

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Patofyziologie idiopatických střevních zánětů
Vztah k primární sklerózující cholangitidě, transplantaci jater a karcinogenezi

MUDr. Lukáš Bajer
Praha 2020

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor:	Fyziologie a patofyziologie člověka
Předseda oborové rady:	prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.
Školící pracoviště:	Klinika hepatogastroenterologie, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha
Školitel:	doc. MUDr. Pavel Drastich, Ph.D.
Konzultant:	MUDr. Miloslav Kverka, Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT.....	5
SEZNAM ZKRATEK.....	6
ÚVOD DO PROBLÉMU.....	7
HYPOTÉZY.....	8
CÍLE PRÁCE.....	8
METODY.....	9
1. Střevní mikrobiota u PSC a IBD.....	9
2. Sérové biomarkery a porucha střevní bariéry u PSC a IBD.....	9
3. Specifika imunitní odpovědi u PSC a IBD.....	10
4. Retrospektivní analýza souboru pacientů po transplantaci jater pro PSC.....	10
5. HLA-typizace dárců a příjemců jaterních transplantátů u PSC.....	11
6. Riziko vzniku neoplázií u IBD a přidružených chorob.....	11
VÝSLEDKY.....	12
1. Střevní mikrobiota u PSC a IBD.....	12
2. Sérové biomarkery a porucha střevní bariéry u PSC a IBD.....	12
3. Specifika imunitní odpovědi u PSC a IBD.....	13
4. Retrospektivní analýza souboru pacientů po transplantaci jater pro PSC.....	14
5. HLA-typizace dárců a příjemců jaterních transplantátů u PSC.....	14
6. Riziko vzniku neoplázií u IBD a přidružených chorob.....	14
DISKUZE.....	16
ZÁVĚRY A SHRNU TÍ.....	18
LITERÁRNÍ REFERENCE.....	19
SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ.....	22

ABSTRAKT

Idiopatické střevní záněty (IBD) jsou skupinou multifaktoriálně podmíněných chorob s celosvětově narůstající incidencí. Dvěma nejlépe definovanými fenotypy jsou Crohnova choroba a ulcerózní kolitida (UC). Idiopatický střevní zánět doprovázející primární sklerózující cholangitidu (PSC), progresivní onemocnění žlučových vedoucí k jaterní cirhóze, je pro svá klinická a patofyziologická specifika považován za samostatný fenotyp IBD (tzv. PSC – IBD).

Cílem experimentální části této práce bylo zejména definovat specifika PSC – IBD v klíčových oblastech podílejících se na patogenezi IBD, kterými jsou: složení střevní mikrobioty, porucha střevní bariéry, genetická predispozice a aberantní imunologická odpověď. Dalším cílem práce bylo popsat vztah IBD k transplantaci jater a vzniku neoplazií na základě analýzy klinických dat pacientů sledovaných v zázemí transplantačního centra.

Za použití metod paralelní sekvenace jsme odhalili specifickou kompozici mikrobioty u PSC – IBD, která se odlišovala od kompozice u UC a kontrol rekrutovaných ze zdravé české populace. V práci jsme odhalili četné sérové biomarkery, úzce korelující s jednotlivými fenotypy IBD či specifickými klinickými kofaktory. Některé z těchto nálezů prokazují klíčovou úlohu střevní bariéry v patogenezi zkoumaných chorob. Zároveň jsme charakterizovali protilátkovou a buněčnou odpověď, která u různých podtypů IBD vykazovala signifikantní rozdíly. Na největším českém souboru pacientů po transplantaci jater pro PSC jsme v rámci retrospektivní studie prokázali klíčovou úlohu střevního zánětu na míru rekurence PSC, a tím i na prognózu jaterního štěpu. V dané kohortě pacientů jsme pomocí HLA-typizace taktéž prokázali význam genetické predispozice. U pacientů transplantovaných pro PSC jsme též zhodnotili riziko rozvoje biliárních a kolorektálních neoplazií. U pacientů resekovaných pro fokální pankreatickou masu jsme popsali vztah autoimunitní pankreatitidy (choroby významně asociované s IBD) k rozvoji karcinomu slinivky břišní.

Na výsledky této práce v budoucnu navážou další projekty v dané výzkumné oblasti. Prezentované závěry mohou dopomoci ke stanovení pro praxi relevantních biomarkerů či terapeutických cílů a k identifikaci pacientů se zvýšeným klinickým rizikem.

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) represents a group of multifactorial illnesses with increasing incidence worldwide. Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are the two most thoroughly defined phenotypes of IBD. IBD associated with primary sclerosing cholangitis (PSC) – a progressive biliary disease leading to cirrhosis and liver failure – is considered as specific IBD phenotype (also referred to as 'PSC – IBD') due to its clinical and pathophysiological characteristics.

The aim of the experimental part of this thesis was to define specific features of PSC – IBD in the key areas of IBD pathogenesis. These are: microbiota composition, gut – barrier failure, genetic predisposition and aberrant cellular and antibody immune response. Furthermore, the other goals were to describe relation of IBD status and activity to liver transplantation (LTx) and carcinogenesis based on thorough analysis of clinical data in patients under surveillance at the liver transplantation unit.

Using the next-generation parallel sequencing technology, we discovered specific bacterial features of gut microbiota composition in PSC – IBD which significantly differed from UC and healthy controls recruited from Czech general population. Moreover, we identified numerous seral biomarkers distinguishing CD, UC and PSC – IBD and/or reflecting disease and treatment status. Some of these findings stress out the importance of gut barrier dysfunction in IBD. Additionally, we characterised antibody and cellular immune response showing significant variations among IBD phenotypes. Within the retrospective study analysing the largest Czech set of patients after LTx for PSC up-to-date we revealed that IBD status has a crucial impact on PSC recurrence rate and therefore the liver graft prognosis. After HLA-typing of subject cohort of patients involved, we also demonstrated the genetic predisposition importance regarding this issue. Additionally, we evaluated risk of biliary and colorectal neoplasia development in context of LTx for PSC. Lastly, we revealed a significant correlation between autoimmune pancreatitis (condition significantly associated with IBD) and pancreatic carcinoma in patients resected for focal pancreatic mass.

In future, the data presented in this thesis will be followed by further projects with similar research focus. Our results may significantly contribute to establishing suitable clinical biomarkers and/or therapeutic goals and identifying high – risk patients.

