

**OPTIMALIZÁCIA STANOVENIA PRÍTOMNOSTI CELIAKÁLNE AKTÍVNYCH
BIELKOVÍN V CEREÁLIÁCH A PSEUDOCEREÁLIÁCH
OPTIMIZATION OF CELIAC DISEASE ACTIVE PROTEINS ESTIMATION IN
CEREALS AND PSEUDOCEREALS**

Peter Socha, Adriana Raždíková, Dana Urminská

ABSTRACT

Celiac disease is caused by hypersensitivity of some people to the presence of prolamin proteins of wheat, rye and barley in food. For prolamin determination methods based on different solubility of proteins, SDS-PAGE and A-PAGE were used. Another specific method is ELISA. Results of protein – fractions preparation indicated that the highest content of prolamins exist in groats of *Triticum spelta* (42.12 %) followed by *Triticum durum* (37.74 %) and wheat (33.78 %). The least amount of prolamins were found in amaranthus (3.15 %). ELISA showed that all cereals contain such concentration of prolamins which exceeded the limits suitable for celiac patients' diet. The highest concentration of prolamins, set by ELISA with antibody R5, was determined from *Triticum spelta* (16250 ppm). Amaranthus, buckwheat, rice and corn are naturally gluten-free foods (till 20 ppm). Existing knowledge about prolamine concentration is not sufficient for their allergy causing ability. By SDS-PAGE and A-PAGE it is possible to predict the share of the toxic protein fractions, but only ELISA is the suitable method for precise determination of presence of celiac- active proteins in plant materials.

Key words: Coeliac disease, cereals, pseudocereals, ELISA

ÚVOD

V posledných rokoch sa stále častejšie vyskytujú informácie o alergických reakciách na jednotlivé potraviny. U senzitivných ľudí vznikajú prvé prejavy už pri príjme malého množstva potraviny. K rizikovým komoditám zaradujeme aj obilniny, ktoré sa stávajú čoraz častejšie pôvodcami neželaných alergií. Jedným z takýchto ochorení je aj celiakia, glutén-senzitívna enteropatia (Ciacci et al., 2002).

Podstata celiakálneho ochorenia spočíva v neznášanlivosti určitých frakcií bielkovín vyskytujúcich sa v zrne väčšiny obilnín, a to predovšetkým prolaminov tvoriacich súčasť lepku. Lepok je nevyhnutný pri tvorbe cesta, teda je dôležitý hlavne z pekárenského hľadiska. Jedinou liečbou celiakie je dodržiavanie celoživotnej bezlepkovej diéty. Pri bezlepkovej diéte je potrebné zo stravy vylúčiť potraviny obsahujúce lepok (Fasano a Catassi, 2001), teda ľudia postihnutí celiakiou nemôžu konzumovať výrobky, pri príprave ktorých boli použité pšenica, raž, jačmeň, a v podmienkach SR aj ovos. Prísna bezlepková diéta kladie vysoké nároky na presné a jednoznačné analytické metódy, ktorými sa identifikuje aj stopové množstvo alergénnych bielkovín v surovine alebo v potravine.

Lepok je komplex zásobných bielkovín obilného zrna, ktorý po navlhčení vytvára súvislú lepkavú mriežku, čo je dôležité pre prípravu kysnutého chleba a pečiva. Lepkové bielkoviny obsahujú veľké percento glutamínu a prolínu, z čoho sa odvodilo označenie glutén. Lepok sa skladá z bielkovín líšiacich sa rozpustnosťou. Predovšetkým je to frakcia bielkovín rozpustných v etylalkohole, tzv. prolaminov, a frakcia bielkovín rozpustných v zásadách, tzv. glutelínov. Lepok je čiastočne kontaminovaný aj cytoplazmatickými bielkovinami rozpustnými v NaCl, čiže frakciami albumínov a globulínov. V celozrnnom obilnom šrote však frakcia cytoplazmatických bielkovín tvorí len asi 30 % z celkového obsahu bielkovín, druhá skupina tzv. zásobných bielkovín predstavuje 60-70 %. Práve tieto ťažko rozpustné frakcie lepku a predovšetkým prolamíny s nízkou molekulovou hmotnosťou okolo 30 kDa sú

zodpovedné za vznik celiakie. Veľmi perspektívnou skupinou plodín pre diétu pri celiakii sú tzv. pseudocereálie, medzi ktoré patrí pohánka, laskavec, quinoa, rosička krvavá a ďalšie. Nepriaznivé frakcie bielkovín sa v nich nevyskytujú alebo majú iba malé percentuálne zastúpenie (Szabová et al., 2003).

Precitlivosť voči lepku, ktorý je prítomný v obilninách, predovšetkým v pšenici, v jačmeni, a v raži, má za následok neobvyklé premnoženie istého druhu bielych krviniek, ktoré poškodzujú stenu tenkého čreva. Tým sa eliminuje resorpcia a vytvára sa stav maloabsorpcie (Corazza et al., 1990). V dôsledku permanentnej neznášanlivosti lepku dochádza ku zmenám sliznice tenkého čreva, ktorá je na rozdiel od normálne zvrásnenej patologicky vyhladená. Jej vyrovnaním sa znižuje plocha na vstrebávanie živín, ktoré tak odchádzajú nevyužité stolicou a v organizme vzniká ich nedostatok (Ilavská a Krátky, 2006).

