

---

# Imunohistochemická studie mechanismů apoptózy a proliferace ve sliznici tenkého střeva u celiakální sprue

---

Lísová S.<sup>1</sup>, Ehrmann J.<sup>1</sup>, Kolek A.<sup>2</sup>, Sedláková E.<sup>1</sup>, Kolář Z.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav patologie LF UP a FN, Olomouc

<sup>2</sup>Dětská klinika FN, Olomouc

---

## Souhrn

Mechanismy vedoucí k morfologickým změnám sliznice tenkého střeva při glutenové enteropatii nebyly dosud plně objasněny, ačkoliv se v současné době uvažuje o dvou hlavních mechanismech: remodelaci sliznice matrixovými metaloproteinázami a atrofii sliznice způsobené zvýšenou apoptózou. Cílem naší studie bylo analyzovat expresi proteinů regulujících apoptózu a některých proliferčních markerů ve sliznici tenkého střeva u dětí s aktivní (AC) a latentní formou (LC) celiakální sprue (CS). Pomocí nepřímé imunohistochemie byla u střevních biopsií 43 dětí s aktivní a latentní formou CS detekována a analyzována exprese Fas, Fas ligandy (Fas-L), tkáňové transglutaminázy (tTG), Bcl-2, Bid, glutathion S-transferázy (GST), CAS 3, CAS 8, PARP, Ki-67, Topoisomerázy IIa a PCNA. Nalezli jsme signifikantně nižší hodnoty exprese Fas na enterocytech u pacientů s AC než u pacientů s LC a kontrol. Počet Fas-positivních slizničních lymfocytů byl snížen u AC v porovnání s LC. Expres Fas-L v enterocytech a slizničních lymfocytech byla vyšší u AC a LC v porovnání s kontrolami. Nalezli jsme signifikantně více Bcl-2 negativních lymfocytů u AC než u LC a kontrol. Expres Bid v enterocytech byla vyšší u LC v porovnání s AC a kontrolami. V intraepiteliálních lymfocytech (IEL) byla též vyšší exprese Bid u LC než u AC a kontrol a na rozdíl od lymfocytů lamina propria, kde největší počet buněk exprimujících Bid byl nalezen u kontrol. Expres CAS 8 byla signifikantně vyšší v kryptálních lymfocytech u AC ve srovnání s LC. Expres tTG v extracelulární matrix a bazální membráně byla signifikantně vyšší u LC a AC ve srovnání s kontrolami. Expres tTG byla vyšší ve skupině AC i LC než u kontrol, jak v enterocytech tak i ve slizničních lymfocytech. Naše nálezy ukazují možnost spoluúčasti Fas/Fas-L, Bcl-2 a CAS 8 na regulaci apoptózy u CS. Zvýšená apoptotická eliminace IEL u LC může částečně vysvětlit zachování normální vilózní morfologie střevní sliznice. Zvýšená exprese tTG může být časným znakem zvýšené apoptózy a může být v souladu s její rolí v patogenezi CS.

**Klíčová slova:** celiakie – apoptóza – Fas/Fas-L – CAS 3,8 – PARP

## Summary

### Immunohistochemical Study of the Apoptotic and Proliferative Mechanisms in the Intestinal Mucosa During Coeliac Disease

Mechanisms leading to morphological changes of the small intestine during coeliac disease are not yet completely recognized, however, two main processes have been suggested recently: remodelling of mucosa by matrix metalloproteinases, and mucosal atrophy by apoptosis. The aim of this study was to analyze the expression of proteins regulating apoptosis and some markers of proliferation in the mucosa of the small intestine of children with active (ACD) and latent form (LCD) of coeliac disease (CD). Intestinal biopsies of 43 children with ACD and LCD were analyzed by standard indirect immunohistochemical technique for Fas, Fas ligand (Fas-L), tissue transglutaminase (tTG), Bcl-2, Bid, glutathione S-transferase (GST), CAS 3, CAS 8, PARP, Ki-67, Topoisomerase IIa, PCNA expression. We found significantly lower numbers of Fas-expressing enterocytes in ACD patients than in LCD patients and controls. The number of Fas-positive mucosal lymphocytes was decreased in ACD when compared with LCD. Fas-L expression in enterocytes and mucosal lymphocytes was higher in ACD and LCD compared to controls. We found significantly more Bcl-2 negative lymphocytes in ACD than in LCD and controls. Bid expression in enterocytes was higher in LCD compared to ACD and controls. In intraepithelial lymphocytes, there was higher Bid expression in LCD than in ACD and controls compared to expression in mucosal lymphocytes, where was found higher number of positive cells in controls than in ACD and LCD. Expression of CAS 8 in mucosal lymphocytes was significantly higher in ACD compared to LCD. The expression of tTG in extracellular matrix and basal lamina was significantly higher in LCD and ACD when compared to controls. Expression of tTG was higher in the group of ACD and LCD in the enterocytes and in the lymphocytes. Our findings showed that Fas/Fas-L, Bcl-2, and CAS 8 may be involved in modulation of apoptosis during CD. Increased apoptotic elimination of IEL in LCD can partially explain preservation of the normal villous architecture. Increased tTG

expression may be an early sign of increased apoptosis or may be related to its role in CD pathogenesis.

**Key words:** coeliac disease – apoptosis- Fas/Fas-L – Cas 3,8 – PARP

*Čes.-slov. Patol., 41, 2005, No. 3, p 85–93*

Celiakální sprue (CS) je definována jako celoživotní intolerance lepku (glutenu), přesněji jeho frakce a-gliadinu, u geneticky predisponovaných jedinců, s charakteristickými morfologickými změnami sliznice tenkého střeva. Reálná incidence tohoto onemocnění, zjišťovaná sérologickým skríníngem, je udávána v evropské populaci mezi 1:300 až 1:85 (22). Poškození střevní sliznice vyvolává obvykle malabsorpci s jejími klinickými a biochemickými projevy. Odstranění lepku ze stravy vede k remisi onemocnění a je v současnosti jediným druhem terapie. Mimo typického malabsorpčního syndromu jsou v literatuře uváděny i další závažné komplikace neléčené celiakie, včetně zvýšeného výskytu T lymfomu tenkého střeva, karcinomu jícnu či karcinomu faryngu (11, 12). Diagnostika celiakální sprue je založena na pozitivitě sérologického vyšetření hladiny protilátek proti endomyziu (EMA), popřípadě protilátek proti gliadinu (AGA) nebo retikulínu (ARA) a na histologickém vyhodnocení jejunální sliznice. Morfologické změny jejunální sliznice u celiakie zahrnují zánětlivou infiltraci, remodelaci a atrofii. Mechanismy vedoucí k morfologickým změnám nejsou zatím kompletně prostudovány. Zdá se však, že těchto mechanismů je několik. Lepek je po zpracování ve střevní sliznici předkládán antigen prezentujícími buňkami T lymfocytům, které uvolňují zánětlivé mediátory. Ty stimulují mimo jiné tvorbu metaloproteináz, které se významnou měrou podílejí na remodelaci střevní sliznice (47). Je též diskutována role zvýšené permeability střevního epitelu a role defektního zpracování lepku enterocyty (31, 32, 45, 56, 57). Účast na rozvoji slizničních změn mají také mechanismy programované buněčné smrti – apoptózy. U neléčené celiakie již byla prokázána vystupňovaná apoptóza enterocytů, zprostředkovaná cytotoxickými T lymfocyty v lamina propria i intraepiteliálními lymfocyty dráhou perforinu/granzymu B (7, 24, 40, 51). Efekt perforinu může být modulován některými členy rodiny Bcl-2, které regulují apoptózu změnou permeability mitochondriální membrány i dalšími proteiny, jako například glutathion S-transferázou (GST), (17, 18). Dalším z klíčových proteinů uplatňujících se v patogenezi CS (39, 41, 42, 53) a zároveň jedním z časných indikátorů apoptózy je tkáňová transglutamináza (tTG) (1, 2, 49). Tkáňová transglutamináza se podílí na deamidaci gliadinových peptidů, s nimiž tvoří komplexy, které při rozvoji zánětlivé odpovědi zprostředkované specifickými T lymfocyty