SEZNAM ZKRATEK

AIP	- autoimunitní pankreatitida
AUC	- area under the curve
BSA	- bovinní sérový albumin
CD	- Crohnova choroba
CI	- confidence interval
EG-VEGF	- endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor
ELISA	- enzyme-linked immuno sorbent assay
ERCP	- endoskopická retrográdní cholangiopankreatografie
FACS	- fluorescent activated cell sorting
HLA	- hlavní histokompatibilní index
HR	- hazard ratio
IBD	- idiopatické střevní záněty
I-FABP	- fatty acid-binding protein, intestinal type
IFN-γ	- interferon gamma
IgA, IgM, IgG	- imunoglobulin A, imunoglobulin M, imunoglobulin G
IKEM	- Institut klinické a experimentální medicíny, Praha
IL	- interleukin
L-FABP	- fatty acid-binding protein, liver type
LBP	- lipopolysaccharide-binding protein
LEfSe	- Linear discriminant analysis Effect Size
LTx	- transplantace jater
MaAsLin	- Multivariate Association with Linear Models
MBP	- mannan-binding lectin
MMP-9	- matrixová metaloproteináza 9
MMP-14	- matrixová metaloproteináza 14
MRCP	- cholangiopankreatografie na magnetické rezonanci
NGS	- next-generation sequencing
OR	- odds ratio
OPG	- osteoprotegerin
PBS	- phosphate-buffered saline, fosfátový pufr
PC	- pancreatic cancer, karcinom slinivky břišní
PCR-SSP	- polymerase chain reaction with sequence-specific priming
PCR-SSOP	- polymerase chain reaction with sequence-specific oligonucleotide probe
PRRs	- pattern recognition receptors
PSC	- primární sklerózující cholangitida
PSC-IBD	- idiopatický střevní zánět při primární sklerózující cholangitidě
QIIME	- Quantitative Insights Into Microbial Ecology
ROBO-4	- roundabout guidance receptor 4
TGF-β1	- transforming growth factor beta
rPSC	- rekurentní forma primární sklerózující cholangitidy
TIMP	- tkáňový inhibitor metaloproteináz
TLR	- toll-like receptor
TMEFF1	- tomoregulin 1
TNF-α	- tumor necrosis factor alpha
UC	- ulcerózní kolitida

ÚVOD DO PROBLÉMU

Idiopatické střevní záněty (IBD) jsou skupinou chorob reprezentovanou dvěma hlavními fenotypy – Crohnovou chorobou (CD) a ulcerózní kolitidou (UC). Jedná se o onemocnění charakterizovaná chronickým zánětem se střídáním období relapsu a remise.¹ Nejen kvůli jejich narůstajícímu výskytu představují celosvětový socioekonomický problém.^{2,3} Patogeneze IBD je multifaktoriální a uplatňují se v ní zejména střevní mikrobiota, porucha střevní bariéry, vnější vlivy, genetická predispozice a aberantní imunitní odpověď.^{4,5} Pacienti s IBD mají oproti zdravé populaci podstatně vyšší riziko rozvoje celé řady chorob, včetně autoimunitních. S IBD je například významně asociována autoimunitní pankreatitida 2. typu.^{6,7}

Primární sklerózující cholangitida (PSC) je vzácnou chorobou žlučového stromu a jednou z nejčastějších indikací transplantace jater (LTx) v České republice. Nemoc vede k rozvoji jaterní cirhózy (včetně všech projevů portální hypertenze), rekurentní bakteriální sepsi, úpornému pruritu a dalším klinicky významným komplikacím výrazně snižujícím kvalitu života nemocných.⁸⁻¹⁰ Ti jsou navíc zatíženi zvýšeným rizikem rozvoje nádorových onemocnění, zejména kolorektálního a cholangiocelulárního karcinomu.¹¹ Pacienti po LTx jsou pak ohroženi rekurentní formou PSC (rPSC), která je u nich nejčastější příčinou selhání jaterního štěpu.^{10,12,13}

PSC je ve většině případů asociována s idiopatickým střevním zánětem, který se pro svá klinická a patofyziologická specifika vymezuje jako samostatný fenotyp IBD (tzv. PSC-IBD). Patogeneze PSC-IBD je pravděpodobně z podstatné části podobná jako u CD a UC, avšak v porovnání s těmito lépe definovanými fenotypy je podepřena významně menší literární evidencí.^{8,14,15}

HYPOTÉZY

- 1) PSC-IBD se v klíčových bodech patogeneze (složení střevní mikrobioty, porucha střevní bariéry, aberantní imunitní odpověď) odlišuje od ostatních fenotypů IBD.
- 2) PSC-IBD ovlivňuje prognózu jaterního štěpu po transplantaci jater pro PSC.
- 3) IBD a s nimi asociované choroby jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku neoplazií.

CÍLE PRÁCE

Hlavní cíle práce

- 1) Charakterizovat za použití sekvenčních metod nové generace (NGS) složení střevního mikrobiomu u pacientů s IBD.
- 2) Stanovit ve vybraných skupinách pacientů hladiny relevantních sérových markerů poruchy střevní bariéry.
- 3) Charakterizovat u jednotlivých fenotypů specifika humorální a buněčné odpovědi.

Vedlejší cíle práce

- 1) Pomocí širokospektrých proteinových arrayí stanovit sérové biomarkery asociované s různými fenotypy IBD.
- 2) Retrospektivně analyzovat soubor pacientů transplantovaných pro PSC se zaměřením na aktivitu IBD, výskyt neoplazií a prognózu jaterního štěpu.
- 3) Určit koincidenci autoimunitní pankreatitidy a karcinomu pankreatu u pacientů resekovaných pro fokální tumorózní pankreatickou masu.

METODY

1. Střevní mikrobiota u PSC a IBD

Od 106 účastníků studie byly odebrány nativní vzorky stolice a rutinní laboratorní parametry společně s anamnestickými údaji. U pacientů s IBD byla zhodnocena aktivita střevního zánětu. Do studie bylo zařazeno 43 pacientů s PSC, a to jak s přidruženým střevním zánětem (n = 32), tak bez něho (n = 11). Kontrolní soubor představoval 32 pacientů s UC a 31 zdravých jedinců. Vzorky byly za použití vlastního originálního protokolu podrobeny izolaci DNA, amplifikaci a přípravě sekvenační knihovny. Za účelem hloubkové taxonomické diference byl pomocí platformy Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, USA) sekvenován úsek genu pro 16S podjednotku ribosomální RNA pokrývající variabilní oblasti V3 a V4. Výstupní sekvenační data byla dále analyzována softwarem QIIME včetně využití statistických nástrojů MaAsLin a LEfSe pro korelaci s příslušnými metadaty (laboratorní hodnoty, aktivita choroby, chronická medikace, atp.).

2. Sérové biomarkery a porucha střevní bariéry u PSC a IBD

Do studie bylo v letech 2015 – 2018 rekrutováno celkem 139 jedinců: 52 s UC, 20 s CD (subfenotyp s postižením tlustého střeva, resp. s absencí choroby v proximálním GIT), 47 s PSC (s i bez konkomitantního IBD) a 28 zdravých kontrol. Krevní séra byla ode všech subjektů odebrána při ambulantní návštěvě na Klinice hepatogastroenterologie IKEM, rozdělena do vícečetných alikvót a archivována před analýzou v -20 °C.

Pokusná sada 18 vzorků (po šesti od pacientů s UC, CD a od zdravých kontrol) byla analyzována širokospektrou proteinovou arrayí Human Antibody Array L-507 dle protokolu poskytovaného výrobcem (RayBiotech, Peachtree Corners, USA). Soubor 507 analyzovaných proteinů zahrnovala spektrum cytokinů, chemokinů, adipokinů, proteáz, solubilních receptorů, aj. Za použití scanneru GeneTAC UC4 Microarray Scanner (Genomic Solution, United Kingdom; resolution, 10 µm) byl vyhodnocen signál jednotlivých proteinů; výstupní informace byly posléze analyzovány programem AG Scan software (ver. 18.7. 2007, The GenoToul bioinformatics, France) a pomocí aplikace Prediction Analysis of Microarrays (PAM; ver. 1.56) pro statistický program R (ver. 3.5.2; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Relevantní biomarkery stanovené pomocí proteinových arrayí (a několik dalších včetně markerů poruchy střevní bariéry dle dostupné empirie) jsme dále kvantifikovali metodou ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) dle návodů přiložených výrobcem k jednotlivým prefabrikovaným kitům (*Tab. 1*).

