

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Jan Zouhar

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Význam a analýza lepku v potravinách, bezlepková výživa

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jan Zouhar**
Osobní číslo: **C20098**
Studijní program: **B0531A130024 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Význam a analýza lepku v potravinách, bezpečková výživa**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši zaměřenou na lepek, jeho význam v potravinářství možnosti jeho eliminace z potravin – bezpečkovou výživu.
2. Uveďte základní složky lepku, jejich charakteristiky a metody analýzy lepku a jeho složek v potravinách.
3. Diskutujte zdravotní aspekty související s lepkem. Popište metodiky používané při diagnostice zdravotních obtíží souvisejících s lepkem a možnosti léčby pacientů postižených některou z uvedených obtíží.
4. Prezentujte základní principy bezpečkové výživy, její hlavní benefity a případná rizika pro inkriminované skupiny osob.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Martin Adam, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec,
Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla,
Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Význam a analýza lepku v potravinách, bezlepková výživa jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na mojí 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 směrnici 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: 26. 6. 2023

Jan Zouhar

Děkuji vedoucímu bakalářské práce panu doc. Ing. Martinu Adamovi, Ph.D. za jeho profesionální přístup, cenné rady a trpělivost při vypracování bakalářské práce.

Dále děkuji mé rodině a blízkým přátelům za jejich psychickou a finanční podporu během celého studia.

Anotace

Tato bakalářská práce se zaměřuje na lepek, jeho význam v potravinářství a následně i jeho eliminaci z potravin – bezlepkovou výživu. Práce popisuje jednotlivé složky lepku a následně jejich analýzu. Dále se zabývá diagnostikou zdravotních obtíží souvisejících s lepkem a možnostmi léčby pacientů trpících některou z uvedených obtíží. V závěrečné části jsou popsány hlavní benefity bezlepkové výživy a případně i její rizika.

Klíčová slova

Lepek, bezlepková výživa, analýza lepku, diagnostika zdravotních potíží

Title

Importance and analysis of gluten in food, gluten-free nutrition

Annotation

This bachelor thesis focuses on gluten, its importance in the food industry, and its subsequent elimination from the food – gluten-free nutrition. The thesis describes individual components of gluten and then their analysis. Furthermore, the thesis deals with the diagnosis of gluten-related health problems and treatment options for patients suffering from any of these problems. In the final part, the main benefits of a gluten-free nutrition are described, as well as possible risks.

Key words

Gluten; Gluten-free nutrition; Gluten analysis; Diagnosis of health problems

Obsah

Seznam obrázků.....	10
Seznam tabulek.....	11
Seznam zkratk a značek	12
Úvod.....	14
1 Lepek.....	15
1.1 Gliadin.....	16
1.2 Glutenin.....	17
1.3 Sekalin.....	19
1.4 Hordein.....	20
2 Analýza lepku v potravinách.....	22
2.1 Extrakce lepku z potravinové matrice.....	23
2.2 Jednotlivé metody analýzy lepku.....	24
2.2.1 ELISA.....	24
2.2.2 SDS-PAGE	29
2.2.3 RP-HPLC.....	32
2.2.4 MALDI-TOF MS	34
3 Zdravotní obtíže související s lepkem.....	38
3.1 Celiakie	38
3.1.1 Diagnostika celiakie	40
3.1.2 Léčba celiakie	41
3.2 Duhringova dermatitida	41
3.2.1 Sérologie.....	42
3.2.2 Přímá imunofluorescence	43
3.2.3 Histopatologie.....	43
3.3 Glutenová ataxie	44

3.3.1	Diagnostika glutenové ataxie	45
3.3.2	Léčba glutenové ataxie	45
3.4	Alergie na lepek	45
3.4.1	Diagnóza alergie na lepek.....	46
3.4.2	Léčba alergie na lepek	46
4	Bezlepková výživa	47
4.1	Školní bezlepková strava	50
4.2	Principy bezlepkové diety	50
4.3	Hlavní benefity bezlepkové výživy.....	51
4.4	Rizika a nevýhody bezlepkové výživy.....	51
5	Závěr	53
6	Seznam použité literatury.....	54

Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura gliadinu	17
Obrázek 2: Gluteninové podjednotky s nízkou a vysokou molekulovou hmotností pod elektronovým mikroskopem	18
Obrázek 3: Schéma protilátky.....	24
Obrázek 4: Schéma kompetitivní a sendvičové metody ELISA.....	25
Obrázek 5: ELISA test na mikrodestičce	28
Obrázek 6: Monoklonální vs. polyklonální protilátky	29
Obrázek 7: Bílkoviny separované pomocí SDS-PAGE a detekované pomocí Coomassieho modři a barvení stříbrem.....	31
Obrázek 8: Schéma HPLC.....	33
Obrázek 9: Schéma MALDI-TOF MS	34
Obrázek 10: Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB)	35
Obrázek 11: Destička MALDI pro 96 vzorků	36
Obrázek 12: Rozdělení intolerancí (nesnášenlivostí) lepku	38
Obrázek 13: Porovnání zdravé a napadené sliznice tenkého střeva při celiakii	39
Obrázek 14: Duhringova dermatitida	42
Obrázek 15: A) Vzorek obarvený hematoxylinem a eosinem vykazující subepidermální B) Vzorek obarvený hematoxylinem a eosinem ukazující hustou akumulaci neutrofilů v papilární dermis tvořící mikroabsces.....	44
Obrázek 16: Kožní prick test (SPT).....	46
Obrázek 17: Symboly označení bezpečných potravin.....	47
Obrázek 18: Extrudované křupky Bimbo s jahodovou příchutí	49
Obrázek 19: Směs na chléb s chia semínky	49
Obrázek 20: Logo projektu Rekrece bez lepku.....	52

Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam komerčně dostupných souprav ELISA pro detekci lepku	26
---	----

Seznam zkratek a značek

AGA – anti-gliadinové protilátky

anti-TG6 – anti-transglutamináza 6

CAC – chlorid kyseliny kaprinové

DGP – deamidované gliadinové peptidy

DH – *dermatitis herpetiformis* (Duhringova dermatitida)

DHB – kyselina dihydroxybenzoová

DIF – přímá imunofluorescence

DNA – deoxyribonukleová kyselina

ELISA – enzyme-linked immuno sorbent assay (enzymová imuno-sorbentní analýza)

EMA – endomysální protilátky

eTG/TG3 – epidermální transglutamináza

FA – kyselina ferulová

GA – glutenová ataxie

GMP – glutenin macropolymer (makropolymer gluteninu)

GPC – gelová permeační chromatografie

GRD – gluten-related disorders (poruchy související s lepkem)

HMW – high molecular weight (vysoká molekulová hmotnost)

HMW-GS – high-molecular-weight glutenin subunits (vysokomolekulární gluteninové podjednotky)

HPLC – high-performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

CHCA – kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová

IgA – imunoglobulin A

IgE – imunoglobulin E

IgG – imunoglobulin G

IR – infračervené (záření)

LFD – lateral flow devices (zařízení pro boční proudění)

LMW-GS – low-molecular-weight glutenin subunits (nízkomolekulární gluteninové podjednotky)

mAb – monoklonální protilátka

MALDI-TOF MS – matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie založená na ionizaci/desorpci laserem za přítomnosti matrice v kombinaci s detektorem doby letu)

ME – merkaptoethanol

pAb – polyklonální protilátka

PCR – polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

RNA – ribonukleová kyselina

RP-HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi

SA – kyselina sinapová

SCL – sekalin

SDS – dodecylsírán sodný

SDS-PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného

SPT – skin prick test (kožní prick test)

TCEP – *tris*(2-karboxyethyl)-fosfin

tTG/TG2 – tkáňová transglutamináza

UV – ultrafialové (záření)

Úvod

Lepek je součástí mnoha potravin, bez kterých by se většina lidí nedokázala obejít, ať už se jedná o běžné pečivo, zákusky, těstoviny nebo například knedlíky. Ale existují i lidé, kteří potraviny obsahující lepek konzumovat nemohou. V minulosti nebyly téměř žádné zmínky o nesnášenlivosti lepku nebo o celiakii, a proto se u některých lidí tato nemoc vyskytla. Hlavním důvodem byla nedostatečná informovanost lékařů a také nedostatek bezlepkových potravin a výrobků. Avšak v dnešní době jsou takové problémy minimální, protože na téměř každou potravinu přirozeně obsahující lepek existuje její náhrada bez lepku.

První část této bakalářské práce je zaměřená na samotný lepek, na popis jednotlivých složek a potravin (obilnin), ve kterých se přirozeně vyskytuje. Je zmíněn význam lepku v potravinářství, jakou plní funkci například při výrobě těsta a jak ovlivňuje jeho kvalitu. Druhá část práce se zabývá analýzou jednotlivých složek lepku, kde jsou popsány čtyři nejpoužívanější a nejznámější metody. Jedná se o imunologické, elektroforetické a optické metody.

Dále se práce zaměřuje na popis obtíží související s lepkem a také metodik, které se používají při jejich diagnostice a v neposlední řadě na jejich léčbu. Vzhledem k tomu, že celiakie je nejčastější onemocnění související s lepkem, tak je zde ze všech zmíněných obtíží popsána nejpodrobněji. Závěrečná část práce se věnuje bezlepkové výživě a vhodným potravinám, jejich hlavním benefitům a rizikům. Je zde popsán systém školního stravování pro žáky, kteří musí jíst bezlepková jídla. Uveden je seznam bezlepkových a nepříjemných potravin.

1 Lepek

Lepek je komplexní směs stovek příbuzných, ale odlišných bílkovin, především gliadinu a gluteninu. Podobné zásobní bílkoviny existují jako sekalin v žitu, hordein v ječmeni a aveniny v ovsu a jsou souhrnně označovány jako „lepek“. Síť glutenových bílkovin se liší v důsledku různých složek a velikostí a variability způsobené genotypem, podmínkami růstu a technologickými procesy^[1].

Lepek lze definovat jako pryžovou hmotu, která zůstane, když se pšeničné těsto promyje, aby se odstranily škrobové granule a ve vodě rozpustné složky. V závislosti na důkladnosti mytí obsahuje sušina 75–85 % bílkovin a 5–10 % lipidů; většinu zbytku tvoří škrob a neškrobové sacharidy. V praxi se termín „lepek“ vztahuje na bílkoviny, protože hrají klíčovou roli při určování jedinečné pečící kvality pšenice tím, že těstu propůjčují schopnost absorbovat vodu, soudržnost, viskozitu a elasticitu. Lepek obsahuje stovky bílkovinných složek, které jsou přítomny buď jako monomery, nebo spojené meziřetězcovými disulfidovými vazbami jako oligo- a polymery^[2].

Tyto bílkovinné složky jsou unikátní svým složením aminokyselin, které se vyznačují vysokými obsahy glutaminu a prolinu a nízkými obsahy aminokyselin s nabitými postranními skupinami. Molekulární hmotnosti nativních bílkovin se pohybují od přibližně 30 000 do více než 10 milionů. Tradičně byly lepkové bílkoviny rozděleny do frakcí podle jejich rozpustnosti v roztocích alkohol-voda (např. 60% ethanol): rozpustné gliadiny a nerozpustné gluteniny. Obě frakce jsou důležitými přispěvateli reologickým vlastnostem těsta, ale jejich funkce se liší^[2].

Hydratované gliadiny mají malou elasticitu a jsou méně soudržné než gluteniny. Přispívají především k viskozitě a roztažnosti systému těsta. Naproti tomu hydratované gluteniny jsou jak soudržné, tak elastické a jsou zodpovědné za pevnost a pružnost těsta. Pro zjednodušení se může gliadin chápat jako „změkčovadlo“ a glutenin jako „rozpouštědlo“. Správná směs obou frakcí je nezbytná pro dodání u viskoelastických vlastností těsta a kvality konečného produktu^[2].

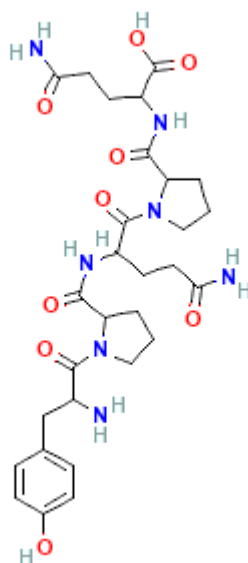
Pšeničný lepek se stále více využívá jako komerční produkt v potravinářském průmyslu pro své všestranné funkční vlastnosti a širokou škálu zdrojů. Používá se široce v produktech na bázi pšenice, potravinářských pomocných látkách, balení potravin, adsorpčních a tepelně izolačních materiálech, potravinách pro zvláštní účely a ve všestranných aplikacích. V budoucnu bude bílkovina pšeničného lepku využívána jako důležitá surovina pro účast na vývoji a přípravě různých potravin a rozložitelných materiálů a aplikační potenciál pšeničného lepku v potravinářském průmyslu bude obrovský^[3].

1.1 Gliadin

Gliadiny tvoří 40–50 % celkových zásobních bílkovin pšenice a jsou klasifikovány do čtyř podkategorií: α -, β -, γ - a ω -gliadiny. Také byly klasifikovány jako $\omega 1,2$ -, $\omega 5$ -, α/β - a γ -gliadiny na základě jejich primární struktury a molekulové hmotnosti. Toto rozdělení bylo provedeno na základě mobility při nízkém pH při gelové elektroforéze^[2]. Cysteinové zbytky gliadinů tvoří hlavně intramolekulární disulfidové vazby, i když byly také popsány α -gliadiny s lichým počtem cysteinových zbytků^[4]. Gliadiny mají povrchově aktivní vlastnosti a v důsledku toho potenciál stabilizovat plynové buňky při výrobě chleba^[5].

V rámci každého typu jsou strukturální rozdíly malé v důsledku substituce, delece a inserce jednotlivých aminokyselinových zbytků. ω -gliadiny se vyznačují nejvyšším obsahem glutaminu, prolinu a fenylalaninu, které tvoří asi 80 % celkového složení. $\omega 5$ -gliadiny mají vyšší molekulovou hmotnost (~50 000) než $\omega 1,2$ -gliadiny (~40 000). Většina gliadinů postrádá cystein, takže neexistuje možnost disulfidických příčných vazeb (viz obrázek 1). Ačkoli distribuce celkových gliadinů mezi různé typy silně závisí na odrůdě pšenice (genotyp) a podmínkách pěstování (půda, klima a hnojení), lze zobecnit, že hlavními složkami jsou α/β - a γ -gliadiny, zatímco ω -gliadiny se vyskytují v mnohem nižších podílech^[2].

Menší část gliadinů (α -gliadiny) má lichý počet cysteinů v důsledku bodových mutací a jsou spojeny dohromady nebo s gluteniny. Objevují se buď v oligomerech rozpustných v alkoholu v gliadinové frakci nebo v polymerech gluteninu nerozpustných v alkoholu^[2].