fungují jako autoantigeny. Tyto komplexy byly též prokázány v extracelulární matrix a bazální membráně střevního epitelu (31, 32, 45, 53, 56, 57). Apoptóza enterocytů zprostředkovaná cytotoxickými T lymfocyty je aktivovaná z významné části interakcí Fas a Fas ligandy (Fas-L). Dosud nebyla provedena komplexnější studie zabývající se analýzou exprese těchto znaků účastnících se apoptózy. Provedli jsme proto analýzu exprese proteinů Fas, Fas-L, tkáňové transglutaminázy (tTG), glutathion S-transferázy (GST), perforinu, kaspázy 3 a 8 (CAS-3, CAS-8), PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) a proteinů Bcl-2, Bid, proliferčních markerů Ki-67, topoizomerázy IIa a PCNA v jejunální sliznici nemocných s rozvinutou, latentní a potenciální formou celiakie a u kontrolní skupiny, s cílem přispět k detailnějšímu poznání mechanismů podílejících se na remodelaci sliznice tenkého střeva u nemocných s celiakální sprue. Vzorky jsme dále vyšetřili i metodou TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) na přítomnost fragmentované DNA v buňkách.

---

## Materiál a metody

---

V našem souboru bylo celkem 64 střevních biopsií od pacientů vyšetřovaných na Dětské klinice LF UP a Fakultní nemocnice v Olomouci, v období 1997–2000. Celiakální sprue byla diagnostikována ve shodě s revidovanými kritérii ESPGAN (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) (59). Aktivní, potenciální a latentní forma celiakie byly klasifikovány na základě návrhu Fergusona a spol (14). V naší studii jsme měli celkem 25 dětí s aktivní neléčenou formou celiakie (AC), v průměrném věku 7,5 let; u všech byly pozorovány klinické projevy malabsorpčního syndromu (průjmy, opoždění růstu, váhový úbytek, atd.). Histologické vyšetření prokázalo subtotální nebo totální atrofii střevní sliznice Marsh 3b nebo 3c, dle modifikované Marshovy histopatologické klasifikace (26) a u všech byla prokázána pozitivita antiendomyziálních protilátek (EMA). Ve skupině s latentní formou celiakie (LC) bylo 18 dětí, v průměrném věku 10,9 let, u kterých byla potvrzena expozice lepkem alespoň po dobu 3 měsíců. U všech byla prokázána pozitivita EMA; u 7 pacientů byla zjištěna normální morfologie jejunální sliznice (Marsh 0), u 11 bylo zjištěno více

než 40 intraepiteliálních lymfocytů na 100 enterocytů (Marsh 1), u všech byla přítomnost HLA alely DQ. Skupinu kontrol tvořilo 21 dětí v průměrném věku 7,6 let. Při histologickém vyšetření byla zjištěna normální morfologie jejunální sliznice (Marsh 0), u všech byly EMA negativní; střevní biopsie u této skupiny pacientů byla indikována pro nespecifické gastrointestinální symptomy. Průkaz protilátek IgA proti endomyziu v séru byl prováděn semikvantitativně nepřímou imunofluorescencí. Vzorky jejunální sliznice byly získány biopsicky sukční kapslí nebo endoskopicky, fixovány ve formalínu po dobu 24 hodin a zality do parafínu. Řezy o síle 5 mm byly umístěny na silanizovaná skla. K detekci všech prokazovaných markerů apoptózy a proliferace byla použita standardní nepřímá imunohistochemická technika s užitím primárních polyklonálních protilátek: anti-Fas (C 20, Santa Cruz, California, USA), anti-Fas-L (N 20, Santa Cruz), anti-CAS-3 (CPP 32, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), anti-CAS-8 (H134, Santa Cruz), anti-Bid (N19, Santa Cruz) a primárních monoklonálních protilátek: anti-Bcl-2 (klon 124, Dako Glostrup, Denmark), anti-GST (klon 353-10, Dako), anti-tTG (klon CUB 7402, Dako), anti-PARP (klon F2, Santa Cruz), anti-topoizomeraza IIa (klon SWT3D1, Dako), anti-Ki-67 (klon

MIB1, Dako). K detekci byly dále použity biotinylované sekundární protilátky a streptavidin konjugovaný s peroxidázou (Dako nebo Novocastra). U negativních kontrol byly primární protilátky vynesány. Expres sledovaných proteinů byla hodnocena v enterocytech na apexech klků i v kryptách, u lymfocytů lamina propria (LPL) a intraepiteliálních lymfocytů (IEL). V bazální membráně (BM) byla zjišťována přítomnost tTG. Stupeň imunopozitivity vyšetřovaných proteinů byl hodnocen semikvantitativně při 400násobném zvětšení v následujícím rozmezí: 0 = méně než 11 % pozitivních buněk, 1 = 11–29 % pozitivních buněk, 2 = 30 až 59 % pozitivních buněk, 3 = více než 60 % pozitivních buněk. Dále byla hodnocena intenzita positivity ve stupnici 1–3 (1 – mírná, 2 – střední, 3 – vysoká pozitivita); součinem těchto dvou veličin bylo vypočítáno histoscore (škála 0–9). Objektivita semikvantitativního vyhodnocování byla dále porovnána s výsledky vyhodnocení exprese Fas a Fas-L při použití systému počítačové analýzy obrazu LUCIA M (Laboratory Imaging, Praha). Srovnání exprese analyzovaných proteinů mezi aktivní celiakii, skupinou latentní a potenciální formy celiakie a kontrolami bylo provedeno chí-kvadrát testy a pomocí dvojcestné analýzy rozptylu s hladinou významnosti 0,05.