Biomarker	Abbreviation	Manufacturer	Cat. No
Endocrine-Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor *	EG-VEGF	R&D systems	DY1209
Interleukin-8 receptor, alpha *	CXCR1/IL8RA	LifeSpan BioScience	LS-F11255
Osteoprotegerin	OPG	R&D systems	DY805
Tomoregulin 1	TMEFF1	LifeSpan BioScience	LS-F52730
Insulin-like Growth Factor 2 *	IGF2	R&D systems	DY292
Transforming Growth Factor- β 1 *	TGF- β 1	R&D systems	DY240
TROY protein	TNFRSF19	LifeSpan BioScience	LS-F39966
Roundabout Guidance Receptor 4 *	ROBO4	RayBiotech	ELH-ROBO4
Matrix Metalloproteinase 9	MMP-9	R&D systems	DY911
Matrix Metalloproteinase 14	MMP-14	R&D systems	DY918
Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1	TIMP-1	R&D systems	DY970
Mannan-Binding Lectin	MBL	R&D systems	DY2307
Soluble CD14	CD14	R&D systems	DY383
Lipopolysaccharide-Binding Protein	LBP	R&D systems	DY870
Trefoil Factor 3	TFF-3	R&D systems	DY4407
Endotoxin-Core Antibody IgM	EndoCab	MyBiosource	MBS9352896
Serum Amyloid A	SAA	HyCult Biotech	HK333
Pre-haptoglobin 2	Zonulin	MyBiosource	MBS2880564
D-amino-acid oxidase	DAAO	MyBiosource	MBS2886321
Intestinal Fatty Acid-Binding Protein	I-FABP	HyCult Biotech	HK406
Liver Fatty Acid-Binding Protein	L-FABP	HyCult Biotech	HK404

Tab 1.: Seznam kvantifikovaných sérových markerů; * - determinováno proteinovou arrayí L-507

3. Specifika imunitní odpovědi u PSC a IBD

Soubor pacientů vycházel v tomto případě z identické kohorty popsané o odstavce výše (včetně využití sérových alikvot a nashromážděných klinických údajů). U vybraných pacientů byly odebrány vzorky plné krve k přímému zpracování.

Sérové koncentrace imunoglobulinů IgA, IgM a IgG byly stanoveny metodou ELISA za použití vlastního optimalizovaného protokolu. Bakteriální lyzáty, izolované ze stolic vybraných pacientů s IBD, byly rozpuštěny v PBS (fosfátový pufr) a inkubovány v 96-jamkové destičce za použití různých koncentrací (0,1mg/ml, 0,5mg/ml, 1mg/ml). Po provedení dalších kroků v rámci protokolu (promývání, blokaci 1% boviním sérovým albuminem (BSA), přidání ředěných patientských sér, navázání sekundární protilátky, inkubaci) byla na spektrofotometru změřena absorbance při 450nm a 650nm. Jako standard bylo využito předem vybrané sérum v sériových dilucích.

Odpověď cirkulujících T-lymfocytů reagujících se střevní mikrobiotou byla analyzována z krve zdravých kontrol (n = 19) a pacientů s CD (n = 17), UC (n = 15) a PSC-IBD (n = 9) za použití metody FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting). Výstupní data byla analyzována pomocí softwaru FlowJo (verze 7.2.5., Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA). Buňky byly stimulovány stafylokokovým enterotoxinem B (koncentrace 1 μ g/ml; Merck) nebo korespondujícím bakteriálním lyzátem (finální koncentrace 10 μ g/ml).

4. Retrospektivní analýza souboru pacientů po transplantaci jater pro PSC

V rámci souboru pacientů transplantovaných pro PSC v IKEM mezi lety 1995–2015 (n = 121) byla provedena důkladná retrospektivní analýza relevantních anamnestických a klinických dat z dostupné dokumentace. Po aplikování vylučovacích kritérií jsme vyfiltrovali kohortu 47 pacientů, u kterých jsme hodnotili rizikové faktory (na straně dárce i příjemce) rekurence PSC v jaterním štěpu. Diagnóza rPSC byla stanovena pomocí přímého či

nepřímého zobrazení žlučového stromu (ERCP nebo MRCP) a histologického nálezu v jaterních biopsiích.¹⁶ Všichni pacienti podstoupili před LTx protokolární koloskopii; u pacientů s potvrzenou diagnózou IBD pak bylo koloskopické vyšetření opakováno zpravidla v ročních intervalech. K určení přežívání pacientů a jaterních štěpů byly zhotoveny Kaplan-Meierovy křivky. Pro účely univariální analýzy byly využity různé statistické testy dle charakteru dat (Student's t-test, Mann-Whitney U-test, Fisher's exact test) v programu JMP 10 software (SAS Institute Inc., Cary, NC). Multivariální analýza byla zpracována pomocí Coxova regresivního modelu proporcionálních rizik.

5. HLA-typizace dárců a příjemců jaterních transplantátů u PSC

U 46 příjemců a 40 dárců z výše popsané studijní kohorty byly archivovány biologické vzorky vhodné k serologické a/nebo molekulárně biologické HLA-typizaci. K serologické typizaci HLA I. třídy byly využity dedikované kity se standardizovaným protokolem (Complement-dependent cytotoxicity assay, BAG Health Care GmbH, Lich, Germany). K DNA-typizaci HLA I. a II. třídy bylo využito metod PCR-SSP (Olerup SSP, Stockholm, Sweden) či PCR SSOP (One Lambda Inc, Canoga Park, USA). Získané výsledky jsme korelovali s klinickými údaji pacientů ve vztahu k rozvoji rekurence základního onemocnění v jaterním štěpu.

6. Riziko vzniku neoplázií u IBD a přidružených chorob

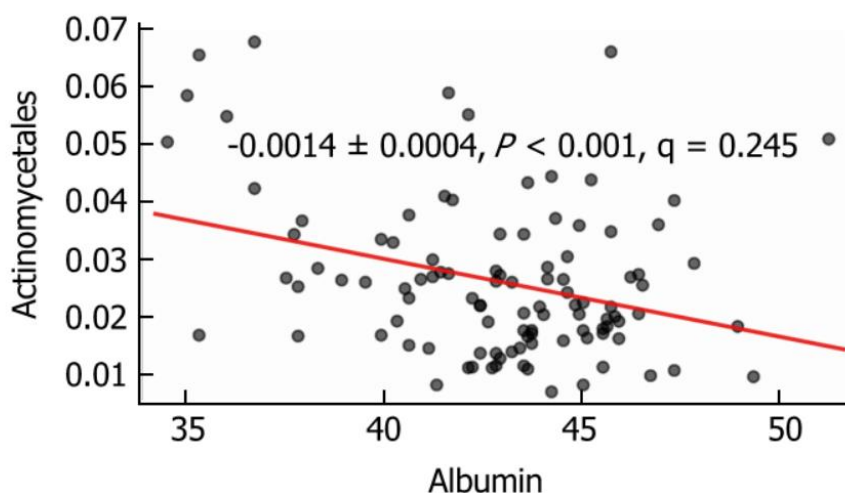
U retrospektivním souboru 102 pacientů po transplantaci jater pro PSC jsme hodnotili výskyt kolorektálních neoplázií před a po LTx a výskyt malignit žlučového stromu v jaterních explantátech. U 64/102 (62,8%) pacientů, kteří měli před LTx diagnostikovaný konkomitantní střevní zánět (PSC-IBD) byla v souladu s mezinárodními doporučeními¹⁷ prováděna koloskopie s etážovým odběrem náhodných (a cílených u suspektních lézí) slizničních biopsií v ročních intervalech. Vzhledem k nízkému počtu v jednotlivých skupinách nebyla v tomto souboru případů provedena následná statistická analýza, a data tak mají ryze popisný charakter.

