

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



**Střevní mikrobiota u idiopatických střevních zánětů a kolorektálních  
neoplázií**

**Darina Kohoutová**

**Autoreferát disertační práce**

**Doktorský studijní program: Vnitřní nemoci**

**Hradec Králové**

**2013**

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Vnitřní nemoci na Katedře interních oborů, Subkatedře gastroenterologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: MUDr. Darina Kohoutová  
II. interní gastroenterologická klinika  
Lékařské fakulty UK a Fakultní  
nemocnice Hradec Králové

Školitel: prof. MUDr. Jan Bureš, CSc.,  
II. interní gastroenterologická klinika  
Lékařské fakulty UK a Fakultní  
nemocnice Hradec Králové

Oponenti: prof. MUDr. Petr Dítě, DrSc.  
Interní gastroenterologická klinika  
LF MU a FN Brno

prof. MUDr. Jan Lata, CSc.  
Katedra interních oborů,  
Ostravská univerzita v Ostravě

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Vnitřní nemoci v pondělí 1. 7. 2013 od 13:00 hodin.

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA MZ 13413.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

prof. MUDr. Jan Bureš, CSc.  
předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Vnitřní nemoci

## Obsah

1. Souhrn .....	3
2. Summary .....	3
3. Úvod do problematiky .....	4
3.1. Střevní mikrobiota .....	4
3.2. Kolorektální karcinom a střevní bakterie ...	5
3.3. Idiopatické střevní záněty a mikrobiota ....	5
3.4. Anti-porinové protilátky .....	6
3.5. Bakteriociny .....	6
4. Cíle disertační práce .....	7
4.1. Stanovení anti-porinových protilátek .....	7
4.2. Bakteriologické vyšetření bioptických vzorků z tračníku a stanovení bakteriocinogenie ...	7
5. Stanovení anti-porinových protilátek ....	8
5.1. Metodika .....	8
5.2. Výsledky .....	8
5.3. Diskuse .....	9
6. Stanovení bakteriocinogenie .....	10
6.1. Metodika .....	10
6.2. Výsledky .....	11
6.3. Diskuse .....	13
7. Závěry .....	14
7.1. Stanovení anti-porinových protilátek .....	14
7.2. Bakteriologické vyšetření bioptických vzorků z tračníku a stanovení bakteriocinogenie ...	15
8. Použitá literatura .....	16
9. Přehled publikační činnosti autora .....	17

## 1. Souhrn

Sporadický kolorektální karcinom (CRC) a idiopatické střevní záněty (IBD) představují závažný celosvětový problém. Přesné určení všech faktorů účastnících se patogeneze je velmi žádoucí. Střevní mikrobiota hraje roli klíčovou. V první části naší práce jsme se zaměřili na vyšetření anti-porinových protilátek v séru našich pacientů. Cílem/antigenem proti-porinových protilátek je porin C lokalizovaný ve vnější membráně *Escherichia coli* (*E. coli*). Potvrdili jsme, že pacienti s IBD a s kolorektálním karcinomem mají zvýšené hodnoty anti-porinových protilátek. V druhé části práce jsme se zabývali bakteriocinogenií a určením genotypů *E. coli*, kdy vyšetřovaným materiálem byly bioptické vzorky tlustostřevní sliznice. Bakteriociny jsou malé proteiny produkované bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae*, vyznačují se antibiotickým, antineoplastickým, proapoptickým a probiotickým efektem. Potvrdili jsme vyšší bakteriocinogenii a přítomnost více virulentních kmenů *E. coli* u pacientů s pokročilou kolorektální neoplázií a pokročilým kolorektálním karcinomem ve srovnání s nepokročilými patologiemi. Potvrdili jsme účast mikrobiot na vývoji kolorektálních patologií.

## 2. Large intestinal microbiota in inflammatory bowel disease and colorectal neoplasia - Summary

Sporadic colorectal cancer (CRC) and inflammatory bowel disease (IBD) represent an immense problem worldwide. Precise definition of all the potential contributors to the pathogenesis of CRC and IBD remain a challenge. Large intestinal microbiota play an extremely important role. Investigation of serum anti-porin antibodies (aimed at porin C in the cell wall of *E. coli*) belonged to the objectives in the first part of our work. We have confirmed, that patients with IBD and patients with CRC had increased levels of anti-porin antibodies. Bacteriocinogeny and investigation of *E. coli* genotypes belonged to the aims in the second part of our work. Bacteriocins are small proteins produced by bacteria of *Enterobacteriaceae* family and are characterised by its antibacterial, antineoplastic, probiotic and proapoptotic effect. We have confirmed higher bacteriocinogeny and presence of more virulent strains of *E. coli* in patients with advanced colorectal adenoma and colorectal carcinoma. All these results confirm contribution of large intestinal microbiota to the development of colorectal pathologies.

### 3. Úvod do problematiky

V současné době se vyspělé státy potýkají s problematikou tzv. civilizačních onemocnění, mezi která kolorektální karcinom a idiopatické střevní záněty bezesporu patří. Česká republika je v posledních desetiletích celosvětově řazena na čelní místa v incidenci i prevalenci kolorektálního karcinomu, mortalita na toto onemocnění zůstává stále vysoká (mortalita na kolorektální karcinom v České Republice v r. 1995: 4290; v r. 2000: 4402; v r. 2005: 4246; v r. 2010: 3879). Idiopatické střevní záněty jsou závažným problémem ve vyspělých zemích. Etiopatogeneze kolorektálního karcinomu i idiopatických střevních zánětů je multifaktoriální, není však pochyb, že tlustostřevní mikrobiota hraje roli zásadní, klíčovou.