**Tab. 1.** Výsledky imunohistochemického vyšetření markerů apoptózy

		aktivní celiakie (AC) (%)	latentní celiakie (LC) (%)	kontroly (K) (%)	AC/K p≤	AC/LC p≤	LC/K p≤
<b>Fas</b>	enterocyty	6,7	80	81	0,0000001	0,00002	nesignifikantní
	glykokalyx	2,4	32,3	53,3	0,014		
	slizniční lymfocyty	6,7	60	9,5	nesignifikantní	0,004	0,007
<b>Fas-L</b>	enterocyty apex	90,5	100	100			nesignifikantní
	enterocyty krypt	100	80	42,9	0,002	nesignifikantní	nesignifikantní
	LPL apex	100	90	66,7			nesignifikantní
	LPL krypt	100	70	28,6	0,0001	nesignifikantní	nesignifikantní
<b>Bcl-2</b>	LPL apex	7,1	22,2	4,8			nesignifikantní
	LPL krypt	0	77,8	66,7	0,0001	0,0004	nesignifikantní
<b>Bid</b>	enterocyty apex	74	84,4	70,6			nesignifikantní
	enterocyty krypt	46	62,5	25,5	0,001	0,024	0,002
	LPL apex	86	68,7	35,3	0,000001	nesignifikantní	0,004
	LPL krypt	50	46,9	21,6	0,005	nesignifikantní	0,015
	IEL apex	12	34,4	7,9	nesignifikantní	nesignifikantní	0,009
	IEL krypt	4	12,5	4			nesignifikantní
<b>Perforin</b>	enterocyty apex	92	100	96,3			nesignifikantní
	enterocyty krypt	80	85	74			nesignifikantní
	lymfocyty apex	88	90	88,9			nesignifikantní
	lymfocyty krypt	92	85	84,2			nesignifikantní
	IEL apex	82	70	81,5			nesignifikantní
	IEL krypt	72	45	74,1			nesignifikantní

**Tab. 2.** Výsledky imunohistochemického vyšetření markerů apoptózy

		aktivní celiakie (AC) (%)	latentní celiakie (LC) (%)	kontroly (K) (%)	AC/K p≤	AC/LC p≤	LC/K p≤
<b>CAS-8</b>	enterocyty apex	93,8	90,6	100		nesignifikantní	
	enterocyty krypt	93,8	75	88	nesignifikantní	0,017	nesignifikantní
	LPL apex	79,2	78,1	92		nesignifikantní	
	LPL krypt	70,8	71,9	92	0,007	nesignifikantní	0,015
	IEL apex	72,9	31,3	74	nesignifikantní	0,0002	0,0001
	IEL krypt	58,3	12,5	42	nesignifikantní	0,00004	0,005
<b>CAS-3</b>	enterocyty apex	92	82,8	93,9		nesignifikantní	
	enterocyty krypt	94	82,8	89,8		nesignifikantní	
	lymfocyty apex	76	72,4	77,6		nesignifikantní	
	lymfocyty krypt	56	58,6	63,3		nesignifikantní	
	IEL apex	74	58,6	46,9	0,006	nesignifikantní	nesignifikantní
	IEL krypt	46	24,1	8,2	0,00002	nesignifikantní	nesignifikantní
<b>tTG</b>	enterocyty	33,3	22,2	14,3		nesignifikantní	
	slizniční lymfocyty	20	11,1	0		nesignifikantní	
	bazální membrána	33,3	66,7	38,1		nesignifikantní	
<b>GST</b>	enterocyty	6,7	33,3	4,8		nesignifikantní	
	slizniční lymfocyty	6,7	11,1	0		nesignifikantní	
<b>PARP</b>	enterocyty apex	48	53,2	46,7		nesignifikantní	
	enterocyty krypt	80	87,5	81,6		nesignifikantní	
	lymfocyty apex	40	65,7	55,3		nesignifikantní	
	lymfocyty krypt	56	68,8	63,3		nesignifikantní	
	IEL apex	28	25	20,4		nesignifikantní	
	IEL krypt	30	3,1	14,2	nesignifikantní	0,011	nesignifikantní

## Výsledky

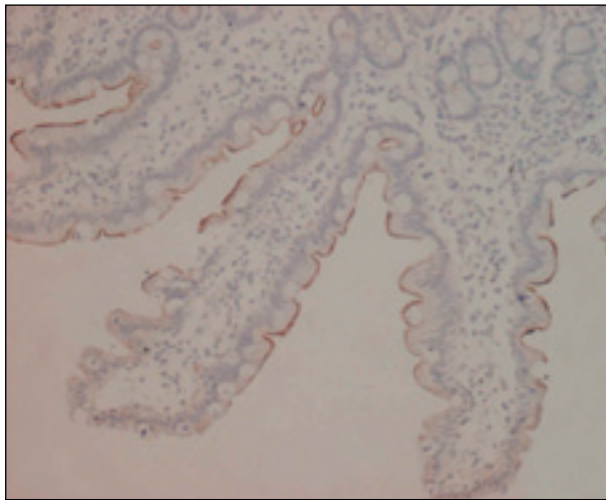
Ve všech vyšetřovaných skupinách byla exprese proteinu Fas v enterocytech vyšší v kryptách, než v horní části klků. Procento Fas pozitivních enterocytů bylo signifikantně nižší u nemocných s AC (6,7 %) ve srovnání s kontrolami (81 %) ( $p \leq 0,0000001$ ) a LC (80 %) ( $p \leq 0,00002$ ). Obdobných výsledků jsme dosáhli i při hodnocení Fas-pozitivity glykokalyxu, která byla u AC pacientů 2,4 % avšak u LC pacientů 32,3 % a u kontrol 53,3 % ( $p \leq 0,014$ ) (obr. 1). Procento Fas pozitivních lymfocytů infiltrujících lamina propria bylo u AC signifikantně nižší (6,7 %;  $p \leq 0,004$ ) ve srovnání s LC (60 %) (tab. 1).

Procento Fas-L pozitivních enterocytů v apikálních částech klků bylo u všech skupin vyšší než 90 %. V kryptálních enterocytech byla Fas-L signifikantně vyšší ( $p \leq 0,002$ ) u AC (100 %), než u kontrol (42,9 %). Expresí Fas-L v cytoplazmě enterocytů měla typicky granulárně/mikrovезikulární charakter (obr. 2). Procento slizničních lymfocytů exprimujících Fas-L bylo signifikantně vyšší ( $p \leq 0,0001$ ) u AC (100 %) ve srovnání s kontrolami (28,6 %) (tab. 1).

