

Metode za detekciju glutena

Stanković, Maroje

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:575646>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Prijediplomski studij kemije

Maroje Stanković

Metode detekcije glutena

Mentor: izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Osijek, kolovoz 2023.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Gluten i njegova struktura	2
2.1. Struktura glijadina	2
2.2. Struktura glutenina	3
3. Biokemija celijakije.....	4
3.1. Prepoznavanje glutena na dendritičnim stanicama	7
3.2. Prepoznavanje glutena u T stanicama	8
4. Detekcija glutena	10
4.1. Imunoenzimska metoda	12
4.2. LFIA	16
4.3. Western blot	18
4.4. Masena spektrometrija	20
4.5. Prijenosni uređaji.....	21
5. Zaključak.....	23
6. Popis literature.....	24

Sažetak

Gluten je naziv za skupinu organskih komponenti u žitaricama koje nisu topljive u vodi. Proteinska komponenta glutena bogata je prolinom, glutaminom i glicinom i dijeli se na monomerne i u etanolu topljive prolamine i polimerne i u etanolu netopljive glutenine. Urođeni imunosni sustav prepoznaje gluten pomoću TL-receptora (engl. toll-like receptors) koji se nalaze na membranama dendritskih i mononuklearnih stanica. Stečeni imunosni sustav prepoznaje gluten vezanjem dijelova glutenskih peptida na molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti tipa II (engl. Major histocompatibility complex II, MHC II) koje ih zatim predstavljaju T-stanicama. Najpopularnije metode detekcije glutena van ljudskog organizma su enzimski povezani imunosorpcijski test (engl. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), imunološki test s bočnim protokom (engl. lateral flow immunoassay, LFIA) i western blot. ELISA se temelji na označavanju antitijela ili traženog proteina enzimom i jedina je metoda koja može apsolutno odrediti koncentraciju glutena. LFIA se temelji na kretanju označenih antitijela kroz nitroceluloznu membranu; ova metoda ima vrlo nisku granicu detekcije i jednostavna je za provesti. Na temelju ove metode razvijeno je nekoliko prijenosnih uređaja za detekciju glutena, no oni još imaju vrlo visoke granice detekcije i nisku točnost. Western blot vrlo je osjetljiva metoda detekcije glutena koja se temelji na razdvajanju proteina elektroforezom u gelu nakon čega se na membrani detektiraju pomoću antitijela; ova metoda koristi se samo u laboratorijskim uvjetima za detekciju vrlo niskih koncentracija glutena. Jedina metoda detekcije koja ne uključuje antitijela je masena spektrometrija, no zbog vrlo skupih uređaja i kompleksnog procesa detekcije još se ne koristi izvan laboratorijskih uvjeta.

Ključne riječi: Gluten; Celijakija; ELISA; LFIA; Western blot

Abstract

Gluten is a name used for a group of water insoluble organic compounds present in cereals. The protein component of gluten is rich in proline, glutamine and glycine and is divided into two categories: monomeric and ethanol soluble prolamins and polymeric and ethanol insoluble glutenins. The innate immune system recognises gluten with the help of toll-like receptors which are found on the membranes of dendritic and mononucleic cells. The adaptive immune system recognises gluten by binding specific segments of gluten to major histocompatibility complex type II (MHC II) cells which present them to T cells. Most commonly used gluten detection methods are enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), lateral flow immunoassay, (LFIA) and western blot. The ELISA method is based on the labelling of antibodies or sample protein with an enzyme and is the only method that can directly detect the concentration of gluten. The LFIA method is based on the movement of labelled antibodies through a nitrocellulose membrane. This method is very simple and has a low detection limit. A small amount of portable gluten detection kits have been developed using this method, but they usually have high detection limits and low accuracy. Western blot is a very sensitive and accurate method based on the separation of proteins using gel-electrophoresis after which they're transferred to a membrane where antibody based detection is used. The only gluten detection method not using antibodies is mass spectrometry, but due to the very high cost of mass spectrometers and the complex process needed to ensure detection this method is not used except for laboratory applications.

Keywords: Gluten; Coeliac disease; ELISA; LFIA; Western blot

1. Uvod

Gluten se može definirati kao skup organskih komponenti koje preostaju nakon što se iz žitarica ukloni škrob i komponente topljive u vodi. Nakon toga ostaje kruta masa koja se sastoji od 75-80 % proteina i 5-10 % lipida, a ostatak čine manji ugljikohidrati.¹ U ovom radu obradit će se samo proteinska komponenta glutena koja određuje njegova svojstva. Proteini u glutenu dijele se u dvije frakcije ovisno o njihovoj topljivosti u razrijeđenom etanolu: topljivi glijadini i netopljivi glutenini.² Ova podjela vrijedi samo za pšenicu i promijenila se analizom drugih žitarica koje sadržavaju proteine slične glijadinima, poput hordeina u ječmu i sekalina u raži; ovi proteini nisu dobro topljivi u razrijeđenom etanolu, ali imaju mnoge druge sličnosti glijadinima od kojih je najznačajniji visok udio glutaminske kiseline, glicina i prolina te monomerna struktura.³ Zbog toga se gluten danas dijeli na prolamine, koji sadržavaju glijadine i druge njima slične proteine, i glutenine. Osim ove podjele proteini u glutenu često se dijele prema njihovoj molekularnoj masi na: proteine većih molekularskih masa (engl. high molecular weight, HMW) koje iznose 70-90 kDa, proteine srednje velikih molekularskih masa (engl. medium molecular weight, MMW), 40-50 kDa i proteine manjih molekularskih masa (engl. low molecular weight, LMW), 30-40 kDa.²

Celijakija je autoimuna bolest koja se očituje pokretanjem upalnog procesa u tankom crijevu kao i proizvodnje antitijela pri konzumaciji glutena. Ona se pojavljuje u oko 1 % pojedinaca, no vrlo često ostaje nedijagnosticirana. U pacijentima celijakije konzumacija glutena dovodi do pokretanja upalnog procesa u tankom crijevu koji uzrokuje razne gastrointestinalne smetnje, a dugotrajnom konzumacijom uzrokuje trajna oštećenja crijevnih resica koja dovode do malapsorpcije. Malapsorpcija je najčešći simptom celijakije i vrlo često dovodi do pojave drugih simptoma izvan probavnog sustava koje uzrokuju nedostaci esencijalnih vitamina i minerala. Od simptoma uzrokovanih malapsorpcijom najčešće su anemija i smanjena gustoća kosti. Osim toga pri konzumaciji glutena dolazi i do proizvodnje antitijela protiv glutena i enzima transglutaminaze, ova antitijela mogu se vezati na nekoliko sličnih proteina poput Purkinje stanica i gangliozida što dovodi do ataksije i gubitka osjeta, kao i na enzim transglutaminazu 3 u koži što u mnogim pacijentima uzrokuje dermatitis herpetiformis. Osim navedenih postoje mnogi rijetki simptomi celijakije koji su uglavnom uzrokovani malapsorpcijom vitamina ili minerala. Budući da je ona autoimuna bolest, za celijakiju ne postoji lijek već se samo sprječava pojava simptoma izbjegavanjem konzumacije glutena.

2. Gluten i njegova struktura

Proteinsku komponentu glutena čine dvije vrste proteina različitih svojstava i struktura. Većinu mase glutena čine monomerni i u razrijeđenom etanolu topljivi prolamini, a manji udio polimerni i u razrijeđenom etanolu netopljivi glijadini.² Obje skupine proteina sadrže velik udio prolina i glutenina te malu količinu cisteina koji u prolaminima stvaraju samo unutarmolekulske veze dok u podjedinicama glutenina manji broj cisteina stvara međumolekulske veze koje im omogućuju polimernu strukturu. Zbog postojanja međumolekulskih veza i većeg broja unutarmolekulskih veza glijadini imaju veći utjecaj na elastičnost glutena dok prolamini uglavnom utječu na njegovu viskoznost.

2.1. Struktura glijadina

Jedni predstavnici prolamina u glutenu pšenice su glijadini. Gotovo svi glijadini sastoje se od samo jednog proteinskog lanca i imaju molekulske mase između 25-50 kDa.⁴ Izvorno su se dijelili na 4 kategorije u ovisnosti o njihovoj pokretljivosti pri elektroforezi u gelu na α -, β -, γ - i ω -glijadine; daljnjim istraživanjem pomoću modernih metoda poput dvodimenzionalne elektroforeze i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti na obrnutim fazama otkrivene su značajne sličnosti između α - i β -glijadina i razlike između proteina svrstanih u ω -glijadine. Zbog tih otkrića točnija je podjela na α/β -, γ -, $\omega 5$ - i $\omega 1,2$ -glijadine, no u mnogim radovima podjela ω -glijadina na $\omega 5$ - i $\omega 1,2$ -glijadine nije korištena.⁵ I $\omega 5$ - i $\omega 1,2$ -glijadini imaju velike molekulske mase i sadrže najveći udio glutaminske kiseline, prolina i fenilalanina koji zajedno čine 80% aminokiselina u ovim proteinima, glavna razlika između njih je što $\omega 5$ -glijadini imaju veću molekulsku masu (~50 kDa) od $\omega 1,2$ -glijadina (~40 kDa), osim toga $\omega 5$ -glijadini imaju veći utjecaj u alergijskim reakcijama. α/β - i γ -glijadini imaju sličnu molekulsku masu (28 – 35 kDa) i imaju izraženu N- i C-terminalnu sekvencu, ali se znatno razlikuju po prisustvu nekih aminokiselina i sastavu terminalnih sekvenca. N-terminalne sekvencije znatno su kraće od C-terminalnih sekvenca i sastoje se od signalnog peptida od 19 ili 20 aminokiselina i kratke sekvencije od manje od 15 aminokiselina. C-terminalne sekvence znatno su dulje i uglavnom se sastoje od 100-150 aminokiselina, a između njih se nalazi ponavljajuća domena koja se uglavnom sastoji od ponavljajućih nizova aminokiselina s vrlo velikim udjelom glutaminske kiseline i prolina, duljine od oko 100 aminokiselina. Glijadini također mogu sadržavati cisteine

u C-terminalnim sekvencama koji omogućavaju stvaranje disulfidnih veza što ovim proteinima omogućuje postizanje kompaktnije strukture. α/β -glijadini gotovo uvijek imaju 6 cisteina u C-terminalnoj sekvenci pa ne stvaraju međumolekulske disulfidne veze; u γ -glijadinima ova sekvenca ima 8 aminokiselina, ali je u $\frac{1}{4}$ γ -glijadina uočen neparan broj cisteina što im omogućuje stvaranje međumolekulskih disulfidnih veza. Osim toga α/β -glijadini u svojoj C-terminalnoj sekvenci imaju dva niza od najviše 50 glutaminskih kiselina, koji znatno povećavaju polarnost proteina i sudjeluju u autoimunim reakcijama. Na slici 1. prikazane su komponente α/β - i γ -glijadina kao i dokazane veze između cisteinskih skupina.⁴



Slika 1. Struktura α/β - i γ -glijadina (preuzeto i prilagođeno iz ⁵).