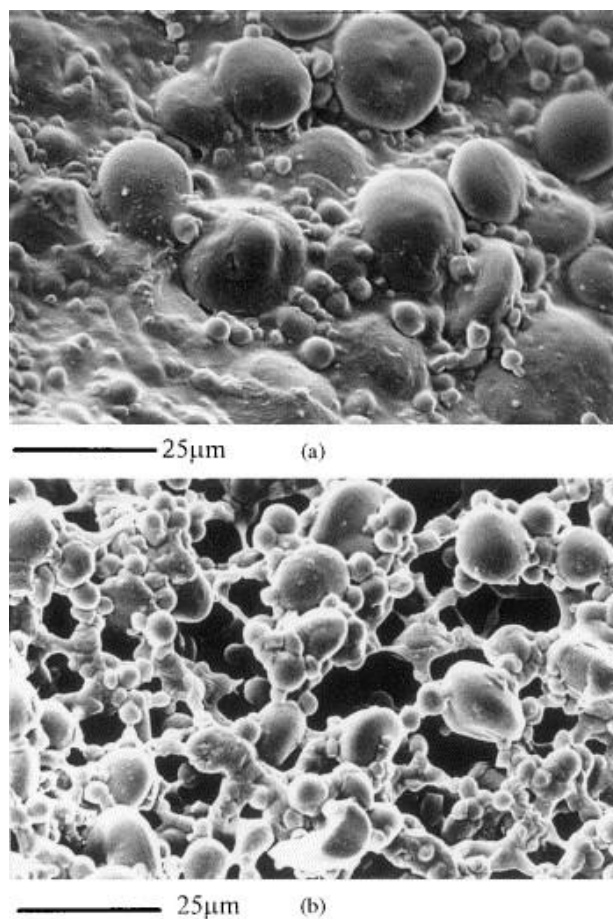


Obrázek 1: Struktura gliadinu [6]

1.2 Glutenin

Gluteninová frakce obsahuje agregované bílkoviny spojené meziřetězcovými disulfidovými vazbami, které mají různou velikost v rozmezí od asi 500 000 do více než 10 milionů. Část gluteninů patří k největším bílkovinám v přírodě. Distribuce těchto gluteninů byla uznána jako jeden z hlavních determinantů vlastností těsta a výkonu při pečení. Největší polymery zvané „glutenin macropolymer“ (GMP) nejvíce přispívají k vlastnostem těsta a jejich množství v pšeničné mouce (~20–40 mg/g) silně koreluje s pevností těsta a objemem bochníku^[2,7]. Díky bílkovinným polymerům spojeným disulfidickými vazbami je pšeničné těsto pružné^[7]. Disulfidové vazby jsou velmi odolné vůči štěpení^[8].

Předpokládá se, že schopnost gluteninových podjednotek tvořit disulfidové vazby je dána primární a sekundární strukturou bílkovin. Tato struktura určuje, zda jsou cysteinové zbytky přítomny a zda jsou dostupné pro tvorbu disulfidových vazeb. Určuje tedy schopnost podjednotky skládat se způsobem, který by byl zapotřebí k vytvoření vazby^[8]. Jsou popsány strukturální rysy různých tříd gluteninových podjednotek. Rozdíly v kvalitě gluteninu mohou vyplývat z variací v jeho struktuře, distribuci velikosti a složení podjednotek^[9].



Obrázek 2: Gluteninové podjednotky s nízkou a vysokou molekulovou hmotností pod elektronovým mikroskopem^[8]

Použití imunoelektronové mikroskopie, při které jsou zlatem značené protilátky proti konkrétním typům podjednotek vystaveny tenkým řezům těsta poprvé umožnilo přímo vizualizovat rozdíly v distribucích různých podjednotek v těstě. Vysokomolekulární gluteninové podjednotky (HMW-GS) vytvořily lineární síť (viz obrázek 2b), zatímco nízkomolekulární podjednotky (LMW-GS) vytvořily shluky a agregáty v souladu s větvelemi tvořícími nízkomolekulární podjednotky z lineárních řetězců z vysokomolekulárních podjednotek (viz obrázek 2a). Gliadiny byly rovnoměrně rozptýleny v lepkových vláknech po celém těstě, což je v souladu s rolí „vyplňování prostoru“^[8].

1.3 Sekalin

Pšenice (*Triticum aestivum* L.) a žito (*Secale cereale* L.), nejběžněji používaná zrna při výrobě chleba jsou taxonomicky blízce příbuzné, a proto jejich jadrové endospermy obsahují homologní bílkoviny. Avšak prolamin vyskytující se v žitných zrnech a bílkovinná frakce rozpustná v alkoholu zvaná sekalin (SCL) dosud nebyly tak široce studovány, pokud jde o jeho funkčnost v potravinových systémech, jako pšeničný prolamin^[10].

Podle předchozích studií elektroforetický záznam sekalinu ukazuje čtyři skupiny polypeptidů, označené jako bílkoviny s vysokou molekulovou hmotností (HMW > 100 kDa), γ -75 kDa, ω -50 kDa a γ -40 kDa. Kvantitativní analýza aminokyselin prokázala, že kyselina glutamová a prolin jsou převládajícími složkami v sekalinu, následované leucinem, fenylalaninem a serinem. Vzhledem k amfifilnímu chování sekalinu v důsledku přítomnosti širokých oblastí bílkovinných β -listů je ethanol (70 % V/V) nejběžnějším rozpouštědlem používaným pro jeho extrakci. Kromě toho vede ethanol k rozvinutí α -helikálních struktur, čímž se zvětší rozsah β -listů a následně se obnaží větší počet hydrofilních skupin. Je vhodné poznamenat, že strukturální rys β -listu by mohl ovlivnit funkční vlastnosti sekalinu, tj. vlastnosti, které bílkovina uděluje potravinářskému produktu jako hydrofobní chování bílkoviny, a tedy interakce s vodnou fází jsou důležité faktory pro funkčnost bílkoviny. Dále je dobře známé, že sekundární a terciární struktura bílkovin se může změnit po chemické modifikaci schopné způsobit změny v povrchové expozici jejich aminokyselin. Indukované zvýšení hydrofobicity bílkoviny tedy může umožnit jeho integraci do lipidových systémů a následně spouštět nové, ale i zlepšené nebo narušené funkční vlastnosti^[10].

Bílkovinná lipofilizační reakce je definována jako chemická nebo enzymatická strukturální změna polypeptidového řetězce přidáním lipidových složek, prováděna několika různými metodami a vedoucí k biomakromolekulám se zvýšenou afinitou k nepolárním sloučeninám s nízkou nebo vysokou molekulovou hmotností. Acylace *N*-hydroxysukcinimid esterem, anhydridy kyseliny octové, jantarové nebo citrkonové, chloridy mastných kyselin nebo redukční alkylace, jakož i připojení hydrofobních aminokyselin nebo alkoholů, jsou nejčastěji používané experimentální postupy k dosažení lipofilizace bílkovin. Zejména chemická acylace je poměrně značná strukturální modifikace, která může dramaticky ovlivnit schopnost bílkoviny interagovat s jinými molekulami a následně modifikovat jeho aktivitu^[10].

Hlavním účelem této studie bylo syntetizovat deriváty sekalinu chemickou acylací chloridem kyseliny kaprinové (CAC), organickou sloučeninou známou jako mastná kyselina se středně dlouhým řetězcem, a prozkoumat následné změny v rozpustnosti sekalinu, hydrofobnosti, pojivové schopnosti, stejně jako v jeho emulgačních a pěnivých vlastnostech. V závěru této studie byla detekována zvýšená hydrofobicita bílkovinného povrchu, kapacita absorpce oleje, emulgační a pěnicí kapacita lipofilizovaného sekalinu, stejně jako stabilita získaných emulzí a pěn. Naopak, po lipofilizaci sekalinu bylo pozorováno značné snížené rozpouštění bílkoviny při různých hodnotách pH a při nízkých i vysokých koncentracích fyziologického roztoku, stejně jako absorpční aktivita vody. Všechny pozorované účinky mohou být závislé na rozbalení bílkoviny a vytvoření stabilního a elastického bílkovinného filmu hydrofobními interakcemi v důsledku kovalentní vazby kyseliny kaprinové na sekalin. Tato zjištění silně naznačují velký potenciál lipofilizovaného sekalinu jako emulgačního nebo pěnivého aditiva v různých potravinářských produktech^[10].

1.4 Hordein

Hordein, prolamin ječmene (*Hordeum vulgare* L.) extrahovaný alkoholovým roztokem, tvoří 35–55 % celkových bílkovin zrna ječmene a je jeho hlavní zásobní bílkovinou. Hordeiny jsou rozděleny do čtyř skupin na základě jejich elektroforetické mobility a složení aminokyselin. Hordeiny B (30–50 kDa, bohaté na síru) a C (55–80 kDa, chudé na síru) zabírají 70–80 % a 10–20 % hordeinové frakce, hordeiny D (80–90 kDa) a A (15 kDa) zabírají méně než 5 % celkové frakce hordeinu. C a některé B hordeiny se objevují jako monomery, zatímco většina B a D hordeinů je spojena meziřetězcovými disulfidovými můstky. Kromě vysokého množství glutaminu je hordein bohatý také na hydrofobní aminokyseliny (kolem 40 %), přičemž nejvyšší hladiny odpovídají prolinu, leucinu a valinu. Takový profil aminokyselin poskytuje vysokou povrchovou hydrofobicitu a silnou agregaci bílkovin. Tyto vlastnosti podporují absorpci bílkovin na hydrofobním rozhraní a poté tvoří viskoelastické filmy ke stabilizaci pěn a emulzí. Tento profil však na druhou stranu vede k výrazně snížené rozpustnosti bílkoviny, protože rozpustnost bílkoviny ve vodě je kritická pro udělení dalších požadovaných a nezbytných vlastností, jako jsou emulgační a pěnicí funkce. Vzhledem k vysokému množství glutaminu je hordein vhodným kandidátem pro hodnocení deamidace se zaměřením na vylepšené funkce. Dopady deamidace na strukturu a funkční vlastnosti hordeinu jsou nejasné^[11].

V jedné studii, kde byly zkoumány bílkoviny z ječmene a rýže, se ukázalo, že endospermová bílkovina ječmene a rýže odhalil silný potenciál být zdrojem antioxidantních bílkovin. Rýžové bílkoviny však byly více koncentrované ve frakci otrub než ve frakci endospermu. Navíc bílkovina z rýžových otrub a hordein z endospermu ječmene byly shledány jako vysoce účinné v antioxidantní aktivitě^[12]. Další studie odhalila, že emulgační a pěnicí vlastnosti částic na bázi hordeinu jsou ovlivněny pH a iontovou silou v důsledku změn velikosti částic a elektrického náboje. Stabilita emulze a texturní vlastnosti mohou být také řízeny koncentrací částic a objemovým podílem dispergované fáze^[13].

Hordeinové frakce se dají použít jako nástroj k odhadování proteolytické aktivity v ječmeni a sladu. Hordein byl použit jako substrát pro test exopeptidázové a endopeptidázové aktivity v zelených sladech. Zjištěné enzymatické aktivity se významně liší od těch získaných s použitím jiných než ječných substrátů, jako jsou dipeptidy, želatina nebo hemoglobin. Slady s podobnými celkovými hladinami karboxypeptidáz, které byly měřeny za použití jiných než ječných substrátů, vykazovaly značné rozdíly v rozsahu, ve kterém tyto enzymy štěpí hordein ječmene. Slady se také více lišily ve své endopeptidázové aktivitě s hordeinem než ve schopnosti trávit želatinu nebo hemoglobin^[14].

Výsledky další studie ukázaly, že kombinace hordeinových polypeptidů B mají určitý vliv na sladovnickou kvalitu prostřednictvím regulace diastatické síly (celková aktivita enzymů rozkládající škrob v ječném sladu). Pro zjištění vlivu disulfidických vazeb na sladovnickou kvalitu bylo provedeno porovnání relativního množství hordeinu extrahovaného v přítomnosti a nepřítomnosti redukčního činidla. V nepřítomnosti redukčního činidla v extrakčním rozpouštědle souvisela vysoká koncentrace hordeinu B se zvýšením výtěžnosti extraktu. Naopak v přítomnosti redukčního činidla zvýšení koncentrace B hordeinu zvyšovalo Kolbachovo číslo (ukazatel jakosti sladovnického ječmene a sladu). Vyšší poměr D hordeinu k B hordeinu, pokud první z nich obsahoval vysokou koncentraci disulfidických vazeb, snižoval kvalitu sladu ve větší míře než v případě, kdy bylo přítomno méně disulfidických vazeb. Pokud podmínky prostředí podporovaly vysokou účinnost příjmu dusíku, byl syntetizován větší podíl disulfidických vazeb D hordeinu, což vedlo ke snížení sladovnické kvality. Předpokládá se, že odrůdy s nižším výnosem dusíku v zrna a nižším poměrem D:B hordeinů poskytují kvalitnější slad^[15].

2 Analýza lepku v potravinách

Podle potravinářského zákoníku (Codex Alimentarius) mohou nést označení bez lepku pouze potraviny nepřesahující úroveň 20 mg lepku na kilogram. To také nastavuje standard pro analytické metody pro detekci lepku. V současné době se nejčastěji používají metody založené na enzymové imuno-sorbentní analýze (ELISA), ale úspěšně se používají i metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR). Pro charakterizaci obilných bílkovin se široce používají metody založené na proteomice, jako jsou vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi (RP-HPLC) nebo gelová permeační chromatografie (GPC). Metody kombinující hmotnostní spektrometrii a kapalinovou chromatografii jsou nejslibnější neimunologické přístupy pro přesnou kvantifikaci stop lepku. Vzhledem k požadavku na drahé vybavení a odbornost však nejsou široce používané pro rutinní analýzy. Nový vývoj zahrnuje imunosenzory, aptamery, mikročipy a multianalytové profilování. Navzdory výhodám a problémům různých metod zůstává potřeba nezávislé referenční metody a obecně použitelného referenčního materiálu^[16].

Požadavky na spolehlivé analytické metody pro kvantifikaci lepku v potravinách jsou dostatečná citlivost, specifita, reprodukovatelnost, robustnost a validace mezilaboratorními studii s několika nezávislými laboratořemi. Detekce lepku v zahříváných nebo extrudovaných výrobcích obsahujících částečně hydrolyzovaný lepek je obzvláště náročná. Jako první krok by měla být co nejúplnější extrakce lepkových bílkovin i peptidů z potravinové matrice. Samotná analýza musí být přesná a adekvátně kalibrovaná proti vhodné reprezentativní a referenční bílkovině^[16].

Většina metod je založena na kvantifikaci prolaminové frakce lepku rozpustné v alkoholu. Glutelinová frakce nerozpustná v alkoholu často není cílená, ačkoli prolamin i gluteliny obsahují imunogenní peptidy. Protože prolamin v lepku se bere jako 50 %, zjištěný obsah prolaminu se pro získání obsahu lepku obvykle vynásobí faktorem 2. To je založeno na předpokladu, že poměr prolamin/glutelin je 1. Komplexní analýza pšeničné, špaldové, dvouzrné, jednozrné, žitné a ječné mouky a také pšeničných škrobů však ukázala, že skutečný poměr prolamin/glutelin byl velmi variabilní v rozmezí od 0,2 v pšeničném škrobu do 13,9 v jednozrně. Proto je obsah lepku buď nadhodnocen, nebo, což je vážnější u pacientů s celiakií, podhodnocen duplikací obsahu prolaminu^[16].