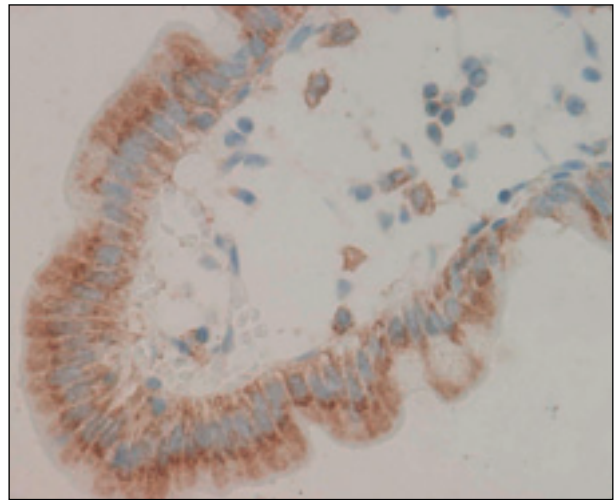
Nalezli jsme signifikantně více Bcl-2 negativních lymfocytů ve skupině s AC (100 %) než u LC (22,2 %) ( $p \leq 0,0001$ ) a u kontrol (33,3 %) ( $p \leq 0,0004$ ) (obr. 3). Expresí Bid byla nejvyšší v kryptálních enterocytech nemocných s LC (62,5 %), ve srovnání s AC (46 %) ( $p \leq 0,024$ ) a kontrolami (25,5 %) ( $p \leq 0,001$ ). V LPL byla nejnížší exprese Bid zjištěna u kontrol (21,6 %) v porovnání s AC (50 %) ( $p \leq 0,005$ ) a s LC (46,9 %) ( $p \leq 0,015$ ) (obr. 4). V IEL byla zjištěna vyšší přítomnost Bid (34,4 %) u LC ve srovnání s AC (12 %) ( $p \leq 0,046$ ) a kontrolami (7,9 %) ( $p \leq 0,009$ ) (tab. 1).

Expresí CAS-8 byla v kryptálních enterocytech signifikantně vyšší u AC (93,8 %) ve srovnání s LC (75 %) ( $p \leq 0,017$ ). V IEL byla exprese CAS-8 nejnížší u LC (12,5 %) v porovnání s kontrolami (42 %) ( $p \leq 0,005$ ) a AC (58,3 %) ( $p \leq 0,00004$ ). Expresí CAS-3 v kryptálních enterocytech byla nesignifikantně vyšší u AC (94 %) v porovnání s kontrolami a LC (89,8 %; 82,8 %), v LPL nebyly mezi vyšetřovanými skupinami zjištěny významné rozdíly. Expresí CAS 3 v IEL byla signifikantně vyšší u AC (46 %), než u LC (24,1 %) ( $p \leq 0,054$ ) a kontrol (8,2 %) ( $p \leq 0,00002$ ) (tab. 2).

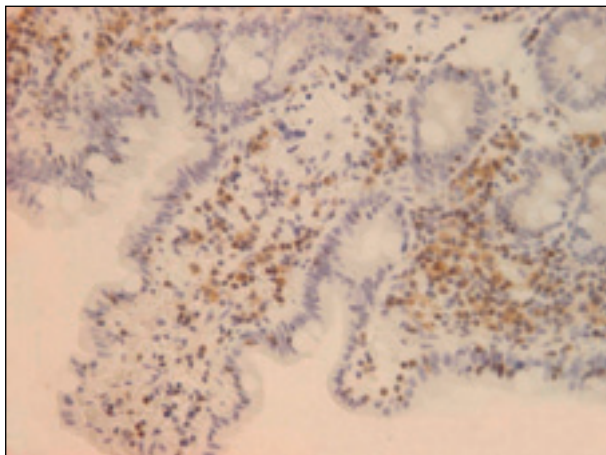
Expresí tTG v enterocytech byla nesignifikantně vyšší u AC (33,3 %) a u LC (22,2 %) ve



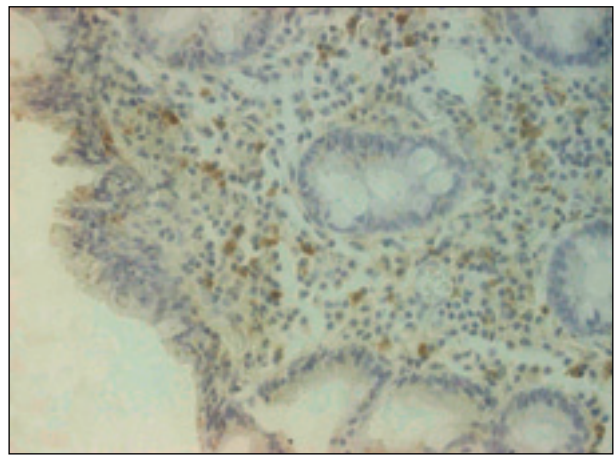
Obr. 1. Pozitivita Fas-proteinu v glykokalyxu



Obr. 2. Expresse Fas-L (granulárně/mikrovezikulární) v cytoplasmě enterocytů



Obr. 3. Expresse Bcl-2 ve slizničních lymfocytech u kontrol



Obr. 4. Expresse Bid v enterocytech a lymfocytech u AC

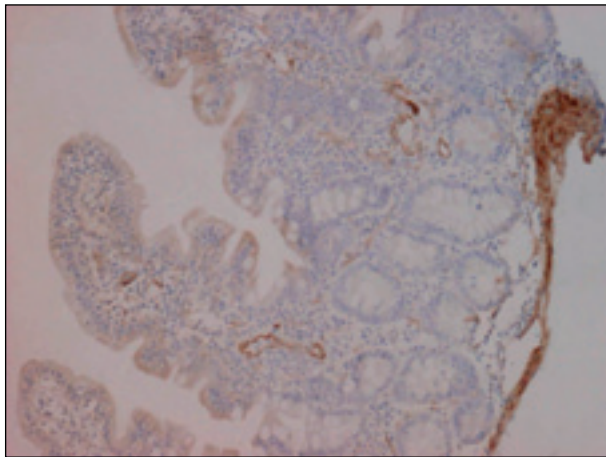
srovnání s kontrolami (14,3 %). Pozitivita tTG ve slizničních lymfocytech byla nesignifikantně vyšší u AC (20 %) a u LC (11,1 %) než u kontrol (0 %). V extracelulární matrix a bazální membráně byla exprese tTG nesignifikantně vyšší u LC (66,7 %) než u AC (33,3 %) a u kontrol (38,1 %) (obr. 5). Při zjišťování pozitivitu GST v enterocytech a slizničních lymfocytech byly zjištěny nejvyšší hodnoty u LC (33,3 % pozitivních enterocytů a 11,1 % pozitivních lymfocytů) (obr. 6), signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami však zjištěny nebyly (tab. 2).

Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v expresi PARP v enterocytech, ale tato byla ve všech skupinách vyšší v kryptách (80–87,5 %), než na vrcholech klků (obr. 7). V lymfocytech lamina propria byly zjištěny hodnoty u AC 56 %, u LC 68,8 % a u kontrol 63,3 %. Expresse PARP byla zjištěna nejvyšší u enterocytů i lymfocytů LP u LC (87,5 % a 68,8 %), nejnižší u rozvinuté for-

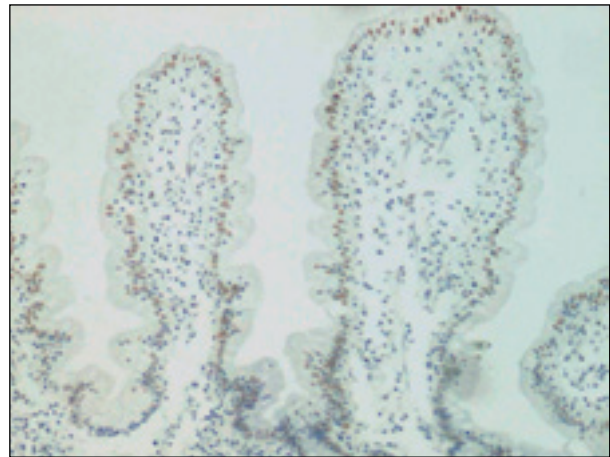
my celiakie (80 % a 56 %). V IEL byla exprese PARP u skupiny latentní celiakie (3,1 %) signifikantně nižší než u AC (30 %) ( $p \leq 0,011$ ) (tab. 2).

Při zjišťování proliferační aktivity pomocí proteinu Ki-67 u enterocytů krypt byly zjištěny nesignifikantně vyšší hodnoty u LC, v porovnání s AC a kontrolami. U LPL byla zjištěna signifikantně vyšší exprese Ki-67 u AC (81 %) v porovnání s LC (41,7 %) ( $p \leq 0,013$ ) a kontrolami (36 %) ( $p \leq 0,004$ ). Expresse Ki-67 u IEL byla signifikantně zvýšena u AC (38,1 %) ( $p \leq 0,003$ ) i LC (33,3 %) ( $p \leq 0,007$ ), než u kontrol (0 %) (tab. 3).

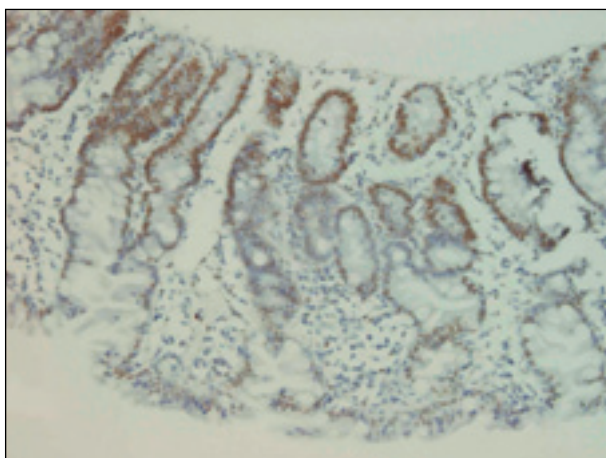
Při zjišťování proliferační aktivity pomocí sledování exprese proteinu topoizomerázy II $\alpha$  jsme nezjistili významné rozdíly v expresi tohoto proteinu v enterocytech ani v LPL u jednotlivých skupin (obr. 8). U IEL byly signifikantně vyšší hodnoty zjištěny u LC (71,4 %) v porovnání s kontrolami (21,7 %) ( $p \leq 0,004$ ) a AC (38,4 %) ( $p \leq 0,007$ ) (tab. 3).



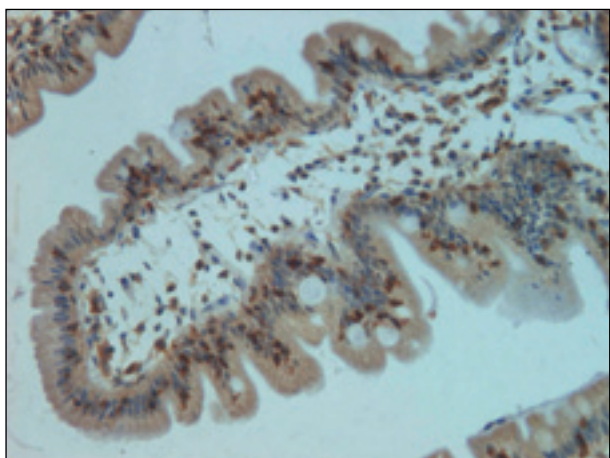
Obr. 5. Expresie tTG v extracelulární matrix a bazální membráně u LC



Obr. 6. Expresie glutation S-transferázy (GST) v enterocytech u LC



Obr. 7. Vyšší exprese PARP v enterocytech krypt než v superficiálních částech sliznice u AC



Obr. 8. Expresie topoizomerázy II $\alpha$  v enterocytech a lymfocytech u LC

Tab. 3. Výsledky imunohistochemického vyšetření markerů proliferace

		aktivní celiakie (AC) (%)	latentní celiakie (LC) (%)	kontroly (K) (%)	AC/K p $\leq$	AC/LC p $\leq$	LC/K p $\leq$
<b>Ki-67</b>	enterocyty apex	28,5	8,4	16	nesignifikantní		
	enterocyty krypt	80,9	100	88	nesignifikantní		
	lymfocyty apex	81	41,7	36	0,004	0,013	nesignifikantní
	lymfocyty krypt	76,2	41,6	40	nesignifikantní		
	IEL apex	38,1	33,3	0	0,003	nesignifikantní	0,007
	IEL krypt	9,5	4,2	0	nesignifikantní		
<b>PCNA</b>							
<b>PCNA</b>	enterocyty apex	79,1	48	56	nesignifikantní		
	enterocyty krypt	95,8	68	76	nesignifikantní	0,012	nesignifikantní
	lymfocyty apex	70,8	28	36	0,022	0,006	nesignifikantní
	lymfocyty krypt	75	28	40	0,036	0,004	nesignifikantní
	IEL apex	37,5	0	0	0,003	0,003	nesignifikantní
	IEL krypt	20,8	0	0	nesignifikantní	nesignifikantní	nesignifikantní
<b>Topoizomeraza II<math>\alpha</math></b>							
<b>Topoizomeraza II<math>\alpha</math></b>	enterocyty apex	30,8	42,8	17,3	nesignifikantní		
	enterocyty krypt	88,5	80,9	100	nesignifikantní		
	lymfocyty apex	61,6	61,9	43,4	nesignifikantní		
	lymfocyty krypt	57,7	61,9	47,8	nesignifikantní		
	IEL apex	38,4	71,4	21,7	nesignifikantní	0,007	0,004
	IEL krypt	30,7	9,6	0	0,015	nesignifikantní	nesignifikantní

