

## Oponentský posudek na dizertační práci

Název: Gut barrier in the pathogenesis and diagnostics of necrotizing enterocolitis and inflammatory bowel disease

Autor: Mgr. Štěpán Coufal

Práce se zabývá hledáním vhodných biomarkerů k posouzení zánětlivé odpovědi ve střevě u nekrotizující enterokolitidy a nespecifických střevních zánětu. Jedná se o aktuální téma, cíle jsou v tomto smyslu jasně definovány, po stránce formální je dizertační práce napsána přehledně a čtivě solidní angličtinou, bez překlepů.

V úvodu jsou podány základní informace o funkcích střevní bariéry. Vymezeny jsou nejčastější bakterie kolonizující střevo za fyziologických podmínek, proteiny obsažené v hlenu na povrchu střevní sliznice i jednotlivé typy epiteliálních buněk zajišťujících adhezivními interakcemi integritu epitelu. Podrobněji jsou popsány mechanismy imunologické střevní bariéry od aferentní fáze vychytávání antigenu M buňkami až po vznik efektorových lymfocytů v sekundární lymfatické tkáni a jejich migraci zpět do lamina propria. Vymezeny jsou pak jednotlivé buňky přirozené imunity-makrofágy, mastocyty a bazofily, eozinofily, neutrofilny, přirozené lymfoidní buňky, NK, NKT buňky a epiteliální buňky, zejména pak Panethovy buňky produkující řadu látek s antimikrobiální aktivitou. V části věnované adaptivní imunitě jsou popsány intraepiteliální lymfocyty, subpopulace efektorových Th lymfocytů, T regulační buňky i mechanismus tvorby sekrečního IgA.

Další kapitoly jsou věnovány patofyziologii zánětlivých onemocnění postihujících střevní sliznici. Nejdříve jsou podány informace o nekrotizující enterokolitidě (NEC), závažném onemocnění s vysokou mortalitou, které postihuje zejména předčasně narozené novorozence a je provázené edémem sliznice se infiltrací leukocyty a koagulační nekrózou vedoucí v těžkých případech až k perforaci střeva. V patogenezi onemocnění se nejspíše uplatní jak dysbalance střevního mikrobiomu, tak i zvýšená permeabilita nezralé střevní sliznice vedoucí k zánětu a nadprodukcii prozánětlivých cytokinů. Diagnostika NEC je založena na kombinaci klinických symptomů s průkazem

pneumatózy střešní stěny a přítomnosti plynu v portálním žilním řečišti pomocí zobrazovacích metod. Laboratorní výsledky mohou ukazovat leukopenii, trombocytopenii nebo elevaci CRP, ale pro časnou diagnostiku onemocnění nejsou dostačující. V případě nespecifických střevních zánětů (IBD) představovaných Crohnovou nemocí (CD) a ulcerózní kolitidou (UC) se předpokládá kombinace genetických faktorů, dokumentovaných řadou celogenomových studií, s vlivem prostředí. Nejčastěji je uváděn vliv kouření, léků, stresu nebo dietních návyků vedoucích k mikrobiální dysbióze, která byla prokázána v případě CD i UC. Zvýšení permeability střešní stěny pak vede spolu s poruchami v signalizaci rozpoznávacích molekul k zánětlivé reakci, která je v případě CD spíše Th1 typu a UC Th2 typu. Th17 profil se může uplatnit u obou typů IBD. Diagnostika IBD je založena na endoskopických metodách, citlivé neinvazivní biomarkery NEC a IBD se stále hledají. Mezi nadějně patří stanovení kaspázou štěpené formy cytokeratinu-18 (ccCK18), proteinů vázících mastné kyseliny (FABP), Trefoil faktoru 3 (TFF-3) nebo sérového amyloidu A (SAA), které mají všechny i vlastnost průchodu do moči což umožňuje eliminovat opakované odběry krve.

Prvním cílem studie bylo posoudit význam stanovení ccCK18 a intestinálního FABP (I-FABP) v diagnostice NEC a jejího odlišení od sepse. V případě CK18 nebyly i při trendu ke zvýšeným hodnotám při NEC zjištěny signifikantní rozdíly v sérových hladinách mezi testovanými skupinami. Oproti tomu intestinální FABP byl v séru pacientů s pozdějším rozvojem NEC zvýšen oproti septickým pacientům, nikoliv však oproti kontrolní skupině. V tomto směru se ukázalo přínosnější stanovení I-FABP v moči, kde se skupina pacientů s NEC výrazně odlišovala jak od septických pacientů, tak i od kontrolní skupiny, navíc vysoké hodnoty I-FABP korelovaly i s tíží onemocnění. V návazné publikaci byl sledován panel několika biomarkerů v moči (I-FABP, L-FABP, TFF-3, SSA) pro případné využití v časně diagnostice a predikci průběhu NEC. Všechny parametry byly v moči pacientů s NEC zvýšeny oproti kontrolní skupině již po 6 hodinách od podezření na tuto diagnózu, oba FABP navíc umožnily i odlišení od pacientů se sepsí. Pacienti s nejtěžší formou NEC měli zvýšené močové hladiny SAA a TFF-3 oproti jedincům s lehčím průběhem. Výsledky dále ukázaly, že kombinace několika markerů může přispět i k predikci délky hospitalizace.