2.1 Extrakce lepku z potravinové matrice

Složitost lepku a potravinových matric obsahujících lepek představuje značné analytické problémy. Nativní glutenové bílkoviny se vyznačují nerozpustností ve vodě nebo solném roztoku, vysokými molekulovými hmotnostmi, heterogenními povrchovými vlastnostmi, inter- a intramolekulárními disulfidovými vazbami a omezenou stabilitou po rozpuštění. Naproti tomu částečně hydrolyzovaný lepek je rozpustný ve vodě nebo v roztocích soli a vodných alkoholů. Nejčastěji používaným rozpouštědlem v metodách detekce lepku je vodný alkohol (60% ethanol nebo 50% 1-propanol), který extrahuje hlavně prolaminovou frakci z nezpracovaných materiálů, jako jsou mouky^[16].

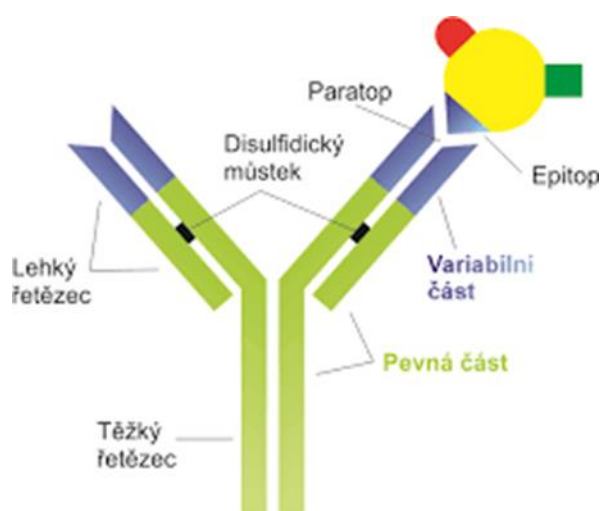
Vodný alkohol však nestačí k rozpuštění prolaminů ze zpracovaných materiálů, protože prolaminy a gluteliny agregují prostřednictvím teplem indukované tvorby meziřetězcovým disulfidových vazeb. Z tohoto důvodu se používají redukční činidla, jako jsou 2-merkptoethanol nebo *tris*(2-karboxyethyl)-fosfin (TCEP) (pro narušení disulfidových vazeb) a disagregační činidla, jako jsou guanidin nebo dodecylsírán sodný (SDS) (pro zvýšenou rozpustnost). Je použito v kombinaci s vodnými alkoholy k extrakci prolaminů spolu s gluteliny ze surovin a zpracovaných materiálů. Extrakce při 50 °C tzv. koktejlem, který obsahuje 2-merkptoethanol a guanidin ve fosfátovém pufru, je součástí sendvičové metody R5 ELISA. Kombinace 2-merkptoethanolu a SDS, TCEP a guanidinu, případně TCEP a aniontové povrchově aktivní látky *N*-lauroyl-sarkosin ve fosfátovém pufru, tzv. univerzální prolamin a glutelinový extrakční roztok se ukázaly jako vhodné pro extrakci lepkových bílkovin a peptidů z různých vzorků potravin^[16].

V závislosti na potravinové matrici mohou být nutné další kroky. Odtučnění *n*-hexanem se doporučuje pro produkty s více než 10 % tuku. U produktů obsahujících vysoké množství polyfenolů může být nutné přidat do extrakčního roztoku rybí želatinu, případně polyvinylpyrrolidon nebo sušené odstředěné mléko, aby se narušily interakce gluten-protein-polyfenol. Kompatibilitu extrakčního rozpouštědla s následným analytickým postupem je samozřejmě nutné ověřit pro každý postup^[16].

2.2 Jednotlivé metody analýzy lepku

2.2.1 ELISA

ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) je analytická metoda, která pomocí imunochemické reakce s enzymatickou detekcí umožňuje stanovení různých antigenů nebo protilátek (viz obr. 3)^[17]. ELISA je založena na detekci protilátek, které jsou kovalentně navázány na enzym, jako je křenuv peroxidáza (substrát/chromogen: např. peroxid močoviny/3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) nebo alkalická fosfatáza (substrát: *p*-nitrofenylfosfát), který generuje barevný chemiluminiscenční nebo fluorescenční produkt pro měření^[16].

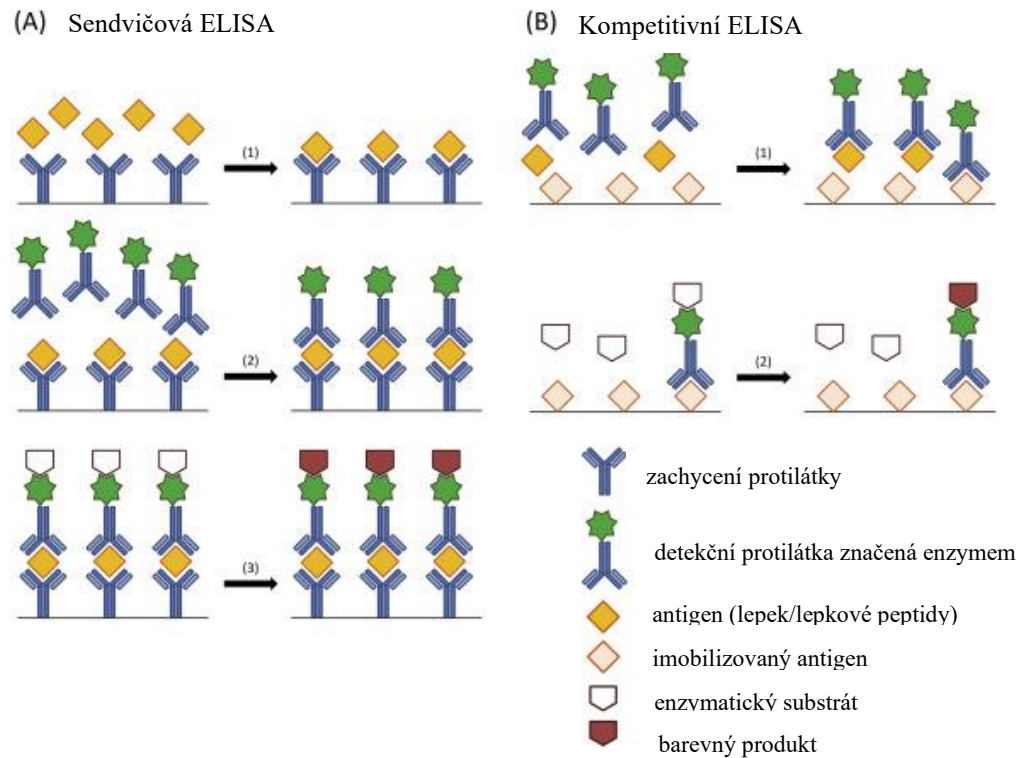


Obrázek 3: Schéma protilátky^[18]

Pro analýzu lepku lze použít dva principy ELISA, a to sendvičový a kompetitivní. V sendvičové ELISA (obr. 4A), destička je potažena známým množstvím záchytné protilátky a nespecifická vazebná místa jsou na povrchu blokována. Poté se aplikuje vzorek obsahující antigen a vytvoří se komplex antigen/protilátka (krok 1). Po odstranění přebytečného antigenu promytím se přidá detekční protilátka značená indikátorovým enzymem a naváže se na druhé vazebné místo antigenu. Antigen je tedy „vložený“ mezi záchytnou a detekční protilátku (krok 2). Nenavázané detekční protilátky se vymyjí a poté se přidá enzymatický substrát, který se přemění na barevný produkt, jehož absorbanci lze měřit na čtečce destiček (krok 3)^[16].

Naměřená absorbance je přímo úměrná koncentraci antigenu v extraktu vzorku, kterou lze vypočítat z kalibrační křivky pomocí referenční bílkoviny lepku. Protože antigen potřebuje mít dvě prostorově oddělená vazebná místa pro záchytnou a detekční protilátku, je sendvičová ELISA vhodná pouze pro větší antigeny, jako jsou intaktní glutenové bílkoviny. Tento požadavek znemožňuje analýzu lepku ve výrobcích obsahujících částečně hydrolyzovaný

lepek, jako jsou pivo, kynuté výrobky, popř. sladové extrakty, protože tyto lepkové peptidy mohou mít pouze jedno vazebné místo^[16].



Obrázek 4: Schéma kompetitivní a sandočové metody ELISA^[16]

Kompetitivní ELISA (obr. 4B) může být použita jak pro intaktní bílkoviny, tak i pro menší antigeny (lepkové peptidy), protože vyžaduje pouze jedno vazebné místo. Na povrchu mikrotitrační destičky je imobilizováno známé množství antigenu. Do jamky se současně přidává vzorek obsahující antigen a omezené konstantní množství enzymaticky značené protilátky. Během inkubace imobilizované a volné antigeny soutěží o vazebná místa protilátky (krok 1). Pokud je ve vzorku přítomno více antigenů, na imobilizované antigeny se naváže méně protilátek. Nenavázané protilátky, antigeny a komplexy antigen/protilátka se odstraní promytím. Po přidání enzymatického substrátu se vytvoří barevný produkt (krok 2). V tomto případě je naměřená absorbance nepřímo úměrná koncentraci antigenu v extraktu vzorku. Pro výpočet koncentrace antigenu v extraktu vzorku se opět použije kalibrační křivka s glutenovým peptidem nebo směsí peptidů^[16].

Bylo vyvinuto několik protilátek specifických pro lepek nebo gliadin, ale většina komerčně dostupných testovacích souprav ELISA pro detekci lepku je založena na R5, G12, 401.21 (Skerritt) a a20, mAb nebo různé pAb (viz tab. 1)^[16].

Tabulka 1: Seznam komerčně dostupných souprav ELISA pro detekci lepku^[16]

Výrobce	ELISA souprava	Zásada	Protilátka
Abnova	Gluten/Gliadin ELISA Kit	Sendvič	pAb
Astori Tecnica	Gluten ELISA Kit	Konkurenční	pAb
Biomedal Diagnostika	GlutenTox ELISA sendvič	Sendvič	A1/G12 mAb
	GlutenTox ELISA konkurenční	Konkurenční	G12 mAb
	GlutenTox tyčinky	Měrka	G12 mAb
Biokontrola	Transia Plate Prolamins	Sendvič	R5 mAb
BioCheck (UK)	Gluten-Check ELISA kit	Sendvič	401,21 mAb
Diagnostická automatizace	AccuDiag™ Gliadin/Gluten ELISA	Sendvič	pAb
Systémy ELISA	ELISA Systems Gliadin test	Sendvič	401,21 mAb
Technologie ELISA	Lepek Aller-Tek	Sendvič	401,21 mAb
	EZ gluten®	LFD	401,21 mAb
Elution Technologies	Gluten Rapid Kit	LFD	pAb
EuroProxima	Gluten-Tec® ELISA	Konkurenční	a20 mAb
Immunolab	Gliadin/lepek	Sendvič	pAb
Imutest	Gluten-Check ELISA Kit	Sendvič	401,21 mAb
	Test lepku v potravinách	Screeningový test	401,21 mAb
InCura	GlutenAlert ELISA	Konkurenční	pAb
Ingenasa	Ingezim Gluten®	Sendvič	R5 mAb
	Ingezim Gluten® SemiQ	Sendvič	R5 mAb
	Ingezim Gluten® Hidrolizado	Přímo	R5 mAb
Institut Morinaga	Sada Wheat Protein ELISA	Sendvič	pAb
Neogen	Upozornění na Gliadina	Screeningový test	401,21 mAb
	Upozornění na Gliadin R5	Screeningový test	R5 mAb
	BioKits Gluten Assay Kit	Sendvič	401,21 mAb
	Veratox® pro Gliadin	Sendvič	401,21 mAb
	Veratox® pro Gliadin R5	Sendvič	R5 mAb
	Odhalte 3-D pro lepek	LFD	401,21 mAb
R-Biopharm	Ridascreen® Gliadin	Sendvič	R5 mAb
	Ridascreen® Fast Gliadin	Sendvič	R5 mAb
	Ridascreen® Gliadin konkurenční	Konkurenční	R5 mAb
	Rida®Quick Gliadin	Měrka	R5 mAb
Romer Labs	AgraQuant® ELISA Gluten G12	Sendvič	G12 mAb
	AgraQuant® ELISA gluten	Sendvič	pAb
	AgraStrip® LFD Gluten G12	LFD	G12 mAb
	AgraStrip® LFD lepek	LFD	pAb
Zeulab	Proteon Gluten Express	Měrka	G12 mAb

LFD – lateral flow devices (zařízení pro boční proudění)

mAb – monoklonální protilátka

pAb – polyklonální protilátka

Specifická těchto protilátek (kromě pAb) je hodnocena především proti pšeničným gliadinům. Někteří hodnotili specifickost protilátek hlouběji a zaměřili se pouze na známé toxické peptidové fragmenty přítomné v pšeničných gliadinech s omezeným ohledem na reaktivitu těchto protilátek na jiné oblasti stejné bílkoviny, jiné prolaminy nebo gluteliny pšenice, žita nebo ječmene^[19].

R5 je monoklonální protilátka proti žitným extraktům. V jedné studii byly hlavní epitopy (konkrétní místa antigenu, na které se váže protilátka) R5 hodnoceny pomocí fágového displeje a pepscan studií. Jako další hodnocení reaktivity protilátky bylo hodnoceno proti aminokyselinovým sekvencím N-konce pšeničného α -gliadinu. Je známo, že tento konec je toxický pro pacienty s celiakií. QQPFP, QQQFP, LQPFP a QLPPF (Q - glutamin, P - prolin, F - fenylalanin, L – leucin) byly identifikovány jako nejsilnější cílové epitopy a jsou přítomny nejen v α -gliadinech, ale také v γ -gliadinech. Existují omezené informace o reaktivitě protilátky proti jiným částem stejného gliadinu, jiným gliadinům nebo gluteninům. Některé z R5 epitopů jsou také přítomny v pšeničných nízkomolekulárních (LMW) gluteninech, které jsou příbuzné s α/β -gliadiny nejen molekulovou hmotností, ale také složením aminokyselin^[19].

G12 je také monoklonální protilátka a byla vypěstována proti syntetickému 33merovému toxickému α -gliadinovému peptidu, přičemž nejreaktivnějším epitopem je QPQLPY (Y -tyrosin). Kromě prolaminu pšenice, žita a ječmene se ukázalo, že tato protilátka váže také prolaminu z některých kultivarů ovsa. Studie hodnotící reaktivitu G12 na kultivary ovsa ukázala, že protilátka váže ty, které vykazovaly toxicitu ve studiích *in vitro* (ve zkumavce). Tato charakteristika G12 polarizovala názory mezi těmi, kteří si myslí, že test na lepek by měl detekovat pouze lepek z pšenice, žita a ječmene, ale ne ovsa, a těmi, kteří to vidí jako příležitost, jak chránit malé procento citlivé populace do ovsa^[19].

