casomorphin-7 immunoreactivity. *Peptides*. 2014, **56**, 68-71. DOI: 10.1016/j.peptides.2014.03.007.
- [88] CIEŚLIŃSKA A., et al., Influence of candidate polymorphisms on the dipeptidyl peptidase IV and  $\mu$ -opioid receptor genes expression in aspect of the  $\beta$ -casomorphin-7 modulation functions in autism. *Peptides*. 2015, **65**, 6-11. DOI: 10.1016/j.peptides.2014.11.012.
- [89] FETISSOV S. O., et al., Neuropeptides in the 58ikrobiota-brain axis and feeding behavior in autism spectrum disorder. *Nutrition*. 2019, **61**, 43-48. DOI: 10.1016/j.nut.2018.10.030.
- [90] VISSOKER R. E., et al., Eating and feeding problems and gastrointestinal dysfunction in Autism Spectrum Disorders. *Research in Autism Spectrum Disorders*. 2015, **12**, 10-21. DOI: 10.1016/j.rasd.2014.12.010.
- [91] LEADER G., et al., Feeding Problems, Gastrointestinal Symptoms, Challenging Behavior and Sensory Issues in Children and Adolescents with Autism Spectrum Disorder. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2020, **50**, 1401-1410. DOI: 10.1007/s10803-019-04357-7.
- [92] DOENYAS C., Dietary interventions for autism spectrum disorder: New perspectives from the gut-brain axis. *Physiology & Behavior*. 2018, **194**, 577-582. DOI: 10.1016/j.physbeh.2018.07.014.
- [93] SHARP W. G., et al., Feeding Problems and Nutrient Intake in Children with Autism Spectrum Disorders: A Meta-analysis and Comprehensive Review of the Literature. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2013, **43**, 2159-2173. DOI: 10.1007/s10803-013-1771-5.
- [94] MARCASON W., What Is the Current Status of Research Concerning Use of a Gluten-Free, Casein-Free Diet for Children Diagnosed with Autism? *Journal of the American Dietetic Association*. 2009, **109**(3), 572. DOI: 10.1016/j.jada.2009.01.013.
- [95] LÁZARO C. P., et al., Opioid peptides and gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorders. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2016, **38**(3), 243-246. DOI: 10.1590/1516-4446-2015-1777.
- [96] SHINDLER A. E., et al., Potential Determinants of Gastrointestinal Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. *Review Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2019. DOI: 10.1007/s40489-019-00187-6.
- [97] Cell Junctions. *Lumen* [online]. [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/boundless-ap/chapter/cell-junctions/>
- [98] FRIEDMAN J., What Is Leaky Gut Syndrome And How Do You Fix It? *Examined Existence* [online]. [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: <https://examinedexistence.com/leaky-gut-syndrome-fix/>

- [99] ESNAFOGLU E., et al., Increased Serum Zonulin Levels as an Intestinal Permeability Marker in Autistic Subjects. *The Journal of Pediatrics*. 2017, **188**, 240-244. DOI: 10.1016/j.jpeds.2017.04.004.
- [100] NAVARRO F., et al., Can probiotics benefit children with autism spectrum disorders? *World Journal of Gastroenterology*. 2016, **22**(46), 10093–10102. DOI: 10.3748/wjg.v22.i46.10093.
- [101] DOENYAS C., Gut Microbiota, Inflammation, and Probiotics on Neural Development in Autism Spectrum Disorder. *Neuroscience*. 2018, **374**, 271-286. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.01.060.
- [102] LI Q., et al., The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017, **11**, 120. DOI: 10.3389/fncel.2017.00120.
- [103] BERDING K., DONOVAN S. M., Microbiome and nutrition in autism spectrum disorder: current knowledge and research needs. *Nutrition Reviews*. 2016, **74**(12), 723-736. DOI: 10.1093/nutrit/nuw048.
- [104] ELDER J. H., et al., The Gluten-Free, Casein-Free Diet In Autism: Results of A Preliminary Double Blind Clinical Trial. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2006, **36**, 413-420. DOI: 10.1007/s10803-006-0079-0. ISSN 0162-3257.