Třetím cílem bylo otestovat I-FABP u novorozenců s gastroschízou (GS), vrozenou vadou spojenou s defektem stěny břišní, ze které mohou vyhřezávat střeva a další orgány.

Výsledky ukázaly zvýšené hladiny močového I-FABP u pacientů s gastroschízou oproti kontrolní skupině, zejména u těžkých forem s nutností operačního řešení ileózní komplikace. Rychlý pokles močového I-FABP po operaci může predikovat také rychlejší uzdravení. Posledním cílem bylo pokusit se najít specifický biomarker pro různé formy nespecifických střevních zánětů (IBD) a přispět k pochopení patogeneze těchto chorob. Výsledky ukázaly, že pokles MMP-9 se vzestupem MMP-14 nejlépe odlišují pacienty s IBD od zdravých osob. Pomocí proteinové arraye s 507 sérovými proteiny bylo zjištěno, že vysoké hodnoty EG-VEGF a CXCR1 mají asociaci s UC a nízké hodnoty EG-VEGF a vysoké u osteoprotegerinu jsou charakteristické pro CD. Pro UC byl charakteristický pokles osteoprotegerinu, přičemž kombinace tohoto parametru s dalšími znaky může napomoci odlišení UC od CD. Nízká hladina TGFbeta u IBD svědčí pro relaps onemocnění a spolu s TFF-3, MMP-9 a LBP spolehlivě odliší tyto pacienty od těch v remisi. Protilátková odpověď proti komenzálním bakteriím u pacientů s IBD se zásadně nelišila od zdravých osob s výjimkou poklesu IgA protilátek proti *Faecalibacterium* a *Bacteroides* u pacientů s CD. Na druhé straně bylo zjištěno, že proti těmto bakteriím mají pacienti s CD zvýšenou buněčnou odpověď.

V diskusi jsou adekvátně dávány výsledky do souvislosti s již publikovanými daty, závěry jsou formulovány jednoznačně a přiléhavě.

Ke kvalitní práci nemám závažné připomínky, jen v literárním úvodu mohlo být alespoň trochu prostoru věnováno stanovení kalprotektinu ve stolici, který patří mezi osvědčené a hojně užívané laboratorní parametry při hodnocení aktivity IBD.

Dovoluji si několik dotazů:

1. V práci (str.26) je uvedeno, že u novorozenců narozených v termínu se nekrotizující entrokolitida vyskytuje sice méně často, ale k jejímu rozvoji dochází časněji. Existuje pro tento fenomen nějaké vysvětlení?
2. Zatímco v případě IBD se předpokládá genetická predispozice, v práci není zmíněna žádná publikace, která by se tímto na úrovni SNPs nebo GWAS zabývala u NE. Existují nějaké studie?

3. Patogenetické mechanizmy IBD jsou studovány na experimentálních modelech. Existuje také experimentální model nekrotizující enterokolitidy?
4. Do jaké míry jsou CK18 a jeho kaspázou štěpená forma specifické pro střevní epitel. Nemůže dojít k elevaci jejich sérových či močových hodnot také při zánětech postihujících plicní epitel, např. při ARDS? Proč jsou v případě CK18 v článku ukázány pouze sérové hodnoty, když u I-FABP bylo hodnoceno sérum i moč a právě výsledky z moči se ukázaly být vhodnější pro diferenciální diagnostiku.
5. Čím si vysvětlujete skutečnost, že právě pacienti s Crohnovou chorobou mají sníženou IgA odpověď proti dvěma komensálním bakteriím než ostatní jedinci a zároveň mají proti těm samým mikroorganismům zvýšenou buněčnou odpověď.
6. Jak je regulována tvorba I-FABP? Mohou být hladiny ovlivněny stravou?

**Závěr:** Z výše uvedeného posudku vyplývá, že předložená dizertační práce je kvalitní po obsahové i formální stránce, splnila stanovené cíle a přinesla nové poznatky. Autor osvědčil kvalitní znalosti v oboru, je schopen samostatně vědecky pracovat a ovládá metody k úspěšnému pokračování ve své vědecké činnosti. Dizertační práce splňuje požadavky stanovené dle § 47 zákona o vysokých školách č. 111/1998 Sb., a proto **doporučuji by byl Mgr. Štěpánovi Coufalovi udělen titul Ph.D.**

V Praze 5.8.2020

Prof. MUDr. Ilja Stříž, CSc.

přednosta Pracoviště laboratorních metod

Institut Klinické a Experimentální Medicíny

Vídeňská 1958/9, 140 21 Praha 4