#### 3.1 Střevní mikrobiota

V gastrointestinálním traktu dospělého člověka přebývá zhruba 100 triliónů mikrobiálních buněk, 15 000 druhů mikroorganismů a přes 800 druhů bakterií [1, 2]. Zcela zásadním problémem je, že stále dokážeme vykultivovat pouze kolem 20 % druhů bakterií gastrointestinálního traktu, které byly identifikovány molekulárními metodami [3]. V současnosti jsou proto kultivační techniky nahrazovány metodami, které jsou založené na hodnocení sekvence 16S rRNA bakteriálních genů [4]. Další alternativou identifikace bakterií v současné době je využití hmotnostní spektrometrie [5]. Střevní mikrobiota se obvykle dělí na prokaryota a eukaryota a dále na organismy striktně anaerobní, mikroaerofilní a fakultativně aerobní [6]. Anaerobních bakterií je zhruba 10-krát více než aerobních [7]. Vliv střevních bakterií na hostitele může být jak přínosný, protektivní, tak ale i nepřínosný až škodlivý. Mezi pozitivní vlivy střevních bakterií vůči hostiteli patří: vazba potenciálních mutagenů, produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem, syntéza vitaminů skupiny B a vitamínu K (přičemž foláty a biotin napomáhají regulovat proliferaci sliznice tlustého střeva), přímé působení na sliznici. Mezi negativní a/nebo škodlivé vlivy střevních mikrobiot vůči hostiteli patří: produkce toxinů, aktivace prokarcinogenů, syntéza karcinogenních a genotoxických látek z nestravitelných součástí potravy, transformace primárních žlučových kyselin na sekundární genotoxické a kancerogenní žlučové kyseliny, aktivace pro hostitele nepříznivých tlustostřevních bakteriálních enzymů (betaglukuronidasa, 7-alfa-dehydroxylasa). Pro výsledný vliv bakterií gastrointestinálního traktu na hostitele hraje zcela zásadní roli typ dietního substrátu, který bude střevním bakteriím dodán a dále kvalitativní i kvantitativní zastoupení jednotlivých druhů mikrobů. Za nepříznivý dietní substrát je považováno červené

maso, živočišné tuky, zvýšený příjem kuchyňské soli, naopak pozitivními vlivy (byť s doposud málo důkazy) se vyznačuje čerstvé ovoce a zelenina, potraviny bohaté na selen (antioxidant, podobně jako vitamin A a C) a kalcium, fermentovatelná i nefermentovatelná vláknina. [6].

### 3.2 Kolorektální karcinom a střevní bakterie

Střevní mikrobiota hraje významnou roli v etiopatogenezi kolorektálního karcinomu. Přímým důkazem je přítomnost mutagenních a genotoxických substancí bakteriálního původu ve stolici člověka [6]. V mnoha studiích byl zkoumán vliv jednotlivých bakterií na vývoj kolorektálního karcinomu. S tímto nádorem jsou spojovány především druhy *Bacteroides* [8], obzvláště *Bacteroides fragilis*, který u pacientů s kolorektálním karcinomem na rozdíl od kontrol produkuje metaloproteinasu. Dále je s kolorektálním karcinomem spojován rod *Clostridium* (především lecitinasa negativní, které přeměňují primární žlučové kyseliny na sekundární) [9] a *Streptococcus bovis* (indukuje tvorbu hyperproliferativních aberantních kolonických krypt, zvyšuje expresi proliferčních markerů a zvyšuje produkci IL-8 sliznicí tlustého střeva) [6]. Infekce *Clostridium septicum* je vzácná, ale v 81 % je spojená s latentní malignitou, ve 34 % s kolorektálním karcinomem [10]. Nežádoucí bakterií je také *Enterococcus faecalis*, protože produkuje volné kyslíkové radikály. U pacientů s kolorektálním karcinomem je také předpokládáno vyšší zastoupení intraepiteliálních *Escherichia coli* [11]. Naopak za protektivní bakterie můžeme považovat např. *Eubacterium aerofaciens* [8] či *Eubacterium lentum* – syntetizuje 21-dehydroxylasu.

Zcela zásadní by bylo v současné době určit, zde se změna složení střevních mikrobiot podílí na vzniku kolorektálního karcinomu nebo je jeho následkem. Pokud by se podílela na jeho vzniku, pak by specifická antibiotická, probiotická nebo prebiotická intervence mohla mít efekt v kontrole vývoje nemoci [1].

### 3.3 Idiopatické střevní záněty a mikrobiota

V současné době se předpokládá, že příčinou idiopatických střevních zánětů (IBD) – Crohnovy choroby (CN) a ulcerózní kolitidy (UC) je nepřiměřená zánětlivá odpověď na střevní bakterie u geneticky predisponovaného jedince. Je potvrzeno, že se tlustostřevní bakteriální složení pacientů s IBD vyznačuje kvalitativními i kvantitativními změnami ve srovnání s osobami kontrolními, kauzální patologické agens však doposud objeveno nebylo.

Zvláštní důležitosti nabývají v etiopatogenezi onemocnění bakterie s vyšší schopností adheze a invaze do sliznice střeva (příkladem je *Escherichia coli*) [12]. U IBD dochází typicky k poruše bariérové funkce. Je přítomna zvýšená paracelulární permeabilita na podkladě abnormální regulace zonulae occludentes; pohárkové buňky produkují méně hlenu, Panethovy buňky se vyznačují sníženou produkcí defenzinů. Výsledkem je zvýšená expozice střevní sliznice intestinálním mikrobiotům a znásobení zánětlivé odpovědi. Naproti zvýšeně stimulované prozánětlivé odpovědi existují v intestinálním prostředí faktory, které odpovídají za snížení prozánětlivých cytokinů. Mezi cytokiny s protizánětlivým efektem se řadí transforming growth factor beta a interleukin-10 [13].