Monoklonální protilátka 401.21, lépe známá jako Skerritt protilátka byla používána v některých komerčních testech ELISA, dokud nebyly známy některé nevýhody a dokud nový vývoj nevedl k produkci a použití jiných protilátek a novějších analytických přístupů. Původně se uvádělo, že protilátka Skerritt je specifická pro gliadiny. Několik výzkumných studií však dále vyhodnotilo specifickost této protilátky a došli k závěru, že není specifická pouze pro ω -gliadin, ale také se silně váže na vysokomolekulární gluteniny. V souvislosti s tímto objevem je třeba zdůraznit jeden důležitý aspekt, a to že vodný alkoholový extrakční roztok používaný ve Skerrittových testech není vhodný, protože není účinný při extrakci Skerrittových cílových sloučenin (gluteninů). Vhodnější by byl roztok obsahující redukční činidlo. Gliadinové

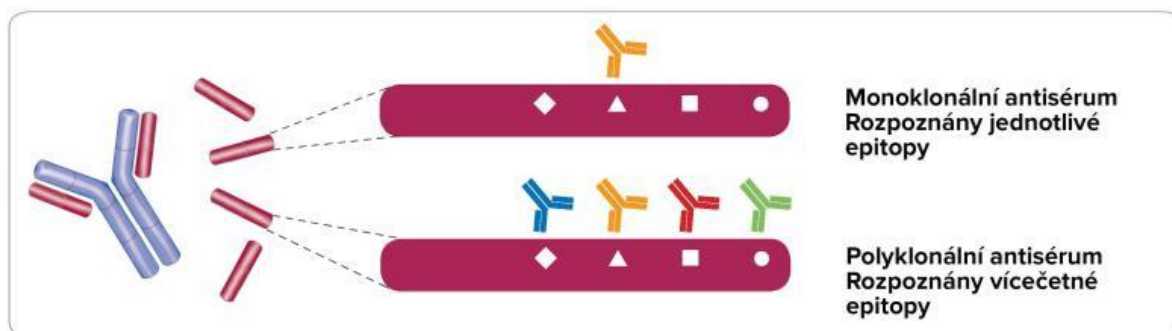
přípravky, které neobsahují gluteniny, by se neměly používat pro kalibraci nebo validaci testu založeného na Skerrittově testu, protože chybí cílová sloučenina (toto je zvláště důležité, pokud se používají i redukční činidla). Je běžnou praxí, že laboratoře porovnávají výkony různých testů (viz obr. 5)^[19].



Obrázek 5: ELISA test na mikrodestičce^[20]

Nejnověji vyvinutá monoklonální protilátka $\alpha 20$ byla vytvořena proti CD-imunogennímu peptidu PFRPQQPYPQP (R – arginin) z α -gliadinů, přičemž tato aminokyselinová sekvence je epitopem s minimálním rozpoznáním. Gliadiny, sekaliny a hordeiny jsou rozpoznávány $\alpha 20$ mAb, ale existují omezené informace o reaktivitě, zejména vůči glutelinové frakci. Kompetitivní ELISA na bázi $\alpha 20$ mAb je kompatibilní s 60% ethanolem jako extrakčním činidlem nebo 60% ethanolem obsahujícím dithitritol jako redukčním činidlem a přidáním jodacetamidu^[16].

Polyklonální protilátky (pAb) (obr. 6) se obvykle pěstují proti gliadinům, přičemž pAb Morinaga vysoké výtěžnosti pro prolaminy, zejména prolaminy ječmene, ale také pro žitné gluteliny. Informace o jiných pAb jsou vzácné a ve vědecké literatuře není k dispozici rozsáhlá srovnávací charakterizace jejich imunoreaktivity a účinnosti v potravinových maticích^[16].



Obrázek 6: Monoklonální vs. polyklonální protilátky^[21]

2.2.2 SDS-PAGE

Gelová elektroforéza na polyakrylamidu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE) se používá k separaci komplexních směsí bílkovin (např. z buněk, subcelulárních frakcí, kolonových frakcí nebo imunoprecipitátů), ke zkoumání složení podjednotek, k ověřování homogenity vzorků bílkovin a k čištění bílkovin pro použití v dalších aplikacích. Při gelové elektroforéze na polyakrylamidovém gelu bílkoviny migrují v reakci na elektrické pole přes póry v matrici polyakrylamidového gelu. Velikost pórů se snižuje se zvyšující se koncentrací polyakrylamidu. Kombinace velikosti pórů a bílkovinného náboje určuje rychlost migrace bílkovin^[22].

Jedná se bezpochyby o jednu z nejpoužívanějších technik pro charakterizaci komplexních směsí bílkovin. Je to pohodlná, rychlá a levná metoda, protože vyžaduje pouze řádově mikrogramová množství bílkovin. Bílkoviny mají elektrický náboj, pokud se nacházejí v prostředí s pH odlišným od jejich izoelektrického bodu, a proto mají schopnost se pohybovat, pokud jsou vystaveny elektrickému poli. Migrační rychlost je úměrná poměru mezi náboji bílkoviny. Čím vyšší je náboj na jednotku hmotnosti, tím rychlejší je migrace^[23].

Bílkoviny nemají předvídatelnou strukturu jako nukleové kyseliny, a proto se jejich migrační rychlosti navzájem nepodobají. Nemohou dokonce migrovat ani při působení elektromotorické síly (když jsou ve svém izoelektrickém bodě). V těchto případech se bílkoviny denaturují přidáním detergentu, jako je dodecylsíran sodný (SDS), aby se oddělily výhradně podle molekulové hmotnosti. SDS je redukční činidlo, které rozbíjí disulfidové vazby, rozděluje bílkoviny na jejich podjednotky a také jim dává záporný náboj, který jim umožňuje migrovat gelem v přímé závislosti na jejich velikosti. Denaturace navíc způsobuje, že ztrácejí svoji terciární strukturu^[23].

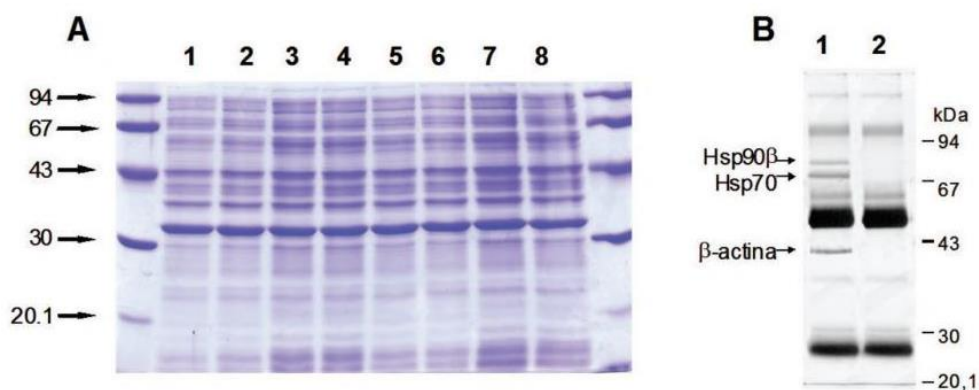
Mezi nejdůležitější vlastnosti polyakrylamidové gelové elektroforézy patří:

- Gely potlačují tepelnou konvekci způsobenou aplikací elektrického pole a mohou také fungovat jako síťové médium, které zpomaluje průchod molekul. Gely mohou také jednoduše sloužit k udržení hotové separace, takže je možné aplikovat barvení po elektroforéze.
- Polyakrylamidové gely vznikají polymerací akrylamidu působením zesíťovaného činidla, bis-akrylamidu, za přítomnosti iniciátoru a katalyzátoru. Persíranový iont ($S_2O_8^{2-}$), který se přidává jako persíran amonný (APS), je iniciátorem tuhnutí gelu a zdrojem volných radikálů, zatímco TEMED (*N, N, N', N'*-tetramethylethyldiamin) katalyzuje polymerační reakci stabilizací těchto volných radikálů. V některých situacích, například při izoelektrické fokusaci, může přítomnost persulfátu narušovat elektroforézu, proto se místo něj používají riboflavin nebo TEMED.
- Roztoky akrylamidu se odplyňují, protože kyslík je inhibítolem polymerace. Kromě toho se při polymeraci uvolňuje teplo, které by mohlo způsobit tvorbu bublin v gelu.
- Rychlost polymerace závisí na koncentraci persíranu (katalyzátoru) a TEMED (iniciátor)^[23].

Systémy polyakrylamidové gelové elektroforézy mohou být prováděny s použitím jednoho nebo více pufrů. V těchto případech lze hovořit o kontinuálních fosfátových pufrách nebo diskontinuálních pufrách, které přejímá metoda diskontinuální elektroforézy. Často se používá termín „Laemliho pufr“ pro popis *tris*-glycinového pufrového systému, který se používá při SDS-PAGE. V diskontinuálních systémech zajišťuje první pufr migraci všech bílkovin v čele migrace, což způsobuje akumulaci celého vzorku, který byl vložen do jamky. Separace skutečně začíná od okamžiku, kdy migrační čelo dosáhne hranice druhého pufru. První gel, „stohovací“, má větší póry (nižší procento akrylamidu/bisakrylamidu) a má kyselější pH než druhý gel, což je to, co skutečně odděluje bílkoviny. Tento systém je vhodný zejména pro analýzu vzorků zředěných bez ztráty rozlišení^[23].

Bílkoviny separované na polyakrylamidovém gelu lze detekovat různými metodami, například barvivy a barvením stříbrem. Barvení Coomassieho modří umožňuje detekovat 0,2–0,6 μg proteinu a je kvantitativní (lineární) až do 15–20 μg . Často se používá v roztocích methanolu a kyseliny octové v roztocích isopropanolu a kyseliny octové se odbarvuje (viz obr. 7A). Pro barvení gelů při dvourozměrné elektroforéze se doporučuje odstranit amfolyty přidáním trichloroctové kyseliny k barvivu a následně odbarvit kyselinou octovou^[23].

Barvení stříbrem je alternativou k rutinnímu barvení bílkovinných gelů (stejně jako nukleových kyselin a lipopolysacharidů) díky snadnému použití a vysoké citlivosti (50–100krát citlivější než barvení Coomassieho modří) (viz obr. 7B). Tato technika je vhodná zejména pro třírozměrné gely^[23].



Obrázek 7: Bílkoviny separované pomocí SDS-PAGE a detekované pomocí Coomassieho modří a barvení stříbrem^[23]

Byla provedena kvantitativní SDS-PAGE celkové bílkoviny z různých odrůd pšenice, kde pufrý obsahující dodecylsírán sodný (SDS) a merkaptoethanol (ME) byly použity k extrakci celkové bílkoviny z mouky nebo jednotlivých semen pěti různých odrůd pšenice (*Triticum aestivum* L.). Těmto extraktům byla přizpůsobena metoda vázání barviva na bílkovinu. Extrahované bílkoviny byly separovány podle molekulové hmotnosti gelovou metodou SDS-PAGE a obrazce byly kvantifikovány denzitometrií gelů poté, co byly bílkoviny obarveny Coomassieho modří. Vzory byly rozděleny do pěti různých oblastí odpovídajících rozsahům molekulové hmotnosti >63 kDa (A1), 48–63 kDa (A2), 40–48 kDa (A3), 31–40 kDa (A4) a 8–31 kDa (A5)^[24].

Pro různé odrůdy byly hodnoceny podíly celkové plochy odpovídající těmto dílčím plochám. Předpokládalo se, že absorpce barviva je přímo úměrná koncentraci bílkoviny (v lineárním rozsahu) se stejnou proporcionalitou pro první čtyři oblasti (převážně zásobní bílkoviny). Předpokládá se, že bílkoviny A5 (převážně albuminy) mají trojnásobně větší šanci vázat barvivo než ostatní bílkoviny a korekce této oblasti byla založena na tomto předpokladu. Odrůda Red River 68, se silnými mísícími vlastnostmi, měla srovnatelně velký podíl svého celkové bílkoviny v A3. Odrůdy Bankuti 1201 a Omar, se slabými mísícími vlastnostmi, měly poměrně malé podíly svého proteinu v A3, ale velké podíly v A4 (převážně gliadiny)^[24].

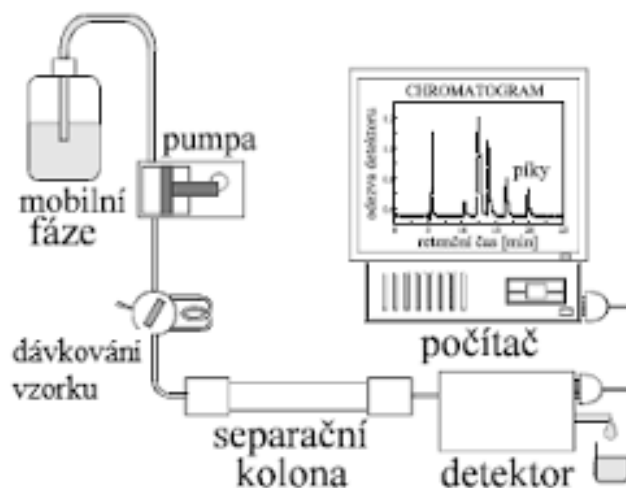
Odrůda Atlas 66 měla poměrně velký podíl bílkovin v A5 (převážně albuminy) a menší podíl v A4, ale nebyly zde žádné výrazné rozdíly ve vzoru, které by mohly jasně souviset s vysokobílkovinným charakterem Atlasu 66. Všechny odrůdy měly většinu bílkovin (65–69 %) v rozsazích molekulových hmotností A3 a A4^[24].

2.2.3 RP-HPLC

Chromatografie je separační technika, která se používá v chemické analýze. Metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) (viz obr. 8) se analyty oddělují průchodem přes kolonu naplněnou částicemi o velikosti mikrometrů. V současnosti je nejběžněji používanou separační technikou HPLC v systému s obrácenými fázemi. Důvody pro to zahrnují jednoduchost, všestrannost a rozsah metody, protože je schopna zpracovat sloučeniny různé polarity a molekulové hmotnosti. RP-HPLC našla jak analytické, tak preparativní aplikace v oblasti biochemické separace a purifikace^[25].

Molekuly, které mají určitý stupeň hydrofobního charakteru, jako jsou bílkoviny, peptidy a nukleové kyseliny, lze oddělit chromatografií s obrácenými fázemi s vynikajícím výtěžkem a rozlišením^[25,26]. Mechanismus chromatografie s obrácenými fázemi závisí na hydrofobní vazbě, tj. na interakci mezi molekulou rozpuštěné látky v mobilní fázi a imobilizovaným hydrofobním ligandem, tj. stacionární fází. Použité počáteční vazebné podmínky v mobilní fázi při RP-HPLC fázemi jsou především vodné, což svědčí o vysokém stupni organizovanosti vody, která obklopuje molekulu rozpuštěné látky a imobilizovaného ligandu. Jak se rozpuštěná látka váže na imobilizovaný hydrofobní ligand, hydrofobní oblast vystavená rozpouštědлу se minimalizuje. Proto se stupeň uspořádané struktury vody zmenšuje s odpovídajícím příznivým zvýšením entropie systému. Tímto způsobem je z energetického hlediska výhodnější pro hydrofobní složky ligandu, aby se asociovaly^[26].

Předpokládá se, že voda přiléhající k hydrofobním oblastem je uspořádanější než voda ve větším množství. Část této „strukturované“ vody je vytěsněna, což vede ke zvýšení objemu vody v hydrofobních oblastech. Separace v chromatografii s obrácenými fázemi závisí na reverzibilní absorpci/desorpci molekul rozpuštěné látky s různým stupněm hydrofobicity k hydrofobní stacionární fázi^[26].



Obrázek 8: Schéma HPLC^[27]

Pro aplikaci techniky HPLC s obrácenými fázemi a jasné pro kvalitativní a kvantitativní analýzu bílkovinných složek ve směsi mouky na úrovni polypeptidů byla vyvinuta metoda stanovení podílů specifických polypeptidů gliadinu a gluteninu. Výsledky ukázaly, že tato metoda je užitečná při studiích nelinearity vlastností těsta ze směsí vyrobených z pšenice před mletím ve srovnání se směsmi mouky vyrobenými po mletí. Krok mletí způsobil určitý stupeň odchylky od lineárního chování v důsledku různých podílů původních obilných proteinů, které vedly k moučným směsím^[28].