Dále jsme zpětně zhodnotili záznamy pacientů, kteří mezi lety 2000 – 2013 podstoupili na IKEM resekci slinivky pro fokální pankreatickou masu. Indikací k chirurgickému výkonu bylo podezření na tumor založené na klinické manifestaci, laboratorních výsledcích a zobrazovacích metodách. Diagnóza AIP byla potvrzena z resekatů expertním patologem a byla založena na ICDC kritériích.¹⁸ Získaná kvantitativní a kvalitativní data byla statisticky vyhodnocena za použití softwaru JMP 10 pro konkrétní data relevantními testy (Mann-Whitney U-test, Fisher's exact test).

VÝSLEDKY

1. Střevní mikrobiota u PSC a IBD

Mikrobiální profil u PSC i UC byl charakterizován nízkou bakteriální diverzitou a významným posunem globální mikrobiální kompozice. *Rothia*, *Veillonella*, *Enterococcus* a 4 další bakteriální kmeny byly v markantním nadbytku u pacientů s PSC, a to bez ohledu na přidružený střevní zánět. U rodů *Rothia*, *Veillonella* a *Streptococcus* byla signifikantní asociace s PSC vysledována až na úroveň jednotlivých druhů: *Rothia mucilaginosa*, *Streptococcus infantus*, *S. alactolyticus*, *S. equi*, *Veillonella parvula* a *V. dispar*. Mikrobiom u PSC byl dále charakterizován nízkým zastoupením druhů *Adlercreutzia equolifaciens* a *Prevotella copri*. Nízký výskyt rodu *Phascolarctobacterium* byl spojen s přítomností střevního zánětu, a to bez ohledu na jeho fenotyp. Pro kompozici mikrobioty u UC byl typický významný pokles kmene *Roseburia* a druhů *Akkermansia muciniphila*, *Butyrivibrio pullicaecorum* a *Clostridium colinum*. Nízké hladiny sérového albuminu (u pacientů s jaterní dysfunkcí) byly spojeny se zvýšeným počtem mikrobů řádu Actinomycetales (Obr. 1).¹⁹



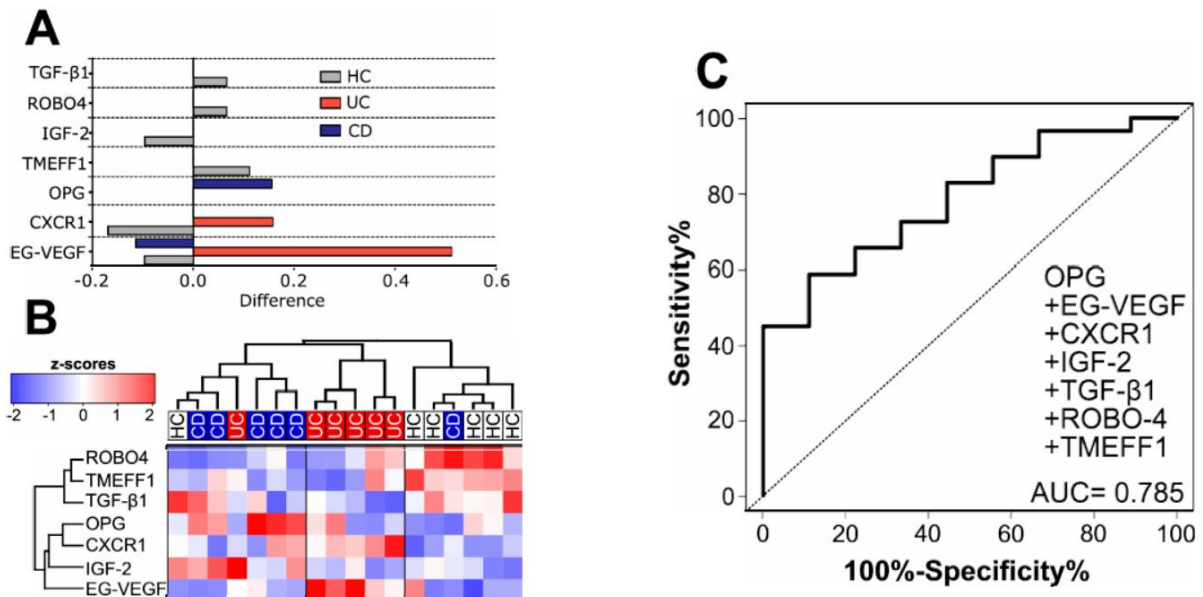
Obr. 1: Negativní korelace hladin sérového albuminu se zastoupením řádu Actinomycetales

2. Sérové biomarkery a porucha střevní bariéry u PSC a IBD

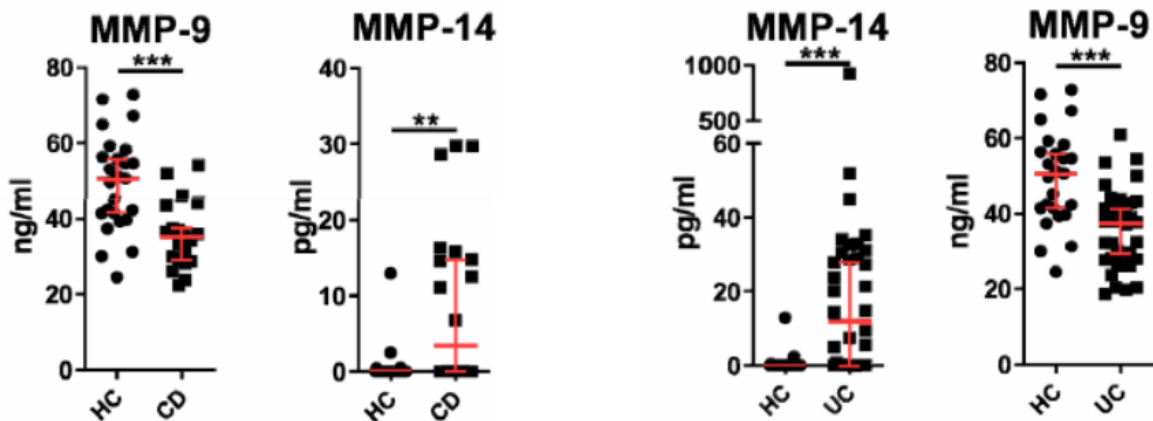
Analýza výstupních dat po stanovení sérových markerů širokospektrovou proteinovou arrayí identifikovala sedm kandidátních molekul velmi spolehlivě odlišující jak IBD od zdravých kontrol (AUC = 0,785), tak s různou intenzitou i jednotlivé fenotypy (CD a UC) mezi sebou (viz Obr. 2). Silnou diskriminaci jednotlivých fenotypů (CD versus UC versus PSC-IBD) vykazoval osteoprotegerin (OPG), který taktéž nejspolehlivěji odlišoval všechny pacienty s kolitidou od zdravých kontrol. Tomoregulin 1 (TMEFF1) a roundabout guidance receptor 4 (ROBO4) měly naproti tomu v diferenciaci zdravých a nemocných pouze zanedbatelnou sílu.