### 3.4 Anti-porinové protilátky

Poriny jsou proteiny lokalizované ve vnější membráně gramnegativních (i některých grampozitivních) bakterií a slouží především k tvorbě kanálů umožňujících vstup hydrofilních substancí, obzvláště nutrientů, do buňky. Je známo, že *Escherichia coli* produkuje 3 základní druhy trimerických porinů: OmpF, OmpC a PhoE [14]. Anti-porinové / proti-porinové protilátky / anti-outer membrane protein C / anti-OmpC antibodies, jsou namířeny proti OmpC porinům. Vzhledem k tomu, že spoluúčast střevních mikrobiot v etiopatogenezi IBD je již všeobecně akceptována, lze předpokládat, že by právě proti-porinové protilátky mohly spolu s dalšími protilátkami typickými pro IBD sloužit k diagnostice a predikci klinického průběhu těchto onemocnění [15]. Mow ve své studii diagnostikoval přítomnost anti-porinových protilátek u 46 % pacientů (z 303 dospělých) s Crohnovou chorobou a dále dokumentoval jejich asociaci s komplikovanou fibrostenozující formou onemocnění [16]. V maďarské studii Pappa et al. jsou anti-OmpC protilátky označovány jako vysoce specifické pro Crohnovu chorobu (specifická 79-100 %), jejich senzitivita je však nižší než v jiných studiích (31 %) [17].

### 3.5 Bakteriociny

Bakteriociny jsou proteiny, produkováné bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae*, především mikroorganismem *Escherichia coli*. Dělí se na několik podskupin, nejdůležitější z nich jsou koliciny a mikrocin. Bakteriociny mají antibiotický, antineoplastický, probiotický a proapoptotický účinek. První kolicin (kolicin V) byl identifikován Gratiou roku 1925, na dalším výzkumu kolicinů se podíleli i čeští vědci – Horák s Burešem [18] a Šmarda se Šmajsem [19]. Koliciny jsou organizovány do 3 domén, přičemž každá z nich odpovídá za

jednu funkci kolicinu: centrální doména odpovídá za vazbu na receptor cílové buňky, N-terminální doména odpovídá za translokaci membránou, C-terminální doména obsahuje aktivní/ cytotoxickou část kolicinu. Produkce kolicinů je kódována plazmidy [18, 20], produkce mikrocinů plazmidy nebo chromozomálně [21]. Operon pro kolicin obsahuje gen pro samotný kolicin, gen pro imunitní protein a gen pro colicin release protein (umožňuje uvolnění kolicinu do extracelulárního media) [20]. Koliciny lze klasifikovat více způsoby, nejdůležitější je klasifikace podle mechanismu účinku (koliciny působící vznikem pórů, působící jako DNA-asy, působící jako RNA-asy nebo interferující se syntézou peptidoglykanu) a podle translokace přes zevní membránu *E. coli* (skupina A a skupina B kolicinů) [20]. Bakteriociny by podle dostupných poznatků měly hrát důležitou roli v patogenezi IBD a CRC [18].

#### **4. Cíle disertační práce**

##### **4.1. Stanovení anti-porinových protilátek**

- Stanovit sérové anti-porinové protilátky (proti OmpC porinům *Escherichia coli*) u pacientů s idiopatickými střevními záněty, kolorektálním adenomem a karcinomem a u kontrolních zdravých osob.
- Určit možné využití sérových anti-porinových protilátek v predikci klinického fenotypu Crohnovy choroby.

##### **4.2. Bakteriologické vyšetření bioptických vzorků z tračníku a stanovení bakteriocinogenie**

- Zavést metodiku bakteriologického vyšetření bioptických vzorků tlustého střeva odebraných při koloskopickém vyšetření.
- Stanovit bakteriocinogenii a genotypy izolovaných koliformních bakterií u pacientů s idiopatickými střevními záněty, kolorektálním adenomem a karcinomem a u kontrolních zdravých osob.
- Stanovit jednotlivé kolicinogenotypy, určit jejich prevalenci u vyšetřených skupin osob a hodnotit rozdíly ve výskytu podle mechanismu účinku kolicinů, způsobu translokace přes zevní membránu *Escherichia coli* a podle skupinové rezistence a tolerance kolicinů.



- Určit, zda se pacienti s kolorektálním karcinomem vyznačují kvalitativními a/nebo kvantitativními změnami v kolicinogenii (kolicinů s protinádorovým účinkem) ve srovnání s kontrolními osobami.

## **5. Stanovení anti-porinových protilátek**

### **5.1. Metodika**

Ke stanovení anti-porinových protilátek byly vybrány 4 skupiny pacientů: pacienti s CN, UC, kolorektálním adenomem (CRA) a CRC. Celkem bylo vyšetřeno 85 pacientů s CN (36 mužů, 49 žen, ve věku 20–79 let, průměr  $43 \pm 14$ , medián 42 let), 26 pacientů s UC (9 mužů, 17 žen, ve věku 20-74 let, průměr  $44 \pm 16$ , medián 40 let), 22 pacientů s CRA (11 mužů, 11 žen, ve věku 26-79 let, průměr  $65 \pm 12$ , medián 64 let) a 11 pacientů s CRC (9 mužů, 2 ženy, ve věku 50-83 let, průměr  $66 \pm 11$ , medián 65 let). Kontrolní skupinu tvořilo 45 zdravých dobrovolníků – dárců krve (24 mužů, 25 žen, ve věku 20-58 let, průměr  $38 \pm 10$ , medián 35 let). Ke stanovení anti-porinových protilátek byly použity soupravy „QUANTA Lite™ OMP Plus, INOVA Diagnostics, San Diego, USA“. Proti-porinové protilátky byly stanovovány metodou ELISA v třídě IgA (vyšetření laskavě provedla RNDr. Marcela Drahošová, Ústav klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové). Projekt byl schválen Etickou komisí Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Při vlastním provádění studie a při vyhodnocení získaných výsledků byla zajištěna ochrana osobních údajů vyšetřených osob v souladu s Metodickým návodem Ministerstva zdravotnictví ČR.

