

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program: Experimentální chirurgie



**MUDr. Ondřej Fabián**

Histopatologické prediktory závažnosti klinického průběhu a rozvoje chirurgických komplikací u dětí se zánětlivými střevními onemocněními.

Histopathological predictors of clinical course severity and development of surgical complications in children with inflammatory bowel diseases.

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Josef Zámečník, Ph.D.

Konzultant: doc. MUDr. Jiří Bronský, Ph.D.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 1. 12. 2020

MUDr. Ondřej Fabián

Podpis

**Identifikační záznam**

FABIÁN, Ondřej. *Histopatologické prediktory závažnosti klinického průběhu a rozvoje chirurgických komplikací u dětí se zánětlivými střevními onemocněními. [Histopathological predictors of clinical course severity and development of surgical complications in children with inflammatory bowel diseases]*. Praha, 2020. 69 s., 5 příl. Disertační práce (Ph.D.).

Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK.  
Školitel Zámečník, Josef.

**Klíčová slova**

zánětlivá střevní onemocnění; Crohnova choroba; ulcerózní kolitida; histopatologie;  
prediktor; imunohistochemie; děti

**Keywords**

inflammatory bowel diseases; Crohn's disease; ulcerative colitis; histopathology; predictor;  
immunohistochemistry; children

## **Poděkování**

Tímto bych rád poděkoval především svému školiteli prof. MUDr. Josefovi Zámečnickovi, Ph.D. z Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol a školiteli-konzultantovi doc. MUDr. Jiřímu Bronskému, Ph.D. z Pediatrické kliniky 2. LF UK a FN Motol za odborné vedení a cenné rady v průběhu celého postgraduálního studia i při zpracování této dizertační práce. Dále děkuji doc. MUDr. Ondřeji Hradskému, Ph.D. z Pediatrické kliniky 2. LF UK a FN Motol za neméně cenné odborné rady a aktivní pomoc v průběhu studií a poděkování patří i jeho spolupracovnicím, jmenovitě MUDr. Tereze Lerchové (dříve Drškové), MUDr. Kristýně Pospíšilové (dříve Potužníkové) a MUDr. Kristýně Zárubové, za spolupráci na klinicko-patologických studiích. V neposlední řadě děkuji laborantovi Filipovi Mikušovi z Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN v Motole za mikroskopické zpracování bioptického materiálu a provádění imunohistochemických vyšetření.

## OBSAH

<b>1. Přehled problematiky.....</b>	<b>9</b>
1.1 Úvod a epidemiologie zánětlivých střevních onemocnění .....	9
1.2 Etiopatogeneze IBD.....	9
1.3 Klinické příznaky IBD.....	11
1.4 Fenotypická klasifikace IBD .....	11
1.5 Diagnostika a morfologie IBD.....	13
1.5.1 Endoskopický nález .....	14
1.5.2 Histopatologický obraz .....	17
1.5.3 Morfologie dětských IBD .....	21
1.6 Monitoring léčených pacientů a skórovací systémy aktivity onemocnění .....	22
1.7 Hodnocení endoskopické rekurence u pacientů po ileocékální resekci.....	28
<b>2. Otázky a cíle práce .....</b>	<b>30</b>
2.1 Prediktivní hodnota histopatologického skórovacího systému u dětí s komplikovaným průběhem Crohnovy choroby.....	30
2.2 Prediktivní hodnota imunohistochemického průkazu tkáňového kalprotektinu u dětí s komplikovaným průběhem ulcerózní kolitidy .....	30
2.3 Tkáňový kalprotektin jako prediktor rekurence Crohnovy choroby u dětí po ileocékální resekci.....	31
2.4 Diagnostický přínos imunohistochemické detekce CD30+ lymfocytů ve střevní sliznici u dětí se zánětlivými střevními onemocněními.....	32
<b>3. Soubory pacientů, použité vyšetřovací metody a statistická analýza.....</b>	<b>33</b>
3.1 Soubory pacientů .....	33
3.2 Zpracování bioptického materiálu .....	33
3.3 Imunohistochemické vyšetření .....	34
3.4 Endoskopické vyšetření .....	34
3.5 Chirurgická technika ileocékální resekce .....	35
3.6 Statistická analýza .....	35
<b>4. Výsledky jednotlivých studií a diskuze .....</b>	<b>37</b>
4.1 Prediktivní hodnota histopatologického skórovacího systému u dětí	

s komplikovaným průběhem Crohnovy choroby .....	37
4.1.1 Diskuze .....	39
4.2 Prediktivní hodnota imunohistochemického průkazu tkáňového kalprotektinu u dětí s komplikovaným průběhem ulcerózní kolitidy .....	40
4.2.1 Diskuze .....	43
4.3 Tkáňový kalprotektin jako prediktor rekurence Crohnovy choroby u dětí po ileocékální resekci .....	44
4.3.1 Diskuze .....	46
4.4 Diagnostický přínos imunohistochemické detekce CD30+ lymfocytů ve střevní sliznici u dětí se zánětlivými střevními onemocněními.....	47
4.4.1 Diskuze .....	51
<b>5. Závěry .....</b>	<b>52</b>
5.1 Prediktivní hodnota histopatologického skórovacího systému u dětí s komplikovaným průběhem Crohnovy choroby .....	52
5.2 Prediktivní hodnota imunohistochemického průkazu tkáňového kalprotektinu u dětí s komplikovaným průběhem ulcerózní kolitidy .....	52
5.3 Tkáňový kalprotektin jako prediktor rekurence Crohnovy choroby u dětí po ileocékální resekci .....	52
5.4 Diagnostický přínos imunohistochemické detekce CD30+ lymfocytů ve střevní sliznici u dětí s IBD .....	53
<b>6. Souhrn .....</b>	<b>54</b>
<b>7. Abstract.....</b>	<b>56</b>
<b>8. Seznam použité literatury.....</b>	<b>58</b>
<b>9. Seznam publikací autora .....</b>	<b>65</b>
10.1 Publikace se vztahem k tématu dizertační práce v časopisech s IF .....	65
10.2 Publikace se vztahem k tématu dizertační práce v časopisech bez IF .....	65
10.3 Publikace bez vztahu k tématu dizertační práce v časopisech s IF.....	65
10.4 Publikace bez vztahu k tématu dizertační práce v časopisech bez IF.....	66

<b>10. Přílohy .....</b>	<b>69</b>
--------------------------	-----------

## SEZNAM ZKRATEK

5ASA = 5-aminosalicylová kyselina

ASC = akutní závažná kolitida

ASCA = protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae*

CD = Crohnova choroba

CDEIS = Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity

CS = systémová kortikoterapie

ER = endoskopická remise

ESPGHAN = European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition

FCPT = fekální kalprotektin

GHAS = Global Histologic Activity Score

GIT = gastrointestinální trakt

HPF = zorné pole s velkým zvětšením

HR = histologická remise

IBD = zánětlivá střevní onemocnění

IBDU = nespecifikovaná IBD

IC = ileocékální

IL = interleukin

pANCA = perinukleární protilátky proti cytoplazmě neutrofilů

PUCAI = Paediatric Ulcerative Colitis Activity Index

PCDAI = Pediatric Crohn's Disease Activity Index

SES-CD = Simple Endoscopic Score for Crohn Disease

TCPT = tkáňový kalprotektin

UC = ulcerózní kolitida

UCEIS = Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity

VEO-IBD = very early onset IBD

## 1. PŘEHLED PROBLEMATIKY

### 1.1. Úvod a epidemiologie zánětlivých střevních onemocnění

Zánětlivá střevní onemocnění (IBD) představují skupinu chronických systémových onemocnění, která postihují převážně zažívací trakt (GIT), a spadají pod ně Crohnova choroba (CD) a ulcerózní kolitida (UC). V případě, kdy není možné IBD blíže zařadit, používá se výraz neklasifikovaná IBD (IBDU). Onemocnění se mohou manifestovat ve kterémkoli období života, nejčastěji postiženou skupinou jsou však mladí dospělí. Incidence i prevalence onemocnění celosvětově stoupá a narůstá i procento dětských pacientů. V České republice incidence IBD dosahuje 12-15/100 000 obyvatel za rok, což odpovídá číslům nacházejícím se přibližně uprostřed mezi hodnotami v západní a východní části světa. Respektují tak již známý západo-východní sestupný gradient (*Jarkovský J. et al., 2017*). Pediatriká IBD pak v České republice dosahují incidence necelých 10/100 000 obyvatel za rok, z čehož 5/100 000 tvoří CD a 4/100 000 UC (*Schwarz J. a Sýkora J., 2013*). IBD dětského věku se nejčastěji manifestují ve druhé dekádě života. UC je v porovnání s CD častější u předškolních dětí, u starších dětí pak až trojnásobně převažuje CD (*Day AS. et al., 2012*).

### 1.2. Etiopatogeneze IBD

Příčina IBD zůstává stále neobjasněna. Etiopatogeneticky jde nejspíše o narušenou interakci mezi imunitní bariérou střevní sliznice a střevní mikroflórou u geneticky vnímavého jedince (*Day AS. et al., 2012*). V současné době je známo téměř 200 genů, jejichž polymorfismy či mutace predisponují pacienty k rozvoji IBD. Některé z nich jsou specifické pro CD či UC, některé jsou pak společné pro celou skupinu IBD (*Jostins L. et al., 2012*). Prvním takto identifikovaným genem byl gen *NOD2*. Protein, který kóduje, patří do skupiny intracelulárních signálních proteinů zodpovědných za rozpoznávání molekul bakteriálního původu a následně zajištění adekvátní imunitní reakce. Dle dostupných studií až 50 % pacientů s CD nese alespoň jednu mutaci v genu *NOD2* (*Lesage S. et al., 2002*). V poslední době je stále více skloňována skupina tzv. very early onset-IBD (VEO-IBD), definovaných jako IBD manifestující se před šestým rokem života. Podstatnou část IBD v této skupině tvoří monogenně podmíněné choroby, charakterizované výhradním nebo téměř výhradním vlivem

jednoho mutovaného genu s minimální účastí polygenního či environmentálního pozadí (Day AS. et al., 2012). Mezi nejčastěji mutované geny ve skupině VEO-IBD patří geny pro interleukin (IL) 10 nebo jeho receptor. V poslední době jsou stále častěji rozpoznávány mutace i v genech pro jiné IL (např. IL 23) či genech zapojených do procesu autofagie (např. *ATG16L1* či *IGRM*) (Zhang YZ. a Li YY., 2014). Obecně lze říci, že pacienti s prokázanými známými genetickými mutacemi mají obvykle dřívější nástup choroby s extenzivnějším postižením GIT v době diagnózy a závažnějším klinickým průběhem (Day AS. et al., 2012).

V rozvoji IBD hrají roli i environmentální faktory. Mezi prokázané rizikové faktory patří kouření, západní způsob stravování, dlouhodobý stres či geografická poloha (Loftus EV., 2004). V neposlední řadě je pak důležitá úloha střevního mikrobiomu. Pacienti s IBD mají doloženou výrazně sníženou diverzitu střevní mikroflóry, s odlišným zastoupením konkrétních bakteriálních kmenů (Eckburg PB., 2005; Martinez C., 2008). To pravděpodobně vede ke zvýšené imunitní reaktivitě vůči vlastní endogenní mikroflóře, což dokládají i zvýšené sérové cirkulující protilátky vůči mikrobiálním antigenům u velké části pacientů s IBD. Pacienti s CD například vykazují typickou pozitivitu protilátek proti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), které nacházíme až u 80 % případů. Oproti tomu, pacienti s UC mají ASCA zvýšené jen v cca 10 % případů a charakterističtější pro ně bývá perinukleární pozitivita protilátek proti cytoplazmě neutrofilů (pANCA), které nacházíme až u 60-70 % těchto pacientů a jen 20-25 % pacientů s CD (de Souza HS. a Fiocchi C., 2016; Levine A. et al., 2014).

V patogenezi IBD pak hraje zásadní roli narušená vrozená i získaná imunita střevní sliznice, vedoucí k rozvoji nepřiměřené zánětlivé reakce. CD byla po dlouhé roky chápána jako prototyp imunopatologického onemocnění, mediovaného především cestou Th1 lymfocytů, které po stimulaci zejména IL12 produkují množství cytokinů s převahou interferonu gamma. UC byla oproti tomu považována za onemocnění s téměř výhradní převahou Th2 dráhy a následnou produkcí širokého spektra prozánětlivých IL (například IL4, IL5 či IL13) (Cobrin GM. a Abreu MT., 2005; Targan SR. a Karp LC., 2005; Korn T. et al., 2009). Současný pohled na imunopatogenezi IBD je však komplexnější a v obou případech jde o spoluúčast obou hlavních imunitních drah s převahou jedné či druhé. Důležitá je pak i činnost NK buněk, dendritických antigen prezentujících buněk a zejména pak Th17 lymfocytů produkujících IL17, který je součástí imunitní reakce u CD i UC (Galvez J., 2014). Roli hraje i narušená integrita enterocytů, snížená exprese jejich adhezivních proteinů či nižší produkce hlenu a antimikrobiálních peptidů (Salim SY., 2011).

### 1.3. Klinické příznaky IBD

Klinické projevy IBD jsou značně variabilní a odvíjí se od aktuální tíže onemocnění, délce jeho trvání a lokality postižení. Nicméně, pro CD je charakteristická triáda chronických bolestí břicha, často vágních a neurčitých, nekrvavého průjmu a úbytku na váze. Pro UC je pak typický krvavý průjem. U dětí je důležitá i růstová retardace, případně opožděný nástup puberty. Až 30 % dětí s IBD má v době diagnózy známky opožděného růstu (*Levine A. et al., 2011*). Přibližně třetina pacientů (u dětí údaje kolísají od 6 do 23 %) se pak manifestuje extraintestinálními příznaky (*Jose FA. et al., 2009; Sawczenko A. a Sandhu BK., 2003*). U dětí se nejčastěji jedná o artritidy (s postižením axiálního i periferního skeletu), kožní projevy (erythema nodosum, pyoderma gangraenosum) oční postižení (episkleritida, uveitida) a jaterní léze (primární sklerozující cholangitida či autoimunitní hepatitida, často v podobě overlap syndromu) (*Day AS. et al., 2012*).

### 1.4. Fenotypická klasifikace IBD

IBD jsou komplexní onemocnění nejen svojí etiopatogenezou, ale vykazují značnou variabilitu i v lokalizaci, závažnosti klinického průběhu a odpovědi na terapii. Přesná fenotypická klasifikace onemocnění tak hraje důležitou roli pro následný terapeutický postup i odhad prognózy. Za tímto účelem byla vytvořena tzv. Montreálská klasifikace (*Silverberg MS., 2005*) subklasifikující dospělé pacienty s IBD na základě jejich fenotypických charakteristik. Její využití pro dětské pacienty však má své limity, proto s odstupem několika let vznikla pediatrická modifikace, tzv. Pařížská klasifikace. Ta lépe odráží odlišnou lokalizaci, rozsah i dynamiku dětských IBD a zohledňuje i případné poruchy růstu (*Levine A. et al., 2011*). Detaily obou klasifikací podávají tabulky 1 a 2.

**Tabulka 1.**

Montreálská a Pařížská klasifikace pro Crohnovu chorobu.

	Montreálská	Pařížská
Věk v době diagnózy	A1: <17 let A2: 17-40 let A3: >40 let	A1a: 0-9 let A1b: 10-16 let A2: 17-40 let A3: >40 let
Lokalizace	L1: terminální ileum (v omezené míře i cékum) L2: colon L3: ileokolická L4: izolovaný horní GIT	L1: distální 1/3 ilea (v omezené míře i cékum) L2: colon L3: ileokolická L4a: horní GIT proximálně od Treitzova vazy L4b: horní GIT distálně od Treitzova vazy
Chování	B1: nestrikurující, nepenetrující B2: strikturující B3: penetrující P: perianální postižení	B1: nestrikurující, nepenetrující B2: strikturující B3: penetrující B2B3: strikturující + penetrující P: perianální postižení
Růstová retardace	N/A	G0: Nebyla přítomna G1: Byla přítomna

GIT = gastrointestinální trakt

## Tabulka 2.

Montreálská a Pařížská klasifikace pro ulcerózní kolitidu.

	Montreálská	Pařížská
Rozsah	E1: ulcerózní proktitida E2: levostranná UC (distálně od lienální flexury) E3: extenzivní UC (proximálně od lienální flexury)	E1: ulcerózní proktitida E2: levostranná UC (distálně od lienální flexury) E3: extenzivní UC (distálně od hepatální flexury) D4: ulcerózní pankolitida (proximálně od hepatální flexury)
Závažnost	S0: klinická remise S1: mírná UC S2: středně závažná UC S3: závažná UC	S0: nikdy nebyla závažná UC S1: někdy byla závažná UC

Závažnost je definována dle hodnoty Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI)

UC = ulcerózní kolitida

### 1.5. Diagnostika a morfologie IBD

Diagnostika IBD byla dlouhá léta především klinickou záležitostí a stála na průkazu chronického zánětu GIT s vyloučením ostatních příčin onemocnění, zejména infekcí. Nicméně, stále se zlepšující diagnostické metody a zvyšující se úroveň poznání o etiopatogeneze IBD začaly situaci paradoxně komplikovat. S postupem času tak byla definována řada atypických podtypů IBD, zejména v pediatrické skupině pacientů. Diagnostika IBD je tak v současné době multidisciplinárním procesem vycházejícím z anamnézy, fyzikálního vyšetření pacienta, výsledků laboratorních vyšetření, endoskopického nálezu, obrazu na zobrazovacích vyšetřeních, mikroskopie a někdy i genetického vyšetření. V případě dětských IBD se diagnostický proces opírá o tzv. revidovaná Portska kritéria z roku 2014, která přinesla nejnovější doporučení stran jednotlivých diagnostických modalit, definovala typické i atypické podtypy IBD na podkladě jejich fenotypu a zdůraznila případná diagnostická úskalí (Levine A. et al., 2014).