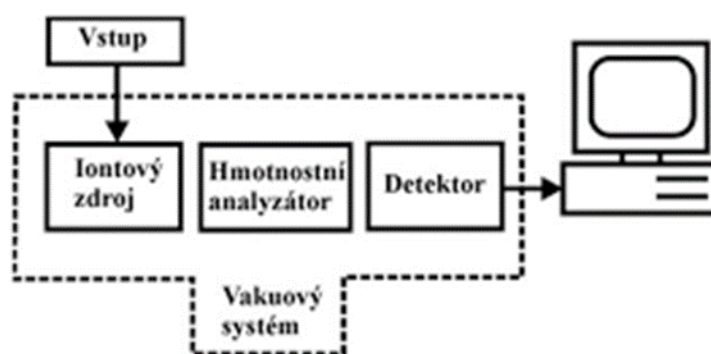
V další studii se zkoumaly disulfidové vazby v pšeničném lepku. Glutenin byl připraven z lepku pšenice odrůdy Rektor extrakcí gliadinu vodným ethanolem. Byl postupně štěpen na rozpustné peptidy enzymy trypsinem a thermolysinem. Separace peptidových směsí byla provedena gelovou permeační chromatografií (GPC) na Sephadexu G25 (gelová filtrační pryskyřice) a RP-HPLC na koloně ODS-Hypersil aplikaci. Cystinové peptidy byly detekovány diferenciální chromatografií vzorků před a po redukci. Po izolaci vícestupňovou RP-HPLC byly cystinové peptidy redukovány. Výsledné cysteinové peptidy byly alkylovány 4-vinylpyridinem, separovány pomocí RP-HPLC a sekvenovány pomocí Edmanovy degradace^[29] (metoda sekvenování proteinů, určení sekvence aminokyselin v rámci jejich polypeptidového řetězce)^[30].

Izolované cysteinové peptidy představovaly značnou část celkového cysteinu v gluteninu: čtyři ze sedmi cysteinových zbytků HMW podjednotek, a osm z devíti cysteinových zbytků LMW podjednotek je dokumentováno alespoň jedním cysteinovým peptidem. Většina peptidů odpovídala známým sekvencím složek glutenové bílkoviny. Ze struktur některých tryptických peptidů byly prokázány inter- a intramolekulární disulfidické vazby pro HMW podjednotky

gluteninu. Cysteinové peptidy z termolytického štěpení byly přiřazeny k LMW podjednotkám gluteninu a γ -gliadinům. Jiné peptidy úzce souvisely s dílčími sekvencemi těchto bílkovinných složek. Výsledky umožnily několik závěrů o uspořádání intra- a intermolekulárních disulfidových můstků v glutenových bílkovinách. Ze struktur některých tryptických peptidů byly prokázány inter- a intramolekulární disulfidické vazby pro HMW podjednotky gluteninu. Cysteinové peptidy z termolytického štěpení byly přiřazeny k LMW podjednotkám gluteninu a γ -gliadinům. Jiné peptidy úzce souvisely s dílčími sekvencemi těchto bílkovinných složek^[29].

2.2.4 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) (viz obr. 9) je nepostradatelným nástrojem analýzy biologických a syntetických polymerů, nejvíce se však uplatňuje v proteomice při analýzách peptidů a bílkovin. Pro analýzu složitějších směsí přispívá off-line spojení se separačními metodami, například s gelovou elektroforézou nebo kapalinovou chromatografií. Jedná se o citlivou analytickou techniku s detekčními limity řádově i desetin femtomolů^[31].

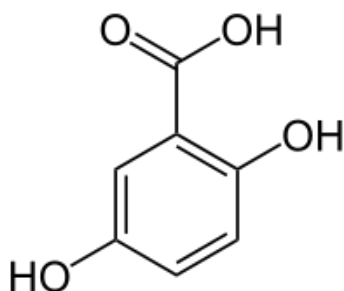


Obrázek 9: Schéma MALDI-TOF MS^[33]

Tuto techniku lze například využít i v klinické diagnostické mikrobiologii, kde umožňuje přesnou identifikaci na druhové úrovni většiny grampozitivních a gramnegativních bakteriálních kmenů, které vyžadují větší pozornost a další vývoj metody^[32]. Metodu lze aplikovat při určování molekulových hmotností biomolekul, monitorování bioreakcí, studiu prostorového uspořádání a posttranslačních modifikací bílkovin, sekvenování peptidů a oligonukleotidů. Využívá šetrné ionizační techniky, což znamená, že biomolekuly nejsou štěpeny, ale pouze ionizovány pomocí matrice, obvykle v pozitivním módu (analyzovány jsou kationty). Obecně se ionizují netěkavé složky biologického materiálu, tedy fragmenty DNA, RNA, lipidy a bílkoviny. Generovat ionty látek s vyšší molekulovou hmotností je možné

s využitím ionizace vzorku laserem za přítomnosti matrice. Technika MALDI využívá nejčastěji dusíkové UV lasery (trvání pulzu 4 ns o vlnové délce 337 nm), méně pak IR lasery. Excitované molekuly matrice ionizují molekuly analytu přenosem protonu. K extrakci iontů z iontového zdroje do hmotnostního analyzátoru TOF (time of flight) dochází pomocí extrakčních mřížek s vysokým napětím. Průletový analyzátor TOF je podle fyzikálních principů separace iontů řazen do skupiny separující ionty dle různé doby letu. Všechny ionty obdrží stejnou kinetickou energii, ionty s menší hodnotou m/z se pak pohybují k detektoru rychleji. K formování molekulových iontů dochází i u molekul s molekulovou hmotností až 10^6 Da a více^[31].

Volba matrice je klíčovým faktorem analýzy. Jako vhodné matrice pro UV lasery jsou používány aromatické karboxylové kyseliny, většinou deriváty kyseliny benzoové rozpuštěné ve vodě a vhodném rozpouštědle. Vhodnými matricemi jsou kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA), 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (sinapová, SA), dihydroxybenzoová (gentisová, DHB) (viz. obr. 10) nebo 4-hydroxy-3-methoxyskořicová (ferulová, FA). Pro gramnegativní bakterie a archea je nejčastěji používaná matrice α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina, pro grampozitivní bakterie 5-chlor-2-merkaptobenzothiazol. Odlišná povaha jednotlivých matricí způsobuje odlišnou krystalizaci a ionizaci látek dle jejich molekulových hmotností. CHCA například ionizuje hlavně peptidy a SA vykazuje dobrou schopnost ionizace v oblasti nižších molekulových hmotností bílkovin a polymerů. Pro vysokomolekulární látky se využívá DHB v roztoku voda:acetonitril 4:1. Vody je zde větší množství, vzorek tak zasychá pomaleji a správně krystalizuje. DHB dobře ionizuje peptidy, bílkoviny, lipidy, nukleové kyseliny a sacharidy, je proto považována za univerzální matrici^[31].



Obrázek 10: Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB)^[34]

Pro úpravu pH slouží kyselina trifluoroctová nebo kyselina mravenčí. Okyselení se provádí pro zvýšení kvality signálu. Roztoky kyselin jsou k analyzované směsi přidávány buď přímo na destičce, nebo se jimi nahrazuje voda při rozpuštění matrice a vzorku. Matrice se volí tak, aby tvořila během schnutí směsné krystaly s analytem a vzniklé krystaly měly co nejmenší velikost a tvořily na destičce souvislý film. Tato vlastnost není předvídatelná, zjišťuje se empiricky. Nestejnorodá krystalizace komplikuje zacílení laseru při získávání dat. Výhodou je možnost „konzervace“ vzorku v krystalech matrice po nanesení na destičku. Analýza nemusí být provedena hned po nanesení vzorku^[31].

Matrice by se měla rozpouštět ve stejném rozpouštědle jako vzorek, aby se molekuly ze vzorku správně začlenily do krystalů matrice. Matrice musí absorbovat vlnovou délku laseru a neměla by reagovat se vzorkem. Za působení laserového pulzu musí být matrice fotostabilní. Nejčastějšími využívanými rozpouštědly jsou aceton a acetonitril ve směsi s vodou. Rozpouštědlo musí být mísitelné s rozpouštědlem matrice a musí mít vhodně povrchové napětí, aby došlo ke správnému rozlití kapky na destičce. Vysoké povrchové napětí a kruhové kapky vykazují směsi rozpouštědel s vysokým podílem vody^[31].

Destičky jsou vyráběny s vysokou přesností obvykle z nerezové oceli nebo hliníku (viz obr. 11). Ocel i hliník jsou vůči matrici a rozpouštědlům inertní. Destičky musí být snadno čistitelné do hladkého povrchu a před analýzou musí být zbaveny nečistot a prachu^[31].



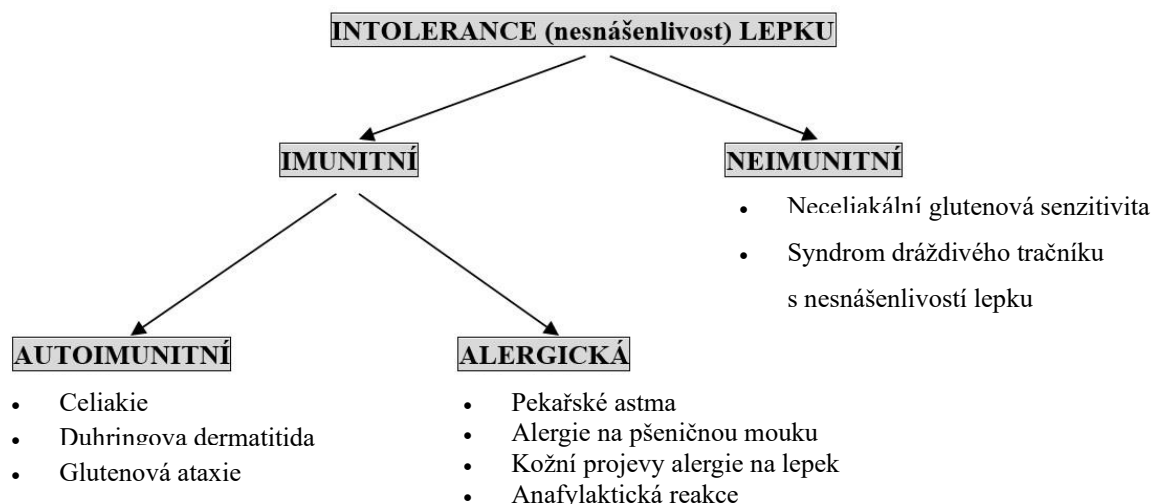
Obrázek 11: Destička MALDI pro 96 vzorků^[35]

Pomocí této metody bylo provedeno stanovení lepku v glukózových sirupech. Deset vybraných vzorků glukózových sirupů (4 sirupy na bázi pšenice a 6 sirupů na bázi kukuřice) bylo analyzováno za účelem zjištění, zda vzorky obsahují bílkoviny lepku (nebo jejich fragmenty) nebo nikoliv. Jako standardy pro případné srovnání se vzorky glukózových sirupů sloužily dva vzorky pšeničných extraktů. Na základě MS analýzy nebyly v měřených vzorcích glukózového sirupu nalezeny žádné proteiny ani jejich fragmenty. Kromě toho byla provedena i SDS-PAGE, ale touto metodou však nebyly detekovány žádné proteiny. Z tohoto stanovení bylo zjištěno, že pacienti trpící onemocněním celiakie se nemusí vyhýbat glukózovým sirupům, protože hodnoty se pohybovaly pod povolenou hranicí lepku v bezlepkových potravinách (20 mg/kg)^[36].

3 Zdravotní obtíže související s lepkem

V posledních letech se zvýšila prevalence širokého spektra poruch souvisejících s lepkem. To lze přičíst změnám v globálních stravovacích návycích. V mnoha zemích dochází k postupné westernizaci stravy a také k celosvětovému rozšíření středomořské stravy, která je založena na velkém počtu potravin obsahujících lepek (včetně pšenice). Zejména konzumace pšenice postupně nahrazuje spotřebu rýže v mnoha zemích severní Afriky. Současné odrůdy pšenice mají navíc oproti minulosti vyšší obsah lepků v důsledku změn řízených jak technologickými, tak nutričními důvody^[37].

Choroby, které souvisejí s působením lepků, můžeme shrnout pod pojmem intolerance (nesnášenlivost) lepků. Ta může být podmíněna buď imunitními (autoimunitní nebo alergické), nebo neimunitními mechanismy (viz obr. 12)^[38].

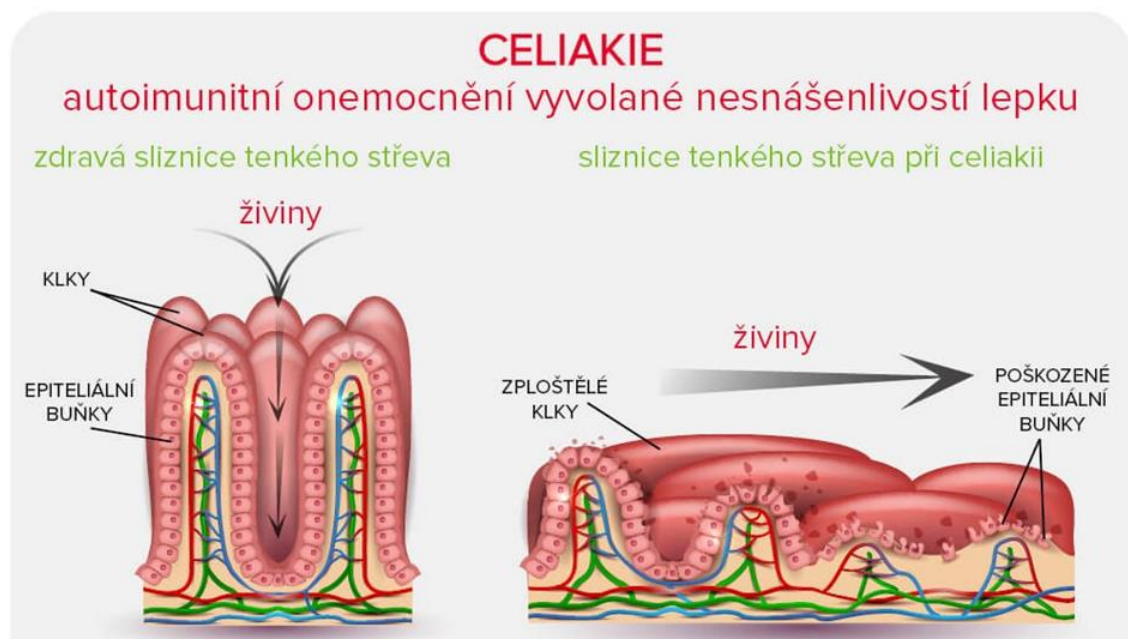


Obrázek 12: Rozdělení intolerancí (nesnášenlivostí) lepků^[38]

3.1 Celiakie

Celiakie je genetické onemocnění autoimunitní povahy (tj. způsobené nepřiměřenou imunitní reakcí organismu proti vlastním tkáním), při kterém konzumace lepků způsobuje poškození tenkého střeva. U pacientů s celiakií způsobuje lepek atrofii klků (výběžků střevní sliznice zodpovědných za vstřebávání živin) (viz obr. 13), což vede k malabsorpci, podvýživě a nedostatku živin v těle. Ke ztrátě tolerance lepků může dojít v jakémkoliv věku a spouštěčem může být infekce zažívacího traktu, léky nebo operace. Riziko vzniku onemocnění je vyšší u příbuzných 1. stupně s celiakií (5–10 %), diabetem 1. typu nebo jinými autoimunitními chorobami^[39].