Mechanismy vedoucí k rozvoji slizniční atrofie u celiakie nejsou ještě plně objasněny, ale zdá se, že v tomto procesu má důležité místo remodelace matrixovými metaloproteinázami a vystupňovaná apoptóza enterocytů (6, 34, 47). Tkáňová transglutamináza (tTG) je v současnosti řazena mezi hlavní efektoři programované buněčné smrti a její průkaz může sloužit jako indikátor připravenosti k apoptóze (39, 42, 53). U celiakie je tTG také považována za univerzální autoantigen, který je cílem cytotoxických T-lymfocytů (41). V naší studii jsme našli vyšší expresi tTG v bazální membráně střevní sliznice u pacientů s latentní formou celiakie, což může podporovat hypotézu o její významné roli v patogenezi tohoto onemocnění (5, 10). Zvýšenou expresi tTG jsme prokázali i v enterocytech u aktivní a v menší míře i latentní celiakie. Tyto nálezy jsou ve shodě s předpokladem vystupňované apoptózy a zvýšené ztráty enterocytů u CS. Při interpretaci je však nutno vzít v úvahu, že získané výsledky průkazu exprese tTG mohou být v závislosti na typu analyzovaných buněk a tkání značně variabilní (54). Možnou zvýšenou připravenost slizničních lymfocytů k apoptóze u aktivní CS, jak je uváděno i v další recentní studii (9), také podporuje náš nález snížené exprese proteinu Bcl-2 v těchto buňkách. Naopak ve slizničních lymfocytech u pacientů s LC jsme prokázali nízkou pozitivitu exprese tTG a vysokou expresi proteinu Bcl-2, na základě čehož lze přijmout hypotézu o ochranném antiapoptotickém efektu proteinu Bcl-2 na slizniční lymfocyty. Je známo, že apoptóza může být zahájena několika odlišnými mechanismy zahrnujícími vnější receptorovou dráhu, mitochondriální dráhu a dráhu indukovanou poškozením DNA. GST je obdobně jako protein Bcl-2 v průběhu apoptózy jedním z důležitých regulátorů permeability mitochondriální membrány (17, 18). Na základě našich nálezů vysokých hodnot exprese GST v enterocytech a lymfocytech u LC, můžeme spekulovat o jisté ochranné roli GST, bránící rozvoji atrofie sliznice. Dále pro zvýšenou apoptózu enterocytů u obou skupin celiakie svědčí zvýšená exprese proapoptotického proteinu Bid. Možné vysvětlení námi zjištěné Fas negativity velkého počtu enterocytů a téměř kompletní negativity jejich apikální části, stejně jako vysokého počtu Fas negativních lymfocytů v lamina propria u aktivní celiakie, lze spatřovat v předchozí ztrátě Fas pozitivních buněk následkem vazby elementů exprimujících Fas-L (6). Tyto závěry podporuje také nález zvýšené exprese Fas-L na enterocytech a lymfocytech v lamina propria, a to jak u aktivní, tak i latentní formy celiakie. Výše popsané změny byly pozorovány

s maximem v oblasti krypt a méně byly vyznačeny v apikálních partiích klků. Pro tento jev nemáme zatím bližší vysvětlení. Hypotéza aktivní role Fas/Fas-L zprostředkované apoptózy při CS je také podporována granulárním charakterem exprese Fas-L v enterocytech. Již v předchozích studiích je pohlíženo na mikrovezikulární lokalizaci Fas-L jako na nově identifikovaný efektivní způsob rychlého zahájení autokrinně nebo parakrinně zprostředkované buněčné smrti cestou rychlého uvolnění granul obsahujících Fas-L na buněčný povrch (27, 58). Přítomnost Fas-L na povrchu enterocytů není překvapující, v literatuře byla uvedena přítomnost Fas-L i na povrchu dalších buněk (46, 60). Je rovněž známo, že některé metaloproteinázy hrající úlohu v remodelaci sliznice u CS interagují s Fas-L a ovlivňují tak průběh apoptózy. Maiuri a spol. a Ciccocioppo a spol. (2001) zjistili naopak na enterocytech dospělých nemocných s aktivní celiakií zvýšenou expresi Fas (7, 24). Tito autoři používali k průkazu poněkud odlišných metod a vyšetřovali vitální nefixované buňky získané od dospělých pacientů, zřejmě ještě před navázáním elementů nesoucích Fas-L. Normální morfologii jejunální sliznice u latentní celiakie by mohla částečně vysvětlit rychlá eliminace cytotoxických IEL mechanismem apoptózy: Di-Sabatino a spol. (9) považují zvýšenou apoptózu IEL u neléčené celiakie odpovědnou za autoimunní a maligní komplikace této choroby. Tito autoři však nestudovali latentní formu choroby. Nižší exprese PARP v apikálních partiích sliznice u nemocných CS i u kontrol ve srovnání s kryptami může být výrazem vystupňované fyziologické apoptózy této části klků. Tento fenomén byl prokázán i jinými metodami, například metodou TUNEL (33). Zvýšenou pohotovost lymfocytů v lamina propria k apoptóze u aktivní a také latentní celiakie podporují nálezy nižší exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 spolu s vyšší expresí Bid ve srovnání s kontrolami. Klíčová role v indukcii slizničních změn je u celiakie připisována intraepiteliálním lymfocytům, zejména v časných fázích patogeneze (16). Tyto cytotoxické lymfocyty exprimují Fas-L. Produkují dále proteinázy perforiny a granzymy A a B, které svou aktivitou způsobují lýzu enterocytů (9, 51). Naše nálezy exprese CAS-3 mohou dokumentovat zvýšenou apoptózu IEL u obou forem celiakie. Vyšší exprese Bid a naopak nižší exprese PARP u IEL latentní celiakie ve srovnání s aktivní celiakií i kontrolami mohou u této formy celiakie reflektovat vystupňovanou apoptózu. Na základě získaných dat můžeme potvrdit, že signální dráha Fas/Fas-L se účastní aktivace apoptózy enterocytů u latentní i aktivní celiakie. Vyšetřované proteiny jsou zahrnuty do mechanismů vedoucích k slizničním morfologickým změnám. Změny v expresi Fas a Bid ve střevní sliznici, zvýšení tTG v BM a rozdíly v počtu Fas-

L a Bcl-2 pozitivních lymfocytů u CD jsou kompatibilní s časnou fází imunitní reakce vyvolané gliadinem a podporují hypotézu o významné roli tTG v tomto procesu. Detekce těchto proteinů ve střevní sliznici může být přínosná při morfologickém hodnocení a při stanovení aktivity choroby. Tato vyšetření by mohla mít praktický význam v predikci vilózní atrofie jejunální sliznice.