Významnú úlohu v patogenéze celiakie zohrávajú imunologické faktory. Podstatou imunitnej reakcie je, že cudzie látky, alergény, po vniknutí do organizmu vyvolávajú obranné reakcie za účelom túto cudzorodú látku eliminovať (Michalík a Bauerová, 2001). Na povrchoch cudzích látok sú molekuly – antigény, ktoré sú rozpoznávané špeciálnymi typmi lymfocytov, B-lymfocytmi a T-lymfocytmi. Tieto bunky tvoria tzv. špecifickú bunkovú imunitu. Okrem toho sa imunitná odpoveď organizmu skladá ešte z humorálnej imunity, ktorú predstavujú protilátky produkované B-lymfocytmi a HLA systémom antigénov (Human Leukocyte Antigen). Antigény rozpoznávané imunitným systémom majú na svojom povrchu typické oblasti, typické chemické molekuly - determinanty alebo epitopy. Lymfocyty a protilátky rozpoznávajú a viažu sa práve na tieto epitopy. B-lymfocyty sú bunky, ktoré produkujú protilátky, ktoré sa delia do viacerých tried: IgA sa vyskytujú v slinách, slzách, v hliene a v sekrétoch tráviaceho traktu. Sú to protilátky predovšetkým voči bakteriálnym patogénom. IgE majú významnú úlohu pri alergických reakciách. IgG sú najčastejšie sa vyskytujúce protilátky – imunoglobulíny, ktoré viažu patogény aj toxíny, a tým uľahčujú ich zachytenie fagocytmi. Funkcia IgD zatiaľ nie je dostatočne preskúmaná. T-bunky sa delia na viaceré typy. napr. Th – pomocné (helper) produkujú cytokíny, ktoré regulujú imunitnú odpoveď organizmu, T_c sú cytotoxické bunky, ktoré ničia vírusy a nádorové bunky, „pamäťové“ T bunky si zapamätajú daný antigén a pri opätovnom kontakte sú zodpovedné za veľmi rýchlu reakciu voči nemu. T_{reg} sú regulačné bunky, ktoré sú zodpovedné za ukončenie imunitnej odpovede organizmu a T_{NK} (Natural Killers) sú bunky, ktoré prepájajú špecifický a vrodenný imunitný systém (Ferenčík, 1989). Antigény, ktoré iniciujú imunitnú reakciu organizmu sa delia podľa pôvodu na exogénne, ktoré môžu byť primárne – vyvolávajú reakciu bezprostredne po ich kontakte s organizmom alebo sekundárne – alergizujú až po svojej zmene v organizme. Druhú skupinu tvoria alergény endogénne, ktoré vznikajú vo vlastnom organizme a to buď ako komplex vlastnej bielkoviny s cudzorodou látkou, alebo ako patologicky pozmenená vlastná bielkovina. Poslednou skupinou sú alergény invazívne, ktoré do organizmu vylučujú mikrobiálne parazity. Do skupiny endogénnych antigénov patria HLA – antigény, ktorých úlohou je napr. ochrana proti rakovinovým bunkám, proti vlastným bunkám infikovaným napr. vírusom, alebo sú významnými faktormi v patogenite autoimunitných ochorení (diabetes I. typu). Sú unikátne v organizme každého jedinca a T-bunky sa podľa týchto glykoproteínov, ktoré sa nachádzajú na ich povrchoch označujú ako CD8, CD4, CD25 atď.

Imunitná odpoveď na prolaminové bielkoviny nie je doteraz presne vysvetlená. Vzniká po pôsobení tráviacich enzýmov, ktoré štiepia prolaminu na peptidy, ktoré majú typickú sekundárnu štruktúru (Jabri a Sollid, 2006). Vzniknuté peptidy prechádzajú stenou črevnej sliznice do *lamina propria*. Enzým transglutamináza (tTG) spôsobí čiastočnú deamináciu molekúl glutamínu na kyselinu glutámovú, čím umožní špecifickú väzbu týchto peptidov na imunoproteíny HLA DQ2 a DQ8 (Waszczuk et al., 2007), a aktiváciu T-buniek, konkrétne typ CD4⁺ buniek. Stimulácia T-buniek vyvolá sekréciu pro-zápalových cytokínov, najmä

γ -interferónu (Wieser, 2004, Wieser a Koehler, 2008), čo sa prejaví ako alergická odozva na konzumáciu prolaminových bielkovín (Jabri a Sollid, 2006). K poznaniu podstaty celiakie významnou mierou prispelo v roku 1997 identifikovanie enzýmu tkanivová transglutamináza (tTG), ako antigénu, ktorý sa vyskytuje vo vnútri *endomyzia* (spojivové tkanivo okolo hladkého svalstva) (Hill a McMillan, 2006). Tkanivová transglutamináza je enzým, ktorý katalyzuje zosieťovanie proteínov v extracelulárnej časti tkanív, aj v intracelulárnom cytoskelete a pravdepodobne zohráva úlohu pri formovaní granulačných tkanív, apoptóze, čiže programovej smrti bunky a raste nádorov. Tento enzým má kľúčovú úlohu v patogenéze celiakálneho ochorenia prostredníctvom modifikácie gliadínu, ktorá vyvoláva intenzívnejšiu produkciu gliadínovo-špecifických T-buniek, ktoré prispievajú k črevnému zápalu a následne k aktivácii B-buniek (Vader et al., 2002). Zistilo sa, že enzým deamiduje glutamínové zvyšky aminokyselín v bielkovinových reťazcoch, a tým vznikajú štruktúry so zvýšenou afinitou k niektorým ďalším zložkám imunitnej reakcie organizmu (Lowichik a Book, 2003; León et al., 2005). Deaminácia glutamínov však môže prebiehať aj počas výroby potravín z obilnej múky (Riha et al., 1996) alebo počas trávenia v žalúdku pôsobením kyseliny chlorovodíkovej (Sjöström et al., 1998). T-bunky pacientov s celiakiou rozoznávajú tri aminokyselinové sekvencie, resp. peptidy, ktoré sú súčasťou α -gliadínových bielkovín a sú v nich intenzívne zastúpené aminokyseliny prolín a glutamín: PFPQPQLPY, PQPQLPYPQ a PYPQPQLPY. Prolaminové bielkoviny sú pomerne vysoko rezistentné voči pôsobeniu tráviacich enzýmov. Zistilo sa, že napr. trávením cielene pripraveného rekombinantného α -gliadínu žalúdočnými a pankreatickými enzýmami *in vitro* sa produkuje vysokostabilný 33-merný peptid, ktorý obsahuje všetky tri T-bunkové epitopy (Shan et al., 2002).

Je potrebné rozlíšiť celiakiu od potravinovej alergie na pšenicu, pšeničný prach a pod., pre ktorú sú typickými príznakmi kožná reakcia, astma a anafylaktický šok. V tomto prípade sú významne zvýšené protilátky IgE, čo znamená, že celiakálne epitopy nie sú totožné s epitopmi pri lepkovej alergii (Rauchová a Rauch, 1996; Fuchs, 2005; Denery-Papini et al., 2007).

Základnými analytickými metódami pre stanovenie prítomnosti celiakálne aktívnych – prolaminových bielkovín sú frakcionácia na základe rozdielnej rozpustnosti s následným stanovením koncentrácie bielkovín uzančnou destilačnou metódou podľa Kjeldahla (Michalík et al., 2002) alebo elektroforetická separácia bielkovín v polyakrylamidovom géli (Urmínská et al., 2009). V poslednej dobe sa však do popredia dostávajú vysokošpecifické imunoanalytické metódy, napr. ELISA.