2.2. Struktura glutenina

Glutenini su polimerne komponente glutena koje se sastoje od više podjedinica različitih masa povezanih disulfidnim vezama. Ovi proteini su u svom izvornom obliku netopljivi u otopinama alkohola, ali njihovom denaturacijom postiže se slična topljivost u otopinama alkohola kao i u glijadinu. Podjedinice glutenina znatno se razlikuju po masi i dijele se na podjedinice male molekulske mase i velike molekulske mase; omjer masa ovih podjedinica u gluteninima je oko 2:1. Podjedinice male molekulske mase imaju vrlo sličnu strukturu glijadinima s kratkom N-terminalnom sekvencom, ponavljajućom domenom koja je kraća nego u glijadinu i C-terminalnom sekvencom s 8 cisteinskih skupina od kojih 6 stvara unutarmolekulske veze, a dvije zbog steričkih smetnji stvaraju samo međumolekulske veze. Podjedinice velike molekulske mase slične su ω -glijadinima, ali imaju veću molekulsku masu zbog dulje

ponavljajuće domene. Ove podjedinice sastoje se od relativno duge N terminalne sekvence od 80-105 aminokiselina, ponavljajuće domene koja se sastoji od 480-700 aminokiselina i C-terminalne sekvence od 42 aminokiseline. Cisteini se mogu nalaziti u sva tri dijela te stvaraju i unutar molekulske i međumolekulske disulfidne veze. Zbog velikog broja međumolekulskih disulfidnih veza glutenini imaju veći utjecaj na rastezljivost glutena.⁵

3. Biokemija celijakije

Celijakija je autoimuna bolest koju uzrokuje aktivacija imunološkog sustava pri prisustvu glutena u tankom crijevu. Aktivacija imunološkog sustava bit će objašnjena podjelom glutena na toksične i imunogene dijelove. I toksični i imunogeni dijelovi glijadinskih lanaca aktiviraju imunološki sustav aktivacijom T stanica i povećavaju koncentraciju B stanica, i makrofaga u tankom crijevu. Toksične frakcije glutena aktiviraju urođeni imunološki sustav tako što se vežu na dendritične i mononuklearne stanice u lamina propriji sluznice tankog crijeva. Te stanice proizvode interleukin-15 koji aktivira enterocite koji zatim aktiviraju T i B stanice i time pokreću upalni proces. Ovim procesom ne dolazi do stvaranja antitijela za gluten, koja mogu uzrokovati najveći štetni utjecaj na cijeli organizam; upalna reakcija uzrokovana ovim procesom uglavnom se odvija samo u crijevima i uzrokuje znatno manje štete od reakcije stečenog imunološkog sustava.⁷ Imunogeni dijelovi aktiviraju T stanice vezanjem za vrstu molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti tipa II (engl. major histocompatibility complex II, MHC II) molekula koje izravno aktiviraju $CDT4^{+}$ stanice čime se pokreće upalni proces koji dovodi do degradacije tankog crijeva i proizvodnje antitijela koja uzrokuju znatno više štete u cijelom organizmu od reakcije na toksične dijelove.⁸ MHC II molekule dio su stečenog imunološkog sustava, a MHC II molekule osjetljive na gluten zovu se humanim leukocitnim antigenima razreda II. (engl. human leukocyte antigen type II, HLA-DQ2) molekule po *HLA-DQ2* skupini gena koji ih kodiraju.⁷ Najvažniji geni u DQ2 skupini su DQ2.5 geni (*DQA1*0501* i *DQB1*0201*) koji su prisutni u 90-95% pacijenata oboljelih od celijakije. Unatoč tome, sama prisutnost ovih gena nije dovoljna za razvitak celijakije i oni moraju postojati uz poremećaj u urođenom imunološkom sustavu kako bi došlo do razvitka celijakije.⁷ Tablica 1. prikazuje prisustvo različitih gena u DQ2 skupini kao i nekih gena u DQ8 skupini za koje se također vjeruje da imaju utjecaj na razvitak celijakije.¹⁰ Gotovo svi oboljeli od celijakije imaju barem jedan od gena u DQ2 skupini, no zbog velikih razlika u prisustvu pojedinih gena u toj skupini

mnogi imunogeni dijelovi glijadinskog lanca ne uzrokuju aktivaciju T stanica kod svih oboljelih.

Tablica 1. Utjecaj DQ2 gena na razvitak celijakije.⁹

	Pacijenti celijakije (%)	Kontrolna skupina (%)	Rizik
<i>DQ2 i DQ8</i>	2.5	0.2	1:7
<i>DQ2, B1*02/*02</i>	23.1	2.4	1:10
<i>DQ8, B1*02 pos.</i>	3.0	0.7	1:24
<i>β2, B1*02/*02</i>	1.4	0.4	1:26
<i>DQ2, B1*02/x</i>	55.1	19.2	1:35
<i>DQ8, B1*02 neg.</i>	7.3	6.5	1:89
<i>β2, B1*02/x</i>	4.6	9.7	1:210
<i>α5</i>	2.1	37.9	1:1842
ostali	0.9	23.0	1:2518

Unatoč tome mnogi imunogeni dijelovi uzrokuju aktivaciju T stanica kod gotovo svih oboljelih, takvi dijelovi gotovo uvijek uzrokuju i brži i jači odgovor imunosnog sustava te su zbog toga nazvani imunodominantnim.⁷ U tablicama 2. i 3. prikazani su do sad istraženi dijelovi lanaca α -i γ -glijadina i glutenina, njihov položaj u lancu i njihova toksičnost i imunogenost; imunodominantni dijelovi označeni su sa ++++. U slučaju postojanja više istraživanja za pojedini dio prikazani su rezultati svih istraživanja.⁷ Većina imunogenih i svi imunodominantni dijelovi moraju se deaminirati pretvorbom glutamina u glutamate kako bi se mogli vezati na HLA-DQ2 molekule, taj proces katalizira enzim transglutaminaza 2. Ovaj se enzim nalazi u tankom crijevu i pri normalnim uvjetima je katalitički neaktivan, a aktivira se samo pri već postojećoj upali. Zbog toga te zbog potrebe već postojećeg oštećenja sluznice tankog crijeva, koje omogućuje toksičnim dijelovima glutenskog lanca pristup lamini propriji, u mnogim oboljelima do pojave simptoma celijakije prvi je puta došlo tek nakon preboljenja virusnih bolesti. Nakon što upalni proces započne, u T stanicama se proizvode velike količine interferona- γ (IFN- γ), proupalnog citokina, koji također potiče aktivaciju transglutaminaze 2.⁸

Osim celijakije postoje i mnoge preosjetljivosti na gluten koje nisu povezane s celijakijom, a koje su otkrivene u mnogim pacijentima bez gena u DQ2 skupini. U ljudi s ovim poremećajem osjetljivost na gluten uglavnom uzrokuje urođeni imunosni sustav i zbog toga je reakcija na

Tablica 2. Toksični dijelovi glijadinskih lanaca.⁷

Sljedovi aminokiselina	Položaj	Toksičnost
VPVPQLQPQNPSQQQPQEQ	α 3–21	–
PGQQQPFPPQQPY	α 31–43	+
PGQQQPFPPQQPYQPQPF	α 31–49	+
PGQQQPFPPQQPYQPQPFPSQQPY	α 31–55	+
PQPQPFPSQQPY	α 44–55	+
SQQPYLQLQFPQPQLPY	α 51–70	+
LQLQFPQPQLPYQPQLPY	α 56–75	+
QQYPLGQGSFRPSQQNPQA	α 202–220	–
LGQGSFRPSQQN	α 206–217	+

Tablica 3. Imunogeni dijelovi glijadinskih lanaca.⁷

Sljedovi aminokiselina	Položaj	Imunogenost
VRVPVPQLQPQNPSQQQPQ	α -gliadin: 1–19	+
QNPSQQQPQEQVPLVQQQ	α -gliadin: 11–28	+
QVPLVQQQFPGQQQPFPPQ	α -gliadin: 21–40	+
PGQQQPFPPQQPYQPQPF	α -gliadin: 31–49	+
FPGQQQPFPPQQPYQPQPF	α -gliadin: 30–49	+
QPYQPQPFPSQQPYLQL	α -gliadin: 41–58	+
PQPFPSQQPYLQLQFPQ	α -gliadin: 46–63	+
PQPQLPYQPQLPY	α -gliadin: 62–75/(a)	+ / + + +
QLQFPQPQLPY	α -gliadin: 57–68 (a)	+ / + + +
QLQFPQ	α -gliadin: 57–63 (a)	+ + +
LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF	α -gliadin: 57–89/(a)	+ / + + +
QLQFPQPQLPY	α -gliadin: 58–69/(a)	+ / + + +
PQPQLPYQPQLPY	α -gliadin: 63–76/(a)	+ / + + +
FFRPQQPYQPQ	α -gliadin: 93–106 (a)	+
LIFCMDVVLQ	α -gliadin: 123–132	+
QQPLQQYPLGQGSFRPSQQNPQAQG	α -gliadin: 198–222	+
QYPLGQGSFRPSQQNPQA	α -gliadin: 203–220/(a)	+ / +
PSGQGSFQPS	α -gliadin: 205–214	–
PSGQGSFQPSQQ	α -gliadin: 205–216/(a)	+ / + + +
SGQGSFQPSQQN	α -gliadin: 206–217/(a)	+ / + + +
QGSFQPSQQN	α -gliadin: 208–217/(a)	– / + + +
LQPQQPFPPQQPYQPQ	γ -gliadin: 60–79	+
FPQQPQQPYQPQ	γ -gliadin: 66–78	+
FSQPQQFPPQ	γ -gliadin: 102–113/(a)	– / +
OQPQQSFPEQQ	γ -gliadin: 134–153/(a)	+ / + + +
VQGQGIIQPQPAQL	γ -gliadin: 222–236/(a)	+ / +
QQQQPPFSQQQSPFSQQQQ	glutenin: 40–59/(a)	– / +
QQPPFSQQQPLPQ	glutenin: 46–60/(a)	– / +
SGQGQRPGQWLQPGQGQQGYPTSPQQSGQGQQLGQ	glutenin: 707–742/(a)	+ / +
PGQGQQGYPTSPQQSGQ	glutenin: 719–736	+
GYPTSPQQSGQGQQLGQ	glutenin: 725–742	+
GYPTSPQQSG	glutenin: 725–735	+
QGYPTSPQQS	glutenin: 724–734/(a)	+ –
QQGYPTSPQQSG	glutenin: 723–735	+
GQQGYPTSPQQSG	glutenin: 722–735	+
GQQGYPTSPQQS	glutenin: 722–734	+

(a): deaminirani

unošenje glutena često slabija i lokalizirana na crijeva. Postoji mogućnost uključivanja stečenog imunskog sustava u slučaju prisustva drugih gena koji modificiraju MHC II molekule, ali je njegova reakcija gotovo uvijek znatno slabija nego kod pacijenata oboljelih od celijakije. Mnogim pacijentima u kojih dolazi do reakcije stečenog imunskog sustava ona je posljedica vezanja glutenina što je vrlo rijetko u pacijentima s celijakijom; ova pojava nije detaljno istražena i nije poznato koji geni uzrokuju ovu reakciju.¹¹