## Literatura

1. **Amendola, A., Gougeon, M. L., Poccia, F. et al.:** Induction of "tissue" transglutaminase in HIV pathogenesis: evidence for high rate of apoptosis of CD4+ T lymphocytes and accessory cells in lymphoid tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 1996, s. 11057–11062. – 2. **Amendola, A., Lombardi, G., Oliverio, S. et al.:** HIV-1 gp120-dependent induction of apoptosis in antigen-specific human T cell clones is characterized by "tissue" transglutaminase expression and prevented by cyclosporine A. *FEBS Lett.*, 339, 1994, s. 258–264. – 3. **Berke, G.:** The CTL's kiss of death, *Cell*, 81, 1995, s. 9–12. – 4. **Brusco, G., Muzi, P., Ciccocioppo, R. et al.:** Transglutaminase and coeliac disease: endomysial reactivity and small bowel expression. *Clin. Exp. Immunol.*, 118, 1999, s. 371–375. – 5. **Ciccocioppo, R., Di Sabatino, A., Gasbarrini, G. et al.:** Apoptosis and gastrointestinal tract. *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 31, 1999, s. 162–172. – 6. **Ciccocioppo, R., Di Sabatino, A., Parroni, R. et al.:** Cytolytic mechanisms of intraepithelial lymphocytes in coeliac disease (CoD). *Clin. Exp. Immunol.*, 120, 2000, s. 235–240. – 7. **Ciccocioppo, R., Di Sabatino, A., Parroni, R. et al.:** Increased enterocyte apoptosis and Fas/Fas ligand system in coeliac disease. *Am. J. Clin. Pathol.*, 115, 2000, s. 494–503. – 8. **Clapper, M. L., Szarka, C. E., Parroni, R. et al.:** Glutathione S-transferases: biomarkers of cancer risk and chemopreventive response. *Chem. Biol. Interact.*, 111, 1998, s. 377–388. – 9. **Di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., D'Aló, S. et al.:** Intraepithelial and lamina propria lymphocytes show distinct patterns of apoptosis whereas both populations are active in Fas based cytotoxicity in coeliac disease. *Gut*, 49, 2001, s. 380–386. – 10. **Farrace, M. G., Picarelli, A., Di Tola, M. et al.:** Presence of anti- "tissue" transglutaminase antibodies in inflammatory intestinal diseases. An apoptosis-associated event? *Cell. Death. Differ.*, 8, 2001, s. 767–770. – 11. **Fassano, A., Catassi, C.:** Current approaches to diagnosis and treatment of coeliac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterol.*, 120, 2001, s. 636–651. – 12. **Feighery, C.:** Coeliac disease (clinical review), 319, 1999, s. 236–239. – 13. **Feldmann, G., Haouzi, D., Moreau, A. et al.:** Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatitis apoptosis in mice. *Hepatol.*, 31, 2000, s. 674–683. – 14. **Ferguson, A., Arranz, E., O'Mahony, S.:** Clinical and pathological spectrum of coeliac disease-active, silent, latent, potential. *Gut*, 34, 1993, s. 150–151. – 15. **Fesus, L., Thomazy, V., Falus, A.:** Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett.*, 224, 1987, s. 104–108. – 16. **Guy-Grand, D., Di Santo, J. P., Henchoz, P., Malassis-Seris, M., Vassalli, P.:** Small bowel enteropathy: role of intraepithelial lymphocytes and cytokines (IL-12, IFN-gamma, TNF) in the induction of cell death and renewal. *Eur. J. Immunol.*, 28, 1998, s. 730–744. – 17. **Hall, A. G.:** Glutathione and the regulation of cell death, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 457, 1999, s. 199–203. – 18. **Hall, A. G.:** Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis, *Eur. J. Clin. Invest.*, 29, 1999, s. 238–245. – 19. **Knight, C. R., Rees, R. C.,**

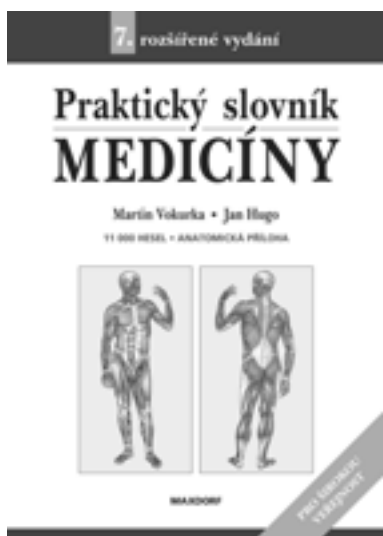
**Platts, A. et al.:** Interleukin-2-activated human effector lymphocytes mediate cytotoxicity by inducing apoptosis in human leukaemia and solid tumour target cells. *Immunology*, 79, 1993, s. 535–541. – 20. **Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N. et al.:** The biochemistry of programmed cell death, *FASEB J.*, 9, 1995, s. 1277–1287. – 21. **Kozáková, H., Štěpánková, R., Tučková, L., Sinkora, M., Jelínková, L., Tlaskalová-Hogenová, H.:** Humoral and cellular immune responses in gluten-treated suckling or had-fed rats. *Physiol. Res.*, 49, 2000, s. 665–672. – 22. **Lenbenthal, E., Branski, D.:** Celiac disease: an emerging global problem. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 35, 2002, 508–512. – 23. **Maiuri, L., Auricchio, S., Coletta, S. et al.:** Blockage of T-cell costimulation inhibits T-cell action in coeliac disease. *Gastroenterology*, 115, 1998, s. 564–572. – 24. **Maiuri, L., Ciacci, C., Raia, V. et al.:** FAS engagement drives apoptosis of enterocytes of coeliac patients. *Gut*, 78, 2001, s. 418–424. – 25. **Marsh, M. N.:** Gluten, major histocompatibility complex and the small intestine: a molecular and immunologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ("celiac sprue"). *Gastroenterology*, 102, 1992, s. 330–354. – 26. **Marsh, M. N., Growe, P. T.:** Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity. *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 9, 1995, s. 173–179. – 27. **Martinez-Lorenzo, M. J., Anel, A., Gamen, S. et al.:** Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J. Immunol.*, 163, 1999, s. 1274–1281. – 28. **Marzari, R., Sblattero, D., Florian, F. et al.:** Molecular dissection of the tissue transglutaminase autoantibody response in coeliac disease. *J. Immunol.*, 166, 2001, s. 4170–4176. – 29. **Mastino, A., Grelli, S., Piacentini, M. et al.:** Correlation between induction of lymphocyte apoptosis and prostaglandin E2 production by macrophages infected with HIV. *Cell. Immunol.*, 152, 1993, s. 120–130. – 30. **Mitsiades, N., Yu, W. H., Poulaki, V. et al.:** Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Res.*, 61, 2001, s. 577–581. – 31. **Molberg, O., McAdam, S. N., Korner, R. et al.:** Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in coeliac disease. *Nat. Med.*, 4, 1998, s. 713–717. – 32. **Molberg, O., McAdam, S. N., Sollid, L. M. et al.:** Role of tissue transglutaminase in coeliac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 30, 2000, s. 232–240. – 33. **Moss, S. F., Attia, L., Scholes, J. V. et al.:** Increased small intestinal apoptosis in coeliac disease. *Gut*, 39, 1996, s. 811–817. – 34. **Mowat, A. M. I.:** Dietary modifications: food dependent autoimmunity in coeliac disease. *Gut*, 43, 1998, s. 599–600. – 35. **Mullighan, C. G., Bunce, M., Welsh, K. I.:** High resolution HLA-DQB1 typing using the polymerase chain reaction and sequence-specific primers. *Tissue Antigens*, 50, 1997, 688–692. – 36. **Nagata, S., Golstein, P.:** The Fas death factor. *Science*, 267, 1995, s. 1449–1456. – 37. **Oberhuber, G., Vogelsang, H., Stolte, M. et al.:** Evidence that intestinal intraepithelial lymphocytes are activated cytotoxic T cells in coeliac disease but not in giardiasis. *Am. J. Pathol.*, 148, 1996, s. 1351–1357. – 38. **Oberhuber, G., Granditsch, G., Vogelsang, H.:** The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 11, 1999, s. 1185–1194. – 39. **Oliverio, S., Amendola, A., Rodolfo, C. et al.:** Inhibition of "tissue" transglutaminase increases cell survival by preventing apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 274, 1999, s. 34123–34128. – 40. **Palejwala, A. A., Watson, A. J.:** Apoptosis and gastrointestinal disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 31, 2000, s. 356–361. – 41. **Piacentini, M.:** Tissue transglutaminase: a candidate effector element of physiological cell death. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 200, 1995, s. 163–175. – 42. **Piredda, L., Farrace, M. G., LoBello, M. et al.:** Identification of "tissue" transglutaminase binding proteins in neural cells committed to apoptosis. *FASEB J.*, 13, 1999, s. 355–364. – 43. **Potten, C. S., Li, Y. Q., O'Connor, P. J., Winton, D. J.:** A possible explanation for the differential can-