ELISA - Enzýmová imunoabsorbentná analýza (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay) je imunoenzýmová metóda, pri ktorej jeden z reaktantov (antigén, protilátka) je imobilizovaný nadviazaním na tuhý nosič, ktorý predstavuje zvyčajne stena skúmavky alebo jamky v mikrotitračnej platni (Ferenčík, 1989). Pri imunoenzýmových metódach sa látka (ligand) špecifickým spôsobom viaže na protilátku, pričom sa označí pomocou enzýmu, čím vznikne konjugát ligand-enzým (Ferenčík a Škárka, 1981). Enzýmy vhodné pre uvedenú techniku by mali mať malú relatívnu molekulovú hmotnosť, vysokú stabilitu a enzýmovú aktivitu, vysokoprečistené, musia sa dať kovalentne nadviazať na protilátky a rôzne funkčné skupiny antigénov. Produkt enzýmovej reakcie musí byť ľahko detekovateľný. K najčastejšie používaným enzýmom patria chrenová peroxidáza, alkalická fosfatáza, beta-D-galaktozidáza a menej často glukózaoxidáza (Ferenčík a Škárka, 1981; Ferenčík, 1989).

Na detekciu celiakálne aktívnych bielkovín sa používa sendvičová ELISA pre antigény, ktorá je založená na postupnom vytvorení komplexu protilátka - antigén prolamin - enzýmom značená protilátka (Hulín et al., 2008). Na tuhej fáze (jamka v mikrotitračnej platni) je imobilizovaná protilátka, na ktorú sa nadväzuje príslušný antigén (prolaminové bielkoviny, pšeničné gliadíny). Po premytí sa pridá voľná enzýmom označená protilátka, ktorá reaguje so

zostávajúcimi voľnými determinantmi antigénu viazaného v komplexe s imobilizovanou protilátkou. Po premytí sa pridáva substrát na detekciu enzýmovej aktivity. Po pridaní roztoku substrátu ho enzým rozloží za vzniku farebného produktu. Intenzita sfarbenia roztoku sa meria spektrofotometricky alebo pri použití mikrotitračných platní pomocou špeciálneho spektrofotometra, tzv. ELISA-reader. Z hodnôt absorbancií nameraných v jamkách mikrotitračných platní so známym množstvom antigénu sa zostrojí analytická čiara, pomocou ktorej sa určia koncentrácie analyzovaných vzoriek antigénu (**Ferenčík, 1989**).

Imunochemické analýzy využívajú buď polyklonálne alebo monoklonálne protilátky. **Ciclitira et al. (1984)** pripravili kompetitívnu metódu RIA s využitím polyklonálnych protilátok voči α -gliadínom. Nedokázali však stanoviť prítomnosť iných celiakálne aktívnych bielkovín. Neskôr **Troncone et al. (1986)** pripravili pre stanovenie gliadínov sendvičovú ELISA s dvomi rôznymi protilátkami. Metóda však vykazovala falošnú pozitivitu, napr. voči bielkovinám kukurice. Výraznejšie zlepšenie metódy znamenalo použitie monoklonálnych protilátok. Pre stanovenie celiakálne aktívnych bielkovín sa používajú protilátky voči gliadínom alebo voči presne definovanej sekvencii aminokyselín, ktorá sa opakuje v toxických bielkovinách. Prvé komerčné ELISA testy obsahovali monoklonálnu protilátku voči tepelne odolným ω -gliadínom (**Skerritt a Hill, 1990**). ω -gliadíny sú však menej alergénne ako α -gliadíny, a preto bolo potrebné zostaviť imunoreakciu s protilátkou voči týmto bielkovinám (**Ellis et al., 1990a, b**). V súčasnosti je základom sendvičovej metódy protilátka R5, ktorá bola pripravená imunizáciou myši ražným peptidom. Je špecifická voči sekvenciám QQFPF, QQQFP, LQFPF a QLFPF (**Osman et al., 2001; Valdés et al., 2003**). Kahlenberg et al. (2005) predpokladajú, že imunodominantnou štruktúrou prolaminov je sekvencia QQQ/PFP. Vzhľadom na to, že v avenínoch ovsu sa tieto epitopy nenachádzajú, metóda nie je vhodná na stanovenie bielkovín ovsu. Využíva sa však na stanovenie kontaminácie ovsu, a to predovšetkým jačmennými bielkovinami (zrnom, sladom) a pre dôkaz „bezpečkovosti“ produktov vyrobených z čistého ovsu. **Méndez et al. (2005)** dokázali, že ELISA s R5 je vhodnou metódou pre stanovenie ražných sekalínov, a to s detekčným limitom 1,5 ppm gliadínu v tzv. bezpečkových potravinách. Napriek tomu, že výsledok analýzy nezávisel na tom, či bola vzorka – potravina tepelne spracovaná, hydrolyzovaná alebo inak technologicky upravená, bol popísaný aj univerzálny extrakčný postup, podľa ktorého je potrebná redukcia a disagregácia gliadínových bielkovín. Extrakčný roztok obsahuje 2-merkaptóetanol a guanidín hydrochlorid.

Sendvičová ELISA s protilátkou R5 a enzýmom chrenová peroxidáza je referenčnou metódou v Codex Alimentarius. Podľa Codex Alimentarius je za prirodzene bezpečkovú surovinu a potravinu označená iba taká, ktorá obsahuje menej ako 20 ppm gluténu. Preto bolo potrebné vyvinúť ELISA systém s protilátkami, ktoré reagujú vysokošpecificky s potenciálne celiaticky-aktívnym epitopom QQFPF, ktorý je súčasťou α -, γ - gliadínov, hordeínov a sekalínov.

Cieľom práce bolo optimalizovať analytické postupy stanovenie celiakálne aktívnych bielkovín v rastlinnom materiáli a analyzovať bielkovinový komplex zna cereálií a pseudocereálií, ktoré sa využívajú pre výrobu potravín.

MATERIÁL A METODIKA

Rastlinný materiál získaný z maloobchodnej siete, ktorý je bežne dostupný spotrebiteľom v tzv. biopredajniach: pšenica letná, pšenica špaldová, pšenica tvrdá, ovos (vločky), jačmeň jarný, pohánka lúpaná, ryža natural, kukurica. Obilniny boli zomleté na celozrný šrot na laboratórnom mlyne. Tritikale bolo zo zdrojov KBB FBP a láskavec metlinatý bol rastlinou dopestovanou na pokusnom poli KUPaH FAPZ v areáli SPU. Analyzované boli mladé rastliny, časť obsahujúca semená aj stopky, ktorá sa môže využívať ako zelenina. Materiál

bol vysušený pri teplote 60°C a homogenizovaný. Jednotlivé rastlinné druhy boli analyzované bez dôrazu na podmienky pestovania a odrody.