Četnost celiakie se zvyšuje, což může souviset s prováděním testů v populaci se zvýšeným rizikem. V západních zemích se celiakie vyskytuje přibližně u 0,6 % populace. Ve více jak 70 % případů je celiakie diagnostikována ve věku >20 let, i když někteří z těchto pacientů mají příznaky již od dětství. Výskyt u žen je dvakrát vyšší než u mužů. Celiakie může začít náhle s výrazným nárůstem příznaků nebo se její příznaky mohou stupňovat postupně. Těhotenství, cestovatelský průjem, akutní gastroenteritida nebo operace trávicího traktu mohou projevy onemocnění urychlit. Od výskytu prvních příznaků do stanovení diagnózy může uplynout až 10 let^[39].



Obrázek 13: Porovnání zdravé a napadené sliznice tenkého střeva při celiakii^[42]

Existují čtyři formy celiakie, a to klasická celiakie, atypická celiakie, němá celiakie a latentní celiakie.

Klasická celiakie nejčastěji způsobuje:

- chronický tučný nebo vodnatý průjem (stolice je řídká, zapáchající a lesklá),
- úbytek hmotnosti u dospělých nebo nedostatečný přírůstek hmotnosti u dětí,
- bolest břicha, plynatost, zvětšený obvod břicha,
- zhoršený tělesný vývoj u dětí,
- různé příznaky spojené s poruchami vstřebávání mikroživin, makroživin a vitamínů (např. anémie z nedostatku železa),
- recidivující afty v ústech,
- zvracení,
- někdy i zácpa.

Klasická celiakie se nejčastěji vyskytuje u dětí, starších osob a těhotných žen. U dětí se příznaky celiakie objevují přibližně měsíc po zařazení mouky a dalších výrobků obsahujících lepek do stravy. U pacientů se s tímto klinickým obrazem překrývají břišní obtíže a příznaky související s malabsorpcí^[39].

Atypická celiakie způsobuje především příznaky svědčící o střevní malabsorpci, jako jsou:

- poruchy krvetvorby; anémie z nedostatku železa,
- kožní a slizniční léze (recidivující afty nebo zánět ústní sliznice),
- poruchy spojené s malabsorpcí vápníku (osteoporóza nebo patologické zlomeniny),
- poruchy hybnosti kloubů (artritida),
- neurologické a psychiatrické poruchy (deprese, epilepsie, ataxie a migréna).

Odhaduje se, že tento typ celiakie je asi sedmkrát častější než klasický typ, ale kvůli svým netypickým příznakům představuje velké diagnostické obtíže. Závažnost příznaků onemocnění může být vyvolána virovou nebo bakteriální infekcí, traumatem měkkých tkání (např. prodělanou operací) nebo těhotenstvím^[39].

Němá celiakie je celiakie, u které se nevyskytují žádné příznaky, ale je přítomna vilózní atrofie a v séru jsou přítomny specifické protilátky – autoprottilátky proti endomyziální nebo tkáňové transglutamináze^[39].

Latentní celiakie je celiakie, při níž mohou být střevní klky normální, ale v krvi jsou přítomny specifické protilátky – autoprottilátky proti endomyziální nebo tkáňové transglutamináze. U pacientů s touto formou celiakie je zvýšené riziko budoucí vilózní atrofie^[39].

3.1.1 Diagnostika celiakie

Diagnostika celiakie je založena na přítomnosti predisponujícího genetického faktoru lidského leukocytárního antigenu HLA DQ2 nebo HLA DQ8 s pozitivní biopsií a sérologickými protilátkami při dietě s lepkem^[40]. Ze vzorku krve se provádí stanovení aktivity specifických protilátek proti: endomysiu hladkého svalstva (eMA endomyziální protilátky), tkáňové transglutamináze (tTG) nebo deamidovaným gliadinovým peptidům (DGP). Ty by měly být prováděny u osob, jejichž strava obsahuje lepek. Takže pokud pacient z nějakého důvodu již dříve sám zahájil bezlepkovou dietu, výsledky nemusí být spolehlivé^[41].

Po odběru krve následuje vyšetření u gastroenterologa, který dokáže diagnózu potvrdit. S gastroenterologem se sjedná termín na biopsii tenkého střeva. Dva dny před zákrokem čeká

pacienta bezlepková dieta a v den vyšetření musí přijít na lačno. Samotné vyšetření se u dětí provádí pod narkózou a trvá cca 30 minut. U dospělých osob zpravidla stačí umrtvení a potlačení dávicího reflexu. Tenkou sondou je odebrán kousek sliznice tenkého střeva a poté je odeslán na rozbor. Na mikroskopickém rozboru se zjistí, zda je ve střevě přítomný zánět a tím může být určena správná diagnóza^[41].

3.1.2 Léčba celiakie

Léčbou první volby je bezlepková dieta. Pouze úplné a přísné vynechání potravin s obsahem lepku vede k úplnému vyhojení sliznice střeva, ústupů projevů celiakie a minimalizaci jejich komplikací. Výjimečně je léčena medikamenty^[43]. Dieta vyžaduje průběžnou edukaci pacientů a jejich rodin ze strany lékařů a dietologů. Regionální podpůrné skupiny celiaků jsou zdroji informací a podpory^[44].

3.2 Duhringova dermatitida

Duhringova dermatitida (Duhringův syndrom, Dermatitis herpetiformis - DH) je kožní projev nesnášenlivosti lepku a je vzácnější než celiakie. Na různých částech těla vznikají svědivé puchýřky podobné oparům. Ty se zejména objevují na vnější straně loktů (viz obr. 14) a na kolenou. Na sliznici tenkého střeva bývají změny charakteristické pro celiakii, střevo nemusí být poškozené plošně, ale pouze ostrůvkovitě. Duhringova dermatitida se může objevit, podobně jako celiakie, kdykoliv během života. Bezlepková dieta je základní terapií, ale odezva organismu na dietu může být mnohem pomalejší než u celiakie^[45].



Obrázek 14: Duhringova dermatitida^[46]

Patogeneze této nemoci je podobná jako u onemocnění celiakie, protože jsou obě komplexní a zahrnují interakce mezi genetickými, imunologickými a environmentální faktory. Zatímco u celiakie je hlavním autoantigenem tkáňová transglutamináza (TG2/tTG) u Duhringovy dermatitidy je hlavním autoantigenem epidermální transglutamináza (TG3/eTG)^[47].

Diagnóza je založena na konzistentním klinickém obrazu spojeném se sérologií, imunofluorescencí a histopatologií. Zlatým standardem pro diagnostiku zůstává přímá imunofluorescence (DIF), ale histopatologické a sérologické testy se používají jako doplněk k další diagnostice^[47].

3.2.1 Sérologie

Různé sérologické testy mohou být použity jako doplněk pro diagnostiku DH v nejednoznačných případech. Většina využívá detekci autoprotilátek, z nichž se mnohé využívají i při diagnostice celiakie. Používá se imunisorbentní test (ELISA) na IgA protilátky proti TG3. Senzitivita tohoto testu se uvádí mezi 52 a 100 %. Detekce protilátek proti TG3 je při diagnostice DH citlivější než detekce protilátek proti TG2 a endomysialním protilátkám. Protilátky anti-TG3 jsou také specifičtější pro DH ve srovnání s celiakií s uváděnou specificitou mezi 90 a 100 %. Hladiny protilátek proti TG3 se mohou odlišit neléčenou DH od jiných kožních svědivých onemocnění^[47].

3.2.2 Přímá imunofluorescence

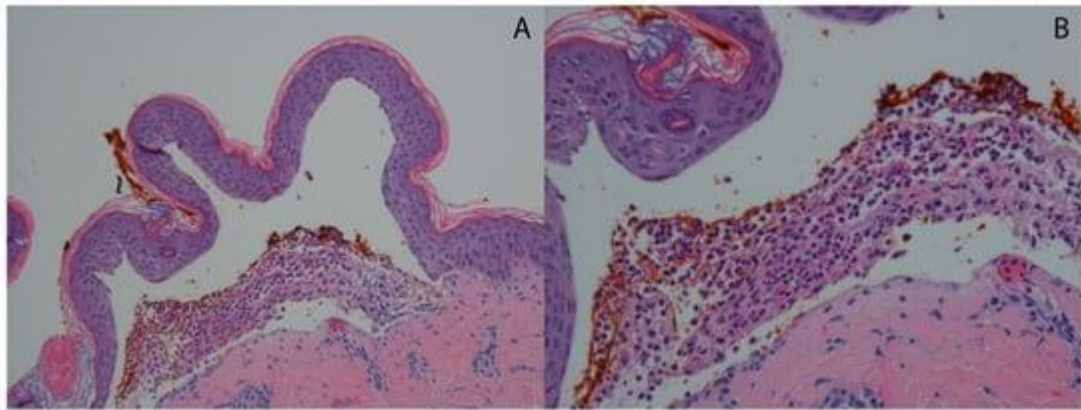
Přímá imunofluorescence (DIF) je zlatým standardem pro diagnostiku DH se senzitivitou 90–95 % a specificitou 95–100 %^[47]. Jedná se o semikvantitativní vyšetřovací metodu, při které se pomocí fluorescenčního mikroskopu detekují cirkulující autoprotilátky v bioptickém materiálu. Přímá imunofluorescence je užitečná v případech s negativní sérologií, nediagnostickými histologickými nálezy nebo jizevnatou alopecii^[48].

Biopsie by měla být provedena z nepostižené perilezionální tkáně, protože léze obsahuje významně větší počet depozit IgA a biopsie z lézí mají obecně vyšší výskyt falešně negativních výsledků. Pokud má pacient s vysokým klinickým podezřením na DH negativní výsledek DIF, měli by lékaři zvážit opakování vyšetření s biopsií z nového místa normálně vypadající perilezionální tkáně. Falešně negativní výsledky se vyskytují asi u 5 % biopsií^[47].

3.2.3 Histopatologie

Histopatologické vyšetření představuje vyšetřovací metodu umožňující definitivní stanovení diagnózy, případně rozsahu nádorového onemocnění. Podezřelá tkáň získaná pomocí biopsie nebo v průběhu operace je po speciální přípravě vyšetřena lékařem – patologem. Ve většině případů lze určit, zda se jedná o nádor, respektive o jaký typ nádoru jde^[49].

Pro barvení hematoxylinem a eosinem je preferována biopsie kůže z lézí celého neporušeného vezikula (viz obr. 15). Pokud nelze nalézt žádné intaktní vezikuly, měla by být odebrána z intaktní, zčervenale kůže. Typickým histopatologickým nálezem DH jsou subepidermální vezikuly a puchýře s akumulací neutrofilů na špičkách dermálních papil (papilární mikroabscesy) s relativním zachováním spodních špiček^[47].



Obrázek 15: A) Vzorek obarvený hematoxylinem a eosinem vykazující subepidermální separaci. B) Vzorek obarvený hematoxylinem a eosinem ukazující hustou akumulaci neutrofilů v papilární dermis tvořící mikroabsces^[47]

3.3 Glutenová ataxie

Pojem poruchy související s lepkem (gluten related disorders - GRD) označuje spektrum různých klinických projevů spouštěných požitím lepku u geneticky náchylných jedinců. Zahrnují jak střevní, tak extraintestinální projevy. Glutenová ataxie (GA) je jedním z nejčastějších neurologických projevů GRD. Původně byla definována jako idiopatická sporadická ataxie v přítomnosti cirkulujících antigliadinových protilátek typu IgA a IgG^[50].

Objeví se porucha plynulých pohybů, problémy s udržením rovnováhy a třes celého těla. Lepek ovlivňuje fungování části mozku nazývané mozeček. Nemocný často padá na zem, ztrácí pocit rovnováhy a koordinaci pohybů. Projevit se také může porucha paměti a mluvy, porucha očních pohybů (nystagmus), snížené svalové napětí a oslabení svalové síly. Bohužel, pokud pacient přijde do ordinace neurologa, zpravidla uslyší, že jeho potíže mají idiopatický původ (bez známé příčiny)^[51].

Glutenová ataxie se časem projeví v kombinaci s myokloniemi, krátce trvajících mimovolnými záškuby svalů, tzv. tiky, třesem patra, třesem víček nebo choreou (mimovolné chaotické záškuby končetin). U 80 % pacientů s dysfunkcí mozku je potvrzený astigmatismus. Glutenová ataxie se nejčastěji projeví kolem 50. roku života. Bylo pozorováno, že pouze u necelých 10 % nemocných s diagnózou glutenová ataxie byly pozorovány symptomy v trávicí soustavě a poškození klků střevní sliznice bylo pozorováno jen u 30 % z nich. Převažují protilátky proti tkáňové transglutamináze, méně často protilátky proti endomysiu. Vzhledem k tomu, že velká část pacientů produkuje protilátky proti gliadinu (AGA), častěji se očekává nález ve třídě IgG než v IgA^[51].

3.3.1 Diagnostika glutenové ataxie

Diagnostika glutenové ataxie zahrnuje použití specifických krevních testů celiakie, avšak ne testy, které jsou považovány za nejpřesnější při vyšetření celiakie. Pokud některý z těchto testů prokáže pozitivní výsledek, lékař by měl předepsat bezlepkovou dietu^[52]. K diagnostice lze použít magnetickou rezonanci^[52,57].

3.3.2 Léčba glutenové ataxie

Pacienti, kteří mají diagnostikovanou glutenovou ataxii, musí dodržovat velmi přísnou bezlepkovou dietu bez absolutního podvádění. Neurologické příznaky vyvolané pohlcením lepku se velmi zdlouhavě zlepšují ve srovnání s gastrointestinálními příznaky. Proto je možné, že by si pacienti mohli více uškodit, pokud by i nadále konzumovali malé množství lepku^[52].

3.4 Alergie na lepek

Alergie na lepek (pšenici) představuje další typ nepříznivé imunologické reakce na proteiny obsažené v pšenici a příbuzných zrnech s různými klinickými projevy v závislosti na způsobu expozice. V tomto případě zprostředkovávají protilátky proti imunoglobulinu E (IgE) zánětlivou odpověď na několik alergenních proteinů^[53].

V závislosti na způsobu expozice alergenu se alergie na pšenici dělí na profesionální astma (pekařovo astma) a rýmu, potravinové alergie postihující kůži, gastrointestinální nebo dýchací trakt, anafylaxi vyvolanou cvičením a kontaktní kopřivku. Požitá pšenice může vyvolat alergii na pšenici zprostředkovanou IgE u dětí i dospělých. Přestože senzibilizace na pšenici hodnocená pomocí sérového IgE je častější než u dospělých, alergie na pšenici vykazuje vyšší prevalenci u dětí. Většina dětí alergických na pšenici trpí středně těžkou až těžkou atopickou dermatitidou a požití pšenice může vyvolat typické reakce zprostředkované IgE, včetně kopřivky, angioedému, bronchiální obstrukce, nevolnosti a bolesti břicha nebo v těžkých případech systémové anafylaxe^[53].