### 1.5.1. Endoskopický nález

Endoskopie hraje zásadní roli v diagnostice IBD i v následném terapeutickém managementu s hodnocením aktuální tíže intenzity a aktivity zánětu. V případě vstupního endoskopického vyšetření v době diagnózy je metodou volby ileokoloskopie do terminálního ilea s etážovým odběrem bioptických vzorků. Výjimku tvoří pouze pacienti s akutní závažnou kolitidou (ASC), u kterých je z důvodu šetrnosti preferována rektosigmoideoskopie. U dětí je součástí standardního diagnostického procesu i horní endoskopie (gastroezofagoduodenoskopie). U dospělých pacientů není stran horní endoskopie doposud jasný konsensus, doporučena je u klinicky nejasných případů, pacientů s podezřením na konkomitantní celiakii nebo u pacientů s horní dyspepsií a suspekci na postižení horního GIT při CD (*Annese V. et al., 2013*).

Endoskopické nálezy u IBD shrnuje tabulka 3 a obr. 1. UC v endoskopickém obrazu vykazuje zánětlivé změny začínající od análního okraje a stoupající variabilně proximálním směrem. Sliznice je v postiženém úseku překrvená, kyprá, fragilní, granulární, často pokrytá fibrinem a hnisem. Ulcerace bývají mělké, plošné, často splývající až geografické. Zánět může být omezený pouze na rektum nebo může stoupat proximálním směrem a někdy postihovat i celé tlusté střevo. U 1/5 pacientů zánět v menší míře přesahuje až do terminálního ilea jako tzv. backwash ileitis. Dříve byla UC považována za izolované onemocnění tlustého střeva, dnes je chápána jako systémové onemocnění, jehož součástí může být postižení i horních partií GIT. Zánět je v případě UC rovnoměrně rozložený, intenzita zánětu proximálním směrem obvykle klesá a přechod do nepostižené části střeva bývá ostrý. Reverzní gradient zánětu s maximem v proximálních partiích tlustého střeva by měl vést k podezření na CD. Nutné je však mít na paměti, že obdobný reverzní gradient bývá také typický pro pacienty s UC a konkomitantní primární sklerozující cholangitidou. V některých případech může UC vykazovat skip léze, a to v podobě rektum šetřící UC, tzv. cecal patch a UC apendicitidy. V případě rektum šetřící UC zůstává sliznice konečníku endoskopicky nepostižena nebo jsou patry jen velmi mírné zánětlivé změny. Tento typ UC je typický spíše pro děti, u dospělých pacientů se s ním setkáváme obvykle jen při léčbě topickými steroidy. Cecal patch je okrsek zánětlivě změněné sliznice céka u pacientů s levostrannou kolitidou, který někdy bývá mylně zaměněn za skip lézi u CD. UC apendicitidu pak nacházíme až u 3/4 pacientů s UC.

Pro CD je charakteristický kolísavý charakter zánětu. V endoskopickém obrazu jsou přítomny tzv. skip léze neboli okrsky zánětlivě změněné sliznice oddělené úseky sliznice

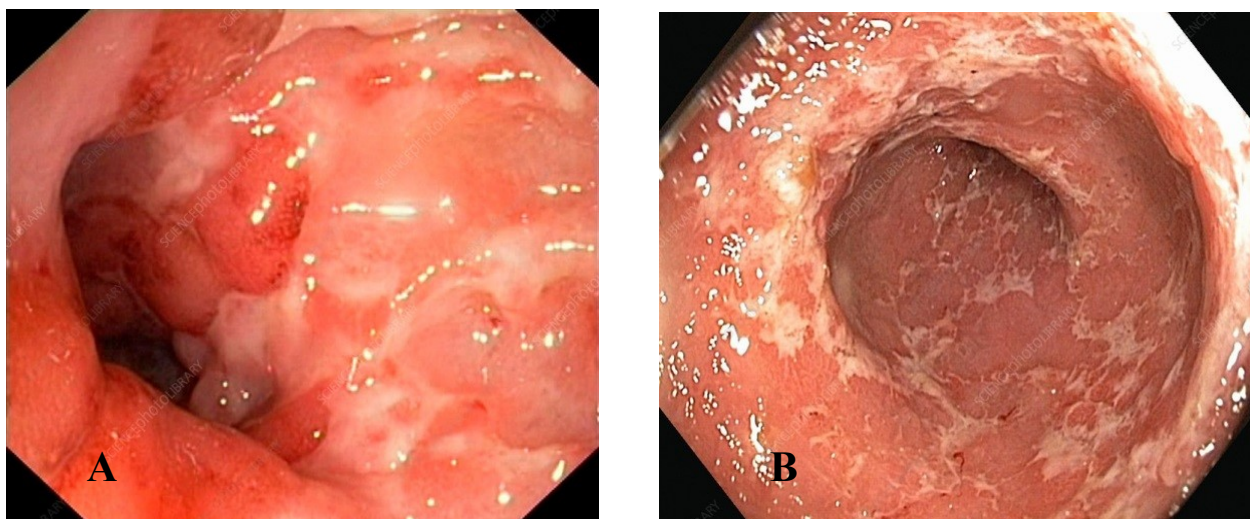
normálního vzhledu. Predilekční lokalizací CD je terminální ileum, postižený však může být jakýkoliv úsek sliznice GIT včetně dutiny ústní. Ulcerace bývají hluboké, plazivé a často jsou přítomny i fisury, které zasahují hluboko do stěny střeva a někdy mohou i perforovat a vést k rozvoji peritonitidy, mezikličkových abscesů či vytvářet píštěle do jiných částí střeva nebo do urogenitálního traktu. Zánět je v případě CD transmurální, často se proto objevují jizevnaté striktury, obvykle v oblasti terminálního ilea. Pro UC nejsou striktury typické, jejich nálezy by měly vždy vést k podezření na karcinom. Dalším charakteristickým rysem CD je obraz tzv. dlažebních kostek nebo kočičích hlav, který také většinou nacházíme v oblasti terminálního ilea. Je způsoben přítomností plazivých ulcerací mezi okrsky kypré a edematózní sliznice, která často vytváří až zánětlivé polypy. Dalším častým nálezem bývají aftózní léze (drobné okrouhlé slizniční defekty, často nad lymfatickým folikulem) a perianální postižení v podobě recidivujících perianálních abscesů, chronických análních fisur či objemných perianálních fibroepiteliálních výrůstků (skin tags). V resekčním bioptickém materiálu nebo v průběhu chirurgických výkonů lze u pacientů s CD pozorovat i známky transmurality zánětu v podobě fibrinózní serozitidy a přerůstání serózního povrchu střeva tukovou tkání (tzv. fat wrapping neboli creeping fat) (*Annese V. et al., 2013*).

**Tabulka 3.**

Makroskopické znaky IBD.

	Ulcerózní kolitida	Crohnova choroba
Lokalizace	Zejména tlusté střevo	Celý GIT
Ileum	Pouze jako backwash ileitida	Často postižené
Tlusté střevo	Levé colon > pravé colon	Pravé colon > levé colon
Rektum	Běžně postiženo	Většinou nepostiženo
Distribuce zánětu	Difúzní (kontinuální)	Segmentální
Ulcerace	Povrchové	Hluboké plazivé vředy, aftózní léze
Zánštlivé polypy	Běžné	Méně časté
Skip léze	Ne	Ano
Obraz „dlažebních kostek“	Ne	Ano
Hluboké fisury	Ne (s výjimkou ASC)	Ano
Píštěle	Ne (s výjimkou ASC)	Ano
Atrofie sliznice	Výrazná	Ano
Zesílení střevní stěny	Ne	Ano
Fat wrapping	Ne	Ano
Striktury	Ne	Ano

GIT = gastrointestinální trakt; ASC = Acute Severe Colitis (akutní závažná kolitida)



**Obr. 1.** Endoskopický obraz IBD

**A** – terminální ileum při Crohnově chorobě; **B** – rektum při ulcerózní kolitidě

### 1.5.2. Histopatologický obraz

Nedílnou součástí diagnostického procesu je i histopatologické vyšetření bioptických vzorků střevní sliznice. Dle oficiálních doporučení by měl bioptický odběr zahrnovat přinejmenším dva vzorky z minimálně šesti etází střeva, mezi které by měl vždy patřit odběr z terminálního ilea a rekta. Odběr by měl cílit na postižená místa i okrsky endoskopicky normální sliznice. V případě slizničních defektů by měl být odběr proveden z okraje defektu se zastiženým přechodem do neporušené sliznice, nikoliv z jeho centra (výjimku tvoří odběr na průkaz cytomegaloviru). U pacientů s ASC by měl být v rámci rektosigmoideoskopie odebrán alespoň jeden vzorek k posouzení mikroskopické intenzity zánětu a případnému vyloučení konkomitantní cytomegalovirové infekce. Patolog by měl spolu s bioptickým materiálem obdržet i dostatečné množství validních klinických údajů o pacientovi včetně anamnézy, endoskopického nálezu a klinicky zvažované diagnózy (nebo přinejmenším širší diagnostické rozvahy) (Annese V. et al., 2013). Pro potřeby diagnostiky IBD je dostačující základní histologické barvení hematoxylinem a eosinem a následné vyšetření preparátu ve světelném mikroskopu. Jakékoliv specializovanější histologické techniky (například imunohistochemie) nejsou doposud součástí rutinní bioptické praxe (Langner C. et al., 2014).

Mikroskopický obraz IBD odpovídá chronické enteritidě, kolitidě či enterokolitidě a je shrnut v tabulce č. 4 a obr. 2. IBD v akutní fázi (se kterým se patolog v bioptické praxi setkává jen výjimečně) má nepříznačnou morfolonii a nelze ji na mikroskopické úrovni

spolehlivě odlišit od bakteriální infekce či jiné etiologie. V chronické fázi pak histopatologický obraz IBD charakterizuje přítomnost chronické zánětlivé celulizace s účastí hojných lymfocytů, plazmatických buněk a často i velmi početných eosinofilů. V případě aktivního zánětu jsou v menší míře zastoupeny i neutrofilové. Ty se zprvu objevují v lamina propria a s narůstající aktivitou onemocnění začínají postupovat nejprve do povrchového epitelu sliznice, později do výstelky Lieberkühnových krypt (což označujeme pojmem kryptitida) a nakonec dojde k destrukci kryptové výstelky a exsudaci neutrofilů do jejího lumen s tvorbou tzv. kryptových abscesů. Přítomnost kryptitidy a kryptových abscesů tak odráží spíše míru aktivity zánětu a není pro IBD nijak diagnostická. Při maximálním stupni aktivity se pak objevují slizniční defekty v podobě erozí a ulcerací. Dále lze pozorovat i další známky chronicity v podobě atrofie sliznice, fibrotizace, novotvorby lymfatických agregátů, a především pak narušené architektiky sliznice. Tou rozumíme deformaci krypt s jejím větvením, angulací a dilatací. Tato změna, ač není přímo 100% patognomická, je pro IBD velmi typická a u jiných onemocnění (zejména chronických infekcí) ji pozorujeme méně často. Dalším charakteristickým znakem IBD je bazální plazmocytoza. Za fyziologického stavu a u jiných střevních zánětlivých onemocnění se plazmatické buňky drží v povrchových vrstvách lamina propria a směrem k bázi sliznice jejich počet klesá. Pakliže je tento gradient narušen a nacházíme početnější plazmatické buňky i těsně nad lamina muscularis mucosae, mluvíme o bazální plazmocytoze. Ta představuje znak velmi typický pro IBD a zároveň jde nejspíš o nejčasnější projev chronicity, který se může objevit již 14 dní po vypuknutí choroby.

Diferenciální diagnostika mezi CD a UC je pak založená na zcela odlišných mikroskopických znacích než IBD vs. non-IBD. UC charakterizuje, obdobně jako v endoskopii, kontinuální a rovnoměrně rozložený zánět, který obvykle zůstává omezený pouze na sliznici. V případě intenzivního zánětu s přítomností slizničních defektů může pronikat i do submukózy, transmuralita zánětu však pro UC není typická. Oproti CD je zde obvykle hojnější kryptitida a početnější kryptové abscesy. Důležité je však zdůraznit, že diagnóza UC je negativní diagnózou, založenou na absenci znaků typických pro CD a vyloučení jiných příčin onemocnění. Pro CD je pak typický diskontinuální charakter zánětu, který kolísá nejenom na endoskopické, ale i mikroskopické úrovni. Zánět se navíc šíří i do hlubších vrstev střevní stěny a často transmuralně proniká až na serózní povrch. V resekčním materiálu tak lze pozorovat i změny na hlubších strukturách jako například submukózní a myenterickou plexitidu, neuronální hyperplázii, fibroobliterativní změny na cévách, transmuralní fibrózu či známky serozitidy. Zcela charakteristickým znakem CD je pak přítomnost epitelioidních granulomů bez nekróz. Ačkoliv je diferenciální diagnóza granulomatózních zánětů GIT velmi

široká a zdaleka se neomezuje jen na CD, nález epiteloidních granulomů u pacientů s IBD vylučuje diagnózu UC (pakliže nejde o granulomy koprofagické či kryptolytické). Dalšími nápomocnými znaky jsou přítomnost transmurálních lymfatických folikulů či pylorická metaplázie, která je na rozdíl od metaplázie panethovské velmi typická pro CD (*Levine A. et al., 2014, Magro F. et al. 2013; Langner C. et al., 2014*). Jak již bylo zmíněno, součástí IBD může být i postižení horního GIT. Dříve bylo chápáno jako jev patognomický pro CD, dnes víme, že se i UC může prezentovat zánětlivými změnami v duodenu, žaludku či jícnu. Mikroskopie IBD v horním GIT je obvykle nespecifická, diagnózu UC nicméně vylučuje přítomnost epiteloidních granulomů, striktur či hlubokých plazivých ulcerací a fisur. Toto kritérium ostatně platí i pro odlišení terminální ileitidy při CD od backwash ileitidy (*Levine A. et al., 2011*).

V případě, kdy IBD nelze blíže zařadit, používáme výraz IBDU. IBDU je definována jako kolitida, u které nelze ani po dokončení kompletního multidisciplinárního diagnostického procesu spolehlivě říct, zda se jedná o CD nebo UC. IBDU je tak klinickou diagnózou, nikoliv patologickou, a lze ji stanovit až po kompletaci mikroskopických, endoskopických, laboratorních a klinických nálezů. Tím se její definice liší od staršího pojmu indeterminovaná kolitida. Tento termín pochází ze 70. let minulého století a doposud nemá ustálenou definici. Byl používán primárně pro resekční materiál z kolektomií, které vykazovaly překryvnou morfologii mezi CD a UC. V dnešní době je tento výraz již obsoletní. Pacienti s IBDU mohou v dalším průběhu onemocnění rozvinout CD znaky a být reklasifikováni na CD. Změnu diagnózy z IBDU na UC však aktuální diagnostická kritéria neumožňují (*Levine A. et al., 2014; Langner C. et al., 2014*).

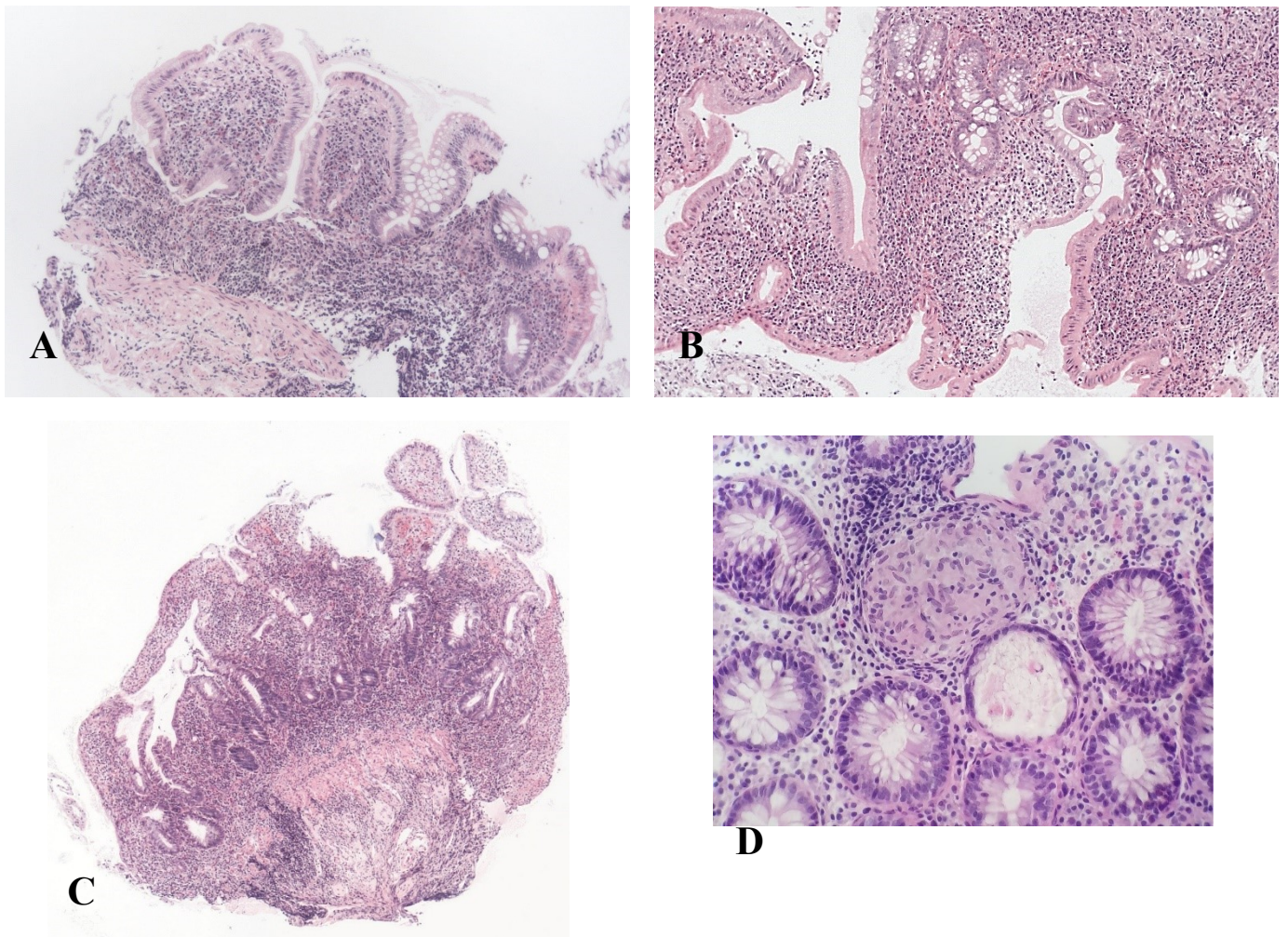
Na závěr je nutné zdůraznit, že neexistuje jediný znak, ať už mikroskopický, endoskopický, klinický či laboratorní, který by byl 100% specifický pro IBD, natož pak CD nebo UC. V rámci diagnostického procesu je nezbytné vyloučit především chronické infekce, které mohou mít endoskopický i mikroskopický obraz neodlišitelný od IBD (např. tuberkulóza či yersinióza) (*Levine A. et al., 2014*).