- [105] NICHOLS M., MELLO A., The gluten-morphine connection: What you need to know about gluteomorphins. *Medicine with Heart* [online]. 2017 [cit. 2020-07-04]. Dostupné z: <https://livinglovecommunity.com/2017/04/23/gluten-morphine-connection/>
- [106] Gliadorphin-7. *Cellmano* [online]. [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: <http://en.cellmano.com/Gliadorphin-7-1872.html>
- [107] β-casomorphin 7. *Medkoo Biosciences* [online]. [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: <https://medkoo.com/products/22884>
- [108] Crystal structure of human Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV). *Protein data bank* [online]. 2003 [cit. 2020-07-02]. Dostupné z: <https://www.rcsb.org/structure/1NU6>
- [109] RUEDA-RUZAFÁ L., et al., Opioid system influences gut-brain axis: Dysbiosis and related alterations. *Pharmacological Research*. 2020, **159**. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104928.
- [110] JOHNSON C. R., et al., Effects of Gluten Free / Casein Free Diet in Young Children with Autism: A Pilot Study. *Journal of Developmental and Physical Disabilities*. 2011, **23**(3), 213-225. DOI: 10.1007/s10882-010-9217-x.
- [111] HULL M., Can autism be helped by gluten-free, casein-free diets? *Examine.com* [online]. 2019 [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: <https://examine.com/nutrition/autism-gluten-free-casein-free/>
- [112] EL-RASHIDY O., et al., Ketogenic diet versus gluten free casein free diet in autistic children: a case-control study. *Metabolic Brain Disease*. 2017, **32**(6), 1935-1941. DOI: 10.1007/s11011-017-0088-z.

- [113] KUSHAK R. I., WINTER H. S., Intestinal microbiota, metabolome and gender dimorphism in autism spectrum disorders. *Research in Autism Spectrum Disorders*. 2018, **49**, 65-74. DOI: 10.1016/j.rasd.2018.01.009.
- [114] WHITELEY P., et al., Gluten- and casein-free dietary intervention for autism spectrum conditions. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2013, **6**. DOI: 10.3389/fnhum.2012.00344.
- [115] GHALICHI F., et al., Effect of gluten free diet on gastrointestinal and behavioral indices for children with autism spectrum disorders: a randomized clinical trial. *World Journal of Pediatrics*. 2016, **12**(4), 436-442. DOI: 10.1007/s12519-016-0040-z.
- [116] HYMAN S. L., et al., The Gluten-Free/Casein-Free Diet: A Double-Blind Challenge Trial in Children with Autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. 2016, **46**(1), 205-220. DOI: 10.1007/s10803-015-2564-9.
- [117] SLOT I. D. B., et al., Immunochemical Detection Methods for Gluten in Food Products: Where Do We Go from Here? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016, **56**(15), 2455-2466. DOI: 10.1080/10408398.2013.847817.
- [118] SCHERF K. A., POMS R. E., Recent developments in analytical methods for tracing gluten. *Journal of Cereal Science*. 2016, **67**, 112-122. DOI: 10.1016/j.jcs.2015.08.006.
- [119] MELINI F., MELINI V., Immunological Methods in Gluten Risk Analysis: A Snapshot. *Safety*. 2018, **4**(4). DOI: 10.3390/safety4040056.
- [120] ELISA Formats. *Bio-Rad* [online]. 2020 [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>
- [121] Metoda ELISA: aspekty jednotlivých uspořádání. *Baria* [online]. 2019 [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://www.baria.cz/blog/metoda-elisa-aspekty-jednotlivych-usporadani/>
- [122] ROSELL C. M., et al., Cereals for developing gluten-free products and analytical tools for gluten detection. *Journal of Cereal Science*. 2014, **59**(3), 354-364. DOI: 10.1016/j.jcs.2013.10.001.
- [123] CELLERINO K., Protein Ingredients Control in Gluten Free Products Using SDS-PAGE, Developed Competitive Enzyme Immunoassays and Commercial ELISA Kits. *World Journal of Food Science and Technology*. 2018, **2**(1), 12-18. DOI: 10.11648/j.wjfst.20180201.12.
- [124] SHUAIB M., et al., Evaluation of Different Wheat Varieties by SDS-PAGE Electrophoresis. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2007, **10**(10), 1667-1672. DOI: 10.3923/pjbs.2007.1667.1672.