Pekařské astma a rýma, známé již z dob Římské říše, jsou dobře charakterizovanými alergickými reakcemi na inhalaci pšeničné mouky, které postihují až 10–15 % pekařů, mlynářů a pracovníků v továrnách na pečivo. U některých pacientů se symptomy mohou rozvinout také

po konzumaci jídel kontaminovaných tepelně neupravenou pšeničnou moukou, jinak po požití vařené pšenice nejsou obvykle hlášeny žádné problémy^[53].

3.4.1 Diagnóza alergie na lepek

Diagnóza alergie na lepek (pšenici) je založena klasicky na kožních prick testech (SPT) (viz obrázek 16), *in vitro* specifických imunoglobulinových E (sIgE) testech a funkčních testech. SPT a sIgE *in vitro* testy jsou první úrovní diagnostiky alergie na lepek. Jsou však ovlivněny nízkou prediktivní hodnotou. Zejména jejich nízkou citlivost lze vysvětlit skutečností, že komerční testovací činidla jsou směsi ve vodě/soli rozpustných pšeničných proteinů, kterým chybí alergeny z nerozpustné lepkové frakce. *In vitro* sIgE testy jsou citlivější (asi 75–80 %) než SPT, ale méně specifické (asi 60 %). Diagnostika alergie na molekulární bázi by mohla překonat některá omezení sIgE *in vitro* testů s použitím extraktů pšeničné mouky^[53].



Obrázek 16: Kožní prick test (SPT)^[54]

3.4.2 Léčba alergie na lepek

Jedinou vhodnou léčbou alergie na lepek je vynechání nebo omezení jejího spouštěče, tím je v tomto případě lepek. Množství, které imunitní reakci spouští je u každého jedince individuální. Zatímco někomu stačí lepek pouze omezit, jiní nesnesou ani jeho stopy, které se v některých potravinách nachází. Jako podpůrnou léčbu lze užívat antihistaminika, která příznaky alergické reakce mírní. Toleranci organismu může také zvýšit alergenová vakcinace^[55].

4 Bezlepková výživa

V bezlepkové dietě je snaha o maximální omezení lepku ve stravě jedince. Lepek, respektive bílkoviny lepku, které vznikají jeho štěpením, jsou obsaženy v běžných potravinách (pšenici, ječmeni, žitu a ovsu). Proto je v případě nesnášenlivosti důležité z jídelníčku vyloučit všechny výrobky z obilovin, které lepek obsahují. Bezlepková dieta může být jak plnohodnotná, tak i pestrá. Základem bezlepkové diety jsou přirozeně bezlepkové potraviny, a dále obiloviny, které neobsahují lepek, nebo výrobky z bezlepkových surovin označené jako bezlepkový výrobek^[56].

Mezi bezlepkové obiloviny patří kukuřice, rýže, proso (jáhly) a pseudoobiloviny (pohanka, amarant a quinoa). Další možnosti jsou luštěniny – sója, hrách, čočka, fazole aj. Patří sem nepochybně i zelenina a ovoce, včetně brambor. Přirozeně bezlepková potravina je i maso. I uzeniny s vysokým podílem masa často obsahují pšeničnou mouku nebo modifikovaný škrob jako plnivo. Mléko, máslo a smetana jsou bezlepkové, u ostatních mléčných výrobků záleží na přidaných látkách, jako jsou zahušňovačla, emulgátory nebo plnidla. Někdy bývá mléko hůře tolerováno, záleží na aktuálním poškození střevní sliznice a vzniku laktóзовé intolerance, stejně tak dochucovačla, jako jsou sójová omáčka nebo kečup. Při nakupování bezlepkového pečiva je třeba sledovat označení výrobku (viz obr. 17)^[56]!



Obrázek 17: Symboly označení bezlepkových potravin^[61]

Mezi nepřijatelné potraviny patří:

- **pšenice** – pšeničné mouky všech druhů (bílé i celozrnné), pšeničná krupice, trhaná, krupky a pšeničné vločky i ve směsích zrno-pšenice,
- **ječmen** – ječná mouka, kroupy, krupky, lámanka, ječné vločky i ve směsích, zrno ječmene, ječný slad, sladěnka a další sladové výtažky,
- **oves** – ovesná mouka, ovesné vločky i ve směsích a oves bezpluchý nebo loupaný,
- **žito** – žitná mouka chlebová, celozrnná, žitné vločky i ve směsích, zrno žita a žitovce a žito pražené na kávu,
- **seitan, klaso a ROBI** – vegetariánský bílkovinný pokrm vyrobený z obilí – obsahuje mnoho lepku,
- **pečivo a chléb** – zakázáno je veškeré kupované pečivo a chléb, pokud není označeno jako bezlepkové,
- **sušená a instantní káva** – obsahují výtažky z obilí, vyjma kvalitních značkových káv,
- **kávoviny, Malcao, Bikava, Caro, Melta** – obsahují sladové výtažky,
- **alkohol** – obecně se nedoporučuje, destiláty a pivo jsou zakázané, pokud nejsou označeny jako bezlepkové (platí hlavně u piva),
- **kečup** – pokud není označen jako bezlepkový,
- **cukrovinky** – všechny plněné čokolády a tyčinky, nugátové bonbony a tyčinky, karamely a sladové bonbony, fondánové cukroví a furé, zmrzlina všeho druhu (polárkové dorty, nanuky) – pokud nejsou označeny jako bezlepkové,
- **náhražky masa z obilovin,**
- **puddinky a krémy** – kupované puddinky a krémy, nugeta a podobné čokoládové krémy^[56].

Jako zástupce firem zabývajících se bezlepkovými potravinami lze uvést firmu POEX Velké Meziříčí sídlící ve Velkém Meziříčí a firmu Nominal sídlící nedaleko Velkého Meziříčí. Firma POEX se od svého vzniku zabývá především výrobou extrudovaných snacksů a cereálních výrobků, balením suchých plodů, dražováním, ale také výrobou bezlepkových výrobků. Obchodní aktivity jsou zaměřeny především na velké obchodní řetězce, na maloobchodní prodej a v neposlední řadě na výrobní spolupráci s významnými výrobci potravin v České republice^[63].

Z bezlepkových potravin firma POEX nabízí různé instantní kaše, kroužky s ovocnou příchutí, kakaové peřinky s čokoládovou a vanilkovou příchutí, kuličky do polévky a extrudované křupky bez příchutě nebo s jahodovou a nově i s meruňkovou příchutí, více známé s nápisem Bimbo (viz obr. 18)^[63].



Obrázek 18: Extrudované křupky Bimbo s jahodovou příchutí^[63]

Firma Nominal, která patří mezi průkopníky ve výrobě bezlepkových potravin v ČR. Jejich produkty používají lidé nejen se zdravotním omezením, ale také ti, kteří nechtějí svůj organismus zbytečně zatěžovat. Firma nabízí různé cereální kaše (pohankové, špaldové, jáhlové, rýžové a čirokové), směsi na chleba (viz obr. 19), mouky a těsta, hrníčkové dortíky (čokoládové, stracciatella, perníkový a citronový) a oleje lisované za studena (lněný, makový a řepkový)^[64].



Obrázek 19: Směs na chléb s chia semínky^[65]

Firma Nominal nabízí na svých webových stránkách bezlepkové recepty, které se mohou hodit pro celiaky, kteří tápou a neví co si mají připravit na jídlo. Z hlavních jídel zde lze najít bramborové knedlíky, těsto, noky s různými přílohami (zelí, žampiony, tuňák apod.), lívance, pizzu a slané koláče. Z dezertů tu jsou vafle, velikonoční beránek, mrkvový dort, kokosové rohlíčky, srdíčka a například koblížky a vdolky. Jako třetí položku zde lze nalézt domácí pečivo – chléb, velikonoční pečivo, bulky, housky a makové krekry^[65].

4.1 Školní bezlepková strava

Ve školním zařízení se většinou nerozlišuje, zda bezlepkově stravovaný žák potřebuje dietu z důvodu intolerance lepku, alergie na lepek nebo kvůli celiakii, protože všechny tyto obtíže znamenají pro školní jídelnu přípravu bezlepkové diety. Pro školní kuchyni je nejbezpečnější připravovat co nejpřísnější dietu, ať se jedná o kteroukoli reakci na lepek, protože žák s méně závažnou formou onemocnění může konzumovat ostatní jemu povolené potraviny mimo školní jídelnu, a žák s přísnější formou diety bude mít stále jistotu, že by u něj po školním obědě neměly nastat žádné obtíže. Toto řešení je ideální hlavně v případě, že možnost školního bezlepkového stravování využívá více dětí s odlišným typem onemocnění^[62].

4.2 Principy bezlepkové diety

Základním principem bezlepkové diety je zobecnit technologickou úpravu pokrmů. Vaření a pečení se v bezlepkové kuchyni v podstatě neliší od běžné kuchyně. Mohou se i nadále používat stejné recepty a postupy, jen je nutné vyloučit veškeré zdroje lepku, tzn. kontrolovat všechny používané suroviny. Dovoleny jsou všechny tepelné úpravy pokrmů, které u pacienta nevyvolávají zažívací potíže. Upřednostňují se lehčí úpravy – vaření, dušení, pečení, zapékání, příprava v alobalu nebo ve fólii, příprava v páře, v mikrovlnné troubě, na grilu bez zbytečného tuku, méně vhodné je smažení a fritování. Vyžaduje-li to strávnickův stav, omezují se potraviny zanechávající nestravitelné zbytky. Nelze-li docílit úplného změknutí (např. zeleniny), je lepší ji raději rozmixovat nebo pasírovat. Technologická úprava je obdobná. Stravu je třeba upravit tak, aby co nejméně dráždila chemicky i mechanicky trávicí trakt. Všechny pokrmy se upravují dostatečně dlouho^[56].

V případě, že bychom chtěli zahušťovat bramborovým škrobem (Solamyl), rýžovou nebo kukuřičnou moukou a dalšími vhodnými prostředky. Dále se může použít strouhané syrové brambory, prolisovanou zeleninu nebo uvařené luštěniny. Bezlepková mouka se hůře zpracovává, méně lepí, a proto je třeba zpravidla přidat do těsta více vody, vajec, oleje apod^[56].

4.3 Hlavní benefity bezlepkové výživy

Pokud člověk žádným onemocněním netrpí, není důvod pečivo ani lepek ze stravy vylučovat. Potenciální benefity dodržování bezlepkové stravy zdravým lidem přinést může. V první řadě je to fakt, že se člověk zamyslí nad svým jídelníčkem. Často se stává, že díky dietě zařadí nové potraviny, omezí některé z méně vhodných potravin a efekt, ať už v podobě zhubnutých kilogramů nebo zdravotních benefitů, se dostaví. A tento efekt v důsledku celkové změny jídelníčku je pak mylně přisuzován vyřazení lepku^[58].

Při bezlepkové dietě se člověk také pravděpodobně vyhne stereotypu, kdy konzumuje pečivo ke snídani, pečivo na svačinu, oběd si dá v lepším případě bez pečiva, následuje po něm ale káva s koláčem a den zakončí pečivem k večeři. Takto poskládaný jídelníček už je hodně jednotvárný a není v České republice určitě nějakou vzácností. Bezlepková dieta tomuto stereotypu pravděpodobně zabrání, pokud ovšem není klasické pečivo pouze nahrazené bezlepkovým a jídelníček bude pořád stejně monotónní. Kladně lze také hodnotit fakt, že při bezlepkové stravě člověk omezí sladké pečivo a všechny možné sušenky, oplatky a další na cukr a tuk bohaté výrobky^[58].

4.4 Rizika a nevýhody bezlepkové výživy

Při dodržování bezlepkové stravy se člověk ochuzuje o mnoho kvalitních potravin, jako jsou například celozrnné pečivo, žitný chléb, ovesné vločky atd., které mimo jiné přináší i značné množství vlákniny. V extrémních případech by také mohlo dojít k nedostatku některých vitamínů, zejména ze skupiny B. Chybět ve stravě mohou při nevhodně sestaveném jídelníčku sacharidy, které jsou důležitým zdrojem energie^[58].

Co se ještě nevýhod týče, bezlepkové potraviny jsou obecně dražší než běžné potraviny obsahující lepek. K další komplikaci může dojít při stravování v restauracích či rozhodování v obchodě, kterou potravinu do košíku vložit a kterou nikoli. Zásadním negativem bezlepkové diety může být případ, kdy ji člověk dodržuje, aniž by měl diagnostikovanou celiakii. Pokud pak dojde k tomu, že se toto onemocnění u něj rozvine, není možné díky nepřítomnosti protilátek onemocnění diagnostikovat a stanovit tak správnou léčbu^[58].

Bezlepková dieta je omezující zejména při stravování mimo domov, protože podniky nejsou schopny garantovat dostupnost bezlepkové stravy. Naštěstí přišla společnost FTonline s. r. o. s projektem „Rekreace bez lepku“ (viz obr. 20) a vytvořila síť ubytovacích zařízení, která ve svých restauracích dokáží zajistit stravování pro celiaky^[59].

Z téměř 200 zájemců se do projektu zapojilo 51 hotelů, penzionů a rekreačních areálů, které jsou rozmístěny po celé České republice a nabízejí tak podmínky pro letní i zimní dovolenou. Jejich personál byl důkladně proškolen. Počítalo se s pravidelnými kontrolami, poradenstvím pro provozovatele a společným marketingem. Zaměřit se na gastroprovoz na přípravu jídel pro celiaky nepředstavovalo nutnost velkých investic, ale spíše zajistit informovanost personálu a dodržování pravidel při přípravě stravy^[59].

Vařit tzv. bezlepkově znamenalo odstranit z jídelníčku veškeré potraviny obsahující obiloviny, dávat pozor na potraviny, jejichž některé složky mohly být při výrobě lepkem kontaminovány (např. instantní polévky, salámy, sójové omáčky, sladkosti, zmrzlina, škrob a sladové přísady) a v kuchyni dodržovat bezpečnostní pravidla, jako jsou skladování bezlepkových potravin odděleně od ostatních, připravovat bezlepkovou stravu zvlášť, pečlivě omývat kuchyňské náčiní i plochy, aby na něm nebyly stopy po jídle s lepkem a další^[59].



Obrázek 20: Logo projektu Rekrece bez lepku^[60]

5 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo provést literární rešerši zaměřenou na lepek a popsat jeho význam v potravinářství. Úvodní část práce se věnuje popisu jednotlivých složek lepku (převážně lepkových bílkovin) a potravin, ve kterých se lepek vyskytuje. Největší obsah lepku se nachází v pšenici, protože při vymytí pšeničného těsta obsahuje sušina 75–85 % bílkovin a 10–15 % lipidů.

Dále se práce věnuje metodám analýzy jednotlivých složek lepku. Jako první je popsána neznámější imunologická metoda ELISA, která slouží ke stanovení různých antigenů nebo protilátek. Poté je zmíněna SDS-PAGE, která se používá k separaci komplexních směsí bílkovin. Jako zástupce separačních metod je popsána vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi, což je v dnešní době nejpoužívanější typ chromatografie. Poslední místo zaujímá MALDI-TOF MS, která se využívá v proteomice.