Prediktivní hodnotu stanovených markerů jsme následně ověřovali metodou ELISA, společně s doposud známými markery střevní bariérové funkce (např. zonulin, I-FABP, L-FABP, aj.) a zánětu (např. mannan-binding lectin (MBL), CD14, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), sérový amyloid, aj.). Několik z těchto markerů byly signifikantně zvýšené u PSC-IBD. Tkáňový inhibitor metaloproteináz TIMP-1 byl pak výrazně zvýšen u CD. V souladu s tímto výsledkem byly obecně proteiny metaloproteinázového systému (MMP-9, MMP-14 a TIMP-1) nejsilnějším diskriminantem mezi IBD a zdravými kontrolami (Obr. 3), obdobě jako LBP (AUC = 0,663). Žádný ze studovaných markerů spolehlivě nepredikoval

rozsah slizničních změn (lokalizovaný nálezn versus pankolitida) u IBD. Hladiny TGF- β 1 byly napříč všemi fenotypy markantně zvýšené ve fázi remise střevní choroby.



Obr. 2: Soubor 7 sérových proteinů spolehlivě odlišující zdravé kontroly od IBD



Obr. 3: Kvantifikace hladin MMP-9 a MMP-14 u IBD a zdravých kontrol; ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$

3. Specifika imunitní odpovědi u PSC a IBD

Pacienti s IBD vykazovali proti většině zkoumaných bakterií srovnatelnou protilátkovou odpověď jako zdravé kontroly. Výjimku zde představovali pacienti s CD, u kterých byla protilátková odpověď obecně snižena. Signifikantní rozdíl proti zdravým kontrolám byl u nich vyjádřen nápadným snížením v IgA-odpovědi proti kmenům *Faecalibacterium* a *Bacteroides*. Nedetekovatelnou odpověď proti kmenu *Faecalibacterium* jsme popsali u 40% pacientů s CD, 23% pacientů s UC, avšak u žádného pacienta s PSC-IBD.

Cirkulující $CD4^+CD154^+$ T-buňky reagovaly proti střevní mikrobiotě produkcí škály prozánětlivých cytokinů. Jejich reaktivita u UC a PSC-IBD se však blížila zdravým kontrolám. T-buňky získané od pacientů s CD však zvýšeně reagovaly proti antigenům kmenů *Roseburia*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium* a *Bacteroides*.

Na základě dostupných metadat jsme korelovali změny imunitní odpovědi ve vztahu k chronické farmakologické terapii. Léčba mesalazinem byla spojena se sníženou protilátkovou IgM-odpovědí, azathioprin snižoval produkci IFN- γ CD154⁺CD4⁺ T-buňkami po stimulaci kmenem *Roseburia* a probiotika obsahující *E. coli Nissle 1917* byla spojena se zvýšenou IgG-odpovědí proti kmeni *Bifidobacteria*. Nejvýznamější změny však vyvolávala léčba anti TNF- α preparáty, které zvyšovaly produkci IFN- γ CD154⁺CD4⁺ T-buňkami při stimulaci kmeny *Roseburia* a *Escherichia*. V případě stimulace kmenem *Escherichia* produkovaly CD154⁺CD4⁺ T-buňky při léčbě infliximabem, adalimumabem či golimumabem významně více cytokinu TNF- α .

4. Retrospektivní analýza souboru pacientů po transplantaci jater pro PSC

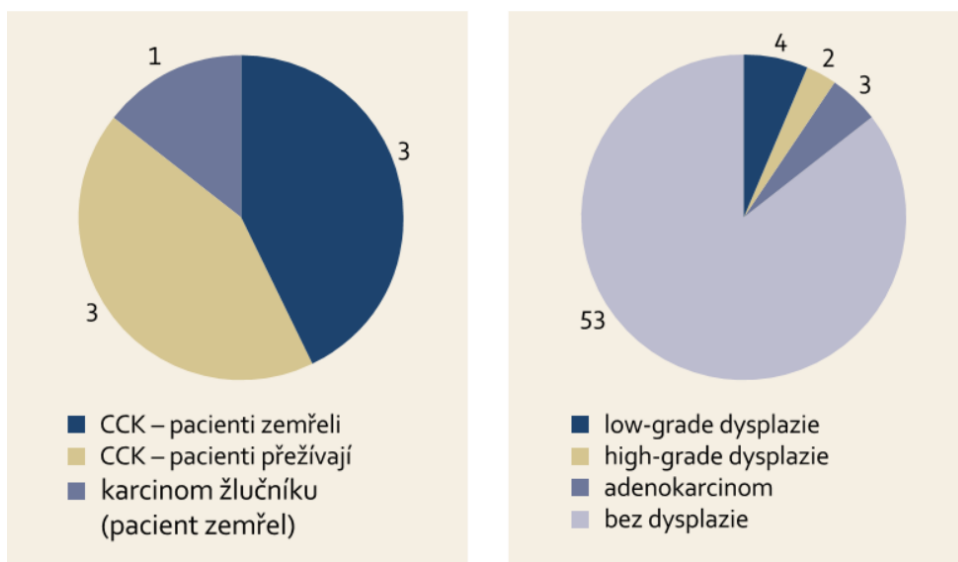
Ve finální kohortě bylo 31 mužů a 16 žen s mediánem věku 36 (15-68) v době LTx a mediánem sledování po LTx v délce 122 (60-249) měsíců. rPSC byla prokázána u 21/47 (44,7%) pacientů s mediánem 63 (12-180) měsíců po transplantaci a byla hlavní příčinou retransplantace. Přežívání pacientů a jaterních štěpů v 1, 5, 10 a 15 letech bylo 95%, 94,2%, 91,4% a 84,6%, resp. 91%, 87,6%, 79,5% a 72,8%. Vznik IBD *de novo* po LTx byl u 11/12 (91,7%) pacientů asociován se vznikem rPSC, a byl tak nejvýznamnějším rizikovým faktorem ($p \leq 0,05$, HR: 4,02, 95% CI: 1,58-10,98). Dalším dle multivariantní analýzy významným rizikovým faktorem pro rPSC byla pozitivní anamnéza akutní celulární rejekce v potransplantačním období – pozitivní korelace byla nalezena u 14/25 (56%) pacientů ($p \leq 0,05$; HR: 2,66, 95% CI: 1,03-7,86). Všech 5 pacientů s variantním syndromem PSC s autoimunitní hepatitidou vyvinulo za medián doby 72 (61-118) měsíců rPSC ($p \leq 0,05$). Mezi pacienty po LTx na různých imunosupresivních režimech (založených na takrolimu nebo cyklosporinu) nebyl významný rozdíl ve vztahu k rozvoji rPSC ($p = 0,32$).