**Tabulka 4.**

Mikroskopické znaky IBD.

	Ulcerózní kolitida	Crohnova choroba
Porucha architektiky	Difúzní	Fokální
Chronický zánět	Difúzní, intenzita klesá proximálním směrem	Fokální, intenzita kolísá
Fokalita zánětu	Není běžná	Běžná
Lokalizace	Slizniční, někdy přesah do submukózy	Transmurální
Serozitida	NE (s výjimkou ASC)	Ano
Lymfoidní agregáty	Pouze ve sliznici a submukóze	Transmurálně
Granulomy	Ne (s výjimkou kryptofagických či koprofagických)	Ano
Akutní zánět	Difúzní	Fokální
Kryptitida	Ano	Ano
Kryptové abscesy	Ano, běžně	Ano, ale méně často
Deplece hlenu	Ano, prominentní a difúzní	Mírná, ložisková
Neuronální hyperplázie	Ne	Ano
Hypertrofie muscularis propriae	Ne	Ano
Panethovská metaplázie	Ano	Ano, ale méně často
Pylorická metaplázie	Ne	Ano

ASC = Acute Severe Colitis (akutní závažná kolitida)



**Obr. 2.** Mikroskopický obraz IBD.

**A, B** – ulcerózní kolitida; **C, D** – Crohnova choroba

### 1.5.3. Morfologie dětských IBD

Morfologie dětských IBD pak vykazuje určitá specifika. UC se v době diagnózy v porovnání s dospělou populací častěji manifestuje jako extenzivní kolitida či pankolitida. CD pak má v době diagnózy vyšší podíl případů omezených na tlusté střevo a častěji je postižený horní GIT (dle dostupných studií v rozmezí 30-80 % případů) (Levine A. et al., 2014). Není však zcela jasné, nakolik má přítomnost zánětu v horním GIT vliv na dlouhodobou prognózu pacientů. Častější je i záchyt epiteloïdních granulomů (Langner C. et al., 2014). Pediatrická IBD také častěji vykazují atypické fenotypy. Jmenovitě UC má v rámci revidovaných Portsých kritérií definováno pět atypických podtypů, které jsou přehledně

shrnuty v tabulce č. 5. Samostatnou kapitolu pak tvoří VEO-IBD, které často mívají odlišný endoskopický nálezn, mikroskopii i klinickou prezentaci a mnohdy „konvenční“ obraz IBD ani vzdáleně nepřipomínají (Levine A. et al., 2014).

### Tabulka 5.

Atypické fenotypy pediatrické UC.

	Makroskopické znaky	Mikroskopické znaky
1) Rektum šetřící (rectal sparing) UC	Makroskopicky (endoskopicky) normální sliznice rekta	Rektum histologicky bez zánětu (absolutní rectal sparing) nebo s mírným chronickým zánětem (relativní rectal sparing)
2) UC krátkého trvání	Kontinuální zánět, může být rectal sparing	Histologicky zánět může kolísat, často chybí porucha architektiky či další známky chronicity
3) Cecal patch	Levostranná kolitida + izolovaný okresek zánětu v céku	Histologie v céku obvykle nespecifická, v levostranném colon rozsahu typický obraz UC
4) UC s postižením horního GIT	Známky zánětu v horním GIT, avšak ne hluboké plazivé ulcerace, fisury či striktury	Chronický aktivní či neaktivní zánět s nespecifickou morfologií, absence granulomů
5) Akutní závažná kolitida	Intenzivní kontinuální zánět od rekta směrem proximálním	Běžně vykazuje CD-like znaky (transmurální zánět, hluboké ulcerace)

UC = ulcerózní kolitida; GIT = gastrointestinální trakt; CD = Crohnova choroba

## 1.6. Monitoring léčených pacientů a skórovací systémy aktivity onemocnění

Pravidelný monitoring aktivity zánětlivého onemocnění je zásadní pro hodnocení remise, správné nastavení terapie i odhad prognózy. Pro tento účel mohou sloužit některé neinvazivní klinické skórovací indexy, v dětské populaci jsou nejčastěji používány Pediatric

Crohn's Disease Activity Index (PCDAI) (*Hyams JS. et al., 1991*) a Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI) (*Turner D. et al., 2007*). Jedná se o validovaná skóre, určená cíleně pro pediatrické pacienty. V případě klinické remise (vymizení veškerých klinických symptomů) není dle aktuálních doporučení endoskopické vyšetření nezbytné (*Annese V. et al., 2013*). Nicméně, klinická remise nemusí nutně znamenat remisi endoskopickou. Endoskopie v současné době představuje zlatý standard pro hodnocení luminální aktivity střevního zánětu a dosažení endoskopické remise (ER) je aktuálně považováno za primární terapeutický cíl. Dle platných doporučení je kontrolní endoskopie u léčených pacientů nezbytná v případě klinických známek přetrvávajícího onemocnění, klinických známek relapsu, pacientů refrakterních k terapii, pacientů s nejistou vstupní diagnózou a v případě zvažovaného chirurgického zákroku. U dospělých pacientů pak má endoskopie zásadní význam i v prevenci rozvoje případných dysplastických změn (*Annese V. et al., 2013*).

ER je definována jako úplné či téměř úplné vymizení viditelného slizničního zánětu (endoskopická normalizace sliznice) za použití bílého světla (bez použití augmentačních endoskopických zobrazovacích technik). U pacientů s UC je ER definována jako Mayo endoscopic subscore 0 nebo 1 (0 odpovídá normální sliznici, 1 pak mírnému erytému, lehce snížené cévní kresbě a mírné fragilitě sliznice). Dle dostupných studií dosažení ER u pacientů s UC snižuje riziko kolektomie či nutnosti imunosupresivní terapie (*Colombel JF. et al., 2011; Froslie KF. et al., 2007; Ardizzone S. et al., 2011*). V případě CD zatím ER postrádá ustálenou definici. Lze za ní považovat jakoukoliv absenci slizničních defektů, případně nulovou hodnotu Simple Endoscopic Score či Crohn's Disease Index of Severity (tato endoskopická skóre jsou blíže popsána v následujících odstavcích). ER u pacientů s CD je dle některých prací asociovaná s nižšími počty relapsů či nutností chirurgického zákroku (*Allez M. et al., 2002; Froslie KF. et al., 2007; Solberg IC. et al., 2008*).

Validní posouzení endoskopické aktivity zánětu vyžaduje její objektivizaci za pomoci standardizovaných skórovacích indexů. Jejich použití není dle platných doporučení mandatorní, řada pracovišť je však v rutinní praxi využívá. Mezi nejrozšířenější skórovací systémy pro UC patří Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS, tabulka 6) (*Navaneethan U. et al., 2012*), případně Mayo Endoscopic Subscore (*Schroeder KW. et al., 1987*), které je výňatkem z klinicko-endoskopického Mayo score. Pro CD se nejčastěji používá Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD, tabulka 7) (*Daperno M. et al., 2004*) či Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity (CDEIS) (*Mary JY. a Modigliani R., 1989*).

**Tabulka 6.**

Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS).

	Skóre 0	Skóre 1	Skóre 2	Skóre 3
Cévní kresba	Normální	Ložiskové zastření	Kompletní zastření	N/A
Krvácení	Ne	Slizniční	Mírné luminální	Středně závažné až závažné luminální
Eroze a ulcerace	Ne	Eroze ≤ 5 mm	Povrchové ulcerace > 5 mm	Hluboké kráterovité ulcerace

UCEIS = součet všech skóre. Skórovány jsou nezávažnější léze.

**Tabulka 7.**

Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD).

	Skóre 0	Skóre 1	Skóre 2	Skóre 3
Velikost ulcerací (cm)	Ne	Aftózní léze (průměr 0.1 - 0,5)	Velké ulcerace (průměr 0.5 - 2)	Velmi velké ulcerace (průměr > 2)
Ulcerovaný povrch	Ne	<10 %	10 – 30 %	>30 %
Postižený (zánětlivě změněný) povrch	Ne	<50 %	50 – 75 %	>75 %
Přítomnost zúžení	Ne	Jedna, prostupná pro endoskop	Mnohotné, prostupné pro endoskop	Neprostopné pro endoskop

SES-CD = součet všech proměnných v pěti segmentech střeva.

ER zdaleka ne vždy odpovídá remisi histologické (HR). Dle různých prací má 16-100 % pacientů s UC v ER mikroskopické známky přetrvávajícího zánětu a u pacientů s CD se údaje pohybují v rozmezí 25-37 % (Bryant RV. et al., 2014). Vystává tak otázka, zda by nemělo

být terapeutickým cílem spíše dosažení HR. Pro objektivní posouzení mikroskopické aktivity zánětu pak slouží histopatologické skórovací systémy. Existuje jich značné množství, většina z nich však byla vytvořena pro pacienty s UC, jen minimum pro CD a žádný primárně pro IBDU. Pouze některé z nich jsou navíc validované a žádný z nich nebyl primárně etablován pro dětskou populaci (*Bryant RV. et al., 2014*). Jedno z nepoužívanějších histopatologických skóre pro pacienty s UC je již dlouhé roky Geboes score (*Geboes K. et al., 2000*). V recentní době pak byly zavedeny dva nové indexy, Nancy Histological Index (*Marchal-Bressenot A. et al., 2017*) a Robarts Histopathology Index (*Mosli MH. et al., 2017*), které jsou na rozdíl od Geboesova skóre skutečně validovaná, a navíc vykazují dobrou interpersonální shodu a korelaci s endoskopickým nálezem (*Irani NR. et al., 2018*). Detaily výše uvedených skóre jsou uvedeny v tabulce 8 a obr. 3.

Vzhledem k diskontinuálnímu charakteru zánětu je mikroskopické hodnocení intenzity a aktivity zánětu u Crohnovy choroby náročnější a dostupné skórovací indexy jsou limitované počtem i významem. Jediný plošněji používaný index pochází od D'Haense a spol. z roku 1998, v se praxi ujal pod názvem Global Histologic Activity Score (GHAS, tabulka 9) a je často užívaný separátně pro terminální ileum a tlusté střevo (jako tzv. Colonic a Ileal GHAS) (*D'Haens GR. et al., 1998*). Není však validovaný a je doložená jeho špatná korelace s endoskopickými indexy (*Geboes K. et al., 2005*).

Nutné je však zdůraznit, že doposud neexistuje jednoznačná shoda, zda by mělo dosažení HR sloužit jako primární terapeutický cíl. Histopatologické hodnocení aktivity zánětu má své limitace a není jisté, jestli dosažení HR představuje pro pacienta skutečný benefit.

## **Tabulka 8.**

Geboes score.

---

Grade 0. Architektonické změny

0.0 Žádná abnormalita

0.1 Mírná abnormalita

0.2 Mírná až střední difúzní nebo multifokální abnormalita

0.3 Závažná difúzní nebo multifokální abnormalita

---

Grade 1. Chronický zánět

1.0 Bez zánět

1.1 Mírný chronický zánět

- 1.2 Střední chronický zánět
- 1.3 Výrazný chronický zánět

---

Grade 2. Neutrofilů a eozinofilů v lamina propria

- 2A.0 Bez eozinofilů
- 2A.1 Mírný nárůst eozinofilů
- 2A.2 Střední nárůst eozinofilů
- 2A.3 Výrazný nárůst eozinofilů
- 2B.0 Bez neutrofilů
- 2B.1 Mírný nárůst neutrofilů
- 2B.2 Střední nárůst neutrofilů
- 2B.3 Výrazný nárůst neutrofilů

---

Grade 3. Neutrofilů v epitelu

- 3.0 Ne
- 3.1 < 5 % postižených krypt
- 3.2 < 50 % postižených krypt
- 3.3 > 50 % postižených krypt

---

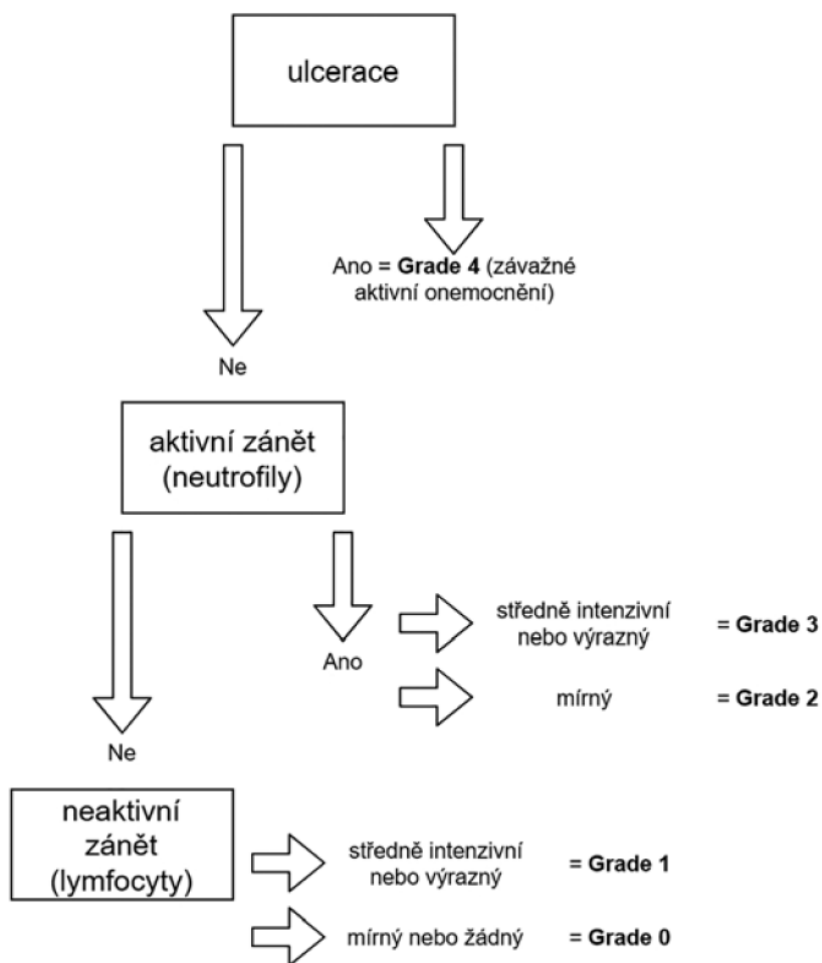
Grade 4. Destrukce krypt

- 4.0 Ne
- 4.1 Pravděpodobná – lokální excés neutrofilů v části krypty
- 4.2 Pravděpodobná – výrazné ztenčení stěny krypty
- 4.3 Nepochybná destrukce krypty

---

Grade 5. Eroze nebo ulcerace

- 5.0 Ne
  - 5.1 Hojící se epitel a zánět v okolí
  - 5.2 Pravděpodobná eroze – ložiskově stržený epitel
  - 5.3 Nepochybná eroze
  - 5.4 Ulcerace nebo přítomnost granulační tkáně
-



**Obr 3.** Nancy Histological Index

**Tabulka 9.**

Global Histology Activity Score (GHAS).

Histopatologická změna	Grade
Poškození epitelu	0 = ne; 1 = fokální; 2 = extenzivní
Porucha architektiky	0 = ne; 1 = střední; 2 = závažné
Chronický zánět v lamina propria	0 = ne; 1 = střední; 2 = výrazný
Neutrofilly v lamina propria	0 = ne; 1 = střední; 2 = výrazně
Neutrofilly v epitelu	0 = povrchový epitel; 1 = kryptitida; 2 = kryptové abscesy
Eroze nebo ulcerace	0 = ne; 1 = ano
Granulomy	0 = ne; 1 = ano
Počet postižených segmentů střeva	1 = < 1/3; 2 = 1/3 – 2/3; 3 = > 2/3

Každá proměnná je skórována nezávisle. GHAS = součet všech individuálních skóre.