Třetí část bakalářské práce se zabývá obtížemi souvisejícími s lepkem, přičemž nejpodrobněji je popsána celiakie. Jedná se o neznámější a nejčastější onemocnění související s lepkem. Mezi další vybrané obtíže je zařazena Duhringova dermatitida, projevující se vznikajícími svědivými puchýřky. Dále pak glutenová ataxie, což je zástupce neurologických onemocnění související s lepkem a v neposlední řadě je zde zastoupena alergie na pšenici.

Poslední část se věnuje bezlepkové výživě, jejím hlavním benefitům a rizikům. Nejprve jsou zde vyjmenováni hlavní zástupci bezlepkových i nevhodných potravin pro lidi, kteří trpí některou z uvedených obtíží. Dále je popsán systém školního bezlepkového stravování, principy bezlepkové výživy, nakonec je zde zmíněn projekt „Rekreace bez lepku“, kde hotely, penziony a rekreační areály nabízí bezlepkové stravování.

Na závěr lze říci, že v dnešní době je velmi široký výběr bezlepkových potravin, což vede k minimalizaci omezení pro lidi trpící nějakým onemocněním souvisejícím s lepkem. Z toho vyplývá, že si i celiak může dovolit jíst téměř cokoliv, na co má chuť.

6 Seznam použité literatury

- [1] BIESIEKIERSKI, Jessica R. What is gluten? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2017, 32: 78–81.
- [2] WIESER, Herbert. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 2007, 24 (2): 115–119.
- [3] ZHANG, Mengli, JIA, Ruobing, MA, Meng, YANG, Tianbao, SUN, Qingjie, LI, Man. Versatile wheat gluten: functional properties and application in the food-related industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62 (1): 1–17.
- [4] BARAK, Sheweta; MUDGIL, Deepak; KHATKAR, B. S. Biochemical and functional properties of wheat gliadins: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, 55 (3): 357–368.
- [5] THEWISSEN, Bert G., CELUS, Inge, BRIJS, Kristof, DELCOUR, Jan A. Foaming properties of wheat gliadin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59 (4): 1370–1375.
- [6] Gliadins. *PubChem* [online]. Rockville Pike (Bethesda): National Library of Medicine [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gliadins>
- [7] SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G.; TATHAM, A. S. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science*, 1992, 15 (2): 105–120.
- [8] LINDSAY, Megan P.; SKERRITT, John H. The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure–function perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 1999, 10 (8): 247–253.
- [9] VERAVERBEKE, Wim S.; DELCOUR, Jan A. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2002, 42 (3): 179–208.
- [10] QAZANFARZADEH, Zeinab, KADIVAR, Mahdi, SHEKARCHIZADEH, Hajar, PORTA, Raffaele. Functional properties of rye prolamins (secalins) and their improvement by protein lipophilization through capric acid covalent binding. *Foods*, 2021, 10 (3): 515.

- [11] ZHAO, Jing; TIAN, Zhigang; CHEN, Lingyun. Effects of deamidation on structure and functional properties of barley hordein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58 (21): 11448–11455.
- [12] CHANPUT, Wasaporn; THEERAKULKAIT, Chockchai; NAKAI, Shuryo. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. *Journal of Cereal Science*, 2009, 49 (3): 422–428.
- [13] BOOSTANI, Sareh, HOSSEINI, Seyed Mohammad Hashem, GOLMAKANI, Mohammad-Taghi, MAREFATI, Ali, HADI, Nabilah Binti Abdul, RAYNER, Marilyn. The influence of emulsion parameters on physical stability and rheological properties of Pickering emulsions stabilized by hordein nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 2020, 101: 105520.
- [14] BAXTER, E. Denise. The use of hordein fractions to estimate proteolytic activity in barley and malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 1976, 82 (4): 203–208.
- [15] PELTONEN, Jari, RITA, Hannu, AIKASALO, Reino, HOME, Silja. Hordein and malting quality in northern barleys. *Hereditas*, 1994, 120 (3): 231–239.
- [16] SCHERF, Katharina Anne; POMS, Roland Ernest. Recent developments in analytical methods for tracing gluten. *Journal of Cereal Science*, 2016, 67: 112–122.
- [17] VLAS, Tomáš ed.; CIBULKA, Roman ed. Sborník prezentací - STUDENTSKÁ KONFERENCE 2020. 1. vyd. Plzeň: Západočeská univerzita v Plzni, 2021, s. 49. ISBN 978-80-261-0947-1.
- [18] BARTOŠ, Vladimír, Kristián ŠAFARČÍK, Marie KARLÍKOVÁ, Ondřej TOPOLČAN, Radek KUČERA a Jindra WINDRICHOVÁ. *Principy imunoanalytických metod pro medicínu* [online]. Plzeň, 2013 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://oid.fnplzen.cz/sites//users/oid/skripta%20Principy%20imunoanalytick%C3%BDch%20metod%20%282%29.pdf>. Skripta.
- [19] DIAZ-AMIGO, Carmen; POPPING, Bert. Accuracy of ELISA detection methods for gluten and reference materials: a realistic assessment. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2013, 61 (24): 5681–5688.
- [20] ELISA test. *Health Jade* [online]. 2019 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://healthjade.net/elisa-test/>

- [21] Freelite. *Binding Site* [online]. Birmingham (UK): The Binding Site Group, 2022 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://www.bindingsite.com/cs-cz/our-products/freelite-and-hevylite/freelite/laboratory-information/polyclonal-vs-monoclonal?disclaimer=1#>
- [22] GALLAGHER, Sean R. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 2012, 6 (1): 7.3.1–7.3. 28.
- [23] GARCÍA-DESCALZO, Laura, GARCÍA-LÓPEZ, Eva, ALCÁZAR, Alberto, BAQUERO, Fernando, CID, Cristina. Gel electrophoresis of proteins. *Gel Electrophoresis/Book*, 2012, 1: 57–68.
- [24] FULLINGTON, J. Garrin; COLE, Earl W.; KASARDA, Donald D. Quantitative SDS-PAGE of total protein from different wheat varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 1980, 31 (1): 43–53.
- [25] PRATHAP, B., AKALANKA, Dey, SRINIVASA RAO, G. H., JOHNSON, P., ARTHANARISWARAN, P. A review-importance of RP-HPLC in analytical method development. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 2013, 3 (1): 15–23.
- [26] KUMAR, Sanjay D.; KUMAR, DR Harish. Importance of RP-HPLC in analytical method development: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2012, 3 (12): 4626.
- [27] DOHNAL, Vlastimil, KADLEČKOVÁ, Ivana. *Analýza látek pomocí HPLC*. Ústí nad Labem, 2013, 30 s. Projekt. Univerzita J. E. Purkyně, Přírodovědecká fakulta.
- [28] LARROQUE, O. R., BEKES, F., WRIGLEY, C. W., RATHMELL, W. G. Analysis of gluten proteins in grain and flour blends by RP-HPLC. In: *Wheat gluten. Proceedings of the 7th International Workshop Gluten 2000, Bristol, UK, 2–6 April 2000*. Royal Society of Chemistry, 2000. p. 136–139.
- [29] KÖHLER, Peter; BELITZ, Hans-Dieter; WIESER, Herbert. Disulphide bonds in wheat gluten: further cystine peptides from high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) subunits of glutenin and from γ -gliadins. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und-forschung* , 1993, 196 (3): 239–247.
- [30] EDMAN, Pehr. Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. *Acta Chemica Scandinavica*. 1950, 4: 283–293.

- [31] *MALDI-TOF MS* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2009 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/sci/podzim2009/Bi6700c/um/MALDI_TOF_MS.pdf.
- [32] CROXATTO, Antony; PROD'HOM, Guy; GREUB, Gilbert. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS microbiology reviews*, 2012, 36 (2): 380–407.
- [33] PACÁKOVÁ, Věra. Kapalinná chromatografie v analytické toxikologii [online]. [cit. 2017-02-15] Obrázek ve formátu JPEG. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/2523025/>
- [34] 2,5-Dihydroxybenzoic acid. *PubChem* [online]. Rockville Pike (Bethesda): National Library of Medicine [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3469#section=Information-Sources>
- [35] Příslušenství HS. *BioVendor LM* [online]. Brno: BioVendor Group, 2023 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://www.biovendor.cz/katalog/prislusenstvi-hs-3.htm>
- [36] DOSTALEK, P., GABROVSKÁ, D., RYSOVÁ, J., MENA, M. C., HERNANDO., A., MÉNDEZ, E., CHMELÍK, J., ŠALPLACHTA, J. Determination of gluten in glucose syrups. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2009, 22 (7–8): 762–765.
- [37] TOVOLI, Francesco, MASI, Chiara, GUIDETTI, Elena, NEGRINI, Giulia, PATERINI, Paola, BOLONDI, Luigi. Clinical and diagnostic aspects of gluten related disorders. *World Journal of Clinical Cases*, 2015, 3 (3): 275.
- [38] KOHOUT, Pavel. Lepek a související onemocnění. *STOB klub* [online]. 2012 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://www.stobklub.cz/clanek/lepek-a-souvisejici-onemocneni/>
- [39] Celiakie - co to je, kde se bere, jak ji léčit a jak se při ní stravovat?. *Herbalus* [online]. Ostrava: Herbalus, 2022 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://www.herbalus.cz/blog/5576257-celiakie-priciny-priznaky-dieta-a-lecba>
- [40] GUJRAL, Naiyana; FREEMAN, Hugh J.; THOMSON, Alan BR. Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World Journal of Gastroenterology*. 2012, 18 (42): 6036.
- [41] FRÜHAUF, Pavel, BRONSKÝ, Jiří, DĚDEK, Petr, NEVORAL, Jiří, KOTALOVÁ, Radana, SÝKORA, Josef, SZITÁNYI, Natália, ŠEBKOVÁ, Alena, ZAHRADNÍČEK, Lubomír. Celiakie-doporučený postup pro diagnostiku a terapii u dětí a dospívajících. *Pediatric pro praxi*, 2016, 17 (3): 1–7.

- [42] Celiakie: příznaky, diagnostika a bezlepková dieta. *Dr. Max* [online]. Lékarna Dr. Max, 2022 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://www.drmax.cz/clanky/celiakie-priznaky-diagnostika-a-bezlepkova-dieta>
- [43] PROKOPOVÁ, Lucie. Celiakie-co má vědět ambulantní internista. *Interní medicína pro praxi*, 2008, 10 (5): 233–239.
- [44] FASANO, Alessio; CATASSI, Carlo. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*, 2001, 120 (3): 636–651.
- [45] REUNALA, Timo L. Dermatitis herpetiformis. *Clinics in Dermatology*, 2001, 19 (6): 728–736.
- [46] Dermatitis herpetiformis, Duhringova choroba - příznaky, projevy, symptomy. *Příznaky a projevy nemocí* [online]. 2012 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://www.priznaky-projevy.cz/kozni/338-dermatitis-herpetiformis-duhringova-choroba-priznaky-projevy-symptomy>
- [47] NGUYEN, Christopher N.; KIM, Soo-Jung. Dermatitis herpetiformis: An update on diagnosis, disease monitoring, and management. *Medicina*, 2021, 57 (8): 843.
- [48] KIM, Randie H.; BRINSTER, Nooshin K. Practical direct immunofluorescence. *The American Journal of Dermatopathology*, 2020, 42 (2): 75–85.
- [49] PETERS, Edmund; LAU, Monica. Histopathologic examination to confirm diagnosis of periapical lesions: a review. *Journal-Canadian Dental Association*, 2003, 69 (9): 598–600.
- [50] HADJIVASSILIOU, Marios; SANDERS, David D.; AESCHLIMANN, Daniel P. Gluten-related disorders: gluten ataxia. *Digestive Diseases*, 2015, 33 (2): 264–268.
- [51] HADJIVASSILIOU, M., GRÜNEWALD, Richard Adam, CHATTOPADHYAY, Arup K., DAVIES-JONES, G. Aelwyn B., GIBSON, Andrew, JARRATT, John A., KANDLER, Rosalind H., LOBO, Alan Joseph W., POWELL, Tom, SMITH, Christine M. L. Clinical, radiological, neurophysiological, and neuropathological characteristics of gluten ataxia. *The Lancet*, 1998, 352 (9140): 1582–1585.

- [52] HADJIVASSILIOU, Marios, GRÜNEWALD, Richard Adam, SANDERS, David S., ZIS, Panagiotis, CROALL, Iain, SHANMUGARAJAH, Priya D., SARRIGIANNIS, Ptolemaios G., TROTT, Nick, WILD, Graeme, HOGGARD, Nigel. The significance of low titre antigliadin antibodies in the diagnosis of gluten ataxia. *Nutrients*, 2018, 10 (10): 1444.
- [53] ELLI, Luca, BRANCHI, Federica, TOMBA, Carolina, VILLALTA, Danilo, NORSA, Lorenzo, FERRETTI, Francesca, RONCORONI, Leda, BARDELLA, Maria Teresa. Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2015, 21 (23): 7110.
- [54] Alergolog-stock snímky, obrázky a fotky. *IStock* [online]. 2023 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://www.istockphoto.com/cs/fotky/alerolog>
- [55] HILL, Ivor D., FASANO, Alessio, GUANDALINI, Stefano, HOFFENBERG, Edward, LEVY, Joseph, REILLY, Norelle, VERMA, Ritu. NASPGHAN clinical report on the diagnosis and treatment of gluten-related disorders. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 2016, 63 (1): 156–165.
- [56] STROSSEROVÁ, Alena. Bezlepková dieta. *Výživa a potraviny*, 2015, 70 (4): 52–55.
- [57] SABENÇA, Carolina, RIBEIRO, Miguel, DE SOUSA, Telma, POETA, Patrícia, BAGULHO, Ana Sofia, IGREJAS, Gilberto. Wheat/Gluten-Related Disorders and Gluten-Free Diet Misconceptions: A Review. *Foods*, 2021, 10 (8): 1765.
- [58] MÁLKOVÁ, Hana. Má bezlepkový dieta význam i pro zdravé jedince? *STOB klub* [online]. 2012 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://www.stobklub.cz/clanek/ma-bezlepkova-dieta-vyznam-i-pro-zdrave-jedince/>
- [59] Rekreacebezlepku.cz usnadní celiakům cestování. *Do penzionu.cz* [online]. FOnline [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://www.dopenzionu.cz/aktuality/rekreacebezlepku-cz-usnadni-celiakum-cestovani-699>
- [60] Hotelová restaurace. *Ambra* [online]. Luhačovice: AMBRA HOTEL, 2014 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://www.hotel-ambra.cz/restaurace.html>
- [61] Označení bezlepkových potravin. *Vařím pecu free* [online]. 2020 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://www.varim-pecu-free.cz/1/oznaceni-bezlepkovych-potravin/>

- [62] STROSSEROVÁ, Alena. 2015. Bezlepková dieta. *Výživa a potraviny: časopis Společnosti pro výživu*. Praha: Výživaservis s.r.o., 70 (4), s. 52–54 příl. ISSN 1211- 846x
- [63] Historie. *POEX* [online]. Velké Meziříčí, 2023 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://www.poex.cz/historie>
- [64] Produkty. *Nominal* [online]. Velké Meziříčí: Nominal, 2022 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://www.nominal.cz/nase-produkce/produkty>
- [65] Bezlepková směs s chia. *Špajza* [online]. Uherský Brod: Spajza, 2022 [cit. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://spajza.cz/pecici-smesi-a-strouhanka/3821-bezlepkova-smes-s-chia-500g-nominal-8594010190889.html>