Stanovenie celkového dusíka podľa Kjeldahla (Michalík et al., 2002) je založené na mineralizácii rastlinnej hmoty v Kjeldahlovej banke v prostredí koncentrovanej kyseliny sírovej a vhodného katalyzátora. Organicky viazaný dusík v organickej hmote sa pri oxidácii v prostredí koncentrovanej kyseliny sírovej mení na amoniak, ktorý reaguje s kyselinou sírovou za vzniku síranu amónneho. Zo síranu amónneho sa amoniak, ako slabšia zásada, vytesní prebytkom alkalického hydroxidu. Vytesnený amoniak sa predestiluje do predlohy so známym množstvom kyseliny sírovej.

Stanovenie bielkovinového dusíka podľa Barnsteina (Michalík et al., 2002) je založené na vyzrážaní bielkovín pomocou CuSO_4 a po odstránení ostatných dusíkatých látok ako sú aminokyseliny, amidy a anorganické zlúčeniny sa dusík stanoví metódou podľa Kjeldahla.

Stanovenie množstva celiakálne aktívnych bielkovín metódou *ELISA* sa realizovalo s využitím testu a postupov Ridascreen Gliadin Test (R- Biopharm, Germany).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celiakia je geneticky podmienená glutén-senzitívna enteropatia, autoimunitné ochorenie sliznice tenkého čreva, ktoré vzniká po príjme gluténu v potrave, resp. ho vyvolávajú určité aminokyselinové sekvencie a z nich vytvorená sekundárna štruktúra peptidov, nachádzajúce sa v prolamínoch pšenice, raže a jačmeňa (gliadíny, sekalíny a hordeíny). Ochorenie je celoživotné a jedinou účinnou terapiou je celoživotná bezlepková diéta – „gluten-free“. Na 28. zasadnutí Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses v roku 2007 bolo navrhnuté, aby sa presnejšie preklasifikovali diétne potraviny vo vzťahu k celiakii. Potraviny boli rozdelené do troch skupín:

- potraviny, ktoré neobsahujú žiadne prolamíny z rastlín druhu *Triticum*, jačmeňa, raže a ovsa. Limit pre obsah gluténu je 20 mg.kg^{-1} ,
- potraviny, ktoré obsahujú zložky zo pšenice, jačmeňa, raže, ovsa, a sú považované za bezlepkové „gluten-free“. Limit pre obsah gluténu je 100 mg.kg^{-1} ,
- potraviny, ktoré sú zmesou zložiek uvedených v bodoch a) a b). Limit pre obsah gluténu je 100 mg.kg^{-1} (dostupné na internete: <http://www.ccnfsdu.de/index.php?id=309> [cit. 08.12.2009]).

Problematickou obilninou vo výžive celiakov je ovos. Aveníny ovsa neobsahujú alergénne epitopy, napriek tomu nie všetci pacienti ovos tolerujú. Predpokladá sa, že výrobky z ovsa sú kvôli agrotechnickým postupom a technologickému spracovaniu takmer vždy kontaminované jačmeňom, a teda nevhodné pre bezlepkovú diétu. Jedine v škandinávskych krajinách je ovos povolený pre výživu stabilizovaných celiakov.

Základným postupom ako určiť množstvo jednotlivých bielkovinových frakcií zrna obilnín je ich rozdelenie na základe rozdielnej rozpustnosti (Tab. 1). V práci boli analyzované konvenčné obilniny – pšenica letná (forma ozimná), pšenica tvrdá, jačmeň, ovos, ryža, kukurica, ale aj menej tradičné obilniny – pšenica špaldová a tritikale. Ako pseudoobilniny boli analyzované pohánka lúpaná a laskavec metlinatý.

Tabuľka 1 Stanovenie celkového dusíka podľa Kjeldahla (% Ncelk) a stanovenie bielkovinového dusíka podľa Barsteina (% Nbielk).

| VZORKA | Ncelk., % | Hrubý proteín, % | N bielk., % |
|--------------------|-----------|------------------|-------------|
| Pšenica letná | 2,761 | 15,753 | 1,529 |
| Pšenica špaldová | 2,272 | 12,950 | 1,993 |
| Pšenica tvrdá | 1,754 | 9,998 | 1,578 |
| Ovos (vločky) | 2,234 | 13,024 | 2,063 |
| Jačmeň jarný | 1,543 | 8,795 | 1,389 |
| Tritikale | 1,501 | 8,751 | 1,333 |
| Pohánka lúpaná | 1,112 | 6,672 | 0,922 |
| Láskavec metlinatý | 2,395 | 14,370 | 1,941 |
| Ryža | 0,982 | 5,843 | 0,842 |
| Kukurica | 1,192 | 7,152 | 1,073 |

Najvyššia koncentrácia látok bielkovinovej povahy bola stanovená v zrne pšenice letnej (15,753 %) a v zrne láskavca (14,47 %). Najmenej bielkovín obsahovala ryža (5,843 %). Bielkoviny láskavca sú z pohľadu výživy veľmi zaujímavé, pretože obsahujú veľa esenciálnych aminokyselín. Z obilnín druhým najvýznamnejším zdrojom bielkovinových látok je ovos (13,024 %). V našich podmienkach takmer nevyužívanou je pšenica špaldová, ktorá obsahuje 12,95 % bielkovinových látok a má podobne ako láskavec, podstatne lepšiu bilanciu esenciálnych aminokyselín v bielkovinách zrna ako pšenica letná a pšenica tvrdá.

Prvým krokom pri analýze celiakálne aktívnych bielkovín je ich extrakcia etanolovým roztokom (Hulín et al., 2008). Bielkovinový komplex zrna analyzovaných cereálií a pseudocereálií je možné rôznymi extrakčnými činidlami rozdeliť na frakcie albumínov a globulínov, rozpustných v NaCl, prolamínov, rozpustných v etanole a glutelínov, rozpustných v NaOH (Tab. 2).