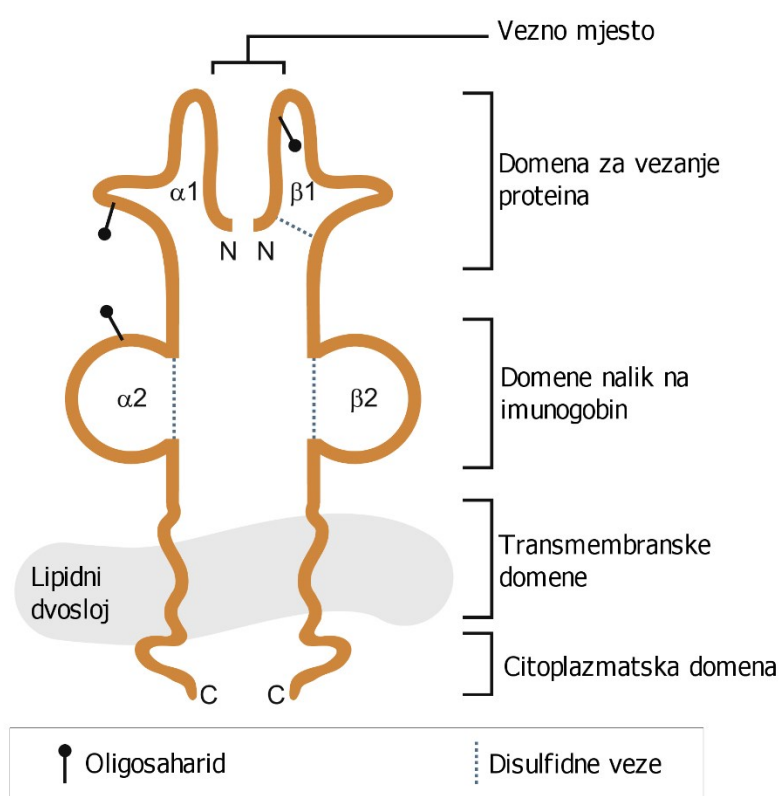
3.1. Prepoznavanje glutena na dendritičnim stanicama

Reakciju urođenog imunskog sustava na gluten započinju dendritične i mononuklearne stanice na kojima se nalaze TL-receptori (eng. Toll-like receptors). TL-receptori nalaze se na membrani dendritičnih stanica i sastoje se od dva dijela. Veći dio TL-receptora čini domena bogata leucinom koja se sastoji od 7-19 ponavljajućih sekvenci posloženih u oblik potkove; ova domena orijentirana je prema izvanstaničnom dijelu membrane i služi za prepoznavanje molekula.¹²

Unutarmembranski dio TL-receptora čini toll/interleukin-1 receptorska domena (engl. toll/interleukin-1 receptor, T/IL-1), koja se sastoji od 150 aminokiselina i otpušta signalne molekule u citoplazmu stanice. Kada dođe do vezanja molekule za izvanstanični dio receptora dolazi do konformacijske promjene koja omogućuje vezanje adapterske molekule (MYD88 (engl. myeloid differentiation primary response gene 88) i TICAM1 (engl. TIR domain containing adaptor molecule 1)) za unutarstanični dio receptora; ove molekule se aktiviraju i otpuštaju i time pokreću procese koji dovode do proizvodnje citokina i hemokina poput interleukina-15. U ljudima je do sad identificirano 10 različitih TL-receptora (označenih TLR1-10) podijeljenih u dvije skupine: unutarstanične (TLR3, TLR7, TLR8, i TLR9), koji se nalaze u membranama endosoma i uglavnom prepoznaju nukleinske kiseline, i izvanstanične (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 i TLR10) koji se nalaze u staničnoj membrani i prepoznaju lipide i proteine. Za prepoznavanje glutena važni su samo izvanstanični receptori, a u pacijentima oboljelim od celijakije najjače su aktivni TLR2 i TLR4.¹² Način aktivacije TL-receptora u pacijentima oboljelim od celijakije nije poznat; moguće je da se toksični dijelovi gluteinskog lanca izravno vežu za TL-receptore i time pokreću upalni proces, no ta hipoteza nije još detaljno istražena.¹³

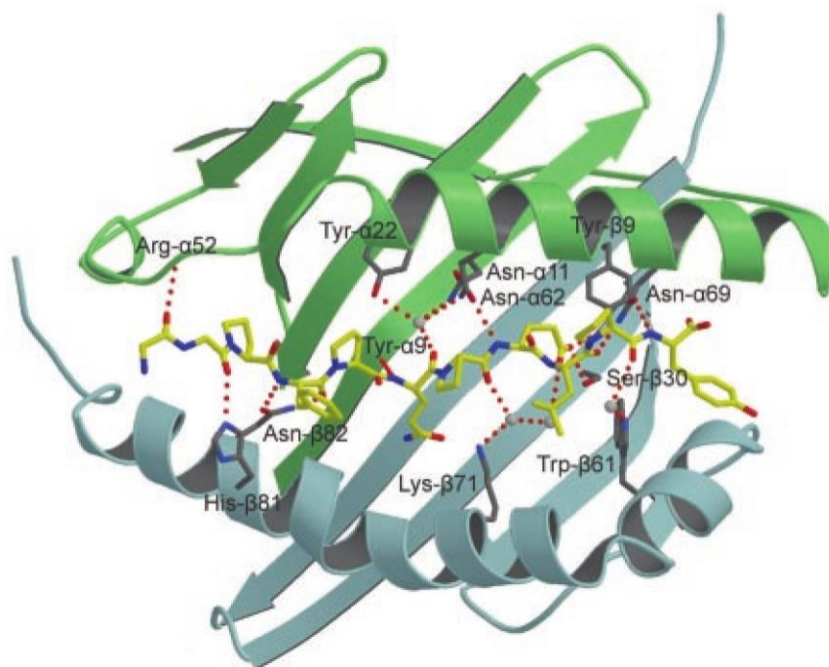
3.2. Prepoznavanje glutena u T stanicama

T stanice prepoznaju gluten vezanjem za HLA-DQ2 molekule koje se nalaze na dendritičnim stanicama i B-stanicama u lamina propriji tankog crijeva. HLA-DQ2 molekule vrsta su MHC II molekula. MHC II molekule nalaze se na svim antigen-prezentirajućim stanicama i imaju vrlo važnu ulogu u obrani tijela od patogena.¹⁴ Vezanje HLA-DQ2 na gluten odvija se na vrlo sličan način kao i vezanje bilo koje MHC II molekule na patogen. MHC II molekule sintetiziraju se u hrapavom endoplazmatskom retikulumu i sastoje se od dva nekovalentno povezana proteinska lanca koji svaki čini jednu polovicu molekule i jednu polovicu veznog mjesta. Podjedinica α teška je 33-35 kDa i na sebi ima dva oligosaharida vezana za amino skupine aspargina (jedan oligosaharid vezan na $\alpha 1$ podjedinici i jedan na $\alpha 2$ podjedinici); β podjedinica je teška 25-30 kDa i ima vezan samo jedan oligosaharid na $\beta 1$ podjedinici bliže veznom mjestu. Svaka podjedinica sastoji se od izvanstaničnog dijela dugog 90-100 aminokiselina na N kraju peptida, transmembranskog dijela dugog 20-25 aminokiselina i kratkog unutarstaničnog dijela dugog 10-15 aminokiselina.¹⁵ Slika 2. prikazuje pojednostavljenu strukturu MHC II molekule.¹⁶



Slika 2. Struktura MHC II molekule (preuzeto i prilagođeno iz ¹⁶).

Vezno mjesto MHC II molekule čine N-terminalni dijelovi obje podjedinice. Bočne dijelove veznog mjesta čine dvije α -uzvojnice, kraća α -uzvojnica, koja je dio α podjedinice, nalazi se nasuprot dulje α -uzvojnice, koja je dio β podjedinice. Sredinu veznog mjesta čini jedna β -nabrana ploča koju gradi 8 β -niti, 4 niti su dio α podjedinice, a 4 β podjedinice. Na vezno mjesto se uglavnom vežu peptidi dugi 12-19 aminokiselina. Vezno mjesto HLA-DQ2 molekule razlikuje se od veznog mjesta ostalih MHC II molekule po tome što ono ima vrlo jak afinitet za proteine bogate prolinom i negativnim nabojima koji nastaju deaminiranjem glutamina.¹⁴ Gluten se veže s HLA-DQ2 stvaranjem nekovalentnih veza između veznog mjesta i glutena na 10 uzastopnih aminokiselinskih ostataka (nazvanih P1-P10). Pri vezanju s glutenom najvažnija su P2 i P4 vezna mjesta gdje dolazi do stvaranja jakih vodikovih veza s aminokiselinskim ostacima glutena. Do stvaranje ovakvih veza dolazi i na P6 i P9 veznim mjestima, no ove veze su slabije od onih na P2 i P4 veznim mjestima.¹⁷ Najuočljivija razlika između ostalih MHC II molekule i HLA-DQ2 je nemogućnost stvaranja vodikove veze na P1 veznom mjestu koja omogućuje prisutnost prolina na tom položaju, stvaranje vodikove veze na P1 veznom mjestu važno je u vezanju gotovo svakog drugog proteina. Ostala vezna mjesta manje su važna u vezanju i na njima su najčešće slabije Van der Waalove sile. Slika 3. prikazuje približnu strukturu veznog mjesta HLA-DQ2 molekule i položaja glutenskog peptida pri njihovom vezanju, kao i aminokiseline u veznom mjestu koje sudjeluju u stvaranju veza s peptidom.¹⁴



Slika 3. Položaj molekule glutena u veznom mjestu HLA-DQ2 molekule ¹⁴.

Nakon vezanja glutena na HLA-DQ2 molekulu, kako bi došlo do aktivacije T stanice HLA-DQ2, molekula mora se vezati na receptor T-stanice (TCR). Ovaj receptor ima sličnu strukturu MHC II molekuli koju čine dva kovalentno nepovezana proteinska lanca. Pri vezanju ovog receptora na HLA-DQ2 molekulu dolazi do stvaranja nekovalentnih veza s oba lanca HLA-DQ2 molekule i s proteinom vezanim za nju. Vezno mjesto TCR manje je selektivno od veznih mjesta MHC II molekula i zbog toga ne dolazi do stvaranja mnogo veza specifičnih za HLA-DQ2 molekula.¹⁷ Unatoč tome uočena je važnost P7 veznog mjesta HLA-DQ2 molekule pri vezanju za TCR. Nakon vezanja HLA-DQ2 molekule na TCR u T stanici dolazi do signalne kaskade koja potiče njenu aktivaciju i otpuštanje velike količine citokina koji aktiviraju druge T- i B-stanice i pokreću proizvodnju antitijela.¹⁹

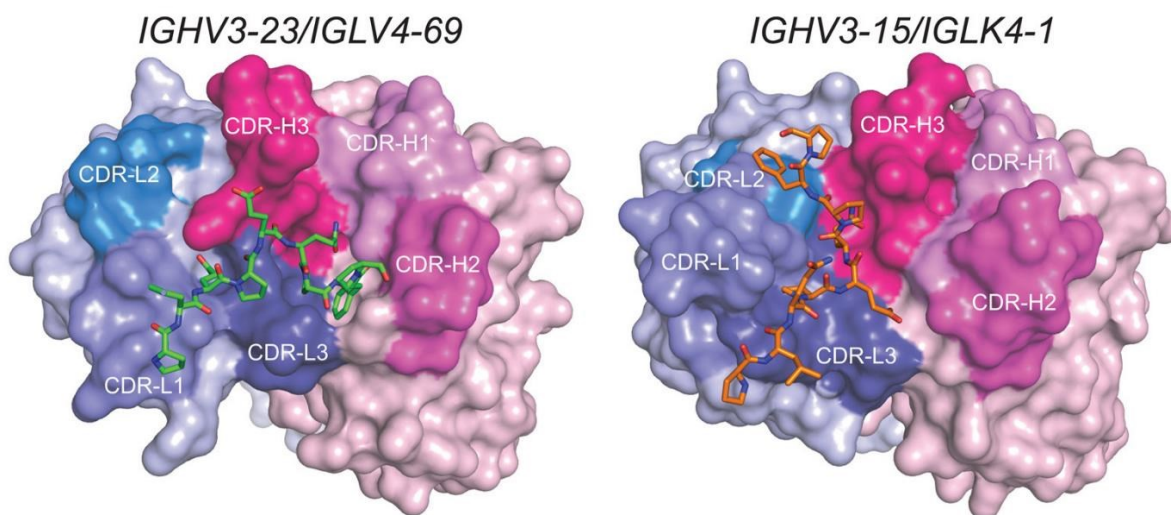
4. Detekcija glutena

Zbog veličine i relativne tipičnosti glutena, mnoge jednostavne metode detekcije proteina nisu dovoljno specifične kako bi razlikovale gluten od drugih sličnih peptida koji nisu opasni pacijentima oboljelim od celijakije. Zbog toga se za detekciju glutena uglavnom koriste metode koje uključuju vezanje glutena za antitijelo. Kao antitijelo u ovim metodama najčešće se koriste imunoglobulini G (IGG), imunoglobulini A (IGA) i imunoglobulini E (IGE), kao i ptičji imunoglobulin Y (IGY) koja imaju vrlo sličnu strukturu IGE antitijelima.²⁰

Sva antitijela sastoje se od jedne ili više proteinskih podjedinica u obliku slova Y. Broj podjedinica u antitijelima varira, no sva antitijela koja se koriste za imunološke metode sastoje se od samo jedne podjedinice, osim IGA koju čine dvije podjedinice. Svaka od ovih podjedinica sastoji se od dva teška lanca, mase od oko 50kDa, i dva laka lanca, mase od oko 25 kDa. Ovi lanci međusobno su vezani disulfidnim vezama i posloženi u oblik slova Y u kojem teški lanci čine po jednu polovicu strukture, a laki lanci čine vanjsku stranu svakog kraka. Amino krajevi oba lanca nalaze se na krajevima oba kraka gdje se nalaze i dva vezna mjesta molekule. Postoji 5 različitih vrsta teških lanaca (μ , δ , γ , α , i ϵ) koji se uglavnom razlikuju u svojim karboksilnim krajevima i prisustvu „zgloba“ u kojem su oba lanca isprepletena i povezana s mnogo disulfidnih veza; svaka vrsta antitijela ima jednu vrstu teškog lanca koji određuje vrstu tog antitijela. Postoje dvije vrste lakih lanaca (λ i κ) koji imaju jednaku vjerojatnost nalaženja u svim vrstama antitijela, ali su oba laka lanca u jednom antitijelu uvijek iste vrste; ove dvije vrste uglavnom se razlikuju po rasporedu aminokiselina u svojim veznim mjestima što ima utjecaj

na njihov oblik i afinitet prema različitim antigenima. Unatoč tome ne postoji velika funkcionalna razlika između ovih lanaca i svrha njihove varijacije nije detaljno istražena.²¹

Vezna mjesta antitijela nalaze se na krajevima oba kraka i čini ih amino kraj jednog teškog i jednog lakog lanca. Laki i teški lanac orijentiraju se slično α i β lancu MHC II molekule i tako svaki čine polovicu veznog mjesta.²¹ Vezna mjesta antitijela znatno su specifičnija i bolje prilagođena obliku peptida koji vežu od veznog mjesta HLA-DQ2 molekule i sadrže više nekovalentnih veza s proteinom što otežava određivanje točne strukture veznog mjesta ovih antitijela. Zbog bolje prilagođenosti sekundarnoj strukturi dijelu glutenskog lanca vezno mjesto antitijela stvara znatno više veza sa svakom aminokiselinom u glutenskom lancu. Pri vezanju s polarnim aminokiselinama, poput glutamina, glutamata i leucina, prevladava manji broj jačih vodikovih veza, dok manje polarne aminokiseline, poput prolina i fenilalanina, Van der Waalsovima interakcijama mogu biti povezane s do 6 različitih aminokiselina u veznom mjestu antitijela. Slika 4. prikazuje vezno mjesto dva različita IGA antitijela specifičnog za isti glutenski peptid (PLQPEQPFP) i njegov položaj u odnosu na različite segmente lakog i teškog lanca tog antitijela.²⁰



Slika 4. Položaj glutenskog peptida u veznom mjestu antitijela kodiranih navedenim genima

20.

Način dobivanja antitijela pri izvođenju imunoloških metoda također je jako važan. Mogu se koristiti dvije vrste antitijela: poliklonska i monoklonska antitijela. Poliklonska antitijela dobivaju se imunizacijom životinja (uglavnom zečeva ili kokoši) s odgovarajućim antigenom te se nakon imunizacije iz krvi životinje odijele željena antitijela. Ova metoda znatno je jeftinija i jednostavnija od proizvodnje monoklonskih antitijela, također ova metoda nije ograničena

moćućim varijacijama u glutenskom lancu jer dolazi do stvaranja antitijela koja se vežu na puno razlićitih dijelova glutenskog lanca, ali zbog toga znatno gubi na preciznosti, jer se meću željenim antitijelima mogu naći druga antitijela što dovodi do pojave lažno pozitivnih rezultata pri korištenju tih antitijela. Monoklonska antitijela proizvode se tako što se nakon imunizacije životinje (gotovo uvijek miša ili zeca) izoliraju B-stanice iz slezene te životinje. Te stanice se zatim spajaju s mijeloma stanicama, koje su tumorna verzija plazmocita, ovim procesom nastaju hibridne stanice koje proizvode velike kolićine jednog antitijela. Stanice koje proizvode željeno antitijelo se zatim kloniraju ćime dobijemo veliku kolićinu stanica koje mogu proizvesti beskonaćnu kolićinu jednog antitijela. Zbog proizvodnje samo jednog antitijela pri testiranju glutena koriste se mješavine više antitijela kako varijacije u glutenskom lancu ne bi onemogućile vezanje. Ova metoda znatno je skuplja, ali omogućuje potpunu sigurnost od lažno pozitivnih mjerenja.²²

4.1. Imunoenzimska metoda

Daleko najćešće korištena imunološka metoda je enzimski vezani imunosorpcijski test (engl. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Ova se metoda temelji na reakciji antitijela na koje je vezan enzim s uzorkom u kojem se nalazi antigen, nakon ćega se sva nevezana antitijela uklone i doda supstrat vezanog enzima, prisustvo reakcije katalizirane vezanim enzimom ukazuje na prisustvo antigena u uzorku. U ovoj metodi uglavnom se upotrebljavaju enzimi koji kataliziraju reakcije koje uključuju vidljivu promjenu boje, u prisustvu enzima se odvijaju vrlo brzo, a vrlo sporo bez enzima. Najćešće enzim-supstrat kombinacije pri testiranju na gluten navedene su u tablici 4.²³

Tablica 4. Najćešće korišteni enzimi u ELISA metodi.²³

Enzim	Supstrat	Boja supstrata	Boja produkta
Peroksidaza hrena	2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)	Prozirna	Zelena
Alkalna-fosfataza	4-Nitrofenilfosfat	Prozirna	Svijetložuta
β -D- galaktozidaza	4-Nitrofenil- β -galaktozid	Prozirna	Źuta

Pri detekciji glutena najčešće se koriste dvije vrste ELISA metode: Sendvič ELISA i kompetitivna ELISA. Sendvič ELISA odvija se tako što se antitijela imobiliziraju na dno mikrotitracijske ploče nakon čega se u jažice dodaju alikvoti uzorka čime dolazi do vezanja antigena na antitijelo. Cijela ploča se zatim ispere kako bi na njoj ostao samo antigen vezan za imobilizirano antitijelo. U jažice se zatim doda otopina drugog antitijela koje se veže na isti antigen na koje je vezan enzim, to antitijelo se također veže na antigen i nakon još jednog ispiranja, kako bi se uklonilo nevezano antitijelo, u jažice se doda supstrat i spektrofotometrijski prati tok reakcije. Ova metoda znatno je točnije od kompetitivne metode zbog potrebe vezanja supstrata na dva različita antitijela kako bi došlo do enzimske reakcije što dovodi do znatno manje vjerojatnosti pojave lažno pozitivnih testova. Glavni nedostaci ove metode su povećanje cijene zbog korištenja dva različita antitijela i nemogućnost testiranja hidroliziranih glutenskih peptida poput onih u kiselom tijestu ili alkoholnim pićima; do ovoga dolazi zbog potrebe dovoljno dugog proteinskog lanca kako bi se na dva različita mjesta mogla vezati dva antitijela.

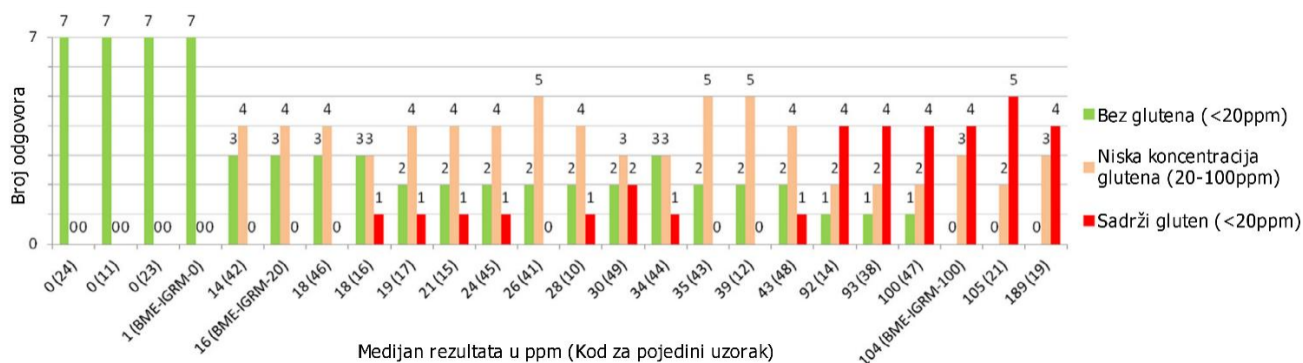
Kada je točnost manje važna ili je potrebno pronalaženja manjih dijelova glutenskog lanca koristi se kompetitivna ELISA. Kompetitivna ELISA se temelji na kompetitivnom vezanju označenih i neoznačenih antigena na antitijela. Ova metoda također započinje imobiliziranjem antitijela na mikrotitracijsku ploču nakon čega se u jažice doda alikvot uzorka i otopina antigena označenog enzimom točno određene koncentracije. Nakon vezanja ploča se ispere i doda se supstrat. Jačina reakcije ovisi o koncentraciji antigena u uzorku, u slučaju da u uzorku nema antigena enzimski reakcija biti će najjača moguća jer neće doći do vezanja antigena neoznačenog enzimom na antitijelo što znači da će sva vezna mjesta antitijela biti popunjena antigenom označenim enzimom. Povećanjem koncentracije antigena u uzorku smanjivati će se jačina reakcije jer će se povećavati količina neoznačenog antigena vezanog za antitijela. Ova metoda koristi se znatno rjeđe od sendvič metode zbog svoje manje točnosti i nemogućnosti detekcije vrlo malih količina antigena jer smanjenje jačine reakcije neće biti uočljivo. Glavne prednosti ove metode su njena mogućnost detekcije kratkih dijelova glutenskog lanca i potreba za korištenjem samo jednog antitijela što smanjuje cijenu testiranja.²⁴

Točnost ELISA metode detaljno je istraživana, no većina istraživanja provedena je na laboratorijskim uzorcima glijadina koje ELISA prepoznaje s višom točnošću od uzoraka koji sadrže cijeli glutenski kompleks. Znatno manje istraživanja provedeno je na uzorcima sličnijim proizvodima za koje je točnost ove metode najvažnija.