5. HLA-typizace dárců a příjemců jaterních transplantátů u PSC

Přítomnost dárcovské alely HLA-DRB1*07 byla spojena s rozvojem rPSC v 10/15 (66,6%) případů ($p = 0,05$; OR: 4,25, 95%CI: 1,09-16,61). Žádný z 6 příjemců s alelou HLA-DRB1*04 nevyvinul v průběhu sledování rPSC ($p = 0,029$). Varianta HLA-DQB1*03 u příjemců měla taktéž prokazatelnou protektivní vazbu na rPSC ($p = 0,030$; OR: 0,1, 95%CI: 0,01-0,88). Výsledek byl potvrzen i v podskupině HLA-DQB1*07 – žádný z příjemců ($n = 7$) s touto alelou nevyvinul rPSC ($p = 0,031$). Obdobná tendence byla patrna též u HLA-DQB1*08, kde nedošlo k rozvoji rPSC u žádného pacienta ($n = 4$); soubor byl však příliš malý k dosažení statistické signifikance. Ostatní sledované varianty HLA-DR a -DQ nebyly s rPSC významně asociovány.

6. Riziko vzniku neoplázií u IBD a přidružených chorob

Nález zhoubného novotvaru biliárního původu v jaterním explantátu byl v našem souboru popsán u sedmi pacientů, v jednom případě se jednalo o karcinom žlučníku, u šesti pak o cholangiocelulární karcinom (u pěti mužů a jedné ženy). Tři z těchto pacientů přežívali 1–6,5 let po LTx bez známek recidivy, ostatní pacienti do 2 let od LTx v souvislosti s generalizací nádorového onemocnění zemřeli (*Obr. 4a*). U 3 pacientů došlo v potransplantačním období k rozvoji kolorektálního karcinomu, u 5 pacientů pak byl v slizničních odběrech byla detekována dysplazie (2 nízkého a 3 vysokého stupně) (*Obr. 4b*).



Obr. 4: Výskyt biliárních (a) a kolorektálních (b) neoplazií po LTx pro PSC

V rámci souboru pacientů (n = 295) byla provedena resekce slinivky břišní u 201 (68,1%) mužů a 94 (31,9%) žen. AIP byla na základě histologie resekátu diagnostikována u 15 pacientů (5,1%, 12 mužů a 3 ženy). 6/15 (40%) bylo hodnoceno jako AIP 1. typu a v 9/15 (60%) případů byla diagnóza uzavřena jako AIP 2. typu. U 6/15 pacientů s AIP (40%) byl zároveň nalezen karcinom pankreatu (PC); ve všech případech se jednalo o mužské pacienty. Rizikovými faktory synchronního výskytu AIP a PC byl v porovnání s pacienty s AIP bez záchytu PC vyšší věk (60,5 vs 49 let, $p = 0,045$), recentní záchyt diabetu (67% vs 11%, $p = 0,09$) a anamnéza významného váhového úbytku (15,5 kg vs 8,5 kg, $p = 0,03$). U žádného z uvedených pacientů nebyla AIP zachycena samotnou resekcí slinivky.

DISKUZE

Idiopatické střevní záněty představují skupinu chorob s celosvětově narůstající incidencí a z pohledu klinické gastroenterologie jde v dnešní době bezpochyby o jedno z nejzávažnějších témat. Střevní zánět asociovaný s primární sklerózující cholangitidou je pro svá klinická specifika v současné době vymezován jako samostatný fenotyp IBD, odlišný od lépe prozkoumaných onemocnění – Crohnovy choroby a ulcerózní kolitidy.¹⁴ Hlavním cílem této disertační práce proto bylo definovat jednotlivé fenotypy, zejména pak právě PSC-IBD, skrze klíčové body v patogenezi, kterými jsou dysbióza, porucha střevní bariéry a aberantní imunitní odpověď.²⁰

Na základě současných poznatků lze s jistotou konstatovat, že „zdravá“ střevní mikrobiota je významným atributem lidské fyziologie. Její alterace naopak byla během poslední dekády prokázána u celé řady chorob, a to nejen gastrointestinálních.²¹ V průběhu posledních desetiletí byla odbornou veřejností široce přijata klíčová role mikrobioty v patogenezi obvyklých fenotypů IBD, tedy CD a UC. S rozvojem sekvenčních technik nové generace (NGS) identifikovaly četné studie specifické změny jak v bakteriální diverzitě, tak i v relativním zastoupení jednotlivých taxonů ve stolici či kolonických slizničních biopsiích u pacientů s CD a UC v porovnání se zdravou populací.²²⁻²⁴ V rámci této práce se podařilo prokázat, že kompozice střevní mikrobioty u PSC a PSC-IBD vykazuje specifickou signaturu, odlišnou od zdravých kontrol a UC. Navzdory použití vlastního originálního metodického protokolu se výsledné závěry studie z větší části překrývaly se závěry ostatních studií na dané téma, přestože vznikly v geograficky odlišných podmínkách. To lze interpretovat tak, že odlišné spouštějící faktory prostředí mohou vést k podobným změnám v mikrobiotě, které jsou s chorobou úzce asociovány. Jedním z klíčových inovativních nálezů v kohortě pacientů z ČR byla těsná asociace vysoké četnosti bakteriálního rodu *Rothia* u PSC, a to bez ohledu na přítomnost konkomitantního střevního zánětu. Relevance závěrů dané studie vychází z obecně akceptovaného modelu patogeneze PSC, který je založen na aberantní bakteriální translokaci skrze zánětlivou střevní stěnu. V důsledku bariérové poruchy dochází dle této představy k portální bakteriémií a k úniku široké škály toxických substancí. Buněčné stěny mikrobů pak interagují s toll-like receptory (TLR) i jinými receptory, které rozpoznávají molekulární vzory (PRRs – pattern recognition receptors), jaterních makrofágů či dokonce biliárního epitelu.²⁵ Může tak vznikat zánět žlučovodů s jejich následnou destrukcí a tvorbou striktur. Přestože jsou bakterie dominantní složkou střevní mikrobioty, je pravděpodobné, že mohou významným způsobem vzájemně interagovat i s ostatními minoritními komponentami jako jsou houby nebo viry.²⁶⁻²⁹ Povědomí o těchto složkách mikrobioty v kontextu IBD a je relativně malé a na podkladě výsledků této práce se jím proto, zejména pak s důrazem na PSC-IBD, intenzivně zabýváme v navazujících, právě probíhajících studiích.

Zásadním cílem výzkumu v oblasti IBD je identifikace snadno stanovitelných biomarkerů odlišujících navzájem jednotlivé fenotypy a predikující průběh choroby včetně míry terapeutické odpovědi. V rámci této práce se nám podařilo odhalit několik sérových markerů (včetně markerů poruchy střevní bariéry), které nejen odlišují IBD od zdravých kontrol a/nebo tři zkoumané subtypy IBD (CD, UC, PSC-IBD) navzájem, ale také mnohdy odrážejí aktivitu zánětu či druh podávané farmakologické léčby. Jedním z takových zajímavých nálezů byla zřetelná diskrepance sérových hladin EG-VEGF (Prokineticin 1) mezi dvěma hlavními fenotypy IBD – UC a CD. Monocyty stimulované Prokineticinem 1 vykazují při odpovědi proti endotoxinu zvýšenou produkci IL-12 a TNF- α a naopak sníženou produkci IL-10.³⁰ Nález tedy může reflektovat rozdílné mechanismy angiogeneze a regulace zánětlivé odpovědi mezi UC a CD.