### **5.2. Výsledky**

U kontrolních osob byla průměrná hodnota vypočtených anti-porinových protilátek  $18,8 \pm 10,7$  U/ml. Výrobce doporučena normální hodnota je  $\leq 20$  U/ml, šedá zóna 20-25 U/ml, hodnoty  $\geq 25$  U/ml jsou považovány za patologické. V kontrolní skupině byly hodnoty anti-porinových protilátek  $\leq 20$  U/ml u 28/45 (62%) a  $\geq 25$  ml/U u 9/45 (20%) osob. U pacientů s CN byla normální hodnota anti-porinových protilátek zjištěna pouze u 22/85 vyšetřených osob (26 %), u pacientů s UC u 6/26 (23 %), ve skupině pacientů s CRC u 2/11 (18 %). U pacientů s CRA byla normální hodnota proti-porinových protilátek zjištěna u 12/22 (55 %). Průměrná hodnota vypočtených proti-porinových protilátek byla ve skupině pacientů s CN  $41,8 \pm 29,5$  U/ml, ve skupině pacientů s UC  $28,9 \pm 13,0$  U/ml, CRC  $36,7 \pm 14,6$  U/ml, CRA  $22,3 \pm 12,7$  U/ml).

Statisticky významné rozdíly anti-porinových protilátek byly shledány mezi kontrolní skupinou a UC ( $p < 0,001$ ), CN ( $p < 0,001$ ) a CRC ( $p < 0,001$ ). Nebyla prokázána statisticky významná diference u skupiny kontrolní a u skupiny pacientů s CRA ( $p = 0,253$ ;  $1 - \beta = 0,211$ ).

Průměrná hodnota vypočtených proti-porinových protilátek s CN a postižením pouze tlustého střeva byla  $30,8 \pm 27,2$  U/ml, postižením tenkého střeva  $36,9 \pm 23,9$  U/ml a postižením tenkého i tlustého střeva  $45,1 \pm 30,6$  U/ml. Statisticky významné rozdíly hodnot anti-porinových protilátek byly prokázány mezi kontrolní skupinou a pacienty s CN postihující pouze tenké střevo ( $p < 0,001$ ), s CN postihující pouze tlusté střevo ( $p = 0,019$ ) a s CN postihující tenké i tlusté střevo ( $p < 0,001$ ).

Průměrná hodnota vypočtených anti-porinových protilátek nemocných s CN a izolovanou zánětlivou (luminální) formou byla  $31,6 \pm 23,4$  U/ml, kombinovanou zánětlivou a stenozující formou  $47,3 \pm 32,9$  U/ml, zánětlivou a fistulující formou  $45,1 \pm 37,8$  U/ml, kombinovanou zánětlivou, stenozující a fistulující formou CN  $44,5 \pm 26,6$  U/ml. Byl nalezen statisticky významný rozdíl hodnot anti-porinových protilátek mezi skupinou kontrolní a jednotlivými podskupinami nemocných s CN ( $p = 0,003$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ).

Hodnoty anti-porinových protilátek mezi skupinou nemocných s pokročilým (A) a nepokročilým (N-A) CRA nedosáhly statisticky významné diference (A:  $22,0 \pm 12,8$  U/ml, N-A:  $23,0 \pm 13,5$  U/ml;  $p = 0,871$ ;  $1 - \beta = 0,05$ ).

### 5.3. Diskuse

Naše studie zjistila zvýšený výskyt anti-porinových protilátek u pacientů s IBD a CRC. Výsledky naší práce podporují asociaci pozitivitu anti-porinových protilátek s komplikovanými formami CN (stenozující a fistulující formou) a tenkostřevním postižením při CN. Zcela novou, doposud nepublikovanou a z naší studie vyplývající skutečností je asociace pozitivitu proti-porinových protilátek s CRC.

Výzkum protilátek u pacientů s IBD patří v posledních desetiletích mezi prioritní zájmy mnoha vědeckých týmů. Doposud nejdůležitějšími stanovovanými dvěma protilátkami asociovanými s IBD jsou pANCA (perinukleární typ protilátek proti cytoplasmě neutrofilů) a ASCA (protilátky proti *Saccharomyces cerevisiae*). Dále byly zkoumány protilátky ALCA (antilaminaribiosidové) a ACCA (antichitobiosidové) [22]. Mezi tři nové sérologické markery

asociované s IBD patří anti-OmpC, protilátky proti I2 (proti fragmentům DNA *Pseudomonas fluorescens*) a CBir1 (protilátky proti bakteriálním flagelinům) [23].

Ve studii Mowa et al. byla přítomnost proti-porinových protilátek zjištěna u 46 % dospělých pacientů s CN [16], ve studii Landerse et al. u 55 % pacientů s CN [24]. V naší studii byly anti-porinové protilátky zvýšeny (nad 25 U/ml) u 61 % (52/85) nemocných s CN. Výsledky naší studie v souladu se studií Mowa et al. [16] prokazují, že pacienti s komplikovanými formami CN mají průměrnou hodnotu anti-porinových protilátek vyšší než pacienti s izolovanou lumenální (zánětlivou) formou CN. Asociace zvýšených hodnot proti-porinových protilátek s komplikacemi CN (fistulujícími a/nebo stenozujícími) je podpořena dalšími výsledky naší studie, které dokazují, že pacienti s postižením tenkého střeva mají průměrnou hodnotu anti-porinových protilátek vyšší ve srovnání s pacienty, kteří mají tlustostřevní postižení při CN. Především stenózy, ale i fistulace jsou často lokalizovány právě v oblasti terminální části ilea.

Pozitivita anti-OmpC protilátek asociovaná s kolorektálním karcinomem je zcela prioritním pozorováním. Vzhledem k pozitivitě anti-OmpC u pacientů v remisi CRC předpokládáme, že nejde o znak aktivity onemocnění, ale daná skutečnost potvrzuje předpokládanou spoluúčast střevních mikrobiot na vývoji CRC.