- [125] Introduction to SDS-PAGE. *Experimental Biosciences* [online]. 2012 [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/gellab2.html>

- [126] BUSTAMANTE M. Á., et al., Techniques for Analyzing Gluten. *Nutritional and Analytical Approaches of Gluten-Free Diet in Celiac Disease*. 2017, 29-46. DOI: 10.1007/978-3-319-53342-1\_3.
- [127] HARASZI R., et al., Analytical Methods for Detection of Gluten in Food-Method Developments in Support of Food Labeling Legislation. *Journal of AOAC International*. 2011, **94**(4), 1006-1025. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/51644221\\_Analytical\\_Methods\\_for\\_Detection\\_of\\_Gluten\\_in\\_Food-Method\\_Developments\\_in\\_Support\\_of\\_Food\\_Labeling\\_Legislation](https://www.researchgate.net/publication/51644221_Analytical_Methods_for_Detection_of_Gluten_in_Food-Method_Developments_in_Support_of_Food_Labeling_Legislation)
- [128] SDS-PAGE – Gel Based Protein Separation. *Pacific Biolabs* [online]. [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://pacificbiolabs.com/sds-page/>
- [129] SDS-PAGE Service. *Pronalyse* [online]. [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://www.creative-proteomics.com/pronalyse/sds-page-service.html>
- [130] ISSAQ H. J., VEENSTRA T. D., Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *BioTechniques*. 2018, **44**(5), 697-700. DOI: 10.2144/000112823.
- [131] LOCK S., Gluten Detection and Speciation by Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Foods*. 2014, **3**(1), 13-29. DOI: 10.3390/foods3010013.
- [132] MANFREDI A., et al., Multiplex liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the detection of wheat, oat, barley and rye prolamins towards the assessment of gluten-free product safety. *Analytica Chimica Acta*. 2015, **895**, 62-70. DOI: 10.1016/j.aca.2015.09.008.
- [133] ALVES T. O., et al., *Celiac Disease and Non-Celiac Gluten Sensitivity: Determination of Gluten Peptides Associated with Celiac Disease by Mass Spectrometry*. 1st ed. Rijeka: InTech, 2017, s. 44-50. ISBN 978-953-51-3177-9.
- [134] Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS). *EAG Laboratories* [online]. [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://www.eag.com/techniques/mass-spec/lc-ms-ms/>
- [135] Polymerase chain reaction (PCR). *Khan Academy* [online]. [cit. 2020-04-23]. Dostupné z: <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
- [136] OLEXOVÁ L., et al., Detection of gluten-containing cereals in flours and “gluten-free” bakery products by polymerase chain reaction. *Food Control*. 2006, **17**(3), 234-237. DOI: 10.1016/j.foodcont.2004.10.009.
- [137] SCHARF A., et al., Performance of ELISA and PCR Methods for the Determination of Allergens in Food: An Evaluation of Six Years of Proficiency Testing for Soy (*Glycine max* L.) and Wheat Gluten (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, **61**(43), 10261-10272. DOI: 10.1021/jf402619d.

- [138] PILOLLI R., et al., Advances in biosensor development based on integrating nanotechnology and applied to food-allergen management. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013, **47**, 12-26. DOI: 10.1016/j.trac.2013.02.005.
- [139] SCOGNAMIGLIO V., et al., Biosensing technology for sustainable food safety. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2014, **62**, 1-10. DOI: 10.1016/j.trac.2014.07.007.
- [140] KUMAR A., et al., *Advanced Biosensors for Health Care Applications: Aptamer Technology for the Detection of Foodborne Pathogens and Toxins*. Elsevier, 2019, s. 45-69. ISBN 978-0-12-815743-5.
- [141] DA SILVA NEVES M. M. P., et al., Celiac disease diagnosis and gluten-free food analytical control. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, **397**(5), 1743-1753. DOI: 10.1007/s00216-010-3753-1.
- [142] CAMPUZANO S., et al., Electrochemical Affinity Biosensors in Food Safety. *Chemosensors*. 2017, **5**(1), 8. DOI: 10.3390/chemosensors5010008.