Osteoprotegerin (OPG) je solubilní glykoprotein, jehož zvýšené sérové koncentrace byly v minulosti prokázány u celé řady zánětlivých chorob.³¹ Hladiny OPG v naší studii nejen

citlivě odrážely použití anti-TNF léčby, ale především, společně s několika dalšími sérovými markery, navzájem významně odlišovaly jednotlivé fenotypy IBD, a to jak CD od UC, tak i UC od PSC-IBD.

Konstantní remodelace a reparace střevní mezibuněčné hmoty a pojivové tkáně jsou řízeny sekrecí matrixových metaloproteináz (MMPs) a jejich inhibitorů (TIMPs). Dysbalance mezi MMPs a TIMPs může vést ke vzniku pro IBD typických patomorfologických defektů, jako jsou vředové nebo fibrotické změny.³² V našem studijním souboru jsme u pacientů s IBD (v porovnání se zdravými kontrolami) detekovali snížené hladiny MMP-9 a naopak zvýšené koncentrace MMP-14. Pacienti s PSC-IBD pak vykazovali zvýšené hladiny TIMP-1. Tyto nálezy naznačují významnou roli matrixových metaloproteináz v patogenezi IBD.

Růstový faktor TGF- β sehrává díky své imunoregulační schopnosti a podpoře bariérové funkce důležitou úlohu v homeostáze střevní sliznice.³³ Vysoké hladiny TGF- β 1 byly v naší studii nejsilnějším faktorem spojeným s remisí IBD napříč fenotypy. Právě vysoké hodnoty TGF- β 1 mohou tedy odrážet úspěšnou protizánětlivou odpověď organismu u pacientů s IBD, a stanovení daného cytokinu tak může sehrát roli v predikci relapsu choroby či při zhodnocení efektu podávané terapie.

Porucha střevní bariéry a následná expozice bakteriálních antigenů imunitním buňkám jsou klíčové body v patogenezi IBD.⁴ Protilátky proti specifickým mikrobům se zde proto nabízejí jako případné vhodné biomarkery. V rámci této práce jsme proto zkoumali posuny v protilátkové odpovědi proti v české populaci prevalentním střevním bakteriím (identifikovaným v rámci vlastního výzkumu dříve – viz výše) u pacientů s IBD. Naše data mimo jiné naznačují, že u pacientů s IBD dochází k poklesu protilátkové odpovědi proti bakterii *Faecalibacterium prausnitzii*, která je za fyziologických podmínek vysoce prevalentní a je jí přisuzována komplexní probiotická aktivita.³⁴ Protilátková i buněčná imunitní odpověď proti střevní mikrobiotě jsou dle analýzy našeho souboru pacientů v některých aspektech modifikovány chronickou medikamentózní terapií.

Rekurentní forma PSC má pravděpodobně obdobné patogenetické rysy jako primární choroba a představuje obvyklou příčinu selhání jaterního štěpu u pacientů transplantovaných pro PSC.^{35,36} V porovnání s ostatními publikovanými studiemi na dané téma jsme v této práci popsali zatím nejvyšší frekvenci rPSC (44,7 %), a to na souboru pacientů s doposud nejdelším intervalem sledování po LTx (medián 122 měsíců). V návaznosti na předešlé práce jsme potvrdili úzký vztah rPSC a PSC-IBD a identifikovali vysoce rizikovou skupinu pacientů s rozvojem střevního zánětu *de novo* po transplantaci.³⁵ Několik předešlých studií prokázalo významnou asociaci některých variant v HLA systému jak s PSC³⁷, tak s IBD³⁸. U PSC je například známá protektivní úloha alely DRB1*04.³⁷ Závěry této práce mimo jiné potvrzují protektivní úlohu dané alely i u rPSC, což opět svědčí pro shodná patogenetická východiska u primární a rekurentní formy tohoto onemocnění. Uvedené výsledky tedy ukazují na podstatnou úlohu genetické predispozice u této komplexní choroby postihující střeva a játra.

Vysoký výskyt kolorektálních neoplázií v našem souboru pacientů je v souladu s mezinárodními doporučeními silným argumentem pro provádění dispenzárních koloskopí u pacientů s PSC-IBD každé 1–2 roky.¹⁶ Nepříznivé přežívání našich transplantovaných pacientů s incidentálním nálezem cholangiocelulárního karcinomu v jaterním explantátu podporuje nutnost screeningu biliárních malignit (včetně karcinomu žlučníku) u pacientů s PSC³⁹ a výhledově i pečlivé selekce kandidátů LTx pro tuto diagnózu (v době sepsání této práce zatím v ČR není součástí klinické praxe).⁴⁰

Autoimunitní pankreatitida je chorobou významně asociovanou s IBD. Dle dosavadních literárních pramenů není dostatečná evidence o zvýšeném riziku karcinomu pankreatu u AIP.⁴¹ V rámci našeho projektu se podařilo prokázat statisticky významný souběžný výskyt AIP a karcinomu slinivky u pacientů resekovaných pro fokální pankreatickou masu, což podporuje nutnost větší ostražitosti u pacientů s AIP.

ZÁVĚRY A SHRNU TÍ

Idiopatické střevní záněty tvoří heterogenní skupinu chorob, patogenetický základ je však pravděpodobně u všech známých fenotypů obdobný. Jeho hlavními pilíři jsou dle dosavadních znalostí především genetická predispozice, střevní mikrobiota, porucha střevní bariéry a patologická imunitní odpověď. Žádný z uvedených faktorů nezpůsobuje onemocnění sám o sobě, každý je však prokazatelně společnou součástí určité „mozaiky“, skrývající se za patogenezi těchto stále více rozšířených chorob. Dle tohoto komplexního principu se bude v blízké budoucnosti bezpochyby ubírat i vývoj nových prostředků farmakologické léčby.

V souladu se stanovenými cíli práce se nám v jednotlivých studiích podařilo rozšířit poznatky ve zmíněných klíčových aspektech patogeneze, s mimořádným důrazem na vztah k primární sklerózující cholangitidě, a dále pak k transplantaci jater a riziku vzniku neoplazií. Závěry této práce v budoucnu napomohou přesnějšímu rozklíčování etiopatogenetických souvislostí, stanovení relevantních biomarkerů pro klinickou praxi a identifikaci rizikových skupin pacientů.