## **6. Stanovení bakteriocinogenie**

### **6.1. Metodika**

Ke stanovení bakteriocinogenie byly vybrány 3 skupiny pacientů: 30 osob s CRC (23 mužů, 7 žen, ve věku 38-86 let, průměr  $67 \pm 11$ , medián 66), 30 nemocných s CRA (17 mužů, 13 žen, ve věku 39-79 let, průměr  $63 \pm 9$ , medián 64 let) a 30 pacientů s IBD (13 mužů, 17 žen, ve věku 20-74 let, průměr  $35 \pm 14$ , medián 33 let). Kontrolní skupinu tvořilo 20 osob (9 mužů, 11 žen, ve věku 23-84 let, průměr  $55 \pm 15$ , medián 56 let) s negativní osobní anamnézou IBD, CRA či CRC a aktuálně normálním slizničním nálezem dokumentovaným při pankoloskopickém vyšetření. Během koloskopie byly odebrány vždy sterilními klíšťkami biotické vzorky ve třech etážích (v céku, colon transversum a rektu) k ex-vivo in-vitro kultivaci sliznice tlustého střeva a následnému stanovení bakteriocinogenie. Konkrétní bakteriocinogenotypizace bakterií

z čeledi *Enterobacteriaceae* a určení genotypu izolovaných kmenů byly provedeny metodami PCR (vyšetření laskavě provedl doc. MUDr. David Šmajš, Ph.D., Biologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně).

Projekt byl schválen Etickou komisí Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Při vlastním provádění studie a při vyhodnocení získaných výsledků byla zajištěna ochrana osobních údajů vyšetřených osob v souladu s Metodickým návodem Ministerstva zdravotnictví ČR.

## 6.2. Výsledky

Při analýze výsledků z hlediska počtu biopsií v jednotlivých souborech nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v počtech vykultivovaných kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae*. Celkem bylo izolováno a dále testováno 666 kmenů. Kolicinogenie byla pomocí PCR metod stanovena u 137 produkčních kmenů, mikrocinogenie u 192 produkčních kmenů. K detekci produkce m (mikrocinu) H47 a mM (senzitivní k chloroformu) byly vyšetřeny všechny vykultivované kmeny. Četnost výskytu vykultivovaných bakterií *E. coli* se statisticky významně lišila mezi souborem kontrol a souborem pacientů s CRC (kontroly: 48/60 (80 %), CRC: 87/89 (98 %);  $p < 0,001$ ), mezi souborem kontrol a souborem nemocných s IBD (kontroly: 48/60 (80 %), IBD: 87/88 (99 %);  $p < 0,001$ ).

Neprokázali jsme statisticky signifikantní rozdíl v bakteriocinogenii, kolicinogenii a mikrocinogenii mezi jednotlivými soubory. Četnost výskytu současné produkce kolicinů a mikrocinů se statisticky významně lišila mezi skupinou pacientů s CRA a CRC (CRA: 19/89 (21 %), CRC: 32/89 (36 %);  $p = 0,031$ ).

Nejnižší četnost výskytu genotypu A a zároveň nejvyšší četnost výskytu genotypu D *E. coli* byla nalezena v souboru pacientů s CRC. Kombinace genotypu B2 *E. coli* spolu s produkcí mH47 a mM byla nejčastěji diagnostikována v souboru kontrol.

Stanovili jsme četnost výskytu jednotlivých bakteriocinů. Koliciny E2,4,6,7 byly nejčastěji zastoupeny u pacientů s IBD. Výskyt kolicinu M byl s nejvyšší frekvencí pozorován ve skupině pacientů s CRC. V případě kolicinogenie je nejčastěji syntetizovaným kolicinem ve všech skupinách kolicin Ia. Ve skupině nemocných s CRA je v četnosti výskytu následován kolicinem Ib, v souboru pacientů s IBD kolicinem E7, ve skupině pacientů s CRC kolicinem M a v souboru kontrol kolicinem Ib. Mikrocin B17 se nejčastěji vyskytoval ve skupině nemocných s CRA, v této skupině se zároveň nejméně často vyskytoval mH47 a mM. Při

prokázané mikrocinogenii byl nejfrekventněji syntetizovaným mikrocinem ve všech zkoumaných skupinách mH47. U nemocných s CRA byl v četnosti výskytu následován mV, v ostatních skupinách mM.

V jednotlivých souborech byly zastoupeny různou mírou bakteriociny působící určitým letálním účinkem na cílovou buňku. Statisticky signifikantní diference byla nalezena v četnosti výskytu depolarizujících kolicinů mezi skupinou pacientů s IBD a souborem kontrol (IBD: 22/90 (24 %), kontroly: 24/60 (40 %);  $p=0,043$ ). Statisticky významný rozdíl byl zjištěn v četnosti výskytu kolicinů působících inhibici syntézy DNA mezi souborem pacientů s IBD a souborem pacientů s CRA (IBD: 10/90 (11 %), CRA: 0 %;  $p=0,001$ ), mezi souborem pacientů s IBD a skupinou pacientů s CRC (IBD: 10/90 (11 %), CRC: 1/90 (1 %);  $p=0,005$ ), mezi skupinou pacientů s IBD a souborem kontrol (IBD: 10/90 (11 %), kontroly: 1/60 (2 %);  $p=0,030$ ). Byl nalezen statisticky významný rozdíl v četnosti výskytu kolicinů působících inhibici syntézy RNA mezi skupinou pacientů s IBD a souborem pacientů s CRA (IBD: 8/90 (9 %), CRA: 1/90 (1 %);  $p=0,017$ ), mezi souborem pacientů s IBD a souborem pacientů s CRC (IBD: 8/90 (9 %), CRC: 0 %;  $p=0,004$ ). Byl pozorován trend ke statisticky významnému rozdílu v četnosti výskytu kolicinů inhibujících syntézu RNA mezi skupinou nemocných s IBD a souborem kontrol (IBD: 8/90 (9 %), kontroly: 1/60 (2 %);  $p=0,068$ ). Nejčastější výskyt kolicinů působících letálně narušením syntézy buněčné stěny (kolicin M) byl identifikován v souboru nemocných s CRC.

Skupina A kolicinů převažovala nad skupinou kolicinů B v souboru nemocných s IBD, ve skupině pacientů s CRA, CRC a souboru kontrol převažovala skupina B kolicinů nad skupinou A kolicinů. Skupina mikrocinů I (mB17, mC7, mJ25) byla méně často zastoupena ve srovnání se skupinou mikrocinů II (mV, mM, mH47) ve všech skupinách vyšetřovaných osob.