Rzychon i sur.²⁵ proveli su dva istraživanja u kojima su usporedili točnost 7 komercijalno dostupnih sendvič ELISA testova u određivanju koncentracije glutena. U prvome istraživanju

koristili su laboratorijski pripremljene uzorke bezglutenskog brašna kontaminiranog glutenom tako da konačna koncentracija glutena u uzorku iznosi 20 mg/kg i 100 mg/kg kao i uzorak nekontaminiran glutenom. Ove koncentracije jednake su regulacijama koje Europska unija zadaje za bezglutenske proizvode koja iznosi 20 mg/kg glutena u gotovom proizvodu i za proizvode s oznakom vrlo niske koncentracije glutena za koju proizvod smije sadržavati između 20 i 100 mg/kg glutena s 95% točnosti. Za uzorak bez glutena svih 7 testova potvrdilo je nepostojanje glutena u uzorku. Za uzorak s koncentracijom glutena od 20 mg/kg dobiveni su rezultati od 4-101 mg/kg sa standardnom devijacijom unutar testa od 21% i 101% između testova. Ovi rezultati ukazuju na vrlo nisku točnost ELISA testova u određivanju koncentracije glutena u proizvodima gdje je vjerojatnost kontaminacije glutenom visoka. Za ovaj uzorak samo 3 od 7 testova pokazalo je koncentraciju glutena manju od 20 mg/kg. Uzimajući u obzir ove rezultate kako bi proizvođač zadovoljio potrebne kriterije za bezglutenski proizvod s 95% vjerojatnosti, njegov proizvod zapravo bi morao imati koncentraciju glutena od manje od 5 mg/kg. Za uzorak s koncentracijom od 100 mg/kg dobiveni rezultati iznosili su između 24 do 574 mg/kg sa standardnom devijacijom unutar testa od 11% i 102% između testova. Koristeći istu pretpostavku kao i za prijašnji uzorak kako bi proizvod mogao biti označen s vrlo niskom koncentracijom glutena njegova koncentracija morala bi iznositi manje od 20 mg/kg.²⁵

U drugom istraživanju istim testovima testirani su razni proizvodi s očekivanim niskim koncentracijama glutena. Za ove uzorke prosječna standardna devijacija iznosila je 17% unutar testa i 76% između testova. Rezultati ovoga testa detaljnije su prikazani na slici 5 tako što je prosječna koncentracija glutena svih testova prikazana uz x os, a na y osi broj testova po čijem bi rezultatu svaki testirani uzorak pripadao prethodno navedenim kategorijama koncentracije glutena.²⁵



Slika 5. Varijacija rezultata različitih sendvič ELISA testova (preuzeto i prilagođeno iz ²⁵).

Ab^a

A

	Ab 1		Ab 2		Ab 3		Ab 4		Ab 5		Ab 6		Ab 7		Ab 8		Ab 9		Ab 10	
	Mean ^b	Rng/2 ^c	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2
	9240	170	12690	2790	2250	980	470	80	1790	450	1920	180	260	10	5630	180	33570	4650	41600	230
WA	7980	3120	9100	600	3270	1450	910	60	3200	750	4440	850	430	90	1670	150	19340	2550	16220	3070
WB	4520	1440	5510	150	2260	850	1620	260	1720	190	3010	1710	1060	180	1240	170	25820	1080	26360	1870
WC	6190	880	7470	130	2050	980	1740	160	1210	100	4330	1040	350	260	2960	420	25750	380	27260	1542
WD	22710	1840	25890	4750	2310	40	4890	1020	22210	8600	10290	950	11280	3270	4120	590	29710	2370	29480	2610
WE	11320	1480	8630	1460	360	20	880	500	2710	850	2910	480	460	80	1260	250	4820	690	4900	610
WF	12910	4240	11530	700	600	60	1700	140	3830	400	3370	250	980	610	2510	120	24830	3150	33290	4170
WG	21330	4230	29700	3870	3810	2970	14470	3630	18300	2890	26020	10400	13480	7550	6260	20	59250	8580	65090	0
WH	13310	3340	18510	90	360	240	30	20	2460	200	1120	90	210	50	300	120	3200	650	3260	180
WI	7380	800	6950	2340	1340	450	930	570	4250	680	3270	800	2100	600	2190	80	27850	4570	38060	1290
WJ	6290	2290	16550	2130	720	4	630	20	1840	340	13710	8600	1030	110	2840	120	19140	260	21950	3590
WK	11690	3670	26490	5450	3390	2550	5710	2570	8680	4120	22340	11820	6760	1930	4260	1210	46350	NE	55170	4930
WL	12160	400	8940	1780	210	30	210	50	2180	210	3460	NE	210	10	4020	270	36860	6050	46870	220
WM	28400	2490	13800	1780	1670	30	1240	190	2570	750	4430	3280	1460	210	6220	980	19920	1370	16530	3110
WN	17840	3650	12920	1090	820	220	660	580	2770	2170	2770	320	700	100	530	30	11440	700	10510	700
WO	9890	5990	3780	210	230	40	170	10	770	510	2420	680	340	80	2570	390	17800	1380	17570	270
WP	4180	70	4180	90	310	30	580	130	1810	200	3660	140	290	4	910	250	13230	460	13640	1030
WQ	2490	510	1990	190	170	20	250	140	1570	3	2910	200	120	10	1140	70	15570	470	14370	2000
WR	14650	1870	24350	2390	1960	160	6980	2160	6800	490	7460	2410	2520	1840	4990	130	20780	3740	26040	710
WS	12880	1780	15500	10	4700	2480	8820	430	3803	2620	4060	1560	3640	280	3430	1000	28960	970	26760	730
WT																				

B

	Ab 1		Ab 2		Ab 3		Ab 4		Ab 5		Ab 6		Ab 7		Ab 8		Ab 9		Ab 10	
	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2
	120	30	80	0	270	20	370	10	1540	160	7520	820	210	30	10	1	5140	220	4540	180
A	150	6	140	20	40	8	50	NE	250	60	230	80	150	30	20	2	290	40	210	10
B	60	20	50	6	60	30	30	10	150	9	450	60	80	20	6	0	120	5	160	10
C	60	20	50	6	80	40	60	20	440	3	1310	NE ^d	100	9	10	2	150	10	160	20
D	190	6	200	20	170	10	80	1	330	70	1170	90	50	1	10	2	1580	150	1650	40
E	150	20	180	4	160	9	160	3	280	8	1490	120	120	8	30	10	1590	10	1530	40
F	16	1	10	2	20	2	10	3	160	20	610	NE	120	8	5	1	120	6	140	9
G	8	0	10	1	7	1	10	2	190	20	270	16	90	2	4	0	9	2	6	1
H	120	3	160	3	240	3	180	2	1070	140	1550	NE	190	10	10	0	650	2	690	90
I	90	1	80	2	170	10	180	6	380	140	850	250	70	4	20	2	1220	20	900	130
J	180	8	110	20	220	20	150	30	670	130	3010	180	150	50	30	3	530	110	540	90
K	110	8	20	5	140	1	100	30	960	180	5530	1420	150	40	20	10	740	100	700	100
L	540	240	430	20	70	30	160	7	3260	630	1840	420	320	20	140	1	3500	790	3500	90
M	40	20	6	0	20	3	40	9	130	40	500	NE	90	20	10	0	340	30	310	20
N	760	260	1700	190	60	30	60	3	220	30	880	360	200	10	170	0	1790	150	1550	100
O	40	20	10	7	6	1	10	NE	30	4	130	40	30	1	6	2	100	2	100	2
P	80	10	60	18	60	6	70	2	70	9	270	60	300	1	9	0	550	70	450	30
Q	30	3	9	4	9	1	10	3	140	20	390	40	50	10	4	0	50	7	60	20
R	950	330	700	220	150	10	100	30	1300	290	1340	910	80	30	100	9	960	70	930	40
S	170	16	90	9	260	20	160	20	330	70	1900	980	190	1	60	5	4030	240	3010	140

C

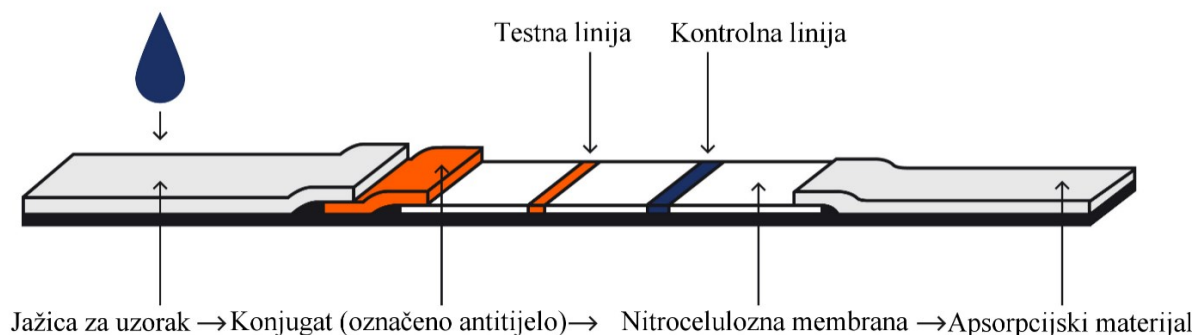
	Ab 1		Ab 2		Ab 3		Ab 4		Ab 5		Ab 6		Ab 7		Ab 8		Ab 9		Ab 10	
	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2	Mean	Rng/2
	9	2	10	0.2	1	0.2	6	1	360	31	650	334	50	0.7	20	1	610	52	550	69
RA	20	3	7	1	2	1	9	1	70	3	190	52	50	5	7	0.7	240	35	110	28
RB	15	1	10	1	3	1	20	3	520	73	850	52	120	35	4	0.5	190	54	160	42
RC	20	4	7	1	1	0.1	10	NE	180	53	550	218	70	5	7	2	150	7	210	42
RD	10	NE	10	5	5	1	5	0.1	340	13	540	20	70	10	4	1	100	10	150	17
RE	4	0	3	0.4	30	0.4	4	0	70	NE	90	NE	50	1	1	0.5	120	3	160	4
RF	8	1	5	0.1	10	2	5	0.1	20	8	70	18	30	5	0.4	0.1	10	0.2	8	1
FA	8	4	1	0.7	10	3	0.3	0.2	50	12	80	NE	20	4	0	0	5	1	6	2
FB																				

Tablica 5. Varijacija rezultata različitih kompetitivnih ELISA testova ²⁶.