Ačkoli je endoskopie pro monitoring aktivity onemocnění léčených pacientů metodou volby, jedná se o invazivní zákrok a u dětí navíc obvykle vyžaduje celkovou anestezii. Je proto snaha zavést a ustálit vhodné neinvazivní biomarkery aktivního zánětu, které by podávaly validní informaci o tíži střevní zánětu a měly, pokud možno, i prediktivní schopnost stran dalšího klinického průběhu onemocnění. V praxi nejrozšířenějším biomarkerem je v tomto směru fekální kalprotektin (FCPT) (Levine A. et al., 2014). Jedná se o cytoplazmatický bílkovinný produkt neutrofilů a člen rodiny S100 proteinů. V případě aktivního zánětu ve střevní sliznici se tento protein uvolňuje do lumen střeva a lze jej detekovat ve stolici. Slouží tak jako vhodný biomarker pro odlišení organických a funkčních onemocnění GIT, zejména pak odlišení IBD od dráždivého tračníku, které mohou mít obdobnou klinickou prezentaci (Walsham NE. a Sherwood RA., 2016). Zároveň lze dynamiku hladin FCPT použít ke sledování odpovědi na léčbu. Dle dostupných studií FCPT vykazuje vysokou senzitivitu a specifitu pro dětskou i dospělou populaci (Fagerberg UL. et al., 2007; Walsham NE. a Sherwood RA., 2016) a dobře koreluje s endoskopickou aktivitou zánětu (Fagerberg UL. et al., 2007). Jeho prediktivní hodnota stran rozvoje komplikací je však sporná, především u dětí.

### **1.7. Hodnocení endoskopické rekurence u pacientů po ileocékální resekci**

Někteří pacienti vyžadují v době diagnózy nebo v průběhu léčby operační zákrok. Častěji do něj dospějí pacienti s CD, až 70 % z nich vyžaduje operaci v průběhu následujících 10 let od diagnózy. U dětí dostupné práce udávají rozmezí 3,4 – 7,9 % v průběhu prvního roku od diagnózy, 13,8 – 47,2 % v průběhu prvních 5 let a 28 – 34,8 % v průběhu 10 let (Splawski JB. et al., 2017). Nejčastějším typem výkonu je ileocékální (IC) resekce z důvodu intenzivního zánětlivého postižení nebo rozvoje striktury v oblasti terminálního ilea (Bernell O. et al., 2000). Mezi další časté indikace k operaci patří intraabdominální absces, závažné akutní krvácení či penetrující onemocnění. Značná část pacientů pak rozvine pooperační rekurenci v oblasti anastomózy nebo neoterminálního ilea, která je definovaná jako de novo rozvoj CD po kurativní resekci (Hyams JS. et al., 1982). Jelikož endoskopická pooperační rekurence mnohdy předchází rekurenci klinické, je metodou volby pro její hodnocení znovu endoskopie, konkrétně ileokolonoskopie do neoterminálního ilea. Měla by být standardně provedena mezi 6. - 12. měsícem po operaci, v případě rozvoje klinických známek rekurence i dříve (Annese V. et al., 2013). Pro objektivní hodnocení posouzení endoskopického nálezu

zde slouží Rutgeertsovo skóre (*Rutgeerts P. et al., 1990*), které vychází z počtu a charakteru ulcerací v oblasti anastomózy a neoterminálního ilea (tabulka 10). Skóre i0 nebo i1 odpovídá přítomnosti méně než 5 vředů, značí nízké riziko progresu a v současné době odpovídá definici remise. Skóre bylo primárně vytvořeno pro dospělé populaci a jeho použití pro dětské pacienty není validované.

**Tabulka 10.**

Rutgeerts' score.

Grade	Endoskopický nález	Riziko symptomatické rekurence v dalších 5 letech
i0	Žádné léze	6 %
i1	≤ 5 aftózních lézí v oblasti anastomózy	6 %
i2	> 5 aftózních lézí ohraničených normální sliznicí nebo okrsky s většími ulceracemi do 1 cm v oblasti anastomózy	27 %
i3	Difúzní aftózní neoterminální ileitida s difúzně zánětlivě změněnou sliznicí mezi afty	63 %
i4	Difúzní zánět s velkými ulceracemi a/nebo obrazem dlažebních kostek a/nebo strikturou	100 %

## **2. OTÁZKY A CÍLE PRÁCE**

### **2.1. Prediktivní hodnota histopatologického skórovacího systému u dětí s komplikovaným průběhem Crohnovy choroby**

Histopatologie má zásadní úlohu v diagnostice dětských IBD. Nicméně, její přínos v rámci kontrolních endoskopií u pacientů na léčbě je sporný. Jak již bylo zmíněno v předchozích odstavcích, v případě kontrolních endoskopií jde zejména o zhodnocení aktuální aktivity zánětu střevní sliznice a zde je metodou volby endoskopie. Význam histopatologie je v tomto směru nejistý a zejména u dětí na toto téma existuje minimum dostupných informací. V této práci jsme si tak stanovili následující cíle:

- Analyzovat, zda mikroskopická aktivita zánětu u dětí s CD, stanovená příslušným histopatologickým skórovacím systémem, koreluje s endoskopickými a klinickými skóre aktivity zánětu.
- Zjistit, zda histopatologický skórovací systém predikuje rozvoj komplikací u dětí s CD.

### **2.2. Prediktivní hodnota imunohistochemického průkazu tkáňového kalprotektinu u dětí s komplikovaným průběhem ulcerózní kolitidy**

S ohledem na výsledky předešlé studie jsme se rozhodli zacílit na specializovanější metody mikroskopického hodnocení aktivity zánětu u dětí s IBD. V úvodní stati byl zmíněn FCPT jako vhodný neinvazivní biomarker lumenální aktivity zánětu GIT s vysokou senzitivitou i specificitou a dobrou korelací s endoskopickým nálezem. Nicméně, FCPT má své limitace a v řadě případů může být falešně pozitivní i falešně negativní. Nejasná je i jeho schopnost predikovat rozvoj komplikací. Naše práce se proto zaměřila na imunohistochemický průkaz CPT přímo ve tkáni bioptických vzorků střevní sliznice. Cílem práce bylo:

- Posoudit, zda může imunohistochemický průkaz tkáňového CPT (TCPT) sloužit jako prediktor komplikovaného průběhu onemocnění u dětí s UC.
- Zjistit, zda počet CPT+ buněk ve střevní sliznici u dětí s UC koreluje s hladinami FCPT a s histopatologickými, endoskopickými a klinickými skóre aktivity zánětu v době diagnózy.

### **2.3. Tkáňový kalprotektin jako prediktor rekurence Crohnovy choroby u dětí po ileocékální resekci**

IC resekce je nejčastějším chirurgickým výkonem u pacientů s CD. Na rozdíl od dospělé populace, v případě dětí je doposud málo dostupných informací o klinických i histopatologických prediktorech rekurence onemocnění. V této studii jsme se proto rozhodli zaměřit na prediktory relapsu v průběhu 6 měsíců po IC resekci a zvláště důkladně jsme cílili na mikroskopické prediktory, především pak na imunohistochemický průkaz TCPT v resekčních okrajích. Od této metody jsme si slibovali zpřesnění hodnocení mikroskopické aktivity zánětu jakožto jednoho z možných prediktorů. Cíle studie byly následující:

- Zjistit, zda počet CPT+ buněk v resekčních okrajích IC resekátů může sloužit jako prediktor endoskopické rekurence v průběhu 6 měsíců od operace u dětí s CD.
- Explorativní analýza s cílem nalézt jiné, mikroskopické či klinické prediktory rekurence.
- Nalézt prediktory rekurence v oblasti tlustého střeva a horního GIT.
- Posoudit vliv laboratorních nálezů a mikroskopického obrazu v době operace na následný terapeutický management.

## **2.4. Diagnostický přínos imunohistochemické detekce CD30+ lymfocytů ve střevní sliznici u dětí se zánětlivými střevními onemocněními**

Diagnostika dětských IBD je složitý multidisciplinární proces a žádný znak, ať již klinický, endoskopický či mikroskopický, není 100% patognomický pro CD či UC. Cílem této studie tak bylo zpřesnění diagnostiky pediatrické IBD. Vycházeli jsme ze základního poznatku, že některé subpopulace Th2 lymfocytů na svém povrchu exprimují antigen CD30. Jelikož je UC oproti CD mediovaná převážně Th2 dráhou, předpokládali jsme, že děti s UC budou mít vyšší hladiny CD30+ lymfocytů ve střevní sliznici, které jsme se rozhodli detekovat imunohistochemicky. Cílem práce bylo:

- Ověřit, zda může imunohistochemický průkaz CD30+ lymfocytů ve střevní sliznici zpřesnit diferenciální diagnózu mezi dětskou CD a UC.
- Zjistit, zda mohou počty slizničních CD30+ lymfocytů u dětí s IBDU sloužit jako časný prediktor budoucí diferenciace směrem k CD nebo UC.

### **3. SOUBORY PACIENTŮ, POUŽITÉ METODY A STATISTICKÁ ANALÝZA**

#### **3.1. Soubory pacientů**

Všechny studie byly prováděny retrospektivně na souborech dětských pacientů, kterým byla diagnostikována IBD ve Fakultní nemocnici v Motole mezi lety 2009 až 2018. Do studií jsme zařazovali pouze pacienty s nově diagnostikovanou IBD. Pacienti, kteří byli v době vstupní endoskopie již na terapii, do studie zařazeni nebyli, stejně tak pacienti s chybějícími histopatologickými, endoskopickými či klinickými daty. U všech pacientů byla vždy nejprve zrevidována diagnóza na základě aktuálních diagnostických doporučení (revidovaná Portska kritéria z roku 2014). Následně byl u pacientů znovu zhodnocen histopatologický nález, endoskopický obraz i klinická data z archivního materiálu. Pro potřeby analýzy byla objektivizována mikroskopická, endoskopická a klinická aktivita zánětu užitím příslušných skórovacích systémů. Z histopatologických skóre byly použity GHAS pro CD, Geboes score a Nancy Histological Index pro UC a námi nově etablované univerzální skóre pro pacienty s IBDU. Hodnoceno bylo ve většině případů 6 standardně zvolených etáží střeva (terminální ileum, cékum, colon ascendens, colon transversum, colon descendens a rektum). Endoskopický obraz byl hodnocen užitím SES-CD a UCEIS. Klinická aktivita zánětu byla stanovena prostřednictvím PUCAI a PCDAI.

Do studie zahrnující pacienty po IC resekci jsme zařadili všechny děti s CD, které podstoupily ve Fakultní nemocnici v Motole IC resekci s primární anastomózou a zároveň u nich byla 6 měsíců po resekci (dříve v případě známek klinického relapsu) provedena endoskopická kontrola s odběrem bioptických vzorků. Do studie nebyli zařazeni pacienti s nutností ileostomie či pacienti, u kterých došlo ke změně terapie ještě před kontrolní endoskopií (například zahájení anti-TNF terapie).

Případné bližší specifikace příslušných souborů pacientů spolu s detailní metodikou jednotlivých studií jsou uvedeny v kapitole 4, která o daných výzkumných projektech pojednává.

#### **3.2. Zpracování bioptického materiálu**

Veškerý bioptický materiál v našich studiích byl zpracován standardními histologickými technikami. Endoskopicky odebrané bioptické vzorky i materiál

z ileocékálních resekcí byly do naší laboratoře patologie dopraveny fixované v 10% pufovaném formolu (pH 7,2). Materiál byl ponechán ve fixativu 24 hodin. Drobné endoskopické vzorky byly zpracovány v celém rozsahu, ileocékální resekaty byly nejprve změřeny a makroskopicky popsány patologem a následně byl proveden reprezentativní odběr vzorků z více míst, cílicí na makroskopicky viditelné slizniční defekty i na nepostižená místa. Vyšetřen byl i proximální a distální reseční okraj. Vzorky byly následně zality do parafinových bloků a sériově prokrájeny. Byly zhotoveny řezy o tloušťce 1 mikrometr, které byly následně barveny hematoxylinem a eosinem.

### **3.3. Imunohistochemické vyšetření**

Cílem imunohistochemického vyšetření je vizualizace jaderných, cytoplazmatických či membránových proteinů v histologických řezech a jejich následné hodnocení ve světelném mikroskopu. Vizualizace je založena na vazbě specifické primární protilátky na detekovaný antigen, který je ve tkáni různými technikami demaskován (nejčastěji tepelně, případně působením mikrovlnného záření, aplikací roztoků s různým pH nebo natrávením enzymem). Komplex antigenu a primární protilátky je následně detekován navázáním sekundární protilátky s biotinem. Vizualizace imunokomplexů primární a sekundární protilátky probíhá enzymaticky. Enzym je navázán na avidin, který vytváří vazbu s biotinem a po následném přidání substrátu vzniká enzymatickou reakcí barevný precipitát pozorovatelný v histologickém řezu v místě vazby primární protilátky na tkáňový antigen. V našich studiích jsme imunohistochemicky detekovali přítomnost dvou antigenů – CD30 (klon Ber-H2, Cell Marque, ředění 1:50) a kalprotektinu (klon MAC387, Invitrogen, ředění 1:1000).

### **3.4. Endoskopické vyšetření**

Před vlastním endoskopickým výkonem je zapotřebí provést vyčištění střev. U dětských pacientů se obvykle používá nízkoobjemová příprava roztokem polyethylen glykolu s askorbátem nebo pikosulfátem a magnesium citrátem, popř. Sinokotem. Následuje ileokoloskopie s intubací terminálního ilea a ezofagogastroduodenoskopie. Insuflace střev za pomoci oxidu uhličitého není součástí standardních pediatrických doporučení. Pro kolonoskopické vyšetření se u dětí pod 1 rok věku a/nebo pod 10 kg hmotnosti využívá  $\leq 6$

mm gastroskop, případně i standardní dospělý gastroskop nebo kolonoskop. U dětí nad 10 kg/1 rok věku se pak obvykle používá pediatrický nebo adultní kolonoskop. V případě horní endoskopie je pak pro děti pod 10 kg/1 rok věku využíván  $\leq 6$  mm gastroskop, u starších dětí pak standardní dospělý gastroskop. V případě těsných striktur nebo naopak nutnosti terapeutické endoskopie je možná modifikace s použitím endoskopů menšího či většího kalibru (*Tringali A. et al., 2017*).

### 3.5. Chirurgická technika ileocékální resekce

Principem IC resekce je vynětí makroskopicky postižené části střeva. Nejčastěji se provádí z laparoskopicky asistovaného přístupu, méně často pak přístupem z laparotomie či laparoskopie. Laparoskopicky asistovaná IC resekce spočívá v zavedení jednoho portu pro kameru skrz pupek a dvou portů do levé poloviny břicha (tzv. multi-port), nebo všech tří portů přes jeden otvor v pupku (single-port). Druhý jmenovaný přístup je v současné době metodou volby ve Fakultní nemocnici v Motole. Po zavedení portů je nejprve zrevidována a následně mobilizována celá IC oblast. Mobilizace s natnutím nástěnného peritonea se provádí od orální poloviny colon transversum přes colon ascendens až do oblasti terminálního ilea. Daný úsek střeva tak zůstane zavěšen pouze na mezenteriu a mesocolon a může být provedena jeho antepozice do rány v pupku. Následně je provedena skeletizace přilehlého cévního zásobení a vlastní IC resekce s end-to-end ileokolickou anastomózou. Střevo je pak reponováno zpět do dutiny břišní a rána zašita po vrstvách (*Amil-Dias J. et al., 2017*).

### 3.6. Statistická analýza

K analýze dat byl použit software R-project (R Core Team, verze 3.4.1). Pro zhodnocení rozdílů mezi průměry a mediány zkoumaných proměnných (histopatologická, endoskopická a klinická skóre aktivity zánětu, počty CD30+ lymfocytů, hladiny FCPT a TCPT) u dětí s CD, UC a IBDU byl použit Mann-Whitney U test a t-test s Welchovou korekcí. K nalezení nejsignifikantnější hladiny cut-off pro dané proměnné byla použita ROC křivka. Jednotlivé ROC křivky byly vzájemně porovnávány pomocí De-Longova testu. Kaplan-Meierovy křivky přežití pak byly použity k analýze frakce pacientů s nekomplikovaným průběhem onemocnění v průběhu času. Ke zjištění, zda byly rozdíly

nalezené v daných proměnných nezávislými prediktory komplikovaného průběhu onemocnění, byly použity lineární a mnohotné regresní modely včetně Coxovy regrese. K ověření vzájemné korelace mezi testovanými proměnnými byl použit Pearsonův korelační koeficient. Všechny testy byly oboustranné a hodnotu významnosti  $p < 0,05$  jsme považovali za statisticky signifikantní. Používali jsme 95% interval spolehlivosti.

## 4. VÝSLEDKY JEDNOTLIVÝCH STUDIÍ A DISKUZE

### 4.1. Prediktivní hodnota histopatologického skórovacího systému u dětí s komplikovaným průběhem Crohnovy choroby

*Studie byla publikována v časopise Pathology: research and practice v roce 2017*

Fabián O, Hradský O, Potužníková K, Kalfusová A, Krsková L, Hornofová L, Zámečník J, Bronský J. Low predictive value of histopathological scoring system for complications development in children with Crohn's disease. *Pathol Res Pract* 2017; 213(4): 353-358.