Tabuľka 2 Frakčná skladba bielkovinového komplexu

| VZORKA | Alb + Glo % N | Prolamíny % N | Glutelíny % N | Zvyšok % N |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| Pšenica letná | 0,387 | 0,578 | 0,598 | 0,140 |
| % zastúpenie | 22,62 | 33,78 | 34,95 | 8,18 |
| Pšenica špaldová | 0,550 | 0,957 | 0,570 | 0,182 |
| % zastúpenie | 24,21 | 42,12 | 25,09 | 8,01 |
| Pšenica tvrdá | 0,471 | 0,662 | 0,463 | 0,140 |
| % zastúpenie | 26,85 | 37,74 | 26,40 | 7,98 |
| Ovos (vločky) | 1,010 | 0,297 | 0,693 | 0,098 |
| % zastúpenie | 48,00 | 14,12 | 32,94 | 4,66 |
| Tritikale | 0,474 | 0,5169 | 0,421 | 0,084 |
| % zastúpenie | 31,58 | 34,58 | 28,05 | 5,60 |
| Jačmeň jarný | 0,449 | 0,483 | 0,457 | 0,140 |
| % zastúpenie | 29,10 | 31,30 | 29,62 | 9,07 |
| Láskavec metlinatý | 1,319 | 0,073 | 0,533 | 0,382 |
| % zastúpenie | 56,98 | 3,15 | 23,02 | 16,50 |
| Pohánka lúpaná | 0,561 | 0,070 | 0,210 | 0,281 |
| % zastúpenie | 50,00 | 6,24 | 18,72 | 25,04 |
| Ryža | 0,123 | 0,064 | 0,440 | 0,337 |
| % zastúpenie | 12,52 | 6,52 | 44,81 | 34,32 |
| Kukurica | 0,205 | 0,281 | 0,382 | 0,309 |
| % zastúpenie | 17,20 | 23,57 | 32,05 | 25,92 |

Pšenica letná je považovaná za najvýznamnejšiu potravinu vyvolávajúcu celiakálne ochorenie v našich podmienkach. Obsahuje 157,53 g bielkovín v 1 kg, ale z nich až 33,78 % (53,21 g) predstavujú prolamíny – gliadíny. Glutén tvoriace bielkoviny majú v zrne pšenice letnej až 68,73 % zastúpenie. Pšenica špaldová sa vyznačuje vyšším zastúpením esenciálnych aminokyselín v bielkovinách zrna ako má pšenica letná alebo pšenica tvrdá, a preto sa pokladá sa biologicky hodnotnejšiu surovinu. Obsahuje 129,50 g bielkovín v 1 kg zrna. Gliadíny tvoria až 42,12 % (o 8,34 % viac ako v zrne pšenice letnej), čo je 54,54 g v 1 kg zrna. Obsah zásobných bielkovín, gliadínov a glutenínov je 67,21 %, čo je porovnateľné s „chlebovou“ pšenicom. Pšenica tvrdá je surovinou na výrobu cestovín. Obsahuje 99,98 g bielkovín v kg zrna. Z týchto látok tvoria gliadíny až 37,74 %, čo je 37,73 g v 1 kg zrna. Z našich výsledkov vyplýva, že pšenica letná obsahuje najnižší podiel gliadínov z troch analyzovaných typov pšeníc. Ovsené vločky obsahovali 130,24 g bielkovín v 1 kg, z ktorých najviac zastúpenou bola frakcia albumínov a globulínov. Prolamíny tvorili iba 14,12 %, čo je 18,38 g v 1 kg biologického materiálu. Jačmeň jarný obsahuje 87,95 g bielkovín v 1 kg zrna. Obsah prolamínových bielkovín je nižší ako v zrne pšenice. V jačmeni tvoria 31,30 %, čo je 27,52 g v 1 kg jačmenného šrotu. Triticale vzniklo krížením pšenice a raže. Obsahuje 87,51 g bielkovín v 1 kg zrna. Triticale sa vyznačuje výrazne vyšším obsahom frakcie albumínov a globulínov ako pšenica letná, nižším obsahom glutelínov, ale vyšším zastúpením prolamínových bielkovín, ktoré tvoria 34,58 %, čo je 30,16 g. Ryža natural obsahuje iba 58,43 g bielkovín v 1 kg. Prolamínové bielkoviny tvoria 6,52 %, čo je 3,80 g v 1 kg ryže. Zaujímavý je vysoký podiel bielkovín rozpustných v NaOH (glutelínov) – až takmer 45 %. Keďže ryža je prirodzene bezlepkovou surovinou tieto bielkoviny nebudú obsahovať alergénne sekvencie aminokyselín. Kukurica obsahuje 71,52 g bielkovín v 1 kg, a z ich 23,57 % (16,85 g) tvoria prolamínové bielkoviny. Láskevca obsahuje v 1 kg semien 143,7 g bielkovín. Z nich je 3,15 %, teda 4,52 g prolamínov. Vysoká koncentrácia, najvyššia zo všetkých analyzovaných rastlinných materiálov, albumínov a globulínov korešponduje poznáním, že bielkoviny laskavca sú bohaté na aminokyseliny esenciálne pre ľudskú výživu. Pohánka lúpaná by mala patriť medzi bezlepkové suroviny a potraviny. V 1 kg pohánky je 66,72 g bielkovín, z nich 6,24 % tvoria prolamíny (čo je 4,10 g). Podobne ako v zrne laskavca, aj v zrne pohánky je vysoký obsah albumínov a globulínov.

Poznanie presnej koncentrácie prolamínových a glutelínových bielkovín nie je ešte dostatočnou informáciou o ich alergénnosti. S využitím elektroforetických metód, predovšetkým SDS-PAGE a kyslej PAGE je možné separovať jednotlivé subfrakcie týchto bielkovín a tak predpokladať množstvo, resp. podiel toxických subfrakcií α -gliadínov. V súčasnosti je však jedinou presnou metódou pre stanovenie presnej koncentrácie alergénnych bielkovín ELISA. Referenčnou metódou v Codex Alimentarius pre stanovenie gliadínov, resp. gluténu, je ELISA na báze monoklonálnej protilátky R5. Metódou s kompetitívnym usporiadaním sa stanovujú predovšetkým peptidové fragmenty prolamínov pšenice, raže a jačmeňa v pivách, škroboch a škrobových derivátoch, teda v tepelne upravených vzorkách (Ellis et al., 1990). Výsledok je však menej presný, pretože je ovplyvnený hydrolyzačným procesom. Iným variantom je sendvičová ELISA (Hernando et al., 2008).

V práci bol použitý komerčný test Ridascreen Gliadin. Klasický test zahŕňal extrakciu vzorky tzv. kokteílovým roztokom, ktorý obsahoval 2-merkaptóetanol a guanidín hydrochlorid. 2-merkaptóetanol redukuje možné disulfidické mostíky, ktorými sa vytvára priestorová štruktúra zásobných bielkovín, a tak je možné extrakčným postupom disagregovať gliadíny a uvoľniť všetky prítomné toxické aminokyselinové sekvencie (alergénne epitopy) pre reakciu s monoklonálnou protilátkou R5. Testom Ridascreen Gliadin bola stanovená koncentrácia gliadínov v zrne cereálií a pseudocereálií (Tab. 3).

Tabuľka 3 Stanovenie koncentrácie celiakálne aktívnych gliadínových bielkovín v cereáliách a pseudocereáliách metódou ELISA

| Vzorka | Test Ridascreen Gliadin gliadín, mg.kg ⁻¹ |
|--------------------|---|
| Pšenica letná | 16250 |
| Pšenica špaldová | 17500 |
| Pšenica tvrdá | 15000 |
| Ovos (vločky) | 14250 |
| Jačmeň jarný | 2250 |
| Tritikale | 1300 |
| Láskavec metlinatý | 8,750 |
| Pohánka lúpaná | 7,500 |
| Ryža | 5,000 |
| Kukurica | 6,250 |

Pšenica letná obsahuje 53,21 g gliadínových bielkovín v 1 kg. Z výsledkov ELISA testu vyplýva, že celiakálne aktívnych bielkovín v 1 kg zrna pšenice je až 16,250 g. Na základe metodiky použitého ELISA testu je možné prepočítať stanovené množstvo gliadínov na celkový obsah gluténu a klasifikovať suroviny a potraviny ako prirodzene bezpečové („Gluten Free“), v ktorých je obsah gluténu menší ako 20 ppm (20 mg.kg⁻¹). V zrne pšenice letnej je obsah gluténu 32,500 g, čo viac ako 1600-krát prevyšuje limit pre prirodzene bezpečové potraviny. V zrne pšenice špaldovej gliadíny tvoria až 54,54 g v 1 kg zrna. Celiakálne aktívnych je 17,500 g gliadínových bielkovín, čo je viac ako v zrne pšenice letnej. Pšenica tvrdá obsahuje 37,73 g gliadínov v 1 kg zrna a je zakázanou potravinou vo výžive celiakov, pretože tieto gliadíny predstavujú 15 g alergénnych bielkovín v 1 kg. Celkove, zrno tvrdej pšenice obsahuje až 30 g gluténu.

V ovsených vločkách tvorili prolamíny iba 18,38 g v 1 kg biologického materiálu, ale ELISA testom sme stanovili, že ovsené vločky obsahovali až 14,25 g gliadínových bielkovín, čo predstavuje 28,50 g celiakálne aktívnych bielkovín v 1 kg. Táto hodnota je asi 1425-krát vyššia ako limit pre prirodzene bezpečové potraviny. Napriek tomu, že monoklonálna protilátka R5 je špecifická voči sekvenciám aminokyselín, ktoré sa v avenínoch ovsu nevyskytujú, stanovenie je využiteľné aj na analýzu ovsených produktov. **Kahlenberg et al. (2005)** zistili, že R5 reaguje aj s epitopmi QQQFP, LQPFP a QLFPF. Na základe analýz a pozorovaní viacerých autorov (**Janatuinen et al., 2000; Högberg et al., 2004**), venujúcich sa problematike celiakie, predpokladáme, že analyzované ovsené vločky boli kontaminované inými obilninami. **Kanerva et al. (2006)** testovali dva ELISA testy, pričom jeden obsahoval protilátku R5 a druhý ω-gliadín protilátku. Do ovsenej múky pridali známe množstvo jačmennej múky a zistili, že test s R5 „nadhodnocuje“ stanovenie, zatiaľ čo test s ω-gliadín-protilátkou „podhodnocuje“ stanovenie. Zdôrazňujú, že v prípade analýz ovsu je dôležité poznať presne kontaminujúce látky. Ovos je z pohľadu celiakie veľmi zaujímavou plodinou. Teoreticky by nemal spôsobovať zdravotné komplikácie, pretože v avenínoch neobsahuje také sekvencie aminokyselín ako sú v gliadínoch, hordeínoch a sekalínoch. Lenže takmer neexistuje výrobok z ovsu, ktorý by nebol kontaminovaný pšenicom, a ešte častejšie jačmeňom. Niektorí výrobcovia potravín si neuvedomujú, že alergénom nie je celé zrno, ale iba jeho bielkovinová časť, a preto je veľké množstvo ovsených výrobkov sladených napr. sladom. Neobsahujú priamo jačmeň, ale obsahujú alergénne proteíny. **Størsrud et al. (2003)** testovali na pacientoch, ktorí boli v remisii prídavok ovsu v množstve asi 93 g denne do potravy. Zistili, že u 15 pacientov sa neobjavili žiadne patologické príznaky, ani v histológii,

ani v sérológii, ale u dvoch sa prejavili gastrointestinálne problémy. Predpokladajú, že ovos môže byť celiakmi tolerovaný, ale nesmie byť kontaminovaný inými obilninami.

Jačmeň jarný je obilnina, ktorá v 1 kg celozrnného šrotu obsahuje 27,52 g prolamínov. ELISA testom sa zistilo že celiakálne aktívnych je 2,25 g, čo je síce medzi konvenčnými obilninami najnižšia koncentrácia, ale po prepočte na obsah gluténu, ktorý je 4,5 g v 1 kg jačmenného šrotu je toto množstvo 112,5-krát vyššie ako limit pre prirodzene bezlepkové potraviny. Stanovenie bolo pomocou protilátky špecifickej voči gliadínom, ale jačmeň vo frakcii C-hordeínov obsahuje oktapeptid PQQFPQQ, ktorý je epitopom pre naviazanie dvoch špecifických monoklonálnych protilátok, IFRN 0061 a 0614. Tieto protilátky v systéme ELISA sú schopné viazať C-hordeín aj keď sa vyskytuje v potravine, ktoré prešla termickou úpravou (Brett et al., 2002). Kanerva et al. (2005) zistili, že ELISA s ω -gliadín-protilátkou viaže iba 4 - 8 % jačmenných prolamínov, zatiaľ čo až 100 % pšeničných gliadínov. Pri analýzach piva dokázali, že niektoré technologické procesy, napr. hydrolýza pomocou kvasiniek, môžu znížiť detekovateľnosť prolamínov. V tomto prípade je ELISA využiteľná len pre kvalitatívnu analýzu.

V zrne tritikale tvoria polamíny 34,58 %, čo je 30,16 g v 1 kg. Na základe výsledkov ELISA analýzy však 1,3 g prolamínových bielkovín tritikale vykazuje alergénne vlastnosti. Obsah týchto bielkovín je rádovo nižší ako v zrne pšenice, ale aj tak výrazne prekračuje limit pre „prirodzene bezlepkové“ suroviny a potraviny a preto je tritikale nevhodnou potravinou pre celiakov.

Základom bezlepkovej diéty sú ryža a kukurica, resp. kukuričný škrob. Analyzovaná bola ryža natural, ktorá obsahuje iba 58,43 g bielkovín v 1 kg a z nich je iba 3,80 g prolamínov. Tieto bielkoviny sú vhodnou potravinou pre celiakov, pretože obsahujú iba 5 mg.kg⁻¹ proteínov, vykazujúcich alergénne vlastnosti. V kukurici bolo stanovených 16,85 g prolamínových bielkovín v 1 kg zrna. Z ELISA analýzy vyplýva, že tieto bielkoviny nevyvolávajú celiakálne ochorenie, pretože ako možný alergén reagovalo množstvo zodpovedajúce koncentrácii iba 6,2 mg.kg⁻¹. Toto množstvo zodpovedá 12,4 mg gluténu v 1 kg kukuričných zŕn, a preto je možné konštatovať, že kukurica je prirodzene bezlepkovou potravinou.

Láskavec, ktorý obsahoval 4,52 g prolamínov v 1 kg zŕn je na základe ELISA testu vhodným na konzumáciu, pretože tieto bielkoviny obsahujú iba 6,25 mg.kg⁻¹ alergénne aktívnych proteínov. Takýto obsah zaraďuje láskavca do kategórie prirodzene bezlepkových potravín.

V 1 kg pohánky tvoria prolamíny 4,10 g. Pohánka, podobne ako láskavec, obsahuje iba 7,5 mg alergénnych bielkovín v 1 kg suchej hmoty a je prirodzene bezlepkovou potravinou s obsahom gluténu 15 mg v 1 kg lúpaného zrna pohánky.

ZÁVER

Celiakia je netropická sprue, geneticky podmienená glutén-senzitívna enteropatia, autoimunitné poškodenie sliznice tenkého čreva, ktoré vzniká po príjme gluténu v potrave.

Na základe výsledkov frakčnej skladby bielkovín je možné konštatovať, že najvyšší obsah prolamínových bielkovín sa vyskytuje v celozrnnom šrote pšenice špaldovej (42,12 %), pšenici tvrdej (37,74 %) a pšenici letnej (33,78 %). Najmenej prolamínov obsahoval láskavec metlinatý (3,15 %). Podľa viacerých literárnych zdrojov môžu alergickú reakciu vyvolať, resp. v čase remisie u pacienta konzumujúceho výhradne bezlepkovú diétu, môžu patologické zmeny v črevnej sliznici znovu vyvolať aj glutelíny. Najvyšší obsah týchto bielkovín bol stanovený v ryži (44,81 %) a v celozrnnom šrote pšenice letnej (34,95 %).

Z výsledkov testu ELISA vyplýva, že všetky cereálie obsahujú prolamínové bielkoviny, resp. glutén, ktorých koncentrácia vysoko prekračuje limity pre potraviny vhodné na konzumáciu celiakmi. Najvyššia koncentrácia prolamínov, stanovených ako gliadín metódou ELISA

s protilátkou R5, bola stanovená v pšenici špaldovej (16250 ppm). Poradie ďalších obilnín podľa klesajúcich obsahov alergénneho agens je nasledovné: pšenica letná, pšenica tvrdá, ovos (vločky), jačmeň jarný, tritikale (1300 ppm). Láskavec metlinatý, pohánka lúpaná, ryža a kukurica patria medzi prirodzene bezlepkové potraviny (8,75 – 5,0 ppm).

Metóda ELISA s protilátkou R5 je vhodnou metódou pre stanovenie prítomnosti gliadínov, sekalínov a hordeínov v rastlinnom materiáli.

LITERATÚRA

BRETT, G. M. – MILLS, E.N. C. – BACON, J. 2002. Temperature-dependent binding of monoclonal antibodies to C hordein. In *Biochemica et biophysica Acta*, vol. 1594, 2002, no.1, p. 17-26.

CIACCI, C. – CIRILLO, M. – CAVALLARO, R. – MAZZACCA, G. 2002. Long-term follow-up of celiac adults on gluten-free diet: prevalence and correlates of intestinal damage. In: *Digestion*, vol. 66, 2002, p. 178-185.

CICLITIRA, P. J. – EVANS, D. J. – FAGG, N. L. et al. 1984. Clinical testing of gliadin fractions in coeliac patients. In *Clinical Science*, vol. 66, 1984, p. 357–364. ISSN 0143-5221.

CORAZZA, V. – DAIMLER, R. – ERNST, A. et al. 1990. *Knihá o zdraví*. Praha: Victoria publishing, 1990. 915 s. ISBN 80-856005-07-4.

DENERY-PAPINI, S. – LAURIÉRE, M. – BRANLARD, G. 2007. Influence of the allergic variants encoded at the Gli-B1 locus, responsible for a major allergen of wheat, on IgE reactivity for patient suffering from food allergy to wheat. In *Journal Agricultural Food Chemistry*, vol. 53, 2007, no. 3, p. 799-805.

ELLIS, H. J. – DOYLE, A. P. – WIESER, H. 1990 a. Measurement of gluten using a monoclonal antibody to a sequenced peptide of alpha-gliadin from the coeliac activating domain I. In *Journal of biochemical and biophysical methods*, vol. 28, 1990, no. 1, p. 77-82. ISSN 0165-022X.

ELLIS, H. J. – FREEDMAN, A. R. – CICLITIRA, P. J. 1990 b. Detection and estimation of barley prolamins content of beer and malt to assess their suitability for patient with coeliac disease. In *Clinica Chimica Acta*, vol. 189, 1990, no. 2, p. 123-130. ISSN 1873-3492.

FASANO, A. – CATASSI, C. 2001. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. In: *Gastroenterology*, vol. 120, 2001, p. 636-651.

FERENČÍK, M. 1989. *Imunochémia*. 2. vyd. Bratislava : Alfa, 1989. 592 s. ISBN 80-05-00043-X.

FERENČÍK, M. – ŠKÁRKA, B. 1981. *Biochemické laboratórne metódy*. Bratislava: ALFA, 1981. 856 s. 63-559-81.

FUCHS, M. 2005. *Alergie číha v jídle i pití ...* Plzeň: Adéla. 2005, 189 s. ISBN 80-902532-5-3.

HERNANDO, A. – MUJICO, J. R. – MENA, M. C. 2008. Measurement of wheat gluten and barley hordeins in contaminated oats from Europe, the United States and Canada by sandwich R5 ELISA. In *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 20, 2008, no. 6, p. 545-554.

HILL, P. G. – McMILLAN, S. A. 2006. Anti-tissue transglutaminase antibodies and their role in the investigation of coeliac disease. In *Ann Clin Biochem*, vol. 43, 2006, p. 105-117.

HOGBERG, L. – LAURIN, P. – FALTH-MAGNUSSON, K. 2004. Oats to children with newly diagnosed coeliac disease. In *International Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 53, 2004, p. 649 – 654. ISSN 0017-5749.

HULÍN, P. – DOSTÁLEK, P. – HOCHÉL, I. 2008. Metody stanovení lepkových bílkovin v potravinách. In *Chemické listy*, vol. 102, p. 327 – 337.

- ILAVSKÁ, A. – KRÁTKY, A. 2006. Neznášam lepok! In *Diabetik*, roč. 5, 2006, č. 4, s.10-14.
- JABRI, B. – SOLLID, L. M. 2006. Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. In *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, vol. 3, 2006, no. 9, p.516-25.
- JANATUINEN, E. K. - KEMPPAIEN, T. A. - PIKKARAIENN, T. H. 2000. Lack of cellular and humoral immunological responses to oats in adults with coliac disease. In *International Journal of Gasthroenterology and Hepatology*, vol. 46, 2000, p. 327-331. ISSN 0017-5749.
- KANERVA, P. - SONTAG-STORM, T. – LEHTONEN, P. 2005. Determination of Prolamin in beers by ELISA a SDS-PAGE. In *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 111, 2005, no. 1, p. 61-65.
- KANERVA, P.M. - SONTAG-STORM, T.S. – RYOPPY, P.H. 2006. Analysis of barley contamination in oats using R5 and α -gliadin antibodies. In *Journal of cereal Science*, vol. 44, 2006, no. 3, p. 347-352.
- KAHLENBERG, F. – SANCHEZ, D. – LACHMENN, I. 2005. Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides. In *European Food Research and Technology*, vol. 222, 2005, p. 78-82.
- LEÓN, F. – SANCHEZ, L. – CAMARERO, C. et al. 2005. Immunopathogenesis of celiac disease. In *Immunologia*, vol. 24, 2005, p. 313-325.
- LOWICHIK, A. – BOOK, L. 2003. Pediatric celiac disease : clinicopathologic and genetic aspects. In *Pediatric and Developmental Pathology*, vol. 6, 2003, p. 470-483.
- MÉNDEZ, E. – VELA, C. – IMMER, U. 2005. Report of a collaborative trial to investigate the performane of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. In *European Joournal of Gastroentherology and Hepatology*, vol. 17, 2005, no. 10, p. 1053-1063. ISSN 1473-5687.
- MICHALÍK, I. – BAUEROVÁ, M. 2001. Celiakálne ochorenia známe i neznáme. In: *Výživa a zdravie*, roč. 46, 2001, č. 1, s. 10-12.
- MICHALÍK, I. – GÁLOVÁ, Z. – SZABOVÁ, E. 2002. *Návody na laboratórne cvičenia z biochémie*. Nitra : SPU, 2002. 100s. ISBN 80-7137-988-3.
- OSMAN, A. A. – UHLING, H. H. – VALDES, I. et al. 2001. A monoclonal antibody that recognize a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. In *European Journal of Gasthroentherology and Hepatology*, vol. 13, 2001, no.10, p. 1189-1193. ISSN 094-691X.
- RAUCHOVÁ, H. – RAUCH, P. 1996. Alergeny potravín. In *Chemické listy*, vol. 91, 1996, p. 189-193. ISSN 1213-7103.
- RIHA, W. E. – IZZO, H. V. – ZHANG, J. el al. 1996. Nonenzymatic deamidation of food proteins. In *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 36, 1996, no. 3, p. 225-255. ISSN 1040-8398.
- SHAN, L. – MOLBERG, O. – PARROT, I. et al. 2002. Structural basisi for gluten intolerance in celiac sprue. In *Science*, 2002, vol. 297, 2002, p. 2275-2279.
- SJOSTROM, H. – LUNDIN, K. E. – MOLBERG, O. et al. 1998. Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease. General impertance of Gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. In *Scandinavian Journal of Immunology*, 1998, vol. 48, no. 2, p. 111-115.
- SKERRIT, J. H. – HILL, A. S. 1990. Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods . In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 38, 1990, no. 8, p. 1771–1778.
- STØRSRUD S. - OLSSON M. - ARVIDSOON R.L. - NILSSON L.A. - NILSSON O. - KILANDER A. 2003. Adult coeliac patients do tolerate large amount of aots. *European Jounal of Clinical Nutrition* 57, p. 163-169 doi: 0.1038/sj.ejcn.1601525

- SZABOVÁ E. – URMINSKÁ D. – MICHALÍK I. 2003. *Využitie pseudocereálií na prípravu potravín pre pacientov s celiakiou*. In Rizikové faktory potravinového reťazca.zborník vedeckých prác z 3. medzinárodnej vedeckej konferencie. Nitra : SPU, 2003, s. 143-145.
- TRONCONE, R. – VITALE, M. - DONATIELLO, A. et al. 1986. A sandwich enzyme immunoassay for wheat gliadin. In *Journal of immunological methods*, vol. 92, 1986, no. 1, p. 21-23. ISSN 0022-1759.
- URMINSKÁ, D. – SOCHA, P. – VOLLMANNOVÁ, A. 2009. ELISA and PAGE analysis of protein determinants from cereal and pseudocereal grain causing human coeliac disease. In: *FEBS Journal*. – Oxford: Blackwell Publishing, 2009, ISSN 1742 464X, vol. 276, suppl. 1 (2009), p. 94.
- VADER, L. W. - DE RU, A. - VAN DER WAL, Y. et al. 2002. Specificity of tissue transglutaminase explain cereal toxicity in celiac disease. In *The journal of experimental medicine*, vol. 195, 2002, no. 5, p. 643-649.
- VALDÉS, I. – GARCIA, E. – LLORENTE, M. et al. 2003. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. In *European Joournal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 15, 2003, no. 5, p. 465-474.
- WASZCZUK, E. – KOSIARA, M. – DOBOSZ, T. et al. 2007. Celiac disease and Diabetes mellitus. In *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, vol. 16, 2007, no. 2, p. 297-301. ISSN 1230-025X.
- WISER, H. 2004. Celiac disease. In *Encyclopedia of grain science*, vol. 1 – 3, 2004,p. 179-187.
- WIESER, H. – KOEHLER, P. 2008. The biochemical basis of celiac disease. In *Cereal Chemistry*, vol. 85, 2008, no. 1, p. 1-14.

Pod'akovanie

Práca bola realizovaná s finančnou podporou projektu VEGA 1/4419/07.

Kontaktná adresa:

Peter Socha, Katedra biochémie a biotechnológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárka univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra. E-mail: socha@afnet.uniag.sk

Adriana Raždíková, Katedra biochémie a biotechnológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárka univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra.

Dana Urminská, Katedra biochémie a biotechnológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárka univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra. E-mail: dana.urminska@uniag.sk