LITERÁRNÍ REFERENCE

1. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2014;20(1):91-99.
2. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(4):205-217.
3. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet.* 2018;390(10114):2769-2778.
4. de Souza HS, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;13(1):13-27.
5. de Souza HSP, Fiocchi C, Iliopoulos D. The IBD interactome: an integrated view of aetiology, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(12):739-749.
6. Halling ML, Kjeldsen J, Knudsen T, Nielsen J, Hansen LK. Patients with inflammatory bowel disease have increased risk of autoimmune and inflammatory diseases. *World J Gastroenterol.* 2017;23(33):6137-6146.
7. Notohara K, Burgart LJ, Yadav D, Chari S, Smyrk TC. Idiopathic chronic pancreatitis with periductal lymphoplasmacytic infiltration: clinicopathologic features of 35 cases. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(8):1119-1127.
8. Karlsen TH, Folseraas T, Thorburn D, Vesterhus M. Primary sclerosing cholangitis - a comprehensive review. *J Hepatol.* 2017;67(6):1298-1323.
9. Dyson JK, Beuers U, Jones DEJ, Lohse AW, Hudson M. Primary sclerosing cholangitis. *Lancet.* 2018;391(10139):2547-2559.
10. Bajer L, Slavcev A, Macinga P, et al. Risk of recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation is associated with de novo inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2018;24(43):4939-4949.
11. Fung BM, Lindor KD, Tabibian JH. Cancer risk in primary sclerosing cholangitis: Epidemiology, prevention, and surveillance strategies. *World J Gastroenterol.* 2019;25(6):659-671.
12. Hildebrand T, Pannicke N, Dechene A, et al. Biliary strictures and recurrence after liver transplantation for primary sclerosing cholangitis: A retrospective multicenter analysis. *Liver Transpl.* 2016;22(1):42-52.
13. Lindstrom L, Jorgensen KK, Boberg KM, et al. Risk factors and prognosis for recurrent primary sclerosing cholangitis after liver transplantation: a Nordic Multicentre Study. *Scand J Gastroenterol.* 2018:1-8.
14. Loftus EV, Jr., Harewood GC, Loftus CG, et al. PSC-IBD: a unique form of inflammatory bowel disease associated with primary sclerosing cholangitis. *Gut.* 2005;54(1):91-96.
15. de Vries AB, Janse M, Blokzijl H, Weersma RK. Distinctive inflammatory bowel disease phenotype in primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol.* 2015;21(6):1956-1971.
16. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J Crohns Colitis.* 2017;11(6):649-670.
17. Van Assche G, Dignass A, Bokemeyer B, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 3: special situations. *J Crohns Colitis.* 2013;7(1):1-33.

18. Shimosegawa T, Chari ST, Frulloni L, et al. International consensus diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: guidelines of the International Association of Pancreatology. *Pancreas*. 2011;40(3):352-358.
19. Bajer L, Kverka M, Kostovcik M, et al. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2017;23(25):4548-4558.
20. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134(2):577-594.
21. Hogenova HT, Zakostelska ZJ, Petanova J, Kverka M. Microbiota, immunity and immunologically-mediated diseases. *Vnitr Lek*. 2019;65(2):98-107.
22. Packey CD, Sartor RB. Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *J Intern Med*. 2008;263(6):597-606.
23. Hold GL, Smith M, Grange C, Watt ER, El-Omar EM, Mukhopadhyia I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World J Gastroenterol*. 2014;20(5):1192-1210.
24. Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Kozakova H, 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. *Cell Mol Immunol*. 2011;8(2):110-120.
25. Harada K, Ohira S, Isse K, et al. Lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through toll-like receptors and related molecules in cultured biliary epithelial cells. *Lab Invest*. 2003;83(11):1657-1667.
26. Mavromanolakis E, Maraki S, Cranidis A, Tselentis Y, Kontoyiannis DP, Samonis G. The impact of norfloxacin, ciprofloxacin and ofloxacin on human gut colonization by *Candida albicans*. *Scand J Infect Dis*. 2001;33(6):477-478.
27. Jawhara S, Thuru X, Standaert-Vitse A, et al. Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *J Infect Dis*. 2008;197(7):972-980.
28. McIlroy J, Ianiro G, Mukhopadhyia I, Hansen R, Hold GL. Review article: the gut microbiome in inflammatory bowel disease-avenues for microbial management. *Aliment Pharmacol Ther*. 2018;47(1):26-42.
29. Sokol H, Leducq V, Aschard H, et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*. 2017;66(6):1039-1048.
30. Wu L, Ruffing N, Shi X, et al. Discrete steps in binding and signaling of interleukin-8 with its receptor. *J Biol Chem*. 1996;271(49):31202-31209.
31. Augoulea A, Vrachnis N, Lambrinoudaki I, et al. Osteoprotegerin as a marker of atherosclerosis in diabetic patients. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:182060.
32. Kapsoritakis AN, Kapsoritaki AI, Davidi IP, et al. Imbalance of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) - 1 and - 4 serum levels, in patients with inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol*. 2008;8:55.
33. Planchon SM, Martins CA, Guerrant RL, Roche JK. Regulation of intestinal epithelial barrier function by TGF-beta 1. Evidence for its role in abrogating the effect of a T cell cytokine. *J Immunol*. 1994;153(12):5730-5739.
34. Miquel S, Martin R, Rossi O, et al. Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(3):255-261.
35. Fosby B, Karlsen TH, Melum E. Recurrence and rejection in liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol*. 2012;18(1):1-15.

36. Rowe IA, Webb K, Gunson BK, Mehta N, Haque S, Neuberger J. The impact of disease recurrence on graft survival following liver transplantation: a single centre experience. *Transpl Int*. 2008;21(5):459-465.
37. Donaldson PT, Norris S. Evaluation of the role of MHC class II alleles, haplotypes and selected amino acid sequences in primary sclerosing cholangitis. *Autoimmunity*. 2002;35(8):555-564.
38. Ahmad T, Marshall SE, Jewell D. Genetics of inflammatory bowel disease: the role of the HLA complex. *World J Gastroenterol*. 2006;12(23):3628-3635.
39. European Association for the Study of the L. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol*. 2009;51(2):237-267.
40. Goldaracena N, Gorgen A, Sapisochin G. Current status of liver transplantation for cholangiocarcinoma. *Liver Transpl*. 2018;24(2):294-303.
41. Majumder S, Takahashi N, Chari ST. Autoimmune Pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2017;62(7):1762-1769.

SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace:

A. Publikace s impakt faktorem

Coufal S, Galanova N, Bajer L, et al. Inflammatory Bowel Disease Types Differ in Markers of Inflammation, Gut Barrier and in Specific Anti-Bacterial Response. *Cells*. 2019 Jul; 8(7): 719. **IF 5.7**

Bajer L, Slavcev A, Macinga P, et al. Risk of recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation is associated with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2018;24(43): 4939-4949. **IF 3.4**

Bajer L, Kverka M, Kostovcik M, Macinga P, et al. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2017;23(25): 4548-4558. **IF 3.4**

Macinga P, Pulkertova A, Bajer L, et al. Simultaneous occurrence of autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer in patients resected for focal pancreatic mass. *World J Gastroenterol*. 2017;23(12):2185-2193. **IF 3.4**

B. Publikace bez impakt faktoru

Bajer L, Wohl P, Drastich P. PSC-IBD: specifický fenotyp idiopatického střevního zánětu asociovaný s primární sklerózující cholangitidou. *Vnitř Lék*. 2018; 64(6): 659–664

Drastich P, Bajer L, Kverka M. Možnosti terapeutické manipulace se střevní mikrobiotou. *Vnitř Lék*. 2018; 64(6): 665–671

Špičák J, Bajer L. Kolorektální karcinom u idiopatických střevních zánětů. *Postgrad. med*. 2015; 17(2): 137-145

Bajer L, Kamenář D, Sticová E, et al. Idiopatický střevní zánět u pacientů s primární sklerozující cholangitidou – samostatný fenotyp IBD. *Gastroent Hepatol*. 2014; 68(1):24-35

Drastich P, Bajer L, Wohl P, et al. Transplantace jater pro primární sklerozující cholangitidu. *Gastroent Hepatol*. 2013; 67(5):413-420

Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertace:

A. Publikace s impakt faktorem

-

B. Publikace bez impakt faktoru

Březina J, Bajer L, Špičák J, et al. Fekální mikrobiální transplantace u idiopatických střevních zánětů. *Gastroent Hepatol* 2016; 70(1):51-56