Při rozdělení skupiny adenomů na nepokročilé (N-A) a pokročilé (A) byla mezi těmito soubory zjištěna statisticky významná diference v bakteriocinogenii (N-A: 7/18 (39 %), A: 51/71 (72 %);  $p=0,010$ ). Mezi souborem pacientů s N-A a A neoplázií byl pozorován trend ke statisticky významnému rozdílu v četnosti výskytu genotypu B2 *E. coli* (N-A: 4/17 (24 %), A: 31/60 (52 %);  $p=0,054$ ).

Pacienti s pravostranným CRC se v biopticky odebraných vzorcích vyznačovali přítomností mikrocinogenních kmenů *E. coli* s genotypem B2 a/nebo D.

Ve skupině pacientů s CRC byla hodnocena závislost bakteriocinogenie na vstupním stadiu nádoru (TNM klasifikace). Se zvyšujícím se stádiem onemocnění byla pozorována rostoucí bakteriocinogenie.

### 6.3. Diskuse

Mikrobiota obecně disponují možností produkce různých obranných látek, čeled' *Enterobacteriaceae* se navíc vyznačuje unikátní produkcí bakteriocinů. Bakteriocinogenotypizace je dnes posuzována nejen na základě hodnocení inhibičních zón růstu indikátorového kmene, ale i pomocí metod PCR.

V našem souboru byla *E. coli* statisticky signifikantně častěji vykultivována u pacientů s CRC a IBD ve srovnání se zdravými jedinci. Průkaz dominantního zastoupení *E. coli* ve sliznici pacientů s IBD je důležitý, neboť v etiopatogenezi onemocnění se ve zvýšené míře uplatňují bakterie s vyšší schopností adheze a invaze do sliznice střeva. Předpokládá se, že zvýšená adhezivita a hydrofobicita patogenních *E. coli* je kódována col-plazmidy [18].

*E. coli* se vyskytuje ve čtyřech základních genotypech A, B1, B2 a D. Kmeny *E. coli* z fylogenetické skupiny B2 v sobě skrývají genomický ostrůvek nazývaný „pks“, kódující produkci colibactinu. Infekce *E. coli* s tímto genomickým ostrůvkem indukuje fosforylaci ostrůvků H2AX v myších enterocytech (studie in vivo). Tato fosforylace vede k přechodnému narušení DNA, nedostatečným opravám DNA a vzniku chromozomových aberací. Tento fakt ospravedlňuje tvrzení, že kmeny *E. coli* obsahující tento „pks“ ostrůvek přispívají k vývoji sporadického kolorektálního karcinomu [25]. U našich pacientů s pravostranným CRC byl v 75 % přítomen genotyp B2 *E. coli*. V této souvislosti je třeba uvažovat nad významem potenciálně karcinogenních *E. coli* vyznačujících se genotypem B2 při karcinogenezi v pravém tračníku.

Genotypy *E. coli* A a B1 se asociují s méně virulentními znaky, naopak genotyp B2 a D s více virulentními. V naší studii byla nejnižší četnost genotypu A nalezena u *E. coli* vykultivovaných ve skupině pacientů s CRC a nejvyšší zastoupení genotypu D bylo rovněž u nemocných s CRC. Tyto výsledky lze interpretovat tak, že u pacientů s CRC dochází k posunu v genotypu *E. coli* směrem k virulentnějším.

Antineoplastickými vlastnostmi bakteriocinů se zabývala především Hannah Farkas-Himsley [26], dále v souvislosti s CRC čeští vědci Šmarda a Bureš. Šmarda neprokázal signifikantní rozdíl v kolicinogenii mezi zdravými dobrovolníky a pacienty s maligním tumorem střeva

[27]. Bureš naopak prokázal statisticky významně nižší kolicinogenii u pacientů s CRC ve srovnání se zdravými kontrolami [18]. Naše recentní studie neprokázala statisticky signifikantní diferencii v bakteriocinogenii mezi jednotlivými soubory.

Zcela zásadním faktem, vyplývajícím z naší studie, je však prokázáný statisticky významný rozdíl v bakteriocinogenii mezi souborem pacientů s nepokročilými a pokročilými kolorektálními neopláziemi. Soubor nemocných s pokročilou neoplázií se vyznačoval vyšší bakteriocinogenií než soubor pacientů s adenomem nepokročilým. Genotyp B2 *E. coli* se častěji vyskytoval ve skupině nemocných s pokročilým adenomem. Všechna zjištěná fakta poukazují na asociaci míry bakteriální virulence s rostoucím stupněm dysplazie. Platnost a správnost těchto výsledků byla potvrzena dalším našim pozorováním: prokázali jsme asociaci míry bakteriocinogenie, kolicinogenie, mikrocinogenie a současné kolicinogenie s mikrocinogenií se zvyšujícím se stádiem kolorektálního karcinomu (staging hodnocen pomocí TNM klasifikace).

Nejvíce vyjádřený antineoplastický efekt mají na základě provedených studií koliciny s RNA-asovou aktivitou a koliciny formující póry. V naší studii jsme zjistili, že nejvíce kolicinů působících letálně vznikem pórů je v kontrolní skupině, nejvíce kolicinů s RNA-asovou aktivitou je ve skupině nemocných s IBD. Naopak nejčastěji jsou zastoupeny koliciny působící mechanismem narušení syntézy peptidoglykanu u pacientů s CRC. Výsledky lze s opatrností interpretovat tak, že u kontrolních osob a u pacientů s IBD se nejčastěji vyskytují koliciny s antibiotickým a antineoplastickým efektem, u pacientů s CRC dominují koliciny s pouze antibakteriálním účinkem. Vzhledem k vysoké incidenci CRC v ČR je výzkum antineoplasticky působících bakteriocinů velmi aktuální a možnost implementace do klinické medicíny žádoucí.

