

---

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Štúdijský program: Biológia  
Štúdijský odbor: Imunológia (NIMUN)



**Bc. Zuzana Gajdárová**

Mikrobiota a idiopatické črevné zápaly

Microbiota and inflammatory bowel diseases

**Diplomová práca**

Vedúca záverečnej práce: Mgr. Klára Kostovčíková, Ph.D.

Praha, 2019

---

### **Čestné prehlásenie**

Prehlasujem, že som prácu vypracovala samostatne, a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca, ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 12.8.2019

Bc. Zuzana Gajdárová

---

## **Pod'akovanie**

Touto cestou by som rada pod'akovala svojej školiteľke Mgr. Kláre Kostovčikovej, Ph.D. za jej trpezlivosť, cenné rady a čas, ktorý mi venovala počas magisterského štúdia. Ďalej by som rada pod'akovala prof. MUDr. Helene Tlaskalovej-Hogenovej, DrSc., MUDr. Miloslavovi Kverkovi, Ph.D. za pomoc a cenné rady, Mgr. Štěpánovi Coufalovi za pomoc pri experimentoch a praktických častiach, a všetkým kolegom v Laboratóriu bunkovej a molekulárnej imunológie za príjemné pracovné prostredie. V neposlednom rade ďakujem svojej rodine, kamarátom a priateľovi za podporu počas celého štúdia a najmä v náročných momentoch.

---

## Obsah

PodĎakovanie .....	3
Abstrakt.....	6
Abstract .....	7
Zoznam skratiek.....	8
1. Úvod.....	10
2. Prehľad literatúry .....	11
2.1. Slizničná imunita.....	11
2.2. Črevná bariéra .....	12
3.1. Idiopatické črevné zápalý .....	14
3.1.1. Ulcerózna kolitída.....	14
3.1.2. Crohnova choroba.....	16
3.1.3. Primárna sklerotizujúca cholangitída.....	18
3.1.4. Diagnostika a liečba.....	19
3.2. Črevná mikrobiota .....	21
3.2.1. Rozdielna mikrobiota v tenkom a hrubom čreve.....	21
3.2.2. Mikrobálne produkty .....	22
3.2.3. Vzťah mikrobioty a hostiteľa.....	24
3.2.3. Dysbióza .....	25
4.1. Biomarkery .....	26
4.1.1. Biomarkery v IBD: používané, objavené alebo možné nové .....	26
3. Ciele práce .....	32
4. Materiál a metodika .....	33
4.1. Vzoroký krvi .....	33
4.1.1. Izolácia PBMC.....	34
4.1.2. Zamrazenie PBMC .....	34
4.1.3. Rozmrazenie PBMC .....	35
4.2. Stimulácia buniek.....	35
4.2.1. Stimulácia rozmrazených PBMC.....	37

---

4.3.	FACS pre intracelulárne cytokíny.....	37
4.3.1.	Optimalizácia protokolu .....	39
4.3.2.	Spracovanie FACS výsledkov .....	42
4.4.	ELISA .....	43
5.	Výsledky .....	45
5.1.	FACS.....	45
5.1.1.	Produkcia IL-2 vrámci skupín ochorenia.....	45
5.1.2.	Produkcia IL-4 vrámci skupín ochorenia.....	46
5.1.3.	Produkcia IL-17 vrámci skupín ochorenia.....	47
5.1.4.	Produkcia TNF- $\alpha$ vrámci skupín ochorení .....	48
5.1.5.	Produkcia IFN- $\gamma$ vrámci skupín ochorení.....	49
5.1.6.	Porovnanie obdobia relapsu a remisie .....	50
5.1.7.	Porovnanie rozdielnych foriem ochorenia.....	51
5.2.	Sérové biomarkery .....	52
5.2.1.	Biomarkery črevnej bariéry .....	52
5.2.2.	Biomarkery zápalu.....	54
5.2.3.	Biomarkery identifikované cez Array.....	56
6.	Diskusia .....	58
7.	Záver .....	62
8.	Zoznam použitej literatúry .....	64

---

## Abstrakt

Idiopatické črevné zápaly (IBD) sú autoimunitné ochorenie postihujúce gastrointestinálny trakt. Medzi hlavné typy patria ulcerózna kolitída (UC) a Crohnova choroba (CD). V poslednom období sa s IBD spája aj primárna sklerotizujúca cholangitída (PSC), čo je chronické ochorenie pečene spojené so stenózou žľčovodov. Presná patogenéza a etiológia týchto ochorení nie je jasná, aj napriek veľkej snahe vedeckej spoločnosti. Jedná sa o multifaktoriálne ochorenia, ktoré sú spájané s dysbiózou črevnej mikrobioty. Diagnostika ochorení je založená na pre pacientov nepríjemných endoskopických vyšetreniach, a preto snaha hľadať nové sérové biomarkery je dobrý cieľ do budúcnosti.

V diplomovej práci bola sledovaná reaktivita buniek periférnej krvi pacientov s IBD na 10 vybraných zástupcov typickej mikroflóry a to: *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Blautia coccooides*, *Roseburia intestinalis*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Prevotella ruminicola* a *Escherichia coli*. Reaktivita pacientov s CD, UC a PSC-IBD bola zvýšená po stimulácii *Faecalibacterium*, *Lactobacillus* a *Prevotella*. Išlo však o nízke percentá buniek produkujúcich cytokíny, preto nie je možné povedať, či by mohli byť zapojené do patogenézy.

Ďalšou časťou práce bolo testovanie vybraných biomarkerov za použitia séra pacientov. Proteíny viažuce mastné kyseliny, a to intestinálny I-FABP a pečeneňový L-FABP poukazovali na poškodenie črevnej bariéry. Zvýšená koncentrácia matrix metaloproteináz konkrétne MMP-14, a znížená hodnota MMP-9 jasne determinovala IBD pacientov od zdravých kontrol. Pri rozdelení UC a CD by mohol pomôcť proteín viažúci lipopolysacharid LBP, ktorého hodnoty boli vyššie u CD.

Tieto výsledky poukazujú na reaktivitu na komenzálne baktérie a na dôležitosť črevnej bariéry pri IBD. Neinvazívna diagnostika má mnoho výhod nie len pre pacientov ale aj z ekonomického hľadiska vrátane možnosti opakovať vyšetrenia v krátkom období.

**Kľúčové slová:** IBD, ulcerózna kolitída, Crohnova choroba, črevná mikrobiota, periférna krv, biomarkery

---

## Abstract

Inflammatory bowel diseases (IBD) are an autoimmune illnesses affecting gastrointestinal tract. The main types include ulcerative colitis and Crohn's disease. Recently, primary sclerosing cholangitis (PSC) has also been associated with IBD. PSC is a chronic liver disease associated with bile duct stenosis. The exact pathogenesis and etiology of these diseases is not clear, despite the great efforts of the scientific community. They are multifactorial diseases that are associated with dysbiosis of intestinal microbiota. Their diagnosis is based on for patients unpleasant endoscopic examinations and therefore the search for new serum biomarkers is needed and appreciated target of scientific interest.

In the first part of diploma thesis, we focused on the reactivity of peripheral blood cells of IBD patients to 10 selected representatives of typical intestinal microbiota: *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Blautia coccooides*, *Roseburia intestinalis*, *Eubacterium rectale*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Prevotella ruminicola* and *Escherichia coli*. Reactivity of CD, UC and PSC-IBD patients was increased after stimulation with *Faecalibacterium*, *Lactobacillus* and *Prevotella*. However, we got low percentage of cytokine-producing cells, so we cannot confirm whether they could be involved in pathogenesis or not.

Next part of the work was testing of selected biomarkers using patients' sera. Fatty acid binding proteins such as intestinal I-FABP and liver L-FABP have shown intestinal barrier damage. Increased matrix metalloproteinases MMP-14 concentration and decreased MMP-9 clearly determined IBD patients from healthy controls. A lipopolysaccharide-binding protein LBP whose values were higher for CD could help to distinguish UC and CD.

Our results indicate reactivity to commensal bacteria and the importance of the intestinal barrier in IBD. Non-invasive diagnostics has many benefits not only for patients but also economically and for the possibility of retesting in a short period of time.

**Key words:** IBD, ulcerative colitis, Crohn's disease, gut microbiota, peripheral blood, biomarkers

---

## Zoznam skratiek

<b>Skratka</b>	<b>Význam v slovenskom jazyku</b>	<b>Význam v anglickom jazyku</b>
ACCA	Protilátky proti karbohydrátu chytobiosy	Anti-Chitobioside Carbohydrate Antibodies
Ag	Antigén	Antigen
AIEC	Adherentno-invazívne <i>Escherichia coli</i>	Adherent-Invasive <i>Escherichia coli</i>
ALCA	Protilátky proti karbohydrátu laminarobiosidu	Anti-Laminaribioside Carbohydrate Antibodies
AMCA	Protilátky proti karbohydrátu mannobiosidu	Anti-Mannobioside Carbohydrate Antibodies
ANCA	Protilátky proti antigénom cytoplazmatických granúl neutrofilných granulocytov	Anti-Neutrophil Cytoplasmatic Antibodies
Anti-OmpC	Protilátky proti proteínu vonkajšej membrány <i>C</i>	Antibodies against Outer Membrane Protein C
ASCA	Protilátky proti <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Anti-Saccharomyces Cerevisiae Antibodies
ATB	Antibiotiká	Antibiotics
ATG16L1	Interleukín	Autophagy related 16 like 1
CBir1	Protilátky proti flagelínu CBir1	Antibodies to CBir1 flagellin
CD	Crohnova choroba	Crohn's disease
CD	Diferenciačná skupina	Cluster of Differentiation
CXCR1	C-X-C chemokínový receptor 1	C-X-C motif chemokine receptor 1
DAO	Diaminooxidáza	DiAminase Oxidase
DC	Dendritická bunka	Dendritic Cell
DMSO	Dimetylsulfoxid	DiMethyl SulfOxid
ECM	Extracelulárny matrix	Extracellular matrix
EG-VEGF	Cievny endotelový rastový faktor odvodený od endokrinnnej žľazy	Endocrine gland derived vascular endothelial growth factor
ELISA	Enzymatická imunoanalýza	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FCS	Fetálne teľacie sérum	Fetal Calf Serum
FIX/PERM	Roztok na fixáciu a permeabilizáciu	Fixation/permeabilization
FOXP3	Forkhead box P3	Forkhead box P3
FVD	Fixovateľné farbivo pre životaschopnosť	Fixable Viability Dye
G <sup>-/+</sup>	Gram negatívne/pozitívne	Gram negative/positive
GALT	Lymfatické tkanivo spojené s črevom	Gut-Associated Lymphoid Tissue
GIT	Gastrointestinálny trakt	GastroIntestinal Tract
IBD	Idiopatické črevné zápal	Inflammatory Bowel Disease
IEC	Epiteliálna bunka čreva	Intestinal Epithelial Cell
I-FABP	Črevný proteín viažuci mastné kyseliny	Intestinal Fatty Acid-Binding Protein
Ig	Imunoglobulín	Immunoglobulin
IGF-2	Rastový faktor 2 podobný inzulínu	Insuline-like growth factor
IL	Interleukín	Interleukin
IL23R	Receptor interleukínu 23	Interleukin-23 Receptor
JAM	Adhézne molekuly spojov	Junction Adhesion Molecules
LBP	Proteín viažuci lipopolysacharid	Lipopolysaccharide binding protein
L-FABP	Pečeňový proteín viažuci mastné kyseliny	Liver Fatty Acid-Binding Protein
LP	Lamina Propria	Lamina Propria
MBL	Lektín viažuci manózu	Mannose-binding lectin
MMP	Metaloproteinázy matrixu	Matrix Metalloproteinase
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina	Messenger RiboNucleotid Acid

---

MUC2	Mucin 2	Mucin 2
NF-κB	Nukleárny faktor kappa B	Nuclear Factor Kappa B
NOD2	Nukleotid-viažuca oligomerizačná doména obsahujúca proteín 2	Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2
OPG	Osteoprotegerín	Osteoprotegerin
PBMC	Mononukleárne bunky periférnej krvi	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Fosfátový pufor	Phosphate-Buffered Saline
PPAR-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Pre-Hapto2	Prekurzor haptoglobínu 2	Precursor of haptoglobin 2
PSA	Polysacharid A	PolySaccharide A
PSC	Primárna sklerotizujúca cholangitída	Primary sclerosing cholangitis
RA	Kyselina retinová	Retinoic Acid
ROBO-4	Roundabout guidance receptor 4	Roundabout guidance receptor 4
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RT	Izbová teplota	Room Temperature
SAA	Sérový amyloid A	Serum Amyloid A
SCFA	Mastné kyseliny s krátkym reťazcom	Short-Chain fatty acid
SFB	Segmentované vláknité baktérie	Segmented Filamentous Bacteria
TFF-3	Trefoil factor 3	Trefoil factor 3
TGF-β1	Transformujúci rastový faktor beta 1	Transforming Growth Factor beta 1
Th	Pomocná T-bunka	T Helper cell
TIMP-1	Tkanivový inhibítor metaloproteináz	Tissue inhibitor of metalloproteinases 1
TLR	Receptor podobný génu Toll	Toll Like Receptor
TMEFF-1	Tomoregulin-1	Tomoregulin-1
T-reg	T-regulačná bunka	Regulatory T-cell
TROY	Tumor Necrosis Factor receptor Superfamily member 19	Tumor Necrosis Factor receptor Superfamily member 19
UC	Ulcerózna kolitída	Ulcerative Colitis
XBP1	Proteín 1 viažuci X-box	X-box Binding Protein 1

---

---

## 1. Úvod

Idiopatické črevné zápaly (IBD) sú autoimunitné ochorenia gastrointestinálneho traktu, ktoré postihujú čoraz viac ľudí. Medzi tieto zápaly patria ulcerózna kolitída a Crohnova choroba. Novšou formou, ktorá je spojená s IBD a to najmä s UC, je primárna sklerotizujúca cholangitída, čo je chronické ochorenie pečene. Patogenéza a etiológia týchto ochorení nie je dobre objasnená aj napriek veľkému úsiliu vedeckej spoločnosti. Diagnostika je založená na pre pacientov nepríjemných endoskopických vyšetreniach. Preto hľadania nových biomarkerov pre diagnostiku, predikciu relapsu alebo zlyhanie liečby je dobrý a zmysluplný cieľ.

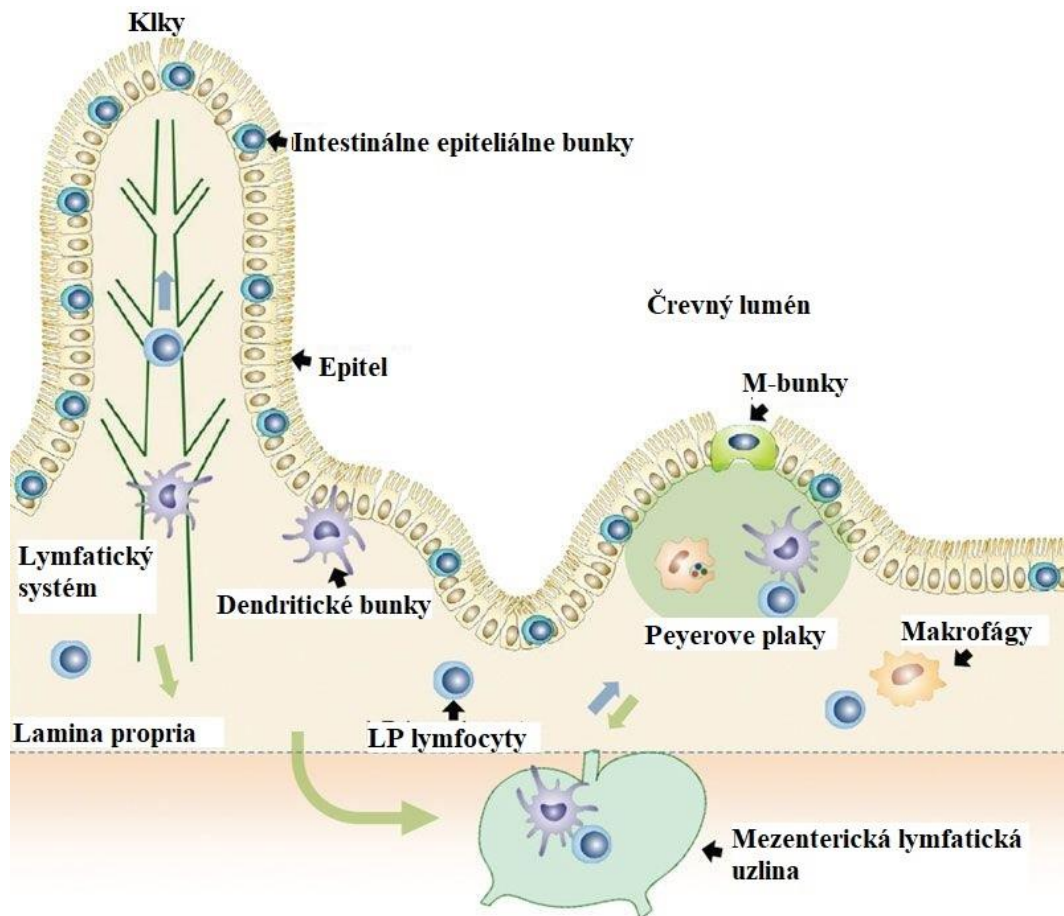
Črevo je tvorené obrovským množstvom mikroorganizmov, bez ktorých by telo nevedelo stráviť prijímanú potravu, získať potrebné živiny a brániť sa proti patogénom. Obsahuje rôzne vírusy, prvoky, huby a najmä obrovské množstvo baktérií, či už prospešných tak aj potenciálne patogénnych. Táto krehká rovnováha sa môže ľahko narušiť, čo vyústí do vzniku zápalových ochorení, alergií, prípadne karcinómov.

V mojej diplomovej práci som sa venovala reaktivite buniek pacientov s IBD s 10 zástupcami bežnej črevnej mikrobioty pomocou metódy prietokovej cytometrie a testovaniu vybraných biomarkerov črevnej bariéry a zápalu prostredníctvom ELISA metódy.

## 2. Prehľad literatúry

### 2.1. Slizničná imunita

Črevo je miesto styku s obrovským množstvom antigénov z vonkajšieho prostredia ale aj vnútorného. Slizničný imunitný systém v čreve sa nazýva GALT. Je tvorený 3 hlavnými časťami: jednovrstvovou epiteliálnou vrstvou zloženou z intestinálnych epiteliálnych buniek, laminy propria (LP), ktorá obsahuje množstvo imunitných buniek a lymfatického tkaniva v prípade čreva Peyerových plakov a izolovaných mezenterických lymfatických uzlín (Obr.1). K obranyschopnosti prispievajú aj mikróby, ktoré pokrývajú sliznicu čreva, a bránia tak naviazaniu patogénov tým, že im berú živiny a zabraňujú ich usadeniu na sliznici (McGhee a Fujihashi, 2012, Van Wijk a Cheroutre, 2009). Tieto mikróby sú konštantne monitorované epiteliálnymi bunkami, ktoré zabezpečujú rovnováhu medzi toleranciou komenzálnych baktérií a odstraňovaním patogénov (Thaiss *et al.*, 2016).



Obr. 1: Stavba a zloženie slizničného imunitného systému v čreve. Prevzaté a upravené Wu, 2014.

---

GALT sa dá rozdeliť na 2 funkčné časti: indukčnú a efektorovú. Efektorová časť je lokalizovaná v lamina propria a zahŕňa dendritické bunky (DC), makrofágy, prirodzené lymfoidné bunky a bunky adaptívnej imunity ako lymfocyty a plazmatické bunky produkujúce IgA. Indukčná časť zahŕňa mezenterické lymfatické uzliny a Peyerove plaky, ktoré nemajú aferentné prívody lymfy, cez ktoré by DC zachytávali antigény (Ag). Namiesto toho DC získavajú Ag od M-buniek, ktoré zachytávajú antigény priamo v lumene čreva (Ohno, 2015).

Imunitná odpoveď v čreve prebieha neustále ale je regulovaná cez T-regulačné lymfocyty (T-reg), ktoré sa nachádzajú vo väčšom množstve v lamina propria, a prostredníctvom svojich regulačných mechanizmov tlmia prehnajú reakciu. Hlavné cytokíny, ktoré ovplyvňujú ich funkciu sú TGF- $\beta$  a IL-10, ktoré sú produkované cez DC (Atarashi *et al.*, 2011). Ďalšia kľúčová zložka imunity v čreve je sIgA, ktorá má kľúčovú úlohu v lokálnej imunitnej odpovedi, a považuje sa za prvú líniu obrany proti patogénom a toxínom. Produkcia sIgA na špecifické Ag nasleduje po ich zachytení M-bunkami čreva, transformáciou antigén prezentujúcich buniek najmä DC, aktiváciou T-lymfocytov a najmä class switch-om B-buniek v mezenterických uzlinách. Komenzálna baktéria indukuje tvorbu len malého množstva sIgA (Lazar *et al.*, 2018). Jeden z významných regulátorov imunity v čreve je aj molekula NOD2. Expresia molekuly NOD2 v črevnej sliznici je ovplyvnená prítomnosťou mikrobioty a expresia NOD2 ovplyvňuje mikrobiotu. Hostiteľ cez NOD2 a komenzálna baktéria udržiava homeostázu cez vzájomnú reguláciu (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2009).

Mucíny zohrávajú taktiež nenahraditeľnú úlohu v obrane. Zachytávajú patogény a parazity a koordinujú imunitnú odpoveď na infekciu. Fungujú aj ako samotné záchytné miesto pre mikroorganizmy cez interakciu medzi mikrobiálnymi komponentami. Avšak zvýšená produkcia mucínových proteínov môže viesť k tvorbe rakoviny (Pillai, 2015). Naopak znížená produkcia mucínov, v dôsledku poškodenia génu *MUC2*, vedie k tvorbe črevného zápalu (Van Der Sluis *et al.*, 2005).

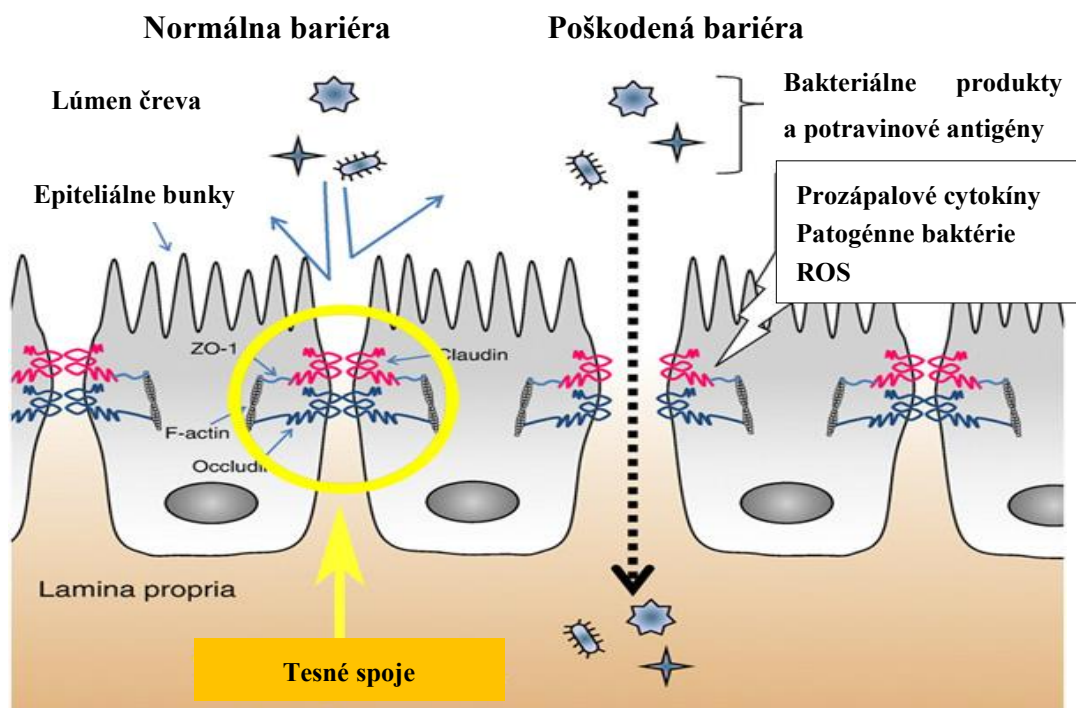
Panetové bunky sú nenahraditeľnou súčasťou črevnej imunity. Sú umiestnené v kryptách tenkého čreva, kde produkujú veľké množstvo antimikrobiálnych látok ako lyzozým, fosfolipáza A2, lektíny a najmä  $\alpha$ -defenzíny (Salzman *et al.*, 2010).

## 2.2. Črevná bariéra

Črevná bariéra je tvorená jednovrstvovým epitelom, ktorý musí odolávať nátlaku Ag z vnútorného a vonkajšieho prostredia. Práve vďaka tejto bariére nedochádza k aberantnej

imunitnej odpovedi na komenzálne baktérie. Integrita črevnej bariéry je zabezpečená cez transmembránové proteíny tesných spojov ako kladíny, okcludíny, zona okcludíny 1, 2, 3, adhézne molekuly (JAM) a medzerové spoje, ktoré sú nevyhnutné pre udržanie pevných spojov medzi bunkami (Landy *et al.*, 2016). Sú pripojené k cytoskeletu cez F-aktín a myozín II. Tesné spoje definujú hranicu medzi apikálnou a bazolaterárnou membránou a zabraňujú paracelulárnemu prechodu látok (Salim a Söderholm, 2010).

Úlohy bariéry sú: 1. zabránenie priameho kontaktu medzi hositeľom a mikrobiotou aby sa zabránilo poškodeniu IEC (Yu *et al.*, 2012). 2. Limituje prechod baktérií k imunologickým senzorom v LP a napomáha tolerancii komenzálnych baktérií (Belkaid a Hand, 2014). 3. Chráni komenzálne baktérie pred priamym odstránením (Kelly *et al.*, 2005). 4. Umožňuje metabolické interakcie medzi nimi, tak aby boli pre obidve zložky výhodné (Nicholson *et al.*, 2012).



Obr. 2. Stavba normálnej a porušenej črevnej bariéry. Pri normálne fungujúcej bariére nedochádza k translokácii antigénov z lúmenu čreva do LP. Pri porušenej bariére sa tieto antigény dostávajú do styku s zložkami imunitného systému, čo vedie k odpovedi. Prevzaté a upravené Suzuki, 2011.

Tejto bariére napomáhajú vyššie spomínané mucíny, antimikrobiálne látky, imunoglobulíny a cytokíny. Ak dôjde k akýmkoľvek abnormalitám v jednotlivých

---

zložkách črevnej bariéry nastane zvýšená permeabilita čreva, čo môže viesť k vstupu antigénov z črevného lumenu do lamina propria, čo môže viesť k lokálnej alebo systémovej imunitnej odpovedi (Lin *et al.*, 2015; Fasano a Shea-Donohue, 2005). Tejto zvýšenej permeabilite čreva sa pripisuje pojem „leaky gut“. Takéto črevo umožňuje prechod Ag, inak situovaných v lúmene čreva, do LP, kde sa odohrávajú lokálne alebo systémové imunitné odpovede. S takýmto poškodením črevnej bariéry súvisia aj idiopatické črevné zápal a mnohé ďalšie patogenézy nie len GIT (Fasano, Shea-Donohue, 2005; Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2015)

### **3.1. Idiopatické črevné zápal**

Idiopatické črevné zápal (IBD) sú autoimunitné ochorenia, medzi ktoré patrí ulcerózna kolitída a Crohnova choroba. Postihujú gastrointestinálny trakt (GIT) u približne 0,3% populácie v mnohých krajinách. Na základe genetických štúdií bolo doposiaľ identifikovaných viac ako 200 génov, ktoré sa podieľajú na hostiteľskej odpovedi proti črevnej mikrobiote (Liu *et al.*, 2015). Súčasná patogenéza sa priklonuje k aberantnej imunitnej odpovedi v geneticky predisponovaných jedincoch na črevnú mikrobiotu, čo vedie k tvorbe chronického zápalu. Tieto patologické zmeny v čreve sa označujú ako dysbióza (Hansen a Sartor, 2015). Dysbióza je charakterizovaná najmä ako zníženie abundancie bakteriálnych kmeňov *Firmicutes* a *Bacteroides*. Naopak sa zvyšuje abundancia kmeňu *Proteobacteria*, medzi ktoré patrí aj *E.coli* (Albenberg *et al.*, 2015). Nie je však jasné, či tento jav je dôsledok ochorenia alebo príčinou vzniku samotného ochorenia (Kverka, Tlaskalová-Hogenová, 2017).