cer incidence in the intestine, based on distribution of the cytotoxic effects of carcinogens in the murine large bowel. *Carcinogenesis*, 13, 1992, s. 2305–2312. – 44. **Powell, W. C., Fingelton, B., Wilson, C. L. et al**: The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Curr. Biol.*, 9, 1999, s. 1441–1447. – 45. **Quarsten, H., Molberg, O., Fugger, L. et al.**: HLA binding and T cell recognition of tissue transglutaminase-modified gliadin epitope. *Eur. J. Immunol.*, 29, 1999, s. 2506–2514. – 46. **Saas, P., Walker, P. R., Hahne, M. et al.**: Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain? *J. Clin. Invest.*, 99, 1997, s. 1173–1178. – 47. **Salmela M. T., MacDonald, T. T., Black, D. et al.**: Upregulation of matrix metalloproteinases in a model of T cell-mediated tissue injury in the gut: analysis by gene array and in situ hybridization. *Gut*, 51, 2002, s. 540–547. – 48. **Savidge, T. C., Walker-Smith, J. A., Philips, A. D.**: Novel insights into human intestinal epithelial cell proliferation in health and disease using confocal microscopy. *Gut*, 26, 1995, s. 269–274. – 49. **Shan, L., Molberg, O., Parrot, I. et al**: Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297, 2002, s. 2275–2279. – 50. **Shibahara, T., Sato, N., Waguri, S. et al.**: The fate of effete epithelial cells at the villus tips of the human small intestine. *Arch. Histol. Cytol.*, 58, 1995, s. 205–219. – 51. **Shiner, M., Eran, M., Freier, S. et al**: Are intraepithelial lymphocytes in celiac mucosa responsible for inducing programmed cell death (apoptosis) in enterocytes? Histochemical demonstration of perforins in cytoplasmic granules of intraepithelial lymphocytes. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 27, 1998, s. 393–396. – 52. **Strater, J., Walczak, H., Hasel, C. et al**: CD95 ligand (CD95L) immunohistochemistry: a critical study on 12 antibodies. *Cell*

*Death Differ.*, 8, 2001, s. 273–278. – 53. **Szondy, Z., Molnar, P., Nemes, Z. et al**: Differential expression of tissue transglutaminase during in vivo apoptosis of thymocytes induced via distinct signaling pathways. *FEBS Lett.*, 404, 1997, s. 307–313. – 54. **Thomazy, V., Fesus, L.**: Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.*, 225, 1989, s. 215–224. – 55. **Troncone, R., Greco, L., Mayer, M. et al**: Latent and potential coeliac disease. *Acta Paediatr. (Suppl)* 412, 1996, s. 10–14. – 56. **Uhlir, H., Osman, A. A., Tanev, I. D. et al**: Role of tissue transglutaminase in gliadin binding to reticular extracellular matrix and relation to coeliac disease autoantibodies. *Autoimmunity*, 28, 1998, s. 185–195. – 57. **Van de Wal Y., Kooy, Y., Van Veelen, P. et al**: Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J. Immunol.*, 161, 1998, s. 1585–1588. – 58. **Wagelie-Steffen, A. L., Hartmann, K., Vliagoftis, H. et al.**: Fas ligand (FasL, CD95L, APO-1L) expression in murine mast cells. *Immunology*, 94, 1998, s. 569–574. – 59. **Walker Smith, J. A., Guandalini, S., Schmitz J. et al.**: Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch. Dis. Child.*, 65, 1990, s. 909–911. – 60. **Younes, M., Schwartz, M. P., Finnie, D. et al**: Overexpression of Fas ligand (FasL) during malignant transformation in the large bowel and in Barrett's metaplasia of the esophagus. *Hum. Pathol.*, 30, 1999, s. 1309–1313.

MUDr. Soňa Lísová  
Ústav pat. anatomie 3. LF UK  
Šrobárova 50  
100 34 Praha 10  
Tel: 267 162 500  
E-mail: lisova@hotmail.com



## PRAKTICKÝ SLOVNÍK MEDICÍNY (7. vydání)

*Martin Vokurka, Jan Hugo a kol.*

Šedmé, další rozšířené vydání úspěšného výkladového slovníku lékařské terminologie. Obsahuje více než 11 000 hesel s velkým počtem příkladů, některá hesla jsou doplněna ilustracemi. Slovník zachycuje aktuální českou lékařskou terminologii ne pouze ve formě vyučované na lékařských fakultách, ale také tak, jak je užívána v každodenní zdravotnické praxi. V tomto duchu obsahuje také řadu hovorových výrazů užívaných zdravotníky, přehled a výklad zkratk užívaných v současné české medicíně aj. Publikace je prvním výkladovým slovníkem lékařských termínů srozumitelným široké veřejnosti u nás.

Vydal Maxdorf v roce 2004, formát A5, váz.,  
ISBN 80-7345-009-7, 490 str., cena 595 Kč.

Objednávku můžete poslat na adresu:

Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz