

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Disertační práce

MUDr. Darina Kohoutová

2013

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program

Vnitřní nemoci

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

**Large intestinal microbiota in idiopathic bowel
disease and colorectal neoplasia**

MUDr. Darina Kohoutová

Školitel: **Prof. MUDr. Jan Bureš, CSc.**

Hradec Králové, 2013

Obhajoba dne: 1.7.2013

Doktorand: **MUDr. Darina Kohoutová**

Pracoviště: II. interní gastroenterologická klinika Lékařské fakulty UK
a Fakultní nemocnice Hradec Králové
Katedra interních oborů, Subkatedra gastroenterologie,
Lékařská fakulta UK v Hradci Králové

Typ doktorského studia: kombinované

Studijní program: vnitřní nemoci

Téma disertační práce: **Střevní mikrobiota u idiopatických střevních zánětů
a kolorektálních neoplázií**

Školitel: **prof. MUDr. Jan Bureš, CSc.**
II. interní gastroenterologická klinika Lékařské fakulty UK
a Fakultní nemocnice Hradec Králové
Katedra interních oborů, Subkatedra gastroenterologie,
Lékařská fakulta UK v Hradci Králové

Zahájení práce: září 2008

Ukončení práce: duben 2013

Prohlášení autora:

Prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde využívána ke studijním účelům za předpokladu, že bude jako zdroj informací řádně citována.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé disertační práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

V Hradci Králové, dne 28.4.2013

MUDr. Darina Kohoutová

Obsah:

Poděkování.....	3
1. Literární přehled současné problematiky.....	4
1.1. Úvod.....	4
1.2. Bakterie gastrointestinálního traktu.....	4
1.2.1. Střevní mikrobiota.....	4
1.2.2. Antibiotika, probiotika, prebiotika.....	8
1.3. Kolorektální karcinom.....	10
1.3.1. Epidemiologie kolorektálního karcinomu.....	10
1.3.2. Kolorektální karcinom a střevní bakterie.....	11
1.3.3. Kolorektální karcinom, dietní návyky a střevní mikrobiota....	13
1.3.4. Kolorektální karcinom, vláknina a střevní mikrobiota.....	14
1.4. Idiopatické střevní záněty a bakterie gastrointestinálního traktu.....	17
1.5. Anti-porinové protilátky.....	18
1.6. Bakteriociny.....	20
1.6.1. Definice, historie, charakteristika kolicinů.....	20
1.6.2. Mechanismus účinku kolicinů.....	22
1.6.3. Klasifikace kolicinů.....	23
1.6.4. Význam kolicinů v klinické medicíně.....	25
1.6.5. Mikrocinny a další bakteriociny.....	26
1.7. Východiska disertační práce.....	30
2. Cíle práce.....	31
2.1. Stanovení anti-porinových protilátek.....	31
2.2. Bakteriologické vyšetření bioptických vzorků z tračníku a stanovení kolicinogenie koliformních bakterií.....	31
3. Stanovení anti-porinových protilátek u pacientů s idiopatickými střevními záněty, adenomy tlustého střeva a kolorektálním karcinomem.....	32
3.1. Metodika.....	32
3.2. Výsledky.....	44
3.3. Diskuse.....	64

4. Kultivační vyšetření bioptických vzorků odebraných ze sliznice tlustého střeva a následné stanovení kolicinogenie u pacientů s idiopatickými střevními záněty, adenomy tlustého střeva a kolorektálním karcinomem.....	72
4.1. Metodika.....	72
4.2. Výsledky.....	82
4.3. Diskuse.....	109
5. Závěry.....	124
6. Summary.....	126
7. Seznam použitých zkratk.....	129
8. Literatura.....	132
9. Přílohy.....	170

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli, prof. MUDr. Janu Burešovi, CSc. za navržení projektu mého postgraduálního studia a průběžné usměrňování výzkumu cennými podněty i radami. Pod jeho vedením jsem nabyla svých prvních vědomostí a zkušeností v oblasti medicínského výzkumu. Poděkování patří i dalším kolegům z pracoviště II. interní gastroenterologické kliniky LFUK a FN Hradec Králové.

Velký dík patří RNDr. Marcele Drahošové, která stanovila proti-porinové protilátky, dále pak za její rady z oboru imunologie (Ústav klinické imunologie a alergologie LFUK a FN). Děkuji MUDr. Monice Morávkové za její praktické rady z oboru mikrobiologie (Ústav klinické mikrobiologie LFUK a FN).

Za provedení kolicinogenotypizace, určení genotypů *Escherichia coli* a možnost konzultace v oblasti problematiky kolicinogenie a molekulární biologie vděčím doc. MUDr. Davidu Šmajsovi, Ph.D. (LF MU Brno).

Za spolupráce tohoto kolektivu jsme byli schopni zavést novou metodiku vyšetřování kolicinogenie a získat cenné výsledky, jejichž aplikace do praxe je vzhledem k incidenci kolorektálního karcinomu v České republice a idiopatických střevních zánětů ve vyspělých státech světa vysoce aktuální.

Za pomoc se statistickým zpracováním dat patří poděkování RNDr. Michalu Čihákovi, Ph.D.

Svým blízkým děkuji za pomoc a podporu.

Darina Kohoutová

Projekt vznikl v rámci řešení výzkumného grantu IGA MZ 13413 a byl částečně z tohoto výzkumného grantu podpořen.

1. Literární přehled současné problematiky

1.1. Úvod

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. Vzhledem k jejich zvyšující se incidenci a výskytu především v mladém věku pacientů se výzkum v oblasti etiopatogeneze stal prioritou mnoha vědeckých týmů. Možnost učinit diagnostiku idiopatických střevních zánětů snadnější, přesnější a tato onemocnění léčit naprosto cíleně na základě dosažených poznatků z oblasti etiopatogeneze zůstává výzvou do budoucna. Etiopatogeneze kolorektálního karcinomu i idiopatických střevních zánětů je multifaktoriální, není však pochyb, že tlustostřevní mikrobiota hraje roli zásadní, klíčovou. Odpověď na otázku, zda a proč bakterie v tlustém střevě pacientů s nádorem tlustého střeva a idiopatickým střevním zánětem produkují koliciny (bakteriociny s baktericidním a anti-neoplastickým efektem) kvalitativně a/nebo kvantitativně odlišně ve srovnání se zdravými kontrolami, by mohla vést alespoň k částečnému objasnění příčiny a vývoje těchto onemocnění. Rovněž rozdílná produkce anti-porinových protilátek (produkovaných proti zevní membráně gramnegativních bakterií *Escherichia coli*) by mohla usnadnit nejen diagnostiku tlustostřevních onemocnění, ale mohla by přinést i zásadní informace o etiopatogenezi kolorektálního karcinomu a idiopatických střevních zánětů. Cílem je možnost aplikace získaných výsledků do klinické praxe tak, aby z výzkumu mohli profitovat samotní pacienti.

1.2. Bakterie gastrointestinálního traktu

1.2.1. Střevní mikrobiota

V gastrointestinálním traktu dospělého člověka přebývá zhruba 100 triliónů mikrobiálních buněk, 15 000 druhů mikroorganismů a přes 800 druhů bakterií. Důležitost a jedinečnost vztahu střevní mikrobiota - hostitel je vysvětlitelná nejen obrovským počtem mikrobů přítomných v gastrointestinálním traktu, ale i reciprocitou vztahu střevní mikrobiota - hostitel. Složitosti nabývá tento vztah při akceptaci interakcí nejen mezi hostitelem a mikrobem (od vztahu patogenního až po komenzální), ale i mezi mnoha druhy střevních bakterií navzájem [37, 205].

Prvním, kdo pozoroval a dokumentoval vztah bakterií a lidského těla již kolem roku 1670, byl Antonie van Leeuwenhoek. Od této doby výzkum významně pokročil a soustředil se především na mikroorganismy, které mohou být kultivovány ex-vivo in-vitro. Zcela zásadním problémem je, že stále dokážeme laboratorně vykultivovat pouze kolem 20 % druhů bakterií gastrointestinálního traktu, které byly identifikovány molekulárními metodami [291].

V současnosti jsou proto kultivační techniky nahrazovány metodami, které jsou založené na hodnocení sekvence 16S rRNA bakteriálních genů. Jde o ribozomální komponenty přítomné ve všech bakteriích, které obsahují variabilní sekvence a udělují specificitu určitému druhu bakterií (sekvenováním malých podjednotek („sequencing of small subunit - SSU“) rRNA lze přímo, pomocí PCR nebo reverzní transkripce SSU rDNA získat bakteriální ribozomální RNA sekvence) [325]. Další alternativou identifikace bakterií v současné době je využití hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS; matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry). Hmotnostní spektrometrie umožňuje detekci celých buněk, jednoduchých buněčných lyzátů, ale i bakteriálních extraktů. Hlavní výhodou metody je její širokospektré využití a rychlost, s jakou lze dosáhnout chemotaxonomické klasifikace [154]. Analýzy mikrobiálních komunit dosáhneme technikami fingerprintingu (všechny metodiky jsou založeny na PCR). Ke kvantifikaci mikrobů slouží metody dot blot hybridizace (ze vzorku je izolováno veškeré množství RNA, navázáno na filtr a hybridizováno se značenými oligonukleotidovými sondami) [259] nebo fluorescent in situ hybridizace - FISH (tato metoda kombinuje SSU rRNA hybridizační sondy s epifluorescenční světelnou mikroskopií, konfokální laserovou mikroskopií nebo průtokovou cytometrií) [236]. Kromě charakteristiky struktury bakterií gastrointestinálního traktu je nezbytné definovat i její aktivitu. K tomu slouží metodika měření exprese funkčních genů, in vivo expresní technologie, použití bakteriálních arteficiálních chromozomových vektorů nebo izotopy značených substrátů [325]. Metody spektrometrie či nukleární magnetické rezonance dokáží analyzovat enzymatickou aktivitu a přítomnost metabolitů střevních mikrobiot. Žádná z těchto metod však není schopna nahradit kultivační techniku, neboť pouze tou jsme schopni izolovat jednotlivé mikroorganismy [37].

Složení bakteriálního osídlení gastrointestinálního traktu není stálé, ale mění se v závislosti na čase, prostoru a prostředí hostitele. Předpokládalo se, že k osídlení gastrointestinálního traktu dochází až postnatálně; v současnosti však dominuje názor, že ke kolonizaci trávicího traktu dochází již intrauterinně, kdy plod polyká plodovou vodu obsahující mikroby. Střevního osídlení je pak dosaženo během několika prvních měsíců života jedince, přičemž nejprve probíhá kolonizace aerobními a fakultativně anaerobními mikroorganismy a až poté následuje osídlení obligatorními anaeroby a *Bifidobakteriemi* [221]. Zásadní úlohu hraje způsob porodu (při porodu per vias naturales dochází k expozici novorozence bakteriím), kojení (přestup bakterií z kůže prsu a hematogenně translokací bakterií ze střeva matky až do mléčných žláz) a potenciální medikace antibiotiky během prvního roku života. Adekvátní kolonizace gastrointestinálního traktu bakteriemi hraje klíčovou roli pro vývoj lymfatické tkáně asociované s gastrointestinálním traktem (gastrointestinal-associated lymphoid tissue; GALT) [222]. Kvalitativní i kvantitativní složení bakteriálního osídlení je rozdílné v orálně-aborální, ale i „radiální“ ose gastrointestinálního traktu. Počet mikrobů v trávicím traktu aborálně stoupá – v tenkém střevě je 10^3 , v tlustém střevě pak 10^{11} mikrobiálních buněk/g obsahu. Vlivem podmínek, které jsou rozdílné v závislosti na proximálně-distální lokalizaci, jsou patrné i změny ve složení mikrobů – v žaludku dominují *Proteobakterie*, ve střevě pak *Firmicutes* (většinu tvoří grampozitivní bakterie – *Bacteroidetes* a *Actinobacteria*). Typické jsou malé rozdíly ve složení bakteriálního osídlení jednotlivých etází tlustého střeva. Interindividuálně rozdílný genotyp, fyziologie (věk, imunologický stav, metabolismus aj.) a

životní styl hostitele (dieta, expozice antibiotikům, patogenům aj.) vytvářejí typické hostitelské prostředí, které umožňuje interindividuálně i intraindividuálně rozdílné bakteriální složení v trávicím traktu [37].

Střevní mikrobiota se obvykle dělí na prokaryota a eukaryota a dále na organismy striktně anaerobní (*Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Peptococcus*, *Clostridium*, *Fusobacterium*), mikroaerofilní (*Lactobacillus*) a fakultativně aerobní (*Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*) [107, 172]. Anaerobních bakterií je zhruba 10-krát více než aerobních [173]. Pokud použijeme metodu hodnocení sekvence 16S rRNA genu, pak druhy *Clostridium*, *Bacteroides*, *Prevotella* a *Bifidobacterium* se zdají být nejčastěji zastoupené druhy střevních bakterií [189].

Vliv střevních bakterií na hostitele může být jak přínosný, protektivní, tak ale i nepřínosný až škodlivý. Vlivy bakterií gastrointestinálního traktu se uplatňují v oblasti nutrice, metabolismu xenobiotik, toxicity složek potravy, významnou úlohu pak mikrobiota hrají v etiopatogenezi mnoha nemocí (infekčních, syndromu bakteriálního přerůstání v tenkém střevě, poinfekčního syndromu dráždivého střeva, autoimunitních onemocnění (celiakie, diabetes mellitus 1. typu), alergických onemocnění, metabolických onemocnění (obezita, diabetes mellitus 2. typu, nealkoholická steatohepatitida), idiopatických střevních zánětů), v modulaci gastrointestinálního imunitního systému, ale i v oblasti karcinogeneze, kdy je přítomnost mutagenních a genotoxických substancí bakteriálního původu ve stolici člověka přímým důkazem [26, 107, 221, 288].

Střevní mikrobiota jsou nutričně plně závislé na svém hostiteli: na nestravitelných zbytcích potravy (vláknina, škroby, oligosacharidy), sekretech (hlen, enzymy, střevní hormony) a deskvamovaných epitelích.

Mezi pozitivní vlivy střevních bakterií vůči hostiteli patří:

1. vazba potenciálních mutagenů
2. produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem (butyrátu, propionátu, acetátu) a monosacharidů především z fermentovatelné vlákniny – např. pektinu a dále z pro makroorganismus nestravitelných složek potravy, jako jsou polysacharidy (tyto složky potravy jsou po vstupu do tlustého střeva degradovány mikrobiálními hydrolasami, lyasami, esterasami aj.) Nejdůležitější mastnou kyselinou s krátkým řetězcem se zdá být butyrát, podrobně viz kapitola 1.3.4.
3. syntéza vitaminů skupiny B a vitamínu K (příčemž foláty a biotin napomáhají regulovat proliferaci sliznice tlustého střeva)
4. přímé působení na sliznici (mikrobiota mají vliv na funkci imunitního systému, na složení hlenu, deskvamaci epitelu, neuro-humorální regulaci)

Mezi negativní a/nebo škodlivé vlivy střevních mikrobiot vůči hostiteli patří:

1. produkce toxinů
2. aktivace prokarcinogenů
3. syntéza karcinogenních a genotoxických látek z nestravitelných součástí potravy
4. pro hostitele nepříznivý metabolismus tlustostřevních bakterií vedoucí k aktivaci řady enzymů, např. betaglukuronidasy, což je nejdůležitější indukovatelný enzymatický systém střevních bakterií. Funkce betaglukuronidasy spočívá v hydrolyze konjugátu kyseliny glukuronové a potenciálně karcinogenního metabolitu vzniklého v játrech vedoucí k jeho uvolnění v tračníku; zvýšená aktivita tohoto enzymu je patrna u osob, jejichž dieta je bohatá na červené maso a živočišné tuky, naopak fermentovatelná vláknina aktivitu tohoto enzymu snižuje. Aktivita betaglukuronidasy je obvykle zvýšena u pacientů s kolorektálním karcinomem ve srovnání s osobami kontrolními [144, 231, 296]. Dále může dojít k aktivaci betaglukosidasy, 7-alfa-dehydroxylasy (viz dále), nitrátreduktasy a nitroreduktasy (požitá nitráty jsou redukovány nitrátreduktasou střevních bakterií na toxičtější nitrity, které vytvářejí s nitrogenními substancemi z velké části karcinogenní a DNA alkylující N-nitro sloučeniny. Vyšší obsah N-nitro sloučenin je přítomen u osob s dietou bohatou na červené maso) [121].
5. střevní mikrobiota ovlivňuje metabolismus žlučových kyselin (především 7-alfa-dehydroxylací). Transformují primární žlučové kyseliny (chenodeoxycholovou a cholovou) na sekundární žlučové kyseliny (deoxycholovou a lithocholovou), které patří mezi promotory tlustostřevních tumorů, jsou genotoxické a kancerogenní a také přispívají k selekci buněk rezistentních vůči apoptóze. Vysokotučná strava zvyšuje koncentraci žlučových kyselin ve stolici, vláknina z pšeničných otrub naopak snižuje [95, 122]. Za 7-alfa dehydroxylaci odpovídá jen velmi limitované procento anaerobních střevních bakterií (naproti tomu hydrolyzy žlučových kyselin či jejich dehydrogenace se účastní velké spektrum anaerobních bakterií) [235].

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 [107]. Je dokázáno, že změnou diety na nízkoenergetickou u původně obézních pacientů lze během jednoho roku docílit změny ve složení střevních bakterií ve smyslu snížení gram pozitivních *Firmicutes* a naopak zvýšení *Bacteroides*. Tato skutečnost podporuje i koncept Baas-Beckinga [226], který předpokládá, že všechn mikrobiální život je rozšířen celosvětově a je jen na lokálních podmínkách selekce prostředí, jaké biodiverzity bude dosaženo v rozdílných prostředích [37].

1.2.2. Antibiotika, probiotika, prebiotika

Léčba antibiotiky je vždy spojena s kvantitativními i kvalitativními změnami bakteriálního osídlení střeva. Většinou jde o změny dočasné (jen vzácně přesahují dobu dvou měsíců), obvykle během 4 týdnů od ukončení antibiotické terapie dochází k obnově původní bakteriální diverzity, což značí výraznou odolnost bakterií gastrointestinálního traktu [37]. Alterace složení bakteriálního osídlení v rámci antibiotické terapie zvyšuje možnost uplatnění se tlustostřevních patogenů. Právem obávanou zůstává především infekce *Clostridium difficile* či *Clostridium perfringens*. Je dokázáno, že současné podávání probiotik spolu s antibiotiky vede ke zvýšení efektu antibiotické terapie (cestou např. produkce bakteriocinů); současně probiotika snižují pravděpodobnost uplatnění se patogenů v gastrointestinálním traktu [222].

Ruský biolog, zoolog a protozoolog Ilja Mečnikov, laureát Nobelovy ceny za fagocytózu v roce 1908, předpokládal jako první ve svém díle „Prodloužení života“ („Prolongation of life“), že by perorálně požití mikrobi mohli být pro člověka užiteční především v léčbě chorob trávicího traktu [120, 298]. Až téměř o sto let později Roy Fuller, britský mikrobiolog, definoval probiotika jako substance vedoucí ke zlepšení rovnováhy střevní mikroflóry. Aktuální definice z roku 2001 tvrdí, že „probiotika jsou živé mikroorganismy, které, pokud jsou požívány v adekvátním množství, přinášejí hostiteli užitek v oblasti jeho zdraví“ [74]. Podmínkou je, že probiotika musí být izolována jako jednotlivé kmeny nebo kombinace jednotlivých kmenů. Mezi nejvíce prostudovaná probiotika patří *Escherichia coli 1917 Nissle* (jako jediné probiotikum má identifikovaný celý genom), dále pak rody *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Pozitivní efekt probiotik je možné spatřovat na mnoha úrovních: suprimují patogeny a modulují bakteriální složení gastrointestinálního traktu, ovlivňují imunitní systém supresí prozánětlivých faktorů a zvýšením protizánětlivých faktorů, ovlivňují proliferaci a diferenciaci epiteliálních buněk, působí na bariérovou funkci střeva. Suprese zánětu byla pozorována např. při použití směsi VSL#3 (3 druhy *Bifidobacterium*, 4 druhy *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus*), která stimuluje dendritické buňky k produkci interleukinu-10 (IL-10). Podobně může dojít vlivem probiotik ke zvýšení hladin transforming growth faktoru- β (TGF- β). Vlivem kmenů avirulentních *Salmonel* dochází ke snížení degradace inhibitoru nukleárního faktoru NF- κ B, tím supresi aktivace NF- κ B a tím snížení produkce prozánětlivých cytokinů včetně tumor necrosis faktoru (TNF) a IL-8 enterocyty a kolonocyty. Působením probiotik dochází také ke zlepšení bariérové funkce střeva – snadnější formaci těsných spojení, redukcí permeability, zvýšení produkce hlenu, zvýšení výměny aniontu Cl^- za OH^- (a snížení rizika sekrečního průjmu), produkci proteinů tepelného šoku (heat shock proteins) a tím ochraně před oxidačním stresem [222]. Zlepšení bariérové funkce střeva (snížení translokace bakterií do mezenteriálních lymfatických uzlin a jater) je žádoucí především u kriticky nemocných, obvykle léčených kombinací antibiotik [18]. Rovněž u pacientů s jaterní cirhózou je medikace probiotiky významná z důvodu snížení permeability střevní stěny, snížení bakteriální translokace a endotoxémie (což bylo prokázáno ve studiích se zvířaty, ale i v klinických studiích) [152]. Důležitým faktem pro praxi je, že užívaná probiotika se nestanou součástí střevních bakterií, ale jsou v tlustém střevě přítomna pouze po dobu medikace nebo po krátkou periodu po jejich užití [26, 46, 270].

Probiotika užívána perorálně jsou efektivní nejen v gastrointestinálním traktu, mohou se ale příznivě uplatnit i v oblasti urogenitálního traktu či dutiny ústní. Ukazuje se, že probiotika mohou mít příznivý dopad i na nemoci neurologické či psychiatrické [222].

V oblasti vývoje kolorektálního karcinomu mají probiotika také svojí úlohu: ve studiích na myších inokulovaných tumorózními buňkami došlo při užití probiotik ke zvýšení buněčné imunitní odpovědi (zvýšení T lymfocytů a NK buněk) [156]. Lze předpokládat, že probiotika jsou schopna snížit riziko vývoje kolorektálního karcinomu následujícími mechanismy: změnou složení bakteriálního osídlení tlustého střeva (zvýšením zastoupení především *Bifidobacterií* a *Lactobacillů*) [91, 208], redukcí tlustostřevního zánětu [13], zvýšením produkce folátu (*Streptococcus termophilus*) [309], snížením mutagenů (např. navázáním nitroslooučenin nebo heterocyklických aminů) [227], genotoxinů (studie na kryších prokázaly snížení genotoxicity tekuté frakce stolice při léčbě probiotiky *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium longum*) [204] a karcinogenů (*Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus casei* dokáží snížit enzymatickou aktivitu β -glukuronidasy) [97, 285], zvýšením imunitní odpovědi (ovlivnění produkce cytokinů a funkce T-lymfocytů) [115, 227], zvýšením apoptózy buněk kolorektálního karcinomu (studie na myších) [293] a produkcí mastných kyselin s krátkým řetězcem (viz kapitola 1.3.4.).

Prebiotika, poprvé představena Gibsonem a Roberfroidem v r. 1995 [94], jsou definována jako nestravitelné součásti potravy, rezistentní ke kyselému žaludečnímu pH, intestinální hydrolyze, účinku trávicích enzymů a absorpci v tenkém střevě; musí jít o látky fermentovatelné tlustostřevními bakteriemi a jde o substance, které příznivě ovlivňují makroorganismus stimulací růstu či aktivity jednoho nebo několika málo druhů bakterií v tlustém střevě (především *Laktobacillů* a *Bifidobakterií*). Obvykle se jedná o oligosacharidy nebo polysacharidy – typickým příkladem je inulin, oligofruktóza (frukto-oligosacharidy), galakto-oligosacharidy a laktulóza [18]. Fermentace sacharidů bakteriemi vede ke vzniku mastných kyselin s krátkých řetězcem, monosacharidů a plynů (podrobně viz kapitoly 1.2.1. a 1.3.4.). Předpokládá se, že k signifikantnímu zvýšení *Bifidobakterií* v tlustém střevě dojde při konzumaci alespoň 4-8 g frukto-oligosacharidů denně [205]. Prebiotika mají antitumorózní efekt – viz kapitola 1.3.4. Metaanalýzou Friedenreicha bylo dokázáno, že při denním příjmu přesahujícím 27 g vlákniny dochází k redukcí rizika vzniku kolorektálního karcinomu o 50 % ve srovnáním s jedinci, jejichž denní příjem vlákniny je nižší než 11 g [89].

Synbiotika, rovněž představena Gibsonem a Roberfroidem v r. 1995 [94], představují kombinaci probiotik a prebiotik. Příznivě by hostitele měla tato kombinace ovlivňovat nejen kombinací efektu, ale i synergismem [227, 228]. Zkoumána byla např. výhodná kombinace *Lactobacillus plantarum* s oligofruktózou. Je dokázáno, že užití synbiotik vede k redukcí poškození DNA, snížení buněčné proliferace a také k redukcí genotoxicity tekuté frakce stolice (jakožto biomarkeru rizika kolorektálního karcinomu) [155]. Použitím synbiotika lze dosáhnout většího snížení tvorby fokusů aberantních krypt než při monoterapii probiotikem nebo prebiotikem [243]. Při medikaci synbiotiky dochází také ke zvýšení produkce interleukinu-2 mononukleáry, zvýšení produkce interferonu u pacientů s nádorem [228] a prevenci suprese aktivity NK buněk v Peyerových placích [241].

Efekt probiotik, prebiotik a synbiotik lze uplatnit v klinické v praxi: probiotiky a synbiotiky lze zkrátit dobu trvání akutní enteritidy; probiotika *Lactobacillus rhamnosus* a *Sacharomyces boulardi* mají efekt v léčbě postantibiotických průjmů způsobených *Clostridium difficile* a lze je použít k prevenci průjmů asociovaných s antibiotiky u dětí. V léčbě průjmů způsobených *Clostridium difficile* je vhodné používat kombinaci antibiotik (perorální vankomycin, metronidazol, rifaximin) spolu s prebiotiky (je patrně méně relapsů než při samostatné antibiotické léčbě). Nejvýhodnější se zdá být však kombinace antibiotika (eliminace/suprese patogenů), probiotika (suplementace změněné mikrobiální flóry) a prebiotika (doplnění žádoucích mikroorganismů - hlavně *Bifidobakterií* a *Laktobacilů*) [18, 222]. V oblasti idiopatických střevních zánětů nespĺnila intervence probiotiky předpokládaný účel. Přesto lze alespoň dílčí efekt pozorovat u pacientů s ulcerózní kolitidou v případě medikace *Escherichia coli* 1917 Nissle - efekt této terapie je srovnatelný s nízkými dávkami 5-aminosalicylové kyseliny v prevenci relapsu ulcerózní kolitidy u dospělých. Dále při použití kombinace probiotik VSL#3 může dojít k navození remise a snížení aktivity onemocnění u pacientů s mírnou nebo středně těžkou ulcerózní kolitidou [253]. Stejnou směs probiotik lze úspěšně použít i k prevenci akutní pouchitidy. Prebiotika (inulin) lze medikovat s cílem redukce pouchitidy a zánětu v ileo-pouch-anální anastomóze. Je známo, že u pacientů s ulcerózní kolitidou jsou populace *Bifidobakterií* 30krát sníženy ve srovnání se zdravými jedinci; podle klinické studie (kontrolované placebem) došlo po medikaci oligofruktózy obohacené inulinem k poklesu kalprotektinu a snížení aktivity zánětu v tračníku. Vlivem probiotik byl popsán pokles Harvey-Bradshaw indexu u pacientů s ileo-kolickou formou Crohnovy choroby [18]. Bohužel Crohnova choroba je k intervenci probiotiky relativně refrakterní. Efektu léčby probiotiky lze docílit i u syndromu dráždivého střeva. Nekrotizující enterokolitida je nejčastější příčinou syndromu krátkého střeva u dětí. Je známo, že probiotika redukuje riziko incidence nekrotizující enterokolitidy o zhruba dvě třetiny a letalitu o polovinu (popsaný mechanismus účinku spočívá jednak v supresi dráhy NF-κB a dále ve stimulaci angiogeneze v tenkostřevních klcích a tím zmírnění hypoxicko-ischemického poškození) [222]. Experimenty na zvířatech (krysách) dokazují, že i prebiotika (oligofruktóza) zvyšují množství tlustostřevních *Bifidobakterií* a brání pomnožení / přerůstání patogenních bakterií (*Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*), které se účastní vzniku nekrotizující enterokolitidy [18].

1.3. Kolorektální karcinom

1.3.1. Epidemiologie kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom je třetí nejčastější rakovinou v západním průmyslovém světě a zůstává na druhém místě co do příčin úmrtí na nádorové onemocnění [288]. Česká Republika se v posledních desetiletích řadí na přední místa v incidenci tohoto nádoru. Naproti tomu v Africe je kolorektální karcinom až 12. nejčastější příčinou úmrtí na zhoubný nádor [188]. Ročně je celosvětově toto onemocnění diagnostikováno u 940 000 osob, 500 000 osob na tuto chorobu zemře [123]. Na vzniku kolorektálního karcinomu se podílejí faktory genetické a

faktory prostředí [288]. Většina kolorektálních karcinomů (více než 80 %) vzniká sporadicky, kdy se z kolorektálního adenomu postupnou akumulací mutací v genech, které kódují růst buněk a opravu DNA (APC gen, K-ras onkogen, tumor supresorový gen p53 (lokalizovaný na 17. chromozomu), delece na chromozomu 18q v oblasti genu Deleted in Colorectal Carcinoma (DCC), mismatch repair geny), stává kolorektální karcinom [107, 123].

1.3.2. Kolorektální karcinom a střevní bakterie

Střevní mikrobiota hrají významnou roli v etiopatogenezi kolorektálního karcinomu. Přímým důkazem je přítomnost mutagenních a genotoxických substancí bakteriálního původu ve stolici člověka [107, 221, 288]. Studiemi na zvířatech (krysách) byla účast bakterií gastrointestinálního traktu na vývoji karcinomu potvrzena. U zvířat s mikrobiálním osídlením byl po působení iniciátoru tumoru 1,2-dimethylhydrazinu zjištěn nádor ve 4 případech (4/24) ve srovnání se vznikem pouze 2 adenomů (2/18) u skupiny bezmikrobních zvířat. Abakteriální skupina krys rovněž disponovala lepší protinádorovou imunitní odpovědí: vyznačovala se vyšší produkcí NK buněk, cytotoxických T lymfocytů a B lymfocytů [232]. Jiné studie na myších dokazují spoluúčast střevních bakterií při vývoji kolorektálního karcinomu: u myši s absencí interleukinu-10 [11] nebo s absencí TCR β (T-cell receptor β) a tumor supresorového genu p53 [137] dochází v případě kolonizace tlustého střeva bakteriemi k vývoji zánětu a nádorů na rozdíl od myši, jejichž trávicí trakt bakteriemi kolonizován není.

Bakterie jsou schopny navodit nebo se účastnit karcinogeneze více mechanismy: mohou se spoluúčastnit vzniku chronického tlustostřevního zánětu, v jehož terénu karcinom vzniká snadněji; mohou se účastnit vzniku adenomů, aniž by navodily zánět (ve studii vyvinuly gnotobiotické myši pouze 50 % adenomů v tenkém střevě) [61]; třetím mechanismem je navození karcinogeneze bakteriemi za určitých podmínek – např. infekcí *Helicobacter hepaticus* za přítomnosti dalších druhů střevních bakterií [319]. Dalším mechanismem je aktivace prokarcinogenů nebo produkce toxinů, karcinogenů a mutagenů (např. fekapentaenů nebo volných kyslíkových radikálů) [92]. Intestinální mikrobiota jsou schopny navozením změny pH aktivovat nežádoucí enzymatické procesy v tlustém střevě (např. aktivace β -glukuronidasy vede k nežádoucí nadprodukci genotoxických a karcinogenních sekundárních žlučových kyselin) [95, 122].

Vzhledem k obtížím při kultivaci nebyl doposud identifikován vzorec mikroorganismů, který by se vyskytoval u pacientů s kolorektálním karcinomem. Metodami detekce bakteriální 16S RNA bylo zjištěno, že u pacientů s kolorektálním karcinomem jsou přímo v tumorózní tkáni (na rozdíl od nádorem nepostíženě sliznice) více zastoupeny *Bacteroides* a méně *Firmicutes*, dále byly v tumorózní tkáni detegovány ve větším množství *Coriobacteridae* a naopak podstatně méně *Enterobacteriaceae*. Je známo, že patogenní bakterie *Citrobacter* nebo *Salmonella* nejsou v tlustém střevě zdravých jedinců přítomny vůbec nebo jsou zastoupeny velmi málo; tyto mikroorganismy jsou však detegovány v nádorem nepostíženě sliznici pacientů s kolorektálním karcinomem a také ve sliznici pacientů s kolorektálním adenomem. Spoluúčast bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* na vývoji kolorektálního karcinomu je pak

vysvětlována navozením asymptomatické, ale chronické zánětlivé odpovědi v tlustostřevní sliznici, a také produkcí genotoxinů, které zasahují DNA (což vede k akumulaci mutací, které charakterizují sekvenci adenom-karcinom). Analogická situace je pozorována i u bakterie *Helicobacter pylori* během procesu karcinogeneze v žaludku [67, 142, 170, 178, 197, 203, 225, 260, 313].

V mnoha studiích byl zkoumán vliv jednotlivých bakterií na vývoj kolorektálního karcinomu. S tímto nádorem jsou spojovány především druhy *Bacteroides* [113, 184], v poslední době pak zvláště *Bacteroides fragilis*, který u pacientů s kolorektálním karcinomem na rozdíl od kontrol produkuje metaloproteinazu [258]. U pacientů s kolorektálním karcinomem (a zvýšeným zastoupením bakterií rodu *Bacteroides*) byla také potvrzena infiltrace nádorových vzorků, ale i lamina propria zdravé mukózy buňkami produkujícími interleukin-17 (IL-17) [281]. Dále je s kolorektálním karcinomem spojován rod *Prevotella* [281], *Clostridium* (především *lecitinas* *negativní*, které přeměňují primární žlučové kyseliny na sekundární) [62], některé rody *Lactobacillus* [140] a *Streptococcus bovis* (indukuje tvorbu hyperproliferativních aberantních kolonických krypt, zvyšuje expresi proliferačních markerů a zvyšuje produkci IL-8 tlustostřevní sliznicí) [107]. Infekce *Clostridium septicum* je vzácná, ale v 81 % je spojená s latentní malignitou, ve 34 % s kolorektálním karcinomem [146]. Ve studii Marchesi et al. nebyly pomocí metody detekce 16S rRNA u pacientů s kolorektálním karcinomem nalezeny téměř žádné sekvence bakteriální RNA *Streptococcus bovis* a *Clostridium septicum* [178]. Lze však předpokládat, že takoví oportunističtí patogeni jsou přítomni především v adenomatózní tkáni a účastní se vzniku karcinomu; v samotné nádorové tkáni již pak přítomni být nemusí [16]. Nežádoucí bakterií je také *Enterococcus faecalis*, protože produkuje kyslíkové radikály. Ve studii na myších byla potvrzena asociace bakterií *Helicobacter hepaticus* a *Citrobacter rodentium* s vývojem kolorektálního karcinomu [123, 284]. U pacientů s kolorektálním karcinomem je také předpokládáno vyšší zastoupení intraepiteliálních *Escherichia coli* [295]. Naopak za protektivní bakterie můžeme považovat některé druhy *Lactobacillus* (*L. acidophilus*), *Bifidobacterium* (*B. longum*) [181, 242] a *Eubacterium aerofaciens* [184] či *Eubacterium lentum* – syntetizuje 21-dehydroxyylasu, která konvertuje karcinogenní žlučový tetrahydrodeoxykortikosteron na nekarcinogenní pregnanolon (pacienti s kolorektálním karcinomem mají fekální aktivitu tohoto enzymu sníženou až o 99 % ve srovnání se zdravými osobami) [15].

Zcela zásadní by bylo v současné době určit, zda se změna složení střevních mikrobiot podílí na vzniku kolorektálního karcinomu (tzn. zda hraje roli v jeho etiopatogenezi) 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 [37].

1.3.3. Kolorektální karcinom, dietní návyky a střevní mikrobiota

Sporadický kolorektální karcinom je onemocnění s výraznou vazbou na environmentální faktory včetně faktorů dietních. Vliv diety byl studován např. u afroameričanů, kteří trpí vyšší incidencí kolorektálního karcinomu ve srovnání s americkými bělochy. Lze předpokládat, že právě rozdílné dietní návyky u obou etnik budou rezultovat v rozdílnou intenzitu expozice kolonocytů mutagenům a v navození kvantitativních i kvalitativních změn ve složení střevních mikrobiot [171, 207, 254-265]. Studie etiopatogeneze sporadického kolorektálního karcinomu srovnávaly domorodé Afričany (kteří mají incidenci kolorektálního karcinomu nízkou: <1:100000), afroameričany (incidence kolorektálního karcinomu: 65:100000) a americké bělochy (incidence kolorektálního karcinomu: 50:100000). Jako první upozornil na nízkou incidenci kolorektálního karcinomu u Afričanů Burkitt a již ten deklaroval úzkou vazbu vzniku nádoru na typ diety [33, 34]. Afričané obvykle konzumují dietu bohatou na kukuřici (s vysokým obsahem škrobů) a malé množství živočišných produktů. Naproti tomu Američané obvykle konzumují vysokoproteinovou a tučnou stravu. Ve srovnání s afroameričany a americkými bělochy bylo ve studii prokázáno, že obsah mastných kyselin s krátkým řetězcem (zejména butyrátu) je vyšší ve stolici domorodých Afričanů ve srovnání s oběma skupinami Američanů [205, 206]. Bylo prokázáno, že červené maso stimuluje kmeny bakterií, které se účastní vzniku sekundárních žlučových kyselin (ty jsou cytotoxické a kancerogenní). Tuk v potravě zvyšuje syntézu a enterohepatickou cirkulaci primárních žlučových kyselin, přičemž část z nich není vstřebána v terminálním ileu, ale dostává se do tlustého střeva, kde dochází za přítomnosti bakteriální 7-alfa-dehydroxylasy k jejich konverzi na sekundární žlučové kyseliny [193]. Červené maso stimuluje také růst sulfát-redukujících bakterií (např. *Desulfovibrio vulgaris*), které produkují genotoxický hydrogensulfid (působí přes volné kyslíkové radikály) [4]. Hydrogensulfid brání oxidaci butyrátu, čímž snižuje jím zprostředkovanou absorpci iontů, ale i tvorbu hlenu či buněčnou detoxifikaci [288]. Sulfátredukující bakterie mají také proproliferativní, antiapoptotický a na střevní epitelie toxický efekt [123]. Je známo, že vysoké zastoupení aminokyselin se sírou je přítomno v hovězím mase. Během metabolismu těchto aminokyselin dochází ke vzniku toxického hydrogensulfidu; samotný sulfid je poté detegován ve vyšším množství ve stolici [169]. Zajímavé je zjištění prokázané kompetice o růstové substance v tlustostřevním prostředí mezi metanogenními a sulfátredukujícími bakteriemi. Tento význam podtrhuje skutečnost, že v evropské a severoamerické populaci je pouze polovina obyvatel exkretorem metanu, kdežto 90 % africké populace (černoši) má metanogenní fenotyp [129, 217, 290]. Bakterie jsou důležitým zdrojem vitaminů, přičemž významnou roli v regulaci epigenetické proliferace epitelu hraje folát (v případě deficitu dochází ke zvýšení rizika zlomů jedno- i dvouvláknové DNA a vzniku mutací DNA při misinkorporaci uracilu za thymin při syntéze DNA) [123, 289] a biotin (ovlivňuje transkripci, replikaci a opravy DNA) [289]. Ve výše uvedené studii bylo potvrzeno, že byt' je přívod folátu ve stravě Afričanů nižší, není střevní obsah folátu u Afričanů nižší ve srovnání se skupinou afroameričanů a amerických bělochů. V jiné studii bylo potvrzeno, že hlavním producentem folátu jsou některé kmeny druhu *Bifidobakterií* (na rozdíl od dalších bakterií, které jsou spíše jeho konzumenty) [218]. Hodnoty střevního obsahu biotinu u amerických bělochů odpovídaly doporučenému příjmu biotinu, u domorodých Afričanů však výrazně převyšovaly doporučený denní příjem [207]. Klíčová role střevních

mikrobiot v produkci vitamínů účastnících se regulace proliferace sliznice je důležitá proto, že v určitých zemích / kontinentech (Afrika) není přívod vitamínů dostatečný, dále nikdy není vstřebáváno 100 % vitamínů v tenkém střevě a vitaminy vyprodukované střevními bakteriemi se mohou uplatnit na základě prokázané přítomnosti specifických tlustostřevních transportérů pro folát, biotin, tiamin, riboflavin a pyridoxin [64, 248-251].

Substancí zvyšující riziko vzniku kolorektálního karcinomu je etanol, který interferuje s dostupností folátu a jehož produktem je karcinogenní acetaldehyd [123]. Nežádoucí účinky nedostatku folátu a nadbytku etanolu ve stravě mohou být kompenzovány aspirinem, ireverzibilním inhibitorem enzymu cyklooxygenasy [96]. Tlustostřevní bakterie disponují alkoholdehydrogenasou, enzymem, který přeměňuje cukry na etanol. V případě nadbytku etanolu však dochází ke změně aktivity mikrobiální alkoholdehydrogenasy a nežádoucímu vzniku acetaldehydu [123]. Heterocyklické aminy, vznikající při tepelné úpravě masa (především při vysoké teplotě - grilování, pečení), jsou prokázaným karcinogenem u myši, potkanů a opic. Byl popsán jejich vztah k vývoji střevních, jaterních tumorů a nádorů prsu [263, 265, 292]. Dalšími škodlivými substancemi jsou fekapentaeny (polynenasycené lipidy schopné alkylace DNA, které jsou produkované tlustostřevními bakteriemi rodu *Bacteroides*) [220] a kyslíkové radikály produkované např. *Enterococcus faecalis* (superoxid, peroxid vodíku, hydroxylový radikál a peroxynitrit, které jsou schopné reagovat přímo s DNA kolonocytů nebo vytvářet reaktivní intermediátory) [123, 124].

1.3.4. Kolorektální karcinom, vláknina a střevní mikrobiota

Dietní vláknina jsou sacharidy, jejichž většina (téměř 100 %) se dostává do tlustého střeva v nezměněné formě a je zde štěpena střevními bakteriemi. Závisí na druhu vlákniny, na bakteriích gastrointestinálního traktu a střevním transitu, zda a jaký produkt fermentace vznikne [18, 43]. Mezi vysoce fermentovatelné vlákniny patří např. pektin, hemicelulóza (obsažené v ovoci a zelenině) nebo ovesné otruby, naopak nefermentovatelnou vlákninu představuje celulóza (obsažená např. v cereáliích) nebo pšeničné otruby. Fermentace vlákniny vede ke vzniku mastných kyselin s krátkým řetězcem (acetátu, propionátu, butyrátu), plynů (metanu, vodíku, oxidu uhličitého aj.) a monosacharidů [18, 49]. Obvykle vzniká nejvíce acetátu; pokud vyjádříme vznikající mastné kyseliny s krátkým řetězcem v molárním množství, pak acetát: propionát: butyrát = 60:20:20 [48]. Nejvyšší počty bakterií, největší intenzita fermentace, ale i proliferace je v proximální části tlustého střeva, protože zde jsou substráty nejdostupnější [168]. pH souvisí s množstvím mastných kyselin s krátkým řetězcem – a právě to by mohlo vysvětlovat maximum incidence kolorektálního karcinomu v rektosigmatu. Pokud je střevní transit delší než 50 hodin, butyrát je kompletně absorbován kolonocyty a není ve stolici detegovatelný [302]. V opačném případě je ale stále vyloučeno jen kolem 5-10 % mastných kyselin s krátkým řetězcem, protože jejich absorpce je především v céku a colon ascendens velmi efektivní a rychlá; je spojena s absorpcí sodíku, vody a exkrecí bikarbonátu. Absorpce mastných kyselin s krátkým řetězcem se děje v souladu s koncentračním spádem; 60 % je absorbováno pasivní difúzí, 40 % kyselin se do kolonocytů

dostává na základě iontové výměny (zahrnující transport sodíku a draslíku) [245]. Zdá se, že z mastných kyselin s krátkým řetězcem by právě butyrát (hlavní anion tlustého střeva) mohl hrát protektivní roli při / proti vzniku kolorektálního karcinomu. Ne však všechny studie podporují toto tvrzení, proto se v této souvislosti používá termínu „butyrátový paradox“. Obecně lze říci, že chemopreventivní účinek butyrátu je závislý na typu vlákniny, která je dodána, dále na množství butyrátu a načasování jeho expozice ve vztahu k nádorovému procesu [166]. Zajímavou skutečností je to, že v současnosti tolik preferované *Bifidobakterie* primárně produkují především acetát a laktát, ne butyrát. Až důležitou souhrou *Bifidobakterií* s butyrát-produkujícími bakteriemi (*Retortamonas intestinalis* a *Eubacterium hallii*) dochází v tlustém střevě ke kýžené konverzi laktátu na butyrát [9, 66].

Nefermentovatelná vláknina má v tlustém střevě také svoji funkci: působí dilučně a snižuje tak koncentraci karcinogenů a prokarcinogenů; dále akceleruje pasáž stolice v tlustém střevě, což opět omezuje působení karcinogenů a prokarcinogenů na střevní sliznici [18]. Další funkcí nefermentovatelné vlákniny je vazba žlučových kyselin, tím zvýšení jejich ztrát stolicí, což vede k redukci lipidů v séru [215].

Butyrát je základním aerobním energetickým substrátem pro kolonocyty. Jako energetický zdroj je preferován před propionátem a acetátem v poměru 90:30:50 [43] a je dokonce upřednostňován i před glukózou a glutaminem, které jsou dodávány krví [85]. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které jsou absorbovány z tlustého střeva, jsou životně důležitým energetickým zdrojem pro pacienty se syndromem krátkého střeva (pokryjí až 1000 kcal energie denně) [205]. Pokud nejsou sacharidy (jakožto preferovaný substrát pro většinu tlustostřevních bakterií) obsaženy v dietě hostitele, mohou bakterie degradovat hlen přítomný v trávicím traktu [234]. Butyrát zvyšuje proliferaci kolonocytů, stimuluje jejich diferenciaci, dokáže však suprimovat proliferaci buněk kolorektálního karcinomu [318]. Dále brání apoptóze normálních kolonocytů, avšak stimuluje apoptózu buněk zasažených kolorektálním karcinomem [55, 166], snižuje angiogenezi [55]. Inhibuje růst transformovaných buněk a naopak přispívá k reverzi neoplastických do non-neoplastických fenotypů buněk [252]. Protinádorový účinek butyrátu spočívá i ve snížení pH, což má za následek redukci solubility žlučových kyselin a navíc snížení aktivity 7-alfa-dehydroxylasy, která přeměňuje primární žlučové kyseliny na sekundární; další efekt má snížení pH na zvýšení dostupnosti vápníku, který váže mastné kyseliny a volné žlučové kyseliny [318].

Rozporuplně ale vyšla již první studie na zvířatech (krysách), kdy byla studována úloha butyrátu v efektu zabránění vývoje experimentálně navozeného kolorektálního karcinomu: paradoxně ve skupině zvířat požívajících butyrát bylo zjištěno větší množství kolorektálních karcinomů ve srovnání se skupinou krys, které butyrát nepožívaly (85 % vs. 50 % zvířat) [88]. Ani autoři dalších studií [35, 36, 57] nepotvrdili protektivní efekt butyrátu na vznik kolorektálního karcinomu, respektive snížení vzniku aberantních krypt. Zásadní příčinou, proč vycházejí studie s butyrátem tak rozdílně, jsou podmínky, které panují v situaci in vivo a ex-vivo in-vitro. Vzorec diferenciaci kolonocytů v jednotlivých kryptách a možnost apoptózy v horní části krypt není in vitro zachován, dále v podmínkách in vitro je pH stálé, kdežto lumenální střevní pH se vlivem mastných kyselin s krátkým řetězcem liší od pH sliznice tračnicku.

Obecně lze říci, že chemopreventivní účinek butyrátu je závislý na typu vlákniny, která je dodána, dále na množství butyrátu a načasování jeho expozice ve vztahu k nádorovému procesu (příčemž butyrát je známý inhibitor histon-deacetylasy). Důležité je množství butyrátu – nízké koncentrace stimulují proliferaci buněk, vysoké koncentrace proliferaci tlumí. Hranicí je dosažení oxidačního plateau pro butyrát, kdy se již dále nemění na oxid uhličitý, ale dochází k syntéze lipidů a ketogenezi. [84, 323]

Acetát a propionát jsou kromě butyrátu další dvě základní mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Acetát se po absorpci stává základním substrátem pro syntézu cholesterolu v játrech a dále po oxidaci zdrojem energie pro buňky kosterního svalstva. Propionát je jednak substrátem pro glukoneogenezi, je ale i inhibitorem glukoneogeneze. Suplementací propionátu v dietě lze docílit snížení hladin cholesterolu in vivo (inhibuje aktivitu enzymů účastnících se syntézy cholesterolu). Snížení poměru acetátu vs. propionátu by tedy mohlo redukovat riziko kardiovaskulárních onemocnění [12, 128, 318].

Prebiotika (především inulin nebo oligofruktózou obohacený inulin) vedou k redukcí vzniku fokusů aberantních krypt v tlustém střevě. Aberantní krypty jsou považovány za preneoplastické léze, exprimují mutace v APC genu i K-ras onkogenu a uplatňují se ve vývoji většiny tlustostřevních nádorů. Ložiska aberantních krypt se vyznačují větší velikostí krypt i perikryptového prostoru a prominujícími epiteliálními buňkami [18, 230]. Působení oligofruktózy nebo inulinu je vysvětlováno příznivým zvýšením *Bifidobakterií* a naopak snížením bakterií rodu *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium* a/nebo grampozitivních koků ve stolici. *Bifidobakterie* jsou schopny vázat tlustostřevní karcinogeny a napomáhat jejich vylučování stolicí, dále jsou producentem mastných kyselin s krátkým řetězcem, laktátu, který snižuje pH a brání tak množení potenciálně patogenních bakterií (např. *Escherichia coli* či *Clostridium perfringens*), současně snížením pH dochází k redukcí enzymatické aktivity patogenů, např. mikrobiální betaglukuronidasy [315]. V experimentální studii na zvířatech (krysách) dochází při suplementaci oligofruktózou obohacenou inulinem k prevenci suprese (a dokonce naopak zvýšení aktivity) NK buněk lymfatické tkáně tlustého střeva a tím potlačení vývoje nádoru (NK buňky rozpoznávají a eliminují nádorové buňky). Současně dochází také ke zvýšení interleukinu-10 [241].

Studii s probiotiky na zvířatech (konkrétně *Bifidobacterium longum* na krysách) bylo potvrzeno, že i ta vedou k redukcí vzniku aberantních krypt. Efekt *Bifidobacterium longum* spočívá v inhibici proliferace buněk tlustostřevní sliznice a snížení aktivity ornitindekarboxylasy, enzymu účastnícího se syntézy polyaminů, které hrají klíčovou roli v proliferaci a diferenciaci buněk [230]. Elevace ornitindekarboxylasy byla zjištěna u pacientů s tlustostřevními neoplazmi [269], v dysplastických polypech (na rozdíl od nedysplastických) [164] a také v tlustostřevní sliznici pacientů s polypózou (na rozdíl od pacientů kontrolních) [165]. Ve studii na zvířatech bylo také prokázáno, že *Bifidobacterium longum* suprimuje expresi celkového a mutovaného K-ras onkogenu v tlustostřevní sliznici. Aktivace K-ras onkogenu patří k časným a nejčastěji se vyskytujícím genetickým změnám odehrávajícím se v lidské karcinogenezi; kolorektální karcinom je pak typickým příkladem [230].

1.4. Idiopatické střevní záněty a bakterie gastrointestinálního traktu

Idiopatické střevní záněty zahrnují dvě základní jednotky: Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu. V současné době se předpokládá, že příčinou těchto chorob je nepřiměřená zánětlivá odpověď na střevní bakterie u geneticky predisponovaného jedince. Je známo, že větší roli hrají genetické faktory v případě Crohnovy choroby. Možnost nahromadění obou nemocí v rámci příbuzných jedinců je vysvětlitelná tím, že některé geny jsou pro tyto jednotky společné. Role bakterií gastrointestinálního traktu je v etiopatogenezi nezpochybnitelná. Byť bylo zkoumáno mnoho patogenů v souvislosti s vývojem těchto dvou jednotek, kauzální patologické agens prozatím objeveno nebylo [288]. Je potvrzeno, že se tlustostřevní bakteriální složení pacientů s idiopatickým střevním zánětem na rozdíl od osob zdravých vyznačuje kvalitativními i kvantitativními změnami – typické je zvýšené zastoupení mikrobu z rodu *Bacteroides* a čeledi *Enterobacteriaceae* a naopak snížené zastoupení bakterií z kmene *Firmicutes* [314]. U pacientů s Crohnovou chorobou bylo zjištěno vyšší zastoupení rodu *Enterococcus*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Listeria spec.* [141]. Naopak podstatně méně byl u pacientů s Crohnovou chorobou detegován *Faecalibacterium prausnitzii*, který produkuje protizánětlivé faktory vedoucí ke snížení aktivace NF- κ B a snížení produkce interleukinu-8 [282, 283]. Zvláštní důležitosti nabývají v etiopatogenezi onemocnění bakterie s vyšší schopností adheze a invaze do sliznice střeva (příkladem je *Escherichia coli*) [6]. Dále bylo zjištěno, že u pacientů s ulcerózní kolitidou i Crohnovou chorobou je signifikantně sníženo procento metanogenních bakterií ve srovnání s pacienty v kontrolní skupině (Crohnova choroba: 30 %, ulcerózní kolitida: 24 %, kontrolní skupina: 48 %; hlavní metanogenní bakterie v lidském střevě je přitom *Methanobrevibacter smithii*) [257]. U idiopatických střevních zánětů dochází typicky k poruše bariérové funkce střeva. Je přítomna zvýšená paracelulární permeabilita na podkladě abnormální regulace zonulae occludentes; pohárkové buňky produkují méně hlenu, Panethovy buňky se pak vyznačují sníženou produkcí defenzinů. Výsledkem je zvýšená expozice střevní sliznice intestinálním mikrobiotům a znásobením zánětlivé odpovědi [288]. Imunitní odpověď na střevní bakterie je přísně regulována a rozhoduje o tom, zda bude zahájena obranná imunitní odpověď nebo bude zajištěna imunotolerance. Buňky přirozeného imunitního systému disponují receptory (tzv. pattern-recognition receptors; PRR), které rozeznávají specifické bakteriální polysacharidy, polynukleotidy, konkrétně pak například flagelin, peptidoglykan buněčné stěny mikroorganismů (jde o tzv. patogen-associated molecular patterns; PAMPS), které se jen málo liší mezi jednotlivými patogeny, avšak u hostitele nalézány nejsou. Mezi pattern-recognition receptors jsou řazeny především dvě skupiny receptorů: toll cell like receptors, což jsou transmembránové receptory [297], přičemž je známo, že lipopolysacharidy (hlavní součást zevní membrány gram-negativních mikrobu) a flagelin (hlavní podjednotka filament bakteriálních bičičků) jsou rozeznávány toll cell like receptory 4 a 5 (TLR 4, TLR 5) [37]. Dalším typem receptorů jsou NOD2 domény („nukleotid-binding“ a „oligomerization domain-like“), které kódují intracelulární senzor peptidoglykanů. NOD2 receptory jsou exprimovány epiteliálními, endoteliálními, dendritickými buňkami, Panethovými buňkami a makrofágy. Po stimulaci NOD2 bakteriálním peptidoglykanem (tvoří strukturu gram pozitivních i gramnegativních bakterií) dochází k aktivaci nukleárního transkripčního faktoru kappa B (NF- κ B; nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells),

aktivaci proteinkinasy, což vede k produkci prozánětlivých cytokinů (TNF, IL-1 β), chemokinů a antimikrobiálních peptidů – podílí se tedy na funkci nespecifického imunitního systému [280]. Kromě proteinkinasy dochází i k aktivaci kaspasového systému a tím nastartování apoptotických kaskád [221]. V genu pro NOD2 (který je umístěn na chromozomu 16q) existuje polymorfismus, přičemž u nositelů polypomorfismu bylo zjištěno snížení aktivity NF- κ B vedoucí především ke snížení produkce defenzinů Panethovými buňkami a zhoršení nespecifické imunitní odpovědi. Byla objevena asociace mezi polymorfismem v genu pro NOD2 a Crohnovou chorobou (postižení ilea s častějšími komplikacemi ve smyslu vývoje stenóz a nutnosti chirurgické intervence) [71, 157]. Za normálního stavu je sekrece prozánětlivých cytokinů antigen-prezentujícími buňkami ve střevě minimální, v případě idiopatických střevních zánětů je však počet antigen-prezentujících buněk s produkcí prozánětlivých cytokinů zvýšen [280]. Naproti vystimulované prozánětlivé odpovědi existují v intestinálním prostředí faktory, které odpovídají za snížení prozánětlivých cytokinů. Mezi cytokiny s protizánětlivým efektem se řadí transforming growth factor beta (TGF- β) a interleukin-10 (IL-10), dále pak chronická stimulace cestou pattern recognition receptors, PRR (včetně chronické stimulace NOD2 buněčnými peptidoglykany) [108].

1.5. Anti-porinové protilátky

Poriny jsou struktury proteinové povahy, které byly objeveny v roce 1976 [194]. Jsou umístěny 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. OmpF a OmpC preferují transport kationtů nad anionty, PhoE transport aniontů [145, 198, 264]. OmpF umožňuje transport větších molekul než OmpC (vytváří větší kanály než OmpC) [200]. Podmínky prostředí intestinálního traktu (osmotický gradient, teplota, pH, atd.) ovlivňují to, zda bude aktuálně preferována produkce OmpC porinů (s užšími kanály) nebo OmpF porinů [106, 112]. Kromě formace kanálů mohou zajišťovat poriny i další funkce: interagovat s protilátkami, fagy a koliciny [268, 305]. Příkladem je interakce OmpF porinu jakožto receptoru pro kolicin A a N [86]. Kromě klasických trimerických porinů může vnější membrána *E. coli* obsahovat i další proteiny ze skupiny porinů: OmpA (homolog porinu OprF, kterým disponuje *Pseudomonas aeruginosa*; tento porin dovoluje pomalejší difúzi malých solutů (např. monosacharidů), ale také difúzi daleko větších solutů, které by kanálem OmpF penetrovat nemohly), NmpC (podobný OmpF-OmpC-PhoE) [14], OmpN (homolog OmpC) [224], OmpG (produkující nezvykle velké kanály) [42], OmpL [52], OmpW (který je receptorem pro některé koliciny) [216], OmpX, OmpT a OmpLA [199]. Poriny dovolují intracelulární penetraci toxinů, ale i některých antibiotik s malým rozměrem – např. betalaktamů. Ke zvýšení rezistence na antibiotika může tak (kromě produkce betalaktamasy) dojít tehdy, pokud je snížena permeabilita mediovaná poriny nebo v případě snížení produkce porinů [5, 159, 320]. Baktericidní vlastnosti séra jsou na *E. coli* obsahující porin C realizovány cestou klasické dráhy komplementu (za součinnosti C1q složky komplementu a anti-OmpC protilátek) [159].

Anti-porinové / proti-porinové protilátky / anti-outer membrane protein C / anti-OmpC antibodies, jsou namířeny proti OmpC porinům. Vzhledem k tomu, že spoluúčast mikroorganismů v etiopatogenezi idiopatických střevních zánětů je již všeobecně akceptována, lze předpokládat, že by právě proti-porinové protilátky mohly spolu s dalšími protilátkami typickými pro idiopatické střevní záněty (protilátky proti *Sacharomyces cerevisiae* (ASCA), protilátky proti cytoplazmě neutrofilů (ANCA), protilátky proti bakteriálním sekvencím typickým pro Crohnovu chorobu = protilátky namířené proti *Pseudomonas fluorescens* (anti-I2) a protilátky proti bakteriálním flagelinům (anti-CBir1)) sloužit k diagnostice a predikci klinického průběhu těchto onemocnění [195, 196]. Mow ve své studii diagnostikoval přítomnost anti-porinových protilátek u 46 % pacientů (z 303 dospělých) s Crohnovou chorobou [187]. V souboru dětské populace byly anti-porinové protilátky diagnostikovány u 24 % pacientů s Crohnovou chorobou a 11 % pacientů s ulcerózní kolitidou. Přestože je zmíněná senzitivita nízká, může být pozitivita anti-porinových protilátek nápomocná v diagnostice malého procenta pacientů s idiopatickými střevními onemocněními tehdy, pokud jsou ostatní pro idiopatické střevní záněty typické protilátky negativní [324]. V případě negativity ANCA a ASCA protilátek se však v diagnostice idiopatických střevních zánětů nelze spoléhat na pozitivitu anti-OmpC: proti-porinové protilátky mohou být u dětí a adolescentů přítomny i tehdy, pokud daný jedinec Crohnovu chorobu či ulcerózní kolitidu diagnostikovanou nemá [54]. Z práce Mow et al. také vyplývá, že pacienti s Crohnovou chorobou a s anti-I2 protilátkami se vyznačují častějším výskytem fibrostenozujícího onemocnění, zatímco pacienti s Crohnovou chorobou a anti-OmpC protilátkami mívají častěji fistulující onemocnění. Crohnova choroba pacientů vyznačujících se výskytem obou těchto protilátek si tak častěji vyžádá tenkostřevní chirurgický výkon ve srovnání s pacienty, kteří se těmito protilátkami nevyznačují [187, 209]. Pacienti s indeterminovanou kolitidou jsou méně často producenty ASCA a ANCA protilátek ve srovnání s pacienty, kteří mají diagnostikovanou Crohnovu chorobu nebo ulcerózní kolitidu. K definitivní diagnóze by opět mohly být nápomocné anti-OmpC a anti-I2 protilátky, neboť tato kombinace je zjišťována až u 50 % pacientů s Crohnovou chorobou a je asociována s tenkostřevním postižením, závažnějším průběhem choroby (který si vyžádá tenkostřevní chirurgický výkon) a s délkou trvání choroby [135, 209]. Bylo zjištěno, že anti-porinové protilátky jsou imunoreaktivní k pANCA - studie Cohavy et al. prokázala, že proteinem imunoreaktivním k pANCA je porin ompC zevní membrány *E. coli*; pacienti s ulcerózní kolitidou (a 70% výskytem ANCA protilátek) se vyznačovali zvýšenou hodnotou anti-OmpC protilátek ve třídě IgG ve srovnání se zdravými kontrolami [40]. Paradoxně výskyt proti-porinových protilátek je častější u pacientů s Crohnovou chorobou (diagnostikováno u 55 % pacientů) než s ulcerózní kolitidou [195, 151]. 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 %) [209].

Lze předpokládat, že když střevní mikrobiota hrají důležitou roli v etiopatogenezi idiopatických střevních zánětů, budou hrát klíčovou roli i v etiopatogenezi kolorektálního karcinomu. Při splnění tohoto předpokladu by proti-porinové protilátky měly být zvýšeny i u pacientů s kolorektálním karcinomem.

1.6. Bakteriociny

1.6.1. Definice, historie, charakteristika kolicinů

Koliciny jsou definovány jako polypeptidy a proteiny, které jsou produkovány bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae*, především pak mikroorganismem *Escherichia coli*. Jde o substance působící letálně / antibioticky na příbuzné bakteriální kmeny [104]. O cytotoxickém efektu kolicinů je na rozdíl od jejich antibakteriálního účinku známo málo. Např. Šmarda et al. však prokázal, že koliciny mají cytotoxický efekt na leukemické buňky [274]. Kolicinogenií nazýváme schopnost bakteriální buňky kolicin produkovat. Obecně se předpokládá, že jedna molekula kolicinu působí letálně na jednu citlivou bakterii. Tlusté střevo je obvyklým a optimálním místem působení kolicinů [31, 38]. Tolerantními mutantami nazýváme ty buněčné kmeny, na které ani po navázání kolicinu na receptor nepůsobí bakteriocin letálně. Rezistentní mutantou je kmen, který se vyznačuje absencí receptorů (k vazbě kolicinu na cílovou buňku tedy ani nedojde) [60, 101, 114, 192, 201, 246].

První kolicin (kolicin V) byl identifikován Gratiou v roce 1925, poprvé bylo termínu „kolicin“ použito Gratiou a Frédericqem roku 1946 [38]. V r. 1953 Jacob et al. poprvé použili termínu „bakteriocin“ k označení kolicinů a látek jim podobných [31]. Mikrociny jsou nízkomolekulární antibiotika produkováná čeledí *Enterobacteriaceae* a podobně jako koliciny působí letálně na příbuzné mikrobiální kmeny [3, 132]. Již v r. 1948 identifikoval Frédericq 17 základních kolicinů. Během následujících let byly objeveny další koliciny, a to i českými vědci: Horákem kolicin E4 [116], Šmardou kolicin Q, Malesovou kolicin E5-E7 [31, 175, 176]. Frédericq také vypracoval metodu kolicinogenotypizace (založená na vzniku kruhové zóny inhibice růstu v okolí testovaného kmene v případě, že je indikátorový kmen ke zkoumanému kolicinu citlivý). Tuto metodu dále propracoval český vědec Horák [116-118]. Doposud bylo popsáno více než 30 druhů kolicinů [279].

Koliciny jsou proteiny o molekulové hmotnosti 40-80 kDa [53, 104, 110, 266]. Všechny koliciny jsou organizovány do 3 domén, přičemž každá z nich odpovídá za jednu funkci kolicinu: centrální doména odpovídá za vazbu na receptor, N-terminální doména odpovídá za translokaci membránou, C-terminální doména obsahuje aktivní / cytotoxickou část kolicinu [8, 51, 179]. Nejprve byla objasněna trojdimenzionální struktura kolicinů formujících póry, posléze struktura kolicinů s nukleasovou aktivitou [38].

Systém produkce kolicinů:

Již v r. 1953 se objevila hypotéza, že produkce kolicinů je kódována extrachromozomálně [38]. Tuto suspekci potvrdili v roce 1965 De Witt a Helinski: geny pro kolicinogenii jsou lokalizovány v plazmidech, tzv. col-plazmidech, někdy nazývaných také col-faktorech [31, 38]. Každý kolicinový operon obsahuje jako první gen *ten*, který kóduje kolicin [38]. K syntéze kolicinu dochází v cytoplasmě kolicinogenní buňky, poté je uvolňován do extracelulárního prostředí. Koliciny jsou produkovány ve formě volných polyzomů, nejsou detegovány ve formě prekurzorů (na rozdíl od periplazmatických bílkovin a bílkovin zevní membrány). Exportovány jsou až 60 minut po ukončení syntézy. Produkce kolicinů je

ovlivnitelná faktory prostředí jako je pH, teplota či rychlost růstu kultury [31]. Laboratorně může být produkce kolicinů indukována např. UV zářením nebo mitomycinem C. Zmíněnou indukcí dramaticky narůstá kolicinogenie: z původního 1 promile kolicinogenních buněk (normální situace) se začne kolicinogenie projevovat až u 50 % buněk [31]. Operon kolicinů s nukleasovou aktivitou obsahuje gen pro imunitní protein, který chrání buňku před sebeustrukcí vlastním kolicinem. Imunitní protein kolicinů formujících póry je lokalizován ve vnitřní membráně produkující buňky [317], imunitní protein kolicinů s nukleasovou aktivitou formuje komplex s kolicinem a vede tak k neutralizaci efektu kolicinu [17]. Imunitní protein je uvolněn za zhruba 20 minut po navázání kolicinu s nukleasovou aktivitou na receptor zevní membrány cílové buňky a je tak umožněno lytické působení kolicinu [147, 310]. Posledním genem operonu je vždy gen kódující „colicin lysis protein / colicin release protein“. Tento gen obsahují operony skupiny kolicinů A, ze skupiny kolicinů B pouze kolicin V, X a kolicin D [38] – viz **Obrázek 1**. Colicin lysis / release proteiny jsou malé lipoproteiny (obvykle obsahují 27-35 aminokyselin) a jsou syntetizovány v cytoplasmě ve formě prekurzorů (o molekulové hmotnosti kolem 4,5 kDa), procházejí acylací a dalšími úpravami a poté jsou z části uvolňovány do extracelulárního media spolu s koliciny [38]. Produkt genu kódujícího „colicin lysis protein“ umožňuje uvolnění kolicinu do média (zvyšuje permeabilitu obalu) a právě ten je zodpovědný za smrt buňky [31, 38]. LexA protein je hlavním inhibítozem transkripce kolicinových operonů [158]. Autolýzu LexA proteinu a nastartování transkripce kolicinových operonů může indukovat např. UV záření, v laboratorních podmínkách je pak používaným agens mitomycin C [31]. Ke stimulaci produkce kolicinů vedou dále např. tyto podmínky: nedostatek thyminu, deplece nutrientů [148], anaerobní podmínky [73] či vysoké teploty [143]. Syntéza kolicinů je maximální za 60-90 minut po indukci a v tomto intervalu je koncentrace 1000-krát vyšší než před indukci [110]. Kolicin se v tomto časovém období stává hlavním proteinem buňky. Smrt buňky, která následuje syntézu skupiny A kolicinů a kolicinů V a X z B skupiny kolicinů, je způsobena colicin lysis / release proteinem, který je exprimován spolu s kolicinem. Tento protein je vždy produkován v menším množství než kolicin [38]. Sekrece kolicinu (jakožto proteinu) do extracelulárního prostředí je realizována jednou z 5 drah, kterými disponují gramnegativní bakterie [199, 301]. Mezi funkce colicin lysis / release proteinu patří: uvolnění kolicinu do extracelulárního media za 60-90 minut po indukci např. tím, že colicin lysis protein vytvoří póry ve vnitřní i vnější membráně buňky (proto se správně „colicin lysis protein“ nazývá „colicin release protein“); quasi lýza (vzestup optické denzity bakteriální kultury produkující kolicin za 60 minut po indukci a následně její pokles, kdy je dosaženo optických denzit podobných před indukci); modifikace struktury buněčné membrány (během pozdních stádií indukce nemohou být odděleny vnitřní a zevní membrána); aktivace OmpLA (fosfolipázy A zevní membrány), což vede k formaci lysofosfolipidů působících jako detergenty permeabilizující zevní a poté i vnitřní membránu; smrt buňky produkující kolicin (zprostředkovaný aktivací OmpLA) [38].

1.6.2. Mechanismus účinku kolicinů

Již v roce 1964 navrhl Nomura tzv. membránový model mechanismu účinku kolicinů [202]. K tomu, aby mohly koliciny působit na cílových buňkách, je nutné jejich navázání na receptory citlivých kmenů. Receptory představují proteiny zevní membrány a primárně jsou určeny k transportu / vstupu specifických nutrietů jako např. vitaminů, sideroforů či nukleosidů [60, 125, 126]. Jako první receptor sloužící k vazbě kolicinů byl objeven BtuB (receptor pro vit. B12) v roce 1976 Sabetem a Schnaitmanem [246]. Tento receptor využívají koliciny A a E [38]. Přirozené ligandy kompetují o receptor s kolicinem (např. ferichrom s kolicinem M [316] nebo vitamin B12 s koliciny E [60]) a mohou tak zabránit letálnímu působení kolicinu na cílovou buňku [38]. Koliciny A, E1-E4, Ia a Ib podléhají na povrchu cílové buňky proteolýze, která je zprostředkována proteasou zevní membrány OmpT [24, 39]. Proteolýza kolicinu však není nezbytná k cytotoxickému účinku kolicinu na cílovou buňku [38]. Druhým krokem po vazbě kolicinu na receptor vnější membrány cílové buňky je import kolicinu (jeho N-terminální a C-terminální složky) tak, aby bylo dosaženo cílového místa působení kolicinu. Tento krok zahrnuje „translokaci“ (přestup kolicinu přes zevní a vnitřní membránu cílové buňky) a „tranzit“ (transport kolicinu periplazmou – intermembránovým kompartmentem). Transport přes zevní membránu buňky probíhá u kolicinů skupiny A pomocí Tol systému proteinů, u kolicinů skupiny B pomocí Ton systému proteinů. Kolicin A a koliciny E (s výjimkou kolicinu E1) jsou po vazbě na receptor BtuB (primárně určený pro vazbu vitaminu B12) transportovány zevní membránou pomocí OmpF porinu a Tol systému proteinů. Výjimečným kolicinem v této souvislosti je kolicin N, který používá k vazbě a současně translokaci OmpF protein (k translokaci pak ještě Tol systém proteinů) [38]. Ve srovnání s transportem kolicinů skupiny A je v současné době jen málo známo o transportu kolicinů skupiny B. Vazba kolicinu na receptor není energeticky závislý proces. Translokace kolicinů skupiny B (s výjimkou kolicinu V a X) je však na rozdíl od translokace skupiny kolicinů A proces energeticky dependentní [38, 134]. Tranzit (transport kolicinu periplazmou) je již opět procesem na energii nezávislým [38]. U kolicinů tvořících póry se C-terminální doména kolicinu dostává od periplazmatické strany vnitřní membrány buňky k jejímu cytoplazmatickému pólu, u enzymaticky působících kolicinů dochází k translokaci C-terminální domény kolicinu do cytoplazmy cílové buňky [38]. Závěrečným krokem je realizace letálního účinku na cílovou buňku (nukleasový efekt či depolarizace cílové buňky iontoforickým efektem na vnitřní membránu). Výjimkou je kolicin M, který narušuje syntézu peptidoglykanu [72, 105]. Koliciny vyznačující se nukleasovou aktivitou tvoří s imunitním proteinem heterodimery, koliciny formující póry jsou monomery [38].

1.6.3. Klasifikace kolicinů

Koliciny lze dělit z několika hledisek:

1. podle mechanismu působení (Nomura 1963); viz **Tabulka 1**
 - působením vzniku pórů: kolicin A, E1, K, N, U, B, Ia, Ib, 5, 10, S1, S4, Y, Js, L
 - působící jako DNA-asy: E2, E7, E8, E9

- působící jako RNA-asy: E3, E4, E5, E6, kloacin DF13, D
- interferující se syntézou peptidoglykanu: kolicin M

2. podle způsobu translokace přes zevní membránu E. coli:

- skupina kolicinů A, která využívá Tol systém (ten se skládá ze 3 proteinů vnitřní membrány a 1 periplazmatického proteinu): kolicin A, E1-E9, K, L, N, S4, U, Y a kloacin DF 13; tato skupina je kódována malými plazmidy (6-10 kb) a uvolňována do média
- skupina kolicinů B, která využívá k translokaci Ton systém (sestává z 3 proteinů vnitřní membrány): kolicin B, D, H, Ia, Ib, M, V a X); tato skupina je kódována velkými plazmidy (40 kb) a není uvolňována do média [38].

3. podle rezistence a tolerance

- jde o skupinovou vlastnost kolicinů a na základě této imunity se dělí koliciny skupiny E na kolicin E1-E9 a skupiny I na kolicin Ia a Ib.

Koliciny formující póry:

Podle současných dostupných poznatků je za formování kanálů / pórů zodpovědná C-terminální doména těchto kolicinů, která se skládá z deseti α -helixových struktur. Helix 8 a 9 tvoří hydrofobní segment, pomocí kterého dochází k vazbě kolicinu na membránu a jeho inzerci do membrány [210]. Je prokázáno, že všechny kolicinové kanály jsou dependentní na transmembránovém napětí a otevírají se při pozitivní a zavírají při negativní voltáži. K dalšímu průniku do membrány a formaci iontových kanálů tedy vede pozitivní voltáž dodaná zavřeným kanálům [38]. Další faktor, který reguluje otevírání kanálů, je pH: při neutrálním pH se kanály otevírají řádově v minutách, při poklesu pH na 3,5 probíhá proces otevírání řádově v milisekundách [31]. Vznik pórů (iontových kanálů) má za následek depolarizaci cytoplazmatické membrány, únik kalia, hořčiku a inhibici makromolekulární syntézy [31, 287]. Imunitu buňky ke kolicinu zajišťuje imunitní protein, malý polypeptid o 11-18 kDa, který je kódován tím samým plazmidem jako kolicin. Zajímavou skutečností je, že imunitní protein nechrání buňku před vlastním kolicinem (polarita transmembránového potenciálu je opačná než je vyžadováno k otevření póru), ale chrání buňku před kolicinem, který je exogenní, nejspíše produkovaný buňkou sousední [38]. Imunitní protein rozeznává a interaguje s C-terminální doménou sobě příbuzného kolicinu ve vnitřní membráně buňky [10, 177] a dokáže buď zabránit otevření kanálu a nebo blokovat kanál, který byl již otevřen [38]. Přestože je exprese imunitního proteinu podstatně nižší, než je produkce kolicinu, je jeho funkce dostačující, neboť se předpokládá laterální difúze imunitního proteinu membránou a tím zajištění promptního rozeznání C-terminální domény kolicinu, která je zodpovědná za tvorbu póru [93, 322].

Koliciny s nukleasovou aktivitou:

Koliciny s nukleasovou aktivitou se dělí do dvou skupin – na ty, které působí v cytoplazmě a na koliciny interferující s biosyntézou peptidoglykanu v periplazmě (kolicin M). Cílovou strukturou většiny kolicinů s enzymatickou aktivitou jsou fosfodiesterové vazby přítomné v DNA (DNA-asy), 16S rRNA (rRNA-asy) a tRNA (tRNA-asy). Předpokladem toho, aby

kolicin s nukleasovou aktivitou mohl působit v cílové buňce, je jeho transport přes vnitřní membránu buňky. O tomto procesu je známo doposud jen velmi málo, přibývá však informací, že prvním krokem translokace přes vnitřní membránu je asociace enzymaticky působícího kolicinu s aniontovými fosfolipidy. Interakcí s aniontovými fosfolipidy dochází ke strukturálním změnám DNA-asových a RNA-asových domén kolicinů [308]. U kolicinů působících DNA-asovým mechanismem byla popsána i možnost tvorby pórů [186], avšak tvorba kanálů nevede v tomto případě ke smrti cílové buňky, nýbrž slouží k translokaci DNA-as vnitřní membránou cílové buňky. Aktivní část kolicinu je opět lokalizována v C-terminální doméně kolicinu (o 90-130 aminokyselinách). DNA-asové koliciny (E2, E7, E8, E9) [44, 127, 262] jsou na kovech dependentní enzymy, které jsou složeny z centrálního 3vláknového β -listu obklopeného helixy. Jádrem DNA-asové kolicinové aktivity je tzv. H-N-H motif (34 aminokyselinová sekvence, objevená v r. 1994 Stubem, jejíž přítomnost byla již popsána ve více než 500 enzymech včetně těch, které se účastní apoptózy u savců) [93, 322]. Důsledkem DNA-asové aktivity na fosfodiesterové vazby dvouvláknové DNA (v případě kolicinu E9 i jednovláknové DNA) je smrt cílové buňky. Koliciny s RNA-asovou aktivitou (E3, E4, E5, E6, kloacin a kolicin D) nevyžadují jako kofaktor metalický ion (na rozdíl od DNA-asových kolicinů), a vedou k lýze buňky štěpením fosfodiesterových vazeb obsažených v RNA a tím inhibicí syntézy proteinů. Koliciny E3, E4, E6 a kloacin štěpí 16S rRNA a kolicin E5 spolu s kolicinem D štěpí tRNA [38]. Experimentálně bylo prokázáno, že i účinek kolicinu E3 je pH dependentní [31]. Všechny nukleasové koliciny opouštějí buňku se sobě vlastním imunitním proteinem. Imunitní proteiny enzymaticky působících kolicinů mají obvykle velikost 10 kDa, váží se na C terminální doménu příslušného kolicinu a vytvářejí tak heterodimerový komplex. Je znám dvojí mechanismus inaktivace enzymaticky působícího kolicinu imunitním proteinem: zablokování enzymaticky aktivního místa kolicinu (tento mechanismus platí pro koliciny, jejichž cílem je tRNA) – tzn. dochází k napodobení substrátu RNA. Druhým mechanismem je pak zablokování místa pro substrát (kolicin) – tímto způsobem realizují svůj účinek imunitní proteiny kolicinů s DNA-asovou a rRNA-asovou aktivitou [38].

Kolicin M

Kolicin M je 28-kDa bakteriocin, který byl poprvé popsán v roce 1974 Braunem et al. [23]. Je lokalizován v periplazmě, ukotven do cytoplazmatické membrány. Jeho účinek je namířen proti bakteriálnímu mureinu a působí cytotoxicky na cílovou buňku mechanismem inhibice syntézy peptidoglykanu [22, 105].

1.6.4. Význam kolicinů v klinické medicíně

Koliciny podle dostupných poznatků mohou / by měly hrát důležitou roli v patogenezi idiopatických střevních zánětů a kolorektálního karcinomu. Lze předpokládat, že u idiopatických střevních zánětů koliciny ovlivňují míru zánětlivé reakce. Bylo konstatováno, že obzvláště patogenní *Escherichia coli* vyznačující se adhezivními vlastnostmi může mít u pacientů s ulcerózní kolitidou význam v patogenezi nemoci. Adhezivita (a zvýšená povrchová

hydrofobicita) jsou přitom vlastnosti determinované col-plazmidy [31, 59]. Bureš et al. zkoumal kolicinogenii u pacientů s idiopatickými střevními záněty: nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v kolicinogenii mezi pacienty s idiopatickým střevním zánětem a skupinou kontrolní; test buněčné přecitlivělosti pacientů s idiopatickým střevním zánětem na koliciny produkované vlastními střevními bakteriemi (konkrétně test inhibice migrace leukocytů) však vyšel abnormálně (ve smyslu stimulované i inhibované migrace leukocytů) u 36 % pacientů s ulcerózní kolitidou, resp. 80 % pacientů s Crohnovou chorobou, což ve srovnání se skupinou kontrolní značí signifikantní rozdíl. Výsledky nekorelovaly s trváním, aktivitou a ani léčbou onemocnění. Abnormální migrace leukocytů je považována za průkaz buněčné přecitlivělosti pacientů s idiopatickými střevními záněty na koliciny sobě vlastních kmenů *Escherichia coli*. Zajímavým faktem také je to, že kolicin K byl u pacientů s ulcerózní kolitidou zaznamenán pouze u jedné osoby, kdežto u zdravých jedinců se kolicin K vyskytuje běžně [31]. Na poli kolorektálního karcinomu uplatňují koliciny svůj anti-neoplastický efekt. Výsledky studie Bureš et al. prokazují signifikantní rozdíl v kolicinogenii u pacientů s kolorektálním karcinomem (zjištěna pouze ve 40 %; 42/105) ve srovnání se skupinou kontrolní (zjištěna v 64 %; 102/160) [31]. Důležité je zjištění, že kolicinogenie u pacientů s kolorektálním karcinomem nekoreluje s klinickým stavem onemocnění, stádiem (hodnoceno podle Dukese) a ani s nádorovými markery (zkoumán byl CEA, CA 19-9, AFP, Cancer serum index (α -orosomukoid / prealbumin), kyselina sialová, lysozym). Zastoupení kolicinů u pacientů s kolorektálním karcinomem a u jedinců ve skupině kontrolní se také lišilo: u pacientů s nádorem byl podstatně častěji zjištěn kolicin B a M (koliciny s experimentálně neprokázaným protinádorovým efektem), naproti tomu kolicin K (s anti-neoplastickým účinkem) byl zjištěn pouze u 2 pacientů (2/105; 2 %), u zdravých osob však v 13 %. Absence kolicinogenní *Escherichia coli* a absence korelace se zmíněnými faktory (klinický stav, stádium onemocnění, nádorové markery) u pacientů s kolorektálním karcinomem vede k závěru, že spíše než že by byla abnormální a snížená kolicinogenie u pacientů s kolorektálním karcinomem projevem / důsledkem nemoci, měla by hrát roli ve vzniku a vývoji kolorektálního karcinomu [31].

Z experimentálních studií vyplývá, že leukemické buňky (lidské i myši) jsou in vitro velmi citlivé na účinek kolicinů. Normální leukocyty se naopak vyznačují poměrně malou citlivostí vůči kolicinům [75]. Studie s leukemickými myšimi buňkami prováděl i Šmarda. V pokusech s kolicinem E3 prokázal za podmínek in vitro inhibici proliferace myších leukemických buněk [273]. Podobně i na HeLa buňky (epiteliální buňky odvozené z lidského karcinomu děložního čípku) prokazují některé koliciny (obzvláště kolicin E3) anti-neoplastický efekt [273, 276]. Jiné koliciny (např. kolicin E2 nebo kolicin D) toxický efekt na HeLa buňky nemají. Z jedné z dalších experimentálních studií vyplývá, že buňky kolorektálního adenokarcinomu byly vůči bakteriocinům podstatně citlivější než normální buňky střevní sliznice [78]. Šmarda také prokázal cytotoxický efekt kolicinu E3 na buňky lidského karcinomu prsu [278]. In vivo (studie na myších) bylo prokázáno, že bakteriociny inhibují fibrosarkom [31]. Chumchalová se Šmardou zkoumali v podmínkách in vitro účinek kolicinů A, E1, E3 a U na lidské fibroblasty a lidské linie nádorových buněk, které se vyznačovaly mutací genu p53. Kolicin E3 a U neprokazovaly žádný inhibiční účinek na buněčné linie, kdežto kolicin E1 (s jednou výjimkou) a kolicin A inhibovaly růst všech linií. Z této studie

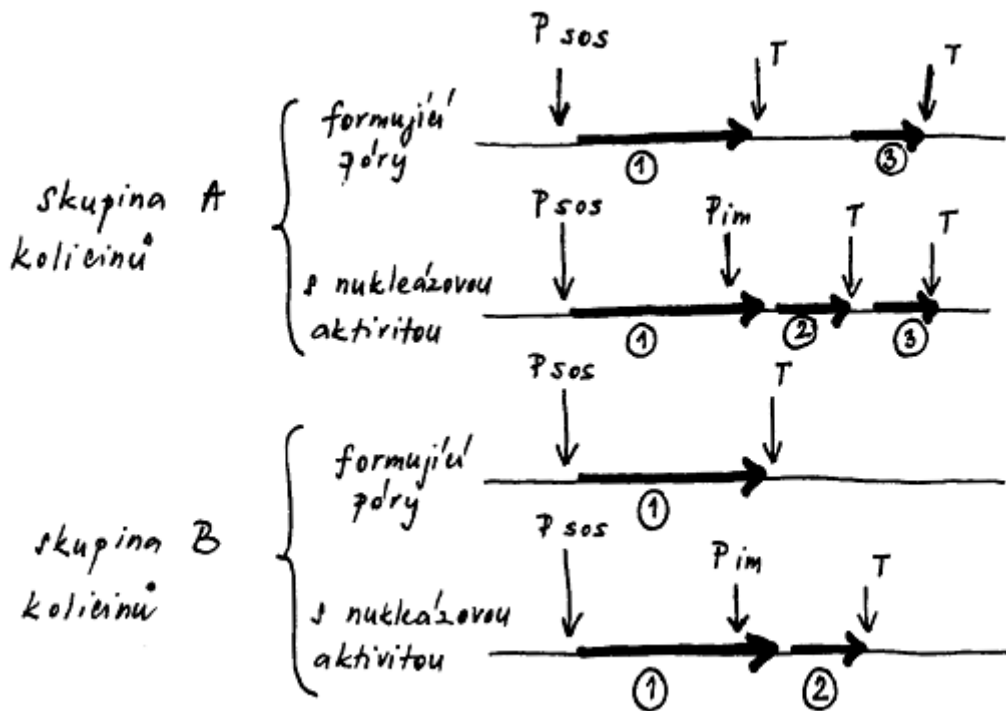
vyplývá, že inhibiční účinek kolicinu závisí na specificitě kolicinu a senzitivě cílové buňky a může se za optimálních podmínek stát cytotoxickým [130]. Předpokládá se trojí anti-neoplastický mechanismus účinku kolicinu: přímý efekt, zprostředkovaný stimulací imunitního systému a pravděpodobně přes ovlivnění cAMP [31]. Koliciny lze použít i k diagnostice: kolicin Js byl využit k průkazu přítomnosti enteroinvazivních kmenů *Escherichia coli*. Tyto kmeny jsou totiž na rozdíl od ostatních kmenů *Escherichia coli* citlivé vůči kolicinu Js. Test s kolicinem Js byl popsán Horákem et al. [119] a svého uplatnění došel v oblasti diferenciální diagnostiky enteroinvazivních enterokolitid a časných stádií idiopatických střevních zánětů [30, 31].

1.6.5. Mikrociny a další bakteriociny

Mikrociny jsou antibakteriální peptidy s molekulovou hmotností do 10 kDa. Jsou produkovány v případě deplece živin. Kódovány jsou buď plazmidy nebo chromozomálně; syntetizovány jsou na rozdíl od většiny antibiotik mikrobiálního původu ribozomálně ve formě prekurzorů a ty jsou postoupeny následné enzymatické modifikaci. Prozatím bylo identifikováno 14 mikrocinů, z nichž pouze 7 bylo izolováno a charakterizováno. Mikrociny disponují velmi variabilní strukturou, což koreluje s rozdílnými mechanismy účinku. V poslední době je výzkumu struktury, vlastností a mechanismu působení mikrocinů věnována velká pozornost [68]. Rozdělení mikrocinů viz **Tabulka 2**.

Dalšími bakteriociny jsou pesticiny – produkované *Yersinia pestis* [102], klebiciny/klebociny – produkované kmeny *Klebsiella* [38], kloaciny – produkované *Enterococcus cloacae*, pyociny – produkované *Pseudomonas spec.* [138], lantibiotika, [58, 109] a megaciny – produkované gram-pozitivní bakterií *Bacillus megaterium* [38].

Obr. 1.



Organizace kolicinových operonů:

P_{sos} : sos promotory

P_{im} : imunitní promotory

T: transkripční terminátory

1 – gen pro kolicin

2 – gen pro imunitní protein

3 – gen pro lysis protein

(převzato z Cascales et al. [38])

Tabulka 1. Základní přehled a mechanismus účinku kolicinů

Skupina A kolicinů (import pomocí Tol systému proteinů):

Kolicin A.....	receptor Btub.....	tvorba pórů
E1.....	receptor Btub.....	tvorba pórů
E2 – E7 – E8 – E9...	receptor Btub.....	DNA-asa
E3 – E4 – E6.....	receptor Btub.....	16S rRNA-asa
E5	receptor Btub.....	tRNA-asa
K.....		tvorba pórů
N.....		tvorba pórů
U.....		tvorba pórů
Kloacin.....		16S rRNA-asa
S1, S4, Y, Js, L		tvorba pórů

Skupina B kolicinů (import pomocí Ton systému proteinů):

Kolicin B.....		tvorba pórů
D.....		tRNA-asa
Ia, Ib.....		tvorba pórů
M.....		inhibice syntézy peptidoglykenu
5, 10.....		tvorba pórů

(převzato z Cascales et al. [38])

Tabulka 2. Základní přehled a mechanismus účinku mikrocinů

Skupina I mikrocinů (molekulová hmotnost <5 kDa; kódovány plazmidy; podléhají posttranslační modifikaci):

Mikrocin B17..... inhibitor DNA gyrasy
C7/C51.....inhibitor aspartyl-tRNA syntetasy
J25.....inhibitor RNA polymerasy

Skupina II mikrocinů (molekulová hmotnost 5-10 kDa):

Podskupina IIa (kódovány plazmidy; bez posttranslační modifikace)

Mikrocin L.....tvorba pórů (Morin et al. 2011)
V..... tvorba pórů
24.....nespecifikován

Podskupina IIb (kódovány chromozomálně; možná posttranslační modifikace)

E492..... tvorba pórů
M.....nespecifikováno
H47..... tvorba pórů
I47.....nespecifikováno

(převzato z Duquesne et al. [68])

1.7. Východiska disertační práce

Koliformní bakterie nepochybně hrají důležitou roli v etiopatogeneze idiopatických střevních zánětů (podrobněji viz kapitola 1.4.). Z publikovaných prací je zřejmé, že se také podílejí na některých dílčích etapách komplexní nádorové biologie kolorektálního karcinomu (podrobněji viz kapitola 1.3.). Přes značné množství publikovaných prací však tyto otázky nejsou definitivně objasněny. Proto každý nový poznatek v této oblasti je mimořádně důležitý a cenný.

Mikrobiota tlustého střeva mohou hrát roli v patogeneze idiopatických střevních zánětů a kolorektálního karcinomu dvojitým způsobem. Za prvé, „normální“ (tj. autochtonní) koliformní bakterie mohou být antigenním spouštěčem imunopatologické reakce makroorganismu. Za druhé, střevní bakterie mohou svými produkty působit protektivně nebo permissivně na patologické procesy sliznice tlustého střeva.

V současné době je již možno koliformní bakterie detailně charakterizovat. Formulovali jsme pracovní hypotézu, že různé úseky tlustého střeva na slizniční úrovni kolonizují genotypicky odlišné rody *Escherichia coli*.

Pro studium první oblasti, tedy pro studium imunopatologické reakce makroorganismu na autochtonní bakterie, jsme zvolili poriny. Poriny jsou látky proteinové povahy ve vnější membráně gramnegativních mikroorganismů (podrobněji viz kapitola 1.5.). Slouží především k tvorbě kanálů umožňujících vstup hydrofilních substancí, obzvláště nutrientů, do bakteriální buňky. Z dosavadních poznatků vyplývá, že poriny jsou významně antigenní. Tvorba anti-porinových protilátek by tak mohla být „komplexním“ ukazatelem imunopatologické reakce lidského organismu na autochtonní koliformní bakterie. Vyslovili jsme pracovní hypotézu, že tvorba anti-porinových protilátek makroorganismem je odlišná u zdravých (asymptomatických) osob a u pacientů s idiopatickými střevními záněty, adenomy tlustého střeva a s kolorektálním karcinomem.

Pro studium druhé oblasti, tedy možných účinků látek bakteriálního původu na makroorganismus, jsme zvolili koliciny. Koliciny tvoří heterogenní skupinu peptidů a proteinů, které mají nejen antibiotické účinky na bakterie stejného rodu, ale působí také na normální a nádorové eukaryotické buňky (podrobněji viz kapitola 1.6.). Velmi důležité jsou nové poznatky, že koliciny mohou mít vedle antibiotického účinku také efekt probiotický a že ovlivňují apoptózu. Formulovali jsme pracovní hypotézu, že kolicinogenie je odlišná mezi zdravými osobami a nemocnými s idiopatickými střevními záněty, adenomy tlustého střeva a s kolorektálním karcinomem.

2. Cíle práce

2.1. Stanovení anti-porinových protilátek

- Zavést metodiku a vyšetřit 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.

2.2. Bakteriologické vyšetření bioptických vzorků z tračnicku a stanovení kolicinogenie koliformních bakterií

- 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.

3. Stanovení anti-porinových protilátek u pacientů s idiopatickými střevními záněty, adenomy tlustého střeva a kolorektálním karcinomem

Vyšetřované anti-porinové protilátky jsou namířeny proti OmpC porinům lokalizovaným ve vnější membráně gramnegativních bakterií *Escherichia coli*. (**Obr. 3.a.–3.c.**). Spoluúčast bakterií gastrointestinálního traktu v etiopatogenezi idiopatických střevních zánětů a kolorektálního karcinomu dnes již není zpochybňována. Byť nebyla doposud v žádné studii publikována asociace zvýšeného výskytu anti-porinových protilátek s kolorektálním karcinomem, lze se domnívat, že budou zvýšené hodnoty tohoto sérologického markeru zjišťovány nejen u pacientů s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou, ale i u pacientů s rakovinou tlustého střeva. Stanovení anti-porinových protilátek by mohlo vést k simplifikaci diagnostického algoritmu těchto závažných tlustostřevních patologií.

3.1. Metodika

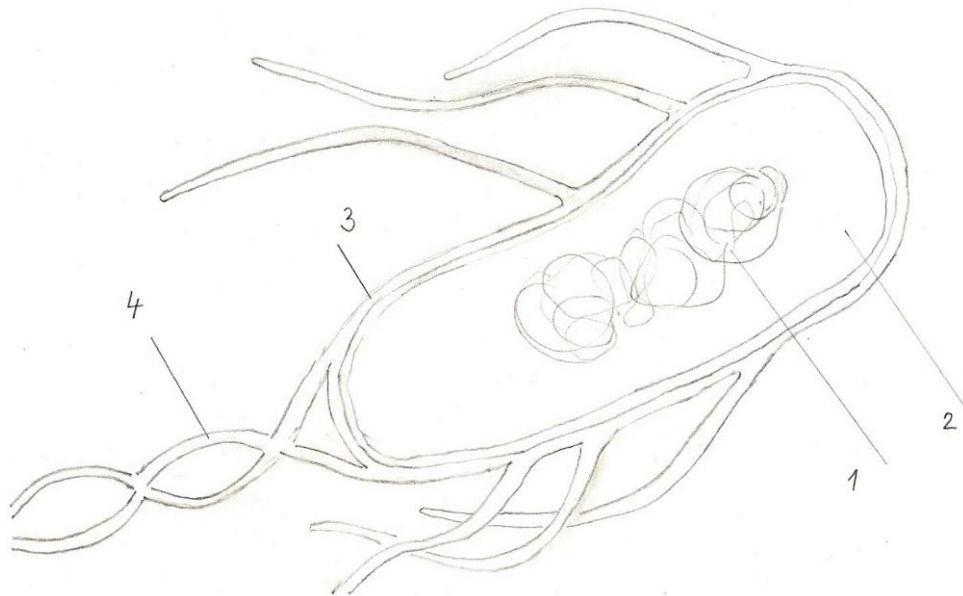
Ke stanovení anti-porinových protilátek byly kromě souboru kontrol (**Obr. 3.1.1.1.-3.1.1.2.**) vybrány 4 skupiny pacientů: pacienti s Crohnovou chorobou (**Obr. 3.1.2.1.-3.1.4.4.**), ulcerózní kolitidou (**Obr. 3.1.5.1.-3.1.5.4.**), kolorektálním adenomem (**Obr. 3.1.6.1.-3.1.6.4.**) a kolorektálním karcinomem (**Obr. 3.1.7.1.-3.1.7.4.**). Celkem bylo vyšetřeno 85 pacientů s Crohnovou chorobou (36 mužů, 49 žen, ve věku 20–79 let, průměr 43 ± 14 , medián 42 let), 26 pacientů s ulcerózní kolitidou (9 mužů, 17 žen, ve věku 20-74 let, průměr 44 ± 16 , medián 40 let), 22 pacientů s kolorektálním adenomem (11 mužů, 11 žen, ve věku 26-79 let, průměr 65 ± 12 , medián 64 let) a 11 pacientů s kolorektálním karcinomem (9 mužů, 2 ženy, ve věku 50-83 let, průměr 66 ± 11 , medián 65 let). Každý pacient podepsal před provedením krevního odběru informovaný souhlas se stanovením anti-porinových protilátek (**viz příloha**). Kontrolní skupinu tvořilo 45 zdravých dobrovolníků – dárců krve (24 mužů, 25 žen, ve věku 20-58 let, průměr 38 ± 10 , medián 35 let).

Samotný odběr byl realizován buď v úvodu diagnostické koloskopie při obvyklé aplikaci periferního žilního katetru nebo v rámci laboratorních odběrů při pravidelné kontrole v gastroenterologické poradně. Vždy bylo do 1 zkumavky odebráno 5 ml srážlivé krve. Zkumavky byly poté transportovány na Ústav klinické imunologie a alergologie LFUK a FNHK, kde byla plná krev ihned po přijetí centrifugována, sérum separováno a zamrzáno na -30 stupňů Celsia. Po dosažení vhodného počtu vzorků od pacientů (obvykle 40) byly proti-

porinové protilátky vyšetřeny. Ke stanovení anti-porinových protilátek byly použity soupravy „QUANTA Lite TM OMP Plus, INOVA Diagnostics, San Diego, USA“. Proti-porinové protilátky byly stanovovány metodou ELISA v třídě IgA (**Obr. 3.1.8.1.**).

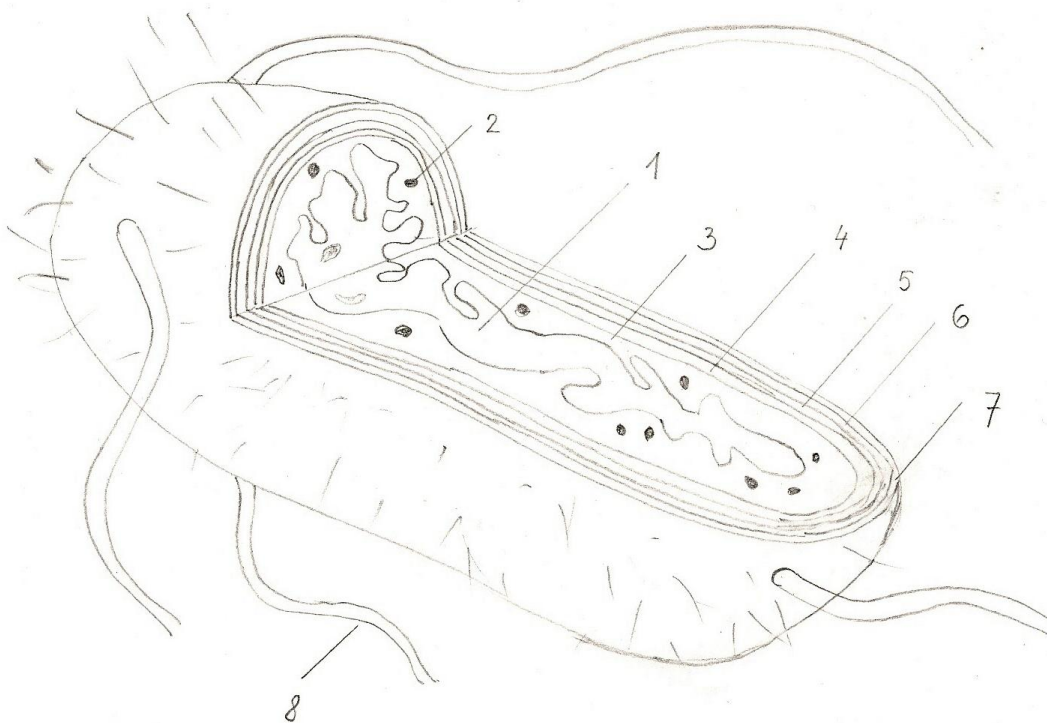
Získané výsledky byly statisticky zpracovány s pomocí statistického softwaru Statistica. Byly vypočteny základní popisné statistiky a provedeno porovnání jednotlivých souborů pomocí nepárového t-testu.

Projekt byl schválen Etickou komisí Univerzity Karlovy v Praze, Lékařskou fakultou 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 (*k zabezpečení a ochraně údajů v informačních systémech provozovaných ve zdravotnických zařízeních uveřejněný ve Věstníku MZČR, částka 6/1994 s odvoláním na ustanovení paragrafu 55 odstavec 2, písmeno d) zákona 230/1996 Sbírky o péči o zdraví lidu v platném znění*).

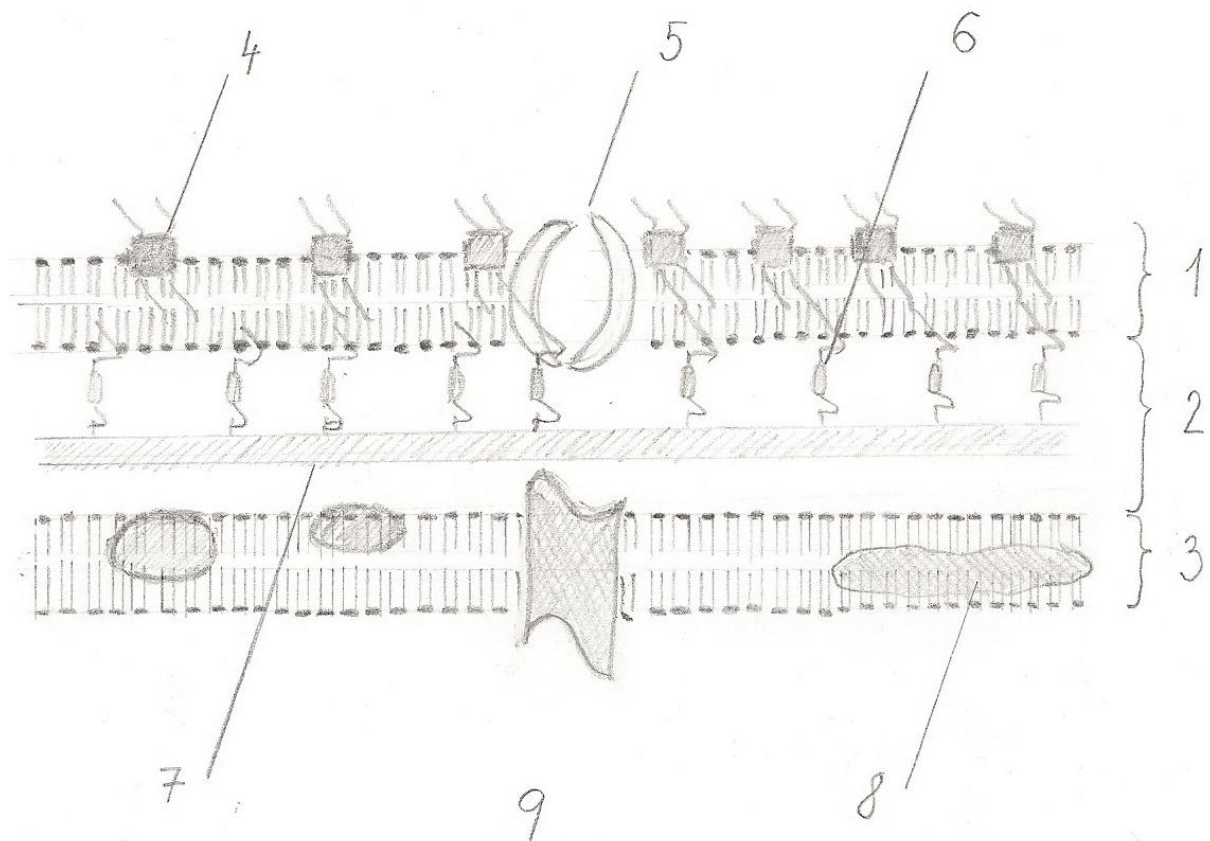


Obr. 3.a. *Escherichia coli* – gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie.

1 - DNA, 2 – cytoplazma, 3 – buněčná membrána, 4 - bičík



Obr. 3.b. Struktura *Escherichia coli*: 1 – jádro, 2 – ribozomy, 3 – cytosol, 4 – plazmatická membrána, 5 – periplazma, 6 – buněčná stěna, 7 – zevní membrána, 8 - bičík

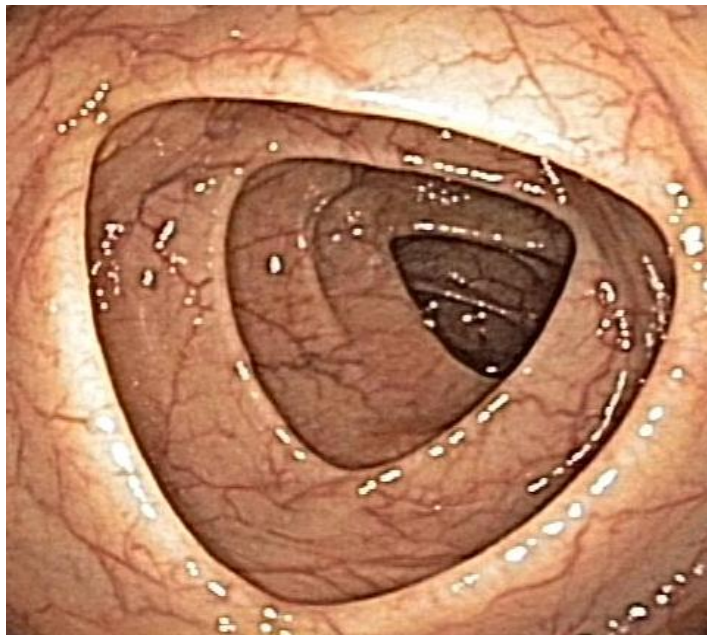


Obr. 3.c. Detailní struktura membrány *Escherichia coli*:

- 1 – zevní membrána
- 2 – periplazmatický prostor
- 3 – vnitřní membrána
- 4 – lipopolysacharidy
- 5 – porin obsažený v zevní membráně
- 6 – lipoprotein
- 7 – peptidoglykan
- 8 – protein obsažený ve vnitřní membráně
- 9 – oblast cytoplazmy



Obr. 3.1.1.1.



Obr. 3.1.1.2.

Endoskopický obraz:

Obr. 3.1.1.1. Terminální ileum: fyziologický nález

Obr. 3.1.1.2. Fyziologický tlustostřevní nález (colon transversum; sliznice je jemná, hladká, lesklá, s dobře patrnou podslizniční cévní kresbou)



Obr. 3.1.2.1.



Obr. 3.1.2.2.



Obr. 3.1.2.3.



Obr. 3.1.2.4.

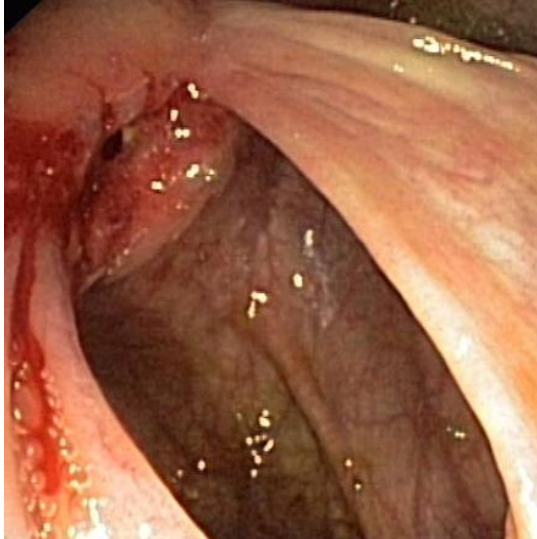
Endoskopický obraz:

Obr. 3.1.2.1. Crohnova choroba – eroze terminálního ilea

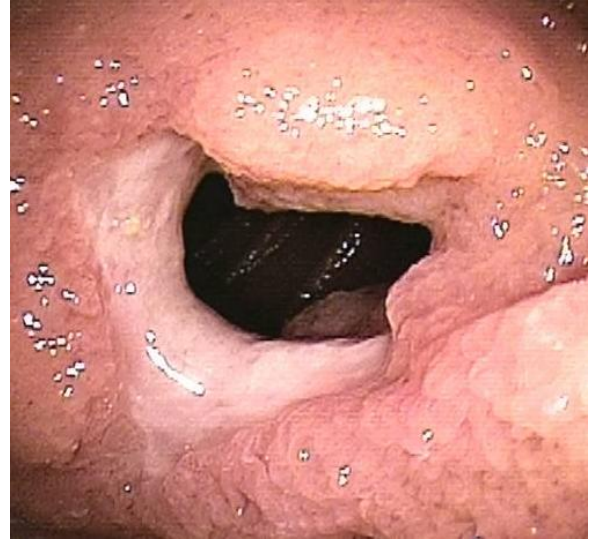
Obr. 3.1.2.2. Crohnova choroba – ulcerace terminálního ilea

Obr. 3.1.2.3. Crohnova choroba – těžké postižení análního kanálu

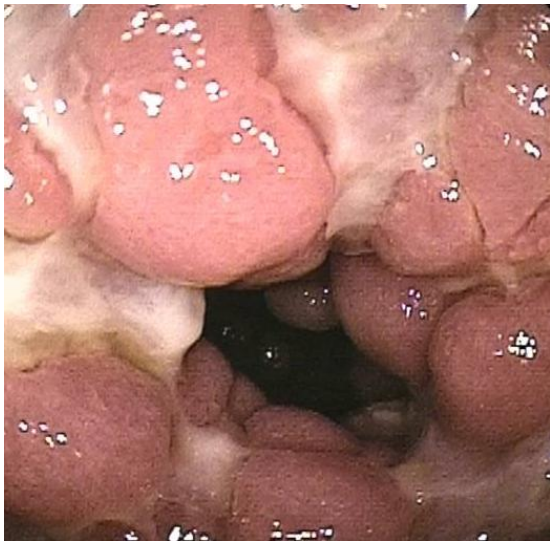
Obr. 3.1.2.4. Crohnova choroba – těžká kolitida



Obr. 3.1.3.1.



Obr. 3.1.3.2.



Obr. 3.1.3.3.



Obr. 3.1.3.4.

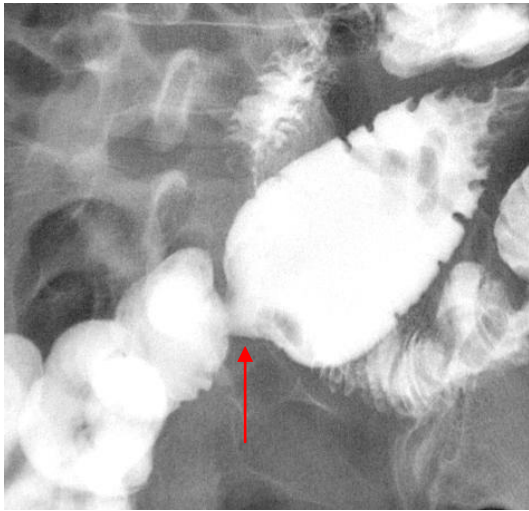
Endoskopické obrazy komplikovaných forem Crohnovy choroby:

Obr. 3.1.3.1. Crohnova choroba – stenozující postižení v oblasti Bauhinské chlopně

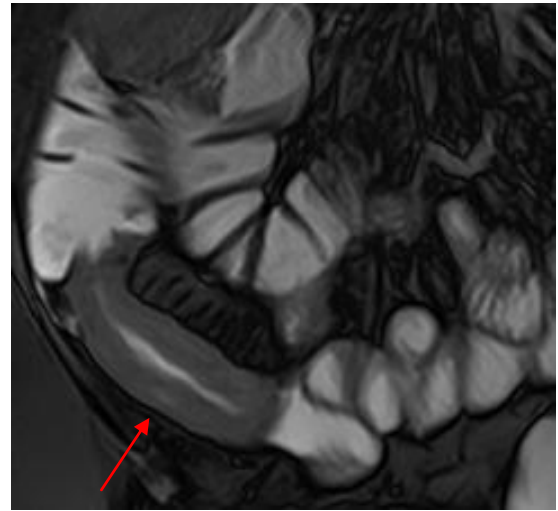
Obr. 3.1.3.2. Crohnova choroba – tenkostěvná stenóza s ulcerací

Obr. 3.1.3.3. Crohnova choroba – zánětlivá a stenozující forma, tenkostěvné postižení

Obr. 3.1.3.4. Crohnova choroba – fistulující forma, vnitřní ústí píštěle v oblasti svěračů



Obr. 3.1.4.1.



Obr. 3.1.4.2.



Obr. 3.1.4.3.



Obr. 3.1.4.4.

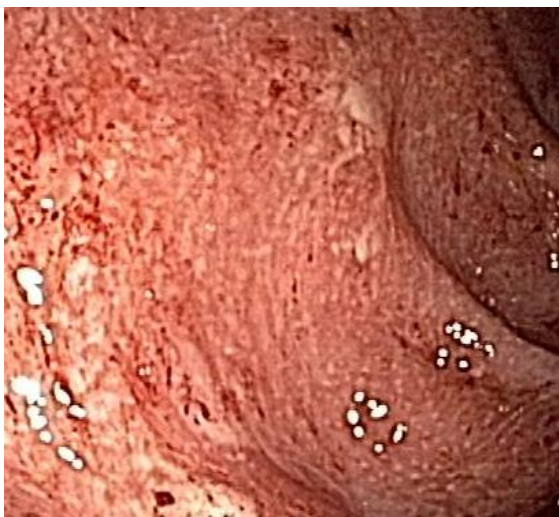
Komplikace Crohnovy choroby – zobrazení klasickou enteroklyzou, MR a CT

Obr. 3.1.4.1. Crohnova choroba – stenóza v oblasti jejunu s prestenotickou dilatací (zobrazeno při klasické enteroklyze)

Obr. 3.1.4.2. Crohnova choroba – stenóza terminálního ilea (MR enterografie)

Obr. 3.1.4.3. Crohnova choroba – infiltrát (formující se absces) v malé pánvi (CT)

Obr. 3.1.4.4. Crohnova choroba – fistulující forma, entero-vezikální píštěl (CT; v močovém měchýři patrný bublinky plynu)



Obr. 3.1.5.1.



Obr. 3.1.5.2.



Obr. 3.1.5.3.



Obr. 3.1.5.4.

Endoskopický obraz:

Obr. 3.1.5.1. Středně aktivní ulcerózní kolitida (erytém, absence podslizniční cévní kresby, granulární vzhled sliznice, eroze)

Obr. 3.1.5.2. Těžká ulcerózní kolitida (ulcerace)

Obr. 3.1.5.3. Těžká ulcerózní kolitida (ulcerace, spontánní krvácení, hojení ve formě zánětlivých polypů)

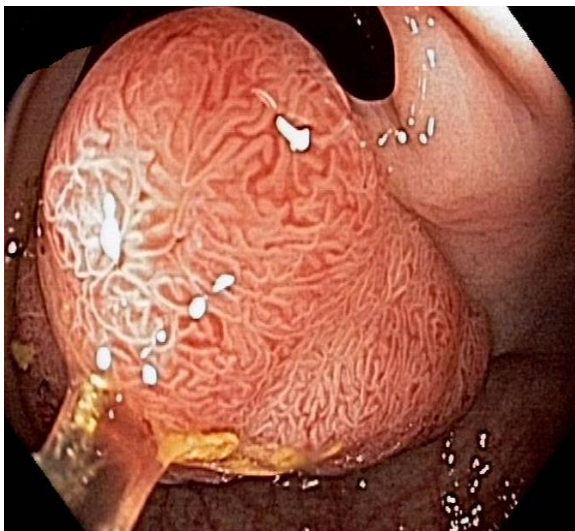
Obr. 3.1.5.4. Slizničními můstky zhojená původně vysoce aktivní ulcerózní kolitida



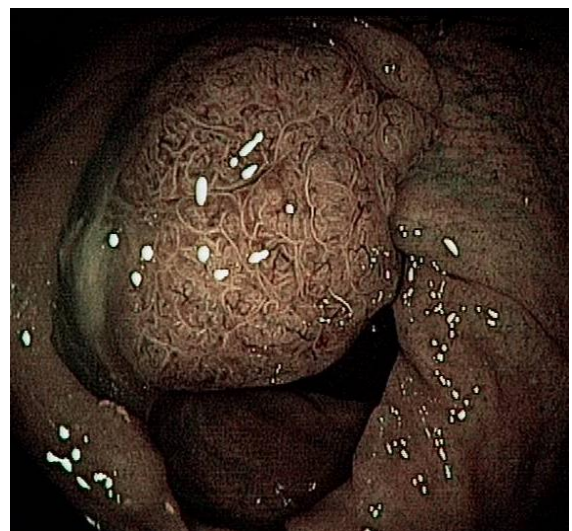
Obr. 3.1.6.1.



Obr. 3.1.6.2.



Obr. 3.1.6.3.



Obr. 3.1.6.4.

Endoskopický obraz:

Obr. 3.1.6.1. Přisedlý polyp adenomového vzhledu v rektu

Obr. 3.1.6.2. Stopkatý polyp adenomového vzhledu v sigmatu

Obr. 3.1.6.3. Pokročilý kolorektální adenom (tubvilózní adenom nízkého stupně dysplázie)

Obr. 3.1.6.4. Pokročilý kolorektální adenom (tubvilózní adenom vysoké stupně dysplázie
v NBI zobrazení – narrow band imaging = zúžený pás světla)



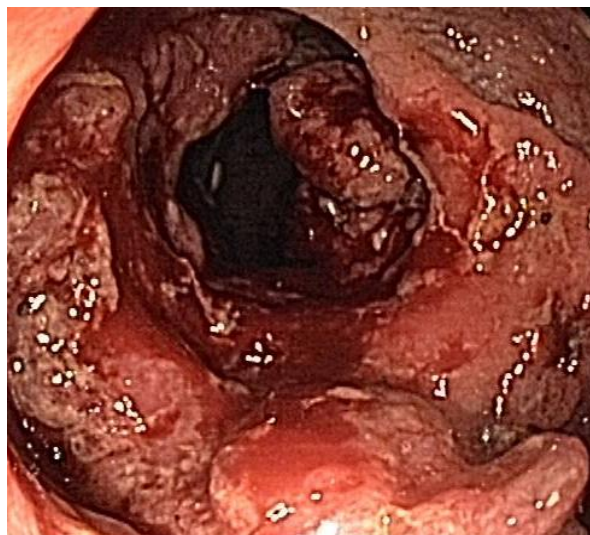
Obr. 3.1.7.1.



Obr. 3.1.7.2.



Obr. 3.1.7.3.



Obr. 3.1.7.4.

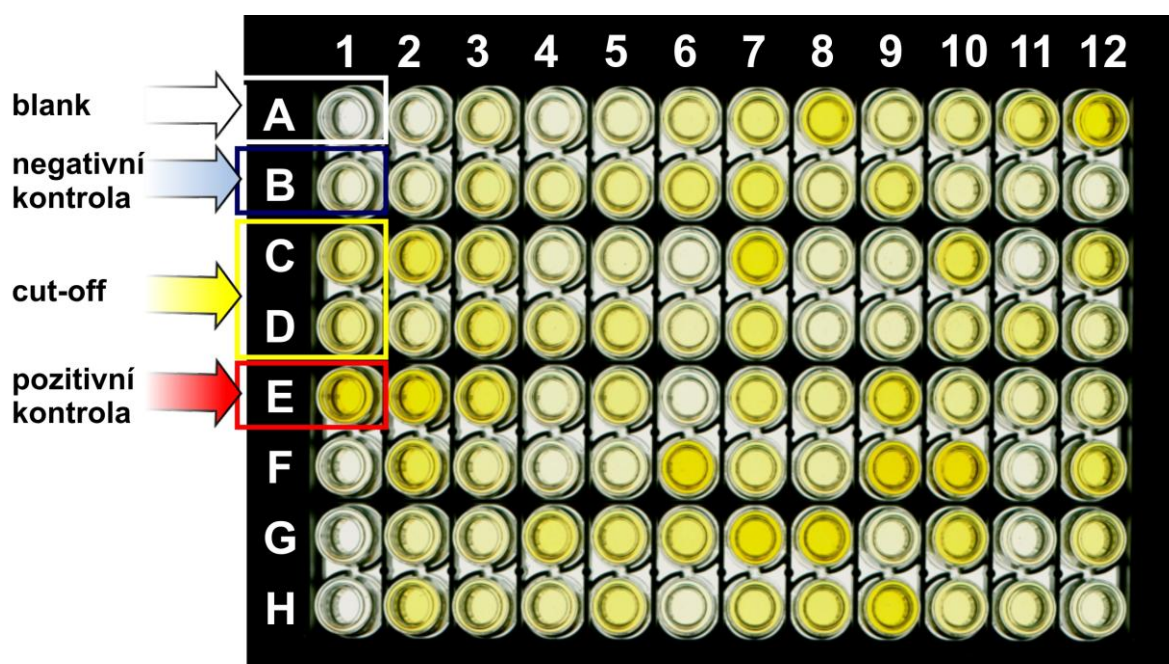
Endoskopický obraz:

Obr. 3.1.7.1. Pokročilý kolorektální karcinom (zobrazení v bílém světle s vysokým rozlišením)

Obr. 3.1.7.2. Pokročilý kolorektální karcinom (stejný nález v NBI zobrazení)

Obr. 3.1.7.3. Pokročilý, exulcerovaný kolorektální karcinom

Obr. 3.1.7.4. Pokročilý, stenozyjící kontaktně i spontánně krvácející kolorektální karcinom



Obr. 3.1.8.1. Princip ELISA (elisa enzyme-linked immunosorbent assay):

Do reakce vstupuje antigen (porin C, připravený výrobcem) a protilátka ze séra pacienta. Vzniká neviditelný a neměřitelný imunokomplex, který vizualizujeme přidáním antiséra konjugovaného s enzymem. Po přidání substrátu pro daný enzym se substrát rozkládá za vzniku barevného produktu, jehož absorbance je měřena.

3.2. Výsledky

U kontrolních osob byla průměrná hodnota vypočtených anti-porinových protilátek $18,8 \pm 10,7$ U/ml (podrobněji viz **Tabulka 3.2.1.1.**). Výrobce doporučená normální hodnota je ≤ 20 U/ml, šedá zóna 20-25 U/ml, hodnoty ≥ 25 U/ml jsou považovány za patologické. U všech kontrolních osob byly vypočtené hodnoty anti-porinových protilátek nižší než 57,8 U/ml. U pacientů s Crohnovou nemocí (CN) byla normální hodnota anti-porinových protilátek zjištěna pouze u 22/85 vyšetřených osob (26 %), u pacientů s ulcerózní kolitidou (UC) u 6/26 (23 %), ve skupině pacientů s kolorektálním karcinomem u 2/11 (18 %). U pacientů s kolorektálním adenomem 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, kolorektálním karcinomem $36,7 \pm 14,6$ U/ml, kolorektálním adenomem $22,3 \pm 12,7$ U/ml). Podrobné údaje popisné statistiky - viz **Tabulka 3.2.1.2.- 3.2.1.5., Graf 3.2.1.**

Statisticky významné rozdíly anti-porinových protilátek byly shledány u skupiny kontrolní a u skupiny pacientů s CN (kontrolní skupina: $18,8 \pm 10,7$ U/ml, CN: $41,8 \pm 29,5$ U/ml; $p < 0,001$; $1 - \beta = 0,999$) – **Tabulka 3.2.2.1.**, u skupiny kontrolní a u skupiny pacientů s UC (kontrolní skupina: $18,8 \pm 10,7$ U/ml, UC: $28,9 \pm 13,0$ U/ml; $p < 0,001$; $1 - \beta = 0,940$) – **Tabulka 3.2.2.2.**, u skupiny kontrolní a u skupiny pacientů s anamnézou kolorektálního karcinomu (kontrolní skupina: $18,8 \pm 10,7$ U/ml, kolorektální karcinom: $36,7 \pm 14,6$ U/ml; $p < 0,001$; $1 - \beta = 0,996$) – **Tabulka 3.2.2.3.** Nebyla prokázána statisticky významná diference u skupiny kontrolní a u skupiny pacientů s kolorektálním adenomem (kontrolní skupina: $18,8 \pm 10,7$ U/ml, adenom: $22,3 \pm 12,7$ U/ml; $p = 0,253$; $1 - \beta = 0,211$) – **Tabulka 3.2.2.4.**

Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi hodnotami proti-porinových protilátek u nemocných s kolorektálním karcinomem a skupinou pacientů s CN (kolorektální karcinom: $36,7 \pm 14,6$ U/ml, CN: $41,8 \pm 29,5$ U/ml; $p = 0,578$; $1 - \beta = 0,086$), mezi skupinou pacientů s kolorektálním karcinomem a nemocnými s UC (kolorektální karcinom: $36,7 \pm 14,6$ U/ml, UC: $28,9 \pm 13,0$ U/ml; $p = 0,115$; $1 - \beta = 0,366$), mezi skupinou pacientů s kolorektálním adenomem a skupinou nemocných s UC (kolorektální adenom: $22,3 \pm 12,7$ U/ml, UC: $28,9 \pm 13,0$ U/ml; $p = 0,083$; $1 - \beta = 0,426$).

Byla zjištěna statisticky významná diference hodnot anti-porinových protilátek pacientů s CN a nemocných s kolorektálním adenomem (CN: $41,8 \pm 29,5$ U/ml, kolorektální adenom:

22,3±12,7 U/ml; $p=0,003$; $1-\beta=0,857$) – **Tabulka 3.2.3.1.**, mezi skupinou pacientů s CN a pacienty s UC (CN: 41,8±29,5 U/ml, UC: 28,9±13,0 U/ml; $p=0,033$; $1-\beta=0,581$) – **Tabulka 3.2.3.2.**, mezi skupinou nemocných s kolorektálním karcinomem a pacienty s kolorektálním adenomem (kolorektální karcinom: 36,7±14,6 U/ml, kolorektální adenom: 22,3±12,7 U/ml; $p=0,006$; $1-\beta=0,835$) – **Tabulka 3.2.3.3.**

Průměrná hodnota vypočtených proti-porinových protilátek s CN a postižením pouze tlustého střeva byla 30,8±27,2 U/ml, postižením tenkého střeva 36,9±23,9 U/ml a postižením tenkého i tlustého střeva 45,1±30,6 U/ml. Podrobné údaje popisné statistiky - viz **Tabulka 3.2.4.1.-3.2.4.3., Graf 3.2.2.**

Statisticky významné rozdíly hodnot anti-porinových protilátek byly prokázány mezi kontrolní skupinou a pacienty s CN postihující pouze tenké střevo (kontrolní skupina: 18,8±10,7 U/ml, CN s postižením tenkého střeva: 36,9±23,9 U/ml; $p<0,001$; $1-\beta=0,973$) – **Tabulka 3.2.5.1.**, mezi kontrolní skupinou a pacienty s CN postihující pouze tlusté střevo (kontrolní skupina: 18,8±10,7 U/ml; CN s postižením tlustého střeva: 30,8±27,2 U/ml; $p=0,019$; $1-\beta=0,677$) – **Tabulka 3.2.5.2.**, mezi kontrolní skupinou a pacienty s CN postihující tenké i tlusté střevo (kontrolní skupina: 18,8±10,7 U/ml, CN s postižením tenkého i tlustého střeva: 45,1±30,6 U/ml; $p<0,001$; $1-\beta=0,999$) – **Tabulka 3.2.5.3.**

Nebyly shledány statisticky významné difference proti-porinových protilátek mezi skupinou pacientů s CN postihující tenké střevo a skupinou nemocných s CN postihující tlusté střevo (CN s postižením tenkého střeva: 36,9±23,9 U/ml, CN s postižením tlustého střeva: 30,8±27,2 U/ml; $p=0,559$; $1-\beta=0,091$), mezi skupinou pacientů s CN postihující tenké střevo a skupinou pacientů s CN postihující tenké i tlusté střevo (CN s postižením tenkého střeva: 36,9±23,9 U/ml, CN s postižením tenkého i tlustého střeva: 45,1±30,6 U/ml; $p=0,387$; $1-\beta=0,140$), mezi skupinou nemocných s CN postihující tlusté střevo a skupinou pacientů s CN postihující tenké i tlusté střevo (CN postihující tlusté střevo: 30,8±27,2 U/ml, CN s postižením tenkého i tlustého střeva: 45,1±30,6 U/ml; $p=0,125$; $1-\beta=0,342$).

Průměrná hodnota vypočtených anti-porinových protilátek nemocných s CN a izolovanou zánětlivou (luminální) formou byla 31,6±23,4 U/ml, kombinovanou zánětlivou a stenozyující formou 47,3±32,9 U/ml, zánětlivou a fistulující formou 45,1±37,8 U/ml, kombinovanou zánětlivou, stenozyující a fistulující formou CN 44,5±26,6 U/ml – podrobně viz **Tabulka 3.2.6.1.-3.2.6.4., Graf 3.2.3.**

Byl nalezen statisticky významný rozdíl hodnot anti-porinových protilátek mezi skupinou kontrolní a jednotlivými podskupinami nemocných s CN. Kontrolní skupina: $18,8 \pm 10,7$ U/ml vs. CN, zánětlivá forma: $31,6 \pm 23,4$ U/ml; $p=0,003$; $1-\beta=0,874$ - **Tabulka 3.2.7.1.**; kontrolní skupina: $18,8 \pm 10,7$ U/ml vs. CN, kombinovaná zánětlivá a stenozující forma: $47,3 \pm 32,9$ U/ml; $p<0,001$; $1-\beta=0,999$ - **Tabulka 3.2.7.2.**; kontrolní skupina: $18,8 \pm 10,7$ U/ml vs. CN, kombinovaná zánětlivá a fistulující forma: $45,1 \pm 37,8$ U/ml; $p<0,001$; $1-\beta=0,987$ - **Tabulka 3.2.7.3.**; kontrolní skupina: $18,8 \pm 10,7$ U/ml vs. CN, kombinovaná zánětlivá, stenozující a fistulující forma: $44,5 \pm 26,6$ U/ml; $p<0,001$; $1-\beta=0,999$ - **Tabulka 3.2.7.4.**

Nebyly nalezeny statisticky významné diference hodnot proti-porinových protilátek mezi jednotlivými podskupinami nemocných s CN. CN, zánětlivá forma: $31,6 \pm 23,4$ U/ml vs. CN, kombinovaná zánětlivá a stenozující forma: $47,3 \pm 32,9$ U/ml; $p=0,076$; $1-\beta=0,445$; CN, zánětlivá forma: $31,6 \pm 23,4$ U/ml vs. CN, kombinovaná zánětlivá a fistulující forma: $45,1 \pm 37,8$ U/ml; $p=0,193$; $1-\beta=0,264$; CN, zánětlivá forma: $31,6 \pm 23,4$ U/ml vs. CN, kombinovaná zánětlivá, stenozující a fistulující forma: $44,5 \pm 26,6$ U/ml; $p=0,075$ U/mL; $1-\beta=0,445$; CN, kombinovaná zánětlivá a stenozující forma: $47,3 \pm 32,9$ U/ml vs. CN, kombinovaná zánětlivá a fistulující forma: $45,1 \pm 37,8$ U/ml; $p=0,861$; $1-\beta=0,054$; CN, kombinovaná zánětlivá a stenozující forma: $47,3 \pm 32,9$ U/ml vs. CN, kombinovaná zánětlivá, stenozující a fistulující forma: $44,5 \pm 26,6$ U/ml; $p=0,738$; $1-\beta=0,063$; CN, kombinovaná zánětlivá a fistulující forma: $45,1 \pm 37,8$ U/ml vs. CN, kombinovaná zánětlivá, stenozující a fistulující forma: $44,5 \pm 26,6$ U/ml; $p=0,947$; $1-\beta=0,051$.

Tabulka 3.2.8.1. sumarizuje průměrný věk jedinců ve vyšetřovaných skupinách a průměrnou hodnotu jejich anti-porinových protilátek.

Ve skupině pacientů s Crohnovou chorobou nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v hodnotě anti-porinových protilátek mezi muži a ženami.

Ve skupině pacientů s adenomy mělo 16 pacientů z 22 (73 %) pokročilou kolorektální neoplázií, 6 pacientů z 22 (27 %) nepokročilou kolorektální neoplázií. Hodnoty anti-porinových protilátek mezi těmito dvěma skupinami nedosáhly statisticky významné diference (pokročilý adenom: $22,0 \pm 12,8$ U/ml, nepokročilý adenom: $23,0 \pm 13,5$ U/ml; $p=0,871$; $1-\beta=0,05$).

Tabulka 3.2.1.1. Kontrolní skupina (popisná statistika)

Proměnná	Počet	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Sm. odch.	Var. koef.
Věk	45	38	35	20	58	10	27
OMP vypočteno	45	18,9	18,3	5,3	57,8	10,7	56,6

Tabulka 3.2.1.2. Skupina pacientů s Crohnovou nemocí (popisná statistika)

Proměnná	Počet	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Sm. odch.	Var. koef.
Věk	85	43	42	20	79	14	33
OMP vypočteno	85	41,8	31,9	0,5	123,1	29,5	70,6

Tabulka 3.2.1.3. Skupina pacientů s ulcerózní kolitidou (popisná statistika)

Proměnná	Počet	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Sm. odch.	Var. koef.
Věk	26	44	40	20	74	16	36
OMP vypočteno	26	28,9	26,8	10,2	63,0	13,0	45,1

Tabulka 3.2.1.4. Skupina pacientů s kolorektálním karcinomem (popisná statistika)

Proměnná	Počet	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Sm. odch.	Var. koef.
Věk	11	66	65	50	83	11	16
OMP vypočteno	11	36,7	42,4	11,7	59,9	14,6	39,9

Tabulka 3.2.1.5. Skupina pacientů s kolorektálním adenomem (popisná statistika)

Proměnná	Počet	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Sm. odch.	Var. koef.
Věk	22	65	64	26	79	12	18
OMP vypočteno	22	22,3	17,7	6,2	50,6	12,7	57,0

Vysvětlivky:

OMP vypočteno: vypočtená hodnota anti-porinových protilátek, Sm. odch.: směrodatná odchylka, Var. koef. – variační koeficient

Tabulka 3.2.2.1. Statistické porovnání mezi skupinou kontrolní a skupinou pacientů s Crohnovou nemocí (nepárový t-test)

Proměnná	Průměr CN	Průměr kontroly	t	sv	p-hodnoty	Počet platných CN	Počet platných kontrolní	Směrodatná odchylka CN	Směrodatná odchylka kontroly	F - poměr rozptyly	p rozptyly
Věk	43	38	2,1	128	0,036	85	45	14	10	1,9	0,019
OMP vypočteno	41,8	18,9	5,0	128	<0,001	85	45	29,5	10,7	7,6	0,000

Tabulka 3.2.2.2. Statistické porovnání mezi skupinou kontrolní a skupinou pacientů s ulcerózní kolitidou (nepárový t-test)

Proměnná	Průměr UC	Průměr kontroly	t	sv	p-hodnoty	Počet platných UC	Počet platných kontrolní	Směrodatná odchylka UC	Směrodatná odchylka kontroly	F - poměr rozptyly	p rozptyly
Věk	44	38	1,7	69	0,088	26	45	16	10	2,3	0,018
OMP vypočteno	28,9	18,9	3,5	69	0,001	26	45	13,0	10,7	1,5	0,248

Tabulka 3.2.2.3. Statistické porovnání mezi skupinou kontrolní a skupinou pacientů s kolorektálním karcinomem (nepárový t-test)

Proměnná	Průměr karcinom	Průměr kontroly	t	sv	p-hodnoty	Počet platných karcinom	Počet platných kontrolní	Směrodatná odchylna karcinom	Směrodatná odchylna kontroly	F - poměr rozptyly	p rozptyly
Věk	66	38	7,9	54	<0,001	11	45	11	10	1,0	0,895
OMP vypočteno	36,7	18,9	4,6	54	<0,001	11	45	14,6	10,7	1,9	0,149

Tabulka 3.2.2.4. Statistické porovnání mezi skupinou kontrolní a skupinou pacientů s kolorektálním adenomem (nepárový t-test)

Proměnná	Průměr adenom	Průměr kontrolní	t	sv	p-hodnoty	Počet platných adenom	Počet platných kontrolní	Směrodatná odchylna adenom	Směrodatná odchylna kontroly	F - poměr rozptyly	p rozptyly
Věk	65	38	9,4	65	<0,001	22	45	12	10	1,2	0,541
OMP vypočteno	22,3	18,9	1,2	65	0,253	22	45	12,7	10,7	1,4	0,333

Tabulka 3.2.3.1. Statistické porovnání mezi skupinou pacientů s Crohnovou nemocí a skupinou pacientů s kolorektálním adenomem (nepárový t-test)

Proměnná	Průměr CN	Průměr adenom	t	sv	p-hodnoty	Počet platných CN	Počet platných adenom	Směrodatná odchylka CN	Směrodatná odchylka adenom	F - poměr rozptyly	p rozptyly
Věk	43	65	-6,4	105	<0,001	85	22	14	12	1,6	0,255
OMP vypočteno	41,8	22,3	3,0	105	0,003	85	22	29,5	12,7	5,4	0,000

Tabulka 3.2.3.2. Statistické porovnání mezi skupinou pacientů s Crohnovou nemocí a skupinou pacientů s ulcerózní kolitidou (nepárový t-test)

Proměnná	Průměr CN	Průměr UC	t	sv	p-hodnoty	Počet platných CN	Počet platných UC	Směrodatná odchylka CN	Směrodatná odchylka UC	F - poměr rozptyly	p rozptyly
Věk	43	44	-0,1	109	0,953	85	26	14	16	1,2	0,574
OMP vypočteno	41,8	28,9	2,2	109	0,033	85	26	29,5	13,0	5,1	0,000

Tabulka 3.2.3.3. Statistické porovnání mezi skupinou pacientů s kolorektálním karcinomem a skupinou pacientů s kolorektálním adenomem (nepárový t-test)

Proměnná	Průměr karcinom	Průměr adenom	t	sv	p-hodnoty	Počet platných karcinom	Počet platných adenom	Směrodatná odchylka karcinom	Směrodatná odchylka adenom	F - poměr rozptyly	p rozptyly
Věk	66	65	0,3	31	0,778	11	22	11	12	1,2	0,772
OMP vypočteno	36,7	22,3	2,9	31	0,006	11	22	14,6	12,7	1,3	0,554

Vysvětlivky: OMP vypočteno: vypočítaná hodnota anti-porinových protilátek, CN: Crohnova nemoc, t: testové kritérium, sv: počet stupňů volnosti, p rozptyly: p hodnota pro rozptyly, UC: ulcerózní kolitida

Tabulka 3.2.4.1. Skupina pacientů s Crohnovou nemocí, postižením tlustého střeva (popisná statistika)

Proměnná	Počet	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Sm. odch.	Var. koef.
Věk	13	45	43	22	64	13	29
OMP vypočteno	13	30,8	18,8	12,3	100,3	27,2	88,2

Tabulka 3.2.4.2. Skupina pacientů s Crohnovou nemocí, postižením tenkého střeva (popisná statistika)

Proměnná	Počet	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Sm. odch.	Var. koef.
Věk	12	44	42	20	66	15	34
OMP vypočteno	12	36,9	27,8	14,7	93,4	23,9	64,8

Tabulka 3.2.4.3. Skupina pacientů s Crohnovou nemocí, postižením tenkého i tlustého střeva (popisná statistika)

Proměnná	Počet	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Sm. odch.	Var. koef.
Věk	60	43	42	22	79	15	35
OMP vypočteno	60	45,1	38,2	0,5	123,1	30,6	67,9

Tabulka 3.2.5.1. Statistické porovnání mezi skupinou kontrolní a skupinou pacientů s Crohnovou nemocí postihující tenké střevo (nepárový t-test)

Proměnná	Průměr kontroly	Průměr CN – tenké	t	sv	p-hodnoty	Počet platných kontrolní	Počet platných CN - tenké	Směrodatná odchylka kontroly	Směrodatná odchylka CN – tenké	F - poměr rozptyly	p rozptyly
Věk	38	44	-1,4	55	0,156	45	12	10	15	2,1	0,090
OMP vypočteno	18,9	36,9	-3,9	55	<0,001	45	12	10,7	23,9	5,0	0,000

Tabulka 3.2.5.2. Statistické porovnání mezi skupinou kontrolní a skupinou pacientů s Crohnovou nemocí postihující tlusté střevo (nepárový t-test)

Proměnná	Průměr kontroly	Průměr CN - tlusté	t	sv	p-hodnoty	Počet platných kontrolní	Počet platných CN - tlusté	Směrodatná odchylka kontroly	Směrodatná odchylka CN – tlusté	F - poměr rozptyly	p rozptyly
Věk	38	45	-2,0	56	0,054	45	13	10	13	2,0	0,260
OMP vypočteno	18,9	30,8	-2,4	56	0,019	45	13	10,7	27,2	6,5	0,000

Tabulka 3.2.5.3. Statistické porovnání mezi skupinou kontrolní a skupinou pacientů s Crohnovou nemocí postihující tenké a tlusté střevo (nepárový t-test)

Proměnná	Průměr kontroly	Průměr CN – tenké a tlusté	t	sv	p-hodnoty	Počet platných kontrolní	Počet platných CN – tenké a tlusté	Směrodatná odchylka kontroly	Směrodatná odchylka CN – tlusté a tenké	F - poměr rozptyly	p rozptyly
Věk	38	43	-1,8	103	0,068	45	60	10	15	2,0	0,017
OMP vypočteno	18,9	45,1	-5,5	103	<0,001	45	60	10,7	30,6	8,2	0,000

Vysvětlivky: CN-tenké: Crohnova nemoc postihující tenké střevo, CN-tlusté: Crohnova nemoc postihující tlusté střevo, CN-tenké a tlusté: Crohnova nemoc postihující tenké a tlusté střevo

Tabulka 3.2.6.1. Skupina pacientů s Crohnovou nemocí, zánětlivou formou (popisná statistika)

Proměnná	Počet	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Sm. odch.	Var. koef.
Věk	23	38	34	20	64	14	36
OMP vypočteno	23	31,6	21,5	12,3	95,4	23,4	73,9

Tabulka 3.2.6.2. Skupina pacientů s Crohnovou nemocí, zánětlivou a stenozující formou (popisná statistika)

Proměnná	Počet	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Sm. odch.	Var. koef.
Věk	20	48	48	23	79	15	32
OMP vypočteno	20	47,3	40,9	3,7	123,1	32,9	69,6

Tabulka 3.2.6.3. Skupina pacientů s Crohnovou nemocí, zánětlivou a fistulující formou (popisná statistika)

Proměnná	Počet	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Sm. odch.	Var. koef.
Věk	13	38	32	24	57	12	31
OMP vypočteno	13	45,1	33,2	0,5	106,4	37,8	83,8

Tabulka 3.2.6.4. Skupina pacientů s Crohnovou nemocí, zánětlivou, stenožující a fistulující formou (popisná statistika)

Proměnná	Počet	Průměr	Medián	Minimum	Maximum	Sm. odch.	Var. koef.
Věk	29	46	47	24	78	14	30
OMP vypočteno	29	44,5	38,7	3,8	106,4	26,6	59,9

Vysvětlivky:

OMP vypočteno: vypočítaná hodnota anti-porinových protilátek, Sm. odch.: směrodatná odchylka, Var. koef. – variační koeficient

Tabulka 3.2.7.1. Statistické porovnání mezi skupinou kontrolní a skupinou pacientů s Crohnovou nemocí, zánětlivou formou (nepárový t-test)

Proměnná	Průměr kontroly	Průměr CN-z	t	sv	p-hodnoty	Počet platných kontrolní	Počet platných CN-z	Směrodatná odchylka kontroly	Směrodatná odchylka CN-z	F - poměr rozptyly	p rozptyly
Věk	38	38	0,0	66	0,989	45	23	10	14	1,7	0,122
OMP vypočteno	18,9	31,6	-3,1	66	0,003	45	23	10,7	23,4	4,8	0,000

Tabulka 3.2.7.2. Statistické porovnání mezi skupinou kontrolní a skupinou pacientů s Crohnovou nemocí, kombinovanou zánětlivou a stenozující formou (nepárový t-test)

Proměnná	Průměr kontroly	Průměr CN-zs	t	sv	p-hodnoty	Počet platných kontrolní	Počet platných CN-zs	Směrodatná odchylka kontroly	Směrodatná odchylka CN-zs	F - poměr rozptyly	p rozptyly
Věk	38	48	-3,1	63	0,003	45	20	10	15	2,1	0,038
OMP vypočteno	18,9	47,3	-5,3	63	<0,001	45	20	10,7	32,9	9,5	0,000

Tabulka 3.2.7.3. Statistické porovnání mezi skupinou kontrolní a skupinou pacientů s Crohnovou nemocí, kombinovanou zánětlivou a fistulující formou (nepárový t-test)

Proměnná	Průměr kontroly	Průměr CN-zf	t	sv	p-hodnoty	Počet platných kontrolní	Počet platných CN-zf	Směrodatná odchylka kontroly	Směrodatná odchylka CN-zf	F - poměr rozptyly	p rozptyly
Věk	38	38	0,1	56	0,915	45	13	10	12	1,3	0,519
OMP vypočteno	18,9	45,1	-4,2	56	<0,001	45	13	10,7	37,8	12,6	0,000

Tabulka 3.2.7.4. Statistické porovnání mezi skupinou kontrolní a skupinou pacientů s Crohnovou nemocí, kombinovanou zánětlivou, stenozující a fistulující formou (nepárový t-test)

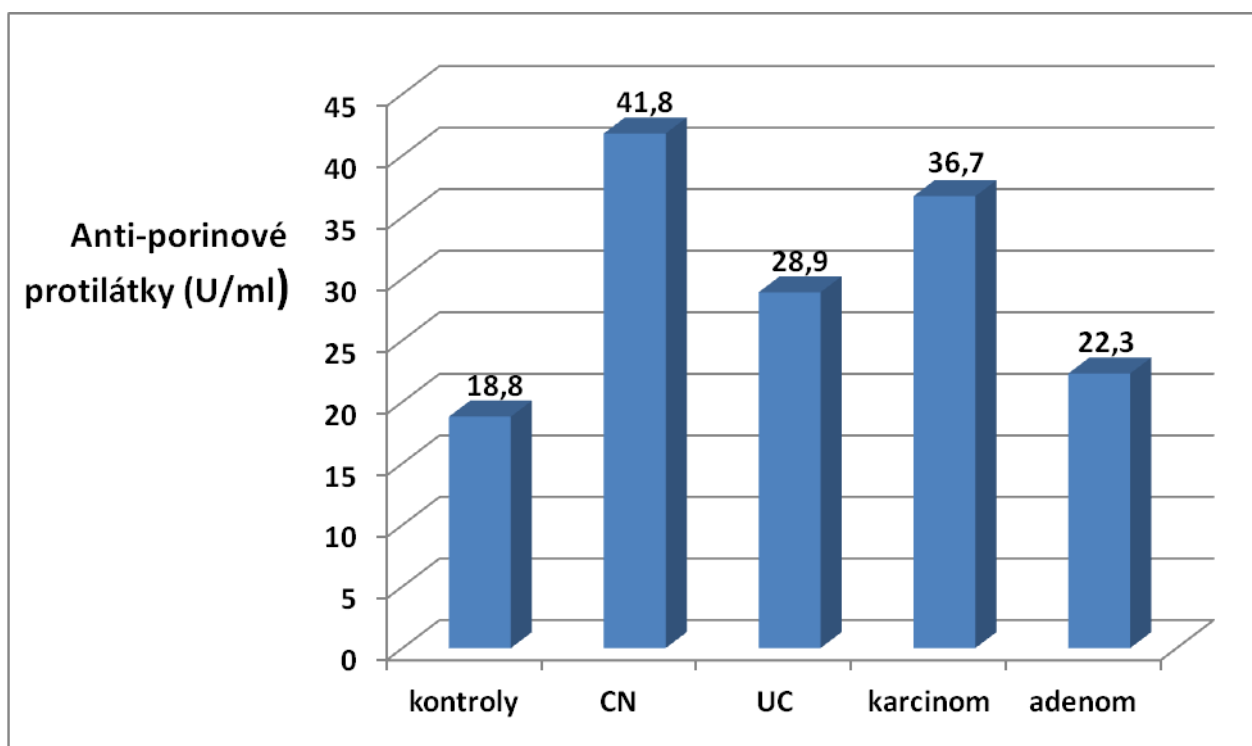
Proměnná	Průměr kontroly	Průměr CN-zsf	t	sv	p-hodnoty	Počet platných kontrolní	Počet platných CN-zsf	Směrodatná odchylka kontroly	Směrodatná odchylka CN-zsf	F - poměr rozptyly	p rozptyly
Věk	38	46	-2,9	72	0,005	45	29	10	14	1,8	0,079
OMP vypočteno	18,9	44,5	-5,8	72	<0,001	45	29	10,7	26,6	6,2	0,000

Vysvětlivky: CN-z: Crohnova nemoc, zánětlivá forma, CN-zs: Crohnova nemoc, zánětlivá a stenozující forma, CN-zf: Crohnova nemoc, zánětlivá a fistulující forma, CN-zsf: Crohnova nemoc, zánětlivá, stenozující a fistulující forma

Tabulka 3.2.8.1. Shrnutí základních popisných statistik jednotlivých zkoumaných skupin

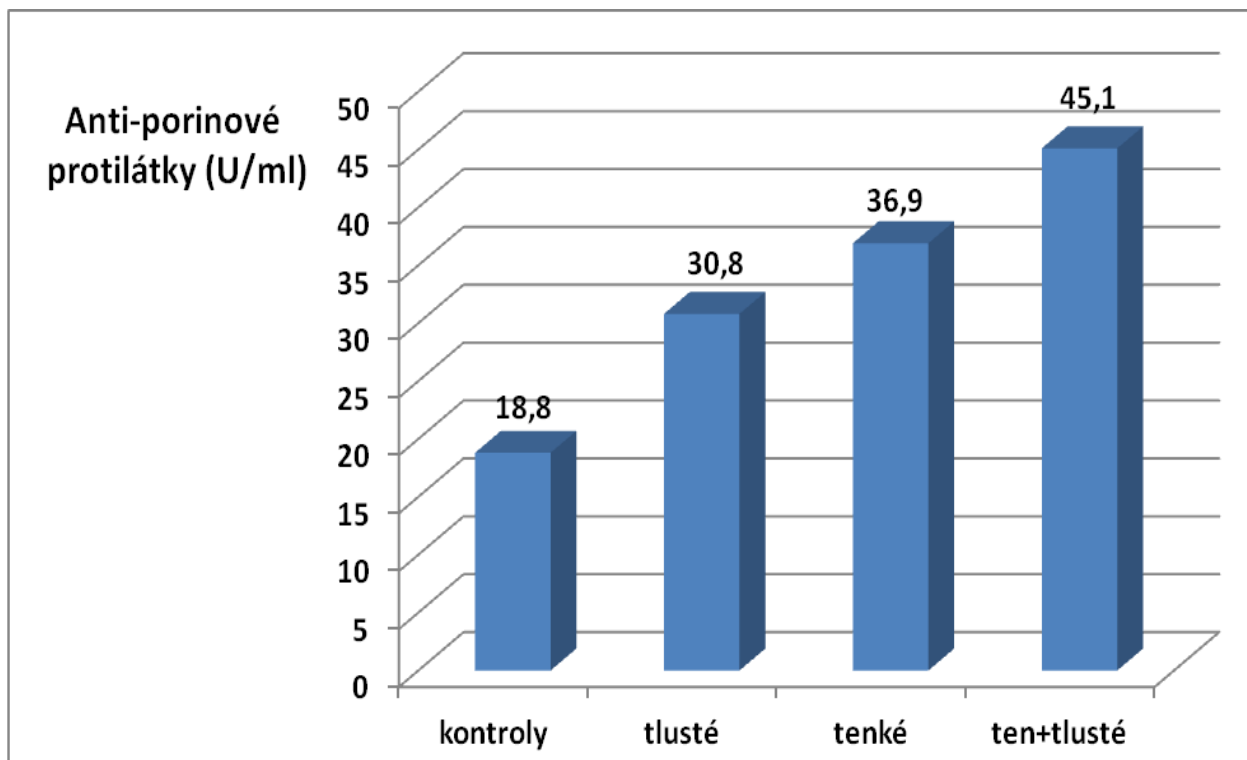
Skupina (n)	Věk (roky)	OMP (U/ml)
Kontrolní (45)	38 ± 10	18,9 ± 10,7
CN (85)	43 ± 14 ¹	41,8 ± 29,5 ²
UC (26)	44 ± 16	28,9 ± 13,0 ²
CA (22)	65 ± 12 ²	22,3 ± 12,7
CC (11)	66 ± 11 ²	36,7 ± 14,6 ²

Vysvětlivky: n: počet jedinců ve skupině, CN: Crohnova nemoc, UC: ulcerózní kolitida, CA: kolorektální adenom, CC: kolorektální karcinom, OMP: vypočtená hodnota anti-porinových protilátek; rozdíl proti kontrolní skupině (nepárový t-test): ¹ < 0,05; ² < 0,001



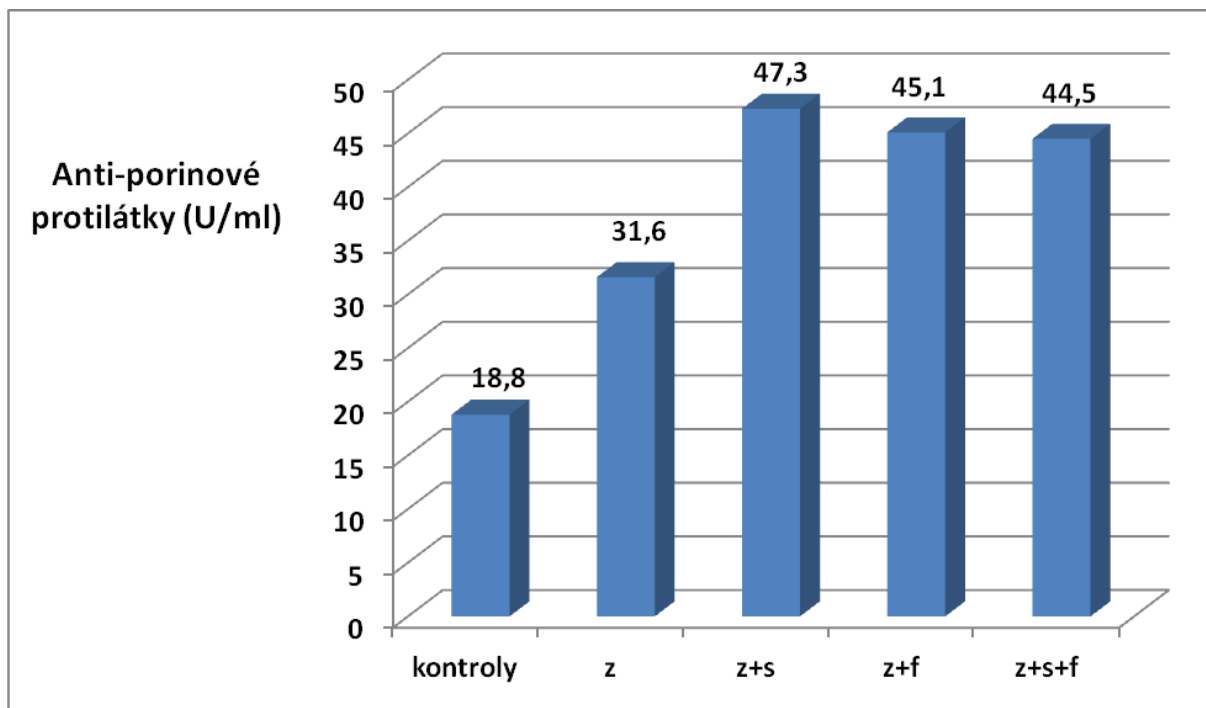
Graf 3.2.1.

Průměrná hodnota vypočtených anti-porinových protilátek (v U/ml) v kontrolní skupině (kontroly), ve skupině pacientů s Crohnovou nemocí (CN), ulcerózní kolitidou (UC), kolorektálním karcinomem (karcinom) a kolorektálním adenomem (adenom).



Graf 3.2.2.

Průměrná hodnota vypočtených anti-porinových protilátek (v U/ml) v kontrolní skupině, skupině pacientů s CN a izolovaným postižením tlustého střeva (tlusté), CN a izolovaným postižením tenkého střeva (tenké) a CN s kombinovaným postižením tenkého i tlustého střeva (ten+tlusté).



Graf 3.2.3.

Průměrná hodnota vypočtených anti-porinových protilátek (v U/ml) v kontrolní skupině (kontroly), skupině pacientů s CN a izolovanou zánětlivou formou (z), skupině pacientů s CN, kombinovanou zánětlivou a stenozující formou (z+s), skupině pacientů s CN, kombinovanou zánětlivou a fistulující formou (z+f) a skupině pacientů s CN, kombinovanou zánětlivou, stenozující a fistulující formou (z+s+f).

3.3. Diskuse

Naše studie potvrdila zvýšený výskyt anti-porinových protilátek u pacientů s idiopatickými střevními záněty (IBD) a kolorektálním karcinomem. Obě tyto skupiny pacientů vykazují při srovnání s kontrolními osobami statisticky významnou diferenci v hodnotě proti-porinových protilátek. Výsledky naší práce podporují asociaci positivity anti-porinových protilátek s komplikovanými formami Crohnovy nemoci (stenozující a fistulující formou) a tenkostřevním postižením při Crohnově chorobě (CN). Zcela novou, doposud nepublikovanou a z naší studie vyplývající skutečností je asociace positivity proti-porinových protilátek s kolorektálním karcinomem. Studií, které se zabývají anti-porinovými protilátkami, není mnoho, navíc některé výsledky jsou publikovány pouze v podobě abstrakt. Náš soubor pacientů se ve srovnání s dostupnými studii vyznačuje vysokými počty vyšetřených osob.

Pozitivita proti-porinových protilátek u pacientů s kolorektálním karcinomem je nesmírně důležitým zjištěním. Otázky, zda je pro vývoj kolorektálního karcinomu nutná přítomnost určitého druhu / kombinace druhů bakterií a zda je pro vývoj karcinomu stěžejní přítomnost bakterií v určité etapě vývoje kolorektálního karcinomu (při obvyklé sekvenci vývoje kolorektálního karcinomu z kolorektálního adenomu), zůstávají doposud nezodpovězeny, ale jistě se stanou předmětem dalšího výzkumu v této oblasti.

Aktuálním problémem (od r. 2011) je nedostupnost komerčních souprav, pomocí kterých jsme anti-porinové protilátky stanovovali. Séra jedinců, u kterých anti-porinové protilátky nebyly doposud vyšetřeny, jsou zmrazena a připravena po obnovení volného prodeje souprav ke stanovení tohoto sérologického markeru.

Cílem / antigenem námi vyšetřovaných proti-porinových protilátek (OmpC protilátek) je porin C, protein lokalizovaný ve vnější membráně gramnegativních, fakultativně anaerobních bakterií *Escherichia coli*. Střevní mikrobiota (včetně *Escherichia coli*) se nepochybně spolupodílí na vzniku kolorektálních patologií. Již mnoho prací prokázalo odlišné zastoupení bakterií ve stolici pacientů s CN nebo ulcerózní kolitidou (UC) ve srovnání se zdravými jedinci [6, 141, 257, 282, 283, 314] a pacientů s kolorektálním karcinomem ve srovnání s kontrolními osobami [113, 184, 258, 281]. Dalším důkazem je však i přítomnost protilátek (nebo jejich odlišné / obvykle vyšší zastoupení), jejichž cílem jsou nejruznější komponenty střevních bakterií u pacientů s idiopatickým střevním zánětem. V této souvislosti je nezbytné připomenout, že přítomnost / produkce protilátek úzce souvisí s imunitním

systemem jedince. Kromě jiných faktorů ovlivňuje vývoj kolorektální patologie intenzita reakce imunitního systému na přítomné tlustostřevní bakterie: střevní mikrobiota mohou být imunitním systémem tolerována, odpověď jednotlivých složek imunitního systému (humorální i buněčné komponenty) může být přiměřená, inadekvátně nadměrná reakce se však spolupodílí na vývoji patologie v tlustém střevě. Ztrátu tolerance vlastních lumenálních bakterií, která vede k detegovatelné humorální odpovědi, popisuje u pacientů s CN mnoho studií, mimo jiné např. práce Duchmanna et al. [65]. Podobná ztráta tolerance vlastních kolorektálních mikrobiot byla detegována i u pacientů s chronickými granulomatózními onemocněními a je přičítána chronické antigenní stimulaci [321]. Kromě získané alterace imunitní odpovědi se v etiopatogenezi CN uplatňují i genetické abnormality (mutace v IBD asociovaných genech). Studie Joossense et al. se zabývala otázkou, zda je možné predikovat riziko vývoje CN na základě kombinace CN-asociovaných genů a/nebo přítomných protilátek proti bakteriálním antigenům. Cílovou skupinou zkoumaných byli zdraví jedinci, kteří měli rozdílný počet (jednoho a více) příbuzných 1. stupně s prokázanou CN. Riziko vývoje CN u zdravého jedince stoupá s počtem nemocných příbuzných 1. stupně: riziko pro probanda s 1 nemocným příbuzným 1. stupně je 1,53; v případě 3 nemocných příbuzných 1. stupně se riziko zvyšuje na 3,57. Pokud je však u probanda s 3 nemocnými příbuznými 1. stupně navíc stanovena pozitivita jedné z protilátek proti bakteriálním antigenům, je riziko vzniku a vývoje CN u takového probanda 9,19-krát vyšší [136].

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*). ANCA protilátky jsou obvykle stanovovány nepřímou imunofluorescencí. Typická je asociace výskytu ANCA protilátek s UC, kdy jsou zjišťovány v 60-80 % [244]. U CN je výskyt ANCA protilátek popsán v 15-25 %, typická je jejich asociace s fenotypem podobným ulcerózní kolitidě [311]. ASCA protilátky (v třídě IgA i IgG) jsou popisovány u 60-70 % pacientů s Crohnovou chorobou a pouze 10-15 % pacientů s ulcerózní kolitidou. Antigenem ASCA protilátek jsou oligomanany (glykoproteiny) buněčné stěny. V průběhu posledních let byl zkoumán přínos dalších humorálních markerů asociovaných s IBD: ALCA (antilaminaribiosidových) a ACCA (antichitobiosidových) protilátek [223, 233]. Studie autorů Rejchrt et al. neprokázala statisticky významný rozdíl ALCA protilátek mezi skupinou pacientů s CN (zahrnuto 89

pacientů) a UC (31 pacientů), mezi skupinou s CN a kontrolami (50 osob) a ani mezi skupinou s UC a kontrolami. ACCA nebyly významně zvýšeny při srovnání skupiny CN nebo UC s kontrolami, byly pouze nalezeny signifikantně vyšší hodnoty ACCA ve skupině CN při srovnání se skupinou UC. Z práce vyplývá, že ALCA a ACCA nejsou vhodné k diagnostice IBD a ani k rozlišení pacientů s CN od pacientů s UC [233]. Mezi tři nové sérologické markery asociované s IBD patří anti-OmpC a dále protilátky proti I2 a CBir1 [19]. Anti-I2 protilátky jsou namířeny proti fragmentům DNA *Pseudomonas fluorescens*. Sekvence I2 jsou typicky přítomny v tlustostřevních lézích pacientů s CN. Anti-I2 pozitivita byla zjištěna u 54 % pacientů s CN, u 10 % pacientů s UC a pouze 4 % zdravých kontrol [187]. Anti-CBir1 jsou protilátky proti bakteriálním flagelinům a jejich výskyt je asociován s tenkostřevním, perforujícím a stenozujícím fenotypem CN [299].

Ve studii Mowa et al. byla přítomnost proti-porinových protilátek zjištěna u 46 % dospělých pacientů s CN [187], ve studii Landerse et al. u 55 % pacientů s CN [151]. V naší studii byly anti-porinové protilátky zvýšeny (nad 25 U/ml) u 61 % (52/85) nemocných s CN. V dětské populaci byla v literatuře pozitivita anti-OmpC protilátek nalezena u 24 % pacientů s CN, 11 % pacientů s UC a 5 % kontrol [324]. Byť studie Cohavy et al. prokázala, že proti-porinové protilátky jsou imunoreaktivní k pANCA [40] a tudíž bychom předpokládali, že zvýšené / patologické hodnoty proti-porinových protilátek budou častěji diagnostikovány u pacientů s UC než CN, opak je pravdou. V naší studii byla průměrná hodnota vypočtených anti-porinových protilátek u pacientů s UC 28,9 U/ml (tedy nižší než u nemocných s CN, u nichž byla průměrná hodnota 41,8 U/ml). Tuto skutečnost podporují ve svých publikacích i někteří další autoři – např. Nakamura a Landers [151, 195]. Maďarská studie Pappa et al. sice poukazuje na to, že senzitivita proti-porinových protilátek může být nižší (31 %) než se uvádělo v závěrech jiných studií, avšak specificitu této humorální odezvy popisuje jako vysokou (specificita 79-100 %) [209]. Senzitivita proti-porinových protilátek vyšla v naší studii pro Crohnovu nemoc 74 %, pro ulcerózní kolitidu 77 %, specificita 60 % (po eliminaci šedé zóny (20-25 U/ml) byla jako hranice pozitivních a negativních výsledků anti-porinových protilátek zvolena hodnota 20 U/ml).

Již studie Mowa et al. a Targana et al. prokázaly asociaci positivity a titru ASCA, anti-OmpC, anti-I2 a anti-CBir1 protilátek s tenkostřevním onemocněním, nutností tenkostřevního chirurgického výkonu, fibrostenozujícího a fistulujícího fenotypu CN a naopak negativní korelaci s tlustostřevním postižením při CN [187, 209, 299]. Pacienti, kteří se vyznačují

pozitivitou anti-I2, anti-OmpC a ASCA, podstupovali tenkostřevní chirurgický výkon podstatně častěji (v 72 %) ve srovnání s těmi, kteří protilátky neexprimovali (v 23%) [187]. Podobně i prospektivní studie na populaci skotských pacientů prokázala asociaci přítomnosti a titru ASCA, anti-I2 a anti-OmpC protilátek s progresivním fenotypem CN [2]. Výsledky naší studie prokazují, že pacienti s lumenální (zánětlivou) formou CN mají průměrnou hodnotu proti-porinových protilátek 31,6 U/ml. Průměrná hodnota anti-porinových protilátek u pacientů s CN, kombinovanou zánětlivou a fistulující formou dosahuje 45,1 U/ml, což podporuje výsledky výše zmíněné studie. Zajímavé je, že v naší studii hodnoty anti-porinových protilátek u pacientů s CN, kombinovanou zánětlivou a stenozující formou, vyšly ještě vyšší (průměrná hodnota: 47,3 U/ml), než u kombinované zánětlivé a fistulující formy CN. Byť výsledky naší studie neprokazují statistický významný rozdíl proti-porinových protilátek mezi jednotlivými podskupinami s CN, přesto lze tento trend identifikovat mezi skupinou pacientů s izolovanou zánětlivou formou CN a skupinou pacientů s kombinovanou zánětlivou a stenozující formou CN ($p=0,076$) a dále mezi skupinou pacientů s izolovanou zánětlivou formou CN a skupinou nemocných s kombinovanou zánětlivou, stenozující a fistulující formou CN ($p=0,075$). Studie Ippoliti et al. zkoumala asociaci genetických abnormalit (přítomnost NOD2 mutací) a získaných imunologických abnormalit (přítomnost a titr ASCA, anti-OmpC, anti-I2 a anti-CBir1 protilátek) s fibrostenozujícím fenotypem CN (typ B2 podle Vídeňské klasifikace). Závěrem bylo zjištění, že přítomnost mutací v NOD2 genu je pozitivně korelována s tenkostřevním postižením při CN, fibrostenozujícím fenotypem, nutností tenkostřevní chirurgické intervence; naopak negativně korelována s fenotypem podobným UC. V kohortě 731 vyšetřovaných byla nalezena pozitivní korelace fibrostenozujícího fenotypu s počtem protilátek: prevalence tohoto fenotypu se pohybovala od 12 % u pacientů, u kterých nebyla detegována žádná z protilátek, až k 64 % u osob, kteří se vyznačovali přítomností všech čtyřech vyšetřovaných protilátek. U 316 pacientů z 731 bylo diagnostikováno fibrostenozující onemocnění. V této skupině nebyla prokázána asociace mezi počtem pozitivních protilátek s NOD2 mutacemi, která by byla statisticky významná, avšak byla nalezena pozitivní korelace mezi prevalencí NOD2 mutací a titrem protilátek. Vzhledem k tomuto zjištěnému faktu se předpokládá, že alterace vrozené a získané složky imunitního systému mají synergický efekt vedoucí k vývoji fibrostenozujícího fenotypu CN [131].

Lze tedy připustit, že obecně nadhraniční hodnoty anti-porinových protilátek jsou asociovány s komplikovanými formami CN, které si častěji vyžadají chirurgický výkon (obvykle na

tenkém střevě) ve srovnání s pacienty, kteří se vyznačují nízkou hodnotou anti-porinových protilátek. Asociace zvýšených hodnot proti-porinových protilátek s komplikacemi CN (fistulujícími a/nebo stenozujícími) je podpořena výsledkem naší studie, který dokazuje, že pacienti s tenkostěvním postižením mají průměrnou hodnotu anti-porinových protilátek vyšší ve srovnání s pacienty, kteří mají tlustostěvné postižení při CN. Především stenózy, ale i fistulace jsou často lokalizovány právě v terminální části ilea.

Stejnou kombinaci protilátek jako Ippoliti et al. vyšetřoval Dubinsky et al. v dětské populaci. U 58 pacientů ze 196 (28 %) došlo k vývoji vnitřně penetrujícího a/nebo fibrostenozujícího fenotypu CN. Pozitivní korelace byla s těmito fenotypy nalezena u pacientů jak s anti-OmpC tak anti-I2 pozitivitou. Pacienti, u kterých byla přítomna pozitivita jedné a více vyšetřovaných protilátek, dospěli časněji k fibrostenozující / vnitřně perforující komplikaci po stanovení diagnózy CN ve srovnání s pacienty, kteří se nevyznačovali pozitivitou v žádné ze stanovovaných protilátek [63].

Anti-I2 protilátky jsou podle studie Spivaka et. al. důležitým markerem pro predikci klinické odpovědi na diverzi tlustého střeva (ať už ileostomie nebo kolostomie) při CN. V současnosti je u CN indikací k kolorektální diverzi kolitida refrakterní ke konzervativní léčbě, těžké perianální postižení a kortikodependentní kolitida u dětí [286]. Možnost predikce úspěšnosti tlustostěvné diverze je zcela zásadní. Spivakova studie hodnotila asociaci exprese ASCA, pANCA, proti-porinových a anti-I2 protilátek s pozitivní klinickou odpovědí na tlustostěvné diverzi u pacientů s CN. Studie zahrnovala 27 pacientů, 17 s rezistentní proktokolitidou, 10 s těžkým perianálním postižením. Anti-I2 pozitivita byla diagnostikována u 16/27 (59 %) nemocných. Klinicky příznivá odpověď na diverzi tlustého střeva byla pozorována u 15 ze 16 (94 %) pacientů s anti-I2 pozitivitou ve srovnání s pouze 18 % (2/11), kteří byli anti-I2 negativní. Pacienti s refrakterní proktokolitidou, kteří měli pozitivitu anti-I2 protilátek, se vyznačovali statisticky významně vyšší klinickou odpovědí na provedení diverze tlustého střeva ve srovnání s pacienty, kteří byli anti-I2 negativní ($p < 0,001$). Ve skupině pacientů operovaných pro perianální postižení nebyla statisticky významná diference v klinické odpovědi mezi skupinou s pozitivními a skupinou s negativními anti-I2 protilátkami pozorována, nalezen byl pouze pozitivní trend ($p = 0,100$). Vysvětlením tohoto výsledku je podle autorů studie fakt, že mikrobiální DNA sekvence *Pseudomonas fluorescens* (I2) jsou izolovány ze sliznice s aktivitou CN a exprese anti-I2 protilátek nebyla asociována s vývojem perianálního postižení [286, 294].

Zcela výjimečným zjištěním vyplývajícím z naší studie je přítomnost vysokého titru anti-OmpC protilátek u pacientů s anamnézou kolorektálního karcinomu (průměrná hodnota 36,7 U/ml). Asociace positivity anti-OmpC a kolorektálního karcinomu nebyla doposud v české a ani ve světové literatuře publikována. Rozdíl v průměrné hodnotě anti-porinových protilátek mezi skupinou kontrolní a mezi skupinou pacientů s kolorektálním karcinomem vyšel statisticky významně ($p < 0,001$). Stejně jako u IBD se v etiopatogenezi kolorektálního karcinomu uplatňují mutace v genech (ať už mutace (a ztráta funkce) v tumor supresorových genech a/nebo aktivace onkogenů), vzhledem k pozitivitě anti-OmpC protilátek je ale zřetelná i alterace ve složce získané imunity. Lze si představit více hypotéz, jak by se mohly bakterie spolupodílet na vývoji kolorektálního karcinomu: dokáže bakterie / určitá kombinace bakterií u imunologicky / geneticky predisponovaného jedince navodit chronickou stimulací sliznice tlustého střeva ztrátu tolerance střevních bakterií, což vede v důsledku ke vzniku zánětu, buněčných atypií a za „vhodných“ podmínek i karcinomu? Humorální odpověď by v tomto případě byla pouze „vedlejším produktem“ škodlivého působení bakterií - protilátky by nebyly označovány jako autoprottilátky, jejich přítomnost by pouze potvrzovala hypotézu nutnosti spoluúčasti bakterií na vývoji karcinomu. Dokáží zasáhnout bakterie (jejich určitá kombinace) genetickou informací buněk a takto vést k získaným mutacím v tumor supresorových genech a/nebo onkogenech? Mění / dokáže změnit přítomnost střevních bakterií v určitém stádiu konverze adenomu v karcinom fyzikálně-chemické vlastnosti v tlustém střevě (pH sliznice / zvýšení permeability / změnu adhezivity premaligních buněk)? Jsou v tomto případě protilátky autoprottilátkami? V našem souboru bylo vyšetřeno 11 pacientů s anamnézou kolorektálního karcinomu (osoby, které přišly k dispenzární koloskopii, u nichž bylo dosaženo remise onemocnění). Z 11 mělo 9 pacientů (82 %) pozitivní anti-OmpC protilátky. Zdá se tedy, že pozitivita anti-porinových protilátek u této skupiny nemocných nesouvisí se stádiem onemocnění či jeho recidivou. Domníváme se, že přetrvávající pozitivita anti-porinových protilátek potvrzuje skutečnost, že se střevní mikrobiota nepochybně spolupodílí na vývoji kolorektálního karcinomu. Získaná imunologická alterace v podobě humorální odezvy zůstává být detegovatelná i po dosažení remise nádorového onemocnění. Důležité bude v budoucnosti naplánovat další studie, v rámci kterých by byla stanovena hodnota anti-OmpC v době nově diagnostikovaného kolorektálního karcinomu a poté při dispenzární koloskopii (za 1 a za 3 roky po vstupní diagnóze).

Devět z 11 pacientů (82 %) mělo levostranný kolorektální karcinom (lokalizovaný aborálně od lienální flexury), 2 pacienti měli karcinom v colon transversum. Oba tito pacienti se vyznačovali nadprůměrnou hodnotou vypočtených anti-porinových protilátek (59,9 U/ml, resp. 30,7 U/ml). Pozitivita anti-OmpC protilátek tedy spíše nesouvisí s lokalizací karcinomu v tlustém střevě. Náš soubor však není rozsáhlý, i zde bude potřeba po obnovení dostupnosti komerčních souprav ke stanovení proti-porinových protilátek ve výzkumu pokračovat.

Cennou informací vyplývající z naší práce je absence zvýšených proti-porinových protilátek u pacientů s kolorektálním adenomem (průměrná hodnota 22,3 U/ml). Při použití nepárového t-testu nebyla prokázána statisticky významná diference v anti-porinových protilátkách mezi skupinou pacientů s kolorektálním adenomem a skupinou kontrolní ($p=0,253$). Ani tento fakt nebyl doposud publikován. Naše hypotéza byla, že se hodnota proti-porinových protilátek bude zvyšovat spolu s vývojem nepokročilého (non-advanced) kolorektálního adenomu v pokročilý adenom (advanced; který je definován velikostí nad 10 mm a/nebo přítomností vysokého stupně dysplázie a/nebo přítomností vilózní komponenty). Z 22 pacientů s adenomem mělo v naší studii 16 pacientů (73 %) pokročilý adenom a 6 pacientů (27 %) nepokročilou kolorektální neoplázií. Mezi těmito dvěma soubory jsme nenalezli statisticky významný rozdíl v hodnotách proti-porinových protilátek ($p=0,871$). Nelze tedy potvrdit naši hypotézu. Otázka, proč mají pacienti s kolorektálním adenomem výrazně nižší anti-porinové protilátky ve srovnání s pacienty s kolorektálním karcinomem, zůstává nezodpovězena. Je možné, že se některé tlustostřevní bakterie spolupodílejí na vývoji kolorektálního karcinomu pouze v některé z jeho etap vývoje a nemusí být přítomny nutně již u pacientů, kteří mají ve svém tlustém střevě doposud „jen“ adenom. Spoluúčast a načasování spoluúčasti tlustostřevních bakterií v etiopatogenezi kolorektálního karcinomu bude jistě nosným tématem dalších výzkumných záměrů.

Průměrný věk v jednotlivých skupinách pacientů s kolorektální patologií se liší od průměrného věku jedinců ve skupině kontrolní (zdraví dárce krve) a dobře koresponduje s výskytem onemocnění v populaci. Idiopatické střevní záněty jsou obvykle diagnostikovány u mladších jedinců, zatímco incidence sporadického kolorektálního adenomu a karcinomu stoupá s věkem jedince.

Naše studie je poměrně rozsáhlá a přináší důležité informace. Potvrzuje asociaci anti-OmpC protilátek s idiopatickými střevními záněty. Zřetelná asociace positivity proti-porinových

protilátek především s komplikovanými formami Crohnovy choroby a tenkostřevním postižením potvrzuje předchozí studie dostupné ve světové literatuře. Při kombinaci s dalšími sérologickými markery (anti-CBir1, anti-I2 a ASCA) by se anti-OmpC protilátky měly stát důležitým nástrojem, jak v klinické praxi predikovat závažnější / komplikovanější průběh Crohnovy choroby. Pozitivita anti-OmpC protilátek asociovaná s kolorektálním karcinomem je zcela prioritním pozorováním. Vzhledem k pozitivitě proti-porinových protilátek u pacientů v remisi kolorektálního karcinomu předpokládáme, že nejde o znak aktivity onemocnění, ale daná skutečnost potvrzuje předpokládanou spoluúčast střevních mikrobiot na vývoji kolorektálního karcinomu. Vzhledem k nízkým anti-OmpC protilátkám u pacientů s nepokročilým i pokročilým kolorektálním adenomem bude nutné v rámci dalších studií vysvětlit načasování imunopatologické reakce nastartované střevními bakteriemi během vývoje kolorektálního karcinomu z kolorektálního adenomu.

4. Kultivační vyšetření bioptických vzorků odebraných ze sliznice tlustého střeva a následné stanovení kolicinogenie u pacientů s idiopatickými střevními záněty, adenomy tlustého střeva a kolorektálním karcinomem

Úloha kolonických bakterií v etiopatogenezi idiopatických střevních zánětů a kolorektálního karcinomu není v současnosti již zpochybňována. Stanovení bakteriálního zastoupení v biopticky odebraných vzorcích sliznice tlustého střeva kultivační metodou představuje jedinečnou možnost, jak specifikovat roli některých „běžně se vyskytujících“ bakterií - například *Escherichia coli* v etiopatogenezi jednotlivých kolorektálních patologií. Kolicinogenie (schopnost *Escherichia coli* a jí příbuzných bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* produkovat koliciny s toxickým a v některých případech anti-neoplastickým efektem) se jeví být významnou determinantou vzniku a vývoje rakoviny tlustého střeva; svoji úlohu mají koliciny i v oblasti idiopatických střevních zánětů. Vzhledem k incidenci kolorektálního karcinomu v České republice a zvyšující se incidenci idiopatických střevních zánětů ve vyspělých státech světa se možnost aplikace získaných výsledků do klinické praxe jeví jako vysoce účelná.

4.1. Metodika

Ke stanovení bakteriálního zastoupení v tlustém střevě a vyšetření kolicinogenie byly vybrány 3 skupiny pacientů: nemocní s anamnézou nebo nově diagnostikovaným kolorektálním karcinomem, pacienti s anamnézou či nově diagnostikovaným adenomem tlustého střeva a pacienti s idiopatickým střevním zánětem (Crohnovou chorobou nebo ulcerózní kolitidou). Celkem bylo vyšetřeno 30 pacientů s kolorektálním karcinomem (23 mužů, 7 žen, ve věku 38-86 let, průměr 67 ± 11 , medián 66), 30 pacientů s kolorektálním adenomem (17 mužů, 13 žen, ve věku 39-79 let, průměr 63 ± 9 , medián 64 let) a 30 pacientů s idiopatickým střevním zánětem (13 mužů, 17 žen, ve věku 20-74 let, průměr 35 ± 14 , medián 33 let). Kontrolní skupinu tvořilo 20 osob (9 mužů, 11 žen, ve věku 23-84 let, průměr 55 ± 15 , medián 56 let) s negativní osobní anamnézou idiopatického střevního zánětu, kolorektálního adenomu či karcinomu a aktuálně normálním slizničním nálezem dokumentovaným při pankoloskopickém vyšetření. Po příchodu pacienta nebo osoby z kontrolní skupiny na

endoskopické pracoviště II. interní gastroenterologické kliniky byla vyšetřovaná osoba seznámena se studií a podepsala informovaný souhlas (**viz příloha**).

Při aplikaci periferního žilního katetru proběhl odběr žilní krve ke stanovení anti-porinových protilátek (zavedení katetru je na pracovišti běžnou praxí před terapeutickou i diagnostickou pankolosií). Během koloskopie byly sterilními klíšťkami odebrány ve třech etážích (v céku, colon transversum a rektu) bioptické vzorky určené k ex-vivo in-vitro kultivaci sliznice tlustého střeva a poté ke stanovení kolicinogenie (**Obr. 4.1.1.1.-4.1.1.4.**). Slizniční biopsie pacienta netraumatizují, jsou nebolestivé. Každý jednotlivý vzorek byl vložen do jedné zkumavky s játrovým bujónem. Zkumavky byly v den odběru spolu s průvodkami dopraveny na Ústav klinické mikrobiologie LF UK a FN Hradec Králové (**Obr. 4.1.2.1.**), kde ihned v úvodu dostává vzorek své laboratorní číslo a je postoupen kultivačnímu vyšetření.

V úvodu mikrobiologického vyšetření byly vzorky sliznice tračnicku vyjmuty ze zkumavky sterilní bakteriologickou kličkou, přeneseny na předem důkladně vypálená a zchladlá podložní skla, překryty druhým stejně připraveným sklem a materiál byl rozdrcen. Následovalo opatrné oddělení skel a všechna rozmělněná tkáň byla sterilním vatovým tampónem navlhčeným v játrovém bujónu setřena a inokulována na krevní a MacConkeyův agar. Na obou plotnách byly provedeny křížové roztěry. Vatový tampón byl se zbytkem materiálu zalomen zpět do játrového bujónu. Takto připravený materiál byl vložen na 5 minut do ultrazvukové lázně, poté krátce protřepán na třepačce (Vortex). Spolu s krevním a MacConkeyovým agarem byl inkubován v termostatu při 37 °C 18-24 hodin. Po této inkubaci byla zkumavka znovu důkladně protřepána a materiál vyočkován na krevní, MacConkeyův a desoxycholátový agar. Na všech plotnách byl proveden křížový roztěr. Následovala další 18-24hodinová inkubace v termostatu při 37 °C. Byly odečítány primo kultivace, pomnožení a pomocí systému Vitek 2 (BioMérieux SA, Marcy l'Etoile, Francie) byly identifikovány všechny druhy bakterií přítomné ve vzorku (**Obr. 4.1.2.2.-4.1.2.3.**). Následovalo stanovení citlivosti na antibiotika, zamrazení bakteriálních kmenů a řádné zaevidování.

Kmeny z čeledi *Enterobacteriaceae* byly ke stanovení kolicinogenie 2-krát ročně transportovány na Biologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy Univerzity v Brně. Zde byly zmrazené kmeny pomocí sterilní jednorázové bakteriologické kličky naočkovány na Petriho misky se dvěma různými typy agarů: jednak do základního média na 1,2% Trypton yeast (TY) agar (složení: 16 g/l tryptonu (Hi-Media, Mumbai, India), 10 g/l extraktu z kvasinek (Hi-Media) a 5 g/l chloridu sodného v destilované vodě) a dále na Nutrient agaru

(médium chudé na živiny, které vede ke zvýšení produkce některých bakteriocinů, zejména mikrocinů). Následovala 48hodinová kultivace při 37 °C a poté expozice parám chloroformu (ponechán k působení 30 minut). Následně byl přidán TY agar s indikátorovou kulturou, přičemž v naší studii byly jako standardní kolicinové indikátorové kmeny použity *Escherichia coli* K 12 ROW, *E. coli* C6 (phi) a kmen *Shigella sonnei* 17. Kultivace s indikátorovou kulturou probíhala 24 hodin při 37 °C. Poté byly odečítány inhibiční zóny (v případě, že je indikátorový kmen citlivý ke zkoumanému kolicinu, vzniká zóna inhibice růstu v okolí testovaného kmene) (**Obr. 4.1.3.1.-4.1.3.2.**). Vzhledem k tomu, že se mikrocinů mH47 a mM působením chloroformu rozkládají, bylo nutné k detekci produkce mH47 a mM vyšetřit metodou PCR nejen kmeny, které byly díky tvorbě inhibiční zóny označeny jako produkční, ale i kmeny bez viditelné inhibiční zóny (neprodukční).

Následovala izolace genomové DNA: z kmenů *E. coli*, které byly v předcházejícím kroku identifikovány jako kmeny produkční, byla vyizolována genomová DNA. Ta byla detegována metodou PCR, která probíhá ve třech krocích: denaturace DNA, připojení primerů, které ohraničí požadovaný úsek DNA (existují specificky navržené primery určené pro detekci kolicinových a mikrocinových genů – viz **Tabulka 4.1.1. a 4.1.2.**) a selektivní namnožení požadovaného úseku DNA, který je ohraničen primery. Paralelně byla PCR provedena také z bakteriálních buněk, které byly lyzovány přímo v PCR reakci (96 °C po dobu 5 minut). Výsledkem PCR reakce byl získán 20 µl PCR produktu konkrétního genu (kódujícího bakteriocin nebo sloužícího k určení genotypu kmene *E. coli*). Vizualizace PCR produktů probíhala na 1% nebo 2% agarózovém gelu (**Obr. 4.1.4.1. a 4.1.4.2.**). U chloroform-senzitivních mikrocinů mH47 a mM byla metoda PCR s primery specifickými pro tento typ bakteriocinů provedena u všech kmenů *E. coli* – produkčních i neprodukčních.

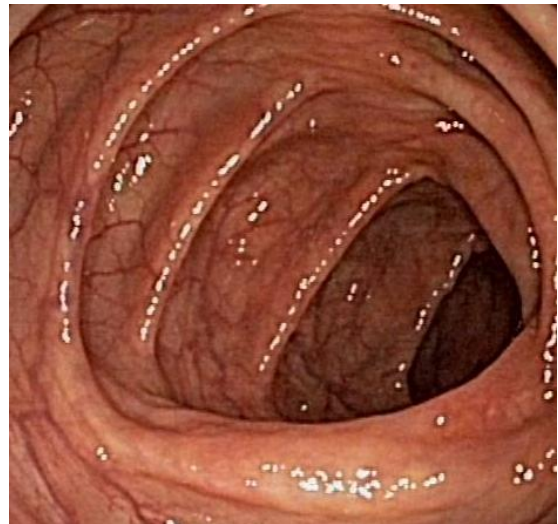
U zástupců jednotlivých kolonií vykultivovaných bakterií *E. coli* byla provedena PCR s cílem identifikovat genotyp. K tomuto účelu byly použity speciální primery umožňující určení fylogenetických skupin *E. coli*.

Získané výsledky byly statisticky zpracovány s pomocí statistického softwaru Statistica. Byly vypočteny základní popisné statistiky a provedeno porovnání jednotlivých souborů pomocí nepárového t-testu. Dále byl k výpočtům použit Mann-Whitneyův test a v některých případech oboustranný Fisherův test.

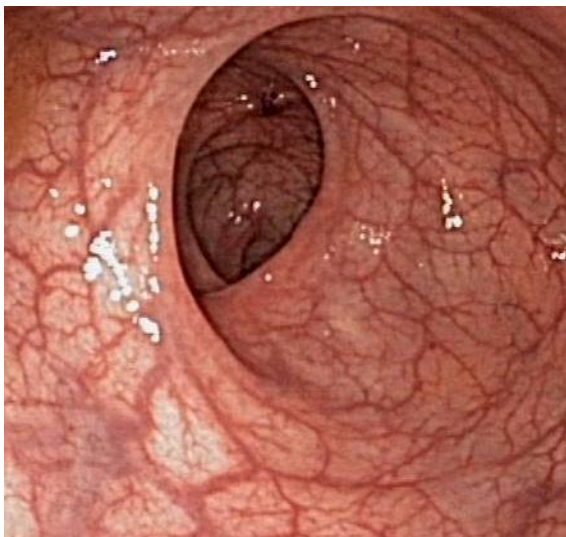
Projekt byl schválen Etickou komisí Univerzity Karlovy v Praze, Lékařskou fakultou v Hradci Králové. Při vlastním provádění studie a při vyhodnocení získaných výsledků byla zajištěna ochrana osobních údajů vyšetřených osob v souladu s Metodickým návodem Ministerstva zdravotnictví ČR (*k zabezpečení a ochraně údajů v informačních systémech provozovaných ve zdravotnických zařízeních uveřejněný ve Věstníku MZČR, částka 6/1994 s odvoláním na ustanovení paragrafu 55 odstavec 2, písmeno d) zákona 230/1996 Sbírky o péči o zdraví lidu v platném znění*).



Obr. 4.1.1.1.



Obr. 4.1.1.2.



Obr. 4.1.1.3.



Obr. 4.1.1.4.

Endoskopický obraz:

Obr. 4.1.1.1. Cékum s ústím appendixu: fyziologický nález

Obr. 4.1.1.2. Colon transversum: fyziologický nález

Obr. 4.1.1.3. Rektum: fyziologický nález

Obr. 4.1.1.4. Bioptické klíšťky používané k bioptickým odběrům sliznice



Obr. 4.1.2.1. Zpracování materiálu na Ústavu klinické mikrobiologie LF UK a FN Hradec Králové (zkumavky se vzorky sliznice tlustého střeva v játrovém bujónu, Petriho misky s agarem, průvodky k materiálu)



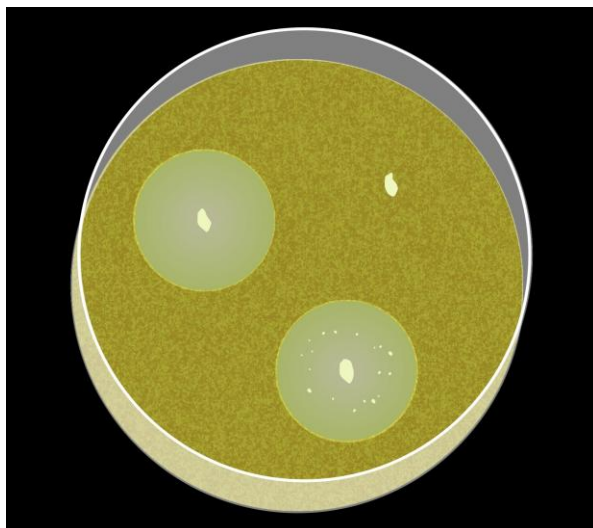
Obr. 4.1.2.2.



Obr. 4.1.2.3.

Obr. 4.1.2.2.: Kolonie *Escherichia coli* izolované na MacConkeyově agaru

Obr. 4.1.2.3.: Kolonie *Escherichia coli* izolované na krevním agaru



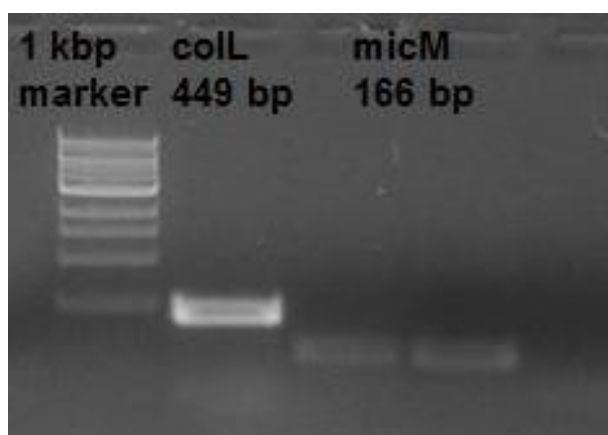
Obr. 4.1.3.1.: Schéma kolicinogenotypizace (kruhová zóna inhibice růstu v okolí testovaného kmene v případě, že je indikátorový kmen ke zkoumanému kolicinu citlivý).



Obr. 4.1.3.2.: Testované kmeny *E. coli* kultivované na Nutrient agaru s indikátorovým kmenem *Escherichia coli* K 12 ROW a patrnými inhibičními zónami v okolí testovaných kmenů produkujících bakteriociny.



Obr. 4.1.4.1.: Vizualizace PCR produktu na agarózovém gelu - gen pro kolicin Ib (collb) a pro mikrocin C7 (micC7)



Obr. 4.1.4.2.: Agarózový gel s produktem PCR reakce - gen pro kolicin L (collL) a pro mikrocin M (micM)

Tabulka 4.1.1.: Soubor primerů použitých k detekci kolicinových genů

Kolicin	Primer	Sekvence primeru	Délka PCR produktu
A	ColA-F	cgtggggaaaagtcatcatc	475
	ColA-R	gctttgctcttctctgatgc	
B	colicinB-F	aagaaaatgacgagaagacg	492
	colicinB-R	gaaagaccaaaggctataagg	
D	ColD-F	ctggactgctgctggtgata	420
	ColD-R	gaaggtgctgctactactgc	
E1	colicinE1-F	tgtggcatcgggcgagaata	649
	colicinE1-R	ctgcttctgaaaagcctttt	
E1-1	cea2F	ggtggaactggaggtagcaa	357
	ceaR	acgtcgtgttctgcttct	
E2	ColE2-F	tgatgctgctgcaaagag	409
	ColE2-R	ttcaaagcgttccctaccac	
E3	ColE3-F	taagcaggctgcattgatg	413
	ColE3-R	tccgatctggaccttcaac	
E4	ColE4-F	gaaggctgcattgatgct	409
	ColE4-R	cggatccggaccttaattt	
E5	ColE3-F	taagcaggctgcattgatg	430
	ColE5-R	ttgaattctgcaatcgtcca	
E6	ColE6-F	accgaacgtccagggtgtt	399
	ColE6-R	ttagcctgctgctcctgat	
E7	ColE7-F	gcattctgccatctgaaat	431
	ColE7-R	cttctgccactttctttcg	
E8	ColE3-F	taagcaggctgcattgatg	449
	ColE8-R	gactgattggcttgcgtga	
E9	ColE3-F	taagcaggctgcattgatg	418
	ColE9-R	gactttctccctccgacct	
Ia	Colla-F	gcatgcaaatgacgctctta	473
	Colla-R	gaggacgccagttctctgtc	
Ib	Collb-F	aacgagtgggctgatgattc	464
	Collb-R	cctttctgctgctgattc	
Js	ColJs-F	tcaaaatgtttggctcctc	254
	ColJs-R	taatctgccctgtcccactg	
K	ColK-F	cagaggtcgtgaacatgaa	469
	ColK-R	tccgctaaatcctgagcaat	
L	Col28b(L)-F	tgcatattgaaagcgtcagc	449
	Col28b(L)-R	caggttatcccctctcacca	
M	ColM-F	gcttaccacttcgcaaaacc	429
	ColM-R	gagcgactctccgataatgc	
N	ColN-F	agcttggcgagtatcttggga	401
	ColN-R	caacacagccccgaataaac	

Tabulka 4.1.1. - pokračování: Soubor primerů použitých k detekci kolicinových genů

Kolicin	Primer	Sekvence primeru	Délka PCR produktu
S4	ColS4-F	tatatggcccaactgctggt	456
	ColS4-R	cgtaaggacggacacctggt	
U	ColU-F	tgattgctgcgagaaaaatg	485
	ColU-R	tctgacagcctctccctggt	
Y	ColY-F	gcaggcagaaaagaacaagg	477
	ColY-R	cggacggtattgccttcat	
5	Col5-F	cattggcaaaagcgaaatct	443
	Col5-R	tgcaactctggaacaatcg	
10	Col10-F	ggttaccggatttctggt	448
	Col10-R	ttctagatgcttgcccact	
Fy	ColFy-Fa	aaattaagcggtgccattgac	580
	ColFy-Fa	ttctaattgcgccagacctt	

Tabulka 4.1.2.: Souhrn primerů použitých pro detekci mikrocinových genů

Mikrocin	Primer	Sekvence primeru	Délka PCR produktu
B17	mcc B17-F	tcacgccagtctccattaggtgtggcatt	135
	mcc B17-R	ttccgccgtgccaccgtttccaccactac	
C7	mcc C7-F	cgttcaactgttgcaatgct	134
	mcc C7-R	agttgaggggcgtgtaattg	
E492	mcc E492-F	gtctctcctgcaccaaagc	291
	mcc E492-R	tttctagcatggcgttctg	
H47	mcc H47-F	cactttcatccctcggattg	227
	mcc H47-R	agctgaagtcgctggcgcacctcc	
J25	mcc J25-F	tcagccatagaaagatataggtgtaccaat	175
	mcc J25-R	tgattaagcattttcatttaataaagtgt	
L	mcc L-F	ggtaaatgatatatgagagaaataacgta	233
	mcc L-R	tttcgctgagttggaatttctgctgcatc	
V	mcc V-F	cacacacaaaacgggagctgtt	680
	mcc V-R	tttcgctgagttggaatttctgctgcatc	
M	micM-4-F	cgttattagcccgggattt	166
	micM-4-R	gcagacgaagaggcacttg	

4.2. Výsledky

Při analýze výsledků z hlediska počtu biopsií v jednotlivých souborech nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v počtech vykultivovaných kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae* (90 biopsií ve skupině adenom, idiopatické střevní záněty, karcinom (30 pacientů, 3 etáže biopsií); 60 biopsií v kontrolní skupině (20 jedinců, 3 etáže biopsií)), podrobně viz **Tabulka 4.2.1**. Celkem bylo izolováno a dále testováno 666 kmenů. Kolicinogenie byla pomocí PCR metod stanovena u 137 produkčních kmenů, mikrocinogenie u 192 produkčních kmenů (průměr zóny inhibice růstu indikátorového kmene bývá užší, pokud jsou daným kmenem produkovány pouze koliciny, širší v případě produkce mikrocinů a/nebo současné produkce kolicinů s mikrocinem). K detekci produkce mikrocinu H47 a mM byly vyšetřeny všechny vykultivované kmene (viz výše).

Četnost výskytu vykultivovaných bakterií *Escherichia coli* se statisticky významně lišila mezi souborem kontrol a souborem pacientů s karcinomem (kontroly: 48/60 (80 %), karcinom: 87/89 (98 %); $p < 0,001$), mezi souborem kontrol a souborem nemocných s idiopatickým střevním zánětem (kontroly: 48/60 (80 %), idiopatický střevní zánět: 87/88 (99 %); $p < 0,001$).

Nebyl prokázán statisticky signifikantní rozdíl v bakteriocinogenii a kolicinogenii mezi jednotlivými soubory (podrobně viz **Tabulka 4.2.1**). Mikrocinogenie byla nižší v souboru pacientů s adenomem (52 %) a v souboru pacientů s idiopatickým střevním zánětem (48 %); vyšší byla v souboru nemocných s karcinomem (60 %) a v souboru kontrol (60 %), podrobně viz **Tabulka 4.2.1**. Statisticky významný rozdíl v mikrocinogenii mezi jednotlivými soubory prokázán nebyl. Četnost výskytu současné produkce kolicinů a mikrocinů se statisticky významně lišila mezi skupinou pacientů s adenomem a karcinomem (adenom: 19/89 (21 %), karcinom: 32/89 (36 %); $p = 0,031$) a tento trend byl pozorován i mezi skupinou pacientů s adenomem a souborem kontrol (adenom: 19/89 (21 %), kontroly: 21/60 (35 %); $p = 0,065$), viz **Tabulka 4.2.1., Graf 4.2.1**.

Nejnižší četnost výskytu genotypu A *Escherichia coli* byla nalezena v souboru pacientů s karcinomem, statisticky významný rozdíl v četnosti výskytu genotypu A *Escherichia coli* byl zjištěn mezi souborem pacientů s karcinomem a souborem pacientů s idiopatickým střevním zánětem (karcinom: 30/87 (34 %), idiopatický střevní zánět: 43/87 (49 %); $p = 0,048$). Podrobné výsledky viz **Tabulka 4.2.1., Graf 4.2.2**.

Nejvyšší četnost výskytu genotypu D *Escherichia coli* byla diagnostikována v souboru pacientů s karcinomem, statisticky významná diference byla v četnosti výskytu genotypu D *Escherichia coli* zjištěna mezi souborem pacientů s karcinomem a souborem kontrol (karcinom: 24/87 (28 %), kontroly: 6/48 (13 %); $p=0,044$). Výsledky viz **Tabulka 4.2.1.**, **Graf 4.2.3.**

Kombinace genotypu B2 *Escherichia coli* spolu s produkcí mikrocinu H47 (mH47) a mikrocinu M (mM) byla nejčastěji diagnostikována v souboru kontrol. Četnost výskytu genotypu B2+mH47+mM prokazovala statisticky významnou diferenci při srovnání souboru kontrol a souboru pacientů s adenomem (kontroly: 19/60 (32 %), adenom: 12/90 (13 %); $p=0,006$), podrobně viz **Tabulka 4.2.1.**, **Graf 4.2.4.**

Četnost výskytu jednotlivých typů kolicinů – viz podrobně **Tabulka 4.2.2.** Statisticky významný rozdíl v četnosti výskytu kolicinu E2,4,6 byl nalezen mezi skupinou pacientů s idiopatickým střevním zánětem a souborem pacientů s adenomem (idiopatický střevní zánět: 8/90 (9 %), adenom: 0 %; $p=0,004$), mezi skupinou pacientů s idiopatickým střevním zánětem a souborem pacientů s karcinomem (idiopatický střevní zánět: 8/90 (9 %), karcinom: 0 %; $p=0,004$). Trend ke statisticky významné diferenci byl pozorován mezi skupinou pacientů s idiopatickým střevním zánětem a souborem kontrol (idiopatický střevní zánět: 8/90 (9 %), kontroly: 1/60 (2 %); $p=0,070$), viz **Graf 4.2.5.** Kolicin E7 byl nejčastěji diagnostikován ve skupině nemocných s idiopatickým střevním zánětem. Byl pozorován statisticky významný rozdíl v četnosti výskytu kolicinu E7 mezi skupinou pacientů s idiopatickým střevním zánětem a souborem pacientů s adenomem (idiopatický střevní zánět: 10/90 (11 %), adenom: 0 %; $p=0,001$), mezi skupinou nemocných s idiopatickým střevním zánětem a souborem pacientů s karcinomem (idiopatický střevní zánět: 10/90 (11 %), karcinom: 1/90 (1 %); $p=0,005$), mezi skupinou nemocných s idiopatickým střevním zánětem a souborem kontrol (idiopatický střevní zánět: 10/90 (11 %), kontroly: 1/60 (2 %); $p=0,030$), viz **Graf 4.2.6.**

Výskyt kolicinu M byl s nejvyšší frekvencí pozorován ve skupině pacientů s karcinomem. Byla zjištěna statisticky významná diference v četnosti výskytu kolicinu M mezi souborem pacientů s karcinomem a souborem pacientů s adenomem (karcinom: 19/90 (21 %), adenom: 4/90 (4 %); $p=0,001$), mezi souborem pacientů s karcinomem a skupinou pacientů s idiopatickým střevním zánětem (karcinom: 19/90 (21 %), idiopatický střevní zánět: 5/90 (6 %); $p=0,002$). Trend ke statisticky významnému rozdílu v četnosti výskytu kolicinu M byl

pozorován mezi skupinou pacientů s karcinomem a souborem kontrol (karcinom: 19/90 (21 %), kontroly: 6/60 (10 %); $p=0,070$), viz **Graf 4.2.7**.

V případě kolicinogenie je nejčastěji syntetizovaným kolicinem ve všech skupinách kolicin Ia. Ve skupině nemocných s adenomem je v četnosti výskytu následován kolicinem Ib, v souboru pacientů s idiopatickým střevním zánětem kolicinem E7, ve skupině pacientů s karcinomem kolicinem M a v souboru kontrol kolicinem Ib, podrobně viz **Tabulka 4.2.3**.

Četnost výskytu jednotlivých typů mikrocinů – viz podrobně **Tabulka 4.2.4**. Statisticky významný rozdíl byl nalezen v četnosti výskytu mB17 mezi souborem pacientů s adenomem a skupinou kontrol (adenom: 12/90 (13 %), kontroly: 2/60 (3 %); $p=0,040$), viz **Graf 4.2.8**. Četnost výskytu mH47 se statisticky signifikantně lišila v souboru pacientů s adenomem a skupinou kontrol (adenom: 22/90 (24 %), kontroly: 27/69 (45 %); $p=0,009$), viz **Graf 4.2.9**. Statisticky významná diference byla zjištěna v četnosti výskytu mM mezi souborem pacientů s adenomem a skupinou kontrol (adenom: 15/90 (17 %), kontroly: 21/60 (35 %); $p=0,010$), viz **Graf 4.2.10**.

Při prokázané mikrocinogenii byl nejfrekventněji syntetizovaným mikrocinem ve všech zkoumaných skupinách mH47. Ve skupině nemocných s adenomem byl v četnosti výskytu následován mikrocinem V, ve všech ostatních skupinách mikrocinem M, podrobně viz **Tabulka 4.2.5**.

V jednotlivých souborech byly zastoupeny různou mírou bakteriociny působící určitým letálním účinkem na cílovou buňku, viz **Tabulka 4.2.6**. Statisticky signifikantní diference byla nalezena v četnosti výskytu depolarizujících kolicinů mezi skupinou pacientů s idiopatickým střevním zánětem a souborem kontrol (idiopatický střevní zánět: 22/90 (24 %), kontroly: 24/60 (40 %); $p=0,043$), viz **Graf 4.2.11**.

Statisticky významný rozdíl byl zjištěn v četnosti výskytu kolicinů působících inhibici syntézy DNA mezi souborem pacientů s idiopatickým střevním zánětem a souborem pacientů s adenomem (idiopatický střevní zánět: 10/90 (11 %), adenom: 0 %; $p=0,001$), mezi souborem pacientů s idiopatickým střevním zánětem a skupinou pacientů s karcinomem (idiopatický střevní zánět: 10/90 (11 %), karcinom: 1/90 (1 %); $p=0,005$), mezi skupinou pacientů s idiopatickým střevním zánětem a souborem kontrol (idiopatický střevní zánět: 10/90 (11 %), kontroly: 1/60 (2 %); $p=0,030$), viz **Graf 4.2.12**.

Byl nalezen statisticky významný rozdíl v četnosti výskytu kolicinů působících inhibici syntézy RNA mezi skupinou pacientů s idiopatickým střevním zánětem a souborem pacientů s adenomem (idiopatický střevní zánět: 8/90 (9 %), adenom: 1/90 (1 %); $p=0,017$), mezi souborem pacientů s idiopatickým střevním zánětem a souborem pacientů s karcinomem (idiopatický střevní zánět: 8/90 (9 %), karcinom: 0 %; $p=0,004$). Byl pozorován trend ke statisticky významnému rozdílu v četnosti výskytu kolicinů inhibujících syntézu RNA mezi skupinou nemocných s idiopatickým střevním zánětem a souborem kontrol (idiopatický střevní zánět: 8/90 (9 %), kontroly: 1/60 (2 %); $p=0,068$), viz **Graf 4.2.13**.

Nejčastější výskyt kolicinů působících letálně narušením syntézy buněčné stěny (kolicin M) byl identifikován v souboru nemocných s karcinomem, viz **Graf 4.2.7**.

V případě produkce kolicinů jsou v souboru kontrol produkovány koliciny s depolarizujícím účinkem ve 100 %, u pacientů s idiopatickým střevním zánětem v 59 %. Byla zjištěna statisticky významná diference v produkci depolarizujících kolicinů v případě kolicinogenie mezi souborem pacientů s idiopatickým střevním zánětem a souborem kontrol (idiopatický střevní zánět: 22/37 (59 %), kontroly: 24/24 (100 %); $p<0,001$), mezi souborem nemocných s idiopatickým střevním zánětem a souborem pacientů s karcinomem (idiopatický střevní zánět: 22/37 (59 %), karcinom: 33/40 (83 %); $p=0,025$), mezi souborem pacientů s idiopatickým střevním zánětem a skupinou pacientů s adenomem (idiopatický střevní zánět: 22/37 (59 %), adenom 29/31 (94 %); $p=0,001$), mezi souborem kontrol a souborem nemocných s karcinomem (kontroly: 24/24 (100 %), karcinom: 33/40 (83 %); $p=0,030$), viz **Tabulka 4.2.7., Graf 4.2.14**.

Při prokázané kolicinogenii byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl v produkci kolicinů inhibujících syntézu DNA mezi souborem pacientů s idiopatickým střevním zánětem a skupinou pacientů s adenomem (idiopatický střevní zánět: 10/37 (27 %), adenom: 0 %; $p=0,002$), mezi skupinou nemocných s idiopatickým střevním zánětem a souborem nemocných s karcinomem (idiopatický střevní zánět: 10/37 (27 %), karcinom: 1/40 (3 %); $p=0,002$), mezi skupinou pacientů s idiopatickým střevním zánětem a souborem kontrol (idiopatický střevní zánět: 10/37 (27 %), kontroly: 1/24 (4 %); $p=0,023$), viz **Tabulka 4.2.7., Graf 4.2.15**.

V případě produkce kolicinů byl v četnosti zastoupení syntézu RNA inhibujících kolicinů nalezen statisticky významný rozdíl mezi skupinou pacientů s idiopatickým střevním zánětem a souborem pacientů s adenomem (idiopatický střevní zánět: 8/37 (22 %), adenom: 1/31 (3 %); $p=0,026$), mezi skupinou pacientů s idiopatickým střevním zánětem a souborem nemocných s karcinomem (idiopatický střevní zánět: 8/37 (22 %), karcinom: 0 %; $p=0,002$), trend ke statisticky významnému rozdílu byl zjištěn mezi souborem pacientů s idiopatickým střevním zánětem a souborem kontrol (idiopatický střevní zánět: 8/37 (22 %), kontroly: 1/24 (4 %); $p=0,060$), viz **Tabulka 4.2.7., Graf 4.2.16.**

Při prokázané kolicinogenii byla zjištěna statisticky významná diference v produkci kolicinu M mezi skupinou pacientů s karcinomem a souborem nemocných s adenomem (karcinom: 19/40 (48 %), adenom: 4/31 (13 %); $p=0,002$), mezi souborem nemocných s karcinomem a souborem pacientů s idiopatickým střevním zánětem (karcinom: 19/40 (48 %), idiopatický střevní zánět: 5/37 (14 %); $p=0,001$), trend ke statisticky významnému rozdílu byl pozorován mezi skupinou pacientů s karcinomem a souborem kontrol (karcinom: 19/40 (48 %), kontroly: 6/24 (25 %); $p=0,074$), viz **Tabulka 4.2.7., Graf 4.2.17.**

Skupina A kolicinů převažovala nad skupinou kolicinů B v souboru nemocných s idiopatickým střevním zánětem, ve skupině pacientů s adenomem, karcinomem a souboru kontrol převažovala skupina B kolicinů nad skupinou A kolicinů, viz **Tabulka 4.2.2., Graf 4.2.18.**

Skupina mikrocinů I (mB17, mC7, mJ25) byla méně často zastoupena ve srovnání se skupinou mikrocinů II (mV, mM, mH47) ve všech skupinách vyšetřovaných osob, viz **Tabulka 4.2.3., Graf 4.2.19.**

Jednotlivé soubory byly hodnoceny z hlediska počtu produkovaných bakteriocinů v případě prokázané bakteriocinogenie. Nejméně multiprodukčních kmenů bylo zjištěno v souboru pacientů s adenomem, nejvíce v souboru nemocných s idiopatickým střevním zánětem a v souboru kontrol, podrobně viz **Tabulka 4.2.8.** Byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi souborem nemocných s adenomem a skupinou pacientů s idiopatickým střevním zánětem (adenom: 20/58 (34 %), idiopatický střevní zánět: 29/53 (55 %); $p=0,030$), mezi souborem nemocných s adenomem a souborem kontrol (adenom: 20/58 (34 %), kontroly: 22/39 (56 %), $p=0,030$), viz **Graf 4.2.20.** Nejvíce kmenů produkujících 2 koliciny bylo diagnostikováno ve

skupině pacientů s karcinomem, nebyly však zjištěny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými soubory. Nejvyšší četnost monoprodukčních kmenů byla nalezena v souboru pacientů s adenomem; byla zjištěna statisticky významná diference mezi souborem nemocných s adenomem a souborem pacientů s karcinomem (adenom: 15/58 (26 %), karcinom: 7/61 (11 %); $p=0,043$), viz **Graf 4.2.21**.

Při rozdělení skupiny adenomů na nepokročilé a pokročilé byla zjištěna statisticky významná diference v bakteriocinogenii mezi těmito skupinami (nepokročilé neoplázie: 7/18 (39 %), pokročilé neoplázie: 51/71 (72 %); $p=0,010$), **Graf 4.2.22**. Ve skupině pokročilých neoplázií byla kolicinogenie, mikrocinogenie a současná kolicinogenie s mikrocinogenií diagnostikována častěji ve srovnání se souborem nepokročilých neoplázií (podrobně viz **Tabulka 4.2.9**). Genotyp A se častěji vyskytoval ve skupině nemocných s nepokročilým adenomem, genotyp B2 u pacientů s pokročilým adenomem. Mezi souborem pacientů s nepokročilou a pokročilou neoplázií byl pozorován trend ke statisticky významnému rozdílu v četnosti výskytu genotypu B2 *Escherichia coli* (nepokročilá neoplázie: 4/17 (24 %), pokročilá neoplázie: 31/60 (52 %); $p=0,054$), **Graf 4.2.23**.

Pacienty s kolorektálním karcinomem jsme rozdělili na nemocné s nádorem pravého a levého tračníku. Skupinu pacientů s nádorem levého tračníku tvořilo 26 jedinců, 4 nemocní měli kolorektální karcinom lokalizovaný v pravém tračníku. Pacienti s pravostranným karcinomem se v biopticky odebraných vzorcích vyznačovali přítomností mikrocinogenních kmenů *E. coli*, jejichž genotyp patřil do fylogenetické skupiny buď B2 a/nebo D, viz **Tabulka 4.2.10**.

Ve skupině pacientů s kolorektálním karcinomem byla hodnocena závislost bakteriocinogenie na vstupním stagingu nádoru (TNM klasifikace). V naší skupině byli 4 pacienti s nádorem kolorekta diagnostikovaným v I. stádiu, 4 pacienti v II. stádiu, 13 pacientů v III. stádiu a 2 pacienti ve IV. stádiu onemocnění. V sedmi případech nebyl možný staging přesně určit (nejčastějším důvodem byl fakt, že šlo o pacienty s anamnézou karcinomu, který byl primárně řešen v jiném zdravotnickém zařízení). Se zvyšujícím se stádiem onemocnění bylo možné pozorovat rostoucí bakteriocinogenii, kolicinogenii, mikrocinogenii, i současnou kolicinogenii s mikrocinogenií, viz **Tabulka 4.2.11**.

Tabulka 4.2.1.

	Adenom	IBD	Karcinom	Norma
počet kmenů z čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	89/90 (99 %)	88/90 (98 %)	89/90 (99 %)	60/60 (100 %)
bakteriocinogenní kmeny	58/89 (65 %)	53/88 (60 %)	61/89 (69 %)	39/60 (65 %)
kolicinogenní kmeny	31/89 (35 %)	37/88 (42 %)	40/89 (45 %)	24/60 (40 %)
mikrocinogenní kmeny	46/89 (52 %)	42/88 (48 %)	53/89 (60 %)	36/60 (60 %)
kmeny produkující kolicin a mikrocin	19/89 (21 %)	26/88 (30 %)	32/89 (36 %)	21/60 (35 %)
počet <i>E. coli</i> z kmenů <i>Enterobacteriaceae</i>	77/89 (87 %)	87/88 (99 %)	87/89 (98 %)	48/60 (80 %)
<i>E. coli</i> - genotyp A	31/77 (40 %)	43/87 (49 %)	30/87 (34 %)	21/48 (44 %)
<i>E. coli</i> - genotyp B1	19/77 (25 %)	17/87 (20 %)	18/87 (21 %)	12/48 (25 %)
<i>E. coli</i> - genotyp B2	35/77 (45 %)	43/87 (49 %)	41/87 (47 %)	24/48 (50 %)
<i>E. coli</i> - genotyp D	16/77 (21 %)	17/87 (20 %)	24/87 (28 %)	6/48 (13 %)
B2 + mH47 + mM	12/90 (13 %)	21/90 (23 %)	19/90 (21 %)	19/60 (32 %)

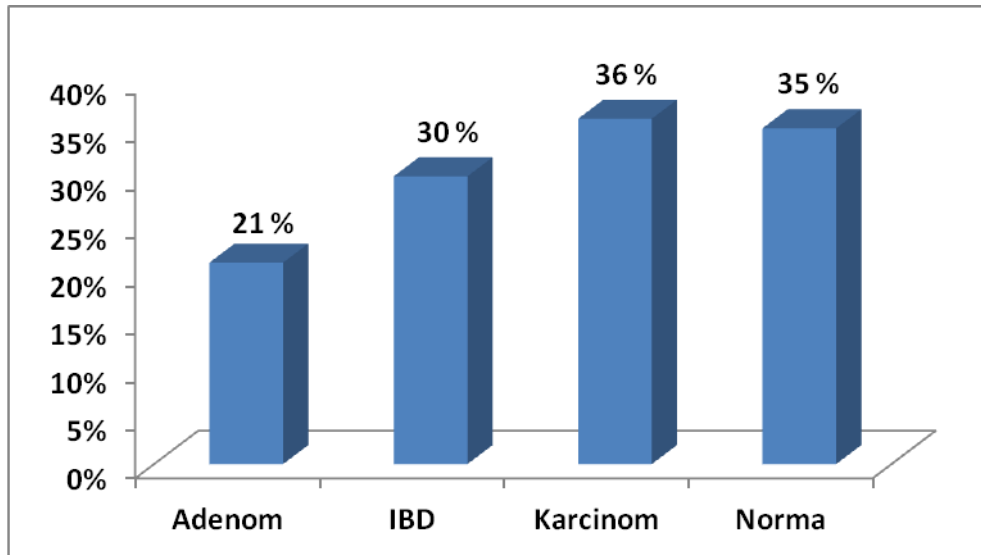
Vysvětlivky:

IBD: idiopatický střevní zánět

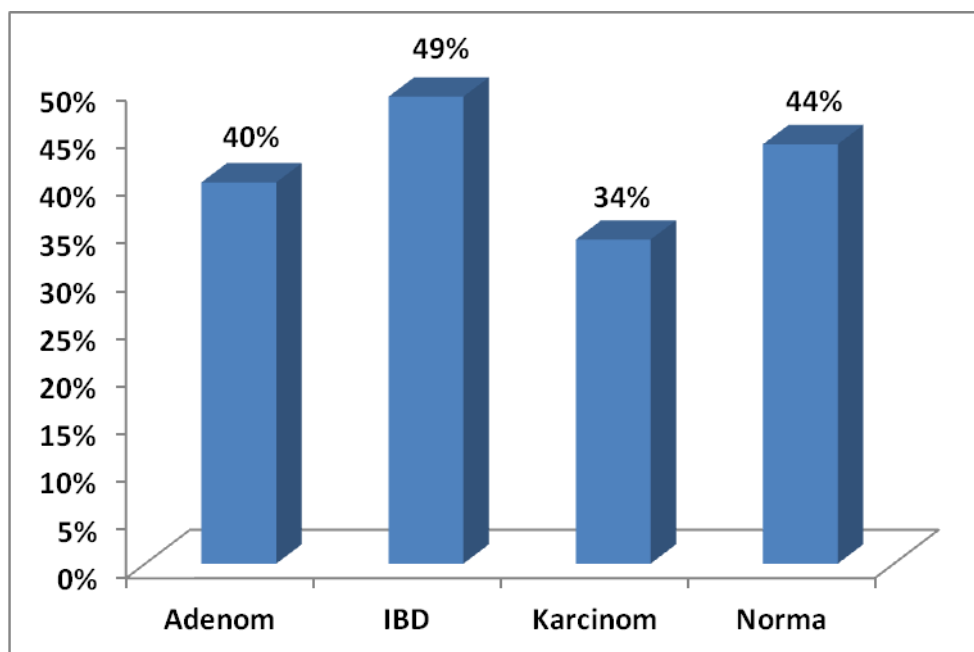
E. coli: *Escherichia coli*

mH47: mikrocin H47, mM: mikrocin M

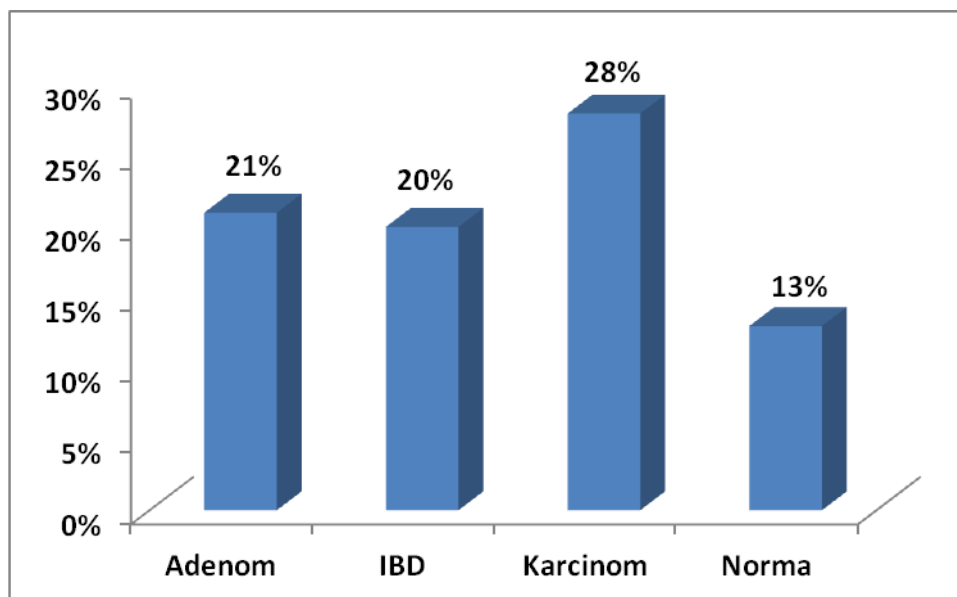
Graf 4.2.1. Srovnání četnosti výskytu současné produkce kolicinů a mikrocinů v jednotlivých souborech. Prokázána statisticky významná diference mezi souborem adenom a souborem karcinom ($p=0,031$).



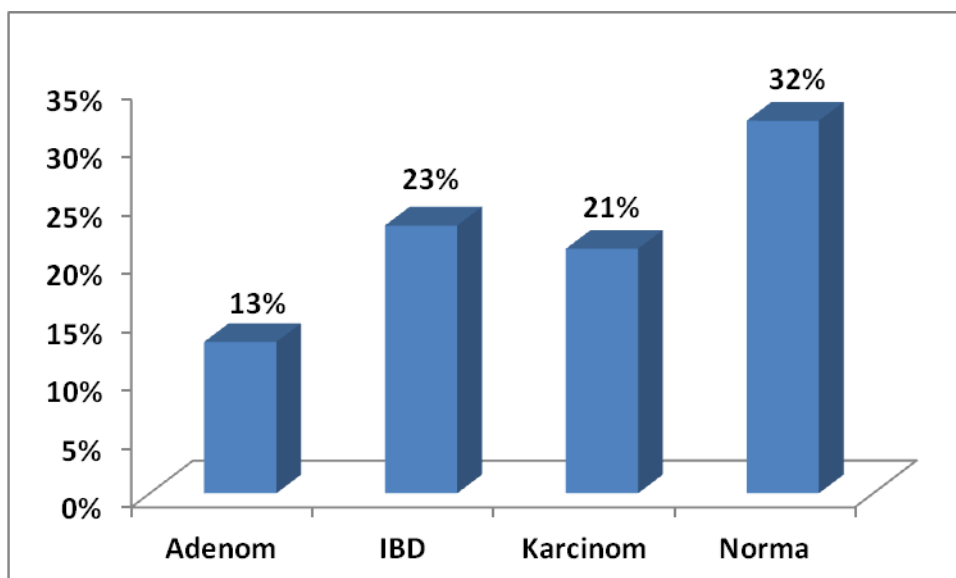
Graf 4.2.2. Srovnání četnosti výskytu genotypu A *Escherichia coli* mezi jednotlivými soubory. Prokázán statisticky významný rozdíl mezi souborem idiopatický střevní zánět (IBD) a souborem karcinom ($p=0,048$).



Graf 4.2.3. Srovnání četnosti výskytu genotypu D *Escherichia coli* mezi jednotlivými soubory. Prokázán statisticky významný rozdíl mezi souborem karcinom a skupinou kontrol ($p=0,044$).



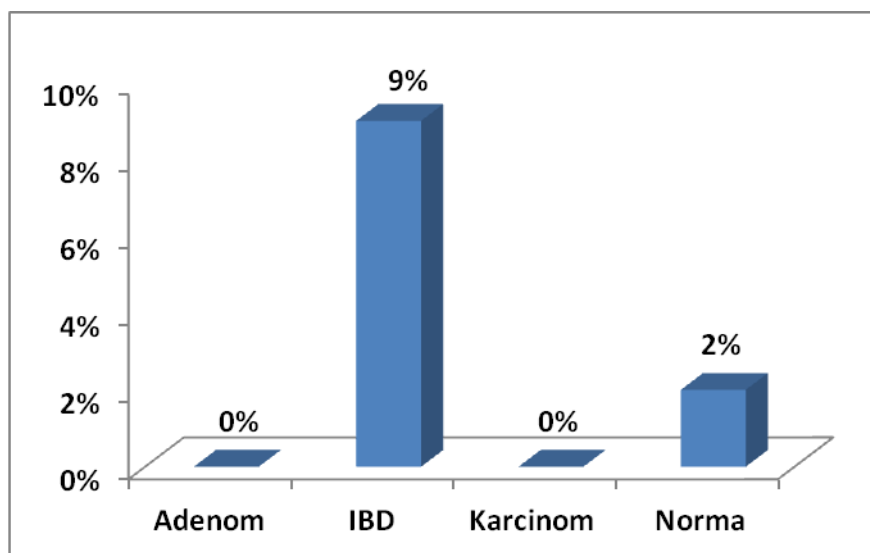
Graf 4.2.4. Srovnání četnosti výskytu kombinace genotypu B2 *E. coli* a současné produkce mH47 a mM v jednotlivých souborech. Prokázána statisticky významná diference mezi souborem adenom a souborem kontroly ($p=0,006$).



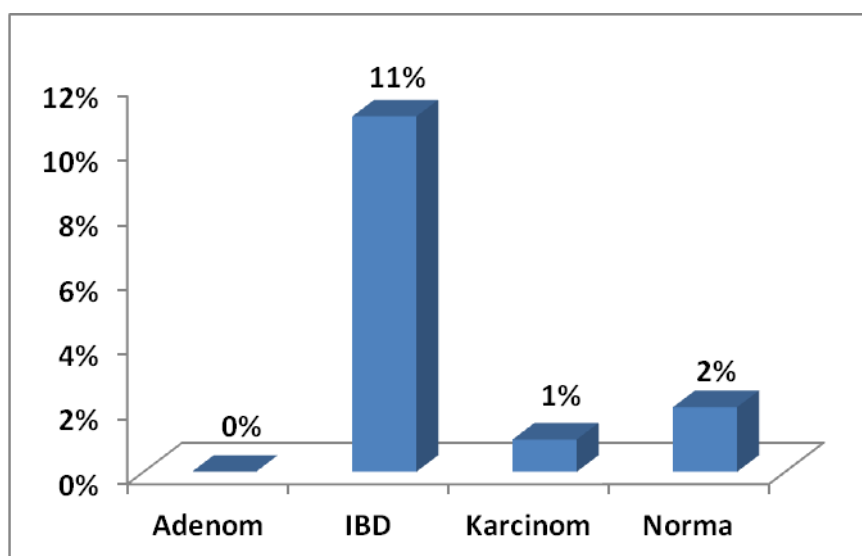
Tabulka 4.2.2. Zastoupení jednotlivých kolicinů v souboru; rozdělení na A a B koliciny (žlutě vyznačeny koliciny skupiny B)

Typ kolicinu	Adenom	IBD	Karcinom	Norma
la	23/90 (26 %)	17/90 (19 %)	20/90 (22 %)	12/60 (20 %)
lb	13/90 (14 %)	9/90 (10 %)	7/90 (8 %)	10/60 (17 %)
E1	8/90 (9 %)	8/90 (9 %)	13/90 (14 %)	9/60 (15 %)
E2	0	8/90 (9 %)	0	1/60 (2 %)
E3	0	2/90 (2 %)	0	0
E4	0	8/90 (9 %)	0	1/60 (2 %)
E5	0	2/90 (2 %)	0	0
E6	0	8/90 (9 %)	0	1/60 (2 %)
E7	0	10/90 (11 %)	1/90 (1 %)	1/60 (2 %)
E8	0	1/90 (1 %)	0	0
M	4/90 (4 %)	5/90 (6 %)	19/90 (21 %)	6/60 (10 %)
B	4/90 (4 %)	0	8/90 (9 %)	6/60 (10 %)
N	2/90 (2 %)	0	0	0
U	2/90 (2 %)	0	0	0
D	1/90 (1 %)	0	0	0
S4	3/90 (3 %)	0	1/90 (1 %)	2/60 (3 %)
K	0	0	4/90 (4 %)	0

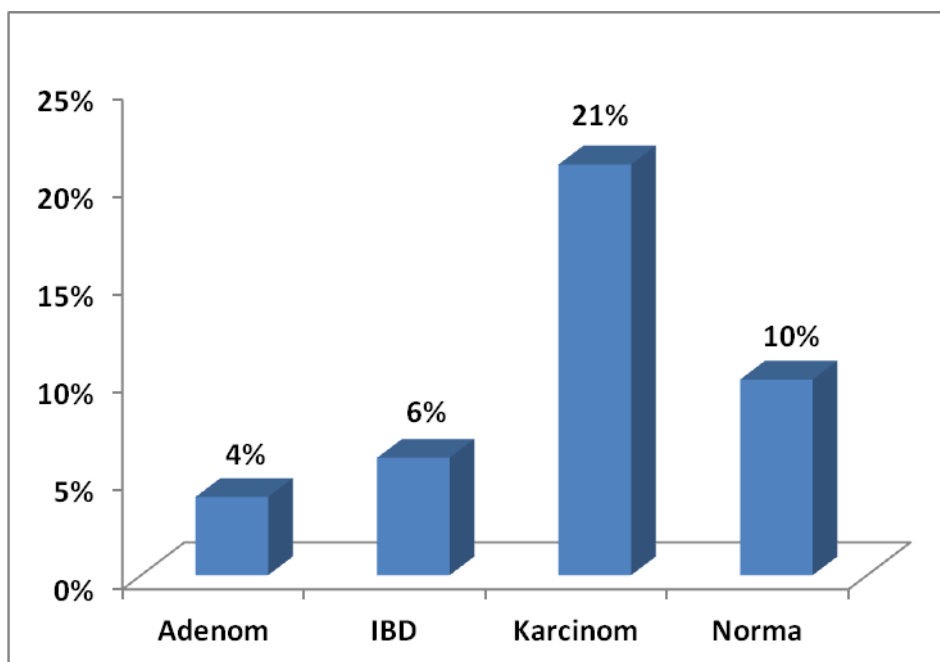
Graf 4.2.5. Srovnání četnosti výskytu kolicinu E2,4,6 mezi jednotlivými soubory. Prokázána statisticky významná diference mezi souborem idiopatický střevní zánět (IBD) a souborem adenom ($p=0,004$), mezi souborem idiopatický střevní zánět a souborem karcinom ($p=0,004$). Trend ke statisticky významnému rozdílu byl pozorován mezi souborem pacientů idiopatický střevní zánět a souborem kontroly ($p=0,070$).



Graf 4.2.6. Srovnání četnosti výskytu kolicinu E7 mezi jednotlivými soubory. Prokázána statisticky významná diference mezi souborem idiopatický střevní zánět (IBD) a souborem adenom ($p=0,001$), mezi souborem idiopatický střevní zánět a souborem karcinom ($p=0,005$), mezi souborem idiopatický střevní zánět a souborem kontroly ($p=0,030$).



Graf 4.2.7. Srovnání četnosti výskytu kolicinu M mezi jednotlivými soubory. Prokázána statisticky významná diference mezi souborem karcinom a souborem adenom ($p=0,001$), mezi souborem karcinom a souborem idiopatický střevní zánět (IBD) ($p=0,002$). Trend ke statisticky významnému rozdílu byl pozorován mezi skupinou karcinom a souborem kontroly ($p=0,070$).



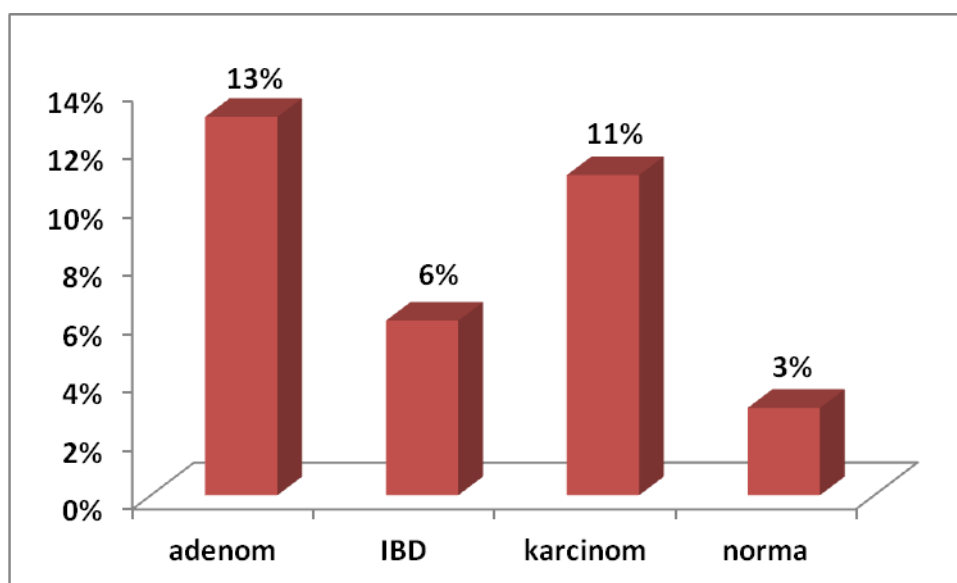
Tabulka 4.2.3. Zastoupení kolicinů se vztahem ke kolicinogenii v jednotlivých souborech (žlutě vyznačeny nejčastěji produkované koliciny)

Typ kolicinu	Adenom	IBD	Karcinom	Norma
la	23/31 (74 %)	17/37 (46 %)	20/40 (50 %)	12/24 (50 %)
lb	13/31 (42 %)	9/37 (24 %)	7/40 (18 %)	10/24 (42 %)
E1	8/31 (26 %)	8/37 (22 %)	13/40 (33 %)	9/24 (38 %)
E2	0	8/37 (22 %)	0	1/24 (4 %)
E3	0	2/37 (5 %)	0	0
E4	0	8/37 (22 %)	0	1/24 (4 %)
E5	0	2/37 (5 %)	0	0
E6	0	8/37 (22 %)	0	1/24 (4 %)
E7	0	10/37 (27 %)	1/40 (3 %)	1/24 (4 %)
E8	0	1/37 (3 %)	0	0
M	4/31 (13 %)	5/37 (14 %)	19/40 (48 %)	6/24 (25 %)
B	4/31 (13 %)	0	8/40 (20 %)	6/24 (25 %)
N	2/31 (6 %)	0	0	0
U	2/31 (6 %)	0	0	0
D	1/31 (3 %)	0	0	0
S4	3/31 (10 %)	0	1/40 (3 %)	2/24 (8 %)
K	0	0	4/40 (10 %)	0

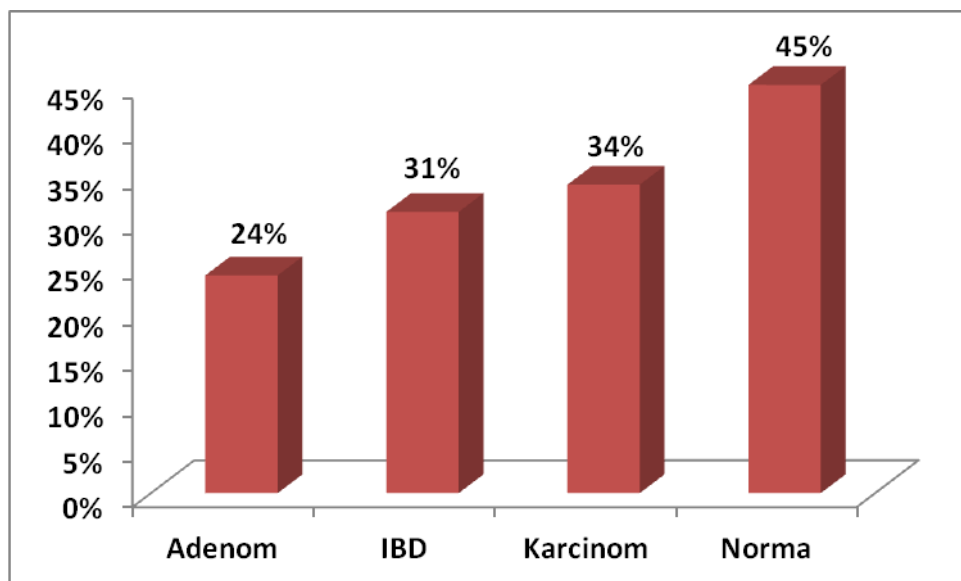
Tabulka 4.2.4. Zastoupení jednotlivých mikrocinů v souboru; rozdělení na mikrocinny skupiny I a II (žlutě vyznačeny mikrocinny skupiny II)

Typ mikrocinu	Adenom	IBD	Karcinom	Norma
B17	12/90 (13 %)	5/90 (6 %)	10/90 (11 %)	2/60 (3 %)
H47	22/90 (24 %)	28/90 (31 %)	31/90 (34 %)	27/60 (45 %)
mM	15/90 (17 %)	25/90 (28 %)	22/90 (24 %)	21/60 (35 %)
mV	17/90 (19 %)	10/90 (11 %)	15/90 (17 %)	13/60 (22 %)
C7	0	1/90 (1 %)	2/90 (2 %)	1/60 (2 %)
J25	2/90 (2 %)	0	0	0

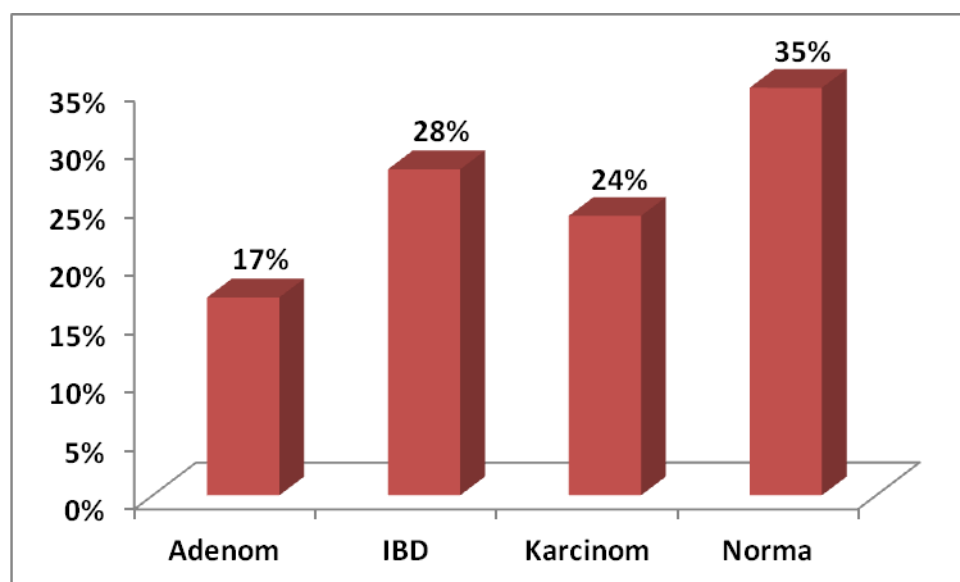
Graf 4.2.8. Srovnání četnosti výskytu mikrocinu B17 mezi jednotlivými soubory. Prokázána statisticky významná diference mezi souborem adenom a souborem kontroly ($p=0,040$).



Graf 4.2.9. Srovnání četnosti výskytu mikrocinu H47 mezi jednotlivými soubory. Prokázána statisticky významná diference mezi souborem adenom a souborem kontroly ($p=0,009$).



Graf 4.2.10. Srovnání četnosti výskytu mikrocinu M mezi jednotlivými soubory. Prokázána statisticky významná diference mezi souborem adenom a souborem kontroly ($p=0,010$).



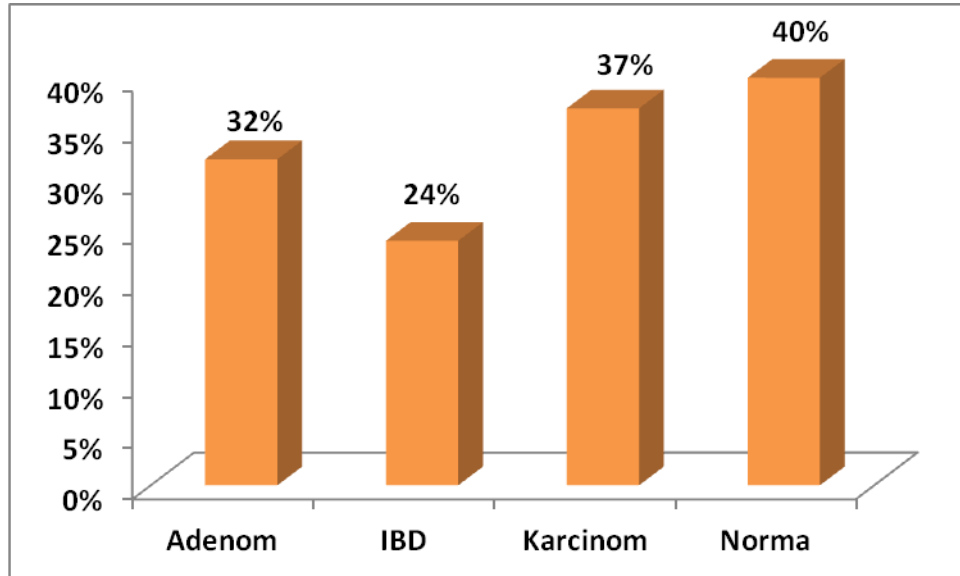
Tabulka 4.2.5. Zastoupení mikrocinů ve vztahu k mikrocinogenii v jednotlivých souborech (žlutě vyznačeny nejčastěji produkované mikrocinogeny)

Typ mikrocinu	Adenom	IBD	Karcinom	Norma
B17	12/46 (26 %)	5/42 (12 %)	10/53 (19 %)	2/36 (6 %)
H47	22/46 (48 %)	28/42 (67 %)	31/53 (59 %)	27/36 (75 %)
mM	15/46 (33 %)	25/42 (60 %)	22/53 (42 %)	21/36 (58 %)
mV	17/46 (37 %)	10/42 (24 %)	15/53 (28 %)	13/36 (36 %)
C7	0	1/42 (2 %)	2/53 (4 %)	1/36 (3 %)
J25	2/46 (4 %)	0	0	0

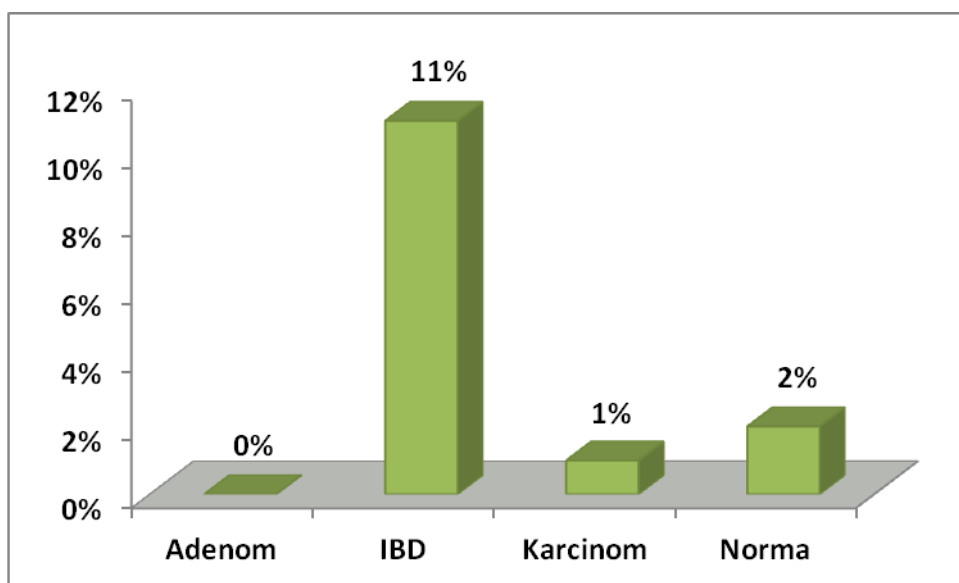
Tabulka 4.2.6. Mechanismus účinku působení bakteriocinů (zastoupení v jednotlivých souborech)

Mechanismus účinku bakteriocinů	Adenom	IBD	Karcinom	Norma
tvorba pórů	29/90 (32 %)	22/90 (24 %)	33/90 (37 %)	24/60 (40 %)
inhibice syntézy DNA	0	10/90 (11 %)	1/90 (1 %)	1/60 (2 %)
inhibice syntézy RNA	1/90 (1 %)	8/90 (9 %)	0	1/60 (2 %)
narušení syntézy buněčné stěny	4/90 (4 %)	5/90 (6 %)	19/90 (21 %)	6/60 (10 %)
mikrocinový mechanismus	46/90 (51 %)	41/90 (46 %)	53/90 (59 %)	36/60 (60 %)

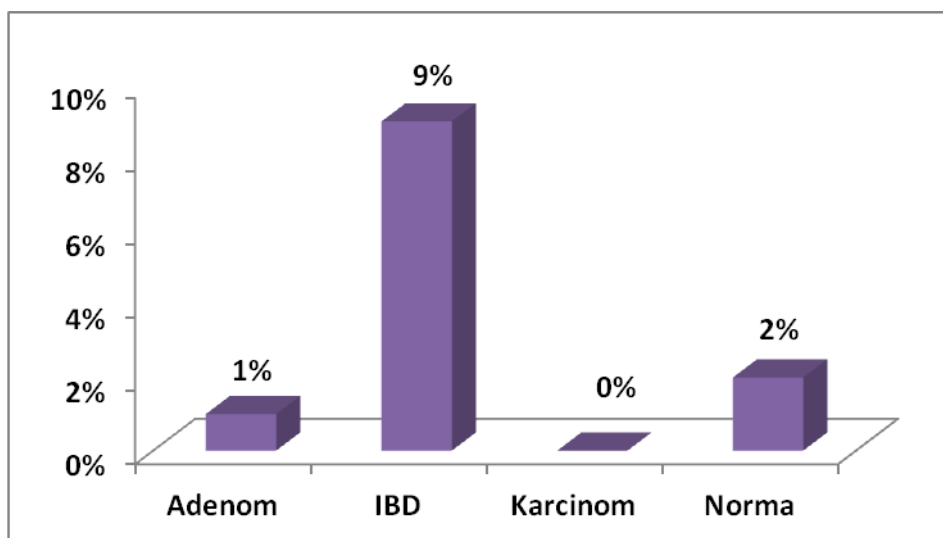
Graf 4.2.11. Srovnání četnosti výskytu depolarizujících kolicinů v jednotlivých souborech. Prokázána statisticky významná diference mezi souborem idiopatický střevní zánět (IBD) a souborem kontroly ($p=0,043$).



Graf 4.2.12. Srovnání četnosti výskytu kolicinů působících letálně inhibicí syntézy DNA v jednotlivých souborech. Prokázána statisticky významná diference mezi souborem idiopatický střevní zánět (IBD) a souborem adenom ($p=0,001$), mezi souborem idiopatický střevní zánět a souborem karcinom ($p=0,005$), mezi souborem idiopatický střevní zánět a skupinou kontrol ($p=0,030$).



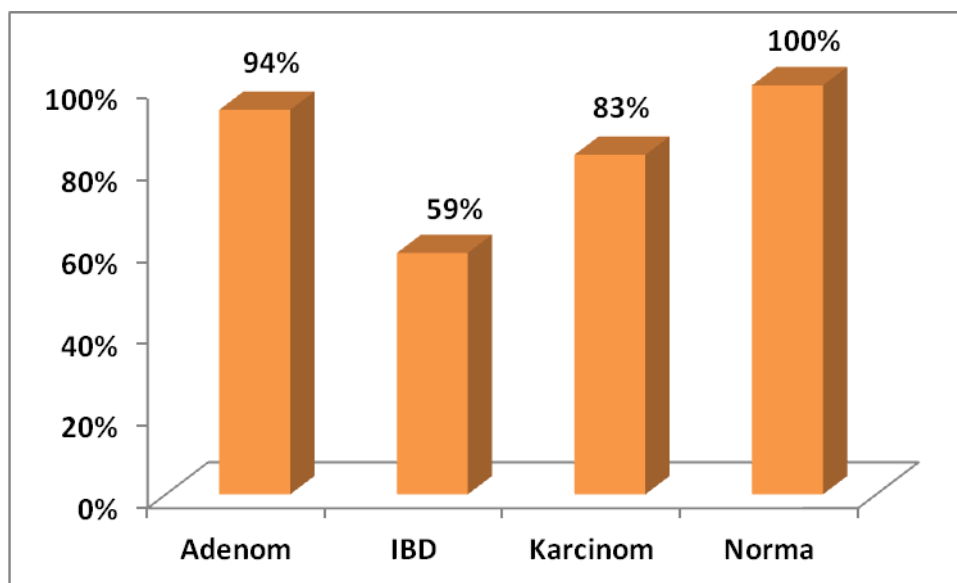
Graf 4.2.13. Srovnání četnosti výskytu kolicinů působících letálně inhibicí syntézy RNA v jednotlivých souborech. Prokázána statisticky významná diference mezi souborem idiopatický střevní zánět (IBD) a souborem adenom ($p=0,017$), mezi souborem idiopatický střevní zánět a souborem karcinom ($p=0,004$). Pozorován trend ke statisticky významnému rozdílu mezi souborem idiopatický střevní zánět a skupinou kontrol ($p=0,068$).



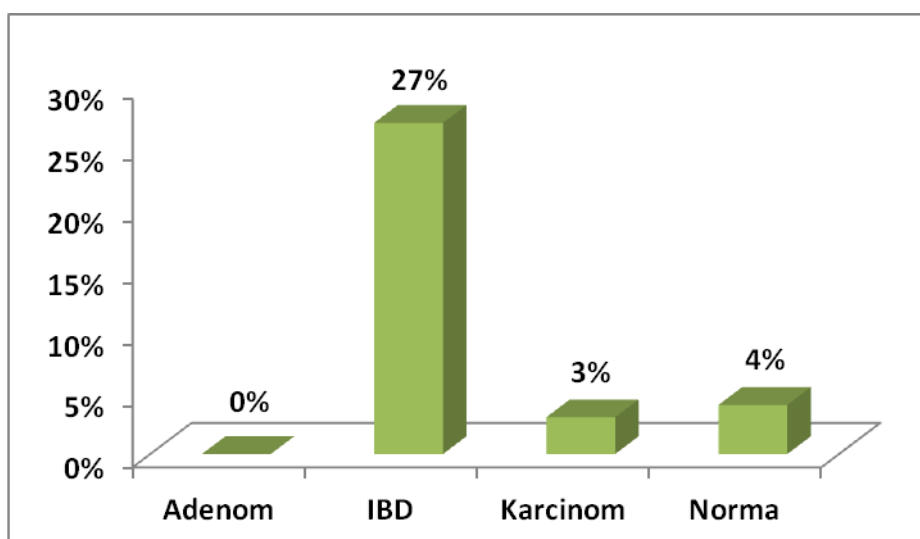
Tabulka 4.2.7. Mechanismus účinku působení kolicinů; zastoupení ve vztahu ke kolicinogenii v jednotlivých souborech

Mechanismus účinku bakteriocinů	Adenom	IBD	Karcinom	Norma
tvorba pórů	29/31 (94 %)	22/37 (59 %)	33/40 (83 %)	24/24 (100 %)
inhibice syntézy DNA	0	10/37 (27 %)	1/40 (3 %)	1/24 (4 %)
inhibice syntézy RNA	1/31 (3 %)	8/37 (22 %)	0	1/24 (4 %)
narušení syntézy buněčné stěny	4/31 (13 %)	5/37 (14 %)	19/40 (48 %)	6/24 (25 %)

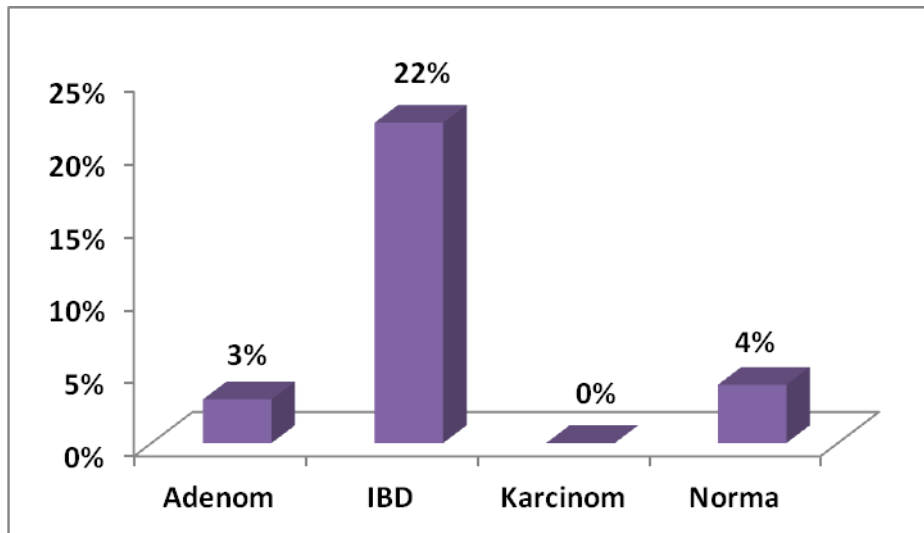
Graf 4.2.14. Srovnání četnosti výskytu depolarizujících kolicinů se vztahem ke kolicinogenii v jednotlivých souborech. Prokázána statisticky významná diference mezi souborem idiopatický střevní zánět (IBD) a souborem adenom ($p=0,001$), mezi souborem idiopatický střevní zánět a souborem karcinom ($p=0,025$), mezi souborem idiopatický střevní zánět a souborem kontroly ($p<0,001$), mezi souborem karcinom a skupinou kontroly ($p=0,030$).



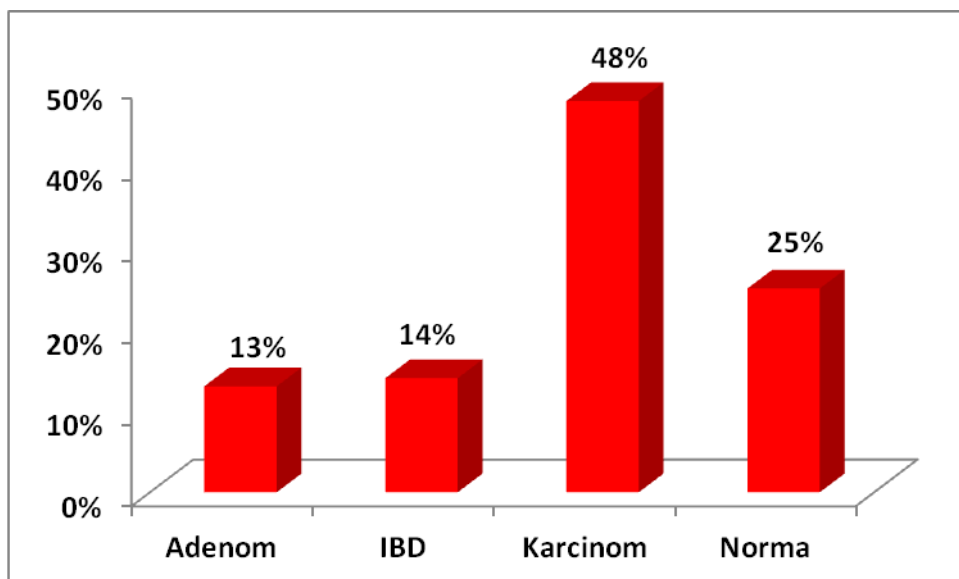
Graf 4.2.15. Srovnání četnosti výskytu kolicinů inhibujících syntézu DNA se vztahem ke kolicinogenii v jednotlivých souborech. Prokázána statisticky významná diference mezi souborem idiopatický střevní zánět (IBD) a souborem adenom ($p=0,002$), mezi souborem idiopatický střevní zánět a souborem karcinom ($p=0,002$), mezi souborem idiopatický střevní zánět a souborem kontroly ($p=0,023$).



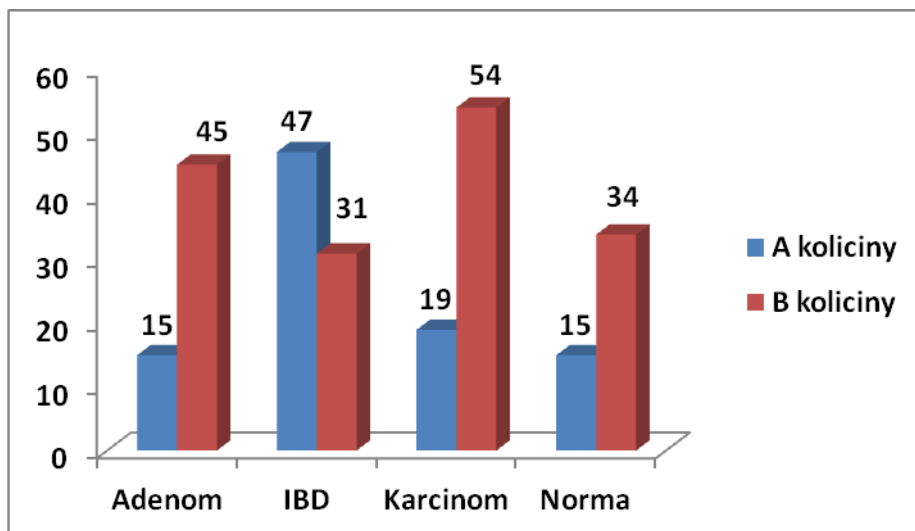
Graf 4.2.16. Srovnání četnosti výskytu kolicinů inhibujících syntézu RNA se vztahem ke kolicinogenii v jednotlivých souborech. Prokázán statisticky významný rozdíl mezi souborem idiopatický střevní zánět (IBD) a souborem adenom ($p=0,026$), mezi souborem idiopatický střevní zánět a souborem karcinom ($p=0,002$). Pozorován trend ke statisticky signifikantní diferencii mezi souborem idiopatický střevní zánět a souborem kontroly ($p=0,060$).



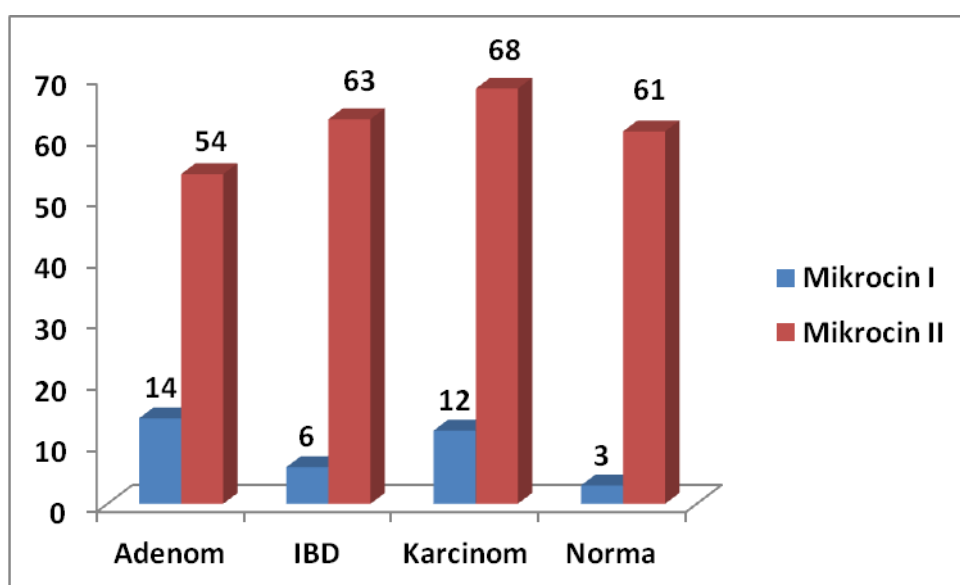
Graf 4.2.17. Srovnání četnosti výskytu kolicinů inhibujících syntézu buněčné stěny se vztahem ke kolicinogenii v jednotlivých souborech. Prokázán statisticky významný rozdíl mezi souborem karcinom a souborem adenom ($p=0,002$), mezi souborem karcinom a souborem idiopatický střevní zánět (IBD) ($p=0,001$). Pozorován trend ke statisticky významné diferencii mezi souborem karcinom a souborem kontroly ($p=0,074$).



Graf 4.2.18. Znázornění absolutního počtu identifikovaných kolicinů z A a B skupiny kolicinů v jednotlivých souborech (ve skupině adenom, idiopatický střevní zánět (IBD), karcinom vždy 30 pacientů, 90 bioptických vzorků; v souboru kontrol 20 osob, 60 bioptických vzorků).



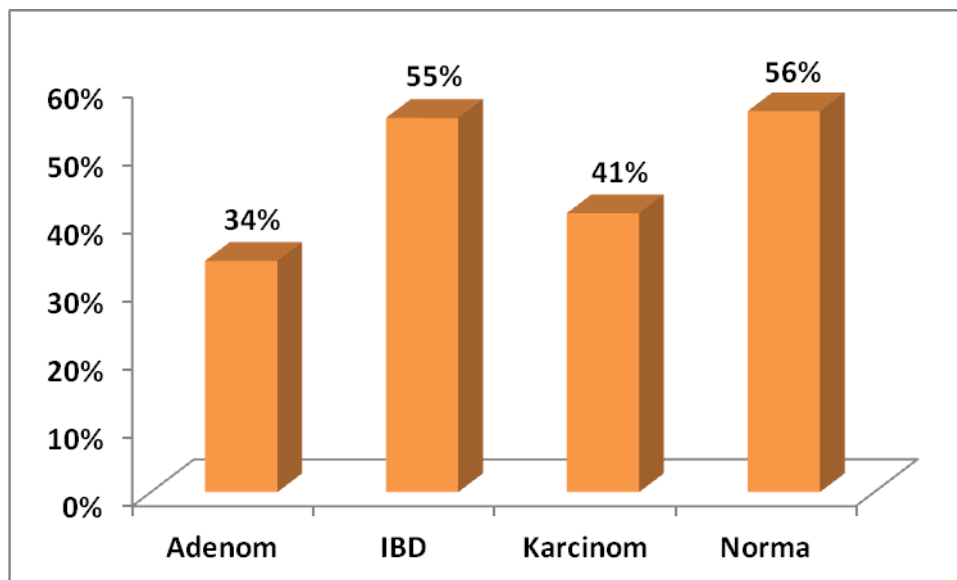
Graf 4.2.19. Znázornění absolutního počtu identifikovaných mikrocinů skupiny I a II v jednotlivých souborech (ve skupině adenom, idiopatický střevní zánět (IBD), karcinom vždy 30 pacientů, 90 bioptických vzorků; v souboru kontrol 20 osob, 60 bioptických vzorků).



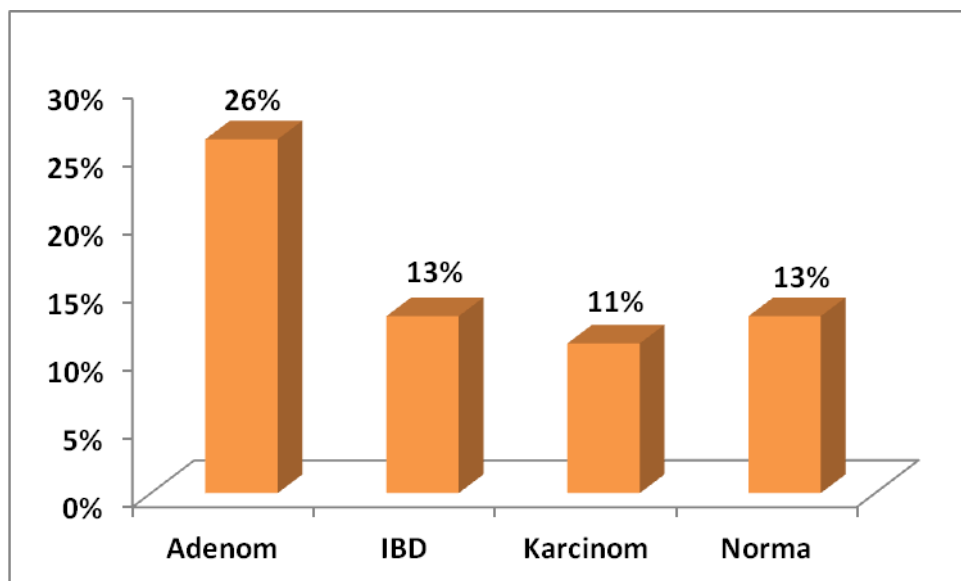
Tabulka 4.2.8. Rozdělení jednotlivých souborů podle počtu produkovaných bakteriocinů v případě prokázané bakteriocinogenie

Počet bakteriocinů	Adenom	IBD	Karcinom	Norma
> 2	20/58 (34 %)	29/53 (55 %)	25/61 (41 %)	22/39 (56 %)
2	23/58 (40 %)	17/53 (32 %)	29/61 (48 %)	12/39 (31 %)
1	15/58 (26 %)	7/53 (13 %)	7/61 (11 %)	5/39 (13 %)

Graf 4.2.20. Zastoupení multiprodukčních kmenů v jednotlivých souborech. Nalezen statisticky významný rozdíl mezi souborem adenom a skupinou idiopatický střevní zánět (IBD) ($p=0,030$), mezi souborem adenom a souborem kontroly ($p=0,030$).



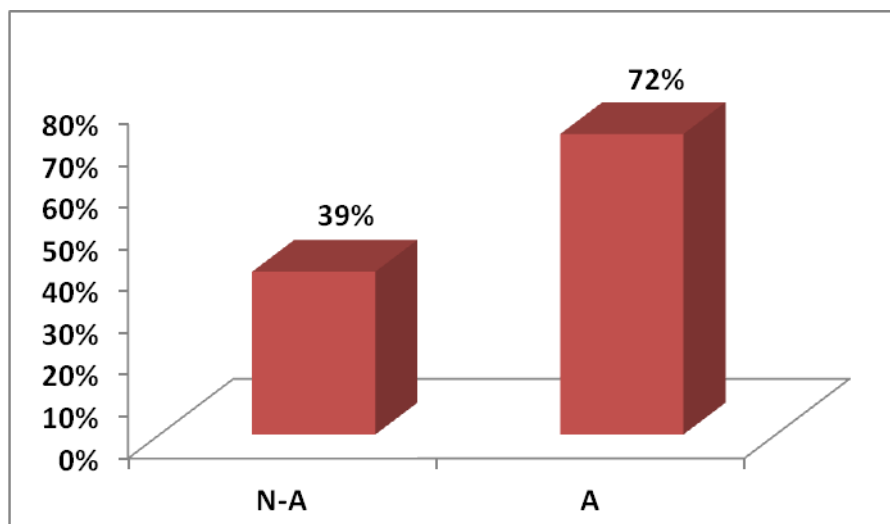
Graf 4.2.21. Zastoupení monoprodukčních kmenů v jednotlivých souborech. Zjištěna statisticky významná diference mezi souborem adenom a souborem karcinom ($p=0,043$).



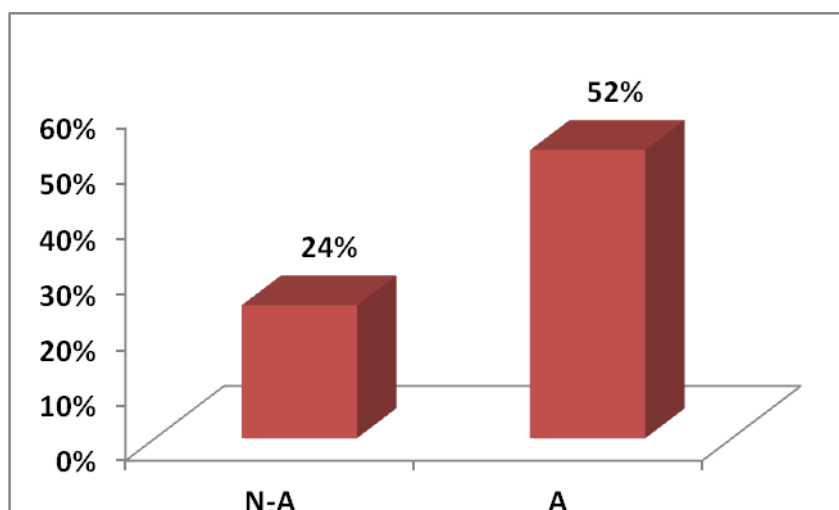
Tabulka 4.2.9. Rozdělení souboru pacientů s adenomem podle pokročilosti neoplázie na nepokročilý a pokročilý adenom

	Nepokročilý adenom	Pokročilý adenom
počet kmenů z čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	18/18 (100 %)	71/72 (99 %)
bakteriocinogenní kmeny	7/18 (39 %)	51/71 (72 %)
kolicinogenní kmeny	3/18 (17 %)	28/71 (39 %)
mikrocínogenní kmeny	7/18 (39 %)	39/71 (55 %)
kmeny produkující kolicin a mikrocín	3/18 (17 %)	16/71 (23 %)
počet <i>E. coli</i> z kmenů <i>Enterobacteriaceae</i>	17/18 (94 %)	60/71 (85 %)
<i>E. coli</i> - genotyp A	9/17 (53 %)	22/60 (37 %)
<i>E. coli</i> - genotyp B1	2/17 (12 %)	17/60 (28 %)
<i>E. coli</i> - genotyp B2	4/17 (24 %)	31/60 (52 %)
<i>E. coli</i> - genotyp D	3/17 (18 %)	13/60 (22 %)

Graf 4.2.22. Bakteriocinogenie v souboru pacientů s nepokročilým adenomem (N-A, non-advanced) a pokročilým (A, advanced) adenomem. Zjištěna statisticky významná diference mezi těmito soubory ($p=0,010$).



Graf 4.2.23. Četnost výskytu genotypu B2 u pacientů s nepokročilým (N-A) adenomem a pokročilým (A) adenomem. Zjištěn trend ke statisticky významné diferenci mezi soubory ($p=0,054$).



Tabulka 4.2.10. Pacienti s kolorektálním karcinomem lokalizovaným v pravé (P) části tračníku. Ve všech biopsiích vykultivovány mikrocinogenní kmeny *Escherichia coli* s genotypem B2 a/nebo genotypem D (červeně vyznačen v pořadí druhý v rámci biopsie vykultivovaný kmen *E. coli*).

Karcinom	Lokalizace	Genotyp	Bakteriocin	Kolicin	Mikrocin
1	P	B2, B2	ano	ne	H47, mM
	P	B2, B2	ano	ne	H47, mM; H47, mM
	P	B2, B2	ano	ne	H47, mM
2	P	B2, B2	ano	la, la	mV, mV
	P	B2	ano	la	mV
	P	B2	ano	la	mV
3	P	D	ano	ne	mV
	P	B1, D	ano	B, E1, M	mV, mV
	P	D	ano	ne	mV
4	P	B2, D	ano	ne	H47, mM
	P	B2, D	ano	ne	H47, mM
	P	B2, D	ano	ne	H47, mM

Tabulka 4.2.11. Rozdělení pacientů podle vstupního stadiu kolorektálního karcinomu: v závislosti na rostoucím stadiu patrný trend ke stoupající bakteriocinogenii, kolicinogenii, mikrocinogenii a současné kolicinogenii s mikrocinogenií (vyznačeno žlutě).

Staging (TNM klasifikace)	I	II	III	IV
počet kmenů z čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	12/12 (100 %)	12/12 (100 %)	38/39 (97 %)	6/6 (100 %)
bakteriocinogenní kmeny	6/12 (50 %)	10/12 (83 %)	26/38 (68 %)	6/6 (100 %)
kolicinogenní kmeny	3/12 (25 %)	4/12 (33 %)	20/38 (53 %)	4/6 (67 %)
mikrocinogenní kmeny	5/12 (42 %)	8/12 (67 %)	24/38 (63 %)	6/6 (100 %)
kmeny produkující kolicin a mikrocin	2/12 (17 %)	2/12 (17 %)	18/38 (47 %)	4/6 (67 %)
počet <i>E. coli</i> z kmenů <i>Enterobacteriaceae</i>	12/12 (100 %)	12/12 (100 %)	38/38 (100 %)	6/6 (100 %)
<i>E. coli</i> - genotyp A	7/12 (58 %)	3/12 (25 %)	15/38 (39 %)	3/6 (50 %)
<i>E. coli</i> - genotyp B1	2/12 (17 %)	3/12 (25 %)	8/38 (21 %)	3/6 (50 %)
<i>E. coli</i> - genotyp B2	5/12 (42 %)	11/12 (92 %)	15/38 (39 %)	0%
<i>E. coli</i> - genotyp D	3/12 (25 %)	4/12 (33 %)	8/38 (21 %)	3/6 (50 %)

4.3. Diskuse

Escherichia coli je gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie. Byla objevena v roce 1885 Theodorem Escherichem, německým pediatrem a bakteriologem [261]. Je zařazována do čeledi *Enterobacteriaceae*. Tato čeleď se vyznačuje nejhojnějším a nejrozmanitějším bakteriálním obranným systémem vůbec [238, 239]. Mikrobiota obecně disponují možností produkce různých obranných látek: klasických antibiotik, lytických agens, nejrůznějších typů exotoxinů; čeleď *Enterobacteriaceae* se navíc vyznačuje unikátní produkcí bakteriocinů [240]. Pro kultivaci bakterií z této čeledi je optimální v naší studii použitý krevní agar (základní médium; umožňuje odečítat případnou hemolytickou aktivitu bakterií), desoxycholátový a MacConkeyův agar (oba inhibují růst grampozitivních bakterií a naopak usnadňují růst gramnegativních bakterií). *Escherichia coli* je fascinující bakterie, která se vyskytuje v mnoha genotypech. Právě variabilita fenotypu a jeho uplatnění se při interakci se sliznicí tlustého střeva lidského makroorganismu může vést ke vzniku infekčního onemocnění, ale i neinfekční patologie v tračníku. *Escherichia coli* a další bakterie z této čeledi jsou typické svou produkcí bakteriocinů: kolicinů, mikrocinů, pyocinů, pediocinů, které působí antibioticky proti blízkce příbuzným druhům z čeledi *Enterobacteriaceae*. Bakteriocinogenie umožňuje zvýšení mikrobiální a genetické diverzity v populacích jednotlivých mikrobů [238, 327]. Bakteriociny jsou kódovány plazmidy, výjimečně chromozomálně (některé mikrocin, např. mH47). Syntéza kolicinů je kódována 3 geny (gen pro samotný kolicin, gen pro imunitní protein a gen pro sekreci kolicinu). Mikrocin jsou kódovány komplexněji (například mikrocin B17 je kódován 7 geny – čtyřmi kódujícími antibiotickou aktivitu, dvěma určenými pro sekreci mikrocinu a jedním kódujícím imunitní protein) [153]. Možnost lineárního přenosu genetické informace nahrává zmíněné mikrobiální a genetické diverzitě [237]. Zvláštní je například fakt, že se kolicin Ia vyskytuje spolu s mikrocinem V podstatně častěji, než by se předpokládalo. Důvodem je, že pokud se tyto dva bakteriociny vyskytují současně, pak jsou kódovány jedním konjugačním plazmidem [133].

Bakteriociny mají antibakteriální efekt, mnohé z nich se vyznačují i účinkem anti-neoplastickým [45, 104].

Výzkum bakteriocinů probíhá již téměř 100 let, první publikaci uveřejnil Gratia v roce 1925 [87]. Bakteriocinogenotypizace je dnes posuzována nejen na základě hodnocení přítomnosti a velikosti inhibičních zón růstu indikátorového kmene (pokud je k bakteriocinu zkoumaného kmene citlivý), ale i pomocí metod PCR. Těmi se dá obejít např. senzitivita (rozkládání)

mikrocinu M a mH47 k aplikovanému chloroformu (inhibiční zóny růstu byly v minulosti falešně negativní). Senzitivita i specifická PCR metod je vysoká, díky používaným primerům (určeným ke stanovení bakteriocinogenie a sloužících k zařazení *Escherichia coli* do fylogenetických skupin) lze očekávat i vysokou specifitu PCR metod.

Antibakteriální účinek kolicinů předpokládá jeden z následujících letálních mechanismů: tvorbu pórů v membráně cílové buňky, degradaci DNA, degradaci 16S RNA / tRNA nebo inhibici syntézy peptidoglykanu. Pouze dva bakteriociny – kolicin M a pesticin působí čtvrtým zmíněným mechanismem [7, 21]. Dlouho se předpokládalo, že kolicin M působí letálně pomocí interference s biosyntézou peptidoglykanu. Nyní bylo upřesněno, že kolicin M je enzymem, který hydrolyzuje vazbu peptidoglykanového lipidového intermediátoru II, proto nemůže dojít k syntéze peptidoglykanu a buňka hyne [304].

Mikrociny jsou baktericidní peptidy o malé molekulové hmotnosti (<10 kDa). Jsou produkovány bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae* v podmínkách, kdy jsou limitovány zdroje esenciálních živin [180]. Doposud bylo objeveno 14 mikrocinů, avšak pouze 7 z nich bylo izolováno a charakterizováno [68]. Díky tomu, že různé mikrocin působí různým letálním účinkem a jednotlivé mikrocin nesdílejí homologní strukturu, stávají se nečekaným nástrojem, jak eliminovat sobě příbuzné bakterie, které kompetují o identické nutriční substráty [229]. Mechanismus účinku mikrocinů je někdy připodobňován „Trojskému koni“. Vysvětlením je fakt, že struktura mikrocinu je natolik podobná esenciálním nutrientům, že cílová buňka mikrocin neidentifikuje jako patologický, a nebo je mikrocin secernován ve formě „neškodlivé“ molekuly a patologickým se stává během dalších posttranslačních procesů až v cílové buňce (kde se váže na esenciální enzymy nebo formuje póry v membráně) [69]. Některé koliciny a mikrocin si jsou strukturálně i funkčně podobné – například mE492 je strukturou podobný kolicinu V a stejně jako on formuje póry [219].

Pyociny jsou bakteriociny produkováné bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Více než 90 % kmenů *Pseudomonas aeruginosa* produkuje některý (někdy více typů) z pyocinů. Jsou popsány 3 druhy pyocinů (působí letálně formací pórů, nebo mají nukleasovou (DNA / RNA) aktivitu). R a F typy pyocinů produkuje 90 % *Pseudomonas*, S typ bakteriocinu produkuje 70 % *Pseudomonas* [45, 182].

Pediocin je produkován druhem *Pediococcus acidilactici*. Má výbornou antibakteriální aktivitu vůči *Listeria monocytogenes* [45].

Materiálem, který byl postoupen kultivaci a následnému stanovení bakteriocinogenie, byla doposud ve všech studiích stolice či anální výtěr. V našem projektu jsme zvolili nový přístup, naším výchozím materiálem byl bioptický vzorek sliznice tlustého střeva. Biopsie byla prováděna ve třech etážích kolorekta (cékum – transversum – rektum). Každý jednotlivý vzorek byl v průběhu koloskopie odebírán sterilními endoskopickými klíšťkami. Výsledky se intraindividuálně v zastoupení bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* a v bakteriocinogenii ve většině případů nelišily. Lze tedy konstatovat, že během odběru nedochází v kanálu endoskopu ke kontaminaci vzorku dalšími bakteriemi. Dále lze souhlasit s prací Lyry et al., že samotné mikrobiální zastoupení se v rámci levého a pravého tračníku neliší. Anna Lyra se spolupracovníky publikovala studii, ve které byly v endoskopicky a histologicky normálním tračníku odebírány biopsie z colon ascendens a colon sigmoideum. V tomto materiálu a dále ve stolici těchto pacientů bylo pomocí kvantitativní PCR stanovováno zastoupení jednotlivých mikrobiálních druhů [167].

V našem souboru byla *E. coli* statisticky signifikantně častěji vykultivována u pacientů s kolorektálním karcinomem a idiopatickým střevním zánětem ve srovnání se zdravými jedinci. Průkaz dominantního zastoupení *E. coli* ve sliznici pacientů s idiopatickým střevním zánětem 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 [6, 31]. Intimnější vztah *E. coli* k tlustostřevní sliznici, získaný obdržetím virulentních faktorů, vede k výrazné stimulaci slizničního imunitního systému a vzniku jeho nepřiměřeně vysoké a tudíž patologické reakce, v jejímž důsledku idiopatické střevní záněty vznikají (podrobně viz kapitola 1.4.).

Z těchto důvodů jsme v naší studii stanovovali bakteriocinogenii u nemocných s idiopatickým střevním zánětem. Neprokázali jsme rozdílnou míru kolicinogenie, mikrocinogenie a ani současné kolicinogenie s mikrocinogenií ve srovnání s ostatními soubory. Nalezli jsme však rozdíly v zastoupení jednotlivých kolicinů (viz dále). V minulosti se této problematice věnoval Bureš et al., který předpokládal uplatnění kolicinů v etiopatogenezi idiopatických střevních zánětů na základě faktu, že koliciny jsou schopné zvyšovat oxidoredukční aktivitu leukocytů in vitro. U nemocných s idiopatickým střevním zánětem nenalezl v kolicinogenii statisticky signifikantní diferenci při srovnání se skupinou kontrolní. Toto pozorování je v souladu s naší recentní studií. Dále Bureš et al. testoval inhibici migrace leukocytů (s koliciny jako antigeny); test vyšel abnormálně u 36 % pacientů s ulcerózní kolitidou (5/14)

a 80 % pacientů s Crohnovou chorobou (12/15), zatímco abnormální výsledek byl pozorován pouze u jednoho kontrolního jedince (1/16; 6 %). Výsledky lze interpretovat jako projev buněčné hypersenzitivity pacientů s idiopatickým střevním zánětem na koliciny svých vlastních kmenů *E. coli* [27, 31]. Stanovením kolicinogenie u pacientů s idiopatickým střevním zánětem se zabýval i Šmarda et al. Zjistil pouze mírně vyšší kolicinogenii u nemocných s Crohnovou chorobou (47,5 %) ve srovnání se zdravými kontrolami (41 %). U pacientů s ulcerózní kolitidou byla kolicinogenie vyšší (56 %) [277]. Možností diagnostikovat přítomnost enteroinvazivních kmenů *Escherichia coli* se zabýval Horák et al. Ten poprvé využil kolicinu Js; k tomuto kolicinu jsou totiž enteroinvazivní kmeny *E. coli* na rozdíl od ostatních kmenů citlivé [119, 272]. Bureš et al. ve své studii zvýšený výskyt enteroinvazivních kmenů *E. coli* u nemocných s ulcerózní kolitidou neprokázal [30], Šmarda s Obdržálkem zvýšený výskyt enteroinvazivních kmenů *E. coli* ve skupině nemocných s ulcerózní kolitidou (41,5 %) ve srovnání se skupinou kontrolní (22 %) dokumentovali [277]. Podle výsledků všech doposud provedených studií se zdá, že se kolicinogenie v populaci nemocných s Crohnovou chorobou výrazněji neliší od kolicinogenie zdravých jedinců. Výzkum by se tedy měl především zaměřit na skupinu pacientů s ulcerózní kolitidou: stanovení bakteriocinogenie a zastoupení enteroinvazivních kmenů *E. coli*. Optimálním materiálem by byly bioptické vzorky kolorektální sliznice a optimálními technikami by byly PCR metody.

Příčinný vztah infekce a vývoje malignity byl již zdokumentován ve více souvislostech. Infekčním agens mohou být viry, bakterie nebo paraziti (schistozomiáza); bakteriální infekce jsou ale daleko nejčastější příčinou. Jako typický příklad lze uvést *Helicobacter pylori* a vývoj karcinomu nebo MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) lymfomu žaludku. Pokud zvážíme množství a rozmanitost střevních mikrobiot, jejich interakce mezi sebou a interakci se sliznicí tlustého střeva, možnost navození prekancerózních podmínek (chronického zánětu, suprese a/nebo změn imunitního systému) se přímo nabízí [41]. Při chronickém zánětu vzniklé cytokiny a chemokiny mohou suprimovat anti-tumorózní aktivitu imunitního systému a také mohou navozovat angiogenezi. Mezi cytokiny, které jsou prokarcinogenní, patří TNF- α , interleukin-6 a interleukin-1. Naproti tomu interleukin-10 a růstový faktor TGF-beta (transforming growth factor- β) vznik kolorektálního karcinomu inhibují [300]. To, že jsou střevní mikrobiota v příčinném vztahu s kolorektální rakovinou, podporuje rozdíl incidence tenkostřevního a tlustostřevního karcinomu. I v případě kmenů *Escherichia coli* byl ve studii

in vivo potvrzen aborální nárůst těchto bakterií a jejich predominantní výskyt v tlustém střevě (ve srovnání se střevem tenkým) [32]. Mezi bakterie podezřelé ze spolupodílu na vývoji kolorektálního karcinomu patří *Streptococcus bovis*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* a další [41].

Escherichia 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 [47].

Naše pacienty jsme rozdělili na nemocné s pravostranným a levostranným kolorektálním karcinomem. Čtyři z nich (biopticky vyšetřeno 12 vzorků) měli pravostranný kolorektální karcinom. Ve všech 12 biopsiích byl vykultivován mikrocinogenní kmen *E. coli*, jehož genotyp patřil do fylogenetické skupiny B2 a/nebo D (více virulentní). V devíti bioptických vzorcích (tzn. 75 %) byla vykultivována *E. coli* s genotypem B2. V této souvislosti je třeba uvažovat nad významem potenciálně karcinogenních *E. coli* vyznačujících se genotypem B2 při karcinogenezi v pravém tračniku. V posledních letech jsou zmiňovány pilovité léze a pilovité adenomy, z kterých dochází k vývoji kolorektálního karcinomu podstatně rychleji než je tomu v případě sekvence „tradiční“ kolorektální adenom – karcinom. Nabízí se možnost, že by na vzniklé genetické odchylky a rychlost jejich vzniku při vývoji kolorektálního karcinomu z pilovitého adenomu mohla mít vliv právě přítomnost *E. coli* s genotypem B2.

Genotypy *Escherichia 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 kolorektálním karcinomem a nejvyšší zastoupení genotypu D bylo rovněž u nemocných s kolorektálním karcinomem. Tyto výsledky lze interpretovat tak, že u pacientů s kolorektálním karcinomem dochází k posunu v genotypu *E. coli* směrem k virulentnějšímu. Byť jsme neprokázali rozdíl v bakteriocinogenii mezi pacienty s karcinomem a ostatními skupinami pacientů, prokázali jsme vzestup bakteriocinogenie v závislosti na dysplazii kolorektálního adenomu a na rostoucím stadiu kolorektálního

karcinomu (viz dále). Tyto všechny nálezy se dobře doplňují a poukazují na vývoj genotypu *E. coli*, ke kterému dochází se vznikem a progresí kolorektální patologie.

Kombinace genotypu B2 a produkce mikrocinu H47 a mikrocinu M byla nejčastěji nalezena u pacientů s normálním kolorektálním nálezem (kontrol), podstatně méně často u ostatních zkoumaných skupin včetně nemocných s idiopatickým střevním nálezem. Tímto profilem se vyznačuje probiotikum *E. coli Nissle 1917* [100, 214, 312], které je v klinické praxi používáno k udržení remise ulcerózní kolitidy (a prevenci „pouchitidy“ – zánětu ileo-análního vaku). Nedostatečné „přirozené“ zastoupení této probiotické bakterie v tlustém střevě pacientů s idiopatickým střevním zánětem se může zřejmě podílet na vývoji kolorektální patologie.

V naší studii jsme hodnotili počet produkovaných bakteriocinů jednotlivými vykultivovanými kmeny z čeledi *Enterobacteriaceae* v případě prokázané bakteriocinogenie. Zajímavým zjištěním je, že u nemocných s idiopatickým střevním zánětem a v souboru kontrol bylo zjištěno nejvíce multiprodukčních kmenů, v souboru pacientů s kolorektálním karcinodem nejvíce kmenů produkujících 2 bakteriociny. Monoprodukčních kmenů bylo identifikováno nejvíce u skupiny pacientů s kolorektálním adenomem. Studie Gordona a spolupracovníků dokumentovala, že kmeny *E. coli*, které produkovaly více než jeden bakteriocin, se častěji vyznačovaly genotypem B2 a méně často patřily k fylogenetické skupině A nebo D [99].

Bakteriociny se vyznačují anti-neoplastickou aktivitou. Tyto účinky byly objeveny na konci 70. let minulého století. Tehdy byly použity přirozeně se vyskytující bakteriociny, které prokazovaly toxicitu k savčím buňkám. Dnes používané purifikované bakteriociny (koliciny, mikrocin, pyocin, pediocin) mají rovněž inhibiční účinek na mnoho neoplastických buněčných linií [45].

V 70. letech minulého století se anti-neoplastickými vlastnostmi bakteriocinů zabýval především kolektiv kanadské vědkyně Hannah Farkas-Himsley, čeští vědci Horák s Burešem a Šmarda se spolupracovníky. Studie Mittelmana ve spolupráci s Farkas-Himsley dokumentovala senzitivitu myších leukemických buněk k bakteriocinům. Po interakci leukemické buňky s kolicinem docházelo ke vzniku odchylek v průběhu buněčného cyklu, což bylo v zápatí monitorováno průtokovou cytometrií. Interakce kolicinu s leukemickou buňkou ústila ve snížení počtu buněk v G0/G1 a SG2M fázi, přičemž docházelo k akumulaci buněk v preG1 fázi [183]. Interakci bakteriocinů s leukemickými buňkami (na rozdíl od

normálních lymfocytů) v periferní krvi potvrzuje studie Musclow et al. [190]. Selektivní interakce bakteriocinů s maligními lymfocyty (ne s normálními lymfocyty) u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií lze použít jako test k časné diagnostice a monitoraci onemocnění lymfoblastickou leukémií [191]. Farkas-Himsley porovnávala senzitivitu myších leukemických buněk k bakteriocinům. Prokázala, že buňky s vyšší onkogenicitou byly k působení bakteriocinu citlivější než buňky s nižším onkogenním potenciálem nebo normální lymfocyty přítomné ve slezině [75]. Z jiné studie vyplývá, že bakteriociny používají k interakci s cílovou maligní buňkou transferinové receptory [80]. Bylo dokumentováno, že po interakci částečně purifikovaného bakteriocinu s membránovým receptorem maligní buňky dochází k aktivaci buněčných endonukleas a fragmentaci DNA. Jde o programovanou smrt buňky, která zahrnuje apoptózu [82]. Původní i purifikované koliciny si přitom uchovávají svoji cytotoxickou aktivitu vůči bakteriálním buňkám a buňkám savců po zamrazení i rozmrazení [81].

Přítomnost bakteriocinů u pacientů s kolorektálním karcinomem se stala předmětem studií, výsledky však nevyšly jednoznačně [45]. Šmarda et al. neprokázal signifikantní rozdíl ve srovnání se zdravými dobrovolníky (kolicinogenie u zdravých kontrol: 41,4 %, kolicinogenie u pacientů s maligním tumorem střeva: 40,6 %) [277]. Studie Bureše et al. naopak prokázala sníženou kolicinogenii u pacientů s kolorektálním karcinomem (*Escherichia coli* byla kultivována z análních výtěrů). Kolicinogenní *E. coli* byla u nemocných s kolorektálním karcinomem zjištěna pouze ve 41,6 %, kdežto u zdravých kontrol v 63,8 %. Tato diference vyšla jako statisticky signifikantní [29]. Myšlenka, že absence kolicinogenních kmenů *E. coli* by mohla stát za příčinou a vývojem kolorektálního karcinomu, se zdála být logickou. Tuto myšlenku může podporovat studie Farkas-Himsley, která dokumentovala selektivní inhibici buněk lidských gastrointestinálních adenokarcinomů pomocí vibriocinu-8SL a pyocinu I-4. Ze studie vyplývá, že se stoupajícím mitotickým indexem stoupá citlivost daných buněk k bakteriocinům [78].

V naší recentní studii jsme testovali pomocí metod PCR bakteriocinogenii, kolicinogenii a mikrocinogenii bakterií, které byly vykultivovány v biopsiích sliznice tlustého střeva (jde tedy na rozdíl od předchozích studií o slizniční mikrobiota). Míra bakteriocinogenie, kolicinogenie a mikrocinogenie se mezi jednotlivými vyšetřovanými soubory statisticky signifikantně nelišila. Přesto lze pozorovat zvýšení mikrocinogenie u kontrolních jedinců a u pacientů s kolorektálním karcinomem (v porovnání s pacienty s kolorektálním adenomem a

idiopatickými střevními záněty). Současná produkce mikrocinů a kolicinů byla vyšší rovněž u kontrolních jedinců a u pacientů s kolorektálním karcinomem. Tyto poznatky vedou k úvaze, že bakteriocinogenie je přirozeně vyšší u zdravých jedinců, kdy slizniční mikrobiota disponují „přirozenou antibiotickou a anti-neoplastickou“ kontrolou. V případě výrazně stresové situace a potenciálního nedostatku nutričních substrátů pro bakterie v časovém období vzniku a především progresu kolorektálního karcinomu dochází ke zvýšení kompetice mezi jednotlivými tlustostřevními populacemi bakterií, což se může mimo jiné projevit zvýšením produkce bakteriocinů. Například deficit thyminu stimuluje produkci kolicinů *in vitro* [267]. V této souvislosti je otázné, zda je primárním cílem střevních mikrobiot produkovat bakteriociny se záměrem vyhnout se vyhynutí dané bakteriální kolonie/daného bakteriálního společenství a/nebo zachránit hostitelský organismus díky anti-neoplastickému působení produkovaných bakteriocinů. První tvrzení by podporovala modelová studie Majeed et al., kdy proti sobě stály dva kmeny DNA degradujících kolicinů (E2 a E7). Byl prokázán letální efekt jednoho kmene vůči druhému; důležitým zjištěním bylo ale také to, že produkce menšího množství bakteriocinu vedlo k odpovědi – expresi bakteriocinu u kmene druhého [174]. Primární záchranu vlastního bakteriálního společenství by také potvrzovala především zvýšená četnost výskytu kolicinu M u nemocných s kolorektálním karcinomem, u kterého anti-neoplastický efekt doposud prokázán nebyl (viz dále). Pro to, že ale může jít o komplexnější řešení situace, nejen o vlastní „sobeckou“ záchranu daného druhu střevních mikrobiot, svědčí nálezy produkce kolicinu K, kterou jsme (byť v několika málo případech) na rozdíl od ostatních zkoumaných skupin u nemocných s kolorektálním karcinomem identifikovali. Kolicin K má anti-neoplastický potenciál (viz dále).

Některá cytostatika jsou schopna stimulovat produkci kolicinů. Typickým příkladem je mitomycin C, po jehož indukci se epichromozomální DNA kolicinogenních kmenů zvětší a dosahuje až 10 % celkové bakteriální DNA [31]. Vlastností mitomycinu C se využívá v terapii gynekologických malignit (karcinomu děložního čípku, karcinomu vulvy) a karcinomu prsu [139].

Zcela zásadním faktem, vyplývajícím z naší studie, je prokázání statisticky významného rozdílu v bakteriocinogenii mezi souborem pacientů s nepokročilými a pokročilými kolorektálními neopláziemi. Pokročilá (advanced) kolorektální neoplázie je definována velikostí (>10 mm) a/nebo přítomností vysokého stupně dysplazie a/nebo přítomností vilózní komponenty. Soubor nemocných s pokročilou neoplázií se vyznačoval vyšší

bakteriocinogenií než soubor pacientů s adenomem nepokročilým. Genotyp A *Escherichia coli* (který se asociuje s méně virulentními znaky) byl častěji nalezen ve skupině nemocných s nepokročilou kolorektální neoplázií, naopak genotyp B2 *Escherichia 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 naším pozorováním: prokázali jsme asociaci míry bakteriocinogenie, kolicinogenie, mikrocinogenie a současné kolicinogenie s mikrocinogenií se zvyšujícím se stádiem kolorektálního karcinomu. Staging jsme hodnotili pomocí TNM klasifikace. Výsledky poukazují na to, že střevní mikrobiota jsou nedoceneným / „zapomenutým“ systémem, který se spolupodílí na vznikající patologii a/nebo na ni reaguje [83].

Koliciny E1, E3, E5 prokazují anti-neoplastickou aktivitu proti mnoha liniím nádorových buněk savců. Šmarda se spolupracovníky zkoumal efekt kolicinů E2, D a E3 na HeLa buňky (lidské epiteliální buněčné linie pocházející z karcinomu děložního hrdla). Kolicin E3 prokazoval cytotoxické a sekundárně cytolytické účinky na HeLa buňky, zatímco purifikované koliciny E2 a D cytotoxický efekt na HeLa buňky neměly [276, 278]. Koliciny E1, E3 a E5 prokazovaly cytotoxický efekt na kolonie fibroblastů [275]. Další studie dokumentovala anti-neoplastický účinek kolicinu E1 a E3 na transformované monoblasty, čímž byl potvrzen cytotoxický efekt na leukemické buňky [274]. Ze studie Fusky a spolupracovníků vyplývá, že pokud je použit kolicin E3 v množství menším než 1,0 mg/ml, pak dochází k proliferaci myších leukemických buněk, při použití vyšších koncentrací dochází k jejich inhibici [90]. Malé proteiny založené na vlastnostech kolicinů mají prokazatelný anti-tumorózní efekt. Peptid podobný kolicinu E3 aplikovaný lokálně ve studii prováděné na zvířecích modelech (myši) vedl k prodloužení přežití a redukcii objemu tumoru z lidských glioblastomových buněk aplikovaných subkutánně [307]. Chumchalová et al. zkoumala aktivitu 4 kolicinů (A, E1, E3, U) proti lidským liniím fibroblastů a proti lidským nádorovým liniím buněk definovaných mutací p53. Kolicin E1 (kromě jednoho případu) a kolicin A inhibovaly jejich růst. Účinek kolicinů na eukaryotické buňky může být tedy považován za cytotoxický a závislý na typu kolicinu a typu cílové buňky [130]. Šmarda zkoumal účinek kolicinů E2 a A: oba koliciny dramaticky snižovaly životnost třech myších buněčných linií, a to až o 58 %. Léčba kolicinem A vedla k prodloužení života u myši s transplantovanými buňkami plazmocytomu v 43 % [50].

Nejvíce vyjádřený anti-neoplastický efekt mají na základě provedených studií koliciny s RNA-asovou aktivitou a koliciny formující póry. Koliciny E3 a E5 nemění profil buněčného cyklu, a proto se spíše předpokládá, že svůj anti-neoplastický efekt realizují mechanismem nekrózy než apoptózy [150, 274]. Koliciny formující póry působí letálně mechanismem apoptózy (dochází k akumulaci buněk v G1 fázi) [130, 150].

V naší studii jsme rozdělili jednotlivé soubory podle zastoupení bakteriocinů se vztahem k jejich mechanismu účinku. Zjistili jsme, že nejvíce kolicinů působících letálně vznikem pórů je v kontrolní skupině, nejvíce kolicinů s RNA-asovou aktivitou je ve skupině nemocných s idiopatickým střevním zánětem. Naopak nejčastěji jsou zastoupeny koliciny působící mechanismem narušení syntézy peptidoglykanu u pacientů s kolorektálním karcinomem. Podtrhnout tato tvrzení lze přepočtem na absolutní kolicinogenii v jednotlivých skupinách. Výsledky lze s opatrností interpretovat tak, že u kontrolních osob a u pacientů s idiopatickým střevním zánětem se nejčastěji vyskytují koliciny s antibiotickým a anti-neoplastickým efektem, u pacientů s kolorektálním karcinomem dominují koliciny s pouze antibakteriálním účinkem.

V našich zkoumaných skupinách jsme stanovovali zastoupení jednotlivých kolicinů a mikrocinů. Koliciny Ia, Ib a ani E1 se významněji v četnosti výskytu mezi jednotlivými skupinami nelišily. Kolicin E1 má prokázaný anti-neoplastický efekt, dále je považován za potenciální virulentní faktor [271]. Zjistili jsme, že koliciny E2, 4, 6, 7 byly podstatně častěji zastoupeny u pacientů s idiopatickým střevním zánětem na rozdíl od skupin ostatních. Koliciny E3 a E5 byly nalezeny (ve 2 %) pouze u pacientů s idiopatickým střevním zánětem, v ostatních zkoumaných skupinách diagnostikovány nebyly.

Studie, které se kolicinogenií u nemocných s idiopatickým střevním zánětem doposud zabývaly, zvýšený výskyt kolicinů skupiny E neprokázaly. Vzhledem k tomu, že střevní mikrobiota hraje ústřední roli v etiopatogenezi idiopatických střevních zánětů, jistě jsou důležitá i v potenciálním zabránění nebo naopak nastartování vývoje neoplazmatu v tomto prekancerózním terénu. Kromě intimního vztahu střevních mikrobiot se slizničním imunitním systémem a možností ovlivnění produkce prokarcinogenních nebo naopak anti-neoplastických cytokinů/chemokinů, se nejspíše uplatňují svým cytotoxickým účinkem i jednotlivé bakteriociny, včetně kolicinů skupiny E.

Anti-neoplasticky působící kolicin A nebyl identifikován v žádné z našich zkoumaných skupin.

Kolicin M se v naší studii vyskytoval s nejvyšší frekvencí u nemocných s kolorektálním karcinomem. Již studie Bureše et al. v minulosti dokumentovala, že nejčastějším kolicinem u pacientů s kolorektálním karcinomem byly koliciny M a B, tzn. koliciny s neprokázaným anti-tumorózním účinkem [31]. V minulosti byla hradeckou skupinou zkoumána kolicinogenie také u pacientů s celiakií v dětské populaci. U dětí s celiakií byla kolicinogenie diagnostikována v 61 % (22/36), což se signifikantně nelišilo od kontrol, u kterých byla kolicinogenie zjištěna v 56 % (36/64). Signifikantní diference však byla nalezena v kolicinogenii mezi dětmi s celiakií s bezlepkovou dietou (70 %) a dětmi s celiakií s normální dietou (33 %). U kontrolní skupiny se častěji vyskytovaly koliciny E1 a K (byť signifikance nenabyla statistické významnosti), naopak u dětí s celiakií se častěji vyskytoval kolicin M a B (rozdíl byl statisticky významný: $p < 0,050$) [211]. Dále byla zkoumána kolicinogenie u dětí s IgA deficitem. Je známo, že u 10 % pacientů s IgA deficitem je přítomna celiakální sprue. U dětí s IgA deficitem (stejně jako u dětí s celiakální sprue) byl častěji na rozdíl od zdravé dětské populace diagnostikován kolicin M a B. Naopak přítomnost kolicinu K byla zjištěna jen u jednoho dítěte s IgA deficitem ze 12 vyšetřovaných (u zdravé dětské populace se kolicin K vyskytuje v 42 %) [212].

Bureš et al. ve své studii prokázal rozdílnou frekvenci výskytu kolicinu K: u zdravých osob byl zjištěn ve 13 %, u nemocných s kolorektálním karcinomem pouze v 1,9 % [31]. Nízké zastoupení kolicinu K bylo zjištěno i u dětí s celiakií a IgA imunodeficitem [211, 212]. V naší recentní studii však byl kolicin K v několika případech identifikován výhradně ve skupině pacientů s rakovinou tlustého střeva. Tyto rozdílné výsledky bude nutné včetně mechanismu účinku kolicinu K na eukaryotní buňky objasnit v dalších studiích.

I u mikrocinů byl experimentálně prokázán anti-tumorózní účinek. Mikrocin E492, produkováný bakterií *Klebsiella pneumoniae*, působí anti-neoplasticky na HeLa buňky (odvozené od karcinomu děložního čípku), linie buněk odvozené od Burkittova lymfomu a buněčné linie odvozené od T-leukemických buněk [45]. Cytotoxický efekt mE492 byl charakterizován na HeLa buňkách: při použití nižších koncentrací způsobuje biochemické a morfologické změny typické pro apoptózu. Použití inhibitoru kaspasy vede k zablokování cytotoxického účinku mE492. V případě použití vyšších koncentrací mE492 dochází v cílové

buňce k vyplavení kalcia z intracelulárních zásob nejspíše na podkladě formace iontových kanálů [111]. Cytotoxický účinek mE492 na lidské buněčné linie, který je zprostředkován mechanismem apoptózy, potvrzuje studie Lagose et al. [149].

V naší kohortě vyšetřovaných jedinců jsme identifikovali nejčastěji mikrocin H47, dále mV a mM, tedy mikrocin z II. skupiny. Mikrocin E492 s prokázaným anti-neoplastickým účinkem jsme neidentifikovali. Mikrocin H47, mV, mM (dále mikrocin B17 a kolicin E1) jsou považovány za bakteriociny asociované s patogenními kmeny (osobní sdělení doc. Šmajse; 2013).

Anti-neoplastická aktivita pyocinů produkovaných *Pseudomonas aeruginosa* byla deklarována Farkas-Himsley [77]. V další studii byla testována senzitivita ovariálních buněk křečků a myších fibroblastů k pyocinu 1-4. Buňky, které byly k pyocinu senzitivní, se akumulovaly v preG1 fázi. Ve světelné mikroskopii byla většina buněk shledána intaktními, avšak při použití značení 3H-thymidinem byla potvrzena degradace DNA v buňkách citlivých k pyocinu [79]. Pyociny S2 inhibují proliferaci buněk odvozených od lidského hepatocelulárního karcinomu a lymfoblastické leukémie. Lymfoblasty byly podle studie Abdi-Ali et al. k působení pyocinu S2 citlivější než buňky hepatocelulárního karcinomu [1]. Pediocin je produkován bakterií *Pediococcus acidilactici*. V nativní, avšak ne rekombinantní formě dokáže inhibovat proliferaci buněk odvozených od lidského plicního karcinomu a lidského kolorektálního adenokarcinomu [45].

Vzhledem k celosvětově vysoké incidenci a mortalitě na zhoubné nádory znamená možnost rozšíření/zefektivnění doposud známých terapeutických strategií u těchto maligních onemocnění mnoho [150]. Využití anti-neoplastického efektu bakteriocinů by tak mohlo mít význam především u tumorů, které současná medicína léčit/vyléčit nedokáže. Předpokládá se i možnost kombinace využití bakteriocinů s dalšími klinicky již vyzkoušenými modalitami s cílem zvýšit jejich efektivitu. Studie Farkas Himsley et al. dokumentovala vlastnosti rekombinantního verotoxinu 1: tento bakteriocin je schopný simulovat toxicitu protinádorových proteinů a dokáže napodobit jejich aktivitu proti různým lidským ovariálním buněčným liniím a v případě jejich mnohočetné rezistence na léčiva zvyšuje jejich senzitivitu [76]. Potenciální terapeutické využití mikrocinů (především jakožto induktorů apoptózy) je v poslední době obzvláště zkoumáno [68]. Vzhledem k vysoké incidenci kolorektálního karcinomu v České republice je výzkum anti-neoplasticky působících bakteriocinů velmi

aktuální. Žádoucí by proto byla realizace studií, které by zkoumaly význam bakteriocinů v prevenci vývoje kolorektálního karcinomu, podobně jako např. celecoxib u pacientů s familiární adenomatózní polypózou [45]. Bakteriocinogenie byla již u několika našich pacientů s Lynchovým syndromem a familiární adenomatózní polypózou stanovena, avšak prozatím jde o malou kohortu nemocných, kdy by statistická analýza mohla vést k nesprávným závěrům.

Na otázku, zda „je kolorektální karcinom infekčním onemocněním“?, není jednoduché odpovědět. Pokud by v prevenci vývoje rakoviny tlustého střeva měla efekt antibiotika, prebiotika či probiotika, lze jednoznačně odpovědět, že ano. Vzhledem ke komplexnosti a složitosti ekologického systému střevních mikrobiot však zůstávají výsledky doposud provedených epidemiologických studií ohledně použití probiotik v rámci prevence vývoje kolorektálního karcinomu u člověka rozporuplné [41].

Vzhledem k prevalenci těžkých infekčních onemocnění, obzvláště pak nozokomiálních a současnému rozvoji rezistence na antibiotika lze v blízké budoucnosti očekávat výzkum v oblasti kolicinogenie a především mikrocinogenie. Jedinečná struktura kolicinů i mikrocinů, jejich variabilní antibakteriální mechanismus účinku (vzhledem k zákeřnosti někdy přirovnávaný k mechanismu „Trojského koně“) se přímo nabízí [68]. Bureš et al. potvrdil, že v případě přítomnosti kolicinogenních kmenů *E. coli* (produkujících kolicin Js) není pro léčbu bacilární dyzenterie antibiotická terapie nutná. Antibiotická léčba (neomycin) je ospravedlnitelná tehdy, pokud kolicinogenní flóra přítomna není [28]. Nozokomiální močové infekce jsou hrozbou všech pacientů, především pak imunosuprimovaných či nemocných hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče. Nepatogenní kolicinogenní kmeny *E. coli*, ke kterým jsou uropatogenní kmeny *E. coli* citlivé, mohou přitom být v praxi použity jako prevence před katetrovými močovými infekcemi [306]. Budič et al. dokumentoval, že nejvíce efektivní z in vitro izolovaných kolicinů E1, E6, E7, K a M proti kmenům *Escherichia coli* u pacientů s bakteriemií původem z močového traktu byl kolicin E7 (bylo k němu rezistentních pouze 13 % kmenů) [25]. Enterohemoragická *Escherichia coli* O157 způsobuje těžká infekční onemocnění u lidí, především u dětí. Toshima et al. zkoumal rezistenci lidského organismu vůči *Escherichia coli* O157. Zjistil, že s věkem jedince stoupá počet přítomných bakteriocinogenních kmenů *E. coli*, které mohou zajistit rezistenci vůči kmenu *E. coli* O157. Z této studie vyplývá, že *E. coli* O157 je často senzitivní ke kolicinu E2, E3, E5, E6, E8, E9, naopak rezistentní je vůči kolicinu B, Ia a Ib. Podobné výsledky vyšly i ve studii Bradley et

al. [20, 303]. V poslední době se výzkum zaměřuje i na letální účinek mikrocinů vůči enterohemoragickému kmenu *Escherichia coli* O157:H7 a O26 [70]. U novorozenců se tvorbou protilátek proti antigenu O *Escherichia coli* zabývala Lodinová-Žádníková et al. [160]. Další studie této vědkyně se věnovaly použití inaktivovaných kmenů enteropatogenních *E. coli* v léčbě gastrointestinálních infekcí nedonošených novorozenců [326]. Perorální podání probiotických kmenů *E. coli* novorozencům vede k rychlé kolonizaci jejich gastrointestinálního traktu, navozuje lokální i sérovou produkci protilátek (přičemž důležitou je především produkce sekrečního IgA) a snižuje počet přítomných patogenů. Možnost redukovat incidenci nozokomiálních infekcí a nutnost podání antibiotik u nedonošených a jinak rizikových novorozenců je v klinické praxi vysoce ceněná [161]. Ke kolonizaci gastrointestinálního traktu Lodinová používala *E. coli* O83 [163] nebo např. Mutaflor (*E. coli* Nissle 1917) [162]. Velmi zákeřnou je v klinické praxi listeriová infekce/sepse. Kolicin E1 je schopen inhibovat *Listeria monocytogenes* [213].

Probiotika působí více mechanismy, kromě jiného se vyznačují produkcí bakteriocinů [98]. Vzhledem k tomu, že střevní mikrobiota hraje významnou roli v etiopatogenezi idiopatických střevních zánětů, očekávali bychom možnost širokého terapeutického využití probiotik. Prozatím však tyto preparáty nenašly uplatnění v léčbě Crohnovy choroby. U nemocných s ulcerózní kolitidou má význam v udržení remise onemocnění terapie Mutaflowrem (*E. coli* Nissle 1917); je alternativou k léčbě 5-ASA (preparáty 5-aminosalicylové kyseliny). *Escherichia coli* Nissle 1917 produkuje mikrocinu H47 a mM [100, 214, 312]. Kombinace probiotik VSL#3 se ukázala být efektivní v léčbě a prevenci pouchitidy po ileo-pouch-anální anastomóze ve srovnání s placebem [103].

Antibakteriální aktivity bakteriocinů se využívá kromě medicíny i v potravinářském průmyslu k uchování potravin. Lantibiotikum nisin působí antibioticky vůči grampozitivním mikrobiotům [56]. V posledních letech je zkoumána možnost použití mikrocinu, který by byl aktivní vůči gramnegativním bakteriím [68].

V naší práci jsme se věnovali stanovení bakteriocinogenie z bioticky odebraných vzorků sliznice tlustého střeva pomocí PCR metod. Neprokázali jsme rozdílnou míru bakteriocinogenie mezi jednotlivými vyšetřovanými soubory (kolorektální karcinom, adenom, idiopatický střevní zánět a kontroly). Zjistili jsme asociaci virulentního genotypu *E. coli* s pokročilým kolorektálním adenomem a asociaci virulentního genotypu *E. coli*

s kolorektálním karcinomem. Potvrdili jsme vyšší výskyt bakteriocinogenie u pokročilých kolorektálních neoplázií a asociaci bakteriocinogenie s rostoucím stagingem kolorektálního karcinomu. V jednotlivých souborech jsme prokázali rozdílné zastoupení kolicinů a rozdílnou četnost výskytu kolicinů při jejich rozdělení v závislosti na mechanismu působení. Tato zjištění dovolují tvrdit, že se jednotlivé soubory liší v počtu antibakteriálně a anti-neoplasticky působících bakteriocinů. Následná implementace do klinické medicíny je žádoucí.

5. Závěry:

5.1. Stanovení anti-porinových protilátek

- Vypracovali jsme metodiku vyšetření anti-porinových protilátek (namířených proti OmpC porinům *Escherichia coli*) u pacientů s idiopatickými střevními záněty, kolorektálním adenomem a karcinomem a u skupiny kontrol. Zvýšené hodnoty anti-porinových protilátek byly zjištěny ve skupině nemocných s idiopatickým střevním zánětem a v souboru pacientů s kolorektálním karcinomem.
- Statisticky signifikantně vyšší hodnoty anti-porinových protilátek byly asociovány s komplikovanými formami Crohnovy choroby (fistulující a stenozující formou). Domníváme se, že stanovená hodnota anti-porinových protilátek by mohla pomoci predikovat vývoj klinického fenotypu Crohnovy choroby.

5.2. Bakteriologické vyšetření bioptických vzorků z tračníku a stanovení kolicinogenie koliformních bakterií

- Zavedli jsme novou metodiku bakteriologického vyšetření a následného stanovení kolicinogenie v biopticky odebraných vzorcích sliznice tlustého střeva (odběry byly prováděny při diagnostickém či terapeutickém koloskopickém výkonu).
- V jednotlivých vyšetřovaných souborech (pacienti s idiopatickým střevním zánětem, kolorektálním adenomem, karcinomem a ve skupině kontrolních zdravých osob) jsme stanovili bakteriocinogenii a genotypy izolovaných kmenů *Escherichia 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 kolorektálním karcinomem. U pacientů s pravostranným kolorektálním karcinomem byl ve 100 % bioptických vzorků diagnostikován mikrocinný kmen *Escherichia coli*, jehož genotyp patřil do

fylogenetické skupiny B2 a/nebo D. V 75 % vzorků ve skupině pacientů s pravostranným kolorektálním karcinomem byla vykultivována *E. coli* s genotypem B2. *Escherichia coli* vyznačující se genotypem B2 byla stanovena častěji u nemocných s pokročilým kolorektálním adenomem 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 idiopatickým střevním zánětem. Koliciny inhibující syntézu peptidoglykanu byly nejvíce zastoupeny u nemocných s kolorektálním karcinomem. V jednotlivých skupinách jsme hodnotili koliciny podle translokace přes zevní membránu *Escherichia coli*, dále podle skupinové rezistence a tolerance.
- Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl v bakteriocinogenii mezi souborem nemocných s kolorektálním karcinomem a skupinou kontrolních osob. Ve skupině nemocných s kolorektálním karcinomem byla pozorována asociace míry bakteriocinogenie, kolicinogenie, mikrocinogenie a současné kolicinogenie s mikrocinogenií se zvyšujícím se stádiem karcinomu (staging hodnocen pomocí TNM klasifikace). Ve skupině pacientů s kolorektálním karcinomem byl častěji diagnostikován kolicin M (kolicin s neprokázaným anti-neoplastickým účinkem) ve srovnání se skupinou kontrolní.

6. Summary:

Sporadic colorectal cancer (CRC) represents an immense problem worldwide. Precise definition of all the potential contributors to the etiopathogenesis of CRC remains a challenge, when considering its high incidence especially in the Czech Republic. Large intestinal microbiota play a very important role, however, their involvement is underestimated. Inflammatory bowel disease (Crohn's disease and ulcerative colitis) belong to the problems of contemporary era. Large intestinal microbiota are in a very close association with the elements of large bowel mucosal immune system. If changes in quality and/or (increased) quantity of the large intestinal microbiota occur, the mucosal immune system responds immediately. However, response does not lead to a „physiological protection“ only, but to excessive and proinflammatory response of the immune system also, which may be followed by pathological patterns of the large bowel mucosa reaction.

The precise diagnostics of inflammatory bowel disease is extremely important for the following control of the disease behaviour and for the optimal therapy chosen. There is a trend of noninvasive tests in the contemporary medicine. Untill now, anti-*Saracharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA, associated with Crohn's disease) and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA; associated with ulcerative colitis) were found to be most important antibodies tested. However, there is an urgent need to classify more precisely, what the individual fenotype of Crohn's disease will be like and what is the relationship between large intestinal microbiota and large bowel pathology. Anti-porin antibodies (anti-OmpC antibodies) aimed at porin C, which is localised at the bacterial cell wall of *Escherichia coli*, could help us to answer these questions.

Methodology and investigation of serum anti-porin antibodies in patients with inflammatory bowel disease, colorectal adenoma, colorectal carcinoma and healthy persons belonged to the objectives of the first part of our work. We have found out, that not only patients with inflammatory bowel disease, but patients with colorectal carcinoma also had increased levels of anti-porin antibodies. These results confirm the contribution of colonic microbiota to the development of large bowel pathology very clearly. No similar study in patients with colorectal carcinoma has been carried out untill now and we find these results highly important, because of potencial opportunity to influence pathogenesis of CRC. Statistically higher levels of anti-porin antibodies found in patients with more complicated forms (internal

perforating and stenosing forms) of Crohn's disease indicate the contribution of large bowel microbiota to the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. The opportunity to use anti-porin antibodies for the prediction of following behaviour of the disease seems to be very helpful in the clinics and hence this investigation should not be omitted in the near future.

Determination of quantitative and qualitative bacteriocinogeny in patients with colorectal adenoma, colorectal carcinoma, inflammatory bowel disease and in healthy individuals belonged to the aims in the second part of our work. Bacteriocins are peptides or small proteins, which are produced by bacteria of the *Enterobacteriaceae* family. Bacteriocins are divided into more groups, colicins and microcins belong to the most important of them. Bacteriocins are characterized by its antibacterial effect, which enables each species/population to survive / protect itself. Some of the colicins and microcins do have anti-neoplastic activity as well. All the colicins and majority of microcins are coded extrachromosomally, in the plasmids. We have established a new methodology of bacteriocin typing: mucosal biopsies were taken in the caecum, transverse colon and the rectum within either diagnostic or therapeutic colonoscopy. After appropriate microbiological culture bacteriocinogeny of each strain and genotypes of *Escherichia coli* strains were investigated by PCR methods. Genotype A (associated with less virulent strains) was found least commonly in patients with colorectal carcinoma (compared among all the groups tested) and genotype D (associated with most virulent strains) was confirmed most frequently in patients with colorectal carcinoma. The conclusion could be, that the large bowel mucosa of the patients with colorectal carcinoma is colonized by *Escherichia coli*, which belongs to more virulent strains. In patients with right-sided colorectal carcinoma there were found microcinogenic strains of *Escherichia coli*, which belonged either to the genotype B2 and/or D. *Escherichia coli* with the genotype B2 was confirmed in 75% of patients with right-sided colorectal carcinoma. Recent studies declare, that *Escherichia coli* of B2 genotype are characterised by the presence of a genomic island called „pks“, which could contribute to the development of sporadic colorectal cancer. These results could help to explain, why the genesis of the colorectal carcinoma from the serrated adenoma (which are localised mainly in the right colon) occurs more quickly comparing sequence „usual colorectal adenoma“ – colorectal carcinoma.

Bacteriocinogeny did not differ among groups tested, however increasing bacteriocinogeny, colicinogeny, microcinogeny and coliciogeny & microcinogeny was associated with the

increasing staging of the colorectal carcinoma (assessed according to the TNM classification). Statistically significant difference in bacteriocinogeny was observed between the group of patients with non-advanced colorectal adenoma and advanced colorectal neoplasia (patients with advanced colorectal neoplasia had higher bacteriocinogeny).

Colicins depolarizing membrane of the target cell were found most frequently in the group of the controls. Colicins, which inhibit either DNA or RNA synthesis, were confirmed to be most common in the patients with inflammatory bowel disease. All three groups of colicins were found to have an antineoplastic potential in the experimental studies. On the contrary, colicin M, which has never been confirmed as an antineoplastic one, was found in the patients with colorectal carcinoma mainly.

Our work has confirmed high importance of the large intestinal microbiota and their contribution to the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease and colorectal carcinoma. Colonic microbiota have been underestimated and still remain a „frequently forgotten organ“. Extensive research of all potential role of large intestinal microbiota belongs to the challenges in the contemporary medicine.

7. Seznam použitých zkratk

ACCA: antichitobioside carbohydrate antibodies, antichitobiosidové protilátky

AFP: alfafetoprotein

ALCA: antilaminaribioside carbohydrate antibodies, antilaminaribiosidové protilátky

ANCA: antineutrophil cytoplasmic antibodies, protilátky proti cytoplazmě neutrofilů

anti-CBir1: antibodies to CBir1, protilátky proti bakteriálním flagelinům

anti-I2: antibodies to *Pseudomonas fluorescens*, protilátky proti *Pseudomonas fluorescens*

anti-OmpC: anti-outer membrane protein C antibodies, protilátky proti proteinu C zevní membrány

APC gen: adenomatous polyposis coli gene, gen pro adenomatózní polypózu střeva

ASCA: anti- *Sacharomyces cerevisiae* antibodies, protilátky proti *Sacharomyces cerevisiae*

BtuB: receptor pro vitamin B12

CA 19-9: cancer antigen 19-9, karcinomový antigen 19-9

cAMP: cyklický adenosinmonofosfát

CEA: carcinoembryonic antigen, karcinoembryonální antigen

col: colicin, kolicin

CN: Crohnova nemoc

CRC: colorectal cancer, kolorektální karcinom

DCC gene: gene deleted in colorectal carcinoma, deletovaný gen u kolorektálního karcinomu

DNA: deoxyribonukleová kyselina

E. coli: *Escherichia coli*

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, heterogenní enzymová imunoanalýza

FISH: fluorescent in situ hybridisation, fluorescent in situ hybridizace

GALT: gastrointestinal associated lymphoid tissue, lymfatická tkáň asociovaná s gastrointestinálním traktem

HeLa buňky: lidské epiteliální buněčné linie pocházející z karcinomu děložního hrdla

IBD: inflammatory bowel disease, idiopatické střevní záněty

Ig: imunoglobulin

IL: interleukin

m: mikrocin

MALDI-TOF MS: matrix-assisted laser desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry

MALT: mucosa associated lymphoid tissue, lymfatická tkáň asociovaná se sliznicí

NBI: narrow band imaging, zúžený pás světla

NF- κ B: nuclear factor- κ B, nukleární faktor- κ B

NK: natural killers cells, NK buňky

NOD2 receptors: nucleotide-binding oligomerization domain receptors, receptory pro vazbu nukleotidů

Omp: outer membrane protein, protein zevní membrány

OmpLA: fosfolipáza A zevní membrány

PAMPS: pathogen associated molecular patterns, molekulární vzory asociované s/typické pro patogeny

pANCA: perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, perinukleární typ protilátek proti cytoplazmě neutrofilů

PCR: polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

PRR: pattern recognition receptors, receptory rozeznávající (bakteriální) vzorce

RNA: ribonukleotidová kyselina

rRNA: ribozomální ribonukleotidová kyselina

SSU: sequencing of small subunit, sekvenování malých podjednotek

TCR- β : T-cell receptor β , T-buněčný receptor β

TGF- β : transforming growth factor- β , transformující růstový factor β

TLR: toll cell like receptor

TNF: tumor necrosis factor, faktor nádorové nekrózy

tRNA: transkripční ribonukleotidová kyselina

TY agar: trypton yeast agar, agar s tryptonem a extraktem z kvasinek

UC: ulcerative colitis, ulcerózní kolitida

5-ASA: 5-aminosalicylová kyselina

8. Literatura

1. Abdi-Ali A, Worobec EA, Deezagi A, Malekzadeh F. Cytotoxic effects of pyocin S2 produced by *Pseudomonas aeruginosa* on the growth of three human cell lines. *Can J Microbiol* 2004; 50(5): 375-381.
2. Arnott ID, Landers CJ, Nimmo EJ, Drummond HE, Smith BK, Targan SR, Satsangi J. Sero-reactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with disease severity and progression, but not NOD2/CARD15 genotype. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(12): 2376-2384.
3. Asensio C, Perez-Diaz JC. A new family of low molecular weight antibiotics from enterobacteria. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 69(1): 7–14.
4. Attene-Ramos MS, Wagner ED, Gaskins HR, Plewa MJ. Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage. *Mol Cancer Res* 2007; 5(5): 455-459.
5. Bakken JS, Sanders CC, Thomson KS. Selective ceftazidime resistance in *Escherichia coli*: association with changes in outer membrane protein. *J Infect Dis* 1987; 155(6): 1220-1225.
6. Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, Peeters H, Bommelaer G, Desreumaux P, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. 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.
7. Barreteau H, El Ghachi M, Barnéoud-Arnoulet A, Sacco E, Touzé T, Duché D, Gérard F, Brooks M, Patin D, Bouhss A, Blanot D, van Tilbeurgh H, Arthur M, Llobès R, Mengin-Lecreulx D. Characterization of colicin M and its orthologs targeting bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis. *Microb Drug Resist* 2012; 18(3): 222-229.

8. Baty D, Frenette M, Lloubes R, Geli V, Howard SP, Pattus F, Lazdunski C. Functional domains of colicin A. *Mol Microbiol* 1988; 2(6): 807–811.
9. Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, Holtrop G, Louis P, Lobley GE, Flint HJ. Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(5): 3593-3599.
10. Benedetti H, Frenette M, Baty D, Knibiehler M, Pattus F, Lazdunski C. Individual domains of colicins confer specificity in colicin uptake, in pore-properties and in immunity requirement. *J Mol Biol* 1991; 217(3): 429–439.
11. Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, Muller W, Menon S, Holland G, Thompson-Snipes L, Leach MW, Rennick D. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest* 1996; 98(4): 1010–1020.
12. Berggren AM, Nyman EM, Lundquist I, Bjorck IM. Influence of orally and rectally administered propionate on cholesterol and glucose metabolism in obese rats. *Br J Nutr* 1996; 76(2): 287–294.
13. Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(7): 1539-1546.
14. Blasband AJ, Marcotte WR, Schnaitman CA. Structure of the 1c and nmpC outer membrane porin protein genes of lambdaoid bacteriophage. *J Biol Chem* 1986; 261(27): 12723-12732.
15. Bokkenheuser VD, Winter J, Mosenthal AC, Mosbach EH, McSherry CK, Ayengar NK, Andrews AW, Lebherz WB 3rd, Pienta RJ, Wallenstein S. Fecal steroid 21-dehydroxylase, a potential marker for colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 1983; 78(8): 469-475.

16. Boleij A, Roelofs R, Schaeps RM, Schulin T, Glaser P, Swinkels DW, Kato I, Tjalsma H. Increased exposure to bacterial antigen Rpl7/L12 in early stage colorectal cancer patients. *Cancer* 2010; 116(17): 4014–4022.
17. Boon T. Inactivation of ribosomes in vitro by colicin E3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68(10): 2421–2425.
18. Bosscher D, Breynaert A, Pieters L, Hermans N. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60(6): S5-11.
19. Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. *Clin Chem* 2006; 52(2): 171-181.
20. Bradley DE, Howard SP, Lior H. Colicinogeny of O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli* and the shielding of colicin and phage receptors by their O-antigenic side chains. *Can J Microbiol* 1991; 37(2): 97–104.
21. Braun V, Helbig S, Patzer SI. Import of periplasmic bacteriocins targeting the murein. *Biochem Soc Trans* 2012; 40(6): 1449-1455.
22. Braun V, Patzer SI, Hantke K. Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie* 2002; 84(5-6): 365–380.
23. Braun V, Schaller K, Wabl MR. Isolation, characterization, and action of colicin M. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 5(5): 520–533.
24. Brey RN. Fragmentation of colicins A and E1 by cell surface proteases. *J Bacteriol* 1982 149(1): 306–315.
25. Budič M, Rijavec M, Petkovšek Z, Zgur-Bertok D. *Escherichia coli* bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. *PLoS One* 2011; 6(12): e28769.

26. Bureš J, Cyrany J, Kohoutová D, Förstl M, Rejchrt S, Květina J, Voříšek V, Kopáčová M. Small intestinal bacterial overgrowth syndrome. *World J Gastroenterol* 2010; 16(24): 2978-2990.
27. Bureš J, Horák V, Burešová E, Fixa B, Komárková O, Hartmann M. Colicinogeny in chronic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1986; 21(7): 819-823.
28. Bureš J, Horák V, Duben J. Importance of colicinogeny for the course of acute bacillary dysentery. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* 1979; 245(4): 469-475.
29. Bureš J, Horák V, Fixa B, Komárková O, Zaydlar K, Lonský V, Masurka V. Colicinogeny in colorectal cancer. *Neoplasma* 1986; 33(2): 233-237.
30. Bureš J, Horák V, Komárková O, Fixa B. Diagnostika enteroinvazivních kmenů *Escherichia coli* pomocí kolicinu Js u nemocných s ulcerózní kolitidou. *Čs Gastroent Výž* 1989; 43(3): 187-189.
31. Bureš J, Horák V, Tichý M, Pidrman V, Jandík P, Fixa B, Komárková O. Kolicinogenie u nespecifických střevních zánětů a kolorektální rakoviny. *Suppl Sbor věd Prací LF UK Hradec Králové* 1991; 34(4): 353-403.
32. 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.
33. Burkitt DP. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1971; 28(1): 3-13.
34. Burkitt DP. Epidemiology of large bowel diseases: the role of fibre. *Proc Nutr Soc* 1973; 32(3): 145-149.

35. Caderni G, Luceri C, De Filippo C, Salvadori M, Giannini A, Tessitore L, Dolara P. Slow-release pellets of sodium butyrate do not modify azoxymethane (AOM)-induced intestinal carcinogenesis in F344 rats. *Carcinogenesis* 2001; 22(3): 525–527.
36. Caderni G, Luceri C, Lancioni L, Tessitore L, Dolara P. Slow-release pellets of sodium butyrate increase apoptosis in the colon of rats treated with azoxymethane, without affecting aberrant crypt foci and colonic proliferation. *Nutr Cancer* 1998; 30(3): 175–181.
37. Camp JG, Kanther M, Semova I, Rawls JF. Patterns and scales in gastrointestinal microbial ecology. *Gastroenterology* 2009; 136(6): 1989-2002.
38. Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Lloubes R, Postle K, Riley M, Slatin S, Cavard D. Colicin Biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007; 71(1): 158-229.
39. Cavard D, Lazdunski C. Colicin cleavage by OmpT protease during both entry into and release from *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* 1990; 172(2): 648–652.
40. Cohavy O, Bruckner D, Gordon LK, Misra R, Wei B, Eggena ME, Targan SR, Braun J. Colonic bacteria express an ulcerative colitis pANCA-related protein epitope. *Infect Immun* 2000; 68(3): 1542-1548.
41. Compare D, Nardone G. Contribution of gut microbiota to colonic and extracolonic cancer development. *Dig Dis* 2011; 29(6): 554-561.
42. Conlan S, Bayley H. Folding of a monomeric porin, OmpG, in detergent solution. *Biochemistry* 2003; 42(31): 9453-9465.
43. Cook SI, Sellin JH. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12(6): 499–507.
44. Cooper PC, James R. Two new colicins, E8 and E9, produced by a strain of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 1984; 130(1): 209–215.

45. Cornut G, Fortin C, Soulières D. Antineoplastic properties of bacteriocins: revisiting potential active agents. *Am J Clin Oncol* 2008; 31(4): 399-404.
46. Corthesy B, Gaskins HR, Mercenier A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J Nutr* 2007; 137(3 Suppl 2): S781–790.
47. Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède JP. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(25): 11537-11542.
48. Cummings JH, Hill MJ, Bone ES, Branch WJ, Jenkins DJ. The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism. II. Bacterial metabolites in feces and urine. *Am J Clin Nutr* 1979; 32(10): 2094–2101.
49. Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 1991; 70(6): 443–459.
50. Cursino L, Smarda J, Chartone-Souza E, Nascimento AMA. Recent updated aspects of colicins of *Enterobacteriaceae*. *Brazil Journ Microbiol* 2002; 33: 185-195.
51. Dankert JR, Uratani Y, Grabau C, Cramer WA, Hermodson M. On a domain structure of colicin E1. A COOH-terminal peptide fragment active in membrane depolarization. *J Biol Chem* 1982; 257(7): 3857–3863.
52. Dartigalongue C, Nikaido H, Raina S. Protein folding in the periplasm in the absence of primary oxidant DsbA: modulation of redox potential in periplasmic space via OmpL porin. *EMBO J* 2000; 19(22): 5980-5988.
53. Davies JK, Reeves P. Genetics of resistance to colicins in *Escherichia coli* K12: cross-resistance among colicins of group B. *J Bacteriol* 1975; 123(1): 96–101.
54. Davis MK, Andres JM, Jolley CD, Novak DA, Haafiz AB, Gonzalez-Peralta RP. Antibodies to *Escherichia coli* outer membrane porin C in the absence of anti-

Saccharomyces cerevisiae antibodies and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies are an unreliable marker of Crohn disease and ulcerative colitis. *J Ped Gastroenterol Nutr* 2007; 45(4): 409-413.

55. Davis CD, Milner JA. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *J Nutr Biochem* 2009; 20(10): 743-752.

56. Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; 69(2): 193–202.

57. Deschner EE, Ruperto JF, Lupton JR, Newmark HL. Dietary butyrate (tributylin) does not enhance AOM-induced colon tumorigenesis. *Cancer Lett* 1990; 52(1): 79–82.

58. Destoumieux-Garzon D, Peduzzi J, Rebuffat S. Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie* 2002; 84(5-6): 511–519.

59. Dickinson RJ, Varian SA, Axon AT, Cooke EM. Increased incidence of faecal coliforms with in vitro adhesive and invasive properties in patients with ulcerative colitis. *Gut* 1980; 21(9): 787-792.

60. Di Masi DR, White JC, Schnaitman CA, Bradbeer C. Transport of vitamin B12 in *Escherichia coli*: common receptor sites for vitamin B12 and the E colicins on the outer membrane of the cell envelope. *J Bacteriol* 1973; 115(2): 506–513.

61. Dove WF, Clipson L, Gould KA, Luongo C, Marshall DJ, Moser AR, Newton MA, Jacoby RF. Intestinal neoplasia in the ApcMin mouse: independence from the microbial and natural killer (beige locus) status. *Cancer Res* 1997; 57(5): 812-814.

62. Drasar BS, Goddard P, Heaton S, Peach S, West B. Clostridia isolated from faeces. *J Med Microbiol* 1976; 9(1): 63-71.

63. Dubinsky MC, Lin YC, Dutridge D, Picornell Y, Landers CJ, Fariior S, Wrobel I, Quiros A, Vasiliauskas EA, Grill B, Israel D, Bahar R, Christie D, Wahbeh G, Silber

- G, Dallazadeh S, Shah P, Thomas D, Kelts D, Hershberg RM, Elson CO, Targan SR, Taylor KD, Rotter JI, Yang H; Western Regional Pediatric IBD Research Alliance. Serum immune responses predict rapid disease progression among children with Crohn's disease: immune responses predict disease progression. *Am J Gastroenterol* 2006; 101(2): 360-367.
64. Dudeja PK, Torania SA, Said HM. Evidence for the existence of a carrier-mediated folate uptake mechanism in human colonic luminal membranes. *Am J Physiol* 1997; 272(6 Pt 1): G1408–1415.
65. Duchmann R, May E, Heike M, Knolle P, Neurath M, Meyer zum Buschenfelde KH. T cell specificity and cross reactivity towards *Enterobacteria*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, and antigens from resident intestinal flora in humus. *Gut* 1999; 44(6): 812-818.
66. Duncan SH, Holtrop G, Lopley GE, Calder AG, Stewart CS, Flint HJ. Contribution of acetate to butyrate formation by human faecal bacteria. *Br J Nutr* 2004; 91(6): 915-923.
67. DuPont HL. Clinical practice. Bacterial diarrhea. *N Engl J Med* 2009; 361(16): 1560–1569.
68. Duquesne S, Destoumieux-Garz'on D, Peduzzi J, Rebuffat S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep* 2007; 24: 708–734.
69. Duquesne S, Petit V, Peduzzi J, Rebuffat S. Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from *enterobacteria*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2007; 13(4): 200-209.
70. Eberhart LJ, Deringer JR, Brayton KA, Sawant AA, Besser TE, Call DR. Characterization of a novel microcin that kills enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and O26. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(18): 6592-6599.

71. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(12): 2393–2404.
72. El Ghachi M, Bouhss A, Barreteau H, Touze T, Auger G, Blanot D, Mengin-Lecreulx D. Colicin M exerts its bacteriolytic effect via enzymatic degradation of undecaprenyl phosphate-linked peptidoglycan precursors. *J Biol Chem* 2006; 281(32): 22761-22772.
73. Eraso JM, Weinstock GM. Anaerobic control of colicin E1 production. *J Bacteriol* 1992; 174(15): 5101–5109.
74. FAO/WHO: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria (October 2001). "Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria". Available from: www.who.int/entity/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf
75. Farkas-Himsley H. Sensitivity to bacteriocins of murine leukaemias with varying oncogenic potency. *Microbios Letters* 1980; 15: 89-96.
76. Farkas Himsley H, Hill R, Rosen B, Arab S, Lingwood CA. The bacterial colicin active against tumor cells in vitro and in vivo is verotoxin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(15): 6996-7000.
77. Farkas-Himsley H, Cheung R. Bacterial proteinaceous products (bacteriocins) as cytotoxic agents of neoplasia. *Cancer Res* 1976; 36(10): 3561–3567.
78. Farkas-Himsley H, Cheung R, Tompkins WAF. Selective antitumor agents: bacteriocins from gram-negative bacteria. *IRCS Med Sci* 1975; 3: 149-151.
79. Farkas-Himsley H, Musclow CE. Bacteriocins, effect on mammalian cells: mode of action analyzed by flow cytometry and cell sorting. *Cell Mol Biol* 1980; 26(6): 597-603.

80. Farkas-Himsley H, Musclow CE. Bacteriocin receptors on malignant mammalian cells: are they transferrin receptors? *Cell Mol Biol* 1986; 32(5): 607-617.
81. Farkas-Himsley H, Yu H. Purified colicin as cytotoxic agent of neoplasia: comparative study with crude colicin. *Cytobios* 1985; 42(167-168): 193-207.
82. Farkas-Himsley H, Zhang YS, Yuan M, Musclow CE. Partially purified bacteriocin kills malignant cells by apoptosis: programmed cell death. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1992; 38(5-6): 643-651.
83. Festi D, Schiumerini R, Birtolo C, Marzi L, Montrone L, Scaioli E, Di Biase AR, Colecchia A. Gut microbiota and its pathophysiology in disease paradigms. *Dig Dis* 2011; 29(6): 518-524.
84. Fitch MD, Fleming SE. Metabolism of short-chain fatty acids by rat colonic mucosa in vivo. *Am J Physiol* 1999; 277(1 Pt 1): G31-40.
85. Fleming LL, Floch MH. Digestion and absorption of fiber carbohydrate in the colon. *Am J Gastroenterol* 1986; 81(7): 507-511.
86. Fourel D, Mizushima S, Bernadac A, Pages JM. Specific regions of *Escherichia coli* OmpF protein involved in antigenic and colicin receptor sites and in stable trimerization. *J Bacteriol* 1993; 175(9): 2754-2757.
87. Fredericq P. Colicines and other bacteriocins. *Ergeb Mikrobiol Immunitätsforsch Exp Ther* 1963; 37: 114-161 [Article in French].
88. Freeman HJ. Effects of differing concentrations of sodium butyrate on 1,2-dimethylhydrazine-induced rat intestinal neoplasia. *Gastroenterology* 1986; 91(3): 596-602.

89. Friedenreich CM, Brant RF, Riboli E. Influence of methodologic factors in a pooled analysis of 13 case-control studies of colorectal cancer and dietary fiber. *Epidemiology* 1994; 5(1): 66-79.
90. Fuska J, Fusková A, Smarda J, Mach J. Effect of colicin E3 on leukemia cells P388 in vitro. *Experientia* 1979; 35(3): 406-407.
91. Gaudier E, Michel C, Segain JP, Cherbut C, Hoebler C. The VSL# 3 probiotic mixture modifies microflora but does not heal chronic dextran-sodium sulfate-induced colitis or reinforce the mucus barrier in mice. *J Nutr* 2005; 135(12): 2753-2761.
92. Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biol Ther* 2006; 5(10): 1265-1269.
93. Geli V, Lazdunski C. An-helical hydrophobic hairpin as a specific determinant in protein-protein interaction occurring in *Escherichia coli* colicin A and B immunity systems. *J Bacteriol* 1992; 174(20): 6432–6437.
94. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995; 125(6): 1401-1412.
95. Gill CI, Rowland IR. Diet and cancer: assessing the risk. *Br J Nutr* 2002; 88(1): S73-87.
96. Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine–low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(4): 265–273.
97. Goldin BR, Swenson L, Dwyer J, Sexton M, Gorbach SL. Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. *J Natl Cancer Inst* 1980; 64(2): 255-261.

98. Gordon DM. The potential of bacteriocin-producing probiotics and associated caveats. *Future Microbiol* 2009; 4(8): 941-943.
99. Gordon DM, O'Brien CL. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology* 2006; 152(Pt 11): 3239-3244.
100. Grozdanov L, Raasch C, Schulze J, Sonnenborn U, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain *Nissle 1917*. *J Bacteriol* 2004; 186(16): 5432-5441.
101. Guterman SK. Colicin B: mode of action and inhibition by enterochelin. *J Bacteriol* 1973; 114(3): 1217-1224.
102. Hall PJ, Brubaker RR. Pesticin-dependent generation of somotically stable spheroplast-like structures. *J Bacteriol* 1978; 136(2): 786-789.
103. Hammer HF. Gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2011; 29(6): 550-553.
104. Hardy KG. Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol Rev* 1975; 39(4): 464-515.
105. Harkness RE, Braun V. Colicin M inhibits peptidoglycan biosynthesis by interfering with lipid carrier recycling. *J Biol Chem* 1989; 264(11): 6177-6182.
106. Hasegawa Y, Yamada H, Mizushima S. Interactions of outer membrane proteins O-8 and O-9 with peptidoglycan sacculus of *Escherichia coli* K-12. *J Biochem* 1976; 80(6): 1401-1409.
107. Heavey PM, Rowland IR. Microbial-gut interactions in health and disease. *Gastrointestinal cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18(2): 323-336.

108. Hedl M, Li J, Cho JH, Abraham C. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(49): 19440-19445.
109. Hechard Y, Sahl HG. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 2002; 84(5-6): 545-557.
110. Herschman HR, Helinski DR. Comparative study of the events associated with colicin induction. *J Bacteriol* 1967; 94(3): 691-699.
111. Hetz C, Bono MR, Barros LF, Lagos R. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(5): 2696-2701.
112. Heyde M, Portalier R. Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K12 by pH. *Mol Gen Genet* 1987; 208(3): 511-517.
113. Hill MJ, Drasar BS, Hawksworth G, Atries V, Crowther JS, Williams RE. Bacteria and aetiology of cancer of the large bowel. *Lancet* 1971; 1(7690): 95-100.
114. Hill C, Holland IB. Genetic basis of colicin E susceptibility in *Escherichia coli*. I. Isolation and properties of refractory mutants and the preliminary mapping of their mutations. *J Bacteriol* 1967; 94(3): 677-686.
115. Hirayama K, Rafter J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect* 2000; 2(6): 681-686.
116. Horák V. Typing of *Shigella sonnei* colicins by means of specific indicators. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* 1975; 233(1): 58-63.
117. Horák V. Colicin typing of *Shigella sonnei* by means of specific indicator strains. An enlarged scheme. *Zentralbl Bakteriolog A* 1980; 246(2): 191-196.

118. Horák V. Fifty-four *Shigella sonnei* colicin types and their typing by specific indicator strains. *Folia Microbiol* 1985; 30(1): 76-79.
119. Horák V, Sobotková J. Sensitivity of colicin Js, one of important characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to enteroinvasive serovars. *Zentralbl Bakteriell Microbiol Hyg A* 1988; 269(2): 156-159.
120. Howell TH. Metchnikoff and prolongation of life. *Age Ageing* 1988; 17(6): 420-421.
121. Hughes R, Cross AJ, Pollock JR, Bingham S. Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation. *Carcinogenesis* 2001; 22(1): 199-202.
122. Hughes R, Kurth MJ, McGilligan V, McGlynn H, Rowland I. Effect of colonic bacterial metabolites on Caco-2 cell paracellular permeability in vitro. *Nutr Cancer* 2008; 60(2): 259-266.
123. Huycke MM, Gaskins HR. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Exp Biol Med* 2004; 229(7): 586-597.
124. Huycke MM, Joyce W, Wack MF. Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis* 1996; 173(3): 743-746.
125. Chai TJ, Foulds J. *Escherichia coli* K12 tolF mutants: alterations in protein composition of the outer membrane. *J Bacteriol* 1977; 130(2): 781-786.
126. Chai TJ, Foulds J. Isolation and partial characterization of protein E, a major protein found in certain *Escherichia coli* K12 mutant strains: relationship to other outer membrane proteins. *J Bacteriol* 1979; 139(2): 418-423.
127. Chak KF, Kuo WS, Lu FM, James R. Cloning and characterization of the ColE7 plasmid. *J Gen Microbiol* 1991; 137(1): 91-100.

128. Chen WJ, Anderson JW, Jennings D. Propionate may mediate the hypocholesterolemic effects of certain soluble plant fibers in cholesterol-fed rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984; 175(2): 215-218.
129. Christl SU, Scheppach W, Kasper H. Wasserstoff-metabolismus im Dickdarm-Physiologie und klinische Bedeutung. *Z Gastroenterol* 1995; 33(7): 408-413.
130. Chumchalová J, Šmarda J. Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. *Folia Microbiol* 2003; 48(1): 111-115.
131. Ippoliti A, Devlin S, Mei L, Yang H, Papadakis KA, Vasilias EA, McGovern DP, Abreu MT, Melmed G, Shaye O, Enayati P, Chen G, Choi J, Taylor K, Landers CJ, Rotter JJ, Targan SR. Combination of innate and adaptive immune alterations increased the likelihood of fibrostenosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16(8): 1279-1285.
132. Jack RW, Jung G. Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity. *Curr Opin Chem Biol* 2000; 4(3): 310-317.
133. Jeziorowski A, Gordon DM. Evolution of microcin V and colicin Ia plasmids in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2007; 189(19): 7045-7052.
134. Jiang X, Payne MA, Cao Z, Foster SB, Feix JB, Newton SM, Klebba PE. Ligand-specific opening of a gated-porin channel in the outer membrane of living bacteria. *Science* 1997; 276(5316): 1261-1264.
135. Joossens S, Colombel JF, Landers C, Poulain D, Geboes K, Bossuyt X, Targan S, Rutgeerts P, Reinisch W. Anti-outer membrane of porin C and anti-I2 antibodies in indeterminate colitis. *Gut* 2006; 55(11): 1667-1669.
136. Joossens M, Van Steen K, Branche J, Sendid B, Rutgeerts P, Vasseur F, Poulain D, Broly F, Colombel JF, Vermeire S, Chamailard M. Familial aggregation and

- antimicrobial response dose-dependently affect the risk for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16(1): 58-67.
137. Kado S, Uchida K, Funabashi H, Iwata S, Nagata Y, Ando M, Onoue M, Matsuoka Y, Ohwaki M, Mortomi M. Intestinal microflora are necessary for development of spontaneous adenocarcinoma of the large intestine in T-cell receptor beta chain and p53 double-knockout mice. *Cancer Res* 2001; 61(6): 2395-2398.
138. Kageyama M, Ikeda K, Egami F. Studies of a pyocin. III. Biological properties of the pyocin. *J Biochem* 1964; 55(1): 59-64.
139. Kahmann L, Beyer U, Mehlhorn G, Thiel FC, Strnad V, Fasching PA, Lux MP. Mitomycin C in patients with gynecological malignancies. *Onkologie* 2010; 33(10): 547-557.
140. Kanazawa K, Konishi F, Mitsuoka T, Terada A, Itoh K, Narushima S, Kumemura M, Kimura H. Factors influencing the development of sigmoid colon cancer. Bacteriologic and biochemical studies. *Cancer* 1996; 77(8): S1701-1706.
141. Kang S, Denman SE, Morrison M, Yu Z, Dore J, Leclerc M, McSweeney CS. Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16(12): 2034-2042.
142. Kang HY, Kim N, Park YS, Hwang JH, Kim JW, Jeong SH, Lee DH, Jung HC, Song IS. Progression of atrophic gastritis and intestinal metaplasia drives *Helicobacter pylori* out of the gastric mucosa. *Dig Dis Sci* 2006; 51(12): 2310-2315.
143. Kennedy CK. Induction of colicin production by high temperature or inhibition of protein synthesis. *J Bacteriol* 1971; 108(1): 10-19.
144. Kim DH, Jin YH. Intestinal bacterial beta-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch Pharm Res* 2001, 24(6): 564-567.

145. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 2000; 37(2): 239-253.
146. 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.
147. Krone WJ, de Vries P, Koningstein G, de Jonge AJ, de Graaf FK, Oudega B. Uptake of cloacin DF13 by susceptible cells: removal of immunity protein and fragmentation of cloacin molecules. *J Bacteriol* 1986; 166(1): 260–268.
148. Kuhar I, Zgur-Bertok D. Transcription regulation of the colicin K cka gene reveals induction of colicin synthesis by differential responses to environmental signals. *J Bacteriol* 1999; 181(23): 7373–7380.
149. Lagos R, Tello M, Mercado G, García V, Monasterio O. Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Curr Pharm Biotechnol* 2009; 10(1): 74-85.
150. Lancaster LE, Wintermeyer W, Rodnina MV. Colicins and their potential in cancer treatment. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 38(1): 15–18.
151. Landers CJ, Cohavy O, Misra R, Yang H, Lin YC, Braun J, Targan SR. Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune response to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* 2002; 123(3): 689-699.
152. Lata J, Jurankova J, Kopacova M, Vitek P. Probiotics in hepatology. *World J Gastroenterol* 2011; 17(24): 2890-2896.
153. Laviña M, Gaggero C, Moreno F. Microcin H47, a chromosome-encoded microcin antibiotic of Escherichia coli. *J Bacteriol* 1990; 172(11): 6585-6588.

154. Lay JO Jr. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev* 2001; 20(4): 172-194.
155. Lee HC, Jenner AM, Low CS, Lee YK. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res Microbiol* 2006; 157(9): 876–884.
156. Lee JW, Shin JG, Kim EH, Kang HE, Yim IB, Kim JY, Joo HG, Woo HJ. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. *J Vet Sci* 2004; 5(1): 41–48.
157. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype–phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70(4): 845-857.
158. Little JW, Mount DW. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* 1982; 29(1): 11-22.
159. Liu YF, Yan JJ, Lei HY, Teng CH, Wang MC, Tseng CC, Wu JJ. Loss of outer membrane protein C in *Escherichia coli* contributes both to antibiotic resistance and escaping antibody-dependent bactericidal activity. *Infect Immun* 2012; 80(5): 1815-1822.
160. Lodinová R, Jouja V, Lanc A. Influence of the intestinal flora on the development of immune reactions in infants. *J Bacteriol* 1967; 93(3): 797-800.
161. Lodinová-Žádníková R, Prokešová L, Tlaskalová-Hogenová H, Kocourková I, Žižka J, Straňák Z. Vliv perorální kolonizace probiotickým kmenem *E. coli* v postnatálním období na frekvenci rekurentních infekcí, alergie a vývoj některých imunologických parametrů. Dlouhodobé studie. *Ceska Gynekol* 2004; 69 Suppl 1: 91-97 [Article in Czech].

162. Lodinová-Žádníková R, Sonnenborn U, Tláskalová H. Probiotics and *E. coli* infections in man. *Vet Q* 1998; 20 Suppl 3: 78-81.
163. Lodinová-Žádníková R, Tláskalová H, Bartáková Z. The antibody response in infants after colonization of the intestine with *E. coli* O83. Artificial colonization used as a prevention against nosocomial infections. *Adv Exp Med Biol* 1991; 310: 329-335.
164. Luk GD, Baylin SB. Ornithine decarboxylase as a biologic marker in familial colonic polyposis. *N Engl J Med* 1984; 311(2): 80-83.
165. Luk GD, Zhang SZ, Hamilton SR. Effects of timing of administration and dose of difluoromethylornithine on rat colonic carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81(6): 421-427.
166. Lupton JR. Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. *J Nutr* 2004; 134(2): 459-482.
167. Lyra A, Forssten S, Rolny P, Wettergren Y, Lahtinen SJ, Salli K, Cedgård L, Odin E, Gustavsson B, Ouwehand AC. Comparison of bacterial quantities in left and right colon biopsies and faeces. *World J Gastroenterol* 2012; 18(32): 4404-4411.
168. Macfarlane GT, Gibson GR, Cummings JH. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol* 1992; 72(1): 57-64.
169. Magee EA, Richardson CJ, Hughes R, Cummings JH. Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine: an in vitro and a controlled feeding study in humans. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(6): 1488-1494.
170. Maggio-Price L, Treuting P, Bielefeldt-Ohmann H, Seamons A, Drivdahl R, Zeng W, Lai L, Huycke M, Phelps S, Brabb T, Iritani BM. Bacterial infection of *Smad3/Rag2* double-null mice with transforming growth factor-beta dysregulation

- as a model for studying inflammation-associated colon cancer. *Am J Pathol* 2009; 174(1): 317-329.
171. Mai V. Dietary modification of the intestinal microbiota. *Nutr Rev* 2004; 62(6): 235-242.
172. Mai V, Draganov PV. Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World J Gastroenterol* 2009; 15(1): 81-85.
173. Mai V, Morris JG Jr. Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. *J Nutr* 2004; 134(2): 459-464.
174. Majeed H, Gillor O, Kerr B, Riley MA. Competitive interactions in *Escherichia coli* populations: the role of bacteriocins. *ISME J* 2011; 5(1): 71-81.
175. Males BM, Stocker BA. *Escherichia coli* K319, formerly used to define colicin group E2, produces colicin E7, is immune to colicin E2, and carries a bacteriophage-restricting conjugative plasmid. *J Bacteriol* 1980; 144(2): 524-531.
176. Males BM, Stocker BA. Colicins E4, E5, E6 and A and properties of *btuB*⁺ colicinogenic transconjugants. *J Gen Microbiol* 1982; 128(1): 95-106.
177. Mankovich JA, Hsu CH, Konisky J. DNA and amino acid sequence analysis of structural and immunity genes of colicins Ia and Ib. *J Bacteriol* 1986; 168(1): 228-236.
178. Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Roelofs R, Boleij A, Tjalsma H. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS ONE* 2011; 6(5): e20447.
179. Martinez MC, Lazdunski C, Pattus F. Isolation, molecular and functional properties of the C-terminal domain of colicin A. *EMBO J* 1983; 2(9): 1501-1507.

180. Mathavan I, Beis K. The role of bacterial membrane proteins in the internalization of microcin MccJ25 and MccB17. *Biochem Soc Trans* 2012; 40(6): 1539-1543.
181. McIntosh GH, Royle PJ, Playne MJ. A probiotic strain of *L. acidophilus* reduces DMH-induced large intestinal tumors in male Sprague-Dawley rats. *Nutr Cancer* 1999; 35(2):153-159.
182. Michel-Briand Y, Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 2002; 84(5-6): 499-510.
183. Mittelman M, Farkas-Himsley H, Haran-Ghera N. Recognition of T-cell murine leukemia by bacteriocin (colicin); correlation with transplantation experiments. *Leuk Res* 1987; 11(3): 215-222.
184. Moore WE , Moore LH. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61(9): 3202-3207.
185. Morin N, Lanneluc I, Connil N, Cottenceau M, Pons AM, Sablé S. Mechanism of bactericidal activity of microcin L in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(3): 997-1007.
186. Mosbahi K, Lemaitre C, Keeble AH, Mobasheri H, Morel B, James R, Moore GR, Lea EJ, Kleantous C. The cytotoxic domain of colicin E9 is a channel-forming endonuclease. *Nat Struct Biol* 2002; 9(6): 476-484.
187. Mow WS, Vasiliauskas EA, Lin YC, Fleshner PR, Papadakis KA, Taylor KD, Landers CJ, Abreu-Martin MT, Rotter JI, Yang H, Targan SR. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 126(2): 414-424.
188. Mqoqi N, Kellet P, Sitas F, Jula M, editors. The incidence of histologically diagnosed cancer in South Africa, 1998–1999. Johannesburg: The National Cancer Registry, National Health Laboratory Service; 2004.

189. Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, Cresci A, Silvi S, Orpianesi C, Verdenelli MC, Clavel T, Koebnick C, Zunft HJ, Dore J, Blaut M. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72(2): 1027-1033.
190. Musclow CE, Farkas-Himsley H. Bacteriocin and flow cytometry in laboratory diagnosis of leukemic peripheral blood lymphocytes and bone marrow cells. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983; 19(2): 163-171.
191. Musclow CE, Farkas-Himsley H, Weitzman SS, Herridge M. Acute lymphoblastic leukemia of childhood monitored by bacteriocin and flowcytometry. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987; 23(4): 411-418.
192. Nagel de Zwaig NR, Luria SE. Genetics and physiology of colicin-tolerant mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1967; 94(4): 1112-1123.
193. Nagengast FM, Grubben MJ, Van Munster IP. Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer* 1995; 31(7-8): 1067-1070.
194. Nakae T. Outer membrane of *Salmonella*. Isolation of protein complex that produces transmembrane channels. *J Biol Chem* 1976; 251(7): 2176-2178.
195. Nakamura RM, Barry M. Serologic markers in inflammatory bowel disease (IBD). *MLO Med Lab Obs* 2001; 33(11): 8-15.
196. Nakamura RM, Matsutani M, Barry M. Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta* 2003; 335(1-2): 9-20.
197. Newman JV, Kosaka T, Sheppard BJ, Fox JG, Schauer DB. Bacterial infection promotes colon tumorigenesis in *Apc(Min/+)* mice. *J Infect Dis* 2001; 184(2): 227-230.

198. Nikaido H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem* 1994; 269(6): 3905-3908.
199. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67(4): 593-656.
200. Nikaido H, Rosenberg EY. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *J Bacteriol* 1983; 153(1): 241-252.
201. Nomura M. Mechanism of action of colicines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964; 52: 1514-1521.
202. Nomura M. Colicins and related bacteriocins. *Annu Rev Microbiol* 1967; 21: 257-284.
203. Nougayrede JP, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Buchrieser C, Hacker J, Dobrindt U, Oswald E. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 2006; 313(5788): 848-851.
204. Oberreuther-Moschner DL, Jahreis G, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Dietary intervention with the probiotics *Lactobacillus acidophilus* 145 and *Bifidobacterium longum* 913 modulates the potential of human faecal water to induce damage in HT29clone19A cells. *Br J Nutr* 2004; 91(6): 925-932.
205. O'Keefe SJ. Nutrition and colonic health: the critical role of the microbiota. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24(1): 51-58.
206. O'Keefe SJ, Chung D, Mahmoud N, Sepulveda AR, Manafe M, Arch J, Adada H, van der Merwe T. Why do African Americans get more colon cancer than Native Africans? *J Nutr* 2007; 137(1): S175-182.

207. O'Keefe SJ, Ou J, Aufreiter S, O'Connor D, Sharma S, Sepulveda J, Fukuwatari T, Shibata K, Mawhinney T. Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *J Nutr* 2009; 139(11): 2044-2048.
208. O'Mahony L, Feeney M, O'Halloran S, Murphy L, Kiely B, Fitzgibbon J, Lee G, O'Sullivan G, Shanahan F, Collins JK. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumor development in IL-10 knockout mice. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15(8): 1219-1225.
209. Papp M, Altorjay I, Dotan N, Palatka K, Foldi I, Tumpek J, Sipka S, Udvardy M, Dinya T, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Tulassay Z, Miheller P, Norman GL, Szamosi T, Papp J, Lakatos PL. 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.
210. Parker MW, Pattus F, Tucker AD, Tsernoglou D. Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature* 1989; 337(6202): 93-96.
211. Pařízek P, Beštová D, Horák V, Bureš J, Pozler O. Kolicinogenie u dětí s celiakální sprue. *Čs Gastroenterol* 1985; 39(4): 217-222.
212. Pařízek P, Kafková D, Bureš J, Horák V, Pařízková E. Kolicinogenie u dětí s IgA deficitem. *Čs Gastroenterol* 1988; 42(3): 168-171.
213. Patton BS, Dickson JS, Lonergan SM, Cutler SA, Stahl CH. Inhibitory activity of colicin E1 against *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 2007; 70(5): 1256-1262.
214. Patzer SI, Baquero MR, Bravo D, Moreno F, Hantke K. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. *Microbiology* 2003; 149(Pt 9): 2557-2570.

215. Phillips J, Muir JG, Birkett A, Lu ZX, Jones GP, O'Dea K, Young GP. Effect of resistant starch on fecal bulk and fermentation-dependent events in humans. *Am J Clin Nutr* 1995; 62(1): 121-130.
216. Pils H, Smajs D, Braun V. Characterization of colicin S4 and its receptor, OmpW, a minor protein of the *Escherichia coli* outer membrane. *J Bacteriol* 1999; 181(11): 3578-3581.
217. Pochart P, Dore J, Lemann F, Goderel I, Rambaud JC. Interrelations between populations of methanogenic archaea and sulfate-reducing bacteria in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 77(1-3): 225-228.
218. Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Zanoni S, Matteuzzi D, Rossi M. Folate production by *Bifidobacteria* as a potential probiotic property. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(1): 179–185.
219. Pons AM, Zorn N, Vignon D, Delalande F, Van Dorselaer A, Cottenceau G. Microcin E492 is an unmodified peptide related in structure to colicin V. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(1): 229-230.
220. Povey AC, Schiffman M, Taffe BG, Harris CC. Laboratory and epidemiologic studies of fecapentaenes. *Mutat Res* 1991; 259(3-4): 387–397.
221. Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M, Tomaro-Duchesneau C. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics* 2011; 5: 71-86.
222. Preidis GA, Versalovic J. Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. *Gastroenterology* 2009; 136(6): 2015-2031.
223. Prideaux L, De Cruz P, Ng SC, Kamm MA. Serological antibodies in inflammatory bowel disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18(7): 1340-1355.

224. Prilipov A, Phale PS, Koebnik R, Widmer C, Rosenbusch JP. Identification and characterization of two quiescent porin genes, nmpC and ompN, in *Escherichia coli* BE. *J Bacteriol* 1998; 180(13): 3388-3392.
225. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464(7285): 59-65.
226. Quispel A. Lourens G. M. Baas Becking (1895–1963). Inspirator for many (micro)biologists. *Int Microbiol* 1998; 1(1): 69-72.
227. Rafter J. Probiotics and colon cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17(5): 849-859.
228. Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson PC, Klinder A, O’Riordan M, O’Sullivan GC, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Roller M, Rowland I, Salvadori M, Thijs H, Van Loo J, Watzl B, Collins JK. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr* 2007; 85(2): 488-496.
229. Rebuffat S. Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochem Soc Trans* 2012; 40(6): 1456-1462.
230. Reddy BS. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *J Nutr* 1999; 129(7): S1478-1482.

231. Reddy BS, Mangat S, Weisburger JH, Wynder EL. Effect of high-risk diets for colon carcinogenesis on intestinal mucosal and bacterial beta-glucuronidase activity in F344 rats. *Cancer Res* 1977, 37(10): 3533-3536.
232. Reddy BS, Narisawa T, Maronpot R, Weisburger JH, Wynder EL. Animal models for the study of dietary factors and cancer of the large bowel. *Cancer Res* 1975; 35(11): 3421-3426.
233. Rejchrt, Drahošová M, Kopáčová M, Cyrany J, Douda T, Pintér M, Bureš J. Antilaminaribioside and antichitobioside antibodies in inflammatory bowel disease. *Folia Microbiol* 2008; 53(4): 373-376.
234. Ridlon JM, Hylemon PB. A potential role for resistant starch fermentation in modulating colonic bacterial metabolism and colon cancer risk. *Cancer Biol Ther* 2006; 5(3): 273-274.
235. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006; 47(2): 241-259.
236. Rigottier-Gois L, Rochet V, Garrec N, Suau A, Dore J. Enumeration of *Bacteroides* species in human faeces by fluorescent in situ hybridisation combined with flow cytometry using 16S rRNA probes. *Syst Appl Microbiol* 2003; 26(1): 110-118.
237. Riley MA. Molecular mechanisms of colicin evolution. *Mol Biol Evol* 1993; 10(6): 1380-1395.
238. Riley MA, Gordon DM. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol* 1999; 7(3): 129-133.
239. Riley MA, Wertz JE. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 2002; 84(5-6): 357-364.

240. Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 117-137.
241. Roller M, Pietro Femia A, Caderni G, Rechkemmer G, Watzl B. Intestinal immunity of rats with colon cancer is modulated by oligofructose-enriched inulin combined with *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*. *Br J Nutr.* 2004; 92(6): 931-938.
242. Rowland IR, Bearne CA, Fischer R, Pool-Zobel BL. The effect of lactulose on DNA damage induced by DMH in the colon of human flora-associated rats. *Nutr Cancer* 1996; 26(1): 37-47.
243. Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 1998; 19(2): 281-285.
244. Rump JA, Schölmerich J, Gross V, Roth M, Helfesrieder R, Rautmann A, Lüdemann J, Gross WL, Peter HH. A new type of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA) in active ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Immunobiology* 1990; 181(4-5): 406-413.
245. Ruppin H, Bar-Meir S, Soergel KH, Wood CM, Schmitt MG Jr. Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology* 1980; 78(6): 1500-1507.
246. Sabet SF, Schnaitman CA. Localization and solubilization of colicin receptors. *J Bacteriol* 1971; 108(1): 422-430.
247. Sabet SF, Schnaitman CA. Purification and properties of the colicin E3 receptor of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1973; 248(5): 1797-1806.
248. Said HM, Ortiz A, McCloud E, Dyer D, Moyer MP, Rubin S. Biotin uptake by human colonic epithelial NCM460 cells: a carrier-mediated process shared with pantothenic acid. *Am J Physiol* 1998; 275(5 Pt 1): C1365-1371.

249. Said HM, Ortiz A, Moyer MP, Yanagawa N. Riboflavin uptake by human-derived colonic epithelial NCM460 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278(2): C270-276.
250. Said HM, Ortiz A, Subramanian VS, Neufeld EJ, Moyer MP, Dudeja PK. Mechanism of thiamine uptake by human colonocytes: studies with cultured colonic epithelial cell line NCM460. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281(1): G144-150.
251. Said ZM, Subramanian VS, Vaziri ND, Said HM. Pyridoxine uptake by colonocytes: a specific and regulated carrier-mediated process. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294(5): C1192-1197.
252. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998; 80(1): S147-171.
253. Sartor RB. Probiotics for gastrointestinal diseases. UpToDate on line. Wellesley, vol. 21.1., 2013. Dostupné z <http://www.uptodate.com>.
254. Satia-Abouta J, Galanko JA, Martin CF, Ammerman A, Sandler RS. Food groups and colon cancer risk in African-Americans and Caucasians. *Int J Cancer* 2004; 109(5): 728-736.
255. Satia-Abouta J, Galanko JA, Martin CF, Potter JD, Ammerman A, Sandler RS. Associations of micronutrients with colon cancer risk in African Americans and whites: results from the North Carolina Colon Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12(8): 747-754.
256. Satia-Abouta J, Galanko JA, Potter JD, Ammerman A, Martin CF, Sandler RS. Associations of total energy and macronutrients with colon cancer risk in African

- Americans and Whites: results from the North Carolina colon cancer study. *Am J Epidemiol* 2003; 158(10): 951-962.
257. Scanlan PD, Shanahan F, Marchesi JR. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using *mcrA* gene analysis. *BMC Microbiology* 2008; 8: 79.
258. Sears CL, Islam S, Saha A, Arjumand M, Alam NH, Faruque AS, Salam MA, Shin J, Hecht D, Weintraub A, Sack RB, Qadri F. Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* infection with inflammatory diarrhea. *Clin Infect Dis* 2008; 47(6): 797-803.
259. Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Dore J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(5): 2263-2266.
260. Shen X, Rawls J, Randall T, Burcal L, Mpande CN, Jenkins N, Jovov B, Abdo Z, Sandler RS, Keku TO. Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. *Gut Microbes* 2010; 1(3): 138-147.
261. Shulman ST, Friedmann HC, Sims RH. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clin Infect Dis* 2007; 45(8): 1025-1029.
262. Schaller K, Nomura M. Colicin E2 is DNA endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73(11): 3989-3993.
263. Schoeffner DJ, Thorgeirsson UP. Susceptibility of nonhuman primates to carcinogens of human relevance. *In Vivo* 2000; 14(1): 149-156.
264. Schulz GE. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1565(2): 308-317.

265. Schut HA, Snyderwine EG. DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1999; 20(3): 353-368.
266. Schwartz SA, Helinski DR. Purification and characterization of colicin E1. *J Biol Chem* 1971; 246(20): 6318–6327.
267. Sicard N, Devoret R. Effects de la carence en thymine sur des souches d'Escherichia coli lysogènes K12⁻ et colicinogènes K15⁻. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1962; 255: 1417-1419.
268. Silverman JA, Benson SA. Bacteriophage K20 requires both the OmpF porin and lipopolysaccharide for receptor function. *J Bacteriol* 1987; 169(10): 4830-4833.
269. Singh J, Rivenson A, Tomita M, Shimamura S, Ishibashi N, Reddy BS. Bifidobacterium longum, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997; 18(4): 833-841.
270. Smajs, Bures J, Smarda, Chaloupkova E, Kvetina J, Forstl M, Kohoutova D, Kunes M, Rejchrt S, Lesna J, Kopacova 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.
271. Smajs D, Micenková L, Smarda J, Vrba M, Sevcikova A, Valisová Z, Woznicová V. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal Escherichia coli: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiol* 2010; 10: 288.
272. Smajs D, Weinstock GM. Genetic organization of plasmid ColJ_s, encoding colicin J_s activity, immunity, and release genes. *J Bacteriol* 2001; 183(13): 3949-3957.
273. Smarda J. The Effect of Colicins. Brno: J. E. Purkyně University Brno, Medical Faculty 1978; 197 s.

274. Smarda J, Fialova M, Smarda J Jr. Cytotoxic effects of colicins E1 and E3 on v-myb-transformed chicken monoblasts. *Folia Biol* 2001; 47(1): 11-13.
275. Smarda J, Keprtova J. Cytotoxic effects of colicins E1-E5 and K on hamster fibroblasts. *Folia Microbiol (Praha)* 1987; 32(2): 133-136.
276. Smarda J, Obdrzalek V. The lethal effect of colicin E3 on HeLa cells in tissue cultures. *IRCS Med Sci* 1977; 5: 524.
277. Smarda J, Obdrzalek V. Incidence of colicinogenic strains among human *Escherichia coli*. *J Basic Microbiol* 2001; 41(6): 367-374.
278. Smarda J, Obdrzalek V, Taborsky I, Mach J. The cytotoxic and cytotoxic effect of colicin E3 on mammalian tissue cells. *Folia Microbiol (Praha)* 1978; 23(4): 272-277.
279. Smarda J, Smajs D. Colicins – exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol* 1998; 43(6): 563-582.
280. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005; 115(1): 66–75.
281. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, Corthier G, Tran Van Nhieu J, Furet JP. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PLoS One* 2011; 6(1): e16393.
282. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottière HM, Dore J, Marteau P, Seksik P, Langella P. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium

- identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(43): 16731-16736.
283. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Cosnes J, Corthier G, Marteau P, Dore J. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15(8): 1183-1189.
284. Solnick JV, Schauer DB. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(1): 59–97.
285. Spanhaak S, Havenaar R, Schaafsma G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr* 1998; 52(12): 899-907.
286. Spivak J, Landers CJ, Vasiliauskas EA, Abreu MT, Dubinsky MC, Papadakis KA, Ippoliti A, Targan SR, Fleshner PR. Antibodies to I2 predict clinical response to fecal diversion in Crohn’s disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 1122-1130.
287. Spriggs DR. Bacteriocins and antagonism: the killing fields. *J Infect Dis* 1986; 153(4): 809-810.
288. Stanghellini V, Barbara G, Cremon C, Cogliandro R, Antonucci A, Gabusi V, Frisoni C, De Giorgio R, Grasso V, Serra M, Corinaldesi R. Gut microbiota and related diseases: clinical features. *Intern Emerg Med* 2010; 5(1): S57-63.
289. Stanley JS, Griffin JB, Zemleni J. Biotinylation of histones in human cells: effects of cell proliferation. *Eur J Biochem* 2001; 268(20): 5424-5429.
290. Strocchi A, Furne J, Ellis C, Levitt MD. Methanogens outcompete sulphate reducing bacteria for H₂ in the human colon. *Gut* 1994; 35(8): 1098-1101.

291. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Doré J. 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.
292. Sugimura T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* 2000; 21(3): 387-395.
293. Sun J, Shi YH, Le GW, Ma XY. Distinct immune response induced by peptidoglycan derived from *Lactobacillus* sp. *World J Gastroenterol* 2005; 11(40): 6330-6337.
294. Sutton CL, Kim J, Yamane A, Dalwadi H, Wei B, Landers C, Targan SR, Braun J. Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000; 119: 23-31.
295. Swidsinski A, Khilkin M, Kerjaschki D, Schreiber S, Ortner M, Weber J, Lochs H. Association between intraepithelial *Escherichia coli* and colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998; 115(2): 281-286.
296. Takada H, Hirooka T, Hiramatsu Y, Yamamoto M. Effect of betaglucuronidase inhibitor on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 1982; 42(1): 331-334.
297. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17(1): 1-14.
298. Tan SY, Dee MK. Elie Metchnikoff (1845-1916): discoverer of phagocytosis. *Singapore Med J* 2009; 50(5): 456-457.
299. Targan SR, Landers CJ, Yang H, Lodes MJ, Conq Y, Papadakis KA, Vasiliauskas E, Elson CO, Hershberg RM. Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response

- that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; 128(7): 2020-2028.
300. Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6): 2101-2114.
301. Thanassi DG, Hultgren SJ. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12(4): 420–430.
302. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 2001; 81(3): 1031–1064.
303. Toshima H, Hachio M, Ikemoto Y, Ogasawara J, Hase A, Takahashi K, Masaki H, Nishikawa Y. Prevalence of enteric bacteria that inhibit growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 in humans. *Epidemiol Infect* 2007; 135(1): 110-117.
304. Touzé T, Barreteau H, El Ghachi M, Bouhss A, Barnéoud-Arnoulet A, Patin D, Sacco E, Blanot D, Arthur M, Duché D, Lloubès R, Mengin-Lecreux D. Colicin M, a peptidoglycan lipid-II-degrading enzyme: potential use for antibacterial means? *Biochem Soc Trans* 2012; 40(6): 1522-1527.
305. Traurig M, Misra R. Identification of bacteriophage K20 binding regions of OmpF and lipopolysaccharide in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 181(1): 101-108.
306. Trautner BW, Hull RA, Darouiche RO. Colicins prevent colonization of urinary catheters. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(2): 413-415.
307. Tsugu H, Onishi H, Fukushima T, Lee S. Anti-tumor activity of de novo designed small globular protein (SGP) in vivo. *Anticancer Res* 2006; 26(6A): 4043-4046.

308. Van der Goot FG, Gonzalez-Manas JM, Lakey JM, Pattus F. A molten-globule membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature* 1991; 354(6352): 408–410.
309. Van Guelpen B, Hultdin J, Johansson I, Hallmans G, Stenling R, Riboli E, Winkvist A, Palmqvist R. Low folate levels may protect against colorectal cancer. *Gut* 2006; 55(10): 1461-1466.
310. Vankemmelbeke M, Healy B, Moore GR, Kleanthous C, Penfold CN, James R. Rapid detection of colicin E9-induced DNA damage using *Escherichia coli* cells carrying SOS promoter-lux fusions. *J Bacteriol* 2005; 187(14): 4900–4907.
311. Vasiliauskas EA, Plevy SE, Landers CJ, Binder SW, Ferguson DM, Yang H, Rotter JJ, Vidrich A, Targan SR. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup. *Gastroenterology* 1996; 110(6): 1810-1819.
312. Vassiliadis G, Destoumieux-Garzón D, Lombard C, Rebuffat S, Peduzzi J. Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(1): 288-297.
313. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9(4): 138–141.
314. Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, Parkes GC, Hudspith BN, Rayment N, Brostoff J, Parkhill J, Dougan G, Petrovska L. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol* 2011; 11: 7.
315. Wang X, Gibson GR. Effect of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl Bacteriol* 1993; 75(4): 373–380.

316. Wayne R, Frick K, Neilands JB. Siderophore protection against colicins M, B, V, and Ia in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1976; 126(1): 7–12.
317. Weaver C, Redborg AH, Konisky J. Plasmid-determined immunity of *Escherichia coli* K-12 to colicin Ia is mediated by a plasmid-encoded membrane protein. *J Bacteriol* 1981; 148(3): 817–828.
318. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40(3): 235-243.
319. Yang L, Pei Z. Bacteria, inflammation, and colon cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12(42): 6741-6746.
320. Yoshimura F, Nikaido H. Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27(1): 84-92.
321. Yu JE, De Ravin SS, Uzel G, Landers C, Targan S, Malech HL, Holland SM, Cao W, Harpaz N, Mayer L, Cunningham-Rundles C. High levels of Crohn's disease-associated anti-microbial antibodies are present and independent of colitis in chronic granulomatous disease. *Clin Immunol* 2011; 138(1): 14-22.
322. Zhang YL, Cramer WA. Intramembrane helix-helix interactions as the basis of inhibition of the colicin E1 ion channel by its immunity protein. *J Biol Chem* 1993; 268(14): 10176–10184.
323. Zhang J, Wu G, Chapkin RS, Lupton J R. Energy metabolism of rat colonocytes changes during the tumorigenic process and is dependent on diet and carcinogen. *J Nutr* 1998; 128(8): 1262–1269.
324. Zholudev A, Zurakowski D, Young W, Leichtner A, Bousvaros A. Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's

disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(11): 2235-2241.

325. Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr* 2004; 134(2): 465-472.
326. Žádníková R, Korych B, Bartáková Z, Havlíková L. Léčba gastrointestinálních infekcí u nedonošených dětí a novorozenců pomocí podání směsi selektovaných, inaktivovaných kmenů enteropatogenní *E. coli*. *Cesk Pediatr* 1983; 38(10): 577-584.
327. Žgur-Bertok D. Regulating colicin synthesis to cope with stress and lethality of colicin production. *Biochem Soc Trans* 2012; 40(6): 1507-1511.

9. Přílohy

Příloha 1: Informovaný souhlas pacienta se studií:

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové a Fakultní nemocnice Hradec Králové, II. interní gastroenterologická klinika; Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, tel: +420 495 834240, fax: +420 495 834785

Název studie: Stanovení anti-porinových protilátek a zastoupení bakterií v tlustém střevě

Koordinátor výzkumu: MUDr. Darina Kohoutová

Cíl studie: Stanovit anti-porinové protilátky z periferní krve (odběr 5 ml krevního séra) a zjistit zastoupení bakterií v tlustém střevě (kultivace vzorků odebraných při koloskopii)

Informovaný souhlas nemocného

Jméno a příjmení:

Rodné číslo:

Adresa:

1.

1. Souhlasím, aby osobní údaje o mé osobě (jméno a příjmení, rodné číslo, adresa, zdravotní pojišťovna) byly trvale zapracovány do dokumentace II. interní gastroenterologické kliniky, Fakultní nemocnice Hradec Králové, pro účely vědecké a výzkumné
2. Souhlasím s jednorázovým odběrem krve (množství 5 ml, bude provedeno při zavádění periferního žilního katetru)
3. Souhlasím s bezbolestným odběrem biotických vzorků z tlustého střeva v rámci rutinní koloskopie

2. Údaje uvedené v bodě 1 poskytuji dobrovolně a jsem si vědom toho, že svůj souhlas se zpracováním osobních údajů mohu kdykoliv odvolat.

Doplňek k informaci pro pacienta (pacientku)

Při zařazení do studie budou Vaše osobní data uchována s plnou ochranou důvěrnosti. Do Vaší dokumentace budou moci na základě Vámi uděleného souhlasu nahlédnout za účelem ověření získaných údajů zástupci nezávislých etických komisí a zahraničních nebo místních kompetentních úřadů. Pro tyto případy je zaručena ochrana důvěrnosti Vašich osobních dat. Při vlastním provádění studie mohou být osobní údaje poskytnuty jiným než výše uvedeným subjektům pouze bez identifikačních údajů, to je anonymní data pod číselným kódem. Rovněž pro výzkumné a vědecké účely mohou být Vaše osobní údaje poskytnuty pouze bez identifikačních údajů (anonymní data) nebo s Vaším výslovným souhlasem.

(s odvoláním na Metodický návod Ministerstva zdravotnictví ČR k zabezpečení a ochraně údajů v informačních systémech provozovaných ve zdravotnictví ČR k zabezpečení a ochraně údajů v informačních systémech provozovaných ve zdravotnických zařízeních uveřejněný ve Věstníku MZČR, částka 6/1994 s odvoláním na ustanovení paragrafu 55, odstavec 2, písmeno d) zákona 230/1996 Sbírky o péči o zdraví lidu v platném znění).

.....
Datum

.....
Podpis nemocného

.....
Podpis lékaře