Panda i sur²⁶ testirali su 20 pšeničnih piva, 20 ječmenih piva, 6 ječmenih piva sa smanjenom koncentracijom glutena i 2 bezglutenska piva s 10 različitih testova koji koriste šest različitih antitijela od kojih su neka korištena više puta u različitim koncentracijama. Rezultati ovoga istraživanja u $\mu\text{g/kg}$ prikazani su u tablici 5 (WA-WT: pšenična piva, A-T: ječmena piva, RA-RF: ječmena piva sa smanjenom koncentracijom glutena, FA i FB: bezglutenska piva). Ovi rezultati ukazuju na vrlo visoku varijaciju u vezanju hidroliziranih glutenskih peptida između antitijela; mnoga antitijela pokazala su znatno niže koncentracije glutena u pšeničnim i ječmenim pivima od očekivanih (Ab3-5: R5 antitijelo i Ab7: 2D4 antitijelo) dok su neka antitijela pokazala puno bolju mogućnost vezanja hidroliziranih glutenskih peptida (Ab6: USDA antitijelo i Ab9 i Ab10: Skerritt antitijelo). Ova razlika bila je najuočljivija u testovima na ječmenom pivu sa smanjenom koncentracijom glutena gdje su samo antitijela 5, 6, 9 i 10 prepoznala značajne koncentracije glutena u uzorku.²⁶

4.2. LFIA

Jedna od često korištenih imunokromatografskih metoda je imunološki test s bočnim protokom (eng. lateral flow immunoassay, LFIA) je vrlo jednostavna i brza metoda koja se često koristi za određivanje glutena izvan laboratorijskih uvjeta. Glavni nedostatak ove metode je potpuna nemogućnost kvantifikacije rezultata. Ova metoda također ima dvije vrste: sendvič metoda i kompetitivna metoda. Slika 6 prikazuje najvažnije dijelove LFIA testne pločice.²⁷



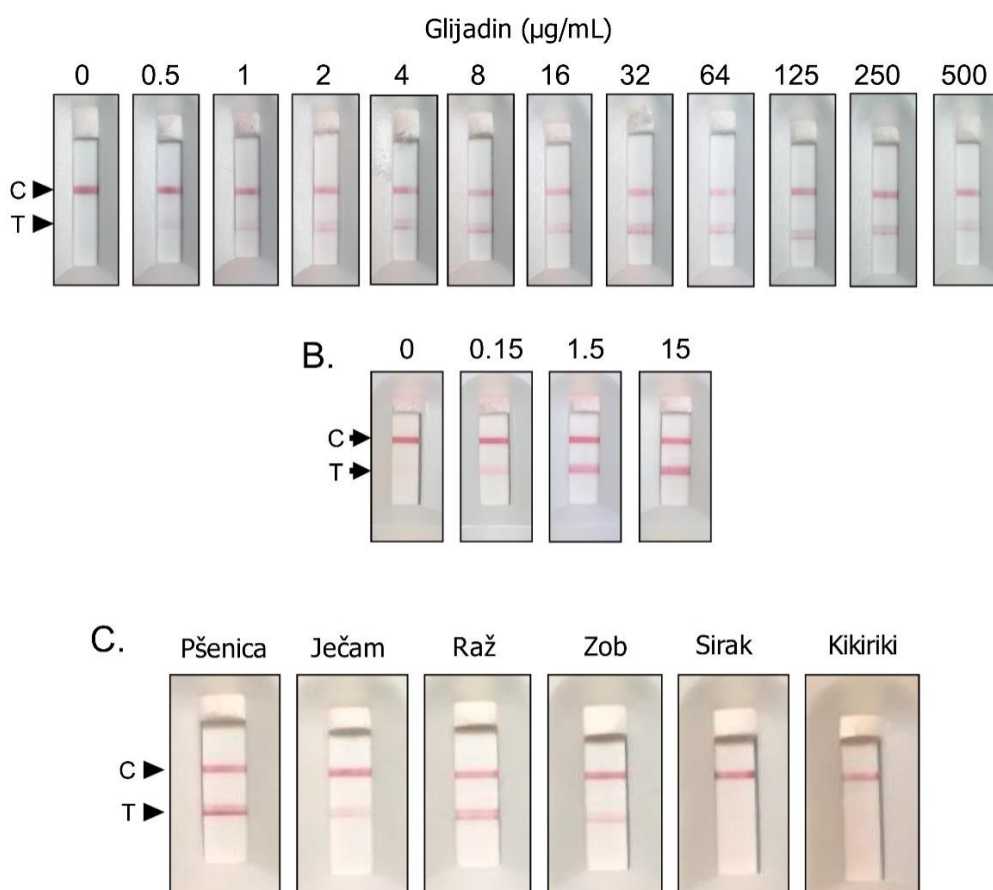
Slika 6. Dijelovi testne pločice LFIA (preuzeto i prilagođeno iz ²⁷).

Glavna razlika između sendvič i kompetitivne metoda je u tome što se nalazi u konjugatu, a što na testnoj liniji. U sendvič metodi se na testnoj liniji nalazi imobilizirano antitijelo isto kao u

sendvič ELISA metodi, a konjugat je označeno antitijelo (najčešće nanočesticama zlata koje daju vrlo vidljivu crvenu boju) koje se veže na drugi dio traženog peptida i teče kroz pločicu zajedno s uzorkom. U obje metode na kontrolnoj se liniji nalazi mješavina vrlo nespecifičnih antitijela koja potvrđuju da je test ispravno izveden.²⁸ U slučaju da se u uzorku nalazi traženi peptid on će se vezati na označeno antitijelo pri prolasku kroz konjugat i zatim na imobilizirano antitijelo na testnoj liniji čime dobivamo pozitivni rezultat. U slučaju da u uzorku nema glutena označena antitijela neće se vezati na testnu liniju i na njoj neće doći do promijene boje. Ova metoda gotovo se uvijek koristi za detekciju glutena zbog svoje veće točnosti i znatno niže minimalne koncentracije traženog peptida u uzorku. Nedostaci ove metode slični su nedostacima sendvič ELISA metode: viša cijena zbog korištenja dva različita antitijela i nemogućnost prepoznavanja hidroliziranih glutenskih peptida.

Kompetitivna metoda razlikuje se od sendvič metode po tome što se na testnoj liniji nalazi imobilizirani peptid za koji se označena antitijela vežu u slučaju da ga u uzorku nema; zbog toga u ovoj metodi promjena boje na testnoj liniji znači da u uzorku nema traženog peptida. U slučaju da u uzorku imamo traženi peptid on će se pri prolasku kroz konjugat vezati za označena antitijela čime će im onemogućiti vezanje za imobilizirani peptid na testnoj liniji, zbog toga na testnoj liniji neće doći do promijene boje. Ova metoda znatno je manje točna i ima veću minimalnu koncentraciju traženog peptida u uzorku. Zbog toga se ne koriste za detekciju glutena, već samo za detekciju vrlo malih molekula za koje se ne može koristiti sendvič metoda.²⁷

Hnasko i sur.²⁹ istražili su sposobnost sendvič LFIA metode u prepoznavanju glutena u vrlo razrijeđenim uzorcima pšeničnog brašna s koncentracijama od 0,5-500 µg/mL s vremenom testiranja od 3 minute (A) i 0,15-15 µg/mL s vremenom testiranja od 5 minuta (B). Test je uspješno vezao gluten u svakom uzorku sa slabo vidljivom promjenom boje pri najmanjim koncentracijama, no već pri 1,5 µg/mL promjena boje bila je vrlo lako uočljiva. Istražena je i sposobnost testa u prepoznavanju glutena u drugim brašnima pri koncentraciji od 50 u čemu je test također bio uspješan (C). Pri testiranju zobnog brašna koje je imalo bezglutensku oznaku dobiven je pozitivan rezultat što ukazuje na kontaminaciju ovog brašna u procesu proizvodnje. Svi rezultati ovoga istraživanja prikazani su na slici 7.²⁹

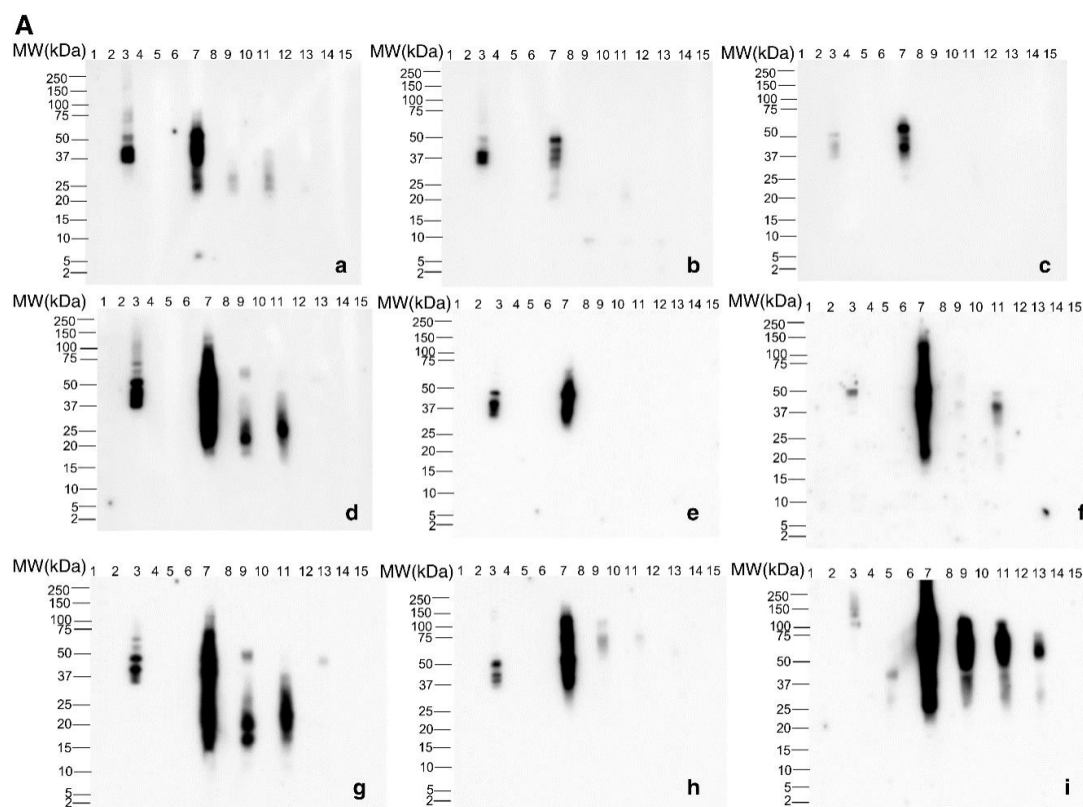


Slika 7. Točnost sendvič LFIA metode (preuzeto i prilagođeno iz ²⁹).

4.3. Western blot

Western blot ili proteinski imunoblot je vrlo osjetljiva metoda koja može detektirati vrlo male koncentracije traženog proteina i djelomično ih kvantificirati, no koristi se vrlo skupim i kompleksnim uređajima. Ova metoda koristi se dvama koracima za detekciju traženog proteina: elektroforezom u gelu i vezanjem za antitijelo. Prije elektroforeze u gelu smjesa proteina poznate koncentracije otopi se u glicerolu i denaturira zagrijavanjem, nakon toga se proteini prenesu u poliakrilamidni gel na kojem se odvija elektroforeza koja razdvaja proteine u ovisnosti o njihovoj molekularnoj masi. Nakon toga proteini se iz gela prebacuju na membranu od polivinilidenfluorida ili nitroceluloze; ovo prenošenje ubrzava se stvaranjem električnog polja između gela i membrane. Nakon toga, kako bi se spriječilo vezanje antitijela za membranu, ona se mora natopiti u razrijeđenom proteinu, najčešće se koristi mlijeko u prahu ili albumin goveđeg seruma. Potom se na membranu doda antitijelo koje se veže za traženi

protein i inkubira. Membrana se zatim ispere i na nju se doda sekundarno antitijelo koje je označeno enzimom (koriste se isti enzimi kao i za ELISA metodu) i veže se na prvo antitijelo. Višak sekundarnog antitijela se ispere i doda se supstrat. Ovom metodom dobije se dvodimenzionalna ploča na kojoj će se, u slučaju da se u uzorku nalazi traženi peptid, nalaziti obojane mrlje. Debljina mrlje u odnosu na smjer u kojemu je provedena elektroforeza u gelu pokazuje varijaciju molekulske mase detektiranog proteina, a debljina u drugome smjeru ukazuje na relativnu koncentraciju tog proteina u uzorku. Ova metoda najčešće se koristi za usporedbu rezultata s drugim metodama kako bi se provjerila točnost tih metoda.³⁰ Na slici 8 nalaze se vizualizirani rezultati Western blot metode iz istraživanja Panda. i Garber u sposobnost ove metode u prepoznavanju hidroliziranog glutena u pivu. Prikazani su rezultati dobiveni testiranjem 5 ječmenih piva (stupci 5, 7, 9, 11 i 13), bezglutenskog piva (stupac 15) i otopine glutena koncentracije 2.5 µg/mL (stupac 3) pomoću 9 različitih antitijela.³¹



Slika 8. Rezultati western blot metode u detekciji glutena u pivu ³¹.

4.4. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija vrlo je pouzdana i točna metoda za detekciju manjih molekula, no tek u prijašnjih 10 godina počela se istraživati njena sposobnost detekcije većih molekula poput glutena. Budući da masena spektrometrija ne može pouzdano detektirati velike molekule u istraživanjima u sposobnost ove metode detektirali su se kratki sljedovi aminokiselina specifični za gluten SRM (engl. selective reaction monitoring) metodom.³² Ova metoda zasniva se na praćenju raspada specifičnog iona koji nastaje raspadom tražene molekule; kako bi se ona mogla izvesti i ion koji nastaje raspadom tražene molekule i ioni koji nastaju njegovim raspadom moraju biti specifični za traženu molekulu.³³

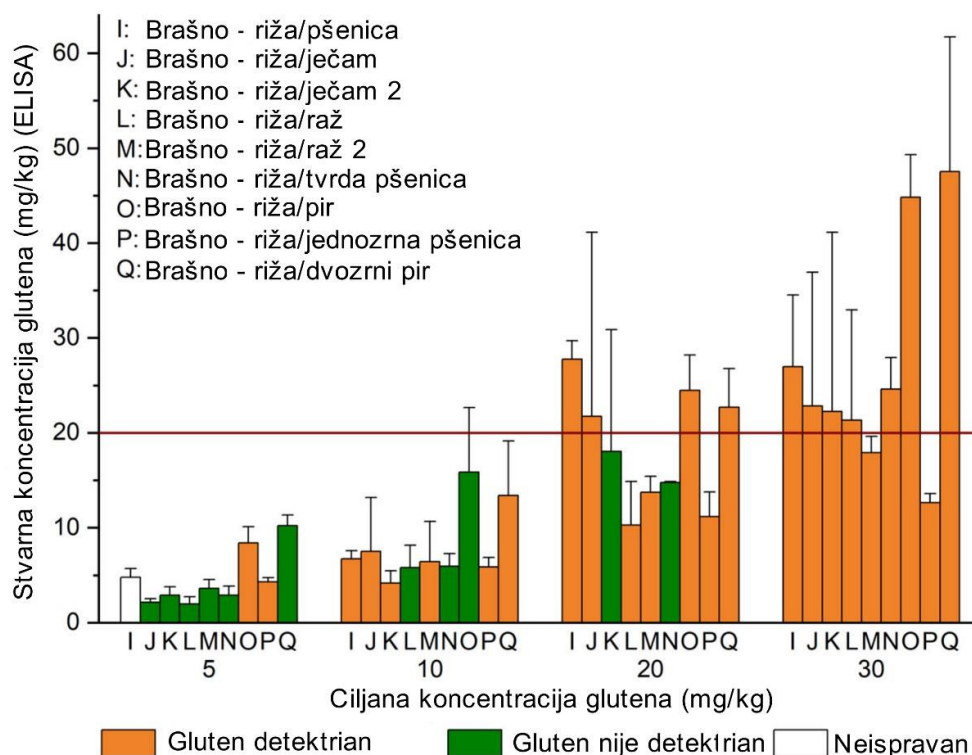
Kako bi dobili sljedove proteina tražene duljine, glutenski lanac se mora razdvojiti na ponovljiv način, ovo se najčešće postigne simulacijom probave glutena tripsinom ili kimotripsinom. Dobiveni peptidi se zatim razdvoje tekućinskom kromatografijom iznimno visoke djelotvornosti (engl. Ultra-high-performance liquid chromatography, UHPLC) čime značajno poboljšamo točnost masene spektrometrije. Nakon toga se dobiveni uzorak analizira u masenom spektrometru. Dobivene vrijednosti usporede se s tabličnim vrijednostima za traženi peptid, a koncentracija peptida može se relativno odrediti usporedbom ukupnih ionskih jakosti fragmenata traženog peptida. Glavna prednost ove metode je njena sposobnost detekcije specifičnog glutenskog peptida bez korištenja antitijela; mogućnost detekcije samo jednog peptida ovoj metodi omogućuje izbor između identifikacija točne sorte žitarice iz koje gluten u uzorku potječe korištenjem slijeda aminokiselina specifičnog za tu sortu ili detekciju glutena iz bilo kojeg izvora korištenjem slijeda prisutnom u svim molekulama glutena. Daljnjim razvojem spektrofotometrijskih uređaja ova metoda mogla bi se koristiti za detekciju glutena u laboratorijskim uvjetima, no zbog vrlo visoke cijene ovih uređaja njeno korištenje još je vrlo rijetko.³²

Ogilvie i sur.³² koristila je ovu metodu za detekciju 6 imunogenih glutenskih peptida od 13-33 aminokiseline kako bi otkrila njihove granice detekcije i kvantifikacije. Granice detekcije za testirane peptide iznosili su između 0,027 i 0,161 $\mu\text{g/mL}$, a za koncentracije između 0,5 i 10 $\mu\text{g/mL}$ dobiven je gotovo linearan odnos između koncentracije i vrijednosti dobivene iz ukupnih ionskih jakosti fragmenata ($R > 0.99$).³² Lock je proveo slično istraživanje s većim koncentracijama glutena (5-200 ppm) i također dobio linearan odnos između ovih vrijednosti s koeficijentom korelacije od 0.9944.³⁴

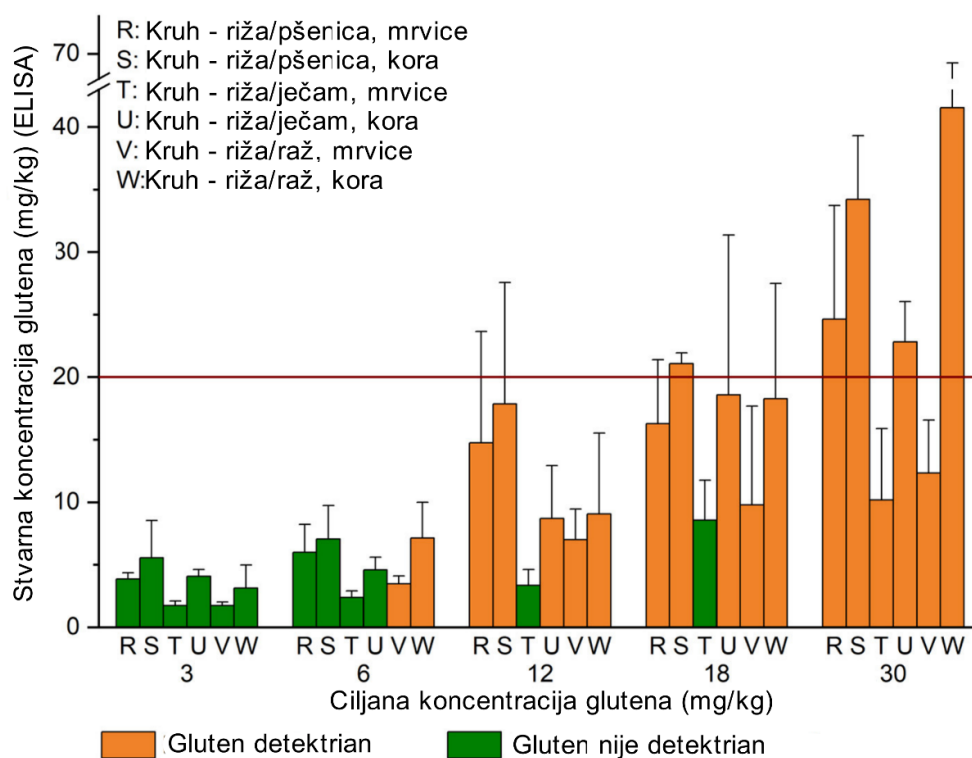
4.5. Prijenosni uređaji

Zbog podizanja svjesnosti o celijakiji u posljednjih 10 godina dolazi do razvoja nekoliko prijenosnih uređaja za detekciju kontaminacije glutena u hrani. Postoji nekoliko većih kompanija koje proizvode ove uređaje, no svi uređaji koriste LFIA metodu i digitalno predstavljaju rezultate. Uređaj koji proizvodi NIMA Partners koristi jednokratne kapsule u kojima se nalazi sve potrebno za izvođenje LFIA metode dok sam uređaj interpretira i prikazuje rezultate. Detekcija glutena odvija se tako što korisnik u jednokratnu kapsulu umetne komadić hrane koju želi testirati i stavi kapsulu u uređaj. Uređaj zatim samelje hranu, otopi ju u ekstrakcijskoj otopini tijekom 30 sekundi i provede detekciju LFIA metodom u trajanju od 2-4 minute. Zbog korištenja LFIA metode ovi uređaji ne mogu kvantificirati već samo daju pozitivan ili negativan rezultat, no zbog znatno veće kompleksnosti ELISA metode, razvitak prijenosnih uređaja koji mogu odrediti točnu koncentraciju glutena u uzorku nije moguć. NIMA Partners jamči detekciju glutena pri koncentracijama većim od 20 ppm s 99% vjerojatnosti, moguću detekciju glutena pri koncentracijama između 2 i 20 ppm i nemogućnost uređaja u detekciji glutena pri koncentracijama manjim od 2 ppm.³⁵

Marići Scerf su istražili sposobnost ovoga uređaja u detekciji glutena u bezglutenskom brašnu i kruhu kontaminiranim glutenom s ciljanim koncentracijama između 3 i 30 ppm. Koncentracija glutena u uzorcima prvo je detektirana ELISA metodom nakon čega su isti uzorci testirani NIMA Partners uređajem. Rezultati istraživanja predstavljeni su na slikama 9 i 10. Ovo istraživanje potvrđuje nepouzdanost uređaja u detekciji glutena pri koncentracijama ispod 20 ppm i ukazuje na gotovo potpunu nemogućnost detekcije glutena pri koncentracijama ispod 10 ppm.³⁵ Zhang i sur.³⁶ istražili su točnost ovoga uređaja koristeći ga za detekciju mnogih tipičnih bezglutenskih jela kao i restoranskih obroka kontaminirajući ih glutenom s ciljanim koncentracijama između 2 i 100 ppm. Rezultati ovoga istraživanja predstavljeni su u tablici 6. Ovo istraživanje ukazuje na zadovoljavajuću točnost uređaja pri detekciji glutena, no korištene koncentracije glutena uglavnom su veće od 20 ppm.³⁶



Slika 9. Detekcija glutena u kontaminiranim brašnima NIMA Partners uređajem (preuzeto i prilagođeno iz ³⁵).



Slika 10. Detekcija glutena u kontaminiranim kruhovima NIMA Partners uređajem (preuzeto i prilagođeno iz ³⁵).

Tablica 6. Točnost NIMA Partners uređaja.³⁶

	%	+/-
Ispravno pozitivan	99.0%	1.2%
Ispravno negativan	92.2%	4.6%
Lažno negativan	1.0%	1.2%
Lažno pozitivan	7.8%	4.6%
Postotak pogreške	6.9%	2.4%
Točnost	96.9%	1.7%

5. Zaključak

Zbog tipičnosti molekule glutena on se pouzdano može detektirati samo metodama koje koriste antitijela ili masenom spektrometrijom. Ove metode često zahtijevaju skupu opremu i zahtjevne procese pripreme ili očitavanja rezultata što znatno ograničava njihovo korištenje. Ovi problemi smanjeni su za metode bez mogućnosti kvantifikacije, a vrlo izraženi za metode koje imaju ovu mogućnost. Jedina metoda koja ima mogućnost određivanja točne koncentracije glutena je ELISA za koju su mnoga istraživanja ukazala na vrlo nisku reproducibilnost posebno za uzorke u kojima je gluten hidroliziran i mora se koristiti kompetitivna metoda; dok ostale metode imaju mogućnost samo relativne kvantifikacije često s niskom točnošću. Masena spektrometrija trenutno je najpouzdanija metoda detekcije glutena i daljnjim istraživanjem specifičnih peptida moguće je izračunavanje kalibracijskih grafova koji bi omogućili apsolutnu kvantifikaciju rezultata, no vrlo visoka cijena ovih uređaja otežava taj proces. Zbog slabog interesa znanstvene zajednice i relativne marginaliziranosti celijakije mnoge od ovih metoda tek su u ranijim stupnjevima razvoja i ne proizvode se masovno. Obzirom na sve veći broj pravodobnog dijagnosticiranja celijakije potreban je razvitak jednostavne i točne metode detekcije glutena u svrhu poboljšanja zdravlja i olakšavanja prehrane oboljelih.

6. Popis literature

1. Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* **24**: 115-119.
2. Kłosok, K. Welc, R. Fornal, E. Nawrocka, A. (2021). Effects of Physical and Chemical Factors on the Structure of Gluten, Gliadins and Glutenins as Studied with Spectroscopic Methods. *Molecules* **26**(2): 508.
3. Rani, M. Sogi, D.S. Gill, B.S. (2021). Characterization of gliadin, secalin and hordein fractions using analytical techniques. *Sci Rep.* **11**.
4. Sheweta, B. Deepak, M. Khatkar, B.S. (2015). Biochemical and Functional Properties of Wheat Gliadins: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **55**(3): 357-368
5. Leffler, D. Green, P. Fasano, A. (2015). Extraintestinal manifestations of coeliac disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**: 561–571
6. Balakireva, A. Zamyatnin Jr, A. (2005). Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities. *Nutrients* **8**: 644.
7. Ciccocioppo, R. Di Sabatino, A. Corazza, G.R. (2005). The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol.* **140**: 408-416.
8. Jabri, B. Ludvig, S.M. (2017). T cells in celiac disease. *J Immunol.* **198**(8): 3005-3014.
9. Anderson, R.P. (2020). Innate and adaptive immunity in celiac disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **36**(6): 470-478.
10. Megiorni, F. Mora, B. Bonamico, M. Barbato, M. Nenna, R. Maiella, G. Lulli, P. Mazzilli, M. (2009). HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Hum. Immunol.* **70**(1): 55-59.
11. Fasano, A. Sapone, A. Zevallos, V. Schuppan, D. (2015). Nonceliac Gluten Sensitivity. *Gastroenterology* **148**(6): 1196-1204.
12. Talipova, D. Smagulova, A. Poddighe, D. (2023). Toll-like Receptors and Celiac Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **24**(1): 265.
13. Moossavi, S. (2014). Gliadin is an uncatalogued Toll-like receptor ligand. *Journal of Medical Hypotheses and Ideas* **8**(1): 44-47.
14. Kim, CY. (2004). Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**(12): 4175-4179.
15. Weenink, S.M. Gautam, A.M. (1997). Antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol. Cell Biol.* **75**: 69-81.
16. Mak, T.W. Saunders, M.E. Jett. B.D. (2014). *Primer to the Immune Response (Second Edition): Chapter 6 - The Major Histocompatibility Complex.* Academic Cell.³

17. Bergseng, E. Xia, J. Kim, C.Y. Khosla, C. Sollid, L.M. (2005). Main Chain Hydrogen Bond Interactions in the Binding of Proline-rich Gluten Peptides to the Celiac Disease-associated HLA-DQ2 Molecule. *J. Biol. Chem.* **280**(23): 21791–21796.
18. Petersen, J. Montserrat, V. Mujico, J.R. Loh, K.L. Beringer, D.X. van Lummel, M. Thompson, A. Mearin, M.L. Schweizer, J. Kooy-Winkelaar, Y, van Bergen, J. Drijfhout, J.W. Kan, W.T. La Gruta, N.L. Anderson, R.P. Reid, H.H. Koning, F. Rossjohn, J. (2014). T-cell receptor recognition of HLA-DQ2–gliadin complexes associated with celiac disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**(5): 480-488.
19. Dahal-Koirala, S. Ciacchi, L. Petersen, J. Risnes, L.F. Neumann, R.S. Christophersen, A. Lundin, K. E.A. Reid, H.H. Qiao, S.W. Rossjohn, J. Sollid, L.M. (2019). Discriminative T-cell receptor recognition of highly homologous HLA-DQ2-bound gluten epitopes. *J. Biol. Chem.* **294**(3): 941-952.
20. Snir, O. Chen, X. Gidoni, M. du Pré, M.F. Zhao, Y. Steinsbø, Ø. Lundin, K.E. Yaari, G. Sollid, L.M. (2017). Stereotyped antibody responses target posttranslationally modified gluten in celiac disease. *JCI Insight* **2**(17): e93961.
21. Janeway, C.A. Travers, P. Walport, M. Shlomchik, M.J. (2001). *Immunobiology*, 5th edition: Part II. The Recognition of Antigen. New York: Garland Science.
22. Garcia-Calvo E. García-García, A. Madrid, R. Martín, R. García, T. (2021). From Polyclonal Sera to Recombinant Antibodies: A Review of Immunological Detection of Gluten in Foodstuff. *Foods* **10**(1): 66-88.
23. Wieser, H. (2008). *Gluten-Free Cereal Products and Beverages: 3 - Detection of gluten.* Academic Cell.
24. MBL Life Science: The principle and method of ELISA.
<https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html>, Pristupljeno kolovoz 2023.
25. Rzychon, M. Brohée, M. Cordeiro, F. Haraszi, R. Ulberth, F. O'Connor, G. (2017). The feasibility of harmonizing gluten ELISA measurements. *Food Chem.* **234**(1): 144-154.
26. Panda, R. Boyer, M. Garber, E. (2017). A multiplex competitive ELISA for the detection and characterization of gluten in fermented-hydrolyzed foods. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**: 6959-6973.
27. Cytiva: Sandwich or competitive format: which is right for your LFA?
<https://www.cytivalifesciences.com/en/us/news-center/lateral-flow-assay-format-sandwich-or-competitive-10001>, Pristupljeno kolovoz 2023.
28. Koczula, K.M. Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays Biochem.* **60**(1): 111-120.

29. Hnasko, R. M. Jackson, E. S. Lin, A. V. Haff, R. P. McGarvey, J. A. (2021). A rapid and sensitive lateral flow immunoassay (LFIA) for the detection of gluten in foods. *Food Chem.* **335**: 129514.
30. Mahmood, T. Yang, P.C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North Am. J. Med. Sci.*, **4(9)**: 429-434.
31. Panda, R. Garber, E. (2019). Western blot analysis of fermented-hydrolyzed foods utilizing gluten-specific antibodies employed in a novel multiplex competitive ELISA. *Anal. Bioanal. Chem.* **411**: 5159-5174.
32. Ogilvie, O. Larsen, N. Sutton, K. Domigan, L. Gerrard, J. Demarais, N. Roberts, S. (2020). A targeted mass spectrometry method for the accurate label-free quantification of immunogenic gluten peptides produced during simulated digestion of food matrices. *MethodsX*, **7**.
33. Proteonomics International: Targeted Mass Spectrometry (MRM/SRM). <https://www.proteomics.com.au/analytical-services/srms-mrm/>, Pristupljeno kolovoz 2023.
34. Lock, S. (2013). Gluten Detection and Speciation by Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Foods* **3(1)**: 13-29.
35. Marić, A. Scherf, K. A (2021). Portable Gluten Sensor for Celiac Disease Patients May Not Always Be Reliable Depending on the Food and the User. *Front. Nutr.* **8021**: 712992.
36. Zhang, J. Portela, S.B. Horrell, J.B. Leung, A. Weitmann, D.R. Artiuch, J.B. Wilson, S. M. Cipriani, M. Slakey, L.K. Burt, A.M. Dias Lourenco, F.J. Spinali, M.S. Ward, J.R. Seit-Nebi, A. Sundvor, S.E. Yates, S.N. (2019). An integrated, accurate, rapid, and economical handheld consumer gluten detector. *Food Chem.* **275**: 446-456.