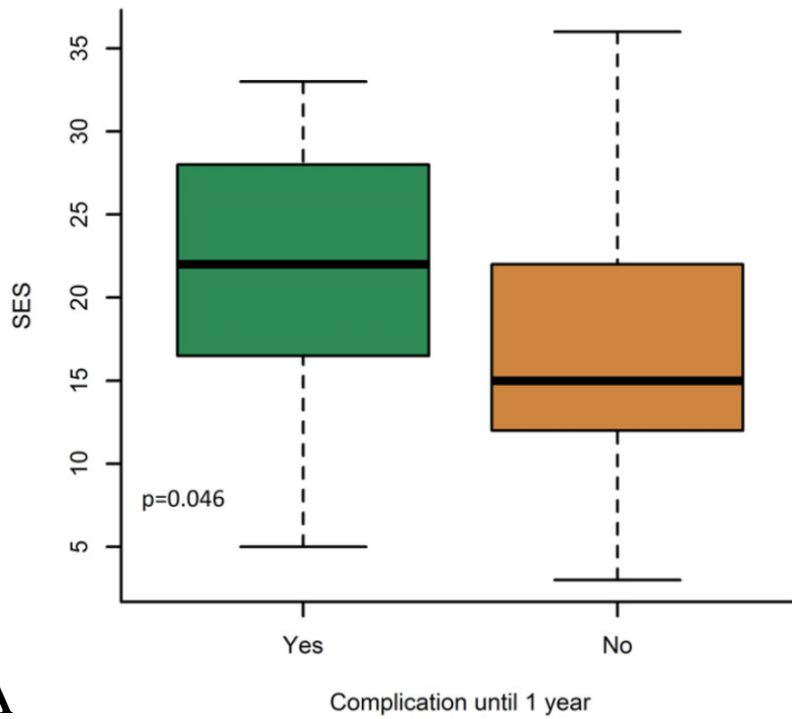
V této studii jsme se rozhodli ověřit, zda mikroskopická aktivita zánětu u dětí s CD stanovená příslušným histopatologickým skórovacím indexem koreluje s endoskopickou a klinickou aktivitou zánětu. Dále jsme testovali, zda má histopatologický skórovací systém prediktivní hodnotu pro rozvoj komplikací u dětí s CD.

Soubor pacientů zařazených do studie je obecně charakterizován v kapitole 3. V této studii byli pacienti následně sledováni po dobu minimálně jednoho roku, zda nerozvinou některou z přesně definovaných komplikací. Za komplikaci jsme považovali:

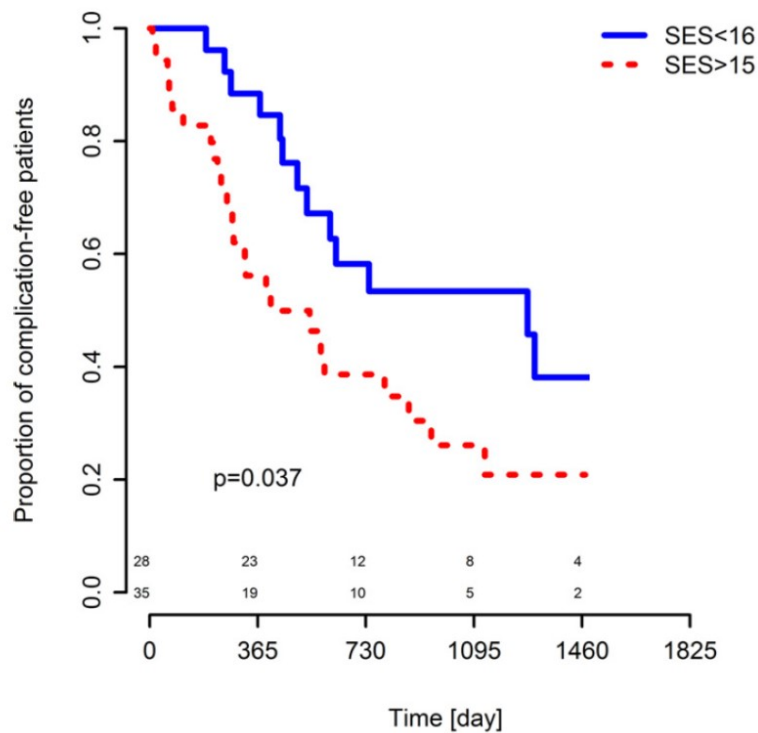
- strikturu neprostupnou pro endoskop nebo s prestenotickou dilatací,
- rozvoj intraabdominálního abscesu nebo píštěle,
- fistulující perianální onemocnění,
- nutnost zahájení anti-TNF terapie.

Do studie nebyli zařazeni pacienti, kteří se již vstupně v době diagnózy prezentovali některou z těchto komplikací, a dále pacienti s předchozí diagnózou IBDU. Ve výsledku náš soubor čítal 63 pacientů. Z těchto 63 pacientů, kteří splnili vstupní kritéria, jich 19 rozvinulo komplikace. U 15 z nich se jednalo o nutnost nasazení anti-TNF terapie, 3 pacienti pak rozvinuli intraabdominální absces a 1 pacient strikturu s prestenotickou dilatací. Mezi skupinami pacientů s a bez komplikací nebyl nalezen signifikantní rozdíl v GHAS ( $p = 0,136$ ) ani PCDAI ( $p = 0,934$ ). Byl však prokázán rozdíl v SES-CD ( $p = 0,046$ ). SES-CD > 15 bodů se navíc ukázalo být nezávislým prediktorem rozvoje komplikací (HR = 3,20;  $p = 0,04$ ) (obr. 4).

Co se týče vzájemných korelací daných skóre, prokázali jsme jen slabou korelaci mezi GHAS a SES-CD ( $r = 0,48$ ;  $p = 0,0001$ ) a žádnou korelaci mezi GHAS a PCDAI ( $r = 0,15$ ;  $p = 0,24$ ).



**A**



**B**

#### **Obr. 4.**

**A** – Krabicový graf porovnávající hodnoty Simple Endoscopic Score (SES) u pacientů s rozvojem a bez rozvoje komplikací v průběhu 1 roku sledování.

**B** – Kaplan-Meierovy křivky přežití nekomplikovaného průběhu onemocnění u dětí se Simple Endoscopic Score  $\leq 15$  body a dětí s  $> 16$  body.

#### **4.1.1. Diskuze**

Histopatologických skórovacích systémů pro IBD je značné množství, většina z nich je však vytvořena pro UC, minimum z nich je validovaných a žádné není vytvořené primárně pro dětské pacienty či pacienty s IBDU. Korelace příslušných skóre s endoskopickým nálezem není ideální, zejména v případě CD (Geboes K. *et al.*, 2005). Na vině je nejspíše samotný biologický charakter onemocnění, které vykazuje fokální charakter zánětu na makroskopické i mikroskopické úrovni, což vede k riziku falešně negativních výsledků v rozsahu endoskopicky odebraných milimetrových bioptických vzorků. Endoskopie, která dokáže přehlédnout celý lumenální povrch střeva, v tomto podává validnější informaci. Výsledky naší studie, kdy jsme prokázali špatnou korelaci mikroskopie s endoskopickým a klinickým obrazem i u dětí s CD, tak nejsou překvapující. Histopatologické hodnocení aktivity zánětu u IBD s sebou nese i řadu dalších, obecnějších limitací. Roli může hrát například hodnocení slizničních defektů, které nemusí být v odběru přehledně zastíženy nebo je zastíženo jen jejich mělký okraj (příčemž řada skórovacích systémů rozlišuje mezi mělkou erozí a hlubokou ulcerací). Pro pacienta je také zásadní, jestli se jedná o odběr z jednoho drobného defektu či jde střevo s extenzivně ulcerovaným povrchem ve většině svého rozsahu, což mikroskopie obtížně posoudí.

Nicméně, ideální skórovací index by neměl jen validně odrážet aktuální intenzitu a aktivitu zánětu, ale měl by mít i prediktivní schopnost stran rozvoje případného komplikovaného průběhu onemocnění. Prognostický význam mikroskopie je však u pacientů s IBD sporný. Dle některých studií (Riley SA. *et al.*, 1991; Wright R. a Truelove SR., 1966) má u dospělých pacientů s UC kombinace mikroskopie a endoskopie lepší výpovědní hodnotu stran predikce klinického průběhu než endoskopie samotná. Konkrétně Geboesovo skóre predikuje rozvoj klinického relapsu u pacientů s UC v klinické i endoskopické remisi (Magro F. *et al.*, 2013; Bessissow T. *et al.*, 2012). Pro Nancy Histological Index a Robartsovo skóre

zatím v tomto směru nejsou k dispozici validní data. V případě CD studie od Baars a spol. (Baars JE. et al., 2012) neprokázala asociaci histopatologického nálezu s klinickým relapsem onemocnění, rozvojem striktury či nutností chirurgického zákroku.

U dětí nebyla prediktivní schopnost histopatologických skórovacích systémů doposud zkoumána. Dle studie od Fernandes a spol. (Fernandes MA. et al., 2016) přidání histologie k Pařížské klasifikaci zvýšilo rozsah postižených úseků střeva u dětí s CD, UC i IBDU, není však zřejmé, zda má toto extenzivnější hodnocení rozsahu postižení prediktivní význam či jakoukoliv relevanci pro následný terapeutický management. V naší studii se GHAS, v souladu s předpoklady, neukázal být prediktorem komplikací u dětí s CD. Oproti tomu, SES-CD se ukázalo být nezávislým prediktorem rozvoje komplikací.

#### **4.2. Prediktivní hodnota imunohistochemického průkazu tkáňového kalprotektinu u dětí s komplikovaným průběhem ulcerózní kolitidy**

*Studie byla publikována v časopise Pathology: research and practice v roce 2019*

**Fabián O, Hradský O, Lerchová T, Mikuš F, Zámečník J, Bronský J.** Limited clinical significance of tissue calprotectin levels in bowel mucosa for the prediction of complicated course of the disease in children with ulcerative colitis. *Pathol Res Pract* 2019; 215(12): 152689.

Studie se pokoušela nalézt nové, specializovanější metody detekce mikroskopické aktivity zánětu u dětí s IBD. S tímto cílem jsme se zaměřili na imunohistochemickou detekci TCPT, který by mohl přesněji odrážet histopatologickou aktivitu zánětu a sloužit jako prediktor komplikovaného průběhu u dětí s UC. Zajímala nás i jeho korelace s histopatologickými, endoskopickými a klinickými skóre aktivity zánětu.

Po vstupní revizi a objektivizaci mikroskopických, endoskopických a klinických nálezů jsme u všech pacientů (n = 49) provedli imunohistochemický průkaz TCPT ve tkáňových řezech a kvantifikovali počet CPT+ buněk na 1 zorné pole mikroskopu s velkým zvětšením (HPF; 400x; 0,24 mm<sup>2</sup>) (obr. 5). Pacienti byli následně sledováni po dobu minimálně jednoho roku, v jehož průběhu jsme pátrali po přítomnosti konkrétních komplikací, které jsme rozdělili do tří podskupin podle své závažnosti (přičemž skupina A byla považována za nejzávažnější):

A

- Rozvoj ASC, definované jako PUCAI > 65
- Nutnost kolektomie
- Nutnost zahájení anti-TNF terapie

B

- Nutnost zahájení systémové kortikoterapie (CS)

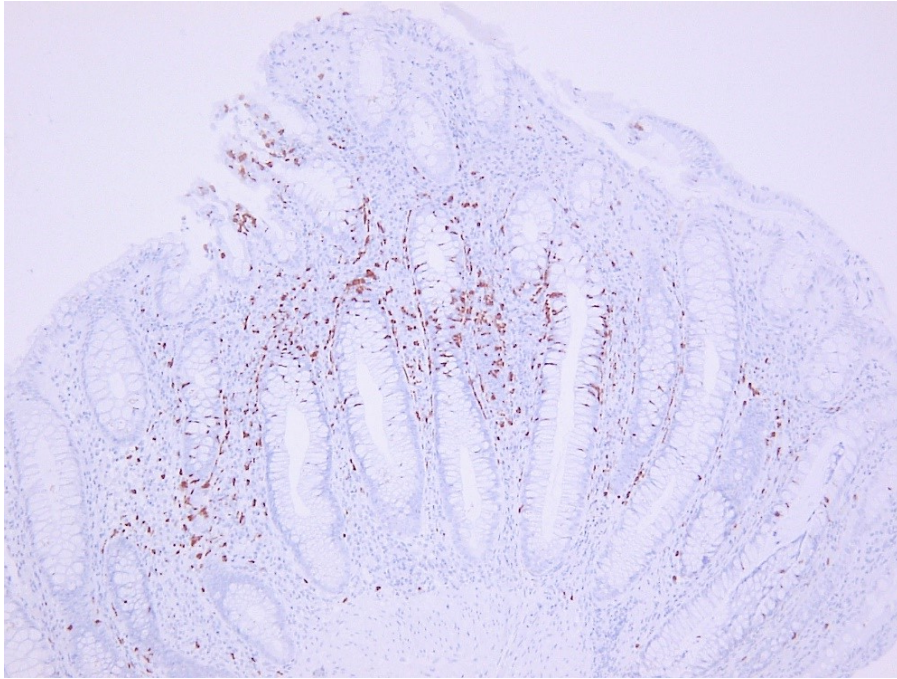
C

- Nutnost zahájení systémové terapie 5-aminosalicylovou kyselinou (5ASA)

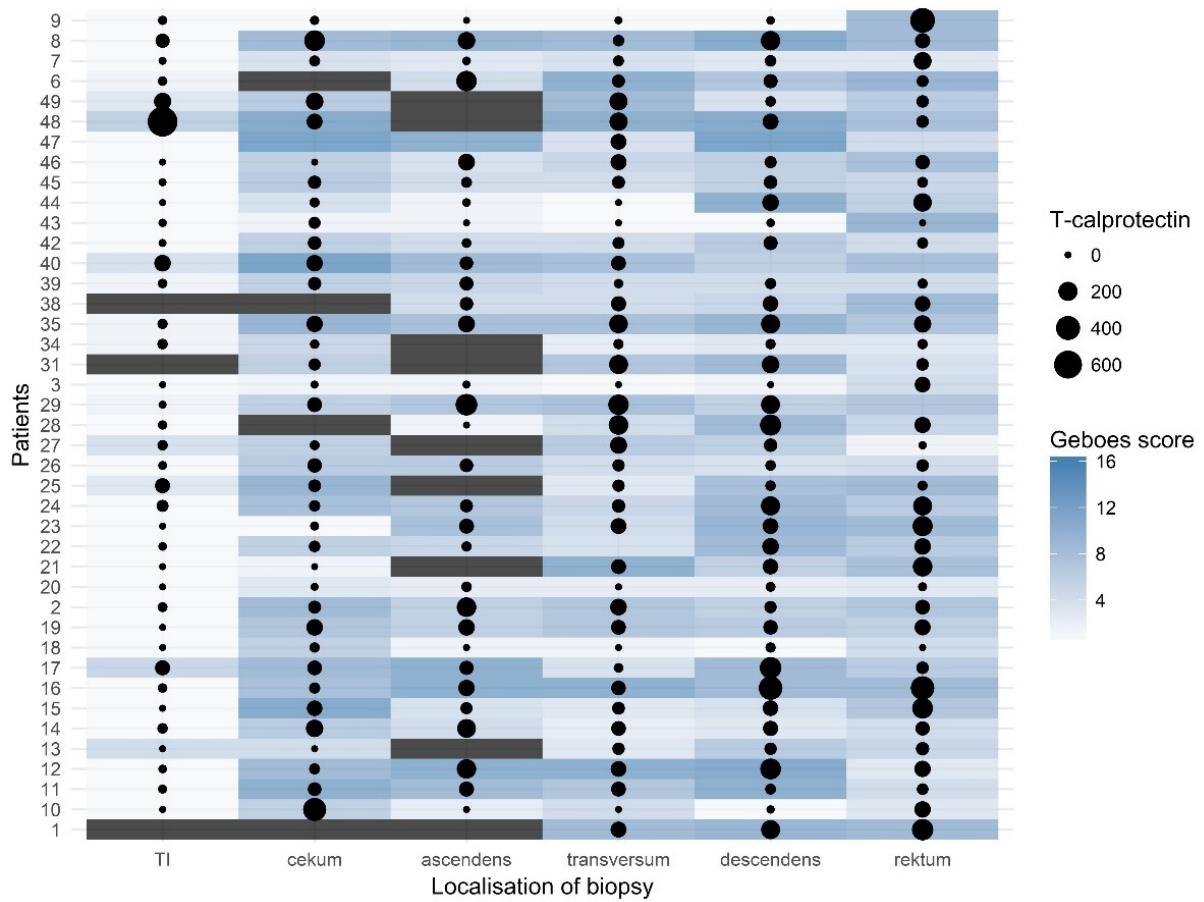
Cíl C se týkal pacientů s ulcerózní proktitidou, jelikož léčba u těchto pacientů byla zahájena topickými steroidy. Pokud na dané terapii selhali a museli být převedeni na systémové 5ASA, byla tato změna považována za komplikaci.

Hladiny TCPT ani hodnoty UCEIS, Geboesova skóre či Nancy Histological Index nepredikovaly žádnou z daných komplikací. Nicméně, hladiny FCPT a střední klinická aktivita zánětu (definována jako PUCAI > 40) se ukázaly být nezávislým prediktorem cílů B (HR 0,422 při  $p = 0,04$  pro FCPT a HR 2,98 při  $p = 0,048$  pro PUCAI) a C (HR 2,517 při  $p = 0,026$  pro FCPT a HR 0,98 při  $p = 0,048$  pro PUCAI), čili nutnosti zahájení systémové CS a 5ASA terapie.

Dále byla nalezena dobrá korelace mezi mediány hodnot TCPT a obou histopatologických skóre ( $k = 0,65$  pro Geboes score a  $k = 0,62$  pro Nancy index při  $p < 0,001$ ) (obr. 6). Slabou korelaci jsme pak prokázali mezi TCPT a UCEIS ( $k = 0,38$ ;  $p = 0,02$ ), mezi TCPT a FCPT ( $k = 0,44$ ;  $p = 0,01$ ) a mezi TCPT a PUCAI ( $k = 0,42$ ;  $p = 0,01$ ). FCPT pak slabě koreloval s histopatologickými skóre ( $k = 0,39$  při  $p = 0,025$  pro Geboes score a  $k = 0,38$  při  $p = 0,03$  pro Nancy Index) a UCEIS ( $k = 0,36$ ;  $p = 0,039$ ) a nekoreloval s PUCAI ( $k = 0,63$ ;  $p = 0,06$ ).



**Obr. 5.** Imunohistochemický průkaz kalprotektinu v buňkách střevní sliznice



**Obr. 6.** Heat mapa znázorňující distribuci hodnot Geboesova skóre a počtu kalprotektin pozitivních buněk ve všech segmentech střeva.

#### 4.2.1. Diskuze

Jedná se o první studii, která zkoumala přínos imunohistochemické detekce TCPT u dětí s IBD. Důvodem pro nás byly limitace fekální detekce CPT. Ačkoliv jde o velmi dobrý, a hlavně neinvazivní marker aktivity střevního zánětu, není specifický pro žádnou konkrétní chorobu, a navíc je detekován až ve stolici, díky čemuž bez korelace s jinými diagnostickými modalitami (například endoskopií) není možné určení lokality zánětu. V některých případech může být navíc falešně pozitivní i falešně negativní. Obyčejná příprava střeva před výkonem může vést k normalizaci jeho hodnot (Kolho KL. et al., 2012), a naopak někteří pacienti s dráždivým tračníkem mohou vykazovat zvýšené hladiny FCPT, nejspíš z důvodu střevní dysbiózy (D'Angelo F. et al., 2017). Dále až čtvrtina dospělé populace vykazuje zvýšené hodnoty FCPT, nejspíše z důvodu výskytu sporadických adenomů (Poullis A. et al., 2004). Dětská populace může mít vyšší hladiny FCPT i fyziologicky, při použití dospělé hodnoty cut-off 50 mg/g stolice má až 17 % zdravých dětí falešně pozitivní nález (Degraeuwe PL. et al., 2015). Proto jsme předpokládali, že by přímý průkaz CPT ve tkáni z bioptických vzorků střevní sliznice mohl lépe odrážet aktuální aktivitu zánětu a mít tak lepší prediktivní schopnost stran rozvoje komplikací. Zejména u pacientů s histologicky neaktivním chronickým zánětem (bez přítomnosti neutrofilů) ve střevní sliznici by mohla detekce TCPT sloužit jako zpřesnění standardní mikroskopie. Jelikož jsme v naší studii našli dobrou korelaci mezi TCPT a histopatologickými skóre aktivity zánětu, TCPT tak nejspíše skutečně validně odráží aktuální tíži mikroskopické aktivity onemocnění. Nicméně, TCPT ani histopatologická skóre nepredikovaly žádnou z námi definovaných komplikací. V případě FCPT naše práce potvrzuje výsledky předchozích studií (Fagerberg UL. et al., 2007; Ricciuto A. et al., 2018) a dokládá sice slabou, ale signifikantní korelaci mezi FCPT a endoskopickou aktivitou zánětu. Zároveň naše výsledky v souladu s dřívějšími pracemi (Sipponen T. a Kolho KL., 2010) neprokazují korelaci mezi FCPT a klinickými skóre aktivity onemocnění, konkrétně PUCAI. Oproti předchozí práci od Hradského a spol. (Hradský O. et al., 2014) jsme našli jen slabou korelaci mezi FCPT a histopatologickými skóre aktivity zánětu. Prediktivní schopnost FCPT je doložená u pacientů v klinické remisi, u kterých se FCPT ukázal být prediktorem relapsu (Theede K. et al., 2016). Chybí však validní data, která by dokládala prediktivní schopnost FCPT v době diagnózy. Naše studie dokládá schopnost FCPT predikovat v době diagnózy nutnost zahájení systémové CS a 5ASA terapie. Obdobnou prediktivní hodnotu jsme zjistili i u střední klinické aktivity onemocnění (PUCAI > 40). Tento výsledek se liší od předchozích prací, ve kterých hodnoty PUCAI v době diagnózy nebyly

spojeny s nutností 5ASA terapie či imunomodulační terapie (Zeisler B. et al., 2013; Mossop H. et al., 2008).

### **4.3. Tkáňový kalprotektin jako prediktor rekurence Crohnovy choroby u dětí po ileocékální resekcí**

*Práce je aktuálně odeslána ke zvážení přijetí do zahraničního impaktovaného periodika.*

Tato studie se soustředila na nalezení nových histopatologických prediktorů rekurence onemocnění u dětí s CD po IC resekcí se zvláštním zaměřením na průkaz TCPT v resekcčních okrajů IC resekatů.

Vstupní kritéria splnilo 48 pacientů. U všech byla zjišťována základní klinická a chirurgická data (jiné provedené chirurgické zákroky kromě IC resekcí; rozsah resekcí; typ terapie; přítomnost penetrujícího postižení; hladiny FCPT a základní laboratorní data). Dále byl zpětně zrevidován histopatologický materiál z resekcčních okrajů IC resekatů, kde bylo pátráno po přítomnosti následujících mikroskopických proměnných:

- intenzita chronického zánětu,
- intenzita aktivního zánětu (neutrofilů v lamina propria, v epitelu a přítomnost slizničních defektů),
- intenzita esinofilní zánětlivé celulizace,
- porucha architektiky sliznice,
- epiteloidní granulomy,
- bazální plazmocytoza,
- pylorická metaplázie,
- fibrotizace,
- lymfocytární lymfangitida,
- transmurální lymfatické agregáty,
- submukózní plexitida,
- myenterická plexitida,
- hyperplázie myenterického plexu,

- obliterativní vaskulopatie,
- akutní fibrinózně-hnisavá peritonitida,
- chronická adhezivní peritonitida.

Na bioptický materiál z proximálního i distálního resekčního okraje byl následně proveden imunohistochemický průkaz TCPT a byly kvantifikovány pozitivní buňky na 1HPF. Změny byly hodnoceny separátně pro proximální a distální okraj. V další fázi byl zhodnocen mikroskopický nále z bioptických vzorků odebraných při kontrolní endoskopii po 6 měsících a mikroskopická intenzita zánětu byla objektivizována užitím GHAS. V době kontroly byla znovu zhodnocena i endoskopická, klinická a laboratorní data. Endoskopický nále z a případné známky endoskopické rekurence v anastomóze byly hodnoceny dle Rutgeertsova skóre. V rámci studie jsme zjišťovali i přítomnost rekurence v horním GIT a v oblasti tlustého střeva, k čemuž složilo modifikované SES-CD (mSES-CD), které obsahovalo stejné proměnné jako standardní SES-CD, pouze bylo použito separátně pro jícen, žaludeční tělo, žaludeční antrum, duodenum, pravostranné colon, colon transversum, levostranné colon a rektum. Endoskopická rekurence byla definována jako Rutgeerts  $\geq$  i2 a/nebo mSES-CD v horním GIT či tlustém střevě  $>$  3.

25 pacientů mělo v době kontroly známky endoskopické rekurence (12 pacientů i2, 5 i3 a 8 i4). Z pacientů v endoskopické remisi pak 1 vykazoval známky rekurence v tlustém střevě a 4 v horním GIT. Nebyla nalezena žádná souvislost mezi počtem CPT+ buněk v distálním resekčním okraji a rozvojem rekurence, v proximálním okraji byla dokonce prokázána negativní asociace (OR = 0,969; p = 0,008). Z dalších histopatologických znaků byla s rozvojem rekurence asociována přítomnost akutní a chronické peritonitidy (OR = 4,15; p = 0,048). Z ostatních testovaných proměnných byly s rozvojem rekurence asociovány nízká sérová hladina albuminu v době diagnózy i v době endoskopické kontroly po 6 měsících, avšak pouze po adjustaci na podskupinu pacientů na biologické terapii (OR = 0,851; p = 0,039 v době diagnózy, OR = 0,759; p = 0,011 v době kontroly), a dále vyšší hodnoty CRP v době endoskopické kontroly (OR = 2,21; p < 0,001) (obr. 7).



pacientů ve výše zmíněných pracích i v naší studii lze zdůraznit nutnost pravidelného sledování těchto pacientů, což se odrazí i v oficiálních doporučeních European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN), která doporučují endoskopickou kontrolu v rozmezí 6-9 měsíců po resekci (Tham YS. et al., 2018).

Imunohistochemický průkaz TCPT u pacientů po IC resekci nebyl dosud zkoumán. Dle našich výsledků nelze tuto metodu doporučit jako vhodný prediktor pooperační rekurence. Oproti předchozím studiím na dospělých pacientech jsme neprokázali ani prediktivní hodnotu myenterické či submukózní plexitidy. Potencionálním novým histopatologickým prediktorem by ale mohla být přítomnost akutní i chronické peritonitidy v resekčních okrajích, jak jsme ukázali v naší práci.

FCPT je standardně používán jako neinvazivní biomarker pooperační rekurence, což dokládá i řada studií (Hukkinen M. et al., 2016; Kamath AF. et al., 2017). Naše výsledky dřívější nálezy nepodporuje, neboť jsme neprokázali asociaci mezi hladinami FCPT v době kontrolní endoskopie a endoskopickou rekurencí. CRP je dle dostupných studií sice méně spolehlivým markerem než FCPT (Tham YS. et al., 2018; de Cruz P. et al., 2015), v naší práci však byl prediktorem rekurence v době endoskopické kontroly. Lze tak předpokládat, že na rekurenci může mít vliv i přítomnost systémového zánětu, přičemž hladiny FCPT mohou být po vyléčení postižené části střeva normalizované.

Nízká hladina sérového albuminu odráží slabý nutriční status pacientů. Výše zmíněná studie od Zárubové a spol. prokázala nízké sérový albumin jako prediktor rekurence u dětí léčených pouze monoterapií azathioprinem. Naše práce tento závěr potvrzuje i u pacientů na biologické terapii. V rozvoji pooperační rekurence tak nejspíše bude hrát roli i nutriční status pacienta.

#### **4.4. Diagnostický přínos imunohistochemické detekce CD30+ lymfocytů ve střevní sliznici u dětí se zánětlivými střevními onemocněními**

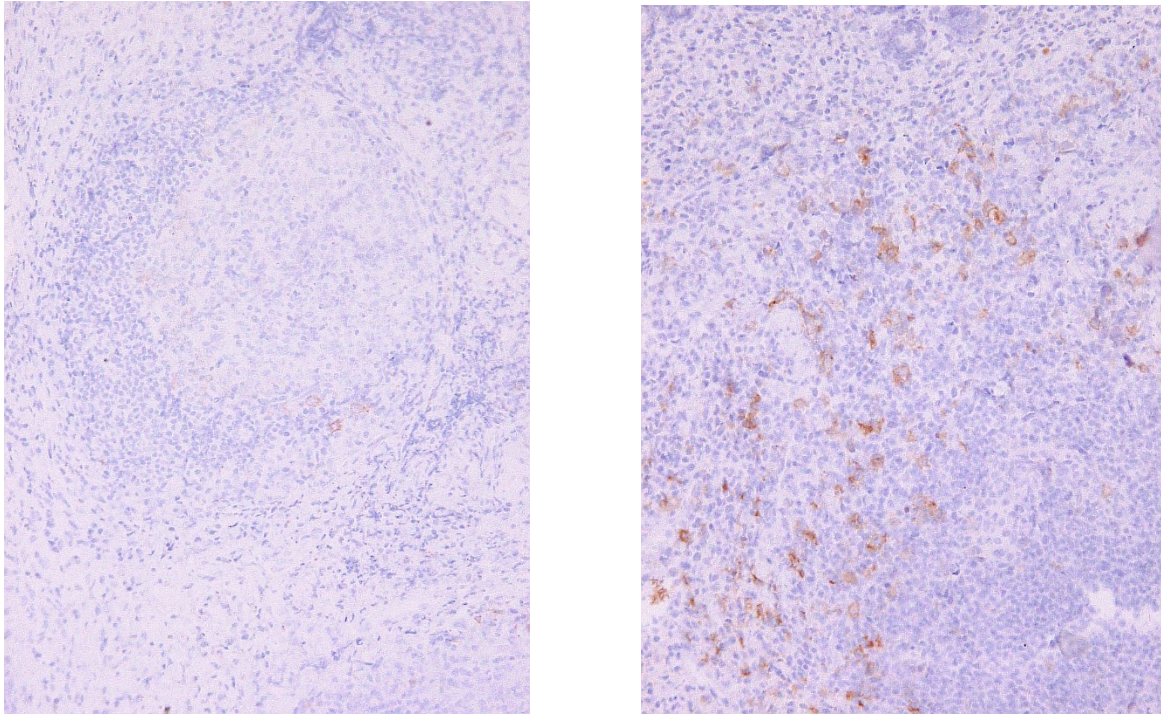
*Studie byla publikována v časopise **Digestive Diseases and Sciences** v roce 2018*

Fabián O, Hradský O, Dršková T, Mikuš F, Zámečník J, Bronský J. Immunohistochemical Assessment of CD30+ Lymphocytes in the Intestinal Mucosa Facilitates Diagnosis of Pediatric Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci* 2018; 63(7): 1811-1818.

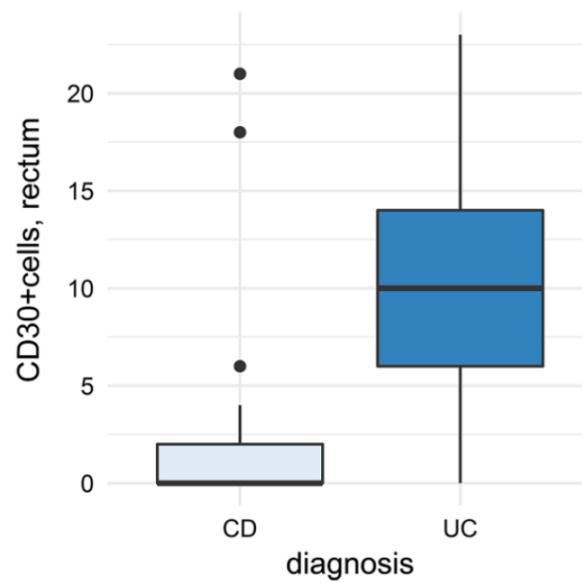
Cílem této práce bylo zpřesnění diagnostiky dětské CD a UC. Pro tento cíl jsme se rozhodli využít detekce CD30+ lymfocytů ve střevní sliznici, jejichž hladiny by dle dostupných prací mohly být vyšší u dětí s UC. Dále nás zajímalo, zda hladiny CD30+ lymfocytů mohou složit i jako prediktor budoucí diference v CD a UC u dětí s IBDU.

Do studie vstoupilo 29 pacientů s CD, 31 s UC a 14 s IBDU. Pacienti byli sledováni po dobu minimálně 18 měsíců, zda u některých dětí s UC či IBDU nedojde k manifestaci CD znaků, které by vedly k překlasifikování choroby. Cílem bylo získat do studie pacienty se stabilní diagnózou, což bylo důležité zejména pro skupinu IBDU. V průběhu zmíněného období 3 pacienti s IBDU a 1 s UC rozvinuli CD znaky (ve všech případech perianální onemocnění) a byli tak překlasifikováni na CD. U všech pacientů byl zpětně zhodnocen histopatologický nález a proveden imunohistochemický průkaz antigenu CD30. Vzhledem k faktu, že pro IBDU pacienty dosud nexistuje žádný skórovací systém, vytvořili jsme pro potřeby studie vlastní jednoduché skóre, které shrnuje tabulka č. 11. CD30+ lymfocyty pak byly počítány na 1 HPF.

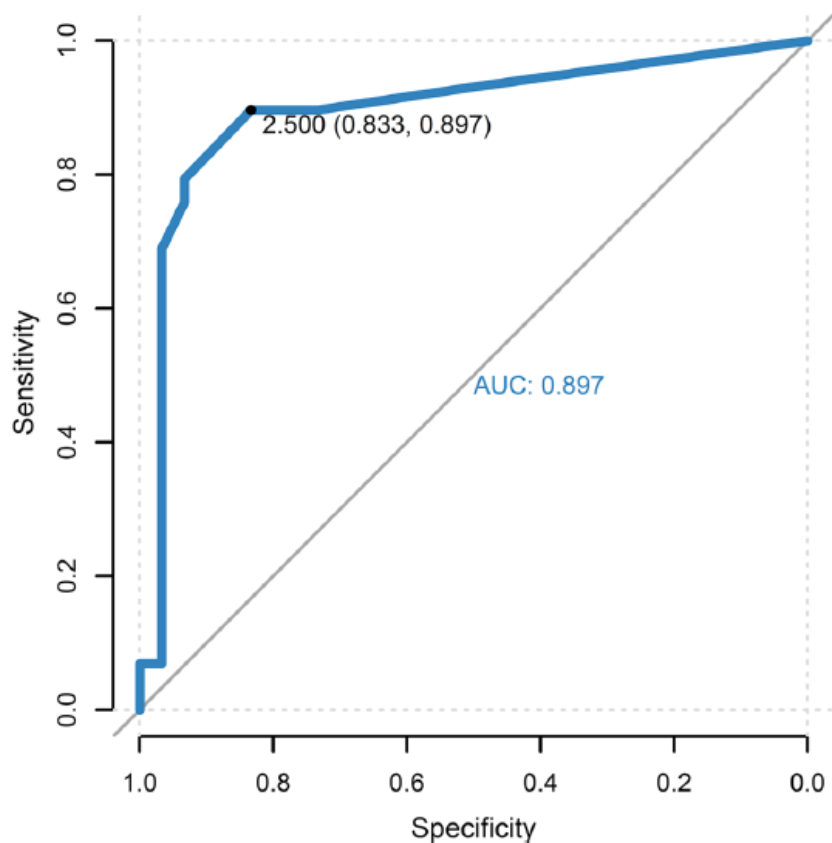
Ve všech segmentech střeva s výjimkou céka a colon ascendens se nám podařilo najít statisticky signifikantní rozdíl v mediánech, průměrných hodnotách i maximálních hodnotách CD30+ lymfocytů mezi CD a UC pacienty. Statisticky nesignifikantní rozdíl byl navíc patrný i v céku a ascendens. Nejvyšší rozdíl byl nalezen v oblasti rekta ( $p < 0,001$ ) (obr. 8 a 9). Na základě analýzy plochy pod křivkou jsme pro rektální lokalizaci následně našli hodnotu cut-off 2,5 pozitivních buněk, které bylo schopné rozlišit CD a UC s 83% senzitivitou a 90% specificitou (obr. 10). Tento rozdíl byl nezávislý na endoskopické i mikroskopické aktivitě zánětu, a také na přítomnosti lymfatických folikulů ( $p < 0,0001$ ), u kterých jsme se obávali případného falešného nadhodnocení počtu CD30+ lymfocytů (zejména v oblasti Peyerských plaků). Nalezená hodnota cut-off byla následně použita pro analýzu skupiny pacientů s IBDU. Nebyl nalezen rozdíl mezi pacienty s CD a IBDU ( $p = 0,8$ ), avšak byl prokázán rozdíl mezi IBDU a UC ( $p = 0,007$ ).



**Obr. 8.** Imunohistochemický průkaz CD30+ lymfocytů ve střevní sliznici.  
**A** – Crohnova choroba, **B** – ulcerózní kolitida



**Obr. 9.** Krabicový graf porovnávající počty CD30+ buněk ve sliznici rektu u dětí s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou.



**Obr. 10.** ROC křivka stanovující cut-off počtu CD30+ lymfocytů ve sliznici rektu k optimálnímu rozlišení mezi Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou.

**Tabulka 11.**

Univerzální histopatologické skóre pro hodnocení mikroskopické aktivity zánětu u IBD.

Grade	Histopatologická změna
0	Bez zánětu
1	Pouze chronický zánět (lymfocyty, plazmatické buňky)
2	Neutrofily v lamina propria
3	Neutrofily v epitelu (povrchový epitel, kryptitida, kryptové abscesy)
4	Slizniční defekt (eroze nebo ulcerace)

IBD = zánětlivá střevní onemocnění

#### 4.4.1. Diskuze

Význam slizničních CD30+ lymfocytů v diagnostice IBD byl doposud zkoumán jen okrajově a pro dětskou populaci žádná studie tohoto typu do této doby neexistovala. V době našeho výzkumu byla známá jediná publikace (Flores C. et al., 2015), která se tímto tématem zabývala. Autoři práce na souboru dospělých pacientů s IBD detekovali počty CD30+ lymfocytů v endoskopicky nejpostiženější části střeva a prokázali signifikantně vyšší počty těchto buněk u pacientů s UC. Cílem naší práce bylo ověřit tuto premisu na dětské populaci, otestovat její nezávislost na intenzitě zánětu a lokalizaci onemocnění a také posoudit hladiny CD30+ buněk u IBDU pacientů. Výsledky naší práce, ve které jsme prokázali signifikantní rozdíl mezi CD a UC pacienty téměř ve všech etážích GIT, korespondují s výše uvedenou studií a také s prací od autorů Giacomelli a spol. (Giacomelli R. et al., 1998), dokládající vyšší hodnoty CD30 u pacientů s UC v séru. Za důležitý považujeme fakt, že rozdíly byly nezávislé na intenzitě zánětu, a tudíž námi nalezená hodnota cut-off by mohla být použitelná i pro pacienty s jen mírným zánětem v rektu. Výsledky naší práce dále naznačují, že pacienti s UC by mohli v budoucnu profitovat z cílené anti-CD30 terapie. V současné době je tato léčba zvažována u pacientů s některými typy lymfomů (Schirrmann T. et al., 2014; Fabbri A. et al., 2017). U pacientů s IBDU by pak mohl rozpočet slizničních CD30+ lymfocytů sloužit jako marker budoucí diferenciaci v UC. Současné diagnosticko-terapeutické postupy totiž neumožňují reklasifikaci IBDU na UC, jelikož UC je negativní diagnózou, založenou na absenci CD znaků. Pacienti s IBDU refrakterní k dosavadní terapii, kteří vykazují vysoké slizniční hladiny CD30+ lymfocytů, by tak mohli představovat jedince s budoucí diferenciací v UC.

Otázkou pak zůstává i samotná biologická povaha IBDU. Ta byla tradičně chápána jako dočasná diagnóza nejistoty. Dle některých recentních prací (Cleynen I. Et al., 2016) by však IBDU mohla představovat samostatný podtyp IBD s vlastním charakteristickým genetickým profilem. Z této hypotézy vycházela i naše studie, kdy jsme se zařazením 18měsíčního sledování snažili vyselektovat stabilní IBDU pacienty s minimálním rizikem budoucí diferenciaci v CD. Námi nalezený signifikantní rozdíl mezi IBDU a UC v počtech CD30+ lymfocytů by tak mohl znamenat, že IBDU má biologicky blíže k CD. Nicméně, současná léčebná strategie u IBDU pacientů je mnohem bližší UC nežli CD (Turner D. et al., 2012). Nabízí se tak otázka, zda by pacienti s IBDU nemohli profitovat ze změny terapie. Nicméně, tato hypotéza je založená na velmi malém počtu dětí v IBDU skupině a musí tak být ověřena dalšími (nejlépe multicentrickými) studiemi v budoucnu.

## **5. ZÁVĚRY**

### **5.1. Prediktivní hodnota histopatologického skórovacího systému u dětí s komplikovaným průběhem Crohnovy choroby**

- Mikroskopická aktivita zánětu stanovená skórovacím systémem GHAS jen slabě koreluje s endoskopickou aktivitou zánětu a nekoreluje s klinickou aktivitou zánětu u dětí s CD.
- Histopatologický skórovací systém nemůže být doporučen jako vhodný prediktor komplikovaného průběhu onemocnění u dětí s CD.
- Oproti tomu endoskopická aktivita zánětu stanovená pomocí SES-CD může sloužit jako nezávislý prediktor rozvoje komplikací u dětské CD.

### **5.2. Prediktivní hodnota imunohistochemického průkazu tkáňového kalprotektinu u dětí s komplikovaným průběhem ulcerózní kolitidy**

- Byla nalezena dobrá korelace hladiny TCPT s histopatologickými skóre aktivity zánětu u dětí s UC; nicméně hladina TCPT se neukázala být vhodným prediktorem komplikovaného průběhu onemocnění.
- Hladiny FCPT v době diagnózy a střední klinická aktivita zánětu stanovená pomocí skórovacího systému PUCAI se ukázaly být nezávislými prediktory nutnosti zahájení CS a 5ASA terapie.

### **5.3. Tkáňový kalprotektin jako prediktor rekurence Crohnovy choroby u dětí po ileocékální resekci**

- Hladiny CPT+ buněk v resekčních okrajích IC resekatů nejsou prediktorem endoskopické rekurence onemocnění po 6 měsících u dětí s CD.

- Nízký sérový albumin a vysoké CRP v době operace a vysoký FCPT v době endoskopické kontroly po 6 měsících predikovaly rozvoj endoskopické rekurence.

#### **5.4. Diagnostický přínos imunohistochemické detekce CD30+ lymfocytů ve střevní sliznici u dětí se zánětlivými střevními onemocněními**

- Histopatologické vyšetření bioptických vzorků střevní sliznice u dětí s IBD spolu s imunohistochemickým průkazem CD30+ lymfocytů v rektu by mohly být slibným nástrojem k lepšímu rozlišení CD a UC v dětském věku.
- Děti s UC by mohly v budoucnu profitovat z cílené anti-CD30 terapie.

## 6. SOUHRN

Cílem předkládané dizertační práce je doložit přínos a limitace histopatologického hodnocení bioptických vzorků u dětí se zánětlivými střevními onemocněními (IBD) v diagnostice a zejména pak v predikci komplikovaného průběhu onemocnění. Dále si klademe za cíl prokázat případný benefit specializovanějších histopatologických metod v těchto dvou oblastech.

V první fázi našeho výzkumu jsme se zaměřili na korelaci mikroskopické aktivity zánětu s aktivitou hodnocenou endoskopicky a klinicky u dětí s Crohnovou chorobou (CD). Zajímala nás i role histopatologického vyšetření jako možného prediktoru rozvoje komplikací. Vycházeli jsme z předchozích prací na toto téma v dospělé populaci, které v tomto směru udávají jen limitovaný přínos histopatologické vyšetření. Naše studie tuto premisu potvrdila i u dětských pacientů, jelikož histopatologický nález jen slabě koreloval s endoskopickým nálezem, nekoreloval s klinickou aktivitou onemocnění a nepredikoval definované komplikace. Endoskopická tíže zánětlivého postižení se oproti tomu ukázala jako vhodný prediktor komplikovaného průběhu onemocnění.

V další fázi výzkumu jsme se snažili hledat jiné, přesnější metody hodnocení histopatologické aktivity zánětu, které by mohly sloužit jako prediktor komplikací. Zaměřili jsme se na imunohistochemický průkaz tkáňového kalprotektinu (CPT). Jakožto produkt neutrofilů je v případě aktivního zánětu v trávicím traktu uvolňován do sliznice a následně do lumen střeva. Dle naší hypotézy by jeho přímý průkaz ve tkáni mohl zpřesnit hodnocení aktivního zánětu u dětí s IBD. Provedli jsme na toto téma dvě práce, jednu na souboru dětských pacientů s ulcerózní kolitidou (UC) a druhou na souboru dětí s CD, které podstoupily ileocékální (IC) resekci a my stanovovali tkáňový CPT v resekčních okrajích IC resekátů. V první jmenované studii jsme zjistili, tkáňový CPT sice dobře koreloval s mikroskopickou aktivitou zánětu stanovenou standardními histopatologickými skóre, špatně však koreloval s endoskopickou aktivitou zánětu, hladinami fekálního CPT a klinickou aktivitou onemocnění a neměl, podobně jako samotné histopatologické vyšetření, prediktivní schopnost stran rozvoje komplikací. Oproti tomu, hladiny fekálního CPT i střední klinická aktivita zánětu (definovaná jako Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index > 40) predikovaly nutnost zahájení systémové kortikoterapie a terapie 5-aminosalicylovou kyselinou. Ani ve druhé studii na toto téma jsme nepotvrdili, že by zpřesnění hodnocení aktivity zánětu v resekčních okrajích IC resekátů predikovalo rozvoj komplikací, v tomto případě endoskopické rekurence po 6 měsících od operace. Jako prediktor se však ukázala být přítomnost akutní a

chronické peritonitidy v resekčních okrajích a dále i vyšší hladiny CRP a nízký sérový albumin v době diagnózy a vysoký fekální CPT v době kontroly.

Třetí oblast našeho výzkumu se pak zaměřila na možnosti zlepšení diagnostiky dětských IBD. Cílili jsme se na imunohistochemický průkaz CD30+ lymfocytů ve střevní sliznici u dětí s CD, UC i neklasifikovanou IBD (IBDU). Jelikož dosavadní poznatky o imunopatogenezi IBD naznačovaly, že by děti s UC mohly mít vyšší hodnoty CD30+ lymfocytů v séru i střevní sliznici, rozhodli jsme se tuto detekci využít jako potenciální marker diference v UC. Naše práce prokázala signifikantní rozdíl v počtech CD30+ lymfocytů ve sliznici téměř všech etází střeva, s maximem v rektu. Děti s UC vykazovaly výrazně vyšší hodnoty CD30+ buněk a podařilo se nám nalézt i hodnotu cut-off, schopnou rozlišit mezi CD od UC s téměř 90% senzitivitou a specificitou. Výsledek dává i naději do budoucna v podobě případné cílené anti-CD30 terapie. Soustředili jsme se i na detekci CD30+ lymfocytů u dětí s IBDU. Nalezený signifikantní rozdíl mezi UC a IBDU pacienty by mohl v budoucnu selektovat IBDU pacienty s možnou diferenciací v UC.

## 7. ABSTRACT

The aim of the presented thesis is to summarize a benefit and limitations of histopathological assessment of bioptic samples for diagnostics and prediction of complicated course of the disease in children with inflammatory bowel diseases (IBD). We would also like to outline a potential benefit of more sophisticated histopathological methods in these domains.

In the first phase of our research, we aimed at correlation of microscopical disease activity in children with Crohn's disease (CD) with activity assessed endoscopically and clinically. We also examined a histopathology as a possible predictor of development of complications, since previous works on adult cohorts indicate only a limited predictive value of microscopy. Our study confirmed this premise also for pediatric patients, since histopathological findings correlated weakly with endoscopy, didn't correlate with clinical activity of the disease and did predict none of the defined complications. On the other hand, endoscopy appeared to be a reliable predictor of complicated course of the disease.

In the next part of our research, we were searching for other, more precise methods of assessment of histopathological disease activity that could serve as predictors of complications. We focused at immunohistochemical assessment of tissue calprotectin (CPT). As a product of neutrophils, this substance is released into mucosa and lumen of the gut in case of active inflammation. Therefore, we speculated, that direct visualization of this substance could pecify the assessment of acute inflammation in children with IBD. The first study was performed on cohort of pediatric patients with ulcerative colitis (UC), the second on children with CD who underwent ileocecal (IC) resection. In the second study, we assessed the tissue CPT in resection margins of resected bowels. In the first study, we demonstrated a good correlation of levels of the tissue CPT with microscopic activity of the inflammation established by standard histopathological scores, but a poor correlation with endoscopy and no correlation with clinical activity of the disease. The tissue CPT had no predictive value for complications development, much like histopathology itself. On the other hand, levels of the fecal CPT and moderate clinical activity of the disease (defined as Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index > 40) predicted a necessity to initiate a systemic 5-aminosalicylic acid therapy and corticotherapy. Neither the second study confirmed that immunohistochemical detection of the tissue CPT could predict a complicated course of the disease, in this case an endoscopic recurrence in 6 months after ileocecal resection. However, a presence of acute and chronic peritonitis in resection margins appeared to be a predictor, as well as a low serum albumin and

elevated CRP at the time of diagnosis and high level of the fecal CPT at the time of endoscopic control.

The third domain of our research focused at improvement of diagnostics of pediatric IBD. We aimed at immunohistochemical assessment of CD30+ lymphocytes in intestinal mucosa in children with CD, UC and IBD unclassified (IBDU). Since the current knowledge about IBD immunopathogenesis indicate that children with UC could have higher levels of CD30+ lymphocytes in serum and intestinal mucosa, we decided to use this detection as a possible marker of UC differentiation. Our work showed a significant difference in numbers of mucosal CD30+ lymphocytes in almost all bowel segments, with maximal difference in rectum. Children with UC showed significantly higher counts of mucosal CD30+ lymphocytes compared to children with CD. We also found a cut-off that was able to differentiate UC from CD with almost 90 % sensitivity a specificity. These results are promising also for a future targeted anti-CD30 therapy. Apart from that, we focused at detection of CD30+ lymphocytes in children with IBDU. A significant difference between UC and IBDU we found could shed a light on biology of IBDU and select IBDU patients with possible future differentiation towards UC.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Allez M, Lemann M, Bonnet J et al.** Long term outcome of patients with active Crohn's disease exhibiting extensive and deep ulcerations at colonoscopy. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(4): 947–953.
- Amil-Dias J, Kolacek S, Turner D et al.** Surgical Management of Crohn Disease in Children: Guidelines From the Paediatric IBD Porto Group of ESPGHAN. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2017; 64(5): 818-835.
- Annese V, Daperno M, Rutter MD et al.** European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2013; 7(12): 982-1018.
- Ardizzone S, Cassinotti A, Duca P et al.** Mucosal healing predicts late outcomes after the first course of corticosteroids for newly diagnosed ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011; 9(6): 483–489.
- Baars JE, Nuij VJ, Oldenburg B et al.** Majority of patients with inflammatory bowel disease in clinical remission have mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18(9): 1634-1640.
- Bernell O, Lapidus A, Hellers G.** Risk factors for surgery and postoperative recurrence in Crohn's disease. *Ann Surg* 2000; 231(1): 38-45.
- Bessissow T, Lemmens B, Ferrante M et al.** Prognostic value of serologic and histologic markers on clinical relapse in ulcerative colitis patients with mucosal healing. *Am J Gastroenterol* 2012; 107(11): 1684-1692.
- Bressenot A, Peyrin-Biroulet L.** Histologic features predicting postoperative Crohn's disease recurrence. *Inflamm Bowel Dis* 2015; 21(2): 468-475.
- Bryant RV, Winer S, Travis SP et al.** Systematic review: histological remission in inflammatory bowel disease. Is 'complete' remission the new treatment paradigm? An IOIBD initiative. *J Crohns Colitis* 2014; 8(12): 1582-1597.
- Buisson A, Chevaux JB, Allen PB et al.** Review article: the natural history of postoperative Crohn's disease recurrence. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 35(6): 625-633.
- Cleynen I, Boucher G, Jostins L et al.** Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet* 2016; 387(10014): 156–167.
- Cobrin GM, Abreu MT.** Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunol Rev* 2005; 206: 277-295.

**Colombel JF, Rutgeerts P, Reinisch W et al.** Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2011; 141(4): 1194–1201.

**Daperno M, D'Haens G, Van Assche G et al.** Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* 2004; 60(4): 505–512.

**Day AS, Ledder O, Leach ST, Lemberg DA.** Crohn's and colitis in children and adolescents. *World J Gastroenterol* 2012; 18(41): 5862–5869.

**de Cruz P, Kamm MA, Hamilton AL et al.** Crohn's disease management after intestinal resection: a randomised trial. *Lancet* 2015; 385(9976): 1406-1417.

**de Souza HS, Fiocchi C.** Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 13(1): 13-27.

**Degraeuwe PL, Beld MP, Ashorn M et al.** Faecal calprotectin in suspected paediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015; 60(3): 339-346.

**D'Angelo F, Felley C, Frossard JL.** Calprotectin in Daily Practice: Where Do We Stand in 2017? *Digestion* 2017; 95(4): 293-301.

**D'Haens GR, Geboes K, Peeters M et al.** Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 1998; 114(2): 262-267.

**Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN et al.** Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308(5728): 1635-1638.

**Fabbri A, Cencini E, Gozzetti A et al.** Therapeutic Use of Brentuximab Vedotin in CD30+ Hematologic Malignancies. *Anticancer Agents Med Chem* 2017; 17(7): 886-895.

**Fagerberg UL, Lööf L, Lindholm J et al.** Fecal calprotectin: a quantitative marker of colonic inflammation in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45(4): 414-420.

**Fernandes MA, Verstraete SG, Garnett EA et al.** Addition of Histology to the Paris Classification of Pediatric Crohn's Disease Alters Classification of Disease Location. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016; 62(2): 242–245.

**Flores C, Francesconi CF, Meurer L.** Quantitative assessment of CD30+ lymphocytes and eosinophils for the histopathological differential diagnosis of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2015; 9(9): 763–768.

**Froslic KF, Jahnsen J, Moum BA et al.** Mucosal healing in inflammatory bowel disease: results from a Norwegian population-based cohort. *Gastroenterology* 2007; 133(2): 412–422.

**Galvez J.** Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. *ISRN Inflamm* 2014; 2014: 928461.

**Geboes K, Riddell R, Ost A et al.** A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut* 2000; 47(3): 404-409.

**Geboes K, Rutgeerts P, Opdenakker G et al.** Endoscopic and histologic evidence of persistent mucosal healing and correlation with clinical improvement following sustained infliximab treatment for Crohn's disease. *Curr Med Res Opin* 2005; 21(11): 1741-1754.

**Giacomelli R, Passacantando A, Parzanese I et al.** Serum levels of soluble CD30 are increased in ulcerative colitis (UC) but not in Crohn's disease (CD). *Clin Exp Immunol* 1998; 111(3): 532–535.

**Gomez P, du Boulay C, Smith CL et al.** Relationship between disease activity indices a colonoscopic findings in patients with colonic inflammatory bowel diseases. *Gut* 1986; 27(1): 92–95.

**Hradský O, Ohem J, Mitrová K et al.** Fecal calprotectin levels in children is more tightly associated with histological than with macroscopic endoscopy findings. *Clin Lab* 2014; 60(12): 1993-2000.

**Hukkinen M, Pakarinen MP, Merras-Salmio L et al.** Fecal calprotectin in the prediction of postoperative recurrence of Crohn's disease in children and adolescents. *J Pediatr Surg* 2016; 51(9): 1467-1472.

**Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS et al.** Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991; 12(4): 439–447.

**Hyams JS, Grand RJ, Colodny AH et al.** Course and prognosis after colectomy and ileostomy for inflammatory bowel disease in childhood and adolescence. *J Pediatr Surg* 1982; 17(4): 400–405.

**Irani NR, Wang LM2, Collins GS et al.** Correlation Between Endoscopic and Histological Activity in Ulcerative Colitis Using Validated Indices. *J Crohns Colitis* 2018; 12(10): 1151-1157.

**Jarkovský J, Benešová K, Hejduk K et al.** Epidemiology, hospitalisation and migration of patients with IBD under specialized care in the Czech Republic. *Gastroent Hepatol* 2017; 71(6): 501-509.

**Jose FA, Garnett EA, Vittinghoff E et al.** Development of extraintestinal manifestations in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15(1): 63–68.

**Jostins L, Ripke S, Weersma RK et al.** Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012; 491(7422): 119-124.

**Kamath AF, Nelson CL, Elkassabany N et al.** Low Albumin Is a Risk Factor for Complications after Revision Total Knee Arthroplasty. *J Knee Surg* 2017; 30(3): 269-275.

**Kolho KL, Alfthan H, Hämäläinen E.** Effect of bowel cleansing for colonoscopy on fecal calprotectin levels in pediatric patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 55(6): 751-753.

**Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK.** IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 485-517.

**Langner C, Magro F, Driessen A et al.** The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide. *Virchows Arch* 2014; 464(5): 511-527.

**Lemmens B, de Buck van Overstraeten A, Arijs I et al.** Submucosal Plexitis as a Predictive Factor for Postoperative Endoscopic Recurrence in Patients with Crohn's Disease Undergoing a Resection with Ileocolonic Anastomosis: Results from a Prospective Single-centre Study. *J Crohns Colitis* 2017; 11(2): 212-220.

**Lesage S, Zouali H, Cezard JP et al.** CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70(4): 845-857.

**Levine A, Koletzko S, Turner D et al.** ESPGHAN revised porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 58(6): 795-806.

**Levine A, Griffiths A, Markowitz J et al.** Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17(6): 1314-1321.

**Loftus EV.** Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126(6): 1504-1517.

**Magro F, Langner C, Driessen A et al.** European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2013; 7(10): 827-851.

**Marchal-Bressenot A, Salleron J, Boulagnon-Rombi C et al.** Development and validation of the Nancy histological index for UC. *Gut* 2017; 66(1): 43-49.

**Martinez C, Antolin M, Santos J et al.** Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(3): 643-648.

**Mary JY, Modigliani R.** Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). *Gut* 1989; 30(7): 983-989.

**Misteli H, Koh CE, Wang LM et al.** Myenteric plexitis at the proximal resection margin is a predictive marker for surgical recurrence of ileocaecal Crohn's disease. *Colorectal Dis* 2015; 17(4): 304-310.

**Mosli MH, Feagan BG, Zou G et al.** Development and validation of a histological index for UC. *Gut* 2017; 66(1): 50-58.

**Mossop H, Davies P, Murphy MS.** Predicting the Need for Azathioprine at First Presentation in Children with Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 47(2): 123-129.

**Navaneethan U, Kochhar G, Phull H et al.** Severe disease on endoscopy and steroid use increase the risk for bowel perforation during colonoscopy in inflammatory bowel disease patients. *J Crohns Colitis* 2012; 6(4): 470–475.

**Poullis A, Foster R, Shetty A et al.** Bowel inflammation as measured by fecal calprotectin: a link between lifestyle factors and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(2): 279-284.

**Ricciuto A, Fish J, Carman N et al.** Symptoms Do Not Correlate With Findings From Colonoscopy in Children With Inflammatory Bowel Disease and Primary Sclerosing Cholangitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2018; 16(7): 1098-1105.

**Riley SA, Mani V, Goodman MJ et al.** Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* 1991; 32(2): 174-178.

**Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G et al.** Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990; 99(4): 956-963.

**Salim SY, Söderholm JD.** Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17(1): 362-381.

**Sawczenko A, Sandhu BK.** Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland. *Arch Dis Child* 2003; 88(11): 995–1000.

**Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM.** Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987; 317(26): 1625–1629.

**Schirrmann T, Steinwand M, Wezler X et al.** CD30 as a therapeutic target for lymphoma. *BioDrugs* 2014; 28(2): 181-209.

**Schwarz J, Sýkora J.** Incidence idiopatických střevních zánětů u dětí a dospívajících v Plzeňském kraji v letech 2001–2011. Prospektivní studie. *Ces-slov Pediatr* 2013; 68(3): 149-156.

**Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T 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. *Can J Gastroenterol* 2005; 19(suppl A): 5–36.

**Sipponen T, Kolho KL.** Faecal calprotectin in children with clinically quiescent inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45(7-8): 872-877.

**Solberg IC, Lygren I, Jahnsen J et al.** Mucosal healing after initial treatment may be a prognostic marker for long-term outcome in inflammatory bowel disease. *Gut* 2008; 57: A15.

**Splawski JB, Pfefferkorn MD, Schaefer ME et al.** NASPGHAN Clinical Report on Postoperative Recurrence in Pediatric Crohn Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2017; 65(4): 475-486.

**Targan SR, Karp LC.** Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev* 2005; 206: 296-305.

**Tham YS, Yung DE, Fay S et al.** Fecal calprotectin for detection of postoperative endoscopic recurrence in Crohn’s disease: systematic review and meta-analysis. *Therap Adv Gastroenterol* 2018; 11: 1756284818785571.

**Theede K, Holck S, Ibsen P et al.** Fecal Calprotectin Predicts Relapse and Histological Mucosal Healing in Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2016; 22(5): 1042-1048.

**Tringali A, Thomson M, Dumonceau JM et al.** Pediatric gastrointestinal endoscopy: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) and European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Guideline Executive summary. *Endoscopy* 2017; 49(1): 83-91.

**Turner D, Otley AR, Mack D et al.** Development and evaluation of a Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI): a prospective multicenter study. *Gastroenterology* 2007; 133(2): 423–432.

**Turner D, Levine A, Escher JC et al.** Joint ECCO and ESPGHAN evidence-based consensus guidelines on the management of pediatric ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012; 55(3): 340–361.

**Walsham NE, Sherwood RA.** Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol* 2016; 9: 21-29.

**Wright R, Truelove SR.** Serial rectal biopsy in ulcerative colitis during the course of a controlled therapeutic trial of various diets. *Am J Dig Dis* 1966; 11(11): 847-857.

**Zárubová K, Hradský O, Čopová I et al.** Endoscopic Recurrence 6 Months After Ileocecal Resection in Children With Crohn Disease Treated With Azathioprine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2017; 65(2): 207-211.

**Zeisler B, Lerer T, Markowitz J et al.** Outcome following aminosalicylate therapy in children newly diagnosed as having ulcerative colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 56(1): 12-18.

**Zhang YZ, Li YY.** Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2014; 20(1): 91-99.

## 9 SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA

### 9.1 Publikace se vztahem k tématu dizertační práce v časopisech s IF

#### 9.1.1 **Fabián O, Hradský O, Potužníková K, Kalfusová A, Krsková L, Hornofová L,**

**Zámečník J, Bronský J.** Low predictive value of histopathological scoring system for complications development in children with Crohn's disease. *Pathol Res Pract* 2017; 213(4): 353-358.

IF 1.8

#### 9.1.2 **Fabián O, Hradský O, Dršková T, Mikuš F, Zámečník J, Bronský J.**

Immunohistochemical Assessment of CD30+ Lymphocytes in the Intestinal Mucosa Facilitates Diagnosis of Pediatric Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci* 2018; 63(7): 1811-1818.

IF 2.9

#### 9.1.3 **Fabián O, Hradský O, Lerchová T, Mikuš F, Zámečník J, Bronský J.**

Limited clinical significance of tissue calprotectin levels in bowel mucosa for the prediction of complicated course of the disease in children with ulcerative colitis. *Pathol Res Pract* 2019; 215(12): 152689.

IF 1.8

#### 9.1.4 **Zárubová K, Fabián O, Hradský O, Lerchová T, Mikuš F, Dotlačil V, Poš L, Škába R, Bronský J.**

Predictive value of tissue calprotectin for disease recurrence after ileocaecal resection in paediatric Crohn's disease.

*Práce je aktuálně odeslána ke zvážení přijetí do zahraničního impaktovaného periodika.*

### 9.2 Publikace se vztahem k tématu dizertační práce v časopisech bez IF

#### 9.2.1 **Fabián O, Hradský O, Bronský J, Zámečník J.**

Histopatologické hodnocení intenzity a aktivity zánětu u zánětlivých střevních onemocnění: Důležitý doplněk endoskopie nebo marná snaha? *Cesk Patol* 2019; 55(3): 158-164.

### 9.3 Publikace bez vztahu k tématu dizertační práce v časopisech s IF

**9.3.1 Fabián O, Gebauer R, Koblížek M, Hornofová L, Janoušek J.** Histopathological evidence of aortopathy in newborns and infants with Tetralogy of Fallot at the time of the surgical repair. *Cardiovasc Pathol* 2019; 40: 59-64.

IF 1.8

**9.3.2 Fabián O, Mokrý D, Masopust J, Skořepa J, Kodetová DN, Zámečník J.** Primary angiosarcoma of the femoral artery in patient with kidney and liver polycystosis and multiple arterial aneurysms: report of the case and review of the literature. *Cardiovasc Pathol* 2019; 39: 8-11.

IF 1.8

**9.3.3 Fiala R, Kochová P, Kubíková T, Címrman R, Tonar Z, Špatenka J, Fabián O, Burkert J.** Mechanical and structural properties of human aortic and pulmonary allografts do not deteriorate in the first 10 years of cryopreservation and storage in nitrogen. *Cell Tissue Bank* 2019; 20(2): 221-241.

IF 2

**9.3.4 Kynčl M, Kočí M, Ptáčková L, Hornofová L, Fabián O, Šnajdauf J, Roček M, Pýchova M.** Congenital bronchopulmonary malformation: CT histopathological correlation. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2016; 160(4): 533-537.

IF 1.2

**9.3.5 Jiroušková M, Nepomucká K, Oyman-Eyrimmez G, Kalendová A, Havelková H, Sarnová L, Chalupský K, Schuster B, Benada O, Miksatková P, Kuchař M, Fabián O, Sedláček R, Wiche G, Gregor M.** Plectin controls biliary tree architecture and stability in cholestasis. *J Hepatol* 2018; 68(5): 1006-1017.

IF 19

## 9.4 Publikace bez vztahu k tématu dizertační práce v časopisech bez IF

9.4.1 **Fabián O, Gebauer R.** Praktický přístup k pitvě srdce s vrozenou srdeční vadou. *Cesk Patol* 2019;55(4): 202-208.

9.4.2 **Fabián O, Štěchovský C.** Histopatologická diagnostika myokarditid. *Cesk Patol* 2019; 55(4): 218-223.

9.4.3 **Fabián O, Štěchovský C.** Nejnovější poznatky v mikroskopické diagnostice kardiomyopatií. *Cesk Patol* 2019; 55(4): 224-230.

9.4.4 **Fabián O.** Aktuální nomenklatura a histopatologická kritéria pro hodnocení neznámých degenerativních onemocnění aorty. *Cesk Patol* 2020; 56(1): 26–31.

9.4.5 **Matějková A, Fabián O.** Diferenciální diagnostika tumorózních lézí srdce. *Cesk Patol* 2020; 56(1): 18–25.

9.4.6 **Havová M, Antonová P, Gebauer R, Fabián O, Chaloupecký V, Vlk L, Hornofová L, Rohn V.** Obstrukce výtokového traktu pravé komory. *Interv Akut Kardiol* 2019; 18(3, Suppl. A): 15–17.

9.4.7 **Fabián O, Havová M, Gebauer R, Poruban R, Materna O, Špatenka J, Burkert J, Chaloupecký V, Rohn V, Mikuš F, Obešlová E, Janoušek J.** Microscopical assessment of explanted allograft heart valves: a limited contribution of histopathology to the pathogenic mechanism of the graft failure in long-term explants. *Článek recentně přijat do recenzovaného periodika Cor et Vasa.*

9.4.8 **Fabián O, Trojánek M, Richterová L, Stejskal F, Dundrová K, Roznětinská M, Zámečník J.** Případ amébové kolitidy s endoskopickými i histopatologickými rysy Crohnovy choroby. *Cesk Patol* 2020; 56(2): 95–98.

9.4.9 **Douda L, Keil R, Lochmannová J, Drábek J, Fabián O, Hornofová L, Honsová E, Jirsa M.** Svízelná diagnostika primární sklerozující cholangitidy u pacienta s

rekurentními epizodami akutní bakteriální cholangitidy. *Gastroent Hepatol* 2015; 69(4): 368-377.

## 10. PŘÍLOHY

### Příloha I

**Fabián O, Hradský O, Potužníková K, Kalfusová A, Krsková L, Hornofová L, Zámečník J, Bronský J.** Low predictive value of histopathological scoring system for complications development in children with Crohn's disease. *Pathol Res Pract* 2017; 213: 353-358.  
IF 1,794

### Příloha II

**Fabián O, Hradský O, Dršková T, Mikuš F, Zámečník J, Bronský J.** Immunohistochemical Assessment of CD30+ Lymphocytes in the Intestinal Mucosa Facilitates Diagnosis of Pediatric Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci* 2018; 63(7): 1811-1818.  
IF 2,937

### Příloha III

**Fabián O, Hradský O, Lerchová T, Mikuš F, Zámečník J, Bronský J.** Limited clinical significance of tissue calprotectin levels in bowel mucosa for the prediction of complicated course of the disease in children with ulcerative colitis. *Pathol Res Pract* 2019; 215(12): 152689.  
IF 1,794

### Příloha IV

**Fabián O, Hradský O, Bronský J, Zámečník J.** Histopatologické hodnocení intenzity a aktivity zánětu u zánětlivých střevních onemocnění: Důležitý doplněk endoskopie nebo marná snaha? *Cesk Patol* 2019; 55(3): 158-164.

### Příloha V

**Zárubová K, Fabián O, Hradský O, Lerchová T, Mikuš F, Dotlačil V, Poš L, Škába R, Bronský J.** Predictive value of tissue calprotectin for disease recurrence after ileocaecal resection in paediatric Crohn's disease.  
*Práce je aktuálně odeslána ke zvážení přijetí do zahraničního impaktovaného periodika.*