## **7. Závěry**

### **7.1. Stanovení anti-porinových protilátek**

- Zjistili jsme významné rozdíly při vyšetření anti-porinových protilátek u pacientů s IBD, CRA, CRC a u kontrolních osob. Zvýšené hodnoty anti-porinových protilátek byly zjištěny ve skupině nemocných s IBD a v souboru pacientů s CRC.
- Statisticky signifikantně vyšší hodnoty anti-porinových protilátek byly asociovány s komplikovanými formami CN (fistulující a stenožující formou). Stanovená hodnota

anti-porinových protilátek by mohla pomoci predikovat vývoj klinického fenotypu CN.

## **7.2. Bakteriologické vyšetření bioptických vzorků z tračníku a stanovení bakteriocinogenie**

- Zavedli jsme novou metodiku bakteriologického vyšetření a následného stanovení bakteriocinogenie v biopticky odebraných vzorcích sliznice tlustého střeva.
- V jednotlivých vyšetřovaných souborech jsme stanovili bakteriocinogenii a genotypy izolovaných kmenů *E. coli*. Bakteriocinogenie se mezi jednotlivými soubory statisticky nelišila; statistickou diferencí v bakteriocinogenii jsme prokázali mezi podskupinou nemocných s nepokročilou a pokročilou kolorektální neoplázií. Nejnižší četnost výskytu genotypu A (asociovaný s méně virulentními znaky) a nejvyšší výskyt genotypu D (asociovaný s více virulentními znaky) byla nalezena u pacientů s CRC. U pacientů s pravostranným CRC byl ve 100 % bioptických vzorků diagnostikován mikrocinogenní kmen *E. coli*, jehož genotyp patřil do fylogenetické skupiny B2 a/nebo D. V 75 % vzorků ve skupině pacientů s pravostranným CRC byla vykultivována *E. coli* s genotypem B2. *E. coli* vyznačující se genotypem B2 byla stanovena častěji u nemocných s pokročilým CRA ve srovnání se skupinou s nepokročilou kolorektální neoplázií.
- Stanovili jsme jednotlivé kolicinogenotypy a určili prevalenci u zkoumaných skupin osob. Koliciny působící depolarizujícím mechanismem byly nejčastěji zastoupeny ve skupině kontrol, koliciny působící letálně inhibicí DNA a RNA byly nejčastěji zjištěny u pacientů s IBD. Koliciny inhibující syntézu peptidoglykanu byly nejvíce zastoupeny u nemocných s CRC. V jednotlivých skupinách jsme hodnotili koliciny podle translokace přes zevní membránu *E. coli*.
- Neproukázali jsme statisticky významný rozdíl v bakteriocinogenii mezi souborem nemocných s CRC a skupinou kontrolních osob. Ve skupině nemocných s CRC byla pozorována asociace míry bakteriocinogenie se zvyšujícím se stádiem karcinomu (staging hodnocen pomocí TNM klasifikace). Ve skupině pacientů s CRC byl častěji diagnostikován kolicin M (kolicin s neprokázaným antineoplastickým účinkem) ve srovnání se skupinou kontrolní.



## 8. Použitá literatura

1. Camp JG, Kanther M, Semova I et al. Patterns and scales in gastrointestinal microbial ecology. *Gastroenterology* 2009; 136(6): 1989-2002.
2. O'Keefe SJ. Nutrition and colonic health: the critical role of the microbiota. *Cur Opin Gastroenterol* 2008; 24(1): 51-58.
3. Suau A, Bonnet R, Sutren M et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(11): 4799-4807.
4. Zoetendal EG, Collier CT, Koike S et al. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr* 2004; 134(2): 465-472.
5. Lay JO Jr. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev* 2001; 20(4): 172-194.
6. Heavey PM, Rowland IR. Microbial-gut interactions in health and disease. *Gastrointestinal cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18(2): 323-336.
7. Mai V, Morris JG Jr. Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. *J Nutr* 2004; 134(2): 459-464.
8. Moore WE, Moore LH. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61(9): 3202-3207.
9. Drasar BS, Goddard P, Heaton S et al. Clostridia isolated from faeces. *J Med Microbiol* 1976; 9(1): 63-71.
10. Kornbluth AA, Danzig JB, Bernstein LH. Clostridium septicum infection and associated malignancy. Report of 2 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1989; 68(1): 30-37.
11. Swidsinski A, Khilkin M, Kerjaschki D et al. Association between intraepithelial Escherichia coli and colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998; 115(2): 281-286.
12. Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL et al. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 2007; 117(6): 1566-1574.
13. Stanghellini V, Barbara G, Cremon C et al. Gut microbiota and related diseases: clinical features. *Intern Emerg Med* 2010; 5(1): S57-63.
14. Schulz GE. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1565(2): 308-317.
15. Nakamura RM, Matsutani M, Barry M. Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta* 2003; 335(1-2): 9-20.
16. Mow WS, Vasilias EA, Lin YC et al. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 126(2): 414-424.
17. Papp M, Altorjay I, Dotan N et al. New serological markers for inflammatory bowel disease are associated with earlier age at onset, complicated disease behavior, risk for surgery, and NOD2/CARD15 genotype in a Hungarian IBD cohort. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(3): 665-681.
18. Bureš J, Horák V, Tichý M et al. Kolicinogenie u nespecifických střevních zánětů a kolorektální rakoviny. *Suppl Sbor věd Prací LF UK Hradec Králové* 1991; 34(4): 353-403.
19. Šmarda J, Šmajš D. Colicins – exocellular lethal proteins of Escherichia coli. *Folia Microbiol* 1998; 43(6): 563-582.
20. Cascales E, Buchanan SK, Duché D et al. Colicin Biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007; 71(1): 158-229.

21. Duquesne S, Destoumieux-Garzon D, Peduzzi J et al. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep* 2007; 24: 708–734.
22. Rejchrt, Drahošová M, Kopáčová M et al. Antilaminaribioside and antichitobioside antibodies in inflammatory bowel disease. *Folia Microbiol* 2008; 53(4): 373-376.
23. Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 2006; 52(2): 171-181.
24. Landers CJ, Cohavy O, Misra R et al. Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune response to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* 2002; 123(3): 689-699.
25. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I et al. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(25): 11537-11542.
26. Farkas-Himsley H, Cheung R. Bacterial proteinaceous products (bacteriocins) as cytotoxic agents of neoplasia. *Cancer Res* 1976; 36(10): 3561–3567.
27. Šmarda J, Obdržálek V. Incidence of colicinogenic strains among human *Escherichia coli*. *J Basic Microbiol* 2001; 41(6): 367-374.

## 9. Přehled publikační činnosti autora

### Původní články:

1. **Kohoutová D**, Špaček J, Papík Z et al. Dysphagia, sicca syndrome, chronic non-infectious diarrhoea – dominant symptoms of systemic AL amyloidosis. A case report. *Folia Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(2): 72-78.
2. **Kohoutová D**, Šteiner I, Bis J et al. Prorůstání karcinomu jater do dolní duté žíly a pravé síně srdeční. *Lék zprávy* 2006; 51(3): 249-254.
3. **Kohoutová D**, Tichý M, Maisnar V et al. Systémová AL amyloidóza – kazuistika. *Klin Biochem Metab* 2007; 15(36): 91-94.
4. **Kohoutová D**, Rejchrt S, Bureš J. Supportive and palliative care in gastroenterology and hepatology. *Folia Gastroenterol Hepatol* 2008; 6(2): 54-59.
5. **Kohoutová D**, Repák R, Laco J et al. Metastatické postižení srdce karcinomem žlučníku. *Folia Gastroenterol Hepatol* 2009; 7(2): 78-81.
6. **Kohoutová D**, Bureš J, Tyčová V et al. Severe cryptogenic multifocal ulcerous stenosing enteritis. A report of three cases and review of the literature. *Acta Med (Hradec Králové)* 2010; 53(1): 25-29.
7. Bureš J, Cyrany J, Kohoutová D et al. Small intestinal bacterial overgrowth syndrome. *World J Gastroenterol* 2010; 16(24): 2978-2990. **IF 2,471**
8. Bureš J, Šmajš D, Květina J, Förstl M, Šmarda J, Kohoutová D, Kuneš M, Cyrany J, Tachecí I, Rejchrt S, Lesná J, Voříšek V, Kopáčová M. Bacteriocinogeny in experimental pigs treated with indomethacin and *Escherichia coli* Nissle. *World J Gastroenterol* 2011; 17(5): 609-617. **IF 2,471**

9. Šmajš D, Bureš J, Šmarda J, Chaloupková E, Květina J, Förstl M, Kohoutová D, Kuneš M, Rejchrt S, Lesná J, Kopáčová M. Experimental administration of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 results in decreased diversity of *E. coli* strains in pigs. *Curr Microbiol* 2012; 64(3): 205-210. **IF 1,82**
10. **Kohoutová D**, Rejchrt S, Čihák M et al. Importance of correct colorectal cancer screening timing in the average-risk Czech population. *Abdomin Oncol* 2013; 1: 1-4 (elektronická publikace; dostupné z <http://abdominaloncology.com/index.php/component/k2/item/3969-importance-of-correct-colorectal-cancer-screening-timing-in-the-average-risk-czech-population>)

#### **Statě ve sbornících:**

11. Kohoutová D. Terminální péče v gastroenterologii a hepatologii. Sborník (XII. hradecké gastroenterologické dny). 14-15.3.2008
12. Kohoutová D, Bureš J, Tyčová V et al. Kryptogenní multifokální ulcerózní stenožující enteritida. Sborník (XIII. hradecké gastroenterologické dny). 20.-21.3.2009
13. Kohoutová D, Pecka M, Cyraný J et al. Jsou idiopatické střevní záněty prokoagulačním stavem? Sborník (XIV. hradecké gastroenterologické dny). 11.-12.3.2010
14. Kohoutová D, Drahošová M, Rejchrt S et al. Asociace anti-porinových protilátek s idiopatickými střevními záněty. Sborník (XV. hradecké gastroenterologické dny). 11.-12.3.2011.
15. Kohoutová D, Rejchrt S, Bureš J. Incidence kolorektálních neoplázií u pacientů s průměrným rizikem do 50-ti let věku. Sborník (XVI. hradecké gastroenterologické dny). 9.-10.3.2012
16. Kohoutová D, Bureš J. Význam kolicinů v medicíně. Sborník (XVII. Hradecké gastroenterologické dny). 25.-26.4.2013

#### **Přednášky:**

1. Kohoutová D, Rejchrt S, Bureš J. Terminální péče v gastroenterologii a hepatologii. XII. hradecké gastroenterologické dny. Hradec Králové, 15.3.2008
2. Kohoutová D, Bureš J, Tyčová V et al. Kryptogenní multifokální ulcerózní stenožující enteritida. XIII. hradecké gastroenterologické dny. Hradec Králové, 21.3.2009
3. Kohoutová D, Bureš J. Screening kolorektálního karcinomu v Královéhradeckém kraji. Rozšířené zasedání Rady pro screening kolorektálního karcinomu. Praha, 24.9.2009

4. Kohoutová D, Pecka M, Cyrany J et al. Jsou idiopatické střevní záněty prokoagulačním stavem? XIV. hradecké gastroenterologické dny. Hradec Králové, 11.3.2010
5. Kohoutová D, Bureš J. Bleeding from peptic lesions in Helicobacter pylori positive and negative persons. 8th International Symposium of Gastroenterology, Emergencies in Gastroenterology. Kiev, 13.-16.5.2010
6. Kohoutová D, Drahošová M, Rejchrt S et al. Asociace anti-porinových protilátek s idiopatickými střevními záněty. XV. hradecké gastroenterologické dny. Hradec Králové, 11.3.2011
7. Kohoutová D, Rejchrt S, Bureš J. Incidence kolorektálních neoplázií u pacientů s průměrným rizikem do 50-ti let věku. XVI. hradecké gastroenterologické dny. Hradec Králové, 10.3.2012
8. Kohoutová D, Bureš J. Význam kolicinů v medicíně. XVII. hradecké gastroenterologické dny. Hradec Králové, 26.4.2013