Environmentálne faktory taktiež ovplyvňujú vznik IBD. Radia sa medzi nich fajčenie, skorá apendektómia, stres, strava, užívanie nesteroidných liekov proti zápalu, antibiotiká a mnohé ďalšie. Avšak žiadny z týchto faktorov nefunguje v patogenéze sám. Kombinácia genetických faktorov, environmentálnych a interakcie hostiteľa s mikrobiotou podporujú vznik IBD. To má za následok poškodenie bariéry (Strober *et al.*, 2007; Kiesslich *et al.*, 2012).

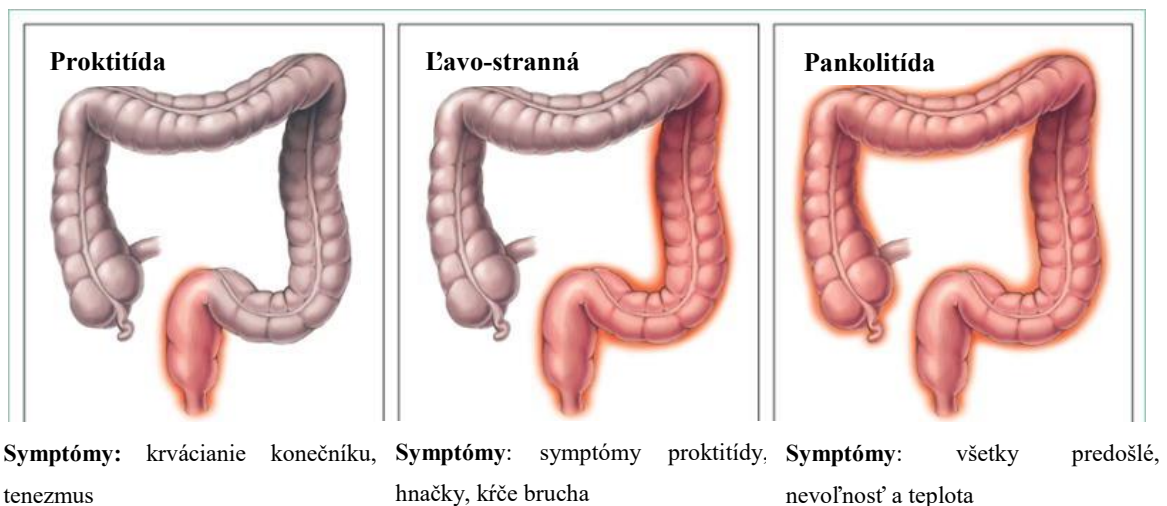
#### **3.1.1. Ulcerózna kolitída**

Ulcerózna kolitída (UC) je jeden z typov IBD, ktorý postihuje oblasť konečníku a hrubého čreva kontinuálnym postupom najmä u dospelých ľudí vo veku 30-40 rokov (Hoivik *et al.*, 2012). Zápal pri UC sa vyskytuje v oblasti lamina propria a submukóze a len v ojedinelých prípadoch v oblasti svalov (Le Berre *et al.*, 1995). Vyznačuje sa

obdobiami remisie, kedy je pacient bez aktívneho prejavu ochorenia a obdobiami aktívneho ochorenia tzv. relapsu, ktoré sa prejavuje najmä častými hnačkami.

V aktívnej fáze ochorenia je membrána sliznice infiltrovaná bunkami podporujúcimi zápal ako lymfocyty, plazmatické bunky a eozinofily, ktoré sa normálne v zdravom jedincovi nachádzajú izolované v lamina propria. Epitel je v tomto období výrazne poškodený, a k poškodeniu funkcie dochádza u pohárikovitých buniek. Ďalej sa vyskytuje hyperplázia epitelu a akumulácia leukocytov do kryptických abcesov. V remisii naopak dochádza k obnoveniu sliznice a obnoveniu funkcie pohárikovitých buniek a vymiznutie abcesov. Mukózna vrstva sa môže obnoviť úplne ale ak bol zápal príliš rozsiahly a vážny vzniká atrofia tkaniva (Morson, 1971, Johansson *et al.*, 2014). U pacientov s dlho trvajúcim ochorením sa vyskytuje fibróza mukóznej vrstvy. Predpokladá sa, že premena rezidentných mezenchymálnych buniek na aktívne myofibroblasty spôsobuje fibrózu tkaniva (Yamagata *et al.*, 2011).

S ochorením je spojená aj redukovaná expresia peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ), čo je negatívny regulátor NF- $\kappa$ B závislej cesty zápalu (Dubuqouy *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 1998). Z genetických faktorov sa s UC spája najmä defekt génu *XBPI* v kolonocytoch (Kaser *et al.*, 2008).



Obr. 3: Rozdelenie a symptómy fenotypov ulceróznej kolitídy. Prevzaté a upravené Silverberg, 2005

Pri UC je aberantná mikrobiota spájaná so znížením produkcie krátkych mastných kyselín (SCFA), medzi ktoré patria butyráty alebo propionáty (Marchesi *et al.*, 2007; Huda-Faujan *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2014). Baktérie produkujúce SCFA majú veľký význam pri znižovaní pro-zápalovej odpovedi v intestinálnych epiteliálnych bunkách, a majú schopnosť produkovať butyráty. Ukázali sa ako účinný spôsob zlepšenia

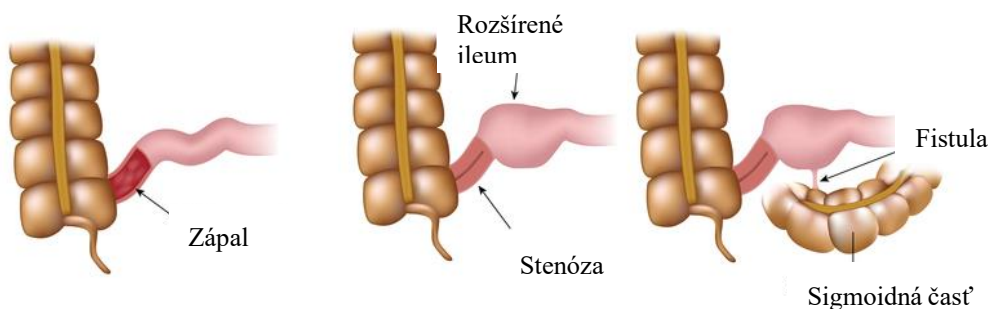
---

sympptómov IBD v modeloch ochorenia (Eeckhaut *et al.*, 2013). V stolici pacientov s UC je znížená abundancia *Faecalibacterium prausnitzii* a *Roseburia hominis*, ktoré produkujú práve butyráty (Machiels *et al.*, 2014).

UC sa spája s Th-2 bunkovou odpoveďou, čo potvrdila štúdia Fuss a kol. z 1996, ktorý našli Th-2 polarizované lymfocyty produkujúce IL-5 v lamina propria u pacientov s UC (Fuss. 1996). Táto teória sa potvrdila aj v ďalšej štúdii, kde bola zistená zvýšená expresia mRNA pre IL-4 a IL-13. IL-13 je cytokín produkovaný NK bunkami, ktoré patria medzi kľúčových mediátorov epiteliálnej cytotoxicity a bariérovej dysfunkcie (Inoue *et al.*, 1999). V štúdii z roku 2014 sa skúmala paradigma o Th-1 bunkovej odpovedi u CD a Th-2 odpovedi u UC. Pri tejto štúdii bola nájdená nová populácia CD4<sup>+</sup> T-lymfocytov produkujúcich IL-9, ktoré sa označili ako Th-9 lymfocyty. Th-9 lymfocyty vznikajú po modulácii cez MHC-II komplex s antigénom v prítomnosti IL-4 a TGF- $\beta$ . IL-9, produkovaný týmito bunkami, negatívne vplyva na proliferáciu a opravu buniek čreva a ovplyvňuje aj črevnú bariéru. Taktiež zvyšuje produkciu pro-zápalového cytokínu TNF- $\alpha$ , čím prispieva k patogenéze ochorenia (Gerlach *et al.*, 2014). V mukóze hrubého čreva pacientov boli nájdené IL-8<sup>+</sup> T-reg, ktoré produkovali veľké množstvo IL-8, indukovali tvorbu pro-zápalových cytokínov a podporovali infiltráciu neutrofilov (Kryczek *et al.*, 2016).

### 3.1.2. Crohnova choroba

Crohnova choroba (CD) je ďalší typ IBD. Rovnako ako UC je typické striedanie období relapsu a remisie. Narozdiel od UC, postihuje akúkoľvek časť GIT najmä však terminálne ileum a hrubé črevo. Zápal je segmentovaný a má diskontinuálny postup. Je charakterizovaná granulomatóznym transmurálnym zápalom a tvorbou fistul a abscesov (Thia *et al.*, 2010; Matsuoka *et al.*, 2018). Ochorenie sa deli na 3 fenotypy: zápalová CD, zužovanie lumenu čreva, tvorba fistul. Ak sa vyskytne zužovanie lumenu a fibróza, jediný spôsob liečby je chirurgická intervencia. Transmurálny zápal, ktorý prechádza všetkými vrstvami čreva, vedie k tvorbe fistul a sinusov, s čím súvisí aj tvorba abscesov (Cheifetz, 2013). Podobne ako pri UC je tvorba fibrotických štruktúr spojená s premenou mezenchymálnych epiteliálnych buniek v prítomnosti TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  na fibroblasty (Rieder *et al.*, 2011).



Obr. 4: Rozdelenie fenotypov CD. Prevzaté a upravené: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/crohn-disease>

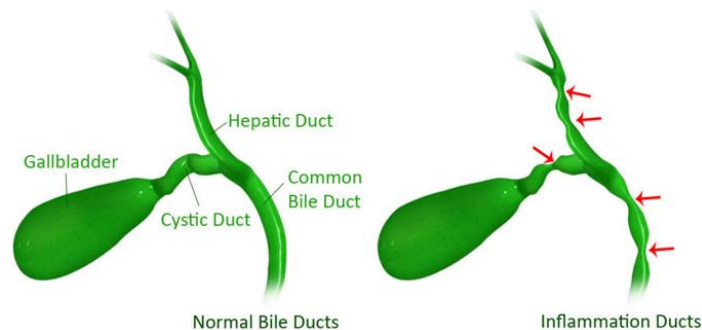
S Crohnovou chorobou je spájaných viacero génov, ktoré sú asociované s vnímaním baktérií a vrodenu imunitou. Patria medzi nich *NOD2*, ktorý je vysoko exprimovaný na Panethových bunkách v tenkom čreve, kde reguluje imunitu a poškodenie tohto génu súvisí so zníženou produkciou  $\alpha$ -defenzínov (Wehkamp *et al.*, 2004). Ďalšie gény sú *ATG16L1*, ktorý je spájaný s autofágiou, ktorá je v prípade CD nesprávna a gén súvisiaci s mukózou *MUC2* (Uehara *et al.*, 2007, Jostins *et al.*, 2012; McGovern *et al.*, 2015).

CD je spájaná s Th-1 bunkovou odpoveďou. V lamina propria pacientov sa našlo veľké množstvo buniek produkujúcich IFN- $\gamma$  a nízke množstvo IL-4. Th-1 bunky aktivujú makrofágy práve prostredníctvom IFN- $\gamma$ , ktoré po aktivácii produkujú IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , ktoré patria medzi pro-zápalové cytokíny (Romagnani *et al.*, 1997). Polarizácia Th-1 buniek prebieha prostredníctvom IL-12 produkovaného cez APC (Hsieh *et al.*, 1993). Ulceratívne lézie u pacientov vznikajú permanentnou infiltráciou zápalových buniek vrátane T-lymfocytov, makrofágov a neutrofilov (Wright *et al.*, 1990). S CD sa spája aj subpopulácia CD4<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-lymfocytov. Hovorí sa o ich protektívnom účinku prostredníctvom regulovania opravy tkaniva a kontroly infiltrácie neutrofilov cez typ V $\delta$ 1+ buniek, ktoré sú u CD pacientov v menšom množstve (Kadivar *et al.*, 2016). Avšak niektoré štúdie hovoria o type V $\delta$ 2+ ako o populácii s pro-zápalovým účinkom, keďže produkujú viac chemokínov a pro-zápalových cytokínov ako TNF- $\alpha$  a IL-17A (Mann *et al.*, 2012). Cytokín IL-23 je taktiež zapojený do patogenézy ochorenia, tým že prispieva k chronickej črevnej patológii. IL-23 podporuje populácie Th-1 a Th-17 T-lymfocytov v súlade s produkciou IFN- $\gamma$ , IL-22 a IL-17 v chronicky zapálenom čreve a znižuje expresiu FOXP3<sup>+</sup> T-reg v lamina propria pacientov s CD (Maloy a Kullberg, 2008).

---

### 3.1.3. Primárna sklerotizujúca cholangitída

Primárna sklerotizujúca cholangitída (PSC) je chronické ochorenie pečene neznámeho pôvodu. Je charakterizované progresívnou fibrózou žľčových kanálov a tvorby ulcerov v mukóze žľčovodu. Ochorenie sa spája s IBD (Karlsen *et al.*, 2017). Patogenéza ochorenia nie je známa ale v minulosti sa navrhovali viaceré teórie. Jednou z nich boli defekty v mechanizme ochrany sliznice pred žľčovými kyselinami (Hohenester *et al.*, 2012). Pri poruche črevnej bariéry dochádza k influxu inak oddelenej črevnej mikrobioty do pečene, čím sa podporuje a zvyšuje Th-17 bunková odpoveď (Katt *et al.*, 2013). Dlhodobou uznávanou teóriou je aj nábor T-lymfocytov z čreva do pečene a poruchy črevnej mikrobioty (Grant *et al.*, 2001 ; Rossen *et al.*, 2015). Porušenie epiteliálnej bariéry žľčovodov, podobne ako porušenie črevnej bariéry u IBD, vedie k expozícii mnohých substancií ako črevná mikrobiota alebo žľčové kyseliny cholangiocytom, čo vedie k poškodeniu a zápalu tkaniva. Toto sa potvrdilo aj u modelov ochorenia, kedy poškodenie bariéry viedlo k úniku kyselín do portálneho obehu. To viedlo k zápalovej odpovedi, ktorá zahŕňala CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty, zvýšenú produkciu TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 a IL-1 $\beta$ . Tieto cytokíny podporujú vznik myofibroblastov, ktoré sú zapojené do procesu fibrózy (Fickert *et al.*, 2004; Fickert *et al.*, 2006).



Obr. 5: Porovnanie zdravých žľčových kanálov a zapálených kanálov u pacientov s PSC.  
Prevzaté a upravené: <https://www.epainassist.com/abdominal-pain/liver/primary-sclerosing-cholangitis-psc>

Väčšina pacientov s PSC trpí aj chronickou UC (PSC-UC). PSC-UC má rozdielny fenotyp ako čistá UC. Častejšie sa vyskytuje v kľudnom štádiu alebo vo forme pankolitídy prípadne diskontinuálnej pravo-strannej kolitídy a vyšším výskytom pouchitídy po kolektómii (Pavlidis *et al.*, 2014). Pacienti majú taktiež 5krát vyššie riziko vzniku kolorektálneho karcinómu v porovnaní s UC pacientmi a zvýšené riziko hepatobiliárnej malignancie najmä cholangiokarcinómu, adenómu a dysplázie prípadne karcinómu žľčníku (Hirschfield *et al.*, 2013).

---

Infiltrácia Th-17 T-lymfocytov v pečeni pacientov s PSC bola popísaná ale presný mechanizmus diferenciácie Th-17 buniek nie je objasnený (Katt *et al.*, 2013). V štúdií z tohto roku bolo preukázané, že mikrobiota PSC/UC bola schopná indukovať Th-17 diferenciáciu buniek v pečeni. Pri odstránení patobiontov *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus gallinarum*, *Proteus mirabilis*, ktoré boli v štúdií použité, došlo k zníženiu počtu Th-17 buniek. Taktiež potvrdili, že črevom-indukované Th-17 bunky boli zahrnuté v odpovedi (Nakamoto *et al.*, 2019).

### 3.1.4. Diagnostika a liečba

Diagnostika je pri IBD mnohé roky rovnaká. Keďže sa jedná o komplexné ochorenia ich diagnostika je niekedy zdĺhavá a nepríjemná.

CD je heterogénne ochorenie s viacerými fenotypmi. Lennard-Jones a kol. preto definovali makroskopické a mikroskopické kritéria pre diagnostiku. Makroskopické zahŕňajú fyzické vyšetrenie, endoskopické vyšetrenia, medzi ktoré sa ako prvý diagnostický postup pri CD radí ileokolonoskopia alebo flexibilná sigmoidoskopia, rádiologické vyšetrenia a analýza odobratých vzoriek. Odobraté vzorky a biospie slúžia aj pri určení mikroskopických kritérií, kde sa hľadá diskontinuálny a granulomatózny zápal čreva (Lennard-Jones a Shivananda, 1997, Carter *et al.*, 2004) . Sérologické vyšetrenia patria taktiež k štandardnému postupu, kde sa najmä pozerá na CRP a ESR ako ukazovatele zápalu a krvný obraz. Z biomarkerov sa používa ASCA ale je to len orientačný údaj rovnako ako fekálny kalprotektín a laktoferín, ktoré sa uplatňujú pri aktívnom zápale (Annese *et al.*, 2013).

UC má podobné diagnostické postupy ako CD. Začína sa rodinnou históriou, fyzickým vyšetrením, endoskopickými a rádiologickými vyšetreniami, histológiou odobratých vzoriek a serologickými vyšetreniami. Rozdiel pri serológii, je ten, že sa sledujú ANCA protilátky, ktoré sú u väčšiny pacientov s UC. Z endoskopického hľadiska sa rovnako využíva ileokolonoskopia a naviac aj gastroduodenoskopia (Silverberg *et al.*, 2005; Stange *et al.*, 2008). Aj pri UC Lennard-Jones vytvoril kritéria, podľa ktorých sa dá charakterizovať UC. Pri UC sa vyskytuje kontinuálny granulomatózny zápal mukózy čreva v časti alebo v celom kolone (Lennard-Jones, 1989).

Liečba IBD je založená najmä na imunosupresívach a steroidoch, vrátane glukokortikosteroidoch, aminosalicylátov a cyklosporínov. Pri UC sa využívajú 5-aminosalicylová kyselina a u pacientov, ktorý na ňu neodpovedajú prednison (Lichtenstein *et al.*, 2006). Pacienti, u ktorých je nutná liečba steroidmi začínajú na

---

azathioprine alebo 6-merkaptopurine. Z biologickej liečby, ktorá sa veľmi často využíva pri IBD, sa používa anti-TNF- $\alpha$  liečba konkrétne infliximab alebo adalimumab. Pri veľmi závažných stavoch sa vykonáva kolektómia (Baugmart a Sandborn, 2007).

Pri CD je liečba podobná. Pri voľbe liečby sa berie ohľad na fenotyp ochorenia. Používajú sa budesonide 9 alebo sulfasalazin, ktorý sa však musí obmedziť kvôli jeho toxicite. Pacienti, ktorí na túto liečbu neodpovedajú užívajú steroidy, a to prednisolone. Podobne ako pri UC má veľké uplatnenie biologická liečba najmä anti-TNF- $\alpha$  vo forme infliximabu alebo adalimumabu. Taktiež sa používa aj azathioprine 2 (Baugmart a Sandborn, 2007).

Diagnostika PSC je náročná, keďže ochorenie nemá charakteristické príznaky. Diagnostika je založená najmä na kombinácii serologických vyšetrení a zobrazovacích metód. Zvýšené sérové markery cholestázy a protilátky v kombinácii s cholangiopankreatografiou s magnetickou rezonanciou alebo endoskopickou retrográdnou cholangiopankreatografiou sa používajú pri zisťovaní ochorenia. Dôležité je zistiť aj históriu pacienta, keďže ochorenie môže vzniknúť ako následok napr. žltacky (Lindor *et al.*, 2015). Liečba je založená na na spomalení progresu ochorenia a zmiernení jeho príznakov. Je založená na podobných farmakách ako UC a CD. Využívajú sa glukokortikoidy, azathioprine a 6-merkaptopurine. Rovnako sa používa aj anti-TNF- $\alpha$  liečba. Pri PSC sa využívajú aj chirurgické intervencie a využíva sa aj transplantácia pečene (Chapman *et al.*, 2010, Lindor, 2011).

---

## 3.2. Črevná mikrobiota

Črevná mikrobiota tvorí súhrn všetkých baktérií, ktoré sa nachádzajú v GIT. Okrem baktérií v čreve nájdeme prvoky, obrovské množstvo vírusov a húb. Naša mikrobiota je zložená z viac ako trilióna bakteriálnych buniek, čo je približne rovnako ako všetky bunky v ľudskom tele (Sender *et al.*, 2016). Baktérie okrem čрева osídľujú pokožku a slizničné povrchy tela ako dýchacie cesty, urogenitálny trakt, kde sú vhodné podmienky pre ich rast a proliferáciu (Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2011). Mikrobiota predstavuje ohromne diverzný ekosystém. Množstvo mikrobiálnych génov je 150krát vyšší ako ľudský genóm (Qin *et al.*, 2010). Medzi dominantné bakteriálne kmene, ktoré tvoria asi 90% mikrobioty patria: *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* a *Verrucomicrobia* (Arumugam *et al.*, 2011). Analýzy ľudskej mikrobioty v stolici preukázali, že každý jedinec má vlastné, unikátne zloženie mikrobioty (Dore *et al.*, 2010).

Mikrobiota zohráva nenahraditeľné úlohy v GIT: posilňuje integritu čрева a pomáha pri tvarovaní epitelu (Natividad a Verdu, 2013), je zapojená do procesu získavania energie a živín (Den Besten *et al.*, 2013), zapája sa do ochrany proti patogénom (Baumler a Sperandio, 2016) a reguluje imunitný systém hostiteľa (Gensollen *et al.*, 2016). Mikrobiotu ovplyvňujú viaceré faktory. Medzi jeden z nich patrí materské mlieko, ktoré má kľúčovú úlohu pri formovaní populácie u kojenca, a to cez prenos mikrobioty mlieka do čрева bábätka (Fernández *et al.*, 2013), ochraňuje pred patogénmi prostredníctvom protilátok od matky (Rogier *et al.*, 2014), a pomáha pri výbere druhov baktérií cez mliečne oligosacharidy, ktoré niektoré baktérie ako *Bifidobacterium longum* vedia využiť ako zdroj uhlíka, a tým môžu prerastať napr potenciálnych patobiontov ako *E.coli* a *Clostridium perfringens* (Yu a Chen, 2013).

### 3.2.1. Rozdielna mikrobiota v tenkom a hrubom čreve

Tenké črevo má viac kyslé prostredie ako hrubé črevo, kvôli prívodu žlčových kyselín a má vyššiu koncentráciu kyslíka. Z týchto dôvodov tu dominujú druhy baktérií, ktoré rýchlo proliferujú v tomto prostredí, a patria medzi fakultatívne anaeróby. Kratší prechod potravy a substancií spôsobuje, že adhéncia baktérií a tvorba mucínov sú dôležité faktory pre kolonizáciu tenkého čрева (Zoetendal *et al.*, 2012). Proximálna časť slúži ako hlavné miesto trávenia a absorpcie makronutrientov. V tenkom čreve má mikrobiota menšiu diverzitu a abundanciu ( $10^3$ - $10^7$  mikrobiálnych buniek na gram) ako v hrubom čreve, kde je to omnoho vyššia ( $10^{12}$  mikrobiálnych buniek na gram) (El Aidy

*et al.*, 2013; Donaldson *et al.*, 2016). V duodene prevládajú *Actinobacteria*, *Firmicutes*, zatiaľ čo *Bacteroidetes* neboli detekované (Angelakis *et al.*, 2015). Z obsahu ileostomy bola zistená prítomnosť *Streptococcus* a *Clostridium spp.* a *Proteobacterie* (Zoetendal *et al.*, 2012). V hrubom čreve sa nachádza takmer 70% všetkých baktérií tela. Je to spôsobené tým, že je to hlavné miesto fermentácie nestrávených zložiek potravy (Hold *et al.*, 2002).

	pH	Funkcia	Baktéria	Denzita (buniek/g)	Kyslík/anti mikrobiálne substancie
<b>Duodenum</b>	5-7	Trávenie proteínov, monosacharidov, SCFA; imunomodulácia	<i>Lactobacillaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	$10^3$ - $10^4$	
<b>Jejunum</b>	7-9	Absorpcia voľných mastných kyselín, vápnika, vitamínov A, D, E, K	<i>Lactobacillaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	$10^4$ - $10^5$	
<b>Ileum</b>	7-8	Absorpcia vitamínu B12, žľčové kyseliny	<i>Lactobacillaceae</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	$10^8$	
<b>Colon</b>	5-7	Absorpcia vody, SCFA	<i>Bacteroidaceae</i> <i>Prevotellaceae</i> <i>Rikenellaceae</i> <i>Lachnospiraceae</i> <i>Ruminococcaceae</i>	$10^{11}$	

Obr. 6: Rozdielne faktory v častiach GIT. Porovnanie pH, funkcie, prevládajúcich tried baktérií a ich denzite, koncentrácia kyslíka a antimikrobiálnych substancií (prevzaté a upravené Scheithauer, 2016).

### 3.2.2. Mikrobálne produkty

Črevná mikrobiota syntetizuje, moduluje a degraduje veľký repertoár malých molekúl. Bakteriálny metagenóm prispieva k produkcii primárnych a modulácii sekundárnych metabolitov, ktoré ovplyvňujú fyziológiu hostiteľa (Holmes *et al.*, 2011). Krátke mastné kyseliny (SCFA) sú organické kyseliny, ktoré obsahujú 2-6 atómov uhlíka. Sú produkované v hrubom čreve cez baktérie v procese anaeróbnej fermentácie nestráviteľných zvyškov potravy ako vláknina, proteíny a glykoproteíny. Sú využité črevným epitelom, a to vo forme E pre enterocyty, regulujú génovú expresiu a ovplyvňujú imunitu. Patria sem butyráty, propionáty a acetáty. Butyráty sa využívajú najmä ako zdroj E pre kolonocyty, propionáty prispievajú ku glukoneogéze v pečeni, a acetáty sa dostávajú to periférneho tkaniva najmä tukového, kde prispievajú k lipogéze alebo sú

---

oxidované svalmi (den Besten *et al.*, 2013; Morisson a Preston, 2016; Koh *et al.*, 2016).

Ovplyvňujú aj imunitný systém hostiteľa. Majú vplyv na produkciu prozápalových cytokínov, podporujú konverziu k T-reg pri špecifických podmienkach a podporujú expresiu Foxp3 na bunkách v hrubom čreve cez GPCR 43 aktiváciu. Taktiež môžu podporiť polarizáciu naivných T-buniek na Th-1 alebo Th-17 populáciu v závislosti od cytokínového prostredia a aktivity inhibítorov histónových deacetyláz (Lin *et al.*, 2015; Haghikia *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2015). Butyráty a acetáty prispievajú k integrite epiteliálnych buniek, čím sa posilňuje ochrana proti infekciám (Fukuda *et al.*, 2011). Ďalšia štúdia preukázala, že suplementácia s SCFA podporuje uchovanie a funkciu slizničnej imunity cez zvyšovanie exprecie *MUC* génov v pohárikovitých bunkách ako odpoveď na butyráty (Gaudier *et al.*, 2004). Hlavní producenti butyrátov sú *Faecalibacterium prausnitzii*, *Clostridium leptum*, *Eubacterium rectale* a *Roseburia spp* (Louis, 2009, Louis, 2017). Acetáty su produkované najmä *Bifidobacterium spp.* a acetáty a propionáty *Akkermansia muciniphila* (Reviere *et al.*, 2016). U pacientov s UC je oxidácia butyrátov nesprávna v zapálenej sliznici. Bolo zistené, že u týchto pacientov je znížená abundancia baktérií produkujúcich butyráty napr. *Roseburia intestinalis*, *Roseburia hominis* a *Faecalibacterium prausnitzii* (Kumari *et al.*, 2013; Machiels *et al.*, 2014). Vo vzorkách stolice pacientov s CD bol detekovaný znížený výskyt mnohých butyrát produkujúcich baktérií ako *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Dialister invisus*, *Blautia faecis* a mnoho iných (Joossens *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2016).

Metabolit produkovaný komenzálnou baktériou *Bacteroides fragilis* má vplyv na vznik zápalu. Polysacharid A (PSA) potláča produkciu pro-zápalového cytokínu IL-17 a podporuje expresiu IL-10 cez CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty naviazaním sa na ich TLR2. Naviazaním na TLR-2 na naivných T-lymfocytoch, PSA indukoval polarizáciu smerom k T-reg (Round *et al.*, 2011). V štúdií z tohto roku bolo zistené, že pacienti s IBD majú výrazne nižšie zastúpenie *B.fragilis* s PSA v porovnaní so zdravými jedincami (Blandford *et al.*, 2019).

Kyselina retinová (RA) má dvojaký vplyv. Ovplyvňuje vznik regulačných alebo prozápalových častí adaptívnej imunity. Podporuje vznik T-reg cez cytokín TGF- $\beta$  a potláča vývoj Th-17 buniek (Mucida *et al.*, 2007). Na druhej strane počas zápalu je nevyhnutná pre indukciu pro-zápalových CD4<sup>+</sup> T-buniek (Hall *et al.*, 2011). Zmenený metabolizmus RA koreluje so zvýšenou pravdepodobnosťou vzniku nádorov u pacientov

---

s UC v dôsledku inhibície CD8<sup>+</sup> cytotoxických T-lymfocytov, zatiaľ čo normalizácia metabolizmu indukovala protektívne aktivity CD8<sup>+</sup> T-lymfocytov pri obrane proti nádorom (Bhattacharya *et al.*, 2016).

Všetky tieto metabolity majú úlohu pri patogenéze zápalových a metabolických ochorení vrátane IBD.

### 3.2.3. Vzťah mikrobioty a hostiteľa

Z imunologického hľadiska sú mikroorganizmy videné ako patogény hostiteľským imunitným systémom. Ako je napísané v časti slizničná imunita, imunitný systém je tlmený cez viaceré mechanizmov, aby nedošlo k reakcii na komenzálne baktérie. Väčšina týchto baktérií sú nepatogénne, a spolu s bunkami GIT žijú v symbiotickom vzťahu. Komenzály pomáhajú pri metabolizme liekov a živín, prevencii kolonizácie patogénov a napomáhajú funkcii črevnej bariéry (Jandhyala *et al.*, 2015). Zdá sa, že úzko súvisiace druhy patogénnych baktérií, ktoré sú v čreve komenzálne, tolerujú kolonizáciu patogénnych baktérií (Stecher *et al.*, 2010).

Medzi patogény patria napríklad segmentované filamentózne baktérie (SFB), ktoré zohrávajú úlohu v indukcii Th-17 populácie T-lymfocytov. Kolonizujú najmä myši ale u ľudí sú obdobné baktérie (Tan *et al.*, 2016). Majú schopnosť prichytiť sa na povrch sliznice, kde sú aktívne „vzorkované“ cez DC a sú schopné vyvolať silnú Th-17 odpoveď. To bolo potvrdené cez zvýšenú produkciu IL-17 a IL-22 po kolonizácii čreva SFB (Gaboriau-Routhiau *et al.*, 2009; Ivanov *et al.*, 2009). Mnoho črevných patogénov využíva svoje gény virulencie ako konkurenčný nástroj na získanie prístupu k unikátnym miestam ako je črevný epitel, inváziu a prežitie v epiteliálnych bunkách a v makrofágoch. Expresia však môže byť energeticky náročná, a preto mnoho týchto patogénov využíva chemické prostredie čreva na rozpoznanie vhodnej chvíle. Sú veľmi dobré v rozpoznávaní rôznych mikrobiálnych a hostiteľských signálov a živín na koordináciu expresie (Hughes a Sperandio, 2008; Kamada *et al.*, 2012; Pifer a Sperandio, 2015).

Vonkajšie a vnútorné faktory sú schopné modifikovať črevnú mikrobiotu. Tieto zmeny môžu viesť k patologickým zmenám a k vzniku dysbiózy, čo vedie k viacerým ochoreniam GIT. Patobionti a oportunistický patogéni sú známe a dočasne benígne mikróby alebo komenzálne baktérie, ktorú sú práve pod environmentálnym tlakom alebo tlakom zo strany hostiteľa schopné spôsobiť ochorenia (Pitlik a Koren, 2017; Buret *et al.*, 2019).

---

### 3.2.3. Dysbióza

Dysbióza je charakterizovaná ako zvýšenie počtu baktérií asociovaných so sliznicou a zníženie celkovej biodiverzity mikrobioty v čreve. Bola popísaná u pacientov s IBD. Štúdie s germ-free myšami naznačili, že dysbióza prispieva k patogenéze IBD. Bola pozorovaná zvýšená expresia pro-zápalových génov u myší kolonizovaných mikrobiotou izolovanou z pacientov s IBD (Du *et al.*, 2015). U geneticky predisponovaných G myší s náchylnosťou na kolitídu, sa vyvinula ťažká kolitída v porovnaní s tými, ktoré boli kolonizované zdravou mikrobiotou. To naznačuje obojsmerný vzťah medzi IBD a dysbiózou (Nagao-Kitamoto *et al.*, 2016).

CD ma výrazne zníženú alfa diverzitu. Za použitia viacerých techník bola zistená najmä znížená abundancia *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Dialister invisus* a naopak zvýšená *Ruminococcus gnavus* a u *Enterobacteriales* ako *E.coli* (Joossens *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2015). Medzi takéto baktérie patria tzv. adherentné *E.coli* (AIEC), ktoré boli izolované z mukózy ilea pacientov s CD. Preukázalo sa však, že u týchto baktérií neboli detekované skoro žiadne gény pre virulenciu ale majú schopnosť napadnúť IEC a makrofágy, preto boli nazvané adherentné (Boudeau *et al.*, 1999). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* je taktiež spájaná s patogenézou CD (Naser *et al.*, 2014). Medzi ďalšie adherentné invazívne baktérie patrí *Fusobacterium nucleatum*, ktorá bola detekovaná vo zvýšenej abundancii v mukóze hrubého čreva pacientov s UC. Táto baktéria sa spája s vážnosťou IBD, čo poukazuje na jej možný podiel v patogenéze (Ohkusa *et al.*, 2009; Strauss *et al.*, 2011). Pri UC sa preukázala znížená abundancia baktérie *Akkermansia muciniphila*, ktorá patrí medzi najviac zastúpené baktérie v čreve a jej znížený výskyt spolu s *Roseburia* bola spojená s PSC a UC (Bajer *et al.*, 2017).

V zapálenej sliznici boli taktiež nájdené rozdiely v mikrobiote u pacientov s CD a UC. Pri CD prevládal v zapálenej sliznici čreva *Streptococcus spp.*, *Bacteroidetes* a *Fusobacteria* zatiaľ čo v zapálenej sliznici hrubého čreva pacientov s UC prevládal *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides spp* (Fyderek *et al.*, 2009; Forbes *et al.*, 2016; Kabeerdoss *et al.*, 2015). V štúdií Forbes, 2016 bolo zistené rozdielne zloženie mikrobioty v zapálenom a nezapálenom tkanive pacientov s IBD (Forbes *et al.*, 2016).

---

## 4.1. Biomarkery

V posledných rokoch sa čoraz viac hľadajú a skúmajú nové biomarkery pre uľahčenie diagnostiky ochorenia a uľahčenie predikcie výskytu komplikácií, prípadne vhodnosti na liečbu. Novšia definícia charakterizuje biomarkery ako „funkčný variant alebo kvantitatívny index biologického procesu, ktorý predpovedá alebo odráža predispozíciu ku chorobe alebo odpoveď na liečbu“ (Fitzgerald, 2016).

Medzi hlavné výhody použitia biomarkerov je ich jednoduché a menej finančne náročné spracovanie, a možnosť opakovaného merania v krátkom období. Taktiež je to pre pacientov menej stresujúce ako klasické diagnostické postupy.

### 4.1.1. Biomarkery v IBD: používané, objavené alebo možné nové

**Genetické biomarkery** by mohli slúžiť na skúmanie predispozície na IBD v rodine, ktorej členovia týmto ochorením trpia. Ako bolo popísané pri jednotlivých ochoreniach, bolo nájdených viacero génov spätých s IBD. *NOD2* je spájaný najmä s CD. Sekvenovanie pre *NOD2* je napr. dôležité v kaukazskej populácii (Ng *et al.*, 2011). Ďalší genetický marker je *IL23R*. V nemeckej štúdii poukázali na to, že homozygóty pre variantu *IL23R* s vyšším rizikom pre IBD lepšie odpovedajú na anti-TNF terapiu ako jedinci s viariantou so znížením rizikom (Jurgens *et al.*, 2010).

**Serologické biomarkery** boli nájdené už v minulom storočí. Patria medzi ne protilátky proti neutrofilným leukocytom (pANCA) a protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). ANCA protilátky sú špecifické najmä pre UC ale aj u pacientov s CD s UC podobnou pankolitídou (Rump *et al.*, 1990). Protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae* boli objavené podobne ako ANCA v minulom storočí. Zvýšené titry ASCA protilátky sú spájané s CD so špecificitou 95% a senzitivitou 50% (Ruemmele *et al.*, 1998). Kombinácia týchto 2 biomarkerov je výhodná. U pediatrických pacientov, ktorý boli pANCA<sup>+</sup>/ASCA<sup>-</sup> bola identifikovaná UC so 70% senzitivitou a 93% špecificitou. U pacientov, ktorí boli ASCA<sup>+</sup>/pANCA<sup>-</sup> ukazovala najvyššiu senzitivitu 54,6% a 92,8% špecificitu u CD (Reese *et al.*, 2006). Kombinácie môžu slúžiť aj ako prediktívne markery, keďže u 80% ľudí, ktorí mali ASCA<sup>+</sup>/pANCA<sup>-</sup> boli neskôr diagnostikovaní s CD a 64% ľudí, ktorí mali pANCA<sup>+</sup>/ASCA<sup>-</sup> boli diagnostikovaný s UC (Joossens *et al.*, 2002). Pankreatické protilátky (PAB) sú protilátky proti trypsín-senzitívnemu proteínu v pankreatickej sekrécii. Sú senzitivne v 20-40% u CD a 5% u UC, a preto ich klinické využitie musí byť viac preskúmané (Lakatos *et al.*, 2008).

---

Ďalšie sú anti-glykánové protilátky ako IgG protilátky proti karbohydrátu laminarobiosidu (ALCA), IgA protilátky proti karbohydrátu chytobiosy (ACCA) a IgG protilátky proti mannobiosidu (AMCA). Tieto markery mali senzitivitu u 20-40% pacientov s CD a 10% pri UC. Ich lepšie klinické využitie by malo nastať s kombináciou ASCA protilátok u CD (Dotan *et al.*, 2006; Seow *et al.*, 2009).

Protilátky proti proteínu vo vonkajšej membráne *E.coli* (anti-OmpC). IgA anti-OmpC sú pozitívne u 55% pacientov s CD a 5-10% pacientov s UC (Joonssen *et al.*, 2006; Zholudev *et al.*, 2004).

Cbir1 sú protilátky proti flagelínovému komponentu baktérií. IgG protilátky sú pozitívne u 55% pacientov s CD a 10% pacientov s UC (Lodes *et al.*, 2004; Targan *et al.*, 2005).

Je známych mnoho ďalších protilátok, ktoré sú spájané s IBD ako napríklad: protilátky proti pohárikovitým bunkám, protilátky proti *Mycobacterium avium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Ceanorhabditis elegans* (Mitsuyama *et al.*, 2016).

**Fekálne biomarkery** majú mnoho výhod. Vzorky stolice od pacientov je možné ľahko zohnať. V porovnaní so sérovými biomarkermi, ktoré môžu odrážať aj iné zápalové a patologické stavy v tele mimo črevného zápalu, by mohli mať vyššiu špecifickosť (Viennois, 2015).

Patrí medzi ne fekálny kalprotektín. Jeho množstvo odráža počet aktivovaných neutrofilov v zápale. Práve prítomnosť v stolici poukazuje na infiltráciu neutrofilov do GIT (Vermeire, 2006). Vie sa využiť pri predikcii relapsu. Pacienti s asymptomatickým priebehom IBD ale zvýšenými hodnotami kalprotektínu v stolici majú s 80% šancou do 6 týždňov obdobie relapsu (Ferreiro-Iglesias *et al.*, 2016). Taktiež sa zistilo, že by mohol pomôcť aj pri fenotypizácii. Jeho hodnoty sú vyššie v aktívnej kolonickej forme CD ako v aktívnej ileálnej CD, ľavo-stranná a distálna forma UC majú vyššie hodnoty ako pankolitída (Sipponen *et al.*, 2008; Ricanek *et al.*, 2011).

Fekálny laktoferín je ďalší biomarker, ktorý sa zisťuje zo stolice. Jeho hodnoty sú signifikantne zvýšené v aktívnej fáze choroby v porovnaní s kludovým obdobím s 90% presnosťou (Kane *et al.*, 2003).

### **Biomarkery integrity črevnej bariéry**

Systém matrix metaloproteináz je známy svojou zvýšenou produkciou u IBD pacientov. Sú vylučované stromálnymi bunkami alebo myofibroblastami ako odpoveď na pro-zápalové cytokíny a rastové faktory. Štiepia extracelulárny matrix (ECM) a štiepia

---

bioaktívne proteíny. Ovplyvňujú funkciu črevnej bariéry, angiogenézu a fibrotizáciu tkaniva (O'Sullivan, 2015). Kolonocyty produkujú pri zápale zvýšené množstvo MMP-1, -3, -7, -9, -10, -11 a -12 u IBD pacientov (Pedersen *et al.*, 2009). Zo vzoriek biopsie mukózy pacientov s UC boli identifikované vaskulárne endoteliálne bunky a infiltrujúce leukocyty ako hlavný zdroj MMP-7 a MMP-13 (Rath *et al.*, 2010). V modeloch kolitídy bola zvýšená expresia MMP-9 spojená s poklesom počtu pohárikovitých buniek, a tým pádom k celkovej zníženej produkcii MUC2 (Liu *et al.*, 2013). Sérové hodnoty MMP-9 korelovali s aktivitou ochorenia u CD a UC a zvýšené hodnoty boli spojené najmä s UC (Matusiewicz *et al.*, 2014). MMP-14 po aktivácii štiepi komponenty ECM ako kolagén typu I a II, fibronektín, laminín, fibrín a proteoglykány (Miekus, 2019). Ako ďalší člen rodiny MMP by mohol byť zapojený do poškodenia črevnej bariéry.

Tkanivové inhibítory metaloproteináz (TIMP) sú prirodzené inhibítory MMP nájdené v tkanive a telových tekutinách. Podobne ako MMP zohrávajú úlohu pri udržiavaní rovnováhy v metabolizme ECM. Sú zahrnuté v procesoch remodelácie tkaniva, hojenia rán ale aj angiogenézy a bunkovom raste (Lambert *et al.*, 2004). Zvýšené sérové hodnoty boli detekované u pacientov s IBD a rozdiely boli aj medzi aktívnymi a inaktívnymi pacientmi (Kapsoritakis *et al.*, 2008). Tieto zvýšené sérové hodnoty korelovali aj s endoskopicky zisteným poškodením mukózy, aktivitou ochorenia a koncentráciou CRP u UC pacientov (Wiercinska-Drapalo *et al.*, 2003).

Trefoil factor 3 (TFF-3) má dôležitú úlohu pri oprave poškodeného črevného tkaniva. Ochraňuje mukóznú vrstvu cez interakciu s mucínom a podporuje integritu črevnej bariéry. Pomáha pri obnove sliznice cez stimuláciu migrácie epiteliálnych buniek a ich proliferáciu (Kjellerv, 2009).

Zonulin je proteín, ktorý je zapojený do reverzibilnej prestavby tesných spojov v čreve je teda zapojený do regulácie permeability sliznice. Bol identifikovaný ako prekursor haptoglobínu 2 pre-haptoglobin 2. Ako prekursor patrí do rodiny haptoglobínov, ktoré sa zaraďujú do proteínov akútnej fázy (Tripathi *et al.*, 2009). Dysregulácia zonulinu môže viesť k zvýšenej permeabilite bariéry. V štúdií z tohto roku sa na kohorte pacientov s ulceróznou kolitídou a celiakiou nepodarilo zachytiť cirkulujúce koncentrácie zonulinu na posúdenie dysregulácie bariéry (Ajamian, 2019).

Proteíny viažuce mastné kyseliny (FABP) sú malé cytoplazmatické proteíny, ktoré sa vyskytujú v tkanive s aktívnym metabolizmom mastných kyselín (Storch a Thumser, 2000). L-FABP je primárne exprimovaný v pečeni v hepatocytoch ale aj v enterocytoch tenkého čreva a kolonocytoch. I-FABP je primárne exprimovaný v čreve

---

a v sére zdravých jedincov je nedetekovateľný (Pelsers, 2003). I-FABP a L-FABP sú exprimované najmä v klkoch a nie v kryptách, preto by mohli slúžiť ako skoré a senzitívne markery črevnej ischémie. Ich zvýšené hodnoty boli detekované u pacientov s ochoreniami čreva a L-FABP bol zvýšený v hepatocelulárnych ochoreniach (Pelsers, 2005).

### **Biomarkery súvisiace so zápalom**

Medzi bežne používané markery zápalu nie len u IBD sú CRP, rýchlosť sedimentácie erytrocytov (ESR) a celkový krvný obraz.

MBL je manózu viažúci lektín, ktorý je dôležitý komponent prirodzenej imunity. Je to malá molekula produkovaná v pečeni, ktorá sa priamo viaže na mikroorganizmi, čím ich opsonizuje a tým podporuje ich fagocytózu a zároveň spúšťa lektínovú cestu komplementu (Brouwer *et al.*, 2008). Polymorfizmy boli spojené s UC a CD a jeho nízke hodnoty boli detekované u pacientov s UC.

Endotoxín alebo lipopolysacharid (LPS) je komponent bunkovej steny G<sup>-</sup> baktérií, a je vylučovaný do hostiteľského prostredia pri poškodení bunkovej steny. Viaže sa na proteín viažuci lipopolysacharid (LBP) a formuje komplex s CD14, čo vedie k aktivácii toll like receptoru 4 (TLR4). Zvýšená abundancia baktérií bohatých na LPS v čreve môže viesť k tvorbe chronického zápalu a zvýšenej produkcii prozápalových cytokínov (Cani *et al.*, 2008; Atreya a Neurath, 2008). Zvýšené hodnoty sú taktiež spájané so zvýšeným rizikom vzniku kolorektálneho karcinómu (Kang, 2013).

CD14 je multifunkčná molekula. Je to receptor pre LPS a iné bakteriálne štruktúry čím dokáže ovplyvňovať imunitný systém, ale solubilná forma je aj proteín akútnej fázy produkovaný v pečeni po indukcii cez IL-6 (Bas, 2004).

LBP je ďalší kľúčový komponent prirodzenej imunity proti G<sup>-</sup> baktériám cez transport ich produktu LPS na membránový CD14, ktorý reprezentuje 1 časť komplexu TLR4. Tak isto prenáša LPS na sérový CD14 a aktivuje endoteliálne a epitelálne bunky (Zweigner *et al.*, 2006). Podobne ako CRP je LBP proteín akútnej fázy indukovaný cez IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$ . Zvýšené hodnoty endotoxínu, LBP a sCD14 boli pozorované u pacientov s relapsom a ich hodnoty sa znižovali pri liečbe (Pasternak *et al.*, 2006).

Amyloid A protein je ďalší proteín, ktorý patrí medzi pretíny akútnej fázy, keďže je primárne syntetizovaný v pečeni a jeho hodnoty sú počas zápalu zvýšené. Serum amyloid proteín A (SAA) a jeho zvýšené hodnoty boli zistené v akútnej fáze viacerých ochorení vrátane IBD pri pro-zápalovom prostredí tvoreným IL-6, IL-1 a TNF- $\alpha$

---

(Hagihara *et al.*, 2004; Verriere, 2006). V štúdií z roku 2017 bola zistená aj jeho korelácia s endoskopickými zisteniami u aktívnych pacientov s CD. Jeho hodnoty boli v tomto období výrazne zvýšené a určité hodnoty by mohli pomôcť s predikciou relapsu (Ishihara *et al.*, 2018).

TROY alebo TNFRSF19 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 19), je člen TNFSR rodiny. Génová expresia je zvýšená v mozgu a epiteliálnom tkanive počas embryonálneho vývinu (Kojima *et al.*, 2000). V spojení s TRAF aktivujú JNK a NF- $\kappa$ B cestu odpovede. TROY v spojení s  $\beta$ -kateninom vytvára komplex s markerom rakoviny LGR5 (Fafilek *et al.*, 2013). Jeho zvýšené hodnoty sú spájané aj s kolorektálnym karcinómom (Nishioka *et al.*, 2018).

DAO alebo diamín oxidáza je intracelulárny enzým s vysokou aktivitou vo vrchnej vrstve črevných klkov. Považuje sa za marker integrity črevného epitelu, kedy sú pri jeho poškodení hodnoty DAO v sére zvýšené (Honzawa *et al.*, 2011)

### **Biomarkery identifikované cez Array**

V predchádzajúcej štúdií boli na základe multiarray identifikované nové potenciálne biomarkery.

Roundabout guidance receptor 4 (ROBO-4) je transmembránový receptor exprimovaný vo vyvíjajúcom sa tkanive špecificky v neovaskulárnom. Je to endotelový špecifický receptor exprimovaný v miestach s aktívnou angiogenezou. ROBO-4 signalizuje indukciu inhibície migrácie endoteliálnych buniek (Seth *et al.*, 2005; Pircher *et al.*, 2014).. Jeho hodnoty sú zvýšené pri vaskularizácii nádorov a jeho hodnoty boli zachytené aj v endotéliu kolorektálneho karcinómu (Gröne *et al.*, 2006).

Rastové faktory podobné inzulínu sú zahrnuté do proliferácie a diferenciácie buniek. Majú hlavnú úlohu v regulácii rastu na bunkovej a tkanivovej úrovni. Poškodenie tejto regulácie sa spája so vznikom viacerých karcinómov (Pollak, 2008). Strata „imprintingu“ *IGF-2* génu na lymfocyty bola asociovaná s 3krát vyšším rizikom vzniku adenómov a až 22krát zvýšené riziko vzniku kolorektálneho karcinómu (Cui *et al.*, 2003). Jeho zvýšená expresia podporuje rast buniek pri kolorektálnom karcinóme a tak isto jeho zvýšené sérové hodnoty by mohli teda zohrávať úlohu pri vzniku tejto neoplázie (Gao *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2017).

Ako ďalší zaujímavý marker sa ukázal osteoprotegerín (OPG). Patrí do TNFR superrodiny a je zapojený do viacerých biologických procesov ako metabolizmus kostí, zápal, tumorogéza (De Voogd *et al.*, 2016). Môže slúžiť ako marker

---

gastrointestinálnych karcinómov vrátane kolorektálneho (Tsukamoto *et al.*, 2011). Je produkovaný osteoblastami a slúži ako inhibítor osteoklastogenézy a celkovo znižuje aktivitu osteoklastov, čím chráni kosti pred degradáciou. Jeho zvýšené sérové hodnoty boli zistené u pacientov s IBD, a to najmä v mukóze s aktívnym zápalom (Moschen *et al.*, 2005). IBD je spojená aj s osteoporózou, a preto OPG môže slúžiť ako marker pri prebiehajúcom zápale a marker pri ochrane kosti (Ali *et al.*, 2009; De Voogd *et al.*, 2016).

Jeden z najdôležitejších cytokínov v črevnej imunite je TGF- $\beta$ . Je to pleiotropný cytokín produkovaný mnohými bunkami vrátane imunitných a ovplyvňuje viacero bunkových funkcií. V čreve je hlavný regulátor imunitnej odpovedi. Potláča prehnajúcu odpoveď na komenzálne bakteriálne antigény a prispieva k indukcii tolerancie. Poškodenie signalizačnej dráhy je spájaná s vytvorením zápalu v čreve u IBD pacientov (Di Sabatino *et al.*, 2008; Ihara *et al.*, 2017). TGF- $\beta$ 1 je najčastejšie sa vyskytujúca izoforma, a jeho zvýšená produkcia bola zistená u izolovaných lymfocytov z LP zo zapálenej sliznice UC pacientov v porovnaní so zdravými kontrolami. Zvýšené sérové hodnoty boli taktiež detekované u aktívnych UC pacientov (Del Zotto *et al.*, 2003; Contini *et al.*, 2017).

Angiogenéza je proces vzniku nových ciev a hrá dôležitú úlohu pri hojení rán, chronickom zápale, výskyte nádorov ich raste a metastázovaní (Alkim *et al.*, 2015). Pomocou endoskopickéj metódy bola zistená zvýšená hustota mikrociev v črevnom tkaníe pacientov s UC a CD a to najmä v aktívnom období (Danese *et al.*, 2010). Členovia rodiny VEGF majú duálnu úlohu v angiogenéze ale sú aj zapojené do zápalu vrátane IBD (Zdravkovic *et al.*, 2014). EG-VEGF dokáže aktivovať monocyty, a tým zvýšiť produkciu TNF- $\alpha$ , IL-12 a znížiť produkciu IL-10 ako odpoveď na LPS (Dorsh *et al.*, 2005). Jeho zvýšené hodnoty by teda mohli súvisieť so zápalom pri prestupe antigénov najmä u pacientov s UC.

Jednou z patologických charakteristík IBD je masívna infiltrácia neutrofilov, leukocytov a monocytov do zapáleného tkaniva v čreve. Zvýšené hodnoty prozápalových chemokínov a infiltrácia je pozorovaná v mukóze pacientov, a tieto pozorovania korelujú so závažnosťou ochorenia (Gijsberg *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). CXCR1 je selektívny receptor viažúci iba CXCL8 a CXCL6 s vysokou afinitou, a preto sa predpokladá jeho úloha v regulácii aktivity neutrofilov (Sabroe *et al.*, 2005).

---

### 3. Ciele práce

V mojej diplomovej práci som sledovala reaktivitu buniek periférnej krvi pacientov s IBD na vybrané mikrobiálne stimuly. Zvolené baktérie predstavujú typických zástupcov mikrobioty českej populácie. Keďže sa predpokladá, že patogenéza ochorenia je spojená s aberantnou imunitnou odpoveďou na komenzálne bakteriálne antigény, zaujímala ma najmä T-bunková odpoveď izolovaných PBMC z krvi pacientov v *in vitro* podmienkach. Ďalším cieľom bolo testovanie možných nových biomarkerov zápalu, poškodenia črevej bariéry a iných, ktoré by pomohli pri diagnostike resp. priebehu a predpokladaní komplikácií ochorenia. Na základe predchádzajúcej štúdií sme vybrali potenciálne nové biomarkery a pomocou ELISA metódy som sledovala koncentráciu jednotlivých biomarkerov v sére pacientov.

Konkrétne ciele:

- Izolácia PBMC z krvi pacientov a zber materiálu
- Analýza reaktivity PBMC pacientov na vybrané mikrobiálne stimuly *in vitro* pomocou prietokovej cytometrie
- Testovanie potenciálne nových biomarkerov za použitia séra pacientov pomocou ELISA metódy

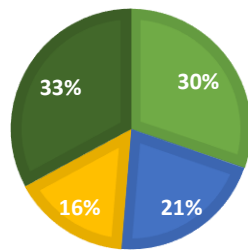
## 4. Materiál a metodika

### 4.1. Vzorky krvi

Krv bola odobratá pacientom, ktorí súhlasili so zapojením do výskumu v Inštitúte klinickej a experimentálnej medicíny na Oddelení gastroenterológie. Krv sa odobrala do 9 ml skúmaviek BD Vacutainer, ktoré obsahovali antikoagulačnú látku heparín. Skúmavka bola ponechaná pri izbovej teplote mimo priameho svetla. Následne som vzorky do 3 hodín začala spracovávať (viď. izolácia PBMC). Dokopy bolo 76 subjektov. Ich rozdelenie podľa diagnózy, fenotypu ochorenia, pohlavia, aktivity ochorenia a liečby je znázornené v koláčových grafoch.

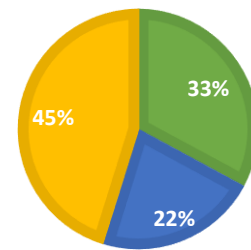
**ROZDELENIE SUBJEKTOV**

■ CD ■ UC ■ PSC ■ Kontroly



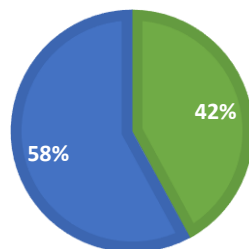
**AKTIVITA OCHORENIA**

■ Zdravý ■ Aktívny ■ Remisia



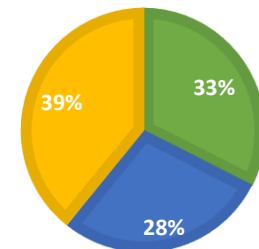
**ZASTÚPENIE POHLAVIA**

■ Ženy ■ Muži



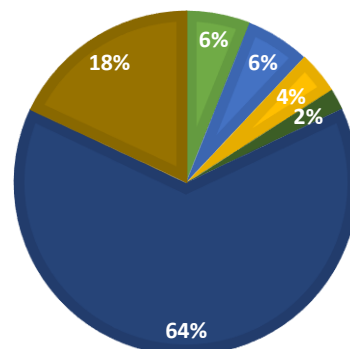
**FENOTYP**

■ Zdravý ■ Pankolitída ■ Parciálna



**LIEČBA**

■ anti-TNF- $\alpha$  ■ Kortikosteroidy ■ Bez liečby ■ Azathioprin ■ Viac druhov ■ 5-ASA



Rozdelenie subjektov podľa klinických parametrov. Pri rozdelení liečby nie su zahrnuté zdravé kontroly.

UC – ulcerózna kolitída

CD – Crohnova choroba

PSC – Primárna sklerotizujúca cholangitída

---

#### 4.1.1. Izolácia PBMC

Vo všetkých experimentoch sa používali PBMC, ktoré predstavujú ľahko dostupný materiál s mnohými výhodami a dobrým náhľadom na fungovanie imunitného systému. Práca s PBMC prebiehala vo všetkých krokoch sterilne v tkanivovom boxe.

Všetci pacienti dali ich informovaný súhlas predtým ako boli zaradený do štúdie. Štúdia bola vykonaná v súlade s Helsinskou deklaráciou a protokol bol schválený Etickou komisiou Inštitútu klinickej a experimentálnej medicíny a Thomayerovej nemocnice (G 14-08-45).

##### **Roztoky:**

- Sterilné PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  free) vytemperované na  $37^{\circ}\text{C}$
- Ficoll-Paque Plus (GE-Healthcare)
- RPMI (FCS, ATB free, Sigma-Aldrich) vytemperované na  $37^{\circ}\text{C}$
- trypanová modrá (0,4% roztok, Sigma-Aldrich)
- Fyziologický roztok (Ardeapharma, a.s.)

9 ml nezrazenej krvi sa zriedila v pomere 1:1 s PBS v 50 ml skúmavke. Následne sa v novej 50 ml skúmavke opatrne prevrstvilo 15 ml Ficollu, tak aby nedošlo k zmiešaniu fáz. Po centrifugácii ( $700 \times g$ , 30 min, RT) na základe zmeny gradientu došlo k oddeleniu jednotlivých fáz krvi. Do novej skúmavky som odobrala PBMC na rozhraní Ficollu a plazmi, a pridala predhriate PBS do objemu 50 ml na premytie. Po ďalšej centrifugácii ( $330 \times g$ , 10 min, RT) som vyliala supernatant a peletu opatrne resuspendovala v 1 ml RPMI. Potom som spočítala nariedené bunky v Bürkerovej komôrke v pomere 1:4 (20  $\mu\text{l}$  buniek + 60  $\mu\text{l}$  fyziologického roztoku a 20  $\mu\text{l}$  farbiva trypanová modrá). Ďalší krok predstavuje zamrazenie buniek (viď 1.1.2. Zamrazenie PBMC).

#### 4.1.2. Zamrazenie PBMC

Vyizolované PBMC boli následne zamrazené v alikvotách. Cez noc boli uložené v Mr. Frosty zamrazovacom kontajneri pri teplote  $-80^{\circ}\text{C}$ . Druhý deň po minimálne 12h v  $-80^{\circ}\text{C}$  boli kryoskúmavky prenesené do mrazáku s teplotou  $-150^{\circ}\text{C}$ .

##### **Roztoky:**

- RPMI (FBS, ATB free, Sigma-Aldrich) vytemperované na  $37^{\circ}\text{C}$
- FCS (Biochrom GmbH, Germany)
- 5% DMSO (Sigma-Aldrich, D2650)

---

Po spočítaní buniek nasledovala ďalšia centrifugácia (330 x g, 10 min, RT). V medzičase som podľa počtu živých izolovaných PBMC namiešala zamrazovacie média – M1 a M2. M1 obsahovalo 40% RPMI a 60% FCS. M2 obsahovalo 20% DMSO a 80% FCS. Po centrifugácii sa supernatant vylial a pridalo sa zamrazovacie médium M1, čím sa bunky nariedili na koncentráciu  $20 \times 10^6$ /ml. M2 sa pridávalo pomaly po kvapkách, a zároveň sa bunky v skúmavke premiešavali krúživým pohybom. Takto nariedené bunky v koncentrácii  $10 \times 10^6$ /ml sa rozalíkvovali do vopred popísaných kryoskúmaviek a uložili do Mr. Frosty zamrazovacieho kontajneru (Thermo Fisher Scientific).

### 4.1.3. Rozmrazenie PBMC

Alikvoty buniek boli rozmrazené čo najrýchlejšie od vybratia z  $-150^\circ\text{C}$ .

#### Roztoky:

- RPMI (FBS, ATB free, Sigma-Aldrich) vytemperované na  $37^\circ\text{C}$
- RPMI (1% ATB (Sigma-Aldrich), 10% FCS, 1% L-glutamin (Sigma-Aldrich)) vytemperované na  $37^\circ\text{C}$
- trypanová modrá (0,4% roztok, Sigma-Aldrich)

Kryoskúmavky bol prenesené čo najrýchlejšie do vopred vyhriateho vodného kúpeľa ( $37^\circ\text{C}$ ), kde ostali po dobu 8 minút. Následne bol celý obsah kryoskúmavky presený do novej 15 ml skúmavky, a po kvapkách bolo pridaných 8 ml RPMI (FCS, ATB free). Pár kvapkami média boli vypláchnuté aj kryoskúmavky aby sa zabezpečil prenos celého obsahu skúmavky. Po centrifugácii sa supernatant vylial a bunky sa premyli ďalšími 8 ml RPMI (FCS, ATB free) a centrifugovali (300 x g, 5 min, RT). Supernatant sa vylial a PBMC sa opatrne resuspendovali v 1 ml RPMI (FCS, ATB free). Rovnako ako pri izolácii PBMC, sa živé bunky spočítali za použitia Bürkerovej komôrky v pomere 1:4, a dali sa poslednýkrát centrifugovať (300 x g, 5 min, RT). Medzičasom sa vypočítal objem RPMI (1% ATB, 10% FCS), ktorý bolo potrebné pridať aby sa bunky nariedili na koncentráciu  $2 \times 10^6$ . Takto nariedené bunky sa preniesli do sterilnej 96U dosky v objeme  $100 \mu\text{l}$ /jamka a nechali sa v inkubátore ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) po dobu 2 hodín.

## 4.2. Stimulácia buniek

Ako stimuly sa používali lyzáty baktérií. Baktérie boli kultivované 24h za použitia príslušného média v Laboratóriu anaeróbnej mikrobiológie (ÚŽFG). Vybraté baktérie predstavujú zástupcov zdravého čreva českej populácie. Z baktérií sa pomocou metódy

French press pripravili bakteriálne lyzáty. Čerstvé bakteriálne kultúry sa po 24h kultivácii centrifugovali a pelety boli premyté sterilnou vodou (B. Braun) a inaktivané pomocou French Press (French Pressure Cell Press Model FA-078, SLM Instruments) pri 1500 psig. Tento proces sa opakoval 3krát pri rovnakom tlaku. Následne boli inaktivované bakteriálne kultúry lyofilizované v lyofilizátore (Lyovac GT2, Leybold Hareus). Takto získané lyofilizáty baktérií boli uložené pri -28°C pre ďalšie použitie. V tabuľke sú uvedené stimuly, ktoré boli používané počas všetkých experimentov. Používaná koncentrácia bola 10µg/ml s výnimkou Stafylokokového enterotoxínu B, ktorý sa používal vo výslednej koncentrácii 1µg/ml.

Baktéria	G <sup>+</sup> /G <sup>-</sup>	Kmeň	Kultivačné podmienky
<i>Bacteroides thetaioamicron</i> VPI 5482	G <sup>-</sup>	<i>Bacteroides</i>	Anaeróbne
<i>Escherichia coli</i> K6	G <sup>-</sup>	<i>Proteobacteria</i>	Aeróbne
<i>Prevotella ruminicola</i> M384	G <sup>-</sup>	<i>Bacteroides</i>	Anaeróbne
Stafylokokový eneterotoxín B	G <sup>+</sup>	<i>Firmicutes</i>	Anaeróbne
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 18363	G <sup>+</sup>	<i>Actinobacteria</i>	Anaeróbne
<i>Blautia coccoides</i>	G <sup>+</sup>	<i>Firmicutes</i>	Anaeróbne
<i>Eubacterium rectale</i> ATCC 33656	G <sup>+</sup>	<i>Firmicutes</i>	Anaeróbne
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> A2-165	G <sup>+</sup>	<i>Firmicutes</i>	Anaeróbne
<i>Lactobacillus plantarum</i> CCDM 182	G <sup>+</sup>	<i>Firmicutes</i>	Anaeróbne
<i>Roseburia intestinalis</i> Li S2	G <sup>+</sup>	<i>Firmicutes</i>	Anaeróbne
<i>Ruminococcus spp.</i>	G <sup>+</sup>	<i>Firmicutes</i>	Anaeróbne

Tab. 1: Zoznam stimulov používaných počas experimentov. Zaradenie medzi G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> a kmeňa a ich kultivačné podmienky.

---

### 4.2.1. Stimulácia rozmrazených PBMC

Ako bolo napísané v časti o rozmrazovaní PBMC, po rozmrazení boli bunky v doske uložené na 2 h do termostatu. V tomto medzičase som si pripravila bakteriálne stimuly, ktoré boli pridávané k bunkám.

#### Roztoky:

- RPMI (1% ATB, 10%FCS, 1% glutamín) vytemperované na 37°C
- Brefeldin A (eBioscience)
- Monensin (eBioscience)

V riediacom korytke som si postupne nariedila jednotlivé stimuly a pomocou multikanálovej pipety som ich v objeme 100 µl pridala k bunkám. Ako pozitívna kontrola slúžil Stafylokokový eneterotoxín B, ktorý sa pridával ako polyklonálny stimul. Ako negatívna kontrola slúžilo RPMI médium, ktoré bolo taktiež pridané v objeme 100 µl k bunkám. Po pridaní všetkých stimulov som dosku dala do inkubátoru (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) a nechala ju inkubovať cez noc. Ráno sa po 14 hodinách inkubácie pridal Brefeldin A vo finálnej koncentrácii 3 µg/mL a Monensin v koncentrácii 2 µM na zastavenie transportu cytokínov z buniek. S týmto roztokom sa inkubovali po dobu 4 hodín, a následne som začala protokol pre FACS pre intracelulárne cytokíny.

### 4.3. FACS pre intracelulárne cytokíny

Pre meranie T-bunkovej odpovedi na stimulácie bola zvolená metóda prietokovej cytometrie. Práca nemusela byť vykonávaná sterilne v tkanivovom boxe ako v predchádzajúcich krokoch.

#### Roztoky:

- RPMI (1% ATB, 10%FCS, 1% glutamín) vytemperované na 37°C
- PBS
- Brefeldin A (eBioscience)
- Monensin (eBioscience)
- Monoklonálne protilátky (zoznam uvedený nižšie)
- PERM/WASH roztok (40,5 ml dH<sub>2</sub>O + 4,5 ml; Invitrogen)
- FIX/PERM (Invitrogen)
- FACSi roztok (1000x zriedený Brefeldin A, Monensin v PBS)
- Ľudský Fc-γ receptor (FcR) inhibítor (eBioscience)

---

Po ukončení 4 hodinovej inkubácie s Monensinom a Brefeldinom A bola doska centrifugovaná (300 x g, 5 min, 4°C). Následne som opatrne odobrala 100µl supernatantu a vyhodila ho. Zvyšný obsah som opatrne prepipetovala a preniesla do novej 96 U dosky, ktorú som následne dala centrifugovať. Po každej centrifugácii som dosku opatrne ale rýchlym pohybom vyklepla a jemne oklepala o papierové obrúsky. Na rozlíšenie živých a mŕtvych buniek bola použitá FVD farba, ktorú živé bunky aktívne vypudzujú tým pádom ostanú mŕtve bunky nafarbené. Do každej jamky, okrem single stainov mimo FVD, som pridala po 10µl FVD zriedeného s FACS-i a nechala dosku inkubovať v tme uloženú na ľade po dobu 30 minút. Po uplynutí 30 minút som pridala 160µl roztoku FACS-i a doska sa nechala stočiť. Tento krok sa opakoval ešte raz ale s objemom 170µl roztoku FACS-i. Ďalší krok bolo pridanie FIX/PERM roztoku k resuspendovaným bunkám, kde inkubačná doba predstavovala 45 minút v tme pri teplote 4°C. Po centrifugácii sa bunky premyli 2x PERM/WASH roztokom objemom 170µl pričom sa rýchlosť centrifugácie zvýšila na 350g. Po premytí sa pridalo 20µl Fc bloku a bunky sa nechali v tme na ľade po dobu min 20 minút. Medzitým som si pripravila monoklonálne protilátky, ktorými boli bunky a kompenzačné guľičky ofarbené a uložila ich do tmy na ľad. Jednotlivé označené protilátky a ich riedenie v Perm/Wash roztoku sú uvedené v tabuľke. Po príprave protilátok a uplynutí inkubačnej doby som pridala 150µl PERM roztoku dosku centrifugovala a supernatant vyklepla. Bunky som následne pomocou vortexu jemne resuspendovala. Pred pridávaním samotných protilátok som si pripravila kompenzačné guľičky a to tak, že som si 1 kvapku dobre zvortexovaných guľičiek kvapla do 1,5ml ependorfovej skúmavky, ktorá obsahovala 700µl PERM/WASH roztoku. Následne som ich napipetovala po 100µl do určených prázdnych jamiek v doske s bunkami. Doska sa s guľičkami stočila (350 x g, 5 min, 4°C). Následne som bunky farbila mixom monoklonálnych protilátok a single stajny (bunky a kompenzačné guľičky) jednotlivými protilátkami s použitím objemu 10µl. Tie slúžili ako kontrola pre nastavenie prístroja. Takto nafarbené bunky som nechala 30 minút na ľade a v tme inkubovať. Po inkubácii som pridala 160µl PERM roztoku, centrifugovala, vyklepla supernatant a premývanie opakovala s objemom 170µl. Ako posledný krok som bunky resuspendovala v 100µl PBS a týmto krokom boli bunky pripravené k meraniu. Meranie sa vykonávalo v Stredisku cytometrie a mikroskopie MBÚ za použitia prietokového cytometru FACS LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Získané data som analyzovala v programe FlowJo (verzia 7.2.5, Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

---

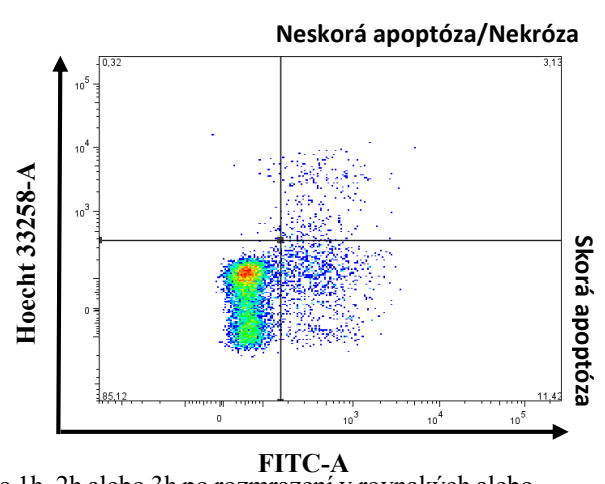
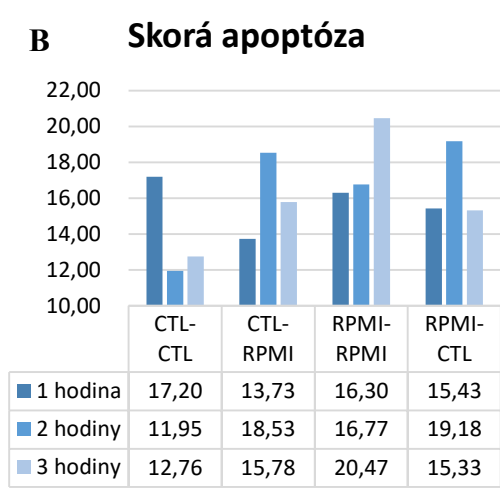
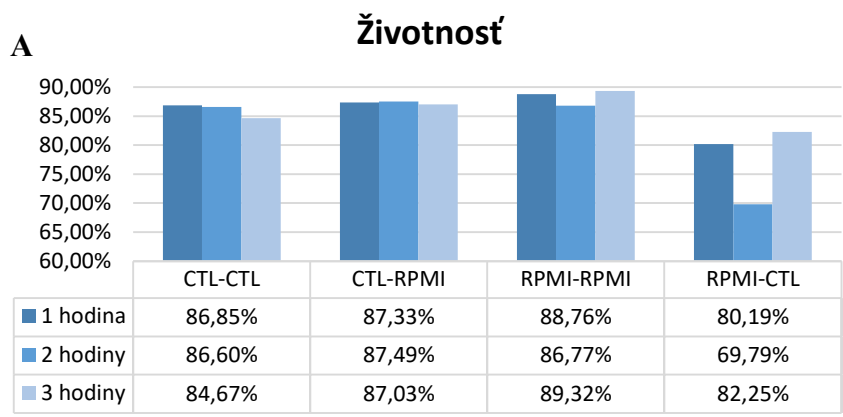
Znak	Monoklonálna protilátka	Riedenie
Životnosť	Fixable Viability Dye eFlour™ 780 (eBioscience™)	1:200
CD3	FITC anti-human CD3 Antibody (UCHT1) (Biolegend®)	1:200
CD4	CD4 Monoclonal Antibody (S3.5), Qdot® 605 (Invitrogen™)	1:150
CD8	Alexa Flour® 700 anti-human CD8 Antibody (SK1) (Biolegend®)	1:100
IL-2	IL-2 Monoclonal Antibody (MQ1-17H12) PE-Cyanine7 (eBioscience™)	1:50
IL-4	IL-4 Monoclonal Antibody (8DE-8) APC (eBioscience™)	1:50
IL-17	IL-17A Monoclonal Antibody (eBio64DEC17) PerCP-Cyanine5.5 (eBioscience™)	1:50
IFN $\gamma$	IFN gamma Monoclonal Antibody (4S.B3) PE (eBioscience™)	1:50
TNF $\alpha$	Brilliant Violet 510™ anti-human TNF- $\alpha$ Antibody (Biolegend®)	1:50
CD154	Brilliant Violet 421™ anti human CD154 (Biolegend®)	1:100

Tab. 2: Zoznam použitých monoklonálnych protilátok a ich riedenie. Na farbenie buniek sa používal mix uvedených protilátok. Na negatívne kontroly sa používali samostatné protilátky

#### 4.3.1. Optimalizácia protokolu

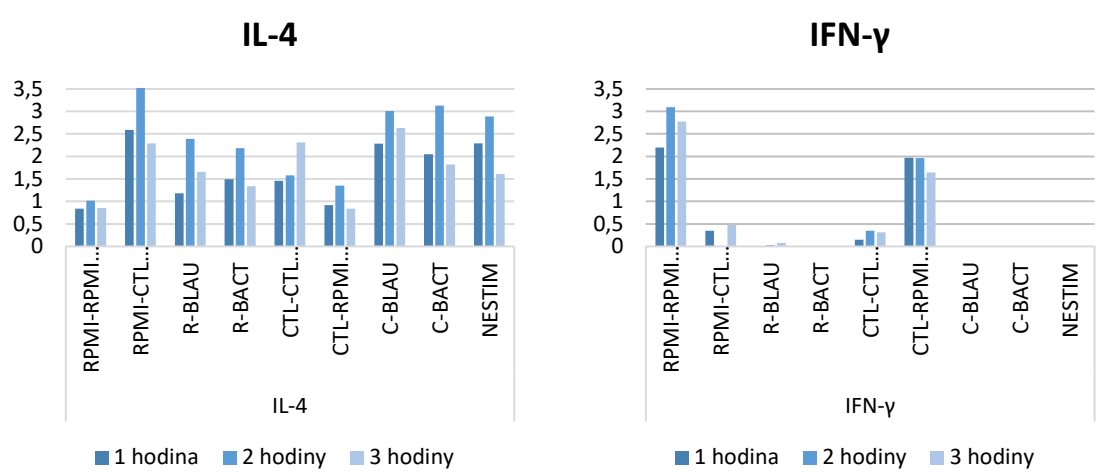
Pred samotným testovaním vzoriek bolo potrebné optimalizovať celý protokol. Testovalo sa viacero vecí. Ideálna dĺžka oddychu buniek po rozmrazení, koncentrácia mikrobiálnych stimulov, zamrazovanie a rozmrazovanie buniek do 2 odlišných médií, kompenzačné guličky vs. bunky ako single stainers a rozdielne CD4 monoklonálne protilátky.

Ako prvé som sa zamerala na porovnanie životnosti buniek zmrazených a rozmrazených do rovnakých médií alebo v cross-match (zamrazené a rozmrazené v rozdielnych médiách) za použitia FVD. Ako je vidieť podľa grafu, aj napriek malým rozdielom sa ako najlepšie preukázalo rozmrazovanie buniek do RPMI média, ktoré boli zmrazené v RPMI (ako väčšina uložených vzoriek). Cross-match sa ukázal ako najnevhodnejší spôsob kvôli najnižšej životnosti buniek. Takisto 2 hodiny oddychu pri teplote 37°C bolo najlepšie z hľadiska produkcie cytokínov a menšieho percenta apoptózy. Apoptóza bola testovaná za použitia farbiva Hoechst 33258-A (Invitrogen) a Annexin V-FITC (BD Biosciences).



Obr. 6 : Graf A: Porovnanie životnosti buniek po 1h, 2h alebo 3h po rozmrazení v rovnakých alebo rozdielnych médiach ako boli bunky zamrazené.

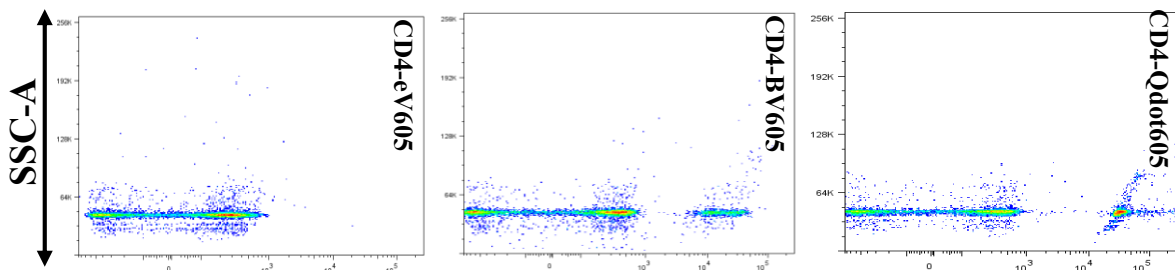
Graf B: Výsledky testu buniek na apoptózu. Príklad rozdelenia populácií po farbení na apoptózu



Obr. 7: Graf: Porovnanie produkcie cytokínov v rozdielnych časoch – 1h, 2h, 3h. Je vidieť, že produkcia cytokínov bola najvyššia po 2 hodinách oddychu buniek po rozmrazení. Uvedené sú len 2 cytokíny ale podobný trend bol aj pri TNF $\alpha$ , IL-2 a IL-17.

---

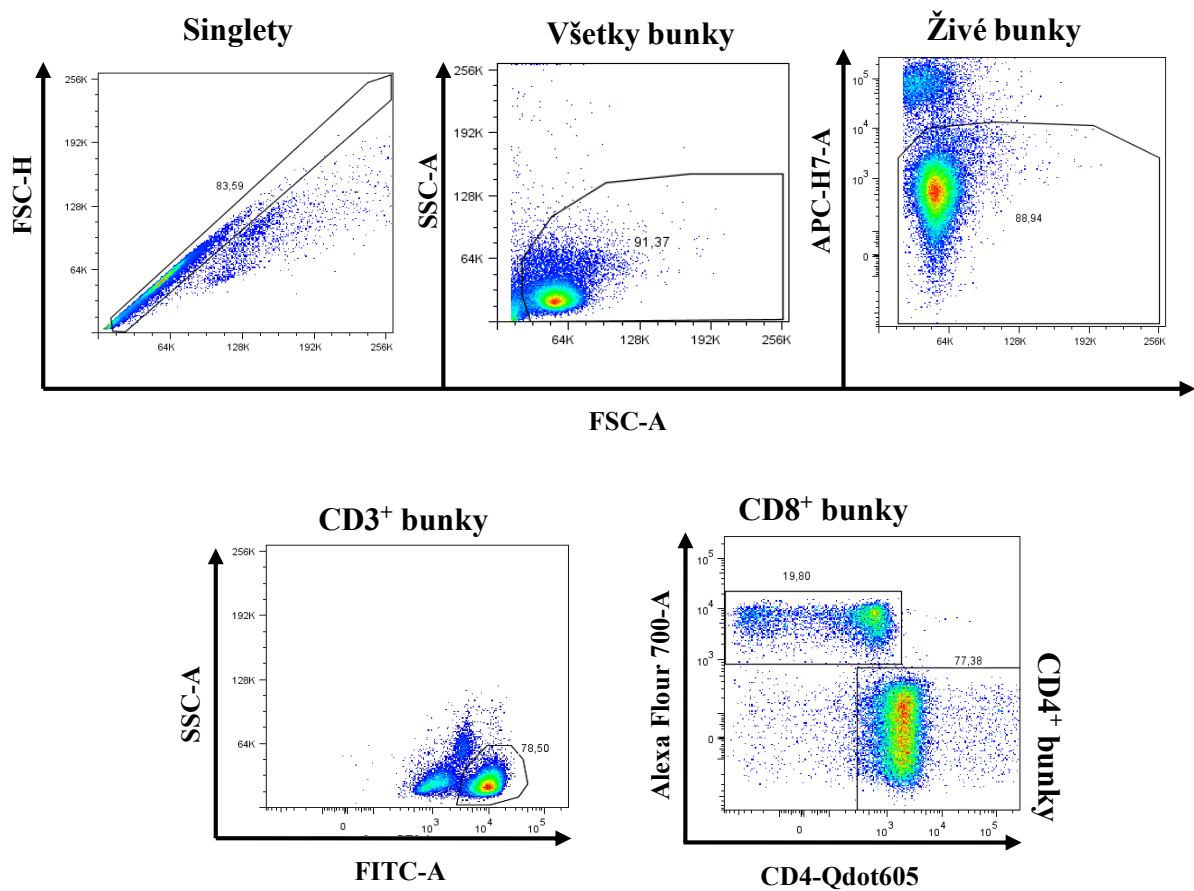
Vzhľadom na zložitosť panelu o 10 rozdielnych protilátok, muselo byť testovaných viacero variant protilátok pre dosiahnutie čo najmenších presvitov a dosiahnutie čo najlepších výsledkov. Testovali sa rozdielne CD4 monoklonálne protilátky. CD4-eV605 (eBioscience), CD4-BV605 (Biolegend) a CD4-Qdot605 (Invitrogen). Na obrázkoch je vidieť ako protilátky rozdeľovali kompenzačné guľičky na negatívnu a pozitívnu populáciu. CD4-eV605 v našom protokole nefarbila bunky dostatočne, a pozitívna a negatívna populácia nebola rozlíšiteľná. CD4-BV605 síce rozdeľovala populácie, ale v kombinácii s ostatnými farbami bolo toto rozlíšenie nedostatočné. CD4-Qdot605 dostatočne oddelila pozitívnu populáciu, a tiež v kombinácii s ostatnými protilátkami vykazovala najlepšie výsledky, a preto sa používala počas všetkých experimentov.



Obr. 8: Porovnanie CD4 monoklonálnych protilátok na kompenzačných guľičkách

### 4.3.2. Spracovanie FACS výsledkov

Ukážka gatovacej stratégie, ktorá sa používala pri analýze získaných dát.



Obr. 9: Gatovacia stratégia. 1. Výber singletov zo všetkých udalostí

2. Výber všetkých buniek zo singletov

3. Výber živých buniek na základe farbenia s FVD. Ofarbené ostali mŕtve bunky.

4. Výber CD3<sup>+</sup> populácie buniek s použitím FITC-A

5. Rozdelenie CD3<sup>+</sup> populácie na CD4<sup>+</sup> na základe farbenia prostredníctvom

CD4-Qdot605 a CD8<sup>+</sup> populáciu za použitia Alexa Flour 700-A

#### 4.4. ELISA

Postupovala som podľa príslušných protokolov, ktoré boli priložené v sade pre daný biomarker. Jednotlivé protilátky sa líšili ale princíp procesu sa nemenil. Postupovala som podľa pokynov výrobcu. Vzorky boli pred analýzou nariadené a a nanosené v pároch do 96F reakčnej dosky.

<b>Biomarker</b>	<b>Výrobca</b>	<b>Detekčný rozsah</b>
EG-VEGF	R&D systems	15,6 - 1000pg/ml
CXCR1	LifeSpan BioScience	0,156 - 10 ng/ml
OPG	R&D systems	62,5 - 4000 pg/ml
TMEFF1	LifeSpan BioScience	0,312 - 20 ng/ml
IGF2	R&D systems	23,4 - 1500 pg/ml
TGF-β1	R&D systems	31,3 - 2000 pg/ml
TROY	LifeSpan BioScience	65,2 – 4000 pg/ml
ROBO4	RayBiotech	0,6 – 150 ng/ml
MMP-9	R&D systems	31,3 - 2000 pg/ml
MMP-14	R&D systems	0,625 - 20 ng/ml
TIMP-1	R&D systems	31,3 - 2000 pg/ml
MBL	R&D systems	15,6 - 1000 pg/ml
CD14	R&D systems	62,5 – 4000 pg/ml
LBP	R&D systems	0,781 – 50 ng/ml
TFF-3	R&D systems	7,81 – 500 pg/ml
Endotoxin	MyBiosource	0,625 - 20 ng/ml
SAA	HyCult Biotech	3,1 - 200 ng/ml
Zonulin	MyBiosource	1,56 - 100 ng/ml
DAO	MyBiosource	78 – 5000 pg/ml
I-FABP	HyCult Biotech	20 - 5000pg/ml
L-FABP	HyCult Biotech	102 – 25 000 pg/ml

Tab. 3: Prehľad kitov použitých na detekciu jednotlivých markerov v sére pacientov spolu s výrobcou a detekčným rozsahom .

---

**Roztoky:**

- PBS (90 g NaCl, 2 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O, 12 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 12 H<sub>2</sub>O, demi H<sub>2</sub>O)
- Premývací pufo (0,5 ml 0,05% Tween 20 v PBS do 1000 ml, pH 7.2-7.4)
- Reagenčný pufo (1% BSA v PBS, 1g BSA v 100 ml PBS)
- Substrátový roztok (3,3',5, 5'-tetramethylbenzidin, TMB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + citrátový pufo)
- Stop roztok ( 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Jednotlivé protilátky sa líšili podľa biomarkeru

Zjednodušený popis postupu: Ako prvé som si pripravila 96F dosku, do ktorej som napipetovala zriedenú primárnu protilátku v PBS v objeme 100µl a dosku nechala cez noc inkubovať pri RT. Nasledujúci deň som dosku nechala premyť 3krát v premývačke. Ďalší krok bola blokácia za použitia 300µl reagenčného riedidla. Po uplynutí hodiny som dosku nechala opäť 3krát premyť objemom 400µl na jamku. Do takto pripravenej dosky som si napipetovala 100µl zriedených vzoriek sér pacientov podľa príslušného riedenia pre daný biomarker vrátane štandardu. Vzorky a štandard sa riedili v reagenčnom pufore. Vzorky sa v doske inkubovali 2 hodiny. Potom som dosku premyla, a pridala 100µl zriedenej detekčnej protilátky a nechala 2 hodiny inkubovať pri RT. Následne som pridala 100µl Streptavidínu-HRP a nechala 20 minút inkubovať pri RT. Po premytí dosky som pridala 100µl substrátového roztoku a nechala inkubovať v tme. Priebežne som kontrolovala farebné zmeny štandardu aby som sa vyhla zafarbeniu blanku. Po inkubácii bola reakcia ukončená pridaním stop roztoku a to 50µl koncentrovanej H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Optická denzita bola meraná pri vlnovej dĺžke 450 nm a 650 nm za použitia spektrofotometra (Multiskan Ascent 96/384, MTX Lab System, USA). Koncentrácia jednotlivých biomarkerov bola kvantifikovaná porovaním s riediacou radou príslušného štandardu. Výsledne hodnoty sú v príslušných jednotkách. Vyhodnotenie dat bolo prevedené v excel a data boli štatisticky spracované v GraphPad Prism 5.

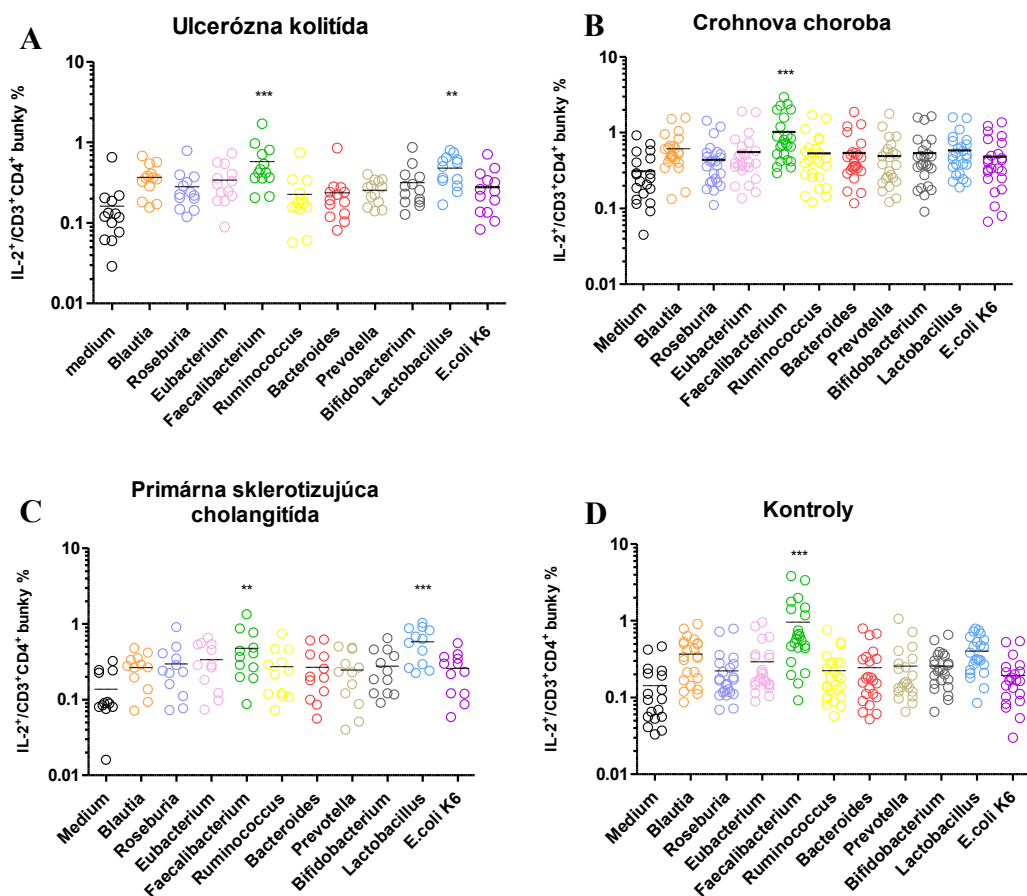
## 5. Výsledky

### 5.1. FACS

Na analýzu získaných dát z prietokovej cytometrie bol použitý program GraphPad Prism (Version 5, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### 5.1.1. Produkcia IL-2 vrámci skupín ochorenia

IL-2 je pleiotropný cytokín, ktorý hrá dôležitú úlohu v aktivácii CD4 a CD8 buniek. T-reg ho ako jediné vedľa využiť v kľudovom stave, kvôli ich konštantne exprimovanému receptoru pre IL-2. Všetky 3 skupiny IBD mali zvýšenú produkciu IL-2 po stimulácii *Faecalibacterium prausnitzii*. Pacienti s UC a PSC mali zvýšenú množstvo IL-2<sup>+</sup> buniek aj pri stimulácii *Lactobacillum*. Zvýšená produkcia IL-2 by mohla prispievať k patogenéze ochorenia. Vyššia odpoveď na *Faecalibacterium* bola pozorovaná aj pri kontrolných vzorkách.



Graf 1: Porovnanie stimulovaných buniek a nestimulovaných pri produkcii IL-2 vrámci jednotlivých skupín ochorení.

A: Produkcia IL-2 pri Ulceróznej kolitíde

B: Produkcia IL-2 pri Crohnovej chorobe

C: Produkcia IL-2 pri Primárnej sklerotizujúcej cholangitíde

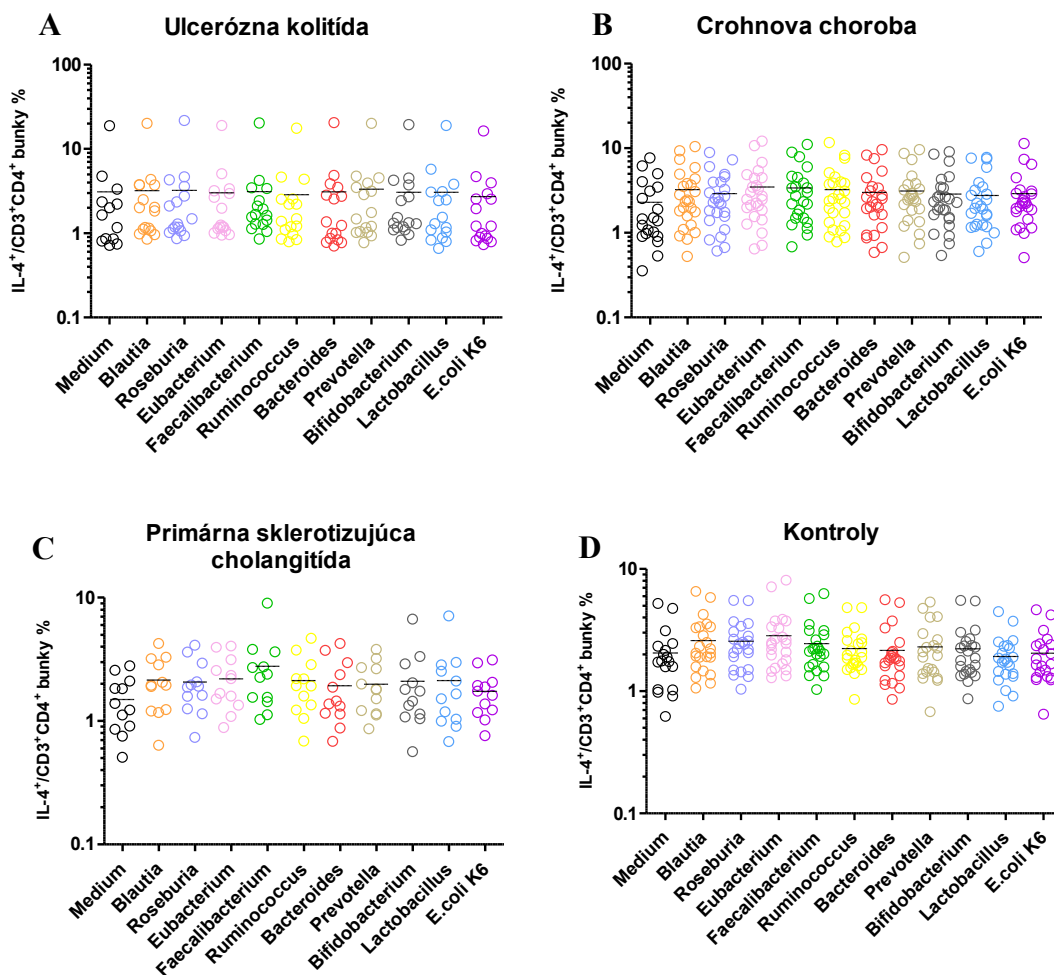
D: Produkcia IL-2 pri zdravých kontrolách

Na analýzu bol použitý 1-way Anova test spolu s Dunnett's Multiple Comparison testom.

### 5.1.2. Produkcia IL-4 vrámci skupín ochorenia

IL-4 je pleiotropný cytokín, ktorý je produkovaný najmä Th-2 bunkami, eozinofilmi a bazofilmi. Podporuje imunitnú odpoveď proti extracelulárnym patogénom. Taktiež podporuje izotypový prešmyk u B-buniek a polarizuje tvorbu IgE a IgG1 protilátok. Pri UC je IL-4 detekovateľný v aktívnom mieste zápalu.

Podľa uvedených výsledkov je viditeľné, že produkcia IL-4 nebola nikde výrazne vyššia. Pri CD bola produkcia porovnateľná s nestimulovanými bunkami a tak isto aj pri UC. Pri PSC je viditeľná vyššia produkcia IL-4 pri stimulácii *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillom* a prakticky pri všetkých stimuloch ale nesignifikantne. Rovnako pri kontrolných vzorkách nebola pozorovaná odlišná produkcia IL-4.



Graf 2: Porovnanie stimulovaných buniek a nestimulovaných pri produkcii IL-4 vrámci jednotlivých skupín ochorení.

A: Produkcia IL-4 pri Ulceróznej kolitíde

B: Produkcia IL-4 pri Crohnovej chorobe

C: Produkcia IL-4 pri Primárnej sklerotizujúcej cholangitíde

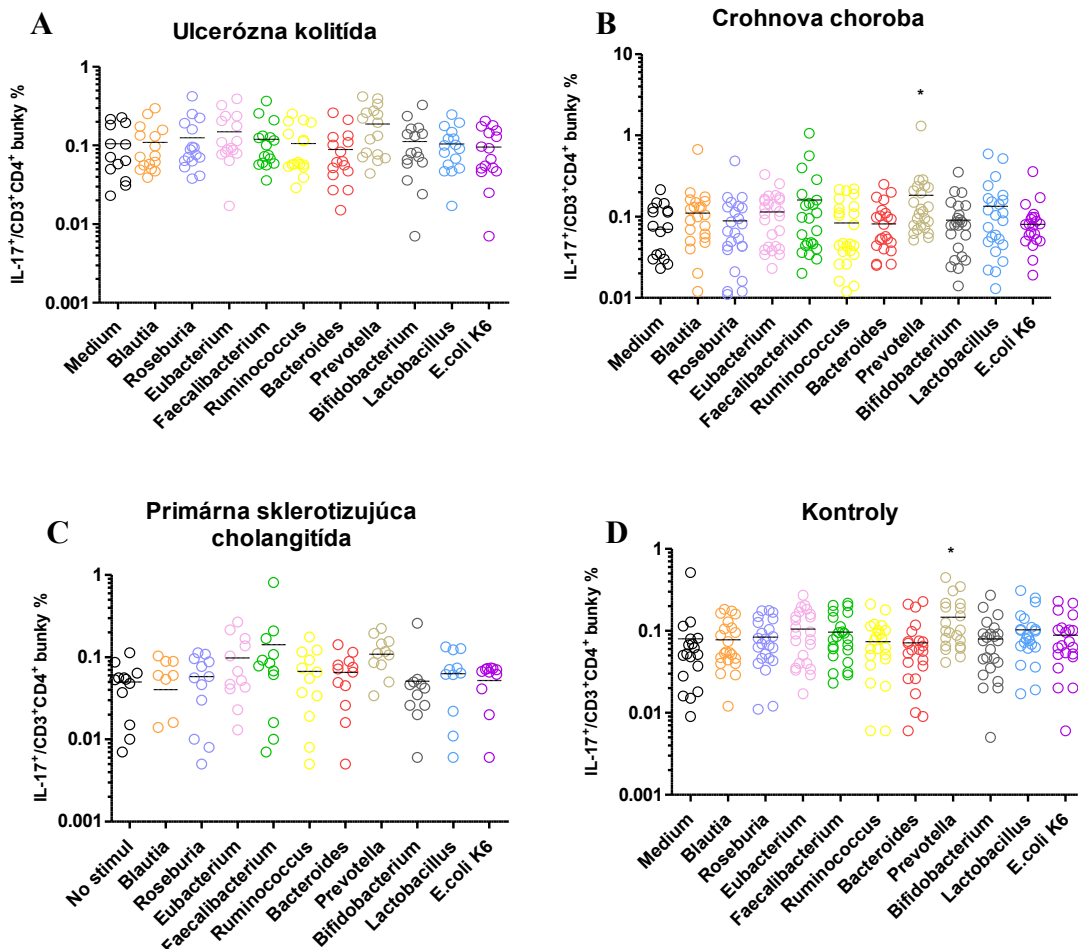
D: Produkcia IL-4 pri zdravých kontrolách

Na analýzu bol použitý 1-way Anova test spolu s Dunnett's Multiple Comparison testom.

### 5.1.3. Produkcia IL-17 vrámci skupín ochorenia

IL-17 patrí medzi pro-zápalové cytokíny. Je produkovaný najmä aktivovanými Th-17 lymfocytmi ale aj NK bunkami, cytotoxickými T-lymfocytmi a ďalšími. Stimuluje pro-zápalovú odpoveď a aktivuje neutrofile cez ich atrahovanie prostredníctvom IL-8. Zvýšená hodnota je spájaná s viacerými patogenezami ako psoriáza, reumatická artritída ale aj IBD. IL-17 je v GIT podporovaný produkciou IL-23.

Produkcia IL-17 bola pri našich pokusoch veľmi nízka. Mohlo to byť spôsobené krátkou dobou stimulácie. Pri UC nebola pozorovaná žiadna významná produkcia pri jednotlivých stimuloch. Pri CD bola významne zvýšená produkcia IL-17 pri stimulácii baktériou *Prevotella*, a rovnaký trend je aj pri kontrolách. Zvýšená produkcia sa dá pozorovať aj pri ďalších baktériách. Pri PSC bola zvýšená koncentrácia pri stimule *Faecalibacterium*. Sú to však nízke hodnoty, preto je ťažké povedať, či by mohli byť zapojené do patogenézy.

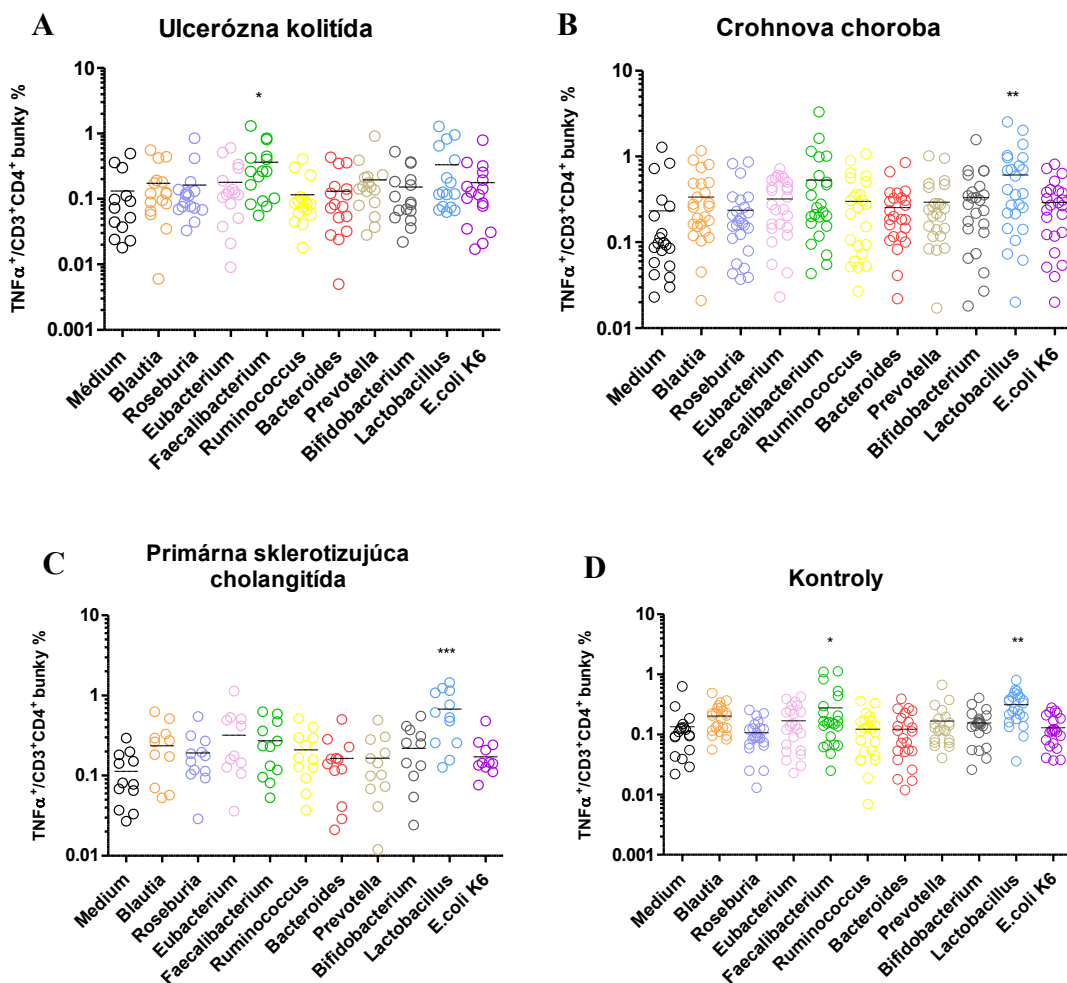


Graf 3: Porovnanie stimulovaných buniek a nestimulovaných pri produkcii IL-17 vrámci jednotlivých skupín ochorení. A: Produkcia IL-17 pri Ulceróznej kolitíde B: Produkcia IL-17 pri Crohnovej chorobe C: Produkcia IL-17 pri Primárnej sklerotizujúcej cholangitíde D: Produkcia IL-17 pri zdravých kontrolách Na analýzu bol použitý 1-way Anova test spolu s Dunnett's Multiple Comparison testom.

### 5.1.4. Produkcia TNF- $\alpha$ vrámci skupín ochorení

Ďalší pro-zápalový cytokín tzv. pyrogén, ktorý sme sledovali bol TNF- $\alpha$ . Je produkovaný najmä aktivovanými makrofágmi, a je zapojený do zápalovej odpovedi, indukuje horúčku, anémiu a aktivuje koagulačné dráhy a fibrolytické odpovede, ktoré sú dôležité pre atrahovanie neutrofilov na miesto zápalu. Produkujú ho aj neutrofili, NK bunky, eozinofili. Jeho dysregulácia je spájaná s viacerými patogenézami vrátane IBD. Mnoho biologických liečiv je zameraných práve proti TNF- $\alpha$ .

Pri UC bola zvýšená produkcia cytokínu pri *Faecalibacterium*. Pri CD a PSC bola zvýšená produkcia pozorovaná najmä pri *Lactobacille*. Tieto bakteriálne antigény sú zrejme taktiež zapojené do patogenézy, keďže stimulujú produkciu pyrogénu najmä počas aktívnej fázy. U kontrol bola zvýšená produkcia pri *Faecalibacterium* podobne ako pri UC a *Lactobacille* podobne ako pri CD.



Graf 4: Porovnanie stimulovaných buniek a nestimulovaných pri produkcii TNF- $\alpha$  vrámci jednotlivých skupín ochorení.

A: Produkcia TNF- $\alpha$  pri Ulceróznej kolitíde

B: Produkcia TNF- $\alpha$  pri Crohnovej chorobe

C: Produkcia TNF- $\alpha$  pri Primárnej sklerotizujúcej cholangitíde

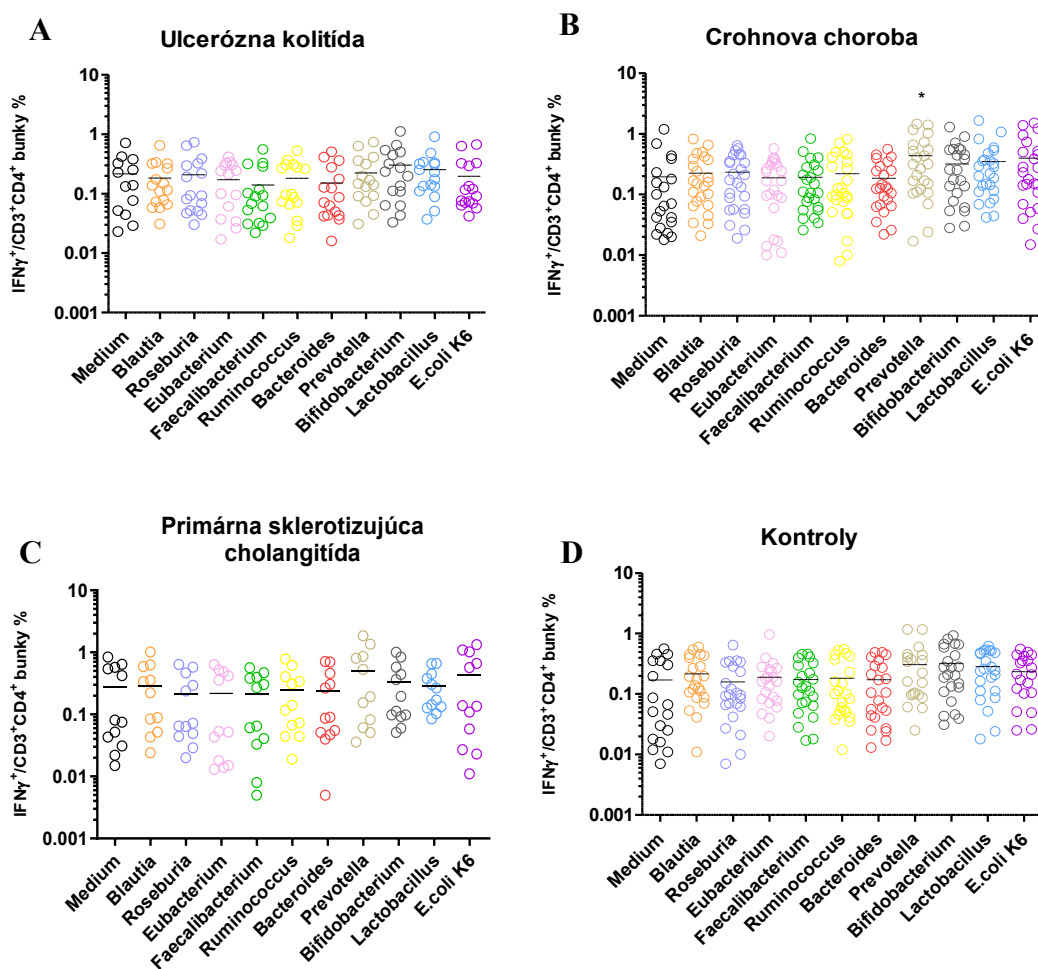
D: Produkcia TNF- $\alpha$  pri zdravých kontrolách

Na analýzu bol použitý 1-way Anova test spolu s Dunnett's Multiple Comparison testom.

### 5.1.5. Produkcia IFN- $\gamma$ vrámci skupín ochorení

IFN- $\gamma$  je cytokín nevyhnutný pre adaptívnu a prirodzenú imunitu. Je to cytokín nevyhnutný pre proti-vírusovú obranu a pri bakteriálnych infekciách. Je produkovaný NK bunkami, CD4<sup>+</sup> Th-lymfocytmi a tak isto aj cez cytotoxické lymfocyty. Aktivuje makrofágy a indukuje expresiu MHC II molekúl. Aberantná odpoveď je spájaná s autoimunitnými ochoreniami. Zvýšená produkcia sa spája aj s IBD.

Pri stimulácii bola produkcia IFN- $\gamma$  nízka podobne ako pri TNF- $\alpha$ . Signifikantný rozdiel bol pri CD konkrétne pri *Prevotella*. Ostatné skupiny ochorení nemali signifikantne zvýšené hodnoty IFN- $\gamma$  a mali podobné percentá buniek. Pri PSC je viditeľné delenie pacientov na 2 skupiny podľa množstva cytokínu.



Graf 5: Porovnanie stimulovaných buniek a nestimulovaných pri produkcii IFN- $\gamma$  vrámci jednotlivých skupín ochorení.

A: Produkcia IFN- $\gamma$  pri Ulceróznej kolitíde

B: Produkcia IFN- $\gamma$  pri Crohnovej chorobe

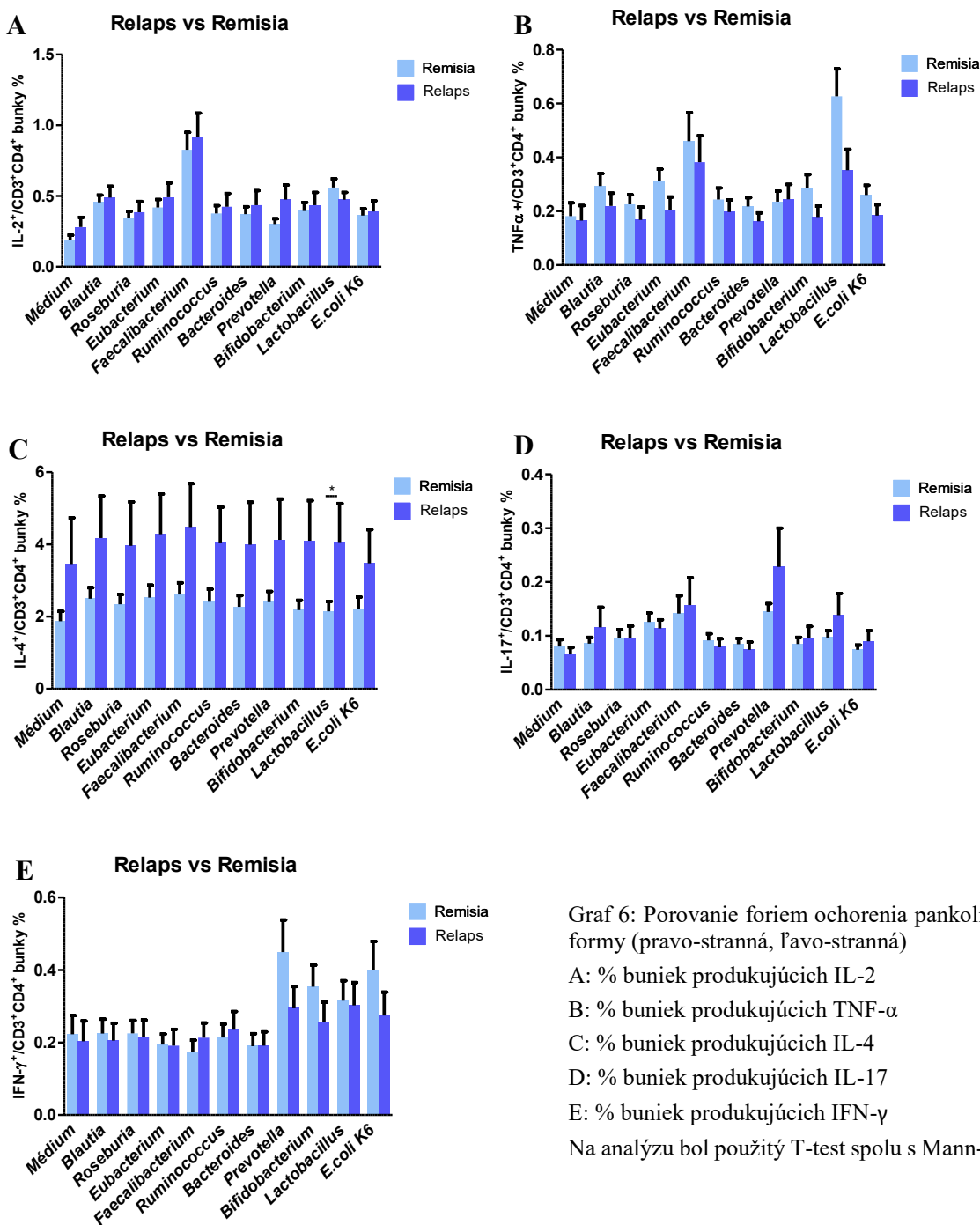
C: Produkcia IFN- $\gamma$  pri Primárnej sklerotizujúcej cholangitíde

D: Produkcia IFN- $\gamma$  pri zdravých kontrolách

Na analýzu bol použitý 1-way Anova test spolu s Dunnett's Multiple Comparison testom.

### 5.1.6. Porovnanie obdobia relapsu a remisie

Podľa štatistických výsledkov je vidieť rozdiely medzi týmito obdobiami, a to najmä v tom, že pacienti v období remisie mali vyššie % buniek produkujúcich TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ , čo je zaujímavé, keďže obidva cytokíny sú produkované pri aktívnych zápaloch. V období relapsu je signifikantne vyššia produkcia IL-4 pri stimulácii *Lactobacillom*. Podobný trend sa dá pozorovať aj pri IL-2 a IL-17. Je teda zrejmé, že odpovede pacientov sa v jednotlivých obdobiach výrazne nelíšia.



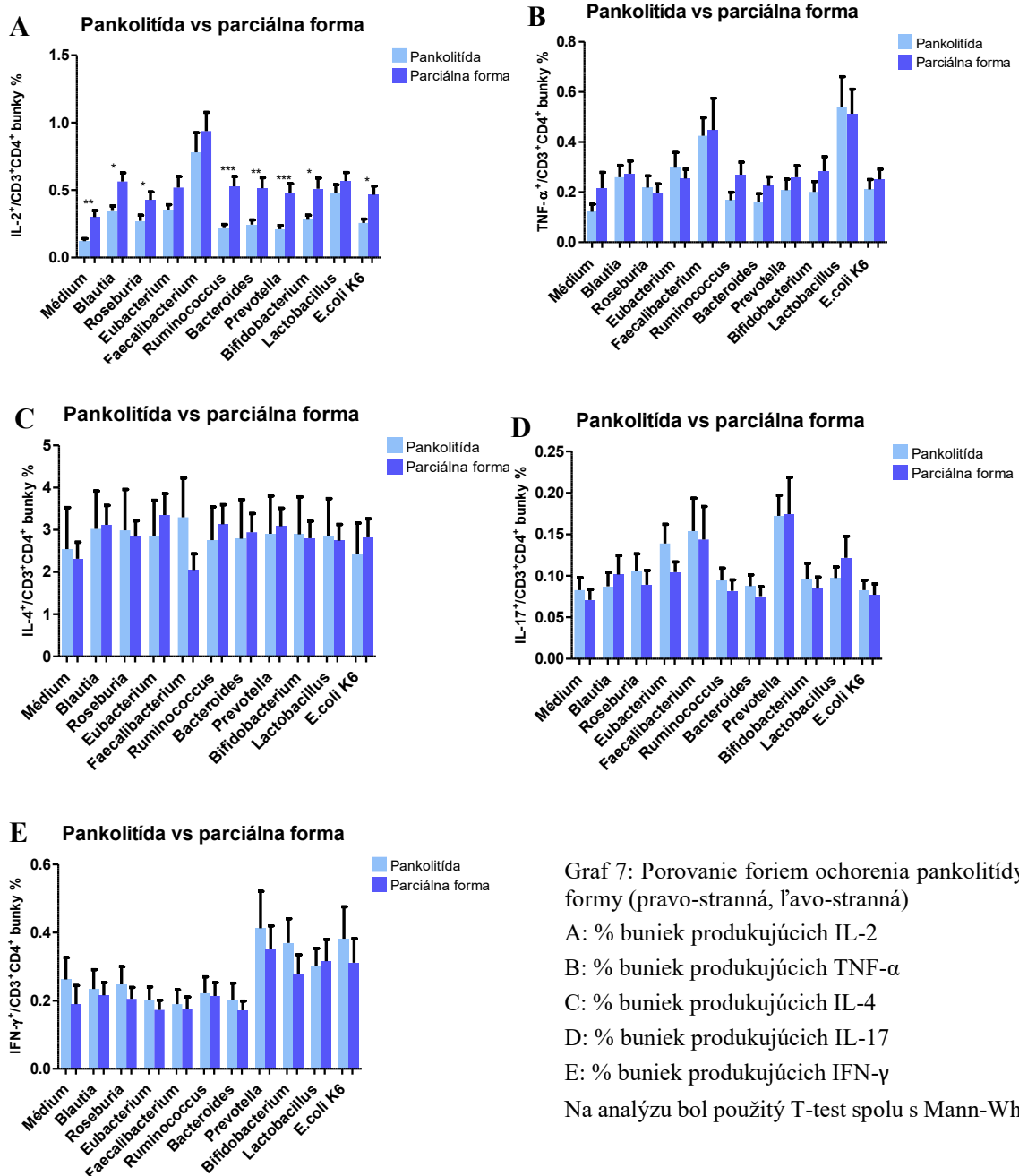
Graf 6: Porovnanie foriem ochorenia pankolitídy a parciálnej formy (pravo-stranná, ľavo-stranná)

- A: % buniek produkujúcich IL-2
- B: % buniek produkujúcich TNF- $\alpha$
- C: % buniek produkujúcich IL-4
- D: % buniek produkujúcich IL-17
- E: % buniek produkujúcich IFN- $\gamma$

Na analýzu bol použitý T-test spolu s Mann-Whitney testom.

### 5.1.7. Porovnanie rozdielnych foriem ochorenia

Rozdielna lokalizácia ochorenia (pankolitída – zasiahnutie celého čreva, parciálna forma - ľavostranná/pravostranná forma) poukázala na nie príliš odlišnú reaktivitu. Percentá buniek, ktoré produkovali IL-2 bolo zvýšené pri parciálnej forme okrem *Eubacterium* u všetkých použitých stimuloch aj pri médiu, čo by mohlo naznačovať, že rozdielne baktérie sú spojené s lokalizáciou ochorenia. Produkcia ostatných cytokínov nevykazovala žiadne rozdiely medzi lokalizáciou ochorenia.



Graf 7: Porovnanie foriem ochorenia pankolitídy a parciálnej formy (pravo-stranná, ľavo-stranná)  
 A: % buniek produkujúcich IL-2  
 B: % buniek produkujúcich TNF- $\alpha$   
 C: % buniek produkujúcich IL-4  
 D: % buniek produkujúcich IL-17  
 E: % buniek produkujúcich IFN- $\gamma$   
 Na analýzu bol použitý T-test spolu s Mann-Whitney testom.

---

## 5.2. Sérové biomarkery

Ďalším zo spomínaných cieľov mojej práce bolo testovať sérové biomarkery, ktoré by pomohli pri diagnostike resp. uľahčili predikciu relapsu alebo zlyhanie liečby. Na základe širokospektraj Array z predchádzajúcej štúdie boli vybraté markery, ktoré by k tomuto cieľu mohli dopomôcť.

Biomarkery som rozdelila do 3 skupín:

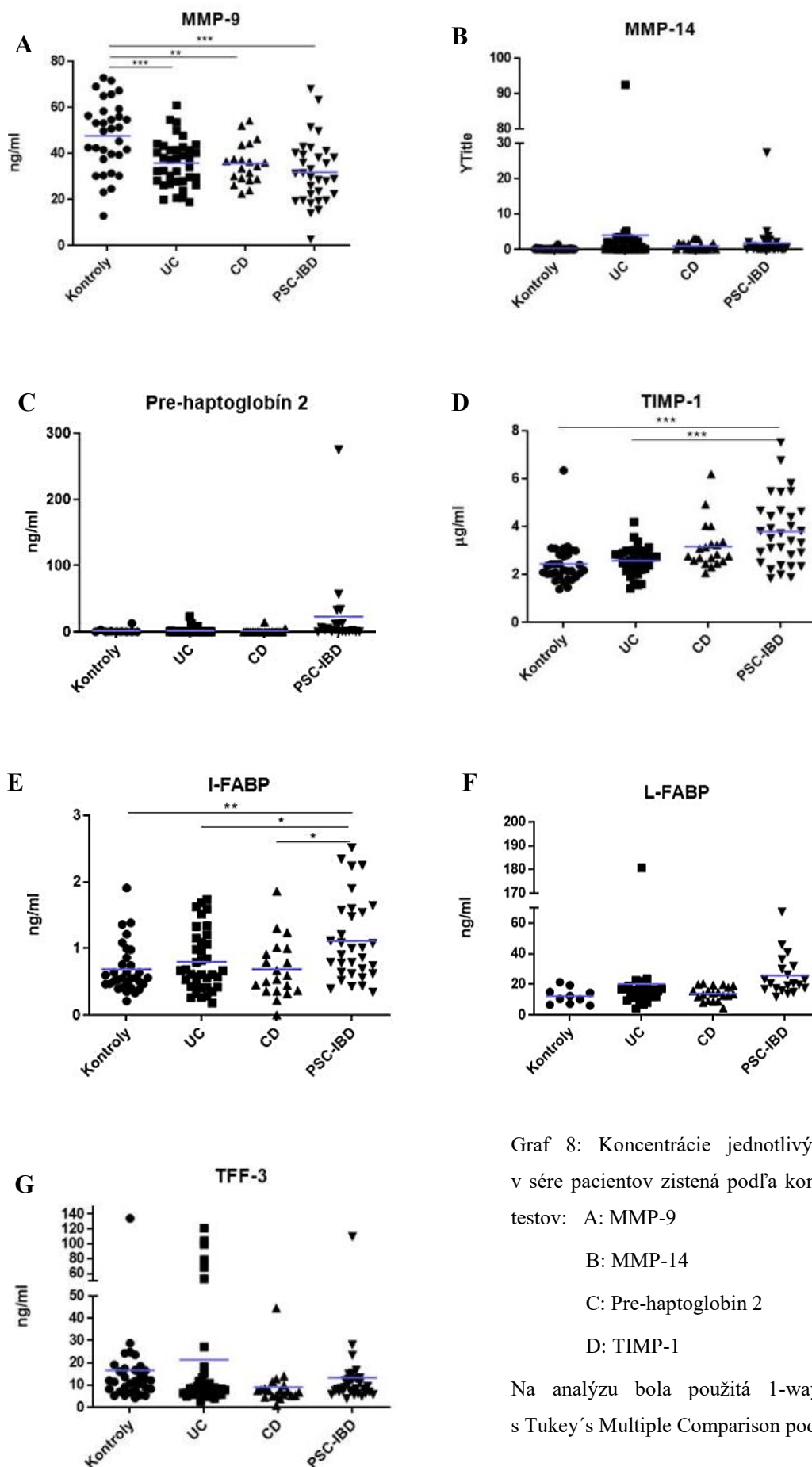
- Zápal: MBL, CD14, LBP, SAA, DAO, TROY, Endotoxín
- Črevná bariéra: MMP-9, MMP-14, TFF-3, TIMP-1, Pre-hapto 2, I-FABP, L-FABP
- Identifikované cez array: CXCR1, OPG, IGF-2, ROBO-4, TGF- $\beta$ 1, EG-VEGF, TMEFF-1

### 5.2.1. Biomarkery črevnej bariéry

Zvýšené hodnoty MMP-9 boli detekované u zdravých kontrol. Boli signifikantne zvýšené oproti všetkým skupinám ochorení. MMP-9 má protektívnu úlohu pri kolorektálnom karcinóme, kde sa správa ako supresor nádoru. Spolu so zvýšenými hodnotami MMP-14 je možné oddeliť zdravé kontroly od pacientov.

PSC-IBD pacienti mali v sére detekovanú signifikantne vyššiu koncentráciu TIMP-1. Ako inhibítor metaloproteináz by mohol poukazovať na zvýšenú remodeláciu tkaniva a aktivitu ochorenia, keďže jeho zvýšené hodnoty sú detekované u aktívnych pacientoch. Tak isto u nich boli zvýšené hodnoty I-FABP proteínu. Ten poukazuje na poškodenie črevnej bariéry, a tak isto boli detekované zvýšené hodnoty L-FABP proteínu, ktorý poukazuje na poškodenie v pečeni, s ktorou je PSC spojená a jeho koncentrácia by mohla poukazovať na stupeň poškodenia.

Kombináciou vyššie spomínaných biomarkerov by sa dala skupina pacientov s PSC-IBD odlíšiť od UC a CD.



Graf 8: Koncentrácie jednotlivých biomarkerov v sére pacientov zistená podľa komerčných ELISA testov: A: MMP-9 E: I-FABP  
 B: MMP-14 F: L-FABP  
 C: Pre-haptoglobín 2 G: TFF-3  
 D: TIMP-1

Na analýzu bola použitá 1-way Anova spolu s Tukey's Multiple Comparison podtestom.

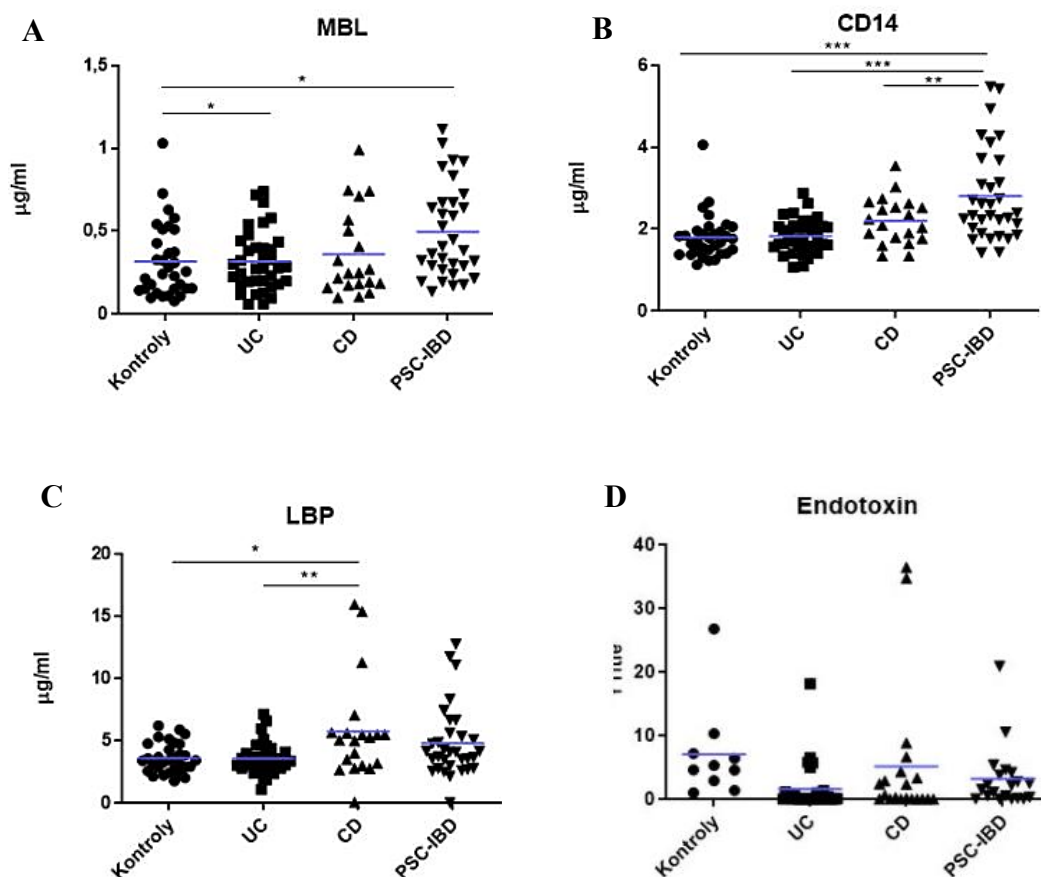
### 5.2.2. Biomarkery zápalu

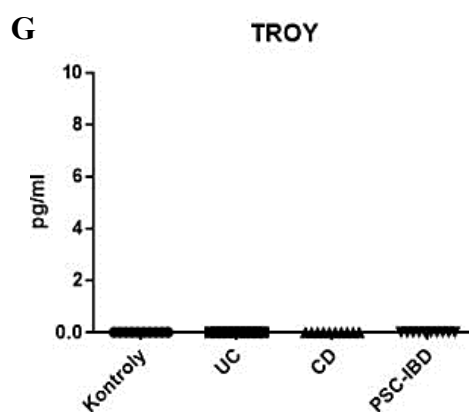
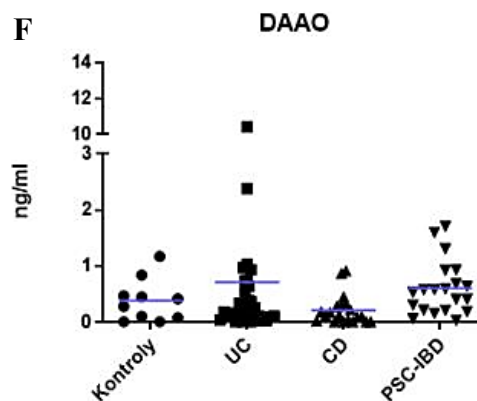
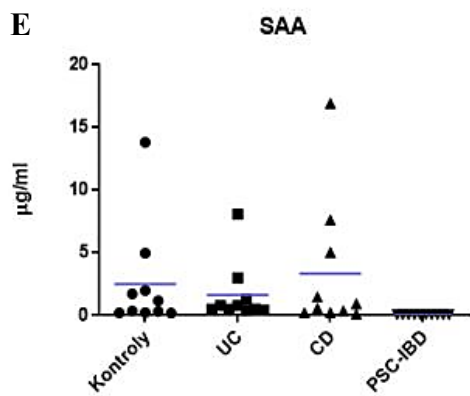
Bežne používaný ukazovateľ je proteín akútnej fázy CRP. Môže však poukazovať na zápal aj mimo GIT, preto by bolo lepšie nájsť marker, ktorý by poukazoval na zápal prebiehajúci v GIT.

MBL je produkovaný v pečeni a jeho zvýšené hodnoty boli zistené v sére pacientov s PSC-IBD, a naopak znížené hodnoty boli u pacientov s UC. Pri PSC-IBD bola signifikantne zvýšená koncentrácia CD14 proteínu oproti všetkým skupinám, čo by mohlo poukazovať na vyššiu aktivitu TLR-4 receptora. S touto skupinou súvisí aj LBP, ktorého hodnoty boli signifikantne vyššie u CD pacientov najmä od UC.

Ostatné markery nepoukazovali na výrazne rozdiely medzi skupinami avšak vyššie hodnoty DAO u pacientov s UC, by mohli poukazovať na viac poškodený črevný epitel. TROY sa nepodarilo detekovať v sére.

Kombináciou MBL, CD14 by bolo možné oddeliť PSC-IBD pacientov od zdravých kontrol ale aj ostatných skupín IBD.





Graf 9: Koncentrácie jednotlivých biomarkerov v sére pacientov zistená podľa komerčných ELISA

testov: A: MBL E: SAA

B: CD-14 F: DAAO

C: LBP G: TROY

D: Endotoxin

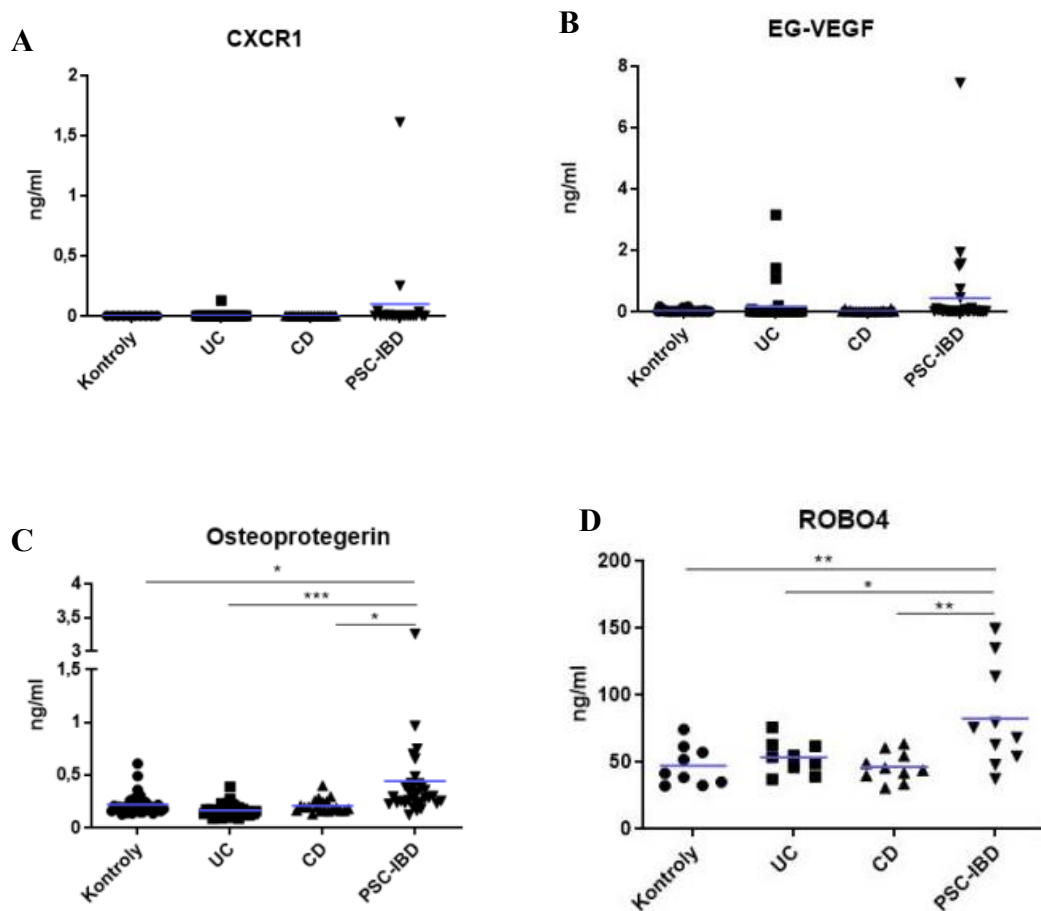
Na analýzu bola použitá 1-way Anova spolu s Tukey's Multiple Comparison podtestom.

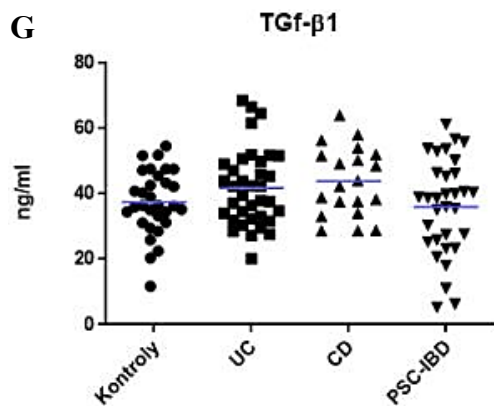
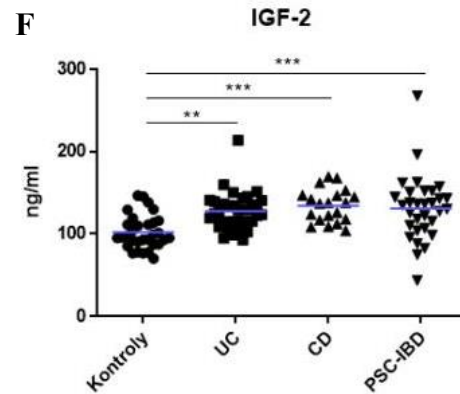
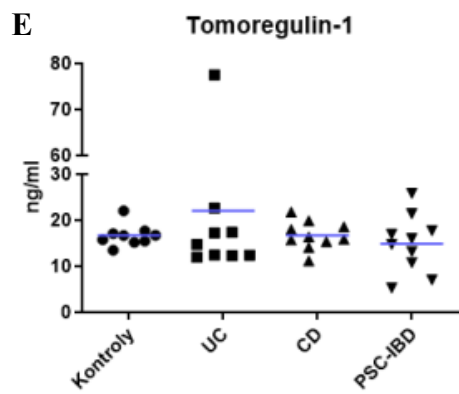
### 5.2.3. Biomarkery identifikované cez Array

Z predchádzajúcej štúdie za použitia proteinovej array boli spomedzi 507 proteínov identifikované ďalšie proteíny, ktoré boli detekované v sére pacientov s IBD. Vysoké hodnoty EG-VEGF a CXCR1 silne korelovali s UC a nízke hodnoty EG-VEGF a vysoké hodnoty OPG boli typické pre CD. Výsledky ELISI nepoukazovali na výrazné rozdiely.

U PSC-IBD sú zvýšené hodnoty OPG oproti všetkým skupinám a rovnako zvýšené hodnoty oproti všetkým skupinám boli aj pri ROBO4. Kombinácia týchto markerov s vyššie spomínanými by mohli pomôcť pri diagnostike PSC.

Pri TGF- $\beta$ 1 boli znížené hodnoty spojené s aktívnou formou ochorenia (relapsom), takže jeho znížené hodnoty by mohli predpovedať blížiaci sa relaps. IGF-2 oddeľoval pacientov s IBD od zdravých kontrol jeho zvýšenými hodnotami, čo by mohlo pomôcť pri prvotnej diagnostike ochorenia.





Graf 10: Koncentrácie jednotlivých biomarkerov v sére pacientov zistená podľa komerčných ELISA

testov: A: CXCR1 E: Tomoregulin-1

B: EG-VEGF F: IGF-2

C: Osteoprotegerin G: TGF-β1

D: ROBO 4

Na analýzu bola použitá 1-way Anova spolu s Tukey's Multiple Comparison podtestom.

---

## 6. Diskusia

Idiopatické črevné ochorenia postihujú čoraz viac ľudí. Je preto dôležité venovať sa ich štúdiu a hľadať možné príčiny a zlepšovaniu diagnostiky. Ich patológia a etiológia nie sú dobre známe, a preto jedným z cieľov mojej diplomovej práce bolo skúmanie reaktivity buniek periférnej krvi pacientov na vybrané mikrobiálne stimuly. Reaktivita bola sledovaná na produkcii cytokínov IL-2, IL-4, IL-17, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ . Diagnostika pri IBD je založená na nepríjemných endoskopických vyšetreniach a za použitia sérologických testov s už dlho zavedenými biomarkermi.

**Pri CD** som pozorovala zvýšené percentá buniek produkujúcich IL-2 pri stimulácii *Faecalibacterium*, čo by mohlo naznačovať že bunky pacientov už v minulosti reagovali na túto baktériu a produkujú rýchlejšie IL-2. Zvýšená produkcia IL-2 bola pozorovaná aj pri štúdiu Hegazy a kol, ktorí navyše pozorovali zníženú produkciu IFN- $\gamma$  pri cirkulujúcich CD4<sup>+</sup> bunkách (Hegazy *et al.*, 2017). Pri IL-4, ktorý by neboli pozorované žiadne výrazné rozdiely oproti nestimulovaným bunkám pri CD, čo by mohlo potvrdiť, že CD je spojená s Th-1 bunkovou odpoveďou.

*Prevotella*, ktorá patrí medzi G<sup>-</sup> baktérie, spôsobila zvýšenú produkciu IL-17 a IFN- $\gamma$  aj keď sa jednalo o malé percentá produkujúcich buniek. Je teda zrejmé, že táto baktéria by mohla byť zapojená do patogenézy ochorenia. Baktéria doposiaľ nebola skúmaná v súvislosti s ľuďmi. Jej úloha bola skúmaná na myších modeloch, kedy transfer *Prevotelly*, spôsobil dysbiózu mikrobioty čreva (Levy *et al.*, 2015). Pri štúdiu súvislosti *Prevotelly* a novými pacienti s CD pred ich liečbou, nebola nájdená žiadna súvislosť (Gevers *et al.*, 2014).

IL-17 bol zvýšený nesignifikantne aj pri ostatných baktériách ako *Blautia*, *Lactobacillus*, *Faecalibacterium*. Jednalo sa však o malé percentá produkujúcich buniek, čo mohlo byť spôsobené krátkou dobou stimulácie. Celkové zvýšenie buniek produkujúcich IL-17A bolo potvrdené aj v inej štúdiu (Hegazy *et al.*, 2017). V štúdiu Zhang a kol. sa pozoroval protektívny účinok *Faecalibacterium*, ktorý inhiboval IL-17 a podporoval tvorbu proti-zápalových cytokínov (Zhang *et al.*, 2014).

Pro-zápalový cytokín TNF- $\alpha$  bol signifikantne zvýšený pri *Lactobacille*. Je to zaujímavé, keďže *Lactobacillus* sa používa ako probiotikum aj pri IBD pacientoch. Jeho protektívny účinok bol potvrdený aj v štúdiu z tohto roku, kedy baktéria ukazovala imunomodulačné účinky podporou produkcie IL-10 ako proti-zápalového cytokínu a inhibíciou IL-17 (Zhang *et al.*, 2019).

---

**Pri UC** neboli taktiež pozorované výrazné rozdiely v produkcii cytokínov oproti nestimulovaným bunkám. Zvýšená produkcia IL-2 a TNF- $\alpha$  bola zistená pri stimulácii *Faecalibacterium*. Abundancia tejto baktérie je znížená celkovo pri IBD, preto reaktivita by mohla súvisieť práve s jej zníženým výskytom. Jej znížený výskyt pri UC bol detekovaný v štúdiu, kde bol skúmaný vzťah medzi *Faecalibacterium* a *Akkermansia* (Lopez Siles *et al.*, 2018). IL-2 sa môže spájať s patogenézou UC. Jeho zvýšené hodnoty boli potvrdené aj v štúdiu (Ebrahimpour *et al.*, 2017).

Pri ostatných cytokínoch neboli pozorované žiadne výrazné produkcie, ktoré by mohli prispieť k patogenéze ochorenia. Zdá sa teda, že pri UC sa treba zamerať na iné cytokíny alebo iné bakteriálne stimuly.

**Pri PSC** *Lactobacillus* spôsobil zvýšené percento buniek produkujúcich IL-2, a TNF- $\alpha$ , a teda táto baktéria by mohla byť zapojená do patogenézy PSC-IBD. Jej korelácia s ochorením bola potvrdená aj v štúdiu, kde sa skúmala mikrobiota pacientov s UC, PSC-IBD a PSC (Bajer *et al.*, 2017). IL-4 bol nesignifikantne zvýšený pri všetkých stimuloch, čo by mohlo naznačovať Th-2 bunkovú odpoveď. IL-17 bol pri niektorých baktériách nesignifikantne zvýšený a to pri *Faecalibacterium*, *Eubacterium* jednalo sa však ako pri ostatných skupinách ochorení o malé množstvo, preto je obtiažne povedať, či by mohli byť zapojené do patogenézy. V pilotnej štúdiu zaoberajúcej sa mikrobiotou a žlčovými kyselinami sa preukázala znížená abundancia *Faecalibacterium* v porovnaní s kontrolami, čo poukazuje na vzťah mikrobioty a PSC-IBD (Vaughn *et al.*, 2019). IL-17 je pri PSC spájaný aj so stratou kostného tkaniva, ktoré sa potvrdilo v myšších modeloch ochorenia (Schmidt *et al.*, 2019), čiže pacienti so zvýšenými hodnotami IL-17 môžu trpieť osteoporózou.

Pri porovnávaní **remisie a relapsu** bolo zaujímavé zistenie. Pri remisii, čo je obdobie kedy choroba nemá aktívne prejavy boli zvýšené hodnoty pro-zápalových cytokínov TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ , ktoré sú typické pre aktívne obdobie ochorenia relapsu. Zvýšené hodnoty TNF- $\alpha$  boli detekované u aktívnych pacientov s CD (Avdagic *et al.*, 2013) a zvýšené hodnoty IFN- $\gamma$  boli spolu s NO zistené taktiež u aktívnych pacientov s IBD (Rafa *et al.*, 2010). Mohlo to byť spôsobené tým, že súbor našich pacientov, ktorí boli v remisii mali blížiaci sa relaps, a preto ich hodnoty pro-zápalových cytokínov boli zvýšené. Pri relapse bolo signifikantne zvýšené % buniek produkujúcich IL-4 pri stimulácii *Lactobacillum*, čo by mohlo poukazovať na možný proti-zápalový účinok. IL-4 spolu s IL-10 poukazovali na polarizáciu na Th-2 bunkovú odpoveď, a teda

---

napomáhanie hojeniu mukózy (Rogy *et al.*, 2000). Podobný trend som sledovala aj pri IL-2 a IL-17.

Ďalej som porovnávala, či je rozdielna odpoveď vzhľadom na **fenotyp** ochorenia. Pacienti boli rozdelení do 2 skupín a to pankolitída a parciálna forma. Pri parciálnej forme boli jediné zvýšené hodnoty u IL-2, a to pri všetkých mikrobiálnych stimuloch okrem *Eubacterium*. Vzhľadom na to, že v súbore boli zahrnutí pacienti so všetkými 3 typmi IBD je ťažké určiť, ktorý z nich by mohol inak reagovať pri rozdielnom fenotype. Pri ostatných cytokínoch neboli pozorované rozdiely medzi pankolitídou a parciálnou formou. Sledovanie rozdielnej odpovedi pri odlišných fenotypoch nebola náplňou zatiaľ žiadnej štúdií.

Z biomarkerov **bariéry** boli zistené zvýšené hodnoty MMP-9 pri kontrolných vzorkách a rozdiel bol oproti všetkým skupinám ochorenia. Zvýšené hodnoty naopak v štúdií Matusiewicz a kol. korelovali s IBD pacientmi a to najmä s UC (Matusiewicz *et al.*, 2014) a zvýšené hodnoty korelovali s aktivitou ochorenia u pediatrických IBD pacientov (Kofla-Dlubacz *et al.*, 2012). Znížené hodnoty u skupín pacientov by mohol poukazovať na zvýšené riziko vzniku karcinómu. U všetkých skupín pacientov boli naopak zvýšené hodnoty MMP-14, čo by mohlo súvisieť s patologickou prestavbou črevnej mukózy. Doposiaľ nebola MMP-14 skúmaná v súvislosti s IBD. Je spájaná s neurodegeneratívnymi ochoreniami kde sa dokázala súvislosť MMP-14 s degeneratívnou neuropatiou (Martins *et al.*, 2017). Kombináciou týchto 2 markerov by bolo možné odlíšiť pacientov s IBD od zdravých.

U PSC-IBD z markerov bariéry boli zistené zvýšené hodnoty TIMP-1, čo by mohlo naznačovať remodeláciu tkaniva. TIMP-1 by mohol pomôcť pri rozlíšení čistej UC a PSC-IBD, ktorá je v súvislosti najmä s UC. Tento inhibítor bol vo zvýšenej miere detekovaný u IBD pacientov a rozdiely súviseli aj s aktivitou ochorenia (Kapsoritakis *et al.*, 2008). U tejto skupiny boli aj zvýšené hodnoty ukazovateľov poškodenia črevnej bariéry I-FABP a pečene L-FABP. Zvýšené sérové hodnoty I-FABP boli detekované u aktívnych pacientov než u pacientov v remisii (Sarıkaya *et al.*, 2015). V štúdií Tornai a kol. poukázali na vzťah medzi črevom a pečeňou, kde pozorovali markery poukazujúce na poškodenie črevnej bariéry u PSC pacientov a ich predikcii pri ochorení (Tornai *et al.*, 2017).

Pri biomarkeroch poukazujúcich na **zápal** bol zistený rozdiel v produkcii MBL. Je to produkt pečene a jeho hodnoty boli vyššie u pacientov s PSC-IBD, zatiaľ čo jeho znížené

---

hodnoty boli detekované pri UC. To by mohlo pomôcť pri rozlíšení čistej UC a UC spojenej s PSC-IBD spolu s vyššie spomínaným TIMP-1. Znížené hodnoty MBL pri UC by mohli naznačovať aj zníženú aktiváciu lektínovej cesty komplementu. Jeho nízke hodnoty sú celkovo späté s pediatrickými pacientmi s IBD a ukázalo sa, že nízke hodnoty boli asociované so zapojením ilea u CD (Kovacz *et al.*, 2013).

U skupiny PSC-IBD boli signifikantne zvýšené hodnoty CD14, čo by mohlo poukazovať na zvýšenú aktiváciu TLR4, ktorý slúži na rozpoznanie LPS alebo protektívnu úlohu. O CD14 sa uvažuje aj ako o protektívnej molekule. V štúdií Buchhaister a kol., zistili, že CD14 má protektívny účinok v udržaní integrity črevnej bariéry. Nedostatok CD14 viedlo k zvýšenej tvorbe pro-zápalových cytokínov (Buchheister *et al.*, 2017).

Pomôcť pri rozlíšení UC a CD by mohol LBP, ktorého hodnoty su signifikantne vyššie pri CD. Zvýšené hodnoty LBP a CD14 sa pozorovali pri relapse a s liečbou sa ich koncentrácia znižovala. Taktiež u pacientov s CD mali ich zvýšené hodnoty podobnú presnosť ako CRP (Lakatos *et al.*, 2010).

Vysoké hodnoty EG-VEGF a nízke hodnoty CXCR1 silne korelovali s UC a nízke hodnoty EG-VEGF a zvýšené hodnoty OPG s CD (Coufal *et al.*, 2019). Tieto zistenia by mohli poukazovať na rozdielnej angiogenéze u UC a CD. OPG môže slúžiť ako marker ochrany kostí alebo ako marker zápalu. Jeho zvýšené hodnoty boli pozorované aj u PSC-IBD. Predchádzajúca štúdia zistila zvýšené hodnoty OPG u pacientov s IBD a poukázala na koreláciu jeho produkcie a koncentrácie pro-zápalových cytokínov (Franchimont *et al.*, 2004).

Na oddelenie zdravých kontrol od všetkých skupín IBD poukazovali zvýšené hodnoty IGF-2. Jeho zvýšené hodnoty boli spojené s kolorektálnym karcinómom a zvýšené sérové hodnoty by mohli poukazovať na vznik tejto neoplázie (Zhong *et al.*, 2017).

---

## 7. Záver

V diplomovej práci bola sledovaná reaktivita PBMC pacientov s IBD s mikrobiálnymi stimulmi.

- Pacienti s CD mali zvýšenú reaktivitu na *Faecalibacterium* vyššou produkciou IL-2. Taktiež u nich bola pozorovaná zvýšená produkcia IL-17 a IFN- $\gamma$  po stimulácii *Prevotellou*, čo naznačuje jej zapojenie do zápalového procesu. IL-17 bol zvýšený aj pri *Lactobacille*, *Blautii*, pričom *Lactobacillus* zvýšil produkciu ďalšieho pro-zápalového cytokínu TNF- $\alpha$ . Tieto baktérie by teda mohli byť zapojené do patogenézy.
- Pri UC bola zistená zvýšená hladina IL-2 a TNF- $\alpha$  po stimulácii *Faecalibacterium*, čo naznačuje jej súvis s patogenézou ochorenia. Pri ostatných cytokínoch neboli pozorované žiadne rozdiely, preto je možno potrebné pri UC sa zamerať na iné cytokíny alebo stimuly.
- Pri PSC-IBD bola pozorovaná nesignifikantne zvýšená produkcia IL-4 pri takmer všetkých stimuloch, čo by mohlo naznačovať Th-2 bunkovú odpoveď alebo protektívny účinok baktérií. Po stimulácii *Lactobacillom* bola zvýšená produkcia IL-2 a TNF- $\alpha$  a zvýšená produkcia pro-zápalového IL-17 bola detekovaná pri *Faecalibacterium*.
- Pri relapse a remisii bolo zistené, že v období remisie bola zvýšená tvorba TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ , ktoré sa radia medzi cytokíny v aktívnej fáze.

Je teda zrejmé, že všetky 3 typy ochorenia spolu zdieľajú spoločné znaky reaktivity na určité baktérie a produkcie cytokínov.

Z testovania biomarkerov boli zistené rôzne kombinácie, ktoré by mohli pomôcť pri diagnostike ochorenia.

- Zvýšené hodnoty MMP-9 u zdravých kontrol a znížené hodnoty MMP-14 u IBD kohorty dobre oddeľovali tieto 2 skupiny, čo by sa dalo využiť pri diagnostike.
- Zvýšené hodnoty TIMP-1 u PSC-IBD a znížené hodnoty MBL u UC by mohli pomôcť pri odlíšení týchto skupín ochorení, keďže PSC-IBD silno koreluje s UC.
- Zvýšené hodnoty EG-VEGF a nízke CXCR1 silne korelovali s UC, zatiaľ čo nízke hodnoty EG-VEGF a zvýšené OPG s CD. Tieto markery by mohli pomôcť pri rozlíšení CD a UC.

- 
- S PSC-IBD sa ešte spájali zvýšené koncentrácie I-FABP a L-FABP spolu s vysokými hodnotami CD14.

Kombinácie vyššie spomínaných markerov, by mohli pomôcť pri diagnostike a fenotypizácii IBD.

Niektoré výsledky boli úspešne publikované v článku Coufal *et al.*, 2019: Inflammatory Bowel Disease Types Differ in Markers of Inflammation, Gut Barrier and in Specific Anti-Bacterial Response. *Cells*. 2019 Jul;8(7):719.

---

## 8. Zoznam použitej literatúry

AJAMIAN M, Steer D, Rosella G, Gibson PR. Serum zonulin as a marker of intestinal mucosal barrier function: May not be what it seems. *PloS one*. 2019 Jan 14;14(1):e0210728.

ALBENBERG, Lindsey, et al. Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology*, 2014, 147.5: 1055-1063. e8.

ALI T, Lam D, Bronze MS, Humphrey MB. Osteoporosis in inflammatory bowel disease. *The American journal of medicine*. 2009 Jul 1;122(7):599-604.

ALKIM C, Alkim H, Koksall AR, Boga S, Sen I. Angiogenesis in inflammatory bowel disease. *International journal of inflammation*. 2015;2015.

ANGELAKIS, Emmanouil, et al. A metagenomic investigation of the duodenal microbiota reveals links with obesity. *PloS one*, 2015, 10.9: e0137784.

ANNESE V, Daperno M, Rutter MD, Amiot A, Bossuyt P, East J, Ferrante M, Götz M, Katsanos KH, Kießlich R, Ordás I. European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2013 Dec 15;7(12):982-1018.

ARUMUGAM, Manimozhiyan, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *nature*, 2011, 473.7346: 174.

ATARASHI, Koji, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*, 2011, 331.6015: 337-341.

ATREYA, R.; NEURATH, M. F. Signaling molecules: the pathogenic role of the IL-6/STAT-3 trans signaling pathway in intestinal inflammation and in colonic cancer. *Current drug targets*, 2008, 9.5: 369-374.

AVDAGIĆ, Nesina, et al. Tumor necrosis factor-alpha serum level in assessment of disease activity in inflammatory bowel diseases. *Medicinski Glasnik*, 2013, 10.2.

BAJER L, Kverka M, Kostovcik M, Macinga P, Dvorak J, Stehlikova Z, Brezina J, Wohl P, Spicak J, Drastich P. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology*. 2017 Jul 7;23(25):4548.

BAJER, Lukas, et al. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology*, 2017, 23.25: 4548.

BAS S, Gauthier BR, Spenato U, Stingelin S, Gabay C. CD14 is an acute-phase protein. *The Journal of Immunology*. 2004 Apr 1;172(7):4470-9.

BAUGMART DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet*. 2007 May 12;369(9573):1641-57.

BÄUMLER, Andreas J.; SPERANDIO, Vanessa. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*, 2016, 535.7610: 85.

---

BELKAID, Yasmine; HAND, Timothy W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, 2014, 157.1: 121-141.

BERG, Rodney D.; GARLINGTON, Alva W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infection and immunity*, 1979, 23.2: 403-411.

BHATTACHARYA, Nupur, et al. Normalizing microbiota-induced retinoic acid deficiency stimulates protective CD8+ T cell-mediated immunity in colorectal cancer. *Immunity*, 2016, 45.3: 641-655.

BLANDFORD, Lucy E., et al. Promoter orientation of the immunomodulatory *Bacteroides fragilis* capsular polysaccharide A (PSA) is off in individuals with inflammatory bowel disease (IBD). *Gut microbes*, 2019, 1-9.

BOUDEAU, Jerome, et al. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infection and immunity*, 1999, 67.9: 4499-4509.

BROUWER, Nannette, et al. Mannose-binding lectin (MBL) facilitates opsonophagocytosis of yeasts but not of bacteria despite MBL binding. *The Journal of Immunology*, 2008, 180.6: 4124-4132.

BUCHHEISTER S, Buettner M, Basic M, Noack A, Breves G, Buchen B, Keubler LM, Becker C, Bleich A. CD14 plays a protective role in experimental inflammatory bowel disease by enhancing intestinal barrier function. *The American journal of pathology*. 2017 May 1;187(5):1106-20.

BURET, Andre Gerald, et al. Pathobiont release from dysbiotic gut microbiota biofilms in intestinal inflammatory diseases: a role for iron?. *Journal of biomedical science*, 2019, 26.1: 1.

CANI, Patrice D., et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 2008, 57.6: 1470-1481.

CARTER MJ, Lobo AJ, Travis SP. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2004 Sep 1;53(suppl 5):v1-6.

CONTINI, Paola, et al. Granulocytes and monocytes apheresis induces upregulation of TGFβ1 in patients with active ulcerative colitis: A possible involvement of soluble HLA-I. *Journal of clinical apheresis*, 2017, 32.1: 49-55.

COUFAL S, Galanova N, Bajer L, Gajdarova Z, Schierova D, Jiraskova Zakostelska Z, Kostovcikova K, Jackova Z, Stehlikova Z, Drastich P, Tlaskalova-Hogenova H. Inflammatory Bowel Disease Types Differ in Markers of Inflammation, Gut Barrier and in Specific Anti-Bacterial Response. *Cells*. 2019 Jul;8(7):719.

---

CUI, Hengmi, et al. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science*, 2003, 299.5613: 1753-1755.

DANESE, Silvio, et al. Narrow-band imaging endoscopy to assess mucosal angiogenesis in inflammatory bowel disease: a pilot study. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2010, 16.19: 2396.

DE VOOGD FA, Geary RB, Mulder CJ, Day AS. Osteoprotegerin: A novel biomarker for inflammatory bowel disease and gastrointestinal carcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2016 Aug;31(8):1386-92.

DEL ZOTTO, B., et al. TGF- $\beta$ 1 production in inflammatory bowel disease: differing production patterns in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clinical & Experimental Immunology*, 2003, 134.1: 120-126.

DEN BESTEN, Gijs, et al. Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2013, 305.12: G900-G910.

DEN BESTEN, Gijs, et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research*, 2013, 54.9: 2325-2340.

DERRIEN, Muriel, et al. Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2004, 54.5: 1469-1476.

DI SABATINO, Antonio, et al. Blockade of transforming growth factor  $\beta$  upregulates T-box transcription factor T-bet, and increases T helper cell type 1 cytokine and matrix metalloproteinase-3 production in the human gut mucosa. *Gut*, 2008, 57.5: 605-612.

DONALDSON, Gregory P.; LEE, S. Melanie; MAZMANIAN, Sarkis K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14.1: 20.

DORÉ, J. O. È. L., et al. The human intestinal microbiota: from phylogenetics to functional metagenomics. *Intestinal Microbiomics: Novel Indicators of Health and Disease. Herborn: Old Herborn University Foundation*, 2010, 15-22.

DORSCH, Marion, et al. PK1/EG-VEGF induces monocyte differentiation and activation. *Journal of leukocyte biology*, 2005, 78.2: 426-434.

DOTAN, Iris, et al. Antibodies against laminaribioside and chitobioside are novel serologic markers in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2006, 131.2: 366-378.

DU Z, Hudcovic T, Mrazek J, Kozakova H, Srutkova D, Schwarzer M, Tlaskalova-Hogenova H, Kostovcik M, Kverka M. Development of gut inflammation in mice colonized with mucosa-associated bacteria from patients with ulcerative colitis. *Gut pathogens*. 2015 Dec;7(1):32.

---

DUBUQUOY, Laurent, et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2003, 124.5: 1265-1276.

EBRAHIMPOUR S, Shahbazi M, Khalili A, Tahoori MT, Zavaran AH, Amari A, Aghili B, Abediankenari S, Mohammadizad H, Mohammadnia-Afrouzi M. Elevated levels of IL-2 and IL-21 produced by CD4+ T cells in inflammatory bowel disease. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2017;31(2):279-87.

EECKHAUT, Venessa, et al. Butyricicoccus pullicaecorum in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2013, 62.12: 1745-1752.

EL AIDY, Sahar, et al. The gut microbiota elicits a profound metabolic reorientation in the mouse jejunal mucosa during conventionalisation. *Gut*, 2013, 62.9: 1306-1314.

FAFILEK, Bohumil, et al. Troy, a tumor necrosis factor receptor family member, interacts with Igr5 to inhibit Wnt signaling in intestinal stem cells. *Gastroenterology*, 2013, 144.2: 381-391.

FASANO, Alessio; SHEA-DONOHUE, Terez. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2005, 2.9: 416.

FERNÁNDEZ, Leónides, et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological research*, 2013, 69.1: 1-10.

FERREIRO-IGLESIAS R, Barreiro-de Acosta M, Otero Santiago M, Lorenzo Gonzalez A, Alonso de la Peña C, Benitez Estevez AJ, Dominguez-Muñoz JE. Fecal calprotectin as predictor of relapse in patients with inflammatory bowel disease under maintenance infliximab therapy. *Journal of clinical gastroenterology*. 2016 Feb 1;50(2):147-51.

FICKERT, Peter, et al. Lithocholic acid feeding induces segmental bile duct obstruction and destructive cholangitis in mice. *The American journal of pathology*, 2006, 168.2: 410-422.

FICKERT, Peter, et al. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology*, 2004, 127.1: 261-274.

FITZGERALD, Garret A. Measure for measure: biomarker standards and transparency. *Science translational medicine*, 2016, 8.343: 343fs10-343fs10.

FORBES, Jessica D.; VAN DOMSELAAR, Gary; BERNSTEIN, Charles N. Microbiome survey of the inflamed and noninflamed gut at different compartments within the gastrointestinal tract of inflammatory bowel disease patients. *Inflammatory bowel diseases*, 2016, 22.4: 817-825.

FRANCHIMONT N, Reenaers C, Lambert C, Belaiche J, Bours V, Malaise M, Delvenne P, Louis E. Increased expression of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL), its receptor RANK and its decoy receptor osteoprotegerin in the colon of Crohn's disease patients. *Clinical & Experimental Immunology*. 2004 Dec;138(3):491-8.

---

FUKUDA, Shinji, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 2011, 469.7331: 543.

FUSS, Ivan J., et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *The Journal of Immunology*, 1996, 157.3: 1261-1270.

FYDEREK, Krzysztof, et al. Mucosal bacterial microflora and mucus layer thickness in adolescents with inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2009, 15.42: 5287.

GABORIAU-ROUTHIAU, Valérie, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*, 2009, 31.4: 677-689.

GAO Y, Katki H, Graubard B, Pollak M, Martin M, Tao Y, Schoen RE, Church T, Hayes RB, Greene MH, Berndt SI. Serum IGF1, IGF2 and IGFBP3 and risk of advanced colorectal adenoma. *International journal of cancer*. 2012 Jul 15;131(2):E105-13.

GAUDIER, E., et al. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2004, 287.6: G1168-G1174.

GENSOLLEN, Thomas, et al. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*, 2016, 352.6285: 539-544.

GERLACH, Katharina, et al. T H 9 cells that express the transcription factor PU. 1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nature immunology*, 2014, 15.7: 676.

GEVERS, Dirk, et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell host & microbe*, 2014, 15.3: 382-392.

GIJSBERS, Klara; GEBOES, Karel; VAN DAMME, Jozef. Chemokines in gastrointestinal disorders. *Current drug targets*, 2006, 7.1: 47-64.

GRANT, Allister J., et al. "MAdCAM-1 expressed in chronic inflammatory liver disease supports mucosal lymphocyte adhesion to hepatic endothelium (MAdCAM-1 in chronic inflammatory liver disease)." *Hepatology* 33.5 (2001): 1065-1072.

GRONE J, Doeblner O, Loddenkemper C, Hotz B, Buhr HJ, Bhargava S. Robo1/Robo4: differential expression of angiogenic markers in colorectal cancer. *Oncology reports*. 2006 Jun 1;15(6):1437-43.

HAGHIKIA, Aiden, et al. Dietary fatty acids directly impact central nervous system autoimmunity via the small intestine. *Immunity*, 2015, 43.4: 817-829.

---

HAGIHARA K, Nishikawa T, Isobe T, Song J, Sugamata Y, Yoshizaki K. IL-6 plays a critical role in the synergistic induction of human serum amyloid A (SAA) gene when stimulated with proinflammatory cytokines as analyzed with an SAA isoform real-time quantitative RT-PCR assay system. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004 Feb 6;314(2):363-9.

HALL, Jason A., et al. Essential role for retinoic acid in the promotion of CD4+ T cell effector responses via retinoic acid receptor alpha. *Immunity*, 2011, 34.3: 435-447.

HANSEN, Jonathan J.; SARTOR, R. Balfour. Therapeutic manipulation of the microbiome in IBD: current results and future approaches. *Current treatment options in gastroenterology*, 2015, 13.1: 105-120.

HEGAZY, Ahmed N., et al. Circulating and tissue-resident CD4+ T cells with reactivity to intestinal microbiota are abundant in healthy individuals and function is altered during inflammation. *Gastroenterology*, 2017, 153.5: 1320-1337. e16.

HIRSCHFIELD, Gideon M., et al. Primary sclerosing cholangitis. *The Lancet*, 2013, 382.9904: 1587-1599.

HOHENESTER, Simon, et al. "A biliary HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> umbrella constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in human cholangiocytes." *Hepatology* 55.1 (2012): 173-183.

HØIVIK, Marte Lie, et al. Work disability in inflammatory bowel disease patients 10 years after disease onset: results from the IBSEN Study. *Gut*, 2013, 62.3: 368-375.

HOLD, Georgina L., et al. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS microbiology ecology*, 2002, 39.1: 33-39.

HOLMES, Elaine, et al. Understanding the role of gut microbiome–host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends in microbiology*, 2011, 19.7: 349-359.

HONZAWA, Yusuke, et al. Clinical significance of serum diamine oxidase activity in inflammatory bowel disease: Importance of evaluation of small intestinal permeability. *Inflammatory bowel diseases*, 2011, 17.2: E23-E25.

HSIEH, Chyi-Song, et al. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 1993, 260.5107: 547-549.

HUDA-FAUJAN, N., et al. The impact of the level of the intestinal short chain fatty acids in inflammatory bowel disease patients versus healthy subjects. *The open biochemistry journal*, 2010, 4: 53.

HUGHES, David T.; SPERANDIO, Vanessa. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6.2: 111.

CHAPMAN, Roger, et al. Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*, 2010, 51.2: 660-678.

- 
- CHEIFETZ AS. Management of active Crohn disease. *Jama*. 2013 May 22;309(20):2150-8.
- IHARA, Sozaburo; HIRATA, Yoshihiro; KOIKE, Kazuhiko. TGF- $\beta$  in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. *Journal of gastroenterology*, 2017, 52.7: 777-787.
- INOUE, Shigeo, et al. Characterization of cytokine expression in the rectal mucosa of ulcerative colitis: correlation with disease activity. *The American journal of gastroenterology*, 1999, 94.9: 2441-2446.
- IRAPORDA, Carolina, et al. Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. *Immunobiology*, 2015, 220.10: 1161-1169.
- ISHIHARA S, Tada Y, Kawashima K, Kataoka M, Sonoyama H, Yamashita N, Oka A, Kusunoki R, Fukuba N, Mishima Y, Oshima N. Serum amyloid A level correlated with endoscopic findings in patients with Crohn's disease—Possible biomarker for evaluating mucosal healing. *Digestive and Liver Disease*. 2018 Jun 1;50(6):553-8.
- IVANOV, Ivaylo I., et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 2009, 139.3: 485-498.
- JANDHYALA, Sai Manasa, et al. Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2015, 21.29: 8787.
- JIANG, Chengyu; TING, Adrian T.; SEED, Brian. PPAR- $\gamma$  agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 1998, 391.6662: 82.
- JOHANSSON, Malin EV, et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut*, 2014, 63.2: 281-291.
- JOOSSENS, Marie, et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, 2011, 60.5: 631-637.
- JOOSSENS, Sofie, et al. Anti-outer membrane of porin C and anti-I2 antibodies in indeterminate colitis. *Gut*, 2006, 55.11: 1667-1669.
- JOOSSENS, Sofie, et al. The value of serologic markers in indeterminate colitis: a prospective follow-up study. *Gastroenterology*, 2002, 122.5: 1242-1247.
- JOSTINS, Luke, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 2012, 491.7422: 119.
- JÜRGENS, Matthias, et al. Disease activity, ANCA, and IL23R genotype status determine early response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology*, 2010, 105.8: 1811.
-

---

KABEERDOSS, Jayakanthan, et al. Alterations of mucosal microbiota in the colon of patients with inflammatory bowel disease revealed by real time polymerase chain reaction amplification of 16S ribosomal ribonucleic acid. *The Indian journal of medical research*, 2015, 142.1: 23.

KADIVAR, Mohammad, et al. CD8 $\alpha\beta$ +  $\gamma\delta$  T cells: a novel T cell subset with a potential role in inflammatory bowel disease. *The Journal of Immunology*, 2016, 197.12: 4584-4592.

KAMADA, Nobuhiko, et al. Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science*, 2012, 336.6086: 1325-1329.

KANE SV, Sandborn WJ, Rufo PA, Zholudev A, Boone J, Lyerly D, Camilleri M, Hanauer SB. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. *The American journal of gastroenterology*. 2003 Jun;98(6):1309.

KANG M, Edmundson P, Araujo-Perez F, McCoy AN, Galanko J, Keku TO. Association of plasma endotoxin, inflammatory cytokines and risk of colorectal adenomas. *BMC cancer*. 2013 Dec;13(1):91.

KAPSORITAKIS, Andreas N., et al. Imbalance of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1 and-4 serum levels, in patients with inflammatory bowel disease. *BMC gastroenterology*, 2008, 8.1: 55.

KARLSEN, Tom H., et al. Primary sclerosing cholangitis—a comprehensive review. *Journal of hepatology*, 2017, 67.6: 1298-1323

KASER, Arthur, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*, 2008, 134.5: 743-756.

KATT, Janosch, et al. Increased T helper type 17 response to pathogen stimulation in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*, 2013, 58.3: 1084-1093.

KELLY, Denise; CONWAY, Shaun; AMINOV, Rustam. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends in immunology*, 2005, 26.6: 326-333.

KIESSLICH, R., et al. Local barrier dysfunction identified by confocal laser endomicroscopy predicts relapse in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2012, 61.8: 1146-1153.

KJELLEV, S. The trefoil factor family—small peptides with multiple functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, 66.8: 1350-1369.

KOFLA-DLUBACZ A, Matusiewicz M, Krzystek-Korpaczka M, Iwanczak B. Correlation of MMP-3 and MMP-9 with Crohn's disease activity in children. *Digestive diseases and sciences*. 2012 Mar 1;57(3):706-12.

KOH, Ara, et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 2016, 165.6: 1332-1345.

---

KOJIMA T, Morikawa Y, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Senba E, Kitamura T. TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 Jul 7;275(27):20742-7.

KOVACS M, Papp M, Lakatos PL, Jacobsen S, Nemes E, Polgar M, Solyom E, Bodi P, Horvath A, Molnar K, Szabo D. Low mannose-binding lectin (MBL) is associated with paediatric inflammatory bowel diseases and ileal involvement in patients with Crohn disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2013 Mar 1;7(2):134-41.

KRYCZEK, Ilona, et al. Inflammatory regulatory T cells in the microenvironments of ulcerative colitis and colon carcinoma. *Oncoimmunology*, 2016, 5.8: e1105430.

KUMARI, Reena; AHUJA, Vineet; PAUL, Jaishree. Fluctuations in butyrate-producing bacteria in ulcerative colitis patients of North India. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2013, 19.22: 3404.

KVERKA, Miloslav; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, Helena. Intestinal microbiota: facts and fiction. *Digestive Diseases*, 2017, 35.1-2: 139-147.

LAKATOS PL, Kiss LS, Palatka K, Altorjay I, Antal-Szalmás P, Palyu E, Udvardy M, Molnar T, Farkas K, Veres G, Harsfalvi J. Serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 are markers of disease activity in patients with Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2010 Sep 23;17(3):767-77.

LAKATOS, Peter Laszlo, et al. Pancreatic autoantibodies are associated with reactivity to microbial antibodies, penetrating disease behavior, perianal disease, and extraintestinal manifestations, but not with NOD2/CARD15 or TLR4 genotype in a Hungarian IBD cohort. *Inflammatory bowel diseases*, 2008, 15.3: 365-374.

LAMBERT, Elise, et al. TIMPs as multifacial proteins. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2004, 49.3: 187-198.

LANDY, Jonathan, et al. Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, 2016, 22.11: 3117.

LAZAR, Veronica, et al. Aspects of gut microbiota and immune system interactions in infectious diseases, immunopathology and cancer. *Frontiers in immunology*, 2018, 9: 1830.

LE BERRE, N., et al. Histological discrimination of idiopathic inflammatory bowel disease from other types of colitis. *Journal of clinical pathology*, 1995, 48.8: 749-753.

LENNARD-JONES JE, Shivananda S. Clinical uniformity of inflammatory bowel disease a presentation and during the first year of disease in the north and south of Europe. EC-IBD Study Group. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 1997 Apr;9(4):353-9.

---

LENNARD-JONES, J. E. Classification of inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1989, 24.sup170: 2-6.

LEVY, Maayan, et al. Microbiota-modulated metabolites shape the intestinal microenvironment by regulating NLRP6 inflammasome signaling. *Cell*, 2015, 163.6: 1428-1443.

LICHTENSTEIN, Gary R., et al. American Gastroenterological Association Institute technical review on corticosteroids, immunomodulators, and infliximab in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2006, 130.3: 940-987.

LIN, May Young, et al. Redirection of epithelial immune responses by short-chain fatty acids through inhibition of histone deacetylases. *Frontiers in immunology*, 2015, 6: 554.

LIN, Rui, et al. Abnormal intestinal permeability and microbiota in patients with autoimmune hepatitis. *International journal of clinical and experimental pathology*, 2015, 8.5: 5153.

LINDOR, Keith D. New treatment strategies for primary sclerosing cholangitis. *Digestive diseases*, 2011, 29.1: 113-116.

LINDOR, Keith D.; KOWDLEY, Kris V.; HARRISON, M. Edwyn. ACG clinical guideline: primary sclerosing cholangitis. *The American journal of gastroenterology*, 2015, 110.5: 646.

LIU, Hongchun, et al. Constitutive expression of MMP9 in intestinal epithelium worsens murine acute colitis and is associated with increased levels of proinflammatory cytokine Kc. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2013, 304.9: G793-G803.

LIU, Jimmy Z., et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nature genetics*, 2015, 47.9: 979.

LODES, Michael J., et al. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *The Journal of clinical investigation*, 2004, 113.9: 1296-1306.

LOPEZ SILES M, Enrich-Capó N, Aldeguer X, Sabat-Mir M, Duncan S, Garcia-Gil J, Martinez-Medina M. Alterations in the abundance and co-occurrence of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* in the colonic mucosa of inflammatory bowel disease subjects. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018;8:281.

LOUIS, Petra; FLINT, Harry J. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS microbiology letters*, 2009, 294.1: 1-8.

LOUIS, Petra; FLINT, Harry J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental microbiology*, 2017, 19.1: 29-41.

MACHIELS, Kathleen, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*, 2014, 63.8: 1275-1283.

---

MALOY, K. J.; KULLBERG, M. C. IL-23 and Th17 cytokines in intestinal homeostasis. *Mucosal immunology*, 2008, 1.5: 339.

MANN, E. R., et al. Skin-and gut-homing molecules on human circulating  $\gamma\delta$  T cells and their dysregulation in inflammatory bowel disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 2012, 170.2: 122-130.

MARCOBAL, Angela, et al. Bacteroides in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. *Cell host & microbe*, 2011, 10.5: 507-514.

MARCHESI, Julian R., et al. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *Journal of proteome research*, 2007, 6.2: 546-551.

MARTINS D, Moreira J, Gonçalves NP, Saraiva MJ. MMP-14 overexpression correlates with the neurodegenerative process in familial amyloidotic polyneuropathy. *Disease models & mechanisms*. 2017 Oct 1;10(10):1253-60.

MATSUOKA, Katsuyoshi, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for inflammatory bowel disease. *Journal of gastroenterology*, 2018, 53.3: 305-353.

MATUSIEWICZ, Malgorzata, et al. Matrix metalloproteinase-9: its interplay with angiogenic factors in inflammatory bowel diseases. *Disease markers*, 2014, 2014.

McGHEE JR, Fujihashi K (2012) Inside the Mucosal Immune System. *PLoS Biol* 10(9): e1001397. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001397>

MCGOVERN, Dermot PB; KUGATHASAN, Subra; CHO, Judy H. Genetics of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 2015, 149.5: 1163-1176. e2.

MIEKUS N, Luise C, Sippl W, Baczek T, Schmelzer CE, Heinz A. MMP-14 degrades tropoelastin and elastin. *Biochimie*. 2019 Jul 3.

MITSUYAMA K, Niwa M, Takedatsu H, Yamasaki H, Kuwaki K, Yoshioka S, Yamauchi R, Fukunaga S, Torimura T. Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2016 Jan 21;22(3):1304.

MORRISON, Douglas J.; PRESTON, Tom. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut microbes*, 2016, 7.3: 189-200.

MORSON, B. C. *Ulcerative Colitis: Pathology of Ulcerative Colitis*. 1971.

MOSCHEN AR, Kaser A, Enrich B, Ludwiczek O, Gabriel M, Obrist P, Wolf AM, Tilg H. The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel disease and relates to the state of bone loss. *Gut*. 2005 Apr 1;54(4):479-87.

MUCIDA, Daniel, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 2007, 317.5835: 256-260.

---

NAGAO-KITAMOTO, Hiroko, et al. Functional characterization of inflammatory bowel disease-associated gut dysbiosis in gnotobiotic mice. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 2016, 2.4: 468-481.

NAKAMOTO, Nobuhiro, et al. Gut pathobionts underlie intestinal barrier dysfunction and liver T helper 17 cell immune response in primary sclerosing cholangitis. *Nature microbiology*, 2019, 4.3: 492.

NASER, Saleh A., et al. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2014, 20.23: 7403.

NATIVIDAD, Jane MM; VERDU, Elena F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacological research*, 2013, 69.1: 42-51.

NG, Siew C., et al. Genetics of inflammatory bowel disease in Asia: systematic review and meta-analysis. *Inflammatory bowel diseases*, 2011, 18.6: 1164-1176.

NICHOLSON, Jeremy K., et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 2012, 336.6086: 1262-1267.

NISHIOKA M, Suehiro Y, Sakai K, Matsumoto T, Okayama N, Mizuno H, Ueno K, Suzuki N, Hashimoto S, Takami T, Hazama S. TROY is a promising prognostic biomarker in patients with colorectal cancer. *Oncology letters*. 2018 Apr 1;15(4):5989-94.

O'SULLIVAN, Gilmer JF, Medina C. Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: an update. *Mediators of inflammation*. 2015;2015.

OHKUSA, Toshifumi, et al. Commensal bacteria can enter colonic epithelial cells and induce proinflammatory cytokine secretion: a possible pathogenic mechanism of ulcerative colitis. *Journal of medical microbiology*, 2009, 58.Pt 5: 535.

OHNO H. Intestinal M cells. *The Journal of Biochemistry*. 2015 Dec 3;159(2):151-60.

PARK, Jeongho, et al. Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR-S6K pathway. *Mucosal immunology*, 2015, 8.1: 80.

PASTERNAK BA, D'Mello S, Jurickova II, Han X, Willson T, Flick L, Petiniot L, Uozumi N, Divanovic S, Traurnicht A, Bonkowski E. Lipopolysaccharide exposure is linked to activation of the acute phase response and growth failure in pediatric Crohn's disease and murine colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2009 Nov 18;16(5):856-69.

PAVLIDES, Michael, et al. Outcomes after ileal pouch anal anastomosis in patients with primary sclerosing cholangitis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2014, 8.7: 662-670.

---

PEDERSEN, G., et al. Spontaneous and cytokine induced expression and activity of matrix metalloproteinases in human colonic epithelium. *Clinical & Experimental Immunology*, 2009, 155.2: 257-265.

PELSERS MM, Hermens WT, Glatz JF. Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clinica chimica acta*. 2005 Feb 1;352(1-2):15-35.

PELSERS MM, Namiot Z, Kisielewski W, Namiot A, Januszkiewicz M, Hermens WT, Glatz JF. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clinical biochemistry*. 2003 Oct 1;36(7):529-35.

PETNICKI-OCWIEJA, Tanja, et al. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106.37: 15813-15818.

PIFER, Reed; SPERANDIO, Vanessa. The interplay between the microbiota and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: *Enterohemorrhagic Escherichia coli and Other Shiga Toxin-Producing E. coli*. American Society of Microbiology, 2015. p. 421-436.

PILLAI, Krishna, et al. MUC1 as a potential target in anticancer therapies. *American journal of clinical oncology*, 2015, 38.1: 108-118.

PIRCHER, Andreas, et al. New antiangiogenic strategies beyond inhibition of vascular endothelial growth factor with special focus on axon guidance molecules. *Oncology*, 2014, 86.1: 46-52.

PITLIK, Silvio D.; KOREN, Omry. How holobionts get sick—toward a unifying scheme of disease. *Microbiome*, 2017, 5.1: 64.

POLLAK, Michael. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8.12: 915.

QIN, Junjie, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *nature*, 2010, 464.7285: 59.

RAFA H, Amri M, Saoula H, Belkhelda M, Medjeber O, Boutaleb A, Aftis S, Nakmouche MH, Touil-Boukoffa C. Involvement of interferon- $\gamma$  in bowel disease pathogenesis by nitric oxide pathway: a study in algerian patients. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2010 Sep 1;30(9):691-7.

RATH, Timo, et al. Cellular sources of MMP-7, MMP-13 and MMP-28 in ulcerative colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 2010, 45.10: 1186-1196.

REESE, George E., et al. Diagnostic precision of anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology*, 2006, 101.10: 2410.

---

RICANEK, Petr, et al. Evaluation of disease activity in IBD at the time of diagnosis by the use of clinical, biochemical, and fecal markers. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 2011, 46.9: 1081-1091.

RIEDER, Florian, et al. Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis. *The American journal of pathology*, 2011, 179.5: 2660-2673.

RIVIÈRE, Audrey, et al. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in microbiology*, 2016, 7: 979.

ROGIER, Eric W., et al. Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111.8: 3074-3079.

ROGY, Michael A., et al. Transfer of interleukin-4 and interleukin-10 in patients with severe inflammatory bowel disease of the rectum. *Human gene therapy*, 2000, 11.12: 1731-1741.

ROMAGNANI, Paola, et al. T cells and cytokines in Crohn's disease. *Current opinion in immunology*, 1997, 9.6: 793-799.

ROSSEN, Noortje G., et al. "The mucosa-associated microbiota of PSC patients is characterized by low diversity and low abundance of uncultured Clostridiales II." *Journal of Crohn's and Colitis* 9.4 (2014): 342-348.

ROUND, June L., et al. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science*, 2011, 332.6032: 974-977.

RUEMMELE, Frank M., et al. Diagnostic accuracy of serological assays in pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 1998, 115.4: 822-829.

RUMP, Jörg A., et al. A new type of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA) in active ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Immunobiology*, 1990, 181.4-5: 406-413.

SABROE I, Jones EC, Whyte MK, Dower SK. Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. *Immunology*. 2005 May;115(1):90-8.

SALIM, Sa'ad Y.; SÖDERHOLM, Johan D. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 2010, 17.1: 362-381.

SALZMAN, Nita H., et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nature immunology*, 2010, 11.1: 76.

SARIKAYA M, Ergül B, Doğan Z, Filik L, Can M, Arslan L. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) as a promising test for Crohn's disease: a preliminary study. *Clin Lab*. 2015 Jan 1;61(1-2):87-91.

---

SENDER R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS biology*. 2016 Aug 19;14(8):e1002533.

SEOW, Cynthia H., et al. Novel anti-glycan antibodies related to inflammatory bowel disease diagnosis and phenotype. *The American journal of gastroenterology*, 2009, 104.6: 1426.

SETH, Pankaj, et al. Magic roundabout, a tumor endothelial marker: expression and signaling. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005, 332.2: 533-541.

SCHEITHAUER, Torsten PM, et al. Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance. *Molecular metabolism*, 2016, 5.9: 759-770.

SCHMIDT T, Schwinge D, Rolvien T, Jeschke A, Schmidt C, Neven M, Butscheidt S, Kriz M, Kunzmann L, Mussawy H, Hubert J. Th17 cell frequency is associated with low bone mass in primary sclerosing cholangitis. *Journal of hepatology*. 2019 May 1;70(5):941-53.

SILVERBERG, Mark S., et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2005, 19.Suppl A: 5A-36A.

SIPPONEN, Taina, et al. Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflammatory bowel diseases*, 2008, 14.1: 40-46.

SMITH, Patrick M., et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, 2013, 341.6145: 569-573.

STANGE, E. F., et al. European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2008, 2.1: 1-23.

STECHER, Bärbel, et al. Like will to like: abundances of closely related species can predict susceptibility to intestinal colonization by pathogenic and commensal bacteria. *PLoS pathogens*, 2010, 6.1: e1000711.

STORCH J, Thumser AE. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2000 Jun 26;1486(1):28-44.

STRAUSS, Jaclyn, et al. Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. *Inflammatory bowel diseases*, 2011, 17.9: 1971-1978.

STROBER, Warren; FUSS, Ivan; MANNON, Peter. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *The Journal of clinical investigation*, 2007, 117.3: 514-521.

TAKAHASHI, Kenichiro, et al. Reduced abundance of butyrate-producing bacteria species in the fecal microbial community in Crohn's disease. *Digestion*, 2016, 93.1: 59-65.

---

TAN, Jian, et al. The role of short-chain fatty acids in health and disease. In: *Advances in immunology*. Academic Press, 2014. p. 91-119.

TAN TG, Sefik E, Geva-Zatorsky N, Kua L, Naskar D, Teng F, Pasman L, Ortiz-Lopez A, Jupp R, Wu HJ, Kasper DL. Identifying species of symbiont bacteria from the human gut that, alone, can induce intestinal Th17 cells in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016 Dec 13;113(50):E8141-50.

TARGAN, Stephan R., et al. Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2005, 128.7: 2020-2028.

TERJUNG, Birgit, et al. "p-ANCA in autoimmune liver disorders recognise human  $\beta$ -tubulin isotype 5 and cross-react with microbial protein FtsZ." *Gut* 59.6 (2010): 808-816.

THAISS, Christoph A., et al. The microbiome and innate immunity. *Nature*, 2016, 535.7610: 65.

THIA, Kelvin T., et al. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology*, 2010, 139.4: 1147-1155.

TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, Helena, et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cellular & molecular immunology*, 2011, 8.2: 110.

TORNAI T, Palyu E, Vitalis Z, Tornai I, Tornai D, Antal-Szalmas P, Norman GL, Shums Z, Veres G, Dezsofi A, Par G. Gut barrier failure biomarkers are associated with poor disease outcome in patients with primary sclerosing cholangitis. *World journal of gastroenterology*. 2017 Aug 7;23(29):5412.

TRIPATHI, Amit, et al. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as preheptoglobin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106.39: 16799-16804.

TSUKAMOTO S, Ishikawa T, Iida S, Ishiguro M, Mogushi K, Mizushima H, Uetake H, Tanaka H, Sugihara K. Clinical significance of osteoprotegerin expression in human colorectal cancer. *Clinical cancer research*. 2011 Apr 15;17(8):2444-50.

UEHARA, Akiko, et al. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Molecular immunology*, 2007, 44.12: 3100-3111.

VAN DER SLUIS, Maria, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, 2006, 131.1: 117-129.

---

VAN WIJK, Femke; CHEROUTRE, Hilde. Intestinal T cells: facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity. In: *Seminars in immunology*. Academic Press, 2009. p. 130-138.

VAUGHN BP, Kaiser T, Staley C, Hamilton MJ, Reich J, Graiziger C, Singroy S, Kabage AJ, Sadowsky MJ, Khoruts A. A pilot study of fecal bile acid and microbiota profiles in inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis. *Clinical and experimental gastroenterology*. 2019;12:9.

VERMEIRE S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys?. *Gut*. 2006 Mar 1;55(3):426-31.

VIENNOIS E, Zhao Y, Merlin D. Biomarkers of inflammatory bowel disease: from classical laboratory tools to personalized medicine. *Inflammatory bowel diseases*. 2015 May 11;21(10):2467-74.

WANG D, DuBois RN, Richmond A. The role of chemokines in intestinal inflammation and cancer. *Current opinion in pharmacology*. 2009 Dec 1;9(6):688-96.

WEHKAMP, Jan, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal  $\alpha$ -defensin expression. *Gut*, 2004, 53.11: 1658-1664.

WIERCINSKA-DRAPALO, Alicja, et al. Plasma matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 as biomarkers of ulcerative colitis activity. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2003, 9.12: 2843.

WRIGHT, Emily K., et al. Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn's disease: a systematic review. *Inflammatory bowel diseases*, 2015, 21.6: 1219-1228.

WRIGHT, Samuel D., et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 1990, 249.4975: 1431-1433.

YAMAGATA, Masaru, et al. Submucosal fibrosis and basic-fibroblast growth factor-positive neutrophils correlate with colonic stenosis in cases of ulcerative colitis. *Digestion*, 2011, 84.1: 12-21.

YU, Linda Chia-Hui, et al. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 2012, 3.1: 27.

YU, Zhuo-Teng; CHEN, Ceng; NEWBURG, David S. Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes. *Glycobiology*, 2013, 23.11: 1281-1292.

ZDRAVKOVIC, Natasa D., et al. Potential dual immunomodulatory role of VEGF in ulcerative colitis and colorectal carcinoma. *International journal of medical sciences*, 2014, 11.9: 936.

---

ZHANG F, Li Y, Wang X, Wang S, Bi D. The impact of lactobacillus plantarum on the gut microbiota of mice with DSS-induced colitis. *BioMed research international*. 2019;2019.

ZHANG, Mingming, et al. Faecalibacterium prausnitzii inhibits interleukin-17 to ameliorate colorectal colitis in rats. *PloS one*, 2014, 9.10: e109146.

ZHOLUDEV, Anna, et al. Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *The American journal of gastroenterology*, 2004, 99.11: 2235.

ZHONG H, Fazenbaker C, Chen C, Breen S, Huang J, Yao X, Ren P, Yao Y, Herbst R, Hollingsworth RE. Overproduction of IGF-2 drives a subset of colorectal cancer cells, which specifically respond to an anti-IGF therapeutic antibody and combination therapies. *Oncogene*. 2017 Feb;36(6):797.

ZOETENDAL, Erwin G., et al. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *The ISME journal*, 2012, 6.7: 1415.

ZWEIGNER J, Schumann RR, Weber JR. The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response. *Microbes and Infection*. 2006 Mar 1;8(3):946-52.

Iné zdroje

<https://www.epainassist.com/abdominal-pain/liver/primary-sclerosing-cholangitis-psc>

<